

· 论 著 ·

乌司他丁对青少年特发性脊柱侧凸患者围手术期炎症细胞因子表达的影响

朱 炜, 邓小明*, 李文献 (第二军医大学长海医院麻醉科, 上海 200433)

[摘要] **目的:**观察乌司他丁(UTI)对青少年特发性脊柱侧凸(AIS)患者围手术期炎症因子(IL-6、TNF- α 、IL-10、IL-4)表达的影响。**方法:**20例AIS患者,ASA I~II级,择期行侧凸矫形术,随机分为2组。UTI组($n=10$):于麻醉后手术前将10 000 U/kg的UTI溶于100 ml生理盐水中,微泵持续静滴,若手术时间超过4 h,追加1次,方法同前。对照组($n=10$):用等量生理盐水替代。术中连续监测心电图(ECG)、脉搏血氧饱和度(SpO₂)、呼气末CO₂分压(P_{ET}CO₂)、中心静脉压(CVP)与桡动脉压,维持平均动脉压(MAP)在(60 \pm 5) mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)。分别于麻醉前(T₁)、诱导后10 min(T₂)、给药后1 h(T₃)、拔管后30 min(T₄)及术后24 h(T₅)抽取静脉血,测定血浆各细胞因子蛋白及其mRNA的表达。**结果:**在T₃、T₄、T₅时,对照组血浆IL-6、TNF- α 水平及其mRNA拷贝数明显高于T₁($P<0.05$ 或 $P<0.01$);UTI组血浆IL-6、TNF- α 水平及其mRNA拷贝数与T₁相比无显著差异,且明显低于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。在T₄、T₅时,对照组血浆IL-10水平及其mRNA拷贝数与T₁比明显升高($P<0.05$);UTI组血浆IL-10水平及其mRNA拷贝数明显高于T₁水平($P<0.01$),且明显高于对照组($P<0.01$)。两组各时间点血浆IL-4水平及其mRNA拷贝数未见显著改变。**结论:**UTI可抑制AIS患者围手术期促炎细胞因子IL-6、TNF- α 及其mRNA产生;并可促进血浆抗炎细胞因子IL-10在蛋白与mRNA水平的增高。

[关键词] 乌司他丁;青少年特发性脊柱侧凸;肿瘤坏死因子;白细胞介素

[中图分类号] R 977.3; R 681.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)02-0203-04

Effect of ulinastatin on expression of inflammatory cytokines during perioperative period of surgical correction of adolescent idiopathic scoliosis

ZHU Wei, DENG Xiao-ming*, LI Wen-xian (Department of Anesthesiology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the effect of ulinastatin(UTI) on the changes of IL-6, TNF- α , IL-10 and IL-4 expression during perioperative period of surgical correction of adolescent idiopathic scoliosis(AIS). **Methods:** Twenty patients with AIS I-II scheduled to receive surgical correction of spinal deformities were equally randomized into 2 groups-UTI group and control group. Patients in UTI group received intravenous infusion of 10 000 U/kg UTI with 250 ml normal saline just before operation and every 4 h thereafter if necessary; patients in control group received same amount of normal saline. ECG, CVP, SpO₂ and P_{ET}CO₂ were continously monitored during operation in both group. Mean arterial pressure (MAP) was maintained at (60 \pm 5) mmHg (1 mmHg=0.133 kPa). Venous blood samples were collected immediately before induction of anaesthesia (T₁), 10 min after induction (T₂), 1 h after UTI administration (T₃), 30 min after extubation (T₄) and 24 h postoperatively (T₅). The plasma levels of IL-6, TNF- α , IL-10 and IL-4 were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and their mRNA expression was assayed by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. **Results:** At T₃, T₄ and T₅, plasma levels of IL-6 and TNF- α and their mRNA copies in control group were significantly higher than that at T₁ ($P<0.05$ or $P<0.01$) and those in UTI group ($P<0.05$ or $P<0.01$); while plasma IL-6 and TNF- α and their mRNA copies in UTI group had no difference compared with those at T₁, but were significantly lower than those of control group ($P<0.05$ or $P<0.01$). At T₄ and T₅, plasma IL-10 and its mRNA copies had a significant increase compared with those at T₁ in control group ($P<0.05$). At T₄ and T₅, plasma IL-10 and its mRNA copies had a significant increase compared with those at T₁ in UTI group ($P<0.01$), and were higher than that of control group ($P<0.01$). The plasma IL-4 and its mRNA copies had no significant change in both groups on each point time. **Conclusion:** UTI can inhibit the release of IL-6, TNF- α and their mRNA copies in perioperation period of surgical correction of AIS, and it may also promote expression of IL-10 protein and IL-10 mRNA.

[KEY WORDS] ulinastatin; adolescent idiopathic scoliosis; tumor necrosis factor; interleukin

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(2):203-206]

青少年特发性脊柱侧凸(AIS)属于骨科的大手术,其手术时间长、创伤大、出血多,在围手术期可激发患者产生全身炎症反应综合征(SIRS),严重者可导致急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、多器官功能障

碍综合征(MODS)。促炎细胞因子IL-6、TNF- α 与

[作者简介] 朱 炜, 硕士。现在南京鼓楼医院麻醉科工作。

* Corresponding author.

抗炎细胞 IL-4、IL-10 是参与 SIRS 的重要炎症介质,其表达水平与手术大小和损伤程度密切相关。近年来研究表明乌司他丁(UTD)在抵御手术刺激、抑制围手术期多种炎症介质的释放、保护重要器官功能等方面作用显著^[1,2]。但对于其在 AIS 患者围手术期的应用研究较少。本文通过 AIS 患者围手术期应用中等剂量(10 000 U/kg)的 UTI,探讨 UTI 对 AIS 患者围手术期 IL-6、TNF- α 、IL-4、IL-10 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 研究对象 20 例 AIS 患者,其中男性 8 例,女性 12 例;年龄 11~18 岁,平均 14.6 岁;术前侧凸 Cobb 角 37°~125°,平均 87.1°。体质量 20~49 kg,ASA I~II 级。随机分为 2 组,每组 10 例。UTI 组:于麻醉后手术前将 10 000 U/kg 的 UTI 溶于 100 ml 的生理盐水中,微泵持续静滴,若手术时间超过 4 h,追加 1 次。对照组:用等量生理盐水替代。

1.2 麻醉方法 所有患者均以静注利多卡因 1.5 mg/kg、芬太尼 2 μ g/kg、普鲁泊福 2 mg/kg、罗库溴铵 0.6 mg/kg 进行麻醉诱导。采用异氟烷低流量紧闭麻醉,氧流量 0.5 L/min,维持患者肺泡气最低吸入浓度(MAC)值在 1.3~1.5。常规颈内静脉与桡动脉置管,术中连续监测心电图(ECG)、脉搏血氧饱和度(SpO₂)、呼气末 CO₂(P_{ET} CO₂)、中心静脉压(CVP)与桡动脉压。术中控制性降压,维持平均动脉压(MAP)在(60 \pm 5) mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)。

1.3 观察指标 分别于麻醉前(T₁)、诱导后 10 min(T₂)、给药后 1 h(T₃)、拔管后 30 min(T₄)及术后 24 h(T₅)自中心静脉抽取静脉血测定 IL-6、TNF- α 、IL-4、IL-10 蛋白及其 mRNA 水平的表达。

1.4 蛋白表达测定 3 ml 抗凝血严格按照 ELISA 试剂盒(深圳晶美公司)说明要求操作,测定各时间点血浆 IL-6、TNF- α 、IL-4、IL-10 蛋白表达。

1.5 mRNA 表达测定

1.5.1 cDNA 第 1 链的合成 (1)溶解 2 ml 抗凝血的红细胞,制备白细胞;(2)以 TRIzol 使用经典法 RNA 抽提试剂盒(上海申能博采生物科技有限公司提供)从白细胞沉淀中抽提总 RNA;(3)按照 RevertAidTM 第 1 链 cDNA 合成试剂盒(上海申能博采生物科技有限公司提供)用 2 μ g RNA 作模板合成 cDNA。

1.5.2 合成细胞因子引物与探针 根据 GenBank 数据库中公开发表的基因序列,设计 IL-6 mRNA、TNF- α mRNA、IL-10 mRNA、IL-4 mRNA、GAP-

DH(看家基因)的引物及探针,各探针在两端分别具有报告基团(6-carboxyfluorescein,6-FAM)(位于 5'端)和猝灭基团(6-carboxy-tetramethyl-rhodamine,TAMRA)(位于 3'端)。各细胞因子引物序列(5'-3')与探针如下。IL-6 mRNA 上游引物 TCC AGG AGC VCC AGC TAT GAA,下游引物 CCC AGG GAG AAG GCA ACT G,探针 TCC TTC TCC ACA AGC GCC TTC GG,产物 65 bp。TNF- α mRNA 上游引物 GAT CAA TCG GCC CGA CTA TCT,下游引物 CAG GGC AAT GAT CCC AAA GT,探针 ACTT TGC CGA GTC TGG GCA GG,产物 67 bp。IL-10 mRNA 上游引物 GTG ATG CCC CAA GCT GAG A,下游引物 GTG ATG CCC CAA GCT GAG A,探针 CCA AGA CCC AGA CAT CAA GCG CA,产物 138 bp。IL-4 mRNA 上游引物 CCA CGG ACA CAA GTG CGA TA,下游引物 CCC TGC AGA AGG TTT CCT TCT,探针 TCT GTG CAC CGA GTT GAC CGT AAC AGA C,产物 149 bp。

1.5.3 实时定量 PCR 反应 10 \times PCR 反应缓冲液 2.5 μ l,25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ l,上游及下游引物(400 mmol/L)各 0.1 μ l,0.1 μ l 荧光素标记探针(50 mmol/L),10 mmol/L dNTP 0.5 μ l,0.5 μ l Taq DNA 酶(1.25 U),2 μ l cDNA 模板,双蒸水补足至 25 μ l。定量 PCR 反应条件:50 $^{\circ}$ C 预热 300 s;95 $^{\circ}$ C 变性 300 s;95 $^{\circ}$ C 20 s,60 $^{\circ}$ C 60 s,40 个循环,每个循环在 60 $^{\circ}$ C 时检测荧光强度。应用基因拷贝数已知的 DNA 片段作为标准,可以对 IL-6、TNF- α 、IL-10、IL-4 以及 GAPDH 进行定量分析。IL-6 基因拷贝数在 10³~10⁶ 范围内,检测阈值(C_t)与拷贝数之间呈线性关系,回归分析显示两者之间的相关系数 $r=0.9988$,不同实验间的误差 $<5\%$ 。TNF- α 、IL-10、IL-4 以及内参照基因 GAPDH 的标准曲线和 IL-6 的相同。

1.6 统计学处理 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组内比较用双因素方差分析,组间比较用两独立样本的 t 检验。

2 结果

在 T₃、T₄、T₅ 时,对照组血浆 IL-6、TNF- α 及其 mRNA 水平明显高于 T₁($P<0.01$ 或 $P<0.05$),UTI 组血浆 IL-6、TNF- α 及其 mRNA 水平明显低于对照组($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。在 T₄、T₅ 时,对照组血浆 IL-10 及其 mRNA 水平与 T₁ 比明显升高($P<0.05$);UTI 组血浆 IL-10 及其 mRNA 水平与 T₁ 比明显升高($P<0.01$),且明显高于对照组($P<$

0.01)。两组间各时间点血浆 IL-4 及其 mRNA 水平在整个围手术期未见显著改变。见表 1、表 2。

表 1 两组患者围手术期血浆 IL-6、TNF- α 、IL-4、IL-10 水平的变化

Tab 1 Perioperative changes of plasma IL-6, TNF- α , IL-10 and IL-4 in the 2 groups

($n=10$, $\bar{x}\pm s$, $\rho_B/\rho_G \cdot \text{ml}^{-1}$)

Index	Group	Time				
		T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅
IL-6	Control	7.01±2.14	7.85±2.44	21.68±6.86*	92.73±31.66**	119.76±29.40**
	UTI	8.15±2.80	9.01±3.12	10.36±3.49 Δ	11.35±3.11 $\Delta\Delta$	10.29±2.29 $\Delta\Delta$
TNF- α	Control	8.77±1.51	9.21±1.02	17.51±2.54*	46.83±6.60**	73.14±7.95**
	UTI	9.81±1.10	10.40±0.82	11.81±1.79 $\Delta\Delta$	12.57±2.30 $\Delta\Delta$	13.48±2.64 $\Delta\Delta$
IL-10	Control	8.01±1.02	9.23±1.32	9.33±1.45	11.63±1.21*	14.48±2.29*
	UTI	7.32±1.63	7.56±1.34	8.56±1.84	62.73±9.73** $\Delta\Delta$	72.21±10.63** $\Delta\Delta$
IL-4	Control	0.90±0.27	1.10±0.27	0.99±0.34	1.19±0.26	1.19±0.33
	UTI	1.09±0.23	1.24±0.38	1.30±0.27	1.33±0.47	1.38±0.24

T₁: Before induction of anaesthesia; T₂: 10 min after induction; T₃: 1 h after UTI administration; T₄: 30 min after extubation; T₅: 24 h postoperation. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs T₁; $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ vs control group

表 2 两组患者 IL-6、TNF- α 、IL-10 和 IL-4 mRNA 水平的变化

Tab 2 Changes of mRNA expression of IL-6, TNF- α , IL-10 and IL-4 in the 2 groups

($n=10$, $\bar{x}\pm s$, copy/10³GAPDH)

Index	Group	Time				
		T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅
IL-6	Control	1 262.55±381.76	1 325.62±417.82	2 037.87±472.82*	2 556.26±1 018.20**	2 720.48±1 170.50**
	UTI	1 071.25±415.15	1 164.04±393.94	1 148.36±371.02 $\Delta\Delta$	1 349.92±536.36 $\Delta\Delta$	1 377.67±174.96 $\Delta\Delta$
TNF- α	Control	759.07±309.41	839.76±177.49	1 441.72±326.72*	1 906.93±540.84**	2 125.01±563.49**
	UTI	891.71±332.47	939.76±305.73	941.60±312.97 Δ	954.37±295.22 $\Delta\Delta$	964.89±276.67 $\Delta\Delta$
IL-10	Control	2.72±0.86	3.19±0.85	3.44±0.95	3.63±0.79*	4.61±1.21*
	UTI	1.79±0.85	2.17±1.20	2.42±0.85	13.54±4.24** $\Delta\Delta$	18.93±6.35** $\Delta\Delta$
IL-4	Control	1 267.79±404.64	1 330.83±605.66	1 372.46±468.71	1 249.72±339.95	1 356.16±454.66
	UTI	1 081.05±350.83	1 208.43±324.21	1 240.89±453.03	1 059.29±375.42	1 234.45±386.74

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs T₁; $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ vs control group. T₁-T₅: See Tab 1

3 讨论

AIS 是青春期前或骨龄成熟前发生的脊柱侧凸,其发病率很高,占整个脊柱侧凸的 80%^[3],常合并心、肺功能低下与凝血功能障碍^[4,5]。AIS 矫形术剥离范围大、内固定材料多、出血多、术中输血多,术中常规采用控制性降压技术,对患者心、脑、肾等重要脏器的血供亦产生一定影响,同时患者多为青少年,各器官系统尚未发育完全,故术后易导致患者免疫功能低下,且并发感染、肠系膜上动脉综合征,胸膜、硬膜破裂的概率也相当大。

手术侵袭、麻醉可激发 SIRS,继续发展下去可以导致 ARDS、MODS。越来越多的证据表明机体的这种反应与体内单核-巨噬细胞源性瀑布样级联反应密切相关,而细胞因子在介导这些反应中起核心作用^[6]。Krohn 等^[7]对胸椎侧凸矫形术患者围手术期研究认为,此类患者围手术期细胞因子反应极其活跃,外周血中 IL-6、TNF- α 、IL-10 明显升高。此时机体除了依靠细胞膜表面的氨基葡聚糖的阻挡

储存作用,限制促炎细胞因子的释放,更为关键的是体内必须生成足量的抗炎细胞因子对其抗衡。然而,机体这种抗炎细胞因子一旦反应过度,则很容易诱发以免疫功能障碍为主要特征的“代偿性抗炎反应综合征”(CARS)的出现^[8]。因此,不论任何情况下,都必须保持这两类细胞因子的有效平衡。

UTI 是从健康成年男性尿液中提取的糖蛋白,由 143 个氨基酸组成,相对分子质量约为 6 700,其基本骨架为两个库纳斯(Kunitz)型区域。UTI 属蛋白酶抑制剂,另具有稳定溶酶体膜,抑制心肌抑制因子(MDF)产生,清除氧自由基及抑制炎症介质释放的作用^[9]。近年来发现其在抵御手术刺激,抑制围手术期多种炎症介质的释放,保护重要器官功能等方面作用显著^[1,2]。

围手术期 IL-6 主要由单核细胞和巨噬细胞产生。它诱导肝 C 反应蛋白(CRP)的表达,大手术后切口后 30 min 即可见循环 IL-6 增高,它在血浆中的浓度与手术所致创伤程度有关^[10]。Kragstbjerg 等^[11]指出:作为术后炎症反应的早期指标,IL-6 比

CRP 更有价值。TNF- α 主要由巨噬细胞分泌,但在手术应激中 TNF- α 的变化尚存在不同报道,其表达量的增加与围手术期出血密切相关。在炎症介质的释放过程中, TNF- α 可能起核心作用,诱发 IL-1、IL-6、IL-8 以及继发性炎症介质的释放^[12]。Natio 等^[13]认为外科创伤不仅导致局部的炎症反应,而且引起免疫及补体系统的应激反应,两者的作用导致了内源性介质的增加,围手术期内源介质的增加、内毒素的出现可引起免疫系统的活性,从而刺激细胞因子水平升高。本实验中,UTI 组患者在麻醉后使用 10 000 U/kg 的 UTI 后,可显著抑制 AIS 患者围手术期血浆 IL-6 与 TNF- α 水平及其 mRNA 表达。Futamura 等^[14]认为 UTI 可能是通过抑制 IL-6、TNF- α 的细胞内信号转导通路,降低核因子 κ B (NF- κ B) 水平而对血浆 IL-6、TNF- α 水平产生抑制作用。Molor 等^[15]近期研究认为 UTI 对血浆 TNF- α 的抑制作用可能与其抑制单核细胞外信号调节蛋白激酶——早期生长反应因子-1 (Egr-1) 通路的激活有关。故推测,UTI 可能是通过抑制 IL-6、TNF- α 的分泌或是单核细胞细胞外信号转导通路抑制围手术期血浆 IL-6、TNF- α 及其 mRNA 表达的升高。

炎症反应中 IL-10 主要由单核巨噬细胞产生,手术创伤后的抗炎性保护效应从 IL-10 开始。de Waal 等^[16]认为 IL-10 通过抑制 NF- κ B 抑制蛋白 (I κ B- α) 的降解阻断单核巨噬细胞中 NF- κ B 的活化,抑制炎症细胞因子及趋化因子的表达,限制急性炎症反应。本实验中,中等剂量的 UTI 可明显促进 UTI 组患者 IL-10 蛋白及其 mRNA 水平的升高。故推测 UTI 促进 AIS 患者围手术期 IL-10 在蛋白及其 mRNA 的表达,可能与 UTI 稳定白细胞膜,调节、局限炎症反应有关,但具体机制仍有待深入研究。

IL-4 是人体内的重要免疫调节剂,具有很强的抗炎作用。本实验中,整个围手术期两组患者血浆 IL-4 水平及其 mRNA 表达均无显著变化,可能与 IL-4 表达量较低有关。

总之,在 AIS 矫正术患者围手术期应用中剂量的 UTI 可抑制血浆促炎性细胞因子 IL-6、TNF- α 在蛋白及其 mRNA 水平的表达,同时促进血浆 IL-10 及其 mRNA 的生成。从而推测 UTI 可能起到减轻大手术围手术期炎症反应,平衡细胞因子级联反应的作用。

[参考文献]

[1] Yang YL, Li JP, Xu XP, et al. Protective effects of tumor necrosis factor alpha antibody and ulinastatin on liver ischemic

reperfusion in rats [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10: 3161-3164.

- [2] Sato N, Endo S, Kimura Y, et al. Influence of a human protease inhibitor on surgical stress induced immunosuppression [J]. Dig Surg, 2002, 19: 300-305.
- [3] 郑振耀,唐盛平,郭霞,等.青少年特发性脊柱侧凸病因研究与进展(一)[J].中国脊柱脊髓杂志,2002,12:139-141.
- [4] 刘尚礼,黄东升,马若凡,等. Cotrel-Dubouset 器械治疗脊柱侧凸并发症分析[J].中华骨科杂志,1998,18:326-328.
- [5] Upadhyay SS, Ho EKW, Gunawardene WMS, et al. Changes in residual volume relative to vital capacity and total lung capacity after arthrodesis of the spine in patients who have adolescent idiopathic scoliosis [J]. J Bone Joint Surg, 1993, 75-A: 46.
- [6] Helmy SA, Wahby MA, EI-Nawaway M. The effect of anaesthesia and surgery on plasma cytokine production[J]. Anaesthesia, 1999, 54:733-738.
- [7] Krohn CD, Reikeras O, Aasen AO. The cytokines IL-1beta and IL-1 receptor antagonist, IL-2 and IL-2 soluble receptor-alpha, IL-6 and IL-6 soluble receptor, TNF-alpha and TNF soluble receptor I, and IL-10 in drained and systemic blood after major orthopaedic surgery[J]. Eur J Surg, 1999, 165:101-109.
- [8] 陈德昌.全身性感染与免疫反应[J].基础医学与临床,1998,18:195-197.
- [9] 潘成,虞惠康,罗月娥.注射用乌司他丁[J].中国新药杂志,2000,9:123.
- [10] Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines [J]. Chest, 2000, 117:1162-1172.
- [11] Kragstbjerg F, Holmberg H, Vikerfors T. Serum concentration of interleukin-6, tumor factor- α and C-reactive protein in patients undergoing major operations[J]. Eur J Surg, 1995, 161: 17.
- [12] D'Andrea A, Ma X, Aste-Amezaga M, et al. Stimulated and inhibitory effects of interleukin(IL-4) and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production [J]. J Exp Med, 1995, 181(5): 537-546.
- [13] Natio Y, Tamai S, Shingu K, et al. Responses of plasma adrenocorticotrophic hormone, cortisol, and cytokines during and after upper abdominal surgery[J]. Anesthesiology, 1992, 77: 426.
- [14] Futamura Y, Kajikawa S, Kaga N, et al. Protection against preterm delivery in mice by urinary trypsin inhibitor [J]. Obstet Gynecol, 1999, 93:100-108.
- [15] Molor-Erdene P, Okajima K, Isobe H, et al. Urinary trypsin inhibitor reduces LPS-induced hypotension by suppressing tumor necrosis factor-alpha production through inhibition of Egr-1 expression [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 288: H1265-H1271.
- [16] de Waal Malefy R, Abrams J, Rennett B, et al. Interleukin-10 inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes[J]. J Exp Med, 1991, 74: 1209-1220.

[收稿日期] 2005-09-09

[修回日期] 2005-11-29

[本文编辑] 孙岩