

氯胺酮对感染性休克大鼠抗休克作用及其相关机制研究

肖红 徐宏伟 刘慧 张兰

【摘要】 目的 探讨氯胺酮在感染性休克大鼠模型中的作用及其可能的机制。**方法** 选择健康成年 SD 大鼠 60 只,随机均分为对照组、模型组和氯胺酮组。用腹腔注射脂多糖(LPS)20 mg/kg 制备大鼠感染性休克模型;对照组给予等量生理盐水;氯胺酮组于制模前腹腔给予氯胺酮 80 mg/kg,1 h 后追加半量。观察各组大鼠存活时间及存活率。用放射免疫分析法测血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量及心肌环磷酸腺苷(cAMP)水平;用免疫组化法测定心肌组织热休克蛋白 70(HSP70)阳性表达。**结果** 模型组大鼠存活率(0)显著低于对照组(100%)及氯胺酮组(70%),差异均有显著性(P 均 <0.05);TNF- α 显著高于对照组及氯胺酮组(P 均 <0.01);cAMP 显著低于对照组及氯胺酮组(P 均 <0.01);HSP70 阳性产物灰度值显著低于对照组,但显著高于氯胺酮组(P 均 <0.01),而对照组和氯胺酮组 TNF- α 、cAMP 比较差异均无显著性(P 均 >0.05)。**结论** 氯胺酮有抗感染性休克的作用,其机制可能为通过刺激 HSP70 表达来抑制 LPS 刺激的 TNF- α 释放,升高心肌 cAMP 含量,从而保护感染心肌。

【关键词】 休克,感染性; 肿瘤坏死因子- α ; 环磷酸腺苷; 热休克蛋白 70; 氯胺酮

Effect of ketamine on endotoxin - induced septic shock in rats and its mechanism XIAO Hong, XU Hong-wei, LIU Hui, ZHANG Lan. Department of Anesthesiology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan, China

Corresponding author: ZHANG Lan

【Abstract】 Objective To explore the effect of ketamine on septic shock in rat and its mechanism. **Methods** Sixty SD rats were randomly divided into control group, model group and ketamine group. Septic shock was replicated by intraperitoneal injection of 20 mg/kg lipopolysaccharide (LPS). Control group was given normal saline only. In ketamine group, the rats received intraperitoneal injection of 80 mg/kg ketamine 20 minutes before shock and 1 hour (ketamine 40 mg/kg) after shock. The survival time and survival rate were observed in each group. Serum tumor necrosis factor - α (TNF - α), myocardial cyclic adenosine monomphosphate (cAMP) were determined with radioimmunity assay, and expression of heat shock protein 70 (HSP70) was assessed by immunohistochemistry method. **Results** The survival rate was lower in model group (0) compared with control group (100%) and ketamine group (70%), the differences were significant (both $P<0.05$). TNF - α was higher, while cAMP was lower in model group compared with control group and ketamine group (all $P<0.01$). Positive expression of HSP70 in model group was lower than control group, while higher than ketamine group (both $P<0.01$). There were no significant differences in TNF - α and cAMP between control group and ketamine gorup (both $P>0.05$). **Conclusion** Serum TNF - α is increased and myocardial cAMP is decreased in LPS - induced septic shock, whereas ketamine can inhibit the effect of LPS and protect myocardium against sepsis probably by stimulating the expression of myocardial HSP70.

【Key words】 septic shock; tumor necrosis factor - α ; cyclic adenosine monomphosphate; heat shock protein 70; ketamine

目前认为,感染性休克的病理生理改变来源于某些炎症介质过度释放,肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 是其中出现最早、且最主要的一种^[1,2]。在感染性休克中,心肌的肾上腺 β 受体-腺苷酸环化酶-环磷酸腺苷(β AR-AC-cAMP)信号转导途径受到抑制,cAMP 水平降低,交感神经反应性丧失,心肌收缩功能受到抑制^[3]。热休克蛋白 70(HSP70)是一种应激

蛋白,它作为分子伴侣,参与细胞内蛋白质的折叠、装配、降解、转移和修复等过程,同时又具有抗损伤作用^[4]。研究证实 HSP70 对缺血心肌有明显的保护作用^[5,6]。氯胺酮是临床上常用的一种静脉麻醉药物,本研究拟采用脂多糖(LPS)复制感染性休克大鼠模型,观察氯胺酮对感染性休克大鼠血清 TNF- α 以及心肌 cAMP 和 HSP70 表达的影响,探讨氯胺酮在感染性休克治疗中的可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型制备:选取健康成年 SD 大鼠 60 只,雌雄各半,体重 180~205 g,按随机数字表法

作者单位:610041 成都,四川大学华西医院麻醉科

责任作者:张兰

作者简介:肖红(1970-),女(汉族),湖南省人,医学硕士,主治医师(E-mail:xiaohong70@yahoo.com)。

分为 3 组,每组 20 只。参照 Romano 及黄坤厚等^[7,8]介绍的方法,用 LPS 复制感染性休克大鼠模型(模型组),即每只大鼠腹腔注射 LPS 20 mg/kg;在 LPS 处理前 20 min 腹腔给予氯胺酮 80 mg/kg,1 h 后追加半量(氯胺酮组),每次给药容积均稀释为 2 ml;对照组每次给予等量生理盐水。各组再随机分为两个亚组,每组 10 只,一个亚组用于收集标本,另一个亚组用于观察存活时间。

1.2 标本收集:①给予 LPS 后 2 h 从大鼠股动脉取血 5 ml 分离血清,于 -20℃ 冰箱保存,用于检测 TNF- α 含量。取血毕 15 s 内快速解剖大鼠,取 1/2 心肌组织,称重后制备组织匀浆,4 000 r/min(离心半径 17.4 cm)离心 10 min,取上清液, -20℃ 冰箱中保存,用于检测 cAMP。另 1/2 心肌组织置于体积分数为 4% 的多聚甲醛中固定,石蜡包埋、切片,检测 HSP70 表达。②观察各组大鼠 10 d 的存活率。

1.3 检测方法:①TNF- α 、cAMP 的检测采用放射免疫分析法。②HSP70 检测采用免疫组化法。心肌组织切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化,然后用体积分数为 3% 的 H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶,微波炉解冻 10 min(加入柠檬酸钠缓冲液)修复抗原,羊血清封闭,加一抗[HSP70 单克隆抗体(单抗)]于 37℃ 湿盒中孵育 2 h,依次滴加生物素化二抗(抗鼠 IgG)和含有链霉抗生物素蛋白的辣根过氧化物酶(SA-HRP),37℃ 湿盒中各孵育 30 min,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,封片镜检。棕黄色颗粒为阳性产物,每组各有一张切片加磷酸盐缓冲液(PBS)替代 HSP70 单抗,作为免疫组化阴性对照。应用 Mias-2000 医用图像分析系统测定 HSP70 阳性产物灰度值,从每只大鼠心肌组织切片任选 6 个视野,取平均值代表其 HSP70 表达强度。

1.4 统计学方法:检测数值以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用多组单因素方差分析和独立样本 *t* 检验,存活率比较用 χ^2 检验,相关性分析用直线相关分析法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠存活率的比较(表 1):对照组大鼠全部存活;模型组大鼠存活时间 5~11 h,氯胺酮组最短存活时间为 32 h。对照组及氯胺酮组存活率均显著高于模型组(P 均 <0.05)。

2.2 各组 TNF- α 、cAMP、HSP70 表达比较(表 2):模型组 TNF- α 水平显著高于对照组及氯胺酮组(P 均 <0.01)。模型组 cAMP 含量显著低于对照组及氯胺酮组(P 均 <0.01)。氯胺酮组 TNF- α 、

cAMP 较对照组差异均无显著性(P 均 >0.05)。模型组 HSP70 阳性产物灰度值显著低于对照组,高于氯胺酮组(P 均 <0.01)。

表 1 各组大鼠存活率的比较($n=10$)

Table 1 Comparison of survival rate in each group($n=10$)

组别	不同时间点大鼠存活数(只)								存活率 (%)
	5 h	7 h	9 h	11 h	13 h	32 h	36 h	10 d	
对照组	10	10	10	10	10	10	10	10	100*
模型组	8	4	3	2	0	0	0	0	0
氯胺酮组	10	10	10	10	10	8	7	7	70*

注:与模型组比较:* $P<0.05$

表 2 各组 TNF- α 、cAMP、HSP70 的变化($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 2 Change of concentrations of TNF- α , cAMP and HSP70 grave value in each group($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	TNF- α (μ g/L)	cAMP(pmol/g)	HSP70 灰度值
对照组	0.29 $\pm$ 0.09	55.33 $\pm$ 0.95	166.06 $\pm$ 4.71
模型组	2.17 $\pm$ 0.45*	14.77 $\pm$ 2.60*	158.06 $\pm$ 5.20*
氯胺酮组	0.60 $\pm$ 0.14 $\blacktriangle$	52.53 $\pm$ 12.99 $\blacktriangle$	149.75 $\pm$ 4.26 $\blacktriangle$

注:与对照组比较:* $P<0.01$;与模型组比较: $\blacktriangle P<0.01$

2.3 心肌组织 HSP70 的表达(彩色插页图 1~3):对照组胞浆中见少量棕黄色颗粒,着色浅;模型组胞浆中棕黄色颗粒较对照组增多,着色加深;氯胺酮组胞浆中棕黄色颗粒较模型组增多,着色明显加深。

2.4 HSP70 表达与存活率、TNF- α 、cAMP 的相关性分析:随 HSP70 表达增强,存活率显著提高,呈显著正相关($r=0.960$, $P<0.05$);TNF- α 显著降低,呈显著负相关($r=-0.949$, $P<0.05$);cAMP 显著增高,呈显著正相关($r=0.992$, $P<0.05$)。

3 讨论

3.1 关于感染性休克的发病机制:心肌组织中存在 β AR-AC-cAMP 信号转导途径^[9]。心肌的 β AR 与其收缩机制耦联,交感神经系统及儿茶酚胺对心肌的正性肌力作用通过心肌 β AR-AC-cAMP 系统完成,以维持心肌收缩功能,保证正常心排量^[10]。在感染性休克中,由于 TNF- α 等促炎因子的作用抑制了心肌 β AR-AC-cAMP 信号转导,使 cAMP 降低,交感神经反应性丧失,心肌收缩功能受抑,引起一系列循环系统功能改变^[3]。本结果显示,感染性休克模型组大鼠血清 TNF- α 较对照组显著升高,心肌 cAMP 显著降低,说明 LPS 所致感染性休克与血清 TNF- α 升高和心肌 cAMP 降低有关。

3.2 氯胺酮对感染性休克的作用:由于氯胺酮具有交感兴奋作用,临床上推荐用于循环衰竭患者的麻醉诱导及镇静。近年来研究发现,氯胺酮也具有抗促炎因子作用,因此可用于感染性休克治疗中的药物

选择^[11,12]。本研究结果显示,当模型组大鼠在 13 h 内全部死亡时,氯胺酮组大鼠仍全部存活,至实验结束,氯胺酮组存活率为 70%。说明氯胺酮有抗感染性休克作用,可显著提高大鼠存活率。本研究显示,氯胺酮能抑制感染性休克大鼠 LPS 刺激 TNF- α 释放;氯胺酮组 cAMP 显著高于模型组,说明氯胺酮感染性休克时可升高 cAMP 水平。氯胺酮还可抑制白细胞介素-6(IL-6)、IL-8 等促炎因子对心血管系统的抑制作用,降低总死亡率^[13,14]。上述结果提示,氯胺酮组可通过抑制 TNF- α 对抗其心肌损害作用,能升高心肌 cAMP 水平,保护感染动物心肌,这可能是氯胺酮抗感染性休克的机制之一。

3.3 HSP70 在氯胺酮抗感染性休克中的作用:本研究显示,模型组 HSP70 表达强于对照组,氯胺酮组 HSP70 表达比模型组明显增强,存活率也显著提高,表明 LPS 可刺激心肌产生 HSP70 来抵抗损伤。氯胺酮可加强 HSP70 抗损伤作用。Meldrum 等^[15]研究也证实,HSP70 通过热刺激诱导或直接通过脂质体载入 HSP70 到心肌组织,对抗 LPS 引起的心肌收缩功能抑制,对 LPS 引起的心肌收缩功能抑制具有保护作用。本研究显示,HSP70 表达强度与 TNF- α 呈显著负相关,与 cAMP 呈显著正相关,与存活率呈显著正相关,表明随 HSP70 表达的增强,TNF- α 降低,cAMP 增高,存活率提高。Feinstein 等^[16]证实 HSP70 可与核转录因子- κ B(NF- κ B)结合而抑制其移位到细胞核,进而抑制 TNF- α 释放,表明 HSP70 在转录水平抑制 TNF- α 释放。Zensho 等^[17]通过对 N18TG2 鼠神经细胞热休克研究中发现,热处理使 cAMP 下降,恢复期 cAMP 恢复与 HSP70 表达在时间上具有很好的一致性,用热休克转录因子(HSTF)抑制剂 Quercetin 抑制 HSP70 表达后,同时也抑制了 cAMP 恢复,HSP70 通过在膜受体、G 蛋白或腺苷酸环化酶等蛋白质的折叠、装配、功能恢复中发挥分子伴侣作用,影响这些蛋白质合成,作用于心肌 β AR-AC-cAMP 信号转导途径,使 cAMP 生成增加,这可能是氯胺酮抑制 TNF- α 、升高 cAMP,保护感染心肌的途径之一。本实验中氯胺酮通过诱导 HSP70 表达加强,扰乱 TNF- α 合成的信号转导过程,使 TNF- α 合成降低。

综上所述,在本研究条件下,LPS 导致的感染性休克可引起血中 TNF- α 升高和心肌 cAMP 下降。氯胺酮通过加强心肌 HSP70 表达,抑制 LPS 介导的 TNF- α 升高及由 TNF- α 介导的 cAMP 降低,恢复心肌的 β AR-AC-cAMP 信号转导和收缩

功能,保护感染心肌,抗感染性休克。

参考文献:

- 1 Tetta C, Cavaillon J M, Camussi G, et al. Continuous plasma filtration coupled with sorbents [J]. *Kidney Int*, 1998, 66 (Suppl):S186-189.
- 2 马宏博,刘清泉,姜良铎,等.扶正排毒液对内毒素休克肺损伤家兔支气管肺泡灌洗液和血清细胞因子含量的影响[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2005, 12(6):369-372.
- 3 Gulick T, Chung M K, Pieper S J, et al. Interleukin 1 and tumor necrosis factor inhibit cardiac myocyte beta-adrenergic responsiveness [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(17):6753-6757.
- 4 Yahara I. Structure and function of heat shock proteins [J]. *Metab Dis*, 1992, 29(2):669-679.
- 5 Nomura F, Aoki M, Forbess J M, et al. Myocardial self-preservative effect of heat shock protein 70 on an immature lamb heart [J]. *Ann Thorac Surg*, 1999, 68(5):1736-1741.
- 6 McCully J D, Lotz M M, Krukenkamp I B, et al. A brief period of retrograde hyperthermic perfusion enhances myocardial protection from global ischemia: association with accumulation of HSP 70 mRNA and protein [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1996, 28(2):231-241.
- 7 Romano F D, Jones S B. Alterations in beta-adrenergic stimulation of myocardial adenylate cyclase in endotoxic rats [J]. *Am J Physiol*, 1986, 250(3 Pt 2):R358-364.
- 8 黄坤厚,张新宇,蔡虹.内毒素休克鼠模型探索[J]. *基础医学与临床*, 1994, 14(1):70.
- 9 Levitzki A. Signal transduction in hormone-dependent adenylylase [J]. *Cell Biophys*, 1988, 12:133-143.
- 10 Calogero A E, Norton J A, Sheppard B C, et al. Pulsatile activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during major surgery [J]. *Metabolism*, 1992, 41(8):839-845.
- 11 Taniguchi T, Shibata K, Yamamoto K. Ketamine inhibits endotoxin-induced shock in rats [J]. *Anesthesiology*, 2001, 95(4):928-932.
- 12 宋学敏,李建国,王焱林,等.氯胺酮对感染性休克大鼠保护作用的研究[J]. *中国危重病急救医学*, 2004, 16(6):348-351.
- 13 Kawasaki T, Ogata M, Kawasaki C, et al. Ketamine suppresses proinflammatory cytokine production in human whole blood in vitro [J]. *Anesth Analg*, 1999, 89(3):665-669.
- 14 吴洁莹,杨皓庄,张穗梅,等.氯胺酮对腹腔感染脓毒症小鼠死亡率和肿瘤坏死因子- α 的影响[J]. *中国危重病急救医学*, 2002, 14(5):273-275.
- 15 Meldrum D R, Meng X, Shames B D, et al. Liposomal delivery of heat-shock protein 72 into the heart prevents endotoxin-induced myocardial contractile dysfunction [J]. *Surgery*, 1999, 126(2):135-141.
- 16 Feinstein D L, Galea E, Aquino D A, et al. Heat shock protein 70 suppresses astroglial-inducible nitric oxide synthase expression by decreasing NF- κ B activation [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(3):17724-17732.
- 17 Zensho H, Nishida A, Shimizu M, et al. Heat shock protein 72 restores cyclic AMP accumulation after heat shock in N18TG2 cells [J]. *Brain Res*, 1998, 790(1-2):278-283.

(收稿日期:2006-10-21 修回日期:2007-04-28)

(本文编辑:李银平)

人工胶体液对感染性休克犬血管通透性及 血管内皮细胞生长因子的影响

(正文见270页)



注: A: 正常; B: 休克后; C: 生理盐水复苏组; D: 高渗盐水复苏组; E: 中分子羟乙基淀粉(HES130/0.4)复苏组;

图1 各组肺组织VEGF阳性表达变化(免疫组化, ×300)

Figure 1 Change of positive expression of VEGF of lung tissues in each group (immunohistochemistry, ×300)

粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子对失血性休克诱导 急性肺损伤小鼠器官组织核转录因子- κ B活化的影响

(正文见295页)



1: NCG组; 2: PCG组; 3: HSI组;
4: HSI0组; 5: DEX组

图1 失血性休克后4 h肾组织
NF- κ B活性的变化

Figure 1 Change of NF- κ B
activity in kidney at 4 hours after
hemorrhagic shock

1: NCG组; 2: PCG组; 3: DEX组;
4: HSI0组; 5: HSI组

图2 失血性休克后4 h肝组织
NF- κ B活性的变化

Figure 2 Change of NF- κ B
activity in liver at 4 hours after
hemorrhagic shock

1: DEX组; 2: HSI0组; 3: HSI组;
4: NCG组; 5: PCG组

图3 失血性休克后4 h心组织
NF- κ B活性的变化

Figure 3 Change of NF- κ B
activity in heart at 4 hours after
hemorrhagic shock

1: PCG组; 2: DEX组; 3: HSI组;
4: HSI0组; 5: NCG组

图4 失血性休克后4 h肺组织
NF- κ B活性的变化

Figure 4 Change of NF- κ B
activity in lung at 4 hours after
hemorrhagic shock

氯胺酮对感染性休克大鼠抗休克作用及其相关机制研究

(正文见303页)

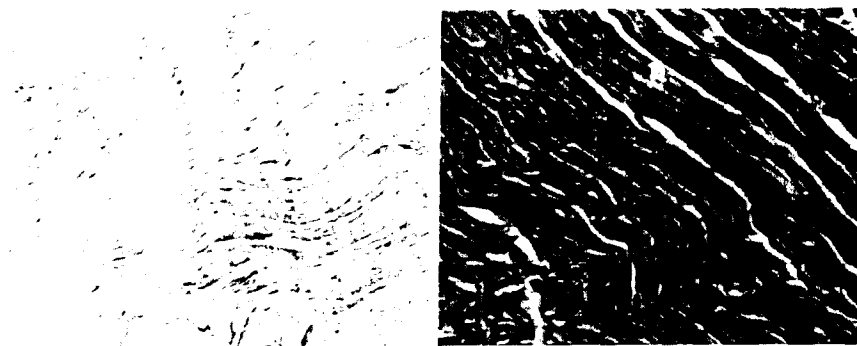


图1 对照心肌组织HSP70阳性表达(SP, ×200) 图2 模型组心肌组织HSP70阳性表达(SP, ×200)
Figure 1 Positive expression of myocardial
HSP70 in control group (SP, ×200) Figure 2 Positive expression of myocardial
HSP70 in model group (SP, ×200)

图3 氯胺酮组心肌组织HSP70阳性表达(SP, ×200)
Figure 3 Positive expression of myocardial
HSP70 in ketamine group (SP, ×200)