

• 论著 •

钙失敏在大鼠失血性休克血管低反应性中的作用

徐竞 刘良明

【摘要】 目的 观察血管平滑肌钙失敏在大鼠失血性休克(HS)血管低反应性中的作用。**方法** 取失血性休克大鼠肠系膜上动脉(SMA),利用离体血管环张力测定技术,以血管环对梯度浓度去甲肾上腺素(NE)的收缩力反映血管反应性,用去极化状态下(120 mmol/L K^+)血管环对梯度浓度 Ca^{2+} 的收缩力反映血管的钙敏感性,观察失血性休克低反应血管是否存在钙敏感性降低以及钙敏感性调节剂血管紧张素 II (Ang II)、胰岛素以及 Rho-激酶特异性抑制剂 Fasudil 是否可以通过调节钙敏感性来调节血管反应性。**结果** 失血性休克后 SMA 对 NE 的反应性和钙敏感性均显著下降,表现为 NE 的量-效曲线明显右移,NE 的最大收缩力(E_{max})和 $-\lg(\text{EC}_{50})$ (pD_2)降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); Ca^{2+} 的量-效曲线明显右移, Ca^{2+} 的 E_{max} 和 pD_2 降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。具有钙敏感性增强作用的 Ang II (10^{-9} mol/L)可使 NE 和 Ca^{2+} 的量-效曲线左移,使 NE 和 Ca^{2+} 的 E_{max} 增高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而具有钙敏感性抑制作用的胰岛素(100 nmol/L)可使 NE 和 Ca^{2+} 的量-效曲线右移,NE 和 Ca^{2+} 的 E_{max} 降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),Fasudil 预处理可消除 Ang II 对 NE 诱导的血管收缩反应的增强效果,降低钙敏感性。**结论** 失血性休克血管平滑肌细胞存在钙敏感性降低,血管平滑肌细胞钙敏感性降低在失血性休克血管低反应性的发生中起重要作用。

【关键词】 休克,失血性; 血管低反应性; 钙敏感性; 钙失敏

Role of calcium desensitization in vascular hyporeactivity in hemorrhagic shock XU Jing, LIU Liang-ming. State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, The Second Department of Research Institute of Surgery, Daping Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

【Abstract】 Objective To evaluate the role of calcium desensitization of vascular smooth muscle in vascular hyporeactivity following hemorrhagic shock (HS) in rats. **Methods** The superior mesenteric artery (SMA) from HS model of rat was adopted to assay the vascular reactivity and calcium sensitivity by observing its contractibility initiated by norepinephrine (NE) and Ca^{2+} under depolarizing conditions (120 mmol/L K^+) with the aid of an isolated organ perfusion system. The experiment was conducted in two parts. In the first part, calcium desensitization was present whether or not in the response-decreased blood vessels was observed, and in the second part, whether angiotensin II (Ang II) and insulin which were calcium sensitivity regulating agents, and a relatively selective inhibitor of Rho-kinase, Fasudil, could regulate the vascular reactivity through regulating the calcium sensitivity was tested. **Results** As compared with the normal group, the cumulative dose-response curve of SMA to NE and Ca^{2+} in shock group was shifted to the right, the maximal contraction (E_{max}) and $-\lg(\text{EC}_{50})$ (pD_2) of NE and Ca^{2+} were decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Ang II shift the cumulative dose-response curve of NE and Ca^{2+} to the left, and increased the contractile response of NE and Ca^{2+} ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). On the contrary, insulin rendered the cumulative dose-response curve of NE and Ca^{2+} shift to the right and decreased the contractile response of NE and Ca^{2+} ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Pretreatment with Fasudil abolished the enhancing effect of Ang II on vascular contraction produced by NE, and reduced the calcium sensitivity. **Conclusion** Calcium desensitization is a physiological condition which exists in the vascular smooth muscle of HS rat, and it plays an important role in vascular hyporeactivity, which is one of the important mechanism of the abnormal condition of vascular hyporeactivity.

【Key words】 hemorrhagic shock; vascular hyporeactivity; calcium sensitivity; calcium desensitization

严重创伤、休克失代偿期常出现血管低反应性,主要表现为全身血管对缩血管和舒血管物质的反应降低或无反应。研究发现,血管低反应性可能与一氧

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271266,30370563);教育部回国人员启动基金资助项目(2004-176)

作者单位:400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所二室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室

通讯作者:刘良明(Email:Liuliangming2002@Yahoo.com)

作者简介:徐竞(1980-),女(汉族),四川省安岳人,硕士研究生。

化氮(NO)水平增高、血管平滑肌细胞钾、钙通道功能失常及细胞膜超极化有关,但抑制 NO,恢复钾、钙通道功能及细胞膜极化状态并不能完全逆转血管低反应性^[1-4]。近年来研究表明,严重创伤、休克后心肌细胞存在钙超载和钙失敏现象,即心肌细胞收缩蛋白对钙敏感性降低,收缩力/钙离子浓度比率降低,致使心肌细胞对以增高胞内钙离子浓度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)为主要作用机制的传统强心药不敏感^[5,6]。休克后血管

平滑肌细胞同样存在钙超载现象,但是否也存在钙失敏现象,钙失敏在血管低反应性发生中是否有作用,国内外尚无文献报道。本研究拟采用大鼠失血性休克模型,研究失血性休克时血管平滑肌细胞是否存在钙失敏现象及其在失血性休克血管低反应性发生中的作用,旨在进一步了解血管低反应性的发生机制,为寻找有效的防治药物提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 失血性休克模型及血管环的制备: Wistar 大鼠 80 只,雌雄各半,体重(226.0 ± 25.3)g,随机取 16 只作为正常对照,余 64 只按如下方法制作失血性休克模型。实验前 12 h 大鼠禁食、自由饮水,实验当日用戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉后,右侧股动脉插管并接血压计,肝素钠 500 U/kg 抗凝,稳定 10 min 后开始放血,使平均动脉压(MAP)在 10 min 内降至 30 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa),维持 2 h 后活杀大鼠,取肠系膜上动脉(SMA),清除周围结缔组织,制成 2~3 mm 长血管环共 64 根。正常大鼠直接活杀取 SMA 并制备血管环共 16 根,用于血管反应性及钙敏感性测定。

1.2 血管反应性测定: 取上述 8 根正常 SMA 血管环作为正常组;32 根休克 SMA 血管环随机分为 4 组:休克组、胰岛素组、血管紧张素 II (Ang II) 组和 Rho-激酶抑制剂 Fasudil 预处理+Ang II 组。血管环挂于注有 Krebs-Henseleit 液(K-H 液,组成:NaCl 118.0 mmol/L, KCl 4.7 mmol/L, NaHCO₃ 25 mmol/L, KH₂PO₄ 1.03 mmol/L, MgSO₄·7H₂O 0.45 mmol/L, CaCl₂ 2.5 mmol/L, 葡萄糖 11.1 mmol/L, pH 7.4)的离体器官灌流槽浴槽中,持续充入体积分数为 95% O₂ 和 5% CO₂ 混合气体,给预初张力 0.5 g, 25 °C 恒温孵育 2 h,每 20 min 换液 1 次,待张力曲线平稳后,测定血管环对肾上腺素(NE)的反应性。胰岛素组和 Ang II 组分别用胰岛素(100 nmol/L)和 Ang II (10⁻⁹ mol/L)孵育 10 min, Fasudil 预处理+Ang II 组用 1 μmol/L Fasudil 预孵 10 min,再用 Ang II (10⁻⁹ mol/L)孵育 10 min,再观察血管环对 NE 的收缩反应,血管环张力通过张力传感器连接至八道生理记录仪(Power Lab, 澳大利亚 AD Instrument 公司)记录。

血管环对 NE 的反应性用浓度累计法测定。使所用 NE 的终浓度分别为 10⁻⁹、10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶ 和 10⁻⁵ mol/L,记录不同 NE 浓度下各血管环产生的最大收缩力(E_{max}),以张力/血管环重量(g/mg)为量化标准,作量-效曲线,曲线拟合法求 NE 的半数

有效浓度(EC₅₀),用 NE 的 -lg[EC₅₀](pD₂)和 E_{max} 及量-效曲线评价血管反应性。

1.3 钙敏感性测定: 取另 8 根正常 SMA 血管环为正常组;另 32 根休克 SMA 血管环随机分为休克组、胰岛素组、Ang II 组和 Fasudil 预处理+Ang II 组。血管环挂于注有 K-H 液的离体器官灌流槽浴槽中孵育 2 h,方法同前所述,待张力曲线平稳以后,换用高钾液[MgSO₄·7H₂O 0.45 mmol/L, NaCl 2.7 mmol/L, KCl 120.0 mmol/L, NaHCO₃ 25 mmol/L, KH₂PO₄ 1.03 mmol/L, 葡萄糖 11.1 mmol/L, pH 7.4]孵育 10~20 min,待张力曲线平稳后,测定血管环对 Ca²⁺ 的反应性。胰岛素组和 Ang II 组分别用胰岛素(100 nmol/L)和 Ang II (10⁻⁹ mol/L)孵育 10 min, Fasudil 预处理+Ang II 组用 Fasudil(1 μmol/L)预孵 10 min,然后用 Ang II (10⁻⁹ mol/L)孵育 10 min,再观察血管环对 Ca²⁺ 的收缩反应,血管环张力通过张力传感器连接至八道生理记录仪记录。

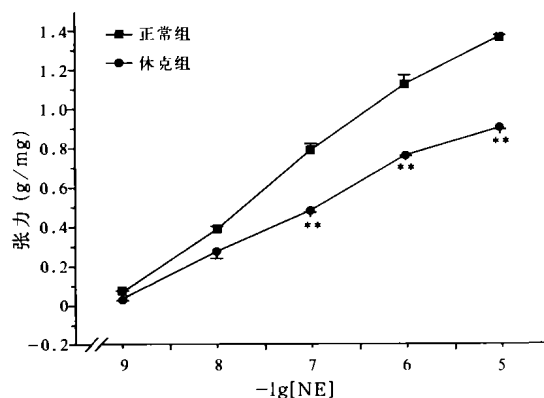
血管环的钙敏感性用浓度累计法测定。使所用的 Ca²⁺ 终浓度分别为 3×10⁻⁵、10⁻⁴、3×10⁻⁴、10⁻³、2×10⁻³、6×10⁻³、10⁻² 和 3×10⁻² mol/L,记录不同 Ca²⁺ 浓度下血管环产生的 E_{max},以张力/血管环重量(g/mg)为量化标准,作量-效曲线,曲线拟合法求 Ca²⁺ 的 EC₅₀,用 Ca²⁺ 的 pD₂ 和 E_{max} 以及量-效曲线评价血管的钙敏感性。

1.4 统计学处理: 所有数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 失血性休克大鼠血管反应性的变化(图 1): 与正常组比较,休克组 NE 的量-效曲线明显右移, E_{max} 降低,在 NE 为 10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵ mol/L 水平有显著性差异(*P* 均 < 0.01),在 NE 为 10⁻⁵ mol/L 时, E_{max} 由正常组的 (1.358 ± 0.007) g/mg 降至 (0.898 ± 0.012) g/mg (*P* < 0.01), pD₂ 也由正常组的 7.187 ± 0.044 降至 7.077 ± 0.015 (*P* < 0.05)。

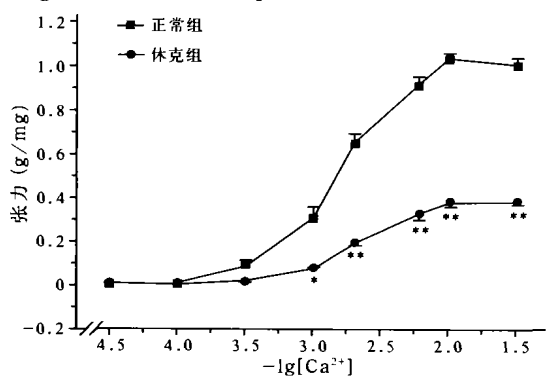
2.2 失血性休克大鼠钙敏感性的变化(图 2): Ca²⁺ 的量-效曲线也明显右移, E_{max} 降低,在 Ca²⁺ 为 10⁻³、2×10⁻³、6×10⁻³、10⁻² 和 3×10⁻² mol/L 水平有显著性差异(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01),在 Ca²⁺ 为 3×10⁻² mol/L 时, E_{max} 由正常组的 (1.004 ± 0.031) g/mg 降至 (0.377 ± 0.014) g/mg (*P* < 0.01), pD₂ 也由正常组的 2.814 ± 0.027 降至 2.557 ± 0.065 (*P* < 0.05)。



注:与同浓度 NE 刺激下的正常组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 1 失血性休克大鼠 SMA 对 NE 收缩反应的变化

Figure 1 Contractile response of SMA to NE in HS rats



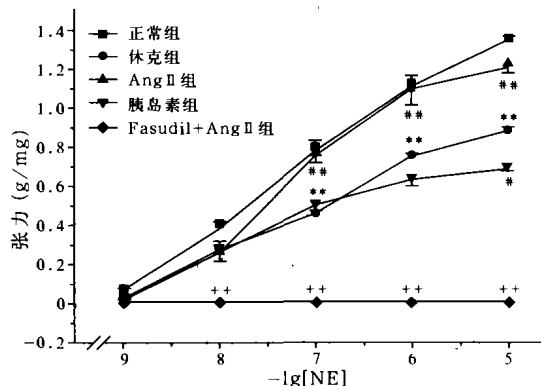
注:与同浓度 Ca^{2+} 刺激下的正常组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 2 失血性休克后大鼠 SMA 钙敏感性的变化

Figure 2 Change of calcium sensitivity of SMA in HS rats

2.3 钙敏感性调节剂 Ang II、胰岛素以及 Rho-激酶抑制剂 Fasudil 对失血性休克大鼠血管反应性的影响(图 3):与休克组比较,Ang II 可使 NE 的量-效曲线明显左移,Emax 增高,在 NE 为 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L 水平有显著性差异(P 均 < 0.01),在 NE 为 10^{-5} mol/L (pD_2 为 5)时,Emax 由休克组的 (0.898 ± 0.012) g/mg 增至 (1.224 ± 0.046) g/mg ($P < 0.01$),且在 NE 为 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L 时与正常组比较均无显著性差异;胰岛素可以使对 NE 反应性的量-效曲线明显右移,Emax 降低,在 NE 为 10^{-5} mol/L 时,Emax 由休克组的 (0.898 ± 0.012) g/mg 降至 (0.694 ± 0.024) g/mg ($P < 0.05$),但 pD_2 均无明显变化;Fasudil 预处理可消除 Ang II 对 NE 诱导血管收缩反应的增强效果。

2.4 Ang II、胰岛素以及 Fasudil 对失血性休克大鼠钙敏感性的影响(图 4):Ang II 可使 Ca^{2+} 的量-效曲线明显左移,Emax 增高,在 Ca^{2+} 为 6×10^{-3} 、 10^{-2} 、 3×10^{-2} mol/L 时,Emax 水平与休克组相比有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);在 Ca^{2+} 为 3×10^{-2} mol/L 时,Emax 由休克组的 (0.377 ± 0.014) g/mg 降至 (0.205 ± 0.014) g/mg ($P < 0.05$),但 pD_2 均无明显变化。

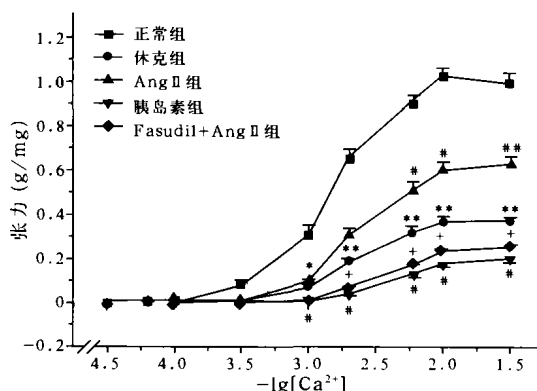


注:与同浓度 NE 刺激下正常组比较: ** $P < 0.01$;
与同浓度 NE 刺激下的休克组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;
与同浓度 NE 刺激下 Ang II 组比较: ++ $P < 0.01$

图 3 Ang II、胰岛素及 Fasudil 预处理下的 Ang II 对失血性休克大鼠 SMA 血管反应性的影响

Figure 3 Effect of Ang II, insulin and Ang II plus Fasudil on vascular reactivity of SMA to NE following HS

0.014) g/mg 增至 (0.630 ± 0.025) g/mg ($P < 0.01$)。胰岛素可使钙敏感性的量-效曲线明显右移,Emax 降低,在 Ca^{2+} 为 10^{-3} 、 2×10^{-3} 、 6×10^{-3} 、 10^{-2} 、 3×10^{-2} mol/L 时,与休克组相比差异显著(P 均 < 0.05);在 Ca^{2+} 为 3×10^{-2} mol/L 时,Emax 由休克组的 (0.377 ± 0.014) g/mg 降至 (0.205 ± 0.014) g/mg ($P < 0.05$)。用 Fasudil 预处理后,Ang II 可使钙敏感性的量-效曲线明显右移,Emax 降低,在 Ca^{2+} 为 2×10^{-3} 、 6×10^{-3} 、 10^{-2} 、 3×10^{-2} mol/L 时,Emax 与休克组比较差异显著(P 均 < 0.05);在 Ca^{2+} 为 3×10^{-2} mol/L 时,Emax 由休克组的 (0.377 ± 0.014) g/mg 降至 (0.256 ± 0.007) g/mg ($P < 0.05$),但 pD_2 均无明显变化。



注:与同浓度 Ca^{2+} 刺激下正常组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;
与同浓度 Ca^{2+} 刺激下休克组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;
与同浓度 Ca^{2+} 刺激下 Ang II 组比较: + $P < 0.05$

图 4 Ang II、胰岛素及 Fasudil 预处理对失血性休克大鼠 SMA 钙敏感性的影响

Figure 4 Effect of Ang II, insulin and Ang II plus Fasudil on the calcium sensitivity of SMA from HS rat

3 讨论

本研究中发现,休克后低反应性血管的确存在钙失敏现象,钙失敏在休克时血管低反应的发生中起重要作用,钙敏感性调节剂 Ang II 和胰岛素可通过调节血管平滑肌细胞的钙敏感性来调节血管的反应性。

Ang II 是一种作用于心血管细胞的非特异多功能激素,可激活多条胞内信号转导通路,调节血管舒缩,例如通过其 AT1 受体,活化磷脂酶 C(PLC),生成三磷酸肌醇(IP3)和甘油二酯(DAG),促进钙动员并激活蛋白激酶 C(PKC)调节钙敏感性,激活 Rho 蛋白、酪氨酸激酶和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK),调节钙敏感性,通过调节 Na^+/H^+ 交换改变胞内 pH 值,调节血管舒缩;还可通过 AT2 受体调节一氧化氮(NO)-cGMP 系统,刺激磷脂酶 A_2 (PLA₂)释放花生四烯酸等,调节血管舒缩^[7]。尽管 Ang II 的钙增敏作用主要是通过激活 Rho、抑制肌球蛋白轻链磷酸酶(MLCP)实现的^[8],但由于它并非特异的 Rho-激酶激动剂,所以其恢复休克时血管对 NE 反应性的机制除其增高钙敏感性外,还可能与其他因素(酪氨酸激酶的活化、胞内 pH 值的改变等)参与有关。为证实 Ang II 主要通过钙增敏作用增强血管对 Ca^{2+} 的收缩,我们采用 Ang II 浓度为 10^{-9} mol/L,在此剂量下, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增高不明显,仅为 $100\sim 200$ nmol/L(相当于静息状态下的浓度),远远小于高钾去极化后钙内流所增加的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ^[9],所以本实验中所用 Ang II 促进血管对 Ca^{2+} 的收缩反应主要是钙敏感性增高而不是 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增高所致;同时,为进一步证实 Ang II 是通过钙增敏作用采用血管的反应性,我们采用在 Rho-激酶特异性抑制剂 Fasudil 预处理下加 Ang II 来测定血管对 NE 的反应性和钙敏感性,结果显示,Fasudil 可阻断 Ang II 的增高钙敏感性和血管反应性的作用,进一步提示 Ang II 增高血管反应性的原因主要是通过钙敏感性增高来实现。

目前测定钙敏感性的方法有两种。一种是制备褪膜血管环,即用去污剂 α -毒素或 β -七叶皂甙等在胞膜打孔,并用钙离子载体 A-23187 耗竭胞内 Ca^{2+} ,使得外加的 Ca^{2+} 可透过胞膜进入胞内,从而测定血管对 Ca^{2+} 的收缩反应来反映钙敏感性^[10];其优点在于 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 与外加的 Ca^{2+} 浓度相等,对 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的钳制精确,不足之处在于会造成胞内小分

子物质甚至部分蛋白如钙调蛋白的丢失^[11]。另一方面是在去极化状态下测定血管环对 Ca^{2+} 的收缩力,即对未褪膜的血管环用无钙高钾(120 mmol/L)溶液造成细胞去极化,导致电压门控钙通道开放,再加入高浓度的 Ca^{2+} ,通过钙内流改变 $[\text{Ca}^{2+}]_i$,并以此测定血管对 Ca^{2+} 的收缩反应来反映钙的敏感性^[12];其优点在于不会造成胞内物质的丢失,且方便易行,不足之处在于对 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的钳制精确度不如褪膜血管。本实验中采用了第二种血管环测定钙敏感性,明确了钙失敏在休克血管低反应性中的作用,但失血性休克中钙失敏受那些因素调控,其调节机制如何,尚待进一步研究。

参考文献:

- 1 Chen S J, Wu C C, Yang S N, et al. Hyperpolarization contributes to vascular hyporeactivity in rats with LPS-induced endotoxic shock[J]. Life Sci, 2000, 68: 659-668.
- 2 开丽, 胡德耀, 王中峰, 等. 失血性休克引起大鼠肠系膜动脉血管平滑肌钾通道活动变化[J]. 生理学报, 2001, 53: 291-285.
- 3 孙高斌, 黄宗海, 孙英刚, 等. 一氧化氮合酶抑制剂对大鼠创伤性休克的治疗作用[J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15: 275-278.
- 4 杨红梅, 王黎, 陈洁, 等. 失血性休克复苏时心肌损伤和一氧化氮的变化及灵芝多糖的干预作用[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2003, 10: 304-306.
- 5 Mei J M, Hu D Y, Chen H S, et al. Effect of MCI-154, a calcium sensitizer, on cardiac dysfunction in endotoxic shock of rabbit[J]. Shock, 2000, 13: 459-463.
- 6 Mei J M, Hu D Y, Cheng H S, et al. Effect of MCI-154, a calcium sensitizer, on calcium sensitivity of myocardial fibers in endotoxic shock rats[J]. Shock, 2000, 14: 652-656.
- 7 Touyz R M, Berry C. Recent advances in angiotensin II signaling[J]. Braz J Med Biol Res, 2002, 35: 1001-1015.
- 8 Somlyo A P, Somlyo A V. Signal transduction by G protein, Rho kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II[J]. J Physiol, 2000, 522: 177-185.
- 9 Touyz R M, El Mabrouk M, He G, et al. Mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase inhibition attenuates angiotensin II-mediated signaling and contraction in spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle cells[J]. Circ Res, 1999, 84: 505-515.
- 10 Akopov S E, Zhang L, Pearce W J. Regulation of Ca^{2+} sensitization by PKC and Rho protein in ovine cerebral arteries: effects on artery size and age[J]. Am J Physiol, 1998, 275: H930-939.
- 11 Stout M A, Silver P J. Calcium transport by sarcoplasmic reticulum of vascular smooth muscle (I): effects of calmodulin and calmodulin inhibitors[J]. J Cell Physiol, 1992, 153: 169-175.
- 12 Bolz S S, Galle J, Derwand R, et al. Oxidized LDL increase the sensitivity of the contractile apparatus in isolated resistance arteries for Ca^{2+} via Rho- and Rho kinase-dependent mechanism[J]. Circulation, 2000, 102: 2402-2010.

(收稿日期: 2004-09-10 修回日期: 2004-12-24)

(本文编辑: 郭方)