文章编号:1000-5404(2011)03-0221-04

论著

白介素-1β通过改变PKC、Rho激酶活性调节家兔内毒素休克后肠系膜上动脉钙敏感性

梁家林,贺教江,臧家涛,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** 观察在内毒素休克及白介素-1β介导家兔肠系膜上动脉(superior mesenteric artery,SMA)钙敏感性改变中SMA PKC、Rho激酶活性的变化。**方法** 健康成年家兔96只,雌雄不拘,分为两实验大组:①内毒素休克组(包括5小组:正常对照组、LPS 30 min组、LPS 1 h组、LPS 2 h组和LPS 4 h组);②IL-1β处理组(包括3小组:0 ng/ml IL-1β组、50 ng/ml IL-1β组、100 ng/ml IL-1β组),每小组12只家兔。经耳缘静脉注入1 mg/kg LPS(O_{111}:B_4)复制内毒素休克模型,在给LPS前及给LPS后30 min,1、2、4 h取家兔SMA,提取其PKC及Rho激酶蛋白并纯化,检测PKC及Rho激酶活性的变化,并与内毒素休克后血管钙敏感性变化进行相关分析;无菌条件下取正常成年家兔SMA,在0、50、100 ng/ml IL-1β作用12 h后,检测其PKC及Rho激酶活性的变化,并与IL-1β处理后家兔SMA钙敏感性变化进行相关分析。**结果** 在给LPS后30 min至1 h成功复制出内毒素休克模型,与正常对照组相比,PKC、Rho激酶活性均在给LPS 30 min后升高($P<0.01$),在2 h及4 h后均降低($P<0.01$),与钙敏感性变化均呈显著正相关($r=0.912$和0.968,$P<0.05$)。与0 ng/ml IL-1β组相比,100 ng/ml IL-1β能使PKC、Rho激酶活性明显降低($P<0.05$),与钙敏感性变化均呈显著正相关($r=0.922$和0.934,$P<0.05$)。**结论** IL-1β能通过改变PKC、Rho激酶活性来调节家兔肠系膜上动脉钙敏感性,IL-1β可能通过改变PKC、Rho激酶活性调节家兔内毒素休克后肠系膜上动脉钙敏感性变化。

【关键词】 内毒素休克;白介素-1β;钙失敏;PKC;Rho激酶
【中图法分类号】 R322.121;R364.14;R392.32 【文献标志码】 A

IL-1β regulates calcium sensitivity in superior mesenteric artery by changing PKC and Rho kinase activity in rabbits with endotoxic shock

Liang Jialin, He Jiaojiang, Zang Jiatao, 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 role of IL-1β in regulating calcium sensitivity in superior mesenteric artery (SMA) by changing the PKC and Rho kinase activity in rabbits with endotoxic shock. **Methods** Ninety-six adult rabbits were divided into endotoxic shock group (including normal control subgroup, and 30 min, 1 h, 2 h and 4 h LPS subgroups) and IL-1β group (including 0 ng/ml, 50 ng/ml, and 100 ng/ml IL-1β subgroups), 12 rabbits in each subgroup. Rabbits were given LPS at 1mg/kg (O_{111}:B_4) *via* marginal ear vein to induce endotoxic shock. Before or 30 min, and 1, 2, and 4 h after LPS was given, SMA was collected from rabbits for measuring PKC and Rho kinase activity, and their correlation to vascular calcium sensitivity was evaluated. Effects of IL-1β at different concentrations (0, 50 and 100 ng/ml) on PKC and Rho kinase activity in SMA were observed, and their correlation to calcium sensitivity was evaluated. **Results** An endotoxic shock model was successfully established at 30 min – 1 h after LPS was administrated. The PKC and Rho kinase activity in SMA was significantly higher in IL-1β group than in control group at 30 min – 1 h after LPS was given and significantly lower in IL-1β group than in control group at 2 h and 4 h after LPS was given ($P<0.01$). The changes of PKC and Rho kinase activity were positively correlated with the calcium sensitivity in SMA ($r=0.912$ and 0.968, $P<0.05$). The PKC and Rho kinase activity in SMA *in vitro* was reduced much more in the 100 ng/ml IL-1β subgroup than in the 0 ng/ml IL-1β subgroup ($P<0.05$). The changes of PKC and Rho kinase activity were positively correlated with the calcium sensitivity in SMA of the 0, 50 and 100 ng/ml

【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

IL-1β subgroups ($r = 0.922$ and 0.934, $P < 0.05$). **Conclusion** IL-1β may regulate the calcium sensitivity in SMA of rabbits with endotoxic shock by changing the PKC and Rho kinase activity.

[Key words] endotoxic shock; interleukin-1; calcium desensitization; PKC; Rho kinase

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

现有研究表明,IL-1β 在内毒素休克的病理生理过程中起重要作用,特别是在血管反应性调节中作用明显:体内外实验研究均显示 IL-1β 能够介导血管收缩反应性下降[1],目前认为其主要通过 NO 和前列腺素等物质的作用及开通 K_{ATP}、BK_{Ca} 通道引起血管平滑肌细胞膜超极化来介导的[2-3]。除上述机制外,本室前期研究发现钙失敏在内毒素休克后期血管低反应性中有重要作用,不仅如此,对于 IL-1β 体外单因素处理后的血管,同样存在钙失敏现象[4]。研究显示 PKC、Rho 激酶是介导血管钙敏感性变化的重要的酶[5]。那么 IL-1β 是否通过改变这两个关键酶的活性而介导内毒素休克后血管钙敏感性变化的呢?本室前期研究发现家兔内毒素休克后血管钙敏感性早期(给 LPS 1 h 内)升高,晚期(给 LPS 2 h 后)下降,内毒素休克后血清 IL-1β 水平变化与 SMA 钙敏感性变化趋势呈显著负相关,100 ng/ml IL-1β 体外孵育家兔 SMA,能导致其钙敏感性明显下降,PKC、Rho 激酶的激动剂能改善 IL-1β 体外孵育家兔 SMA 的钙敏感性,而 Rho 激酶的拮抗剂却加重其钙失敏[4]。提示 IL-1β 可能对 PKC 和 Rho 激酶有作用,但证据不足,为此本实验测定了 PKC、Rho 激酶在整体动物(内毒素休克)和离体实验(IL-1β 体外处理)血管中的活性变化,初步探讨 IL-1β 介导内毒素休克血管钙失敏的机制,为内毒素休克后血管钙失敏的改善提供作用靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验用动物按照第三军医大学动物实验伦理学会规定使用及尸体处理。普通级成年家兔 96 只,雌雄不拘,体质量 2.0~2.5 kg,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。动物实验前 12 h 禁食,自由饮水。

1.2 主要试剂与仪器

脂多糖(LPS,*Escherichia coli* O_{111}: B_4,Sigma 公司),重组人白介素-1β(IL-1β,Sigma 公司),DMEM/F-12 1∶1及新西兰胎牛血清(HyClone 公司),Pep*Tag*® 非放射性蛋白激酶 C 检测系统(Promega),CycLex® Rho-kinase Assay Kit(MBL),VDS-CL 凝胶成像仪(Amersham Biosciences),稳压稳流电泳仪(Bio-Rad),多功能读板机(Bio-TEDSynergy HT),CO_2 培养箱(SHEL/JB),1 ml 的 DEAE 纤维素柱和 HiTrap™ Q HP 柱(GE Healthcare)。

1.3 动物分组及处理

1.3.1 内毒素休克模型的复制及标本获取 健康成年家兔 60 只,分为 5 组:正常对照组、LPS 30 min 组、LPS 1 h 组、LPS 2 h 组和 LPS 4 h 组,每组 12 只,经耳缘静脉注入 1 mg/kg LPS,复制内毒素休克模型[4],在给 LPS 前及给 LPS 后 30 min,1、2、4 h 用 2.0~3.0 ml 3% 戊巴比妥钠经耳缘静脉麻醉后手术开腹取肠系膜上动脉(主干+分支),去除其周围脂肪和结缔组织,将每组标本一分为二,一半用于 PKC 活性测定,一半用于 Rho 激酶活性测定,将其保存于 -70 ℃冰箱备用。

1.3.2 IL-1 体外单因素处理 健康成年家兔 36 只,分为空白对照组(0 ng/ml IL-1β 组),50 ng/ml IL-1β 组,100 ng/ml IL-1β 组,每组 12 只,用 2.0~3.0 ml 3% 戊巴比妥钠经耳缘静脉麻醉后手术开腹取肠系膜上动脉(主干+分支),去除其周围脂肪和结缔组织,将 SMA、IL-1β(0、50、100 ng/ml)、1 ml 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基混合培养,在 37℃细胞培养箱中孵育 12 h,取出血管,用 PBS 液清洗后,将其保存于 -70 ℃冰箱备用。

1.4 PKC 活性测定

将上述 1.3 中保存的血管,用液氮将组织研碎呈粉末状后移入 EP 管中,用 PKC 抽提液(25 mmol/L Tris-HCl, pH = 7.4, 0.5 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L EGTA, 0.05% Triton® X-100, 10 mmol/L beta-mercaptoethanol,临用时加 1% 蛋白酶抑制剂)提取其蛋白,漩涡混合器上震荡 30 min 后,在 4 ℃,用 14 000 × *g* 离心 5 min,保存上清。用 PKC 抽提液 2 ml 预平衡 1 ml 的 DEAE 纤维素柱,将上述离心获得的上清液过柱,用 2 ml PKC 抽提液洗柱子,然后用 1 ml 含 200 mmol/L NaCl 的 PKC 抽提液洗脱含有 PKC 的组分,过柱完 0.9 ml 时开始收集 5 滴洗脱液,作为纯化的 PKC 溶液。按试剂盒步骤测定纯化的 PKC 酶活性,活性鉴定采用凝胶电泳光密度半定量法,以 C1 肽的磷酸化条带的光密度作为 PKC 的相对酶活性水平。

1.5 Rho 激酶活性测定

将上述 1.3 中保存的血管,用液氮将组织研碎呈粉末状后移入 EP 管中,用 Rho 激酶抽提液(50 mmol/L Tris-HCl, pH = 8.0, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 0.1% Triton® X-100, 10 mmol/L beta-mercaptoethanol, 10 mmol/L NaF, 2 mmol/L Na_3VO_4,临用时加 1% 蛋白酶抑制剂)提取其蛋白,漩涡混合器上震荡 30 min 后,在 4 ℃,用 30 000 × *g* 离心抽提液 30 min,保存上清。用 Q-buffer(20 mmol/L Tris-HCl, pH = 8.0, 0.1% Triton X-100, 0.5 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 5 mmol/L beta-glycerophosphate, 2 mmol/L NaF, 2 mmol/L Na_3VO_4, 5 mmol/L beta-mercaptoethanol) 2 ml 预平衡 1 ml 的 HiTrap™ Q HP 柱,将上述离心获得的上清过柱,用 1 ml Q-buffer 洗柱子,再用 1 ml 含 200 mmol/L NaCl 的 Q-Buffer 洗脱不含 Rho 激酶的组分,然后用 1 ml 含 300 mmol/L NaCl 的 Q-buffer 洗脱含有 Rho 激酶的组分,过柱完 0.9 ml 时开始收集 5 滴洗脱液,作为纯化的 Rho 激酶溶液。按试剂盒步骤测定纯化 Rho 激酶的活性,

以450 nm处的光密度值[D(450)]代表Rho激酶的活性大小。

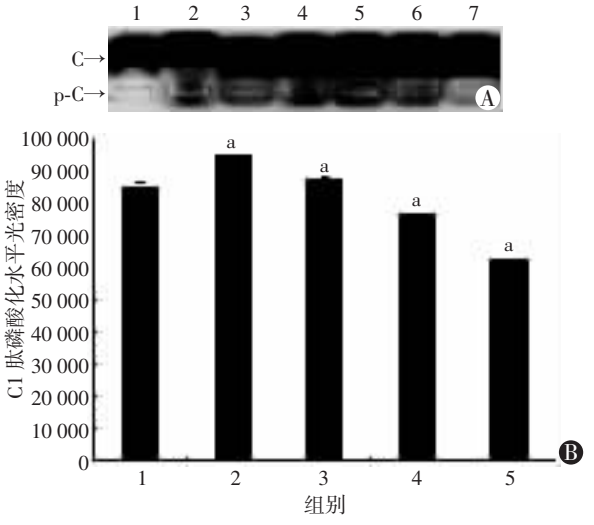
1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，利用SPSS 18.0统计软件，多组间数据采用单因素和或双因素方差分析，对于组间有显著性差异的，用LSD-t检验方法进行组间的两两比较，酶活性与钙敏感性变化采用Pearson进行相关分析。

2 结果

2.1 内毒素休克后SMA PKC活性的变化

家兔在给LPS后30 min至1 h内平均动脉压下降30%以上，成功复制出家兔内毒素休克模型，PKC发挥其酶活性，能使PKC特异的短肽底物PepTag® C1短肽(带正电荷)发生磷酸化变成磷酸化C1肽(带负电荷)，从而通过电泳分开，故磷酸化C1肽的光密度大小反应了PKC的相对活性强弱，在给LPS后30 min、1、2、4 h取其SMA测PKC活性。与正常对照组相比，LPS 30 min和1 h组PKC活性出现增强($P<0.05$)，后开始降低，至LPS 2 h组及LPS 4 h组其PKC活性明显降低($P<0.05$，图1)。

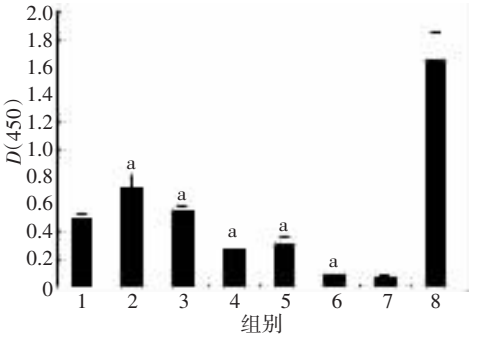


A：电泳结果 1：阴性对照组 2：阳性对照组 3：正常对照组 4～7：分别指LPS 30 min、1、2、4 h组 C：非磷酸化C1肽 p-C：磷酸化C1肽
B：磷酸化C1肽光密度定量分析 a：$P<0.05$，与正常对照组比较，1：正常对照组 2～5：分别指LPS 30 min、1、2、4 h组

图1 给LPS后不同时相点SMA中PKC磷酸化C1肽活性的变化

2.2 内毒素休克后SMA Rho激酶活性的变化

Rho激酶能使底物重组MBS T696发生磷酸化而与HRP标记的抗磷酸化MBS T696 (AF20) 抗体结合，从而获得有颜色的产物，在450 nm测其光密度大小，能反映Rho激酶的相对活性强弱。与正常对照组相比，家兔在给LPS后30 min和1 h Rho激酶活性增强($P<0.05$)，而在LPS 2 h及LPS 4 h组Rho激酶活性出现明显降低($P<0.05$)，扣除阴性对照组的Rho激酶活性，10^{-4} mol/L Rho激酶特异性拮抗剂Y27632几乎能全抑制正常对照组的Rho激酶活性(图2)，说明所提纯的Rho激酶含其他影响活性测定的蛋白含量很少。

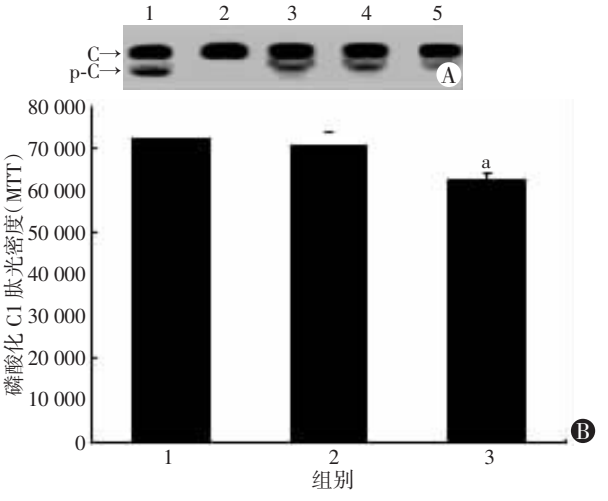


a：$P<0.05$，与正常对照组比较，1：正常对照组 2～5：分别指LPS 30 min、1、2、4 h组 6：指正常对照组在10^{-4} mol/L Rho激酶拮抗剂Y27632作用下的Rho激酶活性 7：指阴性对照组，它检测的是过Q柱的含0.3 mol/L NaCl的Q-buffer的Rho激酶活性 8：阳性对照组，它检测的是10 mU Rho激酶的活性

图2 给LPS后不同时相点Rho激酶活性的变化

2.3 IL-1β对家兔离体SMA PKC活性的影响

与空白对照组相比，100 ng/ml IL-1β体外处理SMA 12 h能够明显降低PKC的活性($P<0.05$)，而50 ng/ml IL-1β却不能明显改变PKC活性(图3)。



A：电泳结果 1：阴性对照组 2：阳性对照组 3：空白对照组 4，5：分别指50 ng/ml、100 ng/ml IL-1β组 C：非磷酸化C1肽 p-C：磷酸化C1肽
B：磷酸化C1肽光密度定量分析 a：$P<0.05$，与空白对照组比较，1：空白对照组 2：50 ng/ml IL-1β组 3：100 ng/ml IL-1β组

图3 IL-1β对家兔离体SMA PKC磷酸化C1肽活性的影响

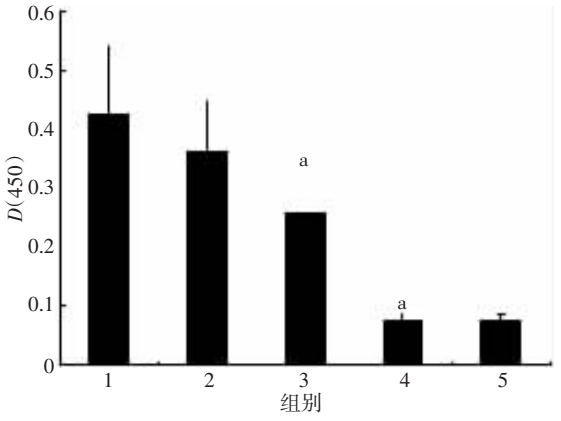
2.4 IL-1β对离体SMA Rho激酶活性的影响

与正常对照组相比，50 ng/ml IL-1β组已有降低Rho激酶活性的趋势，但是无明显差异($P>0.05$)，但是100 ng/ml IL-1β组却能明显降低Rho激酶活性($P<0.05$)，10^{-4} mol/L的Y27632能够显著抑制空白对照组的Rho激酶活性($P<0.05$，图4)。

2.5 PKC和Rho激酶活性变化与血管钙敏感性变化的相关性

家兔给LPS后SMA钙敏感性变化与给LPS后SMA中PKC、Rho激酶活性变化的相关系数分别为($r=0.912$ 和

0.968，$P<0.05$），而 IL-1β 处理后 SMA 的钙敏感性变化与 IL-1β 处理后 SMA 中 PKC、Rho 激酶活性变化的相关系数分别为（$r=0.922$ 和 0.934，$P<0.05$）。



a：$P<0.05$，与空白对照组比较，1：空白对照组；2：50 ng/ml IL-1β 组；3：100 ng/ml IL-1β 组；4：空白对照组在 10^{-4} mol/L Y27632 作用下的 Rho 激酶活性

图4 IL-1β 对家兔离体 SMA Rho 激酶活性的影响

3 讨论

体内外实验均证明，IL-1β 对体内外血管低反应性的产生有重要的调节作用，多种机制参与了该调节作用，如 iNOS、COX-2 表达增加，K_{ATP}、BK_{Ca} 通道激活[2-3]等。但目前纠正这些已知的机制尚不能完全纠正内毒素休克晚期及体外长时间 IL-1β 处理血管的反应性，提示均在着其他机制。本实验室前期研究发现在内毒素休克后及 IL-1β 体外处理之血管环均存在钙失敏现象，它严重影响着内毒素休克后血管平滑肌的收缩能力，对血管低反应性有重要介导作用。并发现 PKC、Rho 激酶的激动剂对改善血管钙敏感性有重要作用，Rho 激酶拮抗剂能加重钙失敏现象[4]。

研究显示 PKC、Rho 激酶是介导血管钙敏感性变化的重要的酶，前者能磷酸化 CPI-17，后者能磷酸化 CPI-17 和 MLCP，磷酸化的 CPI-17 和 MLCP 均能够抑制 MLCP 的活性，使得 MLCK 和 MLCP 的活性比值上升，从而 MLC20 的磷酸化水平升高，增加血管钙敏感性[5]。另研究表明 PKC 在 IL-1β 促进 COX-2[6]、iNOS[7]、基质金属蛋白酶-2[8]等表达时有重要介导作用，而 Rho 激酶在 IL-1β 刺激下其表达和功能均上调[9]，并在 IL-1β 诱导内皮细胞丝状肌动蛋白重组时有 Rho 激酶的激活[10]，可见 IL-1β 对 PKC、Rho 激酶的活性有重要调节作用。那么 IL-1β 是否通过改变 PKC、Rho 激酶活性来调节血管钙敏感性呢？我们进行了相关研究。

我们研究发现，与正常对照组相比，PKC、Rho 激酶在内毒素休克早期（30 min 至 1 h）其活性增强（$P<0.05$），而在晚期（2 h 后）其活性降低（$P<0.05$）。这与内毒素休克后血管钙敏感性的变化趋势一致[4]，两者存在显著的正相关关系。IL-1β 对离体血管作用实验发现，与空白对照组相比，50 ng/ml IL-1β 并不能明显改变离体血管的 PKC、Rho 激酶活性，而 100 ng/ml IL-1β 却能明显降低其 PKC、Rho 激酶活性，且该变化趋势与 IL-1β 体外处理血管的钙敏感性变化趋势一致[4]，两者亦存在显著的正相关关系。

我们的实验提示内毒素休克后血管钙敏感性的变化与 PKC、Rho 激酶的活性改变有关，而 IL-1β 能够通过调节家兔离体血管 Rho 激酶、PKC 的活性变化来调节血管钙敏感性，可推测 IL-1β 可能通过改变 Rho 激酶、PKC 活性调节内毒素休克后血管钙敏感性，但是还需进一步证实，而且 IL-1β 是通过什么机制来调节 Rho 激酶、PKC 活性的，目前尚不清楚，还需进一步的研究。

参考文献：

[1] Vila E, Salaices M. Cytokines and vascular reactivity in resistance arteries[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 288(3): H1016-H1021.

[2] Takizawa S, Ozaki H, Karaki H. Possible involvement of K+ channel opening to the interleukin-1 beta-induced inhibition of vascular smooth muscle contraction[J]. J Vet Med Sci, 1999, 61(4): 357-360.

[3] Gao Y, Yang Y, Guan Q, *et al*. IL-1beta modulate the Ca(2+)-activated big-conductance K channels (BK) via reactive oxygen species in cultured rat aorta smooth muscle cells[J]. Mol Cell Biochem, 2010, 338(1/2): 59-68.

[4] 梁家林，李涛，杨光明，等. 白介素-1β 对家兔内毒素休克血管钙敏感性的调节作用及与 Rho 激酶和 PKC 的关系[J]. 第三军医大学学报，2010，32(20)：2158-2162.

[5] Somlyo A P, Somlyo A V. Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase[J]. Physiol Rev, 2003, 83(4): 1325-1358.

[6] Nakao S, Inoue D. Involvement of protein kinase C in IL-1beta-induced expression of cyclooxygenase-2 in human gingival fibroblasts[J]. J Oral Sci, 2009, 51(3): 417-423.

[7] Ginnan R, Guikema B J, Singer H A, *et al*. PKC-delta mediates activation of ERK1/2 and induction of iNOS by IL-1beta in vascular smooth muscle cells[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2006, 290(6): C1583-C1591.

[8] Mountain D J, Singh M, Menon B, *et al*. Interleukin-1beta increases expression and activity of matrix metalloproteinase-2 in cardiac microvascular endothelial cells: role of PKCalpha/beta1 and MAPKs[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 292(2): C867-C875.

[9] Hiroki J, Shimokawa H, Higashi M, *et al*. Inflammatory stimuli upregulate Rho-kinase in human coronary vascular smooth muscle cells[J]. J Mol Cell Cardiol, 2004, 37(2): 537-546.

[10] Campos S B, Ashworth S L, Wean S, *et al*. Cytokine-induced F-actin reorganization in endothelial cells involves RhoA activation[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2009, 296(3): F487-F495.

（收稿：2010-09-14 修回：2010-10-16）

（编辑 栾 嘉）