

研究论文

阻断肠淋巴液回流提高休克大鼠血管钙敏感性的作用与蛋白激酶C有关

牛春雨*, 赵自刚, 魏艳玲, 张玉平, 张静

河北北方学院微循环研究所, 基础医学院病理生理学教研室, 张家口 075000

摘要: 本研究旨在观察蛋白激酶C (protein kinase C, PKC)是否参与了肠淋巴管结扎或肠淋巴液引流对失血性休克大鼠血管钙敏感性的调节作用。Wistar雄性大鼠分为假手术组(Sham)、失血性休克组(Shock)、休克+肠淋巴管结扎组(Shock+Ligation, 休克手术前行肠淋巴管结扎)、休克+肠淋巴液引流组(Shock+Drainage, 休克手术前行肠淋巴液引流), 在休克3 h时间点, 分离出肠系膜上动脉(superior mesenteric artery, SMA)组织, 检测PKC蛋白水平与磷酸化PKC (p-PKC)活性; 制备SMA血管环, 检测各组SMA血管环对梯度 $[Ca^{2+}]$ 的敏感性, 其指标包括收缩性、最大收缩力(E_{max})和50%最大反应时的 $[Ca^{2+}]$ 负对数(pD_2), 另取Shock+Ligation与Shock+Drainage组SMA血管环分别与PKC调节剂PMA和Staurosporine孵育后, 观察钙敏感性变化。结果显示, Shock组SMA的PKC水平、p-PKC活性、对梯度 $[Ca^{2+}]$ 的收缩性均显著低于Sham组, 而Shock+Ligation组与Shock+Drainage组的以上指标均显著高于Shock组。PKC激动剂PMA提高了Shock+Ligation和Shock+Drainage组大鼠SMA血管环对梯度 $[Ca^{2+}]$ 的收缩性与 E_{max} 值; 而PKC抑制剂Staurosporine则显著降低了Shock+Ligation和Shock+Drainage组大鼠SMA血管环对梯度 $[Ca^{2+}]$ 的收缩性和 E_{max} 值。以上结果提示, PKC参与了阻断肠淋巴液回流对休克大鼠血管钙敏感性的增强作用。

关键词: 失血性休克; 钙敏感性; 蛋白激酶C; 肠淋巴管; 结扎术; 肠淋巴液; 引流术

中图分类号: R364.1+4; R331.4; R331.3+2

Involvement of protein kinase C in enhancement of vascular calcium sensitivity by blocking mesenteric lymph return in hemorrhagic shock rats

NIU Chun-Yu*, ZHAO Zi-Gang, WEI Yan-Ling, ZHANG Yu-Ping, ZHANG Jing

Institute of Microcirculation, Department of Pathophysiology of Basic Medical Institute, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China

Abstract: The aim of the present study was to investigate whether protein kinase C (PKC) was involved in the effect of mesenteric lymph duct ligation or mesenteric lymph drainage on vascular calcium sensitivity in hemorrhagic shock rats. Male Wistar rats were randomly divided into Sham, Shock (hemorrhagic shock), Shock+Ligation (mesenteric lymph duct ligation plus shock) and Shock+Drainage (mesenteric lymph drainage plus shock) groups. After being in shock (hypotension 40 mmHg) for 3 h, the tissue of superior mesenteric artery (SMA) was taken out for detecting the PKC expression and phospho-PKC (p-PKC) activity, and the vascular rings of SMA were prepared and used to measure the response to gradient calcium concentration for assaying the calcium sensitivity, the parameters of which including tension, maximum tension (E_{max}) and negative logarithm of EC_{50} , called the pD_2 . Other vascular rings from Shock+Ligation and Shock+Drainage groups were incubated with PKC regulator PMA or Staurosporine before the measurement of calcium sensitivity. The results showed that, PKC expression, p-PKC activity and calcium sensitivity of SMA in Shock group was significantly lower than that of Sham group, whereas the above-mentioned indexes were significantly elevated in

Received 2011-08-05 Accepted 2011-12-06

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30971203).

*Corresponding author. Tel: +86-313-4029168; E-mail: ncylxf@126.com

Shock+Ligation and Shock+Drainage groups compared with those in Shock group. PKC agonist PMA enhanced the contractile activity of vascular rings to gradient calcium ions, and increased $E_{\max}$ of SMA in Shock+Ligation and Shock+Drainage groups. On the contrary, PKC inhibitor Staurosporine significantly decreased the response to gradient calcium ions and $E_{\max}$ of SMA in Shock+Ligation and Shock+Drainage groups. These results suggest that PKC plays a role in the improvement of vascular calcium sensitivity by blockade of mesenteric lymph return in hemorrhagic shock rats.

Key words: hemorrhagic shock; calcium sensitivity; protein kinase C; mesenteric lymph duct; ligation; mesenteric lymph; drainage

血管低反应性是休克难治的重要因素^[1, 2], 血管平滑肌细胞钙敏感性下降是导致血管低反应性的原因之一^[3–5], 蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 是丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶家族的成员^[6, 7], 可提高休克大鼠血管钙敏感性, 参与休克后血管反应性的调控^[5, 8, 9]。休克时肠淋巴液回流是加重器官损伤的重要因素^[10, 11], 以肠淋巴管结扎或肠淋巴液引流阻断休克时肠淋巴液回流, 均可提高失血性休克大鼠的血管反应性, 其机制与提高血管钙敏感性有关^[12]。鉴于 PKC 在血管钙敏感性中的调节作用, 本研究旨在观察 PKC 在阻断肠淋巴液回流提高休克大鼠血管钙敏感性中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组 SPF 级 Wistar 雄性大鼠 90 只, 体重 260~320 g (中国医学科学院实验动物繁殖中心提供)。所有大鼠实验前 12 h 禁食、自由饮水, 随机分为假手术组 (Sham, $n = 21$)、失血性休克组 (Shock, $n = 21$)、休克 + 肠淋巴管结扎组 (Shock+Ligation, $n = 24$)、休克 + 肠淋巴液引流组 (Shock+Drainage, $n = 24$)。

1.2 动物实验方法 大鼠肌肉注射 1% 戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 全身麻醉后, 分离右侧股动脉和股静脉, 股动脉插三通管, 一端连接 RM6240BD 型生物信号采集系统 (成都仪器厂), 用于监测平均动脉血压 (mean artery pressure, MAP), 另一端用于放血, 股静脉插管用于肝素化抗凝 (500 U/kg); 行腹部手术, 仔细分离肠淋巴管 (mesentery lymph duct, MLD) 与肠系膜上动脉 (superior mesenteric artery, SMA); 术后稳定 30 min, 10 min 内放血使 MAP 降至 40 mmHg, 维持 3 h, 复制大鼠重症休克模型^[13]。Shock + Ligation 组与 Shock+Drainage 组分别于放血前常规方法行肠淋巴管结扎术和肠淋巴液引流术, Sham 组和 Shock 组只在 MLD 下穿线不结扎^[12]。

1.3 SMA 组织留取与蛋白检测 Shock 组、Shock + Ligation 组与 Shock+Drainage 组动物在维持低血压

3 h 后、Sham 组动物在相应时间点 (每组 15 只), 迅速留取 SMA, 长约 5~8 mm, 清除血管周围脂肪结缔组织, 留取血管组织, 置 -70°C 冰箱保存。

每组取 9 条 SMA 用于蛋白质检测, 应用蛋白提取试剂盒 (北京康为世纪) 提取蛋白, 每 3 条血管中提取出的蛋白合并为 1 个样品, 采用 BCA 方法进行蛋白定量; 总蛋白经 SDS-PAGE 分离后, 转移至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉封闭 1.5 h, 随后加入抗 PKC 抗体 (1:2 000, Abcam, 美国)、室温孵育 30 min 后 4°C 过夜, 用 TBST 漂洗 5 次, 加入相应二抗, 室温孵育 40 min, 漂洗 5 次, ECL 显影后, 进行灰度分析。

将保存的每组 6 条 SMA, 用液氮将组织研碎呈粉末状后移入 EP 管中, 加入组织细胞裂解液, 应用超声波细胞破碎仪破碎组织 15 min 后, 应用 Labofuge 400R 型低温高速离心机 (德国科峻) 在 4°C 、14 000 g 离心 5 min, 保存上清。应用磷酸化 PKC (p-PKC) ELISA 检测试剂盒 (美国 BD) 测定 SMA 组织 p-PKC 活性。SMA 组织匀浆蛋白以考马斯亮蓝法定量 (南京建成)。

1.4 离体血管环制备与钙敏感性观察 各组大鼠在休克 3 h 后, 迅速留取 SMA、清除血管周围脂肪结缔组织后, 制备 SMA 血管环, 每根长约 2~3 mm; Sham 与 Shock 组每只动物制备 1 根血管环, 进行钙敏感性测定, 方法: 将 SMA 血管环挂于四腔离体血管器官灌流系统 (成都仪器厂) 的浴槽中, 一端固定于槽底部, 另一端通过张力换能器与生物信号采集系统相连, 浴槽内液体为 5 mL 37°C 的 K-H 液 (NaCl 118 mmol/L、KCl 4.7 mmol/L、 MgSO_4 1.2 mmol/L、 NaHCO_3 25 mmol/L、 KH_2PO_4 1.2 mmol/L、 CaCl_2 2.5 mmol/L、葡萄糖 11 mmol/L、pH 7.3~7.4), 持续充入 95% O_2 和 5% CO_2 混合气体; 孵育 1.5 h 后换高钾液 (NaCl 2.7 mmol/L、KCl 120 mmol/L、 MgSO_4 1.2 mmol/L、 NaHCO_3 25 mmol/L、 KH_2PO_4 1.2 mmol/L、葡萄糖 11 mmol/L、pH 7.3~7.4) 孵育 15 min; 待张力曲线稳定后, 以浓度累积法依

次加入不同浓度的 Ca^{2+} ，使浴槽内 Ca^{2+} 终浓度依次为 3×10^{-5} 、 1×10^{-4} 、 3×10^{-4} 、 1×10^{-3} 、 3×10^{-3} 、 1×10^{-2} 、 3×10^{-2} mol/L，记录同一 Ca^{2+} 浓度下血管环的最大收缩力变化 (g)。实验结束后，称取血管环重量 (mg)，以 g/mg 为量化标准，制作量效曲线，用曲线拟合法求 Ca^{2+} 的半数有效浓度 (EC_{50})，用达到 50% 最大反应时的 $[\text{Ca}^{2+}]$ 负对数 pD_2 ($-\lg[\text{EC}_{50}]$) 和不同 Ca^{2+} 浓度下血管环产生的最大收缩力 ($E_{\max}$) 以及量效曲线评价血管的钙敏感性^[12, 14]。

Shock+Ligation 组与 Shock+Drainage 组的每只动物制备 2 根 SMA 血管环，每组共 18 根血管环。其中：来源于不同动物的 6 根 SMA 血管环不做预处理，按前述方法观察钙敏感性；其余每组各 12 根 SMA 血管环与高钾液孵育 15 min、待张力曲线稳定后，其中 6 根与 PKC 激动剂佛波醇 12-豆蔻酸 13-乙酸酯 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA, 瑞士 Alexis, 终浓度为 $0.1 \mu\text{mol/L}$) 孵育 10 min，作为 Shock+Ligation+PMA 组或 Shock+Drainage+PMA 组；余下的 6 根血管与 PKC 抑制剂星状孢子素 (Staurosporine, 瑞士 Alexis, 终浓度为 100 nmol/L) 孵育 10 min，作为 Shock+Ligation+Staurosporine 组或 Shock+Drainage+Staurosporine 组，按前述方法，观察钙敏感性。

1.5 统计学分析 数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示，采用 SPSS 16.0 统计软件包进行方差齐性检验，方差齐 ($P > 0.10$) 的资料多组间比较采用单因素方差分析，方差不齐 ($P \leq 0.10$) 的资料采用 Kruskal Wallis 检验， $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肠淋巴管结扎或肠淋巴液引流对血管组织 PKC 蛋白表达与 p-PKC 活性的影响

Shock 组 SMA 血管组织 PKC 蛋白表达与 p-PKC 活性显著低于 Sham 组 ($P < 0.01$)；Shock + Ligation 组和 Shock+Drainage 组血管组织 PKC 蛋白表达与 p-PKC 活性显著高于 Shock 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，但两组的 PKC 蛋白表达仍低于 Sham 组 ($P < 0.05$) (图 1、2)。

2.2 PKC 在肠淋巴管结扎提高失血性休克大鼠血管钙敏感性中的作用

Shock 组 SMA 血管环在各梯度 $[\text{Ca}^{2+}]$ 条件下的收缩性、 $E_{\max}$ 值、 pD_2 显著低于 Sham 组 ($P < 0.01$)；Shock+Ligation 组 SMA 血管环对各梯度 $[\text{Ca}^{2+}]$ 的收

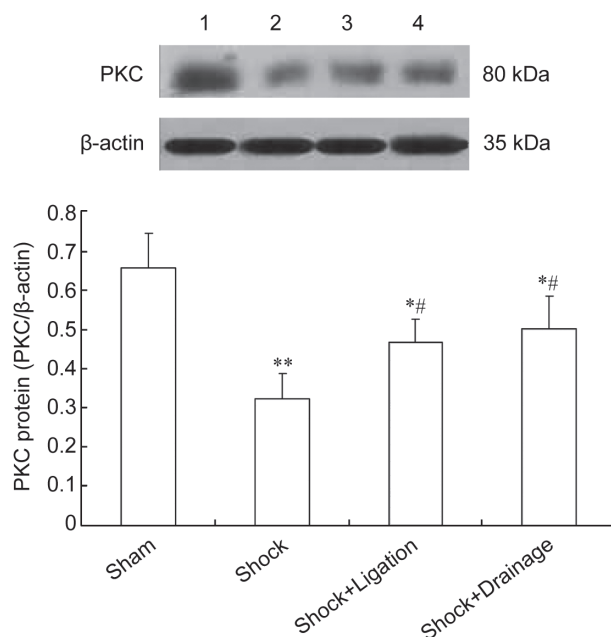


图 1. 肠淋巴管结扎或肠淋巴液引流对失血性休克大鼠肠系膜上动脉组织 PKC 的影响

Fig. 1. Effects of mesenteric lymph duct ligation or mesenteric lymph drainage on PKC protein expression in superior mesenteric artery (SMA) tissue in hemorrhagic shock rats detected by Western blot. 1, Sham; 2, Shock; 3, Shock+Ligation; 4, Shock+Drainage. Mean $\pm$ SD, $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Sham; # $P < 0.05$ vs Shock.

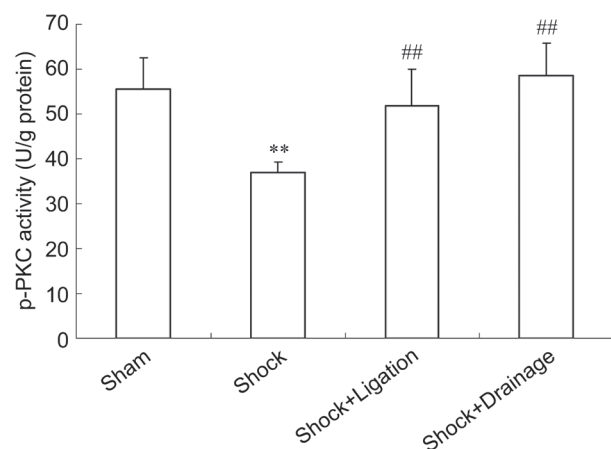


图 2. 肠淋巴管结扎或肠淋巴液引流对失血性休克大鼠肠系膜上动脉组织 p-PKC 活性的影响

Fig. 2. Effects of mesenteric lymph duct ligation or mesenteric lymph drainage on p-PKC activity in superior mesenteric artery (SMA) tissue in hemorrhagic shock rats detected by ELISA assay. Mean $\pm$ SD, $n = 6$. ** $P < 0.01$ vs Sham; # $P < 0.01$ vs Shock.

缩性、 $E_{\max}$ 值显著高于 Shock 组 ($P < 0.01$), 但对梯度 $[Ca^{2+}]$ (自 1×10^{-4} mol/L 起) 的收缩性、 $E_{\max}$ 值仍低于 Sham 组 ($P < 0.01$)。Shock+Ligation 组 SMA 血管环与 PKC 激动剂 PMA 孵育后, 其对梯度 $[Ca^{2+}]$ 的收缩性 (除 $[Ca^{2+}]$ 为 3×10^{-5} mol/L 外)、 $E_{\max}$ 值均显著高于 Shock 组; 对 Ca^{2+} (除浓度为 3×10^{-5} 、 1×10^{-4} mol/L 外) 的收缩性、 $E_{\max}$ 值显著高于 Shock+Ligation 组; 且对 Ca^{2+} (除浓度为 3×10^{-3} 、 1×10^{-2} 、 3×10^{-2} mol/L 外) 的收缩性及 pD_2 显著低于 Sham 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。Shock+Ligation 组 SMA 血管环经 PKC 抑制剂 Staurosporine 孵育后, 其对梯度 $[Ca^{2+}]$ 的收缩性、 $E_{\max}$ 值均显著低于 Sham 组、Shock+Ligation 组 (除 $[Ca^{2+}]$ 为 3×10^{-5} mol/L 外)、Shock+Ligation+PMA 组 ($P < 0.01$), 与 Shock 组无

统计学差异 ($P > 0.05$) (图 3、表 1)。

2.3 PKC在肠淋巴液引流提高失血性休克大鼠血管钙敏感性中的作用

如图 4、表 2 所示, Shock+Drainage 组 SMA 血管环对梯度 $[Ca^{2+}]$ (自 1×10^{-4} mol/L 起) 的收缩性、 $E_{\max}$ 值显著高于 Shock 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 但对各浓度 Ca^{2+} 的收缩性、 $E_{\max}$ 值、 pD_2 仍显著低于 Sham 组 ($P < 0.01$); Shock+Drainage 组 SMA 血管环与 PKC 激动剂 PMA 孵育后, 其对梯度 $[Ca^{2+}]$ 的收缩性、 $E_{\max}$ 值显著高于 Shock 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 对 Ca^{2+} (浓度为 3×10^{-4} 、 1×10^{-3} 、 3×10^{-3} 、 1×10^{-2} mol/L 时) 的收缩性、 $E_{\max}$ 值显著高于 Shock+Drainage 组 ($P < 0.01$), 对 Ca^{2+} (浓度为 3×10^{-5} 、 1×10^{-4} 、 3×10^{-4} mol/L 时) 的收缩性、 pD_2 低于 Sham

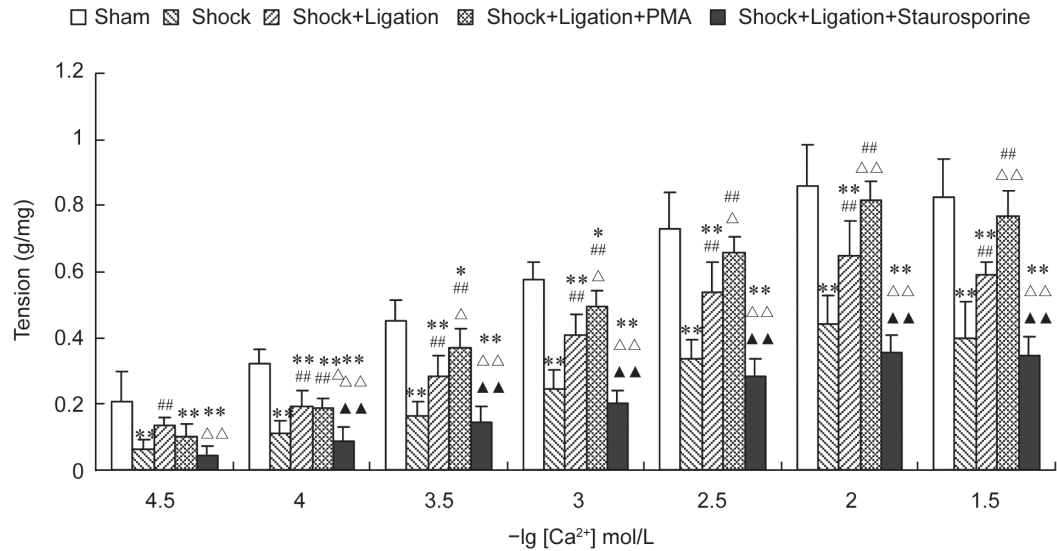


图 3. PKC参与肠淋巴管结扎对失血性休克大鼠血管钙敏感性的调节作用
Fig. 3. Involvement of PKC in the regulation of mesenteric lymph duct ligation on vascular calcium sensitivity in hemorrhagic shock rats. Mean $\pm$ SD, $n = 6$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Sham; ### $P < 0.01$ vs Shock; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Shock+Ligation; $\blacktriangle P < 0.01$ vs Shock+Ligation+PMA.

表 1. 梯度 $[Ca^{2+}]$ 所引起的各组大鼠肠系膜上动脉血管环 $E_{\max}$ 和 pD_2

Group	$E_{\max}$ (g/mg)	pD_2
Sham	0.87 ± 0.12	3.59 ± 0.11
Shock	$0.44 \pm 0.09^{**}$	$3.30 \pm 0.22^{**}$
Shock+Ligation	$0.66 \pm 0.10^{**\#}$	3.43 ± 0.15
Shock+Ligation+PMA	$0.82 \pm 0.06^{\#\Delta\Delta}$	$3.33 \pm 0.05^{**}$
Shock+Ligation+Staurosporine	$0.37 \pm 0.06^{**\Delta\Delta\blacktriangle}$	$3.27 \pm 0.14^{**}$

Mean $\pm$ SD, $n = 6$. ** $P < 0.01$ vs Sham; ### $P < 0.01$ vs Shock; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Shock+Ligation; $\blacktriangle P < 0.01$ vs Shock+Ligation+PMA.

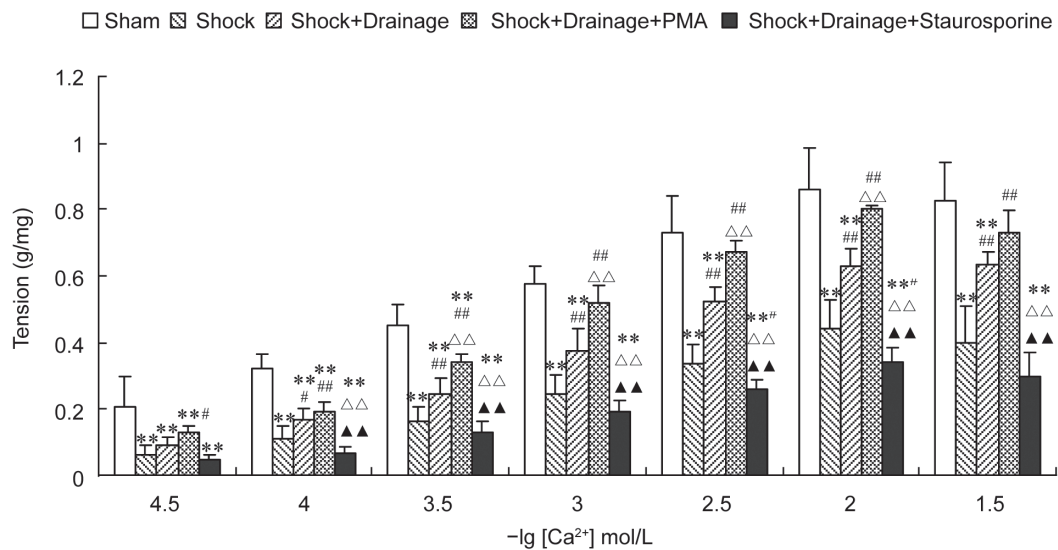


图 4. PKC参与肠淋巴液引流对失血性休克大鼠血管钙敏感性的调节作用

Fig. 4. Involvement of PKC in the regulation of mesenteric lymph drainage on vascular calcium sensitivity in hemorrhagic shock rats. Mean $\pm$ SD, $n = 6$. ** $P < 0.01$ vs Sham; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs Shock; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Shock+Drainage; $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ vs Shock+Drainage+PMA.

表 2. 梯度 $[Ca^{2+}]$ 所引起的各组大鼠肠系膜上动脉血管环 E_{max} 和 pD_2

Group	E_{max} (g/mg)	pD_2
Sham	0.87 ± 0.12	3.59 ± 0.11
Shock	$0.44 \pm 0.09^{**}$	$3.30 \pm 0.22^{**}$
Shock+Drainage	$0.66 \pm 0.05^{***\#}$	$3.28 \pm 0.08^{**}$
Shock+Drainage+PMA	$0.80 \pm 0.01^{\#\Delta\Delta}$	$3.39 \pm 0.07^*$
Shock+Drainage+Staurosporine	$0.35 \pm 0.05^{**\#\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle}$	$3.26 \pm 0.16^{**}$

Mean $\pm$ SD, $n = 6$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Sham; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs Shock; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Shock+Drainage; $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ vs Shock+Drainage+PMA.

组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) ; Shock+Drainage 组 SMA 血管环与 PKC 抑制剂 Staurosporine 孵育后, 其对梯度 $[Ca^{2+}]$ 的敏感性、 E_{max} 值均显著低于 Sham 组、Shock+Drainage 组 (除 Ca^{2+} 浓度为 3×10^{-5} mol/L 外)、Shock+Drainage+PMA 组 (除 Ca^{2+} 浓度为 3×10^{-5} mol/L 外), pD_2 显著低于 Sham 组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 在 Ca^{2+} 浓度为 3×10^{-3} 、 1×10^{-2} mol/L 时的收缩性、 E_{max} 值低于 Shock 组 ($P < 0.05$)。

3 讨论

针对重症休克时血管低反应性发生机制的研究显示, 血管收缩性的高低不仅取决于血管平滑肌细胞内 $[Ca^{2+}]$, 而且与钙的有效利用有着密切的关系; 休克晚期血管平滑肌细胞内存在钙超载, 并非低钙,

说明钙敏感性降低参与了血管低反应性的形成^[3,4]。本文在已证实肠淋巴液回流参与了失血性休克时血管低反应性与钙失敏^[12]的基础上, 观察到失血性休克大鼠 SMA 组织 PKC 蛋白表达及 p-PKC 活性降低, 而肠淋巴管结扎或肠淋巴液引流均可提高 SMA 组织 PKC 的蛋白表达与 p-PKC 活性, 提示阻断肠淋巴液回流提高失血性休克大鼠血管钙敏感性的机制可能与 PKC 有关。

本实验结果显示, 肠淋巴管结扎或肠淋巴液引流阻断肠淋巴液回流均提高了休克大鼠血管的钙敏感性, PKC 激动剂 PMA 不同程度地增强该作用, 提高了两组大鼠 SMA 血管环对梯度 $[Ca^{2+}]$ (尤其是较高浓度) 的收缩力与 E_{max} 值; 而 PKC 拮抗剂 Staurosporine 则抑制了这种作用, 使 SMA 血管环

对梯度 $[Ca^{2+}]$ 的收缩力、 E_{max} 值降低至 Shock 组水平, 甚至更低; 这表明 PKC 在阻断肠淋巴液回流提高失血性休克大鼠血管钙敏感性中发挥一定的作用。当然, 在体应用 PKC 激动剂能否改善失血性休克动物的整体状况以及血流状态, 还有待进一步观察。对于 PKC 提高血管反应性的机制, 有研究显示, PKC 可通过抑制肌球蛋白轻链磷酸酶 (myosin light chain phosphatase, MLCP) 活性, 提高肌球蛋白轻链 (20-kD myosin light chain, MLC20) 磷酸化水平, 进而提高血管钙敏感性, 该作用与整联蛋白连接激酶相关, 且参与血管升压素提高血管反应性的作用^[15–17], 而 PKC 在阻断肠淋巴液回流提高休克大鼠血管钙敏感性中具体的作用机制还有待进一步探讨。

本实验结果亦显示, PKC 特异性激动剂与拮抗剂均未显著影响肠淋巴管结扎或肠淋巴液引流组大鼠的 pD_2 , 提示在阻断肠淋巴液回流提高休克大鼠血管钙敏感性的过程中, 还存在除 PKC 以外的因素在发挥作用。有研究表明, Rho 激酶、PKC 在血管舒缩调节中存在交互作用^[18]; 本实验中 PMA 提高 SMA 血管环对梯度 $[Ca^{2+}]$ 的收缩反应性体现在几个较高的 $[Ca^{2+}]$ 上, 这与我们前期研究发现 Rho 激酶激动剂血管紧张素 II 提高 SMA 血管环对梯度 $[Ca^{2+}]$ 的收缩反应性体现在较低 $[Ca^{2+}]$ 上的结果^[19] 不同, 表明 Rho 激酶、PKC 可能在阻断肠淋巴液回流提高休克大鼠血管钙敏感性中的作用有所不同, 还需要进一步观察。

同时, 本研究显示, 肠淋巴管结扎对休克大鼠 SMA 血管环 pD_2 提高作用不明显, 而肠淋巴液引流组 pD_2 仍低于 Sham 组, 表明肠淋巴管结扎提高血管钙敏感性的作用要强于肠淋巴液引流, 其机制是否与肠淋巴液引流减少部分容量有关, 还是有其它原因, 目前还不清楚; 这也提示除了肠淋巴液外, 休克后血管钙敏感性降低还存在其它因素的作用。

应当指出, PKC 属于丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶家族^[20], PMA 是甘油二酯类似物, 其进入细胞后首先激活 PKC, 有研究显示, PMA 作用于体外培养的肝癌 CRBH7919 细胞 10 min 后即可发挥激活磷脂酶 D 的作用^[21]; Staurosporine 是一种从链霉菌属分离出来的化合物, 可在纳摩尔浓度范围特异性抑制 PKC 的活性, 研究显示, Staurosporine 增强体外培养的肺动脉平滑肌细胞外信号调节激酶 (ERK1/2) 的磷酸化水平的最大激活作用出现在孵育 10 min 时^[22], 故本研究结合文献^[15, 16] 报道的方

法, 在 SMA 与 PMA 或 Staurosporine 分别孵育 10 min 后, 证实了 PKC 参与阻断肠淋巴液回流对失血性休克大鼠血管钙敏感性的增强作用。

参考文献

- 1 Zhao KS, Huang X, Liu J, Huang Q, Jin C, Jiang Y, Jin J, Zhao G. New approach to treatment of shock-restitution of hyporeactivity. *Shock* 2002; 18(2): 189–192.
- 2 Kai L (开丽), Hu DY, Wang ZF, Shi YL, Liu LM. Hemorrhagic shock induces changes in large-conductance Ca^{2+} dependent K^{+} channel activity in mesenteric arterial smooth muscle cells of rats. *Acta Physiol Sin* (生理学报) 2001; 53(4): 291–295 (Chinese, English abstract).
- 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 Sandoval RJ, Injeti ER, Gerthoffer WT, Pearce WJ. Postnatal maturation modulates relationships among cytosolic Ca^{2+} , myosin light chain phosphorylation, and contractile tone in ovine cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293(4): H2183–H2192.
- 5 Xu J (徐亮), Liu LM. The signal transducers involved in the regulation of calcium sensitivity of vascular smooth muscle in hemorrhagic shock. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志) 2006; 22(5): 896–899 (Chinese, English abstract).
- 6 Xu AX (许爱霞), Zheng LP, Tang DF, Du XY, Wen XM, Zheng YH. Role of MAPK and PKC signaling pathways in the regulation of c-erbB₂ in the primordial follicles onset. *Acta Physiol Sin* (生理学报) 2009; 61(5): 439–444 (Chinese, English abstract).
- 7 He YP, Zhao LY, Zheng QS, Liu SW, Zhao XY, Lu XL, Niu XL. Arginine vasopressin stimulates proliferation of adult rat cardiac fibroblasts via protein kinase C-extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway. *Acta Physiol Sin* (生理学报) 2008; 60(3): 333–340.
- 8 Yang G, Li T, Xu J, Liu L. PKC plays an important mediated effect in arginine vasopressin induced restoration of vascular responsiveness and calcium sensitization following hemorrhagic shock in rats. *Eur J Pharmacol* 2010; 628(1–3): 148–154.
- 9 Fang Y, Li T, Fan X, Zhu Y, Liu L. Beneficial effects of activation of PKC on hemorrhagic shock in rats. *J Trauma* 2010; 68(4): 865–873.
- 10 Deitch EA. Gut lymph and lymphatics: a source of factors leading to organ injury and dysfunction. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1207(Suppl 1): E103–E111.
- 11 Fanous MY, Phillips AJ, Windsor JA. Mesenteric lymph: the bridge to future management of critical illness. *JOP* 2007;

- 8(4): 374–399.
- 12 Wei YL (魏艳玲), Niu CY, Zhao ZG, Liu ZQ, Zhang YP, Zhang J. Blockage of mesenteric lymph return promotes the vascular reactivity and calcium sensitivity in hemorrhagic shock rats. *Chin J Pathophysiol (中国病理生理杂志)* 2010; 26(8): 1509–1514 (Chinese, English abstract).
- 13 Peltz ED, Moore EE, Zurawel AA, Jordan JR, Damle SS, Redzic JS, Masuno T, Eun J, Hansen KC, Banerjee A. Proteome and system ontology of hemorrhagic shock: exploring early constitutive changes in postshock mesenteric lymph. *Surgery* 2009; 146(2): 347–357.
- 14 Hu Y, Li T, Tang XF, Chen K, Liu L. Effects of ischemic preconditioning on vascular reactivity and calcium sensitivity after hemorrhagic shock and their relationship to the Rho A–Rho-kinase pathway in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2011; 57(2): 231–239.
- 15 Xu J, Li T, Yang GM, Liu LM. Protein kinase C isoforms responsible for the regulation of vascular calcium sensitivity and their relationship to integrin-linked kinase pathway after hemorrhagic shock. *J Trauma* 2010; 69(5): 1274–1281.
- 16 Li T (李涛), Liu LM, Liu JC. Regulatory effect of protein kinase C and protein kinase G on calcium sensitivity of vascular smooth muscle cells following hemorrhagic shock. *Chin Crit Care med (中国危重病急救医学)* 2007; 19(5): 257–260 (Chinese, English abstract).
- 17 Yang GM (杨光明), Xu J, Li T, Ming J, Chen W, Liu LM. Role of PKC- α and δ isoforms in AVP improved contractile response of VSMC after hypoxia and its relations to MLC20 phosphorylation. *Chin J Pathophysiol (中国病理生理杂志)* 2009; 25(1): 54–58 (Chinese, English abstract).
- 18 Kandabashi T, Shimokawa H, Miyata K, Kunihiro I, Eto Y, Morishige K, Matsumoto Y, Obara K, Nakayama K, Takahashi S, Takeshita A. Evidence for protein kinase C-mediated activation of Rho-kinase in a porcine model of coronary artery spasm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(12): 2209–2214.
- 19 Zhao ZG (赵自刚), Niu CY, Wei YL, Zhang YP, Si YH, Zhang J. Role of Rho kinase in blockading the return of mesenteric lymph to improve vascular calcium sensitivity of hemorrhagic shock rats. *Chin J Pathophysiol (中国病理生理杂志)* 2012; 23(1): 11–15 (Chinese, English abstract).
- 20 Zhong J (钟健), Zhu ZM, Yang YJ. Inhibition of PKC and ERK1/2 in cultured rat vascular smooth muscle cells by angiotensin-(1–7). *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2001; 53(5): 361–363 (Chinese, English abstract).
- 21 Zhu QS (朱全胜), Zhu XL. PMA stimulated hydrolysis of phosphatidylcholine in CRBH7919 cell and its enzymatic basis. *Acta Biochim Biophys Sin (生物化学与生物物理学报)* 1997; 29(6): 553–559 (Chinese, English abstract).
- 22 Zhang JN (张家宁), Chu XJ, Lu CL, Wu CL, Bao HX, Tang XB, Zhu DL. Staurosporine aglycone at high concentration causes ERK1/2 phosphorylation in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报)* 2009; 25(1): 34–38 (Chinese, English abstract).