

研究方案

课题名称 静脉输注利多卡因对乳腺癌患者围术期细胞免疫功能及术后恢复质量的影响

1. 本研究课题的科学依据和意义(国内外研究概况, 水平和发展趋势, 立题依据有何特色和创新之处)

恶性肿瘤根治术围手术期由于手术、麻醉等多方面因素影响, 可能造成肿瘤细胞进入血循环、淋巴道、骨髓甚至播散于各组织器官, 形成微小的转移灶, 同时手术操作可引起神经内分泌、代谢、炎症效应, 并显著抑制机体免疫应答, 进一步影响了肿瘤患者手术后的复发及转移, 影响其远期生存率。围术期麻醉技术和麻醉药物可通过作用于免疫细胞或影响下丘脑-垂体-肾上腺轴来调节机体免疫应答, 进一步影响肿瘤细胞活性。利多卡因是目前临床中唯一可用于围术期静脉注射的局部麻醉药物, 不仅具有具有镇静、镇痛、抗炎、脑保护、抑制气道反应作用, 还可以直接或间接地影响肿瘤预后。利多卡因既能直接调节肿瘤的分子和细胞生物学, 又能减轻手术导致的免疫抑制, 通过阻断手术创伤应激反应, 减少术中阿片类药物的用量, 降低围术期手术及药物对患者免疫功能的影响, 达到保护机体免疫功能的目的。本研究目的是探寻围手术期注射利多卡因对研究纳入对象 T 淋巴细胞、自然杀伤细胞(nature killer cell, NK cell)等免疫细胞的影响, 为围手术期肿瘤患者麻醉方案的选择提出新的思路和相关理论依据。

目前, 癌症已成为世界范围内严重的公共健康挑战, 而乳腺癌是女性最常见的癌症, 影响妇女的日常生活并成为一种常见的死因, 发病率呈现逐年上升且年轻化的趋势。根据 2018 年数据统计, 乳腺癌位居女性恶性肿瘤发病率首位, 每年全世界有 253 万位女性新诊断为乳腺癌, 并且每年有 41 万名女性死于乳腺癌。尽管约 90%新诊断为乳腺癌的患者会行手术切除, 但仍有 3.5%-6.3%的患者因隐匿性转移而面临肿瘤复发。围术期是各种因素促进或抑制残余肿瘤细胞转移和复发的关键时期, 因此越来越多的人开始关注围术期。有研究发现, 外科医生在手术探查过程中, 可能会使残余的肿瘤细胞全身扩散, 而且其在手术操作过程中可能挤压肿瘤细胞进入血液循环, 并遗留微小残余病灶。此外, 术后急性疼痛、手术应激、吸入性麻醉药和阿片类药物的应用已证明是增加术后乳腺癌转移风险的相关因素。其他作者认为麻醉可能是促进围手术期肿瘤转移复发的重要因素: (1)间接通过免疫抑制机制, 如降低细胞免疫功能; (2)直接干扰肿瘤细胞生物学。

近年来, 局部麻醉药抗肿瘤的作用及机制正在被现代医学工作者不断的揭示。研究结果已经证明, 局部麻醉药能够对某些肿瘤细胞的凋亡、增殖、转移、癌基因 DNA 去甲基化等有影响。但不同的局部麻醉药对不同的恶性肿瘤的抗肿瘤作用效果有所不同, 局部麻醉药对肿瘤进展的影响可总结为以下几个方面:

1、可减少阿片类药物的需求

围术期阿片类药物是治疗疼痛的基本药物, 对于麻醉诱导和麻醉维持是必不可少的, 能够缓解手术疼痛引起的应激, 维持生命体征的平稳。目前研究阿片类药物与肿瘤的关系越来越多, 也得到了一些结论。Gupta 等研究证实, 给予临床相关剂量的吗啡, 能够促进人类乳腺癌转移瘤新生血管的形成, 模型小鼠肿瘤加速恶化。这些结果表明临床使用吗啡对于肿瘤血管生成依赖性的癌症有害。许多研究已经证明, 阿片类药物能够通过促血管生成效应和细胞增殖直接导致肿瘤生长, 因此, 减少阿片类药物的使用也能够减少阿片类药物对于肿瘤生长的促进作用。Yardeni 等一项对于 65 例子宫切除术的女性患者的研究表明, 术前和术中利多卡因静脉使用能够直接改善患者的术后疼痛管理和减少手术引起的免疫改变。Marret 等 Meta 分析也证明持续静脉使用利多卡因能够减少术后肠梗阻的持续时间和手术后的腹部疼痛, 减少患者对阿片类药物的需求, 促进患者康复和缩短住院时间。

另外, 许多学者的研究已经证实局部麻醉药可以抑制术后疼痛, 减少阿片类止疼药物的使用, 从而减少阿片类止疼药对免疫系统的有害作用。由于发现局部麻醉药具有抗肿瘤的功效, 而阿片类药物在使用时尽管能解除疼痛, 但是促进肿瘤细胞的增殖、转移以及对免疫系统的有害作

用，所以，局部麻醉药的使用在肿瘤外科麻醉过程中显得更有优势。

2、减轻手术应激反应

Hu 等（2019 年）发现，在择期甲状腺手术患者麻醉诱导气管插管前 10 min 静脉注射 1.5 mg/kg 利多卡因，插管后 5 min 心率与平均动脉压变化幅度较生理盐水对照组小，在控制性降压的高血压病患者气管插管期间亦得出相似结论。Sridhar 等（2015 年）报道择期开腹手术患者在气管插管时静脉注射 1.5 mg/kg 利多卡因，随后以 1.5 mg/（kg · h）泵注至术后 1 h，术后 24 h 白细胞总数、CRP 与 IL-6 变化较对照组小，提示围术期静脉应用利多卡因可有效减轻手术应激反应。

3、保护细胞免疫功能

固有免疫系统的免疫监视作用在肿瘤形成起到重要作用，是治疗乳腺癌的新靶点。NK 细胞在此过程中发挥重要作用，它监测到异常细胞并活化和招募其他免疫细胞来杀伤异常细胞。围术期免疫系统常常发生紊乱，严重干扰 NK 细胞功能从而利于 CTCs 散播，乳腺癌术后 NK 细胞活性被抑制将长达 7 日。临床浓度下利多卡因可保持 NK 细胞的细胞毒性，调节巨噬细胞、修饰间充质基质细胞的作用，从而保护固有免疫的免疫监视作用。

4、诱导肿瘤细胞凋亡

细胞凋亡是一个独特的细胞死亡方式，是正常组织中消除功能衰弱或异常的细胞。这种情况也发生在特定的病理环境下。促进肿瘤细胞凋亡是有效治疗肿瘤的途径之一，让肿瘤患者的预后得以改善。近几年国外学者研究显示，许多局部麻醉药抗肿瘤作用是通过启动肿瘤细胞的凋亡途径来完成。多种基因与肿瘤细胞的凋亡有密切联系。其中，促进细胞凋亡的基因家族有 p53、Fas、Bax、Caspase 等，抑制细胞凋亡的基因家族有 C-myc、Bcl-2、Survivin、Livin 等。

Chang 等最近研究证实，临床应用剂量的利多卡因和布比卡因诱导乳腺癌细胞 MCF-7 凋亡的程度明显高于乳腺上皮细胞 MCF-10A。利多卡因和布比卡因可激活 MCF-7 细胞中的 Caspase7、Caspase8、Caspase9 和促进核小体裂解，从而通过线粒体的内在和外在途径诱导乳腺癌细胞 MCF-7 的凋亡。Chang 等研究证明利多卡因和布比卡因具有浓度依赖方式，可降低甲状腺癌细胞 8505 和 K1 的生存和克隆形成。利多卡因和布比卡因可导致线粒体膜蛋白的分裂和释放出细胞色素 C，同时激活 Caspase3 和 Caspase7，多聚 ADP 核糖聚合酶（polyADP-ribose polymerase, PARP）断裂和更高比率的 Bax/Bcl-2。该研究首次证明了利多卡因和布比卡因作用于甲状腺癌细胞的细胞毒性和抑制 MAPK 通路是局部麻醉药物诱导癌细胞凋亡的重要机制。

Xing 等研究结果显示，利多卡因以剂量和时间依赖方式抑制肝细胞癌 HepG2 细胞的生长，阻滞细胞在 G0/G1 期并诱导细胞凋亡，通过抑制细胞外信号调节激酶 ERK1/2 和 p38 途径，增加 Bax 蛋白、激活 Caspase3 和降低 Bcl-2 蛋白。更重要的是，异种移植实验表明利多卡因能抑制肿瘤的生长和增加顺铂的敏感性。Xuan 等研究表明，布比卡因通过激活卵巢癌内在和外在的凋亡通路而具有直接的抗癌特性，但在前列腺癌中只通过内在凋亡通路。这些研究结果显示，局部麻醉药具有诱导癌细胞凋亡的功效，其诱导癌细胞凋亡，主要通过激活细胞内的凋亡信号途径，同时对生长信号也具有显著的抑制作用。

5、抗肿瘤细胞增殖、转移

肿瘤细胞增殖迅速，是导致肿瘤患者恶化速度增加的主要原因，严重威胁肿瘤患者的生命。抑制肿瘤细胞的增殖是一种有效的抗肿瘤方式。周慧等研究结果表明，普鲁卡因能够抑制鼻咽癌细胞 CNE-2Z 的增殖，此作用呈现出时间依赖关系和剂量-效应关系。普鲁卡因能够阻滞 CNE-2Z 细胞停滞于 G1 期，能够使鼻咽癌细胞 CNE-2Z 中的 RASSFFIA mRNA 表达上调，从而推测普鲁卡因可能通过此机制抑制 CNE-2Z 细胞的增殖。还有些学者研究发现，利多卡因抑制人类舌癌细胞株 CA127 表皮生长因子受体的活力是抗增殖作用的机制之一。舌癌患者口腔局部使用利多卡因能抑

制舌癌细胞的增殖。

Bar-Yosef 等在动物体内注入腺癌细胞后，使用局部麻醉和镇痛能够减少癌细胞的转移。Chamaroux-Tran 等研究证明利多卡因降低正常乳腺上皮细胞 NBEC、MCF-10 和乳腺上皮细胞癌 (TBEC) 系的存活率，与 NBEC 细胞比较，抑制了 TBEC 细胞的迁移，并且破坏了三阴性细胞的非依赖支持物生长。腹膜内利多卡因使用与当前临床镇痛使用相一致的剂量改善 MDA-MB-231 腹膜癌小鼠的存活。Johnson 等体内实验最新研究显示，在 4T1 乳腺癌小鼠模型中，围术期七氟醚麻醉后，静脉注射利多卡因能减少乳腺癌细胞的肺转移，但围术期使用氯胺酮和甲苯噻嗪麻醉可增加乳腺癌细胞的肺转移，表明利多卡因在体内具有抗肿瘤细胞转移的潜力。

6、增加肿瘤细胞抑癌基因脱甲基化作用

在一个健康的身体中，表观遗传机制对人类 DNA 的稳定性和基因表达具有重要的作用。表观遗传机制可增加人类识别一些癌症发生的致病因素。特别是抑癌基因启动子甲基化水平增加能够使肿瘤抑制因子无效和导致癌症的发展，DNA 超甲基化和 DNA 甲基化引起的肿瘤抑制基因的沉默被认为是多种癌症的分子标志。因此，减少甲基化水平有利于癌症的治疗。

Lirk 等研究证实，在体外使用临床应用浓度的利多卡因能够减少乳腺癌细胞的甲基化作用，进一步研究发现，在乳腺癌细胞株 BT-20 (雌激素受体阴性) 和 MCF-7 (雌激素受体阳性) 中，利多卡因能减少细胞株 BT-20 和 MCF-7 的甲基化，罗哌卡因能减少细胞株 BT-20 基因的甲基化，但是布比卡因没有脱甲基作用，而这些被减少的甲基化基因，大多数是肿瘤抑制基因。当利多卡因与 DAC (去甲基化疗法) 结合时，更能够增加癌细胞的抑癌基因脱甲基作用。这些研究结果显示，局部麻醉药物的抗肿瘤作用，内在的原因可能是具有促进抑癌基因启动子的脱甲基化。

加速康复外科 (enhanced recovery after surgery, ERAS) 理念为，尽量减少患者因伤害性刺激引起的炎症反应与免疫抑制，避免术中的急性疼痛演变成慢性疼痛。ERAS 理念已经成为全球的热点，其核心在于减少创伤及应激反应，正好契合肿瘤患者以改善预后为导向的围术期要求。

越来越多的证据表明局部麻醉药还有未发现的有益作用。从广大学者的研究成果上看，局部麻醉药可诱导癌症细胞的凋亡、增殖、转移和脱甲基作用，避免或减少使用阿片类药物等达到抗肿瘤作用，为临床治疗用药提供了理论依据。所以需要深入的评价局部麻醉药在某些癌症手术中的使用和肿瘤治疗学中的优势，进而对癌症患者围手术期中麻醉科医师的用药提供理论指导依据。但是，局部麻醉药种类多样，目前国内外学者对于局部麻醉药抗肿瘤作用的研究尚少，还没有深入的阐明局部麻醉药物抗肿瘤的作用机制，而且不同的局部麻醉药抗肿瘤的机制不完全一样，这些内在的原因有待医学科工作者的更规范、更深入的研究。

创新之处：有许多回顾性临床研究分析了肿瘤切除术中应用区域阻滞麻醉和局麻药的作用。尤其局麻药的抗肿瘤作用在一些基础研究中已经得到证实。但至今为止，还没有令人信服的 RCT 研究。利多卡因的毒理和药代动力学研究已十分清楚，它是多模式镇痛中的常用药。然而，因为没有可靠的临床证据证明利多卡因对肿瘤生物学的影响，目前还无法将利多卡因用于肿瘤病人的治疗。因此，需要临床 RCT 实验来探索临床剂量利多卡因的抗肿瘤作用。

以往研究肿瘤复发常需长时间随访，随访期内患者干预不可控，且随访时间过长可能存在数据丢失，细胞免疫指标如 NK 细胞可能是探索麻醉对肿瘤播散影响的理想替代指标，因为它们可以预测肿瘤复发，这一点已经在各种肿瘤学环境中描述过，并且是通过客观测量的，简单且容易获取，本研究拟采用 T 淋巴细胞和 NK 细胞动态监测来反应患者预后情况。

大量基础实验和临床研究结果促使麻醉医生重新审视目前对肿瘤与非肿瘤病人都采用相同的麻醉方案这一临床现象是否正确？在为肿瘤患者实施理想的麻醉和镇痛过程中，如选择那些既能提供满意麻醉和镇痛又能抑制肿瘤增殖和转移的药物，将会是双赢之举，对肿瘤患者的综合治疗亦有积极的作用，也才能在这样一个乳腺癌多学科综合治疗的年代优化我们的临床决策。

本实验通过将静脉注射利多卡因与安慰剂对照进行比较,探讨其能否为乳腺癌手术患者提供更良好的预后效果。

2. 主要参考文献目录(列出主要的 5 篇)

- [1] Sekandarzad MW, van Zundert AAJ, Lirk PB, Doonerbal CW, Hollmann MW. Perioperative anesthesia care and tumor progression. *Anesth Analg.* 2017;124:1697 - 1708.
- [2] D'Agostino G, Saporito A, Cecchinato V, et al. Lidocaine inhibits cytoskeletal remodelling and human breast cancer cell migration. *Br J Anaesth.* 2018 Oct;121(4):962-968.
- [3] Frédérique Hovaguimian 1, Julia Braun, Birgit Roth Z'graggen, Martin Schläpfer, Claudia Dumrese, Christina Ewald, Konstantin J Dedes, Daniel Fink, Urs Röllli, Manfred Seeberger, Christoph Tausch, Bärbel Papassotiropoulos, Milo A Puhan, Beatrice Beck-Schimmer. Anesthesia and Circulating Tumor Cells in Primary Breast Cancer Patients: A Randomized Controlled Trial. *Anesthesiology.* 2020 Sep;133(3):548-558. doi: 10.1097/ALN.0000000000003409.
- [4] Cata JP, Guerra C, Soto G, Ramirez MF. Anesthesia Options and the Recurrence of Cancer: What We Know so Far? *Local Reg Anesth.* 2020 Jul 7;13:57-72. doi: 10.2147/LRA.S240567. PMID: 32765061; PMCID: PMC7369361.
- [5] Dunn LK, Durieux ME. Perioperative Use of Intravenous Lidocaine. *Anesthesiology.* 2017;126(4):729-737. doi:10.1097/ALN.0000000000001527

3. 研究内容和预期结果(说明课题的具体研究内容、重点解决的科学技术问题、预期成果提供形式)

探讨围手术期静脉注射利多卡因对乳腺癌手术围术期 T 淋巴细胞及 NK 细胞动态变化的影响,并与常规全身麻醉比较,评估其对术中麻醉药物的应用,术后并发症发生率以及术后慢性疼痛的影响,为临床实践提供指导意义。

通过这项研究,拟发表论文 1~2 篇,为临床应用提供参考。

4. 拟采取的研究方法和实施方案(包括科研方法、步骤、主要技术指标、资料的统计学处理和可能遇到的问题及解决办法)

4.1 科研方法及步骤

(1) 研究类型: 本试验为前瞻性、随机、双盲、安慰剂对照试验

(2) 研究对象:

纳入标准:

①年龄 18-85 岁;

②女性患者;

③拟行择期单侧乳腺癌根治术;

④手术期间或术后冰冻病理切片确诊为原发性浸润性乳腺癌(TNM 分期: T₁₋₃、N₀₋₂、M₀);

⑤同意参与本研究并签署知情同意书。

排除标准:

①对利多卡因等局麻药过敏者;

②化疗或放疗史及二次手术患者(复发或重建);

③转移性乳腺癌、炎性乳癌;

④BMI > 30 kg/m²;

⑤内分泌系统疾病、自身免疫性疾病、免疫缺陷病、其他活动性癌症及近期（<1个月）感染史，或 ASA IV-V、白血病等或长期服用免疫抑制剂患者；

⑥出于任何原因不能配合研究者：听力或视力障碍、语言理解障碍、精神疾病等；

⑦怀孕或正在哺乳；

⑧合并中枢神经病变、肝肾功能障碍和低血压（收缩压 \leq 90 mmHg）。

⑨已参与其他研究者。

剔除标准：

①围术期输注血制品者；

②术中使用局部麻醉（硬膜外麻醉、神经阻滞、局部切口浸润）或术中使用化疗药物患者；

③主动退出试验者；

④紧急揭盲病例；

⑤不服从试验的安排或约定者。

试验终止：

①盲底泄密；

②伦理委员会终止或暂停试验；

③应急信件拆阅率超过 20%；

④中期发现干预组并发症或不良事件发生率明显高于对照组。

（3）随机化和盲法

本课题为双盲试验，患者及家属、麻醉医师、手术医生、研究记录者和评估者对分组及所发药物成分均不知情。进行血液标本监测人员和术中病理处理人员对试验分组均不知情。由一名麻醉医师对病人的术前状态进行评估，确定病人是否符合本研究纳入标准，同时向病人介绍将采用 VAS 评估疼痛强度。采用简单随机法进行受试者的随机分组，利用电脑随机系统产生的随机数对受试对象进行随机分组。两组病人静脉输注药物的配置均由一名不参与本研究的麻醉护士独立完

成。装有该制剂的注射器被贴上病人姓名、制备日期及给药途径的标签，设盲人员基于制剂的外形无法判断该制剂为对照组或者试验组制剂。在药物编盲的同时制备应急信件，每一个编盲号设置一个不透光应急信封，内容为病例用药编号、药名，以便出现紧急情况时对个别病例进行揭盲抢救。揭盲后，相应病例作为脱落病例处理。应急信件和已经编盲药物一起发给研究人员。

由专门负责统筹和监督整个研究工作的监视者监督盲法执行，保证受试对象的安全，保证结果的可靠性，负责分发应急信件、保管盲底、试验终末揭盲等。病人术后随访及数据收集由本研究的一名麻醉医师完成。

L 组：麻醉诱导前 10min 使用 2%利多卡因 1.5mg/kg 负荷量静脉泵注，随后采用面罩通气给氧去氮进行麻醉诱导，麻醉诱导结束后使用微量泵以 2.0mg/kg/h 的泵速继续输注此药物直至手术结束。

S 组：等容量的生理盐水给予负荷量与泵注。

(4) 实验流程

所有患者术前常规禁食禁饮，数据采集者术前 1 天访视病人，向患者解释 VAS 的含义及使用方法，取得患者及家属知情同意。入室后所有患者监测无创血压（NIBP）、心电图（ECG）、脉搏血氧饱和度（SpO₂）。开放上肢静脉通道，静脉输注复方电解质 8ml/kg。

采用脑状态指数监护仪监测脑电双频谱指数（bispectral index, BIS）。全身麻醉诱导采用静脉注射咪达唑仑 0.05mg/kg、舒芬太尼 0.05ug/kg、罗库溴铵 0.9mg/kg，依托咪酯 0.4mg/kg，待患者颈部肌肉松弛且 BIS 值下降到 40~60 插入喉罩。呼吸参数设置：调节新鲜气体总流量为 2L/min（FiO₂ 0.5）、潮气量 6~8ml/kg、呼吸频率 12~14 次/min。术中根据情况调整呼吸参数，维持 P_{ET}CO₂ 在 35~45mmHg（1mmHg=0.133kPa）。所有患者在切皮前均静脉注射托烷司琼 4mg，用于预防术后恶心、呕吐。全身麻醉维持，使用丙泊酚（4~6mg/（kg·h））和瑞芬太尼，维持 BIS 值在 40~60 之间，根据需要调整瑞芬太尼的输注量，使平均动脉压(MAP)维持在基线值的±20%以内。低血压被定义为比基线 MAP 超过或降低 20%或持续 30s 以上 MAP<65 mmHg，当出现低血压时，给予去氧肾上腺素 20μg。术中维持心率（HR）60~100 次/min，当出现心动过缓（HR<50 次/min）时，给予阿托品 0.5mg。术中采用加温毯维持患者体温在 36~37℃。缝皮时停用麻醉药，静脉注射新斯的明 0.04mg/kg 和阿托品 0.02mg/kg、氟马西尼 0.5mg，并将患者送至麻醉恢复室（PACU）。待患者清醒、自主呼吸恢复、咽喉反射和咳嗽反射恢复、潮气量和分钟通气量恢复正常，拔除喉罩，予以面罩吸氧 3L/min，在 PACU 观察约 1h 后送回病房。术后所有患者均予标准术后镇痛方案。在麻醉恢复室，如果 VAS 评分超过 6 分，给予地佐辛 5mg，如果是 4~6 分，静脉注射氟比洛芬酯 50mg；在病房，如果 VAS 评分大于 6 分，根据我院外科标准疼痛控制方案静脉注射地佐辛 5mg，如果 VAS 评分是 4~6 分，静脉注射氟比洛芬酯 50mg。术后发生 III 级及

以上（恶心、呕吐程度评估标准：I级为“无”；II级为“轻微恶心，但无呕吐”；III级为“恶心、呕吐明显”；IV级为“严重呕吐”。）恶心、呕吐的患者静脉注射托烷司琼 2mg。

4.2 数据采集

术前访视数据：年龄、BMI、ASA 分级、手术类型、最后一次月经时间；

术中记录数据：记录手术时长、麻醉时长、拔管时间；术中芬太尼、丙泊酚、瑞芬太尼用量；术中补液量；术中血压、心率情况，低血压次数及升压药使用情况；平均 BIS 值、体温；术中 β 受体阻滞剂、COX 抑制剂使用情况；

术后记录数据：记录拔管后 30min (t_1)、1h (t_2)、4h (t_3)、6h (t_4)、12h (t_5)、24h (t_6) 安静和咳嗽时的 VAS 评分；记录术后病理结果及肿瘤分期；记录术后恢复质量得分；记录 PACU 和病房氟比洛芬酯、地佐辛的补救镇痛剂量；记录术后血压、心率最高值与最低值，低血压次数及升压药使用情况；记录术后恶心、呕吐的严重程度；术后 β 受体阻滞剂、COX 抑制剂使用情况；记录术后各种接受托烷司琼治疗的人数等。

术后三月数据：出院后后续治疗方式及次数（化疗、放疗、激素治疗），术后三个月采用简明疼痛量表（BPI）评估患者术后慢性疼痛情况，包括疼痛程度、疼痛部位、疼痛性质以及疼痛对于生活的影响程度等。

血液标本采集：分别于术前 30min (T_0)、肿瘤切除后 (T_1)、术后即刻 (T_2)、术后 24h (T_3)、术后 48h (T_4) 抽取入组患者手术对侧上臂肘静脉血 3ml，全血样本肝素抗凝，室温保存，4 小时内检测。

流式细胞术

流式细胞术（FCM）检测原理 FCM 可以用来快速测量、存储、显示悬浮在液体中的分散细胞的一系列生物特征参量，并能根据预选的参考范围把指定的细胞亚群分选出来。其基本原理为：将待测细胞根据检测需求染色后制成单细胞悬液，用一定压力将待测样品压入流动室，不含细胞的磷酸缓冲液从鞘液管喷出，使鞘液能包裹样品流中的细胞排成单列依次通过激光聚焦检测区。被特异性标上荧光染料的细胞在通过激光检测区时将产生特定波长的激发荧光。这些荧光信号的强度代表了所测细胞膜表面抗原的强度或其核内物质的浓度，通过光电倍增管接收后经一系列的信号转换、放大、数字化处理，就可以用电脑直观的统计染上各种荧光染料的细胞各自所占的百分率。选择不同的单克隆抗体及荧光材料，就可以利用 FCM 同时测定一个细胞上的多种不同特征。

溶液制备：PBS（磷酸盐缓冲液）的配制：分别称取 NaCl 16.00g，KCl 0.40g， NaH_2PO_4 2.88g， K_2HPO_4 0.48g，用 1800ml 三蒸水溶解，用 HCl 将 PH 调至 7.4，加三蒸水定容至 2000ml，高压灭菌后室温保存。Tris- NH_4Cl （红细胞裂解液）的配制分别称取 NH_4Cl （氯化铵）7.47g、Tris（三羟甲基氨基甲烷）1.3g，用 1000ml 水溶解，4℃ 保存。

取 200ul 静脉血于流式管（南京碧云天生物技术有限公司）中，加抗体 2ul/抗体（PerCP/Cyanine5.5 anti-human CD4、APC anti-human CD8a、FITC anti-human CD3、PE anti-human CD56 (NCAM)、PE anti-human CD16、PE/Cyanine7 anti-human CD45、PE Mouse IgG2a, κ Isotype Ctrl、PE Mouse IgG1, κ isotype Ctrl；美国 Biolegend 公司）；混匀，暗处孵育 20min；加红细胞裂解液 2ml；充分混匀，裂解红细胞；加 2 ml PBS 混匀，用 2000r/min 离心（美国 Beckman Coulter 公司），洗涤 3 次，最后加 200 ul PBS 混匀，置暗处 4℃ 待上机，用流式细胞仪（libllr 流细胞仪，美国 BD 公司）检测后记录结果。

4.3 结局指标：

①主要结局指标：a. 围术期外周血 NK 细胞水平变化情况

②次要结局指标：a. 围术期外周血 T 淋巴细胞亚群水平变化情况

b. 术后 24h QoR-15 评分

- c. t_1 、 t_2 、 t_3 、 t_4 、 t_5 、 t_6 安静和咳嗽时的 VAS 评分
- d. 术中丙泊酚，瑞芬太尼用量
- e. 术后镇痛药追加次数及并发症（术后恶心呕吐、头晕、胸闷）的发生率
- f. 患者慢性疼痛发生情况

- ③安全性指标：
- a. 术中心律失常发生情况
 - b. 利多卡因中毒情况

4.4 统计分析：

数据处理

采用 IBM SPSS 25.0 统计学软件进行分析；计量资料首先使用 Kolmogorov-Smirnov 检验判断数据是否服从正态分布，使用 Levene 检验判断数据是否符合方差齐性。正态分布资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间比较采用两独立样本 t 检验，重复测量数据采用重复测量方差分析。非正态分布资料以中位数 (M) 和四分位数间距 (IQR) 表示，采用 Mann-Whitney U 检验；重复测量数据采用 Friedman 秩和检验。计数资料用率表示，比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法；等级资料采用秩和检验。所有统计分析均使用双侧检验， $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

4.5 问题及解决办法

静脉注射利多卡因可能会引起局部麻醉药中毒，中毒患者一般会出现烦躁不安、情绪激动，可给予镇静药物如地西洋、咪达唑仑；发生谵妄、惊厥者可静脉注射硫喷妥钠；对于抽搐患者也可以给予小剂量的肌肉松弛剂，不过必须时刻监测其呼吸情况，以防止呼吸肌麻痹、呼吸骤停。必须保证其呼吸道通畅，如果情况危急应立即行气管插管。对于血压下降的患者应注射血管收缩药，比如去氧肾上腺素、麻黄碱、多巴胺等使血压上升至正常水平；心率缓慢者给予阿托品或肾上腺素；如果出现心脏骤停，应立即进行心肺复苏。

5. 实现本课题已具备的条件(开展本课题的技术优势、现有仪器设备、技术人员及协作条件,以及预试验情况)

徐州医科大学附属医院，地理位置优越，医疗水平高，就诊患者地区分布广、年均择期手术量大，具有丰富的病例来源。科室具备完善的治疗仪器设备、成熟的操作技术。

我院每年乳腺癌根治手术达 500 例以上，乳腺癌患者术后转移复发依然是乳腺癌患者死亡的主要原因。大量基础实验和临床研究结果促使麻醉医生重新审视目前对肿瘤与非肿瘤病人均采用相同的麻醉方案这一临床现象是否正确？在为肿瘤患者实施理想的麻醉和镇痛过程中，如选择那些既能提供满意麻醉和镇痛又能抑制肿瘤增殖和转移的药物，将会是双赢之举，对肿瘤患者的综合治疗亦有积极的作用，也才能在这样一个乳腺癌多学科综合治疗的年代优化我们的临床决策。

Article information: <https://dx.doi.org/10.21037/gs-22-134>