

· 休克与脏器损害 ·

CPI-17 在蛋白激酶 C α 和蛋白激酶 C ϵ 调节失血性休克大鼠血管钙敏感性中的作用



徐竞 杨光明 李涛 明佳 陈玮 刘良明

【摘要】 目的 了解 CPI-17 在蛋白激酶(PK)C α 、PKC ϵ 调节失血性休克大鼠血管钙敏感性中的作用。 方法 将 8 只 Wistar 大鼠制成失血性休克 2 h 模型后,取大鼠肠系膜上动脉(SMA)微血管环,按随机化方法分为休克 2 h 组、PKC α 激动剂组(在培养液中加入 thymelea toxin)、CPI-17 抗体 + PKC α 激动剂组(在培养液中加入 CPI-17 抗体和 thymelea toxin)、PKC ϵ 激动剂组(在培养液中加入碳酰胆碱)、CPI-17 抗体 + PKC ϵ 激动剂组(在培养液中加入 CPI-17 抗体和碳酰胆碱)。另取 8 只正常大鼠的微血管环作为对照组。采用离体微血管环张力测定技术,测定各组大鼠血管环钙敏感性。同时取休克大鼠血管环,采用贴块法培养原代血管平滑肌细胞(VSMC),行缺氧处理,随机分为缺氧 2 h 组、PKC α 激动剂组(同前处理)、PKC ϵ 激动剂组(同前处理)。取正常大鼠 VSMC 作为对照组。采用蛋白质印迹法检测 VSMC 中 CPI-17 蛋白表达和磷酸化情况。 结果 休克 2 h 后大鼠 SMA 血管环钙敏感性明显降低,各实验组大鼠最大收缩力(Emax)均低于对照组($P < 0.01$),而 PKC α 激动剂组、PKC ϵ 激动剂组 Emax 分别为(5.8 ± 0.8)、(5.8 ± 0.9) mN,均高于休克 2 h 组[(4.1 ± 0.6) mN, $P < 0.01$]。缺氧 2 h 组 CPI-17 的蛋白表达及磷酸化吸光度值均明显低于对照组($P < 0.05$),但 PKC α 激动剂组、PKC ϵ 激动剂组却明显高于缺氧 2 h 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。 结论 PKC α 、PKC ϵ 可能通过改变 CPI-17 的蛋白表达及活性,来调节失血性休克后血管的钙敏感性。

【关键词】 休克,出血性; 蛋白激酶 C α ; 蛋白激酶 C ϵ ; 钙敏感性; CPI-17

The role of CPI-17 in vascular calcium sensitivity regulated by protein kinase C α and C ϵ in rats with hemorrhagic shock XU Jing, YANG Guang-ming, LI Tao, MING Jia, CHEN Wei, LIU Liang-ming. the Second Department of Research Institute of Surgery, Daping Hospital, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, the Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

Corresponding author: LIU Liang-ming, Email: Liuliangming2002@yahoo.com, Tel: 023-68757421

【Abstract】 Objective To observe the role of PKC-potentiated inhibitory protein for protein phosphatase 1 of 17×10^3 (CPI-17) in vascular calcium sensitivity regulated by protein kinase C α (PKC α) and C ϵ (PKC ϵ) in rats with hemorrhagic shock (HS). **Methods** Eight Wistar rats were used to reproduce 2 h HS model. Superior mesenteric artery (SMA) rings from HS rats were randomly divided into 2 h shock group (without treatment), PKC α agonist group (with addition of thymelea toxin into the nutrient solution), CPI-17 antibody + PKC α agonist group [incubation with thymelea toxin and CPI-17 antibody (1:800)], PKC ϵ agonist group (with addition of carbachol into the nutrient solution), and CPI-17 antibody + PKC ϵ agonist group [incubation with carbachol and CPI-17 antibody (1:800)]. SMA rings from another eight normal rats were used as normal control group. Calcium sensitivity indices (Emax, pD2) of SMA rings were measured by isolated organ perfusion system. Hypoxic VSMCs in primary culture were randomly divided into 2 h hypoxia group, PKC α agonist group (with above-mentioned treatment), PKC ϵ agonist group (with above-mentioned treatment), normal VSMCs were used as normal control group. Protein expression and phosphorylation of CPI-17 were measured via Western blot. **Results** Emax and pD2 in all the experimental groups were lower than those in normal control group ($P < 0.01$). Emax in PKC α agonist group and PKC ϵ agonist group was increased (5.8 ± 0.8, 5.8 ± 0.9 mN, respectively) as compared with that of 2 h shock group (4.1 ± 0.6 mN, $P < 0.01$). Protein expression and phosphorylation of CPI-17 in VSMC were significantly decreased in 2 h hypoxia group, compared with those in normal control group ($P < 0.05$), and those

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2009.03.003

基金项目:国家重点基础研究发展计划(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第二研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室

通信作者:刘良明, Email:Liuliangming2002@yahoo.com,电话:023-68757421

in PKC α agonist and PKC agonist groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusions** PKC α and PKC ϵ may regulate vascular calcium sensitivity through change in protein expression and activity of CPI-17 in HS rats.

【Key words】 Shock, hemorrhagic; Protein kinase C-alpha; Protein kinase C-epsilon; Calcium sensitivity; CPI-17

严重创伤或休克患者失代偿期常出现血管低反应性,主要表现为全身血管对缩血管物质和舒血管物质的反应降低或不反应^[1-2]。本实验室前期的研究表明,血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)肌肉收缩蛋白对钙的敏感性降低即钙失敏,是休克血管低反应性的重要发生机制之一^[3]。蛋白激酶(protein kinase, PK) C α 、PKC ϵ 通过调节血管钙敏感性,参与了失血性休克血管低反应性的调节^[4],但其调节机制尚不清楚。为此,笔者以失血性休克大鼠为模型,运用离体微血管环张力测定等方法,观察 CPI-17(potentiated inhibitory protein for protein phosphatase 1 of 17×10^3)对 PKC α 、PKC ϵ 调节休克血管钙敏感性作用的影响,以及 PKC α 与激动剂对 CPI-17 蛋白表达和活性的影响,以进一步了解休克血管低反应性的发生机制,为寻找有效的休克血管反应性调节靶点和防治药物提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

PKC α 激动剂 thymelea toxin、 β 肌动蛋白抗体、 β 七叶皂甙、A-2318 购自美国 Sigma 公司,PKC ϵ 激动剂碳酰胆碱购自德国 Merck 公司,CPI-17 抗体、磷酸化 CPI-17 抗体购自美国 Upstate 公司,二辛丁酸(BCA)蛋白定量试剂盒、辣根过氧化物酶(HRP)结合的二抗、发光底物反应试剂盒、洗膜液均购自美国 Pierce 公司。微血管肌动描计系统购自美国 DMT 公司。

1.2 动物分组及处理

清洁级 Wistar 大鼠(第三军医大学大坪医院实验动物中心)16 只,雌雄各半,体质量(230 ± 28)g。将其中 8 只大鼠参照文献[5]方法制作失血性休克 2 h 模型后,取大鼠肠系膜上动脉(SMA)微血管环,按随机化方法分为休克 2 h 组、PKC α 激动剂组(在培养液中加入 1×10^{-7} mol/L thymelea toxin)、CPI-17 抗体 + PKC α 激动剂组(在培养液中加入 1:800 CPI-17 抗体孵育 10 min 后,再加入同前浓度的 thymelea toxin 孵育 10 min)、PKC ϵ 激动剂组(在培养液中加入 4×10^{-6} mol/L 碳酰胆碱)、CPI-17 抗体 + PKC ϵ 激动剂组(在培养液中加入 1:800 CPI-17 抗体孵育 10 min 后,再加入同前浓度的碳酰胆碱孵育

10 min)。所有血管环均先褪膜。取另外 8 只正常大鼠的微血管环作为对照组。

1.3 血管环钙敏感性测定

将所取大鼠的微血管环固定在微血管肌动描计系统的张力传感器和刻度螺旋之间,浸入 K-H 液中,经旋转螺旋,依次给予 3 次张力,记录螺旋读数,根据肌动描计系统计算结果给予初始张力。在 K-H 液中平衡微血管环 15 min 至张力曲线水平。将 K-H 液换成褪膜液,作用 30 min 后再换成高钾液(不含 β 七叶皂甙、A-2318 的褪膜液)。然后采用累积浓度法检测微血管环对梯度浓度 Ca^{2+} 的收缩力,构建 Ca^{2+} 的量效曲线,根据曲线求得最大收缩力(E_{max})和半数有效浓度的负对数值(pD_2)。

1.4 CPI-17 蛋白表达和磷酸化检测

取失血性休克大鼠血管环,贴块法培养原代血管平滑肌细胞(VSMC),取第 4~6 代细胞用于实验。细胞行缺氧处理,将缺氧培养的 VSMC^[6]按随机化方法分为缺氧 2 h 组、PKC α 激动剂组(培养液中加入 1×10^{-7} mol/L thymelea toxin 孵育 10 min)、PKC ϵ 激动剂组(培养液中加入 4×10^{-6} mol/L 碳酰胆碱孵育 10 min)。另取正常大鼠血管环的 VSMC 作为对照组。提取 VSMC 总蛋白,定量后按 $150 \mu\text{g}/\text{孔}$ 上样,以十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,转膜,分别用 CPI-17 抗体、磷酸化 CPI-17 抗体 4°C 孵育过夜,HRP 结合的二抗室温孵育 1 h,化学发光法胶片成像。再用洗膜液洗膜 10 min,加入 β 肌动蛋白抗体, 4°C 孵育过夜,加入 HRP 结合的二抗,室温孵育 1 h,同上述步骤显影。扫描胶片条带用 Quantity one 软件分析,以目的蛋白与 β 肌动蛋白吸光度值之比来反映蛋白表达和磷酸化水平。

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件处理,组内自身对照和配对实验数据行 t 检验。

2 结果

2.1 血管环钙敏感性

休克 2 h 后 SMA 血管环钙敏感性明显降低, E_{max} 值均低于对照组($P < 0.01$)。但 PKC α 激动剂组、PKC ϵ 激动剂组 E_{max} 却高于休克 2 h 组($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 各组大鼠肠系膜上动脉微血管环钙敏感性比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 样本数 | 最大收缩力 (mN) | 负对数值 |
|---------------------------------|-----|-------------------------|-------------|
| 对照组 | 8 | 8.8 ± 0.9 | 4.88 ± 0.20 |
| 休克 2 h 组 | 8 | 4.1 ± 0.6 ^a | 4.70 ± 0.19 |
| PKC α 激动剂组 | 8 | 5.8 ± 0.8 ^{ab} | 4.63 ± 0.20 |
| PKC ϵ 激动剂组 | 8 | 5.8 ± 0.9 ^{ab} | 4.59 ± 0.20 |
| CPI-17 抗体 + PKC α 激动剂组 | 8 | 3.8 ± 0.7 ^a | 4.26 ± 0.17 |
| CPI-17 抗体 + PKC ϵ 激动剂组 | 8 | 4.3 ± 0.8 ^a | 4.22 ± 0.18 |

注:PK 为蛋白激酶;与对照组比较,^a $P < 0.01$;与休克 2 h 组比较,^b $P < 0.01$

2.2 CPI-17 蛋白表达和磷酸化

缺氧 2 h 组 CPI-17 的蛋白表达及磷酸化吸光度值均明显低于对照组 ($P < 0.05$),而 PKC α 激动剂组、PKC ϵ 激动剂组却明显高于缺氧 2 h 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图 1。

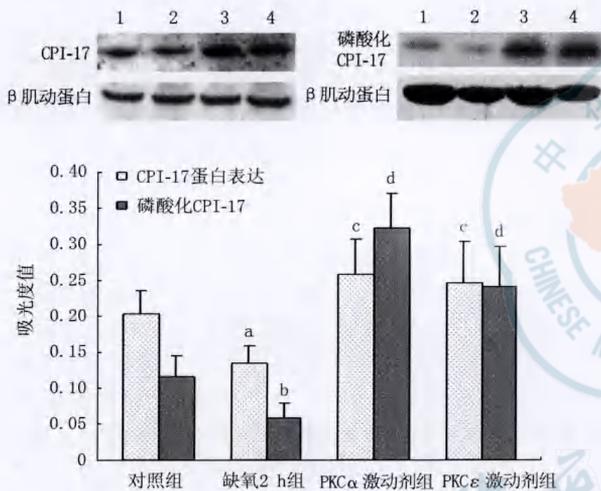


图 1 各组血管平滑肌细胞 CPI-17 蛋白表达和磷酸化情况。上图为电泳图,1~4 分别为对照组、缺氧 2 h 组、蛋白激酶(PK)C α 激动剂组、PKC ϵ 激动剂组;下图为半定量分析图,与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与缺氧 2 h 组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$

3 讨论

研究表明,严重创伤或休克后血管低反应性的发生主要有受体失敏和 VSMC 膜超极化 2 种机制^[1]。本实验室前期研究提出了休克后血管低反应性发生的钙失敏机制^[3]。PKC 对失血性休克后血管反应性和钙敏感性有重要的调节作用。且在众多 PKC 亚型中,PKC α 、PKC ϵ 可通过调节 VSMC 钙敏感性,调节失血性休克大鼠血管反应性。

CPI-17 是一种平滑肌特异的磷蛋白,在猪主动脉中它可经 PKC 磷酸化苏氨酸(Thr)38 位点而活化,活化后的 CPI-17 发生构象变化,结合到肌球蛋白轻链磷酸酶(MLCP)的催化亚基上而抑制 MLCP,

活化后的 CPI-17 对 MLCP 的抑制作用增强,如同一个分子开关,启动 Ca²⁺ 浓度不变情况下的 MLCP 抑制、钙敏感性增高和血管收缩^[7]。在失血性休克的血管平滑肌中,CPI-17 是否经 PKC α 、PKC ϵ 磷酸化而活化,从而介导 PKC 对休克钙失敏的调节,尚鲜见文献报道。本实验结果观察到,抑制 CPI-17 后,PKC α 、PKC ϵ 激动剂促进休克 SMA 对 Ca²⁺ 收缩反应性的作用显著降低,说明 PKC α 、PKC ϵ 可能通过 CPI-17 调节失血性休克血管的钙敏感性。CPI-17 的 Thr38 位点是决定 CPI-17 活性的重要位点,可在 PKC 等激酶分子的作用下磷酸化,并引起 CPI-17 的活性显著增高和平滑肌的收缩^[7]。本实验结果表明,缺氧 2 h 的 VSMC 中 CPI-17 蛋白和 Thr38 位点磷酸化水平均降低,PKC α 、PKC ϵ 激动剂可促进缺氧后的 CPI-17 蛋白表达,增高 Thr38 位点磷酸化水平,说明 PKC α 、PKC ϵ 可能通过调节 CPI-17 的蛋白表达和活性来调节失血性休克后的血管钙敏感性。

由于缺乏 CPI-17 的选择性抑制剂,我们将 SMA 的一级分支微血管环褪膜,使其对大分子物质的通透性增高,再加入 CPI-17 的封闭抗体以抑制其活性。有研究观察到,在常用的几种褪膜剂中,用 Triton X-100 褪膜的平滑肌对 Ca²⁺ 失去了收缩反应,而未褪膜的和用 α 毒素、 β 七叶皂甙褪膜的平滑肌依然具有对 Ca²⁺ 的收缩反应性。蛋白质印迹法检测可见,在用 Triton X-100 褪膜的平滑肌中,几乎不能检测到 CPI-17 蛋白表达,而用 α 毒素、 β 七叶皂甙褪膜对 CPI-17 蛋白表达的检测影响较小^[8]。所以我们选用了 β 七叶皂甙进行褪膜。

参考文献

- [1] 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.中国病理生理杂志,2002,18(11):1425-1426.
- [2] Liu LM, Ward JA, Dubick AM. Hemorrhage-induced vascular hyporeactivity to norepinephrine in select vasculatures of rats and the roles of nitric oxide and endothelin. Shock, 2003, 19(3):208-214.
- [3] Xu J, Liu L. The role of calcium desensitization in vascular hyporeactivity and its regulation after hemorrhagic shock in the rat. Shock, 2005, 23(6):576-581.
- [4] 徐竟,杨光明,李涛,等.蛋白激酶 C ϵ 对失血性休克大鼠血管反应性和钙敏感性的调节作用.中国危重病急救医学,2008,20(3):138-141.
- [5] 张媛,刘良明.低血容量休克大鼠缺氧诱导因子 1 α 的表达及其在血管低反应性发生中的作用.中华烧伤杂志,2006,22(5):343-347.
- [6] Li T, Liu L, Liu JC, et al. Mechanisms of Rho kinase regulation of vascular reactivity following hemorrhagic shock in rats. Shock, 2008, 29(1):65-70.
- [7] Kitazawa T, Eto M, Woodsome TP, et al. Agonists trigger G pro-

tein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility. J Biol Chem, 2000, 275(14):9897-9900.

[8] Kitazawa T, Takizawa N, Ikebe M, et al. Reconstitution of protein kinase C-induced contractile Ca²⁺ sensitization in triton X-100-de-

membranated rabbit arterial smooth muscle. J Physiol, 1999, 520 (Pt1):139-152.

(收稿日期:2008-07-18)
(本文编辑:张红)

· 经验交流 ·

严重烧伤致周围神经损伤 14 例

梁钢 孙建平 孟朝晖 姜玉兰 张庆洋

1 临床资料

2003 年 1 月—2008 年 9 月,笔者单位收治烧伤致周围神经受损患者 14 例,其中男 9 例、女 5 例,年龄 19 ~ 54 岁。致伤原因:电烧伤 7 例、热压伤 7 例。烧伤总面积 0.1% ~ 0.4% TBSA,均为 IV 度。单纯肘部尺神经损伤 3 例、腕部尺神经损伤 5 例、腕部正中神经损伤 4 例,腕部尺神经与正中神经均受损 2 例。本组患者初诊时确诊 8 例;初诊时漏诊或误诊 6 例,其中 2 例于 2 ~ 3 d 后复诊时确诊,4 例于 2 ~ 3 周后因创面感染再次就诊时确诊。术前神经功能情况:早期确诊的 10 例患者运动功能为 M₁ ~ M₃ 级,感觉功能为 S₀ ~ S₃ 级,肌电图显示静息时自发电位增多、收缩时出现运动单位电位时限与波幅异常等,且神经传导速度均减慢。晚期确诊的 4 例患者运动功能为 M₀ ~ M₁ 级,感觉功能为 S₀ ~ S₁ 级,肌电图检查结果较早期确诊患者明显异常,神经传导速度减慢甚至传导消失。术中见早期确诊的 10 例患者均存在不同程度的神经变性,但无明显坏死改变;晚期确诊的 4 例患者因创面感染导致神经不同程度坏死。

2 治疗方法及结果

(1)早期扩创 I 期修复组:对 10 例早期确诊患者中的 7 例,确诊 1 ~ 2 d 后行扩创、保留变性神经并切开外膜,行 I 期组织瓣修复。(2)多次扩创延迟修复组:对余下 3 例早期确诊患者,行多次扩创、保留变性神经并切开外膜,延迟行 I 期组织瓣修复。(3)留待 II 期修复组:对 4 例晚期确诊患者, I 期扩创、组织瓣修复后,受损神经留待 II 期修复(神经游离移植或功能重建)。

II 期功能重建:多次扩创延迟修复组中 1 例患者行拇外展、对指功能重建,留待 II 期修复组中 1 例患者行爪形手畸形功能重建。

本组患者术后随访 6 个月 ~ 3 年。按英国医学研究会感觉、运动评价标准,结合临床所划分的优(M₄S₃级以上)、良(M₃S₃级)、可(M₂S₂级)、差(M₁S₁级)4 个等级^[1]来评价疗效。术后随访,患者肌电图表现为自发电位逐渐减少至消失,并逐渐出现新生电位、复型电位及再生电位等,其恢复时间较运动及感觉功能的临床表现恢复时间早 2 ~ 3 个月。多次扩创延迟修复组与留待 II 期修复组共 7 例患者中,除 2 例患者分别于术后 1 年、13 个月行功能重建并恢复了一定功能外,其余 5 例患者因故未能行 II 期修复,以致遗留严重功能障碍甚至残疾。本组患者术后神经功能恢复情况见表 1。

3 讨论

热压伤是一种复合伤,除皮肤软组织热力烧伤外,往往合并神经等组织的挤压伤、挫裂伤,可继发坏死及进行性坏死,其损伤范围较电烧伤局限且程度略轻。尽管神经电烧伤与热压伤的致伤机制、损伤范围及程度不同,但两者的相似之处在于:对虽已烧损变性但仍存在解剖连续性的神经,早期扩创后立即应用血供丰富的组织瓣修复,将有利于其再生修复^[2];若处理不当则将使烧损变性的神经发生坏死。从本组资料可以看出,行早期扩创 I 期修复的患者功能恢复最满意,而行多次扩创延迟修复与留待 II 期修复的患者功能恢复较差,后者若能行 II 期处理也有望恢复一定功能。遗憾的是,本组应行 II 期修复的患者大多因故未能接受该治疗。

对本组患者的诊治,笔者体会如下:(1)如果接诊医师提高警惕,掌握常见周围神经损伤的诊断要点,可避免漏诊、误诊。(2)应充分发挥神经电生理检查的独特优势,为周围神经损伤的诊治提供客观依据^[3]。(3)早期扩创 I 期修复,是保留并恢复神经功能的较佳方法。(4)对 I 期修复后功能恢复较差或留待 II 期修复患者,应告知其 II 期处理的重要性、时间及方法等,以使患者能如期来院接受治疗,不致失去救治机会。

参考文献

[1] 李峰,穆广志,俞玮,等. 外周神经损伤的显微外科修复. 中华显微外科杂志, 2004, 27(1):27-29.
[2] 黎鳌,杨宗城. 黎鳌烧伤学. 上海:上海科学技术出版社, 2001:179-214.
[3] 张华. 肌电图在周围神经损伤诊断中的应用价值. 临床神经电生理学杂志, 2007, 16(2):74-77.

(收稿日期:2008-09-08)
(本文编辑:罗勤 谢秋红)

表 1 14 例患者术后神经功能恢复情况

| 组别 | 例数 | 神经功能 | | | | 优良率 (%) |
|-------------|----|------|------|------|------|---------|
| | | 优(例) | 良(例) | 可(例) | 差(例) | |
| 早期扩创 I 期修复组 | 7 | 3 | 3 | 1 | 0 | 85.7 |
| 多次扩创延迟修复组 | 3 | 0 | 1* | 0 | 2 | 33.3 |
| 留待 II 期修复组 | 4 | 0 | 1* | 0 | 3 | 25.0 |
| 合计 | 14 | 3 | 5 | 1 | 5 | 57.1 |

注:“*”表示该例患者行 II 期功能重建