

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.16.010

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200312.1716.017.html\(2020-03-13\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200312.1716.017.html(2020-03-13))七氟醚对子痫前期产妇 TNF- α 、IL-6 表达的影响研究*贾杰¹, 黄彩霞¹, 洪淑贞², 韩宝义¹, 莫力¹

(广东省妇幼保健院:1. 麻醉科;2. 产科, 广州 510010)

[摘要] **目的** 观察七氟醚对子痫前期(PE)产妇外周血和胎盘组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)表达的影响。**方法** 选取 30 例拟行择期剖宫产的 PE 产妇,分为硬膜外麻醉组(E组)和硬膜外麻醉+七氟醚麻醉组(E+S组),每组 15 例。采用 ELISA 检测术前、胎儿娩出后母体外周血中 TNF- α 、IL-6 水平,并分离胎盘组织滋养层细胞,采用免疫组织化学(IHC)检测滋养层细胞中 TNF- α 、IL-6 的表达情况,ELISA 检测滋养层细胞培养基中 TNF- α 、IL-6 水平。**结果** E 组胎儿娩出后母体外周血 IL-6 水平高于术前,E+S 组胎儿娩出后母体外周血和胎盘组织 TNF- α 、IL-6 水平明显低于 E 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 七氟醚可降低 PE 产妇外周血与胎盘组织中 TNF- α 、IL-6 的表达水平。

[关键词] 七氟醚;肿瘤坏死因子 α ;白细胞介素 6;先兆子痫;剖宫产术

[中图分类号] R719.8

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2020)16-2657-06

Study on the effect of sevoflurane on expression of TNF- α , IL-6 in preeclampsia pregnancies*

JIA Jie¹, HUANG Caixia¹, HONG Shuzhen², HAN Baoyi¹, MO Li¹

(1. Department of Anesthesiology; 2. Department of Obstetrics, Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou, Guangdong 510010, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of sevoflurane on expression of TNF- α and IL-6 in the peripheral blood and placental tissues of preeclampsia (PE) pregnancies. **Methods** A total of 30 PE pregnancies who were scheduled for cesarean section were selected and divided into the epidural anesthesia group (group E) and the epidural plus sevoflurane anesthesia group (group E+S), with 15 cases in each group. ELISA was used to detect tumor necrosis factors- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) concentrations in maternal peripheral blood before and after fetal delivery, then separated the placental tissue trophoblast cells, immunohistochemistry (IHC) was used to detect the expression of TNF- α and IL-6 in trophoblast cells, while the expression of TNF- α and IL-6 in trophoblast cell culture medium was detected by ELISA. **Results** The concentration of IL-6 in maternal peripheral blood after delivery of the fetus in group E was higher than that before operation. The concentrations of TNF- α and IL-6 in maternal peripheral blood and placenta tissue after fetus delivery in group E+S were significantly lower than those in group E ($P < 0.05$). **Conclusion** Sevoflurane could reduce the expression of TNF- α and IL-6 in peripheral blood and placental tissue of PE pregnancies.

[Key words] sevoflurane; tumor necrosis factor-alpha; interleukin-6; pre-eclampsia; cesarean section

子痫前期(preeclampsia, PE)是妊娠期特有的、严重的产科并发症,是临床中引起产妇与胎儿死亡的重要原因。多胎妊娠、高龄产妇(>40 岁)及应用辅助生殖技术与妊娠期高血压疾病发病风险增加密切相

关^[1-2],随着我国二孩政策的实施,考虑妊娠期高血压的危险因素,其发病率亦会相应升高。PE的发病机制复杂,孕期胎盘的病理状况及胎儿生长受限与PE均有密切关系^[3]。在既往研究中已经认识到,T淋巴

细胞分泌的炎性细胞因子导致的辅助性 T 细胞(Th) 1/Th2 平衡失调^[4]及胎盘缺血缺氧引起的凋亡^[5]在 PE 发病中起到关键作用。前期研究表明:肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)表达异常是先兆子痫的发病基础,此外七氟醚可安全用于剖宫产的全身麻醉^[6]。因此,本研究拟将七氟醚用于 PE 产妇的剖宫产手术,旨在探讨七氟醚对其外周血和胎盘组织中 TNF- α 、IL-6 表达的影响,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2017 年 12 月至 2018 年 6 月在本院择期手术的 30 例 PE 产妇为研究对象。纳入标准:(1)PE 的诊断和分类标准依据《妇产科学》(第八版)^[7];(2)剖宫产分娩产妇。排除标准:(1)有妊娠合并症;(2)胎膜早破及感染征象;(3)术前 3 d 使用抗炎药物。因在前期预实验中,PE 产妇血 TNF- α 、IL-6 表达水平分别为(17.2 \pm 4.2)、(6.2 \pm 1.6)pg/mL,为了检测 \pm 30%水平的差值,功效评估分析显示样本量应为 13 例,若考虑 I 型误差为 0.05,那么第 11 与 12 例的 PE 产妇将获得 90%的功效,结合 10%的样本量丢失率,最后决定每组入组 15 例产妇。将 30 例 PE 产妇分为硬膜外麻醉组(E 组, $n=15$)和硬膜外麻醉+七氟醚麻醉组(E+S 组, $n=15$),所有产妇年龄 22~35 岁,孕周 30~36 周。本研究经中国临床试验注册,注册号为 ChiCTR1800014571,注册时间:2018 年 4 月 12 日。项目通过本院伦理委员会批准,项目批准号为 201701080。

1.2 方法

1.2.1 麻醉方式

所有产妇术前禁食 8 h,禁水 4 h。入手术室后,予以心电图(ECG)和血氧饱和度(SpO₂)监测。于桡动脉置管连续监测动脉压和血液采样。两组均在 L₂₋₃ 间隙行硬膜外神经阻滞麻醉,试验剂量为 2%利多卡因 3 mL,硬膜外麻醉药为 0.75%罗哌卡因(100 mg/10 mL, H20140763,瑞典阿斯利康公司)15~20 mL,并采用针刺和温度觉法确定麻醉平面,使麻醉平面固定于 T₄₋₆ 水平(麻醉平面不达标则剔除)。两组产妇在完成椎管内操作转为平卧位后均面罩吸入纯氧 6 L/min, >5 min。E+S 组给予 6%七氟醚+6 L/min 纯氧吸入(密闭面罩自主呼吸),监测呼气末七氟醚浓度,待呼吸末七氟醚浓度固定于 3%时开始手术,准备切割子宫时,停止七氟醚吸入并加大吸入氧流量使七氟醚快速排出,并使呼气末七氟醚浓度小于 1%。E 组持续面罩吸入纯氧。在麻醉与手术过程中,低血

压(收缩压小于基础血压 20%以上)时采用麻黄碱处理并记录。

1.2.2 标本采集

设定椎管内麻醉前/术前为 T1,椎管内诱导完毕后 10 min 为 T2,手术开始前即刻为 T3,胎儿娩出即刻为 T4,胎盘娩出后为 T5。(1)血标本:T1 与 T4 抽取产妇动脉血样 1 mL,放置于-80 °C 冰箱储存以待检测。(2)胎盘组织:T5 留取约 1 cm³ 大小胎盘组织(剃去肉眼可见的胎膜、结缔组织与血管等),取出后置于配置好的固定液中,实验室进行后续脱水包埋切片处理。

1.2.3 观察指标

(1)记录产妇的一般情况,包括年龄、BMI、孕周、手术原因、PE 程度,T1、T2、T3、T4 时产妇的平均动脉压(MAP)和心率(HR),胎儿娩出后 0、5、10 min 的新生儿 Apgar 评分及脐动脉血气 pH 值,七氟醚吸入的时间、胎儿娩出时间(从切子宫至胎儿娩出的时间)及术中出血量,宫缩乏力的例数(由产科医生评估),术中产妇非低血压引起呕吐发生情况及呼吸抑制发生情况。(2)采用 ELISA 测定血标本 TNF- α 、IL-6 表达水平,分离出胎盘滋养层细胞并行细胞鉴定,采用免疫组织化学(IHC)法检测胎盘组织中 TNF- α 、IL-6 的表达情况,并采用 ELISA 检测滋养层细胞培养基中 TNF- α 、IL-6 的表达水平。

1.2.4 胎盘滋养层细胞培养、分离

胎盘组织过滤除菌后用 4 °C 预冷的生理盐水反复漂洗 3~4 次,剔除较大的血管与钙化组织,用消毒剪刀剪成碎片,导入原代细胞消化用胰蛋白酶进行第 1 次消化(37 °C, 20 min),静置后,弃上清液,继续消化 15 min,将上清液通过尼龙网(200 目)过滤并收集到 50 mL 预先加入 10%体积的小牛血清的离心管中,用于终止胰蛋白酶的消化作用,离心后弃上清液,用 3 mL 0.9%生理盐水重悬离心管底部的细胞。未消化完全的组织继续消化 15 min。消化液同样进行过滤、收集、离心,细胞沉淀前用 1 次获得的细胞悬液进行重悬。采用 percoll 密度梯度离心法分离纯化胎盘滋养层细胞。配置 20%、30%、50%、70% 4 个 percoll 密度梯度,每个梯度加入 5 mL,保持不同浓度的 percoll 液流入离心管的连续性,避免气泡的产生,加入顺序从高到低;将细胞悬液缓慢地加入到制备好的 percoll 密度梯度(20%、30%、50%、70%)表面,保证 percoll 液流入离心管的连续性,避免气泡的产生,加入顺序从高到低,离心后的 percoll 形成 3 个明显的细胞带:底部为红细胞,中间为胎盘滋养层细胞(比重为

1.048~1.062 g/mL),顶部为细胞组织碎片(比重为 1.017~1.033 g/mL)。收集中间的胎盘滋养层细胞,离心后弃上清液,细胞用含 20%胎牛血清的 DMEM 培养液培养 24~48 h,采用磷酸盐缓冲液(PBS)中的 0.1% Triton 透化固定细胞,5% BSA 孵育 1 h 以阻断非特异性染色。采用细胞角蛋白-7(1:100, ab181598,美国 Abcam 公司)和 DAPI(波形蛋白于 1:250, ab92547,美国 Abcam 公司)抗体在加湿箱中于 4℃进行免疫荧光染色过夜,再次用冷 PBS 洗涤细胞 3 次,每次 3 min,并与 Alexa488 标记的抗兔二抗(1:500,美国 Invitrogen 公司)在室温下孵育 1 h,采用 DAPI 的封固剂(ab104139,美国 Abcam 公司)固定细胞,通过荧光显微镜(Olympus America Inc, Center Valley,PA)检查。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 23.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 χ^2 检验或 Fisher 精确检验;计数资料以频数或百分率表示,比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组一般资料比较

两组一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性,见表 1。

表 1 两组一般资料比较($n=15$)

项目	E 组	E+S 组	F	P
年龄($\bar{x} \pm s$,岁)	30.1±3.0	29.5±2.7	0.764	0.98
孕周($\bar{x} \pm s$,周)	35.9±2.1	37.1±0.9	1.243	0.07
BMI($\bar{x} \pm s$,kg/m ²)	22.4±1.5	22.9±1.8	0.546	0.63
PE 程度[n(%)]			0.876	0.79
轻度	6(40.00)	5(33.33)		
中度	4(26.67)	6(40.00)		
重度	5(33.33)	4(26.67)		
胎儿娩出时间($\bar{x} \pm s$,s)	335.1±65.0	345.6±59.7	0.812	0.36
术中出血量($\bar{x} \pm s$,mL)	304.5±115.1	311.6±108.9	0.342	0.85
子宫收缩乏力[n(%)]	4(26.67)	5(33.33)	1.121	0.24
麻黄碱使用量($\bar{x} \pm s$,mg)	5.6±2.3	6.1±1.5	0.810	0.36
七氟醚使用时间($\bar{x} \pm s$,s)	—	605.9±140.6		
剖宫产原因[n(%)]			0.854	0.82
疤痕子宫	11(73.33)	12(80.00)		
产妇主观因素	2(13.33)	2(13.33)		
胎位异常	2(13.33)	1(6.67)		
术中非低血压引起呕吐发生情况[n(%)]	0	0		
呼吸抑制发生情况[n(%)]	0	0		

—:无数据。

2.2 两组各时点 MAP、HR 的比较

两组组间同一时点 MAP、HR 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。两组组内各时点 MAP、HR 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2、图 1。

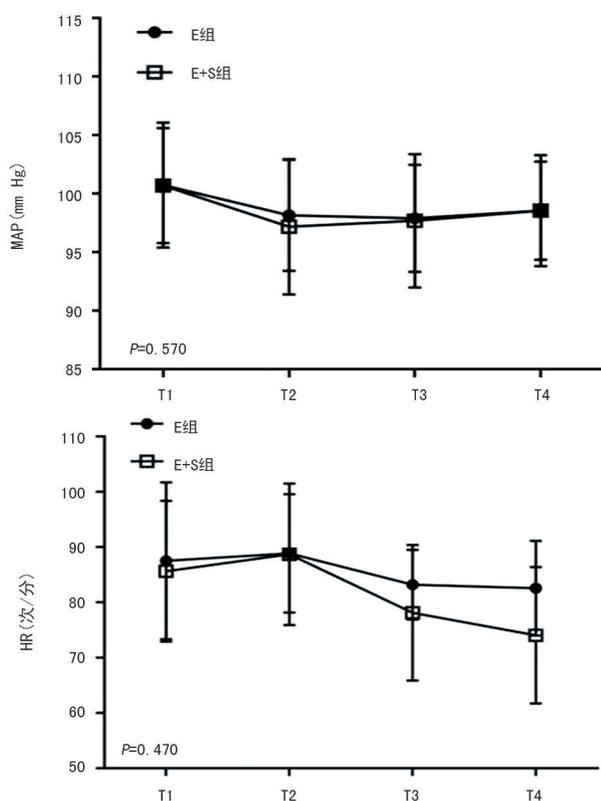


图 1 两组产妇各时点 MAP、HR 曲线图

2.3 两组新生儿 Apgar 评分、脐动脉血 pH 值比较

两组新生儿 Apgar 评分、脐动脉血 pH 值比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 3。

2.4 胎盘滋养层细胞鉴定结果

收集分离后的细胞在光学显微镜下观察以多核的合体滋养层细胞为主,细胞体积大,细胞质丰富,细胞核大卵圆形,单核的细胞滋养层细胞相对较少,贴壁细胞形态多样,呈上皮细胞样生长形如铺路石状或呈长梭状,用 CK7 抗体进行 IF 鉴定,发现 CK7 呈现阳性,主要表达在细胞核,部分表达在细胞质。说明分离的原代细胞即为滋养层细胞且纯度较高,见图 2、3。

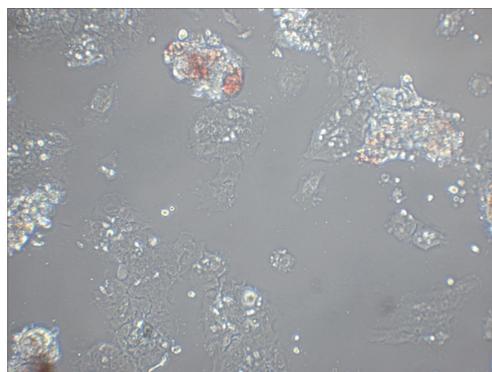


图 2 胎盘滋养层细胞(光镜,×200)

表 2 两组各时点 MAP、HR 比较($\bar{x} \pm s, n=15$)

时点	MAP(mm Hg)				HR(次/分)			
	E组	E+S组	F	P	E组	E+S组	F	P
T1	120.1±7.9	119.1±8.3	0.689	0.781	83.8±7.7	79.0±7.4	0.231	0.381
T2	99.0±8.1	96.4±7.2	0.683	0.852	79.8±8.0	81.0±9.4	0.980	0.088
T3	102.5±9.7	96.3±8.5	0.546	0.531	87.2±9.0	85.0±8.4	0.765	0.121
T4	98.9±8.9	97.3±7.1	5.656	0.068	84.2±8.0	80.0±8.4	5.452	0.071

表 3 两组新生儿 Apgar 评分及脐动脉 pH 值比较($\bar{x} \pm s, n=15$)

项目	E组	E+S组	F	P
新生儿 Apgar 评分(分)				
1 min	7.10±0.89	7.18±0.67	0.562	0.692
5 min	7.98±1.01	7.78±1.15	0.862	2.518
10 min	9.18±0.56	9.03±0.36	1.369	0.961
脐动脉血气 pH 值	7.27±0.12	7.21±0.34	1.125	0.714

2.5 两组 TNF- α 、IL-6 表达情况比较

T4 时 E+S 组母体外周血 TNF- α 、IL-6 表达水平低于 E 组, T4 时 E 组母体外周血 IL-6 水平高于 T1 时, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。TNF- α 、IL-6 蛋白主要表达在胎盘滋养层细胞和血管内皮细胞的细胞膜和细胞质, E+S 组胎盘组织滋养层细胞 TNF- α 、IL-6 的表达水平低于 E 组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 4~6。

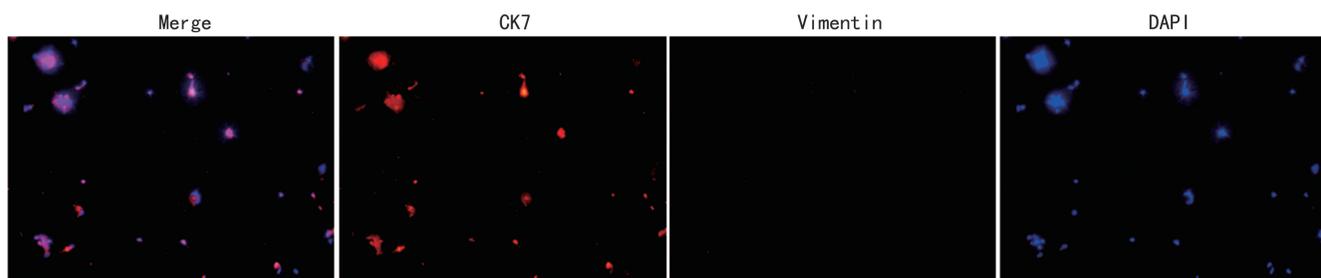
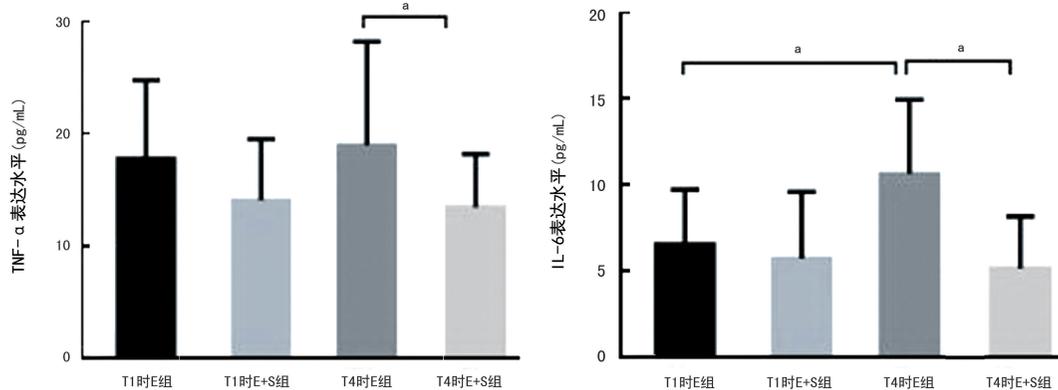
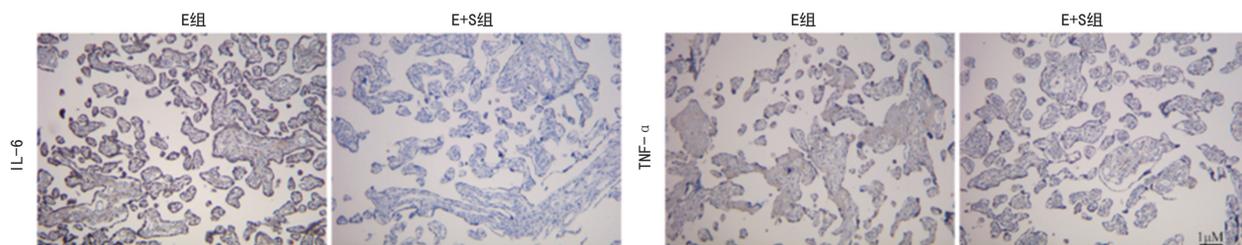
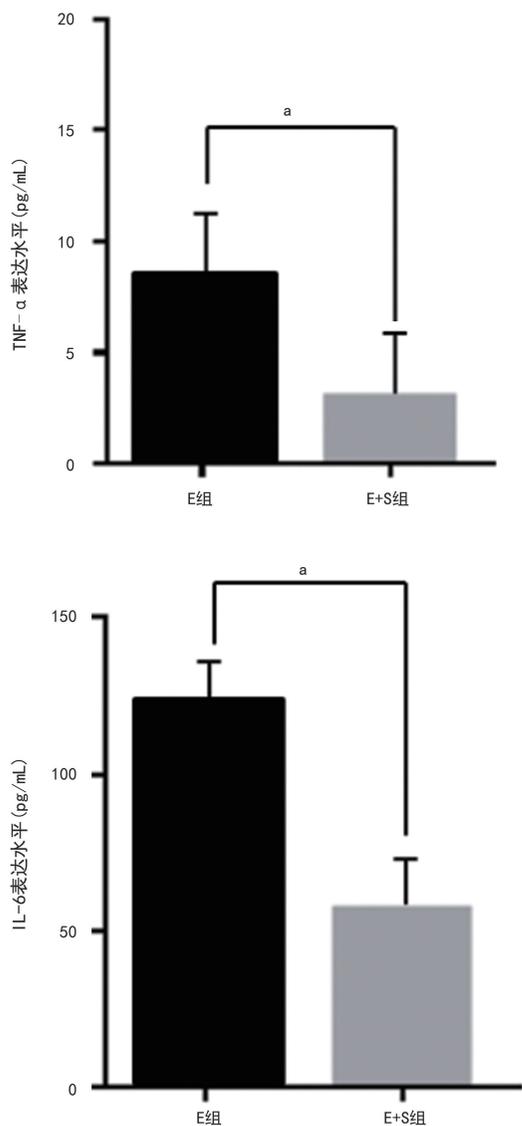


图 3 胎盘滋养层细胞鉴定



a: $P < 0.05$ 。

图 4 血清 TNF- α 、IL-6 的表达情况图 5 胎盘组织 IL-6、TNF- α 的表达情况(IHC, $\times 100$)



^a: $P < 0.05$.

图 6 滋养层细胞培养基中 TNF- α 、IL-6 的表达情况

3 讨论

PE 是产科复杂、危重、常见的疑难并发症, PE 的病因及病理机制一直是产医学中研究的重要课题, 因其涉及母体、胎盘和胎儿等多方面因素, 目前尚无单一机制能完全解释其发病原因。但病因学领域的研究异常活跃, 包括滋养细胞侵袭异常、免疫调节功能异常、内皮细胞损伤及遗传因素等, 其中胎盘是孕期的特殊器官, 推测其对胎儿的生长和母体的孕期状况都有很大的影响, 因此, 对胎盘组织内蛋白表达的研究也具有重要意义。

七氟醚是一种挥发性吸入麻醉药, 血/气分配系数低, 诱导与苏醒快且平稳, 国外已将它应用于产科麻醉, 并认为适当的吸入浓度(2.0%~3.5%)对产妇和胎儿都是安全的^[8], 亦可安全用于 PE 产妇的全身麻醉^[9], 结合本课题组前期研究^[6]与王志鹏等^[10]研究

结果, 发现 3% 七氟醚可以安全用于产科全身麻醉, 因此, 本研究把七氟醚浓度设定为 3%。>1% 浓度的七氟醚可阻断平滑肌钙通道从而抑制子宫收缩, 其强度与剂量呈正相关^[11]。为了减少七氟醚对子宫收缩的影响, 本研究在进行子宫下段手术时通过加大潮气量和呼吸频率快速将七氟醚洗出, 使其呼气末浓度降至 1% 以下, 结果显示使用七氟醚的产妇产后子宫收缩乏力比例及出血并未有明显增多, 由此证实低浓度的七氟醚对子宫收缩及产后出血并无影响, 与 REN 等^[9]研究结论一致。

TNF- α 是炎症反应早期较为敏感的细胞因子, 创伤或感染后其水平迅速升高, 在 90~120 min 达到高峰, 然后逐渐下降^[12]。IL-6 是一类应激病理生理过程中的重要介质, 不仅参与机体免疫与防御, 且在机体的急性期反应与造血反应等方面起重要作用。另外, 本课题组前期研究发现: TNF- α 与 IL-6 表达失调是 PE 的发病基础之一^[6]。为了排除产妇临产启动对炎症与应激反应的干扰, 本研究选取的研究对象均为未临产的产妇, 结果提示: (1) 七氟醚可以降低 PE 产妇外周血 TNF- α 与 IL-6 的水平; (2) 七氟醚可以降低 PE 产妇胎盘 TNF- α 与 IL-6 的表达。推测其原因: (1) 七氟醚有效地抑制了炎症反应的发生或传导过程, 或在促炎性细胞因子的生成、转导或释放的过程中发挥作用, 从而抑制炎症反应, 与炎症反应相关的促炎因子 IL-6 与 TNF- α 水平下降; (2) 应激反应降低, 使胎盘滋养层细胞凋亡减少, 抑制细胞的炎症反应, 导致胎盘 TNF- α 与 IL-6 表达水平降低。

此外, 本研究参照了唐小平等^[13]方法, 将七氟醚联合硬膜外麻醉使用, 为减少硬膜外麻醉效果不完善而引起产妇的不适, 可能对结果产生偏移, 本研究入选所有麻醉平面均应达到 T₄₋₆ 水平^[14], 综合产妇的循环变化、新生儿的结局及术中产妇的不良反应等数据, 可以认为低剂量七氟醚联合硬膜外神经阻滞在剖宫产术胎儿娩出前使用是安全的, 对循环无影响, 对新生儿结局无影响。

综上所述, PE 剖宫产手术中, 3% 七氟醚在胎儿娩出前使用是安全的, 可降低产妇外周血与胎盘组织中 TNF- α 、IL-6 的表达水平, 可能与抑制产妇全身炎症反应有关, 其机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] STANEK J. Histological features of shallow placental implantation unify early-onset and late-onset

- preeclampsia[J]. *Pediatr Dev Pathol*, 2019, 22(2): 112-122.
- [2] YAN L, JIN Y, HANG H, et al. The association between urinary tract infection during pregnancy and preeclampsia[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(36): e12192.
- [3] CANTO-CETINA T, CORAL-VAZQUEZ R M, ROJANO-MEJIA D, et al. Higher prepregnancy body mass index is a risk factor for developing preeclampsia in Maya-Mestizo women: a cohort study [J]. *Ethn Health*, 2018, 23(6): 682-690.
- [4] XU J, GU Y, SUN J, et al. Reduced CD200 expression is associated with altered Th1/Th2 cytokine production in placental trophoblasts from preeclampsia[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2018, 79(1): 1111.
- [5] ZHANG Z, WANG X, ZHANG L, et al. Wnt/ β -catenin signaling pathway in trophoblasts and abnormal activation in preeclampsia [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(2): 1007-1013.
- [6] 贾杰, 李屹, 苏丹晨, 等. 子痫前期产妇血浆中 IL-6、TNF- α 含量变化的相关性研究[J]. *广东医学*, 2016, 10(10): 1412-1415.
- [7] 谢幸, 苟文丽. 妇产科学[M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 92-101.
- [8] MURDOCH H, SCRUTTON M, LAXTON C H. Choice of anaesthetic agents for caesarean section: a UK survey of current practice[J]. *Int J Obstet Anesth*, 2013, 22(1): 31-35.
- [9] REN L Q, SUN X X, GUAN Y. Effects of sevoflurane or propofol combined with remifentanyl anesthesia on clinical efficacy and stress response in pregnant women with pregnancy-induced hypertension [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(6): 1825-1829.
- [10] 王志鹏, 马珏, 王晟, 等. 七氟醚与喉罩在妊娠合并心脏病产妇剖宫产手术中的应用[J]. *南方医科大学学报*, 2018, 38(2): 229.
- [11] LI S, XU J, YAO W, et al. Sevoflurane pretreatment attenuates TNF- α -induced human endothelial cell dysfunction through activating eNOS/NO pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 460(3): 879-886.
- [12] 贾杰, 李屹, 胡祖荣, 等. 七氟醚联合瑞芬太尼用于产科全身麻醉对炎性细胞因子的影响[J]. *实用医学杂志*, 2015, 31(11): 1832-1834.
- [13] 唐小平, 王涵. 硬膜外阻滞麻醉辅助七氟醚吸入用于剖宫产对新生儿 Apgar 评分的影响[J]. *中华全科医师杂志*, 2013, 12(4): 294-295.
- [14] 陈兴发. 罗哌卡因与布比卡因腰麻在剖宫产手术中对最高阻滞平面及 Vas 的影响[J]. *实用妇科内分泌杂志*, 2018, 5(13): 189-191.

(收稿日期: 2020-01-18 修回日期: 2020-03-02)