

脑外伤大鼠血中 CD4⁺ T 细胞变化及相关机制探讨

屈晓东 荔志云 田立桩 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 细胞的变化情况,并尝试从凋亡的角度探讨 CD4⁺ T 细胞变化的原因。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,通过流式细胞术检查血中 CD4⁺ T 细胞的数量和代表两条经典凋亡途径上的两个关键酶 caspase - 8 和 caspase - 9,尝试从凋亡的角度解释 CD4⁺ T 细胞数量的变化原因。结果 从颅脑外伤后第 1 天,大鼠外周血中 CD4⁺ T 细胞数量与对照组相比较明显减少 ($P < 0.05$),而颅脑外伤后第 3 天 CD4⁺ T 细胞数量明显恢复,尽管仍低于对照组,但无统计学意义。CD4⁺ T 细胞内的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 - 8 (caspase - 8) 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 - 9 (caspase - 9) 分别是两条经典的细胞凋亡途径上的关键蛋白酶,都从颅脑外伤后第 1 天开始与对照组相比显著下降且有统计学意义 ($P < 0.05$),直至颅脑外伤后第 10 天 caspase - 8 和 caspase - 9 依然较对照组低 ($P < 0.05$)。结论 颅脑外伤后存在免疫抑制,与 CD4⁺ T 细胞的数量减少有关。颅脑外伤后外周血中 CD4⁺ T 细胞数量减少可能不是通过经典的细胞凋亡途径进行的。

关键词 脑外伤 免疫抑制 流式细胞术 凋亡

Change of CD4⁺ T Cell in Peripheral Blood after TBI and Relevant Mechanism Exploration. Qu Xiaodong, Li Zhiyun, Tian Lizhuang, Wang Maode. Deptment of Neurosurgery, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Command, Gansu 730050, China

Abstract Objective To study the changes in CD4⁺ T cells in the peripheral blood 1, 3, 5, 10 days after traumatic brain injuries in the SD rats and try to explore the reasons for CD4⁺ T cells change from the perspective of apoptosis. **Methods** Feeney's free - fall method was used to produce the epidural impact resulting in the animal model of traumatic brain injury. Rat's blood from heart were drawn in the corresponding time duration and the number of CD4⁺ T cells were checked by flow cytometry. Similarly, the the two key enzymes in the classical apoptotic pathway of caspase - 8 and caspase - 9, i. e. cysteine aspartyl protease - 8 and cysteine aspartyl protease - 9 were also examined to explain the reasons for the changes in the number of CD4⁺ T cells from the perspective of apoptosis. **Results** The CD4⁺ T cell numbers in the peripheral blood from 1 day after traumatic brain injury in rats were significantly reduced ($P < 0.05$) compared with the control group. From three days after traumatic brain injury, CD4⁺ T cell count was significantly restored. However it was still lower than the control group, but not statistically significant. CD4⁺ T cells within the cysteine aspartyl protease - 8 (caspase - 8) and cysteine aspartyl protease - 9 (caspase - 9) were two key proteases of classic apoptotic pathway which started from 1 day after traumatic brain injury and they were decreased significantly compared with the control group ($P < 0.05$). These enzymes remained relatively low until 10 days after traumatic brain injury ($P < 0.05$). **Conclusion** There exists immunosuppression as depicted by the decrease in the number of CD4⁺ T cells after traumatic brain injury. However this decrease in the CD4⁺ T cells in the peripheral blood may not be carried out by the classical apoptotic pathway.

Key words TBI; Immunosuppression; Flow cytometry; Apoptosis

颅脑外伤 (TBI) 后患者在急性期常伴有机体免疫功能指标的变化,使患者机体免疫系统和大脑之间的正常平衡破坏,从而导致机体发生继发免疫损害,容易导致感染^[1-3]。颅脑外伤 (TBI) 后机体的体液免疫和细胞免疫均有影响,但细胞免疫在颅脑外伤后受损更严重,反映脑外伤后机体细胞免疫功能变化指

标主要有淋巴 T 细胞亚群 (CD3、CD4、CD8)^[1,3]。颅脑外伤后导致的继发感染不仅导致患者的预后不良,也增加了患者的医疗花费和经济负担,增加了社会医疗资源的支出。所以降低颅脑损伤 (TBI) 患者的感染并发症对于改善患者预后,节省医疗开支具有非常重要的意义。因此,了解脑损伤后机体的免疫变化规律及免疫抑制机制,可以帮助我们预防和治疗颅脑外伤后感染并发症,并进一步为寻找新的治疗靶点提供理论依据。我们拟通过动物实验了解颅脑外伤后大鼠外周血中 CD4⁺ T 淋巴细胞的变化,并探讨其变化

作者单位:730050 兰州军区兰州总医院神经外科 (屈晓东、荔志云、田立桩);710061 西安交通大学医学院第一附属医院 (王茂德)

通讯作者:王茂德,教授,博士生导师,电子信箱:maodewang@163.com

的可能机制。

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法将脑外伤大鼠(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。对照组总共用 24 只大鼠,实验组动物造模总共用大鼠 32 只,死亡 2 只,存活 30 只,动物造模成功率为 93.8%

2. 仪器与试剂:FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司);试剂:免疫荧光单克隆抗体 CD3/CD4(美国 Biolegend 公司);caspase-8 抗体(Abcam 公司);caspase-9 抗体(Abcam 公司)。

3. CD4⁺T 细胞的检测: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 100μl,分别加入 FITC anti-rat CD3/APC anti-rat CD4 和同型对照各 20μl 双色标记单抗试剂,混匀后室温避光 20min,加红细胞裂解液 1.5ml 静置 10min,然后 2000r/min 离心 5min,弃上清,加细胞清洗 Buffer1.5ml,2000r/min 离心 5min,然后加 1ml PBS 液重悬细胞,上机检测分析。

4. CD4⁺T 细胞中 caspase-8 的检测:各试管中加入抗凝全血 100μl,分别加入 FITC anti-rat CD3/APC anti-rat CD4 和同型对照各 20μl 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 caspase-8 抗体(abcam 公司),混匀,放置 20min,加 1ml PBS

液清洗,2000r/min 离心 5min,加二抗 5μl,静置 20min,然后加 1ml PBS 液重悬细胞,上机检测分析。

5. CD4⁺T 细胞中 caspase-9 的检测:各试管中加入抗凝全血 100μl,分别加入 FITC anti-rat CD3/APC anti-rat CD4 和同型对照各 20μl 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 caspase-9 抗体(abcam 公司),混匀,放置 20min,加 1ml PBS 液清洗,2000r/min 离心 5min,加二抗 5μl,静置 20min,然后加 1ml PBS 液重悬细胞,上机检测分析。以上各指标的测定按试剂盒说明书操作。

6. 统计学方法:观察指标值采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)来表示,用 SPSS 13.0 统计软件对以上数据进行统计学分析。由于关注的是不同时间点的实验组与相应的对照组的差异,所以每个时间点都采用 *t* 检验与对照组进行比较,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 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。

2. 大鼠外周血中 CD4⁺T 细胞动态变化:结果显示,颅脑外伤后大鼠外周血中 CD4⁺T 细胞在颅脑外伤后第 1 天较对照组随即降低,差异有统计学意义(*P* < 0.05),伤后第 3、5、10 天虽然仍然较对照组低,但无统计学差异(*P* > 0.05,图 1、表 1)。

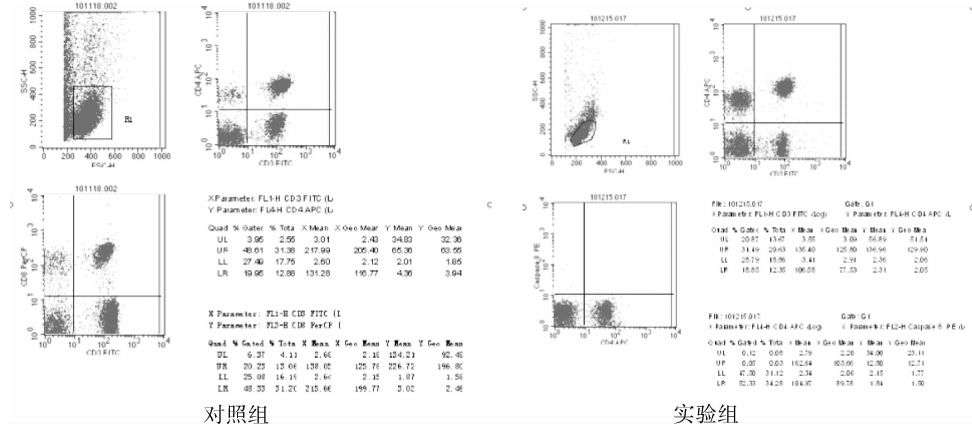


图 1 流式细胞术检测大鼠外周血中 CD4⁺T 细胞

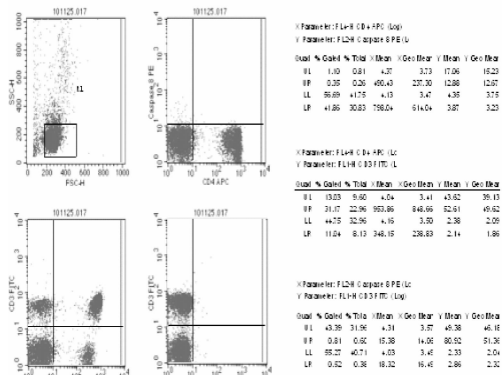
表 1 CD4⁺T 细胞的测定结果

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	33.76 ± 13.48	33.98 ± 12.34	31.98 ± 14.12	31.81 ± 13.59
实验组	6.76 ± 11.44 *	33.75 ± 8.15	31.12 ± 3.07	29.78 ± 5.22

与对照组比较, * *P* < 0.05

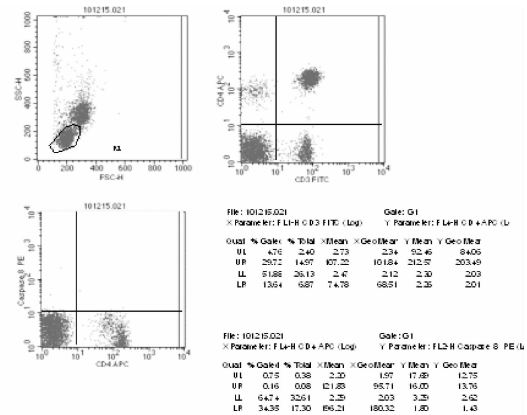
2. 大鼠外周血中 CD4⁺T 细胞内 caspase-8 的测定结果:结果显示,从颅脑外伤后第 1 天开始 CD4⁺T 细胞内 caspase-8 的值与对照组相比显著下降且有统计学意义(*P* < 0.05),直至颅脑外伤后

第 10 天 caspase - 8 依然较对照组低 ($P < 0.05$, 图



对照组

2、表 2)。



实验组

图 2 流式细胞术检测大鼠外周血中 CD4⁺T 细胞内 caspase - 8

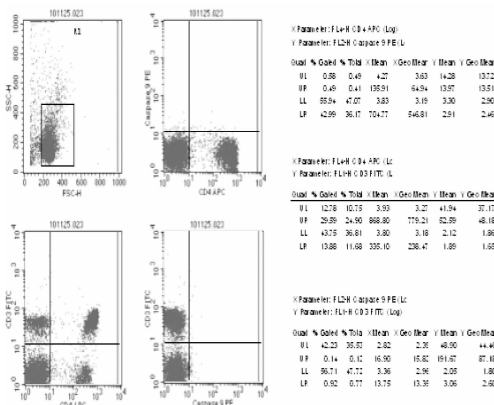
表 2 CD4⁺细胞内 caspase - 8 的值

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	25.43 ± 25.75	24.93 ± 20.47	23.83 ± 19.87	24.39 ± 21.25
实验组	0.12 ± 0.05 *	0.91 ± 1.09 *	0.36 ± 0.68 *	3.76 ± 1.12 *

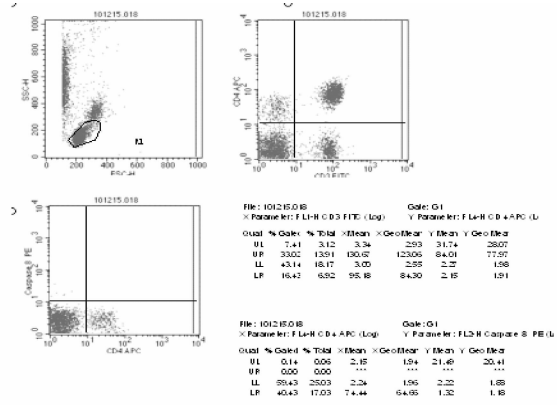
与对照组比较, * $P < 0.05$

3. 大鼠外周血中 CD4⁺T 细胞内 caspase - 9 测定

结果:结果显示,从颅脑外伤后第 1 天开始 CD4⁺T 细胞内 caspase - 9 的值与对照组相比显著下降且有统计学意义 ($P < 0.05$),直至颅脑外伤后第 10 天 caspase - 9 依然较对照组低 ($P < 0.05$, 图 3、表 3)。



对照组



实验组

图 3 流式细胞术检测大鼠外周血中 CD4⁺T 细胞内 caspase - 9

表 3 CD4⁺细胞内 caspase - 9 的值

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	9.00 ± 4.26	8.93 ± 4.13	8.81 ± 3.95	8.88 ± 3.48
TBI 组	0.09 ± 0.06 *	1.18 ± 0.67 *	0.82 ± 0.44 *	1.42 ± 0.75 *

与对照组比较, * $P < 0.05$

综上所述,从颅脑外伤后第 1 天,大鼠外周血中 CD4⁺T 细胞数量与对照组相比较明显减少,且有统计学意义 ($P < 0.05$)。而颅脑外伤后第 3 天 CD4⁺T 细胞数量明显恢复,尽管仍低于对照组,但无统计学意义。CD4⁺T 细胞内的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 -

8 (caspase - 8) 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 - 9 (caspase - 9) 分别是两条经典的细胞凋亡途径上的关键蛋白酶,都从颅脑外伤后第 1 天开始与对照组相比显著下降且有统计学意义 ($P < 0.05$),直至颅脑外伤后第 10 天 caspase - 8 和 caspase - 9 依然较对照组低 ($P < 0.05$)。

讨 论

有研究表明,颅脑外伤 (TBI) 会导致患者机体免疫系统受损,存在免疫抑制,因而颅脑外伤患者容易发生感染,而增加患者的病死率^[4]。重型颅脑损伤

后患者发生免疫状态改变后,在急性期患者发生继发性感染率达到 70% 以上,并且单纯抗感染疗效差,病死率极高,约占治疗后期病死率 1/2 以上。颅脑外伤本身就是一个独立的危险因素,使患者感染的易感性明显增加^[3]。免疫反应是人体生理反应的一个环节,它受控于机体神经系统和内分泌系统的调节,神经系统的变化必然会影响到人体的免疫功能^[5]。CD4⁺T 细胞能促进 B 细胞、T 细胞和其他免疫细胞的增殖与分化,协调免疫细胞间的相互作用。T 细胞在静止状态不产生细胞因子,活化后才能产生。本实验结果表明,颅脑外伤后大鼠外周血中 CD4⁺T 细胞在颅脑外伤后第 1 天较对照组随即降低,且有统计学意义($P < 0.05$),这与其他研究结果一致。于伤后 3、7 天,直至伤后第 10 天外伤组大鼠外周血中的 CD4⁺T 细胞仍低于对照组,但无统计学意义。因此,颅脑外伤后存在免疫抑制,与 CD4⁺T 细胞的数量减少有关。还有研究表明,颅脑外伤后导致 CD4⁺T 细胞数量减少,而且淋巴细胞的功能也发生障碍,使吞噬细胞的活化受抑制,影响机体抗细菌、病毒、真菌及寄生虫侵袭的能力,导致感染机会增加。

凋亡(apoptosis)是细胞程序性死亡(PCD),发生在多细胞生物。现有两种理论揭示了在哺乳动物直接启动凋亡机制:肿瘤坏死因子介导的细胞凋亡理论和 Fas-FasL 介导的细胞凋亡理论,两者均与肿瘤坏死因子受体家族结合,作为外在激活信号。细胞的凋亡由 caspases 的激活来介导,可分为线粒体依赖型的和非依赖型。caspase 在凋亡信号转导中发挥着核心作用,caspase-8 和 caspase-9 是两条经典细胞凋亡途径上的关键酶,caspase-3 通常以无活性的酶原形式存在于细胞中,经两条不同的途径分别由 caspase-9 或 caspase-8 激活,最终引起细胞凋亡^[6-10]。我们通过应用流式细胞法测定 CD4⁺T 细胞内的 caspase-8 和 caspase-9 的量来观察 CD4⁺T 细胞是否发生凋亡。

本研究我们检测了 CD4⁺T 细胞内的 caspase-8 和 caspase-9 代表两条凋亡途径的关键酶。发现从颅脑外伤后第 1 天 CD4⁺T 细胞内的 caspase-8 和 caspase-9 就进行性下降,并且有统计学意义($P < 0.05$),表明颅脑外伤后外周血中 CD4⁺T 细胞数量减少可能不是通过经典的细胞凋亡途径进行的。CD4⁺T 细胞内的 caspase-8 和 caspase-9 进行性下降这可能是机体的一种代偿机制,通过抑制细胞凋亡来用以维持 CD4⁺T 细胞的数量。因此我们认为颅

脑外伤后外周血中 CD4⁺T 细胞数量减少,可能是 CD4⁺来源减少或分布异常所致。也可能是神经系统损伤后通过“硬线”通路(hardwired neural pathways)直接影响机体免疫系统,神经系统通过神经纤维与免疫系统直接联系被称之为“硬线”神经免疫网络^[11,12]。

在这项研究中,我们没有观察 CD4⁺T 的减少程度与颅脑外伤的严重程度之间的关系。但有研究表明,他们之间存在着正相关关系。颅脑外伤后外周血中淋巴细胞的异常分布和 CD4⁺T 细胞的功能改变以及脑外伤后抑制 CD4⁺T 细胞凋亡的机制将是我们下一步拟解决的问题。本研究进一步揭示了颅脑外伤后 3 天内机体处于免疫抑制状态,这为临床上在颅脑外伤后急性期及时应用抗生素来预防感染和颅脑外伤后的免疫调节治疗提供了理论依据。

参考文献

- 1 李卫,姜晓丹,徐如祥. 颅脑损伤后免疫状态的改变[J]. 中华神经医学杂志,2005,4(3):18-20
- 2 彭远强,梁镒添,曾胜田,等. 重型颅脑损伤后患者免疫功能的变化及意义[J]. 首都医药,2007,14(7):37-38
- 3 Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, *et al.* Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat[J]. Brain Res, 1981,211: 67
- 4 Mazzeo AT. Severe human traumatic brain injury, but not cyclosporin A treatment, depresses activated T lymphocytes early after injury[J]. Neurotrauma,2006,23: 962-975
- 5 龚非力. 医学免疫学[M]. 北京:科学出版社,2000:6
- 6 彭林涛,许欣. Fas,bcl-2 和 caspase8 在去甲斑蝥素诱导食管癌细胞凋亡中的作用及机制[J]. 肿瘤防治研究,2010,37(4):398-401
- 7 俞鸣,贾真琳,王宝亭,等. NF- κ B 与 caspase-9 在大豆异黄酮诱导人乳腺癌细胞凋亡中的作用[J]. 中国慢性病预防与控制,2010,18(3):270-271
- 8 徐丽丽,高世勇,季宇彬. 细胞凋亡相关蛋白的研究进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2008,29(11):1361-1363
- 9 Tomberly NA, Lazebnik Y. Caspases: Enemies within[J]. Science, 2005(281):1312-1316
- 10 Tsujimoto Y, Finger LR, YunisJ, *et al.* Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the chromosome translocation[J]. Science. 2004(226):1097-1099
- 11 Downing JE, Miyan JA. Neural immunoregulation: emerging roles for nerves in immune homeostasis and disease [J]. Immunol Today, 2000,21(6):281-289
- 12 Zablocka A. Cooperation between the immune and nervous systems [J]. Postepy Hig Med Dosw,2001,55(1):102-108

(收稿:2012-04-09)

(修回:2012-04-23)