

活性与 TFF3 表达同时增强, 提示肠黏膜免疫炎症反应存在促炎与抗炎的平衡。

总之, TNBS 诱发的大鼠结肠炎肠黏膜有 TFF3 基因的表达, 提示 TFF3 在结肠炎黏膜损伤修复中发挥作用。

4 参考文献

- Emami S, Le Floch N, Bruyneel E, Thim L, May F, Westley B, Rio M, Mareel M, Gispach C. Induction of scattering and cellular invasion by trefoil peptides in src-and RhoA-transformed kidney and colonic epithelial cells. *FASEB J* 2001;15:351-361
- Gouyer V, Wiede A, Buisine MP, Dekeyser S, Moreau O, Lesuffleur T, Hoffmann W, Huet G. Specific secretion of gel-forming mucins and TFF peptides in HT-29 cells of mucin-secreting phenotype. *Biochim Biophys Acta* 2001;1539:71-84
- Hahm KB, Im YH, Parks TW, Park SH, Markowitz S, Jung HY, Green J, Kim SJ. Loss of transforming growth factor beta signaling in the intestine contributes to tissue injury in inflammatory bowel disease. *Gut* 2001;49:190-198
- Taupin D, Pedersen J, Familiari M, Cook G, Yeomans N, Giraud AS. Augmented intestinal trefoil factor(TFF3) and loss of pS2 (TFF1) expression precedes metaplastic differentiation of gastric epithelium. *Lab Invest* 2001;81:397-408
- Cook GA, Familiari M, Thim L, Giraud AS. The trefoil peptides TFF2 and TFF3 are expressed in rat lymphoid tissues and participate in the immune response. *FEBS Lett* 1999;456:155-159
- Moro F, Levenez F, Durual S, Plaisancie P, Thim L, Giraud AS, Cuber J. Secretion of the trefoil factor TFF3 from the isolated vascularly perfused rat colon. *Regul Pept* 2001;101:35-41
- Lin J, Nadroo AM, Chen W, Holzman AR, Fan QX, Babyatsky MW. Ontogeny and prenatal expression of trefoil factor 3/ITF in the human intestine. *Early Hum Dev* 2003;71:103-109
- Shirazi T, Longman RJ, Corfield AP, Probert CS. Mucins and inflammatory bowel disease. *Postgrad Med J* 2000;76:473-478
- Xia B, Han H, Zhang KJ, Li J, Guo GS, Gong LL, Zeng XC, Liu JY. Effects of low molecular weight heparin on platelet surface P-selectin expression and serum interleukin-8 production in rats with trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis. *World J Gastroenterol* 2004;10:729-732
- Porter SN, Howarth GS, Butler RN. An orally administered growth factor extract derived from bovine whey suppresses breath ethane in colitic rats. *Scand J Gastroenterol* 1998;33:967-974
- Bobin-Dubigeon C, Collin X, Grimaud N, Robert JM, Le Baut G, Petit JY. Effects of tumor necrosis factor-alpha synthesis inhibitors on rat trinitrobenzene sulphonic acid-induced chronic colitis. *Eur J Pharmacol* 2001;431:103-110
- Fabia R, Ar'Rajab A, Johansson ML, Willen R, Andersson R, Molin G, Bengmark S. The effect of exogenous administration of *Lactobacillus reuteri* R2LC and oat fiber on acetic acid-induced colitis in the rat. *Scand J Gastroenterol* 1993;28:155-162
- Grisham MB, Volkmer C, Tso P, Yamada T. Metabolism of trinitrobenzene sulfonic acid by the rat colon produce reactive oxygen species. *Gastroenterology* 1991;101:540-547
- Yu K, Jiang SF, Lin MF, Wu JB, Lin J. Extraction and purification of biologically active intestinal trefoil factor from human meconium. *Lab Invest* 2004;84:390-392
- Blanchard C, Durual S, Estienne M, Bouzakri K, Heim MH, Blin N, Cuber JC. IL-4 and IL-13 up-regulate intestinal trefoil factor expression: requirement for STAT6 and de novo protein synthesis. *J Immunol* 2004;172:3775-3783
- Loncar MB, Al-azze ED, Sommer PS, Marinovic M, Schmehl K, Kruschewski M, Blin N, Stohwasser R, Gott P, Kayademir T. Tumour necrosis factor alpha and nuclear factor kappa B inhibit transcription of human TFF3 encoding a gastrointestinal healing peptide. *Gut* 2003;52:1297-1303
- Tran CP, Cook GA, Yeomans ND, Thim L, Giraud AS. Trefoil peptide TFF2 (spasmolytic polypeptide) potently accelerates healing and reduces inflammation in a rat model of colitis. *Gut* 1999;44:636-642

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

大鼠重症急性胰腺炎时免疫机制及 TAI 的影响

姚玮艳, 诸琦, 袁耀宗, 乔敏敏, 章永平, 翟祖康, 姚季生, 程琳琳, 沈天伟

姚玮艳, 诸琦, 袁耀宗, 乔敏敏, 章永平, 翟祖康, 上海第二医科大学附属瑞金医院消化科 上海市 200025
 姚季生, 上海第二医科大学病理教研室 上海市 200025
 程琳琳, 沈天伟, 上海第二医科大学免疫教研室 上海市 200025
 上海市自然科学基金资助, No. 01ZB14026
 项目负责人: 诸琦, 200025, 上海市瑞金二路 197 号, 上海第二医科大学附属瑞金医院消化科. zhuqi@medmail.com.cn
 电话: 021-64370045 传真: 021-64150773
 收稿日期: 2004-06-16 接受日期: 2004-07-22

摘要

目的: 研究重症急性胰腺炎(SAP)时细胞免疫功能的变化并通过给予外源性胸腺素 α_1 (TA1), 观察能否减轻SAP的严重程度并初步探讨其作用机制。

方法: δ SD 大鼠 54 只随机分为对照组、SAP 组和 TA1 治

疗组。SAP 模型采用 50 g/L 牛黄胆酸钠 1 mL/kg 胰胆管逆行穿刺注射建立, 治疗组造模成功后立即皮下注射 TA1 (100 μ g/kg), 对照组仅给予开腹手术。三组大鼠分别在造模后 3, 6, 12 h 处死, 收集外周血与胰腺标本。观察 TA1 对血清淀粉酶、TNF- α 及胰腺组织炎症评分的影响; 同时应用流式细胞术观察外周血 CD3, CD4+, CD8+T 细胞的变化。

结果: SAP 组与治疗组各时间点血清淀粉酶、TNF- α 水平及胰腺组织炎症评分均显著高于对照组 ($P < 0.01$); 12 h 治疗组与 SAP 组相比, TNF- α 水平明显下降, 胰腺组织炎症评分显著改善 ($P < 0.01$)。SAP 组 3, 6 h 外周血 CD3, CD4+T 细胞百分率较对照组明显升高 ($P < 0.01$); 但在 12 h

则明显低于对照组($P < 0.01$); 治疗组 3 h 外周血 CD3, CD4+T 细胞百分率较对照组明显升高($P < 0.01$), 但 6, 12 h 与对照组没有明显的差异。

结论: SAP 时存在细胞免疫功能的低下, 外源性 TA1 可能通过调节 CD3, CD4T 细胞分化从而减轻胰腺炎症。

姚玮艳, 诸琦, 袁耀宗, 乔敏敏, 章永平, 翟祖康, 姚季生, 程琳琳, 沈天伟. 大鼠重症急性胰腺炎时免疫机制及 TA1 的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(9): 2214-2216

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2214.asp>

0 引言

近年研究提示重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)胰腺细胞内的变化乃至胰腺外全身炎症反应可能与免疫机制功能紊乱相关, 主要表现为细胞免疫功能的抑制^[1-3]. 我们观察SAP病程中CD3/CD4+/CD8+T细胞的变化; 并尝试应用免疫功能增强剂 TA1 治疗大鼠SAP, 观察其对SAP的疗效及对宿主CD3/CD4+/CD8+T细胞的影响, 为今后临床可能应用TA1作为免疫干预治疗SAP提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ SD 大鼠(中国科学院上海实验动物中心提供)54只, 体质量230-250g, 随机分为3组: (1)对照组18只, 仅给予开腹手术; (2)SAP组18只, 采用50g/L牛黄胆酸钠(Sigma公司)1mL/kg胰胆管逆行穿刺注射方法建立; (3)TA1治疗组18只, 造SAP模型成功后, 立即给予TA1 100μg/kg sc, TA1为SciClone公司惠赠. 模型建立后3, 6, 12h处死动物各6只, 腹主动脉取血, 一部分抗凝分离PBMC, 另一部分非抗凝取血清; 胰腺组织标本, 一部分置于液氮中保存, 另一部分经中性甲醛固定。

1.2 方法 TNF-α的测定采用Biosource公司ELISA试剂盒, 按说明操作后, 在450nm测定吸光度A值, 以空白管调零, 以标准品500, 250, 62, 31, 16,

0 ng/L的A值在半对数纸上作出标准曲线, 根据标准曲线算出样品值. 血清淀粉酶的测定采用上海瑞金医院检验科全自动生化分析仪检测. 流式细胞术检测CD3/CD4+/CD8+T细胞比例, 溶血素为BD公司产品, 大鼠CD3/CD4+/CD8+抗体为BD公司产品. 病理学检查采用石蜡切片HE染色观察胰腺病理学变化, 病理组织学炎症评分参照文献[4]Schmidt方法, 由两位病理学者采用双盲法评定。

统计学处理 采用SAS统计分析软件处理实验数据, 采用一般线性模型对完全随机化设计资料进行方差分析和均数间两两比较, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 重症急性胰腺炎模型的确立 SAP组的血清淀粉酶以及血清TNF-α较对照组显著增高($P < 0.01$). HE病理显示对照组无明显病理学改变, 胰腺组织无炎细胞浸润; SAP组大鼠胰腺组织大片出血坏死, 小叶结构破坏, 有大量炎细胞浸润, 其中主要为中性粒细胞及单核细胞, 残余的细胞肿胀明显. SAP组造模后血清淀粉酶增高、血清TNF-α增高同时腺组织病理组织学评分升高表明重症胰腺炎模型的确立. 治疗组大鼠胰腺组织病理组织学评分在6, 12h较SAP组明显降低(分别为 $P < 0.05$, $P < 0.01$, 表1)。

2.2 CD3/CD4+/CD8+T细胞的变化 3, 6hSAP组外周血CD3, CD4+T细胞百分率较对照组显著升高($P < 0.01$); 但在12h则明显低于对照组($P < 0.01$), 说明SAP早期(12h)即表现出细胞免疫功能的下降. 虽然3hTA1治疗组外周血CD3, CD4+T细胞百分率较对照组明显升高($P < 0.01$), 但在6, 12h与对照组没有明显的差异; 此外6hTA1治疗组外周血CD8+T细胞百分率较对照组明显下降($P < 0.05$), 12h却明显升高($P < 0.05$), 说明给予外源性免疫干预在SAP早期(12h)即呈现上调细胞免疫功能的作用. SAP组外周血CD8+T细胞百分率没有明显的变化(表1)。

表1 血清淀粉酶、TNF-α, CD3/CD4+/CD8+和胰腺病理(mean±SD, n=6)

造模后/h		淀粉酶(nkat/L)	TNF-α(ng/L)	病理学评分	CD3(%)	CD4(%)	CD8(%)	CD4/CD8
3	对照	12 099.6 ± 1116.2 ^b	20 ± 22 ^b	0.0 ^b	54.4 ± 4.5	36.5 ± 3.3	17.5 ± 1.7	2.1 ± 0.1
	SAP	55 344.4 ± 12964.3	598 ± 142	9.7 ± 0.6	77.0 ± 3.2 ^d	65.1 ± 5.4 ^d	16.1 ± 2.0	4.1 ± 0.5 ^e
	TA1	62 900.9 ± 9681.9	676 ± 97	8.7 ± 0.9 ^b	70.4 ± 5.8 ^d	51.6 ± 5.5 ^d	15.9 ± 4.5	3.6 ± 1.8 ^e
6	对照	15 586.5 ± 555.1 ^b	33 ± 12 ^b	0.00 ^b	53.8 ± 3.7	37.3 ± 4.5	16.2 ± 1.7	2.3 ± 0.4
	SAP	184 315.2 ± 55827.8	304 ± 36	12.5 ± 1.1	67.6 ± 2.3 ^d	49.0 ± 3.5 ^d	18.2 ± 3.5	2.8 ± 0.7
	TA1	155 781.2 ± 18702.1	289 ± 64	10.7 ± 1.0 ^b	50.1 ± 6.9	36.6 ± 4.5	13.3 ± 1.9 ^e	2.8 ± 0.2
12	对照	17 370.1 ± 676.8 ^b	21 ± 13 ^b	0.00 ^b	57.6 ± 2.7	38.8 ± 3.0	17.8 ± 2.0	2.2 ± 0.3
	SAP	10 9772.0 ± 6189.6	151 ± 20	13.8 ± 1.2	40.8 ± 8.9 ^d	27.4 ± 6.4	13.6 ± 2.6	2.0 ± 0.3
	TA1	111 188.9 ± 13789.4	99 ± 15 ^b	11.8 ± 1.2 ^b	63.6 ± 4.8	44.0 ± 4.2	19.1 ± 3.8 ^e	2.4 ± 0.6

^b $P < 0.01$ vs SAP组, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 对照组。

3 讨论

近年研究发现^[1-3],重症急性胰腺炎胰腺细胞内的变化乃至胰腺外全身炎症反应可能与免疫机制功能紊乱相关,主要表现为细胞免疫功能的抑制,故其病理生理过程中免疫机制的重要性日益受到关注.已证实^[5-8]TA1在一些炎症、自身免疫疾病治疗中具有疗效,如:TA1在病毒性肝炎的免疫调节治疗中有促进T细胞成熟,提高亲和力受体数目等生物反应调节作用^[9-11].我们探索TA1在SAP病程中是否具有同样增强细胞免疫,改善炎症病变程度以至减轻SAP的效应.TA1是由乙酰化28个氨基酸构成的,是具有免疫调节活性的多肽激素,主要影响人体免疫系统中的T细胞功能.TA1具有抗衰老、抗肿瘤、抗感染、辅助治疗自身免疫疾病、艾滋病以及调节神经内分泌系统等作用^[5-7],目前临床上应用已日益广泛.Garaci *et al*^[8]研究认为在肿瘤的化疗过程中联合应用TA1能够通过促进T细胞成熟分化为效应CD4+/CD8+T细胞,从而显著提高化疗的疗效,同时能够减轻化疗药物的毒副作用.Shrivastava *et al*^[12]研究发现TA1可激活巨噬细胞,使其具有杀瘤活性.Chadwick *et al*^[13]一项二期临床研究发现TA1可加强HIV感染患者的信号连接T细胞受体基因重组环的重构,但其临床长远效应尚需继续观察.本研究发现,TA1治疗组TNF- α 水平3, 6, 12 h与对照组相比均显著增高($P < 0.01$),但其12 h TNF- α 水平较SAP组降低并具有统计学意义($P < 0.05$).TA1治疗组大鼠胰腺组织病理组织学评分在6, 12 h较SAP明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$).研究结果从生物化学、形态学的角度表明,外源给予适当剂量的TA1可以减轻大鼠的重症急性胰腺炎,包括TNF- α 下降,胰腺的组织学炎症评分降低,说明TA1可减轻SAP的病变严重程度.

Krivoruchko *et al*^[14]研究57例SAP患者时发现合并胰腺感染坏死的51.2%具有HLA-DR2阳性淋巴细胞而且T细胞活性抑制非常显著,中性粒细胞活性低下.Uehara *et al*^[15]研究发现在急性胰腺炎早期CD4+, CD8+T细胞计数明显减少;CD4+辅助T细胞可能参与诱导巨噬细胞活化而引起早期炎症反应,同时通过FAS/FASL发挥其细胞毒作用.我们发现,3, 6 h SAP组外周血CD3, CD4T细胞百分率较对照组明显升高;12 h则显著低于对照组.虽然TA1治疗组3 h外周血CD3, CD4+T细胞百分率较对照组明显升高,但在6, 12 h与对照组没有明显的差异,而且在6 h外周血CD8+T细胞百分率较对照组明显下降($P < 0.05$),12 h则明显升高($P < 0.05$).表明SAP时存在细胞免疫功能的变化,这种变化表现为CD3, CD4+T细胞, CD4+/CD8+比值先增高后降低,本研究的动态观察发现SAP早期(3,

6 h)机体出现免疫功能调节而12 h则表现细胞免疫功能的下降;TA1在SAP早期(6, 12 h)表现出对SAP的细胞免疫具有上调作用.综上所述,TA1可能通过调节细胞免疫功能减轻大鼠重症急性胰腺炎.然而,由于TA1是一种多功能的胸腺激素,他可能在多个环节影响急性胰腺炎的发生、发展,其分子生物学机制尚需进一步深入研究.

4 参考文献

- Bhatnagar A, Wig JD, Majumdar S. Immunological findings in acute and chronic pancreatitis. *ANZ J Surg* 2003;73:59-64
- Pavlov P, Uchikov P, Murdzheva M, Tuleva S, Tsvetkova T. Main lymphocyte populations and their subpopulations in patients with acute pancreatitis studied in the course of disease. *Khirurgiia (Sofia)* 2001;57:4-11
- Kylanpaa-Back ML, Takala A, Kempainen E, Puolakkainen P, Kautiainen H, Jansson SE, Haapiainen R, Repo H. Cellular markers of systemic inflammation and immune suppression in patients with organ failure due to severe acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:1100-1107
- Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Mandavilli U, Knoefel WT, Warshaw AL. A better model of acute Pancreatitis for evaluating therapy. *Ann Surg* 1992; 215:44-56
- Billich A. Thymosin alpha1. SciClone pharmaceuticals. *Curr Opin Investig Drugs* 2002;3:698-707
- Ancell CD, Phipps J, Young L. Thymosin alpha-1. *Am J Health Syst Pharm* 2001;58:879-885
- Ohmori H, Kamo M, Yamakoshi K, Nitta MH, Hikida M, Kanayama N. Restoration of immunocyte functions by thymosin alpha1 in cyclophosphamide-induced immunodeficient mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2001;23:75-82
- Garaci E, Pica F, Sinibaldi-Vallebona P, Pierimarchi P, Mastino A, Matteucci C, Rasi G. Thymosin alpha(1) in combination with cytokines and chemotherapy for the treatment of cancer. *Int Immunopharmacol* 2003;3:1145-1150
- Hugle T, Cerny A. Current therapy and new molecular approaches to antiviral treatment and prevention of hepatitis C. *Rev Med Virol* 2003;13:361-371
- Andreone P, Gramenzi A, Cursaro C, Felling F, Loggi E, D'Errico A, Spinosa M, Lorenzini S, Biselli M, Bernardi M. Thymosin-alpha 1 plus interferon-alpha for naive patients with chronic hepatitis C: results of a randomized controlled pilot trial. *J Viral Hepat* 2004;11:69-73
- Arase Y, Tsubota A, Suzuki Y, Suzuki F, Kobayashi M, Someya T, Akuta N, Hosaka T, Saitoh S, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H. A pilot study of thymosin alpha1 therapy for chronic hepatitis B patients. *Intern Med* 2003;42:941-946
- Shrivastava P, Singh SM, Singh N. Activation of tumor-associated macrophages by thymosin alpha 1. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2004;17:39-47
- Chadwick D, Pido-Lopez J, Pires A, Imami N, Gotch F, Villacian JS, Ravindran S, Paton NI. A pilot study of the safety and efficacy of thymosin alpha 1 in augmenting immune reconstitution in HIV-infected patients with low CD4 counts taking highly active antiretroviral therapy. *Clin Exp Immunol* 2003;134:477-481
- Krivoruchko IA, Boiko VV, Pesotskii ON, Shevchenko RS, Klimova EM, Drozdova LA. The role of immune disorders in formation of local and systemic complications of severe acute pancreatitis. *Klin Khir* 2003;2:20-24
- Uehara S, Gothoh K, Handa H, Tomita H, Tomita Y. Immune function in patients with acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:363-370