文章编号:1000-5404(2010)21-2269-04

论著

血管紧张素Ⅱ激活 p38 MAPK 和 JNK 对诱导失血性休克血管反应性的保护作用

杨光明,徐 竞,李 涛,唐 婧,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 观察血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)激活 p38 MAPK 和 JNK 在恢复失血性休克血管反应性中的作用。方法 采用大鼠失血性休克模型(SD 大鼠 80 只,体质量 200~230 g,雌雄各半),观察 AngⅡ处理对休克大鼠肠系膜上动脉(superior mesenteric artery,SMA)血管组织中 p38 MAPK 和 JNK 的活性变化的影响,并用 p38 MAPK 和 JNK 的特异性拮抗剂 SB203580 和 SP600125,观察阻断 p38 MAPK 和 JNK 对 AngⅡ诱导的失血性休克血管反应性保护作用的影响。结果 失血性休克大鼠肠系膜血管组织中 p38 MAPK 的活性呈休克早期升高、休克晚期降低的趋势,在休克后 0.5 h 和 2 h 时 p38 MAPK 的活性分别为正常对照的 201.2% 和 53.2%($P<0.01$);而 JNK 的活性水平随休克时间的延长而逐渐升高,休克 2 h 时活性升为正常对照的 308.8%($P<0.01$)。在休克晚期给予 AngⅡ处理能明显升高休克血管 p38 MAPK 和 JNK 活性水平,同时 AngⅡ处理也升高了休克晚期肠系膜动脉血管的收缩反应性。p38 MAPK 的拮抗剂 SB203580 和 JNK 的拮抗剂 SP600125 均可拮抗 AngⅡ诱导的 p38 MAPK 和 JNK 激活,p38 MAPK 和 JNK 的活性分别降低为 AngⅡ组的 52.9% 和 44.8%($P<0.05\sim0.01$);同时 p38 MAPK 和 JNK 的拮抗剂也抑制了 AngⅡ升高休克血管反应性的作用,使其分别降低为 AngⅡ组的 60.5% 和 65.0%($P<0.01$)。结论 p38 MAPK 和 JNK 参与 AngⅡ对休克血管反应性的保护作用。

【关键词】 休克;血管紧张素Ⅱ;p38 MAPK;JNK;血管反应性
【中图法分类号】 R363.22;R605.971;R972.5 【文献标志码】 A

Role of angiotensin Ⅱ-activated p38 MAPK and JNK in protective vascular responses following hemorrhagic shock in rats

Yang Guangming, Xu Jing, Li Tao, Tang Jing, 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 role of angiotensin Ⅱ (AngⅡ)-activated p38 MAPK and JNK in vascular protective responses following hemorrhagic shock in rats. Methods Eighty SD rats with hemorrhagic shock (40 males and 40 females), weighing 200 to 230 g, were enrolled in this study. Effect of AngⅡ on the activity of p38 MAPK and JNK was observed in superior mesenteric artery (SMA) of rats after hemorrhagic shock. Effects of AngⅡ-activated p38 MAPK and JNK on vascular protective responses after hemorrhagic shock in rats were observed using the p38 MAPK and JNK antagonists (SB203580 and SP600125). Results The activity of p38 MAPK was increased after early hemorrhagic shock and then decreased after late hemorrhagic shock. The activity of p38 MAPK was 201.2% and 53.2% higher in rats with hemorrhagic shock than in normal controls at 0.5 h and 2 h after hemorrhagic shock, respectively ($P<0.01$). The activity of JNK was increased with the prolongation of hemorrhagic shock, which was 308.8% higher in rats with hemorrhagic shock than in normal controls at 2 h after hemorrhagic shock ($P<0.01$). AngⅡ given at the late hemorrhagic shock could significantly increased the activity of p38 MAPK and JNK and the contractile response of SMA. SB203580 and SP600125 inhibited the AngⅡ-activated p38 MAPK and JNK activity, which was decreased to 52.9% and 44.8%, respectively ($P<0.05$), and suppressed the increased vascular reactivity due to AngⅡ-activated p38 MAPK and JNK, which was decreased to 60.5% and 65.0%, respectively ($P<0.01$). Conclusion p38 MAPK and JNK are involved in the effect of AngⅡ on vascular protective responses following hemorrhagic shock in rats.

【Key words】 shock; angiotensin Ⅱ; p38 MAPK; JNK; vascular reactivity

Supported by the National Basic Research of China (973 Program, 2005CB522601), the Key Program of National Natural Science Foundation (30830053), the National Natural Science Funds for Distinguished Young Scholars (30901559), the Innovation Group Plan of Ministry of Education (IRT0712) and the Research Foundation of Third Military Medical University (2008XG136). Corresponding author: Liu Liangming, Tel: 86-23-68757421, E-mail: E-mail: Liuliangming2002@Yahoo.com

【基金项目】 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2005CB522601);国家自然科学基金重点项目(30830053);国家自然科学基金青年基金(30901559);教育部创新团队资助计划(IRT0712);第三军医大学科研基金(2008XG136)
【通信作者】 刘良明,电话:(023)68757421,E-mail:Liuliangming2002@Yahoo.com

血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ,AngⅡ)是肾素-血管紧张素系统中最重要的活性物质,在心血管功能调节中具有重要的作用[1]。本实验室前期研究发现,AngⅡ(10^{-9} mol/L)能够明显恢复失血性休克动物肠系膜动脉血管对儿茶酚胺类物质的收缩反应性,提示它对休克引起的血管收缩功能损伤具有保护作用[2]。p38 MAPK和JNK是丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族的重要成员,在细胞生长、发育、死亡、应答外界刺激和炎症反应等方面起着重要作用。本研究拟采用大鼠失血性休克模型,观察休克后大鼠肠系膜上动脉(superior mesenteric artery,SMA)血管组织中p38 MAPK和JNK的活性变化以及AngⅡ处理对休克血管p38 MAPK和JNK活性的影响,并采用p38 MAPK和JNK的特异性拮抗剂为工具药,观察阻断p38 MAPK和JNK对AngⅡ诱导的失血性休克血管反应性保护作用的影响,探讨AngⅡ能否通过激活p38 MAPK和JNK发挥调节休克血管反应的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD大鼠80只,体质量200~230 g,雌雄各半,由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供。

1.2 主要试剂

p38 MAPK抑制剂SB203580、JNK抑制剂SP600125、血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)、氟化钠(NaF)、钒酸钠(Na_3VO_4)、β-巯基乙醇、抗β-actin单克隆抗体均购自美国Sigma公司,p38 MAPK活性分析试剂盒为美国Cell Signaling公司产品,兔抗大鼠JNK和p-JNK抗体购自美国Santa Cruz公司,电泳相关试剂购自美国Promega公司,蛋白酶抑制剂cocktail、辣根过氧化物酶标记的兔抗小鼠IgG和Supersignal发光增强试剂盒购自美国Pierce公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.3 大鼠失血性休克模型的建立和实验分组

采用本实验室常用方法复制失血性休克模型[3]:实验前12 h禁食、自由饮水。实验当日用3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉后,右侧股动脉插管,经插管注射肝素钠生理盐水(500 U/kg)抗凝。术毕,大鼠稳定10 min,然后经股动脉插管10 min内放血至血压40 mmHg,并按实验分组维持不同时间,建立不同时期的休克模型。然后处死大鼠,取肠系膜上动脉,制成血管环用于血管反应性测定,其余部分用于提取组织蛋白检测p38 MAPK和JNK活性。

实验包括2个部分,实验1分为5组:正常对照组、休克10 min组、休克30 min组、休克1 h组、休克2 h组,观察休克后不同时期p38 MAPK和JNK的活性水平及血管反应性变化。按照实验分组分别维持大鼠血压在40 mmHg 10、30 min、1、2 h,然后取肠系膜上动脉制备血管环和提取组织蛋白,正常组大鼠插管放置2 h后活杀取SMA。实验2分为5组:正常对照组、休克2 h组、休克2 h+血管紧张素Ⅱ(AngⅡ,10^{-9} mol/L)组、休克2 h+AngⅡ+SB203580(10^{-5} mol/L,p38 MAPK抑制剂)组、休克2 h+AngⅡ+SP600125(10^{-5} mol/L,JNK抑制剂)组,观察AngⅡ预处理对休克血管组织p38 MAPK和JNK活性的影响及其在血管反应性中的作用。取失血性休克2 h大鼠肠系膜上动脉,AngⅡ组用AngⅡ(10^{-9} mol/L)孵育15 min;AngⅡ+SB203580和AngⅡ+SP600125组先分别用SB203580(10^{-5} mol/L)和SP600125(10^{-5} mol/L)预孵育20 min,然后用AngⅡ孵育15 min,再观察血管组织中p38 MAPK和JNK的活性水平和血管环的收缩反应性变化。

1.4 p38 MAPK和JNK活性检测

采用免疫沉淀法纯化蛋白并按照p38 MAPK活性分析试剂盒(Cell Signaling公司)说明检测p38 MAPK活性。主要步骤为:提取血管组织总蛋白并测定蛋白含量,取等量蛋白,加入交联琼脂糖肼珠的小鼠抗p-p38 MAPK单克隆抗体,4 ℃孵育过夜。免疫复合物与ATP和底物活化转录因子2融合蛋白(ATF-2 Fusion Protein,p38 MAPK活性分析试剂盒自带)反应30 min后终止,反应产物经10% SDS-PAGE电泳后,转印至硝酸纤维素膜。常规方法用5%脱脂奶粉封闭、加入抗p-ATF-2抗体(1∶1 000)和辣根过氧化物酶标记的二抗稀释液(1∶10 000)孵育,化学发光法检测蛋白条带。p38 MAPK的活性水平以磷酸化的p38 MAPK免疫沉淀产物催化底物ATF-2磷酸化的程度来反映。

JNK的活性状态通过Western blot方法检测血管组织内JNK和p-JNK的表达变化来反映。血管组织加入蛋白提取液(含Tris-HCl 50 mmol/L,pH 6.8,EDTA 2 mmol/L,EGTA 1 mmol/L,β-巯基乙醇0.1%,氟化钠10 mmol/L,钒酸钠1 mmol/L,Triton X-100 1%,蛋白酶抑制剂cocktail)常规方法提取组织总蛋白,取等蛋白量的各组样本用10% SDS-PAGE进行蛋白电泳,并转印至硝酸纤维素膜,用抗JNK抗体(1∶200)、p-JNK抗体(1∶200)和抗β-actin抗体(1∶2 000)孵育。化学发光法检测蛋白条带,Quantity One分析软件测定图像的光密度值。

1.5 血管反应性测定

采用离体血管环张力测定技术检测血管反应性[2]。根据实验分组给予AngⅡ或p38 MAPK和JNK的抑制剂孵育后,按累积浓度法向浴槽K-H液中依次加入NE,使其终浓度分别为10^{-9}、10^{-8}、10^{-7}、10^{-6}、10^{-5} mol/L,记录不同NE浓度下血管环产生的最大收缩张力(E_{max}),以单位组织湿重的张力(force/mg)为量化标准,用E_{max}和量效曲线评价血管反应性。

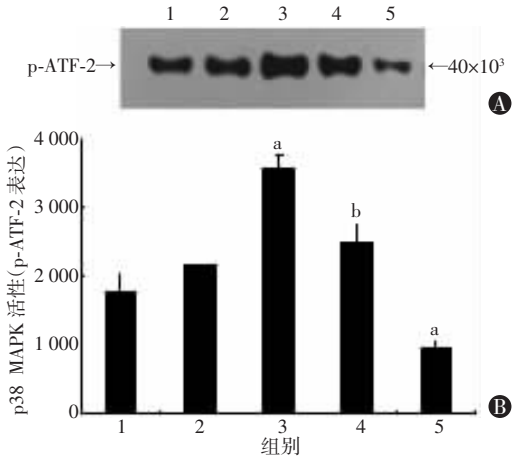
1.6 统计学分析

所有数据均以$\bar{x} \pm s$表示,组间比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 失血性休克不同时期肠系膜动脉p38 MAPK和JNK活性及血管反应性变化

失血性休克后30 min肠系膜血管组织p38 MAPK活性较正常对照组显著升高($P<0.01$),以后逐渐降低,在休克后2 h明显低于正常对照组($P<0.01$,图1)。JNK的蛋白表达在休克不同时期无明显变化,其磷酸化水平随着休克时间的延长而逐渐升高,p-JNK的表达在休克后30 min、1 h和2 h显著高于正常对照组($P<0.01$,图2)。失血性休克大鼠的血管反应性变化呈现先升高后降低的变化趋势(图3)。

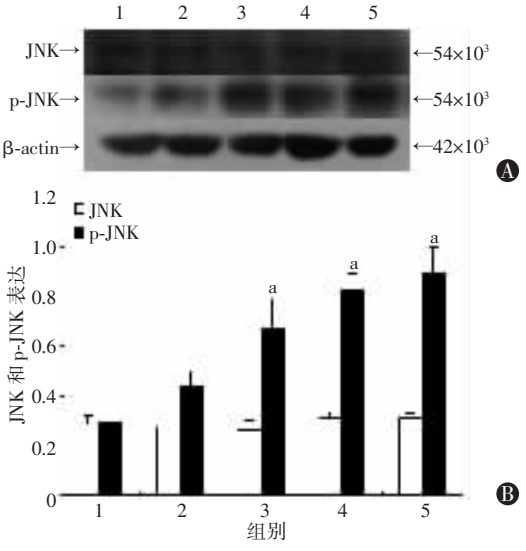


1：正常组 2：休克 10 min 组 3：休克 30 min 组 4：休克 1 h 组 5：休克 2 h 组

A：Western blot 电泳结果 B：半定量分析结果

a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与正常对照组比较

图 1　休克后不同时期 p38 MAPK 的活性水平的变化

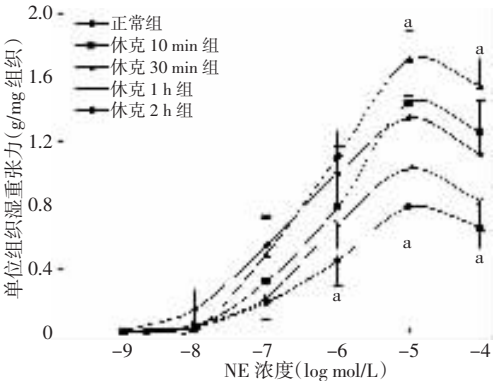


1：正常组 2：休克 10 min 组 3：休克 30 min 组 4：休克 1 h 组 5：休克 2 h 组

A：Western blot 电泳结果 B：半定量分析结果

a：$P<0.01$，与正常对照组比较

图 2　休克后不同时期 JNK 和 p-JNK 的表达变化

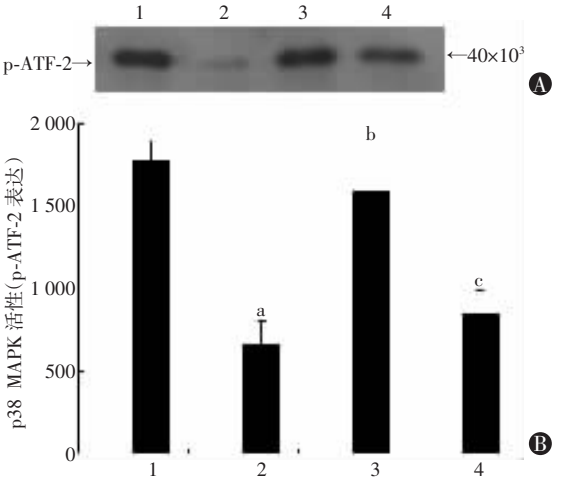


a：$P<0.01$，与正常对照组比较

图 3　休克后不同时期血管反应性变化

2.2　AngⅡ对休克血管 p38 MAPK 和 JNK 活性的影响及其在血管反应性中的作用

AngⅡ(10^{-9} mol/L)处理可使休克大鼠肠系膜动脉血管组织内 p38 MAPK 活性明显升高，p38 MAPK 的抑制剂 SB203580 (10^{-5} mol/L)可拮抗 AngⅡ诱导的 p38 MAPK 活性升高的作用($P<0.05$，图 4)。AngⅡ(10^{-9} mol/L)对休克血管 JNK 的蛋白表达无明显影响，而使其磷酸化水平升高，JNK 的抑制剂 SP600125(10^{-5} mol/L)可拮抗 AngⅡ的作用($P<0.01$，图 5)。同时 AngⅡ也升高了休克大鼠的血管反应性，并且这一作用可被 SB203580 和 SP600125 拮抗($P<0.01$，图 6)。

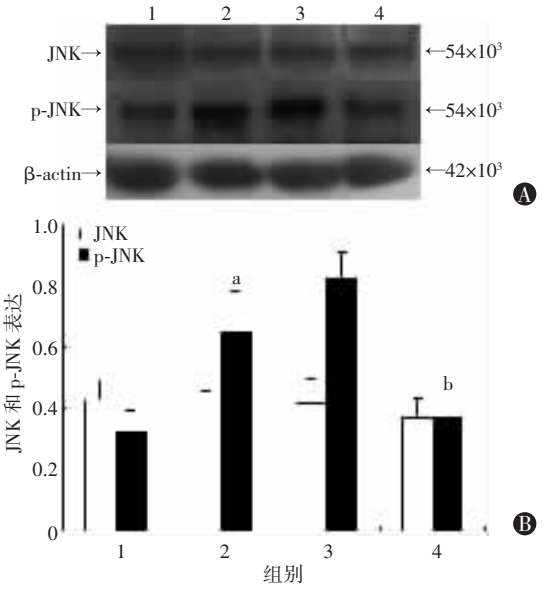


1：正常对照组 2：休克 2 h 组 3：休克 + AngⅡ组 4：休克 + AngⅡ + SB203580 组

A：Western blot 电泳结果 B：半定量分析结果

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

图 4　AngⅡ处理对 p38 MAPK 活性的影响

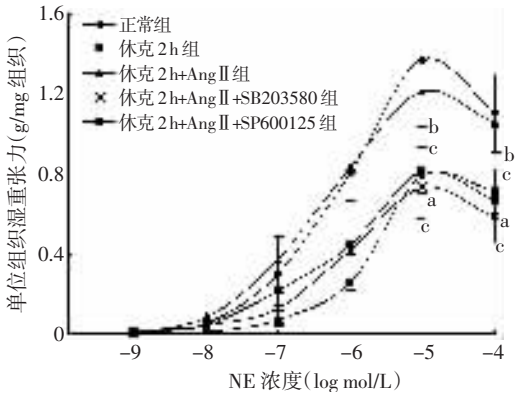


1：正常对照组 2：休克 2 h 组 3：休克 + AngⅡ组 4：休克 + AngⅡ + SP600125 组

A：Western blot 电泳结果 B：半定量分析结果

a：$P<0.05$，与正常对照组比较 b：$P<0.01$，与休克 + AngⅡ组比较

图 5　AngⅡ处理对 JNK 和 p-JNK 表达的影响



1：正常对照组 2：休克2 h组 3：休克 + AngⅡ组 4：休克 + AngⅡ + SB203580组 5：休克 + AngⅡ + SP600125组
a：$P<0.01$，与正常对照组比较 b：$P<0.01$，与休克2 h组比较；c：$P<0.01$，与休克 + AngⅡ组比较

图6　AngⅡ和p38 MAPK与JNK抑制剂对休克血管反应性的影响

3　讨论

血管低反应性是严重创伤/休克以及临床许多重症都存在的一种血管舒缩功能障碍，严重影响了这些疾病的救治[4,5]，阐明其发生机制和寻找有效的恢复休克血管低反应性的药物具有重要意义。我们前期研究发现，给予10^{-9}mol/L的AngⅡ并不引起直接的血管收缩作用，而是能够明显增加失血性休克大鼠肠系膜动脉血管对去甲肾上腺素的收缩反应，升高休克血管反应性[2]。AngⅡ的这一作用不能用AngⅡ通过其1型受体介导的升高胞内钙离子浓度来诱导血管收缩的经典途径来解释，因此本实验对AngⅡ恢复休克血管反应性的可能机制做了初步探讨。

MAPK作为在细胞质信号转导中起重要作用的一类丝/苏氨酸蛋白激酶，与AngⅡ的关系已多见报道，但主要集中在细胞的生长、增殖和凋亡等方面[6,7]。近来研究显示，在NE、5-羟色胺和内皮素-1等血管活性药物诱导血管收缩、调节血管紧张性过程中，发现p38 MAPK和JNK具有重要的调节作用[8,9]。但是，在休克状态下，血管平滑肌细胞中p38 MAPK和JNK的变化情况如何，AngⅡ恢复休克血管反应性的作用是否与这2个分子有关，目前尚少见文献报道。实验采用大鼠失血性休克模型，观察了AngⅡ对休克血管p38 MAPK和JNK活性的调节作用及其在休克血管反应性保护中的作用。结果显示，失血性休克大鼠肠系膜上动脉血管组织中p38 MAPK的活性在早期升高、晚期降低，而JNK的磷酸化水平在休克后逐渐升高。在休克晚期给予AngⅡ处理能明显升高休克血管p38 MAPK的活性和JNK的磷酸化水平，同时AngⅡ处理也升高了休克血管反应性，而p38 MAPK和JNK的特异性拮抗剂可拮抗AngⅡ诱导的p38 MAPK和JNK激活以及休克血管反应性升高。提示AngⅡ可能通过激活p38 MAPK和JNK发挥对休克血管反应性的保护作用。

文献[10]报道，MAPK可通过多条途径调节肌球蛋白轻链磷酸酶（MLCP）和肌球蛋白轻链激酶（MLCK），改变平滑肌细胞舒/缩调节的关键分子——肌球蛋白轻链（MLC）磷酸化状态，从而调节平滑肌的舒/缩功能。如p38 MAPK激活后可通过磷脂酶A_2-花生四烯酸（AA）途径调节MLCP的活性，诱导平滑肌收缩。此外，MAPK还可以通过作用于一些细肌丝连接蛋白如钙介导蛋白（CaD）、调宁蛋白（CaP）等，来参与血管平滑肌的舒缩调节[11]。但是，AngⅡ激活p38 MAPK和JNK后是通过哪条途径调节休克血管反应性尚不清楚。

参考文献：

[1] Mehta P K, Griendling K K. Angiotensin Ⅱ cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 292(1): C82 - C97.

[2] L i T, L iu 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.

[3] 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.

[4] Liu L M, Ward J A, Dubick M A. Hemorrhage-induced vascular hyporeactivity to norepinephrine in select vasculatures of rats and the roles of nitric oxide and endothelin[J]. Shock, 2003, 19(3): 208 - 214.

[5] 徐竞，杨光明，李 涛，等. 缺血预适应诱导的失血性休克血管反应性和钙敏感性保护[J]. 第三军医大学学报，2010，32(17)：1807 - 1811.

[6] 陈鹏，杨成明，曾春雨，等. JNK信号途径通过内质网应激反应介导心肌梗死后心力衰竭小鼠心肌组织的凋亡[J]. 第三军医大学学报，2009，31(24)：2455 - 2458.

[7] 段世刚，李大江，陈龙，等. MAPK信号通路对人胆管癌细胞Fas配体基因表达的调节及其机制的初步探讨[J]. 第三军医大学学报，2010，32(3)：224 - 228.

[8] Lee H M, Won K J, Kim J, *et al*. Endothelin-1 induces contraction via a Syk-mediated p38 mitogen-activated protein kinase pathway in rat aortic smooth muscle[J]. J Pharmacol Sci, 2007, 103(4): 427 - 433.

[9] Matsumoto T, Kakami M, Kobayashi T, *et al*. Gender differences in vascular reactivity to endothelin-1(1-31) in mesenteric arteries from diabetic mice[J]. Peptides, 2008, 29(8): 1338 - 1346.

[10] Somlyo A P, Somlyo A V. Signal transduction and regulation in smooth muscle[J]. Nature, 1994, 372(6503): 231 - 236.

[11] Lee Y R, Lee C K, Park H J, *et al*. c-Jun N-terminal kinase contributes to norepinephrine-induced contraction through phosphorylation of caldesmon in rat aortic smooth muscle[J]. J Pharmacol Sci, 2006, 100(2): 119 - 125.

（收稿 2010-06-23 修回 2010-08-21）
（编辑　王　红）