闭合性创伤小鼠巨噬细胞对 T 淋巴细胞增殖的影响

梁华平　张　艳　耿　波　（第三军医大学野战外科研究所）630042

提　要　本实验利用小鼠闭合性创伤模型研究了创伤后巨噬细胞对 T 淋巴细胞增殖的调节作用，并初步探讨了其作用机理。结果显示：创伤后 1、2、4、7、10 天 T 淋巴细胞转化活性均明显低于正常，伤后巨噬细胞对 T 淋巴细胞转化活性的抑制作用增强，以伤后 1、2、4 d 最为明显。伤后巨噬细胞产生白细胞介素 1(IL-1)的能力无明显变化，但产生肿瘤坏死因子(TNF)和前列腺素 E_2(PGE$_2$)的能力却明显增强。体外应用消炎痛(1μg/ml)可以阻断创伤小鼠 T 淋巴细胞转化活性的受抑状态。丝裂霉素 C(25μg/ml)体外处理创伤后巨噬细胞，可以阻断其细胞因子的生成，但不能完全阻断其对 T 淋巴细胞转化活性的抑制作用。上述结果提示：小鼠闭合性创伤后 T 淋巴细胞增殖功能的降低，同伤后巨噬细胞的抑制作用有一定关系。创伤后巨噬细胞可通过分泌大量的 PGE$_2$ 及直接的细胞接触方式发挥其对 T 淋巴细胞增殖的抑制效应。

关键词　创伤和损伤；巨噬细胞；T 淋巴细胞

严重创伤可致机体的细胞免疫功能受抑，这一变化同伤后感染的发生密切相关[1]。因此研究创伤后细胞免疫功能受抑的发生机制对防治创伤感染具有重要意义。已知 T 淋巴细胞是机体发挥细胞免疫功能的效应细胞，而巨噬细胞可通过提呈抗原及分泌单核因子调节 T 淋巴细胞的增殖与分化。已往研究结果表明[2]，严重创伤后，巨噬细胞提呈抗原能力下降，这一变化同创伤后 T 淋巴细胞功能降低有一定关系。但创伤后巨噬细胞分泌功能变化及其对 T 淋巴细胞功能的影响尚待研究。本实验利用小鼠闭合性创伤模型研究了创伤后巨噬细胞对 T 淋巴细胞增殖的调节作用，并初步探讨了其作用机理。

1　材料和方法

1.1　动物模型及分组

Balb/c 小鼠，雌雄各半，体重 18～22g。随机分为正常对照、伤后 1、2、4、7、10 d 共 6 组，每组 10 只。小鼠致伤利用 35g 重的砝码，从 30cm 高处垂直下落冲撞清醒状态的小鼠股骨部，双侧各接受撞击 15 次，累积接受能量为 3.0 焦耳，以形成钝性损伤(病理切片证实皮下及肌肉严重变性坏死)。各组动物于相应时间活杀，制备腹腔巨噬细胞及脾细胞悬液待测。

1.2　检测指标和方法

1.2.1　T 淋巴细胞转化活性测定：参照文献[3]，结果以净 cpm 值表示。

1.2.2　巨噬细胞抑制活性测定：将脾细胞悬液(5×10^6/ml)加入 24 孔塑料培养板中，1ml/孔，于 37℃、5% CO_2 培养箱中孵育 2 h 使巨噬细胞贴壁，收集非粘附细胞，调到 5×10^6/ml，比较巨噬细胞去除前后 T 淋巴细胞转化活性的变化，计算巨噬细胞活性，以抑制率表示。

$$\text{抑制率}(\%)=1-\frac{\text{全脾细胞 T 淋转净 cpm}}{\text{非粘附细胞 T 淋转净 cpm}}\times 100\%$$

1.2.3　腹腔巨噬细胞培养上清中 IL-1、TNF、PGE$_2$ 的诱生及测定：参照文献[4]进行，IL-1 以胸腺细胞增殖法测定，结果以净 cpm 值表示，TNF 以 L_{929} 细胞株测定，结果以细胞毒性(%)表示，PGE$_2$ 以放射免疫法测定，结果以 ng/ml 表示。

1.2.4　消炎痛的体外作用：于 T 淋转测定的细胞培养系统中，加入消炎痛(SIGMA 产品)，使其终浓度为 1μg/ml，观察其对T淋巴细胞转化活性的影响。

1.2.5　巨噬细胞的丝裂霉素 C 处理：按方法 1.2.2 获取脾脏中的贴壁巨噬细胞，加入丝裂霉素 C(终浓度为 25μg/ml)，于 37℃、5% CO_2 培养箱中孵育 30min 后，以 Hank's 液清洗贴壁的巨噬细胞 2 次，于巨噬细胞培养孔中加回同一个体的脾脏非粘附细胞(细胞终浓度为 5×10^6/ml)，测其 T 淋巴细胞转化活性的变化。

1.3　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。

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2 结果

2.1 创伤后小鼠 T 淋巴细胞转化及巨噬细胞抑制活性的变化

伤后 1 d，脾细胞的 T 淋巴细胞转化活性急剧下降，伤后 2 d 略有回升，伤后 4、7 d 再次下降，伤后 10 d 仍未回复到正常水平。去除脾细胞中的巨噬细胞，对正常小鼠 T 淋巴细胞转化活性无明显影响，但可不同程度地提高创伤小鼠 T 淋巴细胞转化活性，伤后巨噬细胞抑制活性以 1、2、4 d 最为明显（见表 1）。

表 1 创伤后小鼠 T 淋转及巨噬细胞抑制活性变化

Tab 1 Changes of murine T lymphocytes transformation and suppressive activity of macrophages after trauma

Experimental groups	T lymphocytes transformation (cpm)		Suppressive rate of macrophages (%)
	Total of splenocytes	Unadherent cells	
Normal controls	13317±1241	12107± 879	−10±2.7
1st day post trauma	1193± 524**	1864± 621△	36±6.8**
2nd day post trauma	7275± 827*	12470± 864△△	42±7.4**
4th day post trauma	1197± 327**	2720± 446△△	56±6.3**
7th day post trauma	2981± 514**	3641± 643	18±4.1
10th day post trauma	8149± 498*	10027±1021	19±3.8

Compared with normal controls $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$;

Compared with total of splenocytes $^{\triangle}P<0.05$, $^{\triangle\triangle}P<0.01$.

2.2 创伤 4 d 小鼠巨噬细胞产生 IL-1、TNF、PGE_2 的变化

和正常对照组相比，伤后 4 d 组巨噬细胞产生 IL-1 的能力无明显变化，但产生 TNF、PGE_2 的能力明显增强（见表 2）。

表 2 创伤 4 d 后小鼠巨噬细胞产生 IL-1、TNF、PGE_2 的变化

Tab 2 Changes of IL-1, TNF, PGE_2 produced by murine macrophages at 4th day post trauma

Experimental groups	IL-1 (cpm)	TNF (%)	PGE_2 (ng/ml)
Normal controls	7155±242	5±1.0	1.21±0.37
4th day post trauma	7536±318	37±4.8**	5.84±1.32**

Compared with normal controls $^{**}P<0.01$

2.3 消炎痛在体外对正常及创伤小鼠 T 淋巴细胞转化活性的影响

消炎痛在体外对正常小鼠 T 淋巴细胞转化活性无明显影响，但可使创伤 4 d 小鼠 T 淋巴细胞转化活性恢复到正常水平（见表 3）。

表 3 消炎痛体外对正常及创伤小鼠 T 淋转的影响

Tab 3 Effect of indomethacin on murine T lympocytes transformation in vitro

Experimental groups	T lymphocytes transformatibn (cpm)
Normal controls	12330±2021
Normal controls+indomethacin	13487±1344
4th day post trauma	4624± 537**
4th day post trauma+indomethacin	11468± 963△△

Compared with normal controls $^{**}P<0.01$; Compared with 4th day post trauma $^{\triangle\triangle}P<0.01$.

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.4 丝裂霉素 C 在体外对正常及创伤小鼠巨噬细胞活性的影响

丝裂霉素 C 体外对正常小鼠巨噬细胞抑制活性无明显影响，可明显减轻但不能完全阻断创伤 4 d 小鼠巨噬细胞抑制活性(见表 4)。

表 4 丝裂霉素 C 体外对正常及创伤小鼠巨噬细胞抑制活性的影响

Tab 4 Effect of mitomycin-C on suppressive activity of macrophages in vitro

Experimental groups	Suppressive rate of macrophages (%)
Normal controls	−12±3.0
Normal controls+mitomycin-C	−8±1.8
4th day post trauma	56±9.7**
4th day post trauma+mitomycin-C	27±4.9*△

Compared with normal controls $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$;

Compared with 4th day post trauma $^{\triangle}P<0.05$.

3 讨论

巨噬细胞可分为辅助型和抑制型两大类，其对 T 淋巴细胞的调节也相应具有辅助和抑制活性。已往研究表明[5]，创伤后辅助型巨噬细胞减少，功能降低，抑制型巨噬细胞增多，功能增强。这一变化使得创伤后的巨噬细胞在体外能抑制正常机体的 T 淋巴细胞对丝裂原的反应性，且增强刀豆素 A(ConA)诱导的抑制性 T 细胞(Ts)活性。但创伤后巨噬细胞抑制活性的动态变化及其与机体自身的 T 淋巴细胞功能受抑之间的关系如何，尚未见报道。这一问题的揭示可能有助于进一步认识巨噬细胞在创伤后细胞免疫功能受抑中的作用和地位。本研究观察到小鼠闭合性创伤后 T 淋巴细胞转化活性降低，巨噬细胞抑制活性增强，其抑制活性高峰同 T 淋巴细胞转化活性降为最低值相一致。这说明创伤后巨噬细胞的抑制作用可能是 T 淋巴细胞功能下降的重要原因。但动力学变化发现，巨噬细胞的抑制作用主要表现在伤后早期，而 T 淋巴细胞转化活性受抑则持续较长时间，这提示：巨噬细胞的抑制作用可能不是 T 淋巴细胞转化活性降低的唯一原因。

巨噬细胞可通过分泌 IL-1、TNF 促进 T 淋巴细胞增殖，也可通过分泌 PGE_2 等抑制这一过程。本研究发现创伤后巨噬细胞分泌 IL-1 的能力无明显变化，但分泌 TNF、PGE_2 的能力则明显增强。这说明巨噬细胞抑制作用的发挥并非是 IL-1、TNF 产生减少，而是由于 PGE_2 产生增多所致。这种增高的 PGE_2 可直接抑制 T 淋巴细胞增殖和阻断 IL-1、TNF 对 T 淋巴细胞转化活性的增强作用[6]。我们在体外实验中观察到前列腺素合成酶抑制剂——消炎痛可阻断创伤后 T 淋巴细胞转化活性的受抑状态。提示 PGE_2 可能是介导创伤后巨噬细胞发挥抑制效应的重要介质。丝裂霉素 C 可抑制细胞 DNA 及蛋白质的合成。巨噬细胞经丝裂霉素 C 处理后，其培养上清中的细胞因子(如 IL-1、TNF 和 PGE_2)均低至不能检测的水平(数据未列)。为了观察巨噬细胞是否可通过细胞接触方式直接抑制 T 淋巴细胞功能，本研究比较了创伤后巨噬细胞经丝裂霉素 C 处理前后的抑制作用变化。发现处理后的巨噬细胞抑制活性降低，但仍能抑制 T 淋巴细胞转化活性。提示创伤后巨噬细胞可通过细胞-细胞接触方式抑制 T 淋巴细胞功能。这一发现为我们

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

研究创伤后巨噬细胞的抑制效应提供了新的线索。

总之，小鼠闭合性创伤后 T 淋巴细胞功能受抑同巨噬细胞的抑制活性有关，而巨噬细胞可以通过分泌大量 PGE_2 和直接的细胞接触方式发挥其对 T 淋巴细胞增殖的抑制作用。

参考文献

1. Levy EM, Alharbi SA, Grindlinger G, et al. Changes of mitogen responsiveness lymphocyte subsets after traumatic injury: Relation to development of sepsis. Clin Immunol Immunopathol, 1984;32(1):224
2. Stephan RN, Saizawa M, Conrad PJ, et al. Depressed antigen presentation function and membrane interleukin-1 activity of peritoneal macrophages after laparotomy. Surgery, 1987; 102(2):147
3. 严明山 赵勤生。小鼠闭合性创伤对脾淋巴细胞增殖活性的影响。中国免疫学杂志，1989;5:204
4. Miller-Graziano CL, Szabo G, Kodvs K, et al. Aberrations in post-trauma monocyte suboopulation: Role in septic shock syndrome. J Trauma, 1990;30(S12):S86
5. 梁华平 赵勤生。创伤后白介素-2 产生受抑的机制及其研究进展。国外医学：军事医学分册，1991; 4:145
6. 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

(收稿：1993-02-08；修回：1993-06-10)

Effects of macrophages on T lymphocyte proliferation after closed trauma in mice

Liang Huaping, Zhang Yan, Gen Bo (Research Institute of Field Surgery, Third Military Medical College, Chongqing, 630042)

Abstract A murine closed trauma model was used to study the modulating effects of macrophages on T lymphocyte proliferation and the mechanism. It was found that the T lymphocyte transformation was significantly lower than the control on the 1st, 2nd, 4th, 7th and 10 day posttrauma and the suppression of macrophages on T lymphocytes was augmented especially on the 1st, 2nd and 4th day posttrauma. Interleukin 1 production of macrophages was not obviously changed while tumor necrosis factor and prostaglandin E_2 synthesis were significantly increased. Indomethacin 1 μg/ml could block the suppression of macrophages on T cell transformation and mitomycin-C 25μg/ml could stop the synthesis of cytokine but could not block completely the suppression on T cell transformation. These findings suggest that closed trauma induced suppression on T cell transformation results from macrophages through the release of large amounts of prostaglandin E_2 and direct cell to cell contact.

Key words wounds and injuries; macrophages; T lymphocytes

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net