

• 临床研究 •

# 卡巴胆碱对脂多糖刺激后人血单核细胞和淋巴细胞免疫功能的影响

于燕 邹曰坤 胡森 杨红明 柴家科 周国勇 盛志勇

**【摘要】** 目的 探讨拟胆碱药物卡巴胆碱对脂多糖(LPS)刺激后单核细胞人类白细胞组织相容性抗原-DR(HLA-DR)表达率及淋巴细胞凋亡率的影响。方法 分离、培养正常人外周血单核细胞和淋巴细胞,对照组仅加1640培养液,LPS组加LPS刺激,LPS+卡巴胆碱组先用不同浓度卡巴胆碱(100、10、1、0.1、0.01 $\mu$ mol/L)预处理细胞后,再加入LPS(100 $\mu$ g/L)刺激,培养12h后用流式细胞术检测CD14<sup>+</sup>单核细胞HLA-DR表达率和外周血淋巴细胞凋亡率。结果 LPS单独刺激单核细胞时,其HLA-DR表达率明显降低,用卡巴胆碱预处理后,HLA-DR表达率随着卡巴胆碱浓度的增高而增高。LPS单独刺激淋巴细胞时,淋巴细胞凋亡率明显增加,而用卡巴胆碱预处理后,淋巴细胞凋亡率随着卡巴胆碱浓度的增高而降低。结论 卡巴胆碱对LPS引起的人血单核细胞和淋巴细胞免疫功能下调有显著抑制作用。

**【关键词】** 卡巴胆碱;脂多糖类;单核细胞;HLA抗原;淋巴细胞;细胞凋亡

## Effect of carbachol on immune function of monocytes and lymphocytes in human peripheral blood stimulated by lipopolysaccharide

YU Yan, ZOU Yuekun, HU Sen, et al

Burns Institute, the First Affiliated Hospital of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100037, China

**【Abstract】** Objective To investigate the effect of cholinergic drug carbachol on immune function of monocytes and lymphocytes in human peripheral blood stimulated by lipopolysaccharide(LPS). Methods Monocytes and lymphocytes were separated from peripheral blood in healthy adults. The cells for test were divided into control, LPS stimulation alone and LPS stimulation + carbachol groups. Different doses (100, 10, 1, 0.1, 0.01 $\mu$ mol/L) of carbachol were added to monocytes and lymphocytes in  $1 \times 10^9$  cells/L, followed with stimulation by LPS(100 $\mu$ g/L). After cultivating for 12 h, expression of HLA-DR antigen on CD14<sup>+</sup> monocyte and lymphocyte apoptosis rate were determined by direct immunofluorescence on a flow cytometer. Results HLA-DR expression was significantly lower in monocytes stimulated by LPS than those not stimulated. When pretreated with carbachol, HLA-DR expression significantly increased in a concentration-dependent manner. Apoptosis rate in lymphocytes stimulated by LPS alone was significantly higher than those in controls, and much decreased when pretreated with carbachol, which also showed a concentration-dependent manner. Conclusion The results suggested that carbachol had a significant effect on LPS induced immunosuppression in human monocytes and lymphocytes.

**【Key words】** carbachol; lipopolysaccharides; monocytes; HLA antigens; lymphocytes; apoptosis

卡巴胆碱(carbachol)是一种胆碱能激动剂,同时具有M受体和N受体兴奋作用,临床上曾用于治疗胃肠胀气和尿潴留。笔者以往的研究表明,卡巴胆碱具有抑制组织炎症因子释放、增加胃肠动力和降低血管通透性等作用,能减轻烧伤休克及肠缺

血时组织炎症反应和病理损害<sup>[1,2]</sup>。但卡巴胆碱除抗炎作用外,是否还具有免疫调节作用?这方面的研究尚缺乏报道。本研究拟采用体外干预的方式探讨卡巴胆碱对单核细胞表面人类组织相容性抗原-DR(HLA-DR)和淋巴细胞凋亡率的影响,为卡巴胆

收稿日期:2007-04-04

作者单位:100037北京市,解放军总医院第一附属医院全军烧伤研究所多器官功能障碍实验室;100037北京市,海军总医院ICU(邹曰坤)

作者简介:于燕,女,1982年2月生,山东蓬莱人,在读硕士研究生。现工作单位:海军总医院医学整形科。E-mail: yuyan301@sina.com

通讯作者:胡森, Tel:010-66867397, E-mail: hs82080@yahoo.com.cn

碱治疗全身炎症反应所致的免疫功能障碍提供实验依据。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 外周血单核细胞和淋巴细胞的提取和处理

取解放军总医院第一附属医院健康体检合格者外周静脉血与等量 D-Hanks 混匀,按 1:1 缓慢加入淋巴细胞分离液(中国医学科学院),上密度梯度离心(2000rpm/min, 15min),收集中间乳白色细胞层, PBS 洗 2 遍,用含 10% 胎牛血清的 1640 培养液重悬细胞,调整细胞密度为 1×10<sup>9</sup>/L,接种于 6 孔培养板。实验组加入终浓度为 100、10、1、0.1、0.01μmol/L 的卡巴胆碱,5min 后加入终浓度为 100μg/L 的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS, Sigma 公司),在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 及 95% 空气、饱和湿度的 CO<sub>2</sub> 孵箱孵育 12h,轻晃培养板,吸出未贴壁的淋巴细胞,1640 培养液冲洗 2 遍,贴壁单核细胞用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA(invitrogen 公司,加拿大)消化。2 种细胞均用 PBS 洗 2 遍,Binding Buffer 重悬,调整细胞密度为 1×10<sup>8</sup>/L。

1.2 实验分组 实验分为空白组(1640 培养液),单纯 LPS 刺激组(100μg/L)和用卡巴胆碱预先处理的 LPS+卡巴胆碱组,LPS+卡巴胆碱组分为 100、10、1、0.1、0.01μmol/L 5 个浓度组。

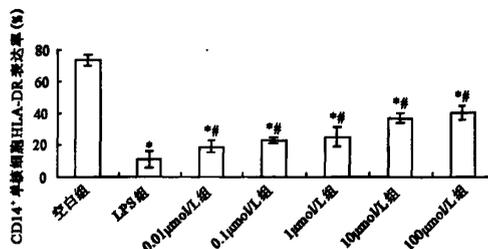
1.3 CD14<sup>+</sup> 单核细胞 HLA-DR 表达率测定 100μl 单核细胞悬液加入藻红蛋白(PE)标记的抗人 CD14 抗原的单克隆抗体及异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗人 HLA-DR 单克隆抗体(Caltag Laboratories 产品)各 5μl,混匀,避光室温孵育 20~30min。上机前再加入 500μl PBS。流式细胞仪(BD 公司)检测。FITC 标记的鼠 IgG2a 同型异构体及 PE 标记的鼠 IgG2b 同型异构体(Caltag Laboratories 产品)作为阴性对照协助射门。

1.4 淋巴细胞凋亡率 200μl 淋巴细胞悬液加入 10μl Annexin V-FITC 和 5μl PI(北京宝赛生物技术有限公司),轻轻混匀,避光室温反应 15min,加入 300μl Binding Buffer,上机检测。用标记了 FITC 的 Annexin V 将活细胞和凋亡细胞分开,PI 可将晚期凋亡和坏死细胞染色,Annexin V 与 PI 匹配使用可将早期凋亡细胞和晚期凋亡细胞及坏死细胞分开。

1.5 统计学处理 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS11.0 统计软件进行方差分析。

## 2 结 果

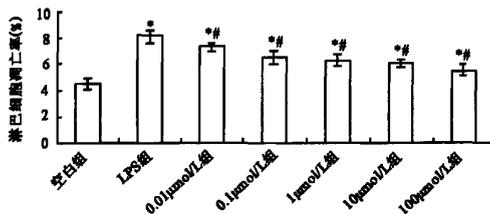
2.1 CD14<sup>+</sup> 单核细胞 HLA-DR 表达率 单独 LPS 刺激单核细胞时,HLA-DR 表达率明显低于空白对照组,预先用卡巴胆碱处理后,HLA-DR 表达率随着卡巴胆碱浓度的增加而逐渐增高(图 1)。



与空白组比较,\*P<0.01,与 LPS 组比较,#P<0.01;数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,n=9

图 1 卡巴胆碱对脂多糖刺激后单核细胞 HLA-DR 表达率的影响

2.2 淋巴细胞凋亡率 LPS 单独刺激淋巴细胞时,淋巴细胞凋亡率明显增加,而用卡巴胆碱预处理后,淋巴细胞凋亡率随着卡巴胆碱浓度的增高而降低(图 2)。



与空白组比较,\*P<0.01,与 LPS 组比较,#P<0.01;数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,n=9

图 2 卡巴胆碱对脂多糖刺激淋巴细胞凋亡率的影响

## 3 讨 论

2000 年,Borovikova 等<sup>[3]</sup>的研究发现迷走神经在调控 LPS 引起的系统性炎症反映中具有重要作用。迷走神经的主要神经递质乙酰胆碱能够显著减少 LPS 刺激下体外培养的巨噬细胞释放促炎介质[肿瘤坏死因子(TNF),白介素(IL)-1β,IL-6,IL-18]的量,直接刺激 LPS 血症大鼠迷走神经传出支可以减少肝脏及血液中 TNF 的量,他们将迷走神经这种抗炎作用命名为“胆碱能抗炎通路”。这为神经系统调节免疫反应提供了依据。该研究还发现,乙酰胆碱的抗炎作用主要是通过胆碱能 N 受体介导。卡巴胆碱也是一种胆碱能激动剂,可作用于 M

和N胆碱受体,且其N样作用强于乙酰胆碱,并且不易被水解。笔者既往的研究表明,卡巴胆碱具有抑制组织炎症因子释放、增加胃肠动力和降低血管通透性等作用。腹腔内注射能增加胃肠蠕动、减轻肠黏膜缺血和炎症反应<sup>[1, 2, 4]</sup>。卡巴胆碱在临床上具有良好的应用前景。本研究着重探讨其对LPS刺激下机体免疫功能的影响。

笔者选取两个能够从不同侧面反映机体免疫功能状况的指标:CD14<sup>+</sup>单核细胞HLA-DR表达率和淋巴细胞凋亡率。CD14<sup>+</sup>单核细胞HLA-DR能够直接反应单核细胞的递呈能力,可以作为衡量机体免疫功能的准确指标<sup>[5]</sup>。单核细胞HLA-DR的表达,一方面可诱导和增强免疫应答反应,一方面与具有免疫抑制作用的细胞互相拮抗,调节免疫应答的过程。研究显示,创(烧)伤可诱导淋巴细胞凋亡的加速。Zoccali等<sup>[6]</sup>认为,外周血淋巴细胞凋亡率可作为脓毒症治疗效果和预后评估的重要指标。

本研究显示,卡巴胆碱能够明显改善LPS刺激引起的单核细胞HLA-DR表达率降低和淋巴细胞凋亡率增加,且在0.01~100 $\mu$ mol/L的浓度范围内,随着浓度的增加作用程度也愈加明显。此项结果表明卡巴胆碱能显著抑制LPS引起的人血单核细胞和淋巴细胞免疫功能下调。也有研究<sup>[7]</sup>认为,卡巴胆碱能够降低树突状细胞的活性,有助于减轻脓毒症早期过度的免疫反应。笔者认为卡巴胆碱对机体免疫主要起调节作用,在炎症反应早期,即全身炎症反应综合征阶段,以抗炎为主并减少过度免疫反应对机体的损伤,但在炎症反应后期,机体处于混合性炎症反应综合征阶段,卡巴胆碱既能抑制过度

的炎症反应,又能抑制免疫功能的下调,起到对机体的保护作用。具体机制尚待进一步研究。

研究结果表明,卡巴胆碱具有减轻组织炎症,促进胃肠运动等作用,其在严重创伤、休克和感染引起的全身失控性炎症反应、脓毒症和多器官功能障碍的防治中具有良好的应用前景。

#### 参考文献

- [1] 胡森,曹卫红,孙丹,等.卡巴胆碱对肠部分缺血-再灌注损伤所致全身炎症反应和多器官功能障碍的影响.中国危重病急救医学,2005,17:49-52.
- [2] 吕艺,孙丹,胡森,等.卡巴胆碱对LPS刺激外周血白细胞释放TNF- $\alpha$ 的影响.感染、炎症、修复,2005,6:7-10.
- [3] Borovikova LV, Ivanova S, Zhang MH, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*, 2000, 405: 458-462.
- [4] 白玉梅,胡森,刘秀华,等.卡巴胆碱对肠部分缺血-再灌注损伤家兔血浆促炎细胞因子含量的影响及对烧创伤后防治的意义.中国临床康复,2004,8:2684-2685.
- [5] Volk HD, Reinke P, Krausch D. Monocyte deactivation: rationale for a new therapeutic strategy in sepsis. *Intensive Care Med*, 1996, 22:1-8.
- [6] Tuzo YL, Pangault C, Gacouin A, et al. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock*, 2002, 18: 487-494.
- [7] 田光,陆江阳,胡森,等.卡巴胆碱对脓毒症小鼠脾脏树突状细胞变化的影响.中国危重病急救医学,2006,18:684-686.
- [3] Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, et al. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med*, 1985, 13:818-829.
- [4] Wiecek SJ, Wu AH, Christenson R, et al. A rapid B-type natriuretic peptide assay accurately diagnoses left ventricular dysfunction and heart failure: a multi-center evaluation. *Am Heart J*, 2002, 144:834-839.
- [5] Berger R, Huelsman M, Strecker K, et al. B-type natriuretic peptide predicts sudden death in patients with chronic heart failure. *Circulation*, 2002, 105: 2392-2397.
- [6] Zoccali C, Mallamaci F, Benedetto FA, et al. Cardiac natriuretic peptides are related to left ventricular mass and function and predict mortality in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol*, 2001, 12:1508-1515.
- [7] Wallen T, Landahl S, Hedner T, et al. Brain natriuretic peptide predicts mortality in the elderly. *Heart*, 1997, 77:264-267.
- [8] Almog Y, Novack V, Megralishvili R, et al. Plasma level of N terminal pro-brain natriuretic peptide as a prognostic marker in critically ill patients. *Anesth Analg*, 2006, 102:1809-1815.

(上接第360页)