

· 实验研究 ·

右美托咪定对脂多糖诱导的脓毒症大鼠全身炎症反应和肺损伤的影响

邓娟 李亚春 朱涛

【摘要】 目的 观察脂多糖(LPS)对大鼠血浆和肺组织中的炎性因子和 Toll 样受体 4(TLR4)表达的影响及右美托咪定的干预作用。**方法** 雄性 SD 大鼠 40 只, 250~300 g, 随机分为四组。Control 组($n=10$)生理盐水 $1 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 大鼠尾静脉泵注 6 h; DEX 组($n=10$)右美托咪定(负荷量 $6.5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 10 min; $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 维持)大鼠尾静脉泵注 6 h; LPS 组($n=10$)经大鼠尾静脉注射 7.5 mg/kg 的 LPS 后继续生理盐水泵注 6 h; LPS+DEX 组($n=10$)经大鼠尾静脉注射 7.5 mg/kg 的 LPS 后泵注右美托咪定 6 h。以 6 h 为实验终结点, 并于此时行右心室取血和肺组织标本的制备。采用 ELISA 法检测血浆 IL-1、IL-6、TNF- α 浓度, Western blot 法检测肺组织 TLR4、髓样分化因子 88(MyD88)、NF- κ B 蛋白含量; 检测大鼠肺组织湿/干比(W/D); 并用 Murakami 法评测肺损伤程度。**结果** 与 Control 组比较, LPS 组大鼠血浆 IL-1、IL-6 和 TNF- α 浓度明显升高, 肺组织中的 TLR4、MyD88、NF- κ B 蛋白含量明显升高($P<0.01$), 肺 W/D 明显升高; LPS+DEX 组上述指标差异均无统计学意义。Control 组和 DEX 组未见明显肺损伤, LPS 组肺间质水肿、炎性细胞浸润明显, LPS+DEX 组肺损伤程度明显减轻($P<0.01$)。**结论** LPS 的刺激可以明显升高大鼠血浆中炎性因子以及肺组织中 TLR4 的表达水平, 右美托咪定的干预可以减轻这一趋势, 缓解大鼠的全身炎症和肺水肿的程度。

【关键词】 脓毒症; 右美托咪定; 肺损伤; Toll 样受体-4

Pulmonary protective effects of dexmedetomidine in septic rats induced by LPS DENG Juan, LI Ya-chun, ZHU Tao. Department of Anesthesiology, Shanghai First People's Hospital of Songjiang Branch, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201600, China

Corresponding author: ZHU Tao, Email: zt19192003@163.com

【Abstract】 Objective To assess the role of intervention of dexmedetomidine in lung tissue and plasma of septic rats induced by lipopolysaccharide. **Methods** Forty SD rats weighing 250-300 g were divided into 4 groups; control group ($n=10$) with saline ($1 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) infused through the tail veins of rats for 6 h; dexmedetomidine (DEX) group ($n=10$) with dexmedetomidine, injected $6.5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ for 10 min followed by $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, continuously infused through tail veins for 6 h; lipopolysaccharide (LPS) group ($n=10$) with lipopolysaccharide (7.5 mg/kg) infused through the tail veins of rats; LPS+DEX group ($n=10$), after infusion of LPS, rats were treated with dexmedetomidine (bolus $6.5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 10 min; $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, continuous infusion) through the tail veins for 6 h. ELISA and Western blot were performed to assess the protein expression of IL-1, IL-6, TNF- α and TLR4; the wet/dry ratio (W/D) of lung tissue in each group was measured and the injury scores were recorded through the Murakami method. **Results** There was no statistical significance between the control group and DEX group in plasma level of inflammatory factors, pulmonary TLR4 expression, wet/dry ratio and injury score of lung tissues, however, compared to the control group, there was a significant elevation in the above-mentioned biomarkers, W/D and injury score of lung tissue ($P<0.01$). Compared to the control group, there was no statistical significance in the LPS+DEX group. Compared to the LPS+DEX group, the biomarkers mentioned above, W/D and injury score of lung tissues were significantly elevated in the LPS group ($P<0.01$). **Conclusion** The irritation of LPS can trigger the elevation of inflammatory factors in plasma, TLR4 expression in lung tissues in rats, while the intervention of dexmedetomidine can significantly alleviate this tendency. Dexmedetomidine can suppress the inflammatory reaction and pulmonary edema in septic rats.

【Key words】 Sepsis; Dexmedetomidine; Lung injury; Toll-like-receptor 4

基金项目:上海市医学会麻醉学分会新晨杯青年麻醉医师培育基金(2014)

作者单位:201600 南京医科大学附属松江中心医院麻醉科

通信作者:朱涛, Email: zt19192003@163.com

脓毒症是指由感染等因素诱发的全身炎症反应综合征,肺炎、急性胰腺炎、急性胆管炎等都可诱发脓毒症。研究表明脓毒症的病死率近年来已经超越心肌梗死成为重症监护病房的头号杀手^[1]。目前脓毒症的研究主要涉及炎症反应的失衡、凝血功能紊乱、免疫功能抑制以及细胞凋亡四个方面。肺脏是脓毒症时最先受到攻击的器官,脓毒症时肺损伤的发生率非常高,可达到 80%~100%,部分患者会出现急性肺损伤甚至多器官功能障碍^[2]。

在脓毒症急性肺损伤患者呼吸机支持治疗时,右美托咪定由于其镇静、镇痛、不抑制呼吸等独特的临床优势而得到广泛的应用^[3]。随着研究的深入,研究者发现右美托咪定除了镇静、镇痛作用外,还具有独特的抗炎作用,能降低呼吸机相关肺损伤,具有一定的肺保护作用^[4],但具体作用机制还不甚明了。本实验旨在研究右美托咪定在脂多糖诱导的脓毒症大鼠模型中的肺保护作用,并探索相关信号通路的蛋白含量,为右美托咪定在脓毒症治疗中的抗炎作用提供理论参考。

材料与方 法

实验试剂 右美托咪定、IL-6、TNF- α 、Toll 样受体 4(TLR4)、髓样分化因子 88(MyD88)、NF- κ B 抗体(Santa-Cruz 公司,美国),内毒素脂多糖(LPS, Santa-Cruz 公司,美国),ELISA 试剂盒(R&D system 公司,美国), β -actin 抗体、胰酶购(Sigma 公司)。

实验动物与分组 SD 雄性大鼠 40 只(上海交通大学附属第一人民医院实验动物中心提供,清洁级),体重 250~300 g,按随机数字法随机分为四组:Control 组,DEX 组,LPS 组和 DEX+LPS 组。

脓毒症大鼠模型构建 根据文献采取大鼠尾静脉置管注射 LPS 的方法建立脓毒症模型^[5],大鼠分组分笼适应性喂养,每笼 3~4 只,模拟昼夜均分环境喂养 4 d 后开始建模,术前 6 h 禁食不禁饮,30 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射,大鼠麻醉后行尾静脉置管,肝素帽封管。研究表明,一定剂量的右美托咪定的干预对脓毒症大鼠的重要脏器有着相应的保护作用^[6],预实验中采用文献中的剂量也印证了这一点,在随后的实验中选定 $6.5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 负荷量, $5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 维持量作为实验的干预剂量。置管后,Control 组按照生理需要量 $1 \text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 持续泵注生理盐水;DEX 组于 10 min 内给予 $6.5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 右美托咪定的负荷量后再以 5

$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 的速率持续泵注;LPS 组于 5 min 内泵注 7.5 mg/kg 的 LPS;DEX+LPS 组在按照 LPS 组泵注完 LPS 后,再依据 DEX 组的剂量泵注右美托咪定。根据文献^[7]和预实验结果,大鼠在尾静脉注射如上剂量的 LPS 6 h 后体内早期炎症达到高峰,因此选择 6 h 为实验终点,并于此时行右心室取血和肺组织标本的制备。

肺组织标本制备 建模 6 h 后,将胸部备皮后的大鼠除头部以外浸没于 75%的酒精中 2~3 min,消毒后置于无菌操作台上,依次切开胸部皮肤,胸骨和胸膜,充分暴露大鼠的心脏,经右心室抽取 8~10 ml 血液,4 500 r/min 离心 15 min 后,取上清液放入 -80°C 冰箱备用,再行 PBS 右心室灌洗后,取双侧肺组织置于冰上,并于右肺上叶相同部位剪取 1 cm^3 肺组织加入裂解液放置于冰上 15 min,12 000 r/min 离心 15 min 后收集上清液置于 -80°C 冰箱备用。剩余右肺统一称量重量后放入锡纸入 65°C 烤箱,24 h 后取出再次称重,计算肺湿/干比(W/D)。左肺浸入戊二醛,制备 HE 染色切片。

采用 ELISA 双抗体夹心法检测大鼠血浆中 IL-1、IL-6 和 TNF- α 的浓度。

采用 Western blot 检测肺组织中的 TLR4、MyD88 和 NF- κ B 蛋白含量。

大鼠肺 W/D 检测 将大鼠右肺统一称量重量后放入锡纸入 65°C 烤箱,24 h 后取出再次称重,计算 W/D 值。

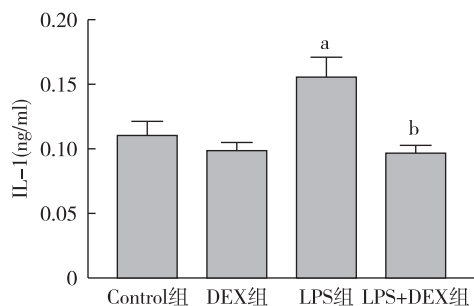
肺组织病理染色 用 4% 多聚甲醛以 30 cm H_2O 压力灌注支气管,结扎后投入 4% 的多聚甲醛溶液中固定 2~3 h。固定完全后制作 HE 染色切片,按照 Murakami 法^[8]评测肺损伤的程度。

统计分析 采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。正态分布计量资料以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 法;计数资料比较采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

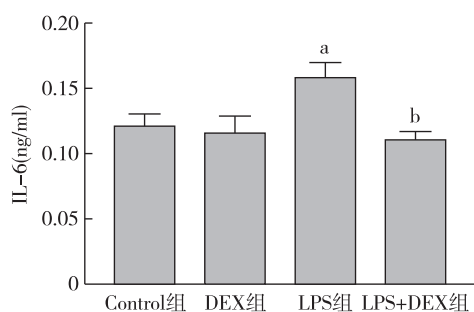
大鼠血浆中 IL-1、IL-6 和 TNF- α 浓度 与 Control 组比较,LPS 组血浆 IL-1、IL-6、TNF- α 浓度明显增加($P<0.01$);与 LPS 组比较,LPS+DEX 组 IL-1、IL-6、TNF- α 浓度明显降低($P<0.01$)(图 1~3)。

大鼠肺组织中 TLR4、MyD88 和 NF- κ B 蛋白含



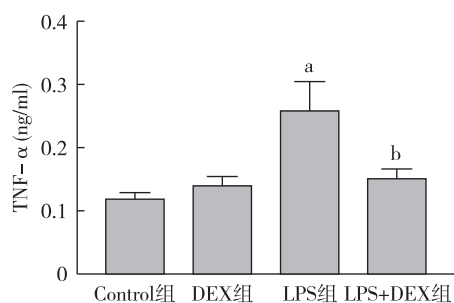
注:与 Control 组比较,^a $P < 0.01$;与 LPS 组比较,^b $P < 0.01$

图 1 四组大鼠血浆中 IL-1 浓度的比较



注:与 Control 组比较,^a $P < 0.01$;与 LPS 组比较,^b $P < 0.01$

图 2 四组大鼠血浆中 IL-6 浓度的比较



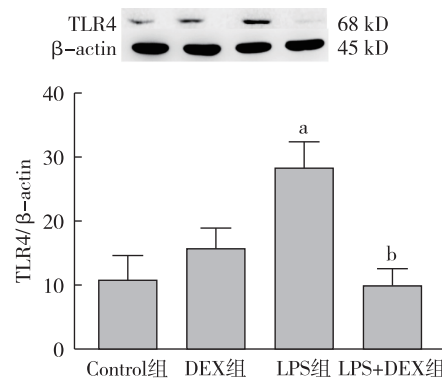
注:与 Control 组比较,^a $P < 0.01$;与 LPS 组比较,^b $P < 0.01$

图 3 四组大鼠血浆中 TNF-α 浓度的比较

量 与 Control 组比较,LPS 组肺组织 TLR4、MyD88、NF-κB 蛋白含量明显增加($P < 0.01$);与 LPS 组比较,LPS+DEX 组 TLR4、MyD88、NF-κB 蛋白含量明显下降($P < 0.01$)(图 4~6)。

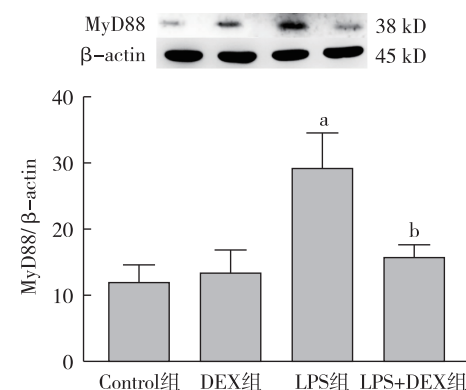
肺 W/D 与 Control 组比较,LPS 组肺 W/D 明显升高($P < 0.01$);与 LPS 组比较,LPS+DEX 组肺 W/D 明显降低($P < 0.01$)(图 7)。

肺组织学观察 Control 组未见明显的损伤表现,DEX 组与 Control 组差异无统计学意义;LPS



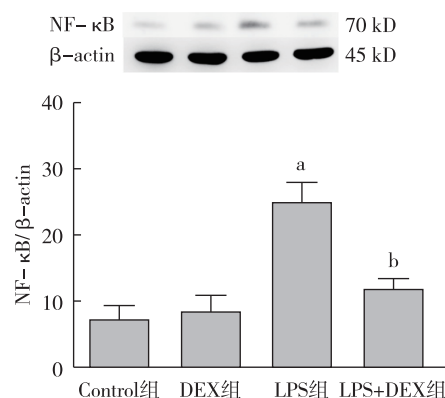
注:与 Control 组比较,^a $P < 0.01$;与 LPS 组比较,^b $P < 0.01$

图 4 四组大鼠肺组织中 TLR4 蛋白含量的比较



注:与 Control 组比较,^a $P < 0.01$;与 LPS 组比较,^b $P < 0.01$

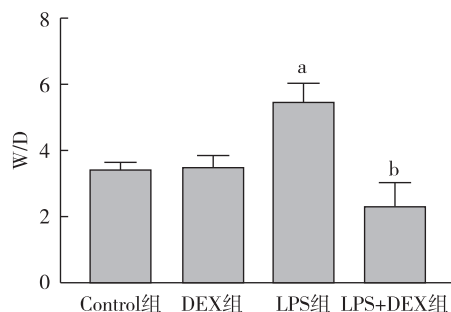
图 5 四组大鼠肺组织中 MyD88 蛋白含量的比较



注:与 Control 组比较,^a $P < 0.01$;与 LPS 组比较,^b $P < 0.01$

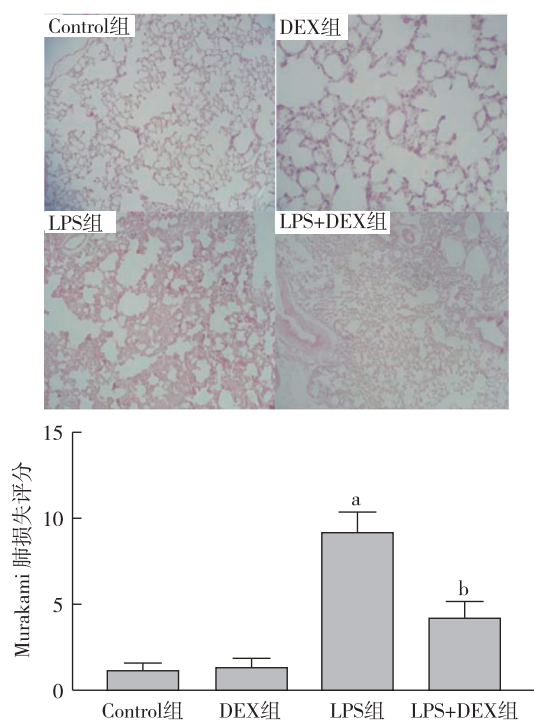
图 6 四组大鼠肺组织中 NF-κB 蛋白含量的比较

组的肺间质水肿、炎性细胞浸润明显($P < 0.01$);LPS+DEX 组的肺损伤程度明显低于 LPS 组($P < 0.01$)(图 8)。



注:与 Control 组比较,^a $P < 0.01$;与 LPS 组比较,^b $P < 0.01$

图 7 四组大鼠肺 W/D 的比较



注:与 Control 组比较,^a $P < 0.01$;与 LPS 组比较,^b $P < 0.01$

图 8 四组大鼠 Murakami 肺损伤评分的比较

讨 论

在生理状态下,机体的内环境处于稳态,抗炎和促炎反应处于动态平衡。脓毒症发生时体内这种平衡被打破,抗炎反应占据优势,并朝向失控的趋势发展,由此引起迅速而难以控制的继发性感染^[9]。在脓毒症发生发展的过程中,肺组织是其攻击的首要器官,患者出现继发的急性肺损伤,甚至多器官功能衰竭。因此抑制过度的炎症反应成为治疗脓毒症急性肺损伤的重要靶点。在本实验中,我们通过尾静脉注射 LPS 成功复制了大鼠脓毒症

模型。

在格兰阴性杆菌感染引起的脓毒症发病过程中,细菌细胞壁上的脂多糖内毒素 LPS 扮演了重要的角色,LPS 构象的变化与激活宿主细胞膜的活性有着相当程度的关联^[10]。LPS 结合蛋白(LBP)与 LPS 结合后再与胞膜上的 CD14 形成复合体而使得 NF- κ B 激酶激活,但是由于 CD14 缺乏相应的胞浆区段,不能直接向细胞内传递 LPS 的相关信号,研究发现 Toll 样受体(Toll-like receptors)是 LPS 信号向细胞内转导的门户蛋白^[11]。Toll 样受体是近年来发现的一种具有信号转导作用的跨膜蛋白家族,其在分子结构上有一细胞内区域与 IL-1 的受体有同源性,细胞内的接头蛋白更易结合到 IL-1 受体相关激酶上。TLR4 是 Toll 样受体家族中的一种,它是 LPS 的受体,主要参与 LPS 的应答。研究表明,LPS、LBP、CD14 形成的复合体与 TLR4 结合后可以通过 MyD88 途径激活 NF- κ B,其最终结果是细胞核内促炎因子编码的增加,而这其中就包括 IL-1、IL-6、TNF- α ^[12]。在本实验中发现,LPS 诱导的大鼠脓毒症模型中,其肺组织中的 TLR4 和 MyD88 的蛋白含量是增加的,这表明 TLR4-MyD88-NF- κ B 通路可能参与了 LPS 诱导的脓毒症的发生和发展。

右美托咪定是一种高选择性 α_2 受体激动药,与 α_2 受体结合后具有镇静、镇痛、抗交感、不抑制呼吸等优点,在手术麻醉以及重症监护中得到了广泛的使用。随着临床研究的深入,右美托咪定的器官保护尤其是肺保护的作用逐渐进入研究者的视野^[13]。在盲肠结扎穿孔的大鼠脓毒症模型中,右美托咪定的干预可以减少肺泡灌洗液中的 TNF- α 和 IL-6,减轻肺部炎症和肺泡壁的水肿,降低大鼠 24 h 的死亡率^[14]。Taniguchi 等^[7]研究发现,右美托咪定的干预可以减轻脓毒症大鼠血液中炎症因子的释放,降低脓毒症大鼠的死亡率,有一定的器官保护作用。本实验发现,右美托咪定的干预可以显著降低 LPS 脓毒症大鼠血浆中的 IL-1 等炎症因子的浓度,最易受累的肺组织在右美托咪定干预后炎症细胞的浸润较 LPS 模型有着显著的改善,表明右美托咪定的干预可以抑制 LPS 脓毒症大鼠的炎症因子的释放,降低肺水肿的程度和炎症细胞浸润,具有一定的肺保护作用。

右美托咪定与 α_2 受体结合后产生抗炎作用可能存在下列机制:(1)右美托咪定与 α_2 受体结合后可抑制肾素的分泌,从而减少 RAS 系统过度激活,

间接使得肺组织中的 TLR4 下调,从而减少下游炎症因子的蛋白合成;(2)右美托咪定激活 α_2 受体后,通过一系列复杂的细胞内信号通路直接影响 TLR4 的表达^[15]。临床研究^[16]和动物实验^[17]都发现, NF- κ B 信号通路的激活会出现各级水平的炎症信号的放大, NF- κ B 在脓毒症的发生、发展和转归中扮演了非常重要的角色,包括右美托咪定在内的 α_2 受体激动剂下调 NF- κ B 结合活性可能是其发挥抗炎和器官保护作用的一个重要机制。本研究结果表明,右美托咪定可能通过对 TLR4-MyD88-NF- κ B 通路的调控抑制大鼠脓毒症模型的炎症反应进一步失控。近期有研究表明,在小鼠脓毒症模型中,右美托咪定对小鼠巨噬细胞炎症蛋白的调控可能是通过 TLR4/NF- κ B/MAPK 通路发挥其抗炎作用的^[18],这一结果在其他实验模型中是否可以重现还需进一步研究。

综上所述,右美托咪定可能通过参与调节 TLR4-MyD88-NF- κ B 通路降低小鼠 LPS 诱导的脓毒症模型大鼠体内炎症因子的释放,从而减轻肺组织的炎症和水肿,具有一定的肺保护作用。这种保护作用是 α_2 受体激动后直接通过复杂的细胞内信号转导调控 TLR4 的表达抑或是通过胞外因子的间接调控还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Herridge MS, Angus DC. Acute lung injury—affecting many lives. *N Engl J Med*, 2005, 353(16): 1736-1738.
- [2] Fuller BM, Mohr NM, Dettmer M, et al. Mechanical ventilation and acute lung injury in emergency department patients with severe sepsis and septic shock: an observational study. *Acad Emerg Med*, 2013, 20(7): 659-669.
- [3] Riker RR, Shehabi Y, Bokesch PM, et al. Dexmedetomidine vs midazolam for sedation of critically ill patients: a randomized trial. *JAMA*, 2009, 301(5): 489-499.
- [4] Yang CL, Chen CH, Tsai PS, et al. Protective effects of dexmedetomidine-ketamine combination against ventilator-induced lung injury in endotoxemia rats. *J Surg Res*, 2011, 167(2): e273-e281.
- [5] Brauer RB, Gegenfurtner C, Neumann B, et al. Endotoxin-induced lung inflammation is independent of the complement membrane attack complex. *Infect Immun*, 2000, 68(3): 1626-1632.
- [6] 李欣, 李景辉. 右美托咪定对脓毒症大鼠高迁移率族蛋白 B1 的作用. *中南大学学报(医学版)*, 2015, 40(9): 987-992.
- [7] 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(6): 1322-1326.
- [8] Murakami K, McGuire R, Cox RA, et al. Heparin nebulization attenuates acute lung injury in sepsis following smoke inhalation in sheep. *Shock*, 2002, 18(3): 236-241.
- [9] Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med*, 1996, 24(7): 1125-1128.
- [10] Gangloff M, Weber AN, Gay NJ. Conserved mechanisms of signal transduction by Toll and Toll-like receptors. *J Endotoxin Res*, 2005, 11(5): 294-298.
- [11] Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 2000, 406(6797): 782-787.
- [12] Nomura F, Akashi S, Sakao Y, et al. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol*, 2000, 164(7): 3476-3479.
- [13] Hofer S, Steppan J, Wagner T, et al. Central sympatholytics prolong survival in experimental sepsis. *Crit Care*, 2009, 13(1): R11.
- [14] Koca U, Olguner CG, Ergur BU, et al. The effects of dexmedetomidine on secondary acute lung and kidney injuries in the rat model of intra-abdominal sepsis. *ScientificWorldJournal*, 2013, 2013: 292687.
- [15] Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NF- κ B system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2016, 8(3): 227-241.
- [16] Bohrer H, Qiu F, Zimmermann T, et al. Role of NF- κ B in the mortality of sepsis. *J Clin Invest*, 1997, 100(5): 972-985.
- [17] Liliensiek B, Weigand MA, Bierhaus A, et al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response. *J Clin Invest*, 2004, 113(11): 1641-1650.
- [18] Verstrepen L, Bekaert T, Chau TL, et al. TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF- κ B: variations on a common theme. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(19): 2964-2978.

(收稿日期:2016-11-08)