

人参皂苷对烫伤脓毒症大鼠 CD19 细胞和 NK 细胞的影响

黄增峰¹, 缪心朗¹, 陈德昌², 黄学仄¹, 李友军¹, 梅慧奇¹

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

【摘要】 目的: 探讨人参皂苷对烫伤后脓毒症大鼠 CD19 细胞(B 淋巴细胞)和自然杀伤细胞(NK 细胞)的影响及其作用机制。方法: 健康雄性 SD 大鼠 66 只被随机分为脓毒症组($n=24$)、人参皂苷组($n=24$)和对照组($n=18$); 将大鼠用沸水致背部 30% 总体表面积 III 度烫伤, 烫伤后 12 h 经腹腔注射内毒素(5 mg/kg)予以“二次打击”, 制成烫伤脓毒症模型。各组分别于“二次打击”后 12、24 和 72 h 活杀大鼠, 用流式细胞仪检测大鼠外周血中 CD19 细胞和 NK 细胞占淋巴细胞的百分比。结果: “二次打击”后大鼠外周血中 CD19 细胞和 NK 细胞活性均显著下降, 此过程随时间延长而加重, 各时间点与对照组比较差异均有显著性(P 均 <0.01); 内毒素打击后 24 h 和 72 h 人参皂苷组 CD19 细胞和 NK 细胞占淋巴细胞百分比均显著高于脓毒症组(P 均 <0.01)。结论: 烫伤和内毒素“二次打击”后外周血中 CD19 细胞和 NK 细胞活性显著下降, 人参皂苷可有效恢复其功能, 显著改善烫伤脓毒症时细胞免疫功能受抑状态。

【关键词】 烫伤; 内毒素; 脓毒症; 人参皂苷; 流式细胞术; CD19 细胞; 自然杀伤细胞

中图分类号: R285.5; R631 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2007)04-0219-03

Effects of ginsenosides (人参皂苷) on CD19 cell (B lymphocyte) and natural killer cell in scalded rats with sepsis HUANG Zeng-feng¹, MIAO Xin-lang¹, CHEN De-chang², HUANG Xue-ze¹, LI You-jun¹, MEI Hui-qi¹. 1. Department of Emergency, Cangnan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Cangnan 325800, Zhejiang, China; 2. Department of Emergency and Critical Care Medicine, Shanghai Changzheng Hospital, Shanghai 200003, China

【Abstract】 Objective: To investigate the mechanism and effects of ginsenosides (人参皂苷) on CD19 cell (B lymphocyte) and natural killer (NK) cell 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 induced by boiling water at 30% full-thickness total body surface area (III grade of scald) at the back of the rat, and administration of endotoxin (5 mg/kg) into the peritoneal cavity immediately 12 hours after scald injury, then the rats were sacrificed at 12, 24 and 72 hours after the second attack, the numbers of CD19 cell and NK cell in peripheral blood of rats were counted by flow cytometry. **Results:** After the second attack, the administration of endotoxin, the CD19 cell and NK cell in peripheral blood of rats were decreased significantly at all the time points compared with those of the control group, and deteriorated further with the time going on (all $P < 0.01$). The proportions of CD19 cell and NK cell in ginsenosides group were significantly higher than those in scald sepsis group at 24 and 72 hours after endotoxin attack (all $P < 0.01$). **Conclusion:** The activities of CD19 cells and NK cells in peripheral blood are inhibited after scald injury and administration of endotoxin, while the ginsenosides can effectively eliminate the inhibition, thus it obviously improves the status of cyto-immune function in scalded rats with sepsis.

【Key words】 scald; endotoxin; sepsis; ginsenosides; flow cytometry; CD19 cell; natural killer cell

脓毒症是感染因素引起的失控性全身炎症反应综合征(SIRS), 易发展为脓毒性休克和多器官功能障碍综合征(MODS), 具有高发病率和病死率的特点^[1]。近年来研究提示, 脓毒症的发生发展与严重创

基金项目: 浙江大学博士后苍南科技开发基金资助项目(2003B12); 浙江省中医药课题基金资助项目(2004C157)

作者简介: 黄增峰(1963-), 男(汉族), 浙江省人, 副主任医师 (Email: WZHZF@163.com)。

伤、烧伤后机体免疫功能紊乱密切相关, 其中细胞免疫功能改变尤为重要^[2]。业已证实, 烫伤脓毒症时 T 细胞亚群均受到不同程度的抑制; 人参皂苷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^[3,4]; 但其调节作用机制尚未完全阐明。本研究拟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 CD19 细胞和自然杀伤细胞(NK 细胞)的变化, 旨在探讨 CD19 细胞和 NK 细

胞在烫伤脓毒症所致免疫抑制中的作用,以及人参皂苷对它们的影响。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料与仪器:人参皂苷(黑龙江东宁制药厂提供,纯度为 91.67%),内毒素为革兰阴性菌(O111:B4)胞壁脂多糖(LPS,第二军医大学微生物教研室提供);异硫氰酸荧光素(FITC)标志的小鼠抗大鼠 CD19 单克隆抗体(单抗),NK 小鼠抗大鼠单抗均为法国 Immunotech 公司产品。Epics-XL 型流式细胞仪(美国 coulter 公司);4K15C 型离心机,倒置显微镜等。

1.2 动物与模型制备:健康雄性 SD 大鼠 66 只,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司〔合格证号:SCXX(沪)2003-0003〕,体重 154~198 g,给大鼠称重、编号,实验前禁食 12 h,自由饮水。用盐酸氯氨酮注射液 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 LPS 5 mg/kg 予以“二次打击”,以模拟烫伤脓毒症模型。

1.3 实验分组:按随机数字表法将 66 只大鼠分为脓毒症组($n=24$)、人参皂苷组($n=24$)和对照组($n=18$)。对照组予麻醉并背部脱毛,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 LPS 后 12、24 和 72 h 各活杀 8 只;人参皂苷组在烫伤和 LPS 打击后即刻予以人参皂苷溶液 100 mg/kg 灌胃,以后按 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,于腹腔注射 LPS 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苷灌胃。各组大鼠处死时间均定于 07:00~09:00。

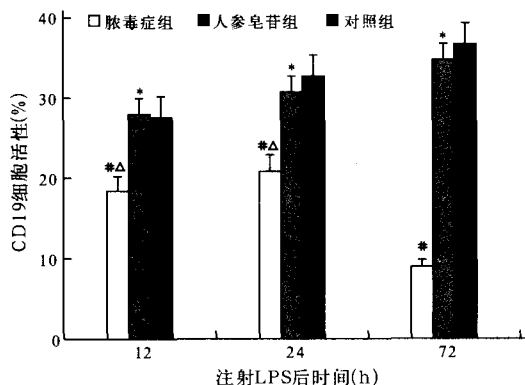
1.4 指标检测与方法:取肝素抗凝全血 100 μl,分别加入 FITC 标志的小鼠抗大鼠 CD19 单抗,NK 小鼠抗大鼠单抗 10 μl,室温避光孵育 15~20 min。再加红细胞裂解液,并振荡混匀。洗涤 1 次,重新悬浮细胞,在 Coulter 免疫制备仪上溶血固定后,流式细胞仪检测。测定淋巴细胞门中 5 000 个细胞,记录 CD19 细胞和 NK 细胞分别占淋巴细胞的百分比。

1.5 统计学处理:所有检测数据均以均数±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

2.1 人参皂苷对烫伤脓毒症大鼠外周血 CD19 细

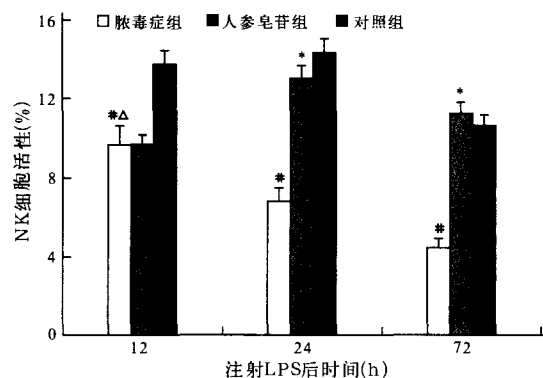
胞的影响(图 1):注射 LPS 后 12 h,外周血 CD19 细胞活性显著降低,此过程随时间延长而加重;72 h 降低更明显($P < 0.01$)。人参皂苷组注射 LPS 后 12、24 和 72 h 外周血 CD19 细胞活性显著高于同时点脓毒症组(P 均 < 0.01)。



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,Δ $P < 0.01$

图 1 人参皂苷对烫伤脓毒症大鼠 CD19 细胞的影响
Figure 1 Effects of ginsenosides on the proportion of CD19 cell in scalded rats with sepsis

2.2 人参皂苷对烫伤脓毒症大鼠外周血 NK 细胞活性的影响(图 2):注射 LPS 后 12 h,外周血 NK 细胞活性显著降低,此过程随时间延长而加重。人参皂苷组注射 LPS 后 12 h 外周血 NK 细胞活性与脓毒症组比较差异无显著性($P > 0.05$),24 h 和 72 h 外周血则均显著高于脓毒症组(P 均 < 0.01)。



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,Δ $P < 0.01$

图 2 人参皂苷对烫伤脓毒症大鼠 NK 细胞活性的影响
Figure 2 Effects of ginsenosides on the activity of NK cell in scalded rats with sepsis

3 讨论

严重烧伤后过度活化的各种免疫细胞和免疫分子相互作用,导致免疫功能紊乱,是诱发脓毒症和 MODS 的主要原因^[2]。近年研究表明,在脓毒症的

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^[5];表现为淋巴细胞增殖能力下降,呈现Ⅱ型辅助T细胞(Th2)反应为主的免疫反应和大量淋巴细胞凋亡等,从而机体对病原体的易感性明显增加^[2]。

CD19 是主要的 B 细胞,具有生成抗体,抵御细胞外病原体的功能,在抗感染过程中发挥着重要作用;激活的 B 细胞通过与其他细胞的接触能产生大量细胞因子,参与免疫调节、炎症反应及造血过程。在严重感染时,经激活后产生抗体的那种静止 B 细胞数量可大为减少,以致黏膜表面分泌的抗体不足以遏制大量细菌定居和增殖。与此同时,抗原特异性 B 细胞在数量上或功能上都不足以分泌相应的循环抗体以阻止细菌穿越黏膜屏障进入血液,导致脓毒症的发生^[6]。因此,体内 CD19 细胞数明显下降也是细胞免疫功能低下的关键环节。以往的研究表明,烫伤脓毒症后外周循环的淋巴细胞大量凋亡,T 辅助细胞(CD4⁺)和 B 细胞的数量明显下降^[4,7]。本实验结果证实,烫伤后脓毒症大鼠外周血 CD19 细胞明显减少,提示了 B 细胞数量减少是烫伤脓毒症所致免疫抑制的一个重要因素。

NK 细胞是体内一类独特的淋巴细胞亚群,是机体天然免疫系统的主要成员,具有早期识别及清除病毒感染和肿瘤细胞等多种生物学功能。NK 细胞除对肿瘤细胞和病毒感染细胞具有强大的细胞毒性外,还具有强大的分泌细胞因子的功能,早期分泌各种细胞因子[如 γ -干扰素(IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)等]和趋化因子,不仅能调节早期天然免疫应答,而且参与调节获得性免疫应答;因此,是连接天然免疫和获得性免疫的桥梁^[8,9]。近年来,越来越多的证据表明,NK 细胞可通过细胞与细胞接触的形式直接与 T 细胞相互作用,还可通过产生 IFN- γ 影响免疫球蛋白的类别转换而促进 B 细胞的发育分化。NK 细胞贯穿于整个免疫系统,将免疫系统的发育、天然免疫力的产生、获得性免疫的启动等环节连为一体,以维持机体免疫状态的正常运行^[10]。有研究表明,烫伤后 NK 细胞的数量、活性和细胞毒因子(CF)活性均明显降低,并随烫伤严重程度而加重^[11]。本实验结果也证实,烫伤后脓毒症大鼠外周血 NK 细胞明显减少;因此,抑制 NK 细胞的凋亡,提高 NK 细胞活性,对调节 T 细胞和 B 细胞免疫功能具有重要的作用。

人参皂苷是人参的主要有效成分,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^[3,12]。本实验结果发现,人参皂苷对烫伤脓毒症大鼠外周血 CD19 细胞和 NK 细胞活性均有不同程度的恢复作用,能明显改善严重烫伤动物的免疫功能。其机制:①通过抑制 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞的活化来纠正烫伤所致细胞受抑状态^[4];②能显著提高 CD19 细胞和 NK 细胞活性,使 T 细胞和 B 细胞的过度凋亡和增殖受抑状态得以明显改善,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。因此可以认为,严重烫伤后在发生细菌入侵的情况下,机体能够产生足够有效的淋巴细胞克隆,对于防止脓毒症的发生发展具有重要意义。人参皂苷作为一种高效、安全的免疫调节剂,在多种创伤急重症动物模型中显示有益作用^[3,4,12,13],但对其确切临床应用效果仍有待进一步探讨。

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(6):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(10):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(4):324-327.
- [4]黄增峰,陈德昌,陈如康,等.人参皂甙对烫伤脓毒症大鼠细胞免疫功能的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2006,13(4):225-227.
- [5]Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer L L, et al. Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity[J]. Shock, 2001, 16(2):83-96.
- [6]陈德昌.严重感染与免疫应答[J].基础医学与临床,2004,24(1):12-15.
- [7]Hotchkiss R S, Tinsley K W, Swanson P E, et al. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4⁺ T lymphocytes in humans[J]. J Immunol, 2001, 166(11):6952-6963.
- [8]Karre K. NK cells, MHC class I molecules and the missing self[J]. Scand J Immunol, 2002, 55(3):221-228.
- [9]Moretta L, Biassoni R, Bottino C, et al. Natural killer cells: a mystery no more[J]. Scand J Immunol, 2002, 55(3):229-232.
- [10]Trivedi P P, Roberts P C, Wolf N A, et al. NK cells inhibit T cell proliferation via p21-mediated cell cycle arrest[J]. J Immunol, 2005, 174(8):4590-4597.
- [11]卓安山,陈爱娟.烫伤对大鼠 NK 细胞影响及不同免疫调节剂对其作用的研究[J].上海免疫学杂志,1998,18(6):345-347.
- [12]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(6):4-6.
- [13]李卫平,陈敏珠.人参皂甙的免疫调节作用[J].安徽医科大学学报,1998,33(5):348-350.

(收稿日期:2007-02-21 修回日期:2007-04-10)

(本文编辑:李银平)