

右美托咪定对脓毒血症大鼠外周血淋巴细胞亚群的影响

陈旻 汪笑秋 洪滢 骆松梅

[摘要] 目的 研究右美托咪定对脓毒血症大鼠外周血淋巴细胞亚群的影响。方法 选用30只健康的雄性Wistar大鼠作为实验材料,所有实验大鼠随机分为三组:右美托咪定治疗组10只、内毒素组10只和0.9%氯化钠注射液组10只。比较三组大鼠的生存率、平均动脉压(MAP)、动脉血氧分压(PaO₂)、外周血T细胞亚群的变化和Th1/Th2。结果 经过24 h后,内毒素组大鼠的生存率均低于氯化钠注射液组和右美托咪定治疗组大鼠,差异均有统计学意义(χ^2 分别=8.98、7.42, P 均<0.05),氯化钠注射液组和右美托咪定治疗组大鼠之间的生存率比较,差异无统计学意义(χ^2 =1.28, P >0.05)。三组大鼠建模后3 h、6 h、12 h及24 h的MAP及PaO₂比较,差异有统计学意义(F 分别=7.13、5.74、7.93、8.21;5.97、6.16、7.22、8.05, P 均<0.05)。氯化钠注射液组大鼠建模后1 h、2 h、3 h、6 h、12 h及24 h的Th1/Th2低于内毒素组和右美托咪定治疗组,差异均有统计学意义(t 分别=3.23、4.17、5.21、5.31、6.29、7.19、4.22、4.93、5.89、6.92、7.15、8.34, P 均<0.05)。结论 右美托咪定可以影响脓毒血症大鼠的Th1/Th2,调节细胞免疫功能并改善大鼠预后。

[关键词] 右美托咪定; 脓毒血症; 外周血淋巴细胞亚群; Th1/Th2

Effect of dexmedetomidine on the peripheral blood lymphocyte subsets in rats with sepsis CHEN Min, WANG Xiaoqiu, HONG Yan, et al. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Lishui Central Hospital, Lishui 323000, China

[Abstract] **Objective** To study the effect of dexmedetomidine on the peripheral blood lymphocyte subsets in rats with sepsis. **Methods** A total of 30 wistar rats were chosen as study objects and divided into three groups randomly: 10 rats in saline group, 10 rats in dexmedetomidine group and 10 rats in sepsis group. The survival rate, MAP, PaO₂, change of peripheral blood lymphocyte subsets and Th1/Th2 were compared among three groups. **Results** After 24 hours, the survival rate of sepsis group was significantly lower than that of saline group and dexmedetomidine group (χ^2 =8.98, 7.42, P <0.05). The survival rate between saline group and dexmedetomidine group was not statistically different (χ^2 =1.28, P >0.05). At 3-hour, 6-hour, 12-hour and 24-hour after modeling, the MAP and PaO₂ among three groups were statistically different (F =7.13, 5.74, 7.93, 8.21, 5.97, 6.16, 7.22, 8.05, P <0.05). At 1-hour, 2-hour, 3-hour, 6-hour, 12-hour and 24-hour after modeling, the Th1/Th2 of saline group were significantly lower than those in sepsis group and dexmedetomidine group (t =3.23, 4.17, 5.21, 5.31, 6.29, 7.19, 4.22, 4.93, 5.89, 6.92, 7.15, 8.34, P <0.05). **Conclusion** Dexmedetomidine can influence the Th1/Th2 in rats with sepsis, regulate the cellular immunity and improve the prognosis.

[Key words] dexmedetomidine; sepsis; peripheral blood lymphocyte subsets; Th1/Th2

脓毒血症是继发于严重创伤、感染及大手术后的一种临床综合征,可导致脓毒症休克及多器官功能障碍综合征^[1]。脓毒症发病率在近十年来一直呈上升的趋势,是重症监护病房患者的主要死亡原因之一,总体死亡率大约为30%~40%^[2]。有研究发现

一些镇静药物对全身炎症反应可产生影响^[3]。目前,右旋美托咪定药物在脓毒血症中得治疗价值引起了临床上的关注^[4]。本次研究旨在研究右美托咪定对脓毒血症大鼠外周血淋巴细胞亚群的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2015年3月在丽水市中心医院选用30只健康的雄性Wistar大鼠作为实验材料,已饲养

10~14周,平均(12.19 ± 1.82)周;体重350~390 g,平均(370.17 ± 20.19)g,所有大鼠均由浙江大学实验动物中心提供。将30只大鼠按体重进行编号和排序,使用随机数字表法将所有实验大鼠随机分为三组:右美托咪定治疗组10只、内毒素组10只和0.9%氯化钠注射液组10只。三组大鼠的周龄、体重等比较,差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。

1.2 模型构建及药物处理 将实验大鼠按照分组进行分笼(3~4只/笼),所有大鼠均进行适应性喂养3 d,模拟昼夜均分环境。大鼠经腹腔注射戊巴比妥钠30 mg/kg,颈动脉置管持续监测有创动脉血压,同时留抽取血液标本通道,并肝素帽封管。在大鼠对侧颈静脉置管连接输液器。经肛门放置温度感受器监测体温,并维持体温在 $36^{\circ}\text{C} \sim 38^{\circ}\text{C}$ 。氯化钠注射液组大鼠经颈静脉推注0.9%氯化钠注射液1.0 ml/kg后,按照 $1.0 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 的速度持续泵入0.9%氯化钠注射液,持续20~30 min;内毒素组经颈静脉推注内毒素15 mg/kg后,按照 $1.0 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 的速度持续泵入0.9%氯化钠注射液,持续20~30 min;右美托咪定治疗组推注内毒素(剂量和方法同内毒素组)后立即持续泵入右美托咪定,速度为 $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,持续20~30 min。

1.3 检测指标 ①药物处理24 h后,比较三组大鼠的生存率。②分别于建模前、建模后1 h、2 h、3 h、6 h、12 h和24 h时记录大鼠的平均动脉血压(mean artery pressure, MAP)。③大鼠外周血T淋巴细胞亚群的变化:大鼠于建模前、建模后1 h、2 h、3 h、6 h、12 h和24 h时分别经动脉血液通道抽血0.6 ml,其中0.3 ml用于血气分析,于 4°C 下离心15 min(3 000 r/min)。记录三组大鼠不同时刻的氧分压(oxygen partial pressure, PaO_2)。采用WBC1083-大鼠外周血白细胞分离液试剂盒(由上海研谨生物科技有限公司生产)分离大鼠血中的白细胞,采用流式细胞术检测三组大鼠 CD^{3+} 、 CD^{4+} 及 CD^{8+} 细胞比例的变化并计算不同时刻 $\text{CD}^{4+}/\text{CD}^{8+}$ 比值,并分离 $\text{CD}^{3+}/\text{CD}^{4+}$ 阳性的淋巴细胞。操作严格按照BD淋巴细胞亚群检测试剂盒说明书执行。③大鼠外周血Th1/Th2变化:将分离出的 CD^{4+} 细胞用磷酸盐缓冲液进行漂洗,同时采用干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)和白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)分别标记为Th1细胞和Th2细胞。采用流式细胞术计算Th1/Th2比值。

1.4 统计学方法 采用SPSS 17.0软件进行分析。计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。三组大鼠的

生存率比较采用 χ^2 检验。不同时刻的T淋巴细胞亚群变化及Th1/Th2比较采用重复测量的方差分析,两两比较采用LSD- t 检验。设 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组大鼠的生存率比较 经过24 h后,氯化钠注射液组大鼠生存率为100%,内毒素组大鼠生存率为30.00%,右美托咪定治疗组大鼠生存率为90.00%,三组大鼠的生存率有统计学差异($\chi^2=14.67$, $P < 0.05$)。内毒素组大鼠的生存率均低于氯化钠注射液组和右美托咪定治疗组大鼠,差异均有统计学意义(χ^2 分别=8.98、7.42, P 均 < 0.05),氯化钠注射液组和右美托咪定治疗组大鼠之间的生存率比较,差异无统计学意义($\chi^2=1.28$, $P > 0.05$)。

2.2 三组大鼠的平均动脉压及血气分析结果变化 见图1

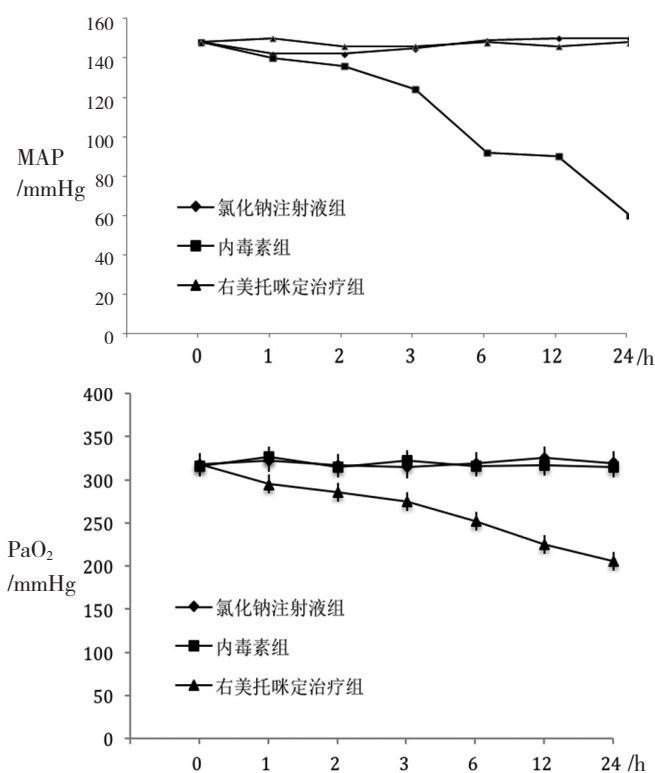


图1 三组大鼠的MAP及 PaO_2 变化

由图1可见,三组大鼠不同时刻的MAP及 PaO_2 的,差异均有统计学意义(F 分别=7.13、5.74、7.93、8.21;5.97、6.16、7.22、8.05, P 均 < 0.05)。右美托咪定治疗组大鼠在3 h、6 h、12 h、24 h的MAP及 PaO_2 较建模前明显降低,差异均有统计学意义(t 分别=4.10、4.21、4.58、5.07;4.15、4.75、5.17、6.32, P 均 < 0.05),氯化钠注射液组在1 h、2 h、3 h、6 h、12 h及24 h

MAP及PaO₂与造模前比较,差异均无统计学意义(t 分别=0.31、0.74、1.15、1.64、1.43、1.37;0.94、0.75、1.12、1.07、0.56、1.45, P 均>0.05),内毒素组在1 h、2 h、3 h、6 h、12 h及24 h MAP及PaO₂与造模前比较,差异均无统计学意义(t 分别=1.19、0.87、1.12、0.98、0.74、1.07;1.14、0.56、1.07、0.82、0.96、1.15, P 均>0.05)。

2.3 三组大鼠的T淋巴细胞亚群变化见图2

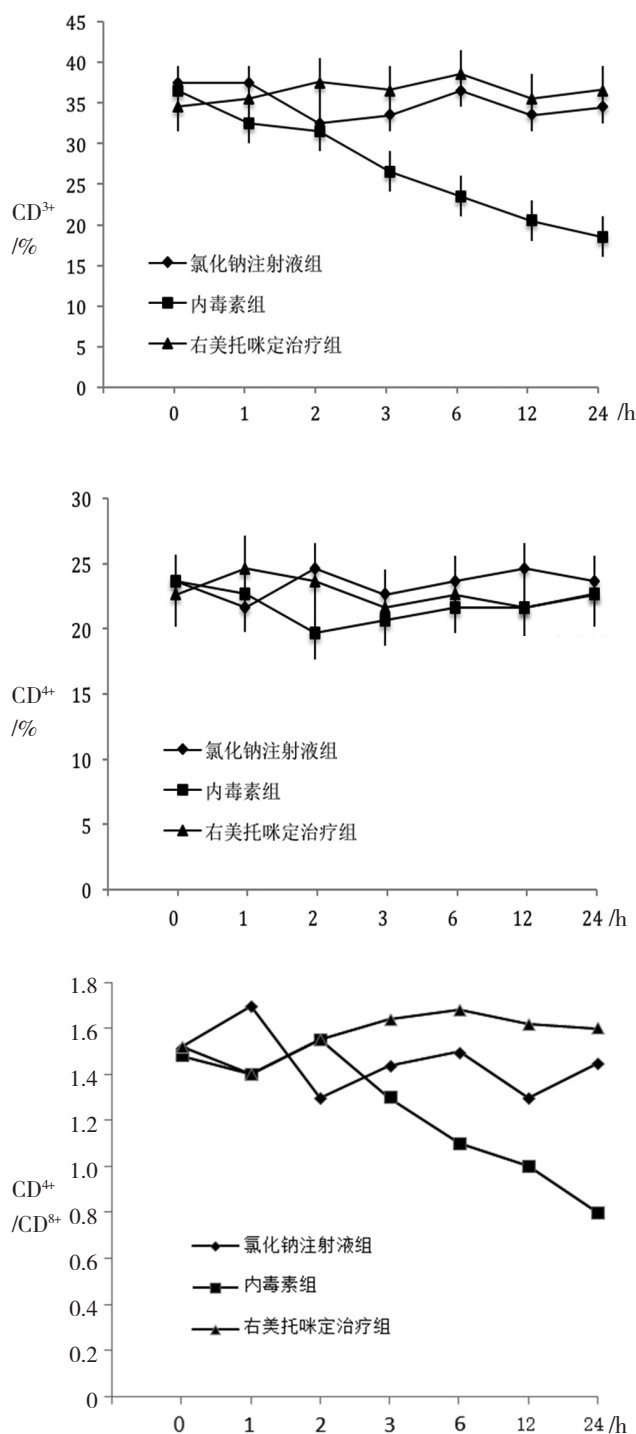


图2 三组大鼠的T细胞亚群分布

由图2可见,三组大鼠1 h、2 h、3 h、6 h、12 h及24 h不同时刻的CD3⁺和CD4⁺/CD8⁺的比较,差异均有统计学意义(F 分别=5.32、4.79、5.76、4.88、4.14、5.31;5.82、4.98、5.93、6.11、6.14、6.31, P 均<0.05)。内毒素组大鼠的1 h、2 h、3 h、6 h、12 h及24 h CD3⁺、CD4⁺和CD4⁺/CD8⁺低于氯化钠注射液组,差异均有统计学意义(t 分别=4.02、4.23、4.21、4.91、4.81、4.02, P 均<0.05)。

2.4 三组大鼠的Th1/Th2变化见图3

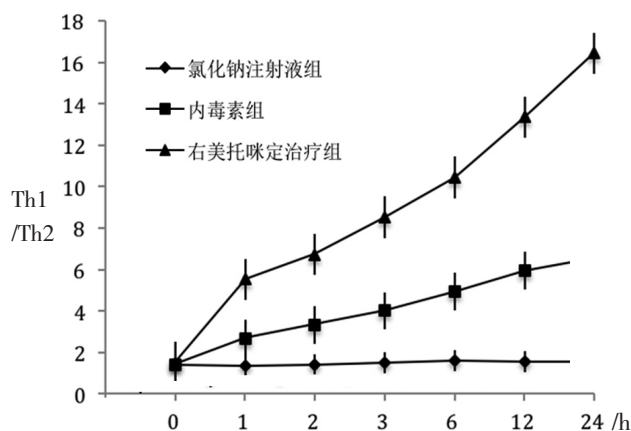


图3 三组大鼠的Th1/Th2变化

由图3可见,氯化钠注射液组大鼠1 h、2 h、3 h、6 h、12 h及24 h的Th1/Th2低于内毒素组和右美托咪定治疗组,差异均有统计学意义(t 分别=3.23、4.17、5.21、5.31、6.29、7.19;4.22、4.93、5.89、6.92、7.15、8.34, P 均<0.05)。

3 讨论

目前,严重的脓毒血症和感染性休克是增加患者死亡率的重要并发症之一^[5],该疾病的病因和机制较为复杂:细菌的内毒素可以直接或间接触发机体的炎症反应,导致免疫功能紊乱、高代谢状态和多器官功能损害,造成脓毒血症^[6]。本次研究中采取内毒素注射的方式构建脓毒血症大鼠模型。右旋美托咪定为美托咪定的右旋异构体,可通过激动中枢神经系统 α 2受体最密集的区域—脑干蓝斑,具有抗交感、镇静、催眠和镇痛的作用^[7]。

T淋巴细胞亚群的分布是反应机体细胞免疫功能的重要指标之一,不同亚群细胞的平衡对维持正常免疫功能具有重要的意义。CD3⁺亚群包括外周血所有的成熟T细胞,代表细胞免疫的整体水平。本次研究显示,内毒素组大鼠的CD3⁺比重低于氯化钠注射液组(P <0.05),说明发生脓毒症时大鼠的细胞免疫功能降低。而右美托咪定治疗组大鼠不同时刻的细胞免疫功能与正常大鼠相近。正常情况下,CD4⁺/CD8⁺

接近1.5~2.0, CD^{4+}/CD^{8+} 下降提示细胞免疫功能减弱,预后不良^[8,9]。本次研究中,内毒素组大鼠的生存率明显低于右美托咪定治疗组($P<0.05$),说明右美托咪定可以改善脓毒血症大鼠的生存率。

CD^{4+} 细胞又称T辅助(Th)细胞。该类细胞可以通过分泌细胞因子调节免疫反应。Th1细胞分泌细胞因子 $INF-\gamma$,激活巨噬细胞和细胞毒性T细胞,产生“促炎反应”^[10]。Th2细胞产生“抗炎反应”,并分泌细胞因子IL-4,协同激活B淋巴细胞^[11]。发生脓毒血症时,机体炎症反应的同时伴有抗炎反应发生,且早期(24 h内)以炎症反应为主,Th1的上升速度高于Th2,故内毒素组和右美托咪定治疗组的Th1/Th2均明显高于氯化钠注射液组。发生脓毒血症时,机体强烈地炎症反应可以导致淋巴细胞凋亡,而淋巴细胞凋亡可以诱导Th1细胞向Th2细胞转化,影响Th1/Th2,故内毒素组的Th1/Th2比例低于右美托咪定治疗组大鼠,这一结果与邓丽静等^[12]的研究结果相符。但由于内毒素大鼠模型死亡的主要原因是为呼吸循环衰竭,既往研究对Th1/Th2与呼吸衰竭的相关性报道较少,但临床研究认为呼吸循环衰竭患者存在细胞免疫功能的紊乱;Th1细胞释放大量的“促炎因子”可能造成重要脏器的损伤,但具体机制需要进一步证明,且内毒素组大鼠在短期内即可达到较高的死亡率。但是本次研究存在一定的局限性:本次研究局限于建模24 h内,对于后期的淋巴细胞亚群变化未进行明确的研究。

综上所述,右美托咪定可以影响脓毒血症大鼠的Th1/Th2细胞比例,调节细胞免疫功能并改善大鼠预后。其原因可能是右美托咪定可以选择性的激动巨噬细胞表面的肾上腺素能受体,促进细胞分泌IL-12并诱导Th1细胞的产生,升高Th1/Th2的比例;右美托咪定同时通过负反馈作用抑制去甲肾上腺素的释放,从而减轻部分炎症反应的放大,降低淋巴细胞凋亡率。

参考文献

- 1 Vincent JL, Opal SM, Marshall JC, et al. Sepsis definitions: time for change[J]. Lancet, 2013, 381(9868): 774-775.
- 2 Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012[J]. Intensive Care Med, 2013, 39(2): 165-228.
- 3 Rauch PJ, Chudnovskiy A, Robbins CS, et al. Innate response activator B cells protect against microbial sepsis[J]. Science, 2012, 335(6068): 597-601.
- 4 纪木火, 吴晶, 李仁奇, 等. 右旋美托咪啶对脓毒血症大鼠急性肺损伤的影响[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2011, 5(21): 6434-6436.
- 5 耿延青. 脓毒症患者血中 $CD^{4+}CD^{25+}$ 调节性T细胞水平与机体细胞免疫状态的相关性研究[J]. 中国医药导报, 2015, 12(3): 7-10, 23.
- 6 Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach[J]. Lancet Infect Dis, 2013, 13(3): 260-268.
- 7 周晨亮, 周清泉, 周青山, 等. 咪达唑仑和右美托咪定对危重脓毒血症患者的炎症反应和胃黏膜pH值的影响[J]. 临床外科杂志, 2013, 21(12): 965-967.
- 8 钟柳君, 曾从丽, 陈齐兴, 等. 铁调素基因干扰对脓毒症小鼠淋巴细胞凋亡的影响[J]. 全科医学临床与教育, 2014, 12(5): 491-494.
- 9 郑文娟, 斯小水, 何建新, 等. 持续静脉-静脉血液滤过联合血液灌流在重症脓毒血症患者治疗中对炎症因子及器官功能的影响[J]. 全科医学临床与教育, 2014, 12(6): 619-622.
- 10 Wang Y, Wang W, Gong F, et al. Evaluation of intravenous immunoglobulin resistance and coronary artery lesions in relation to Th1/Th2 cytokine profiles in patients with Kawasaki disease[J]. Arthritis Rheu, 2013, 65(3): 805-814.
- 11 Yu W, Du H, Fu Q, et al. The influence of Th1/Th2 and $CD4$ regulatory T cells of mesenteric lymph nodes on systemic lipopolysaccharide[J]. Pol J Pathol, 2014, 65(2): 125-129.
- 12 邓丽静, 王岚, 王波, 等. 右美托咪定对脓毒症大鼠炎症反应和淋巴细胞凋亡的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2012, 24(9): 558-561.

(收稿日期 2016-09-09)

(本文编辑 蔡华波)