基础研究 文章编号:0253-3626(2009)05-0529-03

脑创伤性鼠红细胞免疫功能的变化

翟 瑄,梁 平,夏佐中,李映良,周渝冬
(重庆医科大学附属儿童医院神经外科,重庆 400014)

【摘 要】目的:探讨创伤性脑损伤(Traumatic brain injury,TBI)大鼠红细胞免疫功能(Erythrocyte immunity function,EIF)的改变及其机制。方法:选取 Wistar 大鼠 70 只,随机分成对照组(n=10)与创伤组(n=60),创伤组制备成轻型(n=30)和中重型(n=30)创伤性脑损伤模型,酵母菌花环法检测对照组与创伤组大鼠血液中红细胞 C_3b 受体花环率(RBC-C_3bRR)和红细胞免疫复合物花环率(RBC-ICR),放射免疫法测定血清中 β-内啡肽(β-EP)水平。结果:与对照组比较,脑创伤大鼠 RBC-C_3bRR 明显下降(P<0.05),RBC-ICR 和 β-EP 均明显升高(P<0.05),中重型创伤组各指标改变较轻型创伤组更明显(P<0.05)。脑创伤大鼠 β-EP 变化与 RBC-C_3bRR 呈直线负相关(轻型组 r=-0.698,P<0.05;中重型组 r=-0.744,P<0.05);β-EP 变化与 RBC-ICR 呈直线正相关(轻型组 r=0.835,P<0.05;中重型组 r=0.729,P<0.05)。结论:大鼠脑创伤后红细胞免疫功能明显下降,其改变与体内 β-EP 明显升高密切相关。

【关键词】创伤性脑损伤;红细胞免疫;β-内啡肽;大鼠
【中国图书分类法分类号】R651;R743.34 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-01-19

Changes of erythrocyte immunity function in rats with traumatic brain injury

ZHAI Xuan, et al
(*Department of Neurosurgery, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the changes and mechanism of Erythrocyte Immunity Function(EIF) in rats with Traumatic Brain Injury (TBI). *Methods*: Healthy Wistar rats(n=70)were divided into control group (n= 10)and TBI group (n =60), model of TBI were prepared and divided into mild group(n=30) and moderate to severe group(n=30). Red Blood Cell-C3b Receptor Rate(RBC-C3bRR) and Red Blood Cell-Immune Complex Rate(RBC-ICR)of rats with TBI were measured by methed of yeast fungus and the content of serum β-endophin (β-EP)was tested by radioimmunoassay. *Results*: Compared with the control group, RBC-C3bRR of rats with TBI decreased significantly while RBC-ICR and β-EP increased significantly(P<0.05). Moreover, the moderate to severe group had more manifest difference than the mild group(P<0.05). β-endorphin was negatively correlated with RBC-C3bRR(r=0.698, P<0.05)and positively with RBC-ICR(r=0.744, P<0.05) in mild group; and negatively correlated with RBC-C3bRR(r=-0.835, P<0.05)and positively with RBC-ICR (r=0.729, P<0.05)in moderate to severd group. *Conclusion*: EIF in rats with TBI decreased significantly which demonstrated erythrocyte immune dysfunction was related with increasing of the β-EP.

【Key words】 Traumatic brain injury; Erythrocyte immunity; β-endophin; Rats

继发性感染是创伤性脑损伤(Traumatic brain injury,TBI)严重的并发症之一,常导致患者预后不良甚至死亡。TBI 后患者自身免疫功能下降是导致继发性感染出现的重要原因[1],其中包括细胞免疫、红细胞免疫等多系统的免疫抑制。目前对 TBI 后细胞免疫功能障碍的研究已较深入,而对红细胞免疫功能(Erythrocyte immunity function,EIF)改变的报道尚不多见。本文通过对脑创伤大鼠红细胞 C_3b 受体花环率(RBC-C_3bRR)、红细胞免疫复合物花环率(RBC-ICR)和血清 β-内啡肽(β-EP)含量的测定,探讨脑创伤后大鼠红细胞免疫功能的改变及其机制,为临床工作提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年健康 Wistar 大鼠 70 只,雌雄各半,清洁级,体重 220~250 g,由重庆医科大学动物中心提供。

作者介绍:翟 瑄(1974-),男,主治医师,硕士,
研究方向:小儿颅脑损伤、神经系统先天畸形的诊治。
通讯作者:梁 平,男,副教授,E-mail:liangping868@sina.com。
基金项目:重庆市自然科学基金(项目编号:2008BB5208)。

1.2 实验动物分组

70 只大鼠分为对照组（n=10）和 TBI 组（n=60），后者再分为轻型 TBI 组（n=30）和中重型 TBI 组（n=30），每组根据采血时间分为 6 h、12 h、24 h、3 d、7 d，5 个亚组，每个亚组 6 只。以上分组均采取随机原则。

1.3 实验动物模型

脑创伤组参照刘海鹏等[2]建立的气体冲击法制备创伤性脑损伤模型。大鼠手术前禁食 12 h，不禁水，速眠新 0.8 ml/kg，肌肉注射麻醉，俯卧固定于立体定向仪上，头部剪毛，常规消毒铺巾，正中矢状切开皮肤，显露左顶部，剥离骨膜暴露颅骨，于中线左侧旁开 1.5 mm、前囟后 2 mm 钻一直径为 3 mm 骨孔，露出硬脑膜，保持硬脑膜完整，调节气体冲击机气源压力，分别以（400 ± 50）kPa 和（600 ± 50）kPa 冲击大鼠硬脑膜处制成轻型和中重型 TBI 模型。对照组只作颅骨钻孔，显露硬脑膜而不致脑创伤。伤后创口彻底止血，骨蜡封闭骨窗，缝合头皮，动物清醒后分笼喂养。

各组制备中有下列情况之一者不作为实验的受试范围：伤后 6 h 内因各种因素死亡；伤后呼吸抑制时间超过 5 min；开颅导致硬脑膜开放；致伤后流血过多。实验过程中由于以上原因被排除的大鼠只数随机补充。

1.4 样品采集及处理

TBI 组大鼠分别于伤后 6 h、12 h、24 h、3 d、7 d 经动脉放血活杀，每只抽取股动脉血 3 ml 用于指标测定。对照组于手术后 24 h 采取同法处理。取血 2 ml 置于含 1%肝素 20 μl、抑肽酶 40 μl 的管内，4℃、4 000 r/min 离心 10 min，上清液置 -70℃低温冰箱保存，备作 β-EP 放射免疫检测；取血 1 ml 置于含枸橼酸钠的抗凝管内，2 000 r/min 水平离心 10 min，取上清液放入另一试管待用，沉淀红细胞加入生理盐水中混匀，制成每毫升含 1.25×10^7 个红细胞的悬液备用。采用酵母菌花环法（郭氏法）检测红细胞 C_3b 受体花环率（RBC-C_3bRR）、红细胞免疫复合物花环率（RBC-ICR），镜下以 1 个红细胞结合 2 个或 2 个以上酵母菌为 1 个花环，计数 200 个红细胞，算出百分率。放射免疫法测定血清 β-EP 水平。

1.5 统计学分析

检测结果以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，运用 SPSS10.0 统计分析软件完成检验、one-way ANOVA 分析与相关性分析，P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 脑创伤大鼠 RBC-C3bRR、RBC-ICR 及 β-EP 水平的变化

与对照组比较，各脑创伤组伤后 6 h 内即出现 RBC-C3bRR 明显降低（P<0.05），RBC-ICR 明显升高（P<0.05），β-EP 明显升高（P<0.05）。脑创伤组间比较，中重型组较轻型组各指标改变更为显著（P<0.05）。伤后 RBC-C3bRR 呈逐渐回升趋势，但伤后 7 d 仍低于对照组；RBC-ICR 和 β-EP 呈下降趋势，但伤后 7 d 仍高于对照组（见表 1）。

2.2 β-EP 与 RBC-C_3bRR、RBC-ICR 变化的相关性

轻型 TBI 组和中重型 TBI 组中 β-EP 与 RBC-C_3bRR 均呈直线负相关（r=-0.698，P<0.05；r=-0.744，P<0.05）；β-EP 与 RBC-ICR 均呈直线正相关（r=0.835，P<0.05；r=0.729，P<0.05）。

表 1 各组大鼠 RBC-C_3bRR、RBC-ICR、β-EP 变化

组别	时间	检测指标		
		RBC-C_3bRR(%)	RBC-ICR(%)	β-EP(ng/L)
对照组(n=10)	24 h	8.16 ± 1.88▲	9.39 ± 2.28▲	118.47 ± 11.89▲
轻型组(n=30)	6 h	5.98 ± 1.29*	13.06 ± 2.77*	159.11 ± 6.22*
	12 h	5.49 ± 2.34*	12.93 ± 2.03*	141.97 ± 4.13*
	24 h	6.56 ± 2.45*	12.49 ± 2.19*	132.56 ± 3.77*
	3 d	7.07 ± 2.09*	11.06 ± 1.87*	129.17 ± 4.51*
	7 d	7.99 ± 2.32*	9.92 ± 2.46*	120.66 ± 5.16*
中重型组(n=30)	6 h	2.97 ± 1.23**	23.63 ± 3.92**	213.95 ± 26.30**
	12 h	3.34 ± 1.69**	20.49 ± 3.19**	178.99 ± 4.21**
	24 h	3.74 ± 2.16**	18.66 ± 2.94**	156.34 ± 9.44**
	3 d	4.09 ± 2.75**	15.17 ± 2.51**	135.39 ± 5.85**
	7 d	6.25 ± 1.78**	13.11 ± 2.67**	133.19 ± 5.47**

注：表中 * 与▲比较 P<0.05，** 与▲比较 P<0.05，* 与 ** 比较 P<0.05

3 讨 论

3.1 TBI 后免疫抑制

TBI 是神经外科最常见的疾病之一。有文献[3]统计,重型 TBI 患者治疗后期继发感染的发生率可达 70%,是导致预后不良甚至死亡的主要原因之一。国内外学者通过大量动物实验和临床研究证实继发感染与脑创伤后机体免疫功能下降有关[1,4,5],包括细胞免疫、体液免疫、红细胞免疫等多系统。目前对 TBI 后体液免疫和细胞免疫功能障碍的研究已较深入,亦有较多文献报道[6,7],而 TBI 后红细胞免疫功能改变的报道尚不多见。

3.2 红细胞免疫功能(EIF)

EIF 是目前免疫学研究中最为注目的领域之一。传统认为红细胞仅有载氧功能,1981 年美国的 Siegel 提出了"红细胞免疫系统"的新概念,指出红细胞不仅能运输氧和二氧化碳,还具有识别、粘附、杀伤抗原,清除免疫复合物,参与机体免疫调控等多种作用,是机体免疫系统的重要组成部分。红细胞通过膜上的补体受体 CR1,在补体 C_3b 参与下与血液循环中的免疫复合物结合,运送至肝脏及脾脏内皮系统予以清除,即为红细胞主要的免疫功能[8]。EIF 的主要评价指标是红细胞免疫粘附(Red cell immune adhesion,RCIA)能力[9,10],常用红细胞 C_3b 受体花环率(RBC-C_3bRR)和红细胞免疫复合物花环率(RBC-ICR)来表示。RBC-C_3bRR 代表红细胞表面能与 C_3b 结合的 CR1 位点的数量,RBC-ICR 代表覆盖于红细胞表面而未被粘附的免疫复合物的数量。红细胞免疫功能障碍时,其免疫粘附能力下降,清除抗原异物的能力随之下降,即表现为 RBC-C_3bRR 降低,RBC-ICR 升高。国内外已有较多报道证实,脑出血、脑梗死等神经系统疾病患者有红细胞免疫功能的改变[11,12],而目前关于 TBI 后红细胞免疫功能障碍的报道较少见。

3.2 TBI 后 EIF 的改变及意义

本研究显示:与对照组比较,TBI 后大鼠 RBC-C_3bRR 明显降低($P<0.05$),RBC-ICR 明显升高($P<0.05$)。各指标改变于伤后 6 h 即出现,此后逐渐恢复,轻型脑创伤组伤后 7 d 时各指标已接近对照组;中重型脑创伤组各时间点各指标改变较轻型组更为显著($P<0.05$),且伤后 7 d 仍未恢复。本研究证实:TBI 后大鼠出现红细胞免疫功能障碍。RBC-C_3bRR 明显降低,表明红细胞的免疫粘附能力下降;RBC-ICR 明显升高,反映了 TBI 后红细胞清除抗原异物的能力亦有所降低。中重型组较轻型组改变更为显著,表明 EIF 功能障碍程度与伤情密切相关,伤情越重功能障碍越明显。

3.3 TBI 后 EIF 改变的机制及其意义

国内外大量研究表明,机体免疫功能受神经内分泌系统的调控。内源性阿片类物质如 β-EP 对机体机体免疫功能有影响。朱新波等[13]研究发现,机体在创伤应激反应下,下丘脑释放因子促使垂体前叶分泌释放大量 β-EP,部分进入血液使血浆 β-EP 增高。洪新如等[14]临床和实验证实,创伤后 β-EP 含量均高于正常对照组,合并感染者 β-EP 含量维持在高水平,不合并感染者,β-EP 渐下降,但仍高于正常组。上述研究提示 β-EP 参与了创伤后的免疫抑制。同时国内学者[15]研究发现,TBI 后血液中阿片类物质(β-EP)水平升高,可使红细胞出现变形,屈曲能力降低,膜结构改变,致使 CR1 的表达和构型发生变化。孙志阳等[16]通过实验证实,β-EP 对红细胞 CR1 有双重调节作用:在一定范围内,EIF 随着 β-EP 含量的增加而增强,但超过一定范围,随 β-EP 含量的增加 EIF 反而降低。并推测其原因是过多的 β-EP 超过了红细胞表面 β-EP 受体的结合点,改变了 CR1 的构象而降低其活性,从而影响了红细胞免疫粘附能力。

本研究结果显示 TBI 急性期即出现血浆 β-EP 反应性升高,TBI 后 6 h 即出现峰值,之后有所下降,但 TBI 后 7d 组与对照组比较仍有显著性差异($P<0.05$)。提示 TBI 后血液中 β-EP 含量迅速升高,并维持较长时间。同时,我们实验结果表明:轻型和中重型脑创伤组大鼠血浆中 β-EP 与 RBC-C_3bRR、RBC-ICR 均呈直线相关性,表明 β-EP 升高与脑创伤后红细胞免疫功能障碍密切相关,高浓度 β-EP 可能通过改变的 CR1 构型最终引起红细胞免疫功能抑制。

综上所述,我们推测脑创伤后,机体在创伤应激反应下,下丘脑释放因子促使垂体前叶大量释放 β-EP,使血中 β-EP 含量迅速升高,高浓度的 β-EP 导致机体红细胞免疫功能抑制,从而影响机体全身的免疫功能,降低患者抗感染能力。因此,在临床治疗中采取阻断高浓度 β-EP 表达的治疗方法如盐酸纳洛酮、免疫刺激剂的应用等,可能减轻 TBI 后的继发性免疫功能障碍,减少继发感染,改善患者预后。

基础研究 文章编号：0253-3626(2009)05-0532-05

骨保护素的克隆及对骨髓间充质干细胞分化的影响

陈 富，徐希彦，柯珍勇，尹良军，郭常辉，王雪燕，林春阳，邓忠良
（重庆医科大学附属第二医院骨科，重庆 400010）

【摘 要】目的：克隆人骨保护素（Osteoprotegerin，OPG）基因并构建其重组腺病毒，观察其对 BMSCs 分化的影响. 方法：RT-PCR 方法从人肝克隆 OPG 基因全长 cDNA，利用穿梭质粒将 OPG 基因重组获得复制缺陷型重组腺病毒 AdOPG；分离培养兔骨髓间充质干细胞，使用 AdOPG 感染兔 BMSCs，以 RT-PCR 及 Western Blot 的方法鉴定 BMSCs 对 OPG 的表达。比色测定和细胞碱性磷酸酶染色法观察 AdOPG 感染 BMSCs 后 5 d 时碱性磷酸酶（ALP）的表达。结果：克隆获得人 OPG 基因，测序与 Gene bank 一致，构建的重组腺病毒 AdOPG 滴度达 10^9 efu/ml，AdOPG 感染 BMSCs 5 d 后 ALP 活性值为（21 024 ± 507）IU，AdGFP 对照组为（3 079 ± 89）IU，空白对照组为（2 156 ± 78）IU。结论：骨保护素有利于骨髓间充质干细胞向成骨细胞方向分化。

【关键词】腺病毒；人骨保护素；骨髓间充质干细胞
【中国图书分类法分类号】R336 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-04-01

作者介绍：陈 富（1968- ），男，讲师，
研究方向：骨质疏松性骨折治疗。
通讯作者：邓忠良，男，教授，E-mail：deng7586@gmail.com。
基金项目：国家自然科学基金（30672121）；重庆市教委科研课题（渝教科 2002-27）。

参 考 文 献

[1] Chen D Q，Zhu L L. Dynamic change of serum protein S100b and its clinical significance in patients with traumatic brain injury[J]. Chinese Journal of Traumatology，2005，8(4)：245-248.
[2] 刘海鹏，尹志勇，王正国，等.颅脑局部冲击伤——种新的颅脑损伤模型[J]. 中华实验外科杂志，1999，16(1)：91-93.
[3] Hoyt D B，Ozkan A N，Hansbrough J F，et al.Head injury：an immunology deficit inT cell activity [J] .Trauma，1990，30(7)：759-763.
[4] Gnllon P J，Davies M J.Biological variation in the development of sepsis after Surgery or trauma[J]. Lancet，1993，342(8865)：217-220.
[5] Rodriguez J L，Miller C G，Garner W L，et al. Correlation of the local and system rylokine response with clinical outcome following thernal injury [J]. Trauma，1994，34(5)：684-689.
[6] Hofsteter H H，Sewell D L，Liu F，et al.Autoreactive T cells promote post-traumatic healing in the central nervous system[J]. J Neuroimmunol，2003，134(1-2)：25-34.
[7] Miao Y L，Zhang M X，Nie Y L，et al.Changes in T lymphocyte subsets after severe traumatic brain injury[J]. Neural Regeration Research，2007，2(2)：126-128.
[8] McLare C A，Williom son J F，Stewart B J，et al. Indels and imperfect duplication have driven the evolution of human complement receptor 1 (CR1)and CR1-like from their precursor CR1 alpha：Importance of functional sets[J]. Hum Immunol，2005，66(3)：258-273.
[9] 沈关心，周汝麟.现代免疫学实验技术[M].武汉：湖北科学技术出版社，1998.232-340.
[10] 魏建军，周义英，王 敬.SD 和 Wistar 大鼠红细胞免疫功能测定[J]. 四川动物，1999，18(1)：41-42.
[11] 丁素菊，李永生，侯晓军，等.急性脑梗死患者红细胞免疫调控因子对红细胞免疫粘附功能的影响[J]. 中国神经精神疾病杂志，2003，29(2)：120-121.
[12] 章文斌，卜 博，周定标.脑出血患者红细胞免疫及 T 细胞亚群的变化[J]. 中国临床康复，2004，19(8)：3790-3791.
[13] 朱新波，王菊香，林 丹. 纳洛酮对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤血浆 β-EP 和 VIP 的影响[J]. 中国药理学通报，2005，21(6)：760-761.
[14] 洪新如，李 明，高建章，等.大鼠创伤后血浆 β-内啡肽的动态变化及意义[J]. 中华外科杂志，1994，32(4)：220-223.
[15] 王玉龙，杨文东，安振国，等.红细胞 CR1 在急性颅脑损伤患者表达及免疫功能的探讨[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2003，19(2)：206-208.
[16] 孙志阳，赵孟尧，郭 峰，等.脑损伤红细胞免疫功能变化及临床意义[J]. 中华神经外科，1995，11(3)：138-141.

（责任编辑：冉明会）