文章编号:1000-5404(2007)17-1647-03

论著

颈交感神经阻滞对烧伤早期小鼠肝脏干扰素诱导蛋白IFIT1表达的影响

郭晓姝[1,2],方海立[2],李 军[1],粟永萍[1] ([1]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;[2]重庆医科大学基础医学院生理学教研室,重庆 400016)

提 要:目的 检测干扰素诱导蛋白IFIT1(interferon-induced protein with tetratricopetide repeats 1)在小鼠各器官组织的表达状况,并在此基础上探讨颈交感神经阻滞(SB)对烧伤后早期小鼠肝脏IFIT1表达的影响。**方法** 雄性C57/129小鼠50只,分为对照组和SB治疗组,TBSA 15%~20% Ⅲ度小鼠烧伤模型,分别于烧伤前、烧伤后1、6、12 h和24 h取肝组织,采用免疫印迹法(Western blot)观察IFIT1的蛋白表达情况,同时提取正常小鼠心、肝、脾、肺、肾、小肠、淋巴细胞和骨骼肌组织RNA,以RT-PCR检测IFIT1表达情况。**结果** RT-PCR结果显示IFIT1在正常小鼠各组织均有表达,但组织间的表达量存在差异。Western blot结果表明对照组烧伤后肝组织IFIT1表达显著增高($P<0.01$),烧伤后SB治疗组IFIT1表达量较对照组相应时相点降低非常显著($P<0.01$)。**结论** IFIT1在小鼠体内广泛表达。SB对严重创伤的治疗作用可能是通过抑制肝内IFIT1表达来实现的。

关键词: IFIT1;颈交感神经阻滞;烧伤
中图法分类号: R392.11;R614.4;R644.02 **文献标识码:** A

Effect of cervical sympathetic block on hepatic interferon-induced protein IFIT1 in burned mice during early stage

GUO Xiao-shu[1,2], FANG Hai-li[2], LI Jun[1], SU Yong-ping[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University; Chongqing 400038; [2]Department of Physiology, School of Preclinical Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To study the expression of interferon-induced protein with tetratricopetide repeats 1 (IFIT1) in various organs of mice and detect the effect of cervical sympathetic block (SB) on hepatic IFIT1 during the early stage in burned mice. **Methods** Fifty male C57/129 mice inflicted with 15% -20% TBSA full thickness burn injury were divided randomly into control group (untreated by SB) and SB group (treated immediately by SB). Hepatic tissue was taken before burn injury and at 1st h, 6th h, 12th h, and 24th h after burn injury. The protein expression level of IFIT1 was measured by Western blot. RNA was extracted from the heart, liver, spleen, lung, kidney, small intestine, lymphocyte and skeletal muscle of normal mice; then the RNA expression level of IFIT1 was detected by RT-PCR. **Results** The RNA expression of IFIT1 was detected in heart, liver, spleen, lung, kidney, small intestine, lymphocyte and skeletal muscle of normal mice, but there was difference in various organs. The result of Western blot displayed that the protein expression level of IFIT1 in control group increased significantly ($P<0.01$). The level of IFIT1 in SB group was decreased significantly at different time points after burn injury as compared with the control group ($P<0.01$). **Conclusion** IFIT1 is generally expressed in various organs of mice. SB could enhance the function of GR by exerting suppression on IFIT1 level.

Key words: IFIT1; cervical sympathetic block; burn injury

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(G1999054201);国家自然科学基金海外学者合作研究项目(30328025);创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室开放课题(2004)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects) (G1999054201), the National Natural Science foundation of China -Joint Research Fund for Overseas Chinese Scholars (30328025) and the Open Projects of State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury (2004)

作者简介: 郭晓姝(1973-),女,山西省怀仁县人,硕士研究生,医师,主要从事颈交感阻滞对严重创伤救治方面的研究。电话:13637800358,E-mail:guoxiaoshu999@yahoo.com.cn
通讯作者: 粟永萍,电话:(023)68752279, E-mail:suyp2003@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-10-20;**修回日期:** 2006-12-18

糖皮质激素(glucocorticoid, GC)是应激反应的主要激素之一,其生物学效应的发挥取决于靶细胞上的糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)的介导。GR 与机体创伤后的应激和炎症反应密切相关。本研究所以 GR 配体结合区 GR-LBD(GR-ligand binding domain)为诱饵,采用酵母双杂交方法从人骨髓 cDNA 文库筛选到干扰素诱导蛋白 IFIT1(interferon-induced protein with tetratricopetide repeats 1),提示 IFIT1 与 GR 之间可能存在着相互作用[1]。IFIT1 是人类细胞经干扰素诱导产生的最为丰富的蛋白质,相对分子质量为 56×10^3,小鼠同源蛋白相对分子质量为 54×10^3[2]。在研究中我们发现严重烧伤后 IFIT1 表达增多,由此分析增多的 IFIT1 与 GR 结合,导致转录活性降低,GR 的抗炎能力减弱,过度炎症反应发生。如果能够阻断该过程,就可以防止或减轻全身炎症反应综合征(SIRS)的发生,起到积极的治疗效果。颈交感神经阻滞(cervical sympathetic block, SB)作为一种疼痛治疗方法[3],在国内外已被广泛采用。本所前期的研究也表明,SB 可明显降低放烧复合伤小鼠的死亡率,促进小鼠内分泌、免疫和造血等功能的恢复[4],但机制未明,本研究重点探讨 SB 对烧伤后早期小鼠肝脏 IFIT1 的表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

DNA marker(TaKaRa 公司);TriPure(Roche 公司);One Step RNA PCR Kit(TaKaRa 公司);引物合成(上海宝生物公司);0.1% 罗哌卡因(瑞典 AstraZeneca 公司);兔抗鼠 IFIT1 多克隆抗体(前期制备[5]);羊抗兔 IgG-HRP(北京中山);Action(Sunta Cruz 公司);SDS-PAGE 电泳仪(Bio-Rad USA);半干转印仪(Bio-Rad USA);数码二维成像分析系统(Bio-Rad USA);紫外可见光分光光度(BIO-RAD);雄性 C57/129 小鼠 50 只(本实验室提供),体质量 20~22 g。

1.2 方法

1.2.1 半定量 RT-PCR 法检测 IFIT1 RNA 取正常小鼠心、肝、脾、肺、肾、小肠、淋巴细胞和骨骼肌各器官组织各约 40 mg,用组织研磨器混合 1 ml Tripute 试剂提取组织 RNA,经紫外分光光度计测定 RNA 含量。内参照 β-actin 上、下游引物分别为:5′-TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT-3′, 5′-CACGATGGAGGGGCCGGACTCATC-3′,预期扩增产物长度为 241 bp;IFIT1 上、下游引物分别为:5′-GCTACCACCTTTACAGCAACCAT-3′,5′-AATCTTGG CGATAGGCTACGACT-3′,预期扩增产物长度为 580 bp。按照 One Step RT-PCR 设定反应条件:RT 反应 50 ℃ 15 min,RTase 失活 94 ℃ 2 min,94 ℃ 30 s,59 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min 30 s;共 28 个循环。取 10 μl 产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,对照分子质量标准检测扩增结果,凝胶成像系统扫描。

1.2.2 Western blot 检测 IFIT1 蛋白的表达 将 50 只 C57/129 小鼠分为 2 组:对照组和 SB 治疗组($n=25$)。两组均采用 TBSA 15%~20% Ⅲ度小鼠烧伤模型,在烧伤后即刻,SB 治疗组采用颈后穿刺法,双侧注射 0.1% 罗哌卡因各 0.1 ml。分别于烧伤后 1、6、12 h 和 24 h 各取 5 只小鼠脱颈处死取肝组织。蛋白提取液提取肝组织总蛋白,采用 Bradford 方法测定浓度,取 40 μg 行 10% SDS-PAGE 电泳,半干电转印 2 h,5% 脱脂奶粉 4 ℃封闭过夜,兔抗鼠 IFIT1 多克隆抗体 1∶50,4 ℃孵育过夜,滴加羊抗兔 IgG-HRP 1∶5 000,37 ℃孵育 2 h,0.01 mmol/L 磷酸盐缓冲液 Tween-20(PBST)洗膜,二氨基联苯胺(DAB)显色,凝胶成像系统分析结果。

1.3 统计学分析

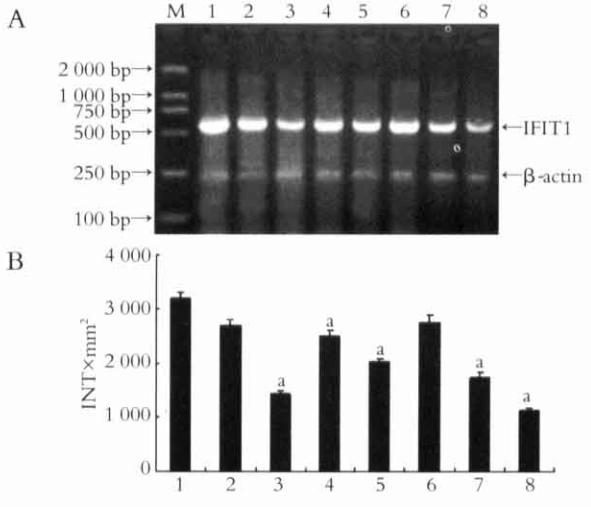
数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件,多组内比较采用单因素方差分析,组间差异比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 半定量 RT-PCR 结果

按上述条件 PCR 的扩增产物,经电泳证实为 580 bp 的 IFIT1 和 241 bp 的 β-actin 片段,与预期的产物大小相同(图 1)。从图 1A 可见,在小鼠的心、肝、脾、肺、肾、小肠、淋巴细胞和骨骼肌组织中均有 IFIT1 的表达,因此提示 IFIT1 在小鼠体内是普遍表达的。

经统计分析表明,IFIT1 的表达在肝和小肠之间无显著差异($P=0.307$),其他各组之间均存在显著性差异($P<0.05$),其中肝组织的表达量仅次于心脏(图 1B),加之肝脏体积大,便于足量取材,故宜作为下一步实验的组织。



M:标准;1-8 分别为心、肝、脾、肺、肾、小肠、淋巴细胞和骨骼肌;a:$P<0.05$,各组织间比较 A: RT-PCR; B: 灰度分析

图 1 正常小鼠各器官 IFIT1 表达情况

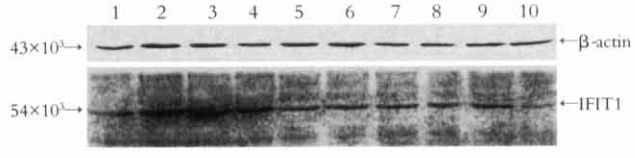
2.2 Western blot 检测各组肝 IFIT1 蛋白表达

凝胶成像扫描系统分析结果见表 1。对照组小鼠烧伤后早期(1 h)肝组织 IFIT1 蛋白表达开始显著增加,6 h 达到高峰,以后逐渐恢复,24 h 与烧伤前相比无显著差异($P>0.05$);SB 治疗组小鼠肝组织 IFIT1 蛋白表达在烧伤后 1、12 h 显著高于烧伤前($P<0.01$),24 h 显著低于烧伤前($P<0.01$);并且 SB 治疗组在各时相点显著低于对照组($P<0.01$),见图 2。

表 1　SB 治疗对烧伤小鼠肝组织 IFIT1 蛋白表达的影响（$\bar{x} \pm s$，$n=5$，INT × mm²）

组别	烧伤前	烧伤后			
		1 h	6 h	12 h	24 h
对照组	937.4 ± 15.6	2 479.3 ± 80.2[a]	2 597.9 ± 73.7[a]	1 502.1 ± 57.4[a]	962.6 ± 48.3
t	–	37.748	44.088	18.987	0.994
P	–	0.000	0.000	0.000	0.382
SB 治疗组	1 016.8 ± 58.7	1 238.2 ± 97.4[ab]	984.8 ± 69.4[b]	1 271.1 ± 66.0[ab]	801.8 ± 63.1[ab]
t	–	3.894	0.705	5.757	4.991
P	–	0.008	0.507	0.001	0.002
t_1	–	19.671	31.860	5.279	4.048
P_1	–	0.000	0.000	0.002	0.007

a：$P<0.01$，与烧伤前比较；b：$P<0.01$，与对照组比较



1－5：对照组，正常、单烧 1、6、12、24 h；6－10：SB 治疗组，正常＋SB、烧伤＋SB 1、6、12、24 h

图 2　肝脏 IFIT1 蛋白表达的变化

3　讨论

本研究首先检测了正常小鼠 IFIT1 在多个器官的表达情况。从实验结果可见，IFIT1 在体内普遍存在尤以心脏、肝脏和小肠组织中的表达量相对较为丰富。肝脏作为机体物质代谢和能量代谢的重要脏器，在应激反应中 IFIT1 表达有无改变以及这些改变是否会对应激过后的体内功能活动造成影响，少见相关文献报道。仅有国外文献报道，病毒感染、双链 RNA 和干扰素均能诱导相关细胞 IFIT1 的表达。IFIT1 通过结合真核生物起始因子的亚单位，随后干扰三聚体 eIF3/eIF2. GTP. Met-tRNA 的相互作用而抑制翻译过程[6]。

烧伤迄今为止仍居创伤死亡率之首。严重创伤后 GC 增多，不仅仅是因为下丘脑-垂体-肾上腺（HPA）轴过度兴奋，皮质醇大量分泌所致，还与海马 GR 表达降低，使其对 HPA 轴的负反馈作用减弱有关。烧伤应激早期机体促炎和抗炎反应为保持机体内稳态的平衡不断进行调控。但是，当促炎介质的释放量过多或抗炎介质释放过少时，则破坏了这种平衡，导致感染的发生发展，表现为体内过度炎症反应——SIRS 的发生[7]。本实验室前期报道[1]，在严重烫伤或烧伤早期存在多种器官组织 GR 减少、功能减弱的现象，同时血清中参与全身炎症反应的细胞因子 TNF-α、IL-1、IL-6 的浓度显著升高，由此认为 IFIT1 作为 GR 功能的辅阻遏子，通过与 GR 结合导致其转录活性降低，而 GR 减少与高细胞因子血症，高 IFIT1 表达之间互为因果关系，呈级联放大效应，最终促进了 SIRS 的发生。

颈交感神经阻滞最初用来治疗一些疼痛性疾病[3]，然而新近的研究表明，由于 SB 可以影响体内多系统多器官功能活动的改变，使其在原发性高血压、糖尿病等的治疗中具有一定的疗效。本实验室曾报道过Ⅲ度烧伤小鼠肝组织 GR 在烧伤后 2 h 即表现减少，4～6 h 降到最低，24 h 后仍未恢复正常[8]。本研究也表明，烧伤后 1 h 小鼠肝组织 IFIT1 就已显著增高，烧伤后 6 h 升至最高，伤后 24 h 仍未恢复正常。而 SB 组与对照组相比，在所观察的各时相点均可显著降低小鼠肝组织 IFIT1 表达，我们猜测这一结果可能与罗哌卡因阻断颈交感神经，从而减少了 IFIT1 与 GR 结合，防止应激反应的过度发生有关，由此起到保护作用。另外 SB 也可以抑制过度兴奋的交感－肾上腺髓质系统[9,10]，降低体内交感神经功能，使其所支配的组织器官血流量增加，通过改善下丘脑的血液循环，调理下丘脑[11,12]，以促进机体内稳态的恢复。

参考文献：

[1] 李淑蓉，粟永萍，刘晓宏，等. 干扰素诱导蛋白 P56 与糖皮质激素受体的相互作用及对其转录活性的影响[J]. 生物化学与生物物理进展，2004，31(9)：791－795.

[2] Guo J, Peters K L, Sen G C. Induction of the human protein P56 by interferon, double-stranded RNA, or virus infection[J]. Virology, 2000, 267(2): 209－219.

[3] 孟庆云，柳顺锁，刘志双. 神经阻滞学[M]. 北京：人民卫生出版社，2003：308－338.

[4] 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.

[5] 郭晓姝，李洪涛，方海立，等. 小鼠 IFIT1 多克隆抗体的制备[J]. 第三军医大学学报，2007，29(15)：1462－1464.

[6] Hui D J, Terenzi F, Merrick W C, *et al*. Mouse P56 blocks a distinct function of eukaryotic initiation factor 3 in translation initiation[J]. J Biol Chem, 2005, 280(5): 3433－3440.

[7] 庄心良，曾因明，陈伯銮. 现代麻醉学[M]. 第 3 版. 北京：人民卫生出版社，2003：172－174.

[8] 李　军，史　忠，粟永萍，等. 烧伤小鼠肝组织糖皮质激素受体的变化[J]. 中国急救医学，2002，22(6)：311－313.

[9] 王贤裕，王清秀，杨　光. 星状神经节阻滞对兔血浆去甲肾上腺素浓度的影响[J]. 中华麻醉学杂志，2001，21(7)：420－422.

[10] Iwade M, Fukuuchi A, Kawamata M, *et al*. Management of severe pain after extended maxillectomy in a patient with carcinoma of the maxillary sinus[J]. Masui, 1996, 45(1): 82－85.

[11] 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.

[12] 王　涛，艾国平，杜智勇，等. 轻度肠型放-烧复合伤救治的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2005，27(21)：2099－2102.

（编辑　汪勤俭）