

· 论 著 ·

氯胺酮对脂多糖诱导的大鼠肺泡巨噬细胞抗氧化能力的影响

尤克强¹, 张小宝¹, 傅诚章²

(1. 江苏省连云港市第一人民医院麻醉科 222000; 2. 江苏省人民医院麻醉科, 南京 210029)

摘要:目的 研究氯胺酮对脂多糖(LPS)刺激的大鼠肺泡巨噬细胞(AM)抗氧化能力的影响。方法 体外培养大鼠肺泡 AM 株 NR8383 经氯胺酮(10、100、1 000 $\mu\text{mol/L}$)预处理, LPS 刺激 24 h 后, 应用试剂盒检测细胞培养上清液中总抗氧化能力(T-AOC)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平。结果 与磷酸盐缓冲液(PBS)组比较, LPS 组培养上清液中 T-AOC 和 GSH-Px 水平均明显下降。低浓度氯胺酮预处理组(10 $\mu\text{mol/L}$)与 LPS 组比较, 差异无统计学意义。而较高浓度氯胺酮预处理组(100、1 000 $\mu\text{mol/L}$)与 LPS 组比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 一定浓度氯胺酮对 LPS 刺激的 NR8383 细胞 T-AOC 和 GSH-Px 水平降低具有明显改善作用。

关键词:氯胺酮; 脂多糖; 大鼠肺泡巨噬细胞系 NR8383; 总抗氧化能力; 谷胱甘肽过氧化物酶

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.16.013

中图分类号: R971.2

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)16-2121-02

Effect of ketamine on antioxidation in Lipopolysaccharide-stimulated rat alveolar macrophage cell line

YOU Ke-qiang¹, ZHANG Xiao-bao¹, FU Cheng-zhang²

(1. Department of Anesthesiology, First People's Hospital of Lianyungang City, Jiangsu 222000, China;

2. Department of Anesthesiology, People's Hospital of Jiangsu Province, Nanjing, Jiangsu 210029, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of ketamine on antioxidation in the supernatant in the rat alveolar macrophage cell line (NR8383) activated by Lipopolysaccharide (LPS). Methods Macrophage was pretreated with ketamine at concentration of 10, 100, 1 000 $\mu\text{mol/L}$, then was stimulated with LPS. The production of T-AOC and GSH-Px in the supernatant of macrophage was assayed by T-AOC and GSH-Px kit. Results LPS induced an decrease of T-AOC and GSH-Px in the supernatant. Pretreatment with ketamine(100, 1 000 $\mu\text{mol/L}$) could inhibit this response. Conclusion Ketamine exerte a ameliorative effect on LPS-induced descent of T-AOC and GSH-Px of NR8383.

Key words: ketamine; lipopolysaccharide; rat alveolar macrophage cell line NR8383; T-AOC; GSH-Px

氯胺酮是常用静脉麻醉药, 离体实验结果显示, 氯胺酮能够抑制巨噬细胞(AM)释放炎症因子^[1], 从而发挥抗炎效应。而脂多糖(LPS)是革兰阴性菌外膜组成成分, 侵入机体后在 LPS 结合蛋白介导下, 与 AM 膜上 CD14 结合, 通过核因子- κB (NF- κB)信号等途径调节细胞因子释放和一氧化氮(NO)产生而参与炎症反应^[2]。AM 是炎症反应的主要效应细胞, AM 通过分泌各种细胞因子、自由基、蛋白酶及各种补体参与局部炎症反应^[3]。本研究以肺泡 AM 系 NR8383 为研究对象, 观察氯胺酮对 LPS 刺激的总抗氧化能力(T-AOC)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的干预作用, 初步探讨氯胺酮对 LPS 诱发的氧化应激作用及可能机制。

1 材料与方

1.1 材料 大鼠 AM 系 NR8383(ATCC)、LPS (Sigma, 美国)、盐酸氯胺酮结晶粉末 (KET, 含量 99.8%, 批号 05051112, 江苏恒瑞医药股份有限公司生产)、Ham's F-12 培养液(hyclone, 美国)、T-AOC 和 GSH-Px 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)、胎牛血清(杭州四季青)、全自动酶标仪(sunrise, 澳大利亚)等。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将 NR8383 细胞株置于含 15% 胎牛血清、青霉素(100 u/mL)、链霉素(100 $\mu\text{g/mL}$)、L-谷氨酰胺(2 mmol/L)、 NaHCO_3 (1.5 g/L) Ham's F-12 培养基中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱中培养。

1.2.2 培养上清液中 T-AOC 和 GSH-Px 的检测 将大鼠 AM 按 5×10^5 个/mL 接种于 24 孔板, 每孔 1 mL。分为 5 组,

对照组(C 组)于培养基中加入与 LPS 等量的磷酸盐缓冲液(PBS); LPS 组(L 组)于培养基中加入 LPS(1 mg/L); 氯胺酮组(K1~3 组)于培养基中加入氯胺酮(终浓度分别为 10、100、1 000 $\mu\text{mol/L}$), 孵育 0.5 h 后, 再加入 LPS。培养 24 h 后收集各组培养液, 离心后取上清液, 立即冻存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱待测。上清液稀释后按试剂盒说明书进行检测。

1.3 统计学方法 采用 SPSS11.5 统计软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异采用 One-way ANOVA, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

LPS 刺激 24 h 后 NR8383 细胞 T-AOC 和 GSH-Px 水平明显降低($P < 0.01$)。氯胺酮低浓度组(10 $\mu\text{mol/L}$)与 LPS 组比较, 差异无统计学意义, 而中、高浓度组(100、1 000 $\mu\text{mol/L}$)能够使 LPS 诱导的 T-AOC 和 GSH-Px 水平升高, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 见表 1。

表 1 各组 T-AOC 和 GSH-Px 水平检测结果(u/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	T-AOC	GSH-Px
C 组	15.2 \pm 0.2	46.2 \pm 4.6
L 组	7.3 \pm 0.5 ^Δ	21.7 \pm 3.6 ^Δ
K1 组	8.9 \pm 0.4	27.5 \pm 2.8
K2 组	11.4 \pm 0.3*	34.1 \pm 6.1*
K3 组	12.2 \pm 0.6*	38.7 \pm 3.5*

^Δ: 与对照组比较, $P < 0.01$; * : 与 LPS 组比较, $P < 0.01$ 。

3 讨 论

AM 是生物体抵御外来微生物入侵的天然屏障,是固有性免疫细胞中重要的效应细胞。AM 位于肺泡腔及小气道内,是肺内重要的常驻细胞和防御细胞。除发挥吞噬防御功能外,也可通过分泌大量的细胞因子始动和调节局部的炎症反应。在慢性阻塞性肺病、免疫复合物诱导的肺损伤、哮喘等肺疾病中 AM 起着重要作用。AM 还能被很多物质激活,如 LPS、 H_2O_2 、IFN- γ 等,产生氧化应激损伤。在哮喘研究模型中,目前多采用大鼠作实验模型,故本研究采用大鼠肺泡 AM,选用具有正常肺泡 AM 特点的大鼠 AM 系 NR8383 作为研究对象,可连续传代,不仅省时省力,而且还可以克服动物个体差异导致的结果不稳定性。NR8383 细胞能提供研究肺泡 AM 适合的试验系统,能够对刺激产生相应的反应,产生细胞因子等。

在激活状态下,AM 产生大量氧自由基,这些分子具有很高的反应性,可以与细菌细胞膜、核酸分子及蛋白质发生氧化还原反应,导致抗氧化能力下降。此外活性氧(ROS)还可上调一些细胞因子及黏附分子,如 TNF、IL-1、ICAM-1 表达水平,放大炎症反应。

LPS 是实验中常用的细胞激活药物,其能够激活细胞产生多种物质。周媛等^[3]发现 LPS 能够使星形胶质细胞内钙离子升高及 ROS 释放增加。现已证实,LPS 处理 AM 后可引起 NF- κ B 途径和 MAPK 途径激活^[4]。Zhou 等^[5]研究发现,在 AM,LPS 除了激活这两种途径外,还可引起胞内游离钙离子浓度升高,进而激活 Protein kinase C (PKC),释放 NO、TNF- α 、ROS 等。有研究显示,用 1 mg/L LPS 刺激肺泡 AM,能够引起 NF- κ B、cAMP、OH 和 O_2^- 明显升高,使细胞处于激活状态^[6]。

T-AOC 是体内抗氧化物质对抗氧化损伤能力的总和,GSH-Px 主要存在于胞浆和线粒体内,能清除过氧化氢以及脂质过氧化物。本研究结果表明,当用 LPS 刺激 AM 后培养上清液中 T-AOC 和 GSH-Px 水平明显降低,说明 LPS 可以导致 AM 的抗氧化能力下降。

氯胺酮是目前常用麻醉药物,近年来研究发现,氯胺酮除传统的麻醉与镇痛作用外,还具有明显抗炎作用。谭志鑫和李玉山^[7]通过失血性休克兔模型发现氯胺酮具有很好的抗氧化作用。有研究显示,氯胺酮能明显抑制严重创伤早期小鼠腹腔 AM 糖皮质激素受体水平的下调,部分改善小鼠严重创伤诱发的应激状态^[8-9]。本实验结果显示,L 组 T-AOC 和 GSH-Px 水平明显低于 C 组,10 μ mol/L 氯胺酮对此无改善作用,而当用较高剂量范围氯胺酮(100、1 000 μ mol/L)预处理时,对 LPS 所致的 NR8383 细胞 T-AOC 和 GSH-Px 水平降低具有明显改善作用。Domino 等^[10]研究表明,氯胺酮 100 μ mol/L 为临床用药剂量,因此本实验结果提示,临床剂量氯胺酮即可抑制 LPS 引起的氧化应激损伤,增加氯胺酮剂量不能达到增加抑制

效应的目的。

综上所述,临床剂量氯胺酮即可抑制 LPS 引起的肺泡 AM T-AOC 和 GSH-Px 水平下降,而增加剂量不能增加抑制效果。

参考文献:

- [1] 李海霞,朱敏敏,周钦海,等. 氯胺酮雾化吸入对于哮喘大鼠肺泡灌洗液及血清白细胞介素-13 浓度的影响[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2006,26(4):265.
- [2] Watters JJ, Sommer JA, Pfeiffer ZA, et al. A differential role for the mitogen-activated protein kinases in lipopolysaccharide signaling; the MEK/ ERK pathway is not essential for nitric oxide and interleukin 1 beta production [J]. J Biol Chem, 2002, 277: 9077.
- [3] 周媛,李洁,刘春风. 脂多糖对星形胶质细胞增殖和细胞内钙离子水平及活性氧与一氧化氮释放的影响[J]. 中国临床康复, 2006, 10(33): 171.
- [4] Osawa Y, Lee HT, Hirshman CA, et al. Lipopolysaccharide induced sensitization of adenylyl cyclase activity in murine macrophages [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2006, 290(1): C143.
- [5] Zhou X, Yang W, Li J. Ca^{2+} and protein kinase C-dependent signaling pathway for nuclear factor-kappaB activation, inducible nitric-oxide synthase expression, and tumor necrosis factor-alpha production in lipopolysaccharide-stimulated rat peritoneal macrophages [J]. J Biol Chem, 2006, 281(42): 31337.
- [6] Moon EY, Pyo S. Lipopolysaccharide stimulates Epacl-mediated Rap1/NF-kappaB pathway in Raw 264. 7 murine macrophages [J]. Immunol Lett, 2007, 110(2): 121.
- [7] 谭志鑫,李玉山. 魔芋葡甘聚糖与氯胺酮对低氧/复氧小鼠的保护作用研究[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(5): 892.
- [8] 钟河江,杨天德,粟永萍. 严重烧伤早期小鼠腹腔巨噬细胞糖皮质激素受体变化及安定-氯胺酮对其影响[J]. 重庆医学, 2004, 33(11): 1616.
- [9] 李军,史忠,粟永萍,等. 安定-氯胺酮对烧伤小鼠肝组织糖皮质激素受体的影响[J]. 重庆医学, 2003, 22(2): 144.
- [10] Domino EF, Zsigmond EK, Domino LE, et al. Plasma levels of ketamine and two of its metabolites in surgical patients using a gas chromatographic mass fragmentographic assay [J]. Anesth Analg, 1982, 61: 87.

(收稿日期:2009-11-05 修回日期:2010-01-22)

摘 要 说 明

论著须附中、英文摘要。摘要必须包括目的、方法、结果(应给出主要数据)及结论四部分,各部分冠以相应的标题。采用第三人称撰写,不用“本文”、“作者”等主语。英文摘要尚应包括文题、作者姓名(汉语拼音,姓的每个字母均应大写,名首字母大写)、单位名称、所在城市名、国名及邮政编码等。作者应列出前 3 位,3 位以上加“et al”。