

蛋白激酶 C 和蛋白激酶 G 对失血性休克大鼠血管平滑肌细胞钙敏感性的调节作用

李涛 刘良明 刘建仓

【摘要】 目的 探讨蛋白激酶 C(PKC)、蛋白激酶 G(PKG)对失血性休克大鼠血管平滑肌细胞钙敏感性的调节作用。方法 经股动脉放血使平均动脉压维持在 40 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)2 h 制备失血性休克大鼠模型。采用离体血管环张力测定技术,测定在失血性休克大鼠肠系膜上动脉(SMA)血管环去极化状态下(120 mmol/L K⁺)对梯度浓度 Ca²⁺的收缩反应性(钙敏感性)变化;同时观察 PKC、PKG 活性调节剂对钙敏感性的影响。测定大鼠 SMA 的 PKC、PKG 活性变化,分析 PKC、PKG 活性变化与血管钙敏感性变化间的关系。结果 休克 2 h SMA 血管环对钙敏感性明显降低,其量-效曲线明显右移,最大收缩力(E_{max})明显降低(P 均<0.01)。PKC 激动剂 PMA 1×10⁻⁷ mol/L 可明显提高休克血管环对钙敏感性,PKC 拮抗剂 staurosporine 1×10⁻⁷ mol/L 可降低休克血管环对钙敏感性(P<0.05 或 P<0.01);PKG 激动剂 8Br-cGMP 1×10⁻⁴ mol/L 可使休克血管钙敏感性降低,其拮抗剂 KT-5823 1×10⁻⁶ mol/L 可提高休克血管钙敏感性(P 均<0.05)。休克 2 h SMA 的 PKC 活性明显降低,PKG 活性明显升高(P<0.05 和 P<0.01),分别与休克血管钙敏感性变化呈正相关和负相关(P 均<0.01)。结论 PKC 和 PKG 参与了失血性休克血管平滑肌细胞钙敏感性的调控,PKC 可上调血管平滑肌细胞的钙敏感性,PKG 可下调其钙敏感性。

【关键词】 血管反应性; 钙敏感性; 休克,失血性; 蛋白激酶

Regulatory effect of protein kinase C and protein kinase G on calcium sensitivity of vascular smooth muscle cells following hemorrhagic shock LI Tao, LIU Liang-ming, LIU Jian-cang. State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 2, Research Institute of Surgery, Daping Hospital, the Third Military University, Chongqing 400042, China

Corresponding author: LIU Liang-ming (Email: liuliangming2002@yahoo.com)

【Abstract】 **Objective** To observe the effect of protein kinase C (PKC) and protein kinase G (PKG) on calcium desensitization following hemorrhagic shock in rats. **Methods** The model of hemorrhagic shock was replicated by blood letting and maintaining mean arterial pressure at 40 mm Hg (1 mm Hg=0.133 kPa) for 2 hours. The superior mesenteric artery (SMA) in hemorrhagic shock rats was adopted to assay the calcium sensitivity via observing the contraction initiated by calcium under depolarizing conditions (120 mmol/L K⁺) with isolated organ perfusion system. Meanwhile, the effects of the PMA (PKC agonist), staurosporine (PKC inhibitor), 8Br-cGMP (PKG agonist) and KT-5823 (PKG inhibitor) on calcium sensitivity and the changes in PKC and PKG activities in SMA were observed following hemorrhagic shock. **Results** The calcium sensitivity of SMA following hemorrhagic shock was significantly decreased, and the dose-effect curve shifted to the right significantly, maximum energy (E_{max}) decreased significantly at 2 hours following shock (all P<0.01). The PMA (1×10⁻⁷ mol/L) and KT-5823 (1×10⁻⁶ mol/L) significantly increased hemorrhagic shock-induced decrease in calcium sensitivity (P<0.05 or P<0.01). Staurosporine (1×10⁻⁷ mol/L) and 8Br-cGMP (1×10⁻⁴ mol/L) further decreased calcium sensitivity after shock (P<0.05 or P<0.01). The activity of PKC was decreased and PKG activity was increased 2 hours following shock (P<0.05 and P<0.01), and was positively and negatively correlated with calcium sensitivity of SMA, respectively (both P<0.01). **Conclusion** PKC and PKG take part in the regulation of calcium sensitivity following hemorrhagic shock. PKC up-regulates calcium sensitivity, and PKG down-regulates calcium sensitivity in vascular smooth muscle cells following hemorrhagic shock.

【Key words】 vascular responsiveness; calcium sensitivity; hemorrhagic shock; protein kinase

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370563,30600228,30625037);国家“973”计划资助项目(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),重庆市人,助理研究员,主要从事休克病理生理研究。

严重创伤/休克失代偿期常出现血管低反应性(vascular hyporesponsiveness, VHR),它表现为全身血管对缩血管物质和舒血管物质的反应性降低或不反应^[1,2]。研究发现,在大鼠失血性休克 2 h 后,血管平滑肌细胞存在钙失敏,失血性休克后钙敏感性降低在 VHR 发生中具有重要作用^[3,4]。蛋白激酶 C

(PKC)、蛋白激酶 G(PKG)对血管平滑肌细胞钙敏感性具有重要的调节作用,但 PKC、PKG 是否参与了休克后血管平滑肌细胞钙敏感性变化的调节,尚不清楚。本实验采用大鼠失血性休克模型,研究 PKC、PKG 活性调节剂对休克血管钙敏感性的影响,同时观察休克后肠系膜动脉 PKC、PKG 的活性变化,分析其活性与血管钙敏感性间的关系。

1 材料与与方法

1.1 动物分组及模型制备: Wistar 大鼠 48 只,雌雄各半,平均体重(208.0±22.9)g,按随机数字表法取出 8 只作为正常对照组,其余 40 只用于制备失血性休克模型,然后再随机分为休克组、PKC 激动剂 PMA 组、PKC 拮抗剂 staurosporine 组、PKG 激动剂 8Br-cGMP 组和 PKG 拮抗剂 KT-5823 组。采用经股动脉放血使平均动脉压维持在 40 mm Hg (1 mm Hg=0.133 kPa)2 h 的方法复制大鼠失血性休克模型,制模成功后活杀大鼠,取肠系膜上动脉(SMA),清除周围结缔组织,制作成 2~3 mm 长的血管环,用于钙敏感性测定。再分别取大鼠肠系膜血管组织用于 PKC、PKG 活性测定。正常对照组大鼠直接活杀后取 SMA 制作血管环,并取肠系膜血管组织测定 PKC、PKG 活性。

1.2 SMA 钙敏感性测定: 将所取 SMA 血管环挂于注有 Krebs-Henseleit 液(K-H 液)的离体器官灌流浴槽中,持续充入体积分数为 95% O₂ 和 5% CO₂ 的混合气体,给预初张力 0.5 g,37 °C 恒温孵育 2 h,20 min 换液一次,张力曲线平稳后换用高钾液孵育 10~20 min,张力曲线平稳后测定血管环对 Ca²⁺ 的反应性。PKC、PKG 激动剂或抑制剂处理组分别用其激动剂或抑制剂孵育血管环 10 min,所用浓度分别为 PMA 1×10⁻⁷ mol/L, staurosporine 1×10⁻⁷ mol/L, 8Br-cGMP 1×10⁻⁴ mol/L, KT-5823 1×10⁻⁶ mol/L。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)。

血管环的钙敏感性用浓度累计法测定,记录不同 Ca²⁺ 浓度下血管环产生的最大收缩力(E_{max}),以收缩力/血管环质量(g/mg)为量化标准,作量-效曲线,曲线拟合法求 Ca²⁺ 的半数有效浓度(EC₅₀),用 Ca²⁺ 达到 50% 最大反应时激动剂浓度的负对数值(pD₂, 即 -lg EC₅₀)和 E_{max} 以及量-效曲线评价血管环的钙敏感性。

1.3 PKC 活性测定: 根据试剂盒说明书测定肠系膜血管组织的 PKC 活性。

1.4 PKG 活性测定: 将肠系膜血管组织在匀浆缓冲液[含 Tris HCl 50 mmol/L (pH 7.4), 异丁硫鸟嘌呤 1 mmol/L, 二硫苏糖醇(DTT) 2 mmol/L, 硝基 L-精氨酸 10 μmol/L, 乙二胺四乙酸(EDTA) 10 mmol/L, 吲朵美辛 10 μmol/L] 中 4 °C 匀浆 2 h, 13 000×g 离心 10 min。取上清液 10 μl, 加入 40 μl 混合反应液[内含 Tris HCl 50 mmol/L (pH 7.4), 异丁硫鸟嘌呤 0.1 mmol/L, 硝基 L-精氨酸 100 μmol/L, 蛋白激酶抑制剂(PKI) 10 μmol/L, 吲朵美辛 10 μmol/L, 环磷酸鸟苷(cGMP) 5 μmol/L, 溴底乙苯(BPDE) 150 μmol/L] 中, 30 °C 反应 10 min。取 40 μl 反应液滴在硝酸纤维素纸上, 稍干, 再用 78 mmol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)洗 10 min×4 次, 加入 6 ml 闪烁液[含质量分数为 0.03% 的对苯撑苯噻唑(POPOP), 质量分数为 5% 的 2,5-苯基噻唑(PPO)] 测定 cpm 值, 以加 BPDE 与不加 BPDE 的差值作为所测定的 PKG 活性。

1.5 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

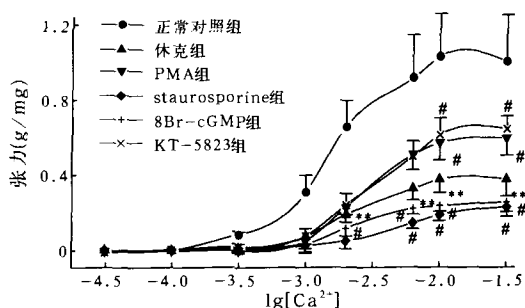
2.1 各组大鼠 SMA 血管环对钙敏感性的变化(表 1, 图 1): 与正常对照组比较, 休克后血管环的 Ca²⁺ 量-效曲线明显右移, E_{max} 显著降低; PMA 组在 1×10⁻⁷ mol/L 时可以使 SMA 血管环的 Ca²⁺ 量-效曲线明显左移, 血管环对钙的收缩力在 1×10⁻² mol/L 和 3×10⁻² mol/L 的 Ca²⁺ 浓度时显著高于休克组, E_{max} 也显著高于休克组 (*P* 均 < 0.05); staurosporine 组在 1×10⁻⁷ mol/L 时可使 SMA 血管环的 Ca²⁺ 量-效曲线明显右移, 其收缩力在 Ca²⁺ 浓度为 6×10⁻³、1×10⁻²、3×10⁻² mol/L 时均显著低于休克组, E_{max} 显著低于休克组 (*P*<0.05 或 *P*<0.01)。

表 1 各组大鼠 SMA 钙敏感性变化($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Change of calcium sensitivity of SMA of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	E _{max} (g/mg)	pD ₂
正常对照组	8	1.030±0.021	2.814±0.027
休克组	8	0.377±0.014**	2.557±0.062*
PMA 组	8	0.595±0.037#	2.551±0.004
staurosporine 组	8	0.230±0.012##	2.435±0.075
8Br-cGMP 组	8	0.256±0.012#	2.570±0.036
KT-5823 组	8	0.624±0.051#	2.580±0.010

注:与正常对照组比较;**P*<0.05,***P*<0.01;与休克组比较:#*P*<0.05,##*P*<0.01



注:与正常对照组比较: ** $P < 0.01$; 与休克组比较: # $P < 0.05$

图 1 各组大鼠 SMA 钙敏感性的变化

Figure 1 Change of calcium sensitivity of SMA of rats in each group

8Br - cGMP 组在 1×10^{-4} mol/L 时可使 SMA 血管环的 Ca^{2+} 量-效曲线明显右移,其收缩力在 Ca^{2+} 浓度为 2×10^{-3} 、 6×10^{-3} 、 1×10^{-2} 、 3×10^{-2} mol/L 时均显著低于休克组, E_{max} 也明显低于休克组 (P 均 < 0.05); KT - 5823 组在 1×10^{-6} mol/L 时可使 Ca^{2+} 的量-效曲线明显左移,其收缩力在 Ca^{2+} 浓度 1×10^{-2} mol/L 和 3×10^{-2} mol/L 时水平显著高于休克组, E_{max} 显著高于休克组 (P 均 < 0.05), 各组 pD_2 比较差异均无显著性。

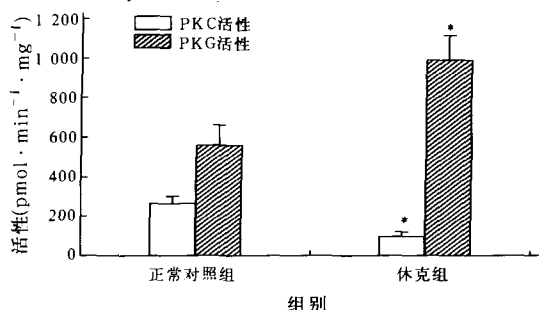
2.2 休克后 PKC、PKG 活性变化(表 2, 图 2): 休克后肠系膜血管组织 PKC 活性较正常对照组显著降低 ($P < 0.05$), 与休克后血管钙敏感性变化呈显著正相关 ($r = 0.998, P < 0.01$)。休克后 PKG 活性较正常对照组明显升高 ($P < 0.05$), 与休克后血管钙敏感性变化呈显著负相关 ($r = -0.987, P < 0.01$)。

表 2 失血性休克后 PKC、PKG 活性变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Change of PKC and PKG activities after hemorrhagic shock ($\bar{x} \pm s$) $pmol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$

组别	动物数(只)	PKC 活性	PKG 活性
正常对照组	8	265.68 ± 35.07	560.82 ± 98.78
休克组	8	98.07 ± 23.35*	991.35 ± 121.65*

注:与正常对照组比较: * $P < 0.05$



注:与正常对照组比较: * $P < 0.05$

图 2 失血性休克后 PKC、PKG 活性变化

Figure 2 Change of PKC and PKG activities after hemorrhagic shock

3 讨论

严重休克或休克晚期存在 VHR, 是休克对多种治疗措施反应减弱或不反应, 休克后期血压难以回升和导致休克死亡的重要原因之一。基础研究显示, PKC、PKG 参与了正常血管平滑肌细胞的钙敏感性调节^[5]。杨光明等^[4]的研究表明, 失血性休克可使血管平滑肌细胞钙敏感性降低, 而使用新型钙增敏剂 MCI - 154 可进一步降低钙敏感性, 其机制可能是通过 Rho - 激酶、PKC、PKG 起调节作用。本实验室前期研究也发现, 休克后钙敏感性降低, 钙失敏在休克 VHR 的发生中具有重要作用。

本组实验采用离体血管环研究发现, PKC 特异性激动剂 PMA 可显著提高休克 SMA 对 Ca^{2+} 的收缩反应, 其特异性抑制剂 staurosporine 可显著降低休克 SMA 对 Ca^{2+} 的收缩反应; PKG 特异性激动剂 8Br - cGMP 可显著降低休克 SMA 对 Ca^{2+} 的收缩反应, 其特异性抑制剂 KT - 5823 可显著增高休克 SMA 对 Ca^{2+} 的收缩反应, 说明 PKC、PKG 参与了休克血管钙敏感性的调控。PKC 具有上调休克血管钙敏感性作用, PKG 具有下调休克血管钙敏感性作用。同时通过测定休克后肠系膜动脉 PKC 和 PKG 活性发现, 休克后 PKC 活性明显降低, PKG 活性明显升高, 与休克后肠系膜动脉血管钙敏感性变化呈明显相关性, 结合血管环结果进一步证明了 PKC 和 PKG 对休克血管钙敏感性的调节作用。而李涛等^[6]研究表明, 在休克早期 SMA 对钙的反应性明显升高, 随休克时间延长, 血管环对钙的反应性逐渐下降, 至 2 h 明显降低, 提示失血性休克血管平滑肌细胞存在钙敏感性的双相变化。

平滑肌细胞膜上受体经受体激动剂激活后, 由磷脂酶 C(PLC)催化的磷脂酰肌醇二磷酸(PIP₂)水解为 1,4,5 - 三磷酸肌醇(IP₃)和二酰基甘油(DG), DG 作为第二信使激活 PKC。休克后可能由于平滑肌细胞膜受体失敏而导致 DG 生成减少, 从而导致 PKC 活性降低。休克后 PKG 活性的增加可能与一氧化氮(NO)浓度增加有关。有研究表明, 休克后 NO 浓度明显增加, 而 NO 可通过 cGMP 而使 PKG 活化^[7]。

研究显示, PKC 调节血管平滑肌细胞钙敏感性途径主要是通过磷酸化 CPI - 17 (protein kinase C dependent phosphatase inhibitor of 17 ku) 而抑制肌球蛋白轻链磷酸酶^[8]; 通过活化丝裂原活化蛋白激酶, 从而参与了血管平滑肌细胞钙敏感性调节^[9]。PKG 可通过磷酸化 Telokin^[10], 也可结合肌球

蛋白轻链磷酸酶的肌球蛋白结合亚单位而活化肌球蛋白轻链磷酸化^[11],从而参与血管平滑肌细胞钙敏感性调节。本实验结果证实,PKC、PKG 参与了休克钙敏感性调节,但其具体调节机制有待进一步研究。

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(6): 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平滑肌钙 K⁺通道活动改变[J]. 生理学报, 2001, 53(4): 291 - 295.
- 3 徐竞, 刘良明. 钙敏感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(1): 20 - 23.
- 4 杨光明, 刘良明. MCI - 154 对失血性休克大鼠血管平滑肌钙敏感性的影响及其机制[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(1): 7 - 11.
- 5 Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, et al. Cyclic GMP - dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA - induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle[J]. J Biol Chem, 2000, 275(28): 21722 - 21729.
- 6 李涛, 刘良明, 杨光明, 等. 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[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(11): 647 - 650.
- 7 Zhao K S, Liu J, Yang G Y, et al. Peroxynitrite leads to arteriolar smooth muscle cell membrane hyperpolarization and low vasoreactivity in evere shock[J]. Chin Hemorheol Microcirc, 2000, 23(2 - 4): 259 - 267.
- 8 Woodsome T P, Eto M, Everett A, et al. Expression of CPI - 17 and myosin phosphatase correlates with Ca²⁺ sensitivity of protein kinase C - induced contraction in rabbit smooth muscle[J]. J Physiol, 2001, 535(Pt 2): 553 - 564.
- 9 Cain A E, Tanner D M, Khalil R A. Endothelin - 1 - induced enhancement of coronary smooth muscle contraction via MAPK - dependent and MAPK - independent Ca²⁺ sensitization pathways[J]. Hypertension, 2002, 39(2 Pt 2): 543 - 549.
- 10 MacDonald J A, Walker L A, Nakamoto R K, et al. Phosphorylation of telokin by cyclic nucleotide kinases and the identification of in vivo phosphorylation sites in smooth muscle[J]. FEBS Lett, 2000, 479(3): 83 - 88.
- 11 Howard K S, Naoki M, Yasuyo K, et al. Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP - dependent protein kinase - 1 α [J]. Science, 1999, 286(19): 1583 - 1587.

(收稿日期: 2007 - 01 - 13 修回日期: 2007 - 03 - 10)

(本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

丝裂原活化蛋白激酶在创伤出血后库普弗细胞 Toll 样受体 2、4 和 9 介导信号转导中的作用

重度创伤会导致免疫功能紊乱, 增加脓毒症和多器官功能衰竭的风险。库普弗细胞(KC)在创伤后免疫应答中起重要作用, 这些作用一部分是由不同的 Toll 样受体(TLR)达成的。丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)是 TLR 信号转导途径中的关键因素, 目前不同的 MAPK 激活作用是否有 TLR 特异性仍不清楚。为此, 美国学者对此进行了研究。实验采用雄性 C3H/HeN 鼠, 经中线开腹术(软组织损伤)制备失血性休克模型[平均动脉压约 35 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa), 持续 90 min], 并进行复苏。复苏 2 h 后分离出 KC, 裂解后用 p38、细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)或 c - Jun 氨基末端蛋白激酶(JNK)蛋白抗体进行免疫印迹分析。同时, 细胞用 p38、ERK1/2 或 JNK MAPK 特异性抑制剂预培养后, 再用 TLR2 激动剂酵母多糖、TLR4 激动剂脂多糖(LPS)和 TLR9 激动剂 CpG DNA 刺激, 培养 24 h 后用流式细胞小球微阵列术分析肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)和 KC 水平。结果表明, 创伤出血后 MAPK 活性与 KC 产生的 TNF- α 、MCP-1 和 KC 均显著增加; LPS 刺激后的 TLR4 活性增强使所有细胞因子水平增高; CpG DNA 刺激后 TLR9 信号转导提高了 TNF- α 和 IL-6 的水平, 而对趋化因子的产生无影响; 选择性抑制 MAPK 途径的结果表明, 趋化因子生成是通过 TLR2、TLR4 和 TLR9 介导的 p38 和 JNK MAPK 途径发生; 而 TNF- α 和 IL-6 的生成则通过不同 TLR 介导的 MAPK 信号转导发生。因此研究者认为, 创伤出血后细胞因子和趋化因子的生成通过 KC 的 TLR 信号转导到不同的 MAPK 路径发生。

耿世佳, 周国勇, 编译自《J Cell Physiol》, 2007, 210(3): 667 - 675; 胡森, 审校

综合应用生物学指标可提高感染诊断的准确性

因社区获得性感染发生全身性炎症反应患者早期准确的诊断一直是临床和实验室研究的热点。最近, 丹麦研究人员提出: 综合多项指标代替单个指标分析可能提高诊断的准确性, 并降低病死率。实验对社区获得性感染导致全身炎症反应综合征(SIRS)的疑似患者进行前瞻性队列研究, 对比了多个脓毒症生物学指标单独分析和综合分析诊断的准确性。研究中用复合免疫测定法检测患者血浆中可溶性尿激酶型纤维蛋白酶原激活剂受体(suPAR)、髓样细胞表达的触发受体(sTREM-1)、巨噬细胞游走抑制因子(MIF)、C-反应蛋白(CRP)、原降钙素(PCT)水平以及中性粒细胞分析, 并将线性程度最好的 3 个指标和所有 6 个指标分别作为两个综合指标。纳入的 151 例患者中有 96 例病因为细菌感染, 各指标诊断的可信度[用 95% 的可信区间(CI)表示]分别为: suPAR 0.50(95% CI 为 0.40~0.60), sTREM-1 0.61(95% CI 为 0.52~0.71), MIF 0.63(95% CI 为 0.53~0.72), PCT 0.72(95% CI 为 0.63~0.79), 中性粒细胞 0.74(95% CI 为 0.66~0.81), CRP 0.81(95% CI 为 0.73~0.86), 3 个指标综合分析 0.84(95% CI 为 0.71~0.91), 6 个指标综合分析 0.88(95% CI 为 0.81~0.92)。6 个指标综合分析诊断准确性明显高于单个指标。因此研究者得出结论: 结合多指标综合分析可以提高细菌性感染区别于非细菌性感染诊断的准确性。作为单个指标, suPAR、sTREM-1 和 MIF 的检测结果价值较低, 而 PCT 和 CRP 检测较为可信。

耿世佳, 周国勇, 编译自《Crit Care》, 2007 - 03 - 16(电子版); 胡森, 审校