

失血性休克大鼠血管平滑肌钙敏感性变化及其在休克双相血管反应性变化中的作用

李涛 刘良明 杨光明 徐竞 明佳

【摘要】目的 观察失血性休克后血管平滑肌钙敏感性是否存在双相变化,以及钙敏感性的双相变化与血管反应性双相变化的关系。**方法** 取失血性休克大鼠肠系膜上动脉(SMA),采用离体血管环张力测定技术,观察在失血性休克后不同时间点(休克即刻、休克 30 min、休克 1 h、休克 2 h)大鼠 SMA 血管环对梯度浓度去甲肾上腺素(NE)的收缩反应性,以及在去极化状态下(120 mmol/L K^+)血管环对梯度浓度钙的收缩反应性变化(钙敏感性),分析血管反应性变化与钙敏感性变化的关系;同时观察钙敏感性增强剂血管紧张素 I (Ang I)和钙敏感性抑制剂胰岛素对血管反应性的影响。**结果** 休克早期(即休克即刻和休克 30 min 时)SMA 对 NE 和钙的反应性明显升高,量-效曲线明显左移,最大收缩力(E_{max})明显升高(P 均 <0.05);随着休克时间的延长,血管环对 NE 和钙的反应性均逐渐下降,到休克 2 h 均已明显降低,其量-效曲线明显右移, E_{max} 明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);休克后不同时间点血管反应性变化与钙敏感性变化呈显著正相关($r=0.9624, P<0.05$)。具有钙敏感性增强作用的 Ang I (1×10^{-9} mol/L)可明显升高休克 2 h 血管环对 NE 和钙的反应性($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而有钙敏感性抑制作用的胰岛素则可降低休克早期(休克即刻)血管环对 NE 和钙的反应性($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 失血性休克血管平滑肌细胞存在钙敏感性的双相变化,血管平滑肌细胞钙敏感性双相变化在失血性休克血管反应性的双相变化中起重要作用。

【关键词】 休克,失血性; 血管低反应性; 钙敏感性; 双相血管反应性

Changes in sensitivity of vascular smooth muscle to calcium and its role in the biphasic change in vascular reactivity following hemorrhagic shock in rats LI Tao, LIU Liang-ming, YANG Guang-ming, XU Jing, MING Jia. State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department Two, Research Institute of Surgery, Daping Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400042, China Corresponding author: LIU Liang-ming (Email: liuliangming2002@yahoo.com)

【Abstract】Objective To observe the change in sensitivity of vascular smooth muscle to calcium and its role in biphasic vascular reactivity following hemorrhagic shock (HS) in rats. **Methods** The superior mesenteric artery (SMA) obtained from rats with HS was used to assay the vascular reactivity and sensitivity to calcium by observing the contraction initiated by norepinephrine (NE) and Ca^{2+} under depolarizing conditions (120 mmol/L K^+) with isolated organ perfusion system. At different time points after shock, the relationship between vascular reactivity and sensitivity to calcium was analyzed. Meanwhile the effects of the angiotensin I (Ang I) and insulin, the calcium sensitivity regulating agents, on vascular reactivity were also observed. **Results** As compared with the control group, the cumulative dose-response curves of SMA to NE and Ca^{2+} at early shock stages, i. e. immediately and 30 minutes after shock, shifted to the left, the maximal contractions (E_{max}) of NE and Ca^{2+} were increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). But the cumulative dose-response curves of SMA to NE and Ca^{2+} at late shock stage shifted to the right, and E_{max} of NE and Ca^{2+} were significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$). Ang I increased the contractile response of SMA to NE and Ca^{2+} when shock persisted for 2 hours, rendering the cumulative dose-response curves of NE and Ca^{2+} shifted to the left ($P<0.05$ or $P<0.01$). But insulin decreased the contractile response of SMA to NE and Ca^{2+} at early stage of shock, rendering the cumulative dose-response curves of NE and Ca^{2+} shifted to the right ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** Sensitivity of vascular smooth muscle to calcium following hemorrhagia displays a biphasic change. It plays important roles in biphasic vascular reactivity.

【Key words】 hemorrhagic shock; vascular reactivity; calcium sensitivity; biphasic vascular reactivity

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271266,30370563);
教育部留学回国人员启动基金(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:李涛(1971-),女(汉族),重庆市江津人,博士研究生。

严重创伤/休克失代偿期常出现血管低反应性,它表现为全身血管对缩血管物质和舒血管物质的反应降低或不反应,目前研究发现它可能与一氧化氮(NO)水平增高、血管平滑肌细胞(VSMC)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]。本实验室前期研究发现,休克后血管反应性存在双相变化,即休克早期血管反应性明显升高,休克晚期血管反应性明显降低;在失血性休克 2 h 后 VSMC 存在钙失敏,且钙失敏在休克血管低反应性发生中起重要作用^[5]。为进一步探讨钙失敏在失血性休克血管低反应发生中的作用,休克后钙敏感性变化是否与血管反应性一样也存在双相变化及其之间的关系,本实验中采用大鼠失血性休克模型,研究失血性休克后不同时间肠系膜上动脉(SMA)血管钙敏感性变化及其与血管反应性变化的关系,以及钙敏感性调节剂对失血性休克血管钙敏感性及血管反应性的调节作用。

1 材料与方 法

1.1 动物分组及模型制备:Wistar 大鼠 56 只,雌雄各半,体重(208.0±23.1)g。随机取 8 只作为正常对照组;其余 48 只制备休克模型,分为休克即刻组、休克即刻+胰岛素组、休克 30 min 组、休克 1 h 组、休克 2 h 组、休克 2 h+血管紧张素 I (Ang I) 组。大鼠实验前 12 h 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,右侧股动脉插管并连接血压计,肝素钠 500 U/kg 抗凝,术毕稳定 10 min 后开始放血,10 min 内使平均动脉压(MAP)降至 40 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa),在此水平上分别维持 0 h(16 只)、30 min(8 只)、1 h(8 只)和 2 h(16 只),活杀大鼠,每只动物取 SMA,清除周围结缔组织,制作成 2~3 mm 长的血管环 2 根,其中一根用于血管反应性测定,另一根用于钙敏感性测定。正常大鼠直接活杀取 SMA,制作血管环。

1.2 血管反应性测定:SMA 血管环挂于注有 K-H 液(Krebs-Henseleit 液,组成:NaCl 118 mmol/L、KCl 4.7 mmol/L、NaHCO₃ 25 mmol/L、KH₂PO₄ 1.03 mmol/L、MgSO₄·7H₂O 0.45 mmol/L、葡萄糖 11.1 mmol/L、CaCl₂ 2.5 mmol/L、pH 7.4)离体器官灌流槽的浴槽中,持续充入体积分数为 95%的 O₂ 和 5%的 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,测定血管环对去甲肾上腺素(NE)的反应性。Ang I 处理组用 Ang I (1×10⁻⁹ mol/L)预孵育休克 2 h 的 SMA 血管环 10 min;休克即刻+胰岛素组用胰岛素(1×10⁻⁷ mol/L)预孵育休克即刻血管环 10 min;分别观察血管环对 NE 的收缩反应,通过张力传感器连接至 8 道生理记录仪记录。

血管环对 NE 的反应性采用浓度累计法测定,使所用 NE 的终浓度分别为 1×10⁻⁹、1×10⁻⁸、

1×10⁻⁷、1×10⁻⁶、1×10⁻⁵和 1×10⁻⁴ mol/L,记录不同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,制作量-效曲线,曲线拟合法求 NE 半数有效浓度(EC₅₀),用 NE pD₂(-log EC₅₀)和 E_{max} 以及量-效曲线评价血管反应性。

1.3 钙敏感性的测定:取 SMA 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,待张力曲线平稳后换高钾液(组成:NaCl 2.7 mmol/L、KCl 120 mmol/L、NaHCO₃ 25 mmol/L、KH₂PO₄ 1.03 mmol/L、MgSO₄·7H₂O 0.45 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钙的反应性。休克 2 h+Ang I 组用 Ang I (1×10⁻⁹ mol/L)预孵育休克 2 h SMA 血管环 10 min;休克即刻+胰岛素组用胰岛素(1×10⁻⁷ mol/L)预孵育休克即刻血管环 10 min,观察血管环对钙的收缩反应,通过张力传感器连接至 8 道生理记录仪记录。

血管环的钙敏感性测定用浓度累计法,钙终浓度分别为 3×10⁻⁵、1×10⁻⁴、3×10⁻⁴、1×10⁻³、2×10⁻³、6×10⁻³、1×10⁻²、3×10⁻² mol/L,记录不同钙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,制作量-效曲线,用曲线拟合法求钙的 EC₅₀,用钙的 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:所有数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间采用 *t* 检验进行统计学处理,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 失血性休克不同时间点 SMA 对 NE 和钙反应性的变化(表 1,图 1,图 2):与正常对照组相比,休克即刻及 30 min 时,SMA 对 NE 和钙的量-效曲线明显左移,两点 E_{max} 均显著性增加(*P*<0.01 或 *P*<0.05),且休克即刻在 NE 浓度为 1×10⁻⁶、1×10⁻⁵ mol/L 水平差异均有显著性(*P*<0.05 或 *P*<0.01),休克 30 min 在 NE 浓度 1×10⁻⁵ mol/L 水平差异具有显著性(*P*<0.05);休克即刻在钙浓度为 1×10⁻³、2×10⁻³、6×10⁻³、1×10⁻² 和 3×10⁻² mol/L 水平差异均有显著性(*P* 均<0.05);休克 30 min 在钙浓度 3×10⁻² mol/L 水平差异有显著性(*P*<0.05)。随休克时间延长,血管环对 NE 和钙的反应性逐渐下降,休克后 2 h,NE 和钙的量-效曲线明显右移,E_{max} 降低(*P*<0.01 或 *P*<0.05)。休克即刻对 NE 的 pD₂ 明显降低,休克后 2 h 明显

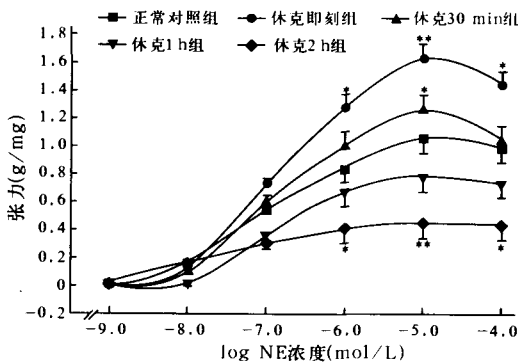
升高(P 均 <0.05)。休克后 2 h, 钙的 pD_2 明显降低($P<0.05$), 其余各组 pD_2 差异均无显著性。

表 1 失血性休克不同时间点大鼠 SMA 对 NE 和钙反应性变化($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 1 Response of SMA to NE and Ca^{2+} at different time after HS in rats($\bar{x}\pm s, n=8$) g/mg

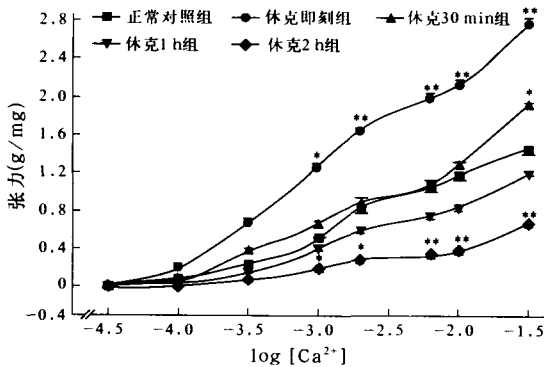
组别	NE 反应性		钙反应性	
	E _{max}	pD_2	E _{max}	pD_2
正常对照组	1.052±0.112	7.136±0.044	1.477±0.031	2.797±0.027
休克即刻组	1.626±0.101**	6.883±0.015*	2.773±0.014**	2.771±0.065
休克 30 min 组	1.257±0.098*	6.782±0.117	1.919±0.025*	2.595±0.012
休克 1 h 组	0.784±0.098	6.793±0.039	1.212±0.014	2.751±0.017
休克 2 h 组	0.453±0.045**	7.768±0.035*	0.669±0.022**	2.557±0.034*

注:与正常对照组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$



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

图 1 失血性休克大鼠 SMA 的 NE 收缩反应性变化
Figure 1 Contractile response of SMA to NE at different time after HS in rats



注:与同浓度钙刺激下的正常对照组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

图 2 失血性休克大鼠 SMA 的钙敏感性变化
Figure 2 Change of calcium sensitivity of SMA to Ca^{2+} at different time after HS in rats

2.2 钙敏感性增强剂 Ang II 及钙敏感性抑制剂胰岛素对失血性休克大鼠血管环 NE 和钙收缩反应性的影响(表 2, 图 3, 图 4): Ang II 可使休克 2 h SMA 对 NE 和钙的量-效曲线明显左移, 与休克 2 h 组相比, E_{max} 均显著增高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 在 NE 浓度 1×10^{-6} 和 1×10^{-5} mol/L 水平差异均有

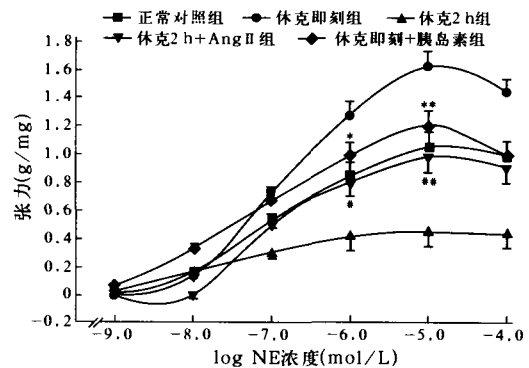
显著性($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 在钙浓度 6×10^{-3} , 1×10^{-2} , 3×10^{-2} mol/L 水平差异均有显著性($P<0.05$ 或 $P<0.01$); Ang II 预孵育休克 2 h SMA 后, SMA 对 NE 和钙的反应性与相同水平下正常对照组相比差异均无显著性。

表 2 Ang II 和胰岛素对 NE 和钙 E_{max} 和 pD_2 的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 Effect of Ang II and insulin on vascular reactivity of SMA to NE and Ca^{2+} ($\bar{x}\pm s, n=8$) g/mg

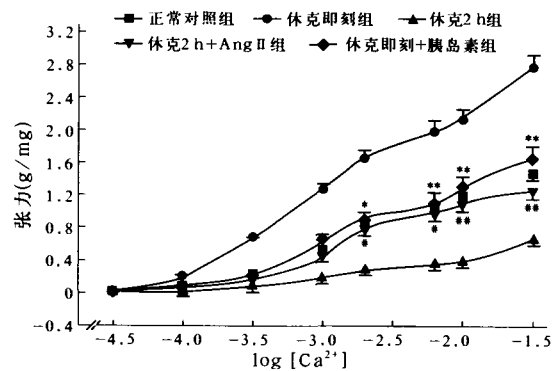
组别	NE 反应性		钙反应性	
	E _{max}	pD_2	E _{max}	pD_2
正常对照组	1.052±0.007	7.136±0.044	1.477±0.031	2.797±0.027
休克即刻组	1.626±0.101	6.883±0.015	2.773±0.014	2.771±0.065
休克即刻+胰岛素组	1.205±0.119**	7.083±0.044	1.543±0.123**	2.765±0.089
休克 2 h 组	0.453±0.021	7.768±0.035	0.669±0.042	2.557±0.034
休克 2 h + Ang II 组	0.985±0.112#	6.878±0.117	1.265±0.132#	2.752±0.012

注:与休克即刻组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与休克 2 h 组比较: # $P<0.05$, ## $P<0.01$



注:与休克即刻组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与休克 2 h 组比较: # $P<0.05$, ## $P<0.01$

图 3 钙敏感性调节剂 Ang II 和胰岛素对 SMA NE 反应性的影响
Figure 3 Effect of Ang II and insulin on vascular reactivity of SMA to NE



注:与休克即刻组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与休克 2 h 组比较: # $P<0.05$, ## $P<0.01$

图 4 钙敏感性调节剂 Ang II 和胰岛素对 SMA 钙反应性的影响
Figure 4 Effect of Ang II and insulin on vascular reactivity of SMA to Ca^{2+}

胰岛素可使休克即刻 SMA 对 NE 和钙的量-效曲线明显右移,与休克即刻组相比,Emax 均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),在 NE 浓度为 1×10^{-6} 和 1×10^{-5} mol/L 水平差异均有显著性,在钙浓度为 6×10^{-3} 、 1×10^{-2} 和 3×10^{-2} mol/L 水平差异均有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);胰岛素预孵育休克即刻 SMA 后,SMA 对 NE 和钙的反应性与相同水平下正常对照组相比差异均无显著性。

2.3 失血性休克不同时间点 SMA 对 NE 反应性的变化与钙敏感性变化的关系:在休克各时间点 SMA 对 NE 反应性与钙敏感性变化之间呈直线正相关关系($r = 0.9624$, $P < 0.05$)。

3 讨论

严重创伤、休克后心肌细胞存在钙超载和钙失敏。我们研究发现,在失血性休克晚期,VSMC 也存在钙失敏,钙失敏在休克血管低反应发生中起重要作用^[6]。休克后血管对 NE 的反应存在双相变化,即在休克早期血管反应性明显升高,在休克晚期血管反应性明显降低,但在休克不同时期,钙敏感性是否存在双相变化,钙敏感性双相变化是否与血管反应性的双相变化之间密切相关,目前尚未见报道。

本研究采用大鼠失血性休克模型,观察了休克后不同时间点 SMA 血管环对 NE 反应性和钙敏感性的变化及其之间的关系,同时观察了钙敏感性调节剂 Ang I 和胰岛素对血管环 NE 反应性和钙敏感性的影响。研究发现,大鼠失血性休克后,SMA 对 NE 和钙的收缩反应性均呈现双相变化,休克早期(休克即刻和休克 30 min)血管环对 NE 和钙的收缩反应性明显升高,休克晚期(休克 2 h)血管环对 NE 和钙的收缩反应性明显降低。血管环对 NE 反应性变化与对钙的收缩反应性变化之间呈现明显的正相关关系。钙敏感性增强剂 Ang I 可通过增加 VSMC 的钙敏感性而恢复休克晚期(休克 2 h)降低的血管反应性,钙敏感性抑制剂胰岛素则可以通过降低 VSMC 的钙敏感性而降低休克早期血管的高反应性。结果提示,休克后血管平滑肌对钙的敏感性存在着双相变化,且钙敏感性的双相改变在失血性休克后血管反应性的双相变化中起重要作用。

由于 Ang I 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,它并非特异的 Rho-激酶激动剂,所以其恢复休克血管对 NE 反应性除其增高钙敏感性以外,还可能与其他因素(酪氨酸激酶的活化、胞内 pH 值的改变等)有关^[6]。本实验室前期工作证实,实验

中所采用的 Ang I 浓度(1×10^{-9} mol/L),主要通过激活 Rho 激酶,抑制肌球蛋白轻链磷酸酶(MLCP)发挥钙增敏作用^[6]。胰岛素作为钙敏感性抑制剂,研究证实,胰岛素可抑制 Rho-激酶的活性,使 MLCP 活性升高,从而导致钙敏感性降低^[7]。

本实验中明确了休克后血管对钙的敏感性也呈双相变化,并与血管反应性的双相变化密切相关。本实验室前期研究证实,失血性休克后 VSMC 钙敏感性变化的调节机制与 Rho-激酶、蛋白激酶 C (PKC)、蛋白激酶 G (PKG)密切相关^[8]。但其具体的调节机制及哪种分子起主要作用,目前尚不清楚。文献[9]报道,在 α -毒素蜕膜的兔气道平滑肌,用 Rho-激酶特异拮抗剂 Y-27632 预处理可剂量依赖性地抑制 GTP 水解类似物(GTPYS)所致钙增敏,但在 Y-27632 增至最大剂量(100 mmol/L)时,仍存在一部分对 Y-27632 无反应的收缩,约占 Emax 的 16%,联合运用 Y-27632(100 mmol/L)和 GF109203X(PKC 拮抗剂)可完全解除 GTPYS 导致的钙增敏,提示 Rho-激酶在 G 蛋白介导的钙增敏中发挥主要作用,而 PKC 作用可能要小些。究竟哪种分子有更重要的调节作用,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钙 K^+ 通道活动变化[J].生理学报,2001,53:291-295.
- 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 开丽,胡德耀,刘良明.阿片受体拮抗剂对失血性休克大鼠血管收缩功能的影响[J].第三军医大学学报,2002,24:1185-1188.
- 6 徐竟,刘良明.钙失敏在大鼠失血性休克血管低反应性中的作用[J].中国危重病急救医学,2005,17:20-23.
- 7 Iizuka K, Yoshii A, Samizo K, et al. A major role for the rho-associated coiled coil forming protein kinase in G-protein-mediated Ca^{2+} sensitization through inhibition of myosin phosphatase in rabbit trachea[J]. Br J Pharmacol, 1999, 128: 925-933.
- 8 Xu Jing, Liu Liangming. The role of calcium desensitization in vascular hyporeactivity and its regulation following hemorrhagic shock[J]. Shock, 2005, 23: 576-581.
- 9 Vincent S, Helene L J, Chrystelle C T, et al. Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca^{2+} sensitization of contraction in vascular smooth muscle[J]. J Bio Chem, 2000, 275: 21722-21729.

(收稿日期:2005-06-24 修回日期:2005-09-20)

(本文编辑:李银平)