

氯胺酮影响嗜中性粒细胞 CD18 和 CD62L 的表达

赵擎宇¹, 张春玲², Markus A. Weigand³, Hubert J. Bardenheuer³, Eike Martin³

(1. 中山大学附属肿瘤医院加强监护室, 广东 广州 510060; 2. 广州市儿童医院, 广东 广州 510120; 3. 德国海德堡大学医学院, 海德堡 69120)

摘要:【目的】探讨氯胺酮是否影响人嗜中性粒细胞(PMN)粘附分子表达。【方法】对分离的人全血细胞用甲酰甲硫氨酰-亮氨酰-苯丙氨酸(FMLP)或豆蔻酰佛波醇乙酯(PMA)刺激, 加入不同浓度氯胺酮后孵化, 用针对 CD18 或 CD62L 的单抗标定, 再通过流式细胞计数了解 CD18 或 CD62L 在 PMN 表面的表达情况。【结果】FMLP 或 PMA 刺激 PMN 可引起细胞表面的 CD18 表达和 CD62L 脱落增加, 氯胺酮对此具浓度依赖性抑制作用, 且对 CD18 表达的抑制用与立体构型无关。【结论】氯胺酮具抗粘附作用, 该作用不似通过与特异受体的反应实现的, 在趋炎性反应亢进的病人的麻醉镇痛时可以优先考虑选用该药。

关键词: 氯胺酮; 嗜中性粒细胞; CD18; CD62L

中图分类号: R971⁺.2; R364.5; R967 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)06-0441-04

Ketamine Inhibits Stimulated Adhesion Molecules of Polymorphonuclear Leukocytes ZHAO Qing-yu¹, ZHANG Chun-ling², Markus A. Weigand³, Hubert J. Bardenheuer³, Eike Martin³. (1. Intensive Care Unit, Tumor Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060; 2. Guangzhou Children's Hospital, Guangzhou 510120; 3. Faculty of Medicine, University of Heidelberg, Heidelberg 69120, Germany)

Abstract 【Objective】To investigate the possible effects of ketamine on adhesion molecule expression of polymorphonuclear leukocytes 【Methods】Washed human whole blood cells were stimulated with *N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) or phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and incubated with ketamine, then their CD18 and CD62L expressions were determined flowcytometrically after monoclonal antibody labelling 【Results】Ketamine inhibited stimulated CD18 up-regulation and CD62L down-regulation on human PMN. Suppression of CD18 up-regulation was dose-dependent but not stereoselective. 【Conclusion】Ketamine suppresses leukocyte pro-inflammatory adhesion molecule changes which is unlikely mediated through specific receptor interaction. Therefore it could be one of choice of analgesedative drugs for patients under overly proinflammatory situation.

Key words: ketamine; polymorphonuclear leukocytes; CD18; CD62L

临床用的氯胺酮是由 *S*(+)-氯胺酮和 *R*(-)-氯胺酮两种同分异构体按 1:1 混合而成的消旋物, 通过对神经细胞 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸(NMDA)受体的拮抗起麻醉镇静作用, 因此, 对脑缺血病人, 氯胺酮具神经保护作用, 此外, 对全身性炎症反应综合征(SIRS)、低血容量休克和通气障碍的病人, 还有促进循环稳定、扩张支气管以及不抑制肠蠕动等优点。有证据表明氯胺酮具抗炎作用^[1~3], 但它对细胞粘附分子的表达的影响尚缺乏研究, 为此我们探讨了氯胺酮对 CD18 和 CD62L 在人嗜中性粒细胞(PMN)表面的表达的作用, 以更全面地了解氯胺酮的抗炎特征。

1 材料与方 法

甲酰甲硫氨酰-亮氨酰-苯丙氨酸(FMLP)、豆

蔻酰佛波醇乙酯(PMA)、台盼蓝和多聚甲醛(PFA)购自美国 Sigma 化学公司; *S*(+)-*R*(-)-和消旋氯胺酮为德国 Parke-Davis 公司惠赠; 叠氮化钠(NaN₃)购于德国 Riedel de Hæn 公司; 氩化荧光素异硫氰酸盐(FITC)标定的抗 CD62L-FITC(抗 CD62L-FITC)购自德国 Coulter Immunotech 公司; 抗 CD18-FITC、抗 IgG₁-FITC、荧光激活细胞分选(FACS)细胞裂解液以及 FACSCalibur 流式细胞计数仪均为美国 Becton Dickinson 公司产品。

1.1 嗜中性粒细胞粘附分子表达的测定

取健康志愿者静脉血 10 mL, 加肝素 20 000 U/L 抗凝, 在室温下用 HBSS(Hanks 液)洗两次以除去血浆, 再用 HBSS 重组回原体积并混匀, 分别取 0.2 mL 含细胞液体, 在有/无氯胺酮情况下于 37℃ 孵育 30 min。此后, 分别用 FMLP(1 μmol/L)或

收稿日期: 2002-07-21

基金项目: 德国海德堡大学科研基金资助项目(IRF0054-98)

作者简介: 赵擎宇(1964-), 男, 河南平顶山人, 博士, 主治医师。

PMA (100 $\mu\text{g/L}$) 刺激 20 min (37 $^{\circ}\text{C}$), 因为预实验表明这样的刺激可使 PMN 表面 CD18 或 CD62L 改变达极值。将上述血细胞置冰上孵育 30 min 后, 加相应的 FITC 荧光单抗 (抗 CD18-FITC、抗 CD62L-FITC) 标定, 30 min 后再加 2 mL FACS 细胞裂解液以破坏其中的红细胞。对所剩白细胞液离心, 以 1 g/L NaN_3 细胞洗涤液 (0.1 g NaN_3 + 100 mL HBSS) 洗涤, 再用含 10 g/L PFA 的细胞固定液 (1 g PFA + 100 mL HBSS) 重新悬置细胞, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 暗环境下保存到细胞荧光分析计数。

FA CScalibur 流式细胞计数仪测定细胞表面的荧光抗体时, 通过前散射 (forward scatter) 和侧散射 (side scatter) 将 PMN、单核细胞和淋巴细胞区分开 (图 1), 前散射与细胞的大小有关, 阈值设为 200, 以除外测量中遇到的细胞碎片, 侧散射与细胞含颗粒情况有关。本研究每个样品中分析 1 万个细胞, 采用洗涤过的全血细胞是为了避免在分离和纯化过程中 PMN 的 CD18 表达增多^[4]。

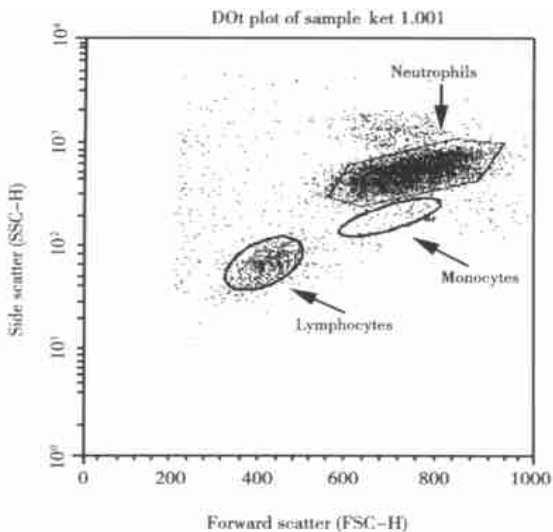


图 1 用流式细胞仪分析标本的 PMN 表面所表达的粘附分子时的点图

Fig 1 Dot plot of blood samples subjected to flow cytometric analysis for adhesion molecule expression on neutrophils

1.2 统计学分析

PMN 的粘附分子表达的测定值每个荧光抗体标定的细胞样品的平均荧光强度以 CD18 或 CD62L 荧光与阴性对照抗体 (同型匹配的 $\text{IgG}_1\text{-FITC}$) 的荧光强度的比值表示, 氯胺酮的作用以细胞激活后的单抗标定的粘附分子 (CD18, CD62L) 荧光强度的因药物作用而致的改变来表示。基础

值为孵化期末粘附分子表达测定值; 对照值为单纯 FMLP 或 PMA 刺激时的粘附分子表达测定值。结果由 8 个不同供体细胞的实验均值 (标准差表示。所有数据均以 Kolmogorov-Smirnov test 检验其正态分布。通过方差分析 (ANOVA) 以及 Scheffé 多重比较分析进行统计学比较。统计学检验水准, 设 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 氯胺酮影响 FMLP 激活的 PMN 的粘附分子的表达

经 1 $\mu\text{mol/L}$ FMLP 刺激, PMN 表面 CD18 特异荧光强度增加了 2.1 倍 ($P < 0.05$, 对照组与基础值比较); 在浓度 $\geq 200 \mu\text{mol/L}$ 时, 消旋氯胺酮显著抑制细胞受激后 CD18 表达的上升幅度 ($P < 0.05$, 与对照组比较), 且抑制作用呈浓度依赖型 (图 2A)。而对于 CD62L, FMLP 的作用是使其在 PMN 表面的表达显著减少 ($P < 0.05$, 对照组与基础值比较); 加用氯胺酮则使这种刺激引起的脱落 (shedding) 效果明显减弱 (图 2B)。

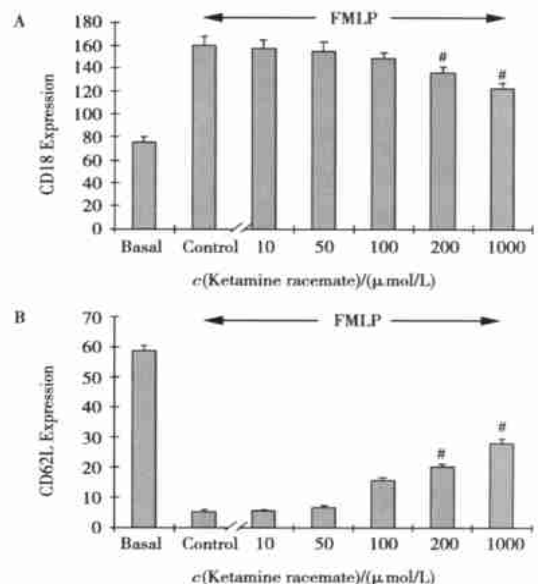


图 2 氯胺酮对 FMLP 刺激引起的 PMN 的 CD18 和 CD62L 表达的作用

Fig 2 Inhibitory effect of ketamine racemate on FMLP-induced CD18 and CD62L expression of PMN
#: vs control $P < 0.05$

2.2 氯胺酮影响 PMA 激活的 PMN 的粘附分子的表达

为进一步了解氯胺酮对 PMN 粘附分子表达

的作用特点,我们还采用了另外一个细胞激动剂 PMA。在无氯胺酮的对照组,100 $\mu\text{g}/\text{L}$ PMA 引起了与 FMLP 刺激类似的 CD18 和 CD62L 表达的变化(图 3A, B)。加消旋氯胺酮后,CD18 表达的增强和 CD62L 脱落的增加均明显受抑制,而抑制对药物浓度的依赖性亦与 FMLP 刺激下的情况类似。

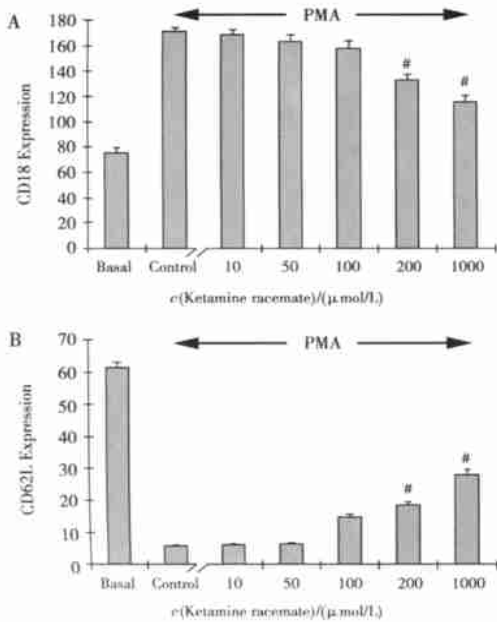


图3 氯胺酮对 PMA 诱导的人 PMN CD18 和 CD62L 表面表达的作用

Fig 3 Inhibitory effect of ketamine racemate on PMA-induced CD18 and CD62L expression of PMN
#: vs Control $P < 0.05$

另外,无论是在加 FMLP 和 PMA 前或与其同时加入培养基,消旋氯胺酮都能抑制 FMLP 和 PMA 刺激引起的 CD18 表达增加,但在 CD18 受诱导表达以后再加氯胺酮则无抑制效果。当无 FMLP 或 PMA 刺激时,在所测试的剂量范围,消旋氯胺酮对 HBSS 中孵化的 PMN 的 CD18 或 CD62L 的静态表达无作用(具体值从略)。

2.3 氯胺酮抑制 CD18 表达与其立体构形特异性无关

为了解氯胺酮同分异构体结构不同是否能引起对 CD18 表达抑制作用的不同,我们观察并比较了类似浓度的氯胺酮同分异构体对 CD18 表达的抑制效果。结果表明,对 FMLP 刺激 PMN 引起的 CD18 表达增加,消旋氯胺酮、S(+)-氯胺酮和 R(-)-氯胺酮均具抑制作用,该作用随浓度增加而增强,异构体抑制 CD18 表达的特点与 2.1 中的结

果类似,而且,三者相互间在抑制程度上差异无显著性(表 1),提示抑制作用与氯胺酮的立体构形特异性关系不大。

表 1 氯胺酮消旋混合物和异构体对 FMLP 诱导的 PMN CD18 表达的抑制

Table 1 Inhibitory effect of ketamine racemate and isomers on FMLP-induced PMN CD18 expression

c(Ketamine) ($\mu\text{mol/L}$)	FMLP ¹⁾ stimulated CD18 expression ²⁾		
	Under S(+)-ketamine	Under racemic ketamine	Under R(-)-ketamine
0	160.7 ± 7.4	160.7 ± 7.4	160.7 ± 7.4
10	155.4 ± 7.1	158.0 ± 6.8	156.1 ± 1.3
50	152.8 ± 9.3	155.3 ± 7.5	151.7 ± 8.7
100	147.6 ± 4.5	149.6 ± 3.9	145.8 ± 4.2
200	137.9 ± 2.9	136.7 ± 3.5	134.2 ± 4.3
1 000	124.5 ± 3.1	122.6 ± 4.7	121.7 ± 4.5

1) FMLP: N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine; 2) Comparison among ketamine isomers at the same concentration for all concentration, $P > 0.05$

3 讨论

循环中的 PMN 在被炎症因子激活而参与炎症反应时,要经过由血流游走进入组织的趋化过程,其中 PMN 在小静脉壁积聚是其能够参加局部炎症反应的重要步骤,而 CD18 和 CD62L 在这个步骤中起着关键作用,二者的先天性缺乏均可引起 PMN 参与炎症反应能力的严重减退。近些年来,一些研究提示氯胺酮有抑制炎症反应的作用,如抑制 PMN 产生 O_2^- 和 IL-6 ^[3]、抑制肿瘤坏死因子(TNF- α)诱导的 PMN 向小静脉壁积聚^[1];其体内应用可降低内毒素引起的白细胞粘附,此现象与剪切力无关^[2],提示粘附分子的表达受到了抑制。

本研究在探索氯胺酮的抗粘附作用时采用了 FMLP、PMA 两种白细胞活化激动剂。其中 FMLP 是由细菌蛋白加工而来的生理性化学趋化物,它可通过与 G 蛋白耦合的化学趋化受体激活 PMN。G 蛋白的激活可活化磷脂酶 C(PLC),并因此引起二酰基甘油(DG)和 1,4,5-三磷酸肌醇(PIP_3)的快速生成。DG 和 PIP_3 可通过释放 Ca^{2+} 激活蛋白激酶 C(PKC)。PKC 的激活可触发 Ca^{2+} 流动、超氧化物生成、细胞脱颗粒以及 PMN 的与 CD18 有关的集聚和粘附。PMA 属佛波醇酯(phorbol ester),可直接

作用于 PKC 而诱导细胞的趋炎性反应。本研究结果表明, 无论是 FMLP 或是 PMA 刺激引起的 CD18 表达增多和 CD62L 脱落, 氯胺酮都能够起抑制作用, 由此可推测其抗粘附效果可能是通过抑制 PKC 或更晚的细胞内信号传导步骤实现的。关于这一点, 已有报道指出巴比妥类或局麻药可抑制 PKC 的激活^[3], 但也可能存在着其它有效的细胞内信号传导途径^[6]。不过, 氯胺酮显然并不促进 CD18 的向细胞内转化, 因为在 CD18 表达已增加之后再加入氯胺酮则无影响。氯胺酮减少刺激引起的 CD62L 脱落表明其抑制 PMN 激活。氯胺酮对未受刺激的人体外的 PMN 表面 CD18、CD62L 表达无效, 该结果与有关报道所称的成年兔活体加入氯胺酮并不显著改变其静息 PMN 的 CD18 和 CD62L 表达的情况相一致^[7]。

PMN 的 CD18 表达和 O_2^- 生成增加均为细胞被激活后的趋炎功能性表现, 且二者关系密切, 本试验中氯胺酮抑制 CD18 表达的程度与其抑制 O_2^- 的产生的程度类似^[5], 即 PMN 的粘附分子表达和氧自由基生成受同样抑制, 因此, 氯胺酮很可能是抑制了 PMN 的这两种趋炎功能的共同的信号传递通路。在临床应用上, 氯胺酮具有安全范围大、操作方便、价格低廉等特点, 其麻醉镇痛作用源于对脑和脊髓中广泛存在的 NMDA 受体的拮抗。在麻醉强度上, S(+)-氯胺酮 3 倍于 R(-)-氯胺酮^[8], 表明药物作用强度与其中枢立体选择性(即药物与受体的亲和力)密切相关。但在本研究中该药对 PMN 功能的抑制并未发现与其立体选择性相关, 提示这种抑制作用不象是通过与特异受体的相互作用实现的。由于氯胺酮使用的浓度范围很广, 因而应考虑氯胺酮在血浆和血液中蛋白结合的巨大变化及同分异构体引起不同的麻醉强度。本研究采用的浓度与消旋氯胺酮麻醉诱导(100 $\mu\text{mol/L}$)和维持(25 $\mu\text{mol/L}$)时的血浓度相近。由于体外孵化细胞需 100 $\mu\text{mol/L}$ 或更高的氯胺酮浓度才可显著抑制 PMN 功能, 故目前无法肯定实验所观察到的作用即等同于既往动物实验^[4] 或临床麻醉中观察到的氯胺酮表现出来的抗炎作用^[9]。

综上所述, 本研究发现氯胺酮抑制 FMLP 和

PMA 诱导的 CD18 表达增多和 CD62L 脱落, 其特点为浓度依赖且在氯胺酮的同分异构体间抑制作用无明显差异, 故此作用可能不是因与特异性受体反应所致。由于中性粒细胞与内皮细胞的粘附是脓毒症或缺血/再灌注损伤发生发展的关键因素之一, 全身性炎症反应综合征(SIRS)或脓毒症病人常需要个体化的镇静、止痛治疗以减缓内、外源刺激引起的应急反应, 但同时应避免心血管系统抑制且不损害肺、肾、肝及免疫功能, 麻醉镇静类药物在此情况下调控白细胞的反应可能对组织损伤起重要作用, 在此意义上, 氯胺酮因其拟交感和抗炎性能而应受推崇。

(感谢中山大学 卫生统计学教研室凌莉副教授在统计学分析方面所给予的帮助)

参考文献:

- [1] Miller L S, Morita Y, Rangan U, *et al*. Suppression of cytokine induced neutrophil accumulation in rat mesenteric venules *in vivo* by general anesthesia[J]. *Int J Microcirc Clin Exp*, 1996, 16(3): 147.
- [2] Schmidt H, Ebeling D, Bauer H, *et al*. Ketamine attenuates endotoxin induced leukocyte adherence in rat mesenteric venules[J]. *Crit Care Med*, 1995, 23(12): 2008.
- [3] 赵擎宇, 张春玲, Weigand M, 等. 氯胺酮抑制白细胞超氧自由基白细胞介素 6 的生成[J]. *岭南急诊医学杂志*, 2001, 6(2): 83.
- [4] Forsyth K D, Levinsky R J. Preparative procedures of cooling and re-warming increase leukocyte integrin expression and function on neutrophils[J]. *J Immunol Meth*, 1990, 128(2): 159.
- [5] Mikawa K, Maekawa N, Hoshina H. Inhibitory effect of barbiturates and local anaesthetics on protein kinase C activation[J]. *J Int Med Res*, 1990, 18(2): 153.
- [6] Morel F, Doussiere J, Vignais P V. The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells-physiological, molecular and pathological aspects[J]. *Eur J Biochem*, 1991, 201(3): 523.
- [7] Ramamoorthy C, Kovarik W D, Winn R K, *et al*. Neutrophil adhesion molecule expression is comparable in perinatal rabbits and humans[J]. *Anesthesiology*, 1997, 86(2): 420.
- [8] Kharasch E D, Labroo R. Metabolism of ketamine stereoisomers by human liver microsomes[J]. *Anesthesiology*, 1992, 77(6): 1201.
- [9] Roytblat L, Talmor D, Rachiinsky M, *et al*. Ketamine attenuates the interleukin-6 response after cardiopulmonary bypass[J]. *Anesth Analg*, 1998, 87(2): 266.

(编辑 张敬瑞)