

• 论著 •

聚腺苷二磷酸核糖基聚合酶在大鼠失血性休克后血管低反应性发生中的作用

周学武 刘建仓 廖自福 王丽亭 刘良明

【摘要】 目的 研究聚腺苷二磷酸核糖基聚合酶(PARP)在大鼠失血性休克后血管低反应性发生中的作用。**方法** 将SD大鼠随机分为休克组、PARP抑制剂3-氨基苯甲酰胺(3-AB)预处理+休克组和假手术对照组,采用股动脉放血复制失血性休克模型。在体观察给予3 μg/kg去甲肾上腺素(NE)升高血压的幅度;离体测定肠系膜上动脉血管环对NE的反应性;硝酸还原酶法测定血浆和肠系膜上动脉血管环组织匀浆中一氧化氮(NO)的含量。**结果** 休克模型完成后即刻静脉给NE,休克组血压升高幅度显著低于假手术对照组($P < 0.01$);回输血1 h后再次静脉给NE,休克组血压显著低于3-AB预处理+休克组和假手术对照组($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。假手术对照组最大收缩张力 $[(0.367 \pm 0.221 \text{ 3}) \text{ g/mm}] > 3\text{-AB}$ 预处理+休克组 $[(0.286 \pm 0.153 \text{ 2}) \text{ g/mm}] > \text{休克组} [(0.185 \pm 0.111 \text{ 3}) \text{ g/mm}, P < 0.05$ 或 $P < 0.01]$;与休克组比较,3-AB预处理+休克组量-效曲线左移,在NE终浓度为 10^{-7} 、 10^{-6} 和 10^{-5} mol/L时其收缩力显著增加(P 均 < 0.05)。3组间血浆NO含量差异均无统计学意义,3-AB预处理+休克组血浆和肠系膜上动脉组织匀浆中NO含量虽较休克组稍有降低,但两组间比较差异无统计学意义。**结论** PARP参与了大鼠失血性休克后血管低反应性的发生。

【关键词】 聚腺苷二磷酸核糖基聚合酶; 失血性休克; 血管低反应性

Effect of poly-adenosine diphosphate ribosyl-polymerase on vascular hyporeactivity in rats with hemorrhagic shock ZHOU Xue-wu, LIU Jian-cang, LIAO Zi-fu, WANG Li-ting, LIU Liang-ming. State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 2, Research Institute of Surgery, Daping Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

【Abstract】 Objective To study the effects of poly-adenosine diphosphate ribosyl-polymerase (PARP) on vascular hyporeactivity during hemorrhagic shock in rats. **Methods** Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into three groups: shock, 3-aminobenzamide (3-AB) pretreatment + shock, and sham operation. Bleeding from the femoral artery to induce hemorrhagic shock model. The blood pressure changes following 3 μg/kg norepinephrine (NE) injection were observed in vivo. The response of vascular rings of superior mesenteric artery (SMA) to NE was determined ex vivo. The nitrogen monoxidum (NO) contents of plasma and tissue homogenate of SMA were measured using the assay kit based on the nitrate reductase reaction. **Results** The maximum increase of mean arterial pressure in response to NE immediately following shock in the shock group was significantly lower than in the sham operation group ($P < 0.01$) and the value at 1 hour after blood reinfusion in the shock group was obviously lower than in the 3-AB pretreatment + shock group ($P < 0.05$) and in the sham operation group ($P < 0.01$). The maximum concentration force in the sham operation group $[(0.367 \pm 0.221 \text{ 3}) \text{ g/mm}]$ was significantly increased than in the 3-AB pretreatment + shock group $[(0.286 \pm 0.153 \text{ 2}) \text{ g/mm}, P < 0.05]$ and in the shock group $[(0.185 \pm 0.111 \text{ 3}) \text{ g/mm}, P < 0.01]$. The cumulative dose-response curves of SMA to NE shifted to the left, and the contraction force was markedly increased as NE concentration reaching 10^{-7} , 10^{-6} and 10^{-5} mol/L in the 3-AB pretreatment + shock group compared to the shock group (all $P < 0.05$). There were no significant difference on plasma NO content among the three groups. However, the NO contents of plasma and tissue homogenate of SMA in the 3-AB pretreatment + shock group were slightly lower than in the shock group ($P > 0.05$). **Conclusion** PARP is involved in the vascular hyporeactivity in hemorrhagic-shocked rats.

【Key words】 poly-adenosine diphosphate ribosyl-polymerase; hemorrhagic shock; vascular hyporeactivity

基金项目:国家重点基础研究发展计划(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、烧伤和复合伤国家重点实验室

作者简介:周学武(1965-),男(汉族),湖北省人,博士,硕士生导师,副研究员,主要研究方向为战、创伤失血性休克的病理生理机制及其防治,参与多项国家和军队科研课题的研究,发表论文10余篇,获军队科技进步二等奖1项,三等奖1项,Email:zhouxw@cta.cq.cn.

已知聚腺苷二磷酸核糖基聚合酶[poly(ADP-ribose)polymerase, PARP]参与了缺血、缺氧、全身炎症反应和循环休克的病理生理过程^[1]。在创伤失血性休克情况下,PARP是否参与血管低反应性的发生,其机制如何,目前报道较少。本研究中拟通过在体和离体实验,观察PARP在大鼠失血性休克后血管低反应性发生中的作用,并通过检测血浆和组

织中一氧化氮(NO)含量探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂:戊巴比妥和 PARP 抑制剂 3-氨基苯甲酰胺(3-aminobenzamide, 3-AB)均购自美国 Sigma 公司,重酒石酸去甲肾上腺素(NE)购自上海禾丰制药有限公司,肝素钠购自江苏万邦生化医药股份有限公司,其余试剂均为市售品分析纯级。Kreb-Henseleit (K-H)液配方:NaCl 118 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; 4 ℃ 保存。NO 试剂盒(硝酸还原酶法)购自南京建成生物工程研究所。

1.2 动物模型制备及实验方法:SD 大鼠,雌雄不拘,体重 180~220 g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所动物中心提供。实验 12 h 前禁食,自由饮水。

1.2.1 动物在体实验:SD 大鼠 27 只,平均体重(213.3±14.1)g,按随机数字表法分成 3 组:休克组(10 只)、PARP 抑制剂 3-AB 预处理+休克组(8 只)、假手术对照组(9 只)。股动脉插管用于放血和观察血压,股静脉插管用于回输血和给药。休克组于 10 min 内放血使平均动脉压(MAP)降至 30 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa),维持 2 h,完成休克模型;3-AB 预处理+休克组于放血 10 min 前按 10 mg/kg 静脉给 3-AB;假手术对照组不放血。模型完成后,各组大鼠按 3 μg/kg 静脉给予 NE,观察血压升高幅度,随后回输失血,1 h 和 2 h 后分别再次静脉给予 NE,观察血压升高幅度。

1.2.2 离体血管环实验:SD 大鼠 67 只,平均体重(218.1±16.7)g,按随机数字表法分成 3 组:休克组(23 只)、PARP 抑制剂 3-AB 预处理+休克组(21 只)、假手术对照组(23 只)。手术和休克模型制备方法同在体实验。完成休克模型后,各组大鼠开腹取肠系膜上动脉 2~3 mm,将血管环用不锈钢丝挂钩挂在盛有 K-H 液的离体器官灌流槽中,挂钩经细线与张力传感器相连,由 Power Lab 多道生理记录

仪记录张力变化。向灌流槽中持续充入体积分数为 95%O₂和 5%CO₂的混合气体,给予预初张力 0.5 g,37 ℃平衡 2 h,每 20 min 换液 1 次,待张力曲线平稳后,测定血管环对 NE 的反应性。用浓度累积法测定血管环对 NE 的反应性,NE 的终浓度分别为 10⁻⁹、10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶和 10⁻⁵ mol/L,记录不同浓度下各血管环产生的收缩力,以收缩力/血管环长度(g/mm)为量化标准,绘制量-效曲线,采用曲线拟合法求 NE 的半数有效浓度(EC₅₀),用 NE 的 -log[EC₅₀](pD₂)和最大收缩张力(E_{max})以及量-效曲线评价血管反应性^[2]。

1.2.3 NO 含量变化的测定:SD 大鼠 44 只,平均体重(210.9±9.9)g,按随机数字表法分成 3 组:休克组(15 只)、PARP 抑制剂 3-AB 预处理+休克组(13 只)、假手术对照组(16 只)。手术和休克模型制备方法同在体实验。完成休克模型后,各组大鼠经股动脉抽血 3 ml,4 ℃,1 500×g 离心 15 min,取血浆, -70 ℃冻存。开腹取肠系膜上动脉,加 0.5 ml 磷酸盐缓冲液(PBS),匀浆后取上清液, -70 ℃冻存。NO 含量测定按照试剂盒说明书进行。

2 结果

2.1 在体实验(表 1):休克模型完成后即刻静脉给予 NE 干预,与 3-AB 预处理+休克组比较,休克组 MAP 升高幅度有所降低,但差异无统计学意义;且休克组 MAP 显著低于假手术对照组(P<0.01)。回输血 1 h 后再次静脉给予 NE,休克组 MAP 升高幅度显著低于 3-AB 预处理+休克组(P<0.05),且显著低于假手术对照组(P<0.01)。

表 1 3 μg/kg NE 对失血性休克大鼠 MAP

组别	动物数	变化的影响(̄x±s)		mm Hg
		休克 2 h	回输血 1 h	回输血 2 h
假手术对照组	9	27.3±9.9	26.7±9.9	24.0±8.2
休克组	10	15.4±6.9 ^a	11.9±5.0 ^{ab}	24.8±10.3
3-AB 预处理+休克组	8	22.3±14.8	18.5±6.8	22.8±11.1

注:与假手术对照组比较,^aP<0.01;与 3-AB 预处理+休克组比较,^bP<0.05

2.2 离体血管环实验(表 2):假手术对照组 pD₂ 为

表 2 3-AB 对失血性休克大鼠肠系膜上动脉血管环反应性的影响(̄x±s)

组别	动物数	NE 浓度(mol/L)					g/mm
		10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	
假手术对照组	23	0.010 9±0.018 3	0.104 0±0.084 3	0.223 5±0.141 8	0.310 1±0.193 0	0.367 1±0.223 1	
休克组	23	0.003 6±0.008 4	0.039 2±0.037 5 ^a	0.108 6±0.075 3 ^{ab}	0.158 3±0.091 8 ^{ab}	0.185 6±0.111 3 ^{ab}	
3-AB 预处理+休克组	21	0.004 7±0.033 6	0.045 5±0.042 9 ^a	0.177 9±0.097 1	0.242 0±0.122 6	0.286 4±0.153 2	

注:与假手术对照组比较,^aP<0.01;与 3-AB 预处理+休克组比较,^bP<0.05

7.279±0.467, 休克组为 7.174±0.349; 3-AB 预处理+休克组为 6.921±1.453; 各组间 pD₂ 值比较差异无统计学意义。3-AB 预处理+休克组 E_{max} 为 (0.286 4±0.153 2)g/mm, 显著高于休克组 E_{max} (0.185 6±0.111 3)g/mm ($P<0.05$); 假手术对照组 E_{max} 为 (0.367 1±0.221 3)g/mm, 显著高于休克组 E_{max} ($P<0.01$)。与休克组比较, 3-AB 预处理+休克组量-效曲线左移, 在 NE 的终浓度分别为 10⁻⁷、10⁻⁶和 10⁻⁵ mol/L 时, 其收缩力均显著高于休克组 (P 均 <0.05)。

2.3 NO 含量变化 (表 3): 休克组、3-AB 预处理+休克组和假手术对照组血浆中 NO 含量比较差异无统计学意义。休克组和 3-AB 预处理+休克组肠系膜上动脉组织匀浆中 NO 含量均显著高于假手术对照组 (P 均 <0.01); 而 3-AB 预处理+休克组肠系膜上动脉组织匀浆中 NO 含量虽较休克组有所降低, 但差异无统计学意义。

表 3 3-AB 对失血性休克大鼠血浆和肠系膜上动脉组织匀浆中 NO 含量的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	血浆 NO 含量 ($\mu\text{mol/L}$)	组织匀浆 NO 含量 ($\mu\text{mol/g}$)
假手术对照组	16	6.176±2.755	3.619±1.503
休克组	15	6.387±1.875	7.515±3.703*
3-AB 预处理+休克组	13	6.147±2.043	7.262±4.039*

注: 与假手术对照组比较, * $P<0.01$

3 讨论

PARP 是一种广泛存在于真核生物细胞核内的蛋白质翻译后修饰酶, 它以尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD⁺) 为底物, 催化其裂解为腺苷二磷酸核糖基 (ADP-ribose) 和尼克酰胺两个部分, 并将前者转移到受体蛋白的谷氨酸残基上, 当该酶发生连续作用时就在受体蛋白分子上连接上了一条腺苷二磷酸核糖基的聚合链, 并发挥聚腺苷二磷酸核糖基化 [poly (ADP-ribosylation), pADPr] 的修饰作用。在生理状态下, PARP 与 DNA 修复、基因完整性监视有关^[1]。

近年来的研究表明, PARP 的激活在氧化应激、炎症反应以及缺血、缺氧损伤等病理过程中起着至关重要的作用^[12]。PARP 参与了肠系膜上动脉夹闭/再灌注休克和感染性休克后的血管反应性降低^[3-4], 被认为是引起外周循环衰竭的中心环节, 但其在创伤失血性休克血管低反应性中的作用却少有报道。Liaudet 等^[5]采用 PARP 基因敲除技术发现, 能升

高失血性休克小鼠的 MAP, 提高其存活率, 提示 PARP 参与了创伤失血性休克后血管反应性降低。本研究中采用大鼠股动脉放血复制失血性休克模型, 随后回输失血, 观察 NE 升高血压的幅度, 结果发现, PARP 抑制剂 3-AB 预处理+休克组血压升高幅度显著大于休克组, 从整体水平证实 PARP 参与了失血性休克后血管低反应性的发生。离体血管环实验证实, 与休克组比较, 3-AB 预处理+休克组在 NE 终浓度分别为 10⁻⁷、10⁻⁶和 10⁻⁵ mol/L 时收缩力均显著高于休克组, 且 E_{max} 增加, 量-效曲线左移, 从离体器官水平证实 PARP 参与了失血性休克后血管低反应性的发生。

对于 PARP 参与氧化应激、炎症反应及缺血、缺氧损伤的病理机制, 通常认为, 缺血、缺氧形成的氧自由基和 NO 可引起单链 DNA 断裂, 后者激活了细胞核内的 PARP。PARP 持续激活时, 细胞消耗大量的 NAD⁺ 和 ATP 而发生坏死, 细胞内各种溶酶体酶释放入血, 进而引起更为严重而广泛的炎症反应和组织损伤; PARP 还通过对核转录因子- κ B、激活蛋白-1 (AP-1) 进行 pADPr 修饰或修复干扰转录的 DNA 断裂片断, 调节原炎症基因和蛋白的表达, 如诱生型一氧化氮合酶 (iNOS)、细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 等^[1]。但在本实验中, 与休克组比较, 3-AB 预处理+休克组血浆和肠系膜上动脉组织匀浆中 NO 含量虽然有所降低, 但两者间差异无统计学意义, 提示 PARP 可能主要不是通过 NO 介导失血性休克后血管低反应性的发生, 其确切机制仍需进一步深入研究。

参考文献

- [1] Cuzzocrea S. Shock, inflammation and PARP [J]. Pharmacol Res, 2005, 52(1): 72-82.
- [2] 徐亮, 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(1): 20-23.
- [3] Di Paola R, Genovese T, Caputi A P, et al. Beneficial effects of 5-aminoisoquinolinone, a novel, potent, water-soluble, inhibitor of poly (ADP-ribose) polymerase, in a rat model of splanchnic artery occlusion and reperfusion [J]. Eur J Pharmacol, 2004, 492(2-3): 203-210.
- [4] Tasatargil A, Dalaklioglu S, Sadan G. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase prevents vascular hyporesponsiveness induced by lipopolysaccharide in isolated rat aorta [J]. Pharmacol Res, 2005, 51(6): 581-586.
- [5] Liaudet L, Soriano F G, Szabó E, et al. Protection against hemorrhagic shock in mice genetically deficient in poly (ADP-ribose) polymerase [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(18): 10203-10208.

(收稿日期: 2007-10-14 修回日期: 2008-02-20)

(本文编辑: 李银平)