

脂氧素 A4 在体外循环期间的变化和相关性分析

魏利娟 马亚飞 郭仲辉 陈小莉

摘要 目的 探讨心脏瓣膜置换术体外循环期间脂氧素 A4(LXA4)的变化及其与肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、IL-10 和中性粒细胞(PMN)的相关性。**方法** 选择拟行心脏瓣膜置换术的患者 30 例,其中,男性 13 例,女性 17 例,年龄 38~72 岁,ASA II~III 级,分别于麻醉诱导前(T_1)、体外循环(CPB)30min(T_2)、CPB 停机时(T_3)、停机后 3h(T_4)、6h(T_5)、24h(T_6)时测定全血中性粒细胞计数以及血清中 TNF- α 、IL-6、IL-10 和 LXA4 的浓度。**结果** 与 T_1 时比较,LXA4、IL-10、TNF- α 、IL-6、PMN 水平在各时间点均明显升高($P<0.05$);LXA4 于 T_3 时达到高峰后逐渐下降,于 T_6 时再次升高($P<0.05$);IL-10 在 T_3 时达到高峰,之后逐渐下降($P<0.05$);TNF- α 浓度和 PMN 计数于 T_4 时达到高峰后逐渐下降,于 T_6 时再次升高($P<0.05$);IL-6 于 T_5 时达到高峰后逐渐下降($P<0.05$);Spearman 相关分析血清 LXA4 水平与 IL-10、TNF- α 和 PMN 计数之间呈相关性($P<0.05$)。**结论** CPB 可触发心脏瓣膜置换患者全身炎症反应,表现为中性粒细胞和促炎细胞因子(TNF- α 、IL-6)水平升高,同时抗炎细胞因子 IL-10 和促炎症消退介质 LXA4 更早被激活,以促进全身炎症反应的消退。

关键词 脂氧素 瓣膜置换术 体外循环 全身炎症反应综合征 围术期

中图分类号 R614

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.08.019

Dynamic Changes and Correlation of LXA 4 in Patients Undergoing Cardiac Valve Replacement During Cardiopulmonary Bypass. Wei Lijuan, Ma Yafei, Guo Zhonghui, et al. The First Affiliated Hospital and College of Clinical Medicine of Henan University of Science and Technology, Henan 471003, China

Abstract Objective To investigate the dynamic changes of lipoxin A 4(LXA 4) and its correlation with tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6(IL-6), IL-10 and polymorph nuclear cell(PMN) during cardiopulmonary bypass(CPB) in patients undergoing cardiac valve replacement. **Methods** Thirty patients with heart valve disease who underwent cardiac valve replacement, 13 males and 17 females, aged 38 to 72 years, ASA II-III, were selected. The serum levels of TNF- α , IL-6, IL-10 and LXA4 were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method, and the amount of neutrophils was also measured. Serial blood samples were collected at the following intervals respectively: before anesthesia induction(T_1), 30min after CPB(T_2) and 0h(T_3), 2h(T_4), 6h(T_5), 24h(T_6) after the end of CPB. **Results** Compared with these at T_1 , the levels of LXA4, IL-10, TNF- α , IL-6 and the amount of neutrophils increased significantly at each time point ($P<0.05$). LXA4 decreased gradually after reaching the peak at T_3 , and increased again at T_6 ($P<0.05$). IL-10 reached the peak at T_3 , and then decreased gradually ($P<0.05$). TNF- α concentration and PMN number decreased gradually after reaching the peak at T_4 and increased again at T_6 ($P<0.05$). IL-6 decreased gradually after reaching the peak at T_5 ($P<0.05$). Serum LXA4 level was correlated with IL-10, TNF- α and PMN number by Spearman correlation analysis ($P<0.05$). **Conclusion** Cardiopulmonary bypass can lead to systemic inflammatory response in patients with heart valve replacement, which is characterized by an increase in the level of polymorph nuclear cells and proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-6), and the activation of anti-inflammatory cytokines IL-10 and proinflammatory mediators LXA4 earlier to promote the regression of systemic inflammatory response.

Key words Lipoxins; Valve replacement; Cardiopulmonary bypass; Systemic inflammatory response syndrome; Perioperative period

体外循环(cardiopulmonary bypass, CPB)诱发的全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response

syndrome, SIRS)与心脏手术后心脏、肺、肾脏等重要脏器功能不全密切相关,甚至可导致多器官功能障碍或死亡^[1]。炎症反应的发生、发展和消退过程与多种细胞介质相关,除了有肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)、IL-6、IL-8 等促炎细胞因子和 IL-4、IL-5、IL-10、IL-13 等抗炎细胞因子参与外,还有一些特殊的促炎症消退介质,如脂氧素(li-

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(201602167);河南省科技计划项目(172102310686)

作者单位:471000 郑州,河南科技大学临床医学院、河南科技大学第一附属医院

通讯作者:魏利娟,副主任医师,电子信箱:weilj66366@126.com

poxins, LXs)、消退素、保护素以及 maresins,也起着非常重要的作用^[2,3]。LXs 是最早发现的具有抗感染和促进炎症消退功能的内源性脂质介质,其中脂氧素 A4 (lipoxin A4, LXA4) 是最具特征的一员,被誉为启动巨噬细胞吞噬的“起始信号”以及抑制中性粒细胞 (polymorph nuclear cell, PMN) 激活的“刹车信号”^[4]。因此本研究拟通过测定心脏瓣膜置换术患者围术期不同时间点 LXA4、TNF- α 、IL-6、IL-10 和 PMN 的水平,探讨 CPB 心脏手术围术期机体在促炎、抗炎和促炎症消退 3 方面相关介质的变化规律和相关性,为早期临床调控 CPB 触发的炎症反应、减少其相关并发症以及增强围术期安全提供依据。

资料与方法

1. 一般资料:本研究经笔者医院医学伦理学委员会批准,并与患者家属签署知情同意书,选取 2017 年 9 月~2018 年 8 月于笔者医院收治的拟行心脏瓣膜置换的心脏病患者 30 例,患者年龄 38~72 岁,ASA 分级 II 或 III 级。纳入标准:①符合心脏瓣膜病诊断标准和手术指征;②无高血压、冠心病和糖尿病病史;③左心室射血分数 >35%,近 1 个月内未发生心肌梗死;④无肺、肝脏、肾脏等重要器官功能不全。排除标准:①二次心脏病手术;②肝、肾功能、凝血功能严重受损;③术前服用非甾体类抗炎药、甾体类抗炎药或免疫抑制剂等药物影响炎症反应的患者;④哺乳期或妊娠期女性以及恶性肿瘤患者。男性 13 例,女性 17 例,患者年龄 48.26 ± 10.31 岁,体重 57.85 ± 11.43 kg,ASA 分级 II 级 10 例、III 级 20 例,主动脉阻断时间 56.74 ± 26.38 min,转流时间 97.19 ± 30.62 min,主动脉瓣置换 7 例,二尖瓣置换 12 例,双瓣置换 5 例,二尖瓣置换 + 三尖瓣成形 6 例,机械通气时间 9.24 ± 2.91 min,ICU 停留时间 28.74 ± 5.57 min。

2. 麻醉与 CPB 方法:患者麻醉诱导给予咪达唑仑 0.05 mg/kg、舒芬太尼 $1 \sim 2$ μ g/kg、顺苯磺酸阿曲库铵 0.2 mg/kg 和 (或) 丙泊酚 1 mg/kg。诱导后给予气管插管机械通气,潮气量 $8 \sim 10$ ml/kg,呼吸频率 $10 \sim 14$ 次/分,维持呼气末二氧化碳分压 $35 \sim 40$ mmHg

(1 mmHg = 0.133 kPa)。术中持续静脉泵入丙泊酚 $2 \sim 5$ mg/(kg · h) 和 苯磺顺阿曲库铵 0.1 mg/(kg · h),间断静脉注射舒芬太尼注射液 0.5 μ g/kg 和吸入 $1\% \sim 2\%$ 七氟醚维持麻醉,手术过程中维持脑电双频指数值 $40 \sim 55$ 。体外循环预充液主要应用乳酸林格注射液、羟乙基淀粉、人血白蛋白。全身肝素化后,ACT > 480s 开始 CPB。CPB 管理采用浅低温非搏动性灌注,维持灌注流量在 $50 \sim 70$ ml/(kg² · min),平均动脉压 $50 \sim 80$ mmHg,血细胞比容 $23\% \sim 25\%$ 。应用 Aalst 胰岛素输注方案维持术中血糖 < 10 mmol/L,术中根据食管超声心动图调整血管活性药物和液体输注维持循环稳定^[5]。

3. 检测指标:分别于麻醉诱导前 (T_1)、CPB 30min (T_2)、CPB 停机时 (T_3)、停机后 3h (T_4)、6h (T_5)、24h (T_6) 时用全血测定中性粒细胞计数,同时抽血离心取血清应用 ELISA 法测定血清中 TNF- α 、IL-6、IL-10 和 LXA4 的浓度。测定值按校正 = 实测值 $\times$ 诱导前 HCT 值/采样时 HCT 测得值进行校正。TNF- α 、IL-6 和 IL-10 检测试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司, LXA4 检测试剂盒购自美国 RD 公司。

4. 统计学方法:采用 SPSS 20.0 统计学软件对数据进行统计分析。正态分布计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,不同时相间比较采用单因素方差分析,用 Spearman 相关分析法进行相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. CPB 不同时间点 LXA4、IL-10、TNF- α 、IL-6、PMN 的变化情况:与 T_1 时比较, LXA4、IL-10、TNF- α 、IL-6、PMN 水平在各时间点均明显升高 ($P < 0.05$),促炎症消退介质 LXA4 于 T_3 时达到高峰后逐渐下降,于 T_6 时再次升高 ($P < 0.05$);抗炎细胞因子 IL-10 在 T_3 时达到高峰,之后逐渐下降 ($P < 0.05$);促炎细胞因子 TNF- α 浓度和 PMN 计数于 T_4 时达到高峰后逐渐下降,于 T_6 时再次升高 ($P < 0.05$);IL-6 于 T_5 时达到高峰后逐渐下降 ($P < 0.05$),详见表 1。

表 1 不同时点 LXA4、IL-10、TNF- α 、IL-6、PMN 的变化情况 ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

指标	T_1	T_2	T_3	T_4	T_5	T_6
LXA4 (ng/L)	0.86 ± 0.65	$1.51 \pm 1.27^*$	$2.64 \pm 1.83^*$	$1.92 \pm 1.36^*$	$1.55 \pm 1.31^*$	$1.73 \pm 1.35^*$
IL-10 (ng/L)	58.61 ± 11.43	$317.53 \pm 25.37^*$	$568.14 \pm 30.68^*$	$474.83 \pm 26.92^*$	$263.51 \pm 22.66^*$	$102.74 \pm 18.72^*$
TNF- α (ng/L)	5.23 ± 2.75	$26.45 \pm 8.53^*$	$30.94 \pm 10.36^*$	$41.53 \pm 9.67^*$	$29.26 \pm 8.85^*$	$33.52 \pm 9.41^*$
IL-6 (ng/L)	18.65 ± 6.42	$31.27 \pm 11.63^*$	$44.78 \pm 12.19^*$	$103.59 \pm 24.73^*$	$157.35 \pm 31.84^*$	$93.64 \pm 21.27^*$
PMN ($\times 10^9$ /L)	3.93 ± 1.54	$6.26 \pm 2.72^*$	$8.35 \pm 4.55^*$	$11.17 \pm 4.76^*$	$9.45 \pm 3.29^*$	$12.53 \pm 3.68^*$

与 T_1 比较, * $P < 0.05$

2. 围术期 LXA4 与 IL - 10、TNF - α 、IL - 6 和 PMN 之间的相关性分析: *Spearman* 相关分析显示, 血清 LXA4 水平与 IL - 10、TNF - α 和 PMN 计数之间呈相关性($P < 0.05$), 而血清 LXA4 水平与 IL - 6 水平之间无明显相关性($P > 0.05$), 详见表 2。

表 2 围术期 LXA4 与其他指标之间的相关性($n = 30$)

指标	IL - 10	TNF - α	IL - 6	PMN
r	0.356	0.413	0.182	0.501
P	0.038	0.015	0.253	0.009

讨 论

CPB 早期由于血液与非内皮表面接触, 激活内皮细胞、中性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞和血小板等细胞防御系统, 导致补体、凝血和纤溶系统异常; 晚期由缺血再灌注损伤、内毒素血症、凝血障碍和肝素/鱼精蛋白反应等因素导致中性粒细胞 - 内皮细胞相互作用和过度激活, 活性氧、花生四烯酸代谢产物和炎症细胞因子大量释放, 二者共同加重 CPB 后 SIRS 的发生^[6,7]。中性粒细胞数的激活程度和 TNF - α 、IL - 6、IL - 8 等促炎细胞因子水平的高低与 CPB 后 SIRS 的严重程度密切相关, 大量促炎细胞因子的释放和 PMN 的聚集可抑制心肌收缩力, 降低周围阻力, 加重肺水肿, 造成 CPB 术后心肺功能不全^[8,9]。

IL - 10 作为一种抗炎细胞因子, 可作用 NF - κ B 细胞内信号转导途径抑制 TNF - α 、IL - 6 等促炎细胞因子的合成, 发挥其抗炎作用^[10]。本研究结果显示, 促炎细胞因子 TNF - α 浓度和 PMN 计数于 CPB 结束后 3h 时达到高峰后逐渐下降, 于 CPB 结束后 24h 再次升高; IL - 6 于 CPB 结束后 6h 时达到高峰后逐渐下降, 且各时间点均明显高于术前水平, 抗炎细胞因子 IL - 10 在 CPB 结束时达到高峰, 之后逐渐下降, 且 CPB 结束后 24h 仍高于术前水平, 表明 CPB 术后导致 PMN 的过度激活, 且早期炎症反应期 PMN 的浸润与促炎细胞因子的出现几乎相一致, 提示 CPB 后诱发 SIRS 的存在, 同时机体不断促进抗炎细胞因子的释放, 以应对过度炎症反应的发生, 避免机体促炎/抗炎水平的失衡。

适度的炎症反应是机体抵抗有害刺激的适应反应, 可促进炎症消退和组织的修复, 使机体内环境回归稳态, 这种效应依赖于机体内源性抗炎和促炎消退介质的调节作用^[11]。LXA4 是花生四烯酸通过脂氧合酶途径产生的代谢产物, 其可通过作用蛋白激酶

C、酪氨酸激酶信号转导及转录激活蛋白信号通路、磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B、丝裂原活化蛋白激酶、核转录因子等多种炎症信号通路抑制炎症因子的释放和功能, 抑制 PMN 的激活、聚集和浸润, 促进 PMN 凋亡和清除, 增强巨噬细胞活性, 促进巨噬细胞吞噬凋亡的 PMN 和微生物颗粒, 且可作用于淋巴细胞、自然杀伤性细胞发挥免疫调节作用, 另外还可通过抑制氧化应激、抗细胞凋亡、上调血红素加氧酶 - 1 等作用减轻心肌缺血再灌注损伤^[12-14]。

本研究结果显示, LXA4 水平在 CPB 后明显升高, 在 CPB 结束时达到高峰后持续降低, 但 CPB 后 24h 再次升高。而在急性心肌梗死数小时和行腹主动脉瘤手术中开放腹主动脉 5min 后也可见 LXA4 迅速增高, 之后降低, 24h 后再次升高^[15,16]。这可能由于 CPB 术后缺血再灌注、补体激活、内毒素释放等多种因素促使 CPB 结束时机体生成 LXA4 水平急剧增加, 以对抗 CPB 术后 SIRS 的发生, 而 CPB 过程脂质过氧化水平增加, 花生四烯酸代谢产物前列腺素类、白三烯类和血栓素类的生成失衡, 均可导致合成 LXA4 的前体脂肪酸减少, 致使 LXA4 水平在 CPB 结束后持续降低, 之后随着机体功能的恢复, LXA4 水平再次增加以促进炎症消退。

SIRS 是多种体液炎症介质和细胞炎症介质与效应细胞间相互作用而形成的极其复杂的反应过程^[17]。研究表明, 多种细胞因子(TNF - α 、IL - 1 β 、IL - 3、IL - 4 等) 刺激可促进脂氧合酶的表达与活性, 增加 LXA4 的生成^[18]。而 LXA4 可与吞噬细胞表面的脂氧素受体结合, 通过调节多种炎症信号通路, 改变细胞结构, 诱导巨噬细胞由 M1 型向 M2 型转化, 其中 M1 型巨噬细胞可分泌促炎细胞因子(IL - 6、TNF - α 等), 加重炎症反应, 而 M2 型可释放抗炎细胞因子(IL - 4、IL - 10 等)^[19]。另外 LXA4 可增强巨噬细胞的吞噬中性粒细胞的能力, 并抑制巨噬细胞自身的凋亡, 从而发挥抗炎和吞噬作用, 促进炎症消退^[20]。本研究显示, 围体外循环期间患者血清 LXA4 水平与 IL - 10、TNF - α 和 PMN 计数之间密切相关, 且 LXA4 和 IL - 10 更早达到高峰, 表明应激反应发生后, 机体迅速增强抗炎和促消退介质的生成, 以抑制 CPB 造成的过度炎症反应。

综上所述, CPB 可触发心脏瓣膜置换患者全身炎症反应, 表现为中性粒细胞和促炎细胞因子(TNF - α 、IL - 6)水平升高, 同时抗炎细胞因子 IL - 10 和促炎症消退介质 LXA4 更早被激活, 以促进全身炎症反

应的消退。由于未检测生成 LXA4 的前体脂肪酸和其他促炎症消退介质的变化,因此有待于进一步分析 CPB 对促炎症消退系统的影响。

参考文献

- 1 Sugita J, Fujii K. Systemic inflammatory stress response during cardiac surgery[J]. *Int Heart J*, 2018, 59(3):457-459
- 2 Chiang N, Serhan CN. Structural elucidation and physiologic functions of specialized pro-resolving mediators and their receptors[J]. *Mol Aspects Med*, 2017, 58: 114-129
- 3 欧唯为,肖继,陈泉,等. 特异性促炎症消退介质在炎症调控中的研究进展[J]. *临床与病理杂志*, 2016, 36(11):1873-1877
- 4 Chandrasekharan JA, SharmaWalia N. Lipoxins: nature's way to resolve inflammation[J]. *J Inflamm Res*, 2015, 30(8):181-92
- 5 Ogiso K, Koriyama N, Obo T, *et al.* Performance of a 2-step insulin infusion protocol with adjustment of insulin doses for Asians in the medical intensive care unit following cardiothoracic surgery[J]. *Diabetol Int*, 2018, 10(1): 12-23
- 6 Bronicki RA, Hall M. Cardiopulmonary bypass-induced inflammatory response: pathophysiology and treatment[J]. *Pediatr Crit Care Med*, 2016, 17(Suppl 1):S272-S278
- 7 Giacinto O, Satriano U, Nenna A, *et al.* Inflammatory response and endothelial dysfunction following cardiopulmonary bypass: pathophysiology and pharmacological targets[J]. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, 2019, 13(2):158-173
- 8 李巍巍,张加强,孟凡民. 婴幼儿体外循环手术围术期血浆炎症因子动态变化及相互关系[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2017, 31(6):577-579
- 9 Evora PR, Bonura C, ArcSncio L, *et al.* Key points for curbing cardiopulmonary bypass inflammation[J]. *Acta Cir Bras*, 2016, 31(1): 45-52
- 10 吴媛,王小闯,王利,等. 基于单中心的早期 CRRT 治疗在严重腹腔

感染中的前瞻对照研究[J]. *医学研究杂志*, 2019, 48(10):48-52

- 11 Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology[J]. *Nature*, 2014, 510(7503):92-101
- 12 Buckley C, Gilroy D, Serhan C. Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation[J]. *Immunity*, 2014, 40(3):315-327
- 13 周游,蒋兴亮. 脂氧素调控炎症信号通路的研究进展[J]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2015, (6):989-993
- 14 John P, Bäck M. Lipoxin and resolvin receptors transducing the resolution of inflammation in cardiovascular disease[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9:1273
- 15 Pillai PS, Leeson S, Porter TF, *et al.* Chemical mediators of inflammation and resolution in post-operative abdominal aortic aneurysm patients[J]. *Inflammation*, 2011, 35(1):98-113
- 16 Fosshaug LE, Colas RA, Anstensrud AK, *et al.* Early increase of specialized pro-resolving lipid mediators in patients with ST-elevation myocardial infarction[J]. *E Bio Medicine*, 2019, 46:264-273
- 17 Boehne M, Sasse M, Karch A, *et al.* Systemic inflammatory response syndrome after pediatric congenital heart surgery: incidence, risk factors, and clinical outcome[J]. *J Card Surg*, 2017, 32(2):116-125
- 18 Basil MC, Levy BD. Specialized pro-resolving mediators: endogenous regulators of infection and inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16(1):51-67
- 19 刘敏,宋丽敏,吴艳,等. 脂氧素促进细胞吞噬作用机制的研究进展[J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2019, 40(7):694-698
- 20 Undurti ND. Arachidonic acid and other unsaturated fatty acids and some of their metabolites function as endogenous antimicrobial molecules: a review[J]. *J Adv Res*, 2018, 11: 57-66

(收稿日期:2020-02-28)

(修回日期:2020-03-31)

RNAi 沉默 HPC2 对鼻咽癌细胞迁移侵袭的影响及分子机制

吴梅 丁伟 唐亮

摘要 **目的** 探讨 HPC2 在鼻咽细胞迁移侵袭中的作用及机制。**方法** 选取鼻咽癌 5-8F 细胞,采用小 RNA 干扰技术沉默 HPC2 的表达后,分 3 组进行功能实验,即 Scrambled 阴性对照组、#1 siRNA-HPC2 组和 #2 siRNA-HPC2 组,运用划痕实验比较细胞迁移愈合速率,Transwell 检测比较各组细胞侵袭能力,Western blot 法检测 EMT 通路关键分子的变化。**结果** 与对照组比较, HPC2 沉默组的细胞迁移愈合速率及侵袭能力降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。从机制研究上发现, HPC2 沉默后, Snail 下调, MMP9 下调。**结论** 沉默 HPC2 表达能降低鼻咽癌细胞的迁移和侵袭能力,机制上可能通过 HPC2/snail/MMP9 轴发挥作用。

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2017D01C093)

作者单位:830001 乌鲁木齐,新疆维吾尔自治区人民医院耳鼻喉中心

通讯作者:吴梅,电子信箱:wxjrmh@163.com