论著

文章编号:1000-5404(2008)21-1976-04

调控 RhoA/Rac 平衡对失血性休克大鼠血管双相反应性的影响

李 涛,徐 竞,杨光明,范小青,廖自福,陈 凤,刘良明 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所第二研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

摘 要:目的 观察调控 RhoA/Rac 平衡在休克后血管反应性双相变化中的作用。**方法** 采用失血性休克模型,分别取 RhoA、Rac 激动剂或抑制剂,观察其对休克早期或休克晚期大鼠平均动脉血压(mean arterial pressure, MAP)、肠系膜上动脉血管管径对去甲肾上腺素(norepinephrine,NE)收缩反应性的影响。**结果** 失血性休克后整体动物肠系膜上动脉对 NE 的收缩反应和 NE 的升压反应呈双相变化,休克早期升高,休克晚期降低。Rac 激动剂血小板衍生生长因子(platete-derived growth factor, PDGF)和 RhoA 特异性抑制剂 C3 转移酶可降低休克早期肠系膜动脉对 NE 收缩反应性和 NE 升压反应性;RhoA 激动剂 U-46619 和 Rac 特异性抑制剂 NSC23766 可改善休克晚期肠系膜上动脉对 NE 的收缩反应和 NE 的升压效果,也进一步升高休克早期收缩反应性; RhoA 激动剂 U-46619 和 Rac 激动剂 PDGF 的作用可以分别被其特异性抑制剂所拮抗。**结论** 用 RhoA 或 Rac 激动剂或拮抗剂可调控失血性休克大鼠血管反应性双相变化,提示休克早期 RhoA 活性升高,Rac 活性降低,而休克晚期 RhoA 活性降低,Rac 活性升高,RhoA/Rac 活性平衡参与了休克后血管反应性双相变化的调节。

关键词: 休克;RhoA;Rac;血管反应性

中图法分类号: R322.12; R363; R605.971 **文献标识码**: A

Effects of balancing RhoA/Rac on biphasic vascular reactivity after hemorrhagic shock in rats

LI Tao, XU Jing, YANG Guang-ming, FAN Xiao-qin, LIAO Zi-fu, CHEN Feng, LIU Liang-ming (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 observe the effects of RhoA/Rac balance on vascular reactivity in rats following hemorrhagic shock (HS). **Methods** SD rats after hemorrhagic shock (40 mmHg for 0 or 2 h) were adopted to observe the effects of RhoA/Rac agonists or inhibitors separately on the mean arterial pressure (MAP) and the caliber of superior mesenteric artery (SMA) after the contraction initiated by norepinephrine (NE). **Results** NE-induced pressure response and contraction of SMA following HS were significantly increased at early shock ($P<0.01$), and then significantly decreased at late shock ($P<0.01$). RhoA inhibitor C3 enzyme and Rac agonist PDGF decreased the pressure response and SMA contraction after NE induction, while RhoA agonist U-46619 and Rac inhibitor NSC23766 had opposite effect in these events, and further increased the contraction of SMA. C3 enzyme and NSC23766 abolished U-46619- and PDGF-induced change of pressure response and SMA contraction initiated by NE. **Conclusion** Regulation of RhoA/Rac balance can modulate the biphasic vascular reactivity following HS, suggesting that RhoA activity is increased and Rac activity is decreased at early shock, and their corresponding activities is opposite at later shock. Balancing of RhoA/Rac activity takes part in the biphasic reactivity regulation of vessels following HS.

Key words: shock; RhoA; Rac; vascular reactivity

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2005CB522601);国家自然科学基金(30600228, 30625037);教育部创新团队基金(IRT0712);重庆市自然科学基金(2007BB5078)

Supported by the the National Key Basic Research and Development Plan of China (973 Program, 2005CB522601), the National Natural Science Foundation of China (30600228, 30625037), the Foundation for Innovation Research Team of Ministry of Education (IRT0712) and the Natural Science Foundation of Chongqing (2007BB5078)

作者简介:李 涛,女,重庆市人,博士,助理研究员,主要从事创伤休克病理生理方面的研究。电话:(023)68757420,E-mail:LT200132@163.com

通信作者:刘良明,电话:(023)68757421,E-mail:liuliangming2002@yahoo.com

收稿日期:2008-06-06;**修回日期**:2008-07-28

严重创伤/休克失代偿期常出现血管的低反应性,研究表明血管低反应性的发生与血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)肾上腺素能受体失敏、细胞膜超极化和 VSMC 肌肉收缩蛋白对钙的敏感性降低即钙失敏有关[1,2]。本实验室前期研究发现失血性休克后血管反应性显现双相变化,休克早期升高,休克晚期降低,研究显示 Rho-kinase 参与了休克后血管反应性双相变化的调节[3,4],但其他机制研究较少。以往研究显示 VSMC RhoA 与 Rac 之间存在活性平衡[5],RhoA 与 Rac 之间活性平衡在细胞许多功能调节中发挥重要作用,但 RhoA 与 Rac 活性平衡是否参与了休克血管反应性的调节目前鲜见报道。本研究拟采用失血性休克整体动物,通过激动和抑制 RhoA 与 Rac,观察 RhoA 与 Rac 平衡在失血性休克血管反应性中的作用。

1　材料与方法

1.1　药品试剂与仪器

药品仪剂:RhoA 激动剂 U-46619,RhoA 抑制剂 C3 转移酶,Rac 激动剂 PDGF,Rac 抑制剂 NSC23766 均购自美国 Sigma。主要仪器:微循环观测仪(德国 Promga)。

1.2　动物及分组

SD 大鼠,88 只,雌雄各半,体质量(201.5 ± 23.1)g,购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。取出 8 只作为正常对照组,其余制作休克模型,分为休克即刻组,休克 2 h 组,休克即刻 + U-46619 组,休克即刻 + C3 转移酶组,休克即刻 + PDGF 组,休克即刻 + NSC23766 组,休克 2 h + U-46619 组,休克 2 h + C3 转移酶组,休克 2 h + PDGF 组,休克 2 h + NSC23766 组。

1.3　整体动物血管反应性测定

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,经插管注射肝素钠等渗盐水(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(superior mesenteric artery, SMA),分离 SMA 血管周围组织,稳定 10 min,经股动脉插管 10 min 内放血至血压 40 mmHg,在大鼠放血前,休克即刻(0 h),休克 2 h 时,开始输药后 10、20、30、40 min 和 50 min 分别从股静脉给去甲肾上腺素(norepinephrine,NE)(3 μg/kg),测量给 NE 前后的平均动脉血压及 SMA 管径变化。整体动物对 NE 的升压效应以给 NE 前后的平均动脉血压差值表示;SMA 管径对 NE 的收缩反应以给 NE 前后的 SMA 血管管径的差值占给 NE 前管径的百分比(血管收缩率)表示。

正常对照组仅插管,不放血,不输液。休克即刻组和休克 2 h组到时间后直接测定;休克即刻 + U-46619 组、休克即刻 + C3 转移酶组、休克即刻 + PDGF 组、休克即刻 + NSC23766 组、休克 2 h + U-46619 组,休克 2 h + C3 转移酶组、休克 2 h + PDGF 组、休克 2 h + NSC23766 组在休克 0 h 或 2 h 测定完毕后,分别输注 U-46619(3 μg/100 g)、C3 转移酶(500 ng/100 g)、PDGF(150 ng/100 g)、NSC23766(40 mg/100 g)。

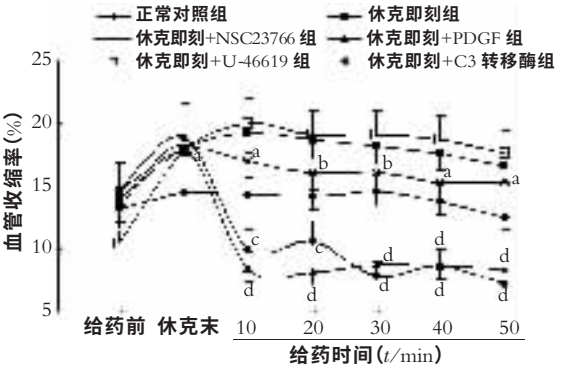
1.4　统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件,两组间比较行 t 检验。

2　结果

2.1　RhoA/Rac 激动剂或拮抗剂对休克早期大鼠肠系膜上动脉收缩反应的影响

休克 0 h SMA 对 NE 的收缩反应性明显升高,在给药后 10、20、30、40 min 和 50 min 时收缩反应明显高于正常对照组($P < 0.05$,$P < 0.01$)。加入 RhoA 的激动剂 U-46619 可进一步升高 SMA 对 NE 的收缩反应性,RhoA 的抑制剂 C3 转移酶明显降低休克早期 SMA 对 NE 的收缩反应性,在给药后 10、20、30、40 min 和 50 min 时均明显低于休克即刻组($P < 0.05$,$P < 0.01$)。Rac 抑制剂 NSC23766 对休克即刻 SMA 收缩反应性无明显影响,Rac 激动剂 PDGF 可降低休克即刻的 SMA 收缩反应性(图 1)。

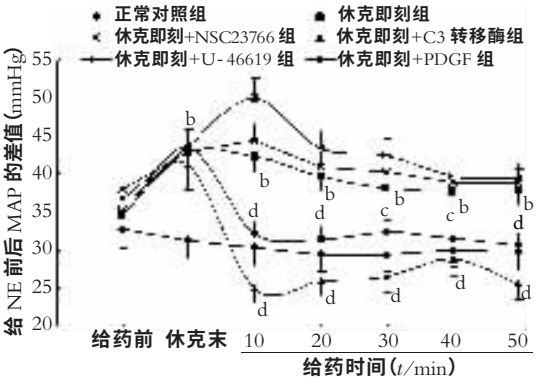


a:$P < 0.05$,b:$P < 0.01$,与正常对照组比较; c: $P < 0.05$,d :$P < 0.01$,与休克即刻组比较

图 1　RhoA/Rac 激动剂和拮抗剂对 NE 诱导的失血性休克即刻大鼠 SMA 收缩反应的影响

2.2　RhoA/Rac 激动剂和拮抗剂对休克大鼠早期 NE 升压效应的影响

休克即刻动物 NE 升压效应明显升高,在给药后 10、20、30、40 min 和 50 min 时 NE 升压反应明显高于正常对照组($P < 0.05$)。RhoA 的激动剂 U-46619 和 Rac 抑制剂 NSC23766 可进一步升高动物的 NE 升压效应,RhoA 的抑制剂 C3 转移酶和 Rac 激动剂 PDGF 明显降低休克动物 NE 升压效应,在给药后 10、20、30、40 min 和 50 min 均明显低于休克即刻组($P < 0.05$,$P < 0.01$,图 2)。

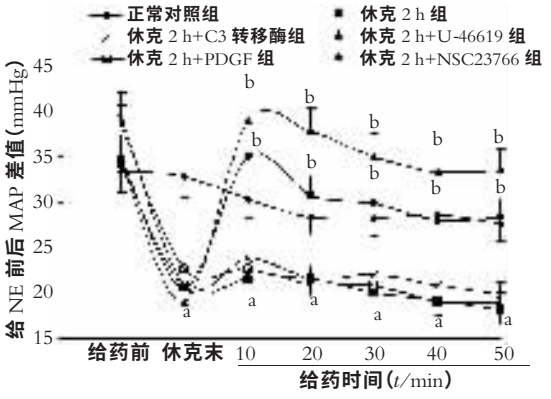


a:$P < 0.05$,b:$P < 0.01$,与正常对照组比较; c:$P < 0.05$,d :$P < 0.01$,与休克即刻组比较

图 2　RhoA/Rac 激动剂和拮抗剂对大鼠失血性休克早期 NE 升压效应的影响

2.3 RhoA/Rac 激动剂和拮抗剂对大鼠休克晚期 NE 升压效应的影响

与正常对照组相比,休克2 h 组大鼠血管反应性明显降低,表现为 NE 的升压效应在休克各时相点明显低于正常对照组($P<0.01$),在给药后 10、20、30、40 min 以及 50 min 点 NE 的升压效应均低于正常对照组($P<0.01$)。RhoA 激动剂 U-46619 和 Rac 抑制剂 NSC23766 可使休克大鼠血管反应性升高,表现为 NE 的升压效应在给药后各时相点明显高于休克 2 h 组($P<0.01$,图3)。

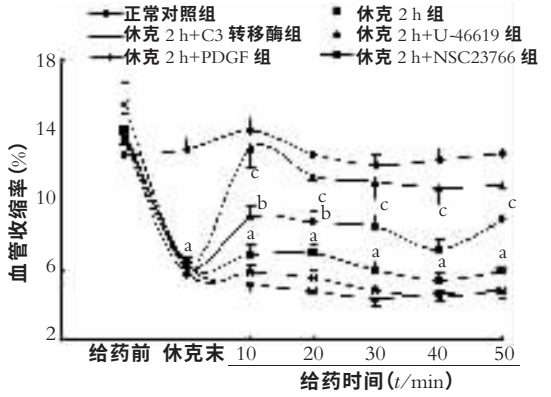


a:$P<0.01$,与正常对照组比较; b:$P<0.01$,与休克 2 h 组比较

图3 RhoA/Rac 激动剂和拮抗剂对大鼠失血性休克 2 h NE 升压效应的影响

2.4 RhoA/Rac 激动剂和拮抗剂对大鼠休克晚期 SMA 收缩反应的影响

与正常对照相比,休克 2 h 组在休克后各相点的 SMA 对 NE 诱导的收缩反应(管径变化)明显降低,在给药后 10、20、30、40 min 以及 50 min 对 NE 的反应均低于正常对照组($P<0.01$),RhoA 激动剂 U-46619 和 Rac 抑制剂 NSC23766 可使 SMA 对 NE 的收缩反应性升高,在开始给药后 10、20、30、40 min 和 50 min 明显高于休克 2 h 组($P<0.05$, $P<0.01$,图4)。



a:$P<0.01$,与正常对照组比较; b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与休克2 h 组比较

图4 RhoA/Rac 激动剂和拮抗剂对失血性休克 2 h 大鼠 NE 诱导的 SMA 收缩反应的影响

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。本实验室前期从离体血管环、VSMC 以及整体动物均发现失血性休克后血管反应性呈双相变化,休克早期升高,晚期降低,Rho-kinase 活性调节剂对休克早期及晚期的血管反应性和钙敏感性具有调节作用[3]。研究显示[5] RhoA 与 Rac 活性之间存在负调节作用,RhoA 活性升高可导致 Rac 活性降低,反之 Rac 活性升高则可抑制 RhoA 的活性,由于 RhoA 为 Rho-kinase 上游蛋白,RhoA 与 Rac 之间活性平衡是否参与了休克血管双相反应性的调节,目前尚不清楚。

本研究结果显示失血性休克后整体动物 SMA 对 NE 的收缩反应和 NE 的升压反应呈双相变化,休克早期升高,休克晚期降低。RhoA 激动剂 U-46619 和 Rac 特异性抑制剂 NSC23766 可改善休克晚期 SMA 对 NE 的收缩反应和 NE 的升压效果,也进一步升高休克早期收缩反应性;Rac 激动剂 PDGF 和 RhoA 特异性抑制剂 C3 转移酶可降低休克早期 SMA 对 NE 收缩反应性和 NE 升压反应性。RhoA 激动剂 U-46619 和 Rac 激动剂 PDGF 的作用可以分别被其特异性抑制剂所拮抗。研究结果说明休克早期 RhoA 活性升高,Rac 活性降低,而休克晚期 RhoA 活性降低,Rac 活性升高,推测 RhoA/Rac 活性平衡参与了休克血管双相血应性的调节。

Wojciak-Stothard 等[6] 发现肺动脉血管内皮细胞在急性缺氧后,RhoA 活性升高,Rac 活性受到抑制,表现为细胞间连结松散,内皮细胞通透性升高;复氧后,Rac 活性升高,RhoA 活性受到抑制,细胞间紧密连结增强,内皮通透性降低。RhoA、Rac 在内皮细胞通透性调节中起相反的作用。此外,血栓素刺激内皮细胞后,应力纤维形成增多,细胞收缩,通透性增高;若抑制 RhoA 活性,则应力纤维形成减少,细胞收缩降低,同时抑制由血栓素引起的内皮细胞通透性的升高;相反,若抑制 Rac 活性,应力纤维的形成增多,细胞收缩加强,促进由血栓素引起的内皮细胞通透性的升高[7]。上述研究结果提示:RhoA 与 Rac 在内皮细胞的通透性调节中起相反的作用,RhoA 与 Rac 之间活性平衡发生变化,内皮细胞通透性也随之发生变化。RhoA/Rac 活性平衡除了参与内皮细胞通透性调节外,还参与其他细胞功能调节。如果使 NIH3T3 纤维母细胞稳定表达 Tiam1 (Tiam1 是一种鸟苷酸交换因子,可特异性地活化 Rac),在 Rac 活性升高的同时伴随 RhoA 活性降低,细胞则会出现上皮样变、粘附增加,同时细胞迁移受抑;研究还发现,若升高细胞 Rac 活性的同时升高 RhoA 活性,则细胞间不能建立连结且细胞迁移加强;但若完全抑制 RhoA 的活性,单使 Rac 活性升高,则并不能引起细胞上皮样变,也不能建立细胞间连结,细胞出现病态样结构[8]。结果提示,RhoA/Rac 活性平衡也与细胞表型和迁移状态有密切关系。本研究结果提示 RhoA/Rac 活性平衡参与了休克双相血管反应性的

调节,但其具体调节机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] Simper D, Strobel W M, Linder L, *et al*. Indirect evidence for stimulation of nitric oxide release by tumor necrosis factor-alpha in human veins in vivo[J]. Cardiovas Res, 1995, 30(4): 960 – 964.

[2] Lang R J, Harvey J R, McPhee G J, *et al*. Nitric oxide and thiol reagent modulation of Ca^{2+}-activated K^+ (BK_{Ca}) channels in myocytes of the guinea-pig taenia caeci[J]. J Physiol, 2000, 525(Pt 2): 363 – 376.

[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] 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.

[5] Burridge K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage[J]. Cell, 2004, 116(2): 167 – 179.

[6] Wojciak-Stothard B, Tsang L Y, Haworth S G. Rac and Rho play opposing roles in the regulation of hypoxia/reoxygenation-induced permeability changes in pulmonary artery endothelial cells[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Phoysiol, 2005, 288(4): L749 – L760.

[7] Wojciak-Stothard B, Potempa S, Eichholtz T, *et al*. Rho and Rac but not Cdc42 regulate endothelial cell permeability[J]. J Cell Sci, 2001, 114(Pt 7): 1343 – 1355.

[8] Sander E E, ten-Klooster J P, van-Delft S, *et al*. Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPase determines cellular morphology and migratory behavior[J]. J Cell Biol, 1999, 147(5): 1009 – 1022.

(编辑　吴培红)

(上接 1971 页)

比较,MMP-9 平均光密度值均明显降低($P<0.05$);强力霉素和三七皂甙两组间比较其平均光密度值差异无统计学意义($P>0.05$,表 1)。

表 1　MMP-9 表达、脑出血量和出血发生率情况

组别	MMP-9 平均光密度 (AOD)	脑出血量 (μl)	脑出血发生率 (%)
假手术组	0.086 ± 0.008	0.00 ± 0.27	0
脑缺血对照组	0.158 ± 0.010[a]	0.00 ± 1.48	0
6 h UK 溶栓组	0.227 ± 0.022[b]	3.16 ± 8.84	16.67
9 h UK 溶栓组	0.293 ± 0.030[bc]	4.92 ± 11.43[b]	33.33[b]
12 h UK 溶栓组	0.326 ± 0.034[bc]	7.56 ± 11.83[bc]	41.67[bc]
6 h UK + Doxy 组	0.147 ± 0.020[d]	2.79 ± 7.94	8.33
9 h UK + Doxy 组	0.185 ± 0.033[d]	4.06 ± 11.27	16.67
12 h UK + Doxy 组	0.233 ± 0.031[d]	5.30 ± 8.73	33.33
6 h UK + Sanqi 组	0.153 ± 0.017[d]	2.81 ± 4.91	8.33
9 h UK + Sanqi 组	0.224 ± 0.019[d]	4.23 ± 12.09	25.00
12 h UK + Sanqi 组	0.251 ± 0.030[d]	6.03 ± 11.07	33.33

a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.05$,与脑缺血对照组比较;c:$P<0.05$,与同组 6 h 比较;d:$P<0.05$,与同时段 UK 组比较

2.2　脑出血量和脑出血发生率

由表 1 可以看出假手术组和缺血对照组几乎没有脑出血发生,而尿激酶溶栓后部分大鼠出现颅内出血,病理检查脑出血为红细胞漏出或血肿形成,6 h UK 组脑出血量和出血发生率均高于缺血对照组,但差异无统计学意义($P>0.05$),9 h 和 12 h UK 溶栓与缺血对照组比较,脑出血量和出血发生率明显增加($P<0.05$),且 12 h UK 组和 6 h UK 组相比也有统计学差异,说明溶栓时间越晚,脑出血量和出血发生率增加更明显。同时段尿激酶联合 MMPs 抑制剂治疗组与单用 UK 组比较,出血量和出血发生率有较少趋势,但无统计学差异($P>0.05$)。强力霉素和三七皂甙各组间无明显差异($P>0.05$)。

3　讨论

静脉溶栓治疗仍是目前急性缺血性脑卒中最有效的药物治疗方法,时间窗内 rt-PA 与尿激酶溶栓治疗的疗效和安全性均得到大规模实验反复证实,但目前面临的主要问题仍是治疗时间窗和溶栓并发症两方面。尿激酶是溶栓的主要药物,本实验主要研究时间窗内及超过时间窗尿激酶溶栓对 MMP-9 及溶栓后出血性转化的影响,以及给予 MMPs 抑制剂强力霉素和三七皂甙抑制 MMP-9 对尿激酶溶栓后出血性转化的干预效果,进一步探讨超过治疗时间窗溶栓的主要并发症及防治措施,寻求延长溶栓时间窗的方法。

大量动物实验和临床研究都证实 rt-PA 溶栓治疗组颅内出血性转化发生率明显高于对照组,并且和溶栓后 MMP-9 蛋白表达水平有相关性。基础 MMP-9 水平与迟发性颅内出血性转化有关,基线水平的 MMP-9 升高是静脉内使用 t-PA 溶栓治疗后脑出血的独立预测因子[3]。

我们在实验中发现尿激酶溶栓后 MMP-9 表达水平显增加,且随溶栓时间延迟 MMP-9 增高越显著,而尿激酶溶栓后脑出血量和出血发生率增加,尤以 9、12 h 溶栓后更明显。说明尿激酶溶栓后颅内出血性转化与溶栓后 MMP-9 高表达相关。若能有效抑制溶栓后 MMP-9 高表达,则有可能减轻溶栓后出血性转化,改善溶栓并发症。强力霉素属广谱 MMPs 抑制剂,而三七皂甙已被证实在脑缺血时具有抑制 MMP-9 的作用。本实验在选用抑制 MMP-9 的药物联合尿激酶溶栓治疗,观察抑制 MMP-9 对尿激酶溶栓后出血性转化的干预效果,发现强力霉素和三七皂甙联合尿激酶溶栓治疗均能有效抑制溶栓后 MMP-9 表达,并且降低溶栓后脑出血量和出血发生率,说明抑制 MMPs 的药物联合尿激酶溶栓治疗可能是减轻溶栓并发症,延长溶栓治疗时间窗的有效方法。

关键词: 脑缺血;尿激酶;溶栓;基质金属蛋白酶-9;出血性转化

中图法分类号: R743　　**文献标识码**: B

参考文献:

[1] 张新江,常丽英,张苏明,等. 大鼠自体血栓大脑中动脉闭塞模型的改良[J]. 卒中与神经疾病, 2003, 10(1): 12 – 15.

[2] Choudhri T F, Hoh B L, Solomon R A, *et al*. Use of a spectrophotometric hemoglobin assay to objectively quantify intracerebral hemorrhage in mice[J]. Stroke, 1997, 28(11): 2296 – 2302.

[3] Castellanos M, Leila R, Serena J, *et al*. Plasma cellular – fibronectin concentration predicts hemorrhagic transformation after thrombolytic therapy in acute ischemic stroke [J]. Stroke, 2004, 35(7): 1671 – 1676.

(编辑　王小寒)