

右美托咪定缓解脓毒症引起的心脏功能障碍的机制研究

于杰,姚刚,赵岚,林生

(烟台山医院东院心血管内二科,山东烟台 264003)

摘要:目的 探究右美托咪定(DEX)缓解脓毒症引起大鼠心脏功能障碍的机制。方法 选择体重 180~220 g 的健康雄性 SD 大鼠 30 只,随机分为空白组(CON 组)、模型组(CLP 组)以及 DEX 干预组(DEX 组),各 10 只。通过盲肠结扎穿孔术(CLP)建立脓毒症模型,DEX 组于术后 12 h 腹腔注射 DEX,CON 组腹腔注射等量灭菌生理盐水。处理后,记录各组大鼠血流动力学参数,检测心功能,采用 Elisa 法检测血清中 IL-6、IL-1 β 水平,采用酶联免疫吸附法检测大鼠血清中肌酸激酶同工酶(CK-MB)、乳酸脱氢酶(LDH)的含量,Western blot 法检测心肌组织中 NLRP3 炎症小体、Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达水平。**结果** 与 CON 组相比,CLP 组和 DEX 组血清中 IL-6、IL-1 β 、CK-MB 以及 LDH 水平均有所升高,心脏血流动力学指标均有所下降($P<0.05$);与 CLP 组比较,DEX 组血清中 IL-6、IL-1 β 、CK-MB 以及 LDH 水平均有所下降,心肌组织中 NLRP3、caspase-1、IL-1 β 蛋白表达水平下降($P<0.05$);与 CLP 组比较,DEX 组心脏血流动力学指标有所改善($P<0.05$)。**结论** 右美托咪定对脓毒症大鼠引起的心脏功能障碍以及心肌损伤具有一定的疗效,其机制可能与抑制 NLRP3 炎症小体激活,进而抑制下游炎症信号通路,减轻炎症,保护心肌组织免于损伤有关。

关键词:右美托咪定;脓毒症;心脏功能障碍;心肌损伤;炎症;NLRP3

中图分类号:R614;R459.7

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2023.06.016

文章编号:1006-1959(2023)06-0077-04

Study on the Mechanism of Metopimpramine in Alleviating Cardiac Dysfunction Caused by Septicemia

YU Jie,YAO Gang,ZHAO Lan,LIN Sheng

(The Second Department of Cardiovascular Medicine,Yantai Hospital of East Hospital,Yantai 264003,Shandong,China)

Abstract: Objective To explore the mechanism of dexmedetomidine (DEX) in alleviating cardiac dysfunction induced by sepsis in rats. **Methods** Thirty healthy male SD rats weighing 180-220 g were randomly divided into blank group (CON group), model group (CLP group) and DEX intervention group (DEX group), with 10 rats in each group. The sepsis model was established by cecal ligation and puncture (CLP). The DEX group was intraperitoneally injected with DEX at 12 h after operation, and the CON group was intraperitoneally injected with the same amount of sterile saline. After treatment, the hemodynamic parameters of rats in each group were recorded, and the cardiac function was detected. The levels of IL-6 and IL-1 β in serum were detected by Elisa method. The contents of creatine kinase isoenzyme (CK-MB) and lactate dehydrogenase (LDH) in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The expression levels of NLRP3 inflammasome, Caspase-1 and IL-1 β protein in myocardial tissue were detected by Western blot. **Results** Compared with the CON group, the serum levels of IL-6, IL-1 β , CK-MB and LDH in the CLP group and the DEX group were increased, and the cardiac hemodynamic indexes were decreased ($P<0.05$). Compared with CLP group, the levels of IL-6, IL-1 β , CK-MB and LDH in serum of DEX group decreased, and the expression levels of NLRP3, caspase-1 and IL-1 β in myocardial tissue decreased ($P<0.05$). Compared with the CLP group, the hemodynamic parameters of the DEX group were improved ($P<0.05$). **Conclusion** Dexmedetomidine has a certain effect on cardiac dysfunction and myocardial injury induced by sepsis in rats, and its mechanism may be related to inhibiting the activation of NLRP3 inflammasome, inhibiting downstream inflammatory signal pathway, reducing inflammation and protecting myocardial tissue from injury.

Key words: Dexmedetomidine; Sepsis; Cardiac dysfunction; Myocardial injury; Inflammation; NLRP3

脓毒症(sepsis)是感染引起的,机体对感染的失控反应所导致的可以威胁生命的器官功能障碍,严重者可危及生命。流行病学研究显示^[1],脓毒症在全

世界范围内的死亡率约为 30%。在美国其每年新发的病例可达百万例,死亡率为 15%~30%。据我国调查显示^[2],在所有 ICU 住院的患者中,脓毒症患者约占 37.5%,其死亡率接近 30%^[1]。脓毒症所造成的疾病负担已经超过超过急性心肌梗死和心力衰竭。临床和基础研究表明,脓毒症会造成机体多组织、器官继发性损伤,心血管系统是主要的受累系统,随着病情恶化,导致死亡率升高。目前,针对脓毒症的治疗,国际指南做出了如下推荐^[3]:早期诊断,尽快去除感

基金项目:山东省医药卫生科技发展计划项目(编号:2016WS0697)

作者简介:于杰(1985.1-),女,山东烟台人,硕士,主治医师,主要从事电生理及冠心病介入治疗研究

通讯作者:赵岚(1968.12-),女,山东烟台人,本科,主任医师,主要从事心律失常及冠心病的诊治研究

染灶,及时的液体复苏,生命体征监护和脏器支持治疗。但即使给予及时有效的治疗措施,脓毒症的死亡率仍在 20%以上^[4]。脓毒症是否预后良好主要取决于机体是否存在脏器损害,而在脓毒症造成的脏器功能损害中,心脏损害占 50%以上,其主要表现为心脏射血分数降低、舒张功能障碍、左心室舒张末期径显著增大,心动过速,心输出量降低等。研究提示^[5],出现心脏损害的脓毒症患者死亡率达 50%。因此,纠正并存的心脏损害对改善脓毒症预后意义显著。右美托咪定(dexmedetomidine, DEX)是一种新型的高选择性 α_2 肾上腺素能受体激动剂,是美托咪定的活性右旋异构体^[6],被推荐用于脓毒症患者。DEX 不仅具有镇静、镇痛、抗焦虑、抗交感、稳定血流动力学的作用,还具有心脏保护作用^[7-9]。研究表明^[10,11],DEX 在心脏缺血再灌注损伤中通过抑制心血管交感神经反应稳定血流动力学,能够改善心脏缺血损伤。此外,DEX 还可减轻内毒素引起的氧自由基的产生和促炎因子的释放,并进一步抑制炎症介质的放大效应^[12]。作为脓毒症的主要特征,许多炎症因子如白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的表达显著增加,而 DEX 能够降低这些炎症因子表达水平。有体外试验表明^[13],脓毒症模型可诱导原代小胶质细胞 NLRP3 炎症小体的活化。然而 DEX 在脓毒症导致心脏损伤中是否通过抑制 NLRP3 炎症小体活化进而抑制炎症反应尚有待研究。为此,本研究通过建立大鼠脓毒症模型,探讨 DEX 缓解脓毒症引起的心脏功能障碍的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SD 大鼠 30 只,雄性,SPF 级,体重 200~240 g,1 个半月龄,购自北京斯贝福生物技术有限公司,生产许可证为 SCXK(京)2020-0003。所有大鼠在本单位动物房饲养,饲养温度控制在 22 °C~24 °C,相对湿度为 50%~60%,室内光照维持 12 h/12 h 昼夜交替,清洁安静、通风良好,自由饮食,饲养 1 周后用于实验。本实验所采用动物实验方案通过动物伦理委员会审核。

1.2 主要试剂与药物 DEX;血清 IL-6、TNF- α 试剂盒、心肌酶肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)酶联免疫吸附试剂盒均购自于北京索莱宝科技有限公司。NLRP3 抗体、Caspase-1、IL-1 β 抗体均购自沈阳万类生物科技有限公司。

1.3 主要仪器 高速低温离心机购自德国 Sigma 公

司,BL-420E 生物机能实验系统,通用型电泳仪、电泳及转膜装置均购自美国 Bio-Rad 公司,Tanon 5200 化学发光分析系统购自上海天能生物科技有限公司,-80 °C超低温冰箱购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,Beckman 255 型自动 pH 计购自美国 Beckman 公司,METTLER TOLEDO 高压蒸汽灭菌器购自瑞士 METTLER 公司,ZE260 微量电子天平购自杭州汇尔仪器设备有限公司,恒温培养摇床购以及玻璃匀浆器购自南通市卫宁实验器材有限公司。

1.4 模型制备与分组 将 30 只 SD 大鼠按照随机数字表法为空白组(CON 组)、模型组(CLP 组)以及 DEX 干预组(DEX 组),各 10 只。空白组给予正常饲养不做任何处理。DEX 组与 CLP 组于术前 12 h 停止进食,腹腔麻醉应用 2%戊巴比妥钠,采用盲肠结扎穿孔法(CLP)制备模型。术后均于大鼠背部皮下注射 1 ml 生理盐水补充容量,之后仍予正常饮食。脓毒症大鼠模型成模标准:术后 6~12 h,大鼠出现寒战、高热(肛温 ≥ 40 °C)、尿少、呼吸急促、萎靡少动等现象即造模成功。成模以后进行给药,以 0.9%氯化钠溶液溶解右美托咪定,以 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的剂量腹腔注射,CON 组和 CLP 组以等剂量的 0.9%氯化钠溶液腹腔及尾静脉注射,1 次/d,持续 3 d。

1.5 血流动力学指标测定 大鼠麻醉后仰卧位固定,行气管插管,连接呼吸机,经左颈动脉管进入左心室腔内行总动脉插管,并于另一端连接压力换能器,通过生物机能实验系统进行左心室舒张末压(LVEDP)、左心室收缩末压(LVSP)、平均动脉压(MAP)值记录。

1.6 血清生化指标检测 大鼠眼眶取血,于 4 °C 下 3000 r/min 离心,静置,取上层血清于 EP 管中,置于 -80 °C 保存备用。IL-6、TNF- α 、CK、LDH 检测严格按照相应的剂盒说明书操作,测定质量浓度。

1.7 NLRP3、Caspase-1 以及 IL-1 β 抗体检测 Western blot 法测定炎症蛋白含量,称取 50 mg 大鼠心脏组织,用预冷的 PBS 缓冲液漂洗 2~3 次,去除血污,剪成小块置于匀浆器中;加入组织蛋白提取试剂,冰浴彻底匀浆;置于离心管中冰浴 30 min,注意应用移液器进行吹打以保证匀浆液裂解;离心并收集上清液后,应用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒进行样品蛋白浓度的测定,此时保证每个样品总蛋白上样量为 40 g;于上述样品中加入适量蛋白上样缓冲液,于 100 °C 沸水中煮 5 min;配胶采用 5%浓缩胶与

8%、10%、12%、15%、18%、20% 的分离胶，电泳分离；转膜后加入封闭液室温封闭 1 h；根据抗体说明书分别进行一抗孵育、二抗孵育，一抗以后进行 3 次洗膜，二抗以后在摇床上洗 4 次，每次均为 5 min；加入新鲜配置的 ECL 混合溶液，根据不同光强度调整曝光条件，显影、定影，同时采用自发光操作对 NLRP3、Caspase-1 以及 IL-1 β 的蛋白表达量进行测量。

1.8 统计学方法 采用 SPSS 23.0 软件进行数据分析，计量资料采用($\bar{x}\pm s$)表示，组间比较采用 *t* 检验，*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠心脏血流动力学指标比较 与 CON 组比较，CLP 组血流动力学指标均有不同程度的降低，差异有统计学意义 (*P*<0.05)；与 CLP 组比较，DEX 组心脏血流动力学指标(LVSP、LVEDP、MAP)有所改善，差异有统计学意义(*P*<0.05)，见表 1。

表 1 各组大鼠心脏血流动力学指标比较($\bar{x}\pm s$, mmHg)

组别	<i>n</i>	LVSP	LVEDP	MAP
CON 组	10	82.61 \pm 5.36	15.75 \pm 1.32	75.39 \pm 6.42
CLP 组	10	52.47 \pm 6.03 ^a	12.42 \pm 2.53 ^a	48.91 \pm 5.23 ^a
DEX 组	10	73.25 \pm 7.83 ^b	13.71 \pm 2.11 ^b	69.84 \pm 6.03 ^b

注：与 CON 组比较，^a*P*<0.05；与 CLP 组比较，^b*P*<0.05

2.2 各组大鼠 IL-6、TNF- α 比较 与 CON 组比较，CLP 组 IL-6、TNF- α 水平均有所升高，差异有统计学意义 (*P*<0.05)；与 CLP 组比较，DEX 组 IL-6、TNF- α 水平有所下降，差异有统计学意义 (*P*<0.05)，见表 2。

表 2 各组大鼠 IL-6、TNF- α 比较($\bar{x}\pm s$, ng/L)

组别	<i>n</i>	IL-6	TNF- α
CON 组	10	50.71 \pm 3.71	24.35 \pm 1.86
CLP 组	10	128.54 \pm 9.56 ^a	72.32 \pm 5.71 ^a
DEX 组	10	83.17 \pm 6.72 ^b	41.35 \pm 3.61 ^b

注：与 CON 组比较，^a*P*<0.05；与 CLP 组比较，^b*P*<0.05

2.3 各组大鼠 CK、LDH 比较 与 CON 组比较，CLP 组 CK、LDH 均有所升高，差异有统计学意义 (*P*<0.05)；与 CLP 组比较，DEX 组 CK、LDH 有所下降，差异有统计学意义(*P*<0.05)，见表 3。

表 3 各组大鼠 CK、LDH 比较($\bar{x}\pm s$, IU/L)

组别	<i>n</i>	CK	LDH
CON 组	10	15.68 \pm 1.76	13.67 \pm 1.35
CLP 组	10	52.31 \pm 5.46 ^a	46.31 \pm 3.79 ^a
DEX 组	10	26.31 \pm 3.14 ^b	22.71 \pm 2.37 ^b

注：与 CON 组比较，^a*P*<0.05；与 CLP 组比较，^b*P*<0.05

2.4 各组大鼠 NLRP3、Caspase-1 以及 IL-1 β 蛋白表达比较 与 CON 组比较，CLP 组 NLRP3、Caspase-1 以及 IL-1 β 蛋白表达含量均有所升高，差异有统计学意义 (*P*<0.05)；与 CLP 组比较，DEX 组 NLRP3、Caspase-1 以及 IL-1 β 的蛋白水平则有所下降，差异有统计学意义(*P*<0.05)，见表 4。

表 4 各组大鼠 NLRP3、Caspase-1 以及 IL-1 β 蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	NLRP3	Caspase-1	IL-1 β
CON 组	10	0.11 \pm 0.23	0.37 \pm 0.03	0.06 \pm 0.00
CLP 组	10	0.54 \pm 0.31 ^a	0.51 \pm 0.01 ^a	0.71 \pm 0.05 ^a
DEX 组	10	0.29 \pm 0.07 ^b	0.23 \pm 0.01 ^b	0.37 \pm 0.04 ^b

注：与 CON 组比较，^a*P*<0.05；与 CLP 组比较，^b*P*<0.05

3 讨论

脓毒症导致的全身器官功能障碍是患者死亡的主要原因之一。虽然对脓毒症的研究已有 2000 年的历史，但脓毒症的发病率并没有出现下降的趋势。临床研究发现，患有心脏损害的脓毒症患者死亡率要显著高于没有心脏损害的患者。脓毒症引起的心脏损害主要表现为心脏血流动力学变化以及相关炎症因子的表达，如 TNF- α 等炎症因子水平增加、心脏功能改变等。炎症是脓毒症的首要特征。本研究发现，CLP 组小鼠 LVEDP、LVSP、MAP 均有不同程度下降，心肌酶谱指标中 CK 含量以及 LDH 含量均增高，且血清指标 IL-6 以及 TNF- α 水平均有所增高，表明 CLP 造模可引起大鼠心脏功能改变以及心肌细胞炎症损伤，提示脓毒症引起的心脏功能障碍模型造模成功^[14]。研究表明，氧化应激和炎症反应是脓毒症导致心脏损伤的主要致病机制。已有体外试验证明脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)可诱导原代小胶质细胞 NLRP3 炎症小体的活化^[15]。DEX 是临床医学中常用的药物，除具有镇静、止疼作用外，还具有抑制交感兴奋、调节免疫、抗感染等多重作用。DEX 能够改善脓毒症所导致的心脏损伤，但具体机制尚不清楚。本研究在 CLP 造模成功基础上，给予 DEX

治疗,结果表明,相比于 CLP 组,DEX 组大鼠心脏血流动力学指标(LVEDP、LVSP、MAP)有所下降($P < 0.05$);同时,DEX 组小鼠的心肌酶谱指标 CK 及 LDH 也有所下降($P < 0.05$),提示 DEX 治疗后能够改善损害心脏的血流动力学并恢复心脏功能。另外,本研究对 DEX 组大鼠的血清炎症指标 IL-6 以及 TNF- α 进行了评价,结果提示 DEX 能够降低脓毒症引起心脏损伤的炎症反应,与 Zeng X 等^[16]的研究结果一致。有研究提示 NLRP3 炎症小体能够被激活进而释放炎症因子表达,其在心脏损伤的过程中发挥重要作用,机体在受到相应刺激时会过度活化 NLRP3 炎症小体,使 NLRP3 寡聚化,并与 ASC 作用募集 pro-Caspase-1,进而激活 Caspase-1,引起 IL-1 β 前体(pro-interleukin-1 β)活化产生 IL-1 β ,从而产生炎症反应,促进心肌重构,推动心脏病病程^[17,18]。因此,抑制 NLRP3 炎性小体活化,能够减轻炎症反应,进而明显改善脓毒症对心肌的重构作用。在本研究中,CLP 组中大鼠的 NLRP3、Caspase-1 以及 IL-1 β 蛋白表达水平均有所升高,而 DEX 组 NLRP3、Caspase-1 以及 IL-1 β 蛋白表达水平则有所下降,表明 DEX 能够通过阻断 NLRP3 炎性小体的形成和活化在 CLP 导致心脏损伤的过程中发挥重要作用。

综上所述,DEX 能够改善脓毒症大鼠的心脏血流动力学参数和心肌损伤程度。此外,DEX 能够降低血清中 TNF- α 、IL-6 水平,也可以降低心肌 CK、LDH 水平,提示 DEX 诱导脓毒症大鼠心肌损伤大鼠的炎性改变,同时诱导心脏组织 NLRP3、Caspase-1 以及 IL-1 β 表达的下调,这意味着 DEX 可能通过抑制炎症信号通路的方式对脓毒症大鼠心肌组织起到保护作用。因此,DEX 在 CLP 诱导的脓毒症心脏损伤中可能通过抑制 NLRP3 炎症小体活化及下游 IL-1 β 以及炎症因子的表达,从而发挥心脏保护作用。

参考文献:

[1] Zhou J, Qian C, Zhao M, et al. Epidemiology and Outcome of Severe Sepsis and Septic Shock in Intensive Care Units in Mainland China[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e107181.
[2] Chang DW, Tseng CH, Shapiro MF. Rehospitalizations Following Sepsis: Common and Costly [J]. Critical Care Medicine, 2015, 43(10): 2085-2093.
[3] Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sep-

sis and septic shock: 2012[J]. Crit Care Med, 2013, 41: 580-637.
[4] Kumar G, Kumar N, Taneja A, et al. Nationwide trends of severe sepsis in the 21st century (2000-2007)[J]. Chest, 2011, 140: 1223-1231.
[5] Rudiger A, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction[J]. Crit Care Med, 2007, 35: 1599-1608.
[6] 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 Medicine, 2013, 39(2): 165-228.
[7] Menda F, Koner O, Sayin M, et al. Dexmedetomidine as an adjunct to anesthetic induction to attenuate hemodynamic response to endotracheal intubation in patients undergoing fast-track CABG[J]. Annals of Cardiac Anaesthesia, 2010, 13(1): 16-21.
[8] Sanders RD, Sun P, Patel S. Dexmedetomidine provides cortical neuroprotection: impact on anaesthetic-induced neuroapoptosis in the rat developing brain [J]. Acta Anaesthesiologica Scandinavica, 2011, 54(6): 710-716.
[9] Ozturk H, Yilmaz F, Kocoglu H, et al. Effect of Dexmedetomidine on Ischemia-Reperfusion Injury in Rat Kidney: A Histopathologic Study[J]. Renal Failure, 2009, 31(1): 70-74.
[10] 毛幸. 右美托咪定通过线粒体自噬对巨噬细胞损伤发挥保护作用[D]. 天津: 天津医科大学, 2019.
[11] 白静, 张文丽, 张军伟, 等. 脓毒症大鼠心肌氧化应激损伤及心肌细胞超微结构变化 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2015, 31(5): 634-638.
[12] 邓福谋, 张炳辉, 连芳, 等. 右美托咪定预处理对大鼠肠缺血再灌注损伤的保护效应[J]. 江西医药, 2018, 53(12): 1385-1387.
[13] 梁磊, 邓林, 谢冕, 等. 右美托咪定通过 Toll 样受体 4 减轻小鼠肺缺血/再灌注损伤[J]. 基础医学与研究, 2018, 38(7): 967-972.
[14] 李健玲, 朱小青, 李学敏, 等. 七氟醚预处理对 LPS 诱导的小鼠心功能障碍的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2012, 28(8): 1410-1414.
[15] 刘富群, 高崎, 王丹丹, 等. 银杏酮酯抑制 LPS/ATP 诱导原代小胶质细胞 NLRP3 炎症小体的激活机制研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(16): 3346-3352.
[16] Zeng X, Wang H, Xing X, et al. Dexmedetomidine Protects against Transient Global Cerebral Ischemia/Reperfusion Induced Oxidative Stress and Inflammation in Diabetic Rats [J]. PLoS One, 2016, 11(3): 1-15.
[17] 何夕松, 李家富, 程圣杰, 等. 柚皮素通过抑制 NLRP3 炎症小体激活改善糖尿病小鼠心肌重构 [J]. 重庆医科大学学报, 2020, 45(12): 1689-1695.
[18] 柏业军, 张丽丽, 张培影, 等. 基于 NLRP3 炎症小体探讨 IL-1 β 、IL-18 对缺血性心脏病心力衰竭患者的影响 [J]. 中国误诊学杂志, 2019, 14(8): 340-343.

收稿日期: 2022-12-23; 修回日期: 2023-02-03

编辑/成森