维普资讯 http://www.cqvip.com

局解手术学杂志 2007年第16卷第5期
J Regional Anat & Operative Surg, 2007, Vol. 16, No. 5

寒冷缺氧降低大鼠脾脏T淋巴细胞的增殖反应

黄庆愿，黄 缄，蔡明春，蒋春华，刘福玉，高钰琪 （第三军医大学病理生理学与高原生理学教研室，重庆 400038）

［摘 要］ **目的** 观察缺氧和寒冷对大鼠脾脏T淋巴细胞功能的影响及其与腺苷脱胺酶之间的关系，探讨冬季急进高原时机体免疫功能改变的规律和机制。**方法** 大鼠分别在常温常氧、寒冷常氧、常温缺氧以及寒冷缺氧环境中生活3 d，用3H-TdR掺入法检测脾脏T淋巴细胞增殖功能，用比色法测定脾脏T淋巴细胞腺苷脱胺酶活性。**结果** 与常温常压对照组比较，单纯寒冷或单纯缺氧均可引起脾脏T淋巴细胞在刀豆素A刺激下的刺激指数显著降低，但缺氧复合寒冷大鼠脾脏T淋巴细胞的刺激指数并未进一步降低，而是接近单纯缺氧大鼠。单纯缺氧和单纯寒冷并不改变大鼠脾脏T淋巴细胞上的腺苷脱胺酶活性，而缺氧复合寒冷则使其显著降低。**结论** 缺氧和寒冷均可抑制脾脏T淋巴细胞的功能，但两者对脾脏T淋巴细胞功能的影响可能并无叠加效应；腺苷脱氨酶活性的改变可能参与寒冷缺氧大鼠脾脏T淋巴细胞功能的降低。

［关键词］ 缺氧；寒冷；T淋巴细胞；腺苷脱氨酶
［中图分类号］ R852.11 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1672-5042(2007)05-0305-03

Effects of hypoxia and cold on the splenic lymphocyte proliferation in rat

HUANG Qing-yuan, HUANG Jian, CAI Ming-chun, JIANG Chun-hua, LIU Fu-yu, GAO Yu-qi (Department of Pathophysiology and Institute of High Altitude Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effects of hypoxia and cold on splenic T lymphocytes proliferation. **Methods** Wistar rats were housed in the following conditions: 1. normal (room temperature: 20 ~ 25℃ at sea level); 2. cold (room temperature: 0 ~ 2℃ at sea level); 3. hypoxia (room temperature: 20 ~ 25℃ at 5 000 m simulated high altitude in hypobaric chamber); 4. hypoxia plus cold (room temperature: 0 ~ 2℃ at 5 000 m simulated high altitude in hypobaric chamber). Three days later, the spleen lymphocyte were collected and stimulated with concanavalin A. The activity of adenosine deaminase was determined by spectrophotometer. **Results** Splenocyte proliferation was significantly decreased after 3 days exposure to cold or hypoxia. The splenocyte proliferation for living in hypoxia combined with cold condition was similar as for living in hypoxia. The activity of adenosine deaminase was not influenced by hypoxia or cold alone but was reduced by combined cold and hypoxia. **Conclusion** Both hypoxia and cold can inhibit the function of lymphocyte but there is no additive effect between hypoxia and cold. Adenosine deaminase may be involved in the inhibitive effect induced by cold combined with hypoxia.

Keywords: hypoxia; cold; T-lymphocyte; adenosine deaminase

急进高原时，机体的免疫系统会发生显著改变，表现为血液中免疫球蛋白含量改变、抗体的产生、T细胞数量和亚型改变等[1]。高原环境对人体的影响，主要因素是缺氧。但临床资料显示，冬季进入高原，急性高原反应的发病率明显高于夏季，寒冷是诱发或加剧高原性疾病的重要因素。高原寒冷气候特点，是否参与机体免疫系统功能的改变，尚缺乏实验依据。本实验利用减压缺氧复合寒冷模型，观察了大鼠脾脏T淋巴细胞功能改变，并对其机制进行了初步研究，以探讨冬季急进高原时，免疫系统功能改变的规律及其在急性高原病发病中的意义。

1 材料与方法

1.1 动物模型

80只健康雄性Wistar大鼠（本校实验动物中心提供），体重（180 ± 15）g，常规分笼喂养，自由饮水进食。适应性喂养1周后，平均分为4组：①常温常氧对照组（n = 20），动物在常温减压舱内饲养，不减压但保持足够的通风量，环境温度为20 ~ 25 ℃，海拔高度为300 m；②寒冷常氧组（n = 20），动物在低温减压舱内饲养，不减压但保持足够的通风量，舱内温度为0 ~ 2 ℃，海拔高度300 m；③常温缺氧组（n = 20），动物在常温减压舱内，舱内温度为20 ~ 25 ℃，模拟海拔高度5 000 m；④寒冷缺氧组（n = 20），动物在低温减压舱内，舱内温度0 ~ 2 ℃，模拟海拔高度5 000 m。动物在上述环境条件下生活3 d后立即取出，在平原进行如下实验。

1.2 脾脏T淋巴细胞增殖实验

动物脱颈致死，无菌取脾，剪碎，用不锈钢丝网（180目和320目）制成单个细胞悬液。用大鼠淋巴细胞分离液分离淋巴细胞。计数活细胞百分数 > 96%。预实验发现，T淋巴细胞分

［基金项目］ 国家自然科学基金资助面上项目（30200130）
［作者简介］ 黄庆愿，男（1967 ~），山东省莱芜市人，副教授，博士，主要从事缺氧病理生理方面的研究。电话：（023）68752340 - 8213，E-mail：wqyhuang@yahoo.com
［收稿日期］ 2007-03-15 ［修回日期］ 2007-04-20

维普资讯 http://www.cqvip.com

裂原-刀豆素(ConA)刺激脾脏T淋巴细胞分裂的最佳浓度和次最佳浓度分别为5 μg/ml和2.5 μg/ml。因此,实验中用5.0 μg/ml和2.5 μg/ml两个ConA浓度刺激T淋巴细胞增殖。细胞在含15%小牛血清的RPMI 1640的培养液中,37 ℃、5% CO_2 孵箱中培养54 h后,每孔加入1.0 μCi 3H-TdR,继续培养18 h。用多头细胞收集器将细胞收集在滤纸上,用Beckman公司生产的液体闪烁记数仪测定放射活性。每个ConA浓度点做5复孔。计算刺激指数(SI)。

1.3 脾脏T淋巴细胞腺苷脱胺酶(ADA)活性测定

各组另取10只大鼠,同上制备淋巴细胞。准确记数淋巴细胞的数目,离心后,沉淀加入2 ml蒸馏水,反复冻融10次,显微镜下确认细胞破裂后,按Giusti G[2]报道的方法测定620 nm处的吸光度(UV-240分光光度计,日本岛津公司)。以每106个淋巴细胞样品37 ℃作用于腺苷60 min所产生氨氮的微克数作为酶的活性单位(U/106个淋巴细胞)。

1.4 实验数据的统计学分析

实验结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。用SPSS软件进行双因素方差分析,$P<0.05$为显著性判断标准。

2 结果

2.1 动物体重的变化

常温常氧对照组和寒冷常氧组大鼠体重无明显变化,而在常温缺氧环境中生活3 d的大鼠和在寒冷缺氧环境中生活3 d的大鼠体重却明显降低。说明缺氧可引起动物体重降低;而在寒冷缺氧环境中,动物体重的降低可能主要是由缺氧引起的(表1)。

表1 各组动物体重的变化($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	体重(g)	
	0 d	3 d
对照组	176±60	180±10
寒冷常氧组	184±19	186±23
常温缺氧组	175±19	152±20*#
寒冷缺氧组	180±19	156±24*#

*:与0 d比较,$P<0.05$;#:与对照组比较$P<0.05$

2.2 大鼠脾脏T淋巴细胞增殖反应结果比较

对照组大鼠脾脏T淋巴细胞,5.0 μg/ml ConA的刺激指数为(64.0±23.7);2.5 μg/ml ConA的刺激指数为(43.5±21.7)。动物从20~25 ℃进入0~2 ℃环境中生活3 d后,用5.0 μg/ml ConA刺激时,3H-TdR的掺入量明显降低;而用2.5 μg/ml ConA刺激时,无明显变化。常温缺氧条件下生活3 d的大鼠,脾脏T淋巴细胞在两个浓度ConA刺激下的3H-TdR的掺入量均显著降低,刺激指数显著下降;大鼠在寒冷缺氧环境中生活3 d后,脾脏T淋巴细胞在5.0 μg/ml ConA刺激下的3H-TdR的掺入量与常温缺氧和寒冷常氧组相比,未见进一步降低;而在2.5 μg/ml ConA刺激下的3H-TdR的掺入量与常温缺氧组相比未见明显差异,但显著低于寒冷常氧组(表2)。

表2 大鼠脾脏淋巴细胞增殖反应(刺激指数)结果比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	ConA (5.0 μg/ml)	ConA (2.5 μg/ml)
对照组	58.0±26.9	43.5±31.7
寒冷常氧组	28.2±16.7#	34.6±17.6
常温缺氧组	29.4±11.3#	20.2±16.1*
寒冷缺氧组	27.5±19.2#	15.1±8.7#△

*:与对照组比较,$P<0.05$;#:与对照组比较$P<0.01$;△:与寒冷常氧组比较,$P<0.05$

2.3 脾脏淋巴细胞腺苷脱胺酶活性测定

脾脏淋巴细胞腺苷脱胺酶活性测定结果见表3。

表3 脾脏淋巴细胞ADA活性测定结果($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	ADA活性(U)
对照组	49.9±10.7
寒冷常氧组	50.7±12.0
常温缺氧组	47.1±10.3
寒冷缺氧组	11.2±8.2*#△

*:与对照组比较,$P<0.05$;#:与常温缺氧组比较,$P<0.05$;△:与寒冷常氧组比较,$P<0.05$

3 讨论

本实验发现缺氧和寒冷均可在一定程度上抑制脾脏T淋巴细胞的增殖反应。当动物处于寒冷缺氧环境中时,T淋巴细胞在2.5 μg/ml ConA刺激下的3H-TdR掺入量接近于单纯缺氧组动物,但显著低于单纯寒冷组,说明缺氧和寒冷两者对脾脏T淋巴细胞的增殖反应可能并无叠加效应;在寒冷缺氧环境中,脾脏T淋巴细胞增殖反应降低可能主要是由机体缺氧引起的。

高原环境对人体的影响主要因素是缺氧。为对抗外环境缺氧的影响,机体通过各种神经内分泌调节,以维持内环境的相对稳定。缺氧时,机体神经内分泌系统的变化,可能通过免疫细胞上的受体,影响机体的免疫功能[1]。本实验结果表明,缺氧可在一定程度上抑制脾脏T淋巴细胞的增殖反应。Caldwell等[3]实验发现,将小鼠脾脏淋巴细胞培养在1%或2.5%的低氧环境中时,T淋巴细胞的成熟延缓,细胞因子的分泌发生改变。Klokker等[4]报道,5 400 m减压缺氧20 min就可引起人体免疫系统显著改变。Loeffler等[5]在研究肿瘤免疫时发现,肿瘤无氧区的T细胞浸润数量虽无明显变化,但其功能显著降低。急性缺氧时,T细胞功能改变,可能在急性高原病的发生发展中起重要作用。

维普资讯 http://www.cqvip.com

但有人发现，缺氧对免疫功能的影响，不能完全用肾上腺皮质反应增强来解释，因为在切除肾上腺的大鼠，缺氧对免疫功能的影响依然存在[6]。

腺苷脱胺酶（adenosine deaminase，ADA）是嘌呤核苷酸代谢过程中起重要作用的酶，广泛存在于人体各种组织和细胞中。在淋巴细胞中活性最高，是前T淋巴细胞分化为T淋巴细胞中不可缺少的酶，与淋巴细胞的增殖、分化有关，是反映细胞免疫功能的一个重要指标。当机体的腺苷脱胺酶活性降低或缺乏时，会引起以胸腺发育不全、T细胞减少和免疫功能降低为特征的严重的免疫缺陷病（severe combined immunodeficiency，SCID）[7]。将外源性ADA基因转染到先天性ADA阴性的SCID病人的骨髓细胞和外周血淋巴细胞后，随着病人T细胞、B细胞、粒细胞和骨髓细胞等表达ADA正常，病人的免疫功能恢复正常[8]。研究表明[9]，ADA活性降低或缺乏引起的SCID，可能是由于ADA活性降低或缺乏时，细胞外腺苷不能被降解所致。在我们的实验中，寒冷缺氧组大鼠ADA活性显著降低，同时脾脏淋巴细胞的增殖反应明显受到抑制，因此寒冷缺氧环境有可能通过降低ADA活性，减少腺苷的降解，增加淋巴细胞周围的腺苷含量，从而抑制脾脏淋巴细胞的功能。单纯缺氧和单纯寒冷组大鼠脾脏淋巴细胞ADA活性无明显改变，但淋巴细胞的增殖反应明显降低。造成这种现象的原因不清楚，是否与腺苷、交感神经兴奋、儿茶酚氨增多及肾上腺皮质激素增多有关，尚需进一步实验证实。

通过本实验，我们可得出如下结论：①缺氧和寒冷均可在一定程度上抑制脾脏T淋巴细胞的增殖反应，但两者对脾脏T淋巴细胞的增殖反应可能并无叠加效应；②在寒冷缺氧环境中，脾脏T淋巴细胞增殖反应降低可能主要是由机体缺氧引起的；③腺苷脱氨酶活性的改变可能参与寒冷缺氧大鼠脾脏T淋巴细胞功能的改变。

[参考文献]

[1] 高钰琪. 高原军事医学[M]. 重庆：重庆出版社，2005. 145－147.
[2] Giusti G, Galanti B. Methods of Enzymatic Analysis[M]. the 3rd edit, Vol IV. New York: Verlag Chemie, Weinheim and Academic Press, 1984. 315－321.
[3] Caldwell CC, Kojima H, Lukashev D, et al. Differential effects of physiologically relevant hypoxic conditions on T lymphocyte development and effector functions[J]. J Immunol, 2001, 167(11): 6140－6149.
[4] Klokker M, Kharazmi A, Galbo H, et al. Influence of in vivo hypobaric hypoxia on function of lymphocytes, neutrocytes, natural killer cells, and cytokines[J]. J Appl Physiol, 1993, 74(3): 1100－1106.
[5] Loeffler DA, Keng PC, Baggs RB, et al. Lymphocytic infiltration and cytotoxicity under hypoxic conditions in the EMT6 mouse mammary tumor[J]. Int J Cancer, 1990, 45(3): 462－467.
[6] 白海波，杜继曾，贾红卫. 低氧对大鼠体液免疫的抑制作用[J]. 生理学报，1997，49(2)：167－172.
[7] Sekhsaria S, Fleisher TA, Vowells S, et al. Granulocyte colony-stimulating factor recruitment of CD34 + progenitors to peripheral blood: impaired mobilization in chronic granulomatous disease and adenosine deaminase－deficient severe combined immunodeficiency disease patients [J]. Blood, 1996, 88(3): 1104－1112.
[8] Blaese RM, Culver KW, Miller AD, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA－SCID: initial trial results after 4 years[J]. Science, 1995, 270(5235): 475－480.
[9] Hasko G, Deitch EA, Szabo C, et al. Adenosine: a potential mediator of immunosuppression in multiple organ failure[J]. Curr Opin Pharmacol, 2002, 2(4): 440－444.

（编辑：蒋登金）

（上接第304页）

音（－），肠鸣音正常。化验：WBC 10.8×10^9/L，N 65.8%，Hb 146 g/L，胸片及肝、胆、胰、脾B超探查未发现异常。入院诊断：左上腹皮肤软组织挫伤。予消肿、活血化淤、对症支持治疗，住院19 h自动要求出院。2 d后，因突发腹痛腹胀伴口渴、发热而再次急诊入院，查体：T 38.7 ℃，P 100次/分，R 26次/分，BP 11.95/6.64 kPa。急性痛苦面容，腹平坦，全腹压痛、肌紧张及反跳痛，移动性浊音阳性，肠鸣音减弱。辅助检查：WBC 11.8×10^9/L，N 87.4%，Hb 110 g/L，血淀粉酶52 U/dl，尿淀粉酶263 U/dl，腹部立位片：肝、胆、脾、胰B超检查无异常，左侧腹腔穿刺抽出不凝固血性液体，考虑为腹腔脏器破裂出血，立即行左侧剖腹探查切口入腹，入腹后发现腹腔内积血，清除腹腔内不凝固血540 ml，探查发现左侧腹膜后血肿破裂出血，裂口约3 cm，血肿腔内仍见小血管出血，附近空肠及系膜多处挫伤、瘀血，使用不吸收丝线予缝扎止血，冲洗腹腔并吸尽积液，观察无活动性出血，放置腹腔引流管，关腹。住院7 d治愈出院。

2 讨论

腹膜后血肿是腹部外伤后的常见并发症，早期诊断和及时有效的治疗，对降低病死率至关重要。本病例为不伴其他脏器伤的腹膜后血肿，也称单纯性的腹膜后血肿，出血量呈渐进性发展，早期无血液动力学改变。因此，单靠致伤病史、体检及临床手段多难以确认。该病例以外伤性迟发性腹膜后血肿破裂出血采取手术缝扎止血治愈。

（编辑：蒋登金）