

# 不同剂量右美托咪定对脓毒症大鼠早期免疫调节的影响

马燕 于湘友

830054 乌鲁木齐, 新疆医科大学第一附属医院重症医学科

通信作者: 马燕, Email: 82902823@qq.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2016.09.011

**【摘要】目的** 通过对盲肠结扎穿孔 (CLP) 后的大鼠输注不同剂量右美托咪定来评估其免疫调节作用。**方法** 48 只盲肠结扎穿孔 (CLP) 后的 Wistar 大鼠随机 (随机数字法) 分为四组: (1) 盲肠结扎穿孔组 (CLP 组); (2) 2.5  $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{h})$  右美托咪定治疗组 (DEX2.5 组); (3) 5  $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{h})$  右美托咪定治疗组 (DEX5.0 组); (4) 10  $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{h})$  右美托咪定治疗组 (DEX10.0 组)。监测 CLP 术后 1 h、3 h 及 5 h 的 HLA-DR 及细胞因子: IL-4、IL-6、IL-10 及 TNF- $\alpha$  变化, 同时监测平均动脉压 (MAP)、心率 (HR), 并计算 24 h 病死率。**结果** 右美托咪定治疗组 (包括 DEX2.5 组, DEX5.0 组, DEX10.0 组), 各组间在 HLA-DR 水平、炎性介质水平、平均动脉压 (MAP) 及心率 (HR) 均无明显变化。与 CLP 组比较, 右美托咪定治疗组 (包括 DEX2.5 组, DEX5.0 组, DEX10.0 组) 的 HLA-DR 水平降低 ( $P = 0.020$ ), 促炎介质 IL-6 水平在 CLP 术后 3 h 时明显增加 ( $P = 0.011$ ), 随后 5 h 时下降, HR 明显下降 ( $P < 0.01$ ) 的同时 MAP 无明显变化 ( $P = 0.124$ )。与 CLP 组比较, 右美托咪定治疗组的病死率的显著减少, 且与剂量成正相关; CLP 组, DEX2.5 组, DEX5.0 组, DEX10.0 组病死率分别为 91.7%, 66.7%, 25.0% 和 18.0%。**结论** 右美托咪定在 CLP 脓毒症大鼠中持续输注 5 h 内即开始诱导免疫调节, 输注同时使 HR 显著下降并维持 MAP 稳定。随着右美托咪定输注剂量的增加, CLP 脓毒症大鼠的生存率显著改善。

**【关键词】** 右美托咪定; 免疫调节; 感染性休克

**基金项目:** 国家自然科学基金 (81160232); 中华医学会国瑞重症科研项目 (13091520537); 新疆医科大学第一附属医院院内自然科学基金 (2013ZRQN11)

## Dose-related effects of dexmedetomidine on immunomodulation and mortality to septic shock in rats

Ma Yan, Yu Xiangyou

Department of Intensive Care Unit, The First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China

Corresponding author: Ma Yan, Email: 82902823@qq.com

**【Abstract】 Objective** To study the immunomodulation effects of different dosage of dexmedetomidine (Dex) in the septic shock model of rats after cecal ligation and puncture (CLP). **Methods** After CLP, 48 wistar rats were randomly (random number) allocated in four groups: (1) CLP group; (2) small-dose Dex group [2.5  $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ ]; (3) medium-dose Dex group [5.0  $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ ]; (4) large-dose Dex group [10.0  $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ ]. HLA-DR (human leukocyte antigen-DR) and plasma cytokine (IL-4, IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$ ) were measured, meanwhile mean arterial blood pressure (MAP), heart rate (HR) and mortality were also documented at 1, 3, and 5 h after the CLP procedure. **Results** There were no obvious differences in HLA-DR level, levels of inflammatory mediators, MAP and HR among there Dex treatment groups. Compared with CLP group, HLA-DR level decreased in three Dex treatment groups ( $P = 0.020$ ) and pro-inflammatory mediator (IL-6) increased at 3 h ( $P = 0.011$ ) then declined at 5 h with decreased HR ( $P < 0.01$ ), and without obvious change in MAP ( $P = 0.124$ ), and all of them led to a

significantly decrease in the mortality. The mortalities in CLP group, small dose group, medium dose group and large dose group were 91.7%, 66.7%, 25.0% and 18.0%, respectively. **Conclusions** Dexmedetomidine used in rats with septic shock rats partially induced immunomodulation initiated within 5 h after CLP evidenced by decreased HR, maintenance of MAP and reduction of mortality rate in dose-dependent fashion.

**【Key words】** Dexmedetomidine; Immunomodulation; Septic shock

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81160232); Chinese Medical Association intensive scientific research Foundation (13091520537); The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University Natural Science Foundation (2013ZRQN11)

脓毒症 (sepsis) 是感染引起全身失控的全身炎症反应综合征 (SIRS), 是创伤、烧伤、休克、感染等临床急危重病患者的常见严重并发症之一, 也是诱发感染性休克、多器官功能障碍综合征 (MODS) 的重要原因, 是 ICU 中主要的死亡原因。其病理过程复杂, 对其发病机制及有效治疗手段的探讨一直是危重病医学研究的热点。目前研究认为, 脓毒症自始至终是全身炎症反应亢进与获得性免疫功能抑制并存的紊乱。在此过程中, 炎症反应诱导免疫抑制发生; 而免疫抑制则带来难以控制的感染, 又进一步加剧炎症反应。两者相互诱导和加强, 共同推动脓毒症的发生和发展, 并贯穿在整个病程中。

右美托咪定是一种  $\alpha$ -2 肾上腺素能受体受体激动剂, 作为一种新型的镇静药物已被广泛应用于脓毒症患者。有研究证实其具有免疫调节的作用, 并在脓毒症治疗中发挥重要作用。但是, 这些益处是否具有剂量依赖效应仍然在探讨中。因此, 笔者建立了盲肠结扎穿孔 (CLP) 的大鼠模型, 通过输注不同剂量右美托咪定来评估其免疫调节作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 动物模型制作

此项研究纳入 48 只雄性 Wistar 大鼠, 周龄 (10 ± 1) 周, 体质量 (222.7 ± 19.6) g。此项实验研究得到当地动物保护委员会的批准, 审批号: 20130216-99, 所有实验动物的保护及处理均参照国际健康机构指南 (National Institutes of Health Guidelines) 实施。

脓毒症模型采用盲肠结扎穿孔法 (cecal ligation and puncture, CLP)。大鼠经腹腔注射麻醉, 麻醉药物选择戊巴比妥钠 (sodium pentobarbital), 注射剂量 40 mg/kg, 浓度 3%, 行

左侧颈动脉穿刺置管, 用于监测平均动脉压 (MAP)、心率 (HR) 及采集血标本, 行尾静脉穿刺置管用于实验药物输注或输液, 为防止导管内血液凝集, 导管内充满肝素化生理盐水 (40 U/mL)。常规消毒腹部, 皮肤正中切开, 长约 1.5 cm, 打开腹腔寻找盲肠, 小心分离其远端与大肠的系膜, 避免碰伤肠系膜血管。在回盲瓣下处用无菌 4 号丝线紧紧结扎, 注意避免造成肠梗阻, 并用无菌 18 号针头在已结扎盲肠远端中央处贯通穿刺, 挤出少量粪便, 然后把盲肠推回腹腔, 关闭腹腔, 分两层缝合。造模成功后 5 h 将实验动物唤醒, 并分笼喂养, 自由饮食。

1.1.1 平均动脉压 (MAP), 心率 (HR) 及体温 (°C) 监测 在实验进行中, 通过动脉导管及压力传感器 (MX9505T; Smiths Medical ASD, USA) 连续监测 MAP。HR 通过软件自动检测压力波形而获得, 并以次/min 表达。大鼠体温是通过以直肠温度变化为基础的热敏加热垫控制。

1.1.2 HLA-DR 和血浆细胞因子检测 别于造模后 1、3、5 h 抽取动脉血液样本 0.8 mL, 使用多重检测酶标仪 (Thermo, USA) ELISA 检测血浆细胞因子浓度, 试剂由 Bioss 提供; 使用流式细胞仪 (Altra, BECKMAN, USA) 检测 HLA-DR, 试剂由 STANTA 提供, 每只 Wistar 大鼠于 24 h 观察期间内共抽取 2.65 mL 的血液。

### 1.2 实验分组

本实验所纳入的实验动物符合: (1) 基础平均动脉压 (MAP), 心率 (HR) 及直肠温度在正常范围内。(2) 开始实验时未见炎症的表现, 皮肤及褶皱处未见出血的迹象。符合纳入条件的 48 只 Wistar 大鼠被随机 (随机数字法) 分为 4 组 ( $n = 12$ )。盲肠结扎穿孔组 (CLP 组): 常规消毒腹部皮肤, 正中切口长约 1.5 cm, 打开腹腔寻找盲

肠,小心分离其远端与大肠的系膜,避免碰伤肠系膜血管。在回盲瓣下处用无菌 4 号丝线扎紧,注意不要造成肠梗阻,并用无菌 18 号针头在已结扎盲肠远端中央处贯通穿刺,挤出少量粪便,然后把盲肠推回腹腔,关闭腹腔,分两层缝合。小剂量治疗组 (Dex2.5 组):动物模型的制作(造模)参照 CLP 组。造模后,右美托咪定即以  $2.5 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{h})$  的速度经尾静脉持续泵入。中剂量治疗组 (Dex5.0 组):造模参照 CLP 组。造模后,右美托咪定即以  $5 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{h})$  的速度经尾静脉持续泵入。大剂量治疗组 (Dex10.0 组):造模参照 CLP 组。造模后,右美托咪定即以  $10 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{h})$  的速度经尾静脉持续泵入。实验结束,参与实验的 Wistar 大鼠以静脉注射过量戊巴比妥钠 ( $>200 \text{mg}/\text{kg}$ ; Hypnol 3%; Sigma, USA) 的方式处死。

### 1.3 统计学方法

计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,组间比较采用非配对的  $t$  检验。血流动力学及细胞因子的变化采用重复测量的方差分析,生存率的比较采用 Kaplan Meier 和 Mantel-Cox 生存检验曲线法进行比较。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。统计学处理采用 StatView 5.0 软件。

## 2 结果

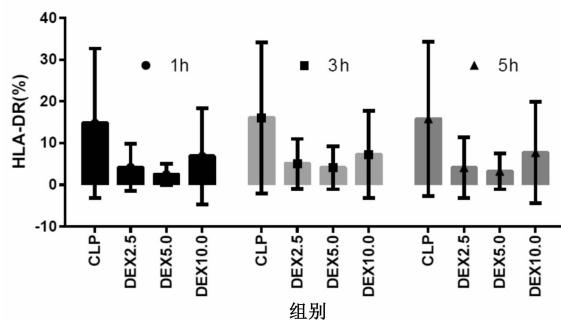
48 只 Wistar 大鼠体质量为 ( $222.7 \pm 19.6$ ) g,组间差异无统计学意义。入选实验大鼠均完成整个实验过程,统计数据收集完整无缺失。

### 2.1 HLA-DR 的评估

评估是否 DEX 影响 CLP 大鼠的免疫调节介质的产生。实验期间,各组在 1 h、3 h、5 h 时间点 HLA-DR 水平差异均无统计学意义。观察到, Dex5.0 组 HLA-DR 水平显著低于其他组,同时观察到 1 h、3 h、5 h, CLP 组 HLA-DR 水平均增加,导致四组之间 HLA-DR 水平差异有统计学意义 ( $P = 0.020$ )。

此外,本研究评估右美托咪定治疗组的大鼠,其免疫调节因子是否具有剂量依赖。结果,与 CLP 组相比,右美托咪定治疗组的大鼠 HLA-DR 水平均降低,其值在 Dex5.0 组最低(图 1)。然而,在右美托咪定治疗组中,三组 HLA-DR 水平差异无统计学意义,与 Dex10.0 组及 Dex2.5 组相比,

HLA-DR 水平在 Dex5.0 组更低。



三个时间点 (CLP 术后 1 h、3 h、5 h) 在四组之间的 HLA-DR 水平差异有统计学意义 ( $P = 0.020$ )

图 1 四组之间 HLA-DR 水平比较

Fig 1 Comparison of HLA-DR level between the four groups

### 2.2 血清促炎因子及抗炎因子

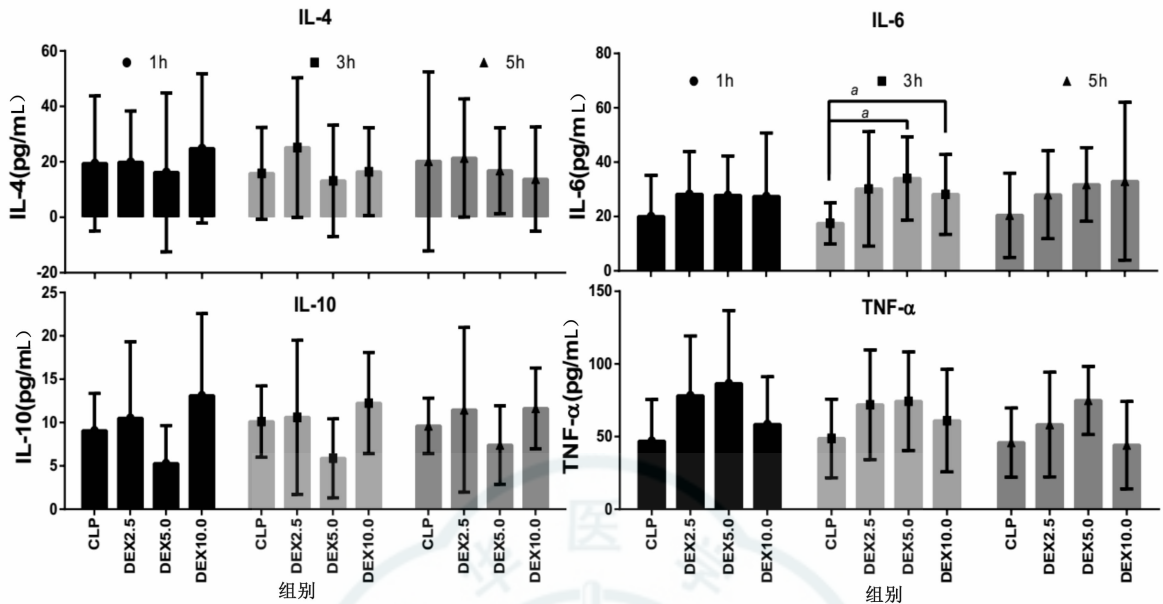
评估右美托咪定是否诱导或抑制大鼠血清促炎和抗炎因子。本研究观察到 IL-4、IL-10 及 TNF- $\alpha$  在实验各组间及 3 个时间点间差异无统计学意义。同时观察到,与 CLP 组比较时, DEX5.0 及 DEX10.0 组促炎因子 IL-6 水平在 CLP 术后 3 h 时点明显增加 ( $P = 0.011$ )。然而, IL-6 水平在 CLP 术后 5 h 时,右美托咪定治疗各组间没有观察到显著的增加,见图 2。

### 2.3 心率 (HR) 及平均动脉压 (MAP)

在 CLP 组,术后的 1 h、3 h 及 5 h 的 HR 变化差异无统计学意义。在右美托咪定治疗组,三组 HR 变化随着时间的延长逐渐降低(均  $P < 0.01$ ) (图 3)。实验观察到 HR 在 DEX5.0 组 CLP 术后 5 h 时点最低 ( $127.32 \pm 53.39$ )。与 CLP 组相比,右美托咪定诱导的平均动脉血压 (MAP) 水平在术后 1 h 即显著降低 ( $P = 0.0004$ ),但随着输注时间的延长,三组 MAP 变化差异无统计学意义。与此相反, CLP 组中 MAP 水平随着输注时间的延长显著降低(图 3)。四组 HR 及 MAP 的变化之间差异无统计学意义。

### 2.4 病死率

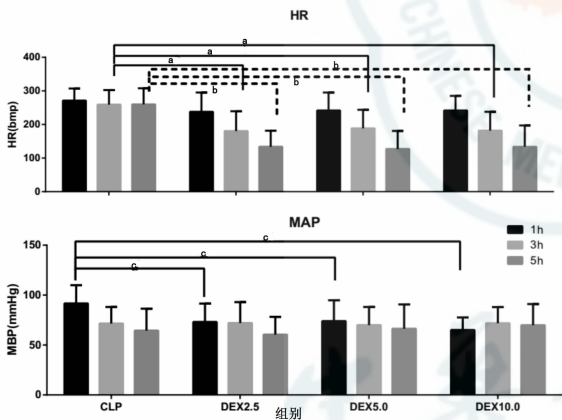
四组造模后 24 h 内的病死率明显不同, CLP, DEX2.5, DEX5.0 及 DEX10.0 组观察到病死率分别为 91.7%, 66.7%, 25.0% 和 18.0% 组。DEX5.0 组及 DEX10.0 组的病死率明显低于其他组。



与 CLP 组 3 h IL-6 水平变化的比较, <sup>a</sup>*P* < 0.05

图 2 三个时间点 (CLP 术后 1 h、3 h、5 h) 在四组之间的细胞因子 IL-4、IL-6、IL-10 及 TNF-α 水平的变化

Fig 2 The comparison of alteration in cytokine IL-4, IL-6, IL-10 and TNF-α at three intervals (1 h, 3 h, 5 h after CLP) between the four groups



与 CLP 组 3 h 心率变化比较, <sup>a</sup>*P* < 0.01; 与 CLP 组 5 h 心率变化比较, <sup>b</sup>*P* < 0.01; 与 CLP 组 1 h 平均动脉压变化比较, <sup>c</sup>*P* < 0.01

图 3 三个时间点 (CLP 术后 1 h、3 h、5 h) 在四组之间的心率 (HR) 及平均动脉压 (MAP) 的变化

Fig 3 Comparison of heart rate (HR) and mean arterial pressure (MAP) at three intervals (1 h, 3 h, 5 h after CLP) between the four groups

### 3 讨论

此项研究中, 右美托咪定治疗组 HLA-DR 水平降低, 促炎介质 (IL-6) 水平于术后 3 h 上升, 5 h 时恢复, 心率下降的同时血压维持相对稳定, 以上这些因素导致病死率显著降低。因此, 笔者认为, 右美托咪定治疗脓毒症大鼠时, 于造模 5 h 内

即发挥部分的诱导免疫调节作用, 从而明显降低病死率, 且呈现剂量相关性。

本实验观察到各组在任何时间点 HLA-DR 水平差异无统计意义, 但同一时间点各组之间差异有统计学意义。右美托咪定诱导 HLA-DR 水平降低, 尤其 DEX5.0 组。因此, 笔者推测输注 1 h 即开始参与免疫调节, 但是无剂量相关性。过度的免疫应激反应可能引起器官损伤。本研究显示 HLA-DR 在 CLP 组增加明显, 提示免疫应激反应增强。相反, 右美托咪定 3 h 内抑制免疫应激反应, 随着时间的延长逐渐参与免疫调节。

本实验中观察到 3 个时点的抗炎细胞因子 (IL-4 和 IL-10) 水平在各组之间差异无统计学意义。对于促炎因子 (IL-6 和 TNF-α), 尽管有研究观察到在使用右美托咪定的脓毒症大鼠及人全血细胞中, 其促炎因子水平下降<sup>[1-2]</sup>, 但是此项研究表明, 在右美托咪定治疗组, TNF-α 水平在 5 h 内增加, 但差异无统计学意义, 同时观察到 IL-6 水平在造模后 1 h 没有明显变化, 但随着输注时间的延长而变化, 如造模后 3 h, IL-6 水平增加, 而造模后 5 h 恢复。已有研究表明, 在脓毒症动物实验及临床研究中, 右美托咪定降低促炎细胞因子的浓度并降低病死率<sup>[3-7]</sup>。因此, 笔者推断 α-2 肾上腺素能受体激动剂在脓毒症开始初期促进促炎细胞因子

(IL-6 和 TNF- $\alpha$ ) 的释放,而在随后的 5 h 内参与免疫调节。其原因需要进一步的研究。

已有研究表明,在右美托咪定持续输注时危重患者的心率虽然下降,但心输出量和血压均无明显的波动<sup>[8-12]</sup>。本研究结果显示,在 CLP 组三个时点的心率 (HR) 无明显变化,但是在右美托咪定组,随着输注时间的延长心率有明显下降趋势。同时观察到右美托咪定降低平均动脉压 (MAP),但随着输注时间的延长,MAP 的下降差异无统计学意义。结果表明,右美托咪定持续输注会引起心率下降,MAP 下降,但持续输注时能够维持 MAP 水平不变。因此,右美托咪定的心血管不良反应可能限制有心血管疾病的患者使用。

值得注意的是,尽管随着输注时间的延长,右美托咪定治疗组血流动力学变化显著,但是病死率却明显下降。更有意义的是,本研究结果证实,实验大鼠的存活率与右美托咪定输注剂量之间呈正相关的关系。此项研究中,右美托咪定选择使用的剂量相对人类麻醉所需的剂量高。而本研究选择 5.0  $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{h})$  右美托咪定的输注剂量是基于先前发表的实验研究,研究结果表明右美托咪定以 5.0  $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{h})$  的浓度输注时,能够降低内毒素大鼠的细胞因子水平,从而提高生存率<sup>[4-6]</sup>。

此项研究有一定局限性。盲肠结扎穿孔的老鼠可能复制大部分脓毒症的临床特征,但它实际上仍然是一个腹膜炎模型复制的过程,因此不能用此项研究结果解释复杂的人类脓毒症进程。

综上所述,右美托咪定治疗脓毒症休克,在 CLP 脓毒症大鼠中持续输注 5 h 内即开始诱导免疫调节,输注同时使 HR 显著下降并维持 MAP 稳定。不仅如此,随着右美托咪定输注剂量的增加,CLP 脓毒症大鼠的生存率显著改善。此研究结果期待进一步的临床研究证实。

### 参 考 文 献

[1] Kawasaki T, Kawasaki C, Ueki M, et al. Dexmedetomidine suppresses proinflammatory mediator production in human whole blood in vitro [J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2013, 74 (5): 1370-1375. DOI: 10.1097/TA.0b013e31828db978.

[2] Taniguchi T, Kurita A, Kobayashi K, et al. Dose- and time-related effects of dexmedetomidine on mortality and inflammatory responses to endotoxin-induced shock in rats [J]. *J Anesth*, 2008, 22 (3): 221-228. DOI: 10.1007/s00540-008-0611-9.

[3] Memi D, Hekimoglu S, Vatan I, et al. Effects of midazolam and dexmedetomidine on inflammatory responses and gastric

intramucosal pH to sepsis, in critically ill patients [J]. *Br J Anaesth*, 2007, 98 (4): 550-552. DOI: 10.1093/bja/aem017.

- [4] Taniguchi T, Kidani Y, Kanakura H, et al. Effects of dexmedetomidine on mortality rate and inflammatory responses to endotoxin-induced shock in rats [J]. *Crit Care Med*, 2004, 32 (6): 1322-1326. DOI: 10.1097/01.CCM.0000128579.84228.2A
- [5] Taniguchi T, Kurita A, Kobayashi K, et al. Dose- and time-related effects of dexmedetomidine on mortality and inflammatory responses to endotoxin-induced shock in rats [J]. *J Anesth*, 2008, 22 (3): 221-228. DOI: 10.1097/01.CCM.0000128579.84228.2A.
- [6] Qiao H, Sanders RD, Ma D, et al. Sedation improves early outcome in severely septic Sprague Dawley rats [J]. *Crit Care Med*, 2009, 13 (4): R136. DOI: 10.1186/cc8012.
- [7] Hofer S, Stepan J, Wagner T, et al. Central sympatholytics prolong survival in experimental sepsis [J]. *Crit Care*, 2009, 13 (1): R11. DOI: 10.1186/cc7709.
- [8] Pandharipande PP, Sanders RD, Girard TD, et al. Effect of dexmedetomidine versus lorazepam on outcome in patients with sepsis: An a priori-designed analysis of the MENDS randomized controlled trial [J]. *Crit Care*, 2010, 14 (2): R38. DOI: 10.1186/cc8916.
- [9] Venn M, Newman J, Grounds M. A phase II study to evaluate the efficacy of dexmedetomidine for to evaluate the efficacy of dexmedetomidine for sedation in the medical intensive care unit [J]. *Intensive Care Med*, 2003, 29 (2): 201-207.
- [10] Riker RR, Shehabi Y, Bokesch PM, et al. Dexmedetomidine vs midazolam for sedation of critically ill patients: A randomized trial [J]. *JAMA*, 2009, 301 (5): 489-499. DOI: 10.1001/jama.2009.56.
- [11] Pandharipande PP, Pun BT, Herr DL, et al. Effect of sedation with dexmedetomidine vs lorazepam on acute brain dysfunction in mechanically ventilated patients: The MENDS randomized controlled trial [J]. *JAMA*, 2007, 298 (22): 2644-2653. DOI: 10.1001/jama.298.22.2644.
- [12] Tan JA, Ho KM. Use of dexmedetomidine as a sedative and analgesic agent in critically ill adult patients: A meta-analysis [J]. *Intensive Care Med*, 2010, 36 (6): 926-939. DOI: 10.1007/s00134-010-1877-6.
- [13] Marik PE, Baram M. Noninvasive hemodynamic monitoring in the intensive care unit [J]. *Crit Care Clin*, 2007, 23 (3): 383-400. DOI: 10.1016/j.ccc.2007.05.002.
- [14] Miranda ML, Balarini MM, Bouskela E. Dexmedetomidine attenuates the microcirculatory derangements evoked by experimental sepsis [J]. *Anesthesiology*, 2015, 122 (3): 619-630. DOI: 10.1097/ALN.0000000000000491.

(收稿日期: 2016-01-14)

(本文编辑: 郑辛甜)