论著

文章编号:1000-5404(2007)04-0284-03

颈交感神经阻滞调节放烧复合伤小鼠巨噬细胞GR的表达及细胞因子分泌的影响

陆建华[1],粟永萍[1],陶 军[2],叶建宁[3] (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(cervical sympathetic ganglia block, SB)在放烧复合伤小鼠腹腔巨噬细胞糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)表达及炎性细胞因子分泌中的作用。**方法** TBSA 15% Ⅲ度烧伤合并5 Gy放射损伤小鼠分为单纯放烧复合伤组、放烧复合伤后单侧颈部SB治疗组、放烧复合伤后双侧颈部SB治疗组,另设正常对照组,每组8只,比较各组巨噬细胞GR水平及巨噬细胞分泌炎性细胞因子TNF-α、IL-1β、IL-6的差异。**结果** 单侧及双侧SB组腹腔巨噬细胞GR蛋白水平均显著高于放烧复合伤组($P<0.01$),单侧及双侧SB组腹腔巨噬细胞分泌TNF-α、IL-1β、IL-6的作用均显著低于放烧复合伤组($P<0.05$)。放烧复合伤后颈部单侧SB组与双侧SB组间巨噬细胞GR蛋白水平及TNF-α、IL-1β、IL-6的表达释放无明显差异($P>0.05$)。**结论** 单侧或双侧颈部SB均可改善放烧复合伤巨噬细胞GR功能,抑制其过度分泌炎性细胞因子。

关键词: 颈交感神经节;阻滞;放烧复合伤;巨噬细胞,糖皮质激素受体;细胞因子

中图法分类号: R392.32;R644;R818.74 **文献标识码:** A

Effects of cervical sympathetic ganglia block on GR expression and cytokine release of macrophage in mice with combined radiation and burn injury

LU Jian-hua[1], SU Yong-ping[1], TAO Jun[2], YE Jian-ning[3] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injurg, Colleg of Preventive Medicine, Chongqing 400038, [2]Department of Anesthesiology, [3]Department of Neurology, Xingiao Hospital Third Militnry Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore the roles of cervical sympathetic ganglia block (SB) in glucocorticoid receptor(GR), protein levels and proinflammatory cytokine release of peritoneal macrophage in mice with combined radiation and burn injury. **Methods** Thirty-two Kunming mice were divided into control group, injury group (inflicted with 5 Gy irradiation and 15% TBSA full thickness burn injury), unilateral SB (inflicted with injury, treated daily by unilateral cervical SB) and bilateral SB group (inflicted with injury, treated daily by bilateral cervical SB). The roles of SB were evaluated by comparing GR protein levels and proinflammatory cytokine (TNF-α, IL-1β, IL-6) release of peritoneal macrophage in each group. **Results** Compared with control group, GR protein levels in injury group decreased significantly. The levels of unilateral SB and bilateral SB group were lower than that of control group but higher than that of injury group. Proinflammatory cytokine (TNF-α, IL-1β, IL-6) release in unilateral SB and bilateral SB groups was higher than that in control group but significantly lower than injury group. There were no significant differences of GR protein levels and proinflammatory cytokine (TNF-α, IL-1β, IL-6) release between unilateral SB and bilateral SB groups. **Conclusion** Bilateral SB and unilateral SB can be an effective therapeutic approach for ameliorating GR function and controlling inflammatory response of peritoneal macrophage following severe trauma.

Key words: cervical sympathetic ganglia block; combined radiation and burn injury; macrophage; glucocorticoid receptor; proinflammatory cytokine

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);国家自然科学基金重点项目(30230360)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China("973" Projects, G1999054201), the China-Joint Research Fund for Overseas Chinese Young Scholars(30328025) and the Key Program of the National Natural Science Foundation(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救治方面的研究,现在广州军区广州总医院全军临床麻醉中心。电话:13719347650

通讯作者: 粟永萍,E-mail: suyping@yahoo.com

收稿日期: 2005-10-21;**修回日期:** 2006-11-21

巨噬细胞被誉为细胞因子工厂，巨噬细胞糖皮质激素受体（glucocorticoid receptor，GR）水平下降导致的炎性细胞因子的过度分泌是严重创伤后系统性炎性反应综合征（SIRS）发生的首要原因，因此，设法调控巨噬细胞 GR 功能，抑制巨噬细胞过度的炎性反应有助于创伤救治。然而，目前诸多手段的效果均不理想[1]。我们以小鼠颈部交感神经阻滞（cervical sympathetic ganglia block，SB），模拟星状神经节阻滞（stellate ganglion block，SGB），研究了 SB 对放烧复合伤小鼠腹腔巨噬细胞 GR 蛋白水平及其分泌炎性细胞因子的影响。

1　材料与方法

1.1　主要试剂

TNF-α、IL-1β、IL-6 ELISA kit 为金美公司产品，利多卡因由第三军医大学新桥医院麻醉科提供，兔抗小鼠-GR 为 Santa Cruz 公司产品。

1.2　动物分组及处理

32 只健康昆明小鼠，雌雄不拘，体质量 20～40 g，由本校实验动物中心提供，分为 4 组，每组 8 只：①对照组。②单纯放烧复合伤组：动物仅给予放烧复合伤。③单侧 SB 组：动物给予放烧复合伤，伤后每天左颈部给予 SB。④双侧 SB 组：动物给予放烧复合伤，伤后每天于左颈部给予 SB，15 min 后对右侧颈部也给予 SB。各组于伤后 3 d 收集腹腔巨噬细胞，观察巨噬细胞 GR 蛋白水平表达及炎性细胞因子（TNF-α、IL-1β、IL-6）分泌的变化。

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 Hanamatsu 等[2]的方法对小鼠进行 SB，注射 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　腹腔巨噬细胞的分离

股动脉放血处死小鼠，PBS 灌洗腹腔，收集腹腔灌洗液，1 200 × *g* 离心 3 min，弃上清。以 5～10 ml 含 10% 胎牛血清的 MEM 培养基重悬细胞。37 ℃孵育 2 h。

1.6　TNF-α、IL-1β、IL-6 的检测

将细胞培养上清标本及试剂盒所有成分放置室温 30 min，按 ELISA kit 说明操作。

1.7　Western blot 检测巨噬细胞 GR 蛋白水平的表达

收集细胞，用冰预冷 PBS 洗 3 遍，低速离心沉淀细胞，去上清。加 500 μl 细胞裂解液（Pierce 公司），冰上 30 min，间断吹打；4 ℃，12 000 × *g*，离心；取上清分装，50 μl/管。Bradford 法蛋白定量，40 μg 总蛋白上样，SDS-PAGE 电泳，以湿转法电转移至 PVDF 膜上。将 PVDF 膜浸入封闭液，4 ℃过夜，加入一抗（GR 单抗，1∶400）孵育，洗膜；加入二抗（1∶300）孵育，洗膜；加入三抗（1∶300）孵育，洗膜；将膜放入 DAB 溶液中显色，膜上的目的蛋白条带在 Gel Doc 2000 凝胶成像系统上分析处理，GR 蛋白含量以 ODu × mm^2 表示。

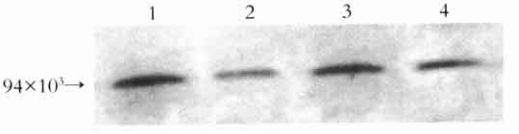
1.8　统计学处理

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

2　结果

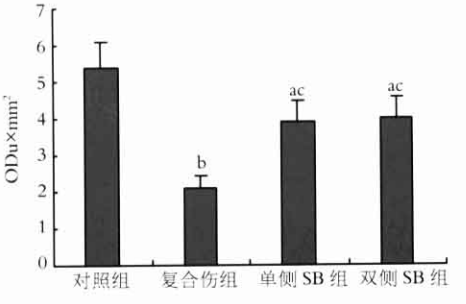
2.1　SB 对放烧复合伤小鼠腹腔巨噬细胞 GR 水平的影响

通过 Western blot 方法，分别检测到了分子量约为 94×10^3 的小鼠腹腔巨噬细胞 GR 蛋白条带（图 1）。条带在 Gel Doc 2000 凝胶成像系统上分析处理后显示，与对照组相比，放烧复合伤后腹腔巨噬细胞 GR 蛋白水平下降非常显著（$P < 0.01$），单侧 SB 组 GR 水平低于对照组（$P < 0.05$），但显著高于放烧复合伤组（$P < 0.01$）。双侧 SB 组腹腔巨噬细胞 GR 也显著低于对照组（$P < 0.05$），但显著高于放烧复合伤组相（$P < 0.01$）。单侧 SB 组与双侧 SB 组之间腹腔巨噬细胞 GR 水平无明显差异（$P > 0.05$）（图 2）。



1：对照组；2：单纯放烧复合伤组；3：单侧 SB 组；4：双侧 SB 组

图 1　各组腹腔巨噬细胞 GR 蛋白条带

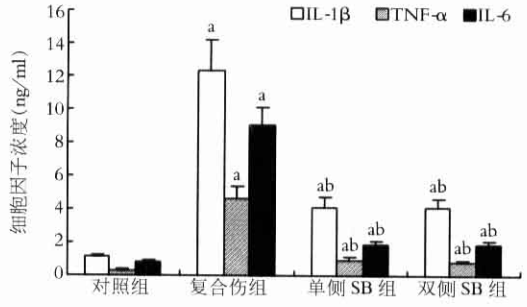


a：$P < 0.05$，b：$P < 0.01$，与对照组比较；c：$P < 0.01$，与复合伤组比较

图 2　SB 治疗后放烧复合伤小鼠腹腔巨噬细胞 GR 水平的变化

2.2　SB 对放烧复合伤小鼠腹腔巨噬细胞分泌炎性细胞因子的影响

与对照组相比，放烧复合伤后腹腔巨噬细胞 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平显著升高（$P < 0.05$）。单侧 SB 组 TNF-α、IL-1、IL-6 表达释放水平高于对照组（$P < 0.05$），但显著低于放烧复合伤组（$P < 0.01$）。双侧 SB 组腹腔巨噬细胞炎性细胞因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 的表达释放高于对照组（$P < 0.05$），显著低于放烧复合伤组（$P < 0.01$）。单侧 SB 组与双侧 SB 组之间的腹腔巨噬细胞分泌 TNF-α、IL－1β、IL-6 能力无显著差异（$P > 0.05$）（图 3）。



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

图3 SB对放烧复合伤小鼠腹腔巨噬细胞分泌TNF-α、IL-1β、IL-6的影响

3 讨论

SGB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的区域性阻滞。SGB广泛用于治疗许多疾病,效果良好[3],其新的治疗作用也不断被发现。

现在观点认为SGB可以使机体的免疫功能保持衡常性稳定。严重创伤后的SIRS乃至于多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的重要原因就是GR功能下降、炎性反应过度导致的免疫系统稳态失衡,那么,SGB能否促进严重创伤后巨噬细胞GR功能的恢复,抑制巨噬细胞炎性细胞因子的过度分泌,从而促进严重创伤后免疫功能的恢复仍然不清楚。

小鼠没有星状神经节,但给小鼠施行SB可以产生类似人SGB的作用,我们对放烧复合伤小鼠施行SB治疗,以探讨SGB能否促进严重创伤后巨噬细胞GR功能的恢复,抑制巨噬细胞过度分泌炎性细胞因子。结果显示:与单纯放烧复合伤组相比,单侧SB及双侧SB治疗均可明显增加放烧复合伤小鼠腹腔巨噬细胞GR水平,这表明,SB确实可以促进严重创伤后巨噬细胞GR水平的恢复,从而改善严重创伤后组织细胞的GR功能。

结果还显示放烧复合伤后腹腔巨噬细胞炎性细胞因子TNF-α、IL-1β、IL-6的分泌释放明显增加,单侧SB组腹腔巨噬细胞TNF-α、IL-1β、IL-6释放水平显著低于放烧复合伤组,双侧SB组腹腔巨噬细胞TNF-α、IL-1β、IL-6的表达释放也明显低于复合伤组,这表明SB治疗可明显抑制放烧复合伤小鼠腹腔巨噬细胞过度分泌炎性细胞因子。由于炎性细胞因子的过度分泌(免疫功能稳态失调)导致的SIRS乃至于MODS是严重创伤应激反应最严重的并发症,因此,上述结果说明SB可能有助于促进放烧复合伤动物免疫功能稳态的恢复,防治放烧复合伤MODS等并发症的发生,从而对严重创伤(放烧复合伤)动物具有保护效应。鉴于颈部SB可以产生类似人SGB的作用,因此,SGB可能成为防治放烧复合伤MODS等并发症发生的手段。

糖皮质激素(glucocorticoid, GC)具有参与机体应激反应、抗炎等作用,而GC的这些生物学作用基本都是通过活化GR而由后者最终实施的。作为一种核转录调控因子,GR活化后能够抑制多种化学介质和炎性细胞因子如TNF-α、IL-1β、IL-6的生成与释放,所以GR在机体调控炎症反应中起着非常重要的作用[4]。复合伤研究所前期的研究及大量文献也证实,严重创伤后GR水平下降导致的GC效应抵制是炎性细胞因子TNF-α、IL-1β、IL-6等过度分泌(免疫功能失调)的关键环节[5,6]。由此我们推测,本实验中SB抑制严重创伤后炎性细胞因子的过度分泌,可能是通过促进了放烧复合伤小鼠巨噬细胞GR水平的恢复引起的。

另外,我们的实验结果还显示单侧SB组与双侧SB组之间的腹腔巨噬细胞GR水平及TNF-α、IL-1β、IL-6的分泌释放无显著差异,结合前面的结果,说明单侧SB就可以达到双侧SB促进放烧复合伤后小鼠免疫功能稳态恢复的效果。

SB如何改善严重创伤(放烧复合伤)后的GR功能,抑制严重创伤后的炎性反应过度仍然不清楚,其深入的机制还有待阐明,最可能的途径是通过抑制严重创伤应激后交感神经系统的过度兴奋而起作用。众所周知,许多药物可以抑制交感神经系统的兴奋,但往往也造成了对心血管系统的干扰,这对严重创伤后的休克是不利的,但SB却没有这方面的副作用,Koyama等[7]发现人SGB抑制心脏交感神经的兴奋,但不会影响血压和心功能,反而会增加心肌供血。这提示我们SB作为严重创伤的治疗手段,可能具有独到的优势。

参考文献:

[1] Hotchkiss R S, Karl I E. The Pathophysiology and treatment of sepsis [J]. N Engl J Med, 2003, 348(2): 138-150.

[2] 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.

[3] Marples I L, Atkinson R E. Stellate ganglion block[J]. Pain Rev, 2001, 8(1): 3-11.

[4] Wright A P, Zilliacus J, Mcewan I J, *et al*. Structure and function of the glucocorticoid receptor[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 1993, 47(1-6): 11-19.

[5] 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

[6] Liu D H, Su Y P, Zhang W, *et al*. Downregulation of glucocorticoid receptors of liver cytosols and the role of the inflammatory cytokines in pathological stress in scalded rats[J]. Burns, 2002, 28(4): 315-320.

[7] Koyama S, Sato N, Nagashima K, *et al*. Effects of right stellate ganglion block on the autonomic nervous function of the heart: a study using the head-up tilt test[J]. Circ J, 2002, 66(7): 645-648.

(编辑 王小寒)