doi:10.11659/jjssx.04E023041

·基础研究·

调节自噬对创伤性失血休克后血管功能障碍的影响

雷 艳[1],彭小勇[2],陈魁君[2],程祥云[2],王建民[2],康建毅[2],李 涛[2],刘良明[2],杨光明[2] (1.陆军军医大学陆军卫勤训练基地战救技能训练教研室,重庆 400038;2.陆军特色医学中心野战外科研究部/创伤烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

[摘 要] **目的** 研究自噬对创伤性失血休克(THS)后血管功能障碍的影响。**方法** 80只SD大鼠随机分为对照组、休克组、休克+自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤(3-MA)1、2、4 mmol/L组、休克+自噬激动剂雷帕霉素(RAPA)0.1、1、2、10 μmol/L组、休克+RAPA(1 μmol/L)+3-MA(2 mmol/L)组,建立THS大鼠模型,观察上调或抑制自噬对THS大鼠血管反应性的影响。24只大鼠随机分为正常组、休克+乳酸林格氏液(LR)组、休克+LR+RAPA组,在体观察诱导自噬对休克大鼠平均动脉血压(MAP)及血流灌注的影响,同时检测血管组织中自噬标志物相关蛋白的表达。**结果** 离体血管功能检测结果显示,THS大鼠的血管反应性明显降低,RAPA处理可提高THS大鼠的血管反应性,而3-MA处理可使THS大鼠血管反应性进一步降低,并且可拮抗RAPA提高THS大鼠血管反应性的作用。在整体动物水平,THS大鼠在给予2倍失血量的LR复苏后,MAP和肝、肾血流灌注有所恢复,但仍显著低于正常大鼠;预先给予RAPA的THS大鼠在经LR复苏后,MAP和肝、肾血流灌注均得到了明显恢复,其效果明显优于单纯LR治疗。Western blot检测结果显示,休克+LR组大鼠血管组织中自噬标志物LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ和Beclin-1/β-actin水平低于正常组大鼠,而RAPA处理升高了休克后以上标志物的水平。**结论** 自噬与THS后血管功能障碍的发生密切相关,上调自噬可提高休克血管反应性和血流灌注,从而改善创伤休克血管功能。

[关键词] 自噬;创伤性失血休克;血管反应性;雷帕霉素;3-甲基腺嘌呤;血流灌注
[中图分类号] R641 [文献标识码] A [收稿日期] 2023-04-11

Effect of autophagy regulation on vascular dysfunction after traumatic hemorrhagic shock

LEI Yan[1], PENG Xiao-yong[2], CHEN Kui-jun[2], CHENG Xiang-yun[2], WANG Jian-min[2], KANG Jian-yi[2], LI Tao[2], LIU Liang-ming[2], YANG Guang-ming[2] (1.Department of Combat Casualty Care Training, Medical Service Training Base, Army Medical University, Chongqing 400038, China; 2.Research Institute of Field Surgery, Army Medical Center/State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of autophagy on vascular dysfunction after traumatic hemorrhagic shock (THS). **Methods** A total of 80 SD rats were randomly divided into the control group, shock group, shock+the autophagy inhibitor 3-methyladenine (3-MA) of 1,2,4 mmol/L groups, shock+the autophagy inducer rapamycin (RAPA) of 0.1,1,2,10 μmol/L groups, and shock+RAPA(1 μmol/L)+3-MA(2 mmol/L) group. The rat model of THS was established to observe the effect of upregulation or inhibition of autophagy on the vascular reactivity of THS rats. A total of 24 rats were randomly divided into the normal group, shock+lactated Ringer's solution (LR) group,

[基金项目] 国家自然科学基金(82072164);重庆市基础研究与前沿探索项目(cstc2018jcyjAX0555);陆军军医大学科技创新能力提升专项项目(2022XJS31)

[通信作者] 杨光明,E-mail:yanggm971@163.com

[17] Culmsee C, Landshamer S. Molecular insights into mechanisms of the cell death program: role in the progression of neurodegenerative disorders[J]. Curr Alzheimer Res, 2006, 3(4): 269-283. doi: 10.2174/156720506778249461.

[18] Kim R. Unknotting the roles of Bcl-2 and Bcl-xL in cell death[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 333(2): 336-343. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.04.161.

[19] Hevler JF, Zenezeni Chiozzi R, Cabrera-Orefice A, et al. Molecular characterization of a complex of apoptosis-inducing factor 1 with cytochrome c oxidase of the mitochondrial respiratory chain[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021, 118(39): e2106950118. doi: 10.1073/pnas.2106950118.

[20] Liu M, Dai Y, Song C, et al. Structural characterization of a pleurotus sajor-caju polysaccharide and its neuroprotection related to the inhibition of oxidative stress[J]. Nutrients, 2022, 14(19): 4047. doi: 10.3390/nu14194047.

[21] Jangra A, Verma M, Kumar D, et al. Targeting endoplasmic reticulum stress using natural products in neurological disorders[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2022, 141: 104818. doi: 10.1016/j.neubiorev.2022.104818.

[22] Oakes SA, Papa FR. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology[J]. Annu Rev Pathol, 2015, 10: 173-194. doi: 10.1146/annurev-pathol-012513-104649.

[23] Cao SS, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease[J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 21(3): 396-413. doi: 10.1089/ars.2014.5851.

(编辑:刘 艺)

and shock+LR+RAPA group, and the effects of induced autophagy on mean arterial pressure (MAP) and organ blood perfusion of THS rats were observed in vivo, and the expression of autophagy marker-related proteins in vascular tissues were detected. **Results** The results of the vascular function experiment in vitro showed that the vascular reactivity of THS rats was significantly decreased, and RAPA treatment could improve the vascular reactivity of THS rats, while 3-MA treatment could further reduce the vascular reactivity of THS rats, which could also antagonize the effect of RAPA on improving vascular reactivity in THS rats. At the overall animal level, the MAP and blood perfusion of liver and kidney of THS rats were restored after giving LR resuscitation with the amount of twice as much as blood loss, while which were still significantly lower than those of the normal rats. After LR resuscitation, the MAP and blood perfusion of liver and kidney were significantly restored of THS rats with pretreated with RAPA, whose effect was significantly better than that with single LR treatment. Western blot revealed that the levels of LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ and Beclin-1/β-actin in vessel tissue from THS rats in the shock+LR group were lower than those of rats in the normal group, while RAPA treatment increased the levels of the above markers after shock. **Conclusion** Autophagy is closely related to the occurrence of vascular dysfunction after THS, and upregulation of autophagy can improve the reactivity and blood perfusion of shock vessel, thereby improving the function of traumatic shock vessel.

Keywords: autophagy; traumatic hemorrhagic shock; vascular reactivity; rapamycin; 3-methyladenine; blood perfusion

创伤是当前威胁人类健康的重大疾患之一。创伤后失血休克是其最常见的并发症之一,在战伤和平时各类事故伤中的发生率和病死率均较高[1]。因此,深入研究创伤性失血休克(traumatic hemorrhagic shock,THS)的发病机制、寻找有效的治疗靶点对提高创伤救治水平非常重要。血管低反应性是严重创伤休克及多种临床重症均存在的一种血管舒缩功能障碍,是导致患者发生顽固性低血压和重要器官组织灌注不足、甚至死亡的重要原因[2]。关于血管低反应性的发生机制,近年来提出了血管平滑肌细胞膜受体失敏、细胞膜超极化及钙失敏等机制,并且针对性地发现了一些有一定血管反应性恢复作用的药物[3-4],但目前这些药物的效果不太理想,需要进一步探寻其发病机制并寻找更有效的治疗靶点。

自噬是细胞对自身组分进行降解和循环再利用的重要生物学过程,是细胞维持内环境稳态的一种自我保护机制[5]。饥饿、缺血、应激等都可能诱发自噬。研究表明,自噬与肿瘤、糖尿病、病毒感染、神经退行性疾病及心肌病等多种疾病密切相关,调控自噬有可能为疾病的治疗提供新的方向[6-7]。本研究小组近期发现,在THS后实验动物血管组织及缺氧处理血管平滑肌细胞中自噬标志物的蛋白水平发生了显著变化[8]。但目前自噬在THS后血管功能障碍中的具体作用尚不清楚。故本研究建立THS大鼠模型,观察自噬激动剂雷帕霉素(rapamycin,RAPA)和其抑制剂3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine,3-MA)对THS后血管反应性的影响,并在整体动物水平观察给予RAPA对休克动物血压水平和重要器官血流灌注的影响,同时检测了血管组织中自噬标志物微管相关蛋白轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3,LC3)和Beclin-1蛋白表达水平,以期为临床THS的治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物、主要试剂及仪器

清洁级SD大鼠104只,体质量180~220 g,由陆军特色医学中心实验动物中心提供,动物使用许可证号:SYXK(军)2017-0058。

RAPA(纯度≥95%,批号:WXBC7891V)、3-MA(纯度≥99%,批号:0000084747)购自美国Sigma公司。乳酸林格氏液(lactated Ringer's,LR)购自四川科伦药业股份有限公司。兔源性LC3抗体和Beclin-1抗体购自美国Cell Signaling Technology公司。小鼠源性β-actin抗体购自美国Invitrogen公司。山羊抗兔和抗小鼠荧光二抗购自美国Jackson公司。蛋白酶抑制剂片购自美国Thermo公司。其他试剂为国产分析纯。

PeriCam PSI ZR激光散斑血流测定仪(瑞典Perimed公司);Power Lab离体器官灌流系统-八通道数据采集分析仪(瑞典AD Instrument公司);双色红外激光成像系统(德国LI-COR公司)。

1.2 THS建模和分组

80只大鼠随机分为10组(n=8):对照组、休克组、休克+3-MA(1、2、4 mmol/L)组、休克+RAPA(0.1、1、2、10 μmol/L)组、休克+RAPA(1 μmol/L)+3-MA(2 mmol/L)组。采用本实验室常规方法制备大鼠THS模型[3]:实验前12 h禁食、自由饮水。实验当日,用30 mg/kg的戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠,予以大鼠右侧股骨骨折,左侧股动脉插管并连接水银血压计,通过放血使血压降至30 mmHg,并维持2 h。模型完成后,开腹取肠系膜上动脉并制备血管环,采用离体血管张力测定技术检测血管反应性[8]。将血管环悬挂于注有K-H液的离体器官浴槽中,平衡2 h后加入124 mmol/L的高钾液诱导血管预收缩,然后更换K-H液再平衡30 min,再按照实验分组加药孵育:3-MA组和RAPA组分别

加入不同剂量的3-MA或RAPA孵育30 min;RAPA+3-MA组先用3-MA预孵育30 min,再用RAPA孵育30 min。然后加入梯度浓度的去甲肾上腺素(norepinephrine,NE)1×10^{-9}~1×10^{-5} mmol/L,记录不同NE浓度下血管环产生的收缩张力(Δ_{NE}),以各血管环对高钾诱导的预收缩张力(Δ_{K+})为量化标准,用量-效曲线和最大收缩张力($E_{max}=\Delta_{NE}/\Delta_{K+}$)评价血管反应性。

1.3 RAPA对THS大鼠血压和器官血流灌注的影响

24只大鼠随机分为3组(n=8):正常组、休克+LR组、休克+LR+RAPA组。休克+LR+RAPA组大鼠以1 mg·kg^{-1}·d^{-1}的RAPA灌胃给药,预给药3 d;按照1.2中的方法制备THS大鼠模型,然后给予2倍失血量的LR进行复苏。休克+LR组大鼠未进行RAPA灌胃,其余操作与休克+LR+RAPA组相同。正常组大鼠正常饲养。分别在休克前、休克末及复苏后0.5、1、2 h,通过股动脉插管连接血压计观察平均动脉血压(mean arterial pressure,MAP)。在复苏后2 h,开腹暴露大鼠肝和肾,采用激光散斑血流测定仪测定血流灌注量。

1.4 Western blot法检测血管组织中自噬标志物相关蛋白表达

各组大鼠完成器官血流量检测后处死,取肠系膜上动脉血管组织。常规方法提取组织蛋白,取等量的各组样本,SDS-PAGE电泳后转至PVDF膜,封闭后分别加入LC3抗体(1∶1 000)、Beclin-1抗体(1∶1 000)或β-actin抗体(1∶2 000)孵育。然后加入山羊抗兔或抗小鼠荧光二抗(1∶20 000)孵育,用双色红外成像激光系统检测蛋白条带。

1.5 统计学方法

采用SPSS 18.0软件进行统计学分析,数据以均数±标准误($\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$)表示,多组间比较采用方差分析,进一步两两比较采用*post-hoc Tukey*检验。P<0.05为差异有统计学意义。

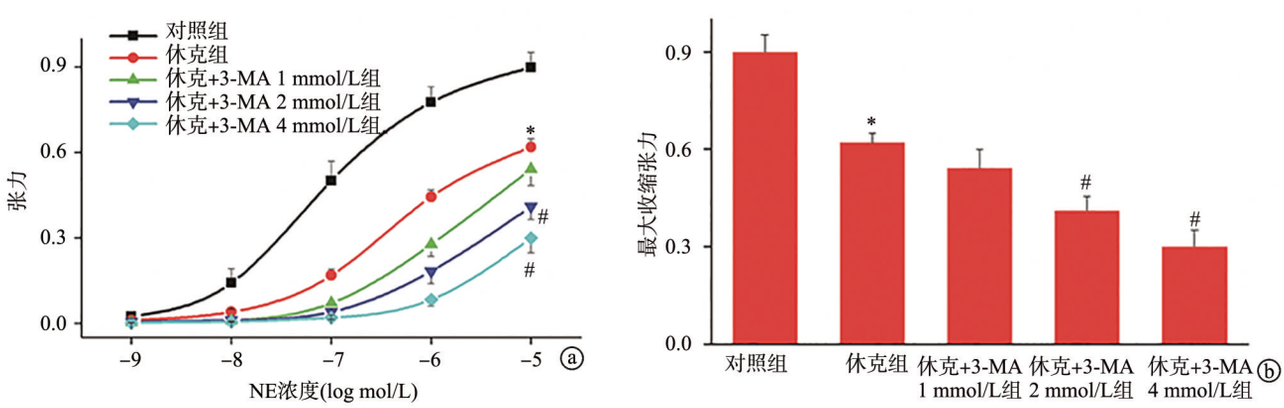
2 结果

2.1 3-MA对THS大鼠血管反应性的影响

与对照组相比,休克组大鼠肠系膜上动脉对NE诱导的血管反应性明显降低(P<0.01);不同剂量的3-MA处理后,休克血管对NE的血管反应性降低,且随3-MA剂量升高血管反应性逐渐降低;2 mmol/L、4 mmol/L的3-MA处理后血管反应性显著低于休克组(P<0.01),见图1。

2.2 RAPA对THS大鼠血管反应性的影响及3-MA的作用

给予不同剂量的RAPA处理后,THS大鼠血管对NE诱导的收缩反应性呈剂量依赖性升高。1、2、10 μmol/L RAPA可显著提高THS大鼠血管反应性(P<0.01)。3-MA预处理明显抑制了RAPA诱导THS大鼠血管反应性升高(P<0.01),见图2。



a:量-效曲线;b:最大收缩张力 *:与对照组比较,P<0.01;#:与休克组比较,P<0.01

图1 抑制自噬对THS大鼠血管反应性的影响

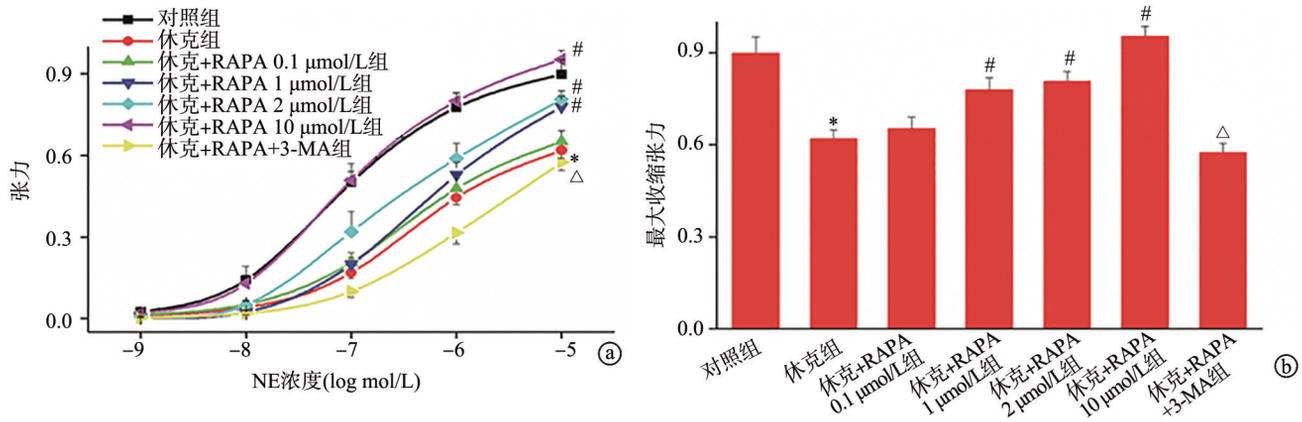
2.3 RAPA对THS大鼠血压和器官血流灌注的影响

休克+LR组大鼠建模时MAP为30 mmHg,模型完成后给予2倍失血量的LR复苏,大鼠MAP有一定升高,随着时间推移逐渐降低。而休克+LR+RAPA组大鼠提前予以RAPA治疗,LR复苏后MAP升高,且在实验期间维持在相对稳定水平,在复苏后2 h MAP水平明显高于休克+LR组(P<0.01),见图3a。

休克+LR组大鼠给予LR复苏后肝、肾血流灌注量显著低于正常组(P<0.01);而休克+LR+RAPA组大鼠的肝、肾血流灌注量显著高于休克+LR组(P<0.01),见图3b。

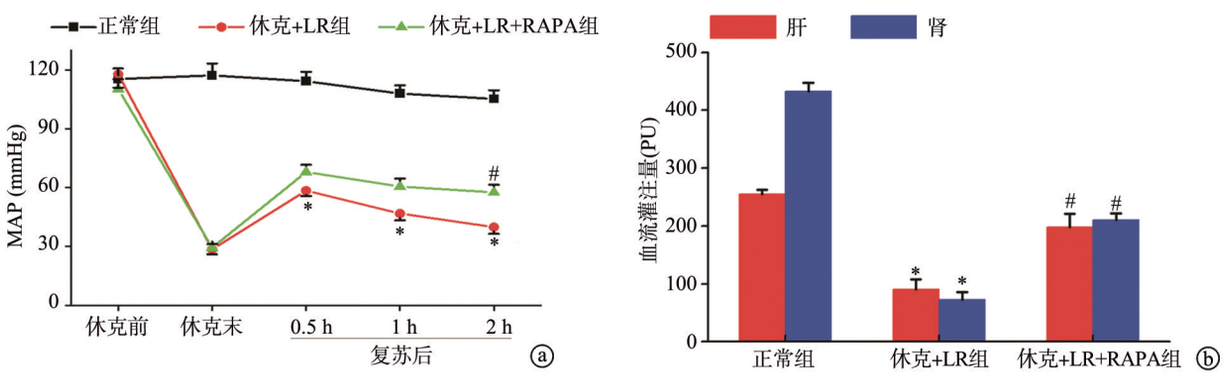
2.4 血管组织中自噬标志物相关蛋白表达

与正常组比较,休克+LR组大鼠的血管组织中LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ及Beclin-1/β-actin降低(P<0.01)。而休克+LR+RAPA组大鼠血管组织中LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ及Beclin-1/β-actin明显高于休克+LR组(P<0.01),见图4。



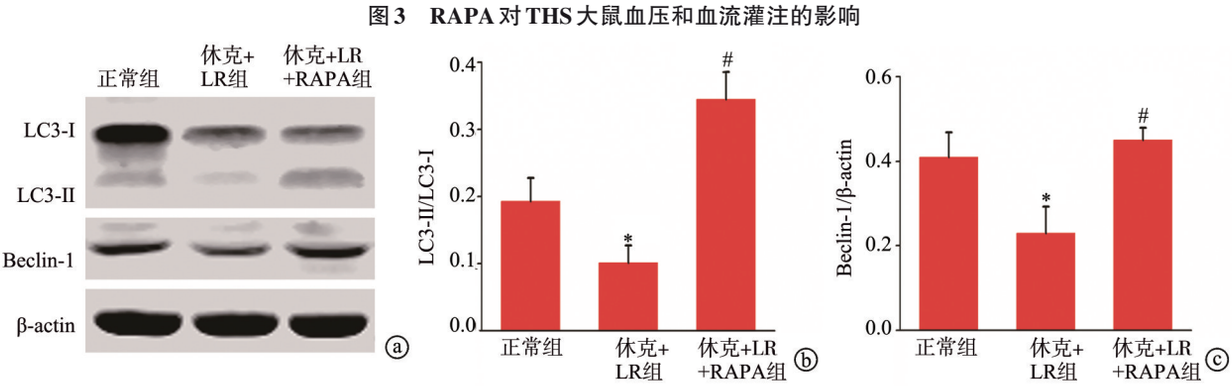
a:量-效曲线;b:最大收缩张力 *:与对照组比较,$P<0.01$;#:与休克组比较,$P<0.01$;△:与休克+RAPA 1 μmol/L组比较,$P<0.01$

图2 RAPA对THS大鼠血管反应性的影响及3-MA的作用



a:血压;b:肝、肾血流灌注量统计 *:与正常组比较,$P<0.01$;#:与休克+LR组比较,$P<0.01$

图3 RAPA对THS大鼠血压和血流灌注的影响



a:免疫印迹条带;b:LC3-II/LC3-I;c:Beclin-1/β-actin *:与正常组比较,$P<0.01$;#:与休克+LR组比较,$P<0.01$

图4 血管组织中自噬标志物相关蛋白表达

3 讨论

自噬是普遍存在于真核细胞中的一种生命过程,其主要依赖于溶酶体系统,对细胞内长寿蛋白、异常蛋白或者受损细胞器进行消化降解,是调节细胞内组分循环再利用的重要机制之一。在正常生理状态下,自噬是维持细胞内环境稳态的重要机制;而在病理状态下,自噬的异常改变可引起细胞损伤、甚至自噬性细胞死亡,参与多种疾病的发生过程。研究表明,自噬还参与了许多心血管疾病的发生发展过程,包括心肌梗死、心力衰竭、心肌病、高血压和动脉粥样硬化等[9-10]。深入研究自噬的分子机制及调控机制对相关疾病的防治具有重要意义[5-7]。但自噬在严重THS后血管功能障碍,特别是血管低反应性中的作用机制目前尚不清楚。

本研究结果发现,自噬激动剂RAPA对THS后降低的血管反应性有明显的恢复作用,而自噬抑制剂3-MA对休克血管反应性具有明显的抑制作用,并且可拮抗RAPA升高休克血管反应性的作用。本研究在给予LR的基础上在体给予1 mg·kg^{-1}·d^{-1} RAPA,使接受

常规LR复苏的THS大鼠的MAP和肝、肾血流灌注量升高,其作用明显优于单纯给予LR;对血管组织样本的检测发现,休克后血管组织的自噬标志分子LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ及Beclin-1/β-actin水平显著降低,RAPA处理可使休克后自噬水平升高。以上结果提示,自噬在THS血管反应性调节中具有重要作用,通过调节自噬能有效改善休克血管功能障碍。

尽管自噬在机体生理调节和病理过程中的重要性已经得到证实,但是如何有效调控自噬仍是一个难题。当前的实验研究结果互相矛盾,即使在同一疾病模型和相似的病理过程中亦是如此。在小鼠心肌缺血再灌注模型中,使用一种心脏自噬抑制因子(cardiac autophagy inhibitory factor,CAIF)的长链非编码RNA能够抑制自噬,减少心肌细胞死亡,减轻心肌梗死程度[11]。然而,Sala-Mercado等[12]认为,诱导自噬对急性心肌缺血再灌注损伤具有保护作用,该研究建立了大动物猪的急性心肌缺血再灌注模型,在缺血前和缺血后均给予琥珀酸氯霉素诱导了自噬标志物Beclin-1和LC3-Ⅱ的表达快速上调,减少了心肌梗死面积。类似的自噬在相似病理过程出现相反变化或作用的现象也出现于其他疾病的研究中,这些情况与自噬既有保护也可能引起损伤的双重作用有关[13-14]。Cai等[15]的研究也显示,上调自噬可对失血休克导致的血管通透性损伤发挥保护作用;然而,Wang等[16]在对失血休克大鼠的研究中发现,通过抑制血管平滑肌细胞过度自噬可以改善肠系膜淋巴介导的血管反应性降低。本研究结果显示,THS引起了大鼠血管组织自噬水平的降低,给予自噬诱导剂RAPA可上调自噬,改善血管收缩功能。这些研究差异可能与不同病理阶段自噬水平的改变情况不同有关,也证实了自噬是一把双刃剑,不恰当的激活或抑制自噬可能加重损伤。虽然目前对自噬的类型、关键调控分子、与疾病的关联等方面都有了较深入的认识,但是自噬在疾病不同病理过程中的作用和调控机制,还需要进一步探索和研究。

综上所述,自噬在THS后血管功能障碍的发生中具有重要作用,休克后血管自噬水平降低,给予自噬诱导剂可改善血管低反应性和器官血流灌注,这可能为临床重症的治疗提供一种新的思路。但是,自噬是否在创伤休克后复杂的病理过程中有不同的作用及具体调节机制,仍需更深入的研究。

[参考文献]

[1] Carsetti A, Antolini R, Casarotta E, et al. Shock index as predictor of massive transfusion and mortality in patients with trauma: a systematic review and meta-analysis[J]. Crit Care, 2023, 27(1): 85. doi: 10.1186/s13054-023-04386-w.

[2] Zhang ZS, Liu YY, He SS, et al. Pericytes protect rats and mice from sepsis-induced injuries by maintaining vascular reactivity and barrier function: implication of miRNAs and microvesicles[J]. Mil Med Res, 2023, 10(1): 13. doi: 10.1186/s40779-023-00442-2.

[3] Lei Y, Peng X, Hu Y, et al. The calcilytic drug Calhex-231 ameliorates vascular hyporesponsiveness in traumatic hemorrhagic shock by inhibiting oxidative stress and miR-208a-mediated mitochondrial fission[J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 4132785. doi: 10.1155/2020/4132785.

[4] 雷 艳,彭小勇,李 涛,等. 抑钙剂NPS 2143对创伤失血性休克大鼠心血管功能的影响[J]. 局解手术学杂志,2018,27(6):387-390. doi:10.11659/jjssx.02E018036.

[5] Mizushima N, Levine B. Autophagy in human diseases[J]. N Engl J Med, 2020, 383(16): 1564-1576. doi: 10.1056/NEJMra2022774.

[6] Mao B, Yuan W, Wu F, et al. Autophagy in hepatic ischemia-reperfusion injury[J]. Cell Death Discov, 2023, 9(1): 115. doi: 10.1038/s41420-023-01387-0.

[7] Wei S, Leng B, Yan G. Targeting autophagy process in center nervous trauma[J]. Front Neurosci, 2023, 17: 1128087. doi: 10.3389/fnins.2023.1128087.

[8] 杨光明,彭小勇,雷 艳,等. 抗氧化干预对低氧低糖诱导血管平滑肌细胞自噬和铁死亡的影响[J]. 局解手术学杂志,2022,31(1):1-5. doi:10.11659/jjssx.08E021149.

[9] Cong L, Bai Y, Guo Z. The crosstalk among autophagy, apoptosis, and pyroptosis in cardiovascular disease[J]. Front Cardiovasc Med, 2022, 9:997469. doi: 10.3389/fcvm.2022.997469.

[10] Gatica D, Chiong M, Lavandero S, et al. The role of autophagy in cardiovascular pathology[J]. Cardiovasc Res, 2022, 118(4): 934-950. doi: 10.1093/cvr/cvab158.

[11] Liu CY, Zhang YH, Li RB, et al. LncRNA CAIF inhibits autophagy and attenuates myocardial infarction by blocking p53-mediated myocardin transcription[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 29. doi: 10.1038/s41467-017-02280-y.

[12] Sala-Mercado JA, Wider J, Undyala VV, et al. Profound cardioprotection with chloramphenicol succinate in the swine model of myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Circulation, 2010, 122(11 Suppl): S179-S184. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.928242.

[13] Yamamoto S, Kazama JJ, Fukagawa M. Autophagy: a two-edged sword in diabetes mellitus[J]. Biochem J, 2013, 456(3): e1-e3. doi: 10.1042/BJ20131282.

[14] Hassanpour M, Rezabakhsh A, Pezeshkian M, et al. Distinct role of autophagy on angiogenesis: highlights on the effect of autophagy in endothelial lineage and progenitor cells[J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1): 305. doi: 10.1186/s13287-018-1060-5.

[15] Cai SM, Xu W, Li YF, et al. Genipin alleviates vascular hyperpermeability following hemorrhagic shock by up-regulation of SIRT3/autophagy[J]. Cell Death Discov, 2018, 4: 52. doi: 10.1038/s41420-018-0057-2.

[16] Wang C, Du HB, Zhao ZA, et al. Autophagy is involved in stellate ganglion block reversing posthemorrhagic shock mesenteric lymph-mediated vascular hyporeactivity[J]. Front Physiol, 2021, 12: 728191. doi: 10.3389/fphys.2021.728191.

(编辑:龙小芬)