

## 人参皂甙对烫伤脓毒症大鼠细胞免疫功能的影响

黄增峰<sup>1</sup>, 陈德昌<sup>2</sup>, 陈如康<sup>3</sup>, 李友军<sup>1</sup>

(1. 浙江省苍南县中医医院急诊科, 浙江 苍南 325800; 2. 第二军医大学长征医院急救科, 上海 200003; 3. 浙江省苍南县人民医院外科, 浙江 苍南 325800)

**【摘要】** 目的: 探讨人参皂甙对烫伤脓毒症后细胞免疫功能的影响及其作用机制。方法: 健康雄性 SD 大鼠 66 只, 随机分为脓毒症组(24 只)、人参皂甙组(24 只)和对照组(18 只)。将大鼠用沸水致背部 30% 总体表面积Ⅲ度烫伤, 烫伤后 12 h 腹腔注射内毒素(5 mg/kg)予以“二次打击”, 制成烫伤脓毒症模型。用流式细胞仪检测大鼠外周血中 CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD8<sup>+</sup>T 细胞、CD25<sup>+</sup>T 细胞和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞(Tr 细胞)的细胞数。结果: “二次打击”后大鼠外周血中 CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD25<sup>+</sup>T 细胞比例显著下降, CD8<sup>+</sup>T 细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr 细胞比例显著升高; 此过程随时间而加重, 各时间点与对照组比较差异均有显著性( $P$  均 $<0.01$ ); 用药后 24 h、72 h 占淋巴细胞百分比人参皂甙组 CD8<sup>+</sup>T 细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr 细胞占淋巴细胞百分比显著低于脓毒症组( $P$  均 $<0.01$ ), CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD25<sup>+</sup>T 细胞比例显著高于脓毒症组( $P$  均 $<0.01$ )。结论: 烫伤和内毒素“二次打击”后外周血中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr 细胞表达增强, 人参皂甙可有效抑制其表达, 显著改善烫伤脓毒症时细胞免疫功能障碍。

**【关键词】** 烫伤; 内毒素; 人参皂甙; 流式细胞术; CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞

中图分类号: R285.5 文南标识码: A 文章编号: 1008-9691(2006)04-0225-03

**Effects of ginsenosides on cyto-immunologic function in scalded rats with sepsis** HUANG Zeng-feng<sup>1</sup>, CHEN De-chang<sup>2</sup>, CHEN Ru-kang<sup>3</sup>, LI You-jun<sup>1</sup>. 1. Department of Emergency, Cangnan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Cangnan 325800, Zhejiang, China; 2. Department of Emergency Center, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 3. Department of Surgery, Cangnan People's Hospital, Cangnan 325800, Zhejiang, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the mechanism and effects of ginsenosides on cyto-immune function in scalded rats with sepsis. **Methods** Sixty-six male SD rats were randomly divided into scald sepsis group ( $n=24$ ), ginsenosides group ( $n=24$ ), and control group ( $n=18$ ). The model of scald sepsis was replicated by scald injury at 30% full-thickness total body surface area and administration of endotoxin (5 mg/kg) into the peritoneal cavity immediately 12 hours after scald injury. Then the numbers of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in peripheral blood of rats were counted by flow cytometry. **Results** After the second attack, the administration of endotoxin, CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> T cells in peripheral blood of rats were decreased significantly and CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in peripheral blood of rats were increased significantly at all the time points compared with the control group, and deteriorated further with the time going on (all  $P<0.01$ ). The proportions of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in ginsenosides group were significantly lower than those in scald sepsis group at 24 and 72 hours after treatment, and the proportions of CD4<sup>+</sup> and CD25<sup>+</sup> T cells were significantly higher than those in scald sepsis group (all  $P<0.01$ ). **Conclusion** The expression of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in peripheral blood is enhanced after scald injury and administration of endotoxin, while the ginsenosides can effectively inhibit the expression, thus it obviously improve the immune dysfunction in scalded rats with sepsis.

**【Key words】** scald; endotoxin; ginsenosides; flow cytometry; CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cell

脓毒症是严重创伤、烧伤、感染后诱发的常见并发症, 进一步发展可导致脓毒性休克、多器官功能障

碍综合征(MODS)<sup>[1]</sup>。近年来研究提示, 脓毒症的发生、发展与严重创伤、烧伤后机体细胞免疫功能紊乱密切相关<sup>[2]</sup>。因此, 调节细胞免疫功能对预防创伤后感染及脓毒症的发生具有重要意义。业已证实, 人参皂甙具有较强的免疫调节作用, 能明显改善创伤和烧伤后免疫功能的异常<sup>[3]</sup>; 但其具体作用机制尚未

基金项目: 浙江大学博士后课题, 苍南科技开发基金资助项目(2003B32)

作者简介: 黄增峰(1963-), 男(汉族), 浙江苍南人, 副主任医师 (Email: wzhzf@163.com)。

完全阐明。本实验中采用大鼠烫伤后内毒素攻击所致脓毒症模型,观察大鼠外周血中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞(Tr 细胞)的变化,旨在探讨烫伤脓毒症所致免疫抑制中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tr 细胞的作用,以及人参皂甙对它们的影响。

### 1 材料与方 法

**1.1 实验材料与仪器:**人参皂甙(黑龙江东宁制药厂,纯度 91.67%),内毒素 O111:B4(第二军医大学微生物教研室提供);异硫氰酸荧光素(FITC)标记的小鼠抗大鼠 CD4、CD8 单克隆抗体(单抗),藻红蛋白(PE)标记的小鼠抗大鼠 CD25 单抗均为法国 Immunotech 公司产品。Epics-XL 型流式细胞仪(美国 Coulter 公司);离心机、倒置显微镜等。

**1.2 动物模型制备及分组:**66 只健康雄性 SD 大鼠,体重 154~198 g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供[合格证号:SCXX(沪)2003-0003],实验前 12 h 禁食,自由饮水。

**1.2.1 动物模型制备:**氯胺酮注射液 80 mg/kg 腹腔注射麻醉,质量分数为 10%的硫化钠背部脱毛。将大鼠背部浸泡于沸水 12 s,造成 30%总体表面积(TBSA)Ⅲ度烫伤(病理证实),烫伤后立即腹腔注射生理盐水 40 ml/kg 进行液体复苏,12 h 后腹腔注射内毒素 5 mg/kg,以模拟烫伤脓毒症模型。

**1.2.2 实验分组:**按随机数字表法将 66 只大鼠分为脓毒症组(24 只)、人参皂甙组(24 只)和对照组(18 只)。对照组给予麻醉并背部脱毛,背部浸泡于 37℃水中 12 s,12 h 后腹腔注射生理盐水 5 ml/kg,于腹腔注射后 12、24 和 72 h 各活杀 6 只;脓毒症组于腹腔注射内毒素后 12、24 和 72 h 各活杀 8 只;人参皂甙组在烫伤和内毒素打击后即刻给予人参皂甙溶液 100 mg/kg 灌胃,以后按 100 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃,于腹腔注射内毒素后 12、24 和 72 h 各活杀 8 只。对照组和脓毒症组以生理盐水替代人参皂甙灌胃。各组大鼠处死时间均定于 07:00~09:00。

**1.3 指标检测与方法:**取肝素抗凝全血 100 ml,分别加入 FITC 标记的小鼠抗大鼠 CD4、CD8 单抗,PE 标记的小鼠抗大鼠 CD25 单抗 10 μl,室温避光孵育 15~20 min。再加红细胞裂解液,并振荡混匀。洗涤 1 次,重新悬浮细胞,在 Coulter 免疫制备仪上溶血固定后,流式细胞仪检测。测定 5 000 个细胞,记录 CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD8<sup>+</sup>T 细胞、CD25<sup>+</sup>T 细胞和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tr 细胞分别占淋巴细胞的百分比。

**1.4 统计学处理:**所有检测数据以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较

采用 *t* 检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结 果

表 1 结果显示:内毒素打击后 12 h,外周血中 CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD25<sup>+</sup>T 细胞比例显著降低,CD8<sup>+</sup>T 细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tr 细胞比例显著升高,此过程随时间而加重。人参皂甙组内毒素打击后 12 h 外周血中 CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD25<sup>+</sup>T 细胞比例升高,CD8<sup>+</sup>T 细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tr 细胞比例降低,但与脓毒症组比较差异均无显著性( $P$ 均 $>0.05$ );内毒素打击后 24 h 和 72 h 外周血中 CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD25<sup>+</sup>T 细胞比例则显著高于脓毒症组( $P$ 均 $<0.01$ );CD8<sup>+</sup>T 细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tr 细胞比例显著低于脓毒症组( $P$ 均 $<0.01$ )。

**表 1 人参皂甙对烫伤脓毒症大鼠 CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD25<sup>+</sup>T 细胞、CD8<sup>+</sup>T 细胞和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tr 细胞占淋巴细胞百分比的影响( $\bar{x}\pm s$ )**

**Table 1 Effect of ginsenosides on the proportion of CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in scalded rats with sepsis( $\bar{x}\pm s$ )**

| T 细胞类型                             | 组别    | 动物数(只) | 12 h 比例(%)   | 24 h 比例(%)   | 72 h 比例(%)   |
|------------------------------------|-------|--------|--------------|--------------|--------------|
| CD4 <sup>+</sup>                   | 对照组   | 6      | 48.62±4.35   | 44.23±3.85   | 42.92±9.41   |
|                                    | 脓毒症组  | 8      | 41.18±4.73*△ | 34.52±3.02*  | 30.50±2.75*  |
|                                    | 人参皂甙组 | 8      | 41.53±3.41   | 42.52±4.12** | 45.48±4.88** |
| CD8 <sup>+</sup>                   | 对照组   | 6      | 17.35±2.07   | 19.86±2.85   | 19.62±3.82   |
|                                    | 脓毒症组  | 8      | 21.62±3.14*△ | 22.95±3.31*  | 26.90±2.78*  |
|                                    | 人参皂甙组 | 8      | 21.14±3.50   | 20.50±3.82** | 18.83±2.74** |
| CD25 <sup>+</sup>                  | 对照组   | 6      | 4.50±1.13    | 3.95±0.98    | 4.62±1.34    |
|                                    | 脓毒症组  | 8      | 2.11±1.05*△  | 0.78±0.24*   | 0.68±0.17*   |
|                                    | 人参皂甙组 | 8      | 2.63±1.26    | 3.51±0.85**  | 4.72±1.29**  |
| CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> | 对照组   | 6      | 0.65±0.14    | 0.85±0.18    | 1.85±0.25    |
|                                    | 脓毒症组  | 8      | 1.63±0.26*△  | 2.73±0.26*△  | 3.31±0.65*   |
|                                    | 人参皂甙组 | 8      | 1.61±0.19    | 1.38±0.25**  | 0.83±0.12**  |

注:与对照组比较:\* $P<0.01$ ;与脓毒症组比较:\*\* $P<0.01$ ;与本组 72 h 比较:△ $P<0.01$

### 3 讨 论

烫伤后机体免疫功能紊乱,极易诱发脓毒症和 MODS,这是导致死亡率升高的主要原因<sup>[4]</sup>。近年来研究表明,脓毒症初始阶段炎症介质大量分泌;随着病情进展,机体可能经历了免疫抑制阶段,因而细胞免疫抑制是脓毒症的重要特征<sup>[5]</sup>,表现为 T 细胞的辅助-抑制免疫调节网络失衡,淋巴细胞增殖能力下降,呈现Ⅱ型辅助性 T 细胞(Th2)反应为主的免疫反应和大量淋巴细胞凋亡等,从而使机体对病原体的易感性明显增加<sup>[2]</sup>。CD25<sup>+</sup>主要表达于成熟的活化 T 细胞,体内 CD25<sup>+</sup>T 细胞数可以提示 T 细胞的活化程度;严重烧伤后白细胞介素-2(IL-2)生成

减少,淋巴细胞膜白细胞介素-2 抗原(IL-2R, CD25<sup>+</sup>)表达明显下降是细胞免疫功能低下的中心环节<sup>[6]</sup>。而 T 细胞亚群的变化最能反映出创、烧伤后机体的细胞免疫状态,故其已被广泛用作评估损伤后机体免疫机能变化的指标。研究表明,创伤后 Th 细胞(CD4<sup>+</sup>)和 B 淋巴细胞的数量明显下降,而抑制性 T 细胞(CD8<sup>+</sup>)升高<sup>[7]</sup>。本实验结果证实,烫伤后脓毒症大鼠外周血中 CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD25<sup>+</sup> T 细胞均明显减少,CD8<sup>+</sup> T 细胞上升,提示烫伤后 CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD25<sup>+</sup> T 细胞数量减少是烫伤脓毒症所致免疫抑制的重要环节。

近年来,一类具有免疫调节功能的 T 细胞引起了学术界的广泛关注和重视,这一类 T 细胞统称为 Tr 细胞。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr 细胞作为一个具有独立功能的 T 细胞亚群,对于维持机体免疫自稳,防止自身免疫性疾病具有极其重要的作用<sup>[8]</sup>。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr 细胞有低反应性与免疫抑制性两大特征<sup>[9,10]</sup>,其免疫低反应性表现在各种刺激原(如高浓度 IL-2、抗 CD3<sup>+</sup> 单抗)均能刺激 CD4<sup>+</sup> T 细胞增生,而不能刺激 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr 细胞增生。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr 细胞最重要的属性是免疫抑制性,特征性表达 IL-2 的 α 链(CD25),CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr 细胞主要分泌细胞因子 IL-10 和转化生长因子-β(TGF-β),活化后的细胞表面分子细胞毒性 T 细胞活化抗原 4 表达增加,特征性表达转录因子 Foxp3<sup>[11]</sup>。激活后的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr 细胞能够通过依赖细胞接触的方式抑制 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞的增生、分化以及分泌细胞因子<sup>[12]</sup>。说明 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr 细胞与 CD4<sup>+</sup>、CD25<sup>+</sup> 等其他 T 细胞不同,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr 细胞即使在抗原刺激条件下不发生增殖,也能抑制其他 T 细胞的增殖。有研究表明,多种病原体感染能够诱导宿主上调 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr 细胞表达,抑制抗原特异性 CD4<sup>+</sup> T 细胞反应,下调 Th1 的功能;而去除 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr 细胞能够显著降低这些病原体的感染率<sup>[13,14]</sup>。另有报道显示:严重创伤患者循环血中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr 细胞显著升高,其中死亡组升高更明显<sup>[15]</sup>。本研究结果也证实,烫伤脓毒症 12 h 后大鼠外周血中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr 细胞的比例明显升高,提示烫伤脓毒症后机体细胞免疫功能的受抑可能是由于 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr 细胞的活化,从而抑制了 CD4<sup>+</sup> T 细胞和 CD25<sup>+</sup> T 细胞增殖而引起。这些结果表明,严重烧、创伤后免疫抑制细胞对机体的免疫功能起到负向调控作用。

人参皂甙为名贵中药人参的有效成分。人参具

有大补元气、固脱生津、安神益智的功效。国内外学者曾对其进行了广泛、系统的药理研究,发现人参皂甙具有抗氧化、清除自由基、扩张血管、改善微循环、抗休克、抗衰老以及增强免疫功能的作用<sup>[3,16]</sup>。本研究结果也表明,人参皂甙对烫伤脓毒症大鼠外周血中 CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD25<sup>+</sup> T 细胞、CD8<sup>+</sup> T 细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr 细胞占淋巴细胞的比例均有不同程度恢复,与脓毒症组比较差异有显著性。说明人参皂甙可以通过抑制 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr 细胞活化来纠正创伤所致细胞受抑状态,从而达到纠正创伤脓毒症引起的细胞免疫功能紊乱的作用。

#### 参考文献:

- [1]姚咏明,盛志勇,林洪远,等.脓毒症定义及诊断的新认识[J].中国危重病急救医学,2004,16:321-324
- [2]董月青,姚咏明.脓毒症中细胞免疫紊乱的机制[J].中国危重病急救医学,2004,16:636-638.
- [3]刘靖华,陈惠孙,胡德耀,等.人参皂甙对创伤失血性休克免疫功能的调节作用[J].第三军医大学学报,2000,22:324-327.
- [4]Sjoberg T, Mzezewa S, Jonsson K, et al. Immune response in burn patients in relation to HIV infection and sepsis[J]. Burns, 2004, 30:670-674.
- [5]Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer L L, et al. Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity[J]. Shock, 2001, 16:83-96.
- [6]Faist E, Schinkel C, Zimmer S, et al. Inadequate interleukin-2 synthesis and interleukin-2 messenger expression following thermal and mechanical trauma in humans is caused by defective transmembrane signalling[J]. J Trauma, 1993, 34:846-853.
- [7]彭曦,汪仕良,尤忠义,等.醋酸精氨酸对严重烧伤家兔免疫功能的影响及其量效关系[J].中国危重病急救医学,2002,14:404-406.
- [8]王胜军,许化溪,杨胜利. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞[J]. 细胞生物学杂志, 2005, 27:61-65.
- [9]Nagler-Anderson C, Bhan A K, Podolsky D K, et al. Control freaks: immune regulatory cells[J]. Nat Immunol, 2004, 5:119-122.
- [10]Wei W Z, Morris G P, Kong Y C. Anti-tumor immunity and autoimmunity: a balancing act of regulatory T cells[J]. Cancer Immunol Immunother, 2004, 53:73-78.
- [11]Fontenot J D, Gavin M A, Rudensky A Y. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells[J]. Nat Immunol, 2003, 4:330-336.
- [12]Asseman C, von Herrath M. About CD4<sup>+</sup> pos CD25<sup>+</sup> pos regulatory cells[J]. Autoimmun Rev, 2002, 1:190-197.
- [13]Hisaeda H, Maekawa Y, Iwakawa D, et al. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells[J]. Nat Med, 2004, 10:29-30.
- [14]Mendez S, Reckling S K, Piccirillo C A, et al. Role for CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity[J]. J Exp Med, 2004, 200:201-210.
- [15]Monneret G, Debarb A L, Venet F, et al. Marked elevation of human circulating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis[J]. Crit Care Med, 2003, 31:2068-2071.
- [16]张仲苗,江波,章荣华,等.人参皂甙 Rg3 对小鼠免疫功能的影响[J].中药药理与临床,2004,20:4-6.

(收稿日期:2006-05-10 修回日期:2006-07-12)

(本文编辑:李银平)