

大鼠梗阻性胆管炎细胞免疫功能降低及中药锦红片的影响

章学林, 张静喆, 顾宏刚, 马恩伟, 朱培庭

■背景资料

梗阻性胆管炎是外科常见危急重症,常并发多脏器功能损害,给治疗带来困难,甚至因多脏器功能衰竭而造成死亡。应用中医药防治急性胆道感染已近半个世纪,积累了丰富的经验。其中具有代表性的经验方锦红片是名老中医顾伯华、徐长生教授创立的具有清热通下作用、对急性胆道感染有显著疗效的经验方,主要由大黄、红藤、蒲公英等中药组成。

章学林, 张静喆, 顾宏刚, 马恩伟, 朱培庭, 上海中医药大学附属龙华医院外科 上海市 200032
上海市重点学科课题资助项目, No. T0304
上海市卫生系统百人计划课题经费资助项目, No. 03HBR-29
通讯作者: 章学林, 200032, 上海中医药大学附属龙华医院外科。
shanghaizxl@sina.com
电话: 021-64385700-3815
收稿日期: 2007-04-04 接受日期: 2007-04-21

Mechanisms of decreased cellular immune function and the impact of Jinhong Tablets during obstructive cholangitis

Xue-Lin Zhang, Jing-Zhe Zhang, Hong-Gang Gu, En-Wei Ma, Pei-Ting Zhu

Xue-Lin Zhang, Jing-Zhe Zhang, Hong-Gang Gu, En-Wei Ma, Pei-Ting Zhu, Department of Surgery, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

Supported by: Scientific Research Project of Shanghai Municipal Key Academic Discipline, No. T0304; One Hundred Talents Scientific Research Project of Health System in Shanghai, No. 03HBR-29

Correspondence to: Xue-Lin Zhang, Department of Surgery, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China. shanghaizxl@sina.com

Received: 2007-04-04 Accepted: 2007-04-21

Abstract

AIM: To explore the mechanism of decreased cellular immune function and the effect of Jinhong Tablets, a Chinese herbal medicine, during the course of obstructive cholangitis.

METHODS: An obstructive cholangitis model was induced in 24 male Sprague-Dawley rats that were randomly divided into model ($n = 8$), Jinhong Tablet-treated ($n = 8$) and simple obstructive cholangitis ($n = 8$) groups. Four days after modeling, all rats were sacrificed and the interleukin (IL)-2, CD_3^+ , CD_4^+ and CD_8^+ levels in plasma were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The endotoxin content was detected by a reagent kit. The index of apoptosis was determined by Tdt-mediated flu-

orescein-dUTP nick end labeling (TUNEL), and ultrastructure changes of the thymus and apoptosis were observed by electron microscopy.

RESULTS: Plasma IL-2, CD_3^+ , and CD_4^+ levels and the thymus mass index in the untreated group were significantly lower than those in the Jinhong Tablet-treated and simple ligation groups (IL-2: 28.5 ± 3.0 ng/L vs 33.9 ± 3.6 ng/L, 39.6 ± 2.2 ng/L, $P < 0.05$, $P < 0.01$; CD_3^+ : $54.5\% \pm 5.5\%$ vs $70.7\% \pm 4.8\%$, $66.3\% \pm 7.1\%$, both $P < 0.01$; CD_4^+ : $34.5\% \pm 8.3\%$ vs $44.2\% \pm 3.3\%$, $44.5\% \pm 4.2\%$, both $P < 0.01$; thymus index: 0.89 ± 0.18 vs 1.10 ± 0.13 , 1.12 ± 0.24 , both $P < 0.05$). There were no significant differences among the three groups with regard to the level of plasma CD_8^+ , while plasma endotoxin and the thymus apoptosis index in the untreated group were significantly higher than in the Jinhong Tablet-treated and simple ligation groups (endotoxin: 0.85 ± 0.14 EU/mL vs 0.53 ± 0.10 EU/mL, 0.49 ± 0.11 EU/mL, both $P < 0.01$; thymus index: 25.7 ± 5.1 vs 15.8 ± 5.5 , 9.0 ± 3.1 , $P < 0.05$, $P < 0.01$). More typical apoptosis cells were seen in thymus tissue than in the untreated group. The results demonstrated that intervention by traditional Chinese medicine improved the immune function, endotoxemia and thymus cell apoptosis, even approaching the levels in the simple obstructive cholangitis.

CONCLUSION: Decreased cellular immune function and abnormal apoptosis of thymus cells exists in rats with obstructive cholangitis; Jinhong Tablets significantly improve the regulation and maintenance of immune function.

Key Words: Jinhong Tablet; Obstructive cholangitis; Thymus gland; Cellular immune; Apoptosis; Enzyme-linked immunosorbent assay; Tdt-mediated fluorescein-dUTP nick end labeling

Zhang XL, Zhang JZ, Gu HG, Ma EW, Zhu PT. Mechanisms of decreased cellular immune function and the impact of Jinhong Tablets during obstructive cholangitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(18):2050-2053

摘要

目的: 探讨梗阻性胆管炎大鼠细胞免疫功能降低的发生机制及清热通下中药锦红片的影响。

方法: δ SD大鼠24只建立急性梗阻性胆管炎模型, 随机分为模型组($n=8$)、锦红片治疗组($n=8$)和单纯胆管梗阻组($n=8$), 检测血浆IL-2, CD_3^+ , CD_4^+ , CD_8^+ , 内毒素, 胸腺指数, 胸腺细胞凋亡指数及电镜下观察胸腺的超微结构及凋亡。

结果: 模型组IL-2, CD_3^+ , CD_4^+ 和胸腺指数显著低于治疗组和单纯胆管梗阻组(IL-2: 28.5 ± 3.0 ng/L vs 33.9 ± 3.6 ng/L, 39.6 ± 2.2 ng/L, $P<0.05$, $P<0.01$; CD_3^+ : $54.5\% \pm 5.5\%$ vs $70.7\% \pm 4.8\%$, $66.3\% \pm 7.1\%$, 均 $P<0.01$; CD_4^+ : $34.5\% \pm 8.3\%$ vs $44.2\% \pm 3.3\%$, $44.5\% \pm 4.2\%$, 均 $P<0.01$; 胸腺指数: 0.89 ± 0.18 vs 1.10 ± 0.13 , 1.12 ± 0.24 , 均 $P<0.05$), CD_8^+ 3组间没有统计学差异, 血浆内毒素和凋亡指数明显高于治疗组和梗阻组(内毒素: 0.85 ± 0.14 EU/mL vs 0.53 ± 0.10 EU/mL, 0.49 ± 0.11 EU/mL, 均 $P<0.01$; 凋亡指数: 25.7 ± 5.1 vs 15.8 ± 5.5 , 9.0 ± 3.1 , $P<0.05$, $P<0.01$), 模型组胸腺可见较多典型的凋亡细胞, 结果显示经中药干预治疗后, 免疫功能、内毒素血症和胸腺细胞凋亡有所改善, 接近单纯胆管梗阻组水平。

结论: 梗阻性胆管炎大鼠存在免疫功能降低, 胸腺细胞异常凋亡。锦红片对维持免疫机能的稳定有积极意义。

关键词: 中药锦红片; 梗阻性胆管炎; 胸腺; 细胞免疫; 凋亡; 酶联免疫法; 末端脱氧核苷酸转移酶缺口标记

章学林, 张静岳, 顾宏刚, 马恩伟, 朱培庭. 大鼠梗阻性胆管炎细胞免疫功能降低及中药锦红片的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(18):2050-2053

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2050.asp>

0 引言

梗阻性胆管炎是外科常见危急重症, 常并发多脏器功能损害, 给治疗带来困难, 甚至因多脏器功能衰竭而造成死亡。免疫功能降低是梗阻性胆管炎的基本病理生理改变^[1-2], 然其形成机制尚未十分明了; 临床上清热通下中药锦红片对急性胆管炎的治疗有相当的疗效, 但中药的作用机制有待阐明。为此, 我们进行了以下研究。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级SD(Sprague Dawley, SD) δ 大鼠24只, 10 wk, 体质量160-180 g, 由上海中医药大学实验动物中心提供。随机数字方法分为模型组、中药锦红片治疗组(治疗组)、单纯胆管梗阻组(梗阻组)3组。每组8只。O111B4大肠杆菌由上海市微生物研究所提供标准菌种, 上海中医药大学附属龙华医院中心实验室负责培养、计数。IL-2ELISA试剂盒, 深圳美晶生物工程有限公司产品。 CD_3^+ , CD_4^+ , CD_8^+ mAb, 美国QharMingen公司产品, 异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记。鲎试剂内毒素定量检测试剂盒, 由上海市医学化验所提供。TUNEL(Tdt-mediated fluorescein-dUTP nick end labeling, TUNEL)试剂盒, Boehringer Mannheim产品。

1.2 方法 模型组与治疗组参照龚建平法建立梗阻性胆管炎模型^[3]。胆管近端注射 5×10^{12} /L O111B4大肠杆菌1 mL/kg, 梗阻组胆管近端注射无菌生理盐水1 mL/kg, 自术后第1天开始, 模型组、梗阻组灌喂生理盐水10 mL/kg, 治疗组灌喂浓度为110 g/L的锦红片(由大黄、红藤、蒲公英组成)悬液10 mL/kg, 每天2次, 连续3 d。第4天取材, 处死大鼠。血浆IL-2测定采用酶联免疫法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)。肝素抗凝血40 μ L, 加入 CD_3 , CD_4 , CD_8 mAb, 混匀, 洗涤, 固定, 流式细胞检测, 每样本检测10 000个细胞, Cell Quest软件测定T细胞亚群。内毒素测定按鲎试剂盒使用说明进行检测。完整取出胸腺后, 电子天平称质量, 计算胸腺指数。胸腺指数 = 胸腺质量(mg)/体质量(g)。TUNEL标记按原位细胞凋亡检测试剂盒(POD法)说明操作。根据显色情况对细胞凋亡定量分析, 每张切片随机选取3个视野($\times 400$), 计数阳性细胞数和细胞总数, 凋亡指数 = 阳性细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。全自动图像分析系统测定凋亡细胞平均光密度, 每张切片随机取5个视野, 计算均值。另取1 mm \times 2 mm的胸腺组织, 用25 g/L戊二醛固定, 梯度脱水, 包埋, 超薄切片, 醋酸铅染色, 电镜下观察细胞凋亡改变。

统计学处理 数据用mean \pm SD表示, 输入电脑, 用SPSS10.0统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 血浆IL-2和T细胞亚群 血浆IL-2含量以模型组最低, 治疗组显著高于模型组($P<0.05$), 接近

■研究前沿

中药治疗梗阻性胆管炎的研究报道不少, 具有潜在优势, 但大多停留在疗效总结阶段, 作用机制亟待深入研究, 疗效尚待提高。对内毒素的直接破坏作用可能是中药与抗生素作用机制的重要区别。

■创新盘点

本文从细胞免疫中枢胸腺细胞凋亡角度阐述梗阻性胆管炎的病理生理改变及中药经验方锦红片的作用机制,视角新颖,对保护胸腺、维持机体免疫功能稳定起着非常重要的作用。

表 1 大鼠梗阻性胆管炎血浆IL-2和T细胞亚群(means \pm SD, $n = 8$)

分组	IL-2(ng/L)	CD ₃ ⁺ (%)	CD ₄ ⁺ (%)	CD ₈ ⁺ (%)
模型组	28.5 \pm 3.0	54.5 \pm 5.5	34.5 \pm 8.3	28.5 \pm 3.3
治疗组	33.9 \pm 3.6 ^a	70.7 \pm 4.8 ^b	44.2 \pm 3.3 ^b	25.7 \pm 3.2
梗阻组	39.6 \pm 2.2 ^b	66.3 \pm 7.1 ^b	44.5 \pm 4.2 ^b	26.9 \pm 4.2

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 模型组.

表 2 梗阻性胆管炎血浆内毒素含量、胸腺指数、凋亡指数及吸光度($n = 8$)

分组	内毒素(EU/mL)	胸腺指数(mg/g)	凋亡指数(%)	吸光度
模型组	0.85 \pm 0.14	0.89 \pm 0.18	25.7 \pm 5.1	0.59 \pm 0.013
治疗组	0.53 \pm 0.10 ^b	1.10 \pm 0.13 ^a	15.8 \pm 5.5 ^a	0.33 \pm 0.017 ^a
梗阻组	0.49 \pm 0.11 ^b	1.12 \pm 0.24 ^a	9.0 \pm 3.1 ^b	0.23 \pm 0.021 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 模型组.

梗阻组. CD₃⁺, CD₄⁺含量模型组显著低于治疗组和梗阻组模型组($P < 0.01$), CD₈⁺各组间无明显差异(表1).

2.2 血浆内毒素含量模型组显著高于治疗组和梗阻组($P < 0.01$), 而胸腺指数明显降低, 胸腺凋亡指数和吸光度明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$, 表2).

2.3 电镜观察 模型组胸腺可见较多典型的凋亡细胞, 特征为染色质浓缩、边聚、核膜皱缩, 微绒毛消失, 凋亡小体形成, 部分呈新月形, 细胞膜完整, 细胞器存在(图1).

3 讨论

梗阻性胆管炎常并发全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS), 由此发展为脓毒血症、多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)而危及患者生命. 尽管新的抗感染药物不断问世并被广泛应用, 但该病的临床疗效并没得到明显改善. 有学者认为, 机体的免疫功能降低可能是制约感染控制的重要原因^[4]. IL-2是一种主要由辅助性T淋巴细胞分泌的淋巴因子, 其主要功能是促进T细胞生长及其他细胞因子的产生, 促进自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)的生长分化和B细胞的增殖与抗体的合成, 具有广泛的生物学效应. Th细胞分子表型为CD₃⁺CD₄⁺CD₈⁻, 主要分泌IL-2等细胞因子, 能促进B细胞、T细胞和其他免疫细胞的增殖与分化, 协调免疫细胞间的相互作用, 诱导和增强免疫应答. Ts细胞分子表型为CD₃⁺CD₄⁻CD₈⁺, 主要分泌抗原特异及

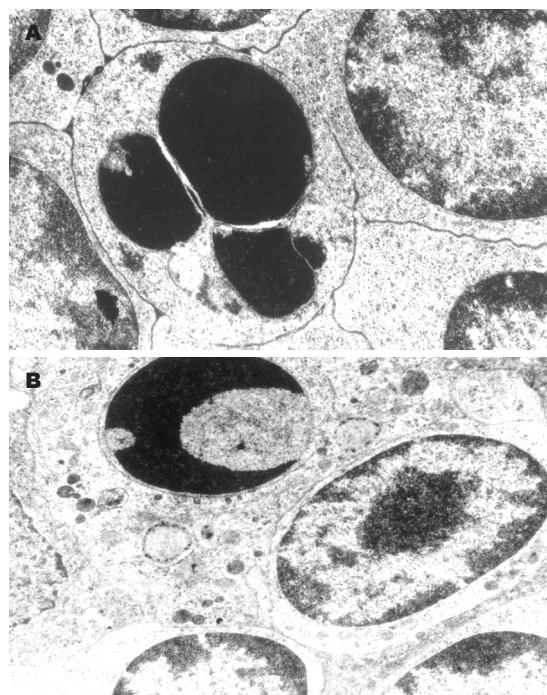


图 1 胸腺细胞凋亡电镜照片. A: 治疗组(TEM \times 5000); B: 模型组.

非特异抑制因子, 抑制T细胞、B细胞的功能, 起免疫调节的负反馈作用. 我们发现, 模型组CD₃⁺, CD₄⁺含量显著低于治疗组和梗阻组. 同时, 模型组血浆IL-2含量也显著低于梗阻组和治疗组. 这一结果提示, 梗阻性胆管炎大鼠存在着免疫功能的降低, 而中药锦红片对降低的免疫功能有一定程度的改善, 这可能是清热通下中药治疗胆道感染的独特优势^[5].

梗阻性胆管炎的发病基础是胆道梗阻和感染, 可导致体内高胆盐、高胆红素、高胆汁酸、高肿瘤坏死因子血症、肠道细菌移位以及内毒素血症等病理生理学变化, 并由此而引起机体强烈的全身炎症反应。本结果显示, 模型组外周血浆内毒素显著增高, 其形成原因是注入胆道系统内的大量O111B4大肠杆菌释出的脂多糖经受损的肝血窦进入血循环、肠道细菌大量增殖及肠黏膜屏障损害, 细菌移位及胆管炎时肝脏清除内毒素功能降低^[6]。而锦红片治疗组外周血浆内毒素有一定程度降低, 显著低于模型组, 同单纯梗组相近, 提示中药锦红片能降低内毒素含量, 推测其机制可能在于具清热通下功效的锦红片有较强的通便和一定的抑杀细菌作用, 能缩小内毒素池。并且锦红片可能也具备如文献报道的直接破坏内毒素的中药功效^[7]。胸腺是机体对应激刺激最敏感的器官, 内毒素、严重创伤、应激等均可引起胸腺细胞的凋亡^[8-9]。我们发现, 模型组胸腺指数较单纯梗阻组显著降低, 凋亡指数增高。电镜观察发现, 无论是模型组还是梗阻组, 都较易发现典型的胸腺凋亡细胞(图1), 而未见明显胸腺细胞坏死, 提示梗阻性胆管炎大鼠胸腺发生明显的萎缩性改变, 其萎缩主要是通过细胞凋亡形成的。胸腺是机体的细胞免疫中枢, 大量产生短命细胞, 未成熟的T淋巴细胞通过在胸腺内的分化、发育, 成熟后释放入血, 以维持外周T淋巴细胞池的恒定, 大多数胸腺淋巴细胞未发育成熟即已凋亡^[10]。脂多糖iv能引起胸腺细胞凋亡, 并且伴有血浆TNF- α 含量显著升高^[11]。我们发现, 外周血浆内毒素升高同胸腺萎缩、胸腺细胞凋亡呈正相关, 表明梗阻性胆管炎大鼠免疫功能降低的机制在于高内毒素血症引起胸腺细胞超正常大量凋亡。有效控制内毒素血症, 对于维持机体免疫功能, 保护机体有重要意义。

锦红片是名老中医顾伯华、徐长生教授创立的具有清热通下作用、对急性胆道感染有显

著疗效的经验方, 主要由大黄、红藤、蒲公英等中药组成^[12]。我们发现, 锦红片治疗组血浆内毒素含量、胸腺凋亡指数显著低于模型组、胸腺指数和血浆IL-2, CD⁺3, CD⁺4含量均明显高于模型组, 这些都说明中药锦红片在干预梗阻性胆管炎中可能发挥了诱导机体内毒素耐受作用, 这对保护胸腺、维持机体免疫功能的稳定起着非常重要的作用, 但具体作用环节有待进一步探讨。

4 参考文献

- 1 智绪亭, 侯向前, 李涛, 孙凯, 刘凤军, 寿楠海. 胆总管梗阻解除前后脑肠肽及免疫水平变化的实验研究. 中国现代普通外科进展 2004; 7: 229-231
- 2 严东旺, 张炳彦, 王炳煌, 郭永章. 血小板活化因子对梗阻性黄疸机体细胞免疫功能的影响. 肝胆外科杂志 2003; 11: 473-475
- 3 龚建平, 韩本立, 罗丁, 段恒春, 彭志明. 急性胆道感染时肠黏膜屏障损伤的研究. 中华实验外科杂志 1991; 8: 115-116
- 4 胡明华, 李涛, 房淑彬, 刘中金. 梗阻性黄疸细胞免疫功能变化的发生机理. 皖南医学院学报 2002; 21: 143-146
- 5 张静喆, 章学林, 高炬, 沈平, 马恩伟, 顾宏刚, 朱培庭. 清热通下中药对胆管炎大鼠肠屏障保护和炎症反应调控的研究. 中西医结合学报 2005; 3: 211-215
- 6 Yee SB, Ganey PE, Roth RA. The role of Kupffer cells and TNF-alpha in monocrotaline and bacterial lipopolysaccharide-induced liver injury. Toxicol Sci 2003; 71: 124-132
- 7 常明向, 章晶, 陈科力. 单味中药及活性成分体外抗内毒素实验研究. 中国药师 2007; 10: 18-20
- 8 McKean DJ, Huntoon CJ, Bell MP, Tai X, Sharrow S, Hedin KE, Conley A, Singer A. Maturation versus death of developing double-positive thymocytes reflects competing effects on Bcl-2 expression and can be regulated by the intensity of CD28 costimulation. J Immunol 2001; 166: 3468-3475
- 9 丁丽, 蔡德鸿, 蒋定文. 超抗原SEB体外诱导胸腺细胞凋亡的研究. 中国免疫学杂志 2005; 21: 121-123
- 10 陈拥彬, 刘德明. 小鼠胸腺的结构、功能与日龄的关系. 实验动物科学与管理 2005; 22: 6-8
- 11 汪洪, 胡峰, 郭菲, 袁铿, 胡银英. 氯化镉拮抗内毒素效应的小鼠体内研究. 中华医学杂志 2004; 84: 242-247
- 12 朱培庭, 张静喆, 高炬, 章学林, 王志刚, 沈平, 宋华荣, 李培成, 严敏瑜, 姜维洁, 陈同钧. 锦红片对急性胆道感染大鼠细胞因子调节和肠黏膜屏障保护作用的实验研究. 上海中医药杂志 2001; 35: 39-42

■同行评价

本文研究了中药锦红片对梗阻性胆管炎细胞免疫功能的影响, 目的比较明确, 方法可靠, 对阐明中药的作用机制有一定的帮助, 总体上有一定的指导意义。

电编 张敏 编辑 程剑侠