DOI:10.16016/j.1000-5404.201907039

周细胞对脓毒症大鼠血管反应性的保护作用

张紫森,刘良明 400042 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)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** 观察周细胞(pericyte, PC)对脓毒症大鼠血管舒缩反应性的保护作用。**方法** 采用盲肠结扎穿孔诱导大鼠脓毒症模型,将SD大鼠(12~14周龄,雌雄各半,体质量180~220 g)按随机单位设计方法分为4组(n=16):正常对照组、脓毒症组、常规治疗组(乳酸林格液体复苏+血管活性药多巴胺+头孢呋辛钠)、PC治疗组(PC 10^6/只+常规治疗),观察不同处理组大鼠肠系膜微动脉舒缩反应性、肠系膜微血管动静脉流速、肝肾血流量及肠系膜上动脉p-MLC_{20}表达的变化。**结果** 与正常对照组相比,脓毒症大鼠血管反应性明显降低(P<0.01);常规治疗可轻微改善脓毒症血管反应性;PC治疗后,脓毒症大鼠微动脉的舒缩反应性、组织器官的灌注量明显改善(P<0.01),肠系膜微动脉的收缩和舒张反应性分别增加至81.5%和86.9%。机制研究发现PC对脓毒症大鼠血管反应性的保护作用与血管p-MLC_{20}有关(P<0.01)。**结论** PC通过改善脓毒症大鼠血管收缩和舒张反应性从而实现了对整体器官的保护作用。

[关键词] 脓毒症;周细胞;血管反应性;p-MLC_{20}
[中图法分类号] R322.13; R363.22; R631 [文献标志码] A

Role and mechanism of pericyte in protection of vascular reactivity in septic rats

ZHANG Zisen, LIU Liangming Department 2, Institute of Surgery Research, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400042, China

[**Abstract**] **Objective** To determine the protective effects of pericytes (PCs) on the mesenteric vasomotor reactivity in septic rats. **Methods** The sepsis model of rats was established with cecal ligation and puncture (CLP). SD rats (both sexes, 12~14 weeks old, weighing 180 to 220 g) were randomly divided into normal control, sepsis, conventional treatment (CT group), and PCs+CT group, with 16 rats in each group. The rats from the CT group were given conventional fluid resuscitation (Ringer lactate liquid)+dopamine+cefuroxime, and those of the PCs+CT group were given venous injection of 10^6 cells PCs in addition. The vascular reactivity in mesenteric arteriole, velocity of red blood cells in mesenteric arteriole and venule, amounts of liver and kidney blood flow, and expression level of p-MLC_{20} in superior mesenteric artery were observed and compared among the groups. **Results** Compared with normal control group, the vascular reactivity was significantly decreased after septic shock (P<0.01). Conventional treatment slightly improved the vascular reactivity. PCs treatment significantly improved vascular hyporeactivity and organ perfusion in rats with septic shock (P<0.01), with constriction and relaxation of mesenteric arteriole increased to 81.5% and 86.9%, respectively. The protective effect of PCs on vascular reactivity was associated with the expression of p-MLC_{20}(P<0.01). **Conclusion** PCs protect the vital organ function by improving the vascular constriction and relaxation in septic rats.

[**Key words**] sepsis; pericytes; vascular reactivity; p-MLC_{20}

Supported by the Key Program of National Natural Science Foundation of China (81830065). Corresponding author: LIU Liangming, E-mail: liangmingliu@yahoo.com

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(81830065)
[通信作者] 刘良明, E-mail:liangmingliu@yahoo.com

脓毒症是由宿主对感染的反应失调引起威胁生命的器官功能障碍[1-2]。脓毒症后会引起血管低反应性,导致组织器官灌注不足,最终出现严重的多器官功能衰竭。尽管近年针对抗感染治疗及血管功能支持技术已取得较大进展,但脓毒症的病死率仍然居高不下。因此,寻找预防和治疗脓毒症休克致血管功能障碍的措施,对降低脓毒症的发生率和病死率具有重要意义。周细胞(pericyte, PC)是位于微血管系统内皮细胞基底膜侧的一种血管壁细胞,具有维持血管稳定性和调节血压的功能。以往大量的研究表明,周细胞对血管内皮屏障功能的调节发挥着重要的作用[3-4]。有研究提示,周细胞还具有调节血管舒缩的功能。如周细胞可以通过自身收缩作用调控大脑毛细血管的血流量[5]。KUTCHER等[6]研究发现,周细胞中 Rho GTPases 依赖的信号通路可引起周细胞的收缩。同时,基础研究显示,Rho 激酶能磷酸化肌球蛋白轻链磷酸酯酶(myosin light chain phosphatase, MLCP),抑制 MLCP 的活性,使得肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase,MLCK)和 MLCP 的活性比值上升,使肌球蛋白轻链磷酸化(p-MLC_{20})水平增加,最终增加血管平滑肌细胞的收缩[7]。那么,周细胞是否也对脓毒症血管反应性具有调控作用,能否作为脓毒症后血管低反应性的救治靶点,有待进一步研究。

本研究采用盲肠结扎穿孔(cecal ligation puncture, CLP)的方法复制脓毒症大鼠休克模型,观察周细胞对脓毒症大鼠血管舒缩反应性的保护作用,对组织器官灌注的影响,进一步探讨血管 MLC_{20} 磷酸化水平在周细胞调节血管反应性中的作用,旨在为脓毒症的救治提供新的措施。

1 材料与方法

1.1 材料

SPF 级 SD 大鼠 64 只,12~14 周龄,雌雄各半,体质量(200±20)g(陆军军医大学野战外科研究所实验动物中心提供)。周细胞专用培养基和 FBS 购自美国 Science Cell 公司,胰蛋白酶购自美国 HyClone 公司,PC 标志物 PDGFR-β、NG-2 购自英国 Abcam 公司,p-MLC_{20} 购自美国 Sigma 公司,MLC_{20} 购自美国 Cell signaling 公司,FITC(羊抗兔)、TRITC(羊抗鼠)荧光二抗购自中国中杉金桥公司,I型胶原酶购自美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 脓毒症模型的建立 SD 大鼠常规腹部消毒,暴露盲肠,将盲肠末端的粪便充盈,在距末端 0.6 cm 处用无菌线丝结扎,采用三角锥贯穿结扎盲肠段的中央,将盲肠按照原来的位置送回腹腔,逐层缝合后,放回笼中,自由饮水。观察大鼠平均动脉血压(mean arterial blood pressure,MAP),当 MAP 下降 30% 以上,模型成功,本次实验模型成功率达到 89%以上。

1.2.2 动物分组及处理 将大鼠按随机单位设计方法分为 4 组(n=16,8 只用于测定肠系膜微动脉舒缩反应性,另 8 只用于测定肠系膜微血管动静脉流速、肝肾血流量和肠系膜上动脉 p-MLC_{20} 的表达):正常对照组、脓毒症组(Sep 组)、常规治疗组(CT 组)、PC 治疗组(PC 组)。正常对照组仅开腹和关腹处理,脓毒症组在模型建立后不作任何处理。常规治疗组为脓毒症模型 12 h 后行常规复苏[液体复苏(乳酸林格氏液体 35 mL/kg),升压药(多巴胺 1.75 mg/kg)及抗生素(头孢呋辛钠 100 mg/kg),使平均动脉压(mean arterial blood pressure, MAP)>70 mmHg,中心静脉压维持在 8 mmHg;PC 治疗组在常规治疗的基础上静脉注射 PC(10^6/只,重悬于 0.5 mL PBS,CT 组静脉注射相等量的 PBS 作为对照)。观察治疗后 24 h,各组大鼠肠系膜微血管舒缩反应性、动静脉流速和肝肾血流量及肠系膜上动脉 p-MLC_{20} 蛋白表达的变化。

1.2.3 大鼠 PC 的培养及鉴定 取初断乳大鼠的视网膜,反复剪至细小片状,转入 2 g/L 的I型胶原酶中,轻轻吹打,在 37 ℃细胞培养箱中消化 25 min 后,立即加入含有 20%FBS 的周细胞培养基。将滤液过 50 μm 滤网,翻转滤网,冲洗收集含微血管片段洗脱液,4 ℃ 250×g 离心 5 min。吸除上清液,加入适量周细胞专用培养基,将沉淀轻轻吹打混匀,接种于 25 cm^2 的细胞培养瓶中。当细胞长至 80%~90%时,立即消化传代。取 3~5 代的 PC 接于激光共聚焦培养皿,待其成长覆盖率 80%左右时,采用细胞免疫荧光技术,检测 PC 标志性蛋白(PDGFR-β 和 NG-2)的表达。

1.2.4 肠系膜微血管舒缩反应性和动静脉流速的测定 动物麻醉后,剪去腹部毛发,沿着腹部正中剖开 2~3 cm 的切口,腹腔中加入 37 ℃的生理盐水,并暴露盲肠。将动物仰卧在观察板上,轻轻提出小肠,并将小肠展放在有观察孔的观察板上,在表面连续滴加 37 ℃生理盐水保持温度和湿度。用配有 37 ℃恒温装置的生物显微镜(OLYMPUS)进行观察。

选取直径在 30~50 μm 之间,200 μm 长无分支,无明显弯曲的肠系膜微动脉,通过彩色 CCD 摄像机(DP21)进行观察。在 10 min 基础观察结束后,依次滴加不同浓度的 NE(10^{-7}、10^{-6}、10^{-5}、10^{-4} mol/L),最后直接滴加 10^{-3} mol/L 浓度的 Ach,记录微动脉血管直径的变化。采用 Image-Pro Plus 5.0 软件测量血管直径的变化,血管收缩率计算公式为:$(D_{Baseline}-D_{NE})/D_{Baseline}\times 100\%$,血管舒张率计算公式为:$(D_{Ach}-D_{NE10^{-4}})/(D_{Baseline}-D_{NE})\times 100\%$。

另选取肠系膜微血管,通过超敏感摄像机(HAMAMATSU, C11440)进行观察。在 10 min 基础观察结束后,以 1 000 帧/s 的速度,记录微血管动静脉的流

速。用 Image-Pro Plus 5.0 软件测定红细胞流速。用 μm/s 表示大鼠肠系膜微动脉和微静脉的血流速度。

1.2.5　MLC_{20} 磷酸化水平的测定　　收集各组肠系膜上动脉,使用 RIPA 裂解液提取蛋白。BCA 试剂盒测定蛋白浓度后,加入等体积的上样缓冲液。将变性后的蛋白等量上样,行 SDS-PAGE(12%的浓缩胶)电泳,用电转膜仪将蛋白转至 PVDF 膜上,放入 5%脱脂奶粉中封闭 1 h,加入一抗(兔抗 p-MLC_{20},1∶1 000;兔抗 MLC_{20},1∶1 000;鼠抗 β-actin,1∶7 000)4 ℃过夜,TBST 缓冲液清洗 3 次后,室温下孵育二抗(山羊抗兔 IgG,山羊抗鼠 IgG)1 h,TBST 缓冲液冲洗 3 次后使用 Oddsey 红外成像仪进行 PVDF 膜扫描。

1.2.6　肝肾血流量的检测　　用激光多普勒血流灌注成像仪(PeriCam PSI ZR, Sweden)测定大鼠肝脏和肾脏的血流量。麻醉大鼠并置于鼠板上,剪开腹部,充分暴露肝脏和肾脏,将低能量的氦-氖激光器探头分别置于肝脏和肾脏上 14 cm 处,检测各组大鼠肝脏和肾脏的血流量。用血流量分析软件(PIMsoft)计算大鼠肝肾血流量。

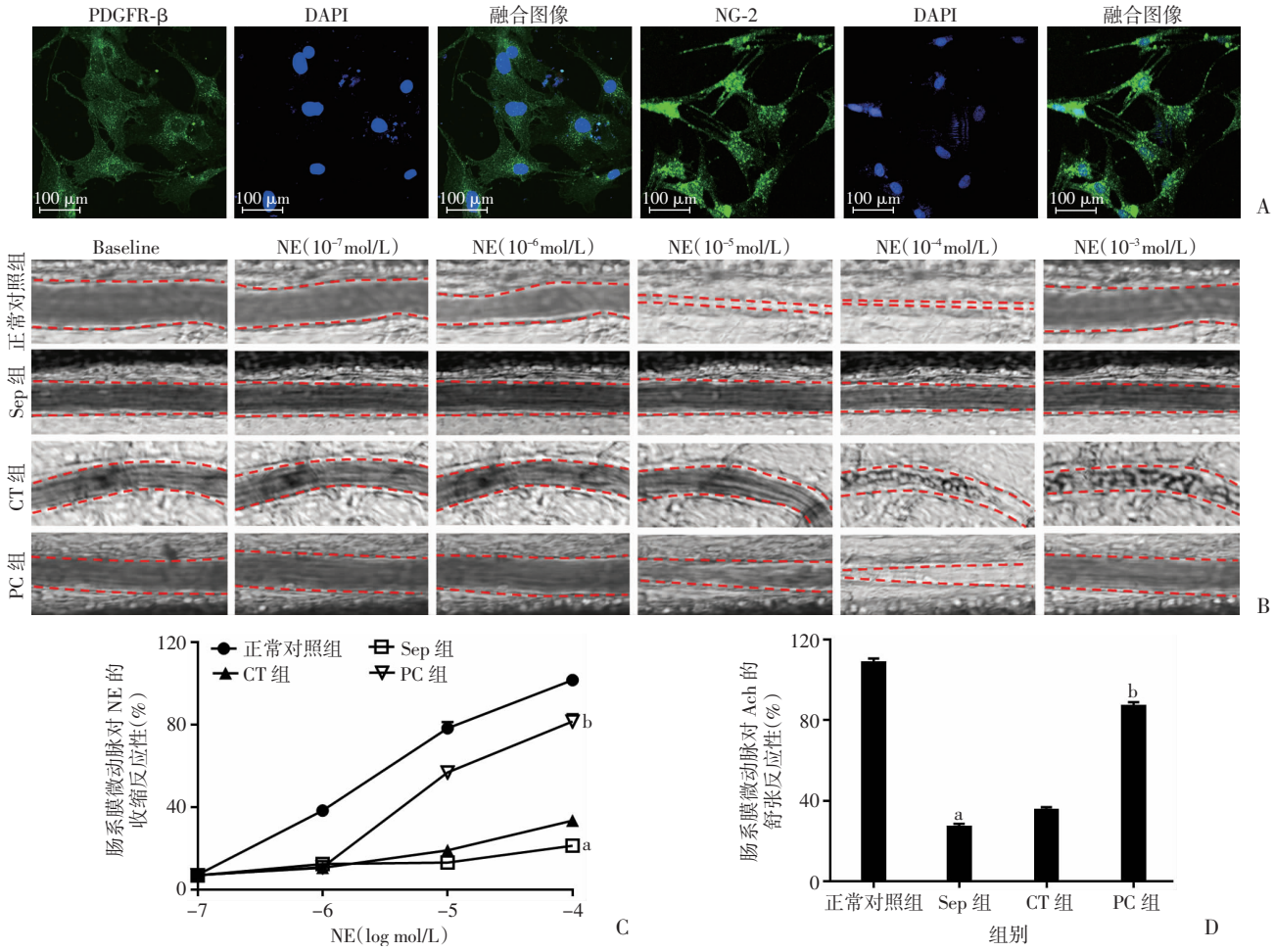
1.3　统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间差异比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 t 检验。检验水准:$\alpha=0.05$。

2　结果

2.1　PC 对脓毒症大鼠肠系膜微血管舒缩反应性的影响

镜下 PC 胞体宽大、扁平,呈不规则三角形或多角形。细胞免疫荧光显示 PC 的表面抗原标记物 PDGFR-β 和 NG-2 呈阳性表达(图 1A)。与正常对照组相比,脓毒症大鼠肠系膜微动脉舒缩反应性明显降低,表现为肠系膜微动脉对 NE 的收缩反应性和对 Ach 的舒张反应性分别下降至 21.2%和 27.0%($P<0.01$)。常规治疗可部分改善肠系膜微血管舒缩反应。与常规治疗组相比,PC 治疗可以显著改善肠系膜微血管舒缩反应性,收缩和舒张反应性分别达到 81.5%和 86.9%($P<0.01$,图 1B~D)。表明 PC 可改善脓毒症后血管低反应性。



A:荧光显微镜观察 PDGFR-β 和 NG-2 标记 PC;B:肠系膜微动脉舒收反应性的测定;C:各组微动脉收缩反应性的变化率($n=8$,$\bar{x}\pm s$);D:各组微动脉舒张反应性的变化率($n=8$,$\bar{x}\pm s$);a:$P<0.01$,与正常对照组比较;b:$P<0.01$,与 CT 组比较

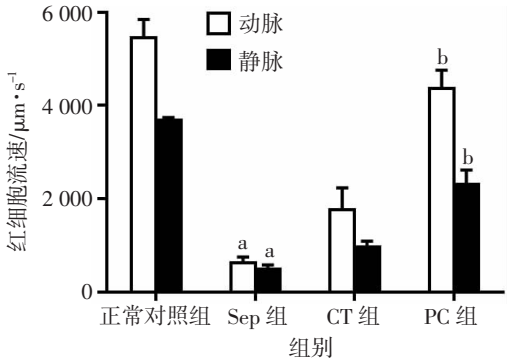
图 1　各组大鼠肠系膜微血管舒缩反应性的变化

2.2　PC 对脓毒症大鼠肠系膜动静脉流速的影响

与正常对照组相比,脓毒症后肠系膜动静脉流速明显降低,表现为肠系膜微血管动脉和静脉红细胞流速分别下降了 88.4%和 87.0%(P<0.01)。常规治疗可部分改善肠系膜微血管动静脉流速。PC 治疗可以显著改善肠系膜微血管动静脉流速,与常规治疗组相比,PC 治疗后脓毒症肠系膜动脉和静脉流速分别增加 147.8%和 137.5%,差异有统计学意义(P<0.01,图 2)。

2.3　PC 对脓毒症大鼠肝肾血流量的影响

与正常对照组相比,脓毒症后肝脏、肾脏血流量明显降低,表现为肝脏和肾脏血流量分别降低了 75.9%和 79.2%(P<0.01)。常规复苏可部分恢复脓毒症大鼠的肝肾血流量。PC 可显著改善脓毒症大鼠的肝肾血流量,与常规治疗组相比,肝脏和肾脏的血流量分别增加了 66.1%和 80.4%(P<0.01,图 3、4)。以上结果提示,PC 通过改善脓毒症血管反应性从而保护组织器官的灌注量。



a:P<0.01,与正常对照组比较;b:P<0.01,与 CT 组比较

图 2　各组大鼠肠系膜微血管动静脉流速的变化(n=8,$\bar{x}\pm s$)

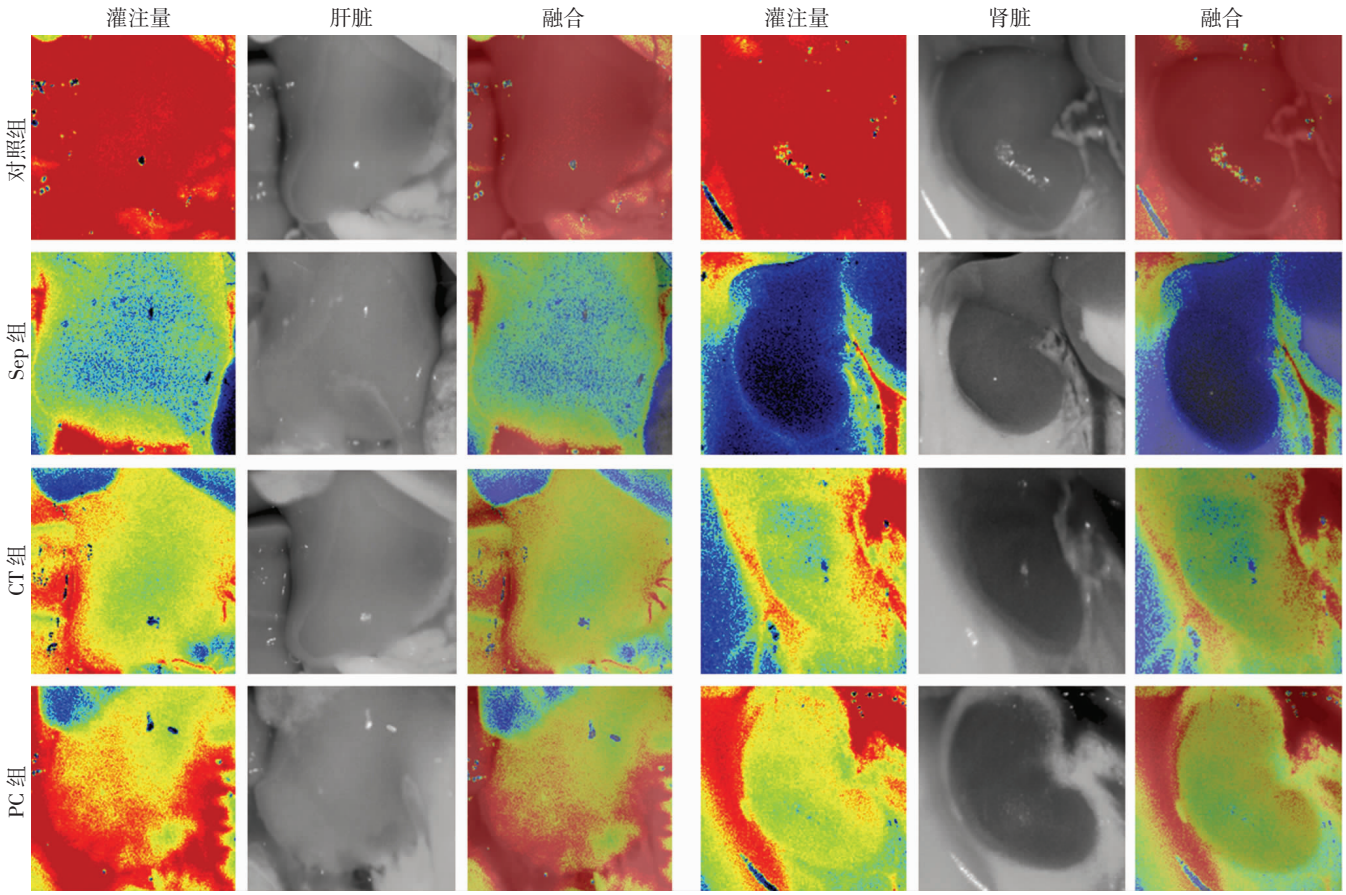
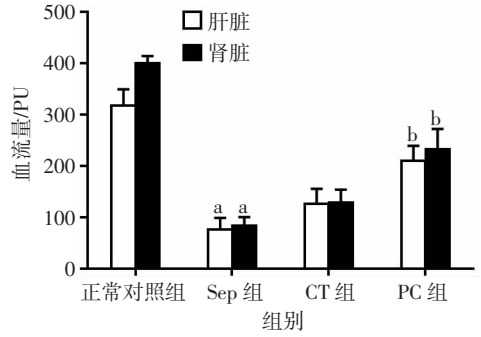


图 3　激光多普勒检测各组大鼠肝脏和肾脏血流量结果

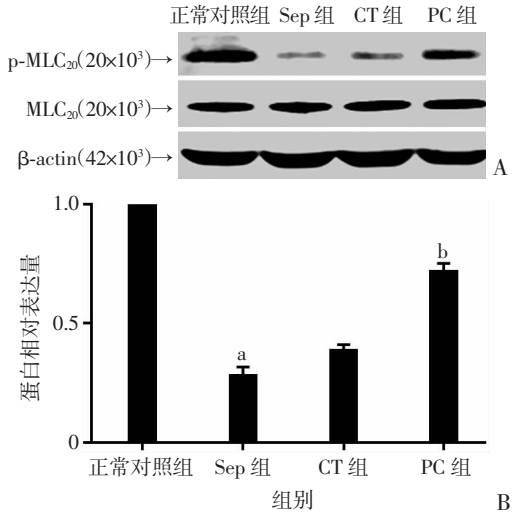


a:$P<0.01$,与正常对照组比较;b:$P<0.01$,与 CT 组比较

图 4 各组大鼠肝肾血流量变化的定量分析($n=8$,$\bar{x}\pm s$)

2.4 PC 对脓毒症大鼠肠系膜上动脉 p-MLC_{20} 蛋白表达的变化

与正常对照组相比,脓毒症组 p-MLC_{20} 的表达明显降低($P<0.01$)。常规复苏对 p-MLC_{20} 的表达有轻微的改变。PC 治疗后,脓毒症大鼠血管 p-MLC_{20} 的表达明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$,图 5)。



A:Western blot 分析;B:各组 p-MLC_{20} 相对表达量($n=3$,$\bar{x}\pm s$);a:$P<0.01$,与正常对照组比较;b:$P<0.01$,与 CT 组比较

图 5 Western blot 检测各组肠系膜上动脉 p-MLC_{20} 蛋白的表达

3 讨论

脓毒症是临床常见的危重病症,其发生率和病死率均很高。血管功能障碍是脓毒症患者器官功能衰竭甚至死亡的主要原因。血管功能障碍包括血管低反应性和血管渗漏[1]。本研究发现,外源性的 PC 对脓毒症大鼠血管收缩和舒张反应性具有明显的保护作用,进一步研究发现,PC 可明显改善脓毒症大鼠的组织灌注量。机制研究发现,PC 通过调节血管 p-MLC_{20} 的表达来改善脓毒症大鼠血管反应性。

以往周细胞的研究主要是对内皮屏障功能的调控。DANEMAN 等[8]发现在胚胎形成过程中,周细胞在血管上的覆盖率决定着血管内皮屏障功能的变化。BELL 等[9]发现周细胞的缺失导致血脑屏障的破坏,增加大脑异常蛋白的累积和大分子物质的浸润。而本研究发现,周细胞通过改善脓毒症大鼠血管舒缩反应性实现了对组织器官的保护作用。

近年来,大量的研究证实,PC 具有调节血管收缩和舒张功能。周细胞的收缩主要由钙离子浓度所介导[10]。如 PEPPIATT 等[11]采用膜片钳技术,通过电刺激视网膜周细胞激发毛细血管收缩,并能以约 2 μm/s 的速度压缩远端的周细胞,当去除周细胞胞内钙离子后,电刺激处理周细胞的收缩现象消失。同时,中枢神经系统周细胞中钙离子通路与周细胞收缩性也有关系,钙离子激活的钾离子通道可以调控周细胞的静息膜电位,钙离子可通过 L-型电压依赖的钙离子通道进入细胞,导致周细胞内钙离子浓度升高,引起周细胞的收缩,而胞内钙离子浓度下降则引起周细胞舒张[12]。研究还发现,周细胞可通过激活多种类型的钾离子通道来调节自身的收缩性,如内部整流器钾离子(KIR)通道、电压门控钾离子通道、钙离子激活的钾离子通道、ATP-敏感的钾离子通道[13-14]。基础研究显示,血管平滑肌细胞收缩和舒张功能主要受 MLC_{20} 磷酸化及脱磷酸化调节,其调节途径包括钙依赖途径和钙敏感性途径[15]。本实验室前期的研究发现,休克后血管低反应性的发生与血管平滑肌 MLC_{20} 磷酸化水平的降低有关[16]。本研究发现,周细胞可以增加血管平滑肌 MLC_{20} 磷酸化的表达,改善脓毒症血管低反应性。但是周细胞进入体内后是如何调节血管平滑肌 p-MLC_{20} 水平的,是通过钙依赖途径还是钙敏感性途径,还有待进一步研究。

参考文献:

[1] RABBOLINI D J, ANGE N, WALTERS G D, *et al*. Systemic capillary leak syndrome: recognition prevents morbidity and mortality[J]. Intern Med J, 2013, 43(10): 1145-1147. DOI:10.1111/imj.12271.

[2] SHARAWY N, LEHMANN C. New directions for sepsis and septic shock research[J]. J Surg Res, 2015, 194(2): 520-527. DOI:10.1016/j.jss.2014.12.014.

[3] AHMAD A A, TABOADA C B, GASSMANN M, *et al*. Astrocytes and pericytes differentially modulate blood: brain barrier characteristics during development and hypoxic insult

[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2011, 31(2): 693-705. DOI:10.1038/jcbfm.2010.148.

[4] GERTZ K, KRONENBERG G, UHLEMANN R, *et al*. Partial loss of VE-cadherin improves long-term outcome and cerebral blood flow after transient brain ischemia in mice[J]. BMC Neurol, 2016, 16: 144. DOI:10.1186/s12883-016-0670-8.

[5] FERNANDEZ-KLETT F, OFFENHAUSER N, DIRNAGL U, *et al*. Pericytes in capillaries are contractile *in vivo*, but arterioles mediate functional hyperemia in the mouse brain[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(51): 22290-22295. DOI:10.1073/pnas.1011321108.

[6] KUTCHER M E, KOLYADA A Y, SURKS H K, *et al*. Pericyte rho GTPase mediates both pericyte contractile phenotype and capillary endothelial growth state[J]. Am J Pathol, 2007, 171(2): 693-701. DOI:10.2353/ajpath.2007.070102.

[7] HODGE R G, RIDLEY A J. Regulating rho GTPases and their regulators[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016, 17(8): 496-510. DOI:10.1038/nrm.2016.67.

[8] DANEMAN R, ZHOU L, KEBEDE A A, *et al*. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis[J]. Nature, 2010, 468(7323): 562-566. DOI:10.1038/nature09513.

[9] BELL R D, WINKLER E A, SAGARE A P, *et al*. Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging[J]. Neuron, 2010, 68(3): 409-427. DOI:10.1016/j.neuron.2010.09.043.

[10] WINKLER E A, BELL R D, ZLOKOVIC B V. Central nervous system pericytes in health and disease[J]. Nat Neurosci, 2011, 14(11): 1398-1405. DOI:10.1038/nn.2946.

[11] PEPPIATT C M, HOWARTH C, MOBBS P, *et al*. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes[J]. Nature, 2006, 443(7112): 700-704. DOI:10.1038/nature05193.

[12] KAMOUCHI M, KITAZONO T, AGO T, *et al*. Calcium influx pathways in rat CNS pericytes[J]. Mol Brain Res, 2004, 126(2): 114-120. DOI:10.1016/j.molbrainres.2004.03.008.

[13] CAO C H, GOO J H, LEE-KWON W, *et al*. Vasa recta pericytes express a strong inward rectifier K^+ conductance[J]. Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol, 2006, 290(6): R1601-R1607. DOI:10.1152/ajpregu.00877.2005.

[14] HIRAO M, OKU H, GOTO W, *et al*. Effects of adenosine on optic nerve head circulation in rabbits[J]. Exp Eye Res, 2004, 79(5): 729-735. DOI:10.1016/j.exer.2004.08.008.

[15] KITAZAWA T, ETO M, WOODSOME T P, *et al*. Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility[J]. J Biol Chem, 2000, 275(14): 9897-9900. DOI:10.1074/jbc.275.14.9897.

[16] LI T, LIU L M, LIU J C, *et al*. Mechanisms of rho kinase regulation of vascular reactivity after hemorrhagic shock in rats[J]. Shock, 2008, 29(1): 65-70. DOI:10.1097/shk.0b013e318063e477.

(**收稿**:2019-07-05;**修回**:2019-09-06)

(编辑 栾 嘉)