DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.04.016
第23卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 4
404 2001年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)04-0404-03

β-内啡肽在大鼠创伤失血性休克脾细胞增殖功能的作用研究

文爱清,刘良明,胡德耀 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第二研究室,重庆 400042)

提 要:目的 探讨创伤失血性休克后,血浆β-内啡肽(β-EP)对脾细胞增殖功能的调节作用。方法 ①以Wistar大鼠制造创伤失血性休克模型,于模型完成后0、1、3、6、12、24 h分别处死大鼠、收集血浆标本并检测β-内啡肽水平,并设假手术对照组;②分离正常大鼠脾细胞,分别与休克血浆(Ⅰ组)、灭活休克血浆(Ⅱ组)及休克血浆+β-内啡肽抗血清(Ⅲ组)体外培养,观察conA诱导的脾细胞增殖功能。结果 ①休克后即刻血浆β-内啡肽水平显著升高($P<0.01$),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,创伤休克血浆可显著降低conA诱导的脾细胞增殖功能($P<0.01$);休克血浆经灭活后,脾细胞增殖功能非常显著回升($P<0.01$);休克血浆经β-EP抗血清处理较未经抗血清处理相比,脾细胞增殖功能明显升高($P<0.05$),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-内啡肽对抑制脾细胞增殖功能有重要的作用。

关键词:β-内啡肽;创伤失血性休克;脾细胞增殖
中图法分类号:R322.21;R605.971;R971.9 文献标识码:A

Role of β-endorphin in conA-induced spleen cell proliferation in rats with traumatic hemorrhagic shock

WEN Ai-qing, LIU Liang-ming, HU De-yao (Research Institute of Field Surgrey, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To investigate the role of β-endorphin (β-EP) in conA-induced spleen cell proliferation after traumatic hemorrhagic shock. **Methods** ①Wistar rats with traumatic hemorrhagic shock were used and killed 0, 1, 3, 6, 12 and 24 h after traumatic hemorrhagic shock. Plasma specimens were collected and β-EP levels in plasma were detected. Rats with sham-operation served as the control. ②Spleen cells isolated from normal rats were cultured in shock plasma (group Ⅰ), inactivated shock plasma (group Ⅱ) and shock plasma+β-EP antiserum (group Ⅲ) respectively. Con A-induced spleen cell proliferation was observed. **Results** ①The plasma β-EP level was elevated significantly immediately after shock, and reached the peak 1 h later, then showed a deceasing tendency and restored to the level as before shock at 24 h. ②Shock plasma remarkedly suppressed spleen cell response to the mitogen conA ($P<0.01$) compared with control; ConA-induced spleen cell proliferative function in group Ⅱ was significantly increased than that in group Ⅰ ($P<0.01$), so did in group Ⅲ, which still lower than in control. **Conclusion** The significantly elevated β-EP in the plasma after hemorrhagic shock might play an important role in inhibiting the proliferation of spleen cells.

Key words: β-endorphin; traumatic hemorrhagic shock; spleen cell proliferation

创伤失血性休克后免疫抑制机制的研究深受人们的关注。研究表明,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。以往的研究证明创伤失血性休克后β-内啡肽(β-endorphin,β-EP)显著升高,同时免疫功能降低,呈负相关[1],然而β-内啡肽在创伤失血性休克后免疫抑制的作用究竟如何,目前缺乏直接证据,值得研究。本研究以体外实验的方法,把休克血浆、灭活休克血浆及休克血浆+β-内啡肽抗血清分别与正常脾细胞共同培养,以了解β-内啡肽在创伤失血性休克后免疫抑制的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

β-内啡肽放免试剂盒、β-内啡肽抗血清(1∶30 000)(第二军医大学神经生物教研室提供),抑肽酶Aprotinin(Sagon,上海),RPMI-1640培养液(Hyclon,美国),conA(Boehringer Mannheim)。余试剂均为AR级。

1.2 实验动物处理

健康Wistar大鼠84只,体重(245±28) g,雌雄不拘(由第三军医大学野战外科研究所提供)。随机分为对照组、休克后0、1、3、6、12、24 h 7个组,每组12只。戊巴比妥钠30 mg/kg腹腔麻醉,定量失血至血压40 mmHg维持1 h后复苏,回输失血及2倍林格氏液,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。

1.3 血浆标本收集

于创伤失血性休克模型完成后,分别于休克前及休克后0、1、3、6、12、24 h分别股动脉放血活杀,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 ℃保存待测,剩余血浆-20 ℃保存用于细胞培养。

1.4 测定指标

①血浆β-内啡肽免疫活性物质(irβ-EP)的测定:按β-内啡肽放免试剂盒说明书进行,结果以3复管平均值表示。②脾细胞增殖功能试验(MTT法[2]):为体外实验。即在正常脾细胞培养的基础上加各种处理因素后测定脾细胞的增殖能力。根据加入的处理因素不同而分为3组,每组6孔:Ⅰ组:休克血浆组;Ⅱ组:灭活休克血浆组;Ⅲ组:休克血浆β-内啡肽抗血清组。即将10%动物休克血浆(Ⅰ组)和灭活休克血浆(Ⅱ组)0.22 μm

基金项目:全军"九五"科研课题(96L041)
作者简介:文爱清(1973-),女,湖南省株洲县人,硕士,医师,主要从事战创伤休克的免疫调理治疗方面的研究。电话:(023)68757432
收稿日期:2000-09-04;修回日期:2000-12-20

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

滤过除菌后, 分别与正常脾细胞共同培养, 观察其脾细胞增殖功能, 495 nm 比色得 D_{495}值。休克血浆+β-内啡肽抗血清组(Ⅲ组)是先将休克血浆 200 μl 与1∶300β-内啡肽抗血清 100 μl 充分混合, 4 ℃冰育 2 h 后操作同前。另外, 每组均设空白对照组及大鼠假手术血浆对照组;β-内啡肽抗血清组(Ⅲ组)设休克血浆+IgG 为自身对照。

1.5　统计学处理

所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 student' s t 检验。

2　结果

2.1　休克后不同时相血浆 ir-β-EP 含量的变化

休克后即刻(0 min)血浆 ir-β-EP 含量较休克前显著升高[(180±62)、(98±30) pg/ml, $P<0.05$], 休克后 1 h 达到最高点, 达(405±132) pg/ml, 为休克前的 4～5 倍; 之后 ir-β-EP 呈下降趋势, 休克后 6 h 仍显著高于休克前($P<0.05$), 休克后 24 h 虽高于休克前, 但无统计学意义($P>0.05$)。

2.2　休克血浆对正常大鼠 conA 诱导脾细胞增殖功能的影响

由于休克即刻(0 min)至休克后 6 h 血浆 ir-β-EP 水平显著高于休克前, 所以取休克 0 min 至休克后 6 h 血浆(10%)分别与正常大鼠脾细胞培养。结果发现休克 0 min 血浆显著地抑制脾细胞对丝裂原 conA 的反应性($P<0.05$); 休克 1 h 血浆抑制效果最明显($P<0.01$); 休克血浆对脾细胞增殖功能的抑制与休克血浆 ir-β-EP 水平呈负相关($r=-0.79$, $P<0.05$), 见表 1。

表 1　休克血浆对大鼠 **conA** 诱导的脾细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Tab 1　The effect of shock plasma on conA induced spleen cell proliferation of rats($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Control	Shock plasma of different time after T-HS			
	0	1 h	3 h	6 h
0.76±0.07	0.53±0.06 *	0.35±0.06 **	0.45±0.05 **	0.56±0.07 **

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

2.3　灭活休克血浆对正常大鼠 conA 诱导脾细胞增殖功能的影响

由于休克 1 h 血浆非常显著地抑制脾细胞增殖功能, 所以取休克 1 h 血浆经灭活后, 与脾细胞共同培养, 结果发现, 与休克血浆比, 灭活休克血浆非常显著地升高脾细胞的增殖功能($P<0.001$); 且略高于对照组, 但相差不显著($P>0.05$), 见表 2。

表 2　休克 **1 h** 血浆经灭活或β-**EP** 抗血清处理后对大鼠 **conA** 诱导的脾细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Tab 2　The effect of inactivated shock plasma orβ-EP antiserum treated shock plasma on conA induced spleen cell proliferation of rats($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Group	Control	SP(1 h)	Inactivity SP	SP+β-EP antiserum	SP+IgG
D_{495}	0.76±0.07	0.35±0.06 **	0.78±0.07 ##	0.46±0.07 *#	0.32±0.06

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* SP group; SP: shock plasma

2.4　β-内啡肽抗血清对正常大鼠 conA 诱导脾细胞增殖功能的影响

休克 1 h 血浆经与β-内啡肽抗血清孵育后, 能明显升高脾细胞增殖功能(0.46±0.07 与 0.35±0.06, $P<0.05$), 但仍然底于对照组, 见表 2。

3　讨论

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 ir-β-EP 增加, 从而血浆 ir-β-EP 明显增加[3]。某些细胞因子如 IL-1、促皮质激素释放激素(CRH)等可促进免疫细胞分泌β-EP。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 ir-β-EP 明显增加, 1 h 达最高峰, 24 h 趋于休克前水平, 与文献[3～5]报道基本一致。β-EP 是 91 肽的β-促脂肪酸释放激素(β-LPH)末端 31 个氨基酸的裂解片断, 因此,β-EP 与β-LPH 之间存在交叉反应[6], 本实验的血浆实际包括血浆中β-EP 及β-LPH, 称为β-EP 的免疫活性物质(ir-β-EP)。

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, NAL(纳络酮)可阻断机体的免疫抑制[7], 另外也证实了免疫细胞(T、B、MΦ 等)上有β-EP 的结合位点[8], 本室以往的研究证明了创伤失血性休克后中枢及外周某些阿片受体增多, 提示内阿片肽(主要是β-EP)可能介导了创伤失血性休克后免疫抑制作用。Elinor 等[1]的研究表明, 住院 ICU 创伤病人在创伤后前 4 d, 血中β-EP 浓度显著升高, 同时病人血中淋巴细胞对 PHA 的反应性降低及 $T4^+$ 细胞的百分比减少, 呈负相关, 然而β-EP 对创伤失血性休克后免疫抑制作用到底如何, 目前缺乏直接证据。本实验首次用体外实验, 以排除其它因素研究血浆中β-EP 对创伤失血性休克免疫抑制的作用。

本结果发现休克血浆能显著地抑制正常大鼠脾细胞对丝裂原的反应性, 且休克 1 h 最明显, 灭活血浆后脾细胞功能非常显著地回升, 表明血浆中 ir-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。为此, 本实验设计了休克血浆+β-EP 抗血清组, 即休克血浆预先经抗血清处理后, 与脾细胞共同培养, 与未经β-EP 抗血清处理及自身对照组的脾细胞功能相比较, 结果发现休克血浆经β-EP 抗血清处理后, 脾细胞增殖功能明显回升。由于β-EP 抗血清特异地中和了休克血浆中的 ir-β-EP, 有力地说明 ir-β-EP 参与创伤失血性休克的免疫抑制, 抑制了脾细胞(主要为 T 淋巴)对 conA 的反应性, 与创伤失血性休克的免疫功能低下有一定的关系。同时, 经β-EP 抗血清处理后的休克血浆组的脾细胞增殖功能仍然低于对照组, 这也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。当然, 我们也认为,β-内啡肽作为创伤休克应激反应的产物, 除抑制脾细胞增殖功能外, 同样有可能抑制免疫应答中的其它环节, 成为创伤失血性休克后免疫抑制的重要因素。已有的研究资料表明β-EP 通过中枢间接和外周直接两条途径发挥免疫调节作用。β-EP 的免疫调节的中枢机制主要是通过 HPA 轴。应激情况下, 垂体释放 β-EP 增加,β-EP 与脑阿片受体结合, 刺激

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

HPA 轴兴奋，释放大量神经肽，如 CRF、促肾上腺皮质激素（ACTH）、α-黑素细胞刺激激素（Alpha-melanocyte stimulating hormone，α-MSH），这些神经肽都具抑制特异性免疫细胞活性的功能。β-EP 对免疫细胞的直接作用主要通过免疫细胞表面阿片受体介导。然而，究竟是何种阿片受体介导了创伤失血性休克后的免疫抑制及其具体的受体机制，目前还不清楚，有待研究。

参考文献：

[1] Elinor M L, Tracy M, Paul H, *et al*. Elevation of circulating β-endorphin levels with concomitant depression of immune parameters after traumatic injury[J]. J Trauma, 1986, 26(3): 246—248.

[2] House R V, Thomas P T, Bhargava H N. *In vitro* exposure to peptidic delta opioid receptor antagonists results in limited immunosuppression[J]. Neuropeptides, 1997, 31(1): 89—92.

[3] Shatney C H, Cohen R M, Cohen M R, *et al*. Endogenous opioid activity in clinical hemorrhagic shock[J]. Surg Gynecol Obstet, 1985, 160(1): 547—551.

[4] Michael L N, Michael H, Michael S, *et al*. Neuropeptide levels early after trauma: immunomodulatory effects[J]. ? J Trauma, 1994, 37(5): 759—762.

[5] Pasi A, Moccetti T, Legler M, *et al*. Elevation of blood levels of beta-endorphin-like immunoreactivity in patients with shock[J]. Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 1983, 42(2): 509—512.

[6] Deitch E A, Xu D, Bridges R M. Opioids modulate human neutrophil and lymphocyte function: Thermal injury alters plasma β-endorphin levels[J]. Surgery, 1988, 104(1): 41—48.

[7] Shavit Y, Lewis J W, Terman G W, *et al*. Opioid peptides mediate the suppressive effect of stress on natural killer cell cytotoxicity[J]. Science, 1984, 223(6): 188—190.

[8] Panerai E, Sacerdote P. β-endorphin in the immune system: a role at last [J]. ? Immunol Today, 1997, 18(7): 317—319.

（编辑　陈聪连）

经验与短篇

文章编号：1000-5404(2001)04-0406-01

Kleine-Levin 综合征 1 例报告

A case report of Kleine-Levin syndrome

史树贵，张　帆　（第三军医大学附属西南医院神经内科，重庆 400038）

患者男，23 岁，因反复发作性睡眠增多 5 年，复发 1 d 入院。患者自 1994 年不明原因睡眠增多，全天均表现睡眠状，可醒来进食及解便，唤之可醒转，随后立即入睡，持续 6 d 好转。以后每 1～2 月发作 1 次，持续 2～6 d 不等。发作前觉头昏、持续性额枕部胀痛、头重，无贪食、多饮、多尿及其它不适。间隙期正常生活及工作。院外服苯妥因钠 0.1 g, 3/d 发作延长至 3～5 月 1 次；既往史、家族史无特殊。入院查体：体型瘦小，内科检查无异常。嗜睡，认知功能正常，四肢肌张力高，肌力 5 级，指鼻试验及快复轮替动作笨拙。颈轻度抵抗，双侧 Kenig 征阳性。辅助检查总胆固醇 6.89 mmol/L, LDL-C 5.12 mmol/L, VLDL-C 0.24 mmol/L, APO-B 0.52 g/L, APO-A1/APO-B 2.56; T_3 0.42（0.59～1.71）、T_4 46.9(52～121) μg/L，皮质醇节律正常，脑脊液检查正常。发作期 EEG 示双额、顶、枕叶弥散性低幅慢波，间歇期正常。入院后予碳酸锂治疗，病情好转，随访 1 年仅发作 1 次。

讨论

Kleine-Levin 综合征（KLS）为少见的周期性睡眠增多的一个亚型，尚无大宗病例报告。文献中其临床表现包括：周期性的过度睡眠，贪食，易激惹，意识混浊和 EEG 改变，部分患者可出现性欲亢进；症状期持续数天至 10 余天，缓解期 10 余天至数月不等；EEG 主要表现为睡眠时各期转换过快，即睡眠破碎（Sleep fragmentation），可有广泛弥散性慢波或高信号复合波，MRI、SPECT/PET 检查无脑的形态学、代谢异常及精神障碍证据[1,2]。诊断主要依靠临床表现。本例临床特点符合，但伴有脂代谢异常及甲状腺功能轻度低下。本征发病机制不明。曾认为精神因素、原发性皮层调节功能障碍[2]、下丘脑-垂体轴功能异常[3]均可能为其病因，但不肯定。Mayer 等[4]报道 5 例患者，并未发现皮质醇节律存在异常。内源性染色体的异常亦有个别报道[5]。

本例患者发作期皮质醇节律无异常与 Mayer 等[4]研究一致；但 T_3、T_4 水平轻度降低，说明患者发作期应激功能可能有异常，此外，肢体肌张力升高、体型瘦小但脂代谢明显异常，与该病的发生及病理方面是否存在必定联系尚不明确，亦未见文献报道。

KLS 预后较好，目前最为理想的治疗方法为锂盐制剂，本例患者经锂盐治疗发作次数明显减少，说明疗效确切，临床值得应用。

关键词：Kleine-Levin 综合征；睡眠障碍
中图法分类号：R442.8; R741　　文献标识码：B

参考文献：

[1] Malomo I O, Lawal R A, Orija O B. Kleine-Levin syndrome: case report [J]. East Afr Med J, 1998, 75(1): 55—56.

[2] Pfeiffer E. Kleine-levin syndrome-diagnostic and therapeutic problems[J]. Z Kinder Jugenpsychiatr Psychother, 1997, 25(2): 117—121.

[3] Malhotra S, Das M K, Gupta N, *et al*. A clinical study of Kleine-levin syndrome with evidence for hypothalamic-pituitary axis disfunction[J]. Biol Psychiatry, 1997, 42(4): 299—301.

[4] Mayer G, Leonhard E, Krieg J, *et al*. Endocrinological and polysomnographic findings in Kleine-levin syndrome: no evidence for hypothalamic and circadian disfunction[J]. Sleep, 1998, 21(3): 278—284.

[5] Hasegawa Y, Morishita M, Suzumura A. Novel chromosomal abberation in a patient with a unique sleep disorder[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1998, 64(1): 113—116.

（编辑　郭建秀）

作者简介：史树贵（1968— ），男，云南省陆良县人，博士研究生，主治医师，主要从事脑血管病和局限性肌张力障碍方面的研究，发表论文 10 篇。电话：(023)68753786

收稿日期：2000-01-14；修回日期：2000-09-05

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