

• 基础研究 •

吸入性麻醉药对促炎性细胞因子表达的影响

李 江, 李丽莎

(云南省第一人民医院麻醉科/昆明理工大学附属医院, 昆明 650031)

摘 要:目的 探究异氟醚预处理减轻炎症反应的可能机制。方法 雄性 Lewis 大鼠 24 只, 随机分为 3 组: 正常组、对照组和异氟醚组, 每组 8 只。以 40%O₂ 为载气, 对照组吸入 40%O₂, 异氟醚组吸入 40%O₂ 加 2%异氟醚, 对照组和异氟醚组均尾静脉注射脂多糖, 脂多糖给予 4 h 后取材, 细胞计数仪统计 BALF 中炎症细胞的数量; ELISA 法和 RT-PCR 法检测肺组织和 BALF 中 TNF- α 蛋白和 mRNA 表达; ELISA 法检测血清中 IL-2 和 INF- γ 的含量。结果 炎症细胞的总数从小到大依次为正常组、异氟醚组、对照组 ($P < 0.05$); 异氟醚组的肺组织和 BALF 中 TNF- α 蛋白和 mRNA 表达明显低于对照组 ($P < 0.05$); 异氟醚组的血清中 IL-2 和 INF- γ 的含量显著低于对照组 ($P < 0.05$)。结论 异氟醚可能通过减少炎症细胞和促炎细胞因子的释放以减轻炎症反应。

关键词: 异氟醚; 麻醉; 吸入; 脂多糖; 支气管灌流液; TNF- α ; IL-2; INF- γ

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.07.023

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)07-0778-03

Effect of inhalation anesthetics on expression of pro-inflammatory cytokine in rats

Li Jiang, Li Lisha

(Department of Anesthesiology, Yunnan Provincial First People's Hospital Affiliated Hospital, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650031, China)

Abstract: Objective To discuss the possible mechanism of isoflurane(ISO) pretreatment in alleviating the inflammatory response. Methods Twenty-four male Lewis rats were randomly divided into three groups, the normal group, the control group and the ISO group(8 in each). The control group inhaled 40%O₂ as the carrier gas. The ISO group inhaled 40%O₂ plus 2%ISO. Lipopolysaccharide(LPS) was injected into tail vein in the control group and the ISO group. Samples were taken at 4 h after LPS injection. The number of inflammatory cells in bronchoalveolar lavage fluid(BALF) was counted by cytometry. The expression of TNF- α gene and protein level in the lung tissues and BALF was determined by RT-PCR and ELISA. Serum IL-2 and INF- γ levels were determined by ELISA. Results The sum of inflammatory cells from small to large in turn was the normal group, the ISO group and the control group ($P < 0.05$). The expression of TNF- α gene and protein level of the lung tissues and BALF in the ISO group were obviously lower than those in the control group ($P < 0.05$). Serum IL-2 and INF- γ levels in the ISO group were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$). Conclusion Isoflurane might alleviate the inflammatory response by reducing the number of inflammatory cells and promoting the release of pro-inflammatory cytokines.

Key words: isoflurane; anesthesia; inhalation; lipopolysaccharide; BALF; TNF- α ; IL-2; INF- γ

严重创伤, 重大手术创伤、休克、感染、脏器缺血再灌注损伤、内毒素血症是围术期常见的现象。围术期过激炎症反应的调控近年来一直是重点研究领域, 众多在体及离体的研究显示吸入麻醉药可明显减少心、脑、肺、肝、肾等器官的损伤, 保护脏器功能^[1-3], 其机制较复杂, 涉及很多方面。其中, 异氟醚为目前临床最常用的吸入麻醉药物之一, 其对炎性因子的影响一直存在争议。因此, 本研究观察了吸入麻醉药异氟醚对大鼠促炎性细胞因子表达的影响, 旨在为临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 选择成年雄性 Lewis 大鼠, 8 周龄, 体质量 200~250 g, 由上海史莱克动物提供商供应, 于上海实验动物中心 (SPF 级) 预检 3 d, 一笼饲养 4 只, 动物室和实验室温度为 23℃, 12 h 明暗轮流光照, 自由饮食。异氟醚 (isoflurane) (河北九派制药有限公司), 脂多糖 (Sigma 公司), 生理盐水 (山东华鲁制药有限公司), 牛胎儿血清 (fetal bovine serum, FBS) (Gibco 公司), 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS), 戊巴比妥钠, 5 mL 离心管, 15 mL 离心管, 2 mL 的一次性注射器, 针头 (16 G), Narcomed 2B 麻醉机 (Drager 公司), 有机玻璃麻醉箱 (40 cm×30 cm×30 cm) 购于北京有机玻璃厂, 多功能

气体检测仪 (Datex-Ohmeda, 芬兰), 大鼠白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2)、干扰素 (interferon-gamma, IFN- γ)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor-alpha, TNF- α)、ELISA 试剂盒 (博士德公司), Trizol RNA 分离液 (美国 Promega 公司), RT-PCR 试剂盒 (美国 Promega 公司), 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、TNF- α 引物 (Invitrogen 公司), 细胞计数仪 Vi-cellXR (美国 Beckman Coulter), 大鼠固定器。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组 将 24 只 Lewis 大鼠采用随机数字法随机分为 3 组: 正常组、对照组、异氟醚组, 每组 8 只。除正常组之外, 其余组均放入密闭有机玻璃麻醉箱内, 进气端与麻醉机呼吸回路相连接, 出气端接多功能气体检测仪并与大气相通。氧气浓度维持在 40%, 大鼠保持自主呼吸, 容器内温度维持在 (23.00±1.00)℃, 湿度为 (50.00±10.00)%; 在此基础上, 异氟醚组分别吸入 2% 的异氟醚。多功能气体检测仪监测容器内异氟醚浓度和氧气浓度, 达到设定值 (40%O₂、2%异氟醚) 后即使开始计时。

1.2.2 动物急性炎症模型制备 大鼠在吸入 2% 的异氟醚后

表 1 3 组大鼠 BALF 中各种炎症细胞数量比较(个,×10³, $\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	巨噬细胞	嗜酸性粒细胞	中性粒细胞	淋巴细胞	总数
正常组	8	114.80±85.25	120.09±156.46	0.86±0.86	1.93±0.34	237.67±237.79
对照组	8	141.24±27.76	201.20±47.64	1 387.08±254.48	7.99±1.68	1 737.50±304.22
异氟醚组	8	129.82±44.20	157.44±41.02	6.43±3.84 *	2.56±0.73 *	296.25±78.94 *

* :*P*<0.05,与对照组比较。

表 2 3 组大鼠 BALF 和血清中 TNF-α、IL-2 和 INF-γ 表达(*n*=8, $\bar{x}\pm s$,pg/mL)

组别	<i>n</i>	BALF		血清	
		TNF-α mRNA	TNF-α	IL-2	INF-γ
正常组	8	0.70±0.19	143.79±4.69 *	192.44±96.68 *	10.67±10.67 *
对照组	8	1.53±0.49	2 717.30±245.49	6 690.67±530.25	412.78±109.01
异氟醚组	8	1.23±0.26 *	758.63±65.76 *	2 995.22±419.41 *	217.25±10.50 *

* :*P*<0.05,与对照组比较。

30 min 尾静脉注射一次脂多糖(5 mg/kg)。

1.2.3 标本采集 脂多糖静脉注射之前给予 30 min 异氟醚,4 h 之后,将大鼠麻醉(12 mg/mL 戊巴比妥钠,5 mL/kg),心脏采血收集,然后在气管上开一小口,将针头(16 G 针头)插入气管内,用止血钳固定,用 5 mL 含 1% FBS 的 PBS 液清洗支气管及肺泡 3 次,如此 3 遍,共用 15 mL 的支气管灌流液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)冲洗。腹主动脉采血并以 12 000 r/min 离心 5 min 取上清液做 ELISA 检测 IL-2 和 IFN-γ。将 BALF 以 1 500 r/min 离心 10 min,上清液分装置-80 ℃保存以测定细胞因子(TNF-α),下层细胞用 PBS+1% FBS 悬浮(约 10⁶/mL),取 100 μL 的细胞悬液,800 r/min 离心 5 min,涂片,晾干,甲醛固定,然后用瑞士-吉姆萨染液,A 液染 3 min,B 液染 10 min,不同种类细胞计数。最后分离取出肺组织中右上肺做 RT-PCR 检测 TNF-α 表达水平。

1.2.4 检测指标 对 BALF 中的炎症细胞进行细胞计数,以及应用 ELISA 检测 BALF 和血浆中的促炎细胞因子(TNF-α、IL-2、IFN-γ)含量。

1.2.5 RT-PCR 法检测 TNF-α mRNA 表达水平 根据 RNA 提取试剂盒说明书提取 RNA,进行逆转录反应(20 μL 体系);PCR 扩增(25 μL 体系),引物序列为:TNF-α 上游引物 5'-CAC CAC GCT CTT CTG TCT ACT GAA C-3',TNF-α 下游引物 5'-CCG GAC TCC GTG ATG TCT AAG TAC T-3',产物长度 546 bp;GAPDH 上游引物 5'-CAC GGC AAG TTC AAT GGC ACA-3',下游引物 5'-GAA TTG TGA GGG AGA GTG CTC-3',产物长度 970 bp。产物进行琼脂凝胶电泳,用 EB 染色,图像采用 Quantity One v462 凝胶定量分析软件进行分析,以 TNF-α 与 GAPDH 扩增条带灰度比值进行统计。

1.3 统计学处理 应用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 Graphpad prism 软件对数据进行单因素方差分析,多组间两两比较采用 Turkey 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

3 组大鼠 BALF 中各种炎症细胞数量见表 1,3 组大鼠 BALF 中 TNF-α 的表达和大鼠血清中 IL-2 和 INF-γ 的含量见表 2。

3 讨 论

脂多糖是一个大分子由脂质和多糖价键相连组成,是革兰

阴性菌外膜的主要组成部分,被充当内毒素,并在动物中引起强烈的免疫反应,同时也是免疫和炎症系统中的主要激活物,包括巨噬细胞、单核细胞和内皮细胞。它能导致败血性休克、炎症发生、多种器官损伤和细胞因子的释放。

麻醉药物对机体免疫功能的影响已被越来越多的实验所证实。其作用可能是通过对机体应激反应、内分泌调节、神经递质的释放、细胞因子的相互作用及对细胞表面受体和离子通道的影响而引起的。麻醉药物可直接作用于炎症细胞(如影响自然杀伤细胞、单核细胞-巨噬细胞、粒细胞的数目或功能),也可以通过影响炎症介质,包括细胞因子,而起到促进或抑制炎症性作用,其中细胞因子在麻醉药物作用中所处的地位日益受到重视。

TNF-α、IL-2 和 INF-γ 都是目前研究最为活跃的促炎细胞因子,它们由炎症细胞激活所释放,能引起强烈的炎症反应。T-和 B-淋巴细胞的激活将会导致 IL-2 的释放,IL-2 与其受体结合诱导一系列的信号级联反应,引起免疫缺陷或自身免疫性疾病。INF-γ 具有免疫调节作用,是一个病毒复制的抑制物,同时也是 Th1 淋巴细胞及其介导的免疫反应的标志。TNF-α 主要由单核-巨噬细胞分泌,在体内外均能刺激 IL-1 的产生。本实验研究发现,吸入性麻醉药物异氟醚能够影响 TNF-α、IL-2 和 INF-γ 的表达,减少它们的产生。这说明吸入性麻醉药物有可能改变手术或炎症产生的促炎细胞因子和抗炎细胞因子的平衡。事实上,许多麻醉药物能够影响促炎细胞因子的表达。研究证实,异氟醚等多种吸入麻醉药抑制器官的缺血再灌注损伤也与其抗炎、抗凋亡作用相关,减少 NF-κB 的激活,减少 TNF-α、IL-1、ICAM-1 和 iNOS 的表达,增强抗凋亡蛋白 Bcl-2 等表达。异氟醚可以通过抑制 ICAM-1 的表达和减少中性粒细胞的迁移以减轻大鼠肝局部缺血再灌注的损伤^[4]。另外,异氟醚还能通过下调小鼠血浆 TNF-α 和 IL-6 水平,减少了腹膜炎败血症所致的肝肾功能损害和死亡率^[5]。本研究表明,大鼠静脉注射脂多糖诱导急性炎症,导致 BALF 中炎症细胞增多以及 BALF 和血浆中 TNF-α、IL-2 和 INF-γ 的表达增加,这暗示了炎症促使炎症细胞渗漏和激活并释放出炎症细胞因子从而导致炎症反应的加剧。通过用异氟醚预处理可以明显地抑制 BALF 中炎症细胞(尤其是中性粒细胞和淋巴细胞)增加以及 BALF 和血浆中 TNF-α、IL-2 和 INF-γ 的表达,该结

论与相关研究一致。这充分地说明了异氟醚具有抗炎作用,能够抑制促炎细胞因子的产生,在一定的程度上减缓了炎症反应。Adams 等^[6]研究也表明,大鼠腹腔注射吸入麻醉药能够降低脂多糖诱导的 IL-6/IL-10 的比率并能减轻炎症反应。薛纪秀等^[7]研究表明丙泊酚和异氟醚能减少胰岛素(IN)、TNF- α 、IL-6 和胰岛素抵抗指数及在一定程度上减轻了应激反应。因此。这对今后临床上麻醉药物的使用提供了理论指导和现实基础。也有研究表明,利多卡因预处理可抑制内毒素诱导的促炎因子 IL-6、TNF- α 的释放和减轻内毒素诱发的兔肺毛细血管通透性增加、肺部炎症细胞浸润及内皮细胞损伤^[8]。但也有实验显示,直接给予大鼠异氟醚上调了大鼠肺脏炎症因子的水平^[9]。这可能与实验条件及炎症模型不同有关。尽管有点矛盾,但更多的研究证明,卤族类吸入性麻醉剂预处理对肺缺血再灌注损伤和神经具有保护作用^[10-11]。

Flondor 等^[12]研究表明,大鼠静脉注射内毒素脂多糖后用吸入性麻醉药异氟烷处理可以抑制促炎细胞因子 TNF- α 及 IL-1 β 的释放,产生抗炎作用。同时,体外研究也表明,麻醉药丙泊酚和氯胺酮可抑制脂多糖刺激的 PBMC 细胞因子的表达^[13]。Weber 等^[14]研究表明,异氟烷能有效抑制人的脐静脉内皮细胞所产生的 TNF- α 和血管细胞黏附分子-1 的分泌。与本研究结果一致。

目前,不同的麻醉药物对细胞因子产生的影响还存在一定的争议,其机制不是十分清楚。本研究表明了吸入麻醉药预处理通过抑制促炎细胞因子产生抗炎作用,可应用于手术上的免疫和抗感染等方面。因此,根据患者病情、手术大小,尤其是那些免疫功能异常、感染、创伤的高危手术患者,选择合适的麻醉药物维持细胞因子平衡,以调节机体免疫,具有重要的临床意义。

参考文献:

- [1] 郑海燕. 丙泊酚麻醉对围术期肝缺血再灌注损伤患者血浆氧化亚氮/内皮素-1 和炎症细胞因子的影响[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(23): 3995-3997.
- [2] 柳垂亮, 李玉娟, 石永勇. 吸入麻醉药抗缺血再灌注损伤及其机制研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(18): 1369-1371.
- [3] 李秀华, 程晓燕, 张岩. 静脉麻醉药预处理对鼠脑缺血损伤皮质区 TNF- α 的影响[J]. 当代医学, 2009, 15(28):

6-8.

- [4] Xu GM, Tao GC. Effects of isoflurane on ICAM-1 expression and neutrophils infiltration in rats with liver ischemia and reperfusion injury[J]. J Med Colleges PLA, 2009, 24(5): 259-265.
- [5] Lee HT, Emala CW, Joo JD, et al. Isoflurane improves survival and protects against renal and hepatic injury in murine septic peritonitis[J]. Shock, 2007, 27(4): 373-379.
- [6] Adams SD, Radhakrishnan RS, Helmer KS, et al. Effects of anesthesia on lipopolysaccharide-induced changes in serum cytokines[J]. J Trauma, 2008, 65(1): 170-174.
- [7] 薛纪秀, 范隆, 徐国勋, 等. 丙泊酚和异氟醚麻醉对胰岛素抵抗及促炎细胞因子的影响[J]. 临床麻醉学杂志, 2008, 24(1): 8-10.
- [8] 廖志婕. 利多卡因预处理对兔肺损伤炎症反应的影响[D]. 广州: 第一军医大学学报, 2006.
- [9] 安海燕, 杨拔贤. 不同浓度异氟醚吸入对大鼠炎症反应的影响[J]. 山东医药, 2009, 49(11): 3-7.
- [10] 张素品. 异氟烷/七氟烷预处理及后处理对大鼠肺缺血再灌注损伤的保护作用[D]. 天津: 天津医科大学, 2009.
- [11] 张俊杰, 郡建勤. 吸入麻醉药的神经保护效应及可能机制[J]. 麻醉与监护论坛, 2011, 18(5): 359-362.
- [12] Flondor M, Hofstetter C, Boost KA, et al. Isoflurane inhalation after induction of endotoxemia in rats attenuates the systemic cytokine response[J]. Eur Surg Res, 2008, 40(1): 1-6.
- [13] 亓玲丽, 郭政. 麻醉药物对细胞因子白细胞介素-1 β 和白细胞介素-6 的影响[J]. 中国药物与临床, 2007, 7(7): 505-507.
- [14] Weber NC, Kandler J, Schlack W, et al. Intermittent pharmacologic pretreatment by xenon, isoflurane, nitrous oxide, and the opioid morphine prevents tumor necrosis factor alpha-induced adhesion molecule expression in human umbilical vein endothelial cells[J]. Anesthesiology, 2008, 108(2): 199-207.

(收稿日期: 2012-08-23 修回日期: 2012-10-21)

(上接第 777 页)

- reductase mediates hypoxia-induced EMT via PI3-kinase and Akt[J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19(2): 380-387.
- [11] 俞小芳, 丁小强, 朱加明, 等. 5/6 肾切除大鼠低氧诱导因子 1 α 和 2 α 在肾内的表达和定位[J]. 中华肾脏病杂志, 2010, 26(9): 689-695.
 - [12] Xu H, Liu X, Ning W, et al. Expression of HIF-1 α in 5/6-nephrectomized rat models of chronic kidney fibrosis[J]. ZhongNan DaXue XuBao, 2009, 3(4): 308-312.
 - [13] 何泽云, 徐元美. 六味地黄丸治疗肾阴虚型慢性肾小球肾炎的临床研究[J]. 湖南中医学院学报, 2004, 24(1): 35-37.

- [14] 何泽云, 阳晓. 参麦注射液对 5/6 肾切除大鼠肾脏及腹膜形态结构的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1998, 18(9): 553-555.
- [15] 何泽云, 陈江华, 李晓峰. 六味地黄丸对肾切除大鼠肾小球化生的影响[J]. 湖南中医学院学报, 2004, 24(2): 1-3.
- [16] 蔡惠芳, 谭元生, 何泽云, 等. 六味地黄丸对大鼠 5/6 肾切除肾功能的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27(2): 17-19.
- [17] 李万斌, 何泽云. 六味地黄丸延缓 5/6 肾切除大鼠肾组织纤维化研究[J]. 中国药师, 2009, 12(4): 411-413.

(收稿日期: 2012-10-26 修回日期: 2012-11-19)