

## · 论著 ·

## 卡巴胆碱对脓毒症小鼠脾脏树突状细胞变化的影响

田光 陆江阳 胡森 吕艺 王宏伟 杨毅

**【摘要】** 目的 从调节脾脏树突状细胞(DC)活性的角度探讨卡巴胆碱在防治脓毒症中的作用机制。方法 将雄性 C57BL/6 小鼠 30 只按随机数字表法均分为正常对照组、脓毒症组和卡巴胆碱组。腹腔注射脂多糖(LPS)制备小鼠脓毒症模型,用流式细胞仪检测 DC 表面分子 CD11c、CD86 和主要组织相容性抗原复合物 I (MHC - I) 的表达;采用免疫组化标记技术检测白细胞介素-1 $\beta$ (IL - 1 $\beta$ )与 IL - 12 p70 的阳性细胞率。结果 注射 LPS 后,脾脏 DC 数量增加,但与正常对照组比较差异无显著性;DC 表面分子 MHC - I 和 CD86 表达以及 IL - 1 $\beta$  和 IL - 12 p70 阳性细胞率均较正常对照组增高,差异均有显著性( $P$  均 $<0.05$ );与脓毒症组比较,卡巴胆碱组脾脏 DC 的数量没有明显变化,但表面分子 MHC - I 和 CD86 表达及 IL - 1 $\beta$  和 IL - 12 p70 阳性细胞率均明显降低,差异具有显著性( $P$  均 $<0.05$ )。结论 卡巴胆碱能降低 DC 活性,有助于减轻脓毒症早期过度的免疫反应和炎症反应。

**【关键词】** 卡巴胆碱; 脓毒症; 树突状细胞; 脾脏

## Effect of carbachol on dendritic cell function in the lipopolysaccharides induced murine sepsis model

TIAN Guang\*, LU Jiang-yang, HU Sen, LÜ Yi, WANG Hong-wei, YANG Yi. \* Department of Pathology, Burn Institute, First Affiliated Hospital of General Hospital of PLA, Beijing 100037, China  
Corresponding author: LU Jiang-yang (Email: lujiy@263.net)

**【Abstract】 Objective** To explore the mechanism of the effect of carbachol in the treatment of sepsis at the angle of modulation of dendritic cell (DC) activity. **Methods** Thirty male C57BL/6 mice were randomized into three groups: normal control, sepsis and carbachol. The sepsis model of mice was reproduced by the injection of lipopolysaccharides (LPS). The expression of interleukin - 1 $\beta$  (IL - 1 $\beta$ ) and IL - 12 p70 positive cells were measured by immunohistochemistry method. The changes in DC activity in the spleen of mice were studied using flow cytometry. **Results** In LPS group, the number of splenic DC was increased, but it was not statistically significant. The expression of DC molecules including major histocompatibility complex - I (MHC - I), CD86 and the rate of positive cells containing IL - 1 $\beta$  and IL - 12 p70 were significantly higher than those in normal controls (all  $P < 0.05$ ). While in carbachol treatment group, the number of splenic DC had no significant change, the expression of IL - 1 $\beta$  was down-regulated, dramatically. The expression of MHC - I, CD86 and IL - 12 p70 were also lowered (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Carbachol can lower the DC activity, suggesting that modulation of DC activity may lower extensive immune and inflammatory response in the early phases of sepsis.

**【Key words】** carbachol; sepsis; dendritic cell; spleen

脓毒症早期树突状细胞(dendritic cell, DC)的过度活化和增生可能会引起过度免疫和大量淋巴细胞凋亡;而在病程后期由于 DC 失活和免疫细胞大量损耗引发免疫抑制和多器官功能障碍综合征(MODS)<sup>[1,2]</sup>。因此,调节 DC 的活性成为防治脓毒症病程进展的新途径。寻找改善机体免疫功能的药物和手段是目前国内外有关脓毒症防治研究的重要内容。卡巴胆碱是一种强力拟胆碱药,胆碱能受体广

泛存在于炎症效应细胞和各种免疫细胞上,如巨噬细胞、DC 等。我们前期的研究已经发现,卡巴胆碱在脓毒症中具有较强的抗炎作用<sup>[3]</sup>。关于卡巴胆碱对免疫功能和免疫细胞的影响尚未见文献报道。本研究拟观察卡巴胆碱对内毒素所致脓毒症模型小鼠脾脏 DC 功能的影响,进一步探讨卡巴胆碱的抗炎机制和应用前景。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料:**脂多糖(lipopolysaccharides, LPS, Escherichia coli O55:B5)购自 Sigma 公司;藻红蛋白(PE)标记的抗鼠 CD11c、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗鼠主要组织相容性抗原复合物 I (MHC - I)、PE/cy5 标记的 CD86 单克隆抗体均购自美国 biolegend 公司;兔抗鼠白细胞介素-1 $\beta$  (IL - 1 $\beta$ )、IL - 12 p70 多克隆抗体购自武汉博士德

基金项目:全军“十五”医学科研基金资助项目(01MA210)

作者单位:100037 北京,解放军总医院第一附属医院(原解放军第三〇四医院)病理科(田光,陆江阳,王宏伟,杨毅);全军烧伤研究所(胡森,吕艺)

通讯作者:陆江阳,博士研究生导师,主任医师(E-mail: lujiy@263.net)

作者简介:田光(1974-),男(汉族),辽宁沈阳人,博士研究生,助理研究员,主要从事创伤及危重病病理学研究,已发表论文 5 篇。

公司;羊抗兔辣根过氧化物酶标记免疫球蛋白 G (HRP-IgG)、3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 显色液均购自北京中山公司;卡巴胆碱由山东正大公司生产。

**1.2 动物分组:**6~8 周龄的雄性 C57BL/6 小鼠 30 只,体重 20~25 g,购自军事医学科学院实验动物中心。实验前于本院动物中心常规饲料饲养 1 周,正常饮水。按随机数字表法分为正常对照组、脓毒症组和卡巴胆碱组。

**1.3 脓毒症模型制备与动物处理:**一次性腹腔注射 LPS (10 mg/kg) 制备小鼠脓毒症模型。卡巴胆碱组于腹腔注射 LPS 前 24 h 给小鼠灌胃注入卡巴胆碱 (3 μg/kg),间隔 8 h,共 3 次,然后制备脓毒症模型。正常对照组和脓毒症组于相同时间点腹腔注射生理盐水。脓毒症组和卡巴胆碱组于腹腔注射 LPS 6 h 后处死小鼠取材;正常对照组于相应时间点处死。

**1.4 脾单细胞悬液制备:**无菌条件下取脾,磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.01 mmol/L, pH 7.2) 洗涤 2 次;放入 200 目的铜网上反复研磨, PBS 冲洗铜网,收集脾细胞悬液, 60×g 离心 5 min;向沉淀悬液中加入 TH<sub>4</sub>Cl-Tris (pH 8.2), 室温放置 2 min, 60×g 离心 5 min, 去上清, 沉淀用 PBS 洗涤 3 次, 镜下计数, 细胞存活率大于 90%。

**1.5 脾脏 DC 免疫表型分析:**取 1.0×10<sup>9</sup>/L 细胞浓度的细胞悬液加入离心管, 每管 100 μl, 加入荧光标记抗体, 终浓度 1 g/L, 4℃ 放置 30 min, PBS 洗涤 3 次, 在流式细胞仪上测定细胞 CD11c、MHC-I 和 CD86 的表达。

**1.6 免疫组化标记技术:**取脾组织, 采用体积分数为 10% 的甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋制片。兔抗鼠 IL-1β、IL-12 p70 标记用间接酶标法, 抗体浓度分别为 1:150 和 1:100, 4℃ 过夜, PBS 漂洗, 加入羊抗兔 HRP-IgG (1:100), 室温孵育 30 min, DAB 显色, 苏木素复染。阴性对照用抗体稀释液代替一抗, 其余操作步骤相同。在每张切片上随机选取 10 个高倍视野, 计数阳性细胞与细胞总数, 两者相除得阳性细胞率 (%)。

**1.7 统计学分析:**数据处理采用 Stata 7.0 统计分析软件, 计量资料以均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 脾脏 DC 免疫表型分析 (表 1):**注射 LPS 后, CD11c 阳性的 DC 数量增加, 但与正常对照组比较差异无显著性 (*P* > 0.05); DC 表面分子 MHC-I 和 CD86 表达均较正常对照组显著增加 (*P* 均 <

0.05)。卡巴胆碱组 DC 表面分子 MHC-I 和 CD86 表达下降, 与脓毒症组比较差异均有显著性 (*P* 均 < 0.05), 但两组间 CD11c 阳性的 DC 数量差异无显著性 (*P* > 0.05)。

**表 1 各组脾脏 DC 免疫表面分子 CD11c、MHC-I 和 CD86 的表达 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )**

**Table 1 Expression of spleen DC CD11c, MHC-I and CD86 in each group ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )**

组别	CD11c (%)	MHC-I (%)	CD86 (%)
正常对照组	2.85±0.45	20.16±2.16	7.46±1.67
脓毒症组	3.37±0.27	48.53±3.74*	15.28±1.31
卡巴胆碱组	3.26±0.33	34.22±3.52 <sup>△</sup>	8.72±1.88

注:与正常对照组比较: \**P* < 0.05; 与脓毒症组比较: <sup>△</sup>*P* < 0.05

## 2.2 免疫组化标记

**2.2.1 IL-1β 标记阳性细胞 (表 2, 彩色插页图 1):**正常对照组小鼠脾脏骨髓、边缘区及脾索内均可见少量散在分布的 IL-1β 阳性细胞, 胞浆呈棕色颗粒状; 脓毒症组 IL-1β 阳性细胞明显增加, 与正常对照组相比差异有显著性 (*P* < 0.05); 卡巴胆碱组 IL-1β 阳性细胞数量与脓毒症组比较显著降低, 但仍高于正常对照组, 差异有显著性 (*P* < 0.05)。

**2.2.2 IL-12 p70 标记阳性细胞 (表 2, 彩色插页图 2):**正常对照组小鼠脾脏骨髓、边缘区及脾索内均可见少量散在分布的 IL-12 p70 阳性细胞, 胞浆呈棕色颗粒状; 脓毒症组 IL-12 p70 阳性细胞数量也显著增加, 与正常对照组比较, 差异有显著性 (*P* < 0.05); 卡巴胆碱组 IL-12 p70 阳性细胞与脓毒症组比较显著降低, 差异有显著性 (*P* < 0.05), 与正常对照组比较差异无显著性 (*P* > 0.05)。

**表 2 各组脾脏 IL-1β 和 IL-12 p70 免疫组化标记阳性细胞率比较 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )**

**Table 2 Comparison of rate of positive spleen cells marked by IL-1β and IL-12 p70 in each group ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )**

组别	IL-1β (%)	IL-12 p70 (%)
正常对照组	2.31±0.87	2.50±1.16
脓毒症组	11.82±3.00*	8.49±3.65*
卡巴胆碱组	6.25±2.07* <sup>△</sup>	4.20±2.25 <sup>△</sup>

注:与正常对照组比较: \**P* < 0.05; 与脓毒症组比较: <sup>△</sup>*P* < 0.05

## 3 讨论

免疫系统损伤是脓毒症中一个重要的病理基础。对死于脓毒症患者的尸检研究显示, 患者有广泛的免疫系统细胞消失, 如 B 细胞、CD4<sup>+</sup>T 细胞和滤泡 DC, 其分别减少抗体生成、巨噬细胞激活和抗原呈递。因此, 减轻免疫细胞损伤, 改善免疫功能是防治脓毒症病程进展的关键。

DC 是机体内功能最强大的专职抗原呈递细胞,也是惟一能激活初始型 T 细胞的抗原呈递细胞。DC 在启动细胞免疫和建立免疫应答反应中起关键作用,同时还具有调节和控制机体细胞免疫平衡的功能。

DC 与脓毒症、MODS 等疾病有着密切的关系。Scumpia 等<sup>[4]</sup>研究证明,DC 是脓毒症小鼠生存所必需的因素,通过改变 DC 的表型能提高脓毒症小鼠的生存率<sup>[5]</sup>。MODS 中,脾脏 DC 数量和活性的变化在建立外周免疫应答反应和维持机体免疫平衡方面起到重要的作用,DC 直接或间接影响免疫器官的功能状态以及全身的细胞免疫水平<sup>[6]</sup>。

胆碱能抗炎通路是最近提出的一条新的神经-内分泌抗炎途径<sup>[7]</sup>。传出迷走神经递质乙酰胆碱有明显的抗炎作用,在体外可降低巨噬细胞对内毒素的反应性,抑制肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )合成;刺激迷走神经和给予拟胆碱药能减轻内毒素休克动物全身炎症反应和降低促炎细胞因子水平。卡巴胆碱作为一种胆碱能激动剂,可作用于 M 和 N 胆碱能受体,不仅能扩张血管、促进胃动力,而且还能减轻局部和全身的炎症反应。以往的研究证明,卡巴胆碱能降低内毒素休克动物血和组织中 TNF- $\alpha$  含量,改善器官功能。

本研究中我们观察了预先给予卡巴胆碱对脓毒症小鼠 DC 的影响。MHC-Ⅱ 分子主要存在于具有抗原呈递作用的免疫细胞表面,细胞 MHC-Ⅱ 分子表达的多少,直接反映了其抗原呈递功能的强弱,从而决定了 T 细胞的活化水平和机体的免疫应答能力。CD86 作为共刺激分子,只存在于具有活性的 DC 中,CD86 表达可反映 DC 的功能。IL-12 是 DC 分泌的重要免疫调节因子,IL-12 p70 是由 p35 和 p40 两个亚基组成的异源二聚体,在免疫应答中起促进作用,而 IL-12 p40 能抑制 IL-12 p70 活性,是 IL-12 p70 的拮抗剂。在 MODS 中,DC 抗原呈

递活性减弱时其分泌的 IL-12 p70 减少,IL-12 p40 表达增加,加重细胞免疫的衰竭<sup>[8]</sup>。

使用卡巴胆碱后脾脏 DC 表面分子 MHC-Ⅱ 和 CD86 表达降低,IL-12 p70 分泌降低,但脾脏 DC 的数量没有明显变化。这提示预先给予卡巴胆碱能够减低 DC 的活性,减少其过分活化所引起的过度细胞免疫和炎症反应。同时脾脏中 IL-1 $\beta$  的表达降低,说明卡巴胆碱能够抑制促炎因子 IL-1 $\beta$  的释放,这样有利于机体维持炎症反应的平衡。卡巴胆碱的免疫调节功能可能是通过作用于 DC 表面的胆碱能受体而实现的。卡巴胆碱既有抗炎作用又有免疫调节作用,可以多靶点干预脓毒症的基本病理环节,对于临床防治脓毒症和 MODS 具有潜在的应用价值。

#### 参考文献:

- Hotchkiss R S, Tinsley K W, Swanson P E, et al. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4<sup>+</sup>T lymphocytes in humans[J]. J Immunol, 2001, 166: 6952 - 6963.
- 陆江阳, 王晓虹, 孙宇, 等. MODS 大鼠胸腺树突状细胞病理改变及作用的研究[J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13: 675 - 677.
- 姜小国, 胡森, 石德光, 等. 肠内注射卡巴胆碱对缺血/再灌注大鼠血浆炎症介质的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 90 - 92.
- Scumpia P O, McAuliffe P F, O'Malley K A, et al. CD11c<sup>+</sup> dendritic cells are required for survival in murine polymicrobial sepsis[J]. J Immunol, 2005, 175: 3282 - 3286.
- Oberholzer A, Oberholzer C, Efron P A, et al. Functional modification of dendritic cells with recombinant adenovirus encoding interleukin-10 for the treatment of sepsis[J]. Shock, 2005, 23: 507 - 515.
- 陆江阳, 李志宏, 王晓虹, 等. 脾脏树突状细胞在多器官功能障碍综合征中的变化及意义[J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18: 24 - 27.
- Borovikova L V, Ivanova S, Zhang M, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory responses to endotoxin[J]. Nature, 2000, 405: 458 - 462.
- 李志宏, 陆江阳, 王晓虹, 等. 多脏器功能不全综合征小鼠 IL-12 的表达及其在免疫失衡中的作用[J]. 解放军医学杂志, 2003, 28: 887 - 889.

(收稿日期: 2006-09-21 修回日期: 2006-10-26)

(本文编辑: 李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

#### 《中国危重病急救医学》杂志稿约说明

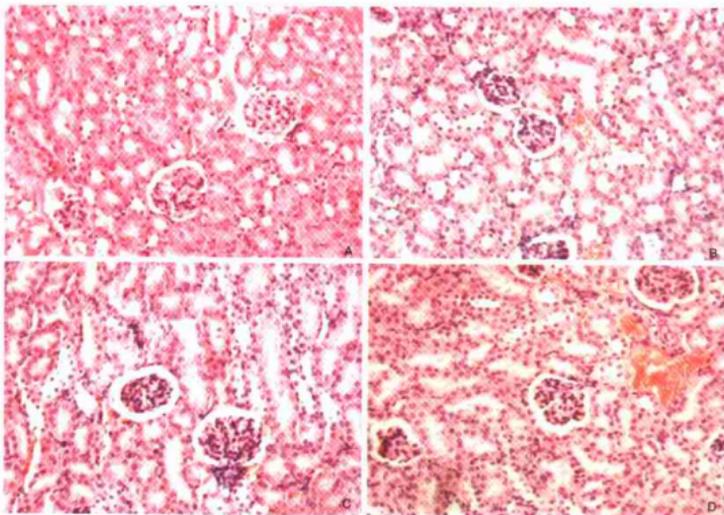
《中国危重病急救医学》杂志稿约刊登在每年的第 1 期上,欢迎广大作者踊跃投稿,投稿请严格按照稿约的要求。同时交付文稿 1 份、单位介绍信或者文稿加盖公章、软盘(WORD 排版)、审稿费每篇 20 元(1 500 字以下)或 40 元(1 500 字以上)、课题批件复印件,以利于稿件审稿过程,提高稿件刊出速度。

本刊对所有来稿均采用同行审稿的方式进行公平、公正地审定。

(本刊编辑部)

## 瘦素保护脓毒症后肾功能及其机制的研究

(正文见665页)



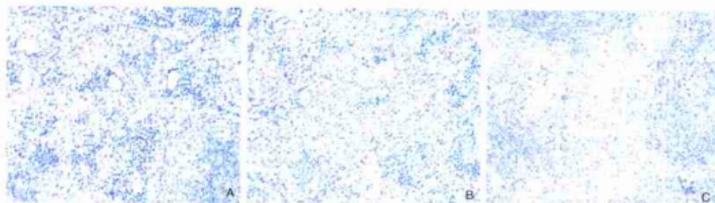
注: A:假手术组; B:脓毒症12 h组; C:Leptin保护12 h组; D:消炎痛保护12 h组

图1 脓毒症小鼠肾组织病理学变化(HE, x 200)

Figure 1 Pathological changes of renal tissue in mouse with sepsis (HE, x 200)

## 卡巴胆碱对脓毒症小鼠脾脏树突状细胞变化的影响

(正文见684页)



注:A:正常对照组; B:脓毒症组; C:卡巴胆碱组

图1 脾脏IL-1 $\beta$ 免疫组化结果(DAB, x 400)

Figure 1 Result of IL-1 $\beta$  in spleen detected by immunohistochemistry (DAB, x 400)



注:A:正常对照组; B:脓毒症组; C:卡巴胆碱组

图2 脾脏IL-12 p70免疫组化结果(DAB, x 400)

Figure 2 Result of IL-12 p70 in spleen detected by immunohistochemistry (DAB, x 400)