环孢素 A 对大鼠缺血缺氧后酸碱平衡的调节作用

雷 艳,董兆君 (第三军医大学军事预防医学院毒理学研究所,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 探讨不同剂量环孢素 A(CsA)对休克引起大鼠缺血缺氧状态下血气指标的影响,初步探讨 CsA 的抗休克效果。**方法** 采用 SD 大鼠创伤失血性休克模型,实验动物分为正常对照组、休克对照组、LR 液复苏组、LR 液 + CsA 1 mg/kg 组、LR 液 + CsA 5 mg/kg 组、LR 液 + CsA 10 mg/kg 组。各组分别在休克前、休克末、复苏后 1 h、复苏后 2 h 取血,观察 pH、HCO_3^-、碱剩余、乳酸指标的变化情况。**结果** 各组在休克末均出现 pH 值下降、HCO_3^- 明显降低、BE 负值增大、乳酸升高,呈现明显的酸中毒。经过液体复苏后,血气指标有所改善。各剂量的 CsA 输注均可改善休克后的酸中毒状态,效果明显优于单用乳酸林格氏液复苏,其中以 CsA 5 mg/kg 的治疗效果最为明显。**结论** 环孢素 A 对严重创伤失血性休克大鼠血气指标有较好的改善作用。

[关键词] 环孢素 A;失血性休克;创伤;血气
[中图分类号] R605.971 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2013)04-0374-03

Effects of cyclosporin A on acid-base balance after hypoxia-ischemia in rats

LEI Yan, DONG Zhao-jun (Institute of Toxicology, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of different doses of cyclosporin A (CsA) on acid-base balance after hypoxia-ischemia in rats and discuss the effects of CsA in terms of antishock. **Methods** The experimental rats were divied into the following 6 groups with traumatic hemorrhagic shock model of SD rats: normal control group, shock control group, LR group, LR + CsA 1 mg/kg group, LR + CsA 5 mg/kg group, and LR + CsA 10 mg/kg group. Draw blood of every group before the shock, at the end of shock, 1 hour after recovery, and 2 hours after recovery respectively, and observe the changes of blood pH, HCO_3^-, base excess (BE), and lactate. **Results** At the end of shock, blood pH, HCO_3^- and base excess decreased while lactate increased obviously which indicated acidosis clearly in all groups. After fluid resuscitation, blood gas index improved accordingly. And the three doses of CsA could relieve symptoms of acidosis with better effects than lactated ringer's solution alone. Among them, CsA 5 mg/kg had the best resuscitation effect. **Conclusion** CsA can effectively improve the blood gases for traumatic hemorrhagic shock.

Keywords: cyclosporin A; hemorrhagic shock; trauma; blood gas

线粒体是细胞的能量代谢中心,参与氧化应激、基因表达和细胞凋亡等多种重要过程的调控。线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, mPTP)是线粒体与细胞质间进行物质和信息交换的重要通道[1],是影响线粒体稳定性和细胞功能的关键因素之一。氧化应激、能量耗竭、细胞内酸中毒等多种因素可诱发 mPTP 开放,mPTP 开放在组织细胞的缺血性、氧化性损害中起着重要作用[2]。通过前期研究我们发现,线粒体 mPTP 关闭剂环孢素 A(cyclosporin A, CsA)对严重创伤失血性休克有较好的治疗作用,但 CsA 是如何发挥抗休克作用的,尚不清楚。本实验采用大鼠创伤失血性休克模型,观察不同剂量 CsA 对休克引起缺血缺氧状态下动物血气指标的影响,以进一步了解 CsA 发挥抗休克作用的途径。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SD 大鼠 48 只,雌雄各半,体质量(203 ± 20)g,由第三军医大学野战外科研究所实验动物中心提供。随机分为 6 组,每组 8 只动物,分别为正常对照组、休克对照组(Shock 组)、乳酸林格氏液复苏组(LR 组)、乳酸林格氏液 + CsA 1 mg/kg 组(CsA 1 组)、乳酸林格氏液 + CsA 5 mg/kg 组(CsA 5 组)、乳酸林格氏液 + CsA 10 mg/kg 组(CsA 10 组)。

1.2 实验方法

动物实验前 12 h 禁食,自由饮水,实验当日用 3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉,行右侧股动脉、股静脉插管。股动脉插管经三通管连接水银血压计和玻璃注射器,用以观察血压、放血和取血测量血气指标,股静脉插管用以给药复苏,经插管注射肝素钠生理盐水(500 U/kg)抗凝。将大鼠单侧股骨折断,并经股动脉插管放血,使血压维持在 40 mmHg,持续 3 h,以此方法建立创伤失血性休克模型,并按照分组予以不同处理。正常对照组不进行骨折和放血处理,仅插管检测血气指标;

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201304012
[基金项目] 国家自然科学基金(81270400)
[通讯作者] 董兆君,E-mail:dongzj@163.com
[收稿日期] 2013-05-16 [修回日期] 2013-05-25

Shock 组在创伤失血性休克模型完成后不复苏;LR 组给予 2 倍失血量的乳酸林格液(LR)进行复苏;LR + CsA 1、5、10 mg/kg 组分别将 1、5、10 mg/kg 的 CsA 加入 2 倍失血量的 LR 中输注,复苏均用输液泵输注。各组分别于休克前、休克末(创伤失血性休克 3 h)、复苏后 1 h、复苏后 2 h 取血,检测 pH、HCO_3^-、碱剩余(base excess,BE)、乳酸等指标。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件中重复测量设计资料的方差分析进行数据处理,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间多重比较采用 Tukey 检验,$P < 0.05$ 表示具有统计学差异。

2 结果

2.1 CsA 对创伤失血性休克大鼠 pH 值的影响

休克末时,各休克处理组的 pH 值均明显低于正常对照组($P < 0.05$)。液体复苏后各组 pH 值逐渐回升,在复苏 2 h 时,LR 组和 CsA 各剂量组的 pH 值与正常组无显著差异,CsA1.5 mg/kg 组明显高于 Shock 组($P < 0.05$),见表 1。

2.2 CsA 对创伤失血性休克大鼠 HCO_3^- 的影响

休克后 HCO_3^- 值明显降低,各休克处理组均低于正常组($P < 0.05$)。不同剂量 CsA 输注后 HCO_3^- 有不同程度升高,在复苏 2 h 时,CsA 1 mg/kg 组和 CsA 5 mg/kg 组的 HCO_3^- 值明显高于 Shock 组($P < 0.05$),且 CsA 5 mg/kg 组明显高于 LR 组($P < 0.05$),见表 2。

2.3 CsA 对创伤失血性休克大鼠 BE 的影响

休克末时,各休克处理组的 BE 值均明显低于正常组($P < 0.05$)。复苏后 BE 指标逐渐回升,在复苏 2 h 时,CsA 各剂量组的 BE 值均明显高于 Shock 组($P < 0.05$),且 CsA 5 mg/kg组明显高于 LR 组($P < 0.05$),见表 3。

2.4 CsA 对创伤失血性休克大鼠乳酸的影响

休克后乳酸值显著升高($P < 0.05$)。经液体复苏后,乳酸值有所下降。在复苏 2 h 时,CsA 各剂量组的乳酸值均明显低于 Shock 组($P < 0.05$),且 CsA 5 mg/kg 组明显低于 LR 组($P < 0.05$),见表 4。

表 1 各处理组 pH 的变化情况($\bar{x} \pm s$,$n = 8$)

分组	休克前	休克末	复苏后 1 h	复苏后 2 h
正常组	7.38 ± 0.06	7.39 ± 0.06	7.40 ± 0.07	7.38 ± 0.08
Shock 组	7.39 ± 0.04	7.28 ± 0.04 *	7.27 ± 0.04 *	7.29 ± 0.05
LR 组	7.36 ± 0.03	7.23 ± 0.06 *	7.31 ± 0.07	7.34 ± 0.05
CsA 1 组	7.40 ± 0.05	7.25 ± 0.05 *	7.37 ± 0.03 #	7.44 ± 0.04 #
CsA 5 组	7.39 ± 0.04	7.26 ± 0.10 *	7.33 ± 0.08	7.39 ± 0.08 #
CsA 10 组	7.41 ± 0.03	7.21 ± 0.09 *	7.33 ± 0.08	7.38 ± 0.08

*:与正常组比较,$P < 0.05$;#:与 Shock 组比较,$P < 0.05$

表 2 各处理组 HCO_3^- 的变化情况($\bar{x} \pm s$,$n = 8$,mmol/L)

分组	休克前	休克末	复苏后 1 h	复苏后 2 h
正常组	25.76 ± 1.95	25.60 ± 3.60	23.74 ± 2.57	24.55 ± 2.93
Shock 组	23.61 ± 2.95	13.21 ± 2.16 *	11.84 ± 2.93 *	12.05 ± 2.81 *
LR 组	23.20 ± 1.91	14.51 ± 1.27 *	14.34 ± 1.90 *	15.46 ± 1.44 *
CsA 1 组	22.39 ± 2.28	12.21 ± 1.70 *	15.29 ± 2.12 *	17.83 ± 2.79 *#
CsA 5 组	25.16 ± 2.44	12.55 ± 2.33 *	19.55 ± 3.16 *#△	19.41 ± 3.33 *#△
CsA 10 组	24.75 ± 2.14	10.31 ± 2.41 *	14.11 ± 2.37 *	15.84 ± 1.55 *

*:与正常组比较,$P < 0.05$;#:与 Shock 组比较,$P < 0.05$;△:与 LR 组比较,$P < 0.05$

表 3 各处理组 BE 的变化情况($\bar{x} \pm s$,$n = 8$,mmol/L)

分组	休克前	休克末	复苏后 1 h	复苏后 2 h
正常组	−1.60 ± 1.53	−0.33 ± 2.34	0.95 ± 1.98	1.91 ± 1.58
Shock 组	−0.45 ± 2.34	−13.60 ± 2.39 *	−14.55 ± 3.58 *	−14.06 ± 3.70 *
LR 组	−1.05 ± 2.01	−13.94 ± 2.21 *	−12.33 ± 2.59 *	−11.35 ± 2.76 *
CsA 1 组	−2.29 ± 1.61	−14.55 ± 1.93 *	−10.43 ± 2.74 *	−7.24 ± 2.75 *#
CsA 5 组	0.59 ± 2.84	−13.84 ± 2.54 *	−8.41 ± 3.69 *#	−6.29 ± 3.05 *#△
CsA 10 组	0.06 ± 1.71	−16.74 ± 3.13 *	−12.06 ± 3.19 *	−9.49 ± 2.42 *#

*:与正常组比较,$P < 0.05$;#:与 Shock 组比较,$P < 0.05$;△:与 LR 组比较,$P < 0.05$

表 4 各处理组乳酸的变化情况($\bar{x} \pm s$, $n = 8$, mmol/L)

分组	休克前	休克末	复苏后 1 h	复苏后 2 h
正常组	1.26 ± 0.30	1.75 ± 0.46	2.33 ± 0.51	2.14 ± 0.57
Shock 组	1.40 ± 0.40	8.70 ± 0.93 *	8.53 ± 1.13 *	8.18 ± 1.11 *
LR 组	1.64 ± 0.53	8.73 ± 1.59 *	8.39 ± 1.21 *	6.66 ± 0.99 *
CsA 1 组	1.15 ± 0.28	8.61 ± 0.57 *	6.88 ± 0.52 *#△	6.01 ± 1.44 *#
CsA 5 组	1.35 ± 0.29	9.29 ± 1.19 *	5.95 ± 1.14 *#△	4.48 ± 0.93 *#△
CsA 10 组	0.98 ± 0.17	8.89 ± 1.28 *	6.73 ± 0.75 *#△	5.80 ± 1.15 *#

*:与正常组比较,$P < 0.05$;#:与 Shock 组比较,$P < 0.05$;△:与 LR 组比较,$P < 0.05$

3 讨论

创伤失血性休克是战创伤最常见的并发症之一,其发生率和死亡率都很高。液体复苏是进行休克早期治疗的重要措施。但由于严重创伤失血性休克的病因、病理复杂,单纯通过液体输入来补充血容量,难以达到理想的救治效果。因此,在严重创伤失血性休克情况下,如何提高液体复苏的效果,是亟待深入研究和解决的难题。

线粒体是细胞能量代谢的中心,是细胞氧化磷酸化反应产生 ATP 的重要场所,调控着细胞能量代谢和凋亡通路[3]。mPTP 是位于线粒体内、外膜之间的非特异性孔道,能够调节线粒体膜的通透性,是线粒体进行氧化应激、ATP 合成及实现其生理功能的必要条件[4-5]。正常情况下,mPTP 处于间断性开放状态[6],线粒体内膜通透性小。当 mPTP 大量开放时,线粒体外的 Ca^{2+} 大量内流,导致线粒体基质渗透压升高,线粒体外膜损伤,膜电位下降,呼吸链解偶联,细胞色素 C 等小分子蛋白释放,最终诱导细胞凋亡或死亡[7-9]。因此,mPTP 是细胞凋亡线粒体途径的枢纽。

环孢素 A 是一种主要作用于 T 淋巴细胞的强效免疫抑制剂,广泛应用于器官移植后抗排斥反应及自身免疫性疾病的治疗[10-11]。同时,CsA 可能通过与 mPTP 的重要组成部分亲环蛋白 CyP-D 结合,发挥强效的抑制 mPTP 开放的作用。国内外研究报道,CsA 可对组织缺血再灌注损伤发挥较好的保护作用。我们的前期实验结果提示,mPTP 开放可能参与了休克后血管低反应性的发生,而 mPTP 关闭剂 CsA 对严重创伤失血性休克有较好的治疗作用,但 CsA 是如何发挥抗休克作用的,目前尚不清楚。在本实验中,休克后大鼠 pH 值下降、HCO_3^- 明显降低、BE 负值增大、乳酸升高,这些血气指标变化均提示代谢性酸中毒的存在。经过液体复苏后,血气指标有所改善,单纯应用 LR 复苏对血气指标的改善作用较弱,给予 CsA 复苏的效果明显优于单纯使用 LR。通过 CsA 不同剂量组之间的比较,我们发现给予 5 mg/kg CsA 的治疗效果优于 1 mg/kg 和 10 mg/kg,其原因可能是 CsA 与其他亲环蛋白家族成员结合,产生不利后果[4]。这一结果提示在使用 CsA 进行休克治疗时应掌握好剂量,避免大量用药时产生的全身毒副作用。

[参考文献]

[1] Zorov DB, Juhaszova M, Yaniv Y, et al. Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore [J]. Cardiovasc Res, 2009, 83(2): 213 - 225.

[2] Gomez L, Paillard M, Thibault H, et al. Inhibition of GSK3beta by post-conditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion [J]. Circulation, 2008, 117(21): 2761 - 2768.

[3] 马宇洁,杨兴易,林兆奋,等. 心肺复苏后大鼠脑线粒体通透性转换孔变化在细胞能量代谢障碍中的作用及机制[J]. 医学研究杂志, 2010, 39(10): 37 - 40.

[4] 方前进,严中亚,李建安. 环孢素 A 对兔肺缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(7): 793 - 796.

[5] 杨 爽,刘晓岩,胡振宇,等. 和厚朴酚通过抑制脑 MPTP 开放和调节 PARP-1 活性保护全脑缺血的作用研究[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(2): 218 - 221.

[6] 戴雍月,朱仁武,倪世容,等. 环孢素 A 对大鼠肺缺血/再灌注损伤中细胞凋亡的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2010, 26(4): 493 - 496.

[7] 李双凤,王 丹,王亚平,等. MPTP 参与硫化氢对大鼠心肌缺血再灌注损伤的延迟性保护作用[J]. 东南大学学报(医学版), 2010, 29(6): 648 - 651.

[8] Joza N, Susin SA, Daugas E, et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death [J]. Nature, 2001, 410(6828): 549 - 554.

[9] Borutaite V, Brown GC. Mitochondria in apoptosis of ischemic heart [J]. FEBS Lett, 2003, 541(1 - 3): 1 - 5.

[10] 甄江涛,樊燕燕,赵晓丽,等. 环孢素 A 对大鼠缺血再灌注心肌嘌呤代谢的影响[J]. 天津医科大学学报, 2012, 18(1): 37 - 39.

[11] 刘 勇,殷桂林,朱水波,等. 心肌缺血期应用环孢素 A 对大鼠心肌功能的影响[J]. 中国医药导报, 2011, 8(33): 15 - 18.

(编辑:魏 源)