

- mouse basal keratinocytes results in basement membrane disruption and acceleration of tumor progression [J]. *Cancer Res*, 2005, 65 (16): 7310–7319
- 12 Bassi DE, Zhang J, Cenna J, *et al.* Proprotein convertase inhibition results in decreased skin cell proliferation, tumorigenesis, and metastasis [J]. *Neoplasia*, 2010, 12(7): 516–526
- 13 D'Anjou F, Routhier S, Perreault JP, *et al.* Molecular validation of PACE4 as a target in prostate cancer [J]. *Transl Oncol*, 2011, 4(3): 157–172
- 14 Fu Y, Campbell EJ, Shepherd TG, *et al.* Epigenetic regulation of proprotein convertase PACE4 gene expression in human ovarian cancer cells [J]. *Mol Cancer Res*, 2003, 1(8): 569–576
- 15 Fu Y, Nachtigal MW. Nachtigal, Analysis of epigenetic alterations to proprotein convertase genes in disease [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 768: 231–245
- 16 Singh H, Heng S, Nicholls PK, *et al.* Proprotein convertases in post-menopausal endometrial cancer: distinctive regulation and non-invasive diagnosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 419 (4): 809–814
- 17 Li S, Shen D, Shao J, *et al.* Endocrine – therapy – resistant ESRI variants revealed by genomic characterization of breast – cancer – derived xenografts [J]. *Cell Rep*, 2013, 4(6): 1116–1130
- (收稿日期: 2013 – 10 – 29)
(修回日期: 2013 – 11 – 11)

不同 M 受体亚型拮抗剂在改善失血性休克大鼠微循环障碍中的作用比较

陈颖茜 王文达 胡莎莎 刘天行 曹济民

摘要 **目的** 探讨胆碱能受体 M₁、M₂ 和 M₃ 亚型拮抗剂在改善大鼠失血性休克时微循环障碍中的不同作用。**方法** 建立大鼠失血性休克模型。将大鼠随机分成 5 组: 对照组、阿托品组、M₁、M₂ 及 M₃ 受体拮抗剂组。除对照组仅等量静脉补液(生理盐水和全血混合物 3:1)外, 其余组动物在此基础上分别静脉注射非选择性 M 受体拮抗剂阿托品 (1250mg/kg)、M₁ 受体拮抗剂替仑西平盐酸盐水合物 (telenzepine dihydrochloride hydrate) (0.22mg/kg)、M₂ 受体拮抗剂西贝母碱 (imperialine) (9.6×10^{-3} mg/kg) 或 M₃ 受体拮抗剂 4 – 二苯乙酰氧 – N – 甲基哌啶甲碘化物 (4 – diphenylacetoxy – N – methylpiperidine methiodide, 4 – DAMP) (1.25×10^{-5} mg/kg)。用微循环显微镜观察肠系膜微血管管径和血流形式的变化。每组选取 25 条三级微动脉进行统计 ($n = 25$)。**结果** 阿托品或 M₁ 受体拮抗剂可使失血性休克大鼠的肠系膜微血管收缩明显减轻甚至扩张, 微血管血流由粒流变为线粒流。M₂ 或 M₃ 受体拮抗剂的上述作用不明显。**结论** 选择性拮抗胆碱能 M₁ 受体可改善大鼠失血性休克时的微循环障碍。

关键词 休克 微循环 M 受体

[中图分类号] R331 [文献标识码] A

Comparison of the Therapeutic Effects of Variant Muscarinic Receptor Antagonists on Hemorrhagic Shock – induced Microcirculatory Dysfunction in the Rat. Chen Yingqian, Wang Wenda, Hu Shasha, Liu Tianxing, Cao Jimin. Institute of Basic Medical Sciences Chinese Academy of Medical Sciences/School of Basic Medicine Peking Union Medical College, 100710 Beijing, China

Abstract **Objective** To investigate the differential therapeutic effects of antagonists for muscarinic (M) receptor subtypes in hemorrhagic shock – induced microcirculatory dysfunction in the rat. **Methods** Rat hemorrhagic shock model was used in the study. Animals were randomly divided into 5 groups: control, atropine, M₁ receptor (M₁R) antagonist, M₂R antagonist and M₃R antagonist. On the basis of equivalent intravenous infusion of saline – blood (3:1) mixture after shock, animals were intravenously infused with non – selective M receptor (MR) antagonist (atropine, 1250mg/kg), M₁R antagonist (telenzepine dihydrochloride hydrate, 0.22mg/kg), M₂R antagonist (imperialine, 9.6×10^{-3} mg/kg) or M₃R antagonist (4 – DAMP, 1.25×10^{-5} mg/kg), respectively. Microscopy was used to measure blood flow patterns and changes of arteriole diameters in the mesenteric microcirculation. The diameters of 25 grade – 3 arterioles ($n = 25$) were selected in each group for statistical analysis. **Results** Atropine and M₁R antagonist telenzepine were significantly effective in improving the blood flow pattern (from particle flow to line – particle flow) and relaxing the arterioles. However, M₂R or M₃R antagonists

基金项目: 国家“大学生创新实验计划”基金资助项目 (201210023060)

作者单位: 100005 中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院 (陈颖茜、王文达、胡莎莎、刘天行); 中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院生理学和病理生理学系 (曹济民)

通讯作者: 曹济民, 电子信箱: caojimin@126.com

were not effective in improving the microcirculatory dysfunction during shock. **Conclusion** Selective M1R blockade improves the microcirculatory dysfunction in rat hemorrhagic shock.

Key words Shock; Microcirculation; Muscarinic receptor

毒蕈碱受体(muscarinic receptor)(M受体)按基因分型目前分为M1、M2、M3、M4和M5 5种亚型,这些受体亚型不同程度地表达于外周组织与中枢神经系统^[1]。M受体拮抗剂在临床中的应用包括非选择性M受体拮抗剂阿托品与山莨菪碱用于抗休克治疗^[2]。失血性休克时内稳态不能维持,可应用大剂量阿托品扩血管,其扩血管的机制可能是机体代偿性散热反应,也可能是阿托品阻断M受体后的扩血管效应所致^[3,4]。大剂量山莨菪碱对改善感染性休克可能为封闭M受体、上调 $\alpha 7nAChR$ 活性而开启相关抗炎通路^[5]。也有研究显示,敲除M3受体基因的小鼠,乙酰胆碱不能对一些小动脉产生扩血管作用,或许与血管M受体直接相关^[6]。尽管以前在不同研究层次上观察到了拮抗M受体的改善微循环效应,但究竟是何种M受体亚型介导这种作用,目前并不十分清楚。因此,有必要对M受体亚型拮抗剂的抗休克作用进行进一步鉴定。本研究在大鼠失血性休克模型上,观察了M1、M2和M3受体拮抗剂对失血性休克大鼠肠系膜微循环的不同影响,试图阐明何种M受体亚型对改善微循环障碍所起的作用最大,为阐明M受体拮抗剂抗休克的机制提供实验依据。

材料与方法

1. 动物和试剂:普通级3~4月龄雌性Wistar大鼠30只,体重160~220g(北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物合格证号:SCXK-京-2006)。动物饲养及实验遵守北京协和医学院生命伦理委员会的有关规定。替仑西平盐酸盐水合物(telenzepine dihydrochloride hydrate)、西贝母碱(imperialine)和4-二苯乙酰氧-N-甲基哌啶甲碘化物(4-diphenylacetoxy-N-methylpiperidine methiodide, 4-DAMP)购自Sigma公司,其他常规试剂购自北京化学试剂公司。

2. 动物分组:根据Frank等^[7]的方法建立大鼠失血性休克模型。实验前将大鼠随机分为5组,每组5只。将每组休克前的数据作为自身正常对照。①对照组:动脉放血(1.5ml/100g),不予药物治疗,仅放血后5min内给予生理盐水-自体血液混合液体(体积比3:1)回输治疗;②阿托品治疗组:于回输治疗后静脉推注阿托品,根据文献[8]选择阿托品剂量1250mg/kg;③M1受体拮抗剂替仑西平治疗组:根据文献[9]选择替仑西平剂量0.22mg/kg;④M2受体拮抗剂西贝母碱治疗组:根据文献[10]选择西贝母碱为 9.6×10^{-3} mg/kg;⑤M3受体拮抗剂4-DAMP治疗组:根据文献[11]选择4-DAMP剂量0.22mg/kg。以上M受体拮抗剂的剂量选择均是在参考

有关文献的前提下,再经过预实验的量-效关系分析,最终选择大鼠可耐受的较大剂量。

3. 肠系膜微循环的观察:实验中在微循环显微镜(B230LED,重庆奥特光学仪器有限公司)高倍镜下观察肠系膜上动脉以下第3级分支的微动脉,用图像分析系统(PCLB-1A,北京微信斯达科技发展有限公司)观察微动脉血管口径、血流速度、血液流态和渗出、出血情况等,并拍摄微血管照片。每组大鼠观察肠系膜三级微动脉25条($n=25$),进行药效的统计学分析。选取观察微血管时保证休克前、休克后及治疗后所观察的区域基本相同。大鼠动脉血压下降至40mmHg即判定为休克状态。每只大鼠休克10min后进行观察,观察时间5min;之后补液及给药,10min后再次观察5min。

4. 统计学方法:应用SPSS 17.0统计软件,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用组间比较和自身对照的方式进行统计学分析。实验组与对照组之间的比较采用 t 检验和方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 不同M受体拮抗剂对失血性休克时微循环血流状态变化的影响:实验中微循环血流状态的变化见表1。所观察到的血流状态显示,阿托品和M1受体拮抗剂替仑西平的改善微循环作用最明显,而M2和M3受体拮抗剂基本未能显示改善微循环的作用。

表1 不同M受体拮抗剂作用后血流状态变化情况

组别	血流状态
休克前	线流,不能见到单个红细胞
休克后	早期为粒线流;晚期变为粒流,乃至血流停滞,动物死亡
单纯补液	粒线流,可看到颗粒状的红细胞
补液+阿托品	粒流至线粒流
补液+替仑西平	粒流至线粒流
补液+西贝母碱	早期线粒流至线流,后期逐渐变为粒流
补液+4-DAMP	早期线粒流至线流,后迅速逐渐变为粒流甚至停滞

2. 不同M受体拮抗剂对失血性休克时微循环血管口径的影响:由于微循环状态的变化直接与微动脉管径的变化有关,本研究进一步观察和统计了不同M受体拮抗剂对休克大鼠微循环动脉口径的变化。与休克前相比,休克后肠系膜微动脉出现典型的收缩状态(图1)。单纯生理盐水-自体血液回输后微动脉管径进一步减小,休克进一步发展。但由于补液是失血性休克的对症治疗方案,故药物治疗均需以补充足量体液为前提。

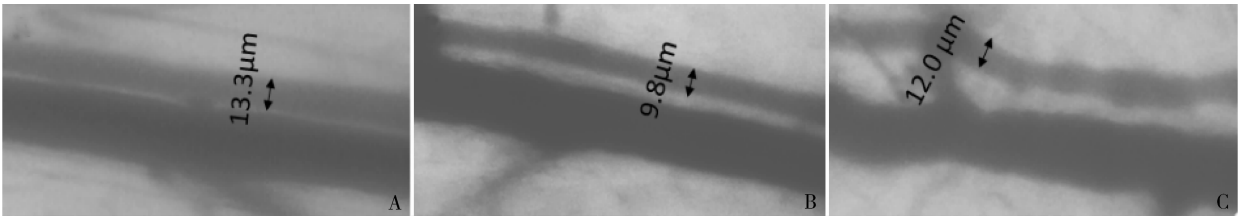


图 1 大鼠休克前、休克后及给予 M1 受体拮抗剂后肠系膜微循环动脉口径变化的代表性显微照片

照片拍摄取自相同区域的血管。A. 休克发生前,微动脉口径(双箭头示)较粗,说明微循环血管通畅;B. 失血性休克发生后,微动脉口径明显收缩变细;C. 给予 M1 受体拮抗剂替仑西平后,微动脉口径与休克时(B)相比明显增大

应用阿托品及替仑西平治疗后,相比于休克状态时,大鼠口唇颜色稍变红润。应用西北母碱治疗后口唇颜色变化不明显。应用 4-DAMP 后,大鼠生理状况迅速恶化,皮肤黏膜迅速变紫,心搏变得微弱,大部分动物均在进行微循环测量前死亡,微动脉管径迅速变小,甚至由于放大倍数不足而难以测量其数据,仅有少数在死亡前测得微动脉管径数据。各组休克前、休克后及治疗后的微动脉平均直径见表 2。由于不同微血管的口径可能有所不同,尽管表 2 给出了微动脉($n=25$)平均直径的变化,但仍可能存在抽样不足

带来的偏差。为了使各组数据更具可比性,本研究以每组动物休克前的微动脉直径作为参照(1 或 100%),再将各组动物休克后及治疗后微动脉直径变化的百分率进行了比较(图 2)。结果表明,失血性休克后肠系膜三级微动脉直径的变化百分率明显增大,提示微动脉收缩。阿托品及 M1 受体拮抗剂替仑西平治疗后呈现微动脉明显舒张,与休克前的微动脉直径相比,百分率变化减小。M2 受体拮抗剂西贝母碱和 M3 受体拮抗剂 4-DAMP 则均不能改善微动脉的收缩(图 2)。

表 2 各组休克前、休克后及治疗后肠系膜微动脉平均直径的变化(μm , 每组微动脉 $n=25$)

组别	对照组	阿托品组	替仑西平组	西贝母碱组	4-DAMP 组
休克前	15.7 $\pm$ 3.0	11.1 $\pm$ 3.7	14.5 $\pm$ 3.7	14.9 $\pm$ 2.0	17.7 $\pm$ 3.9
休克后	12.8 $\pm$ 1.7	6.9 $\pm$ 1.7	10.4 $\pm$ 1.5	11.8 $\pm$ 3.6	13.6 $\pm$ 3.5
治疗后	8.8 $\pm$ 1.6	11.2 $\pm$ 2.0	12.9 $\pm$ 1.2	7.2 $\pm$ 4.1	10.3 $\pm$ 4.3

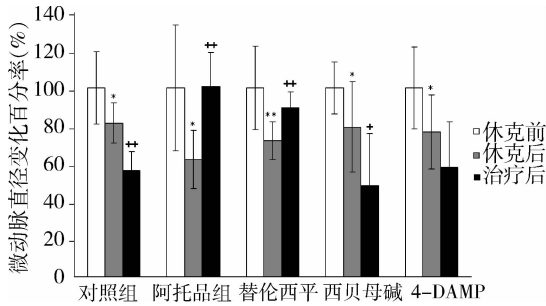


图 2 休克前后及治疗后大鼠肠系膜微动脉直径的百分率变化(每组 $n=25$)

以休克前微动脉口径作为 1 即 100%。其中“对照组”指单纯补液治疗。与休克前微动脉直径相比,* $P<0.05$, ** $P<0.01$;与休克后微动脉直径相比,* $P<0.05$, ** $P<0.01$

讨 论

本研究通过肠系膜微循环观察直接证明了临床上补充足量体液后给予大量阿托品治疗休克的有效性,并显示经 M1 受体拮抗剂治疗后休克大鼠微循环障碍的情况有明显改善,而 M2 及 M3 受体拮抗剂则

没有改善休克微循环障碍的作用,休克进一步发展^[12]。由于本研究为全身用药,考虑到 M1 受体分布于胃壁细胞、神经节和中枢神经系统,从全身作用来看,替仑西平可能作用于神经节的 M1 受体,对交感神经产生了抑制作用,减少了儿茶酚胺的释放,缓解了微动脉的收缩^[13]。另一种可能是,肠系膜微循环表达 M1 受体,替仑西平可通过拮抗肠系膜微循环 M1 受体,使微循环血管扩张,进而改善休克时的微循环障碍。

现有研究表明,M2 受体主要分布于心脏、脑和自主神经节,激动后引起心脏收缩力和心率降低。若 M2 受体在肠系膜微循环上也起着类似激动副交感神经的作用,则 M2 受体拮抗剂作用后会导致内脏血管的收缩,与本实验结果相符。M3 受体分布于外分泌腺、平滑肌、血管内皮、脑和自主神经节,激动后引起平滑肌松弛和腺体分泌^[12]。本研究结果提示肠系膜微循环上可能存在 M3 受体,M3 受体拮抗剂可阻断 M3 受体对平滑肌的松弛作用,导致微动脉迅速收缩,

从而使休克进一步发展。

整体动物实验虽能较好地模拟临床治疗过程,但也仅能从全身作用了解各 M 受体亚型拮抗剂在抗休克治疗作用中的权重,全身给予 M 受体拮抗剂治疗休克可能存在多个靶点。在随后的研究中可通过局部血管内给药精确地确定微循环 M 受体亚型的分布和功能。

总之,本实验进一步探讨了大剂量非选择性 M 受体拮抗剂(以阿托品为代表)治疗休克时起主要作用的 M 受体亚型,并发现了各 M 受体拮抗剂各自的全身综合效应,可为临床针对性用药提供参考。若在临床上能够选用对 M₁ 受体选择性更强的 M 受体拮抗剂,则其正向治疗作用不会受到 M₂、M₃ 受体的负向作用干扰,可更有效地治疗休克,并减少由于多种作用位点带来的不良反应。本研究为揭示 M 受体拮抗剂抗休克的机制提供了一定的整体实验依据,对于开发选择性更高的 M 受体亚型拮抗剂有一定启示意义。

参考文献

- 1 Eglen RM. Overview of muscarinic receptor subtypes[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2012, 208(1):3-28
- 2 史一鸣,钮因尧,陆阳. M 受体及相关选择性药物研究进展[J]. *国际药学研究杂志*, 2009, 36(5):355-361
- 3 张巍,岳峰,郭炯. 小鼠脑低血流灌注缓解随后失血性休克所致

- 变化[J]. *基础医学与临床*, 2000, 20(4):52-54
- 4 郑建普,曹永孝,徐仓宝,等. 阿托品对大鼠肠系膜动脉的舒张作用及机制[J]. *药理学学报*, 2005, 40(5):402-405
- 5 Zhao T, Li DJ, Liu C, *et al*. Beneficial effects of anisodamine in shock involved cholinergic anti-inflammatory pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2011, 2(23):1-3
- 6 Gerickle A, Sniatecki JJ, Mayer VG, *et al*. Role of M₁, M₃, and M₅ muscarinic acetylcholine receptors in cholinergic dilation of small arteries studied with gene-targeted mice[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 300(5):1602-1608
- 7 Rönn T, Lendemann S, de Groot H, *et al*. A new model of severe hemorrhagic shock in rats[J]. *Comp Med*, 2011, 61(5):419-426
- 8 宋洪礼. 大剂量阿托品治疗感染性休克 147 例[J]. *吉林医学*, 1987, 8(6):58
- 9 Schmid WS, Modlin IM, Tang LH, *et al*. Telenzepine-sensitive muscarinic receptors on rat pancreatic acinar cells[J]. *Am J Physiol*, 1998, 274(4):G734-G741
- 10 Lin BQ, Ji H, Li P, *et al*. Selective antagonism activity of alkaloids from bulbs fritillariae at muscarinic receptors: functional studies[J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 551(1-3):125-130
- 11 马满玲,刘艳,王玲. 胆碱对大鼠和家兔心脏 M₃ 受体作用实验研究[J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2008, 37(4):302-304
- 12 李磊,王振杰. 创伤失血性休克的治疗进展[J]. *解剖与临床*, 2010, 15(6):448-451
- 13 杨宝峰. *药理学*[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社, 2011:7

(收稿日期:2013-10-24)

(修回日期:2013-11-11)

阳离子脂质体介导的 A20 基因转染人外周血单核细胞的可行性

徐 丹 曲 鹏 高 静 崔 影

摘 要 **目的** 探讨阳离子脂质体介导的 A20 基因转染人外周血单核细胞的可行性及最佳转染条件。**方法** 采用脂质体 Lipofectamine TM 2000 包裹 pCAGGS-GFP/A20 质粒转染人外周血单核细胞,通过荧光显微镜检测 GFP 报告基因,RT-PCR 检测 A20 基因表达。**结果** 应用 Lipofectamine TM 2000 介导的 A20 基因转染人外周血单核细胞,在 2×10^6 /L 细胞接种浓度,脂质体与质粒的量之比为 4 μ l:3 μ g 时,转染效果最佳,RT-PCR 证实成功获得 A20 目的基因的表达。**结论** 脂质体转染法可介导 A20 基因在人外周血单核细胞获得表达,该研究为 A20 基因转染的相关实验研究提供参考依据。

关键词 脂质体 细胞转染 人外周血单核细胞

[中图分类号] R393 [文献标识码] A

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30670836)

作者单位:116100 大连市金州区第一人民医院心内科

通讯作者:曲鹏,博士生导师,电子信箱:qupeng777@aliyun.com