文章编号:1000-5404(2007)08-0655-03

论著

颈交感神经阻滞对小鼠烧伤早期肝组织核因子-κB及其辅活化子的影响

李 军,粟永萍,王军平,艾国平,邹仲敏 (第三军医大学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)

提 要:目的 观察颈交感神经阻滞(sympathetic block, SB)对烧伤小鼠早期炎症介质核因子-κB(NF-κB)及其辅活化子的影响,初步探讨SB在严重创伤中治疗作用的分子机制。**方法** 将雄性昆明小鼠分为正常对照组、烧伤对照组、LSB组(烧伤后使用利多卡因进行SB治疗)、RSB组(烧伤后使用罗哌卡因进行SB治疗),每组5只。烧伤为TBSA 15%~20% Ⅲ度。烧伤后6 h采用Western blotting测定肝组织NF-κB P65、类固醇受体辅活化子-3(SRC-3)的蛋白表达及核转位。**结果** 烧伤对照组肝组织NF-κB P65、SRC-3蛋白表达水平及核转位显著增加;与烧伤对照组相比,LSB组NF-κB P65蛋白表达无显著变化,SRC-3蛋白表达及NF-κB P65、SRC-3核转位显著下调;RSB组NF-κB P65、SRC-3蛋白表达及核转位均显著低于烧伤对照组,且比LSB组下调更明显。**结论** 烧伤早期(6 h)NF-κB及其辅活化子SRC-3蛋白表达水平及核转位显著上调,SB在严重创伤中的治疗作用可能是通过抑制NF-κB功能活性,降低炎症反应程度而实现的。

关键词: 颈交感神经阻滞;烧伤;核因子-κB;类固醇受体辅活化子-3
中图法分类号: R-332;R45;R644.02 **文献标识码:** A

Effect of cervical sympathetic block on hepatic NF-κB and its coactivator during the early stage in burned mice

LI Jun, SU Yong-ping, WANG Jun-ping, AI Guo-ping, ZOU Zhong-min (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effect of cervical sympathetic block (SB) on NF-κB and its coactivator during the early stage in burned mice. Methods Kunming male mice were randomly divided into normal control, burn control, LSB group (treated immediately by SB with Lidocaine after burn injury) and RSB group (treated immediately by SB with Ropivacaine after burn injury). Third degree burn injury involving 15%–20% of TBSA was produced. At 6 h after burn, the expression and nuclear translocation of hepatic NF-κB P65 and steroid receptor coactivator-3 (SRC-3) were detected by Western blotting. Results After burn injury, the expression and nuclear translocation of hepatic NF-κB P65 and SRC-3 were markedly elevated as compared with normal control group. The level of SRC-3 and nuclear translocation of NF-κB P65 and SRC-3 in LSB group were significantly downregulated compared with that of burn control group, but the NF-κB P65 was no significant difference with that of burn control group. The expression and nuclear translocation of NF-κB P65 and SRC-3 in RSB group were obviously lower than burn control group and LSB group. Conclusion The expression and nuclear translocation of hepatic NF-κB P65 and SRC-3 are markedly elevated during the early stage of burn injury. SB can exert supression on the function of NF-κB and reduce the degree of systemic inflammatory response, which may be the mechanisms for therapeutic effect of SB on severe trauma.

Key words: cervical sympathetic block; burn injury; NF-κB; steroid receptor coactivator-3

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(G1999054201);海外青年学者合作研究基金(30328025)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, G1999054201) and the Joint Research Fund for Overseas Chinese Young Scholars (30328025)

作者简介: 李 军(1971-),男,四川省绵阳市人,博士研究生,主治医师,主要从事创伤应激方面的研究,发表论文13篇。电话:(023)68771725, E-mail: lj89199@163.com
通讯作者: 粟永萍,电话:(023)68752279, E-mail: suyp2003@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-09-15;**修回日期:** 2007-01-30

严重创伤后机体产生强烈的应激和炎症反应，引起明显的应激反应紊乱，导致全身炎症反应综合征（systemic inflammatory response syndrome，SIRS）、多器官功能障碍综合征（multiorgan dysfunction syndrome，MODS）等严重的全身性继发性损害，甚至死亡。这是诸多因素参与的内稳态失衡，单个分子调控难以奏效，通过神经性调控来恢复严重创伤后的稳态，对减轻或防治后续损害可能具有独到的效果。本所前期的研究结果表明，颈交感神经阻滞（sympathetic block，SB）可以抑制放烧复合伤后HPA轴的过度兴奋，并减少血清炎性细胞因子释放，显著降低放烧复合伤动物的死亡率[1,2]，但机制还不完全清楚。核因子-κB（nuclear factor-κB，NF-κB）是重要的炎症转录因子，在严重创伤后应激反应紊乱的发生发展中起着重要作用[3]，它的反式激活受到其辅活化子-类固醇受体辅活化子-3（steroid receptor coactivator-3，SRC-3）的调控[4]。现以烧伤模型研究SB对小鼠烧伤后早期NF-κB及其辅活化子SRC-3蛋白表达和核转位的影响，初步探讨SB在严重创伤中治疗作用的分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

超速低温离心机（德国Heraeus公司）；分光光度仪（美国Beckman公司）；电泳仪、凝胶成像分析系统（美国Bio-Rad公司）；组织蛋白提取液、核蛋白提取液（美国Pierce公司）；兔抗NF-κB P65多克隆抗体、小鼠抗SRC-3单克隆抗体（美国Santa Cruz公司）；辣根酶标记山羊抗兔IgG（H+L）、辣根酶标记山羊抗小鼠IgG（H+L）、浓缩型DAB试剂盒（北京中杉公司）。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及处理　20只健康雄性昆明小鼠（本校实验动物中心），体质量20～25 g，均背部去毛，分为正常对照组、烧伤对照组、LSB组（使用利多卡因进行SB治疗）、RSB组（使用罗哌卡因进行SB治疗），每组5只。烧伤对照组和两SB组均给予背部TBSA 15%～20% Ⅲ度烧伤，SB治疗在烧伤后立即进行。烧伤后6 h脱臼处死，取肝组织。

1.2.2 SB方法　参考Hanamatsu等[5]对小鼠进行双侧SB，注射的药物为0.5%利多卡因0.2 ml或0.125%罗哌卡因0.2 ml，注射后5 min观察小鼠是否出现类似于Horners综合征：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，待操作熟练后进行下一步实验。

1.2.3 肝组织总、核蛋白提取　分别取组织块100 mg，按组织总蛋白提取液、核蛋白提取液使用说明分离肝组织总蛋白和核蛋白，-70 ℃保存备用。

1.2.4 肝组织蛋白NF-κB P65、SRC-3 Western blotting分析

采用Bradford法测定蛋白浓度。各取蛋白40 μg行SDS-PAGE，电泳结束后半干转印1 h至PVDF膜。PVDF膜在封闭液（0.5% BSA、0.01 mol/L PBS）内封闭，4 ℃过夜。分别加入兔抗NF-κB P65多克隆抗体（1∶800）、小鼠抗SRC-3单克隆抗体（1∶200），37 ℃孵育2 h，PBST（0.01 mol/L PBS、0.02%吐温）洗膜5 min×3，再相应加入辣根酶标记山羊抗兔IgG、辣根酶标记山羊抗小鼠IgG（1∶500），37 ℃孵育1 h，PBST洗膜5 min×3，最后硫酸镍铵增强法（DAB显示试剂1 ml、2.5%硫酸镍铵）显色。结果通过凝胶成像分析系统扫描并分析各条带OD值×面积（Int×mm²）。

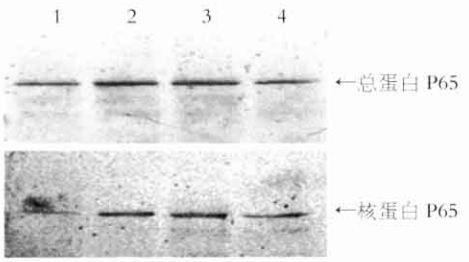
1.3 统计学处理

数据用$x \pm s$表示，采用SPSS 10.0统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 烧伤后NF-κB P65的蛋白表达及核转位

烧伤对照组、LSB组的肝组织NF-κB P65的蛋白表达水平较正常对照组显著升高，LSB组和RSB组与烧伤对照组相比显著下调（$P<0.05$，$P<0.01$），并且RSB组显著低于LSB组（$P<0.01$）；通过测定核内NF-κB P65的蛋白水平来反映其核转位情况，结果可见烧伤对照组、LSB组和RSB组NF-κB P65核转位显著增加，其中烧伤对照组增加最明显，LSB组和RSB组明显低于烧伤对照组（$P<0.01$），而RSB组显著低于LSB组（$P<0.01$）。见图1、表1。



1：正常对照组；2：烧伤对照组；3：LSB组；4：RSB组

图1 NF-κB P65 Western blotting分析

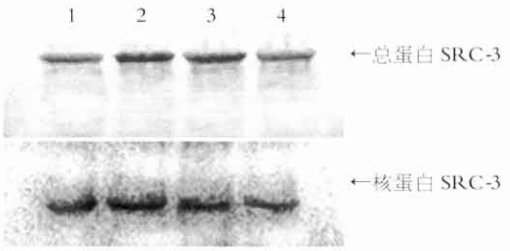
表1 SB对烧伤小鼠早期NF-κB、SRC-3蛋白表达和核转位的影响（Int×mm²，$n=5$，$x \pm s$）

组别	SRC-3		NF-κB	
	总蛋白	核蛋白	总蛋白	核蛋白
正常对照组	1 122.78±99.99	943.05±53.67	1 093.69±104.47	1 008.99±97.25
烧伤对照组	2 650.16±130.89[a]	1 882.45±84.77[a]	2 198.86±139.76[a]	2 455.35±109.62[a]
LSB组	2 563.22±152.63[a]	1 423.65±85.28[ac]	1 992.76±96.82[ab]	1 966.33±67.84[ac]
RSB组	1 563.56±103.74[acd]	932.69±53.69[cd]	1 100.49±108.78[cd]	1 536.38±87.07[acd]

a：$P<0.01$，与正常对照组比较；b：$P<0.05$，c：$P<0.01$，与烧伤对照组比较；d：$P<0.01$，与LSB组比较

2.2 烧伤后SRC-3的蛋白表达及核转位变化

烧伤对照组SRC-3蛋白表达水平及核转位显著增加，而LSB组和RSB组与烧伤对照组相比，SRC-3蛋白表达及核转位显著下调（$P<0.05$，$P<0.01$），但RSB组下调更明显。见图2、表1。



1：正常对照组；2：烧伤对照组；3：LSB 组；4：RSB 组

图 2　SRC-3 Western blotting 分析

3　讨论

SB 是将局部麻醉药注入到颈交感神经及其附近组织，以达到颈交感干、颈交感神经节与节前、节后神经及其支配范围区域性阻滞的目的。研究表明，SB 治疗使放烧复合伤后 5、7、10、15、20、30 d 的死亡率显著降低，7、14、21 d 血白细胞、红细胞及血小板数显著增加，提示 SB 对严重创伤动物具有明显的保护效应，可以成为严重创伤简单有效的治疗手段[2]，但机制还不清楚。

NF-κB 是重要的炎症转录因子，调节许多基因的表达，与炎症和免疫反应有密切关系。本实验结果显示，烧伤后小鼠肝组织 NF-κB P65 蛋白表达水平显著升高，核转位显著加强，而 SB 治疗可以不同程度抑制 NF-κB P65 的表达及核转位。严重烧伤后早期机体产生强烈的应激和炎症反应，引起明显的应激反应紊乱，主要表现为糖皮质激素抵抗（glucocorticoid resistance，GCR）、NF-κB 功能增强、炎性细胞因子大量产生，三者相互影响，互为因果，形成级联式放大效应，引发 SIRS[6-9]。研究显示，NF-κB 表达和活性的增加能降低糖皮质激素的生物学效应，阻断糖皮质激素受体（GR）的核转位[10]，还可引起 GRα mRNA、GRβ mRNA 不对称的增加，使 GRβ 占优势水平，从而导致 GCR[11]。因此，SB 治疗严重创伤的作用机制可能正是通过干预创伤后应激反应紊乱，调节 NF-κB 功能和炎性细胞因子的释放，降低 GCR 程度，从而抑制 SIRS 的发生发展。前期研究表明 SB 治疗使放烧复合伤后 3、6、14 d 的血清炎性细胞因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平显著下降[2]也证实这一点。

NF-κB 的功能状况对炎性细胞因子的产生至关重要。SRC-3 是 NF-κB 的辅活化子，在 NF-κB 介导的免疫和炎症反应中扮演重要的作用，过度表达的 SRC-3 以剂量依赖的模式显著提高 NF-κB 转录活性[4]。小鼠 TBSA 15% ~20% Ⅲ度烧伤后早期（6 h）肝组织 SRC-3 蛋白表达水平及核转位显著增加，给予 SB 治疗后对其具有显著的抑制作用，进一步提示 SB 在严重创伤中的治疗作用可能也是通过抑制 SRC-3 的辅活化作用，从而降低 NF-κB 功能活性，减轻炎症反应程度而实现的。

严重烧伤后 SB 治疗中使用利多卡因或罗哌卡因对肝组织 NF-κB P65 及其辅活化子 SRC-3 蛋白表达及核转位的抑制作用程度不同，可能与两种药物作用时间有关。利多卡因在体内消除快，半衰期仅为 1.5 h，而罗哌卡因作用时间相对较长，半衰期为 4 h。SB 治疗使用罗哌卡因其作用可维持 2 ~6 h，本实验选择烧伤后 6 h 采集标本，基本上在 SB 有效作用时间内，因此，尽管同是局部麻醉药，但罗哌卡因比利多卡因更有效。

参考文献：

[1] 陆建华，陶　军，叶建宁，等. 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[J]. 第三军医大学学报，2006，28（21）：2111 -2114.

[2] 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.

[3] 李　军，刘合年，粟永萍，等. 地西泮-氯胺酮对烧伤小鼠肝组织 c-Jun、NF-κB 的影响[J]. 临床麻醉学杂志，2004，20（1）：26 -28.

[4] Werbajh S，Nojek I，Lanz R，*et al*. RAC-3 is a NF-kappa B coactivator[J]. FEBS Lett，2000，485（2-3）：195 -199.

[5] 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.

[6] 李　军，粟永萍，徐建明，等. 安定-氯胺酮麻醉对烧伤小鼠早期炎症反应的影响[J]. 中华麻醉学杂志，2005，25（3）：190 -192.

[7] 李　军，史　忠，粟永萍. 烧伤后小鼠血清皮质酮及肝组织糖皮质激素受体水平的变化[J]. 第三军医大学学报，2002，24（12）：1427 -1429.

[8] 王明海，太光平，张雅萍，等. 重组腺病毒对烫伤大鼠肝组织核因子-κB 活性的调控[J]. 中华烧伤杂志，2002，18（1）：42 -44.

[9] 王军平，粟永萍，赵景宏，等. TNF-α 和 IL-1 对大鼠肝细胞糖皮质激素受体表达及功能的影响[J]. 第三军医大学学报，2002，24（5）：585 -587.

[10] Okabe T，Yanase T，Nawada H. The role of AP-1 and NF-kappaB in glucocorticoid resistance[J]. Nippon Rinsho，2005，63（9）：1654 -1659.

[11] Webster J C，Oakley R H，Jewell C M，*et al*. Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform：a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance[J]. Proc Natl Acad Sci USA，2001，98（12）：6865 -6870.

（编辑　郭建秀）