

不同麻醉方法对肝癌手术患者炎性细胞因子基因表达的影响

黄凌鲲¹ 王静宇² 曾 宾¹ 陈录平 朱小玲¹

(1 郴州市第一人民医院麻醉科 湖南 郴州 423000 2 郴州市第一人民医院药剂科临床药学室 湖南 郴州 423000)

摘要 目的 探讨不同麻醉方法对肝癌手术患者外周血炎性细胞因子基因表达的影响。方法 选择肝癌手术患者 48 例 随机分为单纯全麻和全麻复合硬膜外麻醉两组,在麻醉前和麻醉后 4h 抽取静脉血,Trizol 法抽提 RNA,RT-PCR 检测 IL-1 β 、IL-6、IL-8 的 TNF- α 的 mRNA 表达水平。结果 麻醉前两组患者间外周血炎性细胞因子基因表达无差别,麻醉 4h 后全麻组外周血 IL-1 β 、IL-6、IL-8 的 mRNA 表达水平显著升高($P<0.05$),并高于联合组($P<0.05$)。结论 不同麻醉方法对细胞因子的分泌会产生不同的影响,单纯全麻将增强肝癌手术病人外周血炎性细胞因子基因的表达。

关键词 麻醉方法 肝癌 炎性细胞因子 mRNA

中图分类号 R614 文献标识码 A 文章编号:1673-6273(2012)17-3281-03

The Impact of Different Anesthesia Methods on Gene Expression of Inflammatory Cytokines in Hepatoma Surgery Patients

HUANG Ling-kun¹, WANG Jing-yu², ZENG Bin¹, CHEN Lu-ping¹, ZHU Xiao-ling¹

(1 Department of Anesthesia, Chenzhou First People's Hospital, Chenzhou, Hunan, 423000, China;

2 Department of Pharmacy, Chenzhou First People's Hospital, Chenzhou, Hunan, 423000, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effects of different anesthetic techniques on gene expression of inflammatory cytokines in patients with liver cancer surgery. **Methods:** 48 liver cancer surgery patients were randomly divided into two groups, general anesthesia group and general anesthesia plus epidural anesthesia group. Draw venous blood before anesthesia and 4h after anesthesia. Extract RNA by Trizol method. Then detect the IL-1 β , IL-6, TNF- α and IL-8 mRNA expression levels with RT-PCR. **Results:** The inflammatory cytokines gene expression in peripheral blood of the two groups had no difference before anesthesia. 4h after anesthesia, the mRNA expression levels of IL-1 β , IL-6 and IL-8 general were significantly increased in anesthesia group ($P<0.05$), and much higher than the combination group ($P<0.05$). **Conclusion:** Different aesthetic methods will produce different effects on cytokine secretion. General anaesthesia could enhance inflammatory cytokine gene expression in peripheral blood of patients with liver cancer surgery.

Key words: Anesthesia; Liver cancer; Inflammatory cytokine; mRNA

Chinese Library Classification(CLC): R614 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)17-3281-03

前言

手术仍是目前治疗肝癌的首选方式,但手术、麻醉等因素可引起机体的应激反应,从而导致内环境紊乱促进炎性细胞因子的产生和分泌。炎性细胞因子在机体炎性反应的发生中起着关键的作用^[1,2],可引起肝细胞基因转录的改变^[3],并进一步影响肝癌患者的预后^[4]。手术所采用的不同麻醉方式可对病人体内的激素、酶类等重要物质造成不同的影响^[5,6],是导致机体应激反应出现差异的重要原因。然而,不同麻醉方式对肝癌患者手术后体内炎性细胞因子合成的影响目前尚不清楚,本研究拟探讨单纯静脉-吸入复合全身麻醉以及硬膜外联合静脉麻醉对肝癌手术患者外周血单个核细胞炎性细胞因子 IL-1 β 、IL-6、IL-8 和 TNF- α 基因表达的影响。

1 材料与方法

1.1 一般资料

作者简介:黄凌鲲(1977-),硕士,研究方向:临床麻醉

E-mail: huanglingkun09@sina.com

(收稿日期:2012-02-02 接受日期:2012-03-10)

选择 ASA I~II 级 Child-Pugh 分类^[7]为 A 级的肝叶切除患者共 48 例,随机分为硬膜外联合全身麻醉组(联合组)、单纯静-吸复合全身麻醉组(全麻组)各 24 例。两组患者术前均无放疗、化疗及激素治疗史,无内分泌、循环系统及免疫系统疾病,围术期无输血。两组患者在肝功能、年龄、性别、体重、手术时间方面的差异无显著性($P>0.05$),并由同一组外科医师实施手术。

1.2 麻醉方法

两组病人入手术室前 30 min 均肌肉注射安定 10 mg、阿托品 0.5 mg。联合组患者入手术室后行 T8~9 间隙硬膜外腔穿刺并置管,给予 0.2%罗哌卡因 5mL 作为试验量,在测试和确定麻醉平面后再行全麻诱导气管插管,插管后经硬膜外导管推注 0.2%罗哌卡因 10~15mL。麻醉诱导系用咪达唑仑 0.15mg/kg、芬太尼 2.5 μ g/kg、异丙酚 1.0mg/kg 以及维库溴铵 0.1mg/kg 静脉推注,麻醉维持采用每隔 1 小时自硬膜外腔给予 0.2%罗哌卡因 5mL,直至手术完毕。同时将异丙酚 200mg 和瑞芬太尼 0.2mg 稀释至 50mL,经微量泵以异丙酚 50 μ g/kg $\cdot$ min 的速度输注,手术完成前 15min 停药。全麻组的麻醉诱导同联合组,麻醉维持采用持续吸入异氟醚,间断静注芬太尼维持。两组患者

均根据术中的肌松情况间断追加维库溴铵 0.05mg/kg。手术全程控制呼吸,机械通气维持 PETCO₂35±5mmHg。术前行右锁骨下静脉穿刺监测 CVP 和维持静脉通路。术中输液以羟乙基淀粉、乳酸林格液为主。

1.3 指标测定

在麻醉诱导后即刻(T₀)和术毕 4h(T₁)分别取肝素抗凝血 20ml,密度梯度离心法(Ficoll)分离 PBMC,在 4℃,以 200g 冷冻离心 10min。弃上清后加入 1 ml Trizol 试剂(Sigma)抽提总

RNA,以六聚体随机引物进行逆转录(reverse transcription, RT)反应后,灭活逆转录酶,置 -70℃ 保存。以上述反应得到的 cDNA 为模板,参考文献^[8]应用特异性引物(见表 1)进行 PCR 反应,反应体系 50 μL,循环条件为:95℃ 5min,93℃ 1min,56℃ 1min,72℃ 1min 35 次循环,72℃ 7min。反应完成后,吸取 5 μL PCR 产物,加入 2.0%琼脂糖凝胶中进行电泳(100V,1.5h),经溴化乙啶染色后,使用凝胶图像分析系统扫描并求积定量,以 β-actin 的表达量设为内标准。

表 1 炎症细胞因子的 PCR 引物序列及相应产物长度

Table 1 The PCR primers of inflammatory cytokines and the length of corresponding products

引物 Primers	序列 Sequences	扩增片段长度 Amplified fragment length
β-actin(+)	5'-CGGGAAATCGTGCCTGACAT-3'	712bp
β-actin(-)	5'-GAACTTTGGGGGATGCTCGC-3'	
IL-1β(+)	5'-TGCCCGTCTTCTGGGAGGG-3'	288bp
IL-1β(-)	5'-GGCTGGGGATTGGCCCTGAA-3'	
IL-6(+)	5'-TTCCCTACTTCCAAGTC-3'	564bp
IL-6(-)	5'-ACTAGGTTTGCGGAGTAG-3'	
IL-8(+)	5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT-3'	289bp
IL-8(-)	5'-TCTCAGCCCTCTTCAAACTTCTC-3'	
TNF-α(+)	5'-TTCTGTCTACTGAACTTCGGGGTGATCGGTCC-3'	354bp
TNF-α(-)	5'-GTATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGGG-3'	

1.4 统计学分析

以细胞因子 mRNA/β-actin mRNA 的比值(Ratio) 为所得数据,采用均数±标准差($\bar{X} \pm S$)表示,用 SPSS12.0 软件处理数据,组内比较用配对 t 检验,两组间均数比较用 t 检验。检验水准 α=0.05,当 P<0.05 时认为有统计学意义。

2 结果

2.1 麻醉效果

两组患者的术前一般情况、麻醉期间的 SpO₂、MAP、HR、pH、PaO₂、PCO₂ 及手术持续时间、肝门阻断时间和手术方式无

差异均无显著差异(P>0.05)。

2.2 免疫指标

两组患者麻醉前后外周血中炎症细胞因子 IL-1β、IL-6、IL-8 和 TNF-α 的 mRNA 表达情况见表 2。在 T₀ 时间点,两组间 IL-1β、IL-6、IL-8 和 TNF-α 的 mRNA 表达差异无显著性(P>0.05);在 T₁ 时间点全麻组 IL-1β、IL-6、IL-8 mRNA 的表达增强(P<0.05),而联合组 IL-1β、IL-6、IL-8 及 TNF-α mRNA 表达无明显变化(P>0.05)。在麻醉后 4h,全麻组 IL-1β、IL-8 和 TNF-α 的 mRNA 表达显著强于联合组(P<0.05)。

表 2 两组患者炎症细胞因子基因表达的变化

Table 2 The gene expression of the inflammatory cytokines in two groups

Item	Groups	T ₀	T ₁
IL-1β	联合组 Unite group	0.44±0.15	0.43±0.12
	全麻组 General anesthesia group	0.46±0.13	0.86±0.14*#
IL-6	联合组 Unite group	0.27±0.07	0.32±0.09
	全麻组 General anesthesia group	0.29±0.08	0.45±0.17*#
IL-8	联合组 Unite group	0.35±0.08	0.39±0.14
	全麻组 General anesthesia group	0.36±0.10	0.87±0.12*#
TNF-α	联合组 Unite group	0.83±0.18	0.75±0.16
	全麻组 General anesthesia group	0.78±0.19	0.85±0.20

注:与联合组比较,*P<0.05;与 T₀ 比较,#P<0.05。

Note:Compared with combined anesthesia group,*P<0.05; compared with T₀,#P<0.05.

3 讨论

炎性细胞因子是由机体的免疫或非免疫细胞所合成、分泌的小分子多肽类物质,生物活性多样,可诱导产生急性期炎症反应,促进多种免疫细胞活化和分化。它们可以调节机体的多种细胞生理功能,同时在创伤、疼痛、感染等应激过程中有作用^[9]。手术创伤、严重感染等外源性刺激可促进机体的过度应激,使炎性细胞因子失衡,引起应激性组织损伤^[10]。作为免疫与急性期炎症反应的介质,炎性细胞因子的出现一方面提示机体的应激启动,另一方面也说明体内有炎症反应存在^[11]。炎性细胞因子与手术应激所致的炎症反应直接相关,其增高的幅度和持续时间与手术的创伤程度正相关,因而在一定程度上可以反映炎症反应的严重程度^[12]。

IL-1 β 属于 IL-1 基因家族,当炎症和感染发生时,机体内的多种免疫细胞均可合成和分泌 IL-1 β 。IL-1 β 的生物学作用十分广泛,主要包括:介导炎症反应、调节免疫应答以及参与调节机体代谢^[13]。IL-6 则是一类应激病理生理过程中的重要介质,已有的研究已经证明,手术可直接或间接的促进 IL-6 的合成及分泌增加,而且 IL-6 升高的水平与手术后并发症的发生率以及手术所引起的组织损伤程度正相关^[14]。IL-8 是一类由 72 个氨基酸残基组成的多肽,作为一种重要的趋化因子,对中性粒细胞、巨噬细胞等吞噬细胞具有强烈的趋化作用。IL-8 不但能刺激中性粒细胞移动和游走并穿越血管内皮细胞,还可以刺激中性粒细胞的呼吸爆发,并产生大量氧自由基和弹性蛋白酶等,因此,IL-8 也是一类重要的炎症介质^[15]。TNF- α 也是一种具有广泛生物效应的重要细胞因子,TNF- α 往往在机体外伤、炎症等应激刺激的早期就明显增高,可以启动炎症反应,增强巨噬细胞的吞噬功能,通过激发和参与免疫应答、炎症而反应发挥作用,对肿瘤细胞的清除也有重要意义。而且,在手术刺激时 TNF- α 还可以诱导其它类别的炎性细胞因子(如 IL-1 β 、IL-8 等)的产生,产生后的 IL-1 β 又可以通过协同作用进一步刺激 IL-6 的合成。

本研究中采用了 RT-PCR 方法来精确测定相关炎性细胞因子 mRNA 的表达,运用此方法来做定量检测时必须考虑所有可能影响测定结果准确性的相关因素,主要包括:逆转录时细胞总 RNA 的量、逆转录的效率、PCR 的循环参数等。为了提高检测的可信程度,目前主流的做法是将某些表达较为恒定的看家基因作为内对照加入相应的 PCR 反应体系中,这样使得检测的特异性基因与加入的内对照看家基因在同一 PCR 管内扩增,而最终结果将以这两种基因的强度比值来表示,通过这种处理可以使该定量实验结果更为准确^[16],在我们的研究中选择了 β -actin 作为内对照。

已有的报道证实:不同麻醉方法可以影响机体的免疫功能和细胞因子的反应,但是麻醉方法对细胞因子的具体影响目前尚无一致的看法。本研究结果显示:不同麻醉方法对细胞因子的分泌会产生不同的影响,在麻醉后 4 小时全麻组炎性细胞因子(IL-1 β 、IL-6、IL-8)的 mRNA 表达水平较联合组显著升高。其原因可能为硬膜外阻滞是局部作用,硬膜外腔中的麻醉药很少被吸收入血循环,所以硬膜外阻滞对外周血促炎性细胞因子表达无明显影响。综上所述,本研究观察到单纯全麻能增

强肝癌手术病人外周血淋巴细胞促炎性细胞因子表达,而联合麻醉无此效应,说明与单纯全麻相比较联合麻醉不易促进炎性细胞因子的基因表达,调节炎性细胞因子之间的平衡,将对机体具有一定的保护作用。

参考文献(References)

- [1] Freise, H. and H.K. Van Aken. Risks and benefits of thoracic epidural anaesthesia[J]. Br J Anaesth, 2011, 107(6): 859-868
- [2] Cardinale, F. Immunological modifications induced from products used during the perioperative period[J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2011, 24(3 Suppl): S13-20
- [3] 彭颖琼, 胡斌, 肖伟, 等. 肝细胞癌中 NF-kBp65、VEGF 和 MMP-9 蛋白的表达及其相关性研究[J]. 现代生物医学进展, 2010(03): 443-446
Peng Ying-qiong, Hu Bin, Xiao Wei, et al. Expression of NF-kBp65, VEGF and MMP-9 in hepatocellular carcinoma and their clinical significance[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010(03): 443-446
- [4] 叶轲, 张鸽文, 梁帅, 等. NET-1 蛋白表达水平在肝细胞癌患者预后中的意义[J]. 现代生物医学进展, 2010(05): 832-835, 1009
Ye Ke, Zhang Ge-wen, Liang Shuai, et al. Prognostic Significance of Neuroepithelial Transforming Protein 1 Expression Pattern in Human Hepatocellular Carcinoma [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010(05): 832-835, 1009
- [5] 宋晓阳, 王燕林, 凌娜佳. 不同麻醉和镇痛方式对开胸手术患者红细胞糖代谢限速酶的影响研究 [J]. 现代生物医学进展, 2010(20): 3880-3882
Song Xiao-yang, Wang Yan-lin, Ling Na-jia, et al. Patients undergoing esophagectomy surgery: effects of different anesthetics and analgesics on their rate-limiting enzyme of sugar metabolism in erythrocytes[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010(20): 3880-3882
- [6] 周颖, 张慧, 李振英. 不同麻醉方法对腹腔镜子宫切除术患者血清皮质醇及儿茶酚胺的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2009(14): 2713-2715, 2712
Zhou Ying, Zhang Hui, Li Zhen-ying, et al. Influence of different anesthetic methods on serum cortisone and catecholamines in patients during laparoscopic hysterectomy [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2009(14): 2713-2715, 2712
- [7] Friedman, L.S. Surgery in the patient with liver disease[M]. Trans Am Clin Climatol Assoc, 2010, 121: 192-204, 205
- [8] Platzer, C. Quantitative PCR analysis of cytokine transcription patterns in peripheral mononuclear cells after anti-CD3 rejection therapy using two novel multispecific competitor fragments [J]. Transplantation, 1994, 58(2): 264-268
- [9] Mosaffa, F. Pro-inflammatory cytokines interleukin-1 beta, interleukin 6 and tumor necrosis factor-alpha alter the expression and function of ABCG2 in cervix and gastric cancer cells [J]. Mol Cell Biochem, 2012, 363(1-2): 385-393
- [10] Rodrigues, S.M., J.E. LeDoux and R.M. Sapolsky. The influence of stress hormones on fear circuitry [J]. Annu Rev Neurosci, 2009, 32: 289-313
- [11] Fang, Y. Changes of serral TNF-alpha, IL-6 and IL-10 level after implantation of valved bovine jugular vein conduit in complex congenital heart diseases [M]. Zhongguo Xue Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 2009, 23(7): 877-881

(下转第 3277 页)

可能还需要更多的数据加以论证。

参考文献(References)

- [1] Woitas RP, Stoffel-Wagner B, Flommersfeld S, et al. Correlation of serum concentrations of cystatin C and creatinine to inulin clearance in liver cirrhosis[J]. Clin Chem, 2000, 46(5):715-721
- [2] 周建华. C-反应蛋白检测的临床价值[J]. 国外医学脑血管疾病分册, 2005:533-536
Zhou Jian-hua. C-reactive protein and its clinical value[J]. International Journal of cerebrovascular disease volumes, 2005:533-536
- [3] 杨志健, 贾恩志, 孙磊. 胱抑素 C 与冠心病的相关性研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2009, 29(5):702-731
Yang Zhi-jian, Jia En-zhi, Sun Lei. Association of cystatin C and coronary heart disease [J]. Acta Universitatis Medicinalis Nanjing(Natural Science), 2009, 29(5):702-731
- [4] McMahan CA, Gidding SS, McGill HC. Coronary heart disease risk factors and atherosclerosis in young people [J]. J Clin Lipidol, 2008, 2(3):118-126
- [5] Charuruks N, Laohajinda B, Rujiwanitgun S, et al. Reference value for C-reactive protein and its distribution pattern in Thai Adults[J]. Circ J, 2005, 69:339-344
- [6] 程红革. 超敏 C 反应蛋白与心血管疾病的预防[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(11):1291-1293
Cheng Hong-ge. Allergic c-reactive protein and cardiovascular disease prevention [J]. International inspection medical journal, 2010, 31(11):1291-1293
- [7] Noto D, Cefalu AB, Barbagallo CM, et al. Cystatin C levels are decreased in acute myocardial infarction. Effect of Cystatin C G73A gene polymorphism on plasma levels[J]. Int J Cardiol, 2005, 101:213-217
- [8] 江春娟, 姜亚平. C-反应蛋白与缺血性卒中[J]. 国外医学脑血管疾病分册, 2005, 13(7):533-536
- Jiang Chun-juan, Jiang Ya-ping. C-reactive protein and ischemic stroke [J]. Foreign medical cerebrovascular disease J, 2005, 13(7):533-536
- [9] Ridker PM, Hennekens CH, Buring IE, et al. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women[N]. N Engl J Med, 2000, 342:836-843
- [10] Hashimoto H, Kitagawa K, Hougaku H, et al. C-reactive protein is an independent predictor of the rate of increase in early carotid atherosclerosis[M]. Circulation, 2001, 104:63-67
- [11] Koenig W, Twardella D, Brenner H, et al. Plasma concentrations of cystatin C in patients with coronary heart disease and risk for secondary cardiovascular events: more than simply a marker of glomerular filtration rate[M]. Clin Chem, 2005, 51:321-327
- [12] Whitcher J, Rifai N, Biasucci LM. Marker of the acute phase response in cardiovascular disease: an update. Clin Chem[M]. Lab Med, 2001, 39:1054-1064
- [13] 薛静, 吕丽霞. 超敏 C 反应蛋白及血脂与缺血性脑卒中颈动脉粥样硬化的关系[M]. 血栓与止血学, 2007, 13(1):12-13
Xue Jing, Lv Li-xia. Allergic c-reactive protein and blood fat and ischemic stroke carotid atherosclerosis relationship [M]. Thrombosis and hemostasis learn, 2007, 13(1):12-13
- [14] Keller T, Messow CM, Lubos E, et al. Cystatin C and cardiovascular mortality in patients with coronary artery disease and normal or mildly reduced kidney function: results from the AtheroGene study[J]. Eur Heart J, 2009, 30(3):314-320
- [15] 董巧玲, 刘俊. 半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 与心血管疾病的联系[J]. 中国心血管研究杂志, 2007, 5(5):395
Dong Qiao-ling, Liu Jun. Homocysteine protease inhibitors C and cardiovascular disease of the relationship[J]. China the cardiovascular research magazine, 2007, 5(5):395

(上接第 3283 页)

- [12] Kawane, K. Cytokine-dependent but acquired immunity-independent arthritis caused by DNA escaped from degradation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(45):19432-19437
- [13] Yazdi, A.S. Inflammatory caspases in innate immunity and inflammation[J]. J Innate Immun, 2010, 2(3):228-237
- [14] Mihara, M., et al. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions [J]. Clin Sci (Lond), 2012, 122(4):143-159
- [15] Shen, Y., D. Wang, X. Wang. Role of CCR2 and IL-8 in acute lung injury: a new mechanism and therapeutic target[J]. Expert Rev Respir Med, 2011, 5(1):107-114
- [16] Dumoulin, F.L. Semi-quantification of human C-C chemokine mRNA with reverse transcription/real-time PCR using multi-specific standards[J]. J Immunol Methods, 2000, 241(1-2):109-119