

理盐水,分别于第 3、14 天测大鼠空腹血糖(FBG),模型组和治疗组大鼠 FBG 为 11.1~<30 mmol/L,并伴有多饮、多尿、多食现象确定为 2 型糖尿病模型。治疗组给予参芍口服液(250 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),对照组和模型组给予等量生理盐水,灌胃 8 周。实验末测各组大鼠 FBG ≥ 11.1 mmol/L 且小于 30 mmol/L,同时模型组和治疗组经左心室插管检测心功能指标,心功能改变较对照组大鼠有意义的最终确定为 2 型糖尿病心肌病大鼠模型,实验末共 27 只大鼠(对照组 10 只,模型组 8 只,治疗组 9 只)纳入实验,3 只淘汰可能由于感染或酮症酸中毒而致死。

**1.2.2 心功能检测** 实验末,对大鼠安装呼吸机,将导管经颈总动脉送入左心室,稳定数分钟后,测定左室收缩压(LVSP)和舒张末压(LVEDP)、左室压力上升或下降最大速率(±dp/dt-max)。

**1.2.3 苏木精-伊红(HE)染色** 10%中性甲醛固定充分后,经乙醇逐级脱水、透明、浸蜡、包埋后,切片(4 μm 厚),再经脱蜡、苏木素 7 min、伊红 8 min、透明、封片等步骤。光镜观察心

肌细胞及细胞间质改变。

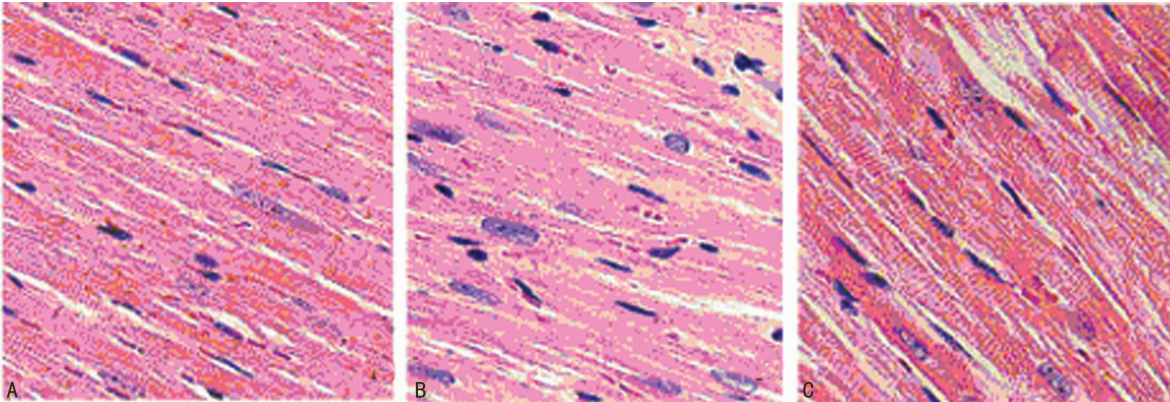
**1.2.4 免疫组织化学** 石蜡切片脱蜡后,枸橼酸钠抗原修复 1 min,一抗为 TLR4 抗体(1:150 稀释)和 NF-κB 抗体(1:150 稀释),加一抗后置于 4℃ 冰箱过夜。用二氨基联苯胺(DAB)显色,采用免疫组织化学图像软件分析结果。

**1.2.5 免疫印迹** 将标本进行 SDS-PAGE 电泳,将目的条带电转印法转印至 PVDF 膜上,分别孵稀的抗体 TLR4(1:1 000)、抗体 NF-κB(1:1 000)过夜。结果采用生物凝胶图像分析系统进行分析。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS16.0 统计学软件进行分析,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

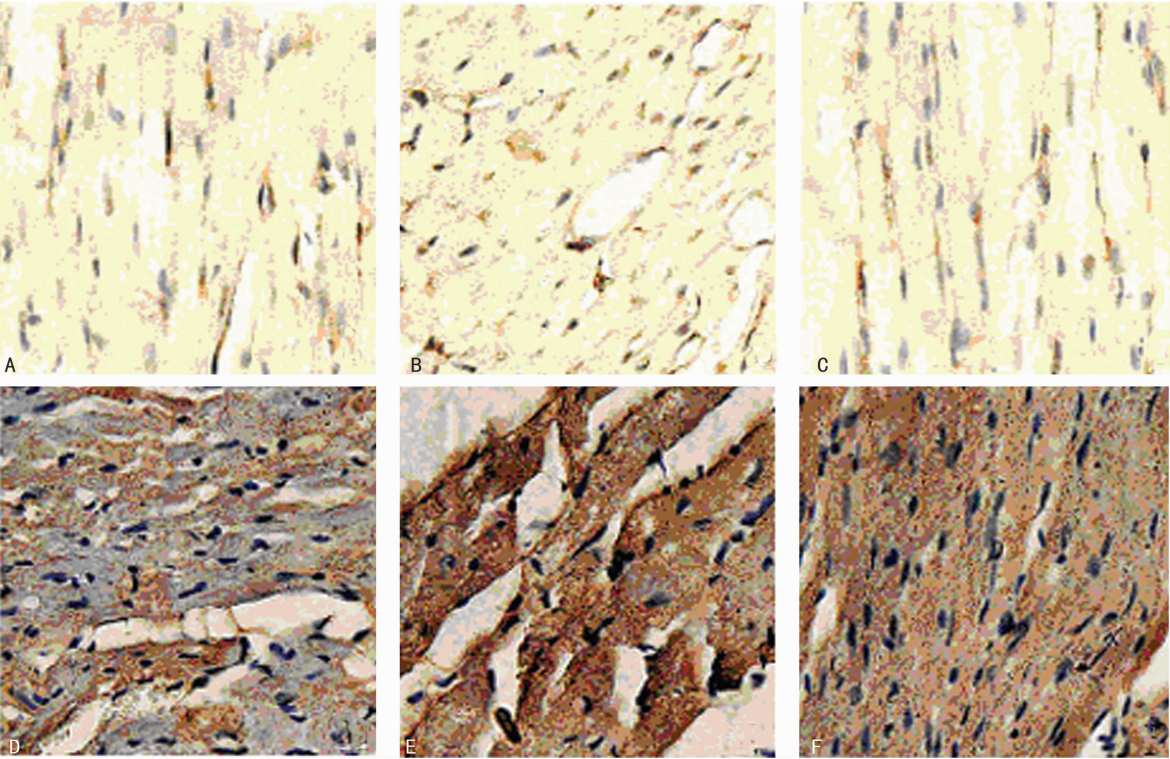
2 结 果

**2.1 心功能检测指标** 模型组较对照组 LVEDP 明显升高,同时 LVSP 和 ±dp/dtmax 下降( $P < 0.05$ ),治疗组较模型组 LVEDP 降低,LVSP 和 ±dp/dtmax 升高( $P < 0.05$ ),见表 1。



A:对照组;B:模型组;C:治疗组。

图 1 各组心肌组织的病理学改变(HE×400)



A:对照组 NF-κB;B:模型组 NF-κB;C:治疗组 NF-κB;D:对照组 TLR4;E:模型组 TLR4;F:治疗组 TLR4。

图 2 各组大鼠心肌组织 TLR4 和 NF-κB 的表达(×400)

表 1 各组左心室插管心功能检测结果(̄x±s)

组别	n	LVSP(mm Hg)	LVEDP(mm Hg)	+dp/dtmax(mm Hg/s)	−dp/dtmax(mm Hg/s)
对照组	10	179.15±20.29	43.97±1.80	4 075.32±647.96	4 053.87±396.48
模型组	8	148.45±21.08 <sup>a</sup>	73.86±2.45 <sup>a</sup>	1 947.67±568.98 <sup>a</sup>	2 024.98±297.59 <sup>a</sup>
治疗组	9	159.45±18.97 <sup>b</sup>	50.02±1.78 <sup>b</sup>	2 978.56±867.90 <sup>b</sup>	3 276.91±311.74 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>:*P*<0.05,与对照组比较;<sup>b</sup>:*P*<0.05,与模型组比较。

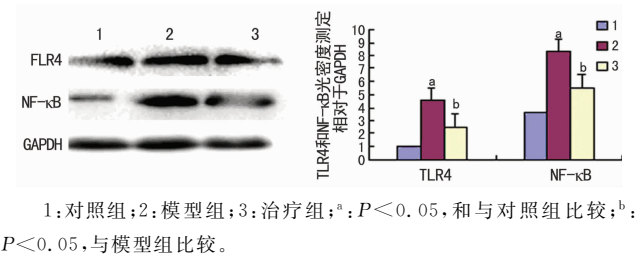
**2.2 心肌形态学改变** 对照组肌纤维排列有序、致密,细胞结构清楚,细胞核椭圆或梭形,大小均一;模型组肌纤维排列紊乱,出现断裂,心肌细胞水肿,细胞核大小不一,细胞间质变宽,满视野见炎性细胞;治疗组部分心肌纤维排列紊乱,见炎性细胞,见图 1。

**2.3 心肌组织 TLR4 和 NF-κB 免疫组织化学结果** TLR4 蛋白表达主要在心肌细胞膜上,NF-κB 表达于心肌细胞质及细胞间质,阳性表达呈棕黄色颗粒沉着。模型组较对照组 TLR4、NF-κB 阳性表达明显增多(*P*<0.05),治疗组较模型组明显减少(*P*<0.05),见图 2、表 2。

表 2 各组大鼠心肌 TLR4 和 NF-κB 阳性细胞数(̄x±s)			
组别	n	TLR4	NF-κB
对照组	10	3.13±0.77	28.24±3.64
模型组	8	12.36±1.01 <sup>a</sup>	114.39±43.26 <sup>a</sup>
治疗组	9	4.25±1.14 <sup>b</sup>	76.56±24.15 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>:*P*<0.05,与对照组比较;<sup>b</sup>:*P*<0.05,与模型组比较。

**2.4 心肌组织 TLR4、NF-κB 免疫印记结果** 与对照组比较,模型组大鼠心肌组织 TLR4 和 NF-κB 表达水平显著升高(*P*<0.05);与模型组比,治疗组大鼠心肌组织 TLR4 和 NF-κB 表达水平降低(*P*<0.05),见图 3。



1:对照组;2:模型组;3:治疗组;<sup>a</sup>:*P*<0.05,和与对照组比较;<sup>b</sup>:*P*<0.05,与模型组比较。

图 3 各组大鼠心肌组织 TLR4、NF-κB 的表达

3 讨 论

糖尿病心肌病作为糖尿病特有的并发症之一,是导致糖尿病晚期死亡的主要原因,因糖尿病代谢异常最终导致心肌代谢异常、心肌功能障碍和结构异常。如能早期找到有效而快速的诊疗方法,将对糖尿病心肌病产生积极影响。

本实验通过高脂饮食结合小剂量 STZ 建立 2 型糖尿病心肌病模型,有研究表明,STZ 对胰岛 B 细胞具有高度选择性,其诱导的糖尿病大鼠,符合人类糖尿病及其并发症的病理变化过程及功能改变<sup>[4-5]</sup>。通过 HE 染色观察到模型组大鼠心肌组织肌纤维排列紊乱,出现断裂,细胞间质变宽,心肌细胞炎性水肿严重,提示本实验建立的 2 型糖尿病大鼠模型出现心肌损伤,符合本次实验动物模型的纳入标准。

目前,天然免疫系统的激活和慢性炎症为糖尿病并发症的发病机制提供了新依据,TLR4 是免疫反应和炎性反应联系的

枢纽。Shimamoto 等<sup>[6]</sup>在研究缺血再灌注实验中发现药物阻断 TLR4 或基因敲除 TLR4,中性粒细胞、多种炎症相关介质和过氧化脂质类的产生明显减少。此外,Ogawa 等<sup>[7]</sup>通过结扎小鼠左冠状动脉建立急性大面积心肌梗死和慢性心力衰竭的模型,也发现模型组小鼠 TLR4 的表达明显高于对照组。说明 TLR4 在炎症介导的心脏疾病中起着重要作用。Ladefoged 等<sup>[8]</sup>发现糖尿病小鼠胰岛组织的 TLR4 的表达量是非糖尿病小鼠 5 倍多,且与血糖水平呈平行增长。本研究发现模型组大鼠心肌组织中 TLR4、NF-κB 的表达均明显上调,且心肌细胞间质炎性细胞明显增多,提示 TLR4 及其调控下的炎性因子可能参与扩张型心肌病(DCM)的发生、发展。

TLR4 参与 DCM 发病的可能机制如下:TLR4 作为一种跨膜糖蛋白,由胞外区、跨膜区、胞内区 3 部分组成,肌体在高糖条件下会产生大量脂多糖、热休克蛋白 60、游离脂肪酸等物质,TLR4 胞外区能够识别脂多糖及游离脂肪酸等<sup>[9]</sup>,并与其结合,进而激活 TLR4。TLR4 被激活后,通过髓样细胞分化因子 88(MyD88)依赖和 MyD88 非依赖两种途径,一方面调节胰岛 β 细胞的基因(胰岛素、PDX1 等基因)表达,使胰岛素分泌进一步受损<sup>[10]</sup>,另一方面下调 NF-κB,诱导分化细胞因子和趋化因子<sup>[11]</sup>。参与免疫和炎性反应,使心肌受损,心室重构,出现心肌收缩和舒张功能障碍。

因此,将 TLR4 作为炎症和免疫性疾病的治疗靶点,以“活血化瘀、益气通络”为法而立方参芍口服液。参芍口服液主要成分为丹参素,有研究表明丹参素具有心脑血管保护、抗动脉硬化及抗炎作用<sup>[12]</sup>。薛中文等<sup>[13]</sup>通过建立冠状动脉粥样硬化的大鼠模型,发现参芍口服液可降低组织炎性因子表达,改善冠状动脉粥样硬化的病变程度。本实验治疗组采用参芍口服液进行干预后,心肌组织 TLR4、NF-κB 炎性因子的表达较模型组降低;心肌间质炎性细胞减少,心功能得到改善,其机制可能是参芍口服液参与调节 TLR4 控制的炎症通路从而改善 DCM 心功能不全的症状,对糖尿病心肌病起到保护作用。

参考文献

[1] Isfort M,Stevens SC,Schaffer S,et al. Metabolic dysfunction in diabetic cardiomyopathy [J]. Heart Fail Rev, 2014,19(1):35-48.

[2] Mellbin LG,Anselmino M,Rydén L. Diabetes,prediabetes and cardiovascular risk[J]. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil,2010,17 Suppl 1:S9-14.

[3] 黄娅茜,王宪,孔炜,等. 糖尿病心肌病发病机制的研究进展[J]. 生理科学进展,2010,41(1):31-36.

[4] 张春虹,臧伟进,徐静,等. 建立糖尿病心肌病动物模型方法的实验研究[J]. 卫生研究,2006,35(6):707-711.

[5] Miric G,Dallemagne C,Endre Z,et al. (下转第 3333 页)



不同麻醉药物对兔严重烫伤早期炎性反应的影响<sup>\*</sup>项尽一,夏建国<sup>△</sup>,张 昆,蒋筱杨,汪 刚

(湖北省武汉市第三医院麻醉科 430060)

**[摘要]** **目的** 探讨不同麻醉药物对兔严重烧伤早期炎性细胞因子变化的影响。**方法** 50 只兔随机分为健康对照组(C 组)、烫伤对照组(SC 组)、异丙酚组(P 组)、氯胺酮组(K 组)和异丙酚-氯胺酮组(PK 组)。除 C 组外制成 30% Ⅲ°烧伤面积(TB-SA)烫伤模型,P 组伤后持续泵注异丙酚 20 mg·kg<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> 4 h,K 组氯胺酮 20 mg·kg<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> 4 h,PK 组异丙酚 10 mg·kg<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>和 氯胺酮 10 mg·kg<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> 4 h;而 C 组和 SC 组仅补液处理。分别于烫伤前、烫伤后 1、6、12、24 h 行血气分析并检测血清白细胞介素(IL)-1β、IL-6 及肿瘤坏死因子-α(TNF-α)浓度。**结果** SC 组和药物干预组伤后二氧化碳分压(PaCO<sub>2</sub>)比烫伤前和 C 组明显降低( $P<0.01$ ),氧分压(PaO<sub>2</sub>)、乳酸(Lac)升高,而 Lac 水平高于烫伤前和 C 组( $P<0.01$ ),且在其后逐渐升高,但均在正常水平,pH 值、PaO<sub>2</sub> 和血氧饱和度(SO<sub>2</sub>)在各时间点与烫伤前比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。烫伤后 SC、药物干预组 IL-1β、IL-6 及 TNF-α 升高( $P<0.05$ ),麻醉药物干预后 IL-1β、IL-6 及 TNF-α 各时间点均比 SC 组降低( $P<0.05$ )。PK 组与 P 组及 K 组相比 IL-1β、IL-6 及 TNF-α 升高较少,组间差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** 异丙酚复合氯胺酮麻醉能更有效地抑制兔严重烧伤早期全身性炎症反应。

**[关键词]** 异丙酚;氯胺酮;严重烧伤;细胞因子**[中图分类号]** R644**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)24-3330-04Effect of different anesthetic on inflammatory cytokine balance in early stage of severe scalds in rabbits<sup>\*</sup>Xiang Jinyi, Xia Jianguo<sup>△</sup>, Zhang Kun, Jiang Xiaoyang, Wang Gang

(Department of Anesthesiology, the Third Hospital of Wuhan City, Wuhan, Hubei 430060, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the influences of different anesthetic on inflammatory cytokine balance in early stage of severe injury in rabbits. **Methods** Fifty healthy New Zealand rabbits were randomly divided into 5 groups( $n=10$ ): control group (group C), scald control group(group SC), propofol anesthesia group (group P), ketamine anesthesia group(group K), propofol-ketamine anesthesia group (group PK). All rabbits except group C were suffered from 30% Ⅲ° TBSA scald. In group P, K and PK, rabbits were constantly infused with total intravenous anesthesia of propofol 20 mg·kg<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> (group P), ketamine 20 mg·kg<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> (group K), propofol 10 mg·kg<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> and ketamine 10 mg·kg<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> (group PK) for 4 h. The group C and the SC only underwent fluid infusion. Blood samples were preserved before scald and 1, 6, 12, 24 h after scald. Arterial blood gas and concentrations of IL-1β, IL-6 and TNF-α in blood serum were determined. **Results** PaCO<sub>2</sub> were decreased and PaO<sub>2</sub>, Lac were increased in group SC, P, K and PK, but the level of Lac went up after scald and then tended to be stable, concentration of Lac in group SC, P, K and PK increased higher than group C ( $P<0.01$ ). Comparison of pH value, PaO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> between group SC and group P, K, PK did not show statistically significant at each time point ( $P>0.05$ ). The levels of IL-1β, IL-6 and TNF-α were markedly higher in group SC, P, K, PK than those of group C ( $P<0.05$ ), the serum levels of cytokines were significantly lower in group P, K and PK than those of group SC ( $P<0.05$ ). Comparison of different anesthetic group, the level of IL-1β, IL-6 and TNF-α was significantly lower in group PK than those of group P and K. Intergroup comparison showed significant difference ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The results suggest that propofol and ketamine anesthesia may effectively inhibit systemic inflammatory response to a certain extent in early stage of severe scald.

**[Key words]** propofol; ketamine; severely scald; cytokine

严重烧伤早期血清肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素(IL)-1β 和 IL-6 等促炎性细胞因子随着机体的炎性反应的增强而升高,在一定程度上预示烧伤后多器官功能衰竭发生与发展的趋势<sup>[1-2]</sup>。有报道显示异丙酚能从多个环节调节炎性反应、具有抑制全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)的作用<sup>[3]</sup>,且氯胺酮兴奋交感神经升高血压与异丙酚复合用于烧伤患者手术麻醉,明显减少异丙酚的用量和有利于维持患者循环功能的稳定。但其对严重烧伤后早期炎性反应的影响还不十分清楚。本研究以兔严重烫伤为动物模型,采用异丙酚、氯胺酮及复合麻醉,通过分析 IL-1β、

IL-6、TNF-α 的变化,探讨氯胺酮-异丙酚静脉复合麻醉对严重烧伤早期炎性反应的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物分组** 本研究已经医院动物管理伦理委员会同意。选择成年健康新西兰雄兔 50 只[湖北省实验动物研究中心提供,动物合格证编号:SCXK(鄂)2008-0005],体质量(2 324±136)g,兔龄(5.0±0.4)个月。采用随机数字表法将其分为 5 组(每组 10 只),健康对照组(C 组)、烫伤对照组(SC 组)、异丙酚组(P 组)、氯胺酮组(K 组)、异丙酚-氯胺酮组(PK 组)。于 24℃、相对湿度 40%~60%饲养 1 周。

降低免严重烧伤全身炎症反应可能的机制为通过降低烧伤后内毒素的大量产生,同时阻断内毒素刺激单核巨噬细胞等释放 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 等炎症介质,以及小剂量氯胺酮镇痛降低伤害刺激引起的应激反应而降低全身炎症反应。

本研究显示,免严重烫伤后早期血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$  进行性升高。TNF- $\alpha$  主要由单核巨噬细胞产生,是介导炎症反应的主要因子。严重烫伤常带有内毒素增加,内毒素可刺激 TNF- $\alpha$  水平升高,并与烫伤的严重程度及预后关系密切。严重烫伤后释放增多的内毒素可激活中性粒细胞等炎症细胞促使 TNF- $\alpha$  的释放,烫伤后血清 IL-6 的升高亦与严重烫伤后内毒素升高有关联,IL-6 是由激活的巨噬细胞、淋巴细胞和内皮细胞等分泌并能诱导 B 淋巴细胞活化。IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  存在协同作用,即 TNF- $\alpha$  能诱导巨噬细胞释放 IL-1 $\beta$ ,IL-1 $\beta$  也能刺激 TNF- $\alpha$  的产生。机体过度释放多种细胞因子和炎症介质如内毒素、IL-6 和 TNF- $\alpha$  等,由此产生连锁放大效应,其中 TNF- $\alpha$  在激活其他细胞因子方面起核心作用。IL-6 参与损伤后急性期反应,是组织损伤和创伤严重程度的重要指标,无论是烫伤本身还是合并感染均导致 IL-6 的释放,IL-6 大量产生可损伤免疫系统功能或导致严重感染。氯胺酮-异丙酚静脉麻醉相较单纯使用氯胺酮或者单纯使用异丙酚可更有效地降低严重烧伤早期免血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 的浓度,在一定程度上抑制严重烧伤早期全身炎症反应。

综上所述,异丙酚复合氯胺酮麻醉能更有效地降低严重烫伤早期免血清促炎细胞因子的水平,是严重烧伤早期手术时一种较好的麻醉方法。

### 参考文献

[1] 夏建国,彭坚,肖红,等.小剂量氯胺酮静脉自控镇痛对严重烧伤休克期患者细胞因子平衡的影响[J].中国危重病急救医学,2006,18(1):32-35.

[2] Yan J,Erdem H,Li R,et al.Steroid receptor coactivator-3/AIB1 promotes cell migration and invasiveness through focal adhesion turnover and matrix metalloproteinase ex-

pression[J].Cancer Res,2008,68(13):5460-5468.

[3] 夏建国,孙建斌.氯胺酮-异丙酚或芬太尼-异丙酚麻醉下严重烧伤早期患者切痂植皮术后炎症反应的比较[J].中华麻醉学杂志,2008,28(9):853-854.

[4] 刘利兵,于军,张学策,等.新西兰兔烫伤模型的建立[J].第四军医大学学报,2009,30(1):86-88.

[5] 谭清彦,杨传山,冯玉芳,等.加温输液对免烧伤休克期血液流变学指标的影响[J].中华烧伤杂志,2007,23(4):298-299.

[6] 隰建成,马远征,周宝桐,等.创伤性脓毒症外周血中性粒细胞及组织中肿瘤坏死因子- $\alpha$  mRNA 表达的变化[J].中国危重病急救医学,2006,18(1):28-31.

[7] Leghmari K,Contreras X,Moureau C,et al. HIV-1 tat protein induces TNF-alpha and IL-10 production by human macrophages; differential implication of PKC-betaII and-delta isozymes and MAP kinases ERK1/2 and p38 [J]. Cell Immunol,2008,254(1):46-55.

[8] Christman JW,Sadikot RT,Blackwell TS. The role of nuclear factor-kappa B in pulmonary diseases [J]. Chest, 2000,117(5):1482-1487.

[9] Lange M,Bröking K,van Aken H,et al. Role of ketamine in sepsis and systemic inflammatory response syndrome [J]. Anaesthesist,2006,55(8):883-891.

[10] Kawasaki C,Kawasaki T,Ogata M,et al. Ketamine iso-mers suppress superantigen-induced proinflammatory cytokine production in human whole blood [J]. Can J Anaesth,2001,48(8):819-823.

[11] Yuki K,Soriano SG,Shimaoka M. Sedative drug modulates T-cell and lymphocyte function-associated antigen-1 function [J]. Anesth Analg,2011,112(4):830-838.

(收稿日期:2016-02-15 修回日期:2016-06-27)

(上接第 3329 页)

Reversal of cardiac and renal fibrosis by pirfenidone and spironolactone in streptozotocin-dia-betic rats [J]. Br J Pharmacol,2001,133(5):687-694.

[6] Shimamoto A,Chong AJ,Yada M,et al. Inhibition of Toll-like receptor 4 with eritoran attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Circulation, 2006, 114 (1 Suppl):S270-274.

[7] Ogawa K,Hirooka Y,Kishi T,et al. Brain AT1 receptor activates the sympathetic nervous system through toll-like receptor 4 in mice with heart failure [J]. Cardiovasc Pharmacol,2011,58(5):543-549.

[8] Ladefoged M,Buschard K,Hansen AM. Increased expression of Toll-like receptor 4 and inflammatory cytokines, interleukin-6 in particular,in islets from a mouse model of obesity and type 2 diabetes [J]. APMIS, 2013, 121 (6): 531-538.

[9] Dasu MR,Devaraj S,Zhao L,et al. High Glucose induces toll-like receptor expression in Human Monocytes; mechanism of activation [J]. Diabetes, 2008, 57 (11): 3090-3098.

[10] Amyot J,Semache M,Ferdaoussi M,et al. Lipopolysaccharides impair insulin gene expression in isolated islets of Langerhans via Toll-Like Receptor-4 and NF-kB signaling [J]. PLoS One,2012,7(4):e36200.

[11] Guha M,Maekman N. LPS induction of gone expression in human monocytes [J]. Cell Signal,2001,13(2):85-94.

[12] 李骅,王四旺,张邦乐,等.丹参素的药理活性与药物动力学研究进展 [J]. 西北药学杂志,2011,26(4):310-312.

[13] 薛忠文,董天,张琦,等.参芍口服液对冠状动脉粥样硬化大鼠主动脉 IL-8、VCAM-1 和 ICAM-1 表达的影响 [J]. 中成药,2012,34(11):2077-2081.

(收稿日期:2016-02-07 修回日期:2016-06-25)