DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.08.003
第25卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 8
2003年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2003

文章编号:1000-5404(2003)08-0657-03

论著

β-内啡肽对大鼠创伤失血性休克后刀豆素A诱导的脾细胞IL-2R表达及IL-2分泌的调节作用

王 军[1],文爱清[2],刘良明[2] (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所:[1]消化内科;[2]第二研究室,重庆 400042)

提 要:目的 探讨血浆β-内啡肽(β-endorphin,β-EP)在创伤失血性休克后以脾细胞IL-2R表达及IL-2分泌为代表的细胞免疫调节中的作用。方法 ①采用大鼠创伤失血性休克模型,收集休克前、休克后0、1、3、6、12、24 h休克血浆(SP),并检测SP中β-EP水平;②采用体外实验,分离并混合4只正常大鼠脾细胞,分别与SP、SP+β-EP抗血清体外培养,观察conA诱导的脾细胞IL-2分泌及IL-2R表达的变化。结果 ①休克后即刻血浆β-EP水平显著升高($P<0.01$),1 h达高峰,之后呈下降趋势,24 h趋于休克前水平。②与对照组相比,SP可显著降低conA诱导的脾细胞功能($P<0.01$),SP中β-EP含量与脾细胞IL-2分泌及IL-2R表达呈显著负相关($P<0.01$);SP经β-EP抗血清处理组较未处理组相比,脾细胞功能明显升高($P<0.05$),但仍低于对照组。结论 创伤失血性休克后血浆中显著升高的β-EP参与了机体的免疫抑制。

关键词:β-内啡肽;创伤;失血性休克;免疫;大鼠
中图法分类号:R392.11;R605.971;R641.02 文献标识码:A

Role of β-endorphin in the regulation of ConA-induced IL-2R expression and IL-2 production in rat splenic cells following traumatic hemorrhagic shock

WANG Jun, WEN Ai-qing, LIU Liang-ming (Department of Gastroenterology, Daping Hospital, Third Military Medical Universtiy, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the role of plasma β-endorphin(β-EP) in the regulation of cellular immunity, mainly IL-2R expression and IL-2 production in rat splenic cells, following traumatic hemorrhagic shock(T-HS). Methods ①Wistar rats with T-HS were used and sacrificed at 0, 1, 3, 6, 12 and 24 h after T-HS. Plasma specimens were collected and β-EP levels in plasma were detected. Rats with sham-operation were served as the controls. ②Models of *in vitro* experiment were used. Spenic cells were isolated and mixed from four normal rats and cocultured with shock plasma or shock plasma+β-EP antiserum. ConA-induced splenic cell IL-2 production and IL-2R expression were observed. Results ①Level of plasma β-EP increased remarkably after T-HS immediately, peaked at 1 h, showed decreasing tendency and restored to pre-shock level 24 h after T-HS. ②Shock plasma significantly suppressed ConA-induced splenic cell function; Levels of plasma β-EP were negatively correlated with IL-2 production and IL-2R expression in spenic cells; Compared with that in SP group, splenic cell function elevated markedly in SP+β-EP antiserum group, but was still lower than that in controls. Conclusion The increased plasma β-EP following T-HS is involved in the suppression of cellular immunity.

Key words: β-endorphin; trauma; hemorrhagic shock; immunity; rats

创伤失血性休克后免疫抑制机制的研究深受人们的关注。研究已证实创伤后免疫功能低下以T细胞免疫功能紊乱为主,表现为Th1细胞增殖功能降低,表达IL-2R下降及分泌IL-2等细胞因子分泌减少。另一方面研究发现休克等应激时中枢释放及外周合成β-内啡肽(β-endorphin,β-EP)增加,使外周血中β-EP含量明显升高。β-EP具有广泛的双向免疫调节作用[1,2],然而创伤后升高的β-EP是否参与其免疫抑制,以及参与免疫抑制中的地位如何,目前仍缺乏其直接证据。本研究采用体外实验的方法,以脾细胞为靶细胞,并对此进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

β-EP放免试剂盒、β-EP抗血清(1∶30 000)(第二军医大学基

基金项目:全军"九五"指令性课题(96L041)
作者简介:王 军(1973-),男,河南省信阳市人,硕士研究生,医师,主要从事神经免疫方面的研究。电话:(023)68757342
收稿日期:2002-09-25;修回日期:2003-01-08

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

础医学部神经生物学教研室)，抑肽酶 aprotinin(Sagon，上海)，RPMI-1640培养液(Hyclon，美国)，小牛血清(Hyclon，美国)，conA(Boehringer Mannheim，德国)，MTT(Sigma，美国)，小鼠抗大鼠CD25抗体和FITC-多克隆抗小鼠IgG(进口分装，深圳晶美公司)，IL-2标准品(第三军医大学免疫学教研室)。

1.2 创伤失血性休克模型的建立

健康Wistar大鼠84只，体质量(245±28) g，雌雄不拘(由第三军医大学野战外科研究所提供)，随机分为休克前及休克后0、1、3、6、12、24 h共7组，每组12只。戊巴比妥钠30 mg/kg腹腔麻醉，股动脉放血至血压40 mmHg维持1 h后复苏，回输失血及2倍林格液，加右股骨中段粉碎性骨折制成创伤失血性休克模型，实验动物按500 U/kg全身血肝素化。对照组为假手术组，即动物仅插管不放血且无创伤骨折。

1.3 血浆标本的收集

于创伤失血性休克模型完成后不同时相点分别股动脉放血处死，取3 ml血置于含抑肽酶(Aprotinin) 50 U/ml的管内，4 ℃、4 000 r/min离心10 min，分离血浆500 μl立即置于－20 ℃保存，用于测定血浆β-EP含量。剩余血浆－20 ℃保存，用于细胞培养。

1.4 体外实验

无菌分离4只Wistar大鼠脾细胞，混合后，用含10%小牛血清1640培养基中培养。在此基础上加各种处理因素。检测指标：脾细胞增殖、IL-2及IL-2R。

1.5 指标测定方法

血浆β-EP含量测定：按试剂盒说明进行，结果以三复管平均值表示；IL-2活性测定：采用CTLL2细胞株依赖法；IL-2R测定：间接免疫荧光法，上流式细胞仪测定5 000个细胞，计算阳性细胞率(%)。

1.6 实验分组及方法

实验分为：休克血浆组(SP)和β-内啡肽抗血清治疗组(SP+β-EP anti-serum，SPAS)，并同时设基础对照组(BL)、SP＋IgG对照组(SPIG)、β-EP抗血清自身对照组(AS)。方法：SP组：取不同时相点的SP(终浓度为10%)分别加入到正常脾细胞培养中；SPAS组：SP与β-EP抗血清(1∶300)按2∶1比例4 ℃冰浴2 h后加入到正常脾细胞培养中。以不加任何处理因素的正常脾细胞培养为BL组，SPIG组及AS组的加样方式同SPAS组，每组6孔。

1.7 统计学处理

实验数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 10.0软件，分别用单因素方差分析、多因素方差分析、相关分析等方法进行统计学处理。

2 结果

2.1 大鼠创伤失血性SP中β-EP含量变化

创伤失血性休克后即刻(0 h)血浆β-内啡肽较休克前显著升高($P<0.05$)，伤后1 h达到最高水平($P<0.01$)，随后呈下降趋势，但在休克后6 h仍非常显著高于对照组($P<0.01$)，这与国内外报道基本一致[3,4]。休克后12 h虽高于休克前，但无统计学意义($P>0.05$)，见表1。

表1 大鼠创伤失血性休克后血浆β-EP含量的变化($\bar{x}\pm s$，$n=10$)

Tab 1 Changes of plasma β-EP following traumatic hemorrhagic shock in rats ($\bar{x}\pm s$，$n=10$)

Group	β-EP (pg/ml)
Control	96.7±28.6
Post T-HS	
0 h	152.7±26.4 *
1 h	418.2±113.9 **
3 h	252.2±82.4 **
6 h	181.5±65.9 **
12 h	136.9±34.7
24 h	109.4±23.8

T-HS：Trauma hemorrhagic-shock *：$P<0.05$；**：$P<0.01$ *vs* control

2.2 SP对正常大鼠脾细胞免疫功能的影响

由于休克即刻(0 h)至休克后6 h血浆β-EP水平显著高于休克前，所以取休克0、1、3、6 h SP(10%)分别与正常大鼠脾细胞培养。结果发现SP非常显著地抑制ConA诱导的IL-2分泌及IL-2R表达($P<0.01$)；休克1 h血浆抑制效果最明显($P<0.01$)，见表2。SP中β-EP含量与IL-2分泌及IL-2R表达呈负相关($P<0.01$)，相关系数r分别为－0.57、－0.62；可决系数R^2分别为0.32，0.4，均小于0.5。

表2 休克血浆对正常大鼠脾细胞IL-2分泌、IL-2R表达的影响($\bar{x}\pm s$，$n=6$)

Tab 2 Effects of plasma from shocked rats on conA-induced IL-2 production and IL-2R expression in normal splenic cells ($\bar{x}\pm s$，$n=6$)

Group	IL-2 (U/ml)	IL-2R (Positive rate，%)
BL	9.56±0.81	78.16±9.42
Control	9.71±1.45	81.65±9.46
SP0	5.78±0.54 **	53.95±5.78 **
SP1	4.63±0.61 **	36.03±5.61 **
SP3	4.71±0.61 **	37.54±2.68 **
SP6	6.40±0.79 **	49.49±5.16 **

SP0，SP1，SP3，SP6：Plasma from shock 0，1，3，6 h group respectively；Control：Normal plasma group；BL：Baseline group；**：$P<0.01$ *vs* control

2.3 体外β-EP抗血清对SP处理脾细胞免疫功能的影响

由于休克1 h血浆抑制效果最明显，以下实验均采用休克1 h血浆。结果发现，与SP组相比，SPAS组，脾细胞IL-2的分泌及IL-2R的表达显著升高($P<0.05$)，但仍然非常显著低于BL组($P<0.01$)。AS组与BL组、SPIG组与SP组间相比，脾细胞IL-2的分泌及IL-2R的表达无显著差异。见表3。

表3 β-EP抗血清对休克血清处理的正常大鼠脾细胞IL-2分泌、IL-2R表达的影响($\bar{x}\pm s$，$n=6$)

Tab 3 Effects of β-EP anti-serum on conA-induced IL-2 production and IL-2R expression in cultured normal splenic cell treated with plasma from shocked rat ($\bar{x}\pm s$，$n=6$)

Group	IL-2 (U/ml)	IL-2R (Positive rate，%)
BL	9.56±0.89	78.16±9.42
SP	4.63±0.61	36.03±5.61
SPAS	5.80±0.59 *△	48.25±6.35 *△
AS	9.71±0.10	79.16±9.42
SPIG	4.65±0.51	37.13±5.06

SP：Shock 1 h plasma group；SPAS：SP1＋β-EP antiserum group；AS：β-EP antiserum self-control group；SPIG：SP1＋IgG group；*：$P<0.01$ *vs* SP group；△：$P<0.01$ *vs* BL

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

自 β-EP 被发现以来的 20 多年中, 人们发现 β-EP 及其受体不仅在神经系统中起镇痛作用, 还对免疫系统内发挥重要的双向免疫调理功能[1,2]。许多研究者利用其免疫调节功能为许多疾病, 如自身免疫疾病等提供了新的治疗靶点[5]。创伤失血性休克后免疫抑制机制的研究深受人们的关注。动物研究及人体观察表明, 创伤、休克等应激使机体免疫受抑, 尤其以细胞免疫抑制明显。而免疫系统的自稳除免疫细胞和体液因子的相互作用和调节外, 还依赖于神经内分泌免疫网络的平衡。内阿片肽(主要是 β-EP)作为"神经调质", 对机体神经内分泌免疫网络有重要的调节功能。创伤、外科手术、休克、情绪改变等应激条件下, 内阿片系统被激活, 导致垂体及免疫细胞合成和释放 β-EP 增加, 从而血浆 β-EP 明显增加[1,4]。关于血浆中显著升高的 β-EP 在创伤失血性休克后免疫抑制中发挥怎样的作用, 以往的研究仅证明创伤失血性休克后血浆 β-EP 显著升高, 同时免疫功能降低, 二者呈负相关[3,6], 从而推出 β-EP 可能参与创伤失血性休克后免疫抑制, 但目前仍缺乏直接证据。

本研究利用大鼠创伤失血性休克为模型, 观察到创伤失血性休克后 0～6 h 血浆 β-EP 明显增加, 1 h 达最高峰, 24 h 趋于休克前水平, 与 Levy 等[3] 和 Nerlich 等[4] 报道基本一致。休克后 0～6 h 血浆非常显著地抑制正常大鼠脾细胞对丝裂原刺激后 IL-2 的分泌及 IL-2R 的表达, 其中休克后 1 h 血浆抑制效果最明显, 且 SP 中 β-EP 含量与脾细胞 IL-2 分泌及 IL-2R 表达呈显著负相关($P<0.01$), 表明血浆中 β-EP 可能参与抑制大鼠脾细胞对 conA 的反应性。但是这还不能排除血浆中其它免疫抑制因子如 PGE_2、儿茶酚胺、糖皮质激素、血清免疫抑制因子等的影响[4,7]。为此, 本实验设计了 SP+β-EP 抗血清组, 即 SP 预先经抗血清处理(4 ℃冰育 2 h)后, 与大鼠正常脾细胞共同培养, 与未经 β-EP 抗血清处理的 SP 组的脾细胞功能相比较, 发现脾细胞 IL-2 的分泌及 IL-2R 的表达明显回升。β-EP 抗血清自身对照组与基础对照组、SPIG 组与 SP 组相比, 结果相差不显著, 表明 β-EP 抗血清对脾细胞功能并无任何作用, 是由于 β-EP 抗血清特异地中和了 SP 中的 β-EP, 导致 SPAS 组脾细胞功能升高, 结果直接说明了 β-EP 参与创伤失血性休克的免疫抑制。

另一方面, SP 中 β-EP 水平与脾细胞 IL-2 的分泌及 IL-2R 表达的相关系数 r 均小于 0.65, 可决系数 R^2 均小于 0.5, 以及经 β-EP 抗血清处理后的 SP 组的脾细胞功能仍然低于对照组, 这些结果说明了参与创伤失血性休克后免疫抑制的因素是复杂和多方面的。除了 β-EP 外可能还有其他内阿片肽、神经体液因子、炎症介质和细胞因子等参与了其过程和环节。

参考文献:

[1] Alberto E P, Paola S. β-endorphin in the immune system: a role at last[J]. Immunology Today, 1997, 18(7): 317－319.

[2] Refojo D, Kovalovsky D, Young J I, *et al*. Increased splenocyte proliferative response and cytokine production in beta-endorphin-deficient mice[J]. J Neuroimmunol, 2002, 131(1-2): 126－134.

[3] Levy E M, McIntosh T, Black P H. Elevation of circulating beta-endorphin levels with concomitant depression of immune parameters after traumatic injury[J]. J Trauma, 1986, 26(3): 246－249.

[4] Nerlich M L, Holch M, Stalp M, *et al*. Neuropeptide levels early after trauma: immunomodulatory effects[J]. ?J Trauma, 1994, 37(5): 759－768.

[5] Sacerdote P, Gaspani L, Panerai A E. Role of beta-endorphin in the modulation of immune responses: perspectives in autoimmune diseases[J]. Adv Exp Med Biol, 2001, 493(1): 137－142.

[6] Lederer J A, Rodrick M L, Mannick J A. The effects of injury on the adaptive immune response[J]. Shock, 1999, 11(3): 153－159.

[7] Tsigos C, Chrousos G P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress[J]. J Psychosom Res, 2002, 53(4): 865－871.

(编辑　郭建秀)

(上接 656 页)

发展于 20 世纪 50 年代, 其方法是将体温降至 20 ℃以下, 停止血液供应, 进行心脏血管手术。1960 年 Wood Hall 首先报道将此项技术成功应用于神经外科手术当中。深低温停循环方法采用体表降温合并体外循环法处理血管性疾病[2]。当体温降至 20～18 ℃时循环停止, 从而停止全身血液供应。采用停止循环可以使动脉瘤缩小乃至塌陷, 从而清楚地辨别动脉瘤与载瘤动脉以及周围结构关系, 在无动脉瘤破裂的情况下进行动脉瘤分离和夹闭, 从而减少术中出血, 降低了手术风险, 同时低温也有脑保护作用, 能提高脑组织对局部缺血的耐受程度。有报道深低温脑循环停止 60 min, 脑组织无明显损害, 如果停循环超过 90 min, 则会造成明显不可逆性脑损害[3]。并且深低温也有一些并发症, 如延迟苏醒、体温不稳、增加血液粘稠度、血栓形成或全身肝素化后的脑表面广泛渗血等。因而并发症的预防和处理以及体外循环下的脑保护等仍是术中及术后重点关注的问题。

总之, 深低温停循环是处理复杂动脉瘤非常有用的措施之一, 尤其适宜于青壮年其它脏器功能良好的巨大动脉瘤患者。随着对深低温和循环停顿病理生理改变认识的提高, 必将提高复杂动脉瘤的疗效。

关键词: 深低温; 体外循环; 动脉瘤
中图法分类号: R730.56; R732.21　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Connolly E S Jr, Solomon R A. Hypothermic cardiac standstill for cerebral aneurysm surgery[J]. Neurosurg Clin N Am, 1998, 9(4): 681－695.

[2] Aebert H, Brawanski A, Philipp A, *et al*. Deep hypothermia and circulatory arrest for surgery of complex intracranial aneurysms[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 1998, 13(3): 223－229.

[3] 康静琼, 李清美. 脑缺血耐受机制的研究进展[J]. 国外医学脑血管疾病分册, 1998, 6(3): 134－137.

(编辑　张大春)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net