文章编号:1000-5404(2006)21-2111-04

论著

颈交感神经阻滞对放烧复合伤小鼠HPA轴的调节及相关机制研究

陆建华[1],陶 军[2],叶建宁[3],粟永萍[1],李洪涛[1],程天民[1] (第三军医大学:[1]军事预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038,[2]新桥医院麻醉科,[3]新桥医院神经内科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨颈交感神经阻滞(SB)对放烧复合伤小鼠HPA轴的调节及可能机制。**方法** TBSA15%Ⅲ度烧伤合并5 Gy放射损伤小鼠分为:对照组、放烧复合伤组及伤后SB治疗组,比较各组血清糖皮质激素(GC)及ACTH浓度的差异;同时利用膜片钳技术检测各组间海马NMDA受体通道特性的变化。另外,将腹腔注射足量NMDA受体阻断剂MK-801的小鼠分为:放烧复合伤组、伤后SB治疗组,比较两组血清GC及ACTH浓度的差异。**结果** 放烧复合伤后血GC及ACTH水平显著升高,SB治疗组血GC和ACTH水平显著底于放烧复合伤组。SB组海马NMDA受体通道开放概率、开放时间常数τ1、τ2虽然高于对照组,但显著低于放烧复合伤组。足量MK-801预处理的放烧复合伤组与SB组之间的血清GC和ACTH水平无显著差异。**结论** SB通过降低NMDA受体的活性,抑制了严重创伤(放烧复合伤)小鼠HPA轴的亢进。

关键词: 颈交感神经节;阻滞;放烧复合伤;HPA轴;NMDA受体

中图法分类号: R338; R644; R818.74 **文献标识码:** A

Effect of cervical sympathetic ganglia block on HPA axis in mice with combined radiation and burn injury and its related mechanisms

LU Jian-hua[1], TAO Jun[2], YE Jian-ning[3], SU Yong-ping[1], LI Hong-tao[1], CHENG Tian-min[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Military Preventive Medicine, [2]Department of Anesthesiology, [3]Department of Neurology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the roles of cervical sympathetic ganglia block (SB) in HPA axis of mice with combined radiation and burn injury and their related mechanisms. **Methods** Kunming mice were divided into control group, injury group (inflicted with 5 Gy irradiation and 15% TBSA full thickness burn injury), SB group (inflicted with combined injury, then treated daily by cervical SB). Serum GC, ACTH concentration and hippocampal NMDA receptor activity in each group were analyzed. In addition, another 20 Kunming mice (all injected intraperitoneally with enough MK-801) were divided into control (inflicted with combined radiation and burn injury) and SB group (inflicted with combined injury, then treated daily by cervical SB). Serum GC and ACTH concentration of these group were also detected. **Results** As compared with control group, serum GC, ACTH concentration and hippocampal NMDA receptor activity in injury group increased significantly. GC, ACTH concentration and NMDA receptor activity were higher than that of control group, but lower than that of injury group markedly. There were no significant differences of serum GC and ACTH concentration between injury group pretreated with MK-801 and SB group pretreated with MK-801. **Conclusion** By inhibiting NMDA receptor activity, SB promotes homeostatic restoration of HPA axis in mice of combined radiation and burn injury.

Key words: cervical sympathetic ganglia block; combined radiation and burn injury; HPA axis

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054201);海外青年学者合作研究基金资助项目(30328025);国家自然科学基金资助重点项目(30230360)

Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" project, G1999054201), the Cooperative Research Foundation for Oversea Young Scholar (30328025) and the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (30230360)

作者简介: 陆建华(1968-),男,江苏省南通市人,博士,副主任医师,主要从事颈部交感神经阻滞对严重创伤的救治方面的研究。电话:13719347650

通讯作者: 粟永萍,E-mail:suyping@yahoo.com

收稿日期: 2005-11-21;**修回日期:** 2006-03-05

应激系统主要包括下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamo-pituitary-adrenal axis, HPA 轴)及植物神经系统[1,2]。严重创伤应激过度的实质就是 HPA 轴的亢进、交感神经系统兴奋性异常导致机体稳态失衡,进而引起一系列后续损害。新近的研究表明:星状神经节阻滞(stellate ganglion block, SGB)能使机体的神经-内分泌-免疫系统保持恒常性的功能[3,4]。因此,我们推测,SGB 可能有助于抑制严重创伤后的 HPA 轴亢进,从而促进机体稳态的恢复。为此,我们以小鼠颈部交感神经阻滞(cervical sympathetic ganglia block, SB)模拟 SGB,研究了 SB 对严重创伤(放烧复合伤)后 HPA 轴兴奋性的影响。

我们过去的研究已经发现:N-甲基-D-天冬胺酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)受体的激活是严重创伤 HPA 轴亢进的重要原因[5],由于 α 及 β 受体信号通路与 NMDA 受体存在磷酸化对话,因此,我们还进一步探寻了 SB 是否通过抑制 NMDA 受体的过度激活,进而抑制了放烧复合伤 HPA 轴的过度激活。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

NMDA、胰蛋白酶、多聚赖氨酸、MK801、购自美国 Sigma 公司,ACTH 放免检验药盒购自美国 DPC 公司,皮质醇放免检验药盒购自 Amersham 公司。

1.2 动物分组及处理

1.2.1 SB 对严重创伤后 HPA 轴兴奋性的影响 第三军医大学实验动物中心提供的普通级昆明小鼠 30 只,雌雄不拘,通过抽签法分为 3 组,每组 10 只。①对照组(control group);②放烧复合伤组(injury group):动物给予放烧复合伤;③伤后 SB 治疗组(SB group):动物给予放烧复合伤,在伤后定期给予颈部交感神经阻滞,每天 1 次,连续 3 d。对照及复合伤组动物颈部注射生理盐水,注射方法同 SB 组。各组于伤后 3 d 取血检测血皮质醇(glucocorticoid, GC)和 ACTH 浓度来反映 HPA 轴兴奋性的变化。

1.2.2 SB 对 NMDA 受体通道特性的影响 动物分组:同上,利用上述各组的动物,于伤后 3 d 取脑组织(一般取海马)通过膜片钳方法检测各组 NMDA 受体的变化。

1.2.3 SB 对 MK-801 预处理小鼠放烧复合伤后 HPA 轴的影响 动物分组:健康昆明小鼠 20 只,腹腔注射足量 NMDA 受体阻断剂 MK-801 (1 mg/kg 溶于 0.2 ml 生理盐水),使 NMDA 受体充分失活,再将动物通过抽签法分为:①放烧复合伤组(对照组):动物给予放烧复合伤,继续腹腔注射 MK-801 1 mg/kg,颈部注射生理盐水 0.3 ml。②伤后 SB 治疗组:动物给予放烧复合伤,继续腹腔注射 MK-801 1 mg/kg,伤后每天定期给予颈部 SB,于伤后 3 d 取血检测血 GC 及 ACTH 浓度。

1.3 动物致伤方法

各组动物背部剃毛后,先给予 5 Gy 放射损伤,再以 2% 凝固汽油涂于背部燃烧 8 s 造成 15% TBSA Ⅲ度烧伤(病理切片证实)。

1.4 SB 方法

参考陆建华[6]及 Hanamatsu 等[7]对小鼠进行 SB,注射的药物为 0.5% 利多卡因 0.2 ml,注射后 5 min 观察小鼠是否出现结膜充血、眼睑下垂、颜面潮红、眼裂变小等,以此判定 SB 的效果。

1.5 血 GC 及 ACTH 浓度的测定

实验动物于放烧复合伤后各时相点断头处死,收集血液,通过离心分离血清,按 RIA 双抗体法测定血皮质醇浓度(相当于 GC 浓度),采用美国 DPC 公司的 ACTH 放免检验药盒检测血 ACTH 浓度。

1.6 通过膜片钳方法检测 SB 对 NMDA 受体的作用

海马神经元的急性分离:具体步骤参照文献[8]进行。分离的细胞悬液滴加于事先涂有 0.1% 多聚赖氨酸的盖玻片上,静置 10~15 min 使细胞充分贴壁。加入 2~3 ml 浴液,采用细胞贴附式(cell-attached)记录 NMDA 受体的单通道电活动。以 pClamp6.0 软件的 Fetchan 分析程序进行开关事件的测量,测量的结果用 pSTAT 程序进行分析处理,以 Gaussion 和 Exponential 方式对通道的电流幅值及通道的开关时间分布直方图进行拟合。对各拟合分别在 Marquardt-LSQ, Simplex-LSQ 及 Simple-MLE 的不同指数水平进行比较,用 Viewresiduals 进行拟合优度检验。

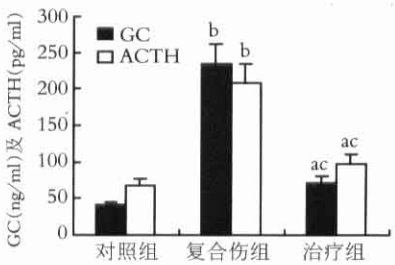
1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 SB 对放烧复合伤小鼠 HPA 轴兴奋性的影响

与正常对照组相比,放烧复合伤后血皮质醇(GC)水平升高非常显著($P<0.01$),ACTH 水平也显著升高($P<0.01$),SB 组血 GC 水平和 ACTH 水平虽然高于对照组,但显著低于放烧复合伤组($P<0.01$)(图 1)。



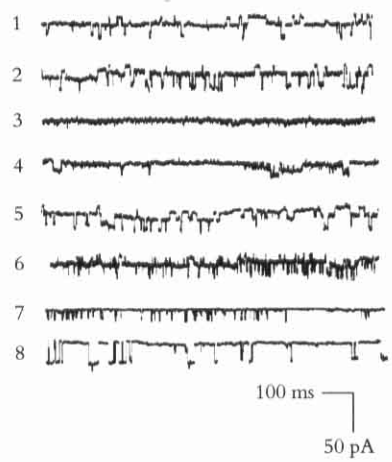
a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与对照组比较; c: $P<0.01$,与放烧复合伤组比较

图 1 SB 治疗对放烧复合伤小鼠血清 GC 及 ACTH 的影响

2.2 SB 对放烧复合伤小鼠 NMDA 受体通道的影响

通过膜片钳方法,记录到各组 NMDA 受体的曲线图(图 2)。各组小鼠 NMDA 受体通道的开放以 35 pS 电导水平的通道开放为主。在 35 pS 电导水平的开放中,与对照组相比,放烧复合伤组的电流幅度无显著差异,但开放概率增加非常显

著，放烧复合伤后开放时间常数 τ1 和 τ2 均比对照组显著增加，各放烧复合伤组关闭时间无明显变化。与放烧复合伤组相比，SB 组电流幅度无显著改变，开放时间常数 τ1 和 τ2 显著下降（$P<0.05$），通道开放概率下降非常显著（$P<0.01$）（表 1）。



1～3：对照组；4～6：放烧复合伤组；7,8：治疗组

图 2　通过细胞贴附式膜片钳方法记录到的各组 NMDA 受体通道的部分曲线图

表 1　各组 35pS 电导水平 NMDA 受体通道开放时间、电流幅度、开放概率及关闭时间的变化（$n=8$）

组别	开放时间（t/ms）		电流幅度（pA）	开放概率	关闭时间（t/ms）
	τ1	τ2			
对照组	0.516±0.092	3.41±0.381	−2.81±0.19	0.086±0.006	99.5±35.8
放烧复合伤组	0.713±0.098[a]	5.01±0.731[a]	−2.79±0.21	0.498±0.009[b]	93.1±42.1
治疗组	0.557±0.012[c]	3.81±0.479[c]	−2.84±0.13	0.225±0.007[bd]	95.1±28.7

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$ 与对照组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与放烧复合伤组比较

2.3　SB 对 MK-801 预处理小鼠放烧复合伤后 HPA 轴的影响

使用足量的 NMDA 受体阻断剂 MK-801 预处理使 NMDA 受体充分失活，然后将此类 NMDA 受体失活小鼠分为放烧复合伤组和放烧复合伤 SB 治疗组，与放烧复合伤组比较，SB 组血皮质醇（GC）水平和 ACTH 水平无显著差异，即 SB 未能再抑制放烧复合伤后血 GC 和 ACTH 的过度升高（图 3）。

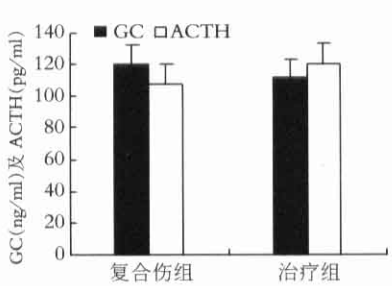


图 3　SB 对 MK-801 预处理小鼠放烧复合伤后 GC、ACTH 的影响

3　讨论

HPA 轴兴奋时，CRH 合成增加，刺激垂体前叶释放 ACTH，使肾上腺皮质释放皮质激素，血清皮质激素水平是其最终表现形式。我们参照文献，使用血 ACTH 及血 GC 的变化探讨严重创伤（放烧复合伤）HPA 轴的变化。

本实验结果显示：与正常对照组相比，放烧复合伤后血皮质醇（GC）水平及 ACTH 水平升高非常显著，表明放烧复合伤后 HPA 轴亢进；SB 组血皮质醇水平和 ACTH 水平虽然高于对照组，但显著底于放烧复合伤组。这表明 SB 确实可以抑制放烧复合伤后 HPA 轴的过度兴奋。

已经知道，放烧复合伤后 HPA 轴过度增加导致的免疫功能紊乱是细菌易感性增加的重要原因，而免疫功能紊乱导致的细菌易感性增加正是放烧复合伤动物死亡的首要原因，因此，我们的结果说明，SB 通过抑制放烧复合伤应激不良 HPA 轴的亢进，从而有助于严重创伤机体稳态的恢复。

关于 SB 对神经内分泌的研究已有很长的时间，早在 20 世纪 70 年代就证明了颈部交感神经阻滞对下丘脑—垂体的促性腺功能具有调节作用。动物实验显示，颈部交感神经阻滞可使丘脑下部的恒常性维持机能受到有益的影响。近年来研究表明：SB 可以调节多种激素以及神经肽的水平。Adachi 等[3]发现：颈部交感神经切断可以调节应激时机体多种与应激相关的激素的分泌如肾上腺皮质激素、β-内啡肽、α-MSH 等。我们的结果进一步证实 SB 促进应激状态下 HPA 轴稳态的恢复。

SB 通过何种途径抑制了放烧复合伤 HPA 轴的亢进还不清楚，一些研究提示，NMDA 受体可能是值得探索的重要环节。众所周知，NMDA 受体的磷酸化是 NMDA 受体激活的重要途径，人们发现：β-肾上腺素能受体通过 cAMP-蛋白激酶 A（cAMP-dependent protein kinase，PKA）影响 NMDA 受体的胞内磷酸化进而调节调节 NMDA 受体活性[9]，而脑部的 α 及 β 受体信号通路显然受颈部交感神经支配。我们过去的研究已经发现：NMDA 受体的激活是 HPA 轴亢进的重要原因，由此，我们推测，SB 抑制严重创伤（放烧复合伤）HPA 轴的亢进，其机制可能与 NMDA 受体密切相关。为此，我们先利用膜片钳（patch clamp）观察 SB 对 NMDA 受体通道特性的影响，再观察足量 MK-801 预处理后 SB 对 HPA 轴的影响。

实验中记录到的 NMDA 受体通道的开放呈现 35 pS 和 100 pS 两个电导水平，以 35 pS 电导水平的通道开放为主。与放烧复合伤组相比，在 35 pS 电导水平

的开放中,SB组电流幅度无显著改变,但通道开放概率下降非常显著,开放时间常数τ1和τ2分别比放烧复合伤组显著下降,表明SB确实可以抑制放烧复合伤后NMDA受体的过度激活,由于NMDA受体的激活是应激情况下HPA轴活性增加的主要原因,我们的结果初步说明,SB通过NMDA受体而抑制了放烧复合伤后HPA轴的过度激活。

为进一步验证此结果,我们利用足量NMDA受体拮抗剂预先阻断NMDA受体,使SB不再能够影响NMDA受体的活性,再观察此情况下SB能否影响放烧复合伤后HPA轴的活性,结果显示:经过足量的NMDA受体阻断剂预处理后,SB组血皮质醇水平和ACTH水平无显著差异,即SB未能再抑制放烧复合伤后血GC和ACTH的过度升高。这进一步证明SB通过作用于神经系统的NMDA受体而促进了放烧复合伤后HPA轴系统稳态的恢复。

参考文献:

[1] SEEMATTER G, BINNERT C, MARTIN J L, *et al*. Relationship between stress, inflammation and metabolism[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2004, 7(2): 169-173.

[2] LORTON D, LUBAHN C, BELLINGER D L. Potential use of drugs that target neural-immune pathways in the treatment of rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases[J]. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2003, 2(1): 1-30.

[3] ADACHI M, OTSUKI M, AKATSU M, *et al*. The effects of heat stimulation and cold stress on the rats with cervical sympathectomy[J]. Masui, 2003, 52(12): 1293-1299.

[4] 张丽红. 星状神经节阻滞的机制[J]. 国外医学:麻醉学与复苏分册, 2003, 24(2): 79-81.

[5] 陆建华,宋艳玲,黎海蒂,等. 海马NMDA受体在大鼠严重烫伤后HPA轴兴奋性变化中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(3): 216-218.

[6] 陆建华,粟永萍,程天民,等. 颈交感神经阻滞对放烧复合伤小鼠的治疗作用[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(12): 1253-1255.

[7] HANAMATSU N, YAMASHIRO M, SUMITOMO M, *et al*. Effectiveness of cervical sympathetic ganglia block on regeneration of the trigeminal nerve following transection in rats[J]. Reg Anesth Pain Med, 2002, 27(3): 268-276.

[8] 陆建华,黎海蒂,高京生,等. 严重烫伤后大鼠海马NMDA受体通道特性的变化[J]. 第三军医大学学报,2003,25(3):219-221.

[9] SWOPE S L, MOSS S J, RAYMOND L A, *et al*. Regulation of ligand-gated ion channels by protein phosphorylation[J]. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res, 1999, 33: 49-78.

(编辑 龙 亮)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2006)21-2114-01

用全自动医学分析仪测定正常Wistar大鼠部分血液学和生物化学参数

杜晓芹,邵卫国,王宪荣,何庆嘉 (第三军医大学西南医院神经外科,重庆 400038)

新的医学检验仪器与传统手工操作的方法相比,自动化、智能化及标准化程度都比较高,而且可测得的指标增加,临床上已广泛应用[1,2]。目前正常大鼠血液常规及生物化学指标的数据,仍沿用传统手工操作的方法。为此,建立新的参考值,有实际应用价值。

1 材料与方法

1.1 动物

健康Wistar大鼠9只,体质量151.4-191.6 g,雄性4只,雌性5只,购自第三军医大学实验动物中心,标准饲料和水供自由饮食,在实验室内适应性饲养1周后进行实验。

1.2 仪器和试剂

用日本SysmexXE2100全自动血细胞分析仪及原装试剂作血液常规检查。用美国Beckman公司Synchron Clinical System CX7全自动生化分析仪及原装试剂作血浆生物化学指标检查。

1.3 血液采集

大鼠在20%乌拉坦溶液腹腔注射(800 mg/kg)麻醉下,暴露并切断颈静脉,用含2.5% EDTA-K2盐水液0.2 ml或肝素钠的注射器,抽取2.0-2.5 ml血液置试管内待测。

1.4 观察指标

血液常规,9个血样中有4个测量后,室温放置10-25 min,再次测定。生物化学指标,一般临床观察及采血后作病理学检查,肉眼观察主要组织器官有否病理改变。

1.5 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用t检验。

2 结果

所有大鼠活动,进食及大便等均无异常。正常大鼠血液常规及血浆生物化学测量值列于表1,2。4只大鼠同一血液样品,两次测量血液常规获得值非常接近,无显著性差异($P>0.05$)。所有大鼠毛皮、黏膜及主要器官均无异常改变。

(下转2122页)

作者简介:杜晓芹(1968-),女,重庆市人,干管护师,主要从事临床护理等方面的研究。电话:(023)68754747

收稿日期:2005-11-18;修回日期:2006-02-18