·论 著·

Rho 激酶和 PKC 在环孢素 A 改善休克血管反应性中的作用及与 MPTP 的关系

雷 艳[1],杨新征[2],董兆君[3] (1. 第三军医大学卫勤训练基地医学综合教研室,重庆 400038;2. 解放军第 222 医院病理科,吉林 吉林 132011;3. 第三军医大学军事预防医学院毒理学研究所,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 观察 Rho 激酶和 PKC 在环孢素 A(CsA)改善创伤失血性休克大鼠血管反应性中的作用及与线粒体通透性转换孔(MPTP)开放的关系。**方法** 采用创伤失血性休克大鼠模型和缺氧培养的血管平滑肌细胞(VMSC),观察了 Rho 激酶和 PKC 在 CsA 调节休克血管反应性中的作用,以及对血管平滑肌细胞线粒体 MPTP 开放的影响,同时观察 CsA 对休克动物炎症因子 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平的影响。**结果** CsA 明显改善了休克血管反应性,Rho 激酶抑制剂 Y27632 可显著拮抗 CsA 恢复休克血管反应性的作用,但是 PKC 抑制剂 staurosporine 对 CsA 的作用无明显影响。CsA 和 Rho 激酶激动剂 U46619 都可抑制缺氧后线粒体 MPTP 的开放程度。休克后大鼠血液中 TNF-α 和 IL-1β 的浓度均显著增加,但 CsA 处理仅使其轻微减少。**结论** CsA 可以通过抑制线粒体 MPTP 开放改善休克后血管的低反应性,发挥对创伤休克的治疗作用。Rho 激酶参与了这其中的调节过程。

[关键词] 线粒体通透性转换孔;环孢素 A;血管反应性;创伤失血性休克;Rho 激酶
[中图分类号] R605.971 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2015)04-0355-04

Role of Rho-kinase and PKC in cyclosporine A regulating vascular reactivity and it relationship to MPTP after traumatic hemorrhagic shock

LEI Yan[1], YANG Xin-zheng[2], DONG Zhao-jun[3] (1. Department of General Medicine, Medical Service Training Base, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 2. Department of Pathology, the 222th Hospital of PLA, Jilin Jilin 132011, China; 3. Institute of Toxicology, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship of the beneficial effect of CsA on vascular reactivity to Rho-kinase, protein kinase C (PKC) and mitochondrial permeability transition pore (MPTP) in traumatic hemorrhagic shock rats. **Methods** With traumatic hemorrhagic shock rats and hypoxia-treated vascular smooth muscle cells (VSMCs), the role of Rho-kinase and PKC in CsA-regulating vascular reactivity following shock and their relationship to MPTP was observed. Meanwhile, the effects of CsA on inflammatory mediators including TNF-α, IL-1β and IL-6 were also studied. **Results** CsA significantly improved the vascular reactivity of superior mesenteric artery following hemorrhagic shock. Rho-kinase inhibitor Y27632 significantly antagonized CsA-induced increase of vascular reactivity, while PKC inhibitor staurosporine had no significant influences on the effects of CsA. Further studies showed that CsA and Rho-kinase agonist U46619 inhibited the opening of MPTP in hypoxia-treated VSMCs. In addition, shock induced a significant increase of TNF-α and IL-1β, but CsA did not show a significant inhibitory effect on their level. **Conclusion** CsA-induced restoration of vascular reactivity following traumatic hemorrhagic shock via inhibiting MPTP opening, and Rho-kinase participate in this process.

Keywords: mitochondrial permeability transition pore; cyclosporine A; vascular hyporeactivity; traumatic hemorrhagic shock; Rho associated serine/threonine kinase

环孢素 A(CsA)是一种临床常见的强效免疫抑制剂。我们前期的研究发现 CsA 对休克有一定的治疗作用,其作用主要通过改善休克后血管反应性和器官血流灌注来实现[1]。但是,CsA 调节血管反应性的具体机制尚不清楚。Rho 激酶(Rho associated serine/threonine kinase)和蛋白激酶 C(protein kinase C,PKC)是重要的血管平滑肌细胞舒缩功能调节分子,在休克后血管反应性调节中发挥着重要作用。近年来的研究证实,CsA 可以通过抑制线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore,MPTP)的开放,改善心、脑等器官的缺血再灌注损伤[2-3]。那么,CsA 调节血管反应性是否与 Rho 激酶或 PKC 有关,其作用是通过免疫抑制或是抑制 MPTP 开放而发挥,目前尚不明确。本文采用了创伤失血性休克大鼠模型,观察 CsA 对休克后炎症介质水平的影响及 Rho 激酶和 PKC 在 CsA 调节血管反应性中的作用,并利用细胞实验观察其与 MPTP 开放的关系,进一步探讨 CsA 发挥抗休克作用的具体机制。

doi:10.11659/jjssx.03E015007
[基金项目] 国家自然科学基金(81270400)
[收稿日期] 2015-03-10 [修回日期] 2015-04-16

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂

SD 大鼠,体质量(200 ± 20)g,由第三军医大学野战外科研究所实验动物中心提供。U46619(Rho 激酶激动剂)、Y27632(Rho 激酶抑制剂)、PMA(PKC 激动剂)、Staurosporine(PKC 抑制剂)购自美国 Sigma 公司,Calcein-AM、MitoTracker deep red 购自美国 Invitrogen 公司,TNF-α、IL-1β 和 IL-6 检测试剂盒购自欣博盛生物科技有限公司。

1.2 炎症介质水平检测

32 只 SD 大鼠随机分为 4 组,每组 8 只,分别为:①正常对照组(sham-operated);②休克组(shock);③乳酸林格氏液(LR)组;④CsA 组(CsA 5 mg/kg)。采用 3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,将大鼠单侧股骨折断,经股动脉插管放血,使血压维持在 40 mmHg,持续 3 h,建立创伤失血性休克模型。休克 3 h 后,LR 组经股静脉输注 2 倍失血量的 LR,CsA 组将 5 mg/kg 的 CsA 加入 LR 中输注。复苏 2 h 后取 2 mL 血液,采用检测试剂盒测定 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 的含量。

1.3 血管反应性测定

SD 大鼠 64 只,随机分为 8 组,每组 8 只。实验分组为:①Sham 组(正常对照组);②Shock 组(休克处理组);③LR 组(休克 + LR);④CsA 组(休克 + LR + CsA 5 mg/kg);⑤CsA + U46619 组(休克 + LR + CsA 5 mg/kg + Rho 激酶激动剂 U46619 10^{-8} mol/L);⑥CsA + Y27632 组(休克 + LR + CsA 5 mg/kg + Rho 激酶抑制剂 Y27632 10^{-6} mol/L);⑦CsA + PMA 组(休克 + LR + CsA 5 mg/kg + PKC 激动剂 PMA 10^{-7} mol/L);⑧CsA + Staurosporine 组(休克 + LR + CsA 5 mg/kg + PKC 抑制剂 Staurosporine 10^{-7} mol/L)。

以相同方法建立休克模型,休克处理 3 h 后给予 CsA 5 mg/kg复苏,随后取大鼠肠系膜上动脉,制备血管环。CsA 组在 CsA 5 mg/kg 复苏后,直接取血管环测定反应性;CsA + U46619 组、CsA + Y27632 组、CsA + PMA 组、CsA + Staurosporine 组在 CsA 5 mg/kg 复苏后,取血管环平衡后,分别用 U46619、Y27632、PMA 和 Staurosporine 孵育 30 min,再观察血管环的反应性。将血管环置于 K-H 液中平衡 2 h,待张力曲线平稳后,测定血管环对去甲肾上腺素(NE)的收缩反应性。

1.4 线粒体 MPTP 开放情况检测

取 SD 大鼠的肠系膜上动脉进行血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)原代及传代培养,以缺氧处理的 VSMC 模拟休克后缺血缺氧状态[4]。实验分为 4 组:①正常对照组(Normal);②缺氧组(Hypoxia);③缺氧 + CsA 组(缺氧 + CsA 1 μmol/L);④缺氧 + Rho 激酶激动剂组(缺氧 + U46619 10^{-8} mol/L)。

将大鼠肠系膜上动脉的 VSMC 接种于共聚焦显微镜专用的培养皿中,移入缺氧培养罐内,充入缺氧气体(95% N_2 和 5% 的 CO_2),达到完全缺氧后开始计时,缺氧处理 3 h。缺氧 + CsA 组在缺氧处理后以 1 μmol/L 的 CsA 孵育 2 h,Rho 激酶激动剂组以 U46619(10^{-8} mol/L)孵育 30 min。采用 calcein-$CoCl_2$ 法,以 MitoTracker deep red 定位细胞线粒体,通过激光共聚焦显微镜(Calcein 488 nm, MitoTracker 644 nm)检测线粒体 MPTP 开放情况。以线粒体中绿色荧光的强度变化反映 MPTP 的开放程度,荧光强度高反映 MPTP 开放水平低,荧光强度低反映 MPTP 开放增加。

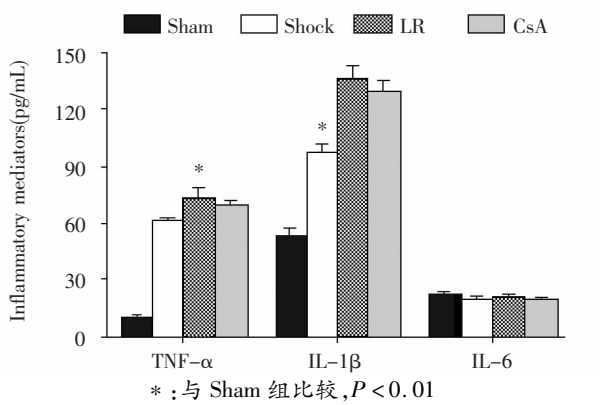
1.5 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较采用重复测量设计资料方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CsA 对休克后 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平的影响

休克后大鼠血液中 TNF-α 和 IL-1β 的浓度均明显增加,显著高于正常对照组($P < 0.01$),输注 LR 可使 TNF-α 和 IL-1β 浓度进一步增加。给予 CsA(5 mg/kg)仅轻微降低了 TNF-α 和 IL-1β 浓度,与 LR 组之间没有显著差异。各组的 IL-6 浓度在休克处理和复苏治疗前后均未出现明显变化(图 1)。



*:与 Sham 组比较,$P < 0.01$

图 1 各组的 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平情况

2.2 CsA 调节休克血管反应性与 Rho 激酶及 PKC 的关系

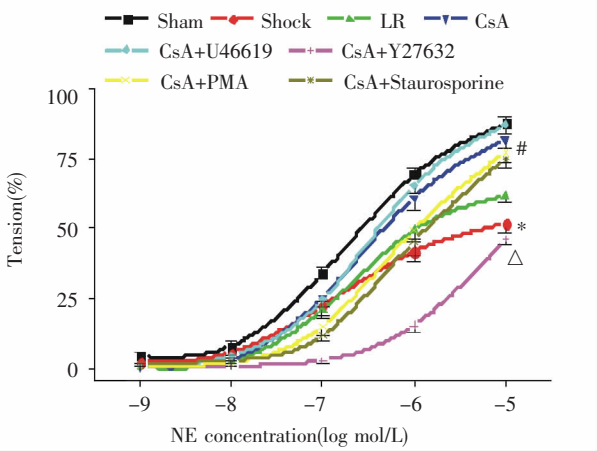
休克后大鼠的血管反应性显著降低,CsA(5 mg/kg)可明显恢复休克后血管反应性,效果明显优于单纯 LR 液复苏($P < 0.01$)。Rho 激酶抑制剂 Y27632(10^{-6} mol/L)可显著抑制 CsA 升高休克血管收缩反应的作用,最大收缩张力较 CsA 组显著降低($P < 0.01$);Rho 激酶激动剂 U46619(10^{-8} mol/L)可使 CsA 升高休克血管收缩功能的作用进一步增加(图 2)。PKC 激动剂 PMA(10^{-7} mol/L)和抑制剂 Staurosporine(10^{-7} mol/L)对 CsA 调节休克血管的反应性无显著影响。

2.3 CsA 和 Rho 激酶对缺氧 VSMC 线粒体的影响

缺氧处理后,VSMC 的荧光强度较正常对照组明显减弱($P < 0.01$),提示缺氧后线粒体 MPTP 开放显著增加。CsA(1 μmol/L)和 Rho 激酶激动剂 U46619(10^{-8} mol/L)可抑制缺氧后线粒体 MPTP 的开放程度,其荧光强度明显高于缺氧组($P < 0.01$),见图 3。

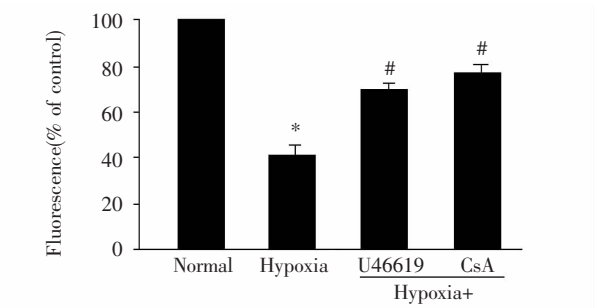
3 讨论

CsA是一种有效的免疫抑制剂,在临床上常用于



*：与 Sham 组比较，$P<0.01$；#：与 LR 组比较，$P<0.01$；△：与 CsA 组比较，$P<0.01$

图 2 各组对去甲肾上腺素的收缩反应性变化



*：与 Normal 组比较，$P<0.01$；#：与 Hypoxia 组比较，$P<0.01$

图 3 各组的荧光强度比较

器官移植术后和许多自身免疫疾病的治疗。相关研究结果提示，CsA 可以通过改善休克后血管反应性和器官血流灌注，对创伤失血性休克的治疗起到一定的积极作用[5-6]，但是其具体机制尚不清楚。有研究报道，创伤失血性休克可以引起炎症应答反应，炎症因子水平升高，导致组织器官损伤。那么，CsA 在创伤失血性休克治疗中的作用是否也与抑制这种免疫应答相关，目前尚无明确报道。为此，我们在实验中观察了 CsA 治疗前后炎症介质 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 的变化情况。结果发现，TNF-α、IL-1β 水平在休克后显著增高，输注 CsA 后仅能使其轻微降低，而 IL-6 水平在 CsA 治疗前后没有明显改变。这一结果说明，在抗休克治疗中，短时间给予适宜剂量的 CsA 不会对免疫因子产生明显的抑制作用。CsA 在抗休克治疗中的有益作用主要通过调节血管反应性而实现，而并非通过免疫抑制。

血管低反应性是影响休克治疗效果的重要因素之一[7-8]。血管低反应性导致微循环障碍，组织缺血缺氧状态得不到很好地缓解，组织损伤将进一步加剧。所以，改善血管低反应性是休克复苏治疗的重要措施之一[9-11]。蛋白激酶 C(PKC)和 Rho 激酶是 G 蛋白偶联受体系统中的效应物。PKC 既可以通过激活细胞质中的靶酶参与生化反应的调控，也能作用于细胞核中的转录因子，参与基因表达的调控[12-13]。PKCα 和 PKCε 可以通过调节肌球蛋白轻链磷酸酶活性，影响肌球蛋白轻链磷酸化水平，对血管的反应性和钙敏感性起到调节作用[14]。Rho 激酶是 Rho 蛋白主要的下游效应靶分子，是调节细胞运动的重要激酶之一[15]。Rho 激酶激活后可以通过激活下游的肌球蛋白轻链激酶，或抑制肌球蛋白轻链磷酸酶活性，增加肌球蛋白轻链的磷酸化水平，调节血管平滑肌细胞收缩[16]。通过前期研究[17]我们发现 PKC 和 Rho 激酶在休克后血管反应性的调节中具有重要作用。在本实验中，我们观察了 CsA 对休克血管反应性的调节作用及其与 Rho 激酶及 PKC 的关系。实验结果显示，CsA 可以明显恢复休克后的血管功能，Rho 激酶的抑制剂可显著抑制 CsA 升高休克血管收缩反应的作用，Rho 激酶激动剂可进一步增加 CsA 升高休克血管收缩反应的作用。提示 Rho 激酶可能参与了 CsA 调节休克后血管功能的过程。

有研究[18-20]发现，CsA 可以通过与 Cyp D 相结合，抑制线粒体 MPTP 的开放，发挥对 MPTP 开放所造成的组织细胞缺血性损害等的保护和治疗作用。在本实验中，我们以缺氧处理的 VSMC 模拟休克后血管的缺血缺氧状态，探讨 CsA 调节休克血管的反应性是否与抑制 MPTP 开放有关。我们观察到，缺氧处理使 VSMC 的 MPTP 开放显著增加，CsA 和 Rho 激酶激动剂可以抑制缺氧后 MPTP 的开放。实验结果提示，CsA 可以通过抑制线粒体 MPTP 开放来改善休克后血管反应性，从而发挥抗休克作用，Rho 激酶可能参与了这一过程的调节。

综上所述，在创伤失血性休克的治疗中，CsA 可通过抑制线粒体 MPTP 开放，改善休克后血管的低反应性，改善组织血液灌注和器官功能而发挥有益作用，并非通过免疫抑制途径。Rho 激酶可能参与了这其中的调节过程。但是，Rho 激酶在这一过程中的具体作用及其与线粒体 MPTP 开放的关系如何，还需要更深入的研究来证实。

[参考文献]

[1] 雷 艳，董兆君. 环孢素 A 改善创伤失血性休克大鼠血管及器官功能[J]. 基础医学与临床，2014，34(9)：1171－1174.

[2] Gill RS，Bigam DL，Cheung PY. The role of cyclosporine in the treatment of myocardial reperfusion injury[J]. Shock，2012，37(4)：341－347.

[3] Leone TA，Finer NN. Shock：a common consequence of neonatal asphyxia[J]. J Pediatr，2011，158(2)：e9－e12.

葛根素的提取及对小鼠解酒护肝功能的鉴定

王 晶[1],李洪敏[1],艾 芳[1],曹 雄[1],吴爱娟[1],韩 琴[2] (1. 成都医学院预防医学专业,四川 成都 615000;2. 成都医学院公共卫生系,四川 成都 615000)

[摘 要] **目的** 提取葛根中的葛根素,HPLC 法检测提取的葛根素,并比较不同剂量的葛根素与解酒效果的相关性,评价不同剂量葛根素解酒护肝效果。**方法** 在前期实验所得的最优条件下提取葛根素备用,HPLC 法定性定量检测葛根醇提物(PRE),将雄性健康昆明小鼠随机分为空白组、阳性对照组、葛根素干预组(每组 10 只)。先给小鼠灌胃葛根提取物,30 min 后灌胃白酒,观察醉酒小鼠的醒酒时间及测定小鼠肝组织 ADH、GOT、GPT 含量变化,以探讨葛根素对醉酒小鼠的影响。**结果** HPLC 测定 8 倍体积分数的 70% 乙醇,在 60 ℃恒温摇床水浴提取 30 min 为葛根素提取的最优条件;与阳性对照组相比,低、中、高剂量的葛根醇提物能显著缩短醉酒小鼠的醒酒时间,中剂量的 PRE 能有效抑制酒精的吸收,降低肝组织中 ADH、GOT、GPT 的浓度,而高剂量的 PRE 对酒精的吸收影响较小。**结论** HPLC 法能对葛根素提取物进行定性定量测定;葛根素对急性酒精中毒导致的小鼠肝损伤有保护性调控作用,葛根素剂量与解酒效果呈良好的正性相关。

[关键词] 葛根素;HPLC;解酒护肝;急性酒精中毒

[中图分类号] R931.6;R34 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2015)04-0358-04

doi:10.11659/jjssx.12E014060

[基金项目] 四川省厅级川菜发展研究项目(CC13Z08)

[通讯作者] 韩 琴,E-mail:16964791@qq.com

[收稿日期] 2015-03-17 [修回日期] 2015-04-15

[4] Li T, Fang YQ, Yang GM, et al. Effects of the balance in activity of RhoA and Rac1 on the shock-induced biphasic change of vascular reactivity in rats[J]. Ann Surg, 2011, 253(1): 185 – 93.

[5] 杨光明,彭小勇,李 涛,等. 环孢素 A 对严重创伤失血性休克大鼠的治疗作用[J]. 局解手术学杂志, 2014, 23(3): 250 – 252.

[6] 朱 娱,田昆仑,吴 跃,等. 不同复苏压力对颅脑创伤合并非控制性失血性休克大鼠血流动力学及存活率的影响[J]. 局解手术学杂志, 2014, 23(4): 372 – 375.

[7] Jerez S, Scacchi F, Sierra L, et al. Vascular hyporeactivity to angiotensin Ⅱ and noradrenaline in a rabbit model of obesity[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2012, 59(1): 49 – 57.

[8] Tunctan B, Korkmaz B, Sari AN, et al. A novel treatment strategy for sepsis and septic shock based on the interactions between prostanoids, nitric oxide, and 20-hydroxyeicosatetraenoic acid[J]. Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem, 2012, 11(2): 121 – 150.

[9] Steppan J, Nyhan SM, Sikka G, et al. Vasopressin-mediated enhancement of adrenergic vasoconstriction involves both the tyrosine kinase and the protein kinase C pathways[J]. Anesth Analg, 2012, 115(6): 1290 – 1295.

[10] 胡 弋,李 涛,徐 竞,等. 缺血预处理对失血性休克大鼠血管反应性及钙敏感性的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(3): 437 – 442.

[11] Mishra N, Nugent WH, Mahavadi S, et al. Mechanisms of enhanced vascular reactivity in preeclampsia[J]. Hypertension, 2011, 11(2): 867 – 873.

[12] Chaplin NL, Amberg GC. Stimulation of arterial smooth muscle L-type calcium channels by hydrogen peroxide requires protein kinase C[J]. Channels (Austin), 2012, 6(5): 385 – 389.

[13] Scruggs SB, Solaro RJ. The significance of regulatory light chain phosphorylation in cardiac physiology[J]. Arch Biochem Biophys, 2011, 510(2): 129 – 134.

[14] Dumont O, Mylroie H, Bauer A, et al. Protein kinase Cε activity induces anti-inflammatory and anti-apoptotic genes via an ERK1/2- and NF-κB-dependent pathway to enhance vascular protection[J]. Biochem J, 2012, 447(2): 193 – 204.

[15] Tsai YR, Huang LJ, Lin HY, et al. Inhibition of formyl peptide-stimulated phospholipase D activation by Fal-002-2 via blockade of the Arf6, RhoA and protein kinase C signaling pathways in rat neutrophils[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2013, 386(6): 507 – 519.

[16] Tan HB, Zhong YS, Cheng Y, et al. Rho/ROCK pathway and neural regeneration: a potential therapeutic target for central nervous system and optic nerve damage[J]. Int J Ophthalmol, 2011, 4(6): 652 – 657.

[17] Satoh K, Fukumoto Y, Shimokawa H. Rho-kinase: important new therapeutic target in cardiovascular diseases[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011, 301(2): H287 – 296.

[18] Liu L, Zhu J, Brink PR, et al. Age-associated differences in the inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by cyclosporine A[J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2011, 55(5): 622 – 630.

[19] Muthuraman A, Ramesh M, Chauhan A. Mitochondrial dependent apoptosis: ameliorative effect of flunarizine on ischemia-reperfusion of celiac artery-induced gastric lesions in the rat[J]. Dig Dis Sci, 2011, 56(8): 2244 – 2251.

[20] Shi Y, Rehman H, Ramshesh VK, et al. Sphingosine kinase-2 inhibition improves mitochondrial function and survival after hepatic ischemia-reperfusion[J]. J Hepatol, 2012, 56(1): 137 – 145.

(编辑:周小林)