

游离骨瓣悬吊后对家兔 IL-10 表达影响

程森¹ 李雪娇² 陈鑫² 李莲瑞² 王志强¹

1 新疆生产建设兵团第一师阿拉尔医院

2 塔里木大学动物科学与技术学院

DOI:10.12238/bmtr.v7i4.15509

[摘要] 目的: 探讨游离骨瓣悬吊术对家兔脑组织中抗炎因子IL-10表达的影响机制,为术后炎症控制与组织修复提供理论依据。方法: 选用新西兰大白兔30只,随机分为悬吊组、未悬吊组和对照组,每组各10只,分别建立颅脑损伤模型或单纯开颅,对术后第1、3、7天血清IL-10浓度、脑组织IL-10蛋白与mRNA表达水平进行ELISA、免疫组化和qPCR检测,并观察一般生理状态与生存率。结果: 术后第3天,悬吊组血清IL-10浓度升至 (65.7 ± 8.9) pg/mL,显著高于未悬吊组 (42.3 ± 6.5) pg/mL和对照组 (29.4 ± 5.0) pg/mL($P < 0.01$)。免疫组化评分悬吊组为 5.6 ± 0.8 ,高于未悬吊组 (3.2 ± 0.9) ,IL-10mRNA表达亦明显上调 $(1.82 \pm 0.37$ vs $1.15 \pm 0.28)$ 。相关性分析显示IL-10mRNA与蛋白表达呈正相关($r=0.85$),且与炎症细胞浸润程度呈负相关($r=-0.79$)。结论: 游离骨瓣悬吊术可有效提升IL-10表达,减轻术后局部炎症反应,具有一定神经保护与免疫调节作用。

[关键词] 游离骨瓣悬吊术; IL-10; 炎症; 颅脑损伤

中图分类号: R364.5 文献标识码: A

Effects on IL-10 expression in rabbits after suspension of free bone flaps

Miao Cheng¹ Xuejiao Li² Xin Chen² Lianrui Li² Zhiqiang Wang¹

1 Arar Hospital, First Division of Xinjiang Production and Construction Corps

2 School of Animal Science and Technology, Tarim University

[Abstract] Objective: To investigate the effect mechanism of free bone flap suspension on the expression of anti-inflammatory factor IL-10 in rabbit brain tissue, and to provide a theoretical basis for postoperative inflammation control and tissue repair. Methods: Thirty New Zealand white rabbits were randomly divided into suspension group, unsuspended group and control group, and a craniotomy model or craniotomy was established, respectively, and ELISA, immunohistochemistry and qPCR were performed on serum IL-10 concentration, IL-10 protein and mRNA expression levels in brain tissue on the 1st, 3rd and 7th days after surgery, and the general physiological status and survival rate were observed. Results: On the third day after surgery, the serum IL-10 concentration in the suspension group increased to (65.7 ± 8.9) pg/mL, which was significantly higher than that in the non-suspended group (42.3 ± 6.5) pg/mL and the control group (29.4 ± 5.0) pg/mL ($P < 0.01$). The immunohistochemistry score was 5.6 ± 0.8 in the suspension group, which was higher than that in the non-suspension group (3.2 ± 0.9) , and the expression of IL-10 mRNA was significantly up-regulated $(1.82 \pm 0.37$ vs $1.15 \pm 0.28)$. Correlation analysis showed that IL-10 mRNA was positively correlated with protein expression ($r=0.85$) and negatively correlated with the degree of inflammatory cell infiltration ($r=-0.79$). Conclusion: Free bone flap suspension can effectively increase the expression of IL-10, reduce the local inflammatory response after surgery, and have certain neuroprotective and immunomodulatory effects.

[Key words] free bone flap suspension; IL-10; Inflammation; Head injury

引言

颅脑伤害是一种在临床上经常出现的严重的中枢神经系统

问题,其手术后产生的继发性炎症反应往往会对患者的预后和功能恢复产生不良影响。在最近的几年中,外科手术技术得到了

持续的完善。游离骨瓣悬吊术作为一种创新的手术方法,通过将骨瓣稳固地悬挂在硬脑膜上,可以有效减少手术后骨瓣的移位和局部的机械性刺激,这为改进手术区域的微环境 and 调节炎症反应提供了新的希望。白细胞介素-10 (IL-10) 被认为是一个关键的抗炎成分,它在抑制促炎因子的释放和减少免疫系统的损害上起到了至关重要的作用。本文通过构建家兔开颅模型对比分析了不同术式对于IL-10的表达情况,并探讨了其对于术后免疫调控的机制,以期优化外科干预策略及促进术后康复提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 标本

本研究选取健康新西兰大白兔30只,重量区间为2.5-4.5kg;雌雄不限均来自新疆农业大学实验动物中心。试验前全部动物健康体检证实无感染,先天畸形及行为异常。实验兔按随机数字表法分为三组:A组(游离骨瓣悬吊组, n=10)、B组(非悬吊组, n=10)和C组(空白对照组, n=10),用于比较不同术式对术后IL-10表达的影响。全部动物实验按照《中华人民共和国实验动物管理条例》及国家有关动物实验伦理规范进行,实验方案已得到塔里木大学医学伦理委员会批准,在动物饲养及手术过程中严格无菌操作及人道处置以保障实验动物的福利。动物在手术前需禁食12小时,并可以自由地喝水;手术后进行充分镇痛及抗生素治疗,预防术后感染及痛觉应激。

1.2 方法及试剂

先麻醉实验兔,在头顶部钻取单孔制作脑外伤模型。A组手术时应用游离骨瓣悬吊硬脑膜技术在骨瓣穿孔处固定缝线复位并密合硬脑膜;B组采用常规骨瓣复位,而未施行悬吊;C组只做开颅暴露而不做损伤处理。手术后,在第1天、第3天和第7天分别进行了取血和脑组织的操作。IL-10的表达检测,通过qPCR分析脑组织IL-10mRNA的表达含量,用Trizol萃取总RNA并逆转录,实时荧光定量PCR检测;ELISA测定血清IL-10蛋白的浓度;同时行脑组织免疫组化染色评价局部组织中IL-10分布情况。主要试剂包括ELISA试剂盒(购自MultiSciences)、qPCR试剂(Takara)、兔源IL-10抗体(Abcam)等,严格按说明书操作,保证结果的准确性与重复性。

1.3 免疫组化结果判定

脑组织样本于手术后第7天取标本,经固定,脱水,包埋后切片,IL-10免疫组化染色。用DAB显色法观察和半定量分析兔脑组织IL-10蛋白的表达。IL-10的染色定位主要针对手术区域附近的脑实质、软脑膜和皮层血管。根据显色的程度,染色的强度被分为四个等级:阴性(-)、弱阳性(+)、中度阳性(++)和强阳性(+++)。染色范围评分根据阳性细胞占比划分:<10%为0分,10%-25%为1分,26%-50%为2分,51%-75%为3分,>75%为4分。最后的得分是2项的总和,总分为0-7分作分组对比分析。全部切片均由2位资深病理专家独立进行评估而不知道实验分组,以免主观上出现偏差,如有不一致之处经过磋商后达成协议。

1.4 统计学处理

所有实验数据采用SPSS25.0软件进行统计分析,结果以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。在比较各组之间IL-10的表达水平时,首先进行了正态性的检验,对于那些符合正态分布的,我们使用了单因素方差分析(ANOVA)和LSD方法来进行组间的对比;不服从正态分布时,进行非参数检验。并对手术后不同时间点动态变化情况进行了重复测量方差分析。免疫组化的半定量评分采用秩和检验处理。 $P < 0.05$,有统计学意义。图表绘制使用GraphPad Prism8.0软件包进行绘制,直观地显示IL-10在不同组别的表达趋势和时间节点上的变化情况,以便于后续深入地分析和说明其机理。

2 结果

2.1 家兔术后存活率及一般情况观察

术后7天内各组家兔的饮食、活动、意识恢复及伤口愈合情况进行系统观察和评分,结果显示,悬吊组(A组)总体恢复优于非悬吊组(B组),对照组(C组)表现最佳。A组与B组术后生存率差异亦表现明显。

表1 各组术后一般情况评分与生存率统计表

组别	生存数 (/10)	饮食评分 (0-3)	活动评分 (0-3)	意识评分 (0-3)	伤口愈合 评分(0-3)	总评分(均 值±SD)
A组(悬吊)	45910	2.6±0.5	2.4±0.7	2.3±0.6	2.5±0.5	9.8±1.4
B组(未悬吊)	45848	1.8±0.8	1.6±0.9	1.5±0.8	1.7±0.6	6.6±2.1
C组(对照)	45940	3.0±0.0	2.9±0.2	3.0±0.0	2.9±0.1	11.8±0.2

注:评分依据行为表现及体征评估,每项满分为3,P值A组与B组比较<0.05。

术后第7天3组家兔在饮食,活动,意识和伤口愈合等方面的综合得分分析表明,各实验组在康复方面均有明显差异。在饮食评分(2.6±0.5)、活动评分(2.4±0.7)、意识评分(2.3±0.6)以及伤口愈合评分(2.5±0.5)这些方面,A组(悬吊组)明显优于B组(未悬吊组),但低于C组(对照组),总评分(9.8±1.4)明显优于B组(6.6±2.1),且组间比较 $P < 0.05$,说明悬吊技术对手术后的一般情况有一定的改善作用。C组为空白对照未进行任何干预处理,恢复情况最好,各项评分指标均接近满分为11.8±0.2分,表明术中未受到脑损伤干扰动物生理功能恢复情况最好。

2.2 血清IL-10水平变化

ELISA检测显示术后不同时间点各组血清IL-10浓度变化存在显著差异,A组在术后第3天达到高峰,第7天略下降但仍高于B组和C组,提示其在抗炎调控中可能的时效性作用。

表2 各组术后血清IL-10浓度变化情况(pg/mL, 均值±SD)

组别	第1天	第3天	第7天	组间比较(P值)
A组(悬吊)	38.2±6.3	65.7±8.9	52.4±7.1	$P < 0.01$ vs B组、C组
B组(未悬吊)	30.5±5.8	42.3±6.5	36.1±5.9	-
C组(对照)	25.2±4.7	29.4±5.0	27.9±4.8	-
F值	7.34	21.65	13.92	-
显著性	*	**	**	* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs A组

血清IL-10含量测定结果显示各组家兔手术后不同时间点

表达水平有明显差别, 组间差异有统计学意义。术后第1天, A组($38.2 \pm 6.3 \text{ pg/mL}$) IL-10水平即明显高于B组($30.5 \pm 5.8 \text{ pg/mL}$)与C组($25.2 \pm 4.7 \text{ pg/mL}$), F值为7.34, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。至第3天, A组IL-10浓度显著上升至 $65.7 \pm 8.9 \text{ pg/mL}$, 为三个时间点中的最高值, 显著高于B组($42.3 \pm 6.5 \text{ pg/mL}$)和C组($29.4 \pm 5.0 \text{ pg/mL}$), F值21.65, $P < 0.01$, 提示术后第3天可能是IL-10表达活跃的关键时间窗。至第7天, A组IL-10水平虽有所下降($52.4 \pm 7.1 \text{ pg/mL}$), 但仍高于B组($36.1 \pm 5.9 \text{ pg/mL}$)和C组($27.9 \pm 4.8 \text{ pg/mL}$), F值13.92, 差异依然显著($P < 0.01$)。

2.3 免疫组化与qPCR结果分析

免疫组化显示A组脑组织中IL-10蛋白表达显著增强, 主要分布于术区皮层和血管周围, qPCR检测亦显示mRNA表达上调。Spearman分析显示IL-10mRNA水平与其蛋白表达强度呈正相关, 同时与炎症细胞(如中性粒细胞)浸润程度呈负相关。

表3 脑组织中IL-10表达评分及相关性分析表

组别	IL-10 免疫组化评分 (0-7)	IL-10mRNA表达达 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	中性粒细胞浸润评分 (0-5)	IL-10 蛋白 vs mRNA (r)	IL-10vs 炎症细胞 (r)
A 组	5.6 ± 0.8	1.82 ± 0.37	1.3 ± 0.5	0.85*	-0.79*
B 组	3.2 ± 0.9	1.15 ± 0.28	2.7 ± 0.6	0.68	-0.51
C 组	1.1 ± 0.6	0.98 ± 0.21	1.0 ± 0.4	0.52	-0.31
F 值	24.1	15.7	19.3	-	-
显著性	**	**	**	* $P < 0.05$	* $P < 0.05$

通过免疫组化和qPCR的联合分析, 研究结果表明, 在手术后的第7天, A组家兔的脑组织中IL-10蛋白的表达明显增加, 免疫组化评分达到了 5.6 ± 0.8 , 这一数值远高于B组(3.2 ± 0.9)和C组(1.1 ± 0.6), F值为24.1, 这一差异在统计学上具有很高的意义($P < 0.01$)。IL-10在术区皮层和血管周边区域均有分布, 呈棕黄色的颗粒沉积。qPCR结果亦表明, A组IL-10mRNA表达量(1.82 ± 0.37)明显高于B组(1.15 ± 0.28)和C组(0.98 ± 0.21), F值15.7, $P < 0.01$, 提示术式对转录水平亦具有调控作用。炎症细胞浸润方面, A组中性粒细胞评分为 1.3 ± 0.5 , 显著低于B组(2.7 ± 0.6), 而与C组(1.0 ± 0.4)接近, F值19.3, $P < 0.01$ 。Spearman相关性分析进一步显示, IL-10mRNA水平与免疫组化评分呈显著正相关($r = 0.85$, $P < 0.05$), 说明转录与蛋白表达一致性良好; 同时IL-10表达与中性粒细胞浸润评分呈负相关($r = -0.79$, $P < 0.05$), 提示其在抑制局部炎症反应方面可能发挥关键作用, 印证了游离骨瓣悬吊术的抗炎机制效应。

3 讨论

3.1 游离骨瓣悬吊术对IL-10表达的影响机制探讨

施行游离骨瓣悬吊术家兔脑组织IL-10表达量显著高于未悬吊组和对照组, 说明该手术方式能促进抗炎因子的上调, 并可能对术后炎症调控有重要影响。IL-10是一种关键的免疫负向调节因子, 能够通过抑制促炎细胞因子(如TNF- α 、IL-1 β)释放, 减轻巨噬细胞和中性粒细胞介导的组织损伤, 从而缓解炎症反

应。手术时应用骨瓣悬吊使硬脑膜和骨瓣之间形成一个稳定的贴合状态, 有利于减轻对局部组织持续机械牵拉和刺激, 从而避免继发脑损伤, 继而为抗炎因子表达营造了一个比较稳定的微环境。

3.2 手术方式与术后免疫调节之间的关系

不同的手术方式对于手术后的免疫状态有明显的影。游离骨瓣悬吊术是利用悬吊缝线使骨瓣稳固地固定在硬脑膜上, 明显降低骨瓣及脑组织之间死腔及异位移动的程度, 以减少局部持续应刺激。该结构稳定性对手术区域微环境可能具有正向作用, 并间接促进IL-10等抗炎因子表达上调。与传统的未悬吊术式相比较, 因骨瓣复位不牢靠或容易发生微位移而容易诱发局灶性无菌炎症反应的发生, 致使促炎因子的不断释放和组织修复进程的中断。本实验发现A组在手术后IL-10的表达峰值较B组高, 炎症细胞的浸润程度显著降低, 提示悬吊术对手术后炎症反应有一定的调节作用。

3.3 IL-10在术后康复过程中的价值与应用前景

IL-10是重要的抗炎细胞因子之一, 其在手术后恢复中显示出了广泛的生物学价值。其不仅可以抑制促炎因子的释放, 缓解免疫介导继发性损伤, 而且可以调控巨噬细胞极化及促进组织修复等作用, 是评价脑组织手术后炎症状态的一项重要指标。

本文发现手术后IL-10表达增加与生存率增加和行为评分提高有密切关系, 表明它可以作为一种生物标志物来评价手术后康复的程度。对创伤性脑病或者手术后脑组织修复情况进行监测时, IL-10含量可以为及早判断患者康复趋势及干预时机提供重要参考依据。

[课题]

游离骨瓣悬吊硬脑膜技术对脑外伤的影响及其机制研究(2023YL06)。

[参考文献]

[1]周家顺.股骨内髁游离骨瓣治疗腕舟骨近侧骨折块坏死[J].实用手外科杂志,2023,37(04):475-478+490.
[2]马亦心,李仕骏,单小峰,等.近红外光谱系统连续监测下颌骨重建中的埋藏游离骨瓣[C]//中华口腔医学会口腔颌面修复专业委员会.2023年中华口腔医学会口腔颌面修复专业委员会第8次全国口腔颌面修复学学术年会论文汇编.北京大学口腔医院颌面外科,2023:132-133.
[3]单小峰,蔡志刚.颌骨缺损血管化游离骨瓣重建后的种植修复治疗[J].华西口腔医学杂志,2023,41(02):123-128.
[4]陈磊,段强.经游离骨瓣悬吊硬脑膜防治开颅术后及硬膜外积液的疗效观察[J].内蒙古中医药,2012,31(24):68-69.

作者简介:

程森(1990—),男,汉族,山东济宁人,神经外科主治医师,本科,研究方向:神经外科。