文章编号:1000-5404(2008)13-1223-04

论著

精氨酸血管加压素抗失血性休克作用及其与 Rho kinase 的关系

方玉强[1],李 涛[2],刘良明[2] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]心血管内科,[2]第二研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

摘 要:**目的** 观察精氨酸血管加压素(arginine vasopressin, AVP)抗失血性休克作用与 Rho kinase 的关系。**方法** 采用大鼠失血性休克模型,整体动物观察 AVP 对失血性休克大鼠去甲肾上腺素(NE)的升压反应和对肠系膜上动脉收缩反应性的影响,同时观察 Rho kinase 在其中的作用;离体血管环观察 AVP 对失血性休克大鼠肠系膜上动脉反应性和钙敏感性的影响,并观察 Rho kinase 在其中的作用。**结果** 失血性休克后大鼠对 NE 的升压反应性和肠系膜动脉对 NE 的收缩反应性明显降低,AVP 0.4 U/kg 可明显增加休克大鼠 NE 升压反应和肠系膜动脉的收缩反应性,Rho kinase 特异性抑制剂 Y-27632 可明显拮抗由 AVP 引起的休克大鼠血管反应性的增加。在离体血管环研究表明,休克后血管反应性和钙敏感性明显降低,AVP 在浓度为 5 nmol/L 和 0.5 nmol/L 可明显增加休克后血管反应性和钙敏感性,Y-27632 可明显拮抗由 AVP 引起的血管反应性和钙敏感性的增加。**结论** AVP 可通过增加休克血管平滑肌细胞的钙敏感性和血管反应性发挥抗休克作用,通过激活 Rho kinase 发挥其抗休克作用。

关键词:失血性休克;精氨酸血管加压素;血管反应性;钙敏感性;Rho kinase
中图法分类号:R363;R605.971;R972.5 **文献标识码**:A

Antishock effect of arginine vasopressin and its relationship with Rho kinase

FANG Yu-qiang[1], LI Tao[2], LIU Liang-ming[2] ([1]Department of Cardiology, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 2, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship of antishock effect of arginine vasopressin (AVP) on hemorrhagic shock and its relationship with Rho kinase. **Methods** Hemorrhagic shock (40 mmHg for 2 h) Wistar rats were treated respectively by AVP (0.4 U/kg), Rho kinase specific inhibitor, Y-27632 (30 μg/kg), or these 2 reagents. The pressor effect of norepinephrine (NE) on these rats and the contractility of their isolated superior mesenteric artery (SMA) were observed. Isolated SMAs from hemorrhagic shock rats were adopted to observe the effects of AVP on vascular reactivity and calcium sensitivity and its relationship to Rho kinase with an isolated organ perfusion system. **Results** AVP at the concentration of 0.4 U/kg significantly improved the pressor effect of NE and the contractile response of SMA. While, Y-27632 (30 μg/kg) abolished these beneficial effects of AVP. The vascular reactivity and calcium sensitivity of SMA were significantly decreased following hemorrhagic shock. AVP at the concentration of 0.5 and 5 nmol/L significantly increased the decreased vascular reactivity and calcium sensitivity. These effects of AVP were abolished by Y-27632 (10 μmol/L). **Conclusion** Rho kinase may take part in the action of AVP on hemorrhagic shock via improving shock induced vascular hyporeactivity and calcium desensitization.

Key words: hemorrhagic shock; vascular reactivity; calcium sensitivity; Rho kinase; arginine vasopressin

研究表明精氨酸血管加压素(arginine vasopressin, AVP)对内毒素休克,血管扩张型休克以及失血性休克有较好的抗休克作用。前期研究表明,失血性休克血管反应性明显降低,具有 Rho kinase 激活作用的血管紧张素-Ⅱ具有明显增加血管反应性,Rho kinase 特异性抑制剂 Y-27632 在浓度 10^{-5} mol/L 可明显抑制血管紧张素-Ⅱ的作用[1]。同时研究表明 AVP 可增加失血性休克大鼠平均动脉血压,明显改善休克大鼠血流动力学指标,但 AVP 抗休克作用与 Rho kinase 关系如

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(2005CB522601);国家自然科学基金(30370563,30600228,30625037);全军医学科研"十一五"计划专项课题(06Z030)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2005CB522601), the National Natural Science Foundation of China (30370563, 30600228, 30625037) and the Tackling Program of "Eleventh Five-year Plan" of PLA (06Z030)
作者简介:方玉强,男,四川省资阳市人,博士,主治医师,主要从事心血管功能障碍方面的研究,发表论文 8 篇,电话:(023)68757800,E-mail:yuqfang@163.com.
通信作者:刘良明,E-mail:liuliangming2002@yahoo.com
收稿日期:2007-07-11;修回日期:2007-09-27

何，是否通过增加 Rho kinase 实现抗休克作用，尚不清楚。本实验用大鼠失血性休克模型，分别从整体动物和离体血管环水平研究了 AVP 抗休克作用与 Rho kinase 的关系。

1 材料与方法

1.1 整体动物血管反应性测定

Wistar 大鼠（10～12 周）40 只，雌雄各半，体质量（201.0±23.1）g，取出 8 只作为正常对照组，其余 32 只制作休克模型，分为休克2 h 组、休克 2 h + AVP 组、休克 2 h + Y-27632 组、休克 2 h + Y-27632 + AVP 组。实验前禁食、自由饮水，实验当日用戊巴比妥钠麻醉，右侧股动脉及股静脉（导管内径 0.58 mm，外径 0.965 mm）插管，股动脉插管经三通管连接水银血压计和玻璃注射器，供观察血压和放血，经插管注射肝素钠生理盐水（500 U/kg）抗凝，股静脉插管供给药。沿腹正中线纵向剖开长 3～4 cm 切口，暴露肠系膜上动脉，复制休克模型。在休克 2 h 时，开始输液，在输液后 30 min、1 h、2 h 以及 3 h 分别从股静脉给 NE（3 μg/kg），测量给 NE 前后的平均动脉血压及肠系膜上动脉管径变化。整体动物对 NE 的升压效应以给 NE 后与给 NE 前平均动脉血压差值表示，肠系膜上动脉管径对 NE 的收缩反应以给 NE 前与给 NE 后的肠系膜上动脉血管管径的差值占给 NE 前管径的百分比表示血管收缩率。

正常对照组仅插管，不放血，不输液。休克对照组在休克 2 h 点测定完毕后给予 2 倍失血量的复方氯化钠溶液输注；休克 2 h + AVP 组和休克 2 h + Y-27632 组在休克 2 h 点测定完毕后，分别在给予 2 倍失血量的复方氯化钠溶液中加入 AVP（0.4 U/kg）和 Y-27632（3 μg/100 g）输注；在休克 2 h + Y-27632 + AVP 组在休克 2 h 点测定完毕后，在给予 1 倍失血量的复方氯化钠溶液中加入 Y-27632（3 μg/100 g）输注，再在 1 倍失血量的复方氯化钠溶液中加入 AVP（0.4 U/kg）输注。AVP 输注速度为 0.04 $U \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$，约 20 min 全部液体输注完毕。

1.2 离体血管环反应性和钙敏感性测定

Wistar 大鼠（10～12 周）56 只，雌雄各半，体质量（212.2±23.1）g，取出 8 只作为正常对照组，其余 48 只制作休克模型。动物处理同前，复制休克模型，活杀大鼠，取肠系膜上动脉（superior mesenteric artery，SMA），清除周围结缔组织，制作成 2～3 mm 长的血管环 2 根，其中 1 根用于血管反应性测定，另 1 根用于钙敏感性测定。实验分为休克 2 h 组、休克 2 h + AVP（0.5 nmol/L）组、休克 2 h + AVP（5 nmol/L）组、休克 2 h + Y-27632 组、休克 2 h + Y-27632 + AVP（0.5 nmol/L）组和休克 2 h + Y-27632 + AVP（5 nmol/L）组。正常组大鼠直接活杀取 SMA，制作血管环。

1.2.1 血管反应性测定　将所取 SMA 血管环挂于注有 K-H 液的离体器官灌流槽的浴槽中，持续充入 95% O_2 和 5% CO_2 混合气体，给预初张力 0.5 g，37 ℃恒温孵育 2 h，每 20 min 换液 1 次，待张力曲线平稳后，测定血管环对 NE 的反应性。休克2 h + Y-27632 组、休克 2 h + AVP（0.5 nmol/L）组和休克 2 h + AVP（5 nmol/L）处理组分别用 Y-27632（10^{-5} mol/L）、AVP（0.5 nmol/L）和 AVP（5 nmol/L）预孵育休克 2 h SMA 10 min；休克 2 h + Y-27632 + AVP（0.5 nmol/L）组和休克 2 h + Y-27632 + AVP（5 nmol/L）先用 Y-27632（10^{-5} mol/L）预孵休克 2 h SMA 10 min，再分别用 AVP（0.5 nmol/L）和 AVP（5 nmol/L）预孵育 10 min；分别观察血管环对 NE 的收缩反应。

1.2.2 血管钙敏感性测定　取 SMA 血管环挂于注有 K-H 液中孵育 2 h，方法同前，待张力曲线平稳后，换用高钾液孵育 10～20 min，待张力曲线平稳后，测定血管环对 Ca^{2+} 的反应性。各组血管环孵育方法同前。观察血管环对 Ca^{2+} 的收缩反应，血管环张力通过张力传感器连接至八道生理记录仪记录。

血管环对 NE 的反应性和钙敏感性均用浓度累计法测定，记录不同 NE 和 Ca^{2+} 浓度下各血管环产生的最大收缩力，以收缩力/血管环质量（g/mg）为量化标准，作量-效曲线，曲线拟合法求 NE 和 Ca^{2+} 的 EC_{50}（半数有效浓度），用 NE 和 Ca^{2+} 的 pD_2 $\{-\log[EC_{50}]\}$ 和最大收缩力（E_{max}）以及量-效曲线评价血管反应性和钙敏感性。

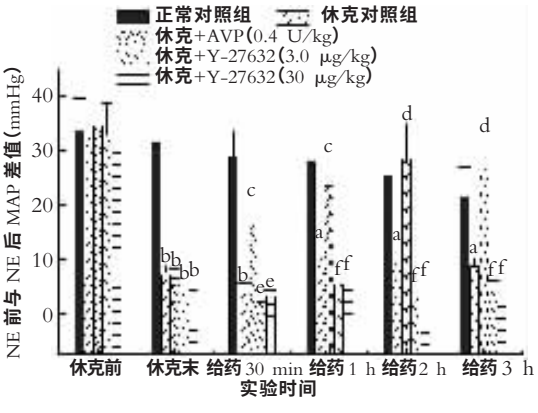
1.3 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用 SPSS 13.0 统计学分析软件进行方差分析。

2 结果

2.1 AVP 对失血性休克大鼠平均动脉血压的作用及其与 Rho kinase 的关系

与正常组相比，休克对照组大鼠 NE 的升压效应在休克各时相点明显低于正常对照组（$P<0.05$，$P<0.01$），在休克末，开始给药后 30 min、1 h、2 h 以及 3 h 点 NE 的升压效应均低于正常对照组（$P<0.05$，$P<0.01$）。AVP（0.4 U/kg），可使休克大鼠血管反应性升高，表现为 NE 的升压效应在开始给药后 30 min、1 h、2 h 以及 3 h 明显高于休克对照组（$P<0.05$，$P<0.01$），但 Rho kinase 特异性抑制剂 Y-27632（3 μg/100 g）预处理后可拮抗由 AVP 引起 NE 升压效应的升高（图 1）。

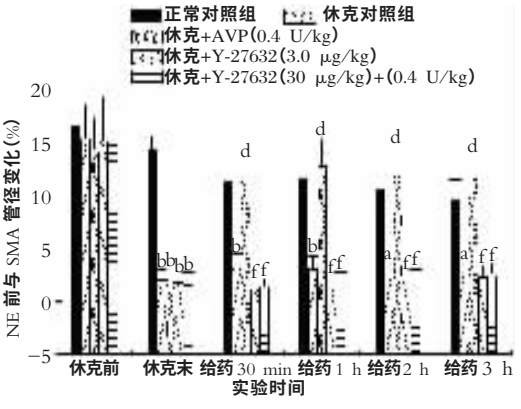


a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与正常对照组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与休克对照组比较；e：$P<0.05$，f：$P<0.01$，与休克 + AVP（0.4 U/kg）组比较

图 1　AVP 对失血性休克大鼠 NE 升压效应的影响及 Rho kinase 的作用（$n=8$，$\bar{x} \pm s$）

2.2　AVP 对失血性休克大鼠肠系膜上动脉收缩反应性的作用及其与 Rho kinase 的关系

与正常对照相比，休克对照组在休克后各相点的肠系膜上动脉对 NE 诱导的收缩反应（管径变化）明显降低（$P<0.05$，$P<0.01$），在休克末，开始给药后 30 min、1 h、2 h 以及 3 h 对 NE 的反应均低于正常对照组（$P<0.05$，$P<0.01$），AVP（0.4 U/kg）预处理后，肠系膜上动脉对 NE 的收缩反应性升高，在开始给药后 30 min、1、2、3 h 明显高于休克对照组（$P<0.01$）。Rho kinase 抑制剂 Y-27632（3 μg/100 g）可拮抗 AVP（0.4 U/kg）引起的肠系膜上动脉对 NE 的收缩反应的升高（图 2）。



a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与正常对照组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与休克对照组比较；e：$P<0.05$，f：$P<0.01$，与休克 + AVP（0.4 U/kg）组比较

图 2　AVP 对失血性休克大鼠 NE 诱导的肠系膜上动脉收缩反应的影响及 Rho kinase 作用（$n=8$，$\bar{x}\pm s$）

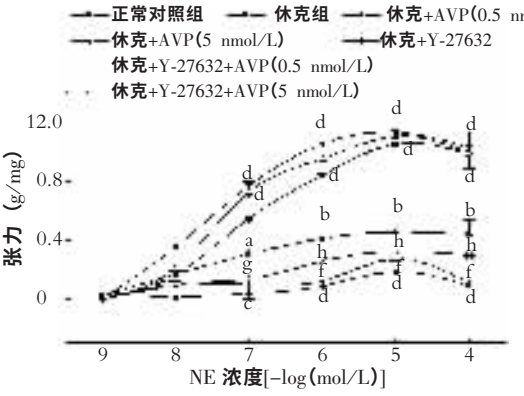
2.3　AVP 对失血性休克大鼠血管反应性和钙敏感性的作用及其与 Rho kinase 的关系

休克后大鼠 SMA 对 NE 和 Ca^{2+} 收缩反应性明显降低，AVP（终浓度 0.5 nmol/L 和 5 nmol/L）均可使休克 2 h 大鼠 SMA 对 NE 和 Ca^{2+} 的量效曲线明显左移，与休克 2 h 组相比，E_{max} 显著增高（$P<0.01$）。Rho kinase 特异性拮抗剂 Y-27632（终浓度 10^{-5} mol/L）可拮抗 AVP 在浓度 0.5 nmol/L 和 5 nmol/L 的作用，使其量效曲线明显右移，E_{max} 显著降低（$P<0.01$，$P<0.05$）（图 3、4，表 1）。

表 1　AVP 对失血性休克大鼠血管反应性和钙敏感性的影响及其与 Rho kinase 的关系（$n=8$，$\bar{x}\pm s$）

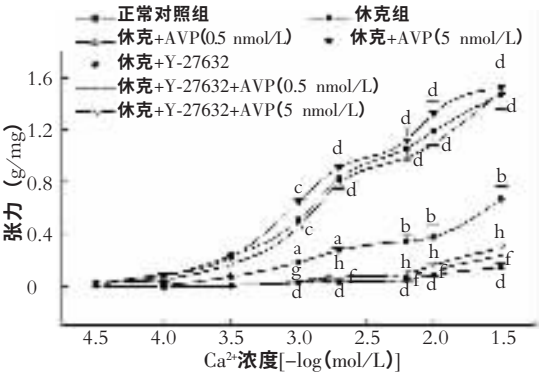
组别	NE		Ca^{2+}	
	E_{max}	pD_2	E_{max}	pD_2
正常对照组	1.052 ± 0.112	7.136 ± 0.044	1.477 ± 0.031	2.797 ± 0.027
休克组	0.453 ± 0.045^{b}	7.381 ± 0.035	0.669 ± 0.022^{b}	2.557 ± 0.034^{a}
休克 + AVP(0.5 nmol/L)	1.105 ± 0.176^{d}	6.978 ± 0.154^{d}	1.497 ± 0.232^{d}	2.767 ± 0.012^{c}
休克 + AVP(5 nmol/L)	1.131 ± 0.165^{d}	6.869 ± 0.189^{d}	1.523 ± 0.342^{d}	2.672 ± 0.056^{c}
休克 + Y-27632	0.183 ± 0.039^{e}	6. 523 ± 0.124	0.145 ± 0.028^{e}	2.825 ± 0.232
休克 + Y-27632 + AVP(0.5 nmol/L)	0.273 ± 0.073^{f}	6.287 ± 0.201^{e}	0.234 ± 0.042^{f}	2.876 ± 0.223
休克 + Y-27632 + AVP(5 nmol/L)	0.323 ± 0.036^{h}	6.356 ± 0.154^{g}	0.292 ± 0.035^{h}	2.791 ± 0.214

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与正常对照组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与休克组比较；e：$P<0.05$，f：$P<0.01$，与休克 + AVP（0.5 nmol/L）组比较；g：$P<0.05$，h $P<0.01$，与休克 + AVP（5 nmol/L）组比较



a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与正常对照组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与休克组比较；e：$P<0.05$，f：$P<0.01$，与休克 + AVP（0.5 nmol/L）组比较；g：$P<0.05$，h：$P<0.01$，与休克 + AVP（5 nmol/L）组比较

图 3　AVP 对休克大鼠血管反应性的作用及与 Rho kinase 的关系（$n=8$，$\bar{x}\pm s$）



a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与正常对照组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与休克组比较；e：$P<0.05$，f：$P<0.01$，与休克 + AVP（0.5 nmol/L）组比较；g：$P<0.05$，h：$P<0.01$，与休克 + AVP（5 nmol/L）组比较

图 4　AVP 对休克大鼠血管钙敏感性的作用及与 Rho kinase 的关系（$n=8$，$\bar{x}\pm s$）

3　讨论

严重创伤、休克后存在血管反应性降低，这种血管低反应是导致严重创伤、休克晚期难以治疗的重要原因之一[2]。本实验室前期研究表明 Rho kinase 在休克血管低反应的发生中具有重要作用，它可通过调节休克血管平滑肌细胞钙敏感性调节休克后血管反应性[3]，同时大量研究以及本实验前期研究结果提示，AVP 对失血性休克、脓毒症休克以及血管扩张型休克等均具有明显抗休克作用[4]。以前的研究认为 AVP 抗休克作用与其通过 V1 受体[5]，引起胞外钙内流有关，但 AVP 抗休克作用是否与 Rho kinase 有关，是否通过增加休克后血管平滑细胞钙敏感性，进而增加休克血管反应性，发挥其抗休克作用研究较少。研究表明血管紧张素Ⅱ孵育可增加休克血管反应性，同时研究结果显示血管紧张素Ⅱ通过增加 Rho kinase 的活性来实现血管反应性的增加，由于推测 AVP 可能通过增

加 Rho kinase 活性来恢复休克血管反应性[6]。

本研究表明小剂量 AVP 对整体动脉血管反应性有明显的增加作用，且 AVP 增加整体动物血管反应性的作用可被 Rho kinase 特异性的拮抗剂 Y-27632 所抑制，说明 AVP 可通过 Rho kinase 引起休克血管反应性的增加。同时，在离体血管环上进一步研究结果提示，休克后血管平滑肌细胞血管反应性和钙敏感性均降低，小剂量 AVP(0.5 nmol/L 和 5 nmol/L)均可增加休克血管平滑肌细胞的血管反应性和钙敏感性，且 Rho kinase 特异性抑制剂 Y-27632 可明显抑制由 AVP 引起血管反应性和钙敏感性的增加。由此说明 AVP 可增加休克血管反应性和钙敏感性，AVP 抗失血性休克的作用可能是通过 Rho kinase 增加了血管平滑肌细胞钙敏感性，进而增加血管反应性而实现。

参考文献：

[1] 李 涛，刘良明，杨光明，等. Rho-激酶在失血性休克大鼠血管低反应发生中的作用[J]. 创伤外科杂志，2005，8(2)：116－119.
[2] Xu J，Liu L. The role of calcium desensitization in vascular hyporeactivity and its regulation after hemorrhagic shock in the rat[J]. Shock，2005，23(6)：576－581.
[3] Li T，Liu L，Xu J，*et al*. Changes of Rho kinase activity after hemorrhagic shock and its role in shock-induced biphasic response of vascular reactivity and calcium sensitivity[J]. Shock，2006，26(5)：504－509.
[4] Dunser M W，Mayr A J，Ulmer H，*et al*. Arginine vasopressin in advanced vasodilatory shock：a prospective，randomized，controlled study[J]. Circulation，2003，107(18)：2313－2319.
[5] Voelckel W G，Lurie K G，Lindner K H，*et al*. Vasopressin improves survival after cardiac arrest in hypovolemic shock[J]. Anesth Analg，2000，91(3)：627－634.
[6] 李 涛，刘良明，杨光明，等. 失血性休克大鼠血管平滑肌钙敏感性变化及其在休克双相血管反应性变化中的作用[J]. 中国危重病急救医学，2005，17(11)：647－650.

(编辑 王 红)

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2008)13-1226-01

雷帕霉素对大鼠缺血再灌注肾超微结构和凋亡蛋白表达的影响

郑传东[1]，苟 欣[1]，杨华安[1]，刘 莉[2]，蒲晓峰[1]，何卫阳[1]
(重庆医科大学：[1]附属第一医院泌尿外科，[2]基础医学院病理学教研室，重庆 400016)

雷帕霉素(rapamycin，RPM)是一种强有力的免疫抑制剂，其免疫作用较环孢素 A 强 100 倍左右，并已广泛应用于肾移植中[1]。本实验通过复制大鼠肾缺血再灌注(IR)模型，研究 RPM 对大鼠缺血再灌注肾 Fas、bcl-2 蛋白表达的影响及对再灌注 24 h 的肾组织超微结构的影响，探讨 RPM 对肾缺血再灌注的保护作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型

54 只 Wistar 雄性大鼠，体质量 200～250 g，购自重庆医科大学实验动物中心。采用随机数字表法分成假手术(sham)组、手术(IR)组、药物(RPM＋IR)组。IR 组、RPM ＋IR 组又按缺血再灌注时间分为再灌注后 0、24、48、72 h，4 个观察时相，每个观察时相 6 只。参照文献[2]建立模型：假手术组：手术组(术前灌胃给等量生理盐水，做对照)；药物组(术前灌胃给药 RPM 4 mg·kg^{-1}·d^{-1}×3 d，术前 2 h 灌胃，术后给药至各个时相点)。

1.2 方法

取左肾组织，制成石蜡切片，对各个组进行 HE 染色，并用光镜观察各组肾病理学变化。取再灌注 24 h 的大鼠左肾组织，送重庆医科大学电镜室行透射电镜(TEM，日立 H-7500)观察。取上述石蜡切片，免疫组化检测 Fas、bcl-2 的表达，计数阳性细胞数及细胞总数，每张切片随机采集 10 个无重叠高倍视野(×400)，阳性表达率(%)＝阳性细胞数/视野所有细胞总数×100%。

1.3 统计学分析

数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 13.00 统计软件对多组间均数比较进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 肾组织 HE 染色结果

假手术组基本正常。手术组 24 h 时肾小管上皮细胞坏死脱落明显，肾小管中可见大量脱落细胞残留物质；48 h 时肾小管开始修复；72 h 时大部分已修复完成。药物组各个时相病变较手术组明显减轻。

2.2 再灌注 24 h 的肾组织超微结构观察结果

假手术组基本正常。手术组近曲小管腔被大量坏死脱落的线粒体等细胞碎片堵塞。药物组近曲小管腔内有少许细胞脱落物质，上皮细胞整体正常。

(下转 1230 页)

基金项目：重庆市卫生局科研基金(05-2-186)
Supported by the Scientific Research Project of Chongqing Bureau of Public Health (05-2-186)
作者简介：郑传东，男，四川省简阳市人，硕士研究生，医师，主要从事肾移植的基础及临床方面的研究。现在成都市第五人民医院泌尿外科。电话：13224038407
通信作者：苟 欣，电话：13101365921
收稿日期：2007-06-20；修回日期：2007-09-25