

高压氧对急性胰腺炎大鼠 T 淋巴细胞亚群及胰腺组织病理变化的影响

金魁 刘宝 周树生 李鑫

【摘要】 目的 研究急性胰腺炎(AP)时是否存在 T 淋巴细胞亚群改变及高压氧治疗对其的影响。方法 按随机数字表法将 56 只 SD 大鼠分为假手术组、模型组、高压氧治疗组,后两组均采用胰管结扎法制备 AP 模型,制模后每组再随机分为术后 1、3、7 d 3 个亚组,每个亚组 8 只。高压氧治疗组制模当日即进行 2.5 atm (1 atm=101.325 kPa)高压氧干预,每日 1 次,每次 2 h。于相应时间点处死大鼠,采用流式细胞仪测定血中 T 淋巴细胞亚群;同时取胰腺组织电镜下观察细胞核、线粒体、粗面内质网和滑面内质网,并进行评分。结果 术后 1 d 模型组、高压氧治疗组血液淀粉酶即显著低于假手术组。模型组术后 CD4⁺、CD8⁺ 及 CD4⁺/CD8⁺ 比值均明显降低,提示 AP 时可能存在免疫功能抑制。经过 7 d 的高压氧治疗,CD4⁺ 细胞于术后 3 d、7 d 明显升高 [(27.92±2.10)% 比 (20.79±2.80)%, (26.58±4.50)% 比 (17.76±4.40)%], CD8⁺ 于术后 7 d 明显升高 [(25.32±3.70)% 比 (22.46±3.10)%], CD4⁺/CD8⁺ 比值于术后 3 d、7 d 明显升高 (1.07±0.14 比 0.86±0.15, 1.04±0.11 比 0.79±0.12, $P<0.05$ 或 $P<0.01$)。电镜下观察发现,高压氧治疗组胰腺组织细胞核、线粒体、粗面内质网和滑面内质网病理评分(分)均较模型组明显改善(10.8±1.6 比 17.9±1.7, 22.1±1.6 比 27.5±1.3, 16.8±1.0 比 29.3±0.8, 21.2±1.4 比 28.7±1.2, 均 $P<0.01$)。结论 本研究显示,7 d 的高压氧治疗对胰腺超微结构及 T 淋巴细胞 CD4⁺、CD8⁺ 亚群和 CD4⁺/CD8⁺ 比值有改善作用,可能通过改善细胞免疫功能对胰管结扎诱导的 AP 起到一定治疗作用。

【关键词】 高压氧; 胰腺炎; T 淋巴细胞亚群; 大鼠; 流式细胞仪; 电镜

Effects of hyperbaric oxygen on T lymphocyte subpopulation and its electron microscopic changes in rats with acute pancreatitis JIN Kui, LIU Bao, ZHOU Shu-sheng, LI Chu. Anhui Provincial Hospital, Affiliated to Anhui Medical University, Hefei 230001, Anhui, China

Corresponding author: LIU Bao, Email: zhouss108@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of hyperbaric oxygen (HBO) therapy on T lymphocyte subpopulations in rats with acute pancreatitis (AP). **Methods** According to random number table, 56 Sprague Dawley (SD) rats were divided into three groups: the sham group, model group, and HBO therapy group. The rats of model and HBO groups underwent pancreatic duct ligation to induce pancreatitis, then they were divided into three subgroups of 8 rats each. The HBO group was treated with a daily exposure to HBO (2.5 atm (1 atm=101.325 kPa)). The rats in each subgroup were euthanased on days 1, 3, 7, and the subpopulations of T lymphocytes in peripheral blood were detected respectively using flow cytometry. The nuclei, mitochondrion, rough and smooth endoplasmic reticulum of the pancreatic cells were examined using electron microscopy. **Results** The serum level of amylase on day 1 in model and HBO groups was significantly lower than that in sham group. In the model group the CD4⁺CD8⁺ cells and the CD4⁺/CD8⁺ ratio in AP rats was significantly decreased, indicating the presence of immune suppression. After 7 days of HBO therapy, compared with the model group, the CD4⁺ lymphocytes in the HBO group were markedly increased on day 3 and day 7 [(27.92±2.10)% vs. (20.79±2.80)%, (26.58±4.50)% vs. (17.76±4.40)%]. The number of CD8⁺ lymphocytes were also increased to a certain extent on day 7 [(25.32±3.70)% vs. (22.46±3.10)%]. The CD4⁺/CD8⁺ ratio was obviously increased on day 3 and day 7 (1.07±0.14 vs. 0.86±0.15, 1.04±0.11 vs. 0.79±0.12, $P<0.05$ or $P<0.01$). Also beneficial effects as evaluated on the nuclei, mitochondrion, rough and smooth endoplasmic reticulum were found in the HBO group (10.8±1.6 vs. 17.9±1.7, 22.1±1.6 vs. 27.5±1.3, 16.8±1.0 vs. 29.3±0.8, 21.2±1.4 vs. 28.7±1.2, all $P<0.01$). **Conclusion** This study shows that 7-day HBO therapy can promote a more balanced profile of T lymphocyte subpopulations, resulting in improvement of cellular immune function, and it can ameliorate pathological changes as shown by electron microscopic examination.

【Key words】 Hyperbaric oxygen; Pancreatitis; T lymphocyte subpopulation; Rat; Flow cytometry; Electron microscopy

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2010.09.005

基金项目:安徽省临床医学应用技术资助项目(06B028)

作者单位:230001 合肥,安徽医科大学附属医院

通信作者:刘宝,Email:zhouss108@163.com

在急性胰腺炎(AP)的病理生理过程中,全身炎症反应综合征(SIRS)较为常见,可导致大量的炎症介质释放,并发脓毒症和多器官功能障碍综合征

(MODS),最终导致患者死亡^[1]。其中过度激活的白细胞及其释放的炎症介质导致促炎/抗炎介质失衡,炎症介质的清除及其他病理生理改变在胰腺炎的病情进展中起到重要的作用。AP 患者的预后与免疫功能的改变密切相关。本研究中采用胰管结扎法制备大鼠 AP 模型,并用高压氧进行干预,观察 CD4⁺、CD8⁺T 细胞变化及电镜下胰腺组织病理改变。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型制备:雌性 SD 大鼠 56 只,体重 200~250 g,由安徽医科大学实验动物中心提供〔动物合格证号:SCXK(皖)2005-001〕,按随机数字表法分为假手术组、模型组、高压氧治疗组,后两组再分为术后 1、3、7 d 组,每组 8 只。按文献^[2]方法制备大鼠 AP 模型,假手术组大鼠仅行开关腹手术。实验过程符合动物伦理学标准。

1.2 高压氧干预:制模成功后,高压氧治疗组大鼠当日即行高压氧治疗,每日 1 次,每次治疗 2 h。高压氧处理采用空气加压舱,治疗压力 2.5 atm(1 atm=101.325 kPa),加压 20 min;稳压后将氧流量调节至 1 000 L/h,用 100%O₂ 洗舱 3 min,然后将氧流量调节至 300 L/h 治疗 60 min 后,减压 25 min。分别在术后 1、3、7 d 麻醉后处死大鼠备检。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 血清淀粉酶水平测定:由心脏直接采血,用生化分析仪测定血清淀粉酶水平。

1.3.2 T 淋巴细胞亚群(CD4⁺辅助细胞和 CD8⁺抑制细胞)检测:心脏取血,肝素抗凝,室温下避光孵育 15 min,加入藻红蛋白标记的 CD4(CD4-PE)和异硫氰酸荧光素标记的 CD8(CD8-FITC)单克隆抗体(美国 Bolegend 公司),离心 5 min,沉淀样本用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次,加入 0.5 ml PBS,用流式细胞仪检测 T 淋巴细胞表面受体。

1.3.3 胰腺组织病理变化:制备标准的胰腺组织切片,醋酸铀-枸橼酸铅双染,透射电镜下每张切片取 15 个细胞进行观察,电镜结果按表 1 进行评分。

表 1 电镜下大鼠胰腺组织病理描述及评分

细胞器	病理描述	评分(分)	细胞器	病理描述	评分(分)
细胞核	正常	0	粗面内质网	正常	0
	不规则染色质分布	1		扩张	1
	异形细胞核	2		不规则片状组织	2
	细胞核退化崩解	3		局部出现断裂	3
线粒体	正常	0	滑面内质网	正常	0
	线粒体嵴突出、变形	1		扩张	1
	线粒体水肿	2		呈空泡化	2
	线粒体破裂、分解	3		出现大块退化融合区域	3

1.4 统计学处理:采用 SPSS 13.0 统计软件进行处理,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清淀粉酶:因血清淀粉酶一般在 24 h 后即开始下降,故术后 3 d、7 d 未再检测。术后 1 d,模型组和高压氧治疗组淀粉酶(U/L)明显高于假手术组(3156.2 ± 639.9 、 2973.1 ± 1042.6 比 798.50 ± 113.5 ,均 $P < 0.01$),模型组与高压氧治疗组无差异。

2.2 T 淋巴细胞亚群检测结果(表 2):模型组和高压氧治疗组大鼠随着胰腺炎进展,血 CD4⁺、CD8⁺细胞数及 CD4⁺/CD8⁺ 比值明显减低。与模型组比较,高压氧治疗组 CD4⁺ 细胞术后 3 d 即有明显升高,CD8⁺ 细胞术后 7 d 显著升高,而 CD4⁺/CD8⁺ 比值术后 3 d 即有明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 2 高压氧对急性胰腺炎大鼠 T 淋巴细胞亚群的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	动物数	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ 比值
模型组	术后 1 d	8	29.26±3.40	25.61±2.60	1.14±0.10
	术后 3 d	8	20.79±2.80	24.62±2.80	0.86±0.15
	术后 7 d	8	17.76±4.40	22.46±3.10	0.79±0.12
高压氧组	术后 1 d	8	30.34±6.10	27.03±4.20	1.12±0.08
	术后 3 d	8	27.92±2.10 ^a	26.06±3.50	1.07±0.14 ^a
	术后 7 d	8	26.58±4.50 ^a	25.32±3.70 ^b	1.04±0.11 ^a

注:与模型组同期比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$

2.3 胰腺组织电镜观察结果:模型组染色质边集和异染色质增加,少数标本可见细胞核崩解、融合;线粒体嵴消失、水肿;粗面内质网和滑面内质网扩张,局部断裂,细胞内外水肿,局部坏死和纤维化形成(图 1a)。高压氧治疗组染色质边集仍然增加,但较模型组明显好转;内质网扩张较模型组好转,且断裂较少,酶原颗粒较模型组增多(图 1b)。胰腺组织病理评分较模型组明显改善(均 $P < 0.01$;表 3)。

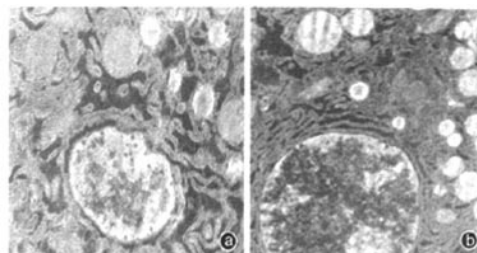


图 1 电镜下观察急性胰腺炎大鼠胰腺组织病理改变 模型组(a)内质网断裂,细胞核聚集,酶原颗粒肿胀减少;高压氧治疗组(b)术后 7 d 酶原颗粒增多,细胞核改善,内质网走行规则,内质网断裂、水肿明显减少 醋酸铀-枸橼酸铅双染 $\times 5000$

表 3 高压氧对急性胰腺炎大鼠胰腺组织病理评分的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	胰腺组织病理评分(分)			
		细胞核	线粒体	粗面内质网	滑面内质网
模型组	8	17.9±1.7	27.5±1.3	29.3±0.8	28.7±1.2
高压氧组	8	10.8±1.6*	22.1±1.6*	16.8±1.0*	21.2±1.4*

注:与模型组比较,* $P < 0.01$

3 讨论

80% 的 AP 死亡患者并发全身感染^[3]。AP 时,免疫功能损害将导致感染扩散,机体抵抗力下降,肠道菌群移位,随之出现多器官功能不全^[4],因此,免疫系统平衡在避免机体损伤方面起重要作用。研究显示,急性出血坏死性胰腺炎小鼠早期即出现辅助性 T 细胞 1/2 失衡状态,由此导致免疫抑制^[5]。胰腺炎免疫应答依赖于免疫细胞间的信息传递及外周血中免疫细胞数量和功能,如自然杀伤细胞(NK 细胞)、B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞亚群(CD4⁺、CD8⁺细胞)。T 淋巴细胞亚群表面表达 CD4⁺ 或 CD8⁺ 的受体,CD4⁺/CD8⁺ 比值的平衡反映了机体的炎症和抗炎反应的水平。目前认为,由于外伤、炎症等导致的免疫功能失衡将会损伤器官或使感染加重,导致 MODS 甚至死亡。有研究显示,存在感染的组织往往有氧分压降低,导致细胞间(细菌和宿主之间)竞争本来就已受损的组织氧供^[6]。胰腺炎的特征之一是组织内氧分压降低,直接影响感染、脓毒症的发生率,导致大量炎症介质释放、组织损伤和 MODS。

本实验中观察到 AP 大鼠的 CD4⁺ 细胞明显降低,CD8⁺ 细胞也较正常大鼠降低,两者比值明显下降,提示存在免疫功能低下,T 淋巴细胞的功能受到抑制,其确切机制目前仍然不十分明了,相关研究认为可能与脾脏的免疫双向调节^[7]有关。而免疫抑制的结果将导致机体对并发症的易感性增加,如全身脓毒症、腹腔脓肿、呼吸和泌尿系统的感染等。已有研究显示,AP 大鼠白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-18、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等炎症介质明显升高^[8],从而加重 AP 的进展速度和器官损害的程度。还有研究显示,AP 大鼠肠道黏膜血流明显减少,细菌移位率显著升高,导致死亡率明显升高^[9]。因此采用改善胰腺 T 淋巴细胞功能障碍和免疫功能低下的治疗手段可能会改善 AP 的预后。本研究结果表明,在高压氧治疗 7 d 后,CD4⁺ 细胞较模型组明显升高,CD8⁺ 细胞数亦升高,CD4⁺/CD8⁺ 比值增加。说明机体免疫抑制状态得到改善,对机体并发感染的抵抗

力增强。但我们注意到,CD4⁺ 细胞、CD4⁺/CD8⁺ 比值于治疗 3 d 后出现差异,CD8⁺ 细胞 7 d 出现差异,提示我们在临床应用中可能需要一定疗程的高压氧治疗才能显示出病情的改善。此外,电镜下观察结果也表明,经过高压氧治疗后的 AP 大鼠细胞核、线粒体、内质网相关病理评分均较模型组有明显改善,与前期进行的胰腺大体标本苏木素-伊红(HE)染色光镜评分的结果^[10]相一致。同时,7 d 的高压氧治疗也可以明显减低炎症介质水平。在大于 1 atm 大气压的高压氧条件下吸入 100%O₂,血清和组织中氧浓度可较正常情况下提高约 10 倍^[11]。在不依赖血红蛋白的情况下提高组织的血氧含量即可满足组织的需要。因此,高压氧可能通过提高组织内氧分压,改善组织氧供,增强免疫系统功能,减少炎症介质释放的机制改善免疫功能低下。

综上,2.5 atm 7 d 的高压氧治疗能有效改善 AP 大鼠 T 淋巴细胞亚群,增加 CD4⁺ 细胞,而 CD8⁺ 变化不大,CD4⁺/CD8⁺ 比值明显增加,并显著改善大鼠胰腺电镜评分。其机制可能为高压氧治疗改善了组织氧供,改善了 T 细胞免疫功能。

参考文献

[1] 林洪远,盛志勇. 全身炎症反应和 MODS 认识的变化及现状. 中国危重病急救医学,2001,13:643-646.

[2] Meyerholz DK, Samuel I. Morphologic characterization of early ligation-induced acute pancreatitis in rats. Am J Surg, 2007, 194:652-658.

[3] Huis M, Balija M, Lojna-Funtak I, et al. Acute pancreatitis in the Zabok General Hospital. Acta Med Croatica, 2001, 55:81-85.

[4] 张震环,李维勤,王浩,等. 重症急性胰腺炎血流动力学和氧代谢变化的实验研究. 中国危重病急救医学,2004,16:715-718.

[5] 傅强,崔乃强,邵伟,等. 急性出血坏死性胰腺炎小鼠辅助性 T 细胞亚群 1/2 的变化规律及中药干预作用研究. 中国中西医结合急救杂志,2006,13:214-217.

[6] Mentula P, Kylanpää ML, Kempainen E, et al. Early inflammatory response in acute pancreatitis is little affected by body mass index. Scand J Gastroenterol, 2007, 42:1362-1368.

[7] 余莉,吴冰,成雨. 大鼠急性胰腺炎模型脾脏免疫状态的研究. 公共卫生与预防医学,2003,14:8-10.

[8] 路小光,战丽彬,曲明阳,等. 大黄附子汤对重症急性胰腺炎大鼠细胞因子的影响. 中国中西医结合急救杂志,2004,11:352-354.

[9] 杨小军,梁婧,田诗政,等. 丹参注射液对急性胰腺炎大鼠肠道黏膜血流和细菌移位影响的实验研究. 中国中西医结合急救杂志,2005,12:245-247.

[10] 金魁,刘宝,周树生,等. 高压氧对大鼠急性胰腺炎影响的研究. 中国急救医学,2010,30:150-153,封 3.

[11] Sheridan RL, Shank ES. Hyperbaric oxygen treatment; a brief overview of a controversial topic. J Trauma, 1999, 47:426-435.

(收稿日期:2010-06-26)

(本文编辑:李银平)