

- 2 Cervantes - Laurean D, Schramm DD, Jacobson EL, *et al.* Inhibition of advanced glycation end product formation on collagen by rutin and its metabolites[J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2006, 17 (8): 531 - 540
- 3 Stanely Mainzen Prince P, Kannan NK. Protective effect of rutin on lipids, lipoproteins, lipid metabolizing enzymes and glycoproteins in streptozotocin - induced diabetic rats[J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2006, 58 (10): 1373 - 1383
- 4 Kamalakkannan N, Prince PS. Antihyperglycaemic and antioxidant effect of rutin, a polyphenolic flavonoid, in streptozotocin - induced diabetic wistar rats[J]. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2006, 98 (1): 97 - 103
- 5 Krishna KM, Annapurna A, Gopal GS, *et al.* Partial reversal by rutin and quercetin of impaired cardiac function in streptozotocin - induced diabetic rats[J]. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2005, 83(4): 343 - 355
- 6 Kamalakkannan N, Stanely MPP. The influence of rutin on the extracellular matrix in streptozotocin - induced diabetic rat kidney[J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2006, 58 (8): 1091 - 1098
- 7 施卫星. 糖尿病患者慢性并发症患病率及相关因素分析[J]. *中华流行病学杂志*, 2010, 25(1): 264
- 8 Buyukkocak S. Erythrocyte oxidant/antioxidant status of diabetic patients[J]. *Journal of Endocrinological Investigation*, 2002, 23(4): 228 - 230
- 9 齐贵胜, 裴素霞, 任家胜. 曲克芦丁对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *时珍国医国药*, 2006, 17(9): 1670 - 1671
- 10 付小蕾, 刘岚, 刘剑丽. 糖尿病肾病的血流变结果分析[J]. *实用医技杂志*, 2003, 10(2): 106 - 107
- 11 Mogesen CE, Christensen CK. The diabetic kidney from hyperfiltration and micoalbumin to endstage renal failure[J]. *Medical Clinics of North America*, 1988, 72(6): 1465 - 1492

(收稿: 2012 - 02 - 13)

(修回: 2012 - 03 - 01)

脑外伤大鼠周围血中 Th1/Th2 比例变化及机制探讨

屈晓东 荔志云 周杰 王茂德

摘要 目的 研究 SD 大鼠在脑外伤后第 1、3、5、10 天外周血中 CD4⁺ T 细胞两个主要亚群辅助性 T 细胞(Th)Th1/Th2 比例的变化情况,并尝试从调节性 T 细胞(Treg)的角度探讨其变化的原因。**方法** 参照改进的 Feeney 氏自由落体硬膜外撞击法制作脑外伤动物模型,在相应的时间点从大鼠心脏取血,应用 ELISA 法测定 γ 干扰素(IFN- γ ,代表 Th1)和白介素 4(IL-4,代表 th2)的量,应用流式细胞术检查血中 Treg 的量。**结果** IFN- γ 和 IL-4 之间的对比关系为,颅脑外伤后大鼠外周血中 IFN- γ 的浓度逐渐升高($P < 0.05$),而 IL-4 的浓度逐渐降低的变化趋势。对 IFN- γ 和 IL-4 进行相关性分析,结果为 IFN- γ 和 IL-4 的变化呈明显负相关(*Pearson* 相关系数 -0.443)。Treg 细胞从脑外伤后第 1 天开始下降($P < 0.05$),直至脑外伤后第 10 天仍未恢复正常。**结论** Th1/Th2 失衡可能是导致颅脑外伤后机体容易发生感染的一个原因,血中 T reg 细胞的减少可能是导致 Th1/Th2 比例失衡的一个原因。

关键词 脑外伤 免疫抑制 流式细胞术 调节性 T 细胞

Th1/Th2 Ratio Imbalance in The Rat Peripheral Blood Following TBI and Possible Mechanisms. Qu Xiaodong, Li Zhiyun, Zhou Jie, Wang Maode. *Department of Neurosurgery, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Command, Gansu 730050, China*

Abstract Objective Many studies have shown that traumatic brain injury(TBI) leads to immune system impairment. Our study aimed to find the part of the reasons for immunosuppression after TBI and further provide theoretical guidance to find new therapeutic targets. **Methods** Adult male and female SD rats (220 - 260 g) were randomized into different groups: the control group and the model groups. One piece skull was taken away without injuring cerebral tissue in control group, while rats in model group were subject to free fall injury in the cerebral hemisphere. The expression of IL-4 and IFN- γ were detected by ELISA analysis, however Treg cell was detected by FCM on the 1, 3, 5, 10 day after TBI. **Results** IFN- γ concentrations in the peripheral blood were increased at 1 day after TBI, but it was not statistical significance until to 5 days. The concentration of IFN- γ following TBI remained elevated significantly at 10 days post injury. However concentrations of IL-4 were significantly decreased from 5 days to 10 days compared with the control group($P < 0.05$). The number of Treg cells in peripheral blood was significantly decreased in groups with TBI as compared with the control group($P < 0.05$). **Conclusion** The imbalance in the two subsets of CD4⁺ cells i. e. Th1 helper cells and Th2 helper cells has been advocated to

contribute for the secondary immunosuppression leading to more infections in TBI patients. $CD4^{+}CD25^{+}$ forkhead box P3 (Foxp3) $^{+}$ regulatory T lymphocytes(Treg cells)has been proposed as a key immunomodulator in such response.

Key words TBI; Immunosuppression; Flow cytometry; Treg

许多研究表明颅脑外伤(TBI)会导致机体免疫系统受损而使患者的发病率和病死率增加。颅脑外伤可引起免疫系统和大脑之间的平衡破坏,从而导致伤后免疫抑制和感染的发生。常见的感染如肺部感染、尿路感染和伤口感染,颅脑外伤本身作为一个独立的危险因素,通过特定的机制,使患者对感染的易感性显著增加。感染不仅使患者的预后不良,也增加了医疗成本和经济负担。所以减少脑外伤患者感染的发生,具有十分重要的意义。因此,探讨颅脑外伤后免疫功能损害的机制可以帮助我们预防和治疗感染并发症,并为我们寻找新的治疗靶点提供理论依据。

颅脑外伤后对人体的体液免疫和细胞免疫功能都有影响,而其对细胞免疫的功能影响更明显。大量的研究表明,在颅脑外伤后体内的 $CD4^{+}$ 数量降低。 $CD4^{+}$ T 细胞有两个主要亚群 Th1(主要分泌 IL-2 和 IFN- γ)和 Th2(主要分泌 IL-4 和 IL-5),Th1 和 Th2 的比例变化在许多疾病的不平衡发挥重要作用,如 Th1/Th2 降低与哮喘的发生有关,Th1/Th2 比例增加可导致流产的发生,而颅脑外伤后机体 Th1/Th2 比例如何变化尚未见有报道。那么颅脑外伤后机体的 Th1/Th2 细胞比例是否失衡?变化的相关机制是什么?这将是本文努力解决的问题。

材料与方法

1. 脑外伤模型的建立:实验动物选用成年 SD 大鼠(220 ~ 250g),雌雄各半,均从西安交通大学医学院动物实验中心购买。将动物编号后应用随机数字表,将脑外伤大鼠(TBI 组)分为 4 个亚组,即致伤后 1、3、5、10 天,每组 8 只,每个时间点

对照组大鼠 6 只。到相应时间点从心脏取血,取血后处死大鼠。大鼠脑损伤模型参照改进的 Feeney 氏自由落体硬膜外撞击法,各对照组仅做右顶叶颅骨开窗,不致伤,其余操作同脑外伤组。整个造模操作过程严格无菌操作。对照组大鼠共 24 只,实验组动物造模共 42 只,死亡 2 只,动物造模成功率 95.2%。

2. 仪器和检测方法: FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司);试剂:免疫荧光单克隆抗体 $CD3/CD4/CD25^{+}$ Foxp3(美国 Biolegend 公司); IL-4 和 IFN- γ 抗体(eBioscience 公司)。

3. 大鼠周围血中 IFN- γ 和 IL-4 的测定:从大鼠心脏采血 2.5ml,室温下血液自然凝固 10 ~ 20min,然后 2000r/min 离心 10min,仔细收集上清,取出血清在 -20℃ 封存,待统一检测,保存过程中如出现沉淀,应再次离心。IL-4 和 IFN- γ 水平用 ELISA 法(eBioscience)测量。IFN- γ 检测的最小浓度为 31.3pg/ml(表 1);IL-4 检测的最小浓度为 1.6pg/ml(表 2)。

4. 大鼠外周血中 $CD4^{+}CD25^{+}$ Foxp3 调节性 T 细胞的流式细胞术测定:从大鼠心脏取血 2ml,EDTA 抗凝。采血后随即往西安交通大学医学院中心实验室统一用流式细胞仪进行检测。各试管中加入抗凝全血 100 μ l,分别加入 APC anti-rat CD4/PE anti-rat25 和同型对照各 20 μ l 双色标记单抗试剂,混匀后室温避光 20min,加固定液 1ml 静置 10min,2000r/min 离心 5min,弃上清,加打孔液 1ml,2000r/min 离心 5min,弃上清,然后加 Alexa Fluor488 anti-rat Foxp3 Flow Kit 5 μ l,混匀,放置 20min,然后加 1ml PBS 液重悬细胞,上机检测分析。各指标的测定按试剂盒说明书操作。数据处理使用处理软件,由电脑自动处理得出结果(图 1、表 3)。

5. 统计学方法:观察指标均采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)来表示,用 SPSS 13.0 统计软件应用两因素方差分析(时间和处理因素)对以上数据进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 IFN- γ 的浓度变化 (pg/ml)

组别	伤后第 1 天	伤后第 3 天	伤后第 5 天	伤后第 10 天
对照组	87.266 $\pm$ 15.767	87.875 $\pm$ 13.142	88.653 $\pm$ 16.001	88.975 $\pm$ 16.484
TBI 组	101.472 $\pm$ 19.301	109.517 $\pm$ 38.893	124.3 $\pm$ 33.846 *	190.07 $\pm$ 84.296 *

与术前比较, * $P < 0.05$

表 2 IL-4 的浓度变化 (pg/ml)

组别	伤后第 1 天	伤后第 3 天	伤后第 5 天	伤后第 10 天
对照组	26.468 $\pm$ 7.863	26.365 $\pm$ 7.274	25.949 $\pm$ 6.948	25.146 $\pm$ 6.368
TBI 组	21.393 $\pm$ 6.517	21.022 $\pm$ 5.079	18.947 $\pm$ 4.690 *	13.618 $\pm$ 5.055 *

与术前比较, * $P < 0.05$

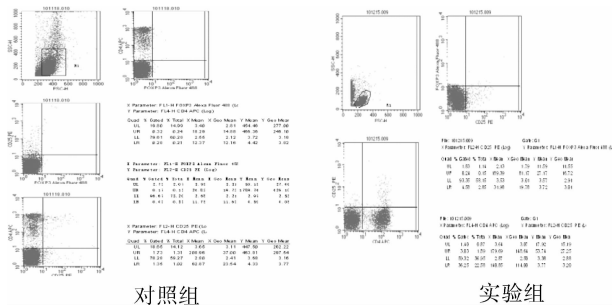


图1 流式细胞术测定 CD4⁺CD25⁺Foxp3 调节性 T 细胞结果

表3 Treg 细胞数量测定结果

组别	伤后第1天	伤后第3天	伤后第5天	伤后第10天
对照组	3.315 ± 1.591	3.147 ± 1.356	3.075 ± 1.166	3.213 ± 1.623
TBI 组	1.022 ± 0.389*	0.232 ± 0.129*	0.33 ± 0.202*	0.503 ± 0.189*

与术前比较, * $P < 0.05$

结 果

实验大鼠生理参数,体重,神经检查发现,对照组大鼠通常在麻醉后 6h 恢复意识,而脑外伤组大鼠伤后持续约 12h 昏迷,致伤 24h 后几乎恢复正常饮食行为。脑外伤组大鼠左侧肢体偏瘫,爬行拖地,尾巴偏向左侧。对照组和脑外伤组大鼠体重在造模前和造模后无显著差异。

由表 1 可看出,颅脑外伤组大鼠外周血中 IFN- γ 浓度与对照组相比有明显差异。IFN- γ 浓度在伤后从第 1 天升高,第 3 天继续升高,但与对照组相比这种差异无统计学意义($P > 0.05$)。伤后第 5 天 IFN- γ 浓度继续升高,并且颅脑外伤组与对照组有统计学意义($P < 0.05$),直至伤后第 10 天,这种差异仍显著存在。

由表 2 可看出,颅脑外伤组大鼠外周血中 IL-4 浓度与对照组相比有明显差异。IL-4 浓度在伤后从第 1 天降低,第 3 天继续降低,但与对照组相比这种差异无统计学意义($P > 0.05$)。伤后第 5 天 IL-4 浓度继续降低,并且颅脑外伤组与对照组有统计学意义($P < 0.05$),直至伤后第 10 天,这种差异仍显著存在。

由表 3 可看出,颅脑外伤组大鼠外周血中 Treg 细胞数量从伤后第 1 天开始与对照组比较明显下降,且有统计学差异($P < 0.05$),这种变化直至伤后第 10 天仍持续存在。而对颅脑外伤各亚组的 Treg 细胞数量进行分析发现,在各颅脑外伤亚组中 Treg 细胞数量无统计学差异。IFN- γ 和 IL-4 之间的对比关系为,颅脑外伤后大鼠外周血中 IFN- γ 的浓度逐渐升

高,而 IL-4 的浓度逐渐降低的变化趋势。对 IFN- γ 和 IL-4 进行相关性分析,结果为 IFN- γ 和 IL-4 的变化呈明显负相关(Pearson 相关系数 -0.443)。

讨 论

本研究中最重要发现是,颅脑外伤可引起大鼠外周血中 IFN- γ 的浓度升高,IL-4 的浓度和 Treg 下降。IFN- γ 在脑外伤后第 5 天明显升高($P < 0.05$),而 IL-4 从脑外伤后第 5 天明显下降($P < 0.05$),这种下降趋势持续到脑外伤后第 10 天仍然存在。Treg 细胞从脑外伤后第 1 天开始下降($P < 0.05$),直至脑外伤后第 10 天仍未恢复正常。

一般认为辅助性 CD4⁺T 细胞分为两类 Th1 和 Th2^[1-3]。通过对 Th2 细胞通路的激活模式主要引起白细胞介素增加,如 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF);而 Th1 细胞则主要分泌 IL-1、IL-2、IL-12、干扰素- γ (IFN- γ),肿瘤坏死因子- β (TNF- β)和血小板聚集因子(PAF),所以 Th1 主要分泌大量的 INF- γ ,Th2 则主要分泌 IL-4^[4,5]。因此 INF- γ 是 Th1 的标志因子,有强大的免疫调节作用,IFN- γ 能够刺激巨噬细胞和提高细胞毒性 T 的活性,诱导一氧化氮的产生,增加 MHC 分子共刺激信号,刺激 CD4⁺T 细胞向 Th1 方向分化,而抑制 CD4⁺T 细胞向 Th2 方向分化^[6]。在动物模型中和临床治疗中 IFN- γ 还有抗病毒作用^[7];IL-4 是由 Th2 细胞分泌的一种重要的促炎因子,具有多种生物学效应,IL-4 一直被认为是 Th2 分泌的代表因子^[8-10]。因此我们通过测定大鼠外周血中 INF- γ 和 IL-4 的浓度来代表 Th1 和 Th2 的量的多少。IL-4 和 INF- γ 作用相互拮抗,从而保持了 Th1 细胞和 Th2 细胞之间的动态平衡,这种抗炎和促炎之间的失衡会导致很多疾病的发生,Th1/Th2 的失衡取决于 Th1/Th2 细胞失衡通路的激活,这两种途径往往是相互排斥的,一个起保护作用,而另一个则促使疾病的发生^[11,12]。IFN- γ 的持续升高,IL-4 的进行性下降表明颅脑外伤后大鼠外周血中 Th1/Th2 趋于 Th1,而远离 Th2,这可能就是导致颅脑外伤后免疫抑制的一个原因。有研究表明 IFN- γ 的水平与颅脑外伤的严重程度呈正相关,所以 IFN- γ 的水平可以预测颅脑外伤的严重程度。

那么是什么原因导致颅脑外伤后血中 Th1/Th2 比例改变呢? Liesz A 等^[13]研究发现主要免疫调节因子 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 淋巴细胞(Treg)

是主要的脑保护调节因子,在缺血性脑损伤炎症后针对多种炎症通路进行调节。在 Treg 细胞缺失的小鼠脑梗死模型中, TNF- α 、INF- γ 和 IL-1b 的表达明显升高^[13]。Campbell 等^[14]都表明了 Treg 细胞通过 Th 细胞相关转录因子,以维持或恢复免疫反应过程中极化的 Th1、Th2 和 Th17 细胞,以恢复免疫平衡。因此我们检测了颅脑外伤后大鼠外周血中的 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞的数量,研究结果发现颅脑外伤组中大鼠外周血中 Treg 细胞数量与对照组相比明显减少,并且与 Th1/Th2 的比例呈明显的负相关(相关系数 -0.367 且 $P < 0.05$)。在一些研究中发现 Treg 数量减少或功能抑制可以导致一些自身免疫性疾病。因此,Treg 细胞数量的减少可能是颅脑外伤后血中 Th1/Th2 比例失衡的原因。在本研究中我们没有观察到这些指标在颅脑外伤后多长时间才能够恢复到正常水平,并且没有将大鼠分为颅脑外伤轻、中、重组进行观察。但这些问题将在我们后续研究中进一步解决。

总之,我们发现颅脑外伤可以引起大鼠外周血中 IFN- γ 水平明显升高,IL-4 表达下降,Th1/Th2 失衡可能是导致颅脑外伤后机体容易发生感染的一个原因。而颅脑外伤后血中 Treg 细胞的减少可能是导致 Th1/Th2 比例失衡的一个原因。Allan, S. E. 等声称 Treg 细胞是一个潜在的抗炎细胞,用 Treg 细胞来治疗自身免疫性疾病,抑制移植排斥反应,促进癌症和慢性感染的免疫反应等方面表现出了令人兴奋的结果。James 等研究表明通过基因治疗增加 IL-4 的表达,用以预防和(或)治疗大鼠关节液模型的关节炎、滑膜炎、降低促炎因子水平、血管化和骨退行性变等炎性改变,这提示对人类类似的治疗可能也是有益的。因此提高颅脑外伤后机体血中的 Treg 细胞数量,或增加颅脑外伤后机体血中的 IL-4 水平,或减少颅脑外伤后机体血中的 IFN- γ 浓度可能能够改善颅脑外伤患者的免疫状况,预防和(或)治疗颅脑外伤后的感染。因此 Treg 细胞在脑外伤后可能有潜在应用价值,提高 IL-4 水平或降低 IFN- γ 水平可能成为未来治疗颅脑外伤的方法。然而在应用到临床上的之前,仍有很多工作要做,但如果成功,可能会改变目前治疗颅脑外伤的治疗现状。

重型颅脑损伤患者伤后存在明显的 Th1/Th2 平衡偏移,如果我们从整体水平调节神经-内分泌-免疫网络的平衡,如增加免疫促进类激素或减少免疫抑制类激素,用细胞因子调理及免疫营养调节治疗等,

就可以改善患者损伤后的 Th1/Th2 免疫失衡,增强患者机体抵抗力,降低患者继发感染发生率,提高临床治愈率。

参考文献

- 1 Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, *et al.* Two types of murine helper T cell clones. Definition according to profiles of lymphokine activities and secretory proteins[J]. The Journal of Immunol,1986,136(7):2348-2357
- 2 Del Prete GF, De Carli M, Mastromauro C, *et al.* Purified protein derivative of Mycobacterium tuberculosis and excretory-secretory antigen(s) of Toxocara canis expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1T helper or type 2 Thelper) profile of cytokine production[J]. J Clin Invest,1991,88(1):346-350
- 3 Umetsu DT, DeKruyff RH. TH1 and TH2 CD4⁺ cells in human allergic diseases[J]. The Journal of Allergy Clinical Immunology,1997,100(1):1-6
- 4 Navarro-Zorraquino M, Garel'a - Alvarez F, Mart'inez - Fernandez A R, *et al.* Pharmacological immunomodulation of surgical trauma [J]. Journal of Investigative Surgery, 2007,20(5):283-289
- 5 Kimura M, Tsuruta S, Yoshida T. Unique profile of IL-4 and IFN- γ production by peripheral blood mononuclear cells in infants with atopic dermatitis[J]. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1998,102(2):238-244
- 6 Jaffe HA, Gao ZC, Mori Y, *et al.* Selective inhibition of collagen gene expression in fibroblasts by an interferon γ transgene[J]. Experimental Lung Research, 1999,25(3):199-215
- 7 Garg R, Gupta SK, Tripathi P, *et al.* Leishmania donovani: identification of stimulatory soluble antigenic proteins using cured human and hamster lymphocytes for their prophylactic potential against visceral leishmaniasis[J]. Vaccine,2006,24(2):2900-2909
- 8 Kopf M, Le Gros G, Bachmann M, *et al.* Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses[J]. Nature,1993,362:245-248
- 9 Kuhn R, Rajewsky K, Muller W. Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice[J]. Science,1991,254:707-710
- 10 Brusselle G, Kips J, Joos G, *et al.* Allergen induced airway inflammation and bronchial responsiveness in wildtype and interleukin-4 deficient mice[J]. Am J Respir Cell Mol Biol,1995,12(4):254-259
- 11 Maher FO, Nolan Y, Lynch MA. Downregulation of IL-4-induced signalling in hippocampus contributes to deficits in LTP in the aged rat [J]. Neurobiology of Aging,2005,26(1):717-728
- 12 Cox F, Liew FY. T-cell subsets and cytokines in parasitic infections [J]. Immunology Today,1992,13:445-448
- 13 Liesz A, Suri - Payer E, Veltkamp C, *et al.* Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke[J]. nature medicine,2009,15:192-199
- 14 Campbell DJ, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FOXP3⁺ regulatory T cells[J]. Nature Reviews Immunology,2011,11:119-130

(收稿:2012-02-05)

(修回:2012-03-09)