

• 论著 •

# 蛋白激酶 Cε 对失血性休克大鼠血管反应性和钙敏感性的调节作用

徐竞 杨光明 李涛 明佳 陈玮 张瑗 刘良明

**【摘要】** 目的 观察蛋白激酶 Cε(PKCε)对失血性休克血管反应性和钙敏感性的调节作用。方法 取失血性休克大鼠肠系膜上动脉,利用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定休克即时、0.5、1、2 和 4 h PKCε mRNA 的表达;取大鼠肠系膜上动脉一级分支,利用离体血管张力测定技术,测定不同休克时间点的血管环反应性和钙敏感性,并观察 PKCε 的激动剂和抑制剂对休克 2 h 血管反应性和钙敏感性的影响。结果 ①大鼠血管反应性和钙敏感性在休克早期增高,晚期进行性降低;正常组织 PKCε mRNA 表达量低,失血性休克后表达逐渐增加,于 1 h 达到峰值( $P < 0.01$ ),4 h 时仍维持在较高水平( $P < 0.01$ )。②PKCε 的激动剂可增高休克 2 h 的血管反应性和钙敏感性,PKCε 的抑制剂可降低休克 2 h 的血管反应性和钙敏感性( $P$  均  $< 0.01$ )。结论 PKCε 对失血性休克血管反应性和钙敏感性有重要的调节作用,可能是一种重要的内源性保护分子。

**【关键词】** 失血性休克; 血管低反应性; 钙敏感性; 蛋白激酶 Cε 反反

**The regulatory effect of protein kinase Cε on vascular reactivity and calcium sensitivity during hemorrhagic shock in rats** XU Jing, YANG Guang-ming, LI Tao, MING Jia, CHEN Wei, ZHANG Yuan, LIU Liang-ming. State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 2, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China  
Corresponding author: LIU Liang-ming (Email: Liuliangming2002@yahoo.com)

**【Abstract】** **Objective** To observe the regulatory effect of protein kinase Cε (PKCε) on vascular reactivity and calcium sensitivity following hemorrhagic shock. **Methods** The superior mesenteric artery (SMA) obtained from rats in hemorrhagic shock for different time duration (immediately, 0.5 hour, 1 hour, 2 hours and 4 hours after shock) were adopted to determine the mRNA expression of PKCε using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique, and the first branch of SMA were adopted to assay the vascular reactivity and calcium sensitivity by observing the contraction initiated by norepinephrine (NE) and  $Ca^{2+}$  with isolated organ perfusion system. The agonist and antagonist of PKCε were used to observe the regulation of PKCε on vascular reactivity and calcium sensitivity at 2 hours after hemorrhagic shock. **Results** ①Vascular reactivity and calcium sensitivity of the first branch of SMA were increased at the early stage of hemorrhagic shock, and decreased at the late stage of hemorrhagic shock. PKCε mRNA exhibited a time-dependent increase following hemorrhagic shock, peaked at 1 hour ( $P < 0.01$ ) and maintained at a high level at 4 hours ( $P < 0.01$ ). ②The agonist of PKCε increased the vascular reactivity and calcium sensitivity of the first branch of SMA, and its antagonist decreased the vascular reactivity and calcium sensitivity of SMA at 2 hours after shock (all  $P < 0.01$ ). **Conclusion** PKCε may be an important endogenous protective molecule. It plays an important role in the regulation of vascular reactivity and calcium sensitization following hemorrhagic shock.

**【Key words】** hemorrhagic shock; vascular hyporeactivity; calcium sensitivity; protein kinase Cε

严重创伤、休克、脓毒症患者在经历缺血、缺氧、再灌注损伤以及肠道菌群移位、内毒素释放等打击后,常出现血压不能有效提升,组织灌注难以改善,细胞缺氧和损伤进行性加重,导致不可逆的组织脏器损伤,以及全身炎症反应综合征(SIRS)、急性呼

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助项目(2005CB522601);国家杰出青年科学基金(30625037)

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,博士生导师,教授,研究员,Email:Liuliang-ming2002@yahoo.com

作者简介:徐竞(1980-),女(汉族),四川省人,博士研究生,实习研究员,主要从事休克病理生理方面的研究。

吸窘迫综合征(ARDS)和多器官功能衰竭(MOF),全身血管对缩血管物质和舒血管物质的反应降低或反应麻痹,即血管低反应性,是其重要原因之一<sup>〔1-2〕</sup>。以往研究认为,休克的血管低反应性发生可能与肾上腺素能受体失敏、血管平滑肌细胞膜超极化<sup>〔3-6〕</sup>等因素有关,本实验室前期的研究提出了休克后血管低反应性发生的钙失敏机制,即血管平滑肌细胞肌肉收缩蛋白对钙的敏感性降低,也就是力/钙比率和肌肉收缩效率降低,蛋白激酶 C(PKC)参与了失血性休克血管低反应性和钙失敏的调节<sup>〔7〕</sup>。PKCε 可在血管平滑肌中表达,且对血管平滑肌张力调节有

重要作用。本实验中采用大鼠失血性休克模型,研究 PKCε 对失血性休克血管反应性和钙敏感性的调控作用,以期为深入了解失血性休克血管低反应性的发生机制、探寻有效防治药物提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂:RNA 抽提试剂 Tripure (美国 Roche 公司), 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) Ver 3.0 试剂盒 (大连宝生物公司), PKCε 激动剂碳酰胆碱 (Carrbachol, 德国 Merck 公司), PKCε 抑制剂 PKCε 转位抑制肽 (Translocation Inhibitor Peptide, 德国 Merck 公司), 去甲肾上腺素 (NE, 上海禾丰制药有限公司)。

1.2 休克模型制备:清洁级 Wistar 大鼠 48 只, 雌雄各半, 体重 (230.0 ± 26.1)g。实验前 12 h 禁食, 实验时先用戊巴比妥 (30 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 右侧股动脉插管并接血压计, 肝素钠 500 U/kg 抗凝。正常对照组不流血; 休克即时组、休克 0.5 h 组、休克 1 h 组、休克 2 h 组、休克 4 h 组动物在术毕稳定 10 min 后开始放血, 10 min 内至平均动脉压 (MAP) 30 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa)。按各组要求维持不同时间后活杀大鼠, 无菌条件下取肠系膜上动脉 (SMA) 主干及分支, 清除周围结缔组织, 将 SMA 一级分支制成约 2.5 mm 长的血管环, 用作血管反应性和钙敏感性测定。其余 SMA 组织用于 RT-PCR。

1.3 PKCε mRNA 表达检测:采用 RT-PCR 半定量检测技术, 采用 Tripure 提取血管组织总 RNA, 经紫外分光光度计测定 RNA 纯度及浓度, 筛选 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 为 1.8~2.0 的用于后续实验。将 RNA 统一量为 1.0 μg 进行逆转录, PKCε 引物 (389 bp) 依据软件 Oligo 6.0 设计, 上游引物 5'-CGAGGACGACTTGTGTTGAATCC-3', 下游引物 5'-CAGTTTCTCAGGGCATCAGGTC-3', 由大连宝生物工程公司合成; 同时扩增上海闪晶分子生物技术研究所以合成的 β-肌动蛋白 (β-actin, 207 bp) 作为内参照, 上游引物 5'-CACCCGCGAGTACAACCTTC-3', 下游引物 5'-CCCATACCCACCATCACACC-3'。经 94 °C 30 s, 60 °C 45 s, 72 °C 1 min, 35 个循环后, 取 4 μl PCR 产物经质量分数为 2% 的琼脂糖凝胶电泳, 以 PKCε 条带与 β-actin 条带的灰度值之比评价 PKCε mRNA 表达水平。

1.4 血管反应性测定:采用离体血管环张力测定技术, 血管环对 NE 的反应性按累积浓度法测定, 用 NE 的量-效曲线、最大收缩张力 (Emax) 以及 pD2 (-log[NE]) 评价血管反应性<sup>[7]</sup>。

1.5 血管钙敏感性测定:采用离体血管环张力测定技术, 按照累积浓度法测定血管环对 Ca<sup>2+</sup> 的反应性, 用 Ca<sup>2+</sup> 的量-效曲线、Emax 以及 pD2 评价血管钙敏感性<sup>[7]</sup>。测定褪膜血管钙敏感性时, 先将 SMA 血管环在含 50 μmol/L β-七叶皂苷和 1 μmol/L A-23187 的褪膜高钾液 (NaCl 32.7 mmol/L, KCl 90 mmol/L, NaHCO<sub>3</sub> 25 mmol/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.03 mmol/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.45 mmol/L, 葡萄糖 11.1 mmol/L, pH 值 7.4 ± 0.5) 中孵育 30 min 褪膜并耗竭胞内储存钙, 即得褪膜血管环, 然后在褪膜高钾液中按累积浓度法测定褪膜血管钙敏感性。

1.6 统计学方法:数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 SPSS 10.0 统计软件, 行 *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 SMA 血管反应性和钙敏感性的变化 (图 1):失血性休克早期, SMA 一级分支的血管反应性和钙敏感性均明显增高, 与正常对照比较, 量-效曲线左移, Emax 增大。正常对照组血管对 NE (1 × 10<sup>-5</sup> mol/L) 的收缩力为 11.035 mN, 休克即时增高至 13.866 mN (*P* < 0.01)。正常对照组血管对 Ca<sup>2+</sup> (4 × 10<sup>-4</sup> mol/L) 的收缩力为 10.663 mN, 休克即时增高至 13.247 mN (*P* < 0.01)。在休克中晚期, 血管反应性和钙敏感性呈进行性下降, 与正常对照比较, 量-效曲线右移, Emax 降低; 在休克 0.5 h 时对 NE (1 × 10<sup>-5</sup> mol/L) 的收缩力为 9.088 mN, 休克 1 h 时降至 5.075 mN, 休克 2 h 时降至 4.821 mN, 休克 4 h 时降至 3.828 mN (*P* 均 < 0.01); pD2 值无明显变化。在休克 0.5 h 时对 Ca<sup>2+</sup> (4 × 10<sup>-4</sup> mol/L) 的收缩力为 8.416 mN, 休克 1 h 时降至 5.625 mN, 休克 2 h 时降至 5.519 mN, 休克 4 h 为 5.520 mN (*P* 均 < 0.01); pD2 值无明显变化。

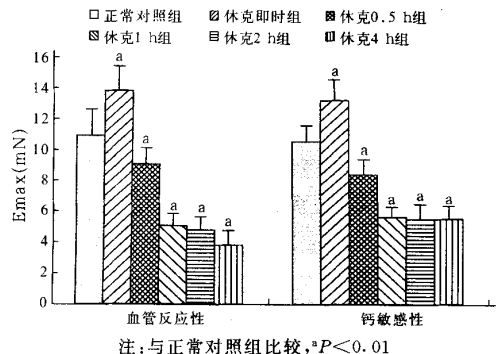
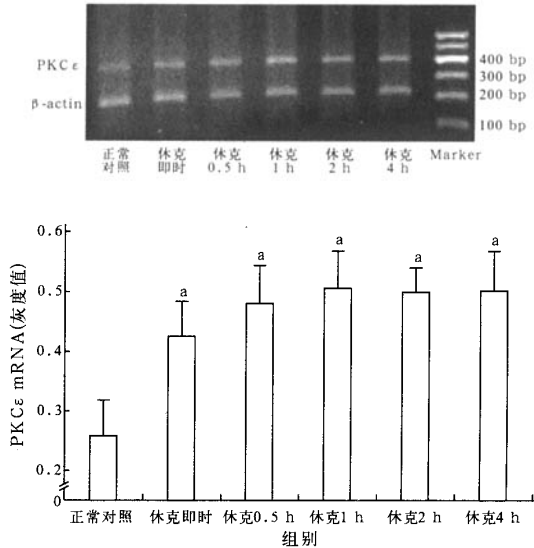
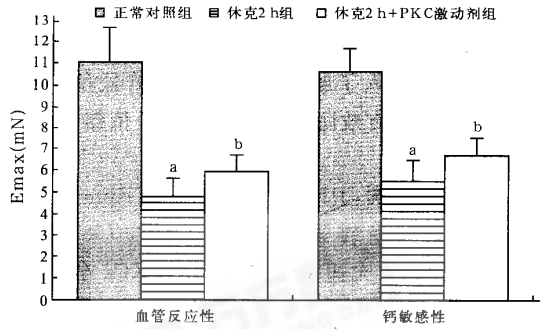


图 1 失血性休克大鼠 SMA 一级分支血管反应性和钙敏感性的变化

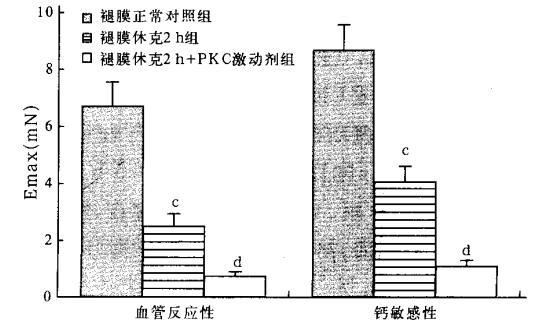
**2.2 失血性休克 PKCε mRNA 表达的变化(图 2):** 正常对照组 SMA 血管组织 PKCε mRNA 表达量较低,失血性休克后 PKCε mRNA 表达逐渐增高,PKCε 相对灰度值(与 β-actin 相比)由正常的 0.259 逐渐增至休克 1 h 的 0.509 ( $P < 0.01$ ),休克 4 h 时为 0.503 ( $P < 0.01$ )。



注:与正常对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$   
**图 2 各组失血性休克大鼠 SMA 血管组织 PKCε mRNA 表达变化的比较**



注:与正常对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与休克 2 h 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$   
**图 3 PKCε 激动剂对失血性休克 2 h 大鼠 SMA 一级分支血管反应性和钙敏感性的影响**



注:与褪膜正常对照组比较,<sup>c</sup> $P < 0.01$ ;与褪膜休克 2 h 组比较,<sup>d</sup> $P < 0.01$   
**图 4 PKCε 抑制剂对失血性休克 2 h 大鼠 SMA 一级分支褪膜血管反应性和钙敏感性的影响**

**2.3 PKCε 的激动剂和抑制剂对失血性休克 2 h SMA 血管反应性和钙敏感性的影响(图 3,图 4):** PKCε 激动剂碳酰胆碱( $4 \times 10^{-6}$  mol/L)可增高休克 2 h SMA 一级分支血管对 NE 的反应性和钙敏感性,表现为量-效曲线左移、Emax 增大,血管对 NE ( $1 \times 10^{-5}$  mol/L) 的收缩力由 4.821 mN 增至 5.956 mN,血管对  $Ca^{2+}$  ( $4 \times 10^{-4}$  mol/L) 的收缩力由 5.519 mN 增至 6.690 mN ( $P$  均  $< 0.01$ );pD2 值无明显变化。

由于 PKCε 抑制剂 PKCε 转位抑制肽不能穿过胞膜,故先将血管环褪膜,结果发现 PKCε 抑制剂 PKCε 转位抑制肽( $1 \times 10^{-5}$  mol/L)可降低休克 2 h 大鼠 SMA 一级分支褪膜血管对 NE 的反应性和钙敏感性,表现为量-效曲线右移、Emax 减小,褪膜血管对 NE ( $1 \times 10^{-5}$  mol/L) 的收缩力由休克 2 h 的 2.512 mN 降低至 0.750 mN ( $P < 0.01$ ),褪膜血管对  $Ca^{2+}$  ( $4 \times 10^{-4}$  mol/L) 的收缩力由休克 2 h 的 4.072 mN 降低至 1.108 mN ( $P < 0.01$ );pD2 值无明显变化。

**3 讨论**

PKCε 属于新型 PKC(nPKC),其活化不依赖于钙,而由磷脂(PL)、二脂酰甘油(DAG)或佛波酯激活,是在血管平滑肌细胞中表达的一种重要的 PKC 亚型。有报道在大鼠 SMA,苯肾上腺素通过活化 PKCε 诱导钙敏感性增高和血管收缩<sup>(8)</sup>;在雪貂主动脉,给予外源性活化的 PKCε 可导致不被肌球蛋白轻链激酶(MLCK)抑制剂 ML-9 削弱的血管收缩<sup>(9)</sup>,说明 PKCε 对血管平滑肌舒缩的调节不依赖于  $Ca^{2+}$  浓度,而是通过调节钙敏感性完成。为研究失血性休克后 PKCε 在血管反应性和钙敏感性调节中的作用,我们以 PKCε 激动剂和抑制剂为工具药,观察对休克 2 h 血管 NE 和  $Ca^{2+}$  诱发收缩反应的影响,结果发现 PKCε 激动剂可增高休克 2 h 血管对 NE 和钙离子的收缩反应,使量-效曲线左移、Emax 增大。因为 PKCε 抑制剂不能穿过细胞膜,因此先将血管环用 β-七叶皂苷褪膜,用 A-23187 耗竭胞内  $Ca^{2+}$ ,结果发现 PKCε 抑制剂可降低休克 2 h 血管(褪膜后)对 NE 和  $Ca^{2+}$  的收缩反应,使量-效曲线右

移、Emax 减小,说明 PKC $\epsilon$  对失血性休克后血管反应性和钙敏感性有重要调节作用。

目前研究认为,PKC $\epsilon$  在多种组织器官中有保护性作用,在兔心肌,缺血预适应可诱导大量 PKC $\epsilon$  从胞质转位至胞膜,增强对心肌的保护作用<sup>[10]</sup>。在失血性休克后血管平滑肌 PKC $\epsilon$  表达如何变化,有怎样的作用,国内外文献报道较少。McKenna 等<sup>[11]</sup> 报告,脂多糖(LPS)100  $\mu$ g/L 作用于大鼠主动脉 3 h 可使 PKC $\epsilon$  蛋白表达增高 2~3 倍,其 mRNA 表达比正常对照增高 3.5~12.0 倍,持续作用 20 h 后 PKC $\epsilon$  蛋白表达和 mRNA 表达均逐渐回降。在缺氧小鼠脑组织,PKC $\epsilon$  表达随缺氧次数增多(3 次之内)达持续增强(第 4 次缺氧时出现回降)<sup>[12]</sup>。我们的研究发现,与正常对照组比较,失血性休克后大鼠 SMA PKC $\epsilon$  mRNA 表达持续增高,从休克即时开始,在休克 1 h 时达到峰值,一直持续到休克 4 h 仍然维持在较高水平,而失血性休克后大鼠 SMA 一级分支血管对 NE 的反应性和钙敏感性却呈先增高后降低的变化趋势(休克早期的血管反应性和钙敏感性增高,休克中晚期的血管反应性和钙敏感性降低)。即休克早期,PKC $\epsilon$  mRNA 表达增高,血管反应性和钙敏感性也增高,二者变化趋势一致;而休克中晚期,PKC $\epsilon$  mRNA 表达持续增高,而血管反应性和钙敏感性却呈进行性下降。

结合前面 PKC $\epsilon$  对失血性休克后血管反应性和钙敏感性有重要调节作用的研究结果,我们认为 PKC $\epsilon$  可能是失血性休克后机体的内源性保护分子,在休克早期表达增强,维持高水平的血管反应性和钙敏感性,以发挥保护效应;在休克中晚期,由于损伤因素作用强大,PKC $\epsilon$  表达增高已不足以维持相当水平的血管反应性和钙敏感性,因而出现血管反应性和钙敏感性的进行性下降。

## 参考文献

- [1] 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(2): 128-136.
- [2] 江其生,胡德耀,肖南,等.失血性休克大鼠血管平滑肌收缩功能变化研究[J].中国病理生理杂志,2002,18(11):1425-1426.
- [3] Chen S J, Wu C C, Yang S N, et al. Hyperpolarization contributes to vascular hyporeactivity in rats with lipopolysaccharide-induced endotoxic shock[J]. Life Sci, 2000, 68(6): 659-668.
- [4] 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依赖钙 K<sup>+</sup>通道活性改变[J].生理学报,2001,53(4): 291-295.
- [5] 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].中国中西医结合急救杂志,2003,15(5):275-278.
- [6] 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(5):304-306.
- [7] Xu J, Lin L. The role of calcium desensitization in vascular hyporeactivity and its regulation after hemorrhagic shock in the rat[J]. Shock, 2005, 23(6): 576-581.
- [8] Eto M, Kitazawa T, Yazawa M, et al. Histamine-induced vasoconstriction involves phosphorylation of a specific inhibitor protein for myosin phosphatase by protein kinase C alpha and delta isoforms[J]. J Biol Chem, 2001, 276(31): 29072-29078.
- [9] Horowitz A, Clément-Chomienne O, Walsh M P, et al. Epsilon-isoenzyme of protein kinase C induces a Ca(2+)-independent contraction in vascular smooth muscle[J]. Am J Physiol, 1996, 271(2 Pt 1): C589-C594.
- [10] Shimizu Y, Minatoguchi S, Hashimoto K, et al. The role of serotonin in ischemic cellular damage and the infarct size-reducing effect of sarpogrelate, a 5-hydroxytryptamine-2 receptor blocker, in rabbit hearts[J]. J Am Coll Cardiol, 2002, 40(7): 1347-1355.
- [11] McKenna T M, Fan S X, Li S. Lipopolysaccharide-responsive protein kinase C isotypes in the adult rat aorta[J]. Shock, 1997, 7(4): 269-273.
- [12] 刘宏雁,王维忠,谢湘林,等. PKC $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\epsilon$ 、 $\zeta$  表达在缺氧预适应中的变化[J].中国老年学杂志,2001,21(3):213-214.

(收稿日期:2007-10-01 修回日期:2007-11-25)

(本文编辑:李银平)

## • 启事 •

### 2008 年全国大内科新进展学习班将举办

2008 年全国大内科新进展学习班由中华医学会主办,拟于 2008 年 5 月下旬在北京举办,共 6 d,培训费 980 元,食宿统一安排,费用自理。学习期满授予学员国家级 I 类继续教育学分 10 分[项目编号:2008-03-10-117(国)]。

1 内容:代谢综合征;短暂性脑缺血发作;肺动脉血栓栓塞症;风湿性疾病;高血压;呼吸衰竭;急性冠脉综合征;急性缺血性脑卒中;抗感染药物;抗栓和溶栓;类风湿关节炎;脑出血;如何选用调脂药;糖尿病急性并发症;糖尿病口服降糖药;糖尿病胰岛素治疗;心房颤动;心律失常;心血管病常用药物等。

2 主讲人:刘又宁、萧建中、马欣、程显声、王鸿懿等教授。

3 报名办法:请将详细的通讯地址填写清楚后寄到:北京市东城区东四西大街 42 号,中华医学会网络信息部,丛凤娟、包文婕收,邮编:100710;信封请注明:“大内科班”。电话:010-85158694(08:30-17:00),手机:13811356867,传真:010-85158693, Email:congjf@cma.org.cn 或 cmawlb@163.com。可电话报名索取正式通知。

(中华医学会信息网络部)