DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.02.023
第25卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 2
144 2003年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)02-0144-03

安定-氯胺酮对烧伤小鼠肝组织糖皮质激素受体的影响

李 军[1],史 忠[2],粟永萍[1],楼淑芬[1],刘晓宏[1],杨天德[2],刘都户[1],王军平[1] (第三军医大学:[1]预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所,重庆 400038;[2]附属新桥医院麻醉科,重庆 400037)

提 要:目的 研究安定-氯胺酮复合麻醉对烧伤小鼠肝组织糖皮质激素受体的影响,初步探讨其对创伤应激的调节作用。方法 雄性BALB/c小鼠,随机分为正常对照组、烧伤对照组、麻醉对照组、预处理组及后处理组。麻醉采用安定-氯胺酮复合麻醉,背部15%~20% Ⅲ度烧伤。烧伤后4 h测定血清皮质酮浓度,用Western blotting在蛋白质水平测定肝组织糖皮质激素受体。结果 烧伤对照组血清皮质酮浓度明显升高,肝组织糖皮质激素受体明显降低。预处理组与后处理组血清皮质酮浓度均低于烧伤对照组,肝组织糖皮质激素受体与正常对照组相差不明显,预处理组与后处理组相差不显著。结论 烧伤应激引起小鼠血清皮质酮明显升高,其受体在蛋白质水平明显降低。安定-氯胺酮复合麻醉对其具有一定的调节作用。

关键词:安定;氯胺酮;烧伤;糖皮质激素受体
中图法分类号:R392.11;R644.02;R971.2 文献标识码:A

Diazepam-ketamine combined anesthesia affects hepatic glucocorticoid receptor in burned mice

LI Jun, SHI Zhong, SU Yong-ping, LOU Shu-fen, LIU Xiao-hong, YANG Tian-de, LIU Du-hu, WANG Jun-ping (Institute of Combined Injury of PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the effect of diazepam-ketamine combined anesthesia on hepatic glucocorticoid receptor (GR) in burned mice. **Methods** BALB/c male mice were randomly divided into five groups: control; burn control, receiving 15%—20% thickness third degree burn injury; anesthesia control, receiving diazepam—ketamine combined anesthesia only; pretreatment, with diazepam-ketamine combined anesthesia initiated 15 min before burn injury; and posttreatment, with diazepam-ketamine combined anesthesia initiated 15 min after burn injury. At 4 h after burn injury or anesthesia, serum corticosterone concentration was examined and hepatic GR was detected by Western blotting. **Results** After burn injury, serum corticosterone level increased markedly whereas hepatic GR decreased markedly. The increased serum corticosterone and reduced GR responses to burn injury were markedly inhibited in the pretreatment group. The inhibitory effect was also found in the posttreatment. **Conclusion** Diazepam-ketamine combined anesthesia is of regulating effect on the remarkable increase of serum corticosterone level and the remarkable decrease of glucocorticoid receptor at protein level in mice due to burn injury stress.

Key words: diazepam; ketamine; burn; glucocorticoid receptor

氯胺酮已经广泛用于循环功能衰竭病人的麻醉诱导和镇静,因为它有增加交感神经系统活性的作用,有利于维持血压和心血管功能。近年来研究表明,氯胺酮对于内毒素血症病人的麻醉和救治也很有效,氯胺酮可减缓细胞因子的产生和释放[1,2]。但是氯胺酮对于创伤早期应激和炎症反应的调节目前国内外未见报道。糖皮质激素(Glucocorticoid, GC)是应激反应的主要激素之一,其生物学效应的发挥取决于靶细胞上的糖皮质激素受体(Glucocorticoid receptor, GR)的介导。GR与机体创伤后的应激和炎症反应密切相关。本实验以烧伤模型研究了安定-氯胺酮复合麻醉对小鼠血清皮质酮和肝组织GR水平的影响,初步探讨安定-氯胺酮麻醉对创伤早期应激和炎症反应的调节作用。

1 材料与方法

1.1 仪器

Heraeus超速低温离心机;Beckman DU640分光光度仪;Bio-RAD Gel Doc2000凝胶成像分析系统。

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054200)
作者简介:李 军(1971—),男,四川省绵阳市人,硕士,主治医师,主要从事创伤应激方面的研究。电话:(023)68752283
收稿日期:2002-02-25;修回日期:2002-06-27

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2　试剂

兔抗小鼠GR多克隆抗体IgG(Santa Cruz); 生物素化山羊抗兔IgG、辣根过氧化物酶标记抗体(博士德); 皮质酮放免试剂盒(天津)。

1.3　方法

1.3.1　实验动物分组及烧伤处理　　50只BALB/c小鼠, 20～25 g, 雄性, 均背部去毛, 随机分为正常对照组、烧伤对照组、麻醉对照组、麻醉后(15 min)烧伤预处理组及烧伤后(15 min)麻醉后处理组, 每组10只。麻醉均采用安定-氯胺酮复合麻醉, 安定0.4 mg/kg, 氯胺酮10 mg/kg, 左股部肌肉注射。使用凝固汽油制作烧伤模型, 约15%～20% Ⅲ度烧伤。分别于烧伤及麻醉后4 h取血和肝脏。

1.3.2　血清皮质酮浓度测定　　采用皮质酮放免试剂盒, 按操作说明检测。

1.3.3　肝组织总蛋白提取　　取肝组织100 mg加入裂解缓冲液(50 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl、0.02% NaN_3、0.1% SDS、100 μg/ml PMSF、1 μg/ml Aprotinin、1% NP40) 1 ml匀浆, 冰上裂解30 min, 4℃ 12 000× g离心20 min, 吸上清, －70℃保存。

1.3.4　肝组织总蛋白SDS-PAGE及GR的Western blotting　　采用Bradford法测定总蛋白浓度。取总蛋白40 μg行SDS-PAGE, 电泳结束后电转印4 h至PVDF膜。PVDF膜封闭液(1% BSA、0.02 mol/L PBS)内封闭, 4℃过夜。加入兔抗小鼠GR多克隆抗体(1∶500), 37℃孵育1 h, PBST(0.02 mol/L PBS、0.02% 吐温)洗膜5 min×3, 再加入山羊抗兔IgG(1∶700), 杂交袋内37℃孵育1 h, PBST洗膜5 min×3, 然后加入辣根过氧化物酶标记抗体(1∶500), 同样37℃孵育1 h及PBST洗膜5 min×3。最后硫酸镍铵增强法(0.06% DAB、2.5% 硫酸镍铵、0.1 mol/L 乙酸钠、0.1% H_2O_2)显色。

1.3.5　统计学处理　　实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用 t 检验。

2　结果

2.1　小鼠血清皮质酮浓度变化

烧伤对照组血清皮质酮浓度明显高于正常对照组, 而麻醉对照组也引起血清皮质酮水平升高, 但是明显低于烧伤对照组。预处理组与后处理组皮质酮水平相差不显著, 但都高于正常对照组, 低于烧伤对照组。结果见表1。

表 1　小鼠血清皮质酮浓度变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Alteration of serum corticosterone concentration of mice($\bar{x}\pm s$)

Group	n	GC(nmol/L)
Control	10	51.41±2.41
Burn control	10	134.80±4.72 *
Anesthesia control	10	69.82±3.21 *△
Pretreatment	10	84.10±3.24 *△
Posttreatment	10	87.15±3.42 *△

*: $P<0.01$ *vs* Control; △: $P<0.01$ *vs* Burn control

2.2　小鼠肝组织GR Western blotting结果

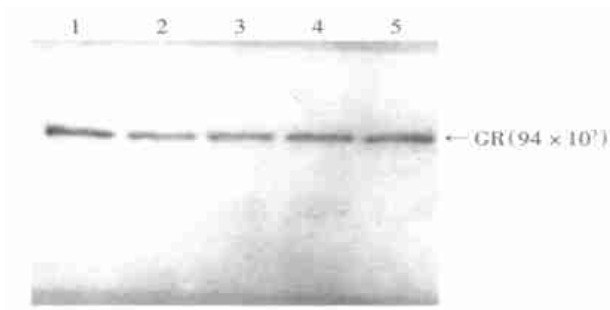
凝胶成像分析系统扫描测定各条带 A 值× 面积(Int×mm²), 结果见表2。结果表明烧伤后4 h肝组织GR在蛋白水平明显降低, 安定-氯胺酮复合麻醉同样也造成肝组织GR下调, 但下调幅度低于烧伤对照组; 安定-氯胺酮麻醉后15 min烧伤的预处理组肝组织GR降低不明显, 而烧伤后15 min安定-氯胺酮麻醉的后处理组肝组织GR也明显高于烧伤对照组; 预处理组与后处理组相差不显著, 见图1。

表 2　烧伤小鼠肝组织 GR 表达水平($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Expression of hepatic glucocortcoid receptor in burned mice($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Int×mm²
Control	6	1 736 668±27 049
Burn control	6	1 193 537±30 973 *
Anesthesia control	6	1 454 088±28 847 *
Pretreatment	6	1 794 677±44 517△
posttreatment	6	1 713 985±24 596△

*: $P<0.01$ *vs* Control; △: $P<0.01$ *vs* Burn control



1: Control; 2: Burn control; 3: Anesthesia; 4: Pretreatment; 5: Posttreatment

图 1　Western blotting 分析结果

Fig 1　Results of Western blotting analysis

3　讨论

GC效应是机体最为重要的应激反应之一, 其中GR是GC效应发挥的关键环节。近年来研究发现, 严重创伤引起机体GR的表达下调。GR的表达降低引起其功能受抑, 尤其是抗炎作用显著减弱, 从而促进过度炎症反应的形成和引发全身炎症反应综合征(SIRS)、多器官功能障碍综合征(MODS)等全身继发性损害。严重创伤后多器官功能衰竭的发生与外周血白细胞GR的降低有着明显的相关性, GR越低, 病情越重, 器官衰竭增多, 病死率增加[3]。大鼠严重烫伤后GR的减少与血浆和脏器组织匀浆中磷脂酶A_2活性的升高、血浆TNF-α和丙二醛的含量增加有显著的相关性[4]。徐仁宝等[5]提出应激时GR减少, 引起受体水平上的肾上腺皮质功能不全, 是休克发生发展的一个重要环节。

安定-氯胺酮复合麻醉作为基本的麻醉方式, 近年来已经广泛用于内毒素血症病人的麻醉和救治。研究表明氯胺酮具有抗炎效应, 对细胞因子的产生和释放有抑制作用[1,2], 其机制还不清楚。氯胺酮对LPS诱导的TNF-α有潜在的抑制效应, 它显著降低TNF-α活性,

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

提高 PaO_2，改善代谢性酸中毒和低血糖，减轻肝损伤，降低内毒素休克的死亡率[6]。Kawasaki 等[7,8] 的研究表明氯胺酮在人全血中直接抑制致炎因子的生成，不仅抑制 LPS 诱导的 TNF-α、IL-6、IL-8 生成，还抑制 TNF-α 诱导的 IL-6、IL-8 生成。IL-6 浓度是炎症级联反应激活的指示剂，它持续增高与手术创伤后器官功能衰竭的发生和死亡率密切相关，氯胺酮可以有效的抑制手术创伤后 IL-6 的升高[9]。

本实验结果显示烧伤后 4 h 小鼠血清皮质酮明显升高，肝组织 GR 显著降低，在烧伤前给予安定-氯胺酮复合麻醉预处理，可以明显缓解这个反应，甚至烧伤后给予安定-氯胺酮复合麻醉，也同样具有抑制作用，表明安定-氯胺酮复合麻醉对烧伤后早期应激反应和炎症反应具有调节作用，可抑制 GR 的表达下调，避免 SIRS、MODS 等全身继发性损害的发生。对于严重创伤后（如烧伤），早期审慎地使用安定-氯胺酮复合麻醉可能有助于机体的恢复，提高生存率。以往的研究证实，GC 对 GR 具有反向调节，血浆 GC 浓度提高是 GR 减少的一个原因[10]。烧伤应激后机体下丘脑-垂体-肾上腺（HPA）轴过度兴奋，引起 GC 的升高与 GR 下调有关。另外，还与此时海马 GR 表达降低，使得其对 HPA 轴的负反馈作用减弱有关。GC 在海马介导应激性刺激的适应性反应，应激后 1 h 海马 GR mRNA 显著下降，这个下降可能被 N-甲基-D-门冬氨酸（N-methyl-D-aspartate，NMDA）受体、苯二氮卓受体等介导[11]。安定-氯胺酮复合麻醉抑制烧伤后 GR 表达下调的机制尚不清楚，可能是抑制了烧伤后 HPA 轴的过度兴奋或/和通过 NMDA 受体、苯二氮卓受体等抑制了海马 GR 的表达下调。实验结果可见麻醉后烧伤小鼠血清皮质酮仍高于正常，而肝组织 GR 与正常组相差不显著，提示安定-氯胺酮复合麻醉对 GR 的调节可能是多环节的，这有待进一步研究证实。

另外，本实验结果还表明，单纯使用安定-氯胺酮复合麻醉，可以引起血清皮质酮升高，肝组织 GR 下调。这可能是由于氯胺酮有明显的类固醇反应，刺激垂体细胞增加 ACTH 分泌，从而引起皮质醇显著升高所造成的[12,13]。

参考文献：

[1] Larsen B, Hoff G, Wilhelm W, *et al*. Effect of intravenous anesthetics on spontaneous and endotoxin-stimulated cytokine response in cultured human whole blood[J]. Anesthesiology, 1998, 89(5): 1218－1227.

[2] Mastronardi C A, Yu W H, McCann S M. Comparisons of the effects of anesthesia and stress on release of tumor necrosis factor-alpha, leptin, and nitric oxidein adult male rats[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2001, 226(4): 296－300.

[3] 马钧，景炳文，杨兴易，等. 多器官衰竭患者白细胞糖皮质激素受体和血浆皮质醇变化的观察[J]. 中国危重病急救医学, 1995, 7(6): 371－373.

[4] 王志红，肖素芳，林海. 烫伤大鼠糖皮质激素受体减少与全身炎症反应综合症的关系[J]. 福建医科大学学报, 2000, 34(1): 39－41.

[5] 徐仁宝. 糖皮质激素受体减少在休克发生中的作用——一个新假说[J]. 生命科学, 1997, 9(2): 78－80.

[6] Koga K, Ogata M, Takenaka I, *et al*. Ketamine suppresses tumor necrosis factor-alpha activity and mortality in carrageenan-sensitized endotoxin shock model[J]. Circ Shock, 1994, 44(3): 160－168.

[7] Kawasaki T, Ogata M, Kawasaki C, *et al*. Ketamine suppresses proinflammatory cytokine production in human whole blood *in vitro*[J]. Anesth Analg, 1999, 89(3): 665－669.

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

[9] Roytblat L, Talmor D, Rachinsky M, *et al*. Ketamine attenuates the interleukin-6 response after cardiopulmonary bypass[J]. Anesth Analg, 1998, 87(2): 266－271.

[10] Kurihara I, Shibata H, Suzuki T, *et al*. Transcriptional regulation of steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) in glucocorticoid action[J]. Endocr Res, 2000, 26(4): 1033－1038.

[11] Tritos N, Kitraki E, Philippidis H, *et al*. Neurotransmitter modulation of glucocorticoid receptor mRNA levels in the rat hippocampus[J]. Neuroendocrinology, 1999, 69(5): 324－330.

[12] Van Berckel B N, Oranje B, van Ree J M, *et al*. The effects of low dose ketamine on sensory gating, neuroendocrine secretion and behavior in healthy human subjects[J]. Psychopharmacology, 1998, 137(3): 271－281.

[13] Kudo M, Kudo T, Matsuki A. Pituitary-adrenal response to ketamine[J]. Masui, 1991, 40(7): 1107－1112.

（编辑 郭建秀）

（上接 140 页）

患者多数患者有明确的病因，根据病史和查体结果做出初步诊断应不困难。然而，本组患者都曾在多家医院多次就诊，未能及时明确诊断。分析延误诊治的主要原因是由于临床医师对于本病的认识不足，引起的教训值得重视。

关键词：脊髓亚急性联合变性；维生素 B_{12}

中图法分类号：R744 文献标识码：B

参考文献：

[1] 朱立菁，钱可久. 脊髓亚急性联合变性 13 例临床分析[J]. 新医学, 2000, 31(10): 602.

[2] Lazzaro V D, Restuccia D, Fogli D, *et al*. Central sensory and motor conduction in vitamin B12 deficency[J]. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1992, 84(5): 433－439.

（编辑 汪勤俭）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net