

## 肌内皮缝隙连接对失血性休克大鼠血管收缩反应的影响

明佳 刘良明 李涛 杨光明 徐竞

**【摘要】** 目的 研究肌内皮缝隙连接(MEGJ)对失血性休克大鼠内皮依赖性和非依赖性血管收缩反应的影响。方法 56 只 SD 大鼠按随机数字表法分为去甲肾上腺素(NE)组和杨梅黄酮组;NE 组分为正常对照以及休克 0、0.5、1 和 2 h 5 个亚组;杨梅黄酮组分为正常对照以及休克 0、0.5、1、2、3 和 4 h 7 个亚组。各组取其肠系膜上动脉(SMA)制成血管环,分别测量在 18 $\alpha$ -甘草次酸(18 $\alpha$ -GA)作用前后血管环对 NE 和杨梅黄酮反应性的变化。结果 SMA 血管环对 NE 的反应性表现为:休克 0 h 和 0.5 h 组明显高于正常对照组和其他休克时间点组,休克 1 h 和 2 h 组明显低于正常对照组和休克 0 h 和 0.5 h 组;18 $\alpha$ -GA 对 NE 诱导的 SMA 血管环收缩反应性无明显影响。SMA 血管环对杨梅黄酮的反应主要表现为:休克 0、0.5、1 和 2 h 组明显高于正常对照组,于休克 2 h 达最高点;休克 3 h 和 4 h 组明显低于正常对照组,运用 18 $\alpha$ -GA 阻断 MEGJ 后,各组血管环的收缩反应性较 18 $\alpha$ -GA 作用前明显下降,其中以休克 1、2 和 3 h 组下降幅度明显大于其他组。结论 失血性休克后早期,内皮依赖和非依赖性的血管收缩反应均有不同程度代偿性增加,休克 1 h 和 2 h 表现为非内皮依赖性血管收缩反应下降,休克 3 h 和 4 h 表现为内皮依赖性血管收缩反应明显降低;MEGJ 在休克后内皮依赖性血管收缩反应的变化中起重要调节作用。

**【关键词】** 休克,失血性; 内皮依赖性; 血管收缩反应; 肌内皮缝隙连接

**Role of arterial myo-endothelial gap junction on the vascular contractile reactivity following hemorrhagic shock in rats** MING Jia, LIU Liang-ming, LI Tao, YANG Guang-ming, XU Jing. State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, 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 role of arterial myo-endothelial gap junction (MEGJ) on endothelium-dependent and independent vascular contractile reactivity following hemorrhagic shock in rats. **Methods** Fifty-six SD rats were randomly divided into noradrenaline (NE) group and myricetin group. NE group was further divided into 5 subgroups: normal control group, 0, 0.5, 1 and 2 hours after hemorrhagic shock groups. Myricetin group was further divided into 7 subgroups: normal control group, 0, 0.5, 1, 2, 3 and 4 hours after hemorrhagic shock groups. Superior mesenteric artery (SMA) was used to compare the changes in vascular responding to NE or myricetin with or without 18 $\alpha$ -glycyrrhetic acid (18 $\alpha$ -GA). **Results** Compared with normal control group, the reactivity of SMA rings to NE was significantly increased at 0 and 0.5 hour after shock and then decreased at 1 hour and 2 hours after shock. 18 $\alpha$ -GA had no effect on SMA constriction induced by NE. The reactivity of SMA rings to myricetin was increased at 0, 0.5, 1 hour and 2 hours after shock, and it reached the peak at 2 hours, then it significantly decreased at 3 hours and 4 hours after shock. 18 $\alpha$ -GA antagonized SMA constriction induced by myricetin. The antagonizing effect on myricetin in shock 1, 2 and 3 hours groups was more obvious than that in the other groups. **Conclusion** At the early stage after hemorrhagic shock, the endothelium-dependent and independent vascular contractile response show a compensatory increase. The endothelium-independent contractile response is significantly decreased at 1 hour and 2 hours after shock, and the endothelium-dependent contractile response is significantly decreased at 3 hours and 4 hours after shock. MEGJ plays an important role in endothelium-dependent vascular contractile reactivity following hemorrhagic shock.

**【Key words】** hemorrhagic shock; endothelium-dependent; vascular contractile response; myo-endothelial gap junction

血管低反应性(hyporesponsiveness)主要表现

基金项目:国家重点基础研究发展计划“973”项目(2005CB522601)

作者单位:400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所,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:明佳(1970-),女(汉族),重庆人,博士研究生,主治医师,主要从事战、创伤休克后血管反应性方面的研究。

为严重创伤/休克失代偿后全身血管对缩血管和舒血管物质的反应减弱或不反应,它参与了创伤/休克的发生发展,制约着创伤/休克的治疗<sup>[1-3]</sup>。血管内皮细胞能够分泌多种血管活性物质调节血管的张力,但它可否直接通过细胞间缝隙连接调节血管舒缩功能,目前研究报道很少。已有的研究表明,血管内皮细胞与血管平滑肌细胞间存在着缝隙连接,即肌内

皮缝隙连接(MEGJ),我们以前的研究发现,MEGJ在肠系膜上动脉(SMA)血管的舒张反应中具有调节作用,但目前尚未见有关 MEGJ 在休克血管收缩反应变化中作用的研究报道。本实验以 SD 大鼠 SMA 为研究对象,采用离体器官灌流浴槽和血管张力测定技术,研究了 MEGJ 在失血性休克后血管收缩反应中的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及分组:**SD 大鼠 56 只,平均体重(270±10)g,雌雄不拘。按随机数字表法分为去甲肾上腺素(NE)组和杨梅黄酮组;NE 组分为正常对照及休克 0、0.5、1 和 2 h 5 个亚组;杨梅黄酮组分为正常对照及休克 0、0.5、1、2、3 和 4 h 7 个亚组。

**1.2 休克模型及血管环制备:**SD 大鼠,实验前禁食 12 h、自由进水,实验当日用 30 mg/kg 的戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,右侧股动脉插管接血压计,肝素钠 500 U/kg 抗凝,术毕稳定 10 min 后开始放血,10 min 左右使血压降至 40 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa)。分别在血压降至 40 mm Hg 即刻(0)、0.5、1、2、3 和 4 h 后活杀大鼠( $n=8$ ),取 SMA,清除周围结缔组织,制成两条 2~3 mm 长的血管环,分别置于 NE 组和杨梅黄酮组。

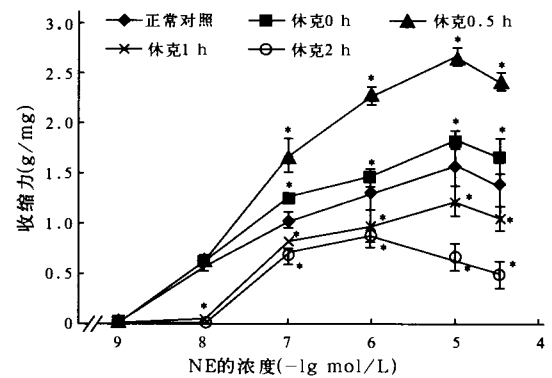
**1.3 血管收缩反应性测定:**将血管环悬挂于一对不锈钢丝上,一端置于固定柱上,另一端与肌张力换能器相连,浸于注有 K-H 液的离体器官灌流浴槽中,持续充入体积分数为 95%的 O<sub>2</sub> 和 5%的 CO<sub>2</sub> 混合气体,给予初张力 0.5 g,37 °C 恒温孵育 2 h,20 min 换液 1 次,待张力曲线平稳后,分别依次加入终浓度为 1×10<sup>-9</sup>、1×10<sup>-8</sup>、1×10<sup>-7</sup>、1×10<sup>-6</sup>、1×10<sup>-5</sup> 和 5×10<sup>-5</sup> mol/L 的 NE 或终浓度为 1×10<sup>-4</sup> mol/L 的杨梅黄酮,观察不同程度休克 SMA 血管环收缩反应变化。然后,血管环继续以 K-H 液 37 °C 恒温孵育约 1 h,20 min 换液 1 次,待张力曲线平稳后,加入 18α-甘草次酸(18α-GA,终浓度为 50 μmol/L)继续孵育 1 h,分别依次加入终浓度为 1×10<sup>-9</sup>、1×10<sup>-8</sup>、1×10<sup>-7</sup>、1×10<sup>-6</sup>、1×10<sup>-5</sup> 和 5×10<sup>-5</sup> mol/L 的 NE 或终浓度为 1×10<sup>-4</sup> mol/L 的杨梅黄酮,观察不同程度休克 SMA 血管环的收缩反应变化。

血管收缩张力 = 加 NE 或杨梅黄酮后血管环的收缩力 / 血管环重量

**1.4 统计学分析:**采用 SPSS 11.0 统计软件包,结果以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,各组间均数比较行 ANOVA 方差分析,加 18α-GA 前后均数比较行配对样本 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

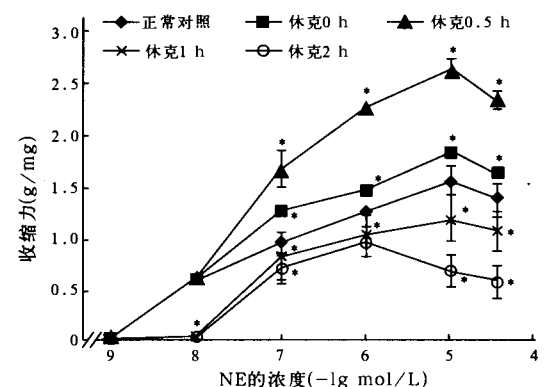
## 2 结果

**2.1 18α-GA 对不同程度休克大鼠 SMA 血管环 NE 反应性的影响:**当 NE 浓度在 1×10<sup>-9</sup> mol/L 时,各组收缩力差异无显著性;在 1×10<sup>-8</sup> mol/L 时,休克 0 h 和 0.5 h 组对 NE 的收缩反应性与正常对照组差异无显著性,休克 1 h 和 2 h 组均明显低于正常对照组;在 1×10<sup>-7</sup>、1×10<sup>-6</sup>、1×10<sup>-5</sup> 和 5×10<sup>-5</sup> mol/L 时,休克 0 h 和 0.5 h 组对 NE 的收缩反应性高于正常对照组,休克 1 h 和 2 h 组低于正常对照组( $P$  均  $< 0.01$ ,图 1)。18α-GA 作用前后,正常对照组、休克 0 h、0.5 h 和 1 h 组在 NE 浓度为 1×10<sup>-5</sup> mol/L 时血管环收缩力达最大值,当 NE 的浓度为 5×10<sup>-5</sup> mol/L 时血管环收缩力下降;休克 2 h 组在 NE 浓度为 1×10<sup>-6</sup> mol/L 时达最大收缩力,在 1×10<sup>-5</sup> mol/L 和 5×10<sup>-5</sup> mol/L 时收缩力进行性下降(图 2,图 3)。18α-GA 作用前后 NE 组 SMA 血管环的收缩力无明显变化(图 3)。



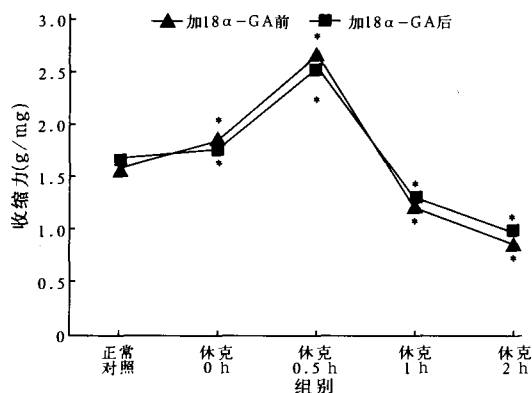
注:与正常对照组比较: \* $P < 0.01$

图 1 加 18α-GA 前 NE 组血管收缩反应性  
Figure 1 Vascular contractile reactivity of SMA before 18α-GA treatment in NE group



注:与正常对照组比较: \* $P < 0.01$

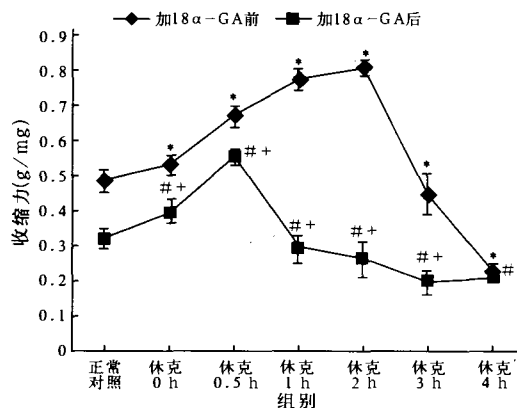
图 2 加 18α-GA 后 NE 组血管收缩反应性  
Figure 2 Vascular contractile reactivity of SMA after 18α-GA treatment in NE group



注:与正常对照组比较: \* $P < 0.01$

图3 18α-GA作用前后NE组血管最大收缩力变化

Figure 3 Changes of maximal vascular contractile reactivity of SMA before and after 18α-GA treatment in NE group



注:与加18α-GA前正常对照组比较: \* $P < 0.01$ ;与加18α-GA后正常对照组比较: # $P < 0.01$ ;与本组加18α-GA前比较: + $P < 0.01$

图4 18α-GA作用前后杨梅黄酮组血管最大收缩力变化

Figure 4 Changes of maximal vascular contractile reactivity of SMA before and after 18α-GA treatment in myricetin group

2.2 18α-GA对不同程度休克大鼠SMA血管环杨梅黄酮反应性的影响(图4):18α-GA作用前,与正常对照组比较,休克0、0.5、1和2h组大鼠SMA血管环对杨梅黄酮的反应性均明显增加( $P$ 均 $< 0.01$ ),最大收缩反应在休克2h;休克3h和4h组SMA血管环对杨梅黄酮的收缩反应性明显下降( $P$ 均 $< 0.01$ )。18α-GA作用后,正常对照组以及休克0、0.5、1、2和3h组SMA血管环对杨梅黄酮的收缩反应性均较18α-GA作用前明显下降,其中正常对照组以及休克0h和0.5h组分别下降了33.37%、25.24%和17.45%,休克1h和2h组分别下降了62.69%和67.51%,休克3h和4h组分别下降了56.10%和5.89%;在休克4h组,用药前后血管环收缩力趋于一致。18α-GA作用后,休克0h和0.5h组对杨梅黄酮的收缩反应性仍然高于18α-GA作用后的正常对照组,休克1、2、3和4h组的收缩力趋于一致,明显弱于18α-GA作用后的正常对照组。

### 3 讨论

休克是机体有效循环血容量减少、组织灌注不足、细胞代谢紊乱和功能受损的病理过程,在休克发生、发展过程中,微循环主要经历了3个时期,即微循环收缩期、微循环扩张期及微循环衰竭期。在微循环收缩期,血管前括约肌收缩和后括约肌相对开放,组织处于低灌注、缺氧状态,外周和内脏的小血管收缩,以保证心、脑等重要器官的有效灌注。在微循环扩张期,血管前括约肌舒张,后括约肌处于收缩状态,血液滞留,毛细血管网内静水压升高。在微循环衰竭期,淤滞在微循环内的黏稠血液处于高凝状态,

红细胞和血小板发生聚集,在血管内形成微血栓,甚至引起弥散性血管内凝血。我们的实验发现,休克早期(0h和0.5h)SMA血管环对各浓度NE的反应性明显高于正常对照组和其他休克各时间点组,休克1h和2h组SMA血管环对NE的反应性明显低于正常对照组和休克0h和0.5h组。其原因可能是因为休克早期机体处于应激期,代偿性增加了内脏血管的反应性,以保证重要脏器的血供;随着休克程度的加重,机体处于失代偿状态,血管平滑肌功能受抑,对NE诱导的收缩反应性下降。而NE主要是通过平滑肌细胞膜上的α受体起作用,不需要血管内膜和MEGJ的参与,故18α-GA对其诱导的收缩反应无明显影响。

血管内皮细胞和平滑肌细胞是血管壁上的两种主要细胞,血管内皮细胞不仅具有屏障功能和参与物质交换的功能,还拥有分泌、合成、代谢及免疫功能,特别是它合成释放的舒张和收缩因子与神经、体液因子共同作用,维持并调节着全身血管的张力。MEGJ作为一种连接血管内皮细胞和平滑肌细胞的组织结构,允许电信号和分子质量低于922.1u,或直径小于1.0nm的离子或小分子物质通过,以电耦联和代谢耦联两种方式介导细胞间电信号和化学信号的传递,使两种细胞之间可以进行直接的信息交流<sup>[4,5]</sup>,这就使得整个动脉壁作为一个功能单位,对于兴奋性和非兴奋性刺激作出统一的反应。18α-GA是一种特异性的缝隙连接解耦联剂,它可以使连接蛋白去磷酸化、缝隙连接斑解聚,从而使血管内皮细胞的电信号和化学信号不能经缝隙连接传给血管平滑肌细胞<sup>[6]</sup>。杨梅黄酮是一种广泛存在于

食物中、具有抗氧化作用的黄酮类化合物,也是一种内膜依赖性的收缩剂<sup>[7]</sup>。我们的实验发现,失血性休克后,内膜依赖性的血管收缩反应与 MEGJ 有密切关系。首先,休克 0、0.5、1 和 2 h 组的 SMA 血管环对杨梅黄酮的反应较正常对照组明显增加,于休克后 2 h 达最高点;休克 3 h 和 4 h 组的 SMA 血管环对杨梅黄酮的反应较正常对照组明显下降。运用 18 $\alpha$ -GA 阻断 MEGJ 后,正常对照组及休克各时间点组 SMA 血管环的收缩反应性均较加入 18 $\alpha$ -GA 前下降,其中以休克 1、2 和 3 h 组下降的幅度较其他组明显。结果提示,①MEGJ 在休克后内皮依赖性的血管收缩反应改变中可能起重要作用;②在休克早期(0 h 和 0.5 h),由于机体的代偿反应,血管收缩反应增加,加上缝隙连接介导的收缩反应等综合作用结果,表现出 SMA 血管环对杨梅黄酮的收缩反应较正常对照组增加,18 $\alpha$ -GA 可以特异性地消除缝隙连接的作用,表现出 18 $\alpha$ -GA 作用以后, SAM 血管环收缩反应性轻度下降;休克 1 h 和 2 h 时,可能由于机体代偿性增加了缝隙连接的表达或开放程度,因而表现出 SMA 血管环收缩反应下降幅度明显大于休克 0 h 和 0.5 h 组;休克 3 h 时,由于机体已处于休克失代偿期,肌内皮缝隙连接的功能开始失代偿,表现出内膜依赖性的收缩反应性下降,运用 18 $\alpha$ -GA 消除了缝隙连接的作用后,休克 2、3 和 4 h 组的收缩反应性趋于一致;休克 4 h 时,可能由于缝隙连接的表达或开放完全受抑制,表现出 SMA 血管环收缩反应在 18 $\alpha$ -GA 作用前后无明显差异。

综上所述,本实验研究发现,休克失代偿后既存在着内皮依赖性血管收缩反应性降低,也存在着内皮非依赖性血管收缩反应性降低。内皮依赖性的血管收缩反应降低与 MEGJ 有密切关系,但其具体机制尚需要进一步的深入研究。

#### 参考文献:

- 1 Liu L M, Ward J A, Dubick M A. Hemorrhage-induced vascular hyporeactivity to norepinephrine in select vasculatures of rats and the roles of nitric oxide and endothelin[J]. Shock, 2003, 19: 208-214.
- 2 Liu L M, Dubick M A. Hemorrhagic shock-induced vascular hyporeactivity in the rat: relationship to gene expression of nitric oxide synthase, endothelin-1, and select cytokines in corresponding organs[J]. J Surg Res, 2005, 125: 128-136.
- 3 Xu J, Liu L. The role of calcium desensitization in vascular hyporeactivity and its regulation after hemorrhagic shock in the rat[J]. Shock, 2005, 23: 576-581.
- 4 Xu H L, Santizo R A, Baughman V L, et al. ADP-induced pial arteriolar dilation in ovariectomized rats involves gap junctional communication[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 283: H1082-1091.
- 5 Ujii H, Chaytor A T, Bakker L M, et al. Essential role of Gap junctions in NO<sup>-</sup> and prostanoid-independent relaxations evoked by acetylcholine in rabbit intracerebral arteries [J]. Stroke, 2003, 34: 544-550.
- 6 Hannah J, Taylor, Andrew T, et al. Gap junction-dependent increases in smooth muscle cAMP underpin the EDHF phenomenon in rabbit arteries [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 283: 583-589.
- 7 Jimenez R, Andriambeloson E, Duarte J, et al. Involvement of thromboxane A<sub>2</sub> in the endothelium-dependent contractions induced by myricetin in rat isolated aorta[J]. Br J Pharmacol, 1999, 127: 1539-1544.

(收稿日期:2006-02-09 修回日期:2006-08-20)

(本文编辑:李银平)

## • 科研新闻速递 •

### 高渗盐水复苏能减轻缺血/再灌注引起的胃肠等远隔器官损害

高渗盐水(HS)复苏可减少休克时中性粒细胞引起的炎症损伤,但其最佳使用剂量目前仍未明确,最近美国科研人员就此进行了研究,他们设想用一个能保护胃肠功能的最佳剂量 HS 进行液体复苏,其对远隔受损器官的保护作用应该好于大剂量的等渗晶体液。该研究采用大鼠作为实验对象,包括两个实验。实验(1):对照组分为不复苏假手术、假手术后用 4 ml/kg 质量分数为 7.5% 的 HS 复苏以及肠系膜上动脉阻断(SMAO)后不复苏 3 组;实验组包括 SMAO 后用等容积液体[4 ml/kg 质量分数为 0.9% 的生理盐水(NS), 4 ml/kg 2.5%、5%、7.5% 和 10.0% 的 HS]复苏和 SMAO 后用等溶质液体(33 ml/kg 0.9% NS, 12 ml/kg 2.5% HS, 6 ml/kg 5% HS, 4 ml/kg 7.5% HS 和 3 ml/kg 10% HS)复苏 2 组。实验(2):对照组不变;实验组包括 SMAO 后用 33 ml/kg 0.9% NS 复苏和 SMAO 后用 4 ml/kg 7.5% HS 复苏 2 组。在 SMAO 后 60 min、并在松开前 5 min 时给予食团灌胃,再灌注后 6 h 处死大鼠,取回肠和肺标本进行组织损伤分析,以髓过氧化物酶(MPO)作为中性粒细胞介导的损伤指标,以血浆中丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)作为肝损伤指标。实验结果:实验(1)中,等容积和等溶质液体复苏均能减轻损伤和炎症反应,效果随液体渗透压升高逐渐好转,达到最佳复苏效果的液体浓度为 7.5%。实验(2)中,用 NS 复苏仅对 SMAO 引起的肺损伤和炎症反应有微小的减轻作用,血浆 ALT 和 AST 水平下降不明显;而 HS 复苏组大鼠的相关参数变化则要显著得多。结论:HS 复苏对机体的保护作用与复苏液体的渗透压相关,最佳剂量 HS 复苏确实有良好的保护作用,NS 对 SMAO 引起的远隔器官损伤无明显改善,该研究结果对于推行 HS 复苏是一个有力支持。

车晋伟,编译自《J Trauma》,2006,61:66-73;胡森,审校