调节肽在休克发病中的作用

董林旺 常英姿 佟利家 苏静怡 唐朝枢

(北京医科大学病理生理教研室,北京 100083)

摘 要

本文探讨了三种调节肽在休克发病中的作用. 结果表明:(1)败血症休克大鼠血浆内皮素(ET)成倍增加,给健康大鼠持续滴注低剂量ET可致明显的休克表现,而给轻度失血休克大鼠静滴ET,则致休克不可逆,用特异的ET-抗血清治疗休克,具有明显疗效;(2)败血症休克大鼠血浆降钙素基因相关肽(CGRP)增加2.6倍,休克早期或晚期运用低剂量CGRP治疗都具有显著疗效;(3)休克大鼠心肌、主动脉组织血管紧张素II明显增加,休克早期抑制其增加可加剧休克,晚期抑制其升高则具有显著疗效. 结论认为,ET是参与休克发病的重要体液因素,CGRP参与休克时机体的代偿调节,组织血管紧张素II在休克不同时期作用不同.

关键词 休克、调节肽,内皮素、降钙素基因相关肽、组织肾素血管紧张素系统

调节肽是存在于神经系统作为神经递质和存在于内分泌细胞起循环激素或局部激素作用的肽类物质,参与调节机体组织器官的多种功能活动,是维持机体内环境恒定的重要物质[1, 2]. 休克是具有多发病环节的调节紊乱性疾病. 因而关于调节肽系统在休克发病中的作用近年来受到高度重视. 本文旨在大鼠腹膜炎败血症休克模型上,探讨近年新发现的具有重要生理调节作用的三种内分泌调节肽内皮素(Endothelin, ET),降钙素基因相关肽(Calcitonin gene-related Peptide, CGRP)及组织源性血管紧张素-II (Tissue Angiotensin II, ANG-II)在休克发病中的作用及其机制.

一、材 料 和 方 法

1. 主要试剂

ET, CGRP及两者的放射免疫测定药盒均购自Peninsula Lab, ANG-II药盒购自海军总医院,TXB_2, 6-keto-$PGF_{1\alpha}$药盒购自中国医学科学院基础医学研究所,Captopril, 血糖药盒购自Sigma公司,其它试剂均为国产分析纯产品.

2. ET作用试验

给健康大鼠静脉持续滴注ET复制休克模型,250—300g雄性Wistar大鼠,术前禁食12h,

1992-03-10 收稿,1992-07-08 收修改稿

20% 乌拉坦腹腔注射麻醉(1g/kg, B.W),经股动脉、颈总动脉分别插管至腹主动脉及左心室,在生理多导仪(Sanei 2G66)上描记动脉血压、心室内压及 II 导联 ECG. 颈外静脉插管以备给药. 术后稳定 20min 后,6 只动物静脉缓慢滴注 ET(0.3 μg/kg · min),当动物收缩压降至原始水平 2/3 时停止滴注,观察到动物死亡;4 只动物以同样速度点滴生理盐水,滴注时间为 ET 组动物平均滴注时间. 两组动物滴注停止后由股动脉取 0.5ml 血(回输 0.5 ml 右旋糖酐),测定血浆乳酸脱氢酶(LDH)、组织蛋白酶 -D(CD)活性,结束实验时,取动物心、肝、肺等组织作病理学检查. 另外 8 只动物由动脉快速放血至平均动脉压为 5.3kPa,并维持该血压水平. 在 10min 内由静脉滴注 ET(4.4μg/kg)和全部放出的血液;对照组($n=6$)滴注等量的生理盐水和放出的血液,观察 2h,由动脉插管取血分别测定血浆 LDH, CD 活性和脂质过氧化产物丙二醛(MDA)的含量[3].

3. 血浆ET 变化及内皮素抗血清(ET-Ab)

动物选择同前,以 Chaudry 等结扎盲肠加穿孔的方法复制大鼠腹膜炎败血症休克模型[4]. 动物随机分为假手术组、休克组和抗血清治疗组,每组 6 例. 治疗组在术后即刻静脉注射 ET-Ab 0.5ml (兔抗鼠,效价1 : 5000, 与其它调节肽无交叉反应),休克组静脉注射等量健康家兔血清,假手术动物除盲肠穿线,不结扎、不穿孔外,其余操作同休克组一致. 术后 20h,轻度乙醚麻醉下,颈动脉插管记录动物血压,并取血分别测定血浆 ET 水平,血糖浓度,LDH, CD 活性,摘取心脏测定心肌组织钙和 MDA 含量.

4. 外源CGRP

大鼠败血症休克模型同前,动物随机分为 4 组(1)休克组($n=7$),分别在术后即刻、4h, 10 和 14h 由颈外静脉滴注 0.25ml 生理盐水;(2)休克早期 CGRP 治疗组(CGRP I 组,$n=8$),分别在术后即刻、4h 静脉滴注 0.25ml CGRP(5μg/kg),术后 10,14h 滴注等量生理盐水; (3)休克晚期治疗组(CGRP II 组,$n=8$),分别在术后即刻、4h 滴注 0.25ml 生理盐水,术后 10,14h 滴注等量 CGRP, (4)假手术组 ($n=4$). 术后 20h,由前述方法测定动脉血压、血糖、血浆 LDH、CD 活性;放免测定血浆及心肌组织中 CGRP, ANG-II 含量和血浆 TXB_2, 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ 水平. 取心肌组织作病理学检查.

5. 组织源ANG-II

败血症休克模型同前,动物随机分为早期休克(10h)、晚期休克(20h)两组,两组又分别分假手术组、休克组及 Captopril 治疗组 3 个亚组. 治疗组在 10mg Captopril/kg · 天灌胃两天后复制休克模型,休克组以等量蒸馏水灌胃作对照. 术后 10, 20h 由前述方法测定动物血压、血糖、体温、心肝组织 MDA 含量,并放免测定心肌和主动脉组织 ANG-II 水平.

实验结果以均数 ± 标准误表示,方差分析组间 q 检验作统计学处理.

二、结 果

1. ET 是参与休克发病的重要体液因素

给健康大鼠静脉持续滴注 ET 可复制出典型休克模型,健康大鼠静脉滴注 ET 即刻,平均动脉压降低 4.16±0.36kPa, 2min 后逐渐回升,并超过原始水平,维持 29.3±2.1min. 继后血压、心输出量进行性降低,脉压差减小,ECG 出现 ST 段降低,T 波倒置,心率缓慢等典型的缺血改变. 血浆 LDH, CD 活性较对照组分别增加 314%, 472% ($p<0.01$). 心、肝、肺组织呈现典型的缺血性、淤血性缺氧变化,呈现典型的休克表现(ET 休克).

外源 ET 静滴致轻度失血性休克发生不可逆，失血性休克大鼠输血治疗后，血压恢复至接近正常水平，实验期内全部存活；失血休克经回输血液并滴注 ET 组动物，血压一过性恢复，1h 后进行性降低，实验期内 5/8 例陷于正常血容量休克，1/8 例死亡．血浆 LDH，CD 活性及 MDA 含量比休克对照动物分别增加 77%，73% 和 86% ($p<0.01$)．

2．败血症休克大鼠血浆ET 水平显著增加，ET-Ab 具有明显的治疗作用

晚期败血症休克动物活动明显受限，普遍发生低血压、低血糖．血浆 ET 水平增加 250%，血浆中 LDH，CD 大量漏出，心肌组织钙聚集(185%)，MDA 含量明显升高．盲肠严重充血、水肿及节段性坏死．用 ET-Ab 中和体内 ET 治疗休克，可以明显改善动物的低血压、低血糖状态，显著减少血浆中 LDH，CD 的漏出，降低心肌组织钙聚集程度和 MDA 含量，具有明显的治疗作用，如表 1 所示．

表 1　晚期败血症休克大鼠血压、血糖、血浆中ET 水平，LDH，CD 活性，心肌组织钙，MDA 含量的变化及 ET-Ab 对其的影响

组别	例数	血压(kPa)	血糖(mmol/L)	ET(pg/ml)	LDH(U/ml)	CD(U/ml)	Ca^{2+}(mol/L)	MDA(nmol/g.w.w)
假手术组	6	16.0±0.9	5.0±0.2	3.1±0.2	351.8+25.2	269.5±36.3	2.0±0.2	77.7±4.3
休克组	6	12.2±0.8[b)]	3.7±0.3[b)]	7.7±1.4[b)]	640.3±47.1[b)]	465.2±45.8[b)]	3.8±0.3[b)]	106.2±4.1[b)]
治疗组	6	14.7±0.6[a)]	4.5±0.2[b)]	1.2±0.2[a)]	429.3±37.3[a)]	324.6±26.7[a)]	2.7±0.1[a)]	89.3±5.8[a)]

$\overline{X}$±SE：与休克组比：a) $p<0.05$，与假手术组比：a) $p<0.05$，b) $p<0.01$

3．CGRP 的抗休克作用

大鼠盲肠结扎并穿孔后 20h，呈典型的晚期败血症休克表现．血浆 CGRP 增加 2.6 倍(14.3±4.0vs sham 5.5±1.8 pg/ml，$p<0.01$)，血浆中 LDH，CD 漏出明显增多，血浆 ANG-II，6-keto-$PGF_{1\alpha}$，TXB_2 水平显著升高．心肌 ANG-II 含量增加 58% ($p<0.01$)．休克早期、晚期用 CGRP 治疗均可明显改善动物的血液动力学，减少血浆中 LDH，CD 的漏出，降低 ANG-II 水平，显著提高 6-keto-$PGF_{1\alpha}$/TXB_2 的比值，但对局部心肌组织 CGRP，ANG-II 含量无明显影响．组织切片上两个治疗组心肌损伤程度都明显轻于休克对照组，如表 2 所示．

表 2　败血症休克大鼠血压、血浆中LDH，CD，AGT-II，TXB_2，6-keto-$PGF_1\alpha$，6-keto-$PGF_1\alpha$/TXB_2 的变化及休克早期，晚期运用 CGRP 治疗对其的影响

组别	例数	血压(kPa)	LDH(mU/mg Pr)	CD(mU/mg Pr)	AGT-II(pg/ml)	TXB_2 (pg/ml)	6-keto-$PGF_1\alpha$(pg/ml)	6-keto-$PGF_1\alpha$/TXB_2
假手术组	4	15.0±0.9	24.1±3.0	309.7±23.2	546.8±5.6	344.0±26.3	89.2±11.2	25.9±1.7
休克组	7	10.3±1.6[a)]	83.3±5.8[b)]	785.3±50.1[b)]	665.2±15.6[b)]	859.0±64.4[b)]	438.3±48.1[b)]	51.0±4.7[b)]
CGRP I 组	8	14.8±0.8[a)]	70.0±2.5[a)]	546.6±41.7[a)]	582.0±2.9[a)]	682.5±58.4	471.3±41.5	69.1±5.3[a)]
CGRP II 组	8	15.5±0.9[a)]	66.7±4.3[a)]	553.4±40.4[a)]	582.4±3.4[a)]	685.1±61.7	450.8±45.1	65.8±4.1[a)]

$\overline{X}$±SE：a)，b)同表 1

4．组织源ANG-II 参与休克发病

早期败血症休克大鼠体温、血压分别升高 1.2±0.3℃ 和 2.4±0.1kPa，血糖明显升高(9.2±0.8vs sham 6.1±0.7mmol/L，$p<0.05$)．心、肝组织 MDA 及心肌、主动脉组织 ANG-II 含量都显著增加．Captopril 治疗对血压、血糖及心肌组织 ANG-II 含量无明显影响，却使心肌、肝组织 MDA 水平升高更为显著，具有加剧休克的作用，如表 3 所示．

表3 早期败血症休克大鼠心、肝组织MDA含量，局部心肌，主动脉组织 ANG-II 水平的变化及 Captopril 对其的影响 *

组别	例数	MDA (nmol/g.w.w.)		AGT-II (pg/100 mg 组织)	
		心肌	肝脏	心肌	主动脉
假手术组	6	51.0±2.9	77.0±10.2	22.0±2.8	167.6±13.6
休克组	12	126.0±15.9[b)]	121.0±14.4[b)]	51.2±6.8[b)]	253.2±24.5[b)]
Captopril 组	10	225.0±16.1[a)]	147.0±11.7[a)]	45.7±3.9	410.4±80.4

$\overline{X}$±SE; a)，b)同表1

晚期败血症休克大鼠低血压、低血糖、组织损伤程度与前述相似. 心肌、肝组织 MDA 和心肌、主动脉组织 ANG-II 含量分别增加 196%，115%，21.2% 和 18.3% ($p<0.05$)，且组织 ANG-II 含量增加与组织 MDA 水平增加呈显著正相关关系($r=0.6841$, $p<0.01$)，与血压降低呈显著负相关关系($\gamma=-0.6127$, $p<0.01$). 用 Captopril 治疗，可显著改善休克动物的血液动力学状态，明显降低心肌、肝组织 MDA 水平，抑制局部心肌、主动脉组织 ANG-II 的升高，具有显著疗效，如表4所示.

表4 晚期败血症休克大鼠血压、血糖、心、肝组织MDA含量，局部心肌，主动脉组织 ANG-II 水平的变化及 Captopril 对其的影响 *

组别	例数	血压(kPa)	血糖 (mmol/L)	MDA (nmol/g.w.w.)		AGT-II (pg/100 mg 组织)	
				心肌	肝脏	心肌	主动脉
假手术组	6	12.8±1.6	10.5±0.8	76.4±10.8	85.1±14.3	102.2±6.9	346.8±23.7
休克组	10	7.5±1.1[b)]	3.1±0.4[b)]	226.3±19.1[b)]	182.6±13.2[b)]	132.5±7.7[b)]	532.0±20.7[b)]
Captopril 组	8	10.9±1.3[a)]	7.3±0.5[a)]	139.5±23.7[a)]	116.2±9.9[a)]	123.2±7.8[a)]	432.1±35.8[a)]

$\overline{X}$±SE; a)，b)同表1

三、讨 论

ET 是由内皮细胞分泌和释放的迄今所知体内缩血管作用最强的物质. 组织缺血、缺氧、儿茶酚胺、NPY 和细胞因子的大量分泌和释放，都能刺激内皮细胞合成和释放 ET[1, 6]. 本文观察到休克大鼠血浆 ET 水平成倍增加，给健康大鼠静脉缓慢滴注 ET 可致典型的休克表现(ET 休克)，而给轻度失血性休克大鼠静滴低剂量的 ET，则导致休克不可逆，提示 ET 可能是参与休克发病的重要体液因素. 为明确 ET 的确切作用，本实验制备特异的 ET 抗血清，用其中和体内 ET 治疗休克，发现 ET-抗血清可明显改善休克动物的血液动力学状态，减轻组织损伤程度，具有明显的抗休克疗效. 进一步证明 ET 是导致休克发生发展的重要体液因素.

休克过程中大量释放的 ET，一方面通过其强烈收缩血管作用，导致血管痉挛，加剧微循环紊乱；另一方面可抑制心功能，抑制心肌乳酸转运，抑制代谢，促进心肌和血管平滑肌钙超负荷的发生[7, 8]，加剧组织损伤、恶化休克. 因而有效地拮抗或抑制 ET 的生物学效应对于防治休克具有重要临床意义.

CGRP 是已知的体内扩血管作用最强的物质，是 ET 的内源性生物学效应拮抗剂. 在缺血、缺氧的多种组织器官上都证实它具有有效的细胞保护作用[1]. 但其在休克发病中的病理生理意义目前尚不清楚. 有学者发现动物血浆 CGRP 水平随休克进程而增加，并推测其与休克动物的低血压发生有关，可能是致休克因子之一[5]. 本实验应用 5μg/kg · B · W. CGRP(该剂

量给健康或休克大鼠静滴仅致血压轻度而短暂降低）缓慢静脉滴注治疗败血症休克大鼠，无论早期或晚期给药，都具有显著疗效．进一步证实 CGRP 的抗休克作用，同时提示 CGRP 的扩血管作用可能不是败血症休克时低血压发生的主要原因，CGRP 也不是致休克因子．

休克时血浆 CGRP 升高可能具有代偿性保护意义．其机制可能与其扩血管改善微循环及细胞保护作用有关．本文观察到，CGRP 可抑制血浆 ANG-II 的增加，提高 6-keto-$PGF_1\alpha$/TXB_2 的比值．ANG-II 被认为是促进休克发展的重要因素，提高 6-keto-$PGF_1\alpha$/TXB_2 比值则可抑制血小板聚集，改善微循环，这对休克动物的预后也是有益的．

组织肾素血管紧张素系统的病理生理意义，近年来日益受到重视．心血管组织 ANG-II 在心血管功能调节中起着十分重要的作用[9, 10]．本文观察到，早期败血症休克时，心肌、主动脉 ANG-II 含量明显增加，用 Captopril 治疗反而加剧休克时组织脂质过氧化损伤；晚期败血症休克时，心肌、主动脉组织 ANG-II 增加更为明显，并发现组织 ANG-II 含量与 MDA 水平呈正相关，与血压水平呈负相关．说明组织 ANG-II 加剧了脂质过氧化损伤，参与晚期休克时低血压的发生．用 Captopril 预防治疗可明显降低组织 ANG-II 水平，具有显著的抗休克疗效．因而休克早期组织 ANG-II 升高可能有代偿意义．抑制其增加，则对机体不利；而休克晚期 ANG-II 过度增加，则可能促进休克发展．抑制其增加，具有明显疗效．

由于休克是一多因素引起的以机体内稳态失衡为特征的复杂病理过程，任何单一因素都不可能决定其全部发生发展过程．休克过程中各种调节肽相互间平衡关系紊乱所致的机体功能代谢障碍，对休克的发生发展及转归可能起着决定性作用．因而在了解单一调节肽在休克发病中所起作用的基础上，继续探讨休克时各种调节肽相互间稳态关系变化的规律，探讨其亚细胞分子水平作用机制，将对休克防治具有更为重要的意义．

参　考　文　献

[1] 汤　健、唐朝枢编著，循环系统的内分泌功能，北京医科大学、协和医科大学联合出版社，北京，1989，62—145.

[2] Yanagisawa, M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**(1988), 6964—6967.

[3] Asakswa, T. & Matshushita, S., *Lipids*, **14**(1979), 401—406.

[4] Chaudry, I. H. et al., *Surgery*, **85**(1979), 202—211.

[5] Wang, X. et al., *Circ. Shock*, **34**(1991), 217—223.

[6] Editorials, *The Lancet*, **337**(1991), 79—81.

[7] Simonson, M. S. & Dunn, M. J., *Hypertension*, **17**(1991), part 2, 856—863.

[8] Yue, T. L. et al., *Neuropeptide*, **17**(1990), 7—12.

[9] Frohlich, E. D., Iwata, T. & Sasiki, O., *Am. J. Med.*, **87**(SUPPI 6B)(1989), 6B—19S.

[10] Unger, T. & GOhlke, P., *Am. J. Cardiol.*, **65**(1990), 3I—10I.