

热应激预处理对梗阻性黄疸大鼠T细胞亚群的影响

毛盛名, 张百萌, 关晓东, 李 坚, 潘海燕, 贾英斌

毛盛名, 张百萌, 关晓东, 李坚, 潘海燕, 贾英斌, 中山大学第五附属医院普通外科 广东省珠海市 519000
通讯作者: 毛盛名, 519000, 广东省珠海市梅华东路52号, 中山大学第五附属医院普通外科3区. 521msm@sina.com.cn
电话: 0756-2528781
收稿日期: 2007-06-05 修回日期: 2007-09-10

The effect of hyperthermia pretreatment on the subgroups of T lymphocytes in obstructive jaundiced rats

Sheng-Ming Mao, Bai-Meng Zhang, Xiao-Dong Guan, Jian Li, Hai-Yan Pan, Ying-Bin Jia

Sheng-Ming Mao, Bai-Meng Zhang, Xiao-Dong Guan, Jian Li, Hai-Yan Pan, Ying-Bin Jia, Department of Hepatobiliary Surgery, the Fifth Affiliated Hospital of Sun-Yat Sen University, Zhuhai 519000, Guangdong Province, China
Correspondence to: Sheng-Ming Mao, Section 3, Department of Hepatobiliary Surgery, the Fifth Affiliated Hospital of Sun-Yat Sen University, 52 Meihua East Road, Zhuhai 519000, Guangdong Province, China. 521msm@sina.com.cn
Received: 2007-06-05 Revised: 2007-09-10

Abstract

AIM: To study the effect of heat stress pretreatment on cell-mediated immunity in rats with obstructive jaundice.

METHODS: Thirty male Wistar rats were randomly divided into three groups: a sham-operated group (S group), a bile duct ligation group (B group), and a heat stress pretreatment + bile duct ligation group (P group). Each group comprised 10 rats. The rats were sacrificed one week after operation, and the levels of T lymphocytes ($CD4^+$ and $CD8^+$) and bilirubin in blood samples from the hearts of the rats were measured by flow cytometry.

RESULTS: One week after ligation of the common bile duct in rats, the number of $CD4^+$ T lymphocytes was significantly decreased compared with that in sham-operated rats, whereas the number of $CD8^+$ T lymphocytes was significantly increased. However, the numbers of $CD4^+$ and $CD8^+$ cells in the P group did not change significantly, which had a statistical difference

compared with B group (52.60 ± 3.27 vs 43.52 ± 2.23 , 2.37 vs 1.96 ; $P < 0.01$).

CONCLUSION: Ligation of the common bile duct inhibits cell-mediated immunity in rats. Heat stress pretreatment can improve the cell-mediated immunity in rats with obstructive jaundice.

Key Words: Obstructive jaundice; Heat stress pretreatment; T lymphocyte; Rats

Mao SM, Zhang BM, Guan XD, Li J, Pan HY, Jia YB. The effect of hyperthermia pretreatment on the subgroups of T lymphocytes in obstructive jaundiced rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(28): 3035-3037

摘要

目的: 研究热应激预处理对梗阻性黄疸大鼠细胞免疫功能的影响。

方法: 将30只Wistar大鼠随机均分为3组: 假手术组(S组)、胆总管结扎组(B组)、热应激预处理+胆总管结扎组(P组)。术后1 wk处死大鼠穿刺心脏取血, 用流式细胞仪检测各份血液标本的T淋巴细胞($CD4^+$ 、 $CD8^+$)分类及胆红素含量。

结果: 胆总管结扎后1 wk, 大鼠血胆红素明显升高, $CD4^+$ 减少, $CD4^+/CD8^+$ 下降; 热应激预处理组的 $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 下降不明显, 但与胆总管结扎组比较有显著差异(52.60 ± 3.27 vs 43.52 ± 2.23 , 2.37 vs 1.96 ; $P < 0.01$)。

结论: 热应激预处理可改善梗阻性黄疸大鼠的细胞免疫功能。

关键词: 梗阻性黄疸; 热应激预处理; T淋巴细胞; 大鼠

毛盛名, 张百萌, 关晓东, 李坚, 潘海燕, 贾英斌. 热应激预处理对梗阻性黄疸大鼠T细胞亚群的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(28):3035-3037
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3035.asp>

0 引言

梗阻性黄疸患者往往伴有全身免疫功能低下,

背景资料
热应激预处理在国内外已经进行了很多年的研究。热应激预处理可对机体提供保护, 提高机体对抗有害刺激的能力, 可增强SOD清除细胞内氧自由基的水平, 以及对IL-6所致中性粒细胞凋亡障碍的影响。梗阻性黄疸是外科常见病、多发病, 患者常伴有免疫功能下降, 导致术后高并发症的发生。本文重点讨论热应激预处理对梗阻性黄疸大鼠T细胞亚群的影响, 目前尚缺乏有关报道。

相关报道

Gulluoglu研究发现,热应激预处理可使梗阻性黄疸大鼠的NK细胞和CD4⁺/CD8⁺比值升高,改善梗阻性黄疸大鼠的免疫反应。Todryk报道HSP70可诱导DC, NK细胞分泌IL-12,能够促进CD4⁺ Th0细胞向Th1转化,增强机体对肿瘤的免疫。

抵抗力降低,导致术后感染性并发症升高,给外科治疗梗阻性黄疸带来一定的困难,影响患者的顺利恢复。许多研究认为,梗阻性黄疸会抑制机体的细胞免疫功能,这可能是导致患者术后感染性并发症升高的重要原因。本实验利用梗阻性黄疸大鼠模型,研究热应激预处理对梗阻性黄疸大鼠T淋巴细胞亚群的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂ Wistar大鼠共随机分3组:梗阻性黄疸组(B组, $n = 10$ 只),热应激预处理+梗阻性黄疸组(P组, $n = 10$ 只),假手术组(S组, $n = 10$ 只),大鼠喂养在清洁动物房内,每笼两只,自由进食饲料和水。每天光照时间为12 h。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的制作 3组均在乙醚开放麻醉下,腹部剃毛,用1%的碘伏消毒切口2次,经剑突下正中小切口进腹,游离出胆总管,于肝门部和其远端用6/0的丝线分别结扎,中间予以切断。腹部切口用4/0的丝线分两层缝合。其中S组接受同样手术,但只游离胆总管而不结扎胆总管;P组在手术前进行热应激预处理,具体方法为:将大鼠麻醉后置于42℃带鼓风装置的恒温干燥箱内,20 min后取出,12 h后进行胆总管结扎手术。术后大鼠自由进食饲料和水,不予补液和抗生素治疗。

1.2.2 大鼠T淋巴细胞亚群的测定 术后1 wk处死大鼠,穿刺心脏取血2 mL置于枸橼酸钠抗凝的试管内,用于流式细胞仪检测T淋巴细胞亚群(CD4⁺、CD8⁺)。试剂为抗大鼠CD4⁺、CD8⁺ mAb,均购自北京鼎国生物制品公司。应用流式细胞仪(美国BD公司生产的FACS Calibur)检测与靶细胞结合的异硫氰酸(FITC)及藻红蛋白(PE)荧光素荧光强度。设定电子窗口分离靶细胞,收集窗口内靶细胞荧光数据,经CellQuest软件处理获得对数荧光直方图。

统计学处理 所有数据均以mean±SD表示,结果采用方差分析及Student's *t*-test检验处理, $P < 0.05$ 为统计学差异显著。

2 结果

2.1 一般状况 胆总管结扎48 h后大鼠尿液颜色开始变黄,4-5 d时全身皮毛开始黄染,进食量逐渐减少,精神萎靡不振,活动减少。术后1 wk,梗阻性黄疸大鼠近肝侧胆总管囊状扩张,肝脏弥漫性肿大,呈黄褐色。部分大鼠腹腔内有少量淡黄色渗液。

表1 三组实验大鼠血浆CD4⁺、CD8⁺细胞

	P组	B组	S组
CD4 ⁺	52.60 ± 3.27 ^a	43.52 ± 2.23	55.37 ± 3.15 ^b
CD8 ⁺	22.18 ± 1.31 ^a	36.70 ± 2.12	20.69 ± 1.26 ^b
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	2.37 ^a	1.96	2.67 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs B组。

2.2 血清胆红素含量 梗阻性黄疸组及热应激预处理+梗阻性黄疸组大鼠血胆红素含量分别为37.3 ± 6.9和36.5 ± 5.9,与假手术组(1.0 ± 0.2)比较明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);梗阻性黄疸组与热应激预处理+梗阻性黄疸组之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 T淋巴细胞分类 CD4⁺、CD8⁺细胞所占百分比在B、P、S组中分别为43.52 ± 2.23, 36.70 ± 2.12; 52.60 ± 3.27, 22.18 ± 1.31; 55.37 ± 3.15, 21.69 ± 1.26。CD4⁺/CD8⁺分别为1.96, 2.37和2.67。B组和P组之间比较有显著性差异($P < 0.05$), B组与S组之间比较差异有显著意义($P < 0.01$), P、S组之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)(表1)。

3 讨论

梗阻性黄疸是胆道梗阻导致血液中胆红素升高,从而引起全身一系列的病理生理变化。梗阻性黄疸可对全身多个器官、系统的功能造成损害,主要有肝^[1]、肾^[2]、胃肠道、免疫系统和凝血系统。胆红素异常升高是有毒性的,他会抑制淋巴细胞的有丝分裂和增殖以及产生IL-2^[3-4]。Haga *et al*^[5]研究发现,非结合胆红素以剂量依赖的方式抑制细胞毒T淋巴细胞(CTL)活性、降低IL-2的反应性、抑制NK细胞活性和细胞介导的抗体依赖性细胞毒活性。我们的实验结果显示,胆总管结扎后1 wk,梗阻性黄疸大鼠的细胞免疫功能明显受损,表现为CD4⁺下降, CD8⁺上升和CD4⁺/CD8⁺下降。这与国内外其他一些学者的结果是相互吻合的。李炳辉 *et al*^[6]研究发现,梗阻性黄疸可以使大鼠血清sIL-2R水平显著升高,伴有CD4⁺下降, CD8⁺升高及CD4⁺/CD8⁺比值下降,表明梗阻性黄疸大鼠存在着细胞免疫功能下降。Scott-Conner *et al*^[7]结扎小鼠胆总管,3 d后小鼠的T淋巴细胞对丝裂原反应降低。Vane *et al*^[8]的实验研究证实,梗阻性黄疸可使肝脏网状内皮系统枯否细胞受抑制,清除细菌和内毒素的功能降低。Plusa *et al*^[9]报道,梗阻性黄疸大鼠的中性粒细胞表达更少的黏附分子受体,对

应用要点

热应激预处理可改善梗阻性黄疸对细胞免疫和肝功能的损害作用,这为热疗在梗阻性黄疸中的应用提供了一定的理论依据。

细菌产物刺激的反应也减弱. 这可能是导致梗阻性黄疸患者更易发生感染性并发症的原因之一. 王涌 *et al*^[10]研究发现, 阻塞性黄疸大鼠血液中T淋巴细胞总量减少, 其中CD4⁺、CD8⁺细胞均有所下降, 而CD4⁺细胞下降更为明显. 梗阻性黄疸导致细胞免疫抑制的机制尚未完全阐明, 目前一些研究认为可能与营养不良、肠道细菌移位、内毒素血症、促炎性细胞因子及血中免疫抑制因子等因素有关. 确切的机制尚有待进一步阐明.

很早以前人们就发现热应激预处理可对机体提供保护, 提高机体对抗有害刺激的能力. 经过许多学者的不懈努力, 后来他们发现原来在热应激条件下, 机体会产生一种蛋白质叫应激蛋白(stress protein, SP)(又称为热休克蛋白heat shock protein, HSP), 这种蛋白质可对机体提供多重保护. 当机体受到各种应激刺激时, 如冷热刺激, 重金属, 创伤, 缺氧, 感染, 中毒, 手术等均可刺激机体产生HSP. 热休克蛋白是一组结构上高度保守的多肽, 广泛存在于自然界的原核细胞和真核细胞中, 参与细胞的损伤和修复. 热休克蛋白是细胞中普遍存在的胞内蛋白, 占正常总胞内蛋白质的5%, 但在应激状态下能升高到15%或更多, 他不仅是维持细胞正常生命活动所必须的, 而且在天然免疫和适应性免疫中也起到重要作用^[11]. Gulluoglu *et al*^[12]研究发现, 热应激预处理可使梗阻性黄疸大鼠的NK细胞和CD4⁺/CD8⁺比值升高, 改善梗阻性黄疸大鼠的免疫反应. 这与我们的试验结果是相吻合的. 但在我们的实验中, 热应激预处理组的CD4⁺细胞亦明显升高, 这可能是实验条件、方法及实验动物的差异造成的. Todryk *et al*^[13]报道, HSP70可诱导DC, NK细胞分泌IL-12, 能够促进CD4⁺ Th0细胞向Th1转化, 增强机体对肿瘤的免疫.

热应激预处理可改善梗阻性黄疸大鼠的细胞免疫功能的确切机制尚不清楚, 我们认为可能与以下因素有关: (1)HSP的分子伴侣作用, (2)HSP的抗凋亡作用, (3)HSP与细胞因子之间

的相互作用, (4)HSP的免疫原性等. 其确切机制尚有待更深入的实验研究去揭示, 其机制的阐明将对改善梗阻性黄疸患者的预后大有裨益.

4 参考文献

- 1 Wang JM, Wang H, Xu LN, Zou SQ. Hepatic injury in rats with obstructive jaundice: roles of the protein kinase C signal pathway and cytoprotection of fructose. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 577-581
- 2 Cruz A, Padillo FJ, Tunez I, Munoz C, Granados J, Pera-Madrado C, Montilla P. Melatonin protects against renal oxidative stress after obstructive jaundice in rats. *Eur J Pharmacol* 2001; 425: 135-139
- 3 Keane RM, Gadacz TR, Munster AM, Birmingham W, Winchurch RA. Impairment of human lymphocyte function by bile salts. *Surgery* 1984; 95: 439-443
- 4 Jiang WG, Puntis MC. Immune dysfunction in patients with obstructive jaundice, mediators and implications for treatments. *HPB Surg* 1997; 10: 129-142
- 5 Haga Y, Tempero MA, Zetterman RK. Unconjugated bilirubin inhibits in vitro cytotoxic T lymphocyte activity of human lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1317: 65-70
- 6 李炳辉, 赵刚. 梗阻性黄疸大鼠白细胞介素2受体和T细胞亚群的变化. *黑龙江医学* 2001; 25: 26-27
- 7 Scott-Conner CE, Grogan JB. Serum and cellular factors in murine obstructive jaundice. *Surgery* 1994; 115: 77-84
- 8 Vane DW, Redlich P, Weber T, Leapman S, Siddiqui AR, Grosfeld JL. Impaired immune function in obstructive jaundice. *J Surg Res* 1988; 45: 287-293
- 9 Plusa S, Webster N, Primrose J. Obstructive jaundice causes reduced expression of polymorphonuclear leucocyte adhesion molecules and a depressed response to bacterial wall products in vitro. *Gut* 1996; 38: 784-787
- 10 王涌, 胡志前, 成志刚, 张玲珍, 王元和. 中药黄芪对阻塞性黄疸大鼠细胞免疫功能的影响. *肝胆外科杂志* 2000; 8: 64-66
- 11 Tsan MF, Gao B. Cytokine function of heat shock proteins. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286: C739-744
- 12 Gulluoglu BM, Bekraki A, Cerikcioglu N, Soyletir G, Aktan AO. Immunologic influences of hyperthermia in a rat model of obstructive jaundice. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 2378-2384
- 13 Todryk S, Melcher AA, Hardwick N, Linardakis E, Bateman A, Colombo MP, Stoppacciaro A, Vile RG. Heat shock protein 70 induced during tumor cell killing induces Th1 cytokines and targets immature dendritic cell precursors to enhance antigen uptake. *J Immunol* 1999; 163: 1398-1408

同行评价
本文立意新颖, 层次清晰, 方法得当, 数据可信, 结论合理, 有较强的可读性和研究价值.

编辑 程剑侠 电编 何基才