DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.04.009

论著

文章编号:1000-5404(2000)05-0324-04

人参皂甙对创伤失血性休克免疫功能的调节作用

刘靖华,陈惠孙,胡德耀,刘良明 (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 探讨人参皂甙(GS)对创伤失血性休克免疫功能的调节作用。方法 分体内实验和体外实验两个部分。体内实验:给大鼠GS预处理3 d后进行创伤失血性休克模型的复制,1 d后处死动物,分别测定淋巴细胞和巨噬细胞的功能;体外实验:创伤失血性休克后1 d处死动物,分离、纯化淋巴细胞和腹腔巨噬细胞,观察GS对免疫功能的影响。结果 和正常对照组大鼠相比,创伤失血性休克1 d大鼠脾淋巴细胞增殖、IL-2活性、IL-2R表达均降低;巨噬细胞MHC-Ⅱ 抗原表达、TNF-α释放降低,巨噬细胞的吞噬能力减弱。GS体内应用(2.5 mg/100 g)对创伤失血性休克大鼠脾淋巴细胞和巨噬细胞的免疫功能有明显的改善作用,表现在脾淋巴细胞增殖能力增强,脾细胞IL-2产生、IL-2R表达增加,巨噬细胞MHC-Ⅱ 抗原表达、TNF-α释放及巨噬细胞的吞噬能力明显提高;一定浓度范围内的GS(1~100 μg/ml)在体外应用对创伤失血性休克大鼠1 d脾淋巴细胞和巨噬细胞的功能也有不同程度的改善作用。结论 人参皂甙在体内和体外对创伤失血性休克大鼠免疫功能抑制均有一定的改善作用。

关键词:人参皂甙;创伤/失血性休克;免疫调节;大鼠
中图法分类号:R605.971 文献标识码: A

Effects of ginsenoside on immunomodulation after traumatohemorrhagic shock in rats

LIN Jing-hua, CHEN Hui-sun, HU De-yao, LIU Liang-ming (Research Institute of Field surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the modulation effects of ginsenoside (GS) on the immune function in traumatohemorrhagic shock in rats. **Methods** The study was divided into in vivo and in vitro part. In the in vivo sutdy, the rats were pretreated with gensinoside 2.5 mg/100 g for 3 days and inflicted with traumatohemorrhagic shock. The rats were killed on the next day and the functions of their lymphocytes and macrophages were observed. In the in vitro study, the rats were inflicted with traumatohemorrhagic shock and killed on the next day. The lymphocytes in the spleen and the macrophages in the peritoneal cavity were isolated and purified. Their immune functions after the treatment of 1 to 100 μg/ ml of GS were studied. **Results** In the in vivo study, the pretreatment of GS resulted in enhanced proliferative capacity, elevated IL-2 releasing and increased IL-2R expression in splenocytes and enhanced antigen presentation, increased TNF releasing and phagocytosis in peritoneal macrophages. In the in vitro study, administration of GS also improved the functions of splenocytes and peritoneal macrophages. **Conclusion** Our findings suggest that GS administration in vivo and in vitro is able to improve the immune functions of lymphocytes and macrophages in traumatohemorrhagic shock.

Key words: ginsenoside; traumatohemorrhagic shock; immunomodulation; rat

严重创伤后免疫功能紊乱是机体易于继发感染的重要原因,而感染的发生则是创伤病人中、晚期死亡的主要原因。因此如何纠正创伤后免疫功能紊乱,控制感染发生是战创伤研究的重点课题。

人参皂甙(Ginsenoside, GS)是人参的主要有效成分,具有较强的免疫调节作用。对创伤、手术后免疫功能异常均有不同程度的恢复作用,但对严重创伤失血性休克后免疫功能改变是否也有调节作用尚不清楚。本实验从体内和体外应用两个方面观察GS对创伤失

基金项目:全军"九五"指令性课题(96L014)
作者简介:刘靖华(1965—),女,陕西省富平县人,博士,主治医师,主要从事休克与免疫方面的研究,发表论文11篇,现在附属西南医院麻醉科工作。电话:(023)68754649-800
收稿日期:1999-07-20;修回日期:2000-01-27

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

血性休克免疫功能的调节作用。

1　材料与方法

1.1　动物

Wistar雄性大鼠，体重 200～280 g，由第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。

1.2　实验设计及分组

体内实验：将动物 30只随机分为正常对照、创伤对照和 GS处理 3个组，每组 10只。给药剂量和途经参照文献[1]：按 2.5 mg/100 g体重皮下注射 GS，每日 1次，连续 3 d。正常对照和创伤对照组皮下注射相同量的生理盐水。末次给药后 1 h行创伤失血性休克及其复苏术。创伤失血性休克后 1 d处死动物并测定各指标。

体外实验：取正常及创伤失血性休克后 1 d的动物各 6只，处死动物后分离脾淋巴细胞和腹腔巨噬细胞。调细胞浓度为 1×10^6/ml，分别加入终浓度为 1 μg/ml，10 μg/ml，100 μg/ml的 GS，观察各指标的变化。每个动物的每种指标均测 3次，最后取其平均值进行统计学分析。

1.3　模型

乙醚麻醉大鼠后，分别经颈内动脉和颈外静脉插管。插管完毕并待动物清醒后，钳夹折断其右后肢(局部无明显出血)，然后经颈内动脉放血，10 min内使血压下降到(35±5)mmHg (1 mmHg=0.133 kPa)。维持 60 min后复苏，复苏液为失血及两倍于失血的林格氏液。

1.4　试剂

ConA和 LPS(Escherichia coli，0111∶B4)购自 Sigma公司，小鼠抗大鼠 CD25抗体(进口分装)购自北京中山公司，OX_6和 OX_{17}(分别为小鼠抗大鼠 I-A和 I-E抗原的单克隆抗体)购自 Serotec公司，TNF-α检测试剂盒购自第四军医大学免疫学教研室，人参皂甙(GS)由白求恩医科大学基础普化教研室提供。

1.5　脾细胞的分离[2]

无菌获取脾脏，用剪刀反复剪切至糊状，然后用不锈钢网筛(100目)滤过。离心 1 000 r/min、10 min后弃上清，用低渗休克法溶解红细胞[2]。最后用 RPMI-1640培养液悬浮细胞。台盼蓝染色，细胞活力>95%。

1.6　腹腔巨噬细胞的分离

过量乙醚处死大鼠，腹腔内注入无菌预冷的 PBS 30～50 ml，按摩腹部 1 min，吸出腹腔液，离心 1 000 r/min、10 min，用 RPMI-1640培养液悬浮细胞，于 37℃、5%CO_2培养箱中培养 2 h，洗去未贴壁细胞，轻轻刮下贴壁的巨噬细胞(Macrophage，Mφ)，调细胞浓度为 1×10^6/ml备用。经瑞氏染色法鉴定 Mφ细胞纯度>90%；台盼蓝染色，细胞存活率>95%。

1.7　脾淋巴细胞增殖能力测定

取无菌制备的大鼠脾淋巴细胞悬液，并调细胞浓度为 1×10^6/ml。于 96孔无菌培养板内每孔加入：细胞悬液 0.1 ml，含有或不含有 ConA的 RPMI-1640培养液 0.1 ml(ConA终浓度 5 μg/ml)，一式三孔。于 37℃、5%CO_2培养箱中培养 48 h，加入 3H-TdR 20 μl(0.25 μCi/ml)/孔，继续培养 16 h。用多头细胞收获仪收集细胞，用液闪仪测其放射性(cpm)。

1.8　IL-2活性(细胞法)[3]和 IL-2受体测定(ELISA法)测定[4]

24孔培养板上每孔加入：脾细胞悬液 1 ml，ConA 50 μl(终浓度 10 μg/ml)，于 37℃，5%CO_2培养中培养 24 h，离心。收集的上清－70℃保存，为 IL-2待测样本；细胞用于 IL-2R测定。IL-2活性和 IL-2R测定的详细步骤见参考文献[3,4]。

1.9　腹腔巨噬细胞 MHC-Ⅱ抗原表达的测定[5]

取腹腔巨噬细胞悬液 1 ml，加入 OX_6、OX_{17}(荧光标记)各 10 μl，4℃避光放置 30 min，其间混悬细胞 1次。用 PBS洗涤细胞 2次，上流式细胞仪进行测定。

1.10　TNF-α的测定

按试剂盒说明书操作。

1.11　腹腔巨噬细胞吞噬能力测定[6]

大鼠腹腔注入 10%鸡红细胞 1 ml，30 min后处死大鼠。分离腹腔巨噬细胞。吸 0.5 ml滴于载玻片上，37℃孵育 30 min，用生理盐水洗掉未贴片的细胞，晾干。用 1∶1丙酮-甲醇液固定，姬姆萨-瑞氏染色液染色，在高倍镜下或油镜下观察计数 200个巨噬细胞，计算吞噬率。

吞噬率=吞噬鸡红细胞的巨噬细胞/巨噬细胞数×100%

1.12　统计学处理

实验所得数据以 $\bar{x}\pm s$表示，分别用 t检验进行统计学处理。

2　实验结果

2.1　GS对创伤失血性休克大鼠脾淋巴细胞增殖、IL-2活性、IL-2R表达的影响

和正常对照组大鼠相比，创伤失血性休克 1 d大鼠脾淋巴细胞增殖、IL-2活性、IL-2R降低。GS体内应用(2.5 mg/100 g)对大鼠淋巴细胞免疫功能有明显的升高作用，见表 1。

表 1　GS对创伤失血性休克 1 d大鼠脾淋巴细胞功能的影响($n=10$)

Tab 1　Effect of GS on splenocyte function 24 hours after trauma-hemorrhagic shock($n=10$)

Group	Proliferation(min^{-1})	IL-2(U/ml)	IL-2R(OD)
Control	5612.2±151.44	6.83±0.56	0.350±0.01
T-HS	3002.2±164.21**	2.32±0.33**	0.169±0.02
T-HS+GS	4124.3±186.00##△△	5.58±0.26##	0.282±0.02##

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

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

2.2 GS 对创伤失血性休克大鼠脾淋巴细胞免疫功能的体外调节作用

一定浓度范围内的GS(1～100 μg/ml)在体外对创伤失血性休克大鼠 1 d 脾淋巴细胞增殖、IL-2 产生、IL-2R 表达均有不同程度的升高作用,见表 2。

表 2 GS 对创伤失血性休克 1 d 大鼠脾淋巴细胞免疫功能的体外调节作用($n=6$)

Tab 2 Effect of GS on splenocyte function 24 hours after trauma-hemorrhage *in vitro* ($n=6$)

Group	GS(ρ_B/μg·ml^{-1})	Prohferation(min^{-1})	IL-2(U/ml)	IL-2Rα(D_{495})
Control	0	5724.5±438.26	7.83±0.75	0.3402±0.03
T-HS	0	2902±272.01**	2.13±0.45**	0.1737±0.07*
T-HS+GS	1	3350.17±131.33#	3.63±0.56##	0.2385±0.02#
	10	3846.33±101.01##	4.38±0.60##	0.2833±0.03#
	100	3772.5±225.80##	4.08±0.71##	0.2770±0.02#

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

2.3 GS 对创伤失血性休克大鼠腹腔巨噬细胞 MHC-Ⅱ抗原表达、TNF-α 释放、巨噬细胞吞噬活性的影响

和正常对照组大鼠相比,创伤失血性休克后 1 d 大鼠腹腔巨噬细胞 MHC-Ⅱ表达降低,TNF-α 分泌减少,巨噬细胞吞噬活性降低。GS 体内应用后对上述各指标均有明显的升高作用,见表 3。

表 3 GS 对创伤失血性休克 1 d 大鼠腹腔巨噬细胞功能的影响($n=10$)

Tab 3 Effect of GS on pMφ function 24 hours after trauma-hemorrhagic shock 24 hours *in vivo* ($n=10$)

Group	Phagocytosis(%)	I-A(%)	I-E(%)	TNFα(ρ_B/pg·ml^{-1})
Control	32.4±1.66	70.0±1.45	68.4±3.52	296.21±23.42
T-HS	27.2±3.54*	37.5±5.64**	34.6±5.26**	133.42±12.11**
T-HS+GS	37.5±4.24##	49.2±2.04#	48.5±3.86#	208.25±16.38#

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

2.4 GS 对创伤失血性休克大鼠腹腔巨噬细胞 MHC-Ⅱ抗原表达、TNF-α 释放、吞噬功能的体外调节作用

不同浓度范围内的GS(1～100 μg/ml)在体外对创伤失血性休克 1 d 大鼠 MHC-Ⅱ抗原表达、TNF-α 释放、吞噬功能均有不同程度的改善作用,见表 4。

表 4 GS 对创伤失血性休克 1 d 大鼠腹腔巨噬细胞功能的体外调节作用($n=6$)

Tab 4 Effect of GS on pMφ function 24 hours after trauma-hemorrhagic shock *in vitro* ($n=6$)

Group	GS(ρ_B/μg·ml^{-1})	Phagocytosis(%)	I-A(%)	I-E(%)	TNF-α(ρ_B/pg·ml^{-1})
Control	0	33.4±1.76	71.32±1.22	68.77±1.58	281.17±25.58
TH-S	0	28.4±3.18**	38.27±5.99**	35.68±5.97**	130.67±10.21**
T-HS-GS	1	31.7±1.19	40.48±4.65#	41.83±1.19#	160.83±17.01##
	10	33.23±1.59#	44.30±2.03#	45.48±1.87##	170.33±22.28##
	100	32.15±1.09#	45.13±1.08#	42.58±3.05#	168.5±17.17##

T-HS: Trauma-hemarrhagic shock control; **: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* T-HS

3 讨论

近年来的研究表明,一些中药的有效成分如黄芪多糖、人参皂甙、三七皂甙等均可不同程度地恢复创伤和烧伤后免疫功能的低下。杨贵珍[7]发现人参皂甙(GS)对手术应激(截肢术、胸壁手术和剖腹术)所引起的细胞免疫功能抑制有明显的调节效应和恢复作用,可完全拮抗腹腔巨噬细胞的受抑状态。

本实验发现,体内应用 GS 不仅可减轻创伤失血性休克对脾淋巴细胞增殖、IL-2 释放、IL-2R 表达的抑制程度,对巨噬细胞 MHC Ⅱ抗原表达、TNF-α 释放也有升高作用,可拮抗创伤失血性休克对巨噬细胞吞噬能力的抑制作用。表明 GS 对创伤失血性休克免疫功能抑制也有一定的改善作用。

本实验还发现,一定浓度范围内的 GS 在体外也可不同程度提高大鼠脾淋巴细胞和巨噬细胞免疫功能。表明 GS 对创伤失血性休克后淋巴细胞和巨噬细胞有直接的调节作用。在本实验中 GS 对创伤失血性休克免疫功能抑制仅有部分改善作用,说明创伤失血性休克的病理过程是复杂的,引起免疫功能改变的机制是多方面的,一种单一的措施不可能完全逆转其全部病理过程。上述结果为深入研究 GS 对创伤失血性休克对免疫功能的调节作用提供了重要线索。

参考文献:

[1] 杨贵贞,麻彤晖. 人参皂甙抗小鼠手术应激时细胞免疫细胞调整效应[J]. 中国中西医结合杂志,1988,8(5):479—484.

[2] B. 米舍尔 S. 施吉[美] 编著. 细胞免疫学方法选编[M]. 北京:人民卫生出版社,1986.20—23.

[3] Stephan R N, Kupper T S, Geha A S, et al. Hemorrhage without tissue trauma produces immunosuppression and enhances susceptibility to sepsis[J]. Arch Surg, 1987, 122(1): 62—69.

[4] 陈永硕 主编. 现代实用免疫细胞化学技术[M]. 上海:上

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

海科学技术出版社, 1997.98－101.
[5] Ayala A, Perrin M M, Chaudry I H. Defective macrophage antigen presentation following hemorrhage is associated with the loss of MHC class Ⅱ(Ia)antigens[J]. Immunology, 1990, 70(1): 33－38.
[6] 巴德年 主编.《当代免疫学技术与应用》[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998. 152－154.
[7] 杨贵珍. 对中药免疫药理学研究的思考[J]. 中国免疫学杂志, 1996, 12(1): 3－5.

（编辑　郭建秀）

文章编号: 1000-5404(2000)04-0327-01

经验与短篇

鼻内窥镜功能性手术 60 例

Report of 60 cases of functional nasal endoscopic surgery

汪　建, 魏运军, 范文汉, 曾 卫东　（第三军医大学附属西南医院耳鼻咽喉科, 重庆　400038）

近年来, 由于鼻窦内窥镜的应用, 使人们对鼻窦炎发生的解剖、病理基础有了新的认识, 创立了功能性鼻窦内窥镜手术, 将鼻窦外科学推向了一个展新的阶段。我科从 1996 年 10 月开展鼻窦内窥镜手术以来选择有随访史病例 60 例 92 侧, 现将其临床资料总结如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

60 例 (92 侧), 男 35 例, 女 25 例; 年龄 18～71 岁, 平均 37 岁; 单侧病例 28 例(47%)。临床症状: 鼻塞、流鼻涕、患侧头闷涨感。术前均经鼻窦 CT 扫描, 药物治疗效果不佳。60 例的诊断分型分期[1]: Ⅰ　型 26 例, 1 期 9 例, 2 期 12 例, 3 期 5 例; Ⅱ　型 30 例, 1 期 20 例, 2 期 6 例, 3 期 4 例; Ⅱ型 4 例。

1.2 手术方法

全部手术均为局麻, 患者取平卧位, 1%地卡因 20 ml 加肾上腺素 2 ml, 行鼻腔粘膜表面麻醉 2 次, 1%利多卡因(含肾上腺素)行中鼻甲前缘、后部、钩突局部浸润麻醉, 开蝶窦者, 在蝶窦前壁浸润麻醉。在内窥镜下, 用鼻息肉圈套器套下大块鼻息肉, 切开钩突, 开放筛泡, 切除中鼻甲基板, 取除明显水肿或息肉样变的粘膜。钩突后方可见上颌窦自然开口, 清除自然口周围病变组织, 扩大自然口, 用弯头组织钳取除上颌窦及额隐窝处病变组织, 对蝶窦有严重病变者, 开放蝶窦前壁, 清除其中的病变组织。疗效判定采用 1997 年海口会议标准[1]。

2 结果

全部病例随访 6～24 个月, 术后 2 周内术腔干痂较多, 2 周后有囊泡样结构出现, 3 周后干痂逐渐脱落。60 例中治愈 39 例(65%), 其中Ⅰ型 22 例(85%), Ⅱ型 17 例(57%), 好转 16 例(27%), 其中Ⅰ型 4 例(15%), Ⅱ型 11 例(37%), Ⅱ型 1 例(25%), 无效 5 例(8%), 其中Ⅱ型 3 期 2 例(7%), Ⅱ型 3 例(75%)。

术中出血量一般 200 ml 左右, 超过 500 ml 1 例, 术后眼睑淤斑 2 例, 其中 1 例有一过性复视, 鼻中隔穿孔 1 例, 中鼻甲与中隔粘连 4 例。

3 讨论

传统鼻窦手术一般来说是以彻底清除病变组织为原则的根治性手术, 鼻窦内窥镜功能性手术与传统的鼻窦手术相比, 具有损伤小、患者痛苦小、最大限度保留鼻腔、鼻窦功能且面部不留疤痕等优点。因此, 近年来鼻窦内窥镜功能性手术已在我国各大中城市广泛开展起来了。

我们认为鼻窦内窥镜功能性手术主要适应于慢性鼻窦炎鼻息肉Ⅰ、Ⅱ　型(临床有效为 92%), 且能按时换药的患者。Ⅱ型病变者由于效果不佳(无效占 75%), 我们还是采用传统根治术为主。对于手术的麻醉, 我们全部采用局麻, 除个别病例外(主要为Ⅱ型患者), 均获满意的麻醉效果(包括开蝶窦)。

术后换药是鼻窦内窥镜手术成功的关键, 术后换药是指术后在内窥镜下, 清理残留的病变组织, 钳净术腔内的血痂, 保证术腔的光滑。我们观察到, 术后不能按时换药的病例, 其疗效大大低于按时换药者, 主要表现为中鼻甲粘连和窦口闭塞。

术后并发症目前国内外已有报道[2,3], 我们认为并发症的发生与医生技术的熟练程度成反比, 与能否按时换药成正比。我们所报道的术后眼睑淤斑和一过性复视都是出现在我们刚开始作鼻窦内窥镜功能性手术的初期, 由于损伤了纸样板所引起。1 例鼻中隔穿孔也是我们第 1 例在鼻窦内窥镜下行鼻中隔矫正术, 术后纱条填塞过紧、时间过长所至。术后不能按时换药者, 术后中鼻甲粘连的发生率大大高于按时换药者。

总之, 鼻窦内窥镜手术顺应目前国际流行微创手术的潮流, 为耳鼻咽喉科的患者带来了福音。目前, 鼻窦内窥镜手术已渗透到颅底外科、眼外科, 是一个非常有前途的手术。

关键词: 鼻窦炎; 鼻息肉; 内窥镜术
中图法分类号: R765.9　　文献标识码: B

参考文献:
[1] 中华医学会耳鼻咽喉科学分会. 慢性鼻窦炎鼻息肉临床分型分期及内窥镜鼻窦手术疗效评定标准[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 1998, 33(3): 134－136.
[2] Stankiewicz J A. Complication in endoscopic intranasal ethmoidectomy: an update[J]. Laryngoscope, 1989, 99(1): 686－690.
[3] 李　源, 许　庚. 鼻内窥镜手术并发症探讨[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 1998, 33(3): 142－143.

（编辑　张大春）

作者简介: 汪　建(1961－), 男, 四川省成都市人, 博士, 副教授, 主要从事头颈部肿瘤方面的研究, 发表论文 10 余篇。电话: (023)68754135

收稿日期: 1999-04-02; 修回日期: 1999-09-30

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