

重症胰腺炎早期 Th1/Th2 型细胞因子变化的实验研究

岳雁鸿¹, 孙治君^{2△} (1. 四川省眉山市中医院普外科 620010; 2. 重庆医科大学附属第二医院普外科 400010)

【摘要】 目的 研究辅助性 T 淋巴细胞 Th1、Th2 型细胞因子及 Th1/Th2 比值在重症胰腺炎(SAP)早期的变化,探讨 Th1/Th2 比值与 SAP 严重程度的关系。**方法** 将 56 只 Wistar 大鼠[体质量(250±30)g]随机分为假手术组(A 组, $n=28$)和 SAP 组(B 组, $n=28$),A 组和 B 组又分为 2、6、12、24 h 组,每组 7 只。B 组行逆行胰胆管匀速注射 5%牛磺胆酸钠;A 组开腹后仅翻动胃十二指肠数次。然后按规定时间(2、6、12、24 h)处死大鼠,观察腹水量和胰腺病理严重程度,检测腹水淀粉酶、血清淀粉酶和 Th1、Th2 型细胞因子及 Th1/Th2 比值的变化。**结果** (1)A 组胰腺无炎症反应,Th1、Th2 型细胞因子及 Th1/Th2 比值无明显变化($P>0.05$);(2)B 组随着 SAP 病情的加重 Th1 型细胞因子逐步降低,Th2 型细胞因子逐步升高,Th1/Th2 比值降低($P<0.05$)。**结论** SAP 早期 Th1/Th2 比值呈失衡状态,趋向 Th1 抑制和 Th2 极化,其失衡程度与 SAP 严重程度有关。

【关键词】 胰腺炎,急性坏死性; Th1 细胞; Th2 细胞; 干扰素 II 型; 白细胞介素 4

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.17.013 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)17-2076-02

Experimental study on changes of Th1/Th2 cytokines in early severe acute pancreatitis YUE Yan-hong¹, SUN Zhi-jun^{2△} (1. Department of General Surgery, Meishan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Meishan, Sichuan 620010, China; 2. Department of General Surgery, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

【Abstract】 Objective To explore the changes of Th1/Th2 cytokines and their ratio as well as the relation between the ratio of Th1/Th2 and the severity in early severe acute pancreatitis (SAP). **Methods** 56 Wistar rats [weight(250±30)g] were randomly divided into sham operation group (group A, $n=28$) and SAP group (group B, $n=28$). Each group was divided into 2 h, 6 h, 12 h and 24 h subgroups again, 7 cases per group. Group B was induced by evenly retrograde injection of 5% sodium taurocholate to pancreatic duct; the stomach and duodenum were only flipped several times after opening the abdomen in group B; then the rats were put to death at set time. The quantity of ascites and pathologic severity of pancreatic tissue were observed and ascites amylase, serum amylase and the change of Th1/Th2 cytokines and their ratio were detected. **Results** (1) There were no inflammatory reaction in pancreatic tissue and no change of Th1/Th2 cytokines as well as their ratio in group A; (2) With the aggravation of SAP, Th1 cytokine stepped down, Th2 cytokine stepped up and the ratio of Th1/Th2 fell in group B ($P<0.05$). **Conclusion** The imbalance of Th1/Th2 inclines to Th1 suppression and Th2 polarization in early SAP, and the imbalance extent is related to the severity of SAP.

【Key words】 pancreatitis, acute necrotizing; Th1 cells; Th2 cells; interferon type II; interleukin-4

1986 年 Mosmann 发现,根据产生不同的细胞因子谱和执行不同的生物学功能,小鼠辅助性 T 淋巴细胞(Th)可分为 Th1 和 Th2 型,Th1 以表达干扰素 γ (IFN- γ)和白细胞介素 2 (IL-2)为主,Th2 以表达 IL-4 和 IL-6 为主,二者的平衡对维持正常机体免疫状态有着重要作用。有研究显示,在重症胰腺炎(SAP)时存在严重的机体免疫紊乱^[1-2]。本实验通过检测外周血 Th1 型细胞因子 IFN- γ 和 Th2 型细胞因子 IL-4 的表达,探讨 Th1、Th2 型细胞因子在 SAP 早期的变化及 Th1/Th2 比值与 SAP 严重程度的关系。

1 材料与方法

1.1 动物模型的建立 选取 Wistar 大鼠 56 只,均为雄性,体质量(250±30)g,随机分为假手术组(A 组, $n=28$)和 SAP 组(B 组, $n=28$),各组再分为 2、6、12、24 h 组,每组 7 只(分别记为 A1、A2、A3、A4 和 B1、B2、B3、B4)。B 组用 3.5%水合氯醛

(0.8 mL/100 g)行腹腔注射麻醉,常规固定、备皮、消毒、铺巾,作剑突下正中切口,长约 1.5 cm,入腹后提起十二指肠,在十二指肠乳头对侧肠壁用皮试针扎一小孔,再用特制的钝头 5 号针头自该孔进入十二指肠腔,轻柔地穿过十二指肠乳头进入胰胆管约 1 cm,在靠近十二指肠用 2-0 带线缝针在胰胆管周围一缝线,打活结固定 5 号针头,在靠近肝门处用一血管夹夹闭胰胆管近心端,用 1 mL 皮试空针向胰胆管内匀速注射 5%牛磺胆酸钠(0.1 mL/100 g, 0.1 mL/min),注射完毕后保持 8 min,拔出针头,松开血管夹和结扎线,腹腔内留置青霉素 20 万单位,关腹后皮下注射生理盐水补液(3 mL/100 g),做好标记,放入鼠笼自由进食水。A 组开腹后仅翻动胃十二指肠数次,然后关腹,其余步骤同 B 组。

1.2 标本采集 模型建立后,在规定时间内(术后 2、6、12、24 h)行心脏采血并处死大鼠,收集腹水和胰腺组织,所采全血静置

△ 通讯作者, E-mail: ch. sunzj@yahoo. com. cn.

凝固后以 3 000 r/min 离心 10 min,用 EP 管收集血清冻存于一 70 ℃ 冰箱待用。测量腹水后用 EP 管收集 1.5 mL 冻存于一 70 ℃ 冰箱待用,所采胰腺标本放入 4% 多聚甲醛进行固定、脱水、包埋、切片,HE 染色。

1.3 指标检测

1.3.1 腹水淀粉酶和血清淀粉酶测定 检测试剂盒由德国利德曼公司提供,应用日立 7060 全自动生化分析仪按试剂盒说明书操作,微机处理,得出结果。

1.3.2 细胞因子 IFN-γ 和 IL-4 测定 采用酶联免疫吸附试验(ELISA 法)测定,试剂盒由深圳晶美生物工程有限公司提供,按照说明书操作,绘制标准曲线,求出各指标浓度。

1.3.3 胰腺组织 HE 染色及病理学评分 胰腺病理组织评分

方法参考 Kusske 法加以改进,在光学显微镜下由病理科按照水肿、炎细胞浸润、出血、坏死的轻重程度进行盲法评分,见表 1。

1.4 统计学处理 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。全部资料的统计学分析均采用 SPSS13.0 统计软件完成。

2 结果

A 组腹腔内无腹水,各脏器未见异常;B 组腹腔内可见血性腹水、肠管胀气、肝脏肿胀、胰腺充血肿胀、出血坏死,胰周和肠系膜可见乳白色钙化斑,镜下见胰腺间质和腺细胞水肿,闰管闭塞,炎细胞浸润,灶性出血坏死至成片出血坏死,病情随时间的延长逐渐加重。各指标检测结果见表 2。

表 1 胰腺病理评分标准

组织病变	0 分	1 分	2 分	3 分
水肿	无	小叶间灶性水肿	小叶间弥散性水肿	腺体紊乱分离
炎细胞浸润	无	局限导管内	实质内小于 50%	实质内大于 50%
出血	无	实质出血小于 25%	实质出血 25%~50%	实质出血大于 50%
坏死	无	导管周围坏死小于 5%	灶性坏死 5%~20%	弥散性实质坏死大于 20%

表 2 各组指标变化情况($\bar{x} \pm s, n=7$)

组别	腹水量(mL)	腹水淀粉酶(U/L)	血清淀粉酶(U/L)	胰腺病理评分	血清 IFN-γ (pg/mL)	血清 IL-4 (pg/mL)	Th1/Th2
A1	—	—	611.20±100.39	0.00±0.00	20.80±2.57	9.84±1.52	2.13±0.27
A2	—	—	597.94±133.85	0.00±0.00	20.31±1.45	10.10±1.76	2.04±0.23
A3	—	—	652.09±135.86	0.00±0.00	20.71±1.69	10.71±1.99	1.97±0.23
A4	—	—	650.90±136.68	0.00±0.00	19.93±1.48	10.97±2.05	1.85±0.24
B1	4.16±0.67	16 974.71±916.70	4 538.06±610.43*	4.14±0.90*	26.33±2.29*	11.93±1.93*	2.24±0.23*
B2	6.00±0.61 [△]	22 089.41±2 134.30 [△]	7 112.20±815.26* [△]	5.86±1.07* [△]	19.44±2.28* [△]	21.04±2.10* [△]	0.92±0.43* [△]
B3	9.80±0.84	33 606.90±2 566.65	12 512.05±1 214.58*	8.14±1.21*	15.81±2.13*	28.44±2.54*	0.55±0.03*
B4	10.81±0.98	39 286.30±2 381.87 [△]	13 435.84±1 022.46*	9.29±1.11*	13.13±1.84* [△]	31.86±2.38* [△]	0.41±0.04* [△]

注:与 A 组各时间点比较,* $P < 0.05$;与同组内前一时间点比较,[△] $P < 0.05$ 。—表示无数据。

3 讨 论

SAP 是外科常见急腹症,病情凶险,发展快,病死率高,在疾病早期即可并发全身炎症反应综合征(SIRS)并导致多器官功能障碍(MODS),造成胰腺以外的远隔重要脏器发生器质性和功能性损伤^[3]。传统的胰酶激活与自身消化学说对此难以解释。已有研究提示 SAP 的演进过程与 Th 的功能极化和机体免疫状态有关^[4]。一般认为 Th1 型细胞介导细胞免疫反应,Th2 型细胞介导体液免疫反应,二者量和比值的变化对机体免疫平衡有重要影响。

本实验中假手术组无炎症表现,各时间点的 Th1、Th2 型细胞因子无明显变化,Th1/Th2 比值较恒定,而 SAP 组随时间的延长病情逐渐加重,在术后 24 h 病理改变达到高峰,Th1 型细胞因子在术后极早期(2 h)有短暂性升高,之后随时间的延长逐渐减低,Th2 型细胞因子在 SAP 造模后逐渐升高,Th1/Th2 比值在假手术组无明显差异,但在相同时间点 SAP 组均显著降低,甚至出现比例倒置,呈现 Th1 抑制和 Th2 极化

的失衡状态。SAP 模型极早期是以牛磺胆酸钠引起的化学性胰腺损伤为主,进而激活胰酶造成自身消化,此阶段的炎症反应主要在胰腺器官,而胰外炎症反应较轻,机体 Th1 型细胞因子表达占优势,但随着时间的延长,胰外器官组织炎症反应逐渐加重,Th2 型细胞因子占优势。此时细胞免疫减弱,机体的皮肤和胃肠道黏膜等抵御病菌的屏障作用减弱,易致细菌异位进入血液循环,发生菌血症或脓毒血症,导致发生 SIRS;Th2 型细胞因子的大量增加,通过扳机样作用使细胞因子发生瀑布式级联反应,导致体液免疫过激和全身炎症反应加重,使胰外其他重要脏器功能发生障碍,最终出现 MODS^[5]。Ueda 等^[2-3]在鼠 SAP 模型中检测到脾细胞功能的改变,IL-2 和 IFN-γ 的活性受到抑制,Th1/Th2 比值的平衡倾向于 Th1 受抑制和 Th2 极化。而 Rau 等^[4]分别用 Th1 型细胞因子 IFN-γ 和免疫抑制剂 FK506 治疗 SAP 大鼠纠正 Th1/Th2 比值失衡,结果二者均能减轻机体免疫失衡,改善胰腺局部和全身损伤。

一般认为 Th1 型介导细胞免疫反应,Th2(下转第 2079 页)

3 讨 论

NPY 是一种生物活性多肽,属于缩血管多肽之一,它参与了多种疾病的病理过程,近年来颇受临床和科研工作者的关注^[3-5]。NPY 广泛分布于哺乳动物或人的神经系统及其他组织器官中,循环血液中也有一定量的分布。其主要来源有:(1)交感神经的释放,当交感神经兴奋性升高时,NPY 释放增加。(2)血小板内 NPY 的释放,当胶原刺激等因素引起血小板聚集继而使血小板活化时,可使 NPY 释放增多,最终使血浆中 NPY 水平升高。本文检测结果表明,肝硬化患者血清 NPY 水平明显低于健康对照组,差异有统计学意义($P<0.01$),尤以肝硬化伴腹水组为甚。造成患者血中 NPY 水平降低的原因可能与以下因素有关:(1)由于血小板具有合成和分泌 NPY 的能力,而肝硬化时尤其是合并脾功能亢进时血小板减少,这可能是造成肝硬化患者血清 NPY 水平降低的重要原因。(2)NPY 主要分布于中枢神经系统,肝性脑病时由于中枢神经系统受抑制,可能导致 NPY 释放降低。(3)NPY 是体内主要的血管收缩因子,而肝硬化时由于患者循环系统多呈高排低阻状态,血管外阻力下降,这可能造成 NPY 减少。与此同时,患者的肾素-血管紧张素-醛固酮系统活性增强,引起体内钠水滞留。因此,血浆 NPY 水平的降低与肝硬化的血液流变学异常及水肿、腹水形成有关^[6]。

国内外文献一致认为,血清 HA 和 PⅢP 水平与肝组织炎症活动密切相关,并在一定程度上反映病情的轻重^[7-8]。本文检测结果表明,肝硬化患者血清 HA 和 PⅢP 水平均显著地高于健康对照组($P<0.01$),且以肝硬化伴腹水组尤甚,这与文献报道结果一致。另外,本文还对血清 NPY 与 HA、PⅢP 水平进行了相关性分析,结果表明三者呈明显负相关($r=-0.4185$ 、 -0.5016 , $P<0.01$)。

(上接第 2077 页)

介导体液免疫反应,二者量和比值的变化对机体免疫平衡有重要影响。IFN- γ 是 Th1 的标志性细胞因子,能激活巨噬细胞,促进其杀灭微生物,上调主要组织相容性复合物Ⅱ类分子水平。Takahito 等^[6]在一项研究中发现,IFN- γ (-/-)大鼠在 SAP 过程中伴有更严重中性粒细胞浸润,胰腺损伤更重,但在 SAP 诱导后 4 h 给予 IFN- γ 能显著减轻胰腺炎的病情。IL-4 是 Th2 的标志性细胞因子,但 Th2 产生的细胞因子还包括 IL-6、IL-10、IL-5 和 IL-13 等。已有研究证实,Th2 型细胞因子 IL-6 在 SAP 时有不同程度的过度生成,可反映急性胰腺炎的严重程度,IL-6 过度分泌可以损害正常的细胞和组织,其水平过高常提示疾病预后不良^[7-8]。如果能通过药物或其他方式改变 Th1/Th2 比值的极化,纠正其失衡状态,将对 SAP 的病情大有裨益,为治疗 SAP 提供一种新的方法和途径。

参考文献

[1] Bhatia M, Wong FL, Cao Y, et al. Pathophysiology of acute pancreatitis[J]. Pancreatolgy, 2005, 5(2):132-144.
[2] Ueda T, Takeyama Y, Yasuda T, et al. Functional alterations of splenocytes in severe acute pancreatitis[J]. J Surg Res, 2002, 102(2):161-168.
[3] Ueda T, Takeyama Y, Yasuda T, et al. Significant eleva-

综上所述,检测肝硬化患者血清 NPY、HA 和 PⅢP 水平的变化,对了解病情、观察预后、探讨其发病机制等具有重要临床价值。

参考文献

[1] Tatemoto K, Carlquist M, Muttu V. Neuropeptide Y-a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide[J]. Nature, 1982, 296(5858):659-660.
[2] 程明亮,刘三都. 肝纤维化的基础与临床[M]. 北京:人民卫生出版社,1996.
[3] 陈立刚,迟宝秦,孙艳. 神经肽 Y 的临床研究进展[J]. 吉林大学学报:医学版, 2007, 33(2):399-401.
[4] 安洪真,梁堃,罗南兹. 不同肾脏疾病时 leptin 与 NPY 的水平变化[J]. 放射免疫学杂志, 2008, 21(4):293-294.
[5] 刘宁,黄雯. 慢性肾衰竭瘦素及神经肽 Y 的变化及其对消化系统的影响[J]. 国际移植与血液净化杂志, 2007, 5(4):25-27.
[6] 何浩明,王惠明,马达. 标记免疫分析与 PCR 在医学中的应用[M]. 合肥:安徽大学出版社,2002.
[7] 张定凤. 肝纤维化非创伤性指标的综合性诊断[J]. 中华肝脏病杂志, 2001, 9(5):260-261.
[8] 丁红兵,陈永鹏,冯筱榕,等. 慢性乙型肝炎纤维化分期与血清纤维化标志物的相关性分析[J]. 中华肝脏病杂志, 2001, 9(2):78-80.

(收稿日期:2011-03-08)

tion of serum interleukin-18 levels in patients with acute pancreatitis[J]. J Gastroenterol, 2006, 41(2):158-165.
[4] Rau BM, Krüger CM, Hasel C, et al. Effects of immunosuppressive and immunostimulative treatment on pancreatic injury and mortality in severe acute experimental pancreatitis[J]. Pancreas, 2006, 33(2):174-183.
[5] 吕云福. 现代胰腺外科学[M]. 北京:人民军医出版社, 2003:126-134.
[6] Takahito H, Yuko I, Akihiko K, et al. IFN-gamma protects cerulein-induced acute pancreatitis by repressing NF-kappa B activation[J]. J Immunol, 2007, 178(11):7385-7394.
[7] Bhatia M, Brady M, Shokubi S, et al. Inflammatory mediators in acute pancreatitis[J]. J Pathol, 2000, 190(2):117-125.
[8] Laser HG, Gross V, Scheibenbogen C, et al. Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute phase response and reflects severity in acute pancreatitis[J]. Gastroenterology, 1991, 101(3):782-785.

(收稿日期:2011-05-24)