

肌内皮缝隙连接在失血性休克大鼠内皮依赖和非内皮依赖的血管舒/缩功能调节中的作用

杨光明, 唐婧, 李涛, 徐竞, 刘良明* (第三军医大学大坪医院野战外科研究所第二研究室, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆 400042)

摘要: 目的 研究肌内皮缝隙连接(myo-endothelial gap junction, MEGJ)通道在失血性休克大鼠肠系膜上动脉血管(SMA)的内皮依赖和非内皮依赖的血管收缩/舒张功能调节中的作用。方法 利用在体血管管径测定技术, 观察 MEGJ 的阻断剂 18 α -甘草次酸(18 α -GA)对非内皮依赖的血管收缩剂去甲肾上腺素(NE)和舒张剂硝普钠(SNP)、以及对内皮依赖的血管收缩剂杨梅黄酮和舒张剂乙酰胆碱(ACh)诱导的休克大鼠血管舒/缩功能的影响。结果 18 α -GA(2 mg·kg⁻¹)对非内皮依赖的血管舒张剂 SNP(10 μ g·kg⁻¹)诱导的失血性休克大鼠 SMA 血管管径舒张和收缩剂 NE(3 μ g·kg⁻¹)诱导的血管管径收缩没有明显的影响; 而 18 α -GA 处理可明显抑制内皮依赖的血管舒张剂 ACh(2 μ g·kg⁻¹)和收缩剂杨梅黄酮(2 μ g·kg⁻¹)诱导的血管舒/缩反应, 18 α -GA 处理组的 ACh 诱导的血管舒张率和杨梅黄酮诱导的管径收缩率分别降低至相应对照组的 35.1%和 26.8%($P < 0.01$)。结论 MEGJ 在失血性休克大鼠内皮依赖的血管舒张/收缩功能调节中具有重要的作用。

关键词: 失血性休克; 肌内皮缝隙连接; 血管舒张/收缩功能; 内皮依赖性; 非内皮依赖性

中图分类号: R962.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)01-0001-04

Effects of Myo-Endothelial Gap Junction on the Endothelium-Dependent and -Independent Vascular Relaxation/Constriction in Hemorrhagic Shock Rats

YANG Guangming, TANG Jing, LI Tao, XU Jing, LIU Liangming* (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 observe the effects of myo-endothelial gap junction(MEGJ) on the endothelium-dependent and -independent vasorelaxation/vasoconstriction of superior mesenteric artery(SMA) in hemorrhagic shock rats. **METHODS** With determined the changes of diameter of SMA by a intravital microscope system, the effects of 18 α -glycyrrhetic acid(18 α -GA), a uncoupling agent of MEGJ, on endothelium-independent vascular contractile response to norepinephrine(NE), endothelium-independent relaxation reactivity to sodium nitroprusside(SNP), and endothelium-dependent contractile response to myricetin, endothelium-dependent relaxation reactivity to acetylcholine(ACh) in hemorrhagic shock rats were observed. **RESULTS** After treatment with 18 α -GA(2 mg·kg⁻¹), the endothelium-independent vasorelaxation/vasoconstriction of SMA induced by SNP (10 μ g·kg⁻¹) or NE(3 μ g·kg⁻¹) in hemorrhagic shock rats had no significant changes. While 18 α -GA pretreatment significantly blocked the endothelium-dependent relaxation reactivity to ACh(2 μ g·kg⁻¹) and contractile response to myricetin(2 μ g·kg⁻¹), the vascular relaxation/contractile response of SMA to ACh or myricetin in 18 α -GA group were decreased to 35.1% and 26.8% of the control group, respectively($P < 0.01$). **CONCLUSION** MEGJ played important role in the regulation of endothelium-dependent vasorelaxation/vasoconstriction in hemorrhagic shock rats.

KEY WORDS: hemorrhagic shock; myo-endothelial gap junction; vasorelaxation/vasoconstriction; endothelium-dependent; endothelium-independent

严重创伤/休克等多种临床重症常存在血管舒缩功能障碍, 主要表现为血管对血管活性药物治疗的反应减弱甚至不反应(血管低反应性)^[1-2], 阐

明其发生机制对寻找有效的防治措施具有重要意义。血管内皮细胞(vascular endothelial cell, VEC)作为血管壁的主要组成细胞, 在维持血管基础张

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(30830053); 国家自然科学基金青年基金项目(30901559); 国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(2005CB522601); 教育部创新团队研究计划资助项目(IRT0712)

作者简介: 杨光明, 男, 博士, 助理研究员 Tel: (023)68757420
研究员 Tel: (023)68757421 E-mail: Liuliangming2002@yahoo.com

E-mail: ygm971@yahoo.com.cn *通信作者: 刘良明, 男, 博士,

力和调节血管舒缩功能中具有重要作用。VEC 和血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)间存在着缝隙连接,称为肌内皮缝隙连接(myo-endothelial gap junction, MEGJ), MEGJ 可以穿过血管内弹力层,使 VEC 和 VSMC 进行直接的电和化学交流^[3-4],因此 MEGJ 在血管功能调节中具有重要作用,并与多种病理情况下血管功能异常有密切关系。本试验采用在体血管管径测定技术,观察阻断 MEGJ 通道对失血性休克大鼠肠系膜上动脉血管(superior mesenteric arterie, SMA)的内皮依赖和非内皮依赖的血管收缩/舒张功能的影响,探讨 MEGJ 在失血性休克后血管反应性调节中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD 大鼠 96 只,♀♂各半,体重 200~250 g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供,实验动物合格证号:SCXK(渝)2007-0005。

1.2 试剂

18 α -甘草次酸(18 α -GA,纯度>98%,批号:118K0904)和杨梅黄酮(myricetin,纯度>96%,批号:70050)购自美国 Sigma 公司;乙酰胆碱(ACh,纯度>99%,批号:YY1219B1006Y, Bio Basic Inc 公司);去甲肾上腺素(NE, 1 mL:2 mg,批号:091102,上海禾丰制药有限公司);硝普钠(SNP, 50 mg·支⁻¹,批号:080120,北京双鹤现代医药技术有限责任公司);肝素钠注射液(2 mL:12 500 U,批号:0907104,江苏万邦生化医药股份有限公司)。其他试剂为国产分析纯。

1.3 失血性休克模型复制及药物处理

96 只大鼠随机分为 NE 组、杨梅黄酮组、ACh 组和 SNP 组,每组又分别分为 3 个亚组,即:正常对照组、休克对照组、休克+18 α -GA(MEGJ 阻断剂)组。

采用本实验室常用方法复制失血性休克模型:实验前 12 h 禁食、自由饮水。实验当日用 3% 戊巴比妥钠(30 mg·kg⁻¹)腹腔注射麻醉后,右侧股动脉插管供观察血压和放血,股静脉插管供复苏和给药,经插管注射肝素钠生理盐水(500 U·kg⁻¹)抗凝。经股动脉插管 10 min 内放血至血压 40 mmHg,并维持在此水平 2 h。然后剪去腹毛,沿腹正中线纵向剖开长约 3~4 cm 切口,暴露肠系膜

上 SMA。术毕,大鼠稳定 5 min,休克+18 α -GA 组按照 2 mg·kg⁻¹的剂量将 18 α -GA 加入到 3 mL·(200 g)⁻¹体重的复方氯化钠溶液中于 30 min 内用输液泵输注;休克对照组仅予 3 mL·(200 g)⁻¹体重的复方氯化钠溶液;正常对照组(假手术组)仅进行手术操作,不放血、不输液。

1.4 指标测定

采用在体血管管径测定技术^[5]观察 MEGJ 的阻断剂 18 α -GA 对非内皮依赖的血管收缩剂 NE 和舒张剂 SNP、以及对内皮依赖的血管收缩剂杨梅黄酮和血管舒张剂 ACh 诱导的休克血管舒缩功能的影响。将大鼠肠系膜上动脉暴露于体内血管观测仪(S6D,德国 Leica 公司)下,清除血管周围结缔组织,血管管径变化情况由仪器连接的摄像机记录并输入计算机保存,用图像分析软件读取血管管径值。通过静脉插管分别推注 NE(3 μ g·kg⁻¹)、杨梅黄酮(2 μ g·kg⁻¹)、ACh(2 μ g·kg⁻¹)或 SNP(10 μ g·kg⁻¹),记录给药前和给药即刻的大鼠 SMA 管径值。以给收缩剂或舒张剂前后的 SMA 管径的差值占给药前血管管径的百分比表示血管收缩率/舒张率,以此反映血管收缩/舒张功能。

1.5 数据处理及统计学分析

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间采用单因素方差分析;方差分析有统计学意义的组间比较采用 Q 检验。 $P < 0.05$ 为具有显著性差异; $P < 0.01$ 为具有非常显著性差异。

2 结果

2.1 18 α -GA 对休克大鼠内皮依赖和非内皮依赖的血管收缩功能的影响

给予 2 mg·kg⁻¹的 18 α -GA 处理后,失血性休克大鼠肠系膜上动脉血管对非内皮依赖的血管收缩剂 NE(3 μ g·kg⁻¹)诱导的血管管径收缩较未给予 18 α -GA 的休克对照组大鼠的血管收缩没有明显变化,见图 1A;而 18 α -GA 处理可使休克大鼠 SMA 对内皮依赖的血管收缩剂杨梅黄酮(2 μ g·kg⁻¹)所诱导收缩反应较 18 α -GA 作用前明显降低,休克+18 α -GA 组的杨梅黄酮诱导的管径收缩率仅为休克对照组的 26.8%($P < 0.01$),见图 1B。

2.2 18 α -GA 阻断 MEGJ 通道在休克大鼠内皮依赖和非内皮依赖的血管舒张功能调节中的作用

MEGJ 的阻断剂 18 α -GA(2 mg·kg⁻¹)处理后,非内皮依赖的血管舒张剂 SNP(10 μ g·kg⁻¹)诱导的休克大鼠 SMA 的舒张反应有所降低,但各组间无明显

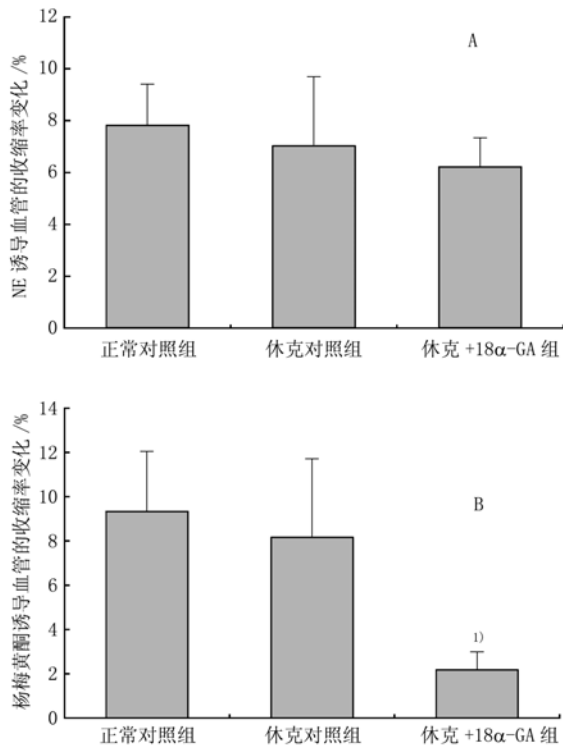


图1 18α-GA对休克大鼠SMA非内皮依赖(A)和内皮依赖(B)的血管收缩功能的影响(n=8)
与休克对照组比较, ¹⁾P<0.01

Fig 1 The effects of 18α-GA on the endothelium-independent(A) and -dependent(B) vasoconstriction of SMA in shock rats (n=8)
Compared with shock control group, ¹⁾P<0.01

显著统计学差异, 见图2A; 而18α-GA处理明显抑制了内皮依赖的血管舒张剂ACh(2 μg·kg⁻¹)诱导的血管舒张作用, 休克+18α-GA组的ACh诱导的血管舒张率为休克对照组的35.1%(P<0.01), 见图2B。

3 讨论

VEC是血管壁的主要组成细胞, 除了具有屏障功能和物质交换功能, 还在维持血管基础张力和调节血管舒缩功能中发挥重要作用。它可释放多种血管活性物质如: 一氧化氮、前列环素、内皮超极化因子等舒血管因子和内皮素、血管紧张素II和血栓素A₂等缩血管物质参与血管张力的调节。除此之外, VEC还可通过一种细胞间的膜性通道结构——缝隙连接, 以直接通讯的方式与VSMC进行细胞间的信息交流, 使整个血管作为一个完整的功能单位参与机体的各项活动^[6]。

缝隙连接是介导细胞间直接进行物质和信息交流的膜通道结构, 血管组织中存在丰富的缝

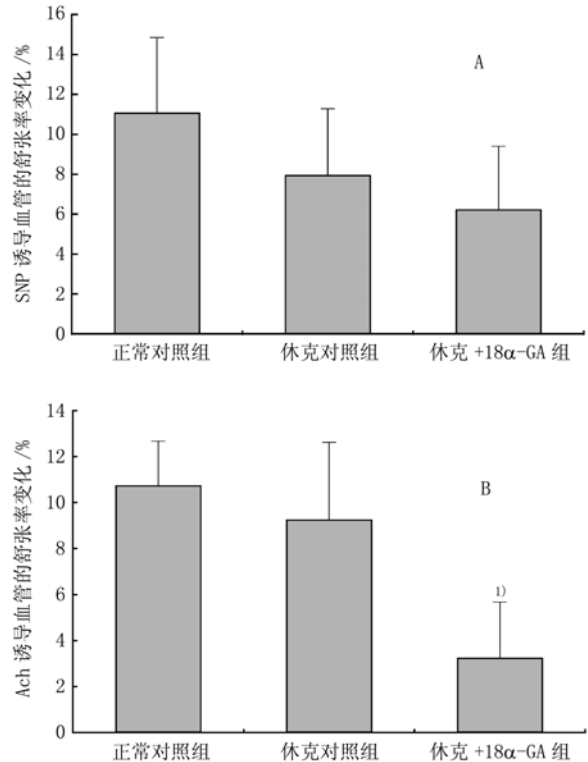


图2 18α-GA对休克大鼠SMA非内皮依赖(A)和内皮依赖(B)的血管舒张功能的影响(n=8)
与休克对照组比较, ¹⁾P<0.01

Fig 2 The effects of 18α-GA on the endothelium-independent(A) and -dependent(B) vasorelaxation of SMA in shock rats (n=8)
Compared with shock control group, ¹⁾P<0.01

隙连接, 在VEC和VSMC间的缝隙连接即为MEGJ。它由相邻细胞膜上的两个配对半通道(连接子)衔接而成, 连接子由6个亚单位即连接蛋白(connexin, Cx)在细胞膜内环绕排列成中空的半通道, 这个半通道与另一个细胞膜上的半通道连接形成一个完整的缝隙连接通道。缝隙连接允许电信号和分子质量低于1 kDa或直径<1.0 nm的离子或小分子物质通过, 以电偶联和化学偶联两种方式介导细胞间电和化学信号的传递, VEC和VSMC间的缝隙连接间使血管壁上这两种不同类型的细胞进行直接的信息交流, 在正常组织的发生、发展、死亡, 以及多种病理生理过程中发挥着重要作用^[7]。

本实验室以缝隙连接特异性的阻断剂18α-GA为工具药, 采用大鼠失血性休克模型和在体血管管径测定技术, 观察阻断MEGJ通道后, 失血性休克大鼠肠系膜上动脉血管收缩/舒张反应的变化

情况。结果显示, 18 α -GA 对休克大鼠血管对非内皮依赖的血管舒张剂(SNP)和收缩剂(NE)诱导的舒/缩反应没有明显影响, 而对内皮依赖的血管舒张剂(ACh)和收缩剂(杨梅黄酮)的舒/缩反应有明显的抑制作用。提示 MEGJ 在失血性休克大鼠内皮依赖的血管收缩/舒张功能调节中具有重要的作用, 结合笔者的前期研究发现^[8-9]MEGJ 与休克失代偿期大鼠的离体血管的舒缩功能变化也有密切关系, 因此推测针对 MEGJ 进行调节可能从一个新的方向去寻找有效的恢复休克等临床重症血管低反应性的药物。目前发现人类缝隙连接蛋白家族包括 21 个成员, 它们在各个组织器官中的分布不同、功能也有差异, 其中在心血管系统中发现的主要有 Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 和 Cx46^[10]。而哪些连接蛋白亚型参与了休克后血管舒缩功能和血管反应性的调节, 它们的调节作用及其机制如何, 尚需进一步研究阐明。

REFERENCES

- [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(3): 208-214.
- [2] YANG G M, XU J, LI T, et al. Effect of PKC ϵ isoform in

AVPrRegulating the MLC₂₀ phosphorylation of sMA after shock and MLCP/MLCK activity of VSMC [J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学), 2009, 26(8):615-618.

- [3] ISAKSON B E, DULING B R. Heterocellular contact at the myoendothelial junction influences gap junction organization [J]. Circ Res, 2005, 97(1): 44-51.
- [4] HAEFLIGER J A, NICOD P, MEDA P. Contribution of connexins to the function of the vascular wall [J]. Cardiovasc Res, 2004, 62(2): 345-356.
- [5] YANG G M, LIU L M, XU J, et al. Effect of arginine vasopressin on vascular reactivity and calcium sensitivity following hemorrhagic shock in rats and its relationship to Rho-kinase [J]. J Trauma, 2006, 61(6): 1335-1342.
- [6] DHEIN S, JONGSMA H J. Forming the network-gap junction in the cardiovascular system [J]. Cardiovasc Res, 2004, 62(2): 225-227.
- [7] PAPP R, GONCZI M, KOVAS M, et al. Gap junctional uncoupling plays a trigger role in the antiarrhythmic effect of ischaemic preconditioning [J]. Cardiovasc Res, 2007, 74(3): 396-405.
- [8] MING J, LIU L M, LI T, et al. Role of arterial myo-endothelial gap junction on the vascular contractile reactivity following hemorrhagic shock in rats [J]. Chin Crit Care Med (中国危重病急救医学), 2006, 18(9): 519-522.
- [9] MING J, LIU L M, LI T, et al. Effect of myo-endothelial gap junction on vascular relaxation reactivity following hemorrhagic shock in rats [J]. J Trauma Surg (创伤外科杂志), 2006, 8(2): 120-123.
- [10] JOHSON T L, NEREM R M. Endothelial connexin 37, 40, and 43 respond uniquely to substrate and shear stress [J]. Endothelium, 2007, 14(4/5): 215-226.