

芬太尼对人外周血 NF- κ B 活性的影响

饶 艳¹, 王焱林^{1*}, 李建国¹, 段军民²

(1. 武汉大学中南医院麻醉科, 湖北 武汉 430071; 2. 武汉癫痫病医院, 湖北 武汉 430035)

摘要: **目的** 验证芬太尼是否影响免疫炎症反应中的某些因素,如同吗啡。**方法** 外周血取自7个正常志愿者,实验分为正常对照组、芬太尼(20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)组、模型组(脂多糖, LPS组)和治疗组(芬太尼20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +LPS、芬太尼2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +LPS)。用流式细胞术检测人外周血中性粒细胞和单核细胞中核因子(NF- κ B)活性,用ELISA检测血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白介素-6(IL-6)含量。**结果** 芬太尼组NF- κ B活性及TNF- α 和IL-6含量与正常对照组比较,均无明显差异($P > 0.05$)。治疗组(芬太尼20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +LPS、芬太尼2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +LPS)中NF- κ B的活性分别为81.9%, 76.1%(中性粒细胞)和78.6%, 72.6%(单核细胞),明显低于模型组88.9%和85.1%($P < 0.01$)。TNF- α 含量在治疗组(芬太尼20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +LPS、芬太尼2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +LPS)为459和357 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$, IL-6为796和720 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$,两者均低于模型组(其中TNF- α 为1226 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$, IL-6为1563 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)($P < 0.01$)。**结论** 芬太尼对NF- κ B的活性及TNF- α 和IL-6的含量无影响,但可抑制LPS诱导的NF- κ B的活性及TNF- α 和IL-6的含量,且高剂量芬太尼的抑制作用大于低剂量芬太尼的作用。

关键词: 芬太尼; 核因子- κ B; 肿瘤坏死因子; 白介素-6

中图分类号: R971.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2003)03-0192-04

芬太尼(fentanyl)和吗啡(morphine)是临床上常用的两种阿片类镇痛药。近来研究发现,吗啡可作

为免疫调节剂,影响免疫系统和炎症反应。许多报道显示,吗啡可通过影响NF- κ B(nuclear factor-kappa B)的活性来影响细胞因子的表达^[1~3]。另外芬太尼也可影响细胞因子的表达,如芬太尼可抑制大鼠在脑缺血再灌注过程中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白介素-1 β (IL-1 β)表达^[4]。Yoshida等^[5]观察到,在行食管部分切除术中,芬太尼可减少患者血浆IL-6水平。

NF- κ B作为一种重要的核转录因子,参与调控的免疫因子包括一系列细胞因子和粘附因子等,在炎症反应中起重要的中介作用。考虑到芬太尼是一种类似于吗啡的阿片类镇痛药,并结合NF- κ B活性特点及吗啡的免疫调节效应,因此推断芬太尼也可能通过影响NF- κ B的活性而发挥其作用。本研究以人外周血中性粒细胞和单核细胞作为研究对象,用脂多糖(LPS)诱导炎症反应,采用流式细胞术测定NF- κ B的活性,以及ELISA检测TNF- α 和IL-6含量,拟探讨芬太尼对NF- κ B活性和TNF- α , IL-6含量的影响。

1 材料与方法

1.1 药品和试剂

芬太尼(辽卫药准字,001834)由武汉大学中南医院提供,NF- κ B单克隆小鼠抗人抗体P65和FITC标记的山羊抗小鼠抗体购自Santa Cruz公司,LPS(*E. coli* 0111: B₄)购自Sigma公司,PharMLyseTM、人TNF- α 和IL-6 ELISA试剂盒均购自美国Genzyme公司。

1.2 细胞的培养与活化

外周血取自7个正常志愿者,年龄为(25 \pm 5)岁,均无近期感染史、过敏史及使用免疫抑制剂史。本实验利用LPS诱导炎症反应,观察芬太尼在临床用药浓度(1~30 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)^[6]、大剂量时对NF- κ B活性及TNF- α , IL-6表达的影响。试验前将全血分为六组:正常对照组、芬太尼对照组、模型组(LPS组)和治疗组。每组取血100 μL ,治疗组先加入LPS 100 μL ,在37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min,再加入不同浓度(20

收稿日期: 2002-11-06 接受日期: 2003-01-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30170906)

作者简介: 饶 艳(1974-),女,硕士(在读),湖北武汉人,主要从事麻醉药对核因子和细胞因子影响的研究。

* 联系作者 E-mail: chang512@public.wh.hb.cn Tel: (027)87317776

$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 芬太尼, 37°C 孵育 6 h。模型组以磷酸盐缓冲液(PBS)代替芬太尼, 芬太尼组以 PBS 代替 LPS。各组均离心 $200\times g$, 10 min。上清液收集在 EP 管中, 储藏在 -70°C 待用。血细胞中加入 PharMLyse™ 2 mL, 避光 15 min 以溶解红细胞, 然后用 70% 乙醇固定待用。

1.3 流式细胞仪检测前细胞的准备^[7]

按 Foulds^[7] 等方法进行, 稍有更改, 具体如下: 细胞用 PBS 洗后, 加入 0.05% Triton-X100, 重悬于 5 mL 柠檬酸缓冲液中, 离心 $300\times g$, 5 min, 弃上清。加入 1:100 (体积比) 稀释的 NF- κ B P65 单克隆小鼠抗人抗体 $50\ \mu\text{L}$, 混匀, 置于 4°C , 45 min。PBS 洗 3 次, 加入 1:100 稀释的 FITC-山羊抗小鼠多抗 $50\ \mu\text{L}$, 混匀, 4°C , 45 min。PBS 洗 3 次, 上机检测。

1.4 NF- κ B 活性的检测^[7]

流式细胞仪的荧光检测器通过检测 FITC 发出的绿色荧光($\lambda = 530\text{ nm}$)来反映 NF- κ B 的活性, 其值以 NF- κ B 的表达率(%)来表示。前向散射光/垂直散射光(FSC/SSC)可确定白细胞亚群, 区分中性粒细胞和单核细胞。

1.5 肿瘤坏死因子- α 和白介素-6 浓度的检测

用人 TNF- α 和 IL-6 ELISA 试剂盒检测。这些试剂盒的板内、板间变异系数均 $< 9.6\%$, 可检测人 TNF- α 和 IL-6 的最小值分别为 10 和 $15\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.6 统计学处理

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 10.0 统计软件进行处理。组间比较用单因素方差分析并用 q 检验进行两两比较。

2 结果

2.1 芬太尼对 NF- κ B 活性的影响

不同浓度的芬太尼($20\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)来检测对 NF- κ B 活性的影响, 结果显示, 正常对照组和芬太尼组 NF- κ B 活性较低, 且两组差异无显著性。治疗组(芬太尼 $20\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ + LPS、芬太尼 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + LPS)中 NF- κ B 的活性分别为 81.9%, 76.1% (中性粒细胞)和 78.6%, 72.6% (单核细胞)。明显低于模型组(88.9%和 85.1%) ($P < 0.01$, 表 1)。

2.2 芬太尼对肿瘤坏死因子- α 和白介素-6 含量的影响

各组 TNF- α 和 IL-6 的变化趋势与 NF- κ B 活性变化趋势相似(表 2)。

Tab 1. Effect of fentanyl on nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation in human neutrophils and monocytes

Group	Concentration $/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	NF- κ B/%	
		Neutrophil	Monocyte
Control	0	4.0 ± 2.2	2.9 ± 1.3
Fentanyl + PBS	20	4.0 ± 0.8	3.1 ± 0.9
	2000	3.8 ± 0.7	2.8 ± 1.0
LPS + PBS	100	88.9 ± 2.0	85.1 ± 2.3
LPS + fentanyl	20	$81.9 \pm 2.9^{**}$	$78.6 \pm 2.6^{**}$
	2000	$76.1 \pm 2.9^{**}$	$72.6 \pm 2.0^{**}$

PBS: phosphate-buffered saline. Lipodysaccharides (LPS) was added 30 min before fentanyl 20 or $2000\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ in treatment groups, then incubated for 6 h. $\bar{x} \pm s$, $n = 7$. $^{**} P < 0.01$, compared with LPS + PBS group.

Tab 2. Effect of fentanyl on the plasma TNF- α and IL-6 production in human whole blood

Group	Concentration $/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	TNF- α	IL-6
		$/\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	$/\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$
Control	0	279 ± 72	444 ± 230
Fentanyl + PBS	20	230 ± 76	424 ± 242
	2000	223 ± 62	396 ± 236
LPS + PBS	100	1226 ± 177	1563 ± 630
LPS + fentanyl	20	$459 \pm 158^{**}$	$796 \pm 158^{**}$
	2000	$357 \pm 48^{**}$	$720 \pm 177^{**}$

Treatments were the same as described in Tab 1. $\bar{x} \pm s$, $n = 7$. $^{**} P < 0.01$, compared with LPS + PBS group.

3 讨论

本实验利用不同浓度的芬太尼($20\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)来检测对 NF- κ B 活性及 TNF- α , IL-6 表达的影响, 研究显示, 芬太尼对正常状态下 NF- κ B 活性及 TNF- α , IL-6 的表达无影响, 但可抑制 LPS 诱导的 NF- κ B 的活性, 从而减少 TNF- α 和 IL-6 的产生。本实验 TNF- α 和 IL-6 的含量相差较大, 可能由于个体差异较大或样本例数较少($n = 7$)所致。在实验中可观察到, 女性的细胞因子水平明显低于男性。本结论与 Oh^[4]和 Yoshida 等^[5]的研究相一致。但也有人认为, 芬太尼对 NF- κ B 的活性和细胞因子的表达无影响。如 Larsen 等^[8]认为, 芬太尼对正常状态 LPS 诱导的 TNF, IL-1 β 和 IL-10 均无影响; Loop 等^[9]认为, 芬太尼不影响 Jurkat 细胞和 CD3⁺ 淋巴细胞 NF- κ B 的活性。这可能与研究的细胞种类及 LPS 和

芬太尼浓度不同有关。

炎症是机体对各种损伤所发生的、以防御反应为主的病理反应,这些反应包括血管、细胞、间质和神经-体液等的变化。麻醉药可直接作用于炎性细胞(如影响自然杀伤细胞、单核-巨噬细胞、粒细胞的数目或功能),也可以通过影响炎性介质(包括细胞因子)而起到促进或抑制炎性作用。其中细胞因子在麻醉药物的免疫、炎症反应中所处的地位日益受到重视。芬太尼是一种临床常用的阿片类镇痛药,广泛用于临床麻醉、术后及癌症病人的镇痛。TNF- α 和IL-6是两种重要的促炎性细胞因子,主要由单核-巨噬细胞和中性粒细胞产生,对免疫、代谢和炎症具有重要的调节和介导作用。而NF- κ B作为一种重要的核转录因子,在调节免疫、炎症反应中起重要作用。一般情况下,NF- κ B与其抑制蛋白I κ B结合并存在于胞浆中,在外界信号(如致炎因子等)刺激下,I κ B发生磷酸化而降解,释放出游离的NF- κ B并转移到核内,激活基因表达^[10]。有研究表明,在LPS刺激后,NF- κ B被活化而发生核易位,启动TNF- α 表达。而释放的TNF- α 与LPS可进一步共同激活效应细胞(包括单核-巨噬细胞、中性粒细胞等)NF- κ B活化而分泌IL-6等其他细胞因子^[11]。由于免疫炎症细胞中NF- κ B的活性的升高对于进一步分泌炎性细胞因子起决定意义。而芬太尼可抑制炎症细胞内NF- κ B活性,从而进一步抑制一系列的细胞因子表达,进而抑制整个机体的炎症免疫反应。因此,芬太尼降低炎症免疫细胞中NF- κ B的活性作用可能是其免疫抑制效应的分子机制之一。

4 参考文献:

- [1] Sueoka E, Sueoka N, Kai Y, Okabe S, Suganuma M, Kanematsu K, *et al.* Anticancer activity of morphine and its synthetic derivative, KT-90, mediated through apoptosis and inhibition of NF- κ B activation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **252**(3):566 - 570.
- [2] Welters ID, Menzebach A, Goumon Y, Cadet P, Menges T, Hughes TK, *et al.* Morphine inhibits NF- κ B nuclear binding in human neutrophils and monocytes by a nitric oxide-dependent mechanism[J]. *Anesthesiology*, 2000, **92**(6):1677 - 1684.
- [3] Roy S, Cain KJ, Chapin RB, Charboneau RG, Barke RA. Morphine modulates NF-kappaB activation in macrophages [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **245**(2):392 - 396.
- [4] Oh WS. Effect of fentanyl on TNF-alpha and IL-1beta levels during global ischemia/reperfusion in rats[J]. *Int J Tissue React*, 2002, **24**(1):11 - 21.
- [5] Yoshida S, Noake T, Tanaka Y, Ishibashi N, Shirouzu Y, Shirouzu K, *et al.* Effect of fentanyl citrate anesthesia on protein turnover in patients with esophagectomy[J]. *J Surg Res*, 1996, **64**(2):120 - 127.
- [6] Sheng ZR. *Practical Clinical Anesthesiology*(实用临床麻醉学)[M]. Shenyang: Liaoning Science and Technology Publishing House, 1987. 92 - 96.
- [7] Foulds S. Novel flow cytometric method for quantifying nuclear binding of the transcription factor nuclear factor kappa B in unseparated human monocytes and polymorphonuclear cells[J]. *Cytometry*, 1997, **29**(2):182 - 186.
- [8] Larsen B, Hoff G, Wilhelm W, Buchinger H, Wanner GA, Bauer M. Effect of intravenous anesthetics on spontaneous and endotoxin-stimulated cytokine response in cultured human whole blood [J]. *Anesthesiology*, 1998, **89**(5):1218 - 1227.
- [9] Loop T, Liu Z, Humar M, Hoetzel A, Benzing A, Pahl HL, *et al.* Thiopental inhibits the activation of nuclear factor kappaB [J]. *Anesthesiology*, 2002, **96**(5):1202 - 1213.
- [10] Welters ID, Fimiani C, Bifinger TV, Stefano GB. NF-kappaB, nitric oxide and opiate signaling[J]. *Med Hypotheses*, 2000, **54**(2):263 - 268.
- [11] Kawasaki T, Ogata M, Kawasaki C, Ogata J, Inoue Y, Shigematsu A. Ketamine suppresses proinflammatory cytokine production in human whole blood *in vitro*[J]. *Anesth Analg*, 1999, **89**(3):665 - 669.

Effects of fentanyl on activation nuclear factor-kappaB in human whole blood

RAO Yan¹, WANG Yan-Lin¹, LI Jian-Guo¹, DUAN Jun-Min²

(1. Department of Anesthesiology, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China;

2. Wuhan Epilepsy Hospital, Wuhan 430035, China)

Abstract: **AIM** To clarify if fentanyl affects some factors in immunity and inflammation as morphine did. **METHODS** Blood samples were collected from 7 healthy volunteers. Each was divided into 6 parts: normal control, fentanyl ($20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ or $2 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) control, lipopolysaccharide (LPS) alone and fentanyl $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ or $2 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + LPS. The nuclear factor-kappaB (NF- κ B) activation in human neutrophils and monocytes was examined by flow cytometric analysis, the plasma tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) concentrations were measured using ELISA. **RESULTS** The low NF- κ B activation (2.8% - 4.0%) and TNF- α and IL-6 production was no significant difference in normal control and fentanyl control ($P > 0.05$). The NF- κ B activation in treatment groups (fentanyl $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ + LPS, fentanyl $2 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + LPS) were

81.9% and 76.1% in neutrophils and 78.6% and 72.6% in monocytes, respectively, which were less than those in LPS alone group (88.9% and 85.1%, $P < 0.01$). TNF- α production in treatment groups (fentanyl $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ + LPS, fentanyl $2 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + LPS) and LPS group were 459, 357 and $1226 \text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$, IL-6 were 796, 720 and $1563 \text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. The differences were significant between treatment groups and LPS one ($P < 0.01$). **CONCLUSION** Fentanyl alone has no effect on NF- κ B activation and TNF- α and IL-6 production, but attenuates LPS-induced NF- κ B activation and TNF- α and IL-6 production.

Key words: fentanyl; nuclear factor-kappaB; tumor necrosis factors; interleukin-6

(本文编辑 乔虹)