维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)05－0622－03

异丙酚对大鼠局灶性脑缺血/再灌注损伤期炎性细胞因子的影响

雷秀珍，李秀英

(重庆医科大学临床学院麻醉科，重庆 400016)

【摘 要】目的：探讨脑缺血再灌注损伤中肿瘤坏死因子－α(TNF－α)、白细胞介素－6(IL－6)、白细胞介素－8(IL－8)含量的变化及异丙酚(propofol)对它们的影响。方法：72 只成年 Wistar 大鼠随机分为 3 组，A 组为假手术组($n=8$)；B 组为对照组($n=32$)，在缺血前 10min 腹腔注射生理盐水 10ml/kg，脑缺血 2h 后，分为 4 小组($n=8$)，分别再灌注 1h、6h、12h、24h；C 组为异丙酚组，在缺血前 10min 腹腔注射异丙酚 100mg/kg，脑缺血 2h 后，分组同 B 组。观察血浆中 TNF－α、IL－6、IL－8、丙二醛(MDA)，超氧化物歧化酶(SOD)含量的变化，取大脑组织 HE 染色，光镜观察。结果：异丙酚组的 TNF－α、IL－6、IL－8、MDA 含量明显低于对照组($P<0.05$)，而 SOD 活性高于对照组。光镜下异丙酚组的细胞结构尚完整；对照组细胞损伤严重。结论：异丙酚抑制脑缺血再灌注时炎性细胞因子的表达，从而减轻细胞因子介导的炎性损伤，具有脑保护作用。

【关键词】脑缺血再灌注；肿瘤坏死因子(TNF－α)；白细胞介素－6(IL－6)；白细胞介素－8(IL－8)；异丙酚

【中国图书分类法分类号】R971.2；R651 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－11－20

Effect of propofol on tumor necrosis factor－alpha, interleukin－6, interleukin－8 in rats following cerebral ischemia－reperfusion

LEI Xiuzhen, et al

(*Department of Anesthesiology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore changes of tumor necrosis factor alpha (TNF－α), interleukin－6 (IL－6), interleukin－8 (IL－8) in plasma and the effect of propofol on these cytokines in rats following cerebral ischemia－reperfusion injury. *Methods*: Focal cerebral ischemia model was induced by occluding the middle cerebral artery (MCA). Seventy two adult Wistar rats were divided randomly into three groups: sham operation group (group A), control group (group B), which was intraperitoneally infused with 0.9% saline (10ml·kg^{-1}) before ischemia and subdiuided into four groups two hours after ischemia and reperfused respectively for one hour, six hours, twelve hours, and twenty－four hours. Propofol group (group C), which was intraperitoneally infused with propofol (100mg. kg^{-1}) before ischemia and reperfusion. The serum concentration of TNF－α, IL－6, IL－8 and malondialdehyde (MDA) contents and activities of superoxide dismutase (SOD) were measured. Hematoxylin and eosin staining for the cerebral tissue was processed. *Results*: The serum concentration of TNF－α, IL－6, IL－8 and MDA of propofol group were significantly lower than control group, while the activity of SOD in plasma was higher than control group. Under light microscope, the structure of cells remained perfect in propofol group, while the cells of control group showed swelling, karyorrhexis and karyolysis. *Conclusion*: In addition to antioxidation, propofol effectively suppresses the production and release of inflammatory cytokine, and therefore protect the brain from ischemia and reperfusion injury.

【Key words】Ischemia－reperfusion; Tumor necrosis factor－alpha; Interleukin－6; Interleukin－8; Propofol

脑缺血再灌注损伤后的病理生理机制非常复杂，炎性细胞因子在脑缺血继发性损伤中起着重要作用[1]。大量的研究表明异丙酚有脑保护作用。本实验拟动态观察异丙酚对大鼠脑缺血再灌注损伤 TNF－α、IL－6、IL－8 的影响，从细胞因子角度来探讨异丙酚的脑保护作用。

作者介绍：雷秀珍(1975－)，女，住院医师，硕士

主要研究方向：麻醉脑保护。

1 材料和方法

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 动物模型

健康成年 Wistar 大鼠(重庆医科大学动物中心提供),体重 270±30g,雌雄不拘。参照 Zea longa 等[2]方法改进后的线栓法阻断大脑中动脉(MCA),颈纵向切口,分离右侧颈总动脉(CCA),颈内动脉(ICA)和颈外动脉(ECA。结扎 ECA 及 CCA 近心端,在 CCA 远心端上剪一小切口,将前端呈鼓锤状的单丝尼龙线置入 CCA(约 18.5±0.5mm),并缓慢插入 ICA 直至 MCA,缺血 2h,拔出尼龙线至 CCA 中,完成再灌注。术中术后室温控制在 25～28℃,用电灯泡照射给大鼠保暖以保持直肠体温在 37℃±0.5℃。

1.2 实验动物分组与用药

A 组假手术组($n=8$)仅把尼龙线插入 CCA 中 1～2mm。B 组对照组($n=32$),在建模型前 10min 腹腔注射 0.9%生理盐水 10ml/kg。根据实验要求,脑缺血 2h 后拔出线栓至 CCA 中,恢复脑血流完成再灌注,再分为 4 小组($n=8$)分别持续观察 1h、6h、12h 和 24h。C 组异丙酚组($n=32$),在建模型前 10min 腹腔注射异丙酚 100mg/kg。脑缺血 2h 后,分组同 B 组。

1.3 神经功能损害评估

麻醉苏醒后,将动物放回鼠笼,自由饮食。脑缺血再灌注后 1h、6h、12h、24h 进行神经功能损害评分,评分标准,0 分:无神经损伤体征;1 分:不能完全伸直左侧前爪;2 分:向左侧转圈;3 分:向左侧倾倒;4 分:不能自发行走,意识丧失。评分 2 分以上的大鼠入选。

1.4 标本采集

各组大鼠均在实验各时间点采集静脉血,按试剂盒说明分离和保存血清。并经左心室向升主动脉内高压灌注生理盐水 100ml 以及 4%多聚甲醛溶液 50～70ml,灌注结束后取出大脑组织,石蜡包埋切片,HE 染色,作光镜观察。

1.5 检测方法

血清中的 TNF－α、IL－6、IL－8 用放免法测定(试剂盒由解放军总医院科技开发中心提供,批号:2002－12－26、2002－12－28、2002－12－26),试剂配制和检验操作严格按药盒说明。放射测定使用全自动 γ－免疫计算器(型号:DFM－90 型),MDA、SOD 分别采用硫代巴比妥酸比色法和黄嘌呤氧化法测定(试剂盒由南京建成生物工程研究所提供)。实验取出缺血侧大脑组织,HE 染色,光镜观察。

1.6 统计学分析

所有数据进入 SAS 8.0 软件进行分析处理,测定值用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多均数的比较用 F 方差分析,组间均数比较用 q 检验,以 $P<0.05$ 为显著性差异。

2 结 果

2.1 脑缺血再灌注时血中 TNF－α、IL－6、IL－8 水平的变化(见表 1)。

再灌注 1h 时 B 组、C 组的 TNF－α 均较 A 组升高($P<0.05$),但 IL－8 的升高较晚,随再灌注时间的延长 TNF－α、IL－6、IL－8 均升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),但 C 组升高水平与 B 组比较明显降低($P<0.05$)

2.2 血浆 MDA、SOD 的变化

MDA 在 C 组再灌注 1h 同 A 组相比变化不明显,随再灌注时间延长有增加($P<0.05$),同 B 组相比各相应时点降低($P<0.05$),而 B 组同 A 组相比明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。SOD 在 C 组再灌注 1h 同 A 组相比无明显变化,但同 B 组相比均升高($P<0.05$),而 B 组的 SOD 均低于 A 组($P<0.05$)。(见表 2)

2.3 组织病理学结果

光镜观察假手术组大脑皮质结构层次清晰;对照组大脑皮质结构层次随着脑缺血再灌注时间的延长结构破坏加重,出现胞核深染,胞体皱缩,细胞呈三角形或圆形,胞核破裂或消失;异丙酚组同样随着脑缺血再灌注时间的延长大脑皮层结构破坏加重,但其损伤程度明显轻于同时点对照组,锥体细胞形

表 1 血清 TNF－α、IL－6、IL－8 含量的变化($n=8,\bar{x}\pm s$)

组 别	再灌注时间(h)	TNF－α(ng/ml)	IL－6(pg/ml)	IL－8(ng/ml)
假手术组		1.09±0.11	54.65±3.24	0.63±0.03
对照组	再灌注 1h	1.73±0.08□	63.06±2.94*	0.64±0.02
	再灌注 6h	1.93±0.10□	74.71±3.43□	0.71±0.02*
	再灌注 12h	2.03±0.17□	92.61±3.36□	0.87±0.02□
	再灌注 24h	2.52±0.24□	118.21±7.31□	1.23±0.10□
异丙酚组	再灌注 1h	1.33±0.06*▲	55.31±1.56▲	0.56±0.02
	再灌注 6h	1.48±0.03*▲	60.93±2.18*▲	0.63±0.03▲
	再灌注 12h	1.65±0.04□▲	79.92±1.78□▲	0.70±0.01*▲
	再灌注 24h	1.82±0.05□▲	90.18±2.08□▲	0.83±0.02□▲

注:与假手术组比,* $P<0.05$,□ $P<0.01$,与对照组比,▲ $P<0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 血清 MDA 和 SOD 含量的变化($n=8, \bar{x} \pm s$)

组 别	再灌注时间(h)	MDA(nmol/ml)	SOD(NU/ml)
假手术组		7.87±0.66	125.06±2.97
对照组	再灌注 1h	9.73±1.03△	92.79±2.50▼
	再灌注 6h	10.37±1.05▼	85.42±1.38▼
	再灌注 12h	11.13±1.03▼	69.22±4.11▼
	再灌注 24h	11.75±1.03▼	51.19±3.84▼
异丙酚组	再灌注 1h	8.78±0.93■	107.20±2.49■
	再灌注 6h	9.05±0.54△■	95.16±3.35▼■
	再灌注 12h	9.36±0.63△■	90.39±1.69▼■
	再灌注 24h	9.77±0.89△■	86.80±1.01▼■

注:与假手术组比,△$P<0.05$,▼$P<0.01$ 与对照组比,■$P<0.05$

态欠规则,胞浆及核轻度深染,神经细胞呈三角形或多角形。

3 讨 论

脑缺血再灌注损伤后,与再灌注有关的急性炎症反应在继发性脑损伤中的作用日益受到重视,而与中性粒细胞有关的炎症反应在继发性脑损伤中起关键的作用。中性粒细胞介导的损伤包括向损伤区聚集与向血管内皮细胞粘附两个病理过程。有证据表明,IL-8 是介导中性粒细胞的关键分子[3],它不仅起中性粒细胞的化学趋化因子和激活因子的作用,同时也增强中性粒细胞表面与细胞间粘附分子-1(ICAM-1)结合的 CD16/CD18(MCA-1)的结合活性,而 ICAM-1 是影响中性粒细胞向脑血管内皮表面粘附的关键分子。有研究证实,使用抗 ICAM-1 单克隆抗体可减轻中性粒细胞介导的脑损害。炎性细胞因子 TNF-α 不仅可直接促进中性粒细胞向损伤区的聚集,而且可上调细胞粘附分子 ICAM-1 和选择素等的表达[4]。IL-6 是一种具有免疫调节作用特别是调节急性期反应的细胞因子,它是单核/巨噬细胞的趋化因子,从而使损伤区单核/巨噬细胞增多,导致继发性损伤加重。本研究提示,局灶脑缺血再灌注后,异丙酚组和对照组 TNF-α、IL-6 的升高较早,IL-8 升高稍晚,并持续至再灌注 24h 仍维持于较高水平,这提示局灶脑缺血再灌注后,炎性细胞因子在继发性脑损伤中起着非常重要的作用。体外研究表明,TNF-α 可刺激单核/巨噬细胞产生 IL-6,并产生剂量依赖性;另有研究报道,TNF-α 也诱导 IL-8 的产生。这些细胞因子相互影响、相互作用,形成网络效应,同时 TNF-α 可能是细胞因子的重要启动因子,可上调其它细胞因子的产生,这样才导致局部炎症扩大加重脑组织的损伤。

近年来,异丙酚的抗氧化特性及脑保护作用已逐渐为人们所认识,研究发现异丙酚有类似巴比妥药物的作用。异丙酚可抑制脑电活动,降低脑代谢率及血流量,保持脑血管对 CO_2 的反应性,抑制脑及脊髓代谢,降低中枢神经系统葡萄糖利用率,减少钙内流,清除氧自由基等。本研究提示,异丙酚能够有效抑制脑缺血再灌注时炎性细胞因子的表达,可能与异丙酚的多方面的脑保护特性有关。近年,Taniguchi 等[5]在脓毒血症期间给予异丙酚可减少内毒素所致的炎性细胞因子 TNF-α、IL-6 的产生,并减轻中性粒细胞肺浸润,减轻酸中毒。最近,在内毒素休克大鼠的研究中进一步证实,异丙酚有效降低脓毒性休克动物的死亡率,其机制可能与减少炎性细胞因子 TNF-α、IL-6 的产生有关[6]。离体培养也显示,不同剂量的异丙酚均能抑制脂多糖刺激外周血单核细胞合成和释放炎性细胞因子 IL-6[7]。有研究证明异丙酚能抑制 IL-8 的生成[8]。本研究结果与报道相似,同时异丙酚组的 MDA 低于对照组($P<0.05$),而 SOD 含量却高于对照组。对照组 MDA 明显升高,反映氧自由基产物增多。异丙酚组炎性细胞因子、SOD、MDA 的变化以及光镜下结果,均说明异丙酚的作用是多方面的。

综上所述,本研究仅初步探讨了脑缺血再灌注损伤血中 TNF-α、IL-6、IL-8 的变化,上述炎性细胞因子参与了脑缺血。再灌注损伤的发生发展过程。异丙酚抑制炎性细胞因子的表达,减轻了脑缺血再灌注损伤,其作用机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Jean WC, Spellman SR, Nussbaum E S, et al. Reperfusion injury after focal cerebral ischemia: the role of inflammation and the therapeutic horizon[J]. Neurosurgery, 1998; 43: 1382-1396.

[2] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy inrats[J]. Stroke, 1989; 20(1): 84-91.

[3] Mukaide N, Matsumoto T, Yoloi, et al. Inhibition of neutrophil mediated acute inflammation injury by and antibody against interleukin-8 (IL-8)[J]. Inflammation Res, 1998; 47 (S3) 3: S151-157.

(下转第 663 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

与同期未快速复发组相比，快速复发组口腔癌患者的发病部位，生长方式，TNM 分期及病理类型上并无区别，另外，口腔癌发生的不同部位，其术后快速复发率基本接近，这与有关报道并不一致，但不能轻易否认它的临床意义。临床上，无论舌癌、颊癌还是牙龈癌，在术后的快速复发上可能是一样的，必须引起高度重视。从手术方式和术后淋巴结转移来看，两组差别有显著性，非连续性的颈淋巴结清扫术并不能很好控制原发灶，原发灶的复发都是在切口深在的位置，多与颈部切口相连，手术并未达到"三维整块切除"的目的，这可能是因为在颈部与原发灶之间还残存有已被破坏了的淋巴转移通道，一些隐匿或跳跃的癌细胞被种植的缘故。所以三维边界的病理检查阴性至关重要，同时强调原发灶、颌骨与颈淋巴清扫必须连续，整块切除标本。另外，王治平[6]报告，淋巴结转移被视为单一的重要的预后指标，是临床上对预后影响最大的因素；从统计结果看，无论原发灶的大小如何，只要术后颈淋巴结病理检查有转移，特别是多个淋巴结转移，临床上要高度怀疑其术后快速复发的可能性。

所以，我们认为，年轻患者(40 岁左右)，手术方式和颈淋巴结是否转移是口腔癌术后快速复发的临床危险因素。应该强调首次手术治疗的正确性和彻底性，特别是对于年轻患者，强调功能外科，更应该重视手术的完全彻底，决不姑息侥幸。术后淋巴结转移应该被视为放射治疗的指征，目的是为了巩固原发灶和颈部手术治疗的效果。必须加强术后一年内的随访，以便及时发现问题，早期处理。

参 考 文 献

[1] Loree TR, Mullms AD, Spellman J, et al. Head and Neck mucosal melanoma: a 32—year review[J]. Ear Nose Throat J, 1999;78(5):372.

[2] 关晓蜂，李瑞武，王玉新，等. 44 例口腔鳞癌年轻患者的临床分析[J]. 上海口腔医学，1996;5(4):189－191.

[3] 孙明磊，王昌美，温玉明，等. 舌癌颈淋巴清扫术不同术式的疗效[J]. 临床口腔医学杂志，2002;18(1):22－23.

[4] 廖贵清，黄洪章，曾融生，等. 口腔颌面部恶性肿瘤术后近期复发的临床分析[J]. 中国肿瘤临床与康复，2002;9(5):84－86.

[5] Regine WF, Valentino J, Sloar DA, et al. Postoperative radiation therapy for primary and recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck: Results of comparative analysis[J]. Head Neck, 1999;21(6):554.

[6] 王治平. 口腔癌复发的临床危险因素[J]. 国外医学口腔医学分册，2002;29(5):306－307.

(上接 624 页)

[4] Mc Carron RM, Wang L, Racke Mk, et al. Cytokine regulated adhesion between encephali to gentic T lymphocytes and cerebral vosular endothelial cells[J]. J Nuroimmuunol, 1993;43:23－30.

[5] Taniguchi T, Yamamoto K, Ohomto N, et al. Effects of propofol on hemodynamic and inflammatory responses to endotoxemia in rats[J]. Crit Care Med, 2000;28(4):1101－1106.

[6] Taniguchi－Takaumi, Kankura－Hiroko, Yamato－ken. Effects of posttreatment with propofol on morality and cytokine responses to endotoxin－induced shock in rat[J]. Crit Care Med, 2002;30(4):904－907.

[7] Takano M, Yogosawa T, Okawa－Takatsuji M, et al. Effects intravenous anesthetics on interleukin－6(IL－6), IL－10 production by lipopolysaccharide－stimulated mononuclear cell from healthy volunteers[J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2002;46:176－179.

[8] Gally HF, Dubbels AM, Webster NR, et al. The effect of midazolam and propofol on interleukin－8 from human polymorphonuclear leukocytes[J]. Anesth Analg, 1998;86(6):1289－1293.