环孢素 A 对严重创伤失血性休克大鼠的治疗作用

杨光明,彭小勇,李 涛,徐 竞,刘良明 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所第二研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

[**摘 要**] **目的** 观察环孢素 A(CsA)对创伤失血性休克大鼠的治疗作用。**方法** 采用 144 只健康成年 SD 大鼠,分为正常对照组、休克对照组、乳酸林格氏液(LR)复苏组、CsA 1 mg/kg、5 mg/kg 和 10 mg/kg 组。建立创伤失血性休克模型后,观察不同剂量 CsA 治疗对休克动物的存活时间和 24 h 存活率的影响,同时通过股动脉和左心室插管测定血流动力学指标,观察 CsA 对大鼠平均动脉血压(MAP)、左心室收缩压(LVSP)、左心室舒张末压(LVEDP)、左心室压力最大上升/下降速率($\pm dp/dt_{max}$)和心率(HR)的影响。**结果** CsA(5 mg/kg 和 10 mg/kg)可明显提高创伤失血性休克大鼠的存活时间和 24 h 存活率。休克后大鼠血流动力学指标包括 MAP、LVSP、$\pm dp/dt_{max}$ 和 HR 都显著降低,LR 复苏可使各项指标有所回升,但显著低于正常对照组;CsA(5 mg/kg 和10 mg/kg)可明显升高 LVSP 和 $\pm dp/dt_{max}$,在复苏 2 h 时明显高于 LR 组,并接近正常水平。**结论** CsA 显示出较好的抗创伤失血性休克作用,其中以 5 mg/kg 和 10 mg/kg 的给药剂量效果明显。

[**关键词**] 失血性休克;创伤;环孢素 A;血流动力学

[**中图分类号**] R605.971 [**文献标识码**] A [**文章编号**] 1672-5042(2014)03-0250-03

Beneficial effects of Cyclosporin A on traumatic hemorrhagic shock in rats

YANG Guang-ming, PENG Xiao-yong, LI Tao, XU Jing, LIU Liang-ming (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 2, Research Institute of Surgery, Daping Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the beneficial effects of cyclosporin A (CsA) on traumatic hemorrhagic shock in rats. **Methods** The traumatic hemorrhagic shock model was adopted in 144 SD rats which were divided into 6 groups: sham-operated group, shock control group, lactated Ringer's solution (LR) group, CsA 1 mg/kg, 5 mg/kg and 10 mg/kg group. The effects of three doses of CsA on the animal survival time and 24 h survival rate were observed, and the effects of CsA on hemodynamic parameters, including mean arterial blood pressure (MAP), left intraventricular systolic pressure (LVSP), left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP), maximal change rate of left intraventricular pressure ($\pm dp/dt_{max}$) and heart rate (HR) were also observed. **Results** CsA at the concentration of 5 mg/kg and 10 mg/kg can significantly increase the survival time and 24 h survival rate of shock rats, the survival rate was increased to 56.3% from 25% of LR group. After shock, the hemodynamic parameters were significantly decreased including MAP, LVSP and $\pm dp/dt_{max}$, LR infusion only improved the hemodynamics to some extent, which were significantly lower than those in sham-operated group. CsA (5 mg/kg and 10 mg/kg) can significantly improve the hemodynamics of shock rats including LVSP and $\pm dp/dt_{max}$, which were increased at 2 h after resuscitation as compared

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201403011

[**基金项目**] 国家自然科学基金项目(81270400);国家自然科学基金青年基金项目(30901559);重庆市基础与前沿研究计划项目(cstc2013jcyjA10012);国家重点实验室专项课题(SKLZZ201020)

[**通讯作者**] 刘良明,E-mail:liangmingliu@yahoo.com

[**收稿日期**] 2013-12-20 [**修回日期**] 2014-02-18

[5] 黎介寿. 肠内营养 - 外科临床营养支持的首选途径[J]. 中国临床营养杂志,2003,11(3):4 - 5.

[6] 吴肇汉. 临床营养与胃肠外科疾病[J]. 中华胃肠外科杂志,2002,5(3):169 - 171.

[7] Mahesh C, Sriram K, Lakshmiprabha V. Extended indications for enteral nutritional support[J]. Nutrition, 2000, 16(2): 129 - 130.

[8] 韩东景,赵 楠,李 伟,等. 食管癌患者术前营养不足和营养风险发生率及临床营养支持现状调查[J]. 中华肿瘤防治杂志,2013,20(16):1274 - 1278.

[9] 管宏俊,陈云琦,孙长鹏,等. 食管癌术后患者两种营养支持治疗的比较[J]. 肠外与肠内营养,2012,19(1):24 - 28.

[10] 夏晓明,施仁忠,张亚锋. 食管癌术后早期肠内营养对患者免疫功能的影响[J]. 山东医药,2012,52(18):38 - 39.

[11] 冉立峰,杨 炜. 不同营养方式对老年食管癌患者术后免疫功能的影响[J]. 免疫学杂志,2013,29(8):681 - 684.

[12] 王 华,简玉华. 老年胃癌患者术后早期肠内营养的应用价值分析[J]. 局解手术学杂志,2013,22(3):280 - 281.

(编辑:魏 源)

to LR group, and return to about normal levels. 1 mg/kg of CsA also restored the hemodynamic parameters, but there were no significant differences between CsA 1 mg/kg group and LR group. **Conclusion** CsA has good beneficial effect on traumatic hemorrhagic shock, and 5 mg/kg and 10 mg/kg of CsA showed a better effect.

Keywords: hemorrhagic shock; trauma; cyclosporin A; hemodynamics

环孢素 A(cyclosporin A, CsA)是一种由 11 个氨基酸组成的环状多肽,作为一种免疫抑制剂,已广泛应用于抑制器官移植术后的排斥反应和自身免疫性疾病的治疗。CsA 能够抑制线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, MPTP)的开放,在缺血缺氧再灌注引起的心、脑等器官损伤中发挥保护作用[1-2]。线粒体 MPTP 是位于线粒体内外膜间的多蛋白孔道,在线粒体功能调节和细胞缺血缺氧性损伤过程中发挥着重要作用[3-4]。但是,在休克状态下,通过抑制线粒体 MPTP 能否改善病理条件下的心血管功能,实现对休克动物的保护作用,目前尚不清楚。我们采用大鼠创伤失血性休克模型,观察不同剂量 CsA 对休克大鼠存活时间、24 h 存活率、平均动脉血压及血流动力学指标的影响,以明确 CsA 是否对创伤失血性休克大鼠具有保护作用及其适宜的治疗剂量。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD 大鼠 144 只,雌雄各半,体质量 180 ~ 220 g,由第三军医大学野战外科研究所实验动物中心提供。

1.2 实验分组及方法

1.2.1 CsA 对创伤失血性休克大鼠 24 h 存活率和存活时间的影响 实验分 6 组,分别为正常对照组、休克对照组、乳酸林格氏液(LR)复苏组、CsA 1 mg/kg 组、CsA 5 mg/kg 组、CsA 10 mg/kg组。每组 16 只动物。创伤失血性休克模型的建立方法[5]:用 3% 戊巴比妥钠麻醉动物,右侧股动脉和股静脉插管,分别用于观察血压、放血和给药复苏,经插管注射肝素钠生理盐水(500 U/kg)抗凝。用老虎钳折断左侧股骨,通过股动脉插管 10 min 内放血至血压 40 mmHg,维持 3 h。各实验组的给药复苏方法:LR 复苏组给予 2 倍失血量的 LR 输注,CsA 1、5、10 mg/kg组分别在 2 倍失血量的 LR 中加入 CsA 1、5、10 mg/kg 后输注。复苏均使用输液泵,输注速度为 20 mL/h,约 30 min 输注完毕。休克对照组在休克模型建立后不予复苏治疗。复苏完毕后拔除各血管插管,结扎血管,缝合伤口,肌肉注射青霉素和链霉素(10^5 U/kg),给予正常饮食,观察动物存活情况至 24 h,记录存活时间并计算存活率。

1.2.2 CsA 对创伤失血性休克大鼠血流动力学的影响 实验分组同上,每组 8 只动物,模型的复制及复苏方法同上。经右颈动脉插管至左心室,连接血流动力学测定仪(Power Lab,澳大利亚 AD Instrument 公司),分别在休克前、休克末、复苏 1 h、2 h测定血流动力学指标[6],包括左心室收缩压(LVSP)、左心室舒张末压(LVEDP)、左心室压力最大上升/下降速率($\pm dp/dt_{max}$)和心率(HR)。

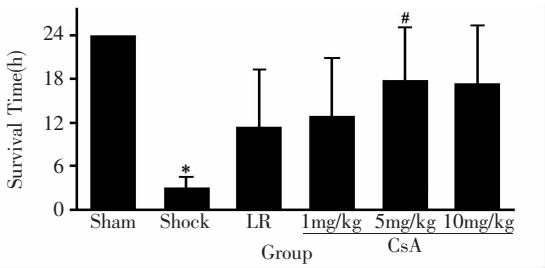
1.3 统计学处理

数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。使用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,组间比较采用方差分析,$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 对创伤失血性休克大鼠存活情况的影响

正常对照组中全部大鼠存活均超过 24 h;休克对照组大鼠在休克后 8 h 内全部死亡,平均存活时间约为 3 h;LR 复苏组 24 h 存活率为 25%,平均存活时间为 11.4 h;CsA 1 mg/kg 输注后,大鼠存活时间和 24 h 存活率分别为 12.8 h 和 31.2%,略高于 LR 组;CsA 5 mg/kg 和 10 mg/kg 输注可明显改善休克动物的存活情况,存活时间分别为 17.9、17.3 h,24 h 存活率均为 56.3%(图 1)。



*:与正常对照组比较,$P < 0.01$;#:与 LR 复苏组比较,$P < 0.05$

图 1 CsA 对创伤失血性休克大鼠存活时间的影响

2.2 对创伤失血性休克大鼠 MAP 和 HR 的影响

休克后大鼠 MAP 显著降低,复苏后 MAP 均有不同程度升高。不同剂量的 CsA 输注后都能升高创伤失血性休克大鼠 MAP,高于 LR 复苏组。在复苏 2 h 时,休克对照组、LR 复苏组、CsA 1 mg/kg、5 mg/kg、10 mg/kg 组大鼠 MAP 分别为(40.8 ± 12.3)(51.1 ± 9.7)(62.3 ± 12.0)(67.1 ± 6.3)(66.3 ± 5.8) mmHg,分别为正常对照组的 37.3%、46.7%、56.9%、61.3%、60.5%,其中 CsA 5 mg/kg 和 10 mg/kg 组与 LR 组之间存在统计学差异($P < 0.05$)。CsA 输注也恢复了休克后降低的 HR,但 CsA 各剂量组与 LR 组之间无统计学差异。

2.3 对创伤失血性休克大鼠 LVSP 和 LVEDP 的影响

休克后各组 LVSP 均明显降低,输注 LR 后 LVSP 回升至(73.6 ± 14.3) mmHg,但显著低于正常对照组(127.1 ± 14.2) mmHg($P < 0.01$)。CsA 5 mg/kg 和 10 mg/kg 输注可明显升高 LVSP,在输液后 2 h 时 LVSP 分别为(121.2 ± 14.4) mmHg 和(119.9 ± 15.2) mmHg,明显高于 LR 组($P < 0.05$),并接近正常水平;CsA 1 mg/kg 输注也升高了休克大鼠 LVSP,但与 LR 组比较无显著差异。各组间 LVEDP 无统计学差异。

2.4 对创伤失血性休克大鼠 ± dp/dt_{max} 的影响

休克后各组的 ± dp/dt_{max} 均明显下降,各剂量 CsA 输注可使降低的 ± dp/dt_{max} 明显回升,其中 CsA 5 mg/kg 和 10 mg/kg 的效果较为显著。在输液后 2 h 时,LR 复苏组的 ± dp/dt_{max} 分别为(5118.0 ± 892.0) mmHg/s、(-4689.1 ± 531.1) mmHg/s,而 CsA 5 mg/kg 组的 ± dp/dt_{max} 分别为(6424.2 ± 674.1) mmHg/s、(-5783.6 ± 721.7) mmHg/s,CsA 10 mg/kg 组的 ± dp/dt_{max} 分别为(6343.0 ± 618.9) mmHg/s、(-5737.5 ± 522.2) mmHg/s,明显高于 LR 复苏组($P < 0.05$),并接近正常水平;CsA 1 mg/kg 输注的效果与 LR 组比较无显著性差异。

3 讨论

线粒体通透性转换是损害性刺激(如氧化应激、钙超载、缺氧和细胞毒性药物等)引起线粒体膜通透性发生突然升高的一种现象,它在线粒体损伤及随后的细胞功能障碍、细胞凋亡或坏死中扮演重要角色[7]。目前认为线粒体通透性转换是由线粒体通透性转换孔(MPTP)开放所引起。MPTP 是横跨线粒体内、外膜之间的非选择性通道,但其具体组成尚不完全清楚,通常认为它是由位于线粒体内、外膜上多种蛋白组成的复合孔道,主要由外膜的电压依赖性阴离子通道(VDAC)、内膜的腺苷酸转移酶(ANT)和基质的亲环蛋白 D(CyP-D)组成[8-9]。近来研究表明,MPTP 开放在组织细胞的缺血性、氧化性损害中起着重要作用。采用 MPTP 的抑制剂环孢素 A(CsA)处理,可明显减轻缺血-再灌注和缺氧-复氧所引起的心肌和脑组织损伤[1,2,10]。采用 CsA 抑制线粒体 MPTP 开放能否改善休克动物的心血管功能、发挥抗休克作用目前尚不清楚。本研究采用大鼠创伤失血性休克模型研究 CsA 对休克动物存活时间、24 h 存活率、平均动脉血压及血流动力学指标的影响。结果发现,CsA 可明显延长休克大鼠的存活时间,提高 24 h 存活率,改善休克后血流动力学指标 MAP、LVSP、± dp/dt_{max},表明 CsA 对创伤失血性休克有较好的治疗作用。

环孢素 A(CsA)作为一种强效免疫抑制剂,已广泛用于器官移植术后的排斥反应,随着研究的深入,CsA 在自身免疫性疾病、血液病、皮肤病和呼吸系统疾病等方面的治疗作用也逐步被发现。但是,在临床应用中,CsA 在用药剂量过大或用药时间过长时会引起严重的不良反应,包括肝毒性、肾毒性、神经毒性和胃肠道反应等[11]。因此,选择适宜的剂量和给药方式对发挥 CsA 的治疗作用、减少不良反应十分重要。本实验采用静脉一次性给药的方式,观察 3 种剂量的 CsA(1、5、10 mg/kg)的抗休克作用,发现 5 mg/kg 和 10 mg/kg 的 CsA 均有明显的改善血流动力学、提高休克动物存活率的作用,而 CsA 1 mg/kg 的治疗作用与 LR 组相比无统计学差异。结果提示,5 mg/kg 和 10 mg/kg 的 CsA 都显示了较好的抗休克作用,且两者的治疗效果无明显差异,那么在临床应用中 CsA 5 mg/kg 可能是较好的选择,采用这一剂量能在发挥 CsA 治疗作用的同时减少其不良反应。

本实验结果表明环孢素 A 具有较好的抗创伤失血性休克作用,其中以 5 mg/kg 和 10 mg/kg 的效果较为明显。这一研究发现为以线粒体 MPTP 为调节靶点、将 MPTP 抑制剂 CsA 应用于创伤休克的治疗提供了理论基础,但 CsA 对重要生命器官功能的影响如何,需要进一步研究证明。

[参考文献]

[1] Gill RS, Lee TF, Manouchehri N, et al. Postresuscitation cyclosporine treatment attenuates myocardial and cardiac mitochondrial injury in newborn piglets with asphyxia-reoxygenation[J]. Crit Care Med, 2013, 41(4): 1069-1074.

[2] Hausenloy DJ, Boston-Griffiths EA, Yellon DM. Cyclosporin A and cardioprotection: from investigative tool to therapeutic agent[J]. Br J Pharmacol, 2012, 165(5): 1235-1245.

[3] Vianello A, Casolo V, Petrussa E, et al. The mitochondrial permeability transition pore (PTP)-an example of multiple molecular exaptation[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1817(11): 2072-2086.

[4] Assaly R, de Tassigny Ad, Paradis S, et al. Oxidative stress, mitochondrial permeability transition pore opening and cell death during hypoxia-reoxygenation in adult cardiomyocytes[J]. Eur J Pharmacol, 2012, 675(1-3): 6-14.

[5] 杨光明,李 涛,徐 竞,等. 细胞外信号调节激酶在失血性休克后活性变化及其在血管反应性调节中的作用[J]. 中华实验外科杂志, 2011, 28(6): 907-910.

[6] Li T, Lin X, Zhu Y, et al. Short-term, mild hypothermia can increase the beneficial effect of permissive hypotension on uncontrolled hemorrhagic shock in rats[J]. Anesthesiology, 2012, 116(6): 1288-1298.

[7] Ruiz-Meana M. Ischaemic preconditioning and mitochondrial permeability transition: a long-lasting relationship[J]. Cardiovasc Res, 2012, 96(2): 157-159.

[8] Elrod JW, Molkentin JD. Physiologic functions of cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition pore[J]. Circ J, 2013, 77(5): 1111-1122.

[9] Giorgio V, von Stockum S, Antoniel M, et al. Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(15): 5887-5892.

[10] Diaz RJ, Fernandes K, Lytvyn Y, et al. Enhanced cell-volume regulation in cyclosporin A cardioprotection[J]. Cardiovasc Res, 2013, 98(3): 411-419.

[11] 张 燊,张治明,苏泽轩. 钙蛋白酶抑制剂 E-64 对于环孢素 A 诱发小鼠肾脏损伤的保护作用[J]. 中华实验外科杂志, 2011, 28(12): 2083-2085.

(编辑:雷 艳)