文章编号:1000-5404(2010)09-0865-04

论著

TNF-α对家兔内毒素休克钙敏感性的影响及其与Rho激酶和蛋白激酶C的关系

贺教江,李 涛,杨光明,徐 竞,朱 娱,刘良明 (400042 重庆,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)

[摘要] **目的** 观察肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor α, TNF-α)对内毒素休克血管钙敏感性的影响及其与Rho激酶和蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)的关系。**方法** 取正常和内毒素休克家兔肠系膜上动脉(superior mesenteric artery, SMA),采用离体血管环张力测定技术,用去极化状态下(120 mmol/L KCl)SMA血管环对梯度浓度钙的收缩力反映血管的钙敏感性。用ELISA法测定血浆炎性因子TNF-α的水平,观察TNF-α对SMA血管环钙敏感性的影响及与PKC和Rho激酶的关系。**结果** 家兔LPS(1 mg/kg)静脉注射后,早期(即LPS注射后30 min和1 h)SMA血管环对钙的反应性升高,量-效曲线左移,最大收缩力(E_{max})升高($P>0.05$);随着时间的延长,SMA血管环对钙的反应性逐渐下降,到LPS注射后6 h明显降低,其量-效曲线明显右移,最大收缩力(E_{max})明显降低($P<0.01$)。家兔LPS(1 mg/kg)静脉注射后2 h,血清中TNF-α的水平逐渐升高,4 h达到高峰,6 h有所降低但仍高于正常组($P<0.05$,$P<0.01$),其变化趋势与血管钙敏感性变化呈一定负相关关系($r=-0.675\ 3$)。低浓度的TNF-α(20 ng/ml)孵育可明显升高SMA对钙的反应性,高浓度的TNF-α(200 ng/ml)可明显降低SMA对钙的反应性($P<0.05$,$P<0.01$)。Rho激酶特异性抑制剂Y-27632(1×10^{-5} mol/L)可明显降低低浓度的TNF-α升高SMA对钙的反应性($P<0.05$,$P<0.01$);而PKC的抑制剂Staurosporine(1×10^{-7} mol/L)无拮抗作用($P>0.05$)。**结论** TNF-α对内毒素休克血管的钙敏感性有重要的调节作用,其调节作用可能主要与Rho激酶有关,与PKC关系不大。

[关键词] 肿瘤坏死因子-α;内毒素休克;脓毒性休克;钙敏感性;钙失敏
[中图法分类号] R392.32; R631.02; R345 **[文献标志码]** A

Effect of TNF-α on calcium sensitivity in rabbits with endotoxin-induced shock and its relation with Rho-kinase and protein kinase C

He Jiaojiang, Li Tao, Yang Guangming, Xu Jing, Zhu Yu, Liu Liangming (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 effect of TNF-α on vascular calcium sensitivity in rabbits with endotoxin-induced shock and its relation with Rho-kinase and protein kinase C (PKC). **Methods** Vascular calcium sensitivity of superior mesenteric artery (SMA) from normal and endotoxin-induced shock rabbits was detected according to the contraction initiated by Ca^{2+} under depolarizing conditions (120 mmol/L KCl) using the *in vitro* angiotasis assay technique. TNF-α level was measured by ELISA. Effect of TNF-α on calcium sensitivity of SMA and the relation between Rho-kinase and PKC were observed. **Results** The vascular reactivity of SMA to Ca^{2+} was increased with the cumulative dose-response curve of SMA to Ca^{2+} shifted to the left and the E_{max} of Ca^{2+} increased in rabbits 30 min and 1 h after LPS intravenous injection ($P>0.05$). However, it was then decreased with the cumulative dose-response curve of SMA to Ca^{2+} shifted to the right and the E_{max} of Ca^{2+} significantly decreased ($P<0.01$). The serum TNF-α level began to increase, reached its peak, and decreased to its normal level in 2, 4 and 6 h, respectively, after LPS administration, but was still higher than that in control group ($P<0.05$, $P<0.01$), which was negatively correlated with vascular calcium sensitivity. The low and high levels of TNF-α incubated with SMA significantly increased and decreased the vascular reactivity of SMA to Ca^{2+}, respectively ($P<0.05$, $P<0.01$). However, the PKC inhibitor, staurosporine, had no effect on TNF-α ($P>0.05$). **Conclusion** TNF-α plays an important role in regulation of the calcium sensi-

[基金项目] 国家杰出青年科学基金(30625037)
[通信作者] 刘良明,电话:(023)68757421,E-mail: liangmingliu@yahoo.com

tivity of vascular smooth muscle in rabbits with endotoxin-induced shock, which may be related to Rho-kinase but not with PKC.

[Key words] tumor necrosis factor α; endotoxic shock; sepsis shock; calcium sensitivity; calcium desesitization

Supported by the National Science Fund for Distinguished Young Scholars of China (30625037). Corresponding author: Liu Liangming, Tel: 86-23-68757421, E-mail: liangmingliu@yahoo.com

脓毒症及脓毒性休克是临床危重症的一种常见并发症,且是危重病患者的重要死亡原因之一。研究表明,感染/脓毒性休克的后期常存在血管低反应性[1-4],血管低反应性的存在严重影响休克的治疗效果。研究发现内毒素休克和失血性休克血管平滑肌细胞均存在钙敏感性降低(钙失敏),血管平滑肌细胞钙敏感性降低在休克血管低反应性的发生中起到重要作用[5-8]。内毒素休克是临床革兰阴性细菌感染的主要并发症之一,全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)为其主要的病理生理特征,肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor α,TNF-α)为其主要炎症介质。Bucher等[9]研究表明TNF-α和IL-1通过非NO依赖方式下调抗利尿激素受体mRNA的表达而使血管的反应性下降。Singh等[10]研究表明内毒素休克产生的TNF-α可降低肾上腺能受体(adrenergic receptor, AR)对其激动剂的反应性,通过降低AR的亲和力,降低受体数目。还有研究发现内毒素休克后各种细胞因子(TNF-α、IL-6和IL-1等)的综合作用可使血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)α1-AR基因表达下调[11]。这些研究表明TNF-α等细胞因子可通过影响血管平滑肌细胞膜受体的表达和亲和力,参与休克血管低反应性的发生。TNF-α可否通过影响血管平滑肌细胞的钙敏感性来调节内毒素休克血管的反应性,其具体机制如何,国内外尚少见文献报道。本实验室采用家兔内毒素休克模型,对此进行了研究,旨在进一步了解内毒素休克钙失敏的发生机制,为寻找有效的休克血管低反应性防治药物提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物模型及分组

普通级家兔(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心)48只,雌雄不拘,体质量2.0~2.5 kg。于实验前12 h禁食,可自由饮水。内毒素休克模型通过经耳缘静脉注射LPS 1.0 mg/kg复制,平均动脉压(MAP)降至基础水平的70%以下可界定为内毒素休克。分为正常对照组,LPS组0.5、1、2、4、6 h,每组8只,正常组麻醉固定后从耳缘静脉抽取2 ml血液后不做任何处理,直接处死后取肠系膜上动脉(SMA)主干,清除周围结缔组织,制成2~3 mm长血管环用于钙敏感性的测定;LPS组0.5、1、2、4、6 h直接经耳缘静脉给LPS(美国Sigma公司),分别于0.5、1、2、4、6 h麻醉固定后从耳缘静脉抽取2 ml血液后处死,按上述方法取SMA标本测钙敏感性。留取的血液标本低温高速离心(4 ℃,2 000 r/min,20 min)后取其上清液存储于-70 ℃的冰箱中用于TNF-α浓度测定。

普通级家兔40只,按上述方法取SMA主干制成2~3 mm的血管环40个与TNF-α在37 ℃共孵育10 h。实验分单纯对照组、20 ng/ml TNF-α组、200 ng/ml TNF-α组、20 ng/ml TNF-α + Rho-kinase抑制剂Y-27632组、20 ng/ml TNF-α + PKC抑制剂Staurosporine组共5组,每组8个血管环。

1.2 血管环钙敏感性测定

SMA血管挂于注有K-H液(Krebs-Henseleit solution,组成:NaCl 118 mmol/L, KCl 4.7 mmol/L, $NaHCO_3$ 25 mmol/L, KH_2PO_4 1.03 mmol/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.45 mmol/L, $CaCl_2$ 2.5 mmol/L,葡萄糖11.1 mmol/L,pH 7.4)的离体器官灌流槽(西班牙Letica公司)的浴槽中,持续充入95% O_2和5% CO_2混合气体,给预初张力3.0 g,25 ℃恒温孵育2 h,20 min换液1次。待张力曲线平稳后,换用高钾液(组成:NaCl 2.7 mmol/L, KCl 120 mmol/L, $NaHCO_3$ 25 mmol/L, KH_2PO_4 1.03 mmol/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.45 mmol/L,葡萄糖11.1 mmol/L,pH 7.4)孵育1 h,15 min换液1次,待张力曲线平稳后,测定血管环对Ca^{2+}的反应性。20 ng/ml TNF-α + Y-27632组和20 ng/ml TNF-α + Staurosporine处理组分别用Y-27632(1×10^{-5} mol/L)和Staurosporine(1×10^{-7} mol/L)孵育10 min,再观察血管环对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(Power Lab,澳大利亚AD Instrument公司)。

血管环的钙敏感性用浓度累计法测定,使所用的Ca^{2+}终浓度分别为1×10^{-4}、3×10^{-4}、1×10^{-3}、2×10^{-3}、6×10^{-3}、1×10^{-2}、3×10^{-3} mol/L,记录不同Ca^{2+}浓度下血管环产生的E_{max},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Ca^{2+}的半数有效浓度(EC_{50}),用Ca^{2+}的E_{max}以及量-效曲线评价血管的钙敏感性。

1.3 TNF-α的检测

采用双抗夹心ELISA法测定TNF-α的浓度,具体操作根据TNF-α试剂盒说明书进行。

1.4 统计学处理

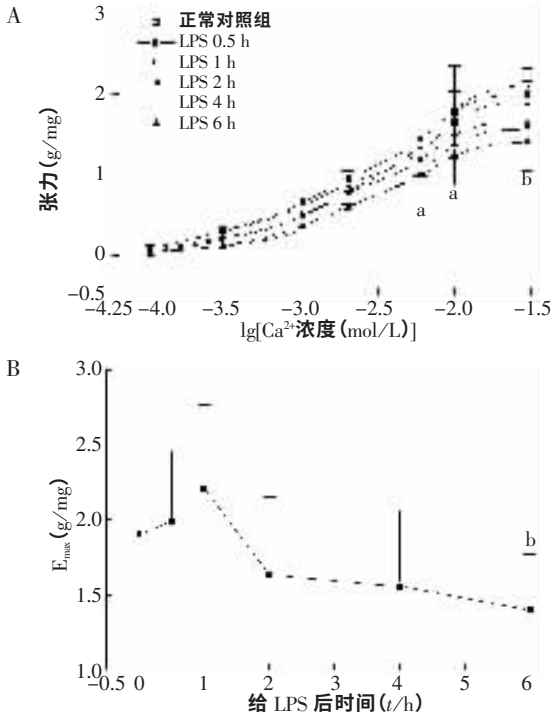
数据均以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 10.0统计软件进行双因素方差分析。

2 结果

2.1 内毒素休克不同时间点钙敏感性变化

与正常对照组相比,给LPS后30 min和1 h, SMA对钙的

敏感性呈升高趋势,它对钙的量效曲线左移。但随时间延长,血管环对钙的反应性逐渐下降,休克后期(给LPS后4、6 h)钙的量效曲线明显右移,E_{max}降低($P<0.01$),给LPS后6 h在钙浓度为6×10^{-3}、1×10^{-2}和3×10^{-2} mol/L水平差异均有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$,图1)。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与正常对照组比较

A:给LPS后不同时相点家兔SMA对钙敏感性变化;B:给LPS后不同时相点SMA对钙的E_{max}变化

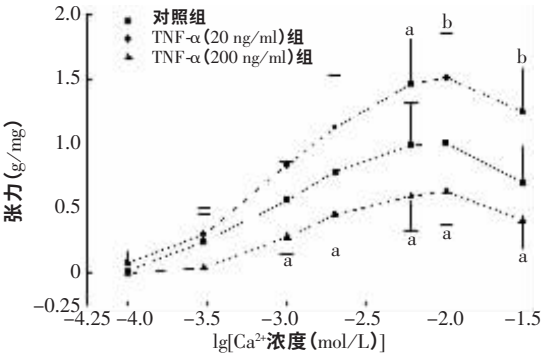
图1 家兔内毒素休克后不同时间SMA血管钙敏感性变化

2.2 内毒素休克不同时间TNF-α水平的变化

正常对照组,LPS组0.5、1、2、4、6 h血清中TNF-α的含量依次为(11.176±3.978)、(12.286±4.087)、(11.327±2.062)、(13.226±2.848)、(24.269±8.156)、(15.916±2.538) ng/ml。由此可见,与正常对照组相比,血清中TNF-α的含量在静脉注射LPS(1 mg/kg)后2 h升高,LPS后4 h达到高峰,6 h有所降低但仍高于正常组($P<0.05$,$P<0.01$)。其变化规律与给LPS后钙敏感性变化呈一定的负相关关系($r=-0.675\,3$,$P<0.01$)。

2.3 肠系膜上动脉血管环与不同浓度的TNF-α孵育后钙敏感性变化

与培养基孵育10 h对照组相比,20 ng/ml TNF-α孵育10 h后SMA对钙的量效曲线明显左移,E_{max}明显升高($P<0.01$),在钙浓度为6×10^{-3}、1×10^{-2}和3×10^{-2}mol/L水平差异均有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$)。而200 ng/ml TNF-α孵育10 h后SMA对钙的量效曲线明显右移,E_{max}明显降低($P<0.05$),在钙浓度为1×10^{-3}、2×10^{-3}、6×10^{-3}、1×10^{-2}和3×10^{-2}mol/L水平差异均有统计学意义($P<0.05$,图2)。



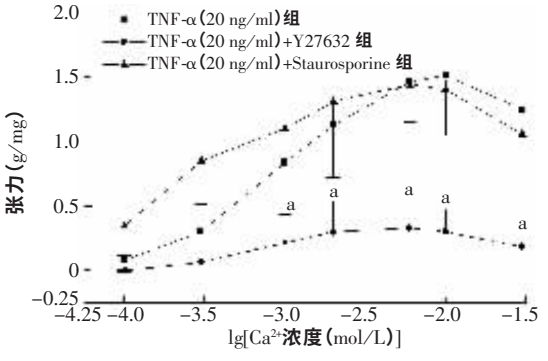
a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

图2 不同浓度的TNF-α对SMA血管钙敏感性的影响

2.4 Rho激酶抑制剂Y-27632及PKC抑制剂Staurosporine对低浓度TNF-α孵育10 h后SMA血管环钙收缩反应性的影响

Y-27632可使低浓度TNF-α(20 ng/ml)孵育10 h后的SMA对钙的量效曲线明显右移,E_{max}显著降低($P<0.01$),在钙浓度为1×10^{-3}、2×10^{-3}、6×10^{-3}、1×10^{-2}和3×10^{-2} mol/L水平差异均有统计学意义($P<0.01$,图3)。

Staurosporine对低浓度TNF-α(20 ng/ml)孵育10 h后的SMA对钙的量效曲线无明显影响,在钙各浓度差异均无统计学意义($P>0.05$,图3)。



a:$P<0.01$,与20 ng/ml TNF-α组比较

图3 Y-27632和Staurosporine对低浓度TNF-α孵育10 h后SMA血管环钙收缩反应性的影响

3 讨论

内毒素休克以全身炎症反应综合征为主要病生变化特征,大量炎性因子的失控性表达参与了内毒素休克的重要病理生理过程。TNF-α为多功能的循环炎性介子,主要由内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞产生。研究表明,由LPS刺激导致TNF-α的大量释放主要通过核转录因子(NF)κB调控,同时TNF-α又可以引起其他炎性因子的大量释放,导致微循环功能障碍、血管反应性下降等[12]。研究发现:在内毒素休克和失血性休克中血管平滑肌细胞均存在钙敏感性降低(钙失敏),血管平滑肌细胞钙敏感性降低在休克血管低反

应性的发生中起重要作用[5-8]。但 TNF-α 在内毒素休克钙失敏中有无作用,是通过何种途径来调节的尚不清楚。

本研究采用家兔内毒素休克模型,观察了经耳缘静脉注射 LPS(1.0 mg/kg)后不同时间点 SMA 血管环钙敏感性的变化,同时观察了家兔血清中 TNF-α 水平的变化。研究发现,家兔内毒素休克后,SMA 钙的收缩反应性均呈现休克早期(LPS 后 30 min 和 1 h)升高,休克晚期(LPS 后 4、6 h)血管环对钙的收缩反应性明显降低。家兔 LPS(1 mg/kg)静注后 2 h,血清中 TNF-α 的水平开始逐渐升高,LPS 后 4 h 达到高峰,6 h 有所降低但仍高于正常组。SMA 血管环对钙的收缩反应性与血清中 TNF-α 的变化呈现明显负相关变化($r = -0.675\ 3$, $P < 0.01$),即随着血清中 TNF-α 浓度的增高,SMA 血管环对钙的收缩反应性减低。进一步采用离体 SMA 血管环与不同浓度的 TNF-α 孵育观察其对 SMA 血管环钙敏感性的影响及 Rho 激酶抑制剂 Y-27632 和 PKC 抑制剂 Staurosporine 的作用。结果表明,低浓度 TNF-α(20 ng/ml)可升高 SMA 血管环对钙的反应性,高浓度 TNF-α(200 ng/ml)可降低 SMA 血管环对钙的反应性。这与家兔静脉注射 LPS 后 1 h SMA 血管环对钙的收缩反应性升高、血清中 TNF-α 水平较低和静脉注射 LPS 后 4、6 h SMA 血管环对钙的收缩反应性减低、血清中 TNF-α 水平显著升高具有很好的相关性。Y-27632 明显降低低浓度 TNF-α(20 ng/ml)孵育 10 h 后 SMA 血管环对钙反应性的升高效应,而 Staurosporine 对低浓度 TNF-α(20 ng/ml)对 SMA 血管环的钙敏感性的升高效应无影响。结果提示,TNF-α 对内毒素休克血管平滑肌细胞钙敏感性具有调节作用,且可能主要是通过 Rho 激酶而不是 PKC 途径来调节的。

本实验采用的低浓度 TNF-α(20 ng/ml)和高浓度 TNF-α(200 ng/ml)与 SMA 血管环孵育的浓度均高于家兔内毒素休克早期(给 LPS 后 30 min 和 1h)和休克晚期(给 LPS 后 4、6 h)血清中所测得的浓度。这主要是体内、外环境的差异所致。TNF-α 在体内可引起其他炎性因子的产生而共同影响 SMA 血管环对钙的收缩反应性,而体外孵育无此作用。因此体外孵育只有增加 TNF-α 浓度才能达到同一作用效果。李涛等[13,14]研究表明,在失血性休克中,Rho 激酶和 PKC 都参与了血管平滑肌细胞钙敏感性调节。Rho 激酶主要通过抑制肌球蛋白轻链磷酸酶活性进而增加肌球蛋白轻链磷酸化水平,调节血管平滑肌细胞钙敏感性;PKC 对血管平滑肌细胞钙敏感性调节主要是通过 CPI-17 磷酸化而抑制肌球蛋白轻链磷酸酶和活化丝裂原活化蛋白激酶来实现。本研究初步说明在内毒素休克中 TNF-α 主要通过 Rho 激酶而不是 PKC 来调节内毒素休克血管平滑肌细胞钙敏感性。但 TNF-α 对 Rho 激酶的具体调节机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] Di-Villa-Bianca R, Sorrentino R, Mitidieri E, *et al*. Recombinant human erythropoietin prevents lipopolysaccharide-induced vascular hyporeactivity in the rat[J]. Shock, 2009, 31(5): 529-534.

[2] Boffa J J, Arendshorst W J. Maintenance of renal vascular reactivity contributes to acute renal failure during endotoxemic shock[J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(1): 117-124.

[3] Hou L C, Li N, Zheng L N, *et al*. CB1 cannabinoid receptor participates in the vascular hyporeactivity resulting from hemorrhagic shock in rats[J]. Chin Med J (Engl), 2009, 122(8): 950-954.

[4] Sompamit K, Kukongviriyapan U, Nakmareong S, *et al*. Curcumin improves vascular function and alleviates oxidative stress in non-lethal lipopolysaccharide-induced endotoxaemia in mice[J]. Eur J Pharmacol, 2009, 616(1/3): 192-199.

[5] Buluc M, Demirel-Yilmaz E. Resveratrol decreases calcium sensitivity of vascular smooth muscle and enhances cytosolic calcium increase in endothelium[J]. Vascul Pharmacol, 2006, 44(4): 231-237.

[6] 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.

[7] 贺教江, 李涛, 杨光明, 等. 钙失敏在家兔内毒素休克血管低反应性中的作用[J]. 创伤外科杂志, 2009, 11(6): 544-547.

[8] 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.

[9] Bucher M, Hobbhahn J, Taeger K, *et al*. Cytokine-mediated downregulation of vasopressin V(1A) receptors during acute endotoxemia in rats[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002, 282(4): R979-R984.

[10] Singh M, Notterman D A, Metakis L. Tumor necrosis factor produces homologous desensitization of lymphocyte beta 2-adrenergic responses [J]. Circ Shock, 1993, 39(4): 275-278.

[11] Shan Q, Bourreau J. Cardiac and vascular effects of nitric oxide synthase inhibition in lipopolysaccharide-treated rats[J]. Eur J Pharmacol, 2000, 406(2): 257-264.

[12] Peters K, Unger R E, Brunner J, *et al*. Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis[J]. Cardiovasc Res, 2003, 60(1): 49-57.

[13] Li T, Liu L, Liu J, *et al*. Mechanisms of Rho kinase regulation of vascular reactivity following hemorrhagic shock in rats[J]. Shock, 2008, 29(1): 65-70.

[14] 李涛, 徐竞, 杨光明, 等. 调控 RhoA/Rac 平衡对失血性休克大鼠血管双相反应性的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(21): 1976-1979.

(**收稿**:2009-12-10;**修回**:2009-12-24)

(编辑 张 维)