DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.01.007

创伤小鼠淋巴细胞内环磷酸腺苷、环磷酸鸟苷的变化*

梁华平 田丰群 王正国 耿 波 陈荣德 (第三军医大学野战外科研究所) 630042

提 要 用小鼠闭合伤、截肢伤及烧伤模型,观察创伤后4 d小鼠脾细胞、胸腺细胞、肠系膜淋巴结细胞内环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)的变化。结果显示:创伤后三种类型的淋巴细胞在静息状态或经ConA刺激时的cAMP水平增高,cGMP水平下降,cAMP/cGMP比值增加。创伤后血清、巨噬细胞、T_S细胞在体外可明显提高正常小鼠脾细胞内cAMP水平,降低其cGMP水平。去除创伤小鼠脾细胞中的巨噬细胞、T_S细胞可使其cAMP、cGMP含量恢复至接近正常水平。提示:创伤可导致淋巴细胞内cAMP、cGMP含量发生改变,这一变化同创伤后血清、巨噬细胞、Ts细胞的作用有关。

关键词 创伤和损伤;淋巴细胞;腺苷环-磷酸;鸟苷环-磷酸;小鼠

中图法分类号 Q524;R641

严重创伤可致机体免疫功能受抑的观点已被广泛接受,但对其发生机理尚不清楚[1,2]。环核苷酸环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)是细胞内重要信使分子,可参与调节机体多种重要功能和活动。除参与感染、发热、炎症以及临床上许多疾病过程的调节和发病机制外,在免疫反应的调节方面也起重要作用。鉴于创伤后淋巴细胞内环核苷酸的变化情况尚未见报道,本研究利用小鼠闭合伤、截肢伤、烧伤模型,观察脾细胞、胸腺细胞、肠系膜淋巴结细胞内cAMP、cGMP的变化,为深入研究创伤免疫抑反应的发生机理提供线索。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

采用Balb/c小鼠(本校动物所提供),体重18~22 g,雌雄各半,随机分为正常对照、闭合伤、截肢伤及烧伤共4组,每组10只动物。

1.2 致伤模型

参照文献[3]制备小鼠闭合伤模型,即利用35 g重的砝码冲撞清醒状态小鼠的双侧股骨部,使之累积接受能量为3.0焦耳。采用双后肢膝关节以下离断术制备截肢伤模型。于小鼠背部制备10%体表面积Ⅱ度烧伤模型[4]。各致伤动物于伤后第4天活杀,制备血清、腹腔巨噬细胞、脾细胞、胸腺细胞、肠系膜淋巴结细胞悬液待测。

1.3 淋巴细胞内cAMP和cGMP含量测定

1.3.1 样品制备:常规方法用4℃预冷之Hank's液制备小鼠脾、胸腺、肠系膜淋巴结细胞悬液,洗涤1次后调细胞浓度为1×10^7/ml,取2 ml移入试管,加入ConA(Sigma公司)使其终浓度为10 μg/ml,37℃温育2 h,并设空白对照。各试管于100℃水浴上煮沸5 min,2 000 r/10 min离心取上清,冷冻干燥后待测。

1.3.2 样品测定:使用北京401所提供的^3H标记cAMP和cGMP放免测定药盒进行检测。

1.4 脾细胞中T_S细胞的获取

于脾细胞悬液中加入大鼠抗小鼠Lyt2单抗(北京医科大学免疫教研室提供),冰浴30 min,洗涤二次,加入预先包被有兔抗大鼠Ig的无菌塑料平皿中,室温70 min,轻轻冲出非粘附细胞,再用滴管用力冲下粘附的Lyt2阳性细胞(即T_S细胞)洗涤三次,以间接免疫荧光法鉴定细胞纯度>95%备用。

1.5 创伤后血清、巨噬细胞、T_S细胞对正常脾细胞cAMP、cGMP含量的影响

在正常脾细胞cAMP、cGMP样品制备之前,分别加入创伤后血清(终浓度为10%)、巨噬细胞(占细胞总数10%)、T_S细胞(占细胞总数10%),并设正常血清、巨噬细胞、T_S细胞为对照。于37℃温育2 h,制备cAMP、cGMP样品测定其含量。

1.6 脾细胞中巨噬细胞的去除

将脾细胞悬液置于塑料平皿中,于培养箱中孵育2 h使巨噬细胞贴壁,收集非粘附细胞并调至原浓度,比较脾细胞在巨噬细胞去除前后cAMP、cGMP含量的变化。

1.7 脾细胞中T_S细胞的去除

参照文献[3]进行,比较T_S细胞去除前后各指标的变化。

1.8 数据处理

结果以平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用成组或配对t检验进行显著性分析。

2 结果

2.1 创伤后淋巴细胞内cAMP、cGMP含量的变化

和正常对照相比,闭合伤、截肢伤及烧伤小鼠脾脏、胸腺、肠系膜淋巴结细胞在静息状态和经ConA活化时的cAMP含

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39270860

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

量增加，cGMP 含量下降，cAMP/cGMP 比值增高。正常小鼠淋巴细胞经 ConA 刺激后，其 cAMP、cGMP 含量均增加，但以 cGMP 增加为主，而各创伤小鼠淋巴细胞则以 cAMP 增加更为明显（见表 1）。

表 1 创伤后淋巴细胞内 cAMP、cGMP 含量的变化（pmol/1×10⁷ 细胞）

Tab 1 Changes of cAMP, cGMP contents in lymphocytes after trauma (pmol/1×10⁷ cells)

Experimental groups (cellular origin)	Unstimulated			Stimulated with ConA		
	cAMP	cGMP	cAMP/cGMP	cAMP	cGMP	cAMP/cGMP
Normal controls						
spleen	12.4±2.1	4.2±1.6	3.0±0.4	32.8±4.0	30.7±5.0	1.1±0.3
thymus	11.5±3.3	6.7±1.4	1.8±0.3	25.7±3.7	20.1±3.9	1.3±0.4
lymph nodes	13.2±2.8	4.1±1.9	3.3±0.7	36.3±4.4	28.6±4.2	1.2±0.3
Closed trauma						
spleen	18.2±3.9※	3.2±1.0※	5.5±1.2※	39.7±4.7※	16.1±3.5※※	2.4±0.5※
thymus	18.3±4.6※	4.1±1.6※	4.7±1.3※	36.2±3.8※	17.2±2.9	2.1±0.9※
lymph nodes	19.6±3.5※	2.8±1.1※	6.6±1.5※	39.5±2.0	14.5±3.3※※	2.8±0.8※
Amputation						
spleen	19.7±4.5※	3.5±0.8※	5.6±1.1※	36.5±2.9	11.4±2.8※※	3.2±0.7※
thymus	17.2±3.6※	3.2±1.4※	5.2±0.9※	39.7±3.7※	10.6±1.9※※	3.7±1.0※
lymph nodes	18.6±3.9※	2.1±0.7※	8.7±1.9※	43.6±2.8※	15.3±2.0※※	2.8±0.7※
Burn						
spleen	21.4±5.1※※	4.1±1.2	5.3±1.7※	44.5±4.7※	12.6±1.4※※	3.5±0.9※
thymus	22.2±4.7※※	4.4±1.1※	5.1±1.2※	47.6±5.1※※	18.2±2.3	2.6±0.8※
lymph nodes	24.6±3.8※※	4.2±0.9	5.7±1.0※	40.4±3.7	13.7±1.9※※	2.9±0.5※

Compared with normal controls ※ $P<0.05$, ※※ $P<0.01$

2.2 创伤后血清、巨噬细胞、T_S 细胞对正常脾细胞 cAMP、cGMP 含量的影响

和正常对照相比，闭合伤小鼠血清、巨噬细胞、T_S 细胞在体外均可明显提高正常小鼠脾细胞在静息状态和经 ConA 活化时 cAMP 水平，但对 cGMP 的作用则相反（见表 2）。截肢伤及烧伤小鼠血清、巨噬细胞、T_S 细胞的作用与此相类似。

表 2 创伤后血清、巨噬细胞、T_S 细胞对正常脾细胞 cAMP、cGMP 含量的影响（pmol/1×10⁷ 细胞）

Tab 2 The effects of serum, macrophages, T_S cells from traumatized mice on cAMP, cGMP contents in normal splenocytes (pmol/1×10⁷ cells)

Experimental groups	Unstimulated			Stimulated with ConA		
	cAMP	cGMP	cAMP/cGMP	cAMP	cGMP	cAMP/cGMP
Normal controls						
serum	12.7±2.3	4.4±0.9	2.9±0.3	33.1±4.1	32.1±5.1	1.0±0.2
macrophages	13.1±2.0	4.3±1.3	3.0±0.9	34.6±4.4	29.7±4.9	1.2±0.3
T_S cells	11.8±1.9	4.0±1.1	3.0±0.8	31.7±3.9	29.9±4.7	1.1±0.3
Closed trauma						
serum	16.4±3.7※	2.8±0.9※	5.8±1.3※	38.4±3.6	22.0±2.9※	1.7±0.4※
macrophages	19.3±4.0※	3.1±0.7※	6.2±1.2※※	41.2±5.0※	20.3±3.6※	2.1±0.5※
T_S cells	18.7±3.3※	3.0±1.0※	6.1±1.4※※	39.6±4.3※	18.6±4.3※	2.1±0.7※

Compared with normal controls ※ $P<0.05$, ※※ $P<0.01$

2.3 去除脾细胞中巨噬细胞、T_S 细胞后 cAMP、cGMP 含量的变化

去除正常小鼠脾细胞的巨噬细胞和 T_S 细胞，对其 cAMP、cGMP 含量无明显影响。去除闭合伤小鼠脾细胞中的巨噬细胞、T_S 细胞均可明显降低其 cAMP 水平，增加 cGMP 水平，使 cAMP/cGMP 比值接近正常（见表 3）。截肢伤、烧伤小鼠脾细胞经去除巨噬细胞、T_S 细胞后，其 cAMP、cGMP 变化情况与此相类似。

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

表 3　去除脾细胞中巨噬细胞、T_S 细胞后 cAMP、cGMP 含量的变化(pmol/1×10^7 细胞)

Tab 3　The changes of cAMP, cGMP contents after removal of macrophages, T_S cells from splenocytes (pmol/1×10^7 cells)

Experimental groups	Unstimulated			Stimulated with ConA		
	cAMP	cGMP	cAMP/cGMP	cAMP	cGMP	cAMP/cGMP
Normal controls						
total splenocytes	12.4±2.1	4.2±1.6	3.0±0.4	32.8±4.0	30.7±5.0	1.1±0.3
removal of macrophages	11.2±2.0	4.2±1.3	2.8±0.9	30.4±4.2	32.4±4.4	0.9±0.2
removal of T_S cells	11.9±2.6	4.4±0.9	2.8±0.6	33.9±3.7	34.6±4.9	1.0±0.3
Closed trauma						
total splenocytes	18.2±3.9※	3.2±1.0※	5.5±1.2※	39.7±4.7※	16.1±3.5※※	2.4±0.5※
removal of macrophages	11.0±3.3△	4.0±1.3△	2.9±1.1△	30.8±3.2△	28.9±3.0△	1.1±0.4△△
removal of T_S cells	10.2±4.1△	4.4±1.1△	2.4±0.8△△	33.0±4.5	29.6±2.8△	1.2±0.3△

Compared with normal controls ※ $P<0.05$, ※※ $P<0.01$

Compared with total splenocytes in closed trauma group △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$

3　讨论

有关创伤与免疫的研究正成为人们研究的热点。以往研究表明[3,4,5]，严重创伤可致淋巴细胞功能受抑，但对其发生机理尚不清楚。这同以往研究多停留在免疫指标的检测，未能从细胞内分子水平进行研究有关。cAMP、cGMP 是发现较早的细胞内信使分子。对于免疫细胞而言，cAMP 常介导免疫抑制效应。表现为：抑制 T 细胞的活化与增殖；抑制 IL-2 的生成、IL-2R 的表达以及活化 T 细胞对 IL-2 的反应。此外对 B 细胞增殖和抗体的生成也具有明显的抑制作用。一切升高 cAMP 水平的因素如前列腺素 E_2(PGE_2)、霍乱毒素等均能通过增加细胞内 cAMP 含量抑制 T、B 细胞的功能。与 cAMP 相反，cGMP 和其激活剂(如咪唑、左旋咪唑等)则可增强 T、B 细胞的功能[6,7,8]。可见淋巴细胞内 cAMP、cGMP 含量及其比值的变化均可直接影响淋巴细胞的功能。我们在以往的研究中曾观察到创伤后 T、B 淋巴细胞增殖反应减弱，IL-2 产生减少，IL-2R 表达受抑。且这一变化在伤后 4 d 最为明显[3,4,5]。推测这可能同创伤后淋巴细胞内 cAMP、cGMP 的变化有关。为了证实这一设想，我们选取创伤后 4 d 这一时相点(此时淋巴细胞功能受抑最明显)，对闭合伤、截肢伤及烧伤小鼠不同来源淋巴细胞(脾脏、胸腺、肠系膜淋巴结)内 cAMP、cGMP 进行了检测。发现在三种创伤情况下，处在静息状态和经 ConA 刺激的淋巴细胞内 cAMP 含量增加，cGMP 含量下降，cAMP/cGMP 比值增高。此外还观察到正常淋巴细胞经 ConA 刺激后，其 cAMP、cGMP 含量均增加，但以增加 cGMP 为主，而创伤小鼠则以增加 cAMP 为主。表明创伤后淋巴细胞内 cAMP、cGMP 的调节机制发生了改变，最终导致 cAMP/cGMP 比值增高。我们在另一实验中曾观察到，创伤后淋巴细胞内 cAMP、cGMP 含量的变化同 T 淋巴细胞增殖反应、IL-2 的产生、IL-2R 表达的变化密切相关(另文报道)。结合本实验可以认为，创伤后淋巴细胞内 cAMP、cGMP 的改变可能是导致创伤后淋巴细胞功能受抑的重要因素之一。

有关创伤后淋巴细胞内 cAMP、cGMP 变化的发生机理尚不清楚。已知 PGE_2 明显增加淋巴细胞内 cAMP 含量进而提高 cAMP/cGMP 比值[8]。我们曾观察到，创伤后血清中 PGE_2 含量明显增高，巨噬细胞以及 T_S 细胞产生 PGE_2 明显增强[5,9]。本研究发现，创伤后血清、巨噬细胞、T_S 细胞在体外可明显提高正常脾细胞 cAMP 水平，降低 cGMP 水平。去除创伤小鼠脾细胞中的巨噬细胞、T_S 细胞则可使其 cAMP、cGMP 水平不同程度地恢复。表明创伤后血清、巨噬细胞及 T_S 细胞参与了淋巴细胞内 cAMP、cGMP 的调节过程。其调节机制可能同 PGE_2 的作用有关。我们曾发现创伤后血清、巨噬细胞、T_S 细胞对 T 淋巴细胞功能的抑制活性增加[3,5,10]。结合本实验推测其抑制效应的发挥可能是通过增加淋巴细胞内 cAMP、降低 cGMP 含量而实现的。有关创伤后淋巴细胞内 cAMP、cGMP 变化的详细机理及其他信使分子的变化情况尚待研究。

参考文献

1 Deitch EA. The immunocompromised host. Surg Clin North Am, 1988, 68: 181

2 Grbic JT, Mannick JA, Gough DB, et al. The role of prostaglandin E_2 in immune suppression following injury. Ann Surg, 1991, 214(3): 253

3 梁华平，耿　波，田丰群，等. 创伤后白细胞介素 2 与抑制性 T 细胞关系的实验研究. 解放军医学杂志, 1993, 18(4): 271

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

4 梁华平,赵鄞生,张玉纯,等.烧伤后小鼠分裂原刺激的母细胞转化、白介素2的实验研究.中华整形烧伤外科杂志,1992,8(2):125
5 梁华平,张 艳,耿 波.闭合性创伤小鼠巨噬细胞对T淋巴细胞增殖的影响.第三军医大学学报,1993,15(5):405
6 Dosreis GA, Nobrega AF, Carvalbo RP. Purinergic modulation of T lymphocyte activation: differential susceptibility of distinct activation steps and correlation with intracellular 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate accumulation. Cell Immunol,1986,101(1):213
7 Gilmore W, Weiner LP. The effects of pertussis toxin and cholera toxin on mitogen-induced interleukin-2 production: evidence for G protein involvement in signal transduction. Cell Immunol,1988,113(2):235
8 Anastassiou ED, Paliogianni F, Balow JP, et al. Prostaglandin E_2 and other cyclic AMP-elevating agents modulate IL-2 and IL-2R gene expression at multiple levels. J Immunol,1992,148(9):2845
9 梁华平,张 艳,田丰群,等.烧伤血清中前列腺素E_2的变化及其与T淋巴细胞的关系.中华整形烧伤外科杂志,1994,10(4):326
10 梁华平,赵鄞生.烧伤后血清对T淋巴细胞抑制的实验研究.解放军医学杂志,1991,16(6):446

(收稿:1994-03-28;修回:1994-12-16)

Changes of cAMP and cGMP in the lymphocytes after trauma in mice

Liang Huaping, Tian Fengqun, Wang Zhenguo, Gen Bo, Chen Rongde (Research Institute of Field Surgery, Third Military Medical University, Chongqing, 630042)

Abstract Murine model of closed trauma, amputation and burn injury was employed to observe the changes of cAMP levels in the lymphocytes from the spleen, the thymus and the mesenteric lymph nodees on the 4th day after trauma. It was found that under resting and ConA-stimulated conditions, the lymphocytes from 3 different sources all showed an increase of cAMP and a decrease of cGMP and the ratio of cAMP/cGMP was elevated likewise. Serum, macrophages and T_S cells from the traumatized mice could significantly elevate cAMP and reduce cGMP of normal splenocytes in vitro. Removal of macrophages and T_S cells from the splenocytes in traumatized mice could restore the cAMP and cGMP levels nearly to normal.

These findings indicate the the changes of cAMP and cGMP levels in the lymphocytes after trauma result from the effects of serum, macrophages and T_S cells.

Key words wounds and injuries; lymphocytes; adenosine cyclic monophosphate; guanosine cyclic monophosphate; mice

个案与短篇

吗丁啉致泌乳作用一例

A case of effect of lactation induced by Motilium

钱银山 王益春 (第三军医大学新桥医院消化科) 630037

患者朱××,女性,30岁。因上腹胞胀、隐痛半年,加重伴嗳气半年来院门诊,钡餐检查诊断为胃窦炎,给予得乐冲剂及吗丁啉治疗。因治病心切,自服吗丁啉20 mg 3次/d,治疗后症状明显减轻。但第5天出现双乳房胀痛,并有少量乳汁溢出,第6天用手按压乳房时,乳液射出1 m远,并有大量乳液不断流出,即来院妇科检查,无妇产科疾病发现。又来消化科门诊,考虑与服用吗丁啉有关,停用吗丁啉,6天后泌乳现象消失。半月后病人再次试服吗丁啉10 mg 3次/d,1周后再次发生泌乳作用。患者23岁结婚,24岁生一男婴,母奶喂养半月,无任何诱因突然停止泌乳。

讨论

泌乳素的分泌受下丘脑的多巴胺系统调节,直接通过泌乳素抑制因子(PIF)和泌乳素释放因子(PRF)控制其分泌量。多巴胺受体兴奋时,PIF就增多,泌乳素分泌量减少,泌乳作用就停止,因此就不发生泌乳。当多巴胺受体被抑制,PIF减少,而PRF就增多,泌乳素分泌量也增多,从而导致泌乳。吗丁啉属多巴胺受体拮抗剂,大量服用,可使下丘脑PIF减少,PRF增多,泌乳素分泌量也增多,从而导致未绝经期的非哺乳女性的泌乳现象。此病人在哺乳期无诱因突然中止泌乳,可能与多巴胺受

(下转51页)

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