

· 研究报告 ·

右美托咪定对脓毒症大鼠早期和晚期炎症介质表达的影响

徐丽 鲍红光 张勇 王晓亮 方兆晶

【关键词】 右美托咪定; 脓毒症; 高迁移率族蛋白 B1; 肿瘤坏死因子- α ; 白细胞介素-6

脓毒症是目前引起重症监护病房(ICU)患者死亡的主要原因之一^[1]。近些年, 尽管人们对脓毒症发病机制进行了一定的研究, 也提出了针对其早期炎症因子如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)的靶点治疗, 可是脓毒症的病死率仍高达 50% 左右, 严重威胁着人们的健康^[2]。右美托咪定(DEX)是一种高选择性的 α_2 -肾上腺素能受体激动剂, 具有镇静、镇痛、遗忘、抗焦虑、无呼吸抑制等特点^[3]。有研究报道, DEX 可降低脓毒症大鼠的死亡率并抑制其炎症反应^[4-6], 但有关 DEX 对脓毒症大鼠晚期炎症因子高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1)影响的研究报道甚少。本研究中拟采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备大鼠脓毒症模型, 并用 DEX 进行干预, 评价 DEX 对 TNF- α 、IL-6 和 HMGB1 的影响。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备: 清洁级健康雄性 Wistar 大鼠 136 只, 10~14 周龄, 体重 250~300 g, 由南京医科大学附属南京医院动物实验中心提供, 合格证号: SCXK(苏)2009-0001。采用 CLP 建立脓毒症动物模型。对照组大鼠剖腹后仅分离盲肠, 不结扎和穿孔。术后皮下注射生理盐水 10 ml/kg 补充体液。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.2 动物分组及处理: 136 只大鼠按随机数字表法分为对照组、脓毒症模型组、DEX 预处理组及 DEX 后处理组 4 组, 每组 34 只。DEX 两组大鼠分别于制模前、制模后 2 h 腹腔注射 DEX 40 μ g/kg(江苏恒瑞医药生产); 对照组、脓毒症模型组

均给予等量生理盐水。各组分别于术后 4、8、12 和 24 h 随机活杀 6 只大鼠并留取血和肺组织标本; 每组剩余的 10 只大鼠用来观察术后 7 d 的死亡率, 同时绘制大鼠的生存曲线。观察期间死亡的动物被排除并重新制模补充。

1.3 标本采集与处理: 腹腔注射戊巴比妥麻醉大鼠, 开胸经心脏取血 5 ml, 离心取血清, 同时留取肺组织约 100 mg, 于 -80 $^{\circ}$ C 下保存待测。

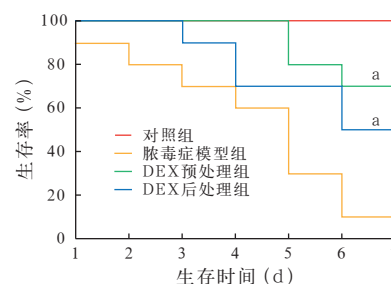
1.3.1 血清 TNF- α 、IL-6、HMGB1 水平测定: 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清 TNF- α 、IL-6、HMGB1 水平, 按试剂盒(Amersham 公司, 美国)说明书步骤进行操作。

1.3.2 肺组织 HMGB1 mRNA 表达测定: 制备肺组织匀浆, 用 TRIzol 一步法提取总 RNA, 逆转录成 cDNA, 作为实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)扩增模板。登录 GeneBank 数据库, 获得大鼠 HMGB1 以及内参照三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)mRNA 序列, 用 Primer 5.0 软件设计特异引物, 引物由上海英俊生物公司合成。PCR 检测体系: cDNA 3 μ l, 上、下游引物各 0.5 μ l(10 mmol/L), 2 $\times$ SYBR 绿色实时 PCR 混合液 12.5 μ l, 用双蒸水补齐总体积 25 μ l。扩增条件: 预变性 95 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 15 s, 58 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 15 s, 40 个循环。取各样本的临界循环数(Ct 值), 计算 HMGB1 mRNA 的相对表达量, 获得目的基因相对内参基因的表达倍数。

1.4 统计学处理: 采用 SPSS 16.0 统计软件对实验数据进行分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 均进行正态性检验及方差齐性检验, 组间比较采用单因素方差分析, 组内比较采用重复测量数据的方差分析; 采用 Kaplan-Meier 方法比较各组死亡率; 相关分析采用 Pearson 相关分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠死亡率: 对照组大鼠无死亡; 脓毒症模型组大鼠的死亡率(90%)明显高于 DEX 预处理组(30%)和 DEX 后处理组(50%, 均 P<0.05)。说明 DEX 预处理和后处理均可显著降低脓毒症大鼠的死亡率。各组大鼠生存曲线见图 1。



注: DEX: 右美托咪定; 与脓毒症模型组比较, ^aP<0.05

图 1 各组大鼠生存曲线

2.2 DEX 对脓毒症大鼠血清 TNF- α 、IL-6、HMGB1 水平的影响(图 2; 表 1): 与对照组比较, 脓毒症模型组血清 TNF- α 及 IL-6 水平均于术后 4 h 明显升高(均 P<0.05), 之后逐渐下降, 24 h TNF- α 恢复至对照组水平; HMGB1 水平于术后 8 h 显著升高, 之后逐渐升高至 24 h 达峰值(均 P<0.05)。DEX 预处理组和 DEX 后处理组各指标上升幅度明显小于脓毒症模型组(均 P<0.05), 但仍明显高于对照组(均 P<0.05)。DEX 预处理组与 DEX 后处理组间各时间点血清 TNF- α 、IL-6、HMGB1 水平比较差异无统计学意义(均 P>0.05)。

2.3 DEX 对脓毒症大鼠肺组织 HMGB1 mRNA 表达的影响(表 1): 脓毒症模型组术后 8 h 肺组织 HMGB1 mRNA 表达明显高于对照组, 随时间延长表达逐渐增加(均 P<0.05)。DEX 预处理组和 DEX 后处理组 HMGB1 mRNA 表达均显著低于脓毒症模型组(均 P<0.05); 而 DEX 预处理组和 DEX 后处理组间各时间

DOI: 10.3760/cma. j. issn.1003-0603. 2012. 09.020

作者单位: 210006 江苏, 南京医科大学附属南京医院麻醉科

通信作者: 鲍红光, Email: hongguang_bao@hotmail.com

表 1 DEX 对脓毒症大鼠术后不同时间点血清和肺组织 HMGB1 水平的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	血清 HMGB1($\mu\text{g/L}$)				肺组织 HMGB1 mRNA			
	4 h	8 h	12 h	24 h	4 h	8 h	12 h	24 h
对照组	5.52 $\pm$ 0.12	6.03 $\pm$ 0.08	6.02 $\pm$ 0.14	6.27 $\pm$ 0.23	0.32 $\pm$ 0.02	0.33 $\pm$ 0.01	0.33 $\pm$ 0.08	0.37 $\pm$ 0.06
脓毒症模型组	5.47 $\pm$ 0.21	10.03 $\pm$ 0.36 ^a	12.75 $\pm$ 0.73 ^a	15.78 $\pm$ 0.46 ^a	0.39 $\pm$ 0.07	1.73 $\pm$ 0.12 ^a	2.75 $\pm$ 0.23 ^a	3.08 $\pm$ 0.24 ^a
DEX 预处理组	5.63 $\pm$ 0.34	7.43 $\pm$ 0.61 ^{ab}	8.16 $\pm$ 0.25 ^{ab}	9.87 $\pm$ 0.42 ^{ab}	0.33 $\pm$ 0.03	0.87 $\pm$ 0.24 ^{ab}	1.01 $\pm$ 0.15 ^{ab}	1.28 $\pm$ 0.41 ^{ab}
DEX 后处理组	5.58 $\pm$ 0.15	8.01 $\pm$ 0.38 ^{ab}	8.53 $\pm$ 0.52 ^{ab}	10.84 $\pm$ 0.47 ^{ab}	0.34 $\pm$ 0.11	1.01 $\pm$ 0.09 ^{ab}	1.23 $\pm$ 0.32 ^{ab}	1.19 $\pm$ 0.34 ^{ab}

注:DEX:右美托咪定,HMGB1:高迁移率族蛋白 B1;与对照组比较,^a $P<0.05$;与脓毒症模型组比较,^b $P<0.05$

HMGB1 mRNA 表达差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。

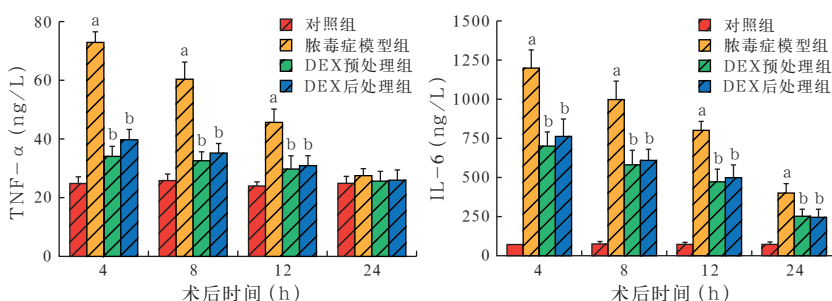
2.4 血清 HMGB1 与肺组织 HMGB1 mRNA 表达的相关性分析: Pearson 直线相关分析表明,血清 HMGB1 水平与肺组织 HMGB1 mRNA 表达呈显著正相关($r=0.973, P<0.05$)。

3 讨论

细胞因子在脓毒症的发病机制中起着关键作用,TNF- α 和 IL-6 作为早期炎症介质,被普遍认为是引起脓毒症器官功能障碍和死亡的“核心因子”^[7]。大量研究证实,TNF- α 是脓毒症发展过程中最早出现的细胞因子之一,能够诱发细胞因子级联反应,刺激 IL-6、IL-1 等释放,引起一系列的炎症连锁反应;血清 TNF- α 水平与脓毒症的严重程度密切相关^[8]。而另据文献报道,IL-6 水平对脓毒症的死亡率亦有很好的预示作用,阻滞 IL-6 可以提高 CLP 致脓毒症大鼠的存活率^[9-10]。Wang 等^[11]于 1999 年首次提出,HMGB1 作为关键的晚期炎症介质参与了脓毒症的发病过程,是目前脓毒症重要的控制治疗靶点。在脓毒症的临床研究和动物实验中,血清 HMGB1 水平升高,且升高程度与脓毒症的严重程度及预后密切相关^[11-12]。Ulloa 和 Tracy^[13]研究脓毒症动物模型发现,采用 HMGB1 拮抗剂能够阻滞脓毒症继发多器官功能衰竭,改善脓毒症动物的生存率。

本研究显示:脓毒症早期血清 TNF- α 和 IL-6 水平显著升高,以 CLP 术后 4 h 最为显著,随后逐渐下降;术后 8、12、24 h 血清 HMGB1 含量和肺组织中 HMGB1 mRNA 表达水平均较对照组明显升高。直线相关分析显示,大鼠血清 HMGB1 含量与肺组织 HMGB1 mRNA 表达水平呈显著正相关。

DEX 是一种新型的高选择性 $\alpha 2$ -肾上腺素能受体激动剂,目前已被用于



注:DEX:右美托咪定,TNF- α :肿瘤坏死因子- α ,IL-6:白细胞介素;

与对照组比较,^a $P<0.05$;与脓毒症模型组比较,^b $P<0.05$

图 2 DEX 对脓毒症大鼠术后不同时间点血清 TNF- α 、IL-6 浓度的影响

重症患者,具有良好的镇静和镇痛作用,且能够维持患者正常免疫反应^[14]。近年来研究表明,DEX 可以抑制脓毒症的炎症反应,减少 TNF- α 、IL-6 等炎症因子的表达。Hofer 等^[15]发现 DEX 可以明显抑制 CLP 诱导的 TNF- α 、IL-6 产生,改善脓毒症大鼠的预后。Taniguchi 等^[5]研究表明,DEX 可以减少大鼠对内毒素的炎症反应,从而改善预后。本研究结果发现,DEX 应用于脓毒症大鼠,无论是预处理还是后处理均可显著改善其生存率,早期炎症介质 TNF- α 、IL-6 及晚期炎症介质 HMGB1 的血清水平和肺组织 HMGB1 mRNA 表达均明显降低,表明 DEX 通过抑制早期炎症介质 TNF- α 、IL-6 及晚期炎症介质 HMGB1 的表达而发挥抗炎作用,从而改善脓毒症大鼠的生存率。

DEX 抑制炎症反应的机制尚不清楚。Gu 等^[16]发现 DEX 可以抑制 Toll 样受体 4(TLR4)介导的炎症通路。HMGB1 作为 TLR4 的内源性受体,与 TLR4 结合后激活髓样分化因子 88(MyD88)依赖和非依赖性两条信号转导通路,从而进一步激活下游信号转导分子丝裂素活化蛋白激酶(MAPKs)以及核转录因子- κ B(NF- κ B)^[17-18]。通过这些信号通路,可以诱导炎症因子如 TNF- α 、IL-6 等的产生

和释放,而这些炎症因子又能够诱发 HMGB1 的合成与释放,因此在前炎症因子与 HMGB1 之间形成了正反馈机制。而本实验中发现,DEX 不但下调了脓毒症大鼠血清 TNF- α 、IL-6 的水平,同时减少了血清和肺组织中 HMGB1 的表达,因而推测 DEX 通过抑制 HMGB1 表达,从而抑制 TLR4 介导的一系列炎症反应。

参考文献

- [1] 姚咏明,盛志勇.脓毒症研究的若干新动态.中国危重病急救医学,2000,12:323-325.
- [2] 梁华平,姚咏明,王正国.关注脓毒症及其结局的预测研究.中国危重病急救医学,2005,17:709-711.
- [3] Phan H, Nahata MC. Clinical uses of dexmedetomidine in pediatric patients. Paediatr Drugs, 2008, 10:49-69.
- [4] Sezer A, Memiş D, Usta U, et al. The effect of dexmedetomidine on liver histopathology in a rat sepsis model: an experimental pilot study. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg, 2010, 16:108-112.
- [5] Taniguchi T, Kidani Y, Kanakura H, et al. Effects of dexmedetomidine on mortality rate and inflammatory responses to endotoxin-induced shock in rats. Crit Care Med, 2004, 32:1322-1326.

- [6] Memiş D, Hekimoğlu S, Vatan I, et al. Effects of midazolam and dexmedetomidine on inflammatory responses and gastric intramucosal pH to sepsis, in critically ill patients. *Br J Anaesth*, 2007, 98:550-552.
- [7] Wang H, Vishnubhakat JM, Bloom O, et al. Proinflammatory cytokines (tumor necrosis factor and interleukin 1) stimulate release of high mobility group protein-1 by pituicytes. *Surgery*, 1999, 126:389-392.
- [8] Ebong S, Call D, Nemzek J, et al. Immunopathologic alterations in murine models of sepsis of increasing severity. *Infect Immun*, 1999, 67:6603-6610.
- [9] Riedemann NC, Neff TA, Guo RF, et al. Protective effects of IL-6 blockade in sepsis are linked to reduced C5a receptor expression. *J Immunol*, 2003, 170:503-507.
- [10] Remick DG, Bolgos GR, Siddiqui J, et al. Six at six: interleukin-6 measured 6 h after the initiation of sepsis predicts mortality over 3 days. *Shock*, 2002, 17:463-467.
- [11] Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*, 1999, 285:248-251.
- [12] 邵义明, 姚华国, 梁小仲, 等. 高迁移率族蛋白 B1 表达水平与小鼠脓毒症严重程度及预后关系的实验研究. *中国危重病急救医学*, 2006, 18:668-672.
- [13] Ulloa L, Tracey KJ. The "cytokine profile": a code for sepsis. *Trends Mol Med*, 2005, 11:56-63.
- [14] 黄青青. 右美托咪定在重症监护病房中的应用. *中国危重病急救医学*, 2010, 22:578-580.
- [15] Hofer S, Steppan J, Wagner T, et al. Central sympatholytics prolong survival in experimental sepsis. *Crit Care*, 2009, 13:R11.
- [16] Gu J, Sun P, Zhao H, et al. Dexmedetomidine provides renoprotection against ischemia-reperfusion injury in mice. *Crit Care*, 2011, 15:R153.
- [17] Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4:499-511.
- [18] Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*, 2001, 2:675-680.

(收稿日期:2012-03-28)

(本文编辑:李银平)

·读者·作者·编者·

本刊常用的不需要标注中文的缩略语

急性肺损伤(ALI)	白细胞介素(IL)	原位末端缺刻标记法(TUNEL)
急性呼吸窘迫综合征(ARDS)	核转录因子- κ B(NF- κ B)	链霉素-亲和素-生物素-过氧化物酶法(SABC)
急性冠脉综合征(ACS)	C-反应蛋白(CRP)	十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)
全身炎症反应综合征(SIRS)	降钙素原(PCT)	天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(caspase)
多器官功能障碍综合征(MODS)	动脉血二氧化碳分压(PaCO ₂)	高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)
多器官功能衰竭(MOF)	动脉血氧分压(PaO ₂)	胱抑素 C(CysC)
呼吸机相关性肺炎(VAP)	平均动脉压(MAP)	β -肌动蛋白(β -actin)
慢性阻塞性肺疾病(COPD)	肺动脉楔压(PAWP)	三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)
急性肾损伤(AKI)	心排血量指数(CI)	苏木素-伊红染色(HE 染色)
急性肾衰竭(ARF)	脉搏(经皮)血氧饱和度(SpO ₂)	肠内营养(EN)
重症监护病房(ICU)	氧合指数(PaO ₂ /FiO ₂ , OI)	肠外营养(PN)
急性生理学与慢性健康状况评分系统(APACHE)	一氧化氮(NO)	全胃肠外营养(TPN)
格拉斯哥昏迷评分(GCS)	一氧化碳(CO)	美国食品与药物管理局(FDA)
格拉斯哥预后评分(GOS)	人脐静脉内皮细胞(HUVEC)	世界卫生组织(WHO)
序贯器官衰竭评分(SOFA)	肾小球滤过率(GFR)	美国心脏病学会(ACC)
简化急性生理学评分系统(SAPS)	肌酐清除率(CCr)	美国胸科医师协会(ACCP)
器官功能衰竭评分(OSF 评分)	丙氨酸转氨酶(ALT)	危重病医学会(SCCM)
多器官功能障碍评分(MOD 评分)	天冬氨酸转氨酶(AST)	欧洲危重病医学会(ESICM)
损伤严重程度评分(ISS)	异硫氰酸荧光素(FITC)	美国心脏协会(AHA)
重症监护谵妄筛查量表(ICDSC)	四甲基偶氮唑盐(MTT)	欧洲肠外肠内营养学会(ESPEN)
心肺复苏(CPR)	脂多糖(LPS)	连续性肾脏替代治疗(CRRT)
脉搏指示连续心排血量(PiCCO)	支气管肺泡灌洗液(BALF)	连续性静-静脉血液滤过(CVVH)
早期目标导向治疗(EGDT)	磷酸盐缓冲液(PBS)	受试者工作特征曲线(ROC 曲线)
磁共振成像(MRI)	乙二胺四乙酸(EDTA)	弥散性血管内凝血(DIC)
随机对照临床试验(RCT)	3,3'-二氨基联苯胺(DAB)	最低抑菌浓度(MIC)
盲肠结扎穿孔术(CLP)	逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)	
肿瘤坏死因子(TNF)	蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)	
	酶联免疫吸附试验(ELISA)	