维普资讯 http://www.cqvip.com

·论 著·

PKC信号通道对严重创伤性休克大鼠血管舒缩功能的调节作用

雷 艳,郭光金 (第三军医大学基础医学部外科应用解剖与手术学教研室,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 探讨蛋白激酶C(PKC)信号通道是否参与了严重创伤性休克后血管舒缩功能的调控。**方法** 取严重创伤性失血性休克大鼠的腹腔动脉(CA),观察PKC激活剂PMA及PKC抑制剂Staurosporine对休克后去甲肾上腺素(NE)、氯化钾(KCl)诱导的血管收缩反应的影响,以及PMA对乙酰胆碱(ACh)介导的内皮依赖性舒张(EDR)和硝普钠(SNP)介导的内皮非依赖性舒张(EIDR)反应的影响。**结果** 严重创伤性失血性休克大鼠腹腔动脉对NE、KCl诱导的收缩反应以及ACh、SNP介导的舒张反应都显著降低;PMA(0.01、0.1、1 μmol/L)对NE、KCl诱导的休克血管收缩反应有显著的增强作用,且呈浓度依赖性;Staurosporine(100 nmol/L)可使休克血管对NE、KCl的反应性进一步降低,同时Staurosporine预处理能显著抑制PMA增强休克血管收缩反应的作用;PMA(0.1 μmol/L)可使ACh和SNP诱导的舒张反应都进一步降低。**结论** PKC信号通道对严重创伤后的血管舒缩功能具有重要的调节作用。

[关键词] 严重创伤性休克;蛋白激酶C;血管舒缩功能
[中图分类号] R605.971 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2007)02-0075-03

Role of protein kinase C signaling pathway on vascular contraction and relaxation in severe truamatic shock rats

LEI Yan, GUO Guang-jin (Department of Surgical Applied Anatomy and Operative Surgery, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the modulation of protein kinase C (PKC) signaling pathway on vascular systolic/relaxant function of rats after severe truamatic shock. **Methods** The celiac artery (CA) rings were isolated from severe truamatic hemorrhagic shock rats and adopted to assay the effect of PMA, an activator of PKC, and Staurosporine, an inhibitor of PKC on the contraction of CA induced by norepinephrine (NE) and KCl, and the effect of PMA on the endotheliuim-dependent relaxation (EDR) of CA induced by ACh and on the endothelinm-independent relaxation (EIDR) of CA induced by SNP. **Results** The contractile response of CA to NE and KCl after severe truamatic hemorrhagic shock was significantly decreased as compared with the normal group, PMA (0.01、0.1、1 μmol/L) pretreatment significantly increased the contractile response of CA to NE and KCl. Staurosporine, the inhibitor of PKC, further decreased the contractile response of CA to NE and KCl and antagonized PMA-induced increase of vascular contraction. PMA (0.1 μmol/L) significantly decreased the relaxation of CA to ACh and SNP. **Conclusion** PKC signaling pathway may be have an important role on the regulation of vascular systolic/relaxant function after severe truamatic shock.

Keywords: severe truamatic shock; protein kinase C; vasomotor function

严重创伤休克后常出现血管舒缩功能障碍,这是导致血压持续下降和重要生命器官灌流量不足、伤者死亡的重要原因之一[1],但其机制尚未完全阐明。蛋白激酶C(PKC)是重要的细胞内信号转导通路,许多研究表明,PKC对平滑肌收缩功能有重要调节作用。有文献报道,在多种病理过程中PKC激活可能是心血管系统内源性自身保护的关键环节[2]。而对于严重创伤后的血管功能,PKC信号通道是否具有调控作用和发挥保护作用尚不清楚。本研究对此进行了初步探讨,希望为寻找有效的防治药物提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

健康成年SD大鼠128只(第三军医大学实验动物中心提供),雌雄各半,体重200~250 g。PKC激动剂phorbel12-myristate13-aetate(PMA)和抑制剂Staurosporine、乙酰胆碱(ACh)均购自Sigma公司。其他试剂均为市售分析纯。

1.2 休克模型和腹腔动脉环制备

实验前12 h动物禁食、自由饮水。实验当日大鼠以戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉后,右侧股动脉插管接水银血压计供放血和观察血压,肝素钠500 U/kg抗凝,大鼠稳定10 min,然后以特制钳夹致大鼠左侧股骨骨折及周围软组织损伤,并在10 min内经股动脉插管放血至血压降至(35±5)mmHg,并维持在此水平3 h,然后开腹分离腹腔动脉(CA),制成约3 mm长的

[作者简介] 雷 艳(1979-),女,重庆市人,助教,本科,主要从事普通外科临床及实验方面的研究。电话:(023)68752251
[收稿日期] 2006-11-02 [修回日期] 2006-12-20

维普资讯 http://www.cqvip.com

动脉环。正常大鼠除不放血外,其余处理同模型组。将环置于37 ℃恒温离体器官灌流浴槽内,浴槽盛有 Krebs-Henseleit 液(K-H 液),持续充入 95% O_2 和 5% CO_2 混合气体,每 30 min 换液 1 次。给与初张力 0.5 g,平衡 2 h,待张力曲线平稳后用于实验。血管环张力通过张力传感器经八道生理记录仪记录。

1.3 血管收缩反应性测定

80 只大鼠平分为 2 批,分别用于观察 NE 和 KCl 诱导的血管收缩反应,每批均随机分为正常组、休克组、PMA 组、Staurosporine 组、PMA + Staurosporine 组,每组 8 只。在血管环张力曲线平稳后,按累积浓度法向浴槽 K-H 液中依次加入 NE 或 KCl,使其终浓度分别为 NE:0.001、0.01、0.1、1、10、100 μmol/L,或 KCl:10、20、40、70、100 mmol/L。Staurosporine 组在加入 NE 或 KCl 前先加入 Staurosporine(100 nmol/L)孵育 10 min;PMA 组分别加入三种浓度的 PMA(0.01、0.1、1 μmol/L)孵育 10 min;PMA + Staurosporine 组先用 Staurosporine(100 nmol/L)孵育 10 min,再加入 PMA(0.1 μmol/L)孵育 10 min,再加入 NE、KCl 观察血管环的张力变化。记录各组血管环在不同 NE、KCl 浓度下产生的最大收缩力,分别作量 - 效曲线,对每一血管环的收缩数据应用曲线拟合法计算 Emax(最大收缩张力)和 pD_2(达到 50% Emax 的激动剂浓度),以正常组血管环的 Emax 为 100%(分别记为 ENE、EKCl),其余各点以占该值的百分率表示。

1.4 血管舒张反应性测定

48 只大鼠平分为 2 批,分别用于观察 PKC 激动剂 PMA 对 ACh 介导的内皮依赖性舒张和 SNP 介导的内皮非依赖性舒张的影响,每批均随机分为正常组、休克组、休克 + PMA 组,每组 8 只。按上述方法制备正常及休克动脉环,平衡 2 h 后加入 NE 10 μmol/L 预收缩 5 ~ 10 min(预收缩的最大张力记为 E0),待收缩稳定后,正常组和休克组分别按累积浓度法加入 ACh(0.01、0.1、1、10、100 μmol/L)或 SNP(0.0001、0.001、0.01、0.1、1 μmol/L);PMA 组先加入 PMA(0.1 μmol/L)孵育 10 min 再分别加入 ACh 或 SNP。记录加入不同浓度的 ACh、SNP 后血管张力(记为 EX),以下式计算血管舒张率:$\Delta E(\%) = (E_0 - E_X)/E_0 \times 100\%$,并计算最大血管舒张率以评价血管的舒张功能。

1.5 统计学分析

所有数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验进行统计学处理。$P<0.05$ 为相差显著,$P<0.01$ 为相差非常显著。

2 结果

2.1 PMA 对 NE、KCl 诱导的血管收缩反应的作用

严重创伤性休克可导致动物 CA 对 NE、KCl 诱导的收缩反应明显降低,Emax 和 pD_2 均显著降低($P<0.01$),提示严重创伤性失血性休克可导致外周阻力血管对缩血管物质反应性降低。而 PKC 的激动剂 PMA(0.01、0.1、1 μmol/L)对 NE、KCl 诱导的休克血管收缩反应有显著的增强作用,且呈浓度依赖。对 NE 诱导的收缩反应,休克组以及 0.01、0.1、1 μmol/L 的 PMA 组的 Emax 分别为正常组的(54.8 ± 4.4)%、(63.6 ± 5.4)%、(76.8 ± 4.8)%、(84.9 ± 8.5)%;而对 KCl 分别为正常组的(63.7 ± 4.7)%、(69.5 ± 5.0)%、(83.4 ± 6.3)%、(88.4 ± 5.5)%。PMA 各浓度组 Emax、pD_2 与休克组相比均有显著差异(表 1)。

表 1 PMA 和 Staurosporine 对 CA 收缩反应的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	NE		KCl	
	Emax(mg)	pD_2	Emax(mg)	pD_2
正常组	542 ± 36	3.86 ± 0.15	433 ± 31	2.61 ± 0.16
休克组	297 ± 22*	3.22 ± 0.11*	276 ± 26*	2.08 ± 0.08*
PMA0.01 μmol/L 组	345 ± 27#	3.46 ± 0.22#	301 ± 23#	2.35 ± 0.20#
PMA0.1 μmol/L 组	416 ± 17△	3.71 ± 0.25△	361 ± 30△	2.89 ± 0.15△
PMA1 μmol/L 组	460 ± 30△	3.57 ± 0.17#	383 ± 28△	2.49 ± 0.17#
Staurosporine 组	182 ± 15△	3.12 ± 0.14	195 ± 18△	2.14 ± 0.13
PMA + Staurosporine 组	201 ± 28☆	3.20 ± 0.21☆	213 ± 14☆	2.10 ± 0.09☆

*:与正常组比较,$P<0.01$;#:与休克组比较,$P<0.05$;△:与休克组比较,$P<0.01$;☆:与 PMA0.1 μmol/L 组比较,$P<0.01$

2.2 Staurosporine 对 NE、KCl 诱导的血管收缩反应的作用以及对 PMA 作用的影响

PKC 抑制剂 Staurosporine(100 nmol/L)可使休克血管对 NE、KCl 的反应性进一步降低,Emax 显著降低($P<0.01$),但 pD_2 与休克组相比无显著差异;同时 Staurosporine 预处理也显著抑制了 PMA 增强休克血管收缩反应的作用,Emax、pD_2 与 PMA0.1 μmol/L 组相比均显著降低($P<0.01$),与 Staurosporine 单用组相比无显著差异(表 1、图 1)。

2.3 PMA 对严重创伤休克后血管舒张反应的影响

严重创伤性失血性休克也影响了 CA 的舒张功能,休克组血管对 ACh 介导的内皮依赖性舒张和 SNP 介导的内皮非依赖性舒张反应都显著低于正常组($P<0.01$)。PMA(0.1 μmol/L)预处理使 ACh 和 SNP 诱导的舒张反应都进一步降低,PMA 使 ACh 最大舒张率由休克组的(71.9 ± 5.2)% 变为(50.9 ± 6.3)%($P<0.01$,图 2a),使 SNP 最大舒张率由休克组的(82.6 ± 6.2)% 变为(69.7 ± 5.4)%($P<0.01$,图 2b)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

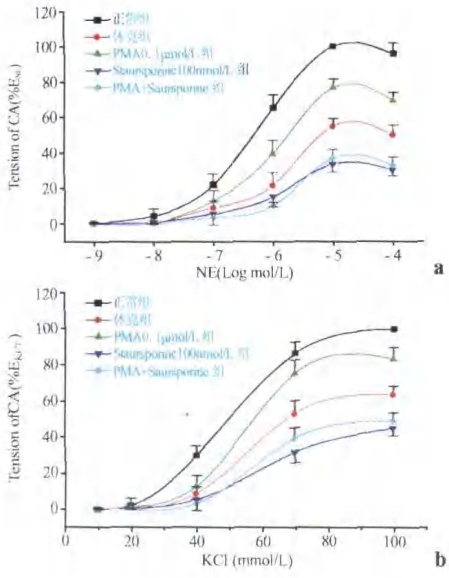


图1 Staurosporine 对 NE(a)、KCl(b)诱导严重创伤性休克 CA 收缩反应的作用以及对 PMA 作用的影响

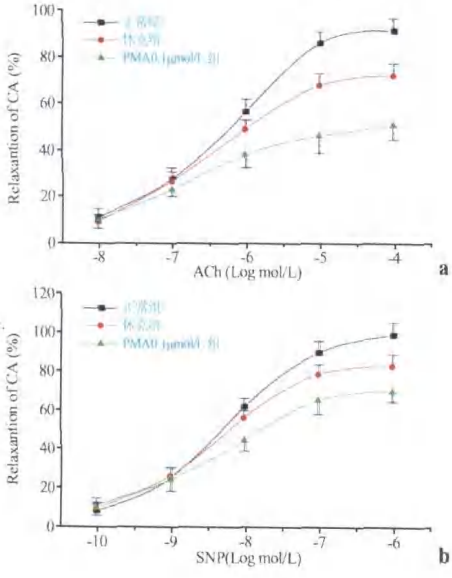


图2 PMA 对严重创伤性休克后 ACh(a)介导的 EDR 和 SNP(b)介导的 EIDR 反应的影响

3 讨论

严重创伤休克引起的血容量骤减和多种应激反应造成的血管功能紊乱是影响治疗效果、导致患者死亡的重要原因之一。目前尚无很好的改善血管功能的药物，主要原因在于严重创伤休克后血管舒缩功能障碍的机制尚未完全阐明。因此，探索其发生机理，对正确选用血管舒缩功能恢复药物、有效进行创伤休克的救治，具有十分重要的意义。

本实验采用了 PKC 特异性的激活剂 PMA 和抑制剂 Staurosporine，通过这两种工具药研究了 PKC 可能在严重创伤休克后血管舒张、收缩功能的调节中均有重要作用。其激活剂 PMA 可明显的促进休克血管对 NE、KCl 等缩血管物质的反应性，并能抑制 ACh 介导的 EDR 和 SNP 介导的 EIDR 反应，而其抑制剂 Staurosporine 可显著降低休克血管对 NE、KCl 诱导的收缩反应，且能取消 PMA 促进血管收缩反应性的作用。血管平滑肌细胞的舒缩主要受肌球蛋白轻链(myosin light chain，MLC20)的磷酸化及脱磷酸化调节，其调节途径主要包括钙依赖途径和非钙依赖途径。在严重创伤休克后，血管平滑肌细胞存在严重的钙超载，这种情况下经典的钙依赖途径作用甚微，而非钙依赖性途径调节钙敏感性从而调节血管平滑肌舒缩具有重要意义。既往认为 PKC 主要通过经典的钙依赖途径来发挥调节血管舒缩的作用，近年来随着研究的深入，人们发现 PKC 具有多种同工酶，它们的分布及生物效应各不相同，主要分 3 大类：依赖钙的传统型 PKC(conventional，cPKCs)、不依赖钙的新型 PKC(novel，nPKCs)、和对 Ca^{2+} 和二酰基甘油/佛波酯类均不依赖的非典型 PKC(atypical，aPKCs)，共包括 α、βI、βII、γ、δ、ε、θ、η、ι、λ、ζ 等十几种亚型[3]。对大鼠腹腔动脉和雪貂主动脉等的研究显示，新型 PKC-ε 亚型可能参与了激动剂通过非钙依赖性调节途径来诱导血管收缩[4]，传统型 PKC 受 Ca^{2+} 浓度增高而激活，但也可能和新型 PKC-ε、PKC-δ 亚型一样，通过非 Ca^{2+} 依赖途径调节血管舒缩功能[5]。

本实验初步证明了 PKC 信号传导通路在严重创伤休克后血管舒缩功能中具有重要的调节作用，但哪一种或几种 PKC 的同工酶参与了这一过程的调控，以及具体的调节通路如何，尚需进一步研究阐明。

[参考文献]

[1] Huda R, Vergara LA, Solanki DR, et al. Selective activation of protein kinase C delta in human neutrophils following ischemia reperfusion of skeletal muscle[J]. Shock, 2004,21(6):500-504.

[2] Hudman D, Standen NB. Protection from the effects of metabolic inhibition and reperfusion in contracting isolated ventricular myocytes via protein kinase C activation[J]. J Mol Cell Cardiol, 2004,37(2):579-591.

[3] Apple KA, McLean JE, Squires CE, et al. Differential effects of protein kinase C isoform activation in endothelin-mediated myocyte contractile dysfunction with cardioplegic arrest and reperfusion[J]. Ann Thorac Surg, 2006,82(2):664-671.

[4] Wilson DP, Sutherland C, Borman MA, et al. Integrin-linked kinase is responsible for Ca^{2+}-independent myosin diphosphorylation and contraction of vascular smooth muscle[J]. Biochem J, 2005,392(Pt3):641-648.

[5] Strock J, Diverse Pierluissi MA. Ca^{2+} channels as integrators of G protein-mediated signaling in neurons[J]. Mol Pharmacol, 2004,66(5):1071-1076.

(编辑：余汇洋)