doi:10.11659/jjssx.06E016020

·基础研究·

大鼠肝部分切除术后腹腔神经丛阻滞抑制早期应激反应

魏晓红[1],林 露[1],李 军[2],牛 洁[2],刘小燕[1] (1.成都军区总医院心血管外科,四川 成都 610083;2.成都军区总医院麻醉科,四川 成都 610083)

[摘 要] **目的** 观察大鼠肝部分切除术(PH)后给予腹腔神经丛阻滞(NCPB)对早期应激反应的影响。**方法** 30只健康清洁雄性SD大鼠,随机分为对照组和NCPB组,每组15只,均构建大鼠70% PH模型。NCPB组在PH术毕关腹前给予0.5%利多卡因的NCPB,而对照组以0.9%生理盐水替换。分别于术后6 h、12 h、24 h测定血清C反应蛋白(CRP)、皮质酮(GC)、促肾上腺皮质激素(ACTH)、去甲肾上腺素(NA)、肾上腺素(AD)浓度及肿瘤坏死因子(TNF)-α、白介素(IL)-1β水平,并通过Western blot分析外周血单核细胞(PBMCs)糖皮质激素受体(GR)的蛋白表达。**结果** PH术后24 h内大鼠产生明显的应激反应,术后血清CRP、GC、ACTH、NA及AD浓度均有不同程度的升高,但在相应时间点NCPB组均显著低于对照组($P<0.01$或$P<0.05$);对照组PBMCs的GR蛋白表达在PH术后明显下降,在相应时间点NCPB组均显著高于对照组($P<0.01$);无论是对照组还是NCPB组的血清TNF-α和IL-1β水平在术后24 h内均逐渐升高,但在相应时间点NCPB组均显著低于对照组($P<0.01$或$P<0.05$)。**结论** PH术中给予NCPB可有效抑制术后早期应激反应,有助于减轻全身性炎症反应。

[关键词] 肝部分切除术;腹腔神经丛阻滞;应激反应

[中图分类号] R614.4 [文献标识码] A [收稿日期] 2016-07-26

Postoperative early stress response alleviated by celiac plexus block after partial hepatectomy in rats

WEI Xiao-hong[1], LIN Lu[1], LI Jun[2], NIU Jie[2], LIU Xiao-yan[1] (1. Department of Cardiovascular Surgery, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu Sichuan 610083, China; 2. Department of Anesthesiology, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu Sichuan 610083, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of neurolytic celiac plexus block (NCPB) on stress response during the early stage of partial hepatectomy (PH) postoperation in rats. **Methods** Thirty healthy SPF-grade male Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group and NCPB group, and then were constructed the 70% PH model. NCPB group received NCPB with 0.5% lidocaine before closing abdominal, and control group received the same procedures, but 0.9% physiological saline was injected instead of 0.5% lidocaine. The serum concentration of CRP, GC, ACTH, NA and AD, and the levels of serum TNF-α and IL-1β were determined at 6 hours, 12 hours and 24 hours after PH. The western blot assay was performed to examine the expression of GR in the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). **Results** The obvious stress response was produced within 24 hours after PH in rats, postoperative serum CRP, GC, ACTH, NA and AD concentrations increased in the different extent, but the NCPB group were significantly lower than those in the control group in the corresponding time point ($P<0.01$ or $P<0.05$). The expression levels of GR in PBMCs in the control group were significantly decreased after PH, and markedly lower than those in the NCPB group in the corresponding time point ($P<0.01$). The serum TNF-α and IL-1β levels were gradually increased in the control group and NCPB group within 24 hours after PH. But at the respective time points, the levels in the NCPB group were significantly lower than those in control group ($P<0.01$ or $P<0.05$). **Conclusion** Intraoperation NCPB can effectively inhibit postoperative stress response at the early stage after PH, and thereby help to reduce the degree of systemic inflammatory response.

Keywords: partial hepatectomy; neurolytic celiac plexus block; stress response

严重创伤后,机体产生强烈的应激反应,导致炎症级联反应过度激活,引发全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS),目前认为这是导致创伤后脏器功能损害及死亡的主要原因[1-2]。因此,探寻有效的措施,抑制严重创伤后应激反应程度,对于减少病死率具有重要的临床意义。自主神经系统在严重创伤后应激反应中发挥重要作用[3]。腹腔神经丛是人体最大的自主神经丛,腹腔神经丛阻滞(neurolytic celiac plexus block, NCPB)不仅可用于治疗慢性顽固性腹痛[4],前期研究还发现其可用于减轻肝部分切除术(partial hepatectomy, PH)后的肝肾功能损害[5-6]。为了探讨其机制,本研究拟进一步通过PH模型,探讨NCPB对创伤后应激反应的影响。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

Heraeus超速低温离心机(德国);Beckman DU640

[基金项目] 成都军区医学科学技术研究计划重点项目(B14010);成都军区总医院院管课题(2013YG-B010)

[通信作者] 李 军,E-mail:lj89199@163.com

分光光度仪、Biorad 电泳仪和半干转印仪、Gel Doc2000 凝胶成像分析系统(美国);γ 计数仪(武汉)。皮质酮(GC)放免试剂盒、促肾上腺皮质激素(ACTH)放免试剂盒、去甲肾上腺素(NA)放免试剂盒、肾上腺素(AD)放免试剂盒、单核细胞分离液(北京北方生物技术研究所),Rat C-Reactive Protein(CRP) ELISA kit(Cusabio);细胞蛋白提取液(Pierce);兔抗 GR 多克隆抗体、兔抗 β-actin 单克隆抗体(Santa Cruz);辣根酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)、浓缩型 DAB 试剂盒(北京中杉)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及处理 30 只清洁级 SD 雄性大鼠,3 月龄,体质量(205±15)g,自由进食和饮水,由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供(医动字第 24301045)。随机分为对照组和 NCPB 组,每组 15 只,参照文献[6]创建大鼠 70% PH 模型。NCPB 组在 PH 术中关腹前给予 0.5% 利多卡因 NCPB,而对照组以 0.9% 生理盐水替换。NCPB 的方法:在膈肌顶至肾上极的腹主动脉两旁腹膜后的结缔组织内给予 0.5% 利多卡因局部浸润,每只 2 mL。分别于术后 6 h、12 h、24 h断头处死 5 只大鼠,收集静脉血,部分自然沉积分离血清,-70 ℃保存,部分参照文献[7]按 Ficoll 法分离收集外周血单核细胞(PBMCs)。

1.2.2 PH 术后大鼠血清指标检测 按试剂盒操作说明测定血清 CRP、GC、ACTH、NA 及 AD 的浓度。

1.2.3 单核细胞 GR Western blot 分析 按细胞总蛋白提取液使用说明分离 PBMCs 总蛋白。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、0.01M PBS)内封闭,4 ℃过夜。分别加入兔抗 GR 多克隆抗体(1∶200)、兔抗 β-actin 单克隆抗体(1∶500),37 ℃孵育 2 h,PBST(0.01M 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(1∶400),37 ℃孵育 1 h,PBST 洗膜 5 min×3,最后 DAB 试剂盒显色。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),以与 β-actin的比值代表 GR 的相对表达量。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件分析,计量资料用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,$P<0.05$表示差异具有统计学意义,$P<0.01$ 为差异具有显著性统计学意义。

2 结果

2.1 NCPB 对大鼠 PH 术后早期血清 CRP、GC、ACTH、NA 及 AD 的影响

NCPB 组血清 CRP 水平在 PH 术后 6 h 与对照组相比差异无统计学意义,2 组在术后 12 h 和 24 h 均逐渐升高,但在相应时间点 NCPB 组的升高程度低于对照组,差异具有显著统计学意义($P<0.01$);对照组血清 GC、ACTH 和 AD 在 PH 术后 6 h 最高,12 h 和 24 h 逐渐下降,而 NCPB 组在术后 12 h 最高,并在相应时间点均低于对照组,差异具有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$);PH 术后 6 h 血清 NA 迅速升高,在 12 h 和 24 h 逐渐回落,而 NCPB 组在 24 h 内逐渐升高,并在相应时间点均低于对照组,差异均有显著统计学意义($P<0.01$),见表 1。

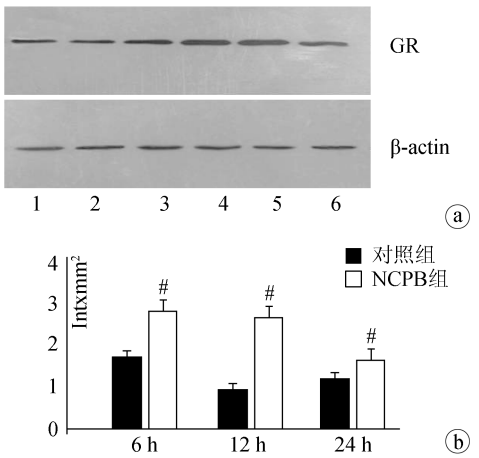
表 1 NCPB 对 PH 术后大鼠应激反应相关指标的影响($\bar{x}\pm s$, $n=5$, pg/mL)

项目	组别	术后 6 h	术后 12 h	术后 24 h
CRP	对照组	187.4±17.5	265.6±25.8	562.2±55.1
	NCPB 组	166.2±15.8	181.5±17.9#	256.1±22.5#
GC	对照组	97.3±8.8	78.2±6.2	41.7±3.8
	NCPB 组	18.5±1.8#	40.2±3.9#	35.8±2.7*
ACTH	对照组	86.9±7.2	68.6±5.6	53.2±4.8
	NCPB 组	9.2±0.7#	25.8±2.4#	24.6±2.3#
NA	对照组	956.6±88.4	883.6±84.0	743.2±68.8
	NCPB 组	255.4±23.7#	282.7±27.1#	347.9±33.2#
AD	对照组	981.3±84.2	920.7±88.1	853.2±74.5
	NCPB 组	165.6±12.6#	341.1±33.2#	298.9±28.7#

*:与对照组比较,$P<0.05$;#:与对照组比较,$P<0.01$

2.2 NCPB 对大鼠 PH 术后早期 PBMCs GR 蛋白表达的影响

对照组 PBMCs 的 GR 蛋白表达在 PH 术后 12 h 和 24 h 明显下降,而 NCPB 组在 PH 术后 24 h 也显著降低,与对照组相比,NCPB 组在术后 6 h、12 h 和 24 h 均高于对照组,差异具有显著统计学意义($P<0.01$)。Western blot 分析结果见图 1。



a:总蛋白 GR Western blot 分析 1~3:分别表示对照组 24 h、12 h、6 h;4~6:分别表示 NCPB 组 6 h、12 h、24 h;b:PBMCs GR 蛋白相对表达水平 #:与对照组比较,$P<0.01$

图 1 PBMCs GR 蛋白表达

2.3 NCPB 对 PH 术后大鼠血清炎性细胞因子的影响

通过 ELISA 方法检测大鼠 PH 术后 24 h 内血清炎性细胞因子水平,结果显示,对照组血清 TNF-α 在

术后 12 h 最高,而 NCPB 组在术后 24 h 最高,并在相应时间点均低于对照组,差异具有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$);同样,对照组与 NCPB 组的血清 IL-1β 水平在术后 24 h 内均逐渐升高,但 NCPB 组在这 3 个时间点均低于对照组,差异有显著性统计学意义($P<0.01$)。

表 3 PH 术后大鼠血清炎性细胞因子的变化($\bar{x}\pm s$,$n=5$,pg/mL)

项目	组别	术后 6 h	术后 12 h	术后 24 h
TNF-α	对照组	933.8±91.1	1836.5±153.1	1676.2±161.6
	NCPB 组	545.4±46.2#	824.5±71.3#	1411.7±123.3*
IL-1β	对照组	23.4±1.9	28.5±2.6	58.8±5.4
	NCPB 组	14.8±1.1#	23.3±1.9#	30.6±2.8#

*:与对照组比较,$P<0.05$;#:与对照组比较,$P<0.01$

3 讨论

创伤后应激反应是宿主对创伤刺激的保护和防御反应,以交感神经兴奋和丘脑下部-垂体前叶-肾上腺皮质功能增强为主要特点。适度的应激对机体有益,但过久过强的刺激可以引起明显的应激反应紊乱,造成对机体的损伤效应。研究表明,严重创伤后应激反应紊乱是引发 SIRS 和多器官功能障碍综合症(multi-organ dysfunction syndrome,MODS)等继发性全身损害的重要因素和关键性始动因素,而早期全身性损害又是引起严重创伤后死亡的重要原因[8-9],因此对严重创伤后应激反应实施必要的干预具有重要的临床意义。

严重创伤后过度应激反应主要表现为下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴和交感-肾上腺髓质(SAM)系统的过度兴奋[10-12]。以血清 ACTH 及 GC 水平来反应 HPA 轴的兴奋程度,结果显示大鼠血清 GC 和 ACTH 水平在 PH 术后 6 h 均迅速达到高峰,12 h 和 24 h 逐渐下降,而手术结束前给予 NCPB 处理,可显著降低相应时间点的血清 GC 和 ACTH 水平,且使其峰值推迟到术后 12 h。另外,创伤后 SAM 系统的过度兴奋,血清 NA 和 AD 浓度可迅速持续升高,从而可导致机体重要脏器的缺血缺氧及功能障碍。本研究也发现 PH 术后早期大鼠血清 NA 和 AD 浓度均迅速升高,NCPB 处理可显著降低其升高的程度。这些结果表明,NCPB 处理在一定程度上可减轻 PH 术后早期的应激反应程度,从而有利于维持创伤后内环境的稳定。CRP 是一个急性期反应蛋白,可部分反映创伤后应激炎症反应程度[13-14]。大鼠血清 CRP 在 PH 术后 12 h 和 24 h 显著升高,而 NCPB 处理可有效降低其相应时间点的水平,进一步证实 NCPB 处理可减轻 PH 术后早期的应激反应程度。严重创伤后过度的应激反应可导致 SIRS 和 MODS 的发生发展,造成对机体脏器功能的损伤效应。因此 NCPB 处理减轻早期应激反应,在一定程度上有助于 PH 术后的脏器功能保护。

GC 效应是机体最为重要的应激反应之一,其中 GR 是 GC 效应发挥的关键环节。研究发现,严重创伤后早期应激反应可引起机体 GR 表达下调,GR 表达降低是 GC 抵抗的主要表现,在一定程度上可反映机体应激反应的程度[15]。GC 抵抗是 SIRS、MODS 等全身继发性损害的重要环节,本研究发现大鼠的 PBMCs 的 GR 蛋白表达在 PH 术后 12 h 和 24 h 显著下降,而手术结束前给予 NCPB 处理可显著抑制其水平降低,进一步证实 NCPB 处理可显著减轻严重创伤后的应激反应程度,缓解 GC 抵抗。

机体遭受严重创伤后,迅速启动内部固有的防御反应维持内环境稳定,其中重要表现之一是细胞因子的大量分泌释放,血液中 TNF-α、IL-1β 等致炎细胞因子水平显著增加[16]。通过 ELISA 方法检测,本研究结果证实大鼠 PH 术后 24 h 内血清 TNF-α 和 IL-1β 水平即显著升高,而手术结束前给予 NCPB 可不同程度降低这些致炎细胞因子的分泌和释放,表明 NCPB 处理可通过减轻应激反应程度,缓解严重创伤后 SIRS 的发生发展,这可能是 NCPB 减轻 PH 术后肝肾等脏器功能损害的重要机制之一。

NCPB 减轻 PH 术后应激反应程度的机制尚不完全清楚,可能与其调节神经内分泌系统功能和镇痛作用有关。NCPB 作为一种镇痛手段,目前已经在临床广泛使用,但还较少用于术后镇痛。从本研究结果来看,PH 术中直视下给予 NCPB,操作简单安全,且能有效抑制 PH 术后早期的应激反应,防止 SIRS 的发生发展,因此值得进一步研究和临床推广。

[参考文献]

[1] Binkowska AM,Michalak G,Słotwiński R. Current views on the mechanisms of immune responses to trauma and infection[J]. Cent Eur J Immunol,2015,40(2):206-216. doi:10.5114/ceji.2015.52835.

[2] 杨新征,朱宝宇,于 飞. 严重创伤致多器官功能不全综合征的发病机制[J]. 局解手术学杂志,2013,22(6):663-664. doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201306034.

[3] Liu MH,Tian J,Su YP,et al. Cervical sympathetic block regulates early systemic inflammatory response in severe trauma patients[J]. Med Sci Monit,2013,19:194-201. doi:10.12659/MSM.883833.

[4] Sahai AV. Celiac plexus neurolysis and pancreatic cancer survival:back to the future? [J]. Gastrointest Endosc,2015,82(1):57-58. doi:10.1016/j.gie.2015.02.024.

[5] Li J,Yan HT,Che JX,et al. Effects of neurolytic celiac plexus block on liver regeneration in rats with partial hepatectomy[J]. PLoS One,2013,8(9):e73101. doi:10.1371/journal.pone.0073101.

[6] 车建翔,邱庆明,倪 俊,等. 腹腔神经丛阻滞对肝部分切除术后大鼠肾功能的影响[J]. 西南国防医药,2015,25(2):117-119. doi:10.3969/j.issn.1004-0188.2015.02.001.

[7] 魏晓红,刘小燕,李 军,等. 氯胺酮对体外循环诱导外周血单核细胞 NF-κB 及 TNF-α 表达的影响[J]. 西南国防医药,2009,19(1):48-50. doi:10.3969/j.issn.1004-0188.2009.01.016.

doi:10.11659/jjssx.08E016014

头颈部鳞癌中 FOXP3 基因相关的竞争性内源性 RNA 网络分析

孙 娟,王 薇,胡文良,孙学威,李玲香,崔晓波 (内蒙古医科大学附属医院耳鼻咽喉科,内蒙古 呼和浩特 010050)

[摘 要] **目的** 探索 FOXP3 基因在头颈部鳞癌中的作用机制。**方法** 选取 TCGA 数据库中的 279 例头颈部鳞癌二代测序样本,利用 cbioportal 筛选样本中 FOXP3 的共表达基因;利用 String 数据库,建立 FOXP3 的共表达网络;利用 DAVID 数据库分析共表达网络功能;利用 miRTarBase 和 StarBase 数据库,筛选能够调控 FOXP3 的短链非编码 RNA(microRNA)、长链非编码 RNA(lncRNA)和环状非编码 RNA(circRNA);最后,利用 Cytoscape 软件建立 FOXP3 的竞争性内源性 RNA(ceRNA)网络。**结果** 在 TCGA 数据库的头颈部鳞癌样本中共筛选出 FOXP3 的共表达基因 950 个。(Spearman 分数大于 0.5)功能分析结果显示这些共表达基因的功能主要为免疫应答,T 细胞、淋巴细胞和粒细胞激活等免疫相关功能。ceRNA 网络揭示 miR-31-5p 和 miR-210-3p 能够靶向调控 FOXP3 基因。此外,XIST、TUG1、JRK 和 LINC00473 等 42 个 lncRNA 和 ZNF223_hsa_circ_000898 和 ISY1_hsa_circ_001090 等 31 个 circRNA 能够通过 ceRNA 作用调控 FOXP3。**结论** 成功建立 FOXP3 基因相关的 ceRNA 网络,并挖掘出 42 个 lncRNA 和 31 个 circRNA 可能通过 ceRNA 作用调控 FOXP3,可为头颈部鳞状细胞癌的分子机制研究和分子靶向治疗提供新的切入点。

[关键词] 喉鳞状细胞癌;FOXP3;长链非编码 RNA;环状非编码 RNA;竞争性内源性 RNA;短链非编码 RNA;靶向治疗
[中图分类号] R739.65 [文献标识码] A [收稿日期] 2016-08-10

FOXP3-related ceRNA network analysis in head and neck squamous cell carcinoma

SUN Juan, WANG Wei, HU Wen-liang, SUN Xue-wei, LI Ling-xiang, CUI Xiao-bo (Department of Otolaryngology, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot Inner Mongolia 010050, China)

Abstract: Objective To explore the FOXP3-related mechanism underlying head and neck squamous cell carcinoma. **Methods** We used cbioportal to identify the co-expressed genes of FOXP3 in 279 samples from head and neck squamous cell carcinoma in TCGA database. We used String database to establish the co-expression network of FOXP3. The function of co-expression network was identified through DAVID database. We used miRTarBase and StarBase database to screen the microRNA, lncRNA and circRNA that regulate FOXP3. Finally, Cytoscape software was used to establish FOXP3-related ceRNA network. **Results** We found 950 FOXP3 related co-expressed gene. (Spearman score ouer 0.5) These genes were enriched in immune response including T cell, leukocyte and lymphocyte activation. CeRNA network revealed that 2 microRNAs (i.e., miR-31-5p and miR-210-3p), 42 lncRNAs (e.g., XIST, TUG1, JRK and LINC00473) and 31 circRNAs (e.g., ZNF223_hsa_circ_000898 and ISY1_hsa_circ_001090) could regulate FOXP3. **Conclusion** We established FOXP3-related ceRNA network and identified 42 lncRNAs and 31 circRNAs that regulate FOXP3. The data generated from this study could provide a new cut point

[基金项目] 内蒙古自治区自然科学基金(2014MS0856);内蒙古医科大学科技百万工程项目(KJbw2013014)
[通信作者] 孙 娟,E-mail:immu_sunjuan@163.com

[8] Ramanathan R, Leavell P, Mays C, et al. Impact of sepsis on surgical outcomes[J]. Surg Infect (Larchmt), 2015, 16(4): 405 - 409. doi: 10.1089/sur.2014.063.

[9] Rettig TC, Rigter S, Nijenhuis VJ, et al. The systemic inflammatory response syndrome predicts short-term outcome after transapical transcatheter aortic valve implantation[J]. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2015, 29(2): 283 - 287. doi: 10.1053/j.jvca.2014.10.005.

[10] Whitaker AM, Farooq MA, Edwards S, et al. Post-traumatic stress avoidance is attenuated by corticosterone and associated with brain levels of steroid receptor co-activator-1 in rats[J]. Stress, 2016, 19(1): 69 - 77. doi: 10.3109/10253890.2015.1094689.

[11] Marik PE, Flemmer M. The immune response to surgery and trauma: Implications for treatment[J]. J Trauma Acute Care Surg, 2012, 73(4): 801 - 808. doi: 10.1097/TA.0b013e318265cf87.

[12] Lord JM, Midwinter MJ, Chen YF, et al. The systemic immune response to trauma: an overview of pathophysiology and treatment[J]. Lancet, 2014, 384(9952): 1455 - 1465. doi: 10.1016/S0140 - 6736(14)60687 - 5.

[13] 卢海滨,周 健,王耀丽,等. 外周血 CD64 指数对创伤手术后脓毒症的早期诊断价值[J]. 局解手术学杂志, 2016, 25(5): 339 - 342. doi: 10.11659/jjssx.03E016031.

[14] Guisasola MC, Ortiz A, Chana F, et al. Early inflammatory response in polytraumatized patients: cytokines and heat shock proteins. A pilot study[J]. Orthop Traumatol Surg Res, 2015, 101(5): 607 - 611. doi: 10.1016/j.otsr.2015.03.014.

[15] 李 军,史 忠,粟永萍,等. 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. doi: 10.3321/j.issn:1000 - 5404.2002.12.016.

[16] Li J, Li F, Che J, et al. Ameliorative effects of neurolytic celiac plexus block on stress and inflammation in rats with partial hepatectomy[J]. Trop J Pharm Res, 2015, 14(6): 1021. doi: 10.4314/tjpr.v14i6.12.

(编辑:杨 颖)