

不同时期海洛因依赖大鼠胃窦 CD4、CD8 和 IL-2 表达*

夏白娟, 李一欣, 洪艳, 韩晶, 梁文妹

(贵阳医学院 组织学与胚胎学教研室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 探讨海洛因依赖期间大鼠胃窦内 CD4、CD8 及白细胞介素-2(IL-2)的表达。方法: 正常成年 SD 大鼠, 随机分为正常对照组(NCG)、盐水对照组(SCG组)和不同时期海洛因依赖组(HDG组); 采用免疫组织化学 SABC 法及图像分析法, 观察 SCG 组和 HDG 组造模第 10、17、24、31 及 38 天大鼠胃窦黏膜 CD4、CD8 和 IL-2 表达。结果: 与 NCG 组及 SCG 组比较, HDG 组大鼠胃窦 CD4、IL-2 阳性细胞数量减少, 染色变浅, 图像分析的细胞计数和平均灰度值差异也有统计学意义($P < 0.05$); HDG 组大鼠胃窦 CD8 阳性细胞较 NCG 及 SCG 组细胞数量增多, 染色变深, 在海洛因依赖第 24 天变化最为明显, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 在海洛因依赖期间, CD4、IL-2 在胃窦表达减弱, CD8 表达增强, 提示海洛因依赖对大鼠胃黏膜免疫功能造成损伤。

[关键词] CD4 阳性 T 淋巴细胞; CD8 阳性 T 淋巴细胞; 白介素 2; 胃窦; 海洛因; 大鼠, Sprague Dawley

[中图分类号] R329.44; R34-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2015)03-0241-04

The Expression of CD4, CD8 and IL-2 in Gastric Antrum of Heroin-dependent Rats in Different Periods

XIA Baijuan, LI Yixin, HONG Yan, HAN Jing, LIANG Wenmei

(Department of Histology and Embryology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the expression of CD4, CD8 and interleukin-2 (IL-2) in gastric antrum of heroin-dependent rats. **Methods:** Adult SD rats were divided into normal control group (NCG), saline control group (SCG) and heroin-dependent group (HDG). Immunohistochemical SABC method and image analysis technique were performed to detect the expression of CD4, CD8 and IL-2 in the 10th, 17th, 24th, 31st day after establishing heroin-dependent model. **Results:** The number of CD4, IL-2 positive cells and intensity of immunohistochemical staining of CD4, IL-2 in HDG were decreased, compared with NCG and SCG. The results of image analysis showed that the difference of the number and the average gray degree of CD4, IL-2 were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with NCG and SCG, the intensity of immunohistochemical staining and the number of CD8 positive cells in gastric antrum in HDG increased, the most obvious change appeared at 24th day of heroin dependence. **Conclusions:** The expression of CD4, IL-2 in gastric antrum is distinctly reduced, that of CD8 enhance during heroin dependence, suggesting that the immune function of rat antrum is damaged by heroin.

[Key words] CD4 positive T Cells; CD8 positive T Cells; interleukin-2; gastric antrum; heroin; rats, Sprague-Dawley

阿片类物质滥用可对成瘾者消化系统造成明显的损害,引起胃肠蠕动减慢、消化道溃疡及胃肠

功能紊乱等症状,可能与胃肠道的免疫功能降低有关^[1-3]。T 淋巴细胞在机体免疫中起着重要作用,

*[基金项目] 贵州省卫生厅优秀青年基金(No:G2009-11); 贵州省科技厅基金[黔科合 J 字 2010(2153)]

网络出版时间:2015-03-19 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20150319.0959.017.html>

主要包括 CD4 和 CD8 淋巴细胞两大亚群。分布在胃肠黏膜的 CD4 和 CD8 淋巴细胞能保护黏膜,防御病原菌的入侵^[4]。IL-2 (interleukin-2) 则是由 CD4 产生的一种细胞因子,能活化巨噬细胞,参与免疫防御^[5]。课题组前期研究曾报道过海洛因戒断、脱毒和复吸期间 CD4、CD8 和 IL-2 在大鼠胃窦的表达变化^[6],但目前对不同时期海洛因依赖大鼠胃黏膜免疫功能影响的研究少见报道,本实验通过建立相关大鼠模型,观察不同时期海洛因依赖期间(10、17、24、31、38 d),CD4、CD8 和 IL-2 在大鼠胃窦的表达,探讨海洛因依赖期间胃黏膜免疫功能的变化。

1 材料与方法

1.1 动物分组与试剂

成年雄性(Sprague Dawley, SD)大鼠 66 只,体重 180 ~ 220 g,由贵阳医学院实验动物中心提供;按配对原则随机分为正常对照组(normal control group, NCG)6 只,盐水对照组(saline control group, SCG)和海洛因依赖组(heroine dependent group, HDG),各 30 只。海洛因粉剂,纯度 61.48%,由贵州省公安厅提供,临用时用灭菌注射用水溶解。

1.2 方法

1.2.1 海洛因依赖大鼠模型 HDG 组按体重逐日递增皮下注射海洛因药液,首日剂量为 3 mg/kg,2 次/日(上午 8 时,下午 3 时),每日递增 3 mg/kg,连续注射 9 d 至成瘾,第 9 天剂量为 27 mg/kg。此后每日上午 8 时皮下注射海洛因一次,维持至取材,剂量为 27 mg/kg。SCG 组按体重每日注射 HDG 组相当剂量的生理盐水。NCG 组不予任何处理。

1.2.2 标本制备 HDG 组及 SCG 组分别于第 10、17、24、31、38 天取材,(分别为 HDG₁₀, HDG₁₇, HDG₂₄, HDG₃₁, HDG₃₈ 和 SCG₁₀, SCG₁₇, SCG₂₄, SCG₃₁, SCG₃₈ 组)每组每次处死 6 只, NCG 组每次处死一只。取胃窦组织,多聚甲醛液固定,常规石蜡包埋,制成 4 μ m 厚的连续切片。

1.2.3 CD4、CD8 和 IL-2 阳性细胞检测 免疫组织化学 SABC 法,切片常规脱蜡脱水,室温 10% 甲醇-H₂O₂ 10 min,正常羊血清(1:50)室温下封闭 20 min,分别滴加兔 CD4、CD8 和 IL-2 抗血清,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;羊抗兔 IgG(1:100)37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min,

SABC 复合物(1:100)37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min, DAB-H₂O₂ 液显色,苏木精复染细胞核,中性树胶封片。方法对照采用 PBS 缓冲液代替特异性抗血清,其余步骤同上。

1.2.4 观察指标 随机选取 HDG 组各时间点和同期 SCG 组各胃窦切片 3 例, NCG 组 3 例于 40 倍物镜下,每例切片随机选取 5 个视野,大鼠胃窦黏膜中 CD4 阳性细胞经免疫组织化学染色之后可见免疫反应产物呈棕黄色,分布于黏膜内固有层,胞体小,多呈圆形、椭圆形;CD8 阳性细胞经免疫组织化学染色之后可见免疫反应产物呈棕黄色或棕黑色,位于细胞胞膜和胞质内,多分布于胃窦黏膜固有层内;大鼠胃窦 IL-2 阳性细胞免疫反应产物呈棕黄色或棕黑色细颗粒状,存在于细胞胞质中,阳性细胞多分布于固有层腺底部的结缔组织中。用 BioMias 图像分析系统检测 CD4、CD8 和 IL-2 阳性细胞的平均灰度值。

1.3 统计学方法

数据用均数 \pm 标准差表示($\bar{x} \pm s$)。应用 SPSS 11.5 软件包对所得数据进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

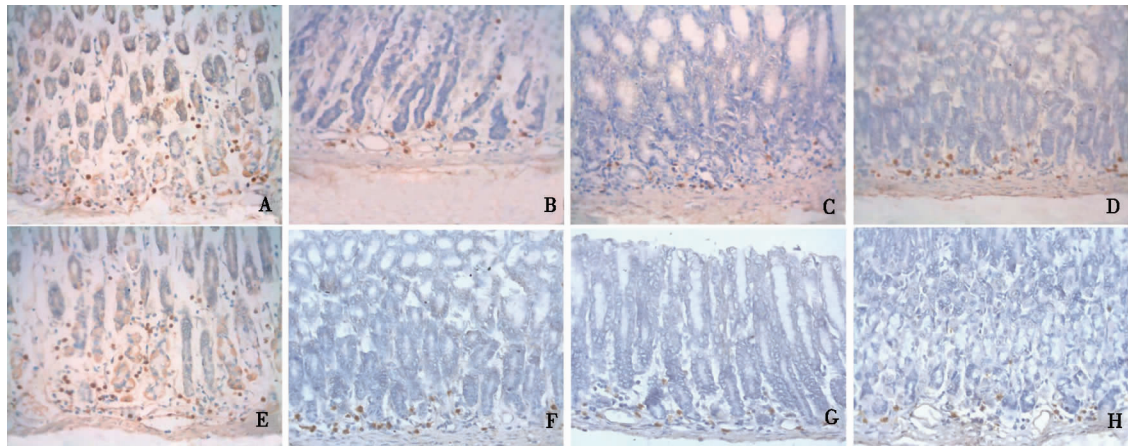
在实验过程中,SCG 组和 NCG 组大鼠皮毛光滑,饮食正常,无拉稀便等现象,体重逐渐增长;HDG 组大鼠随海洛因剂量的递增,从第 10 天开始出现典型的海洛因依赖症状。表现为:给药后动物呆滞、活动减少、嗜睡,四肢及躯体肌紧张,尾巴僵直上翘,两眼凸出、发亮,眼神迷离无光彩,用硬物戳之无反应,类似死后僵硬一般,这些表现持续约 30 min;此后开始出现兴奋状态,表现为活动增多,乱窜,快速不停地转圈运动,舔毛,咬前爪及磕铁笼等,兴奋持续时间约 90 min。

2.2 CD4、CD8 和 IL-2 表达

光镜下,SCG 各组 and NCG 组比较,大鼠胃窦中 CD4 阳性细胞的分布及免疫染色强度无明显差别(图 1-A);HDG 组大鼠胃窦黏膜内的 CD4 阳性细胞数量随着海洛因依赖时间的延长逐渐减少,且免疫染色强度减弱(图 1-B、图 1-C)。SCG 各组大鼠胃窦中 CD8 阳性细胞的分布及免疫染色强度与 NCG 组无明显差别,HDG 大鼠胃窦黏膜内 CD8 阳性细胞在海洛因依赖早期没有太大变化,于

依赖 24 d 时数量明显增加,免疫染色有所增强(图 1 - D、图 1 - E)。与 NCG 组比较,SCG 组 IL-2 阳性细胞的分布及免疫反应染色强度均无明显变化,

经统计学处理,该两组平均灰度值无显著差异($P>0.05$)(图 1 - F)。海洛因依赖大鼠组胃窦 IL-2 阳性细胞数量减少(图 1 - G、图 1 - H)。



A ~ C 为 SCG₁₀、HDG₃₁ 及 HDG₃₈ 组 CD4 阳性细胞,D ~ E 为 HDG₂₄ 及 HDG₃₈ 组 CD8 阳性细胞;F ~ H 为 SCG₃₁、HDG₁₇ 及 HDG₂₄ IL-2 阳性细胞

图 1 各组大鼠胃窦 CD4、CD8、IL-2 免疫反应阳性细胞(SABC ×400)

Fig. 1 The CD4, CD8 and IL-2 positive cells in gastric antrum of rats in each group

2.3 CD4、CD8 和 IL-2 阳性细胞数量

大鼠胃窦黏膜 CD4、CD8 和 IL-2 阳性细胞数在 NCG 与 SCG 各组之间的差异无统计学意义($P>0.05$)。HDG 组 CD4 和 IL-2 阳性细胞数量减少,与 NCG、SCG 比较差异有统计学意义($P<0.05$),且随着依赖时间的延长两种细胞减少的趋势越明

显,差异有统计学意义($P<0.05$);HDG 组 CD8 阳性细胞数量在海洛因依赖的第 10、17 天时无明显变化,在第 24 天时升高($P<0.05$),此后数量虽有所升高,但差异不具有统计学意义($P<0.05$),且 CD4/CD8 的比值明显 <1 。见表 1。

表 1 各组大鼠胃窦黏膜中 CD4、CD8、IL-2 阳性细胞数量

Tab. 1 The number of CD4, CD8 and IL-2 positive cells in gastric antrum of rats in each group

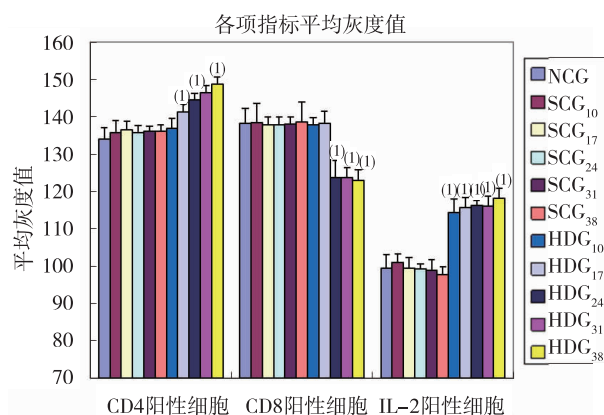
组别	阳性细胞数($\bar{x} \pm s, n=6$)					
	CD4	P	CD8	P	IL-2	P
NCG	27.833 ± 1.581 1		18.333 ± 2.249 2		23.808 ± 1.032	
SCG ₁₀	28.000 ± 1.328 4	0.769	18.389 ± 1.420 0	0.924	24.200 ± 1.207	0.108
SCG ₁₇	28.277 ± 1.673 5	0.434	18.444 ± 1.338 2	0.849	24.133 ± 1.125	0.137
SCG ₂₄	28.111 ± 2.323 5	0.624	18.944 ± 1.696 8	0.296	24.451 ± 1.356	0.136
SCG ₃₁	28.333 ± 1.495 1	0.378	18.278 ± 1.564 5	0.924	25.267 ± 3.452	0.077
SCG ₃₈	28.167 ± 1.723 5	0.557	19.00 ± 1.782 3	0.255	24.814 ± 2.628	0.058
HDG ₁₀	25.111 ± 1.323 5	0.000 1	18.722 ± 1.673 5	0.506	19.953 ± 1.926	0.000 1
HDG ₁₇	22.833 ± 1.886 5	0.002	19.833 ± 1.543 5	0.061	15.758 ± 3.682	0.000 1
HDG ₂₄	21.389 ± 2.033 2	0.000 1	25.667 ± 2.249 2	0.000 1	12.733 ± 0.389	0.000 1
HDG ₃₁	17.167 ± 1.581 1	0.000 1	27.056 ± 1.474 2	0.000 1	10.067 02 ± 2.492	0.000 1
HDG ₃₈	13.611 ± 1.460 8	0.000 1	28.611 ± 1.974 5	0.000 1	7.516 ± 2.703	0.000 1

2.4 CD4、CD8 和 IL-2 阳性细胞平均灰度值

CD4、IL-2 阳性细胞的平均灰度值在 NCG 和 SCG 各组分别比较,差异均无统计学意义($P>$

0.05); CD4 阳性细胞和 IL-2 阳性细胞平均灰度值在 HDG 组随着海洛因依赖时间延长而逐渐增加,CD4 差异有统计学意义($P<0.05$),而 IL-2 差

异无统计学意义($P > 0.05$)。HDG 组 CD8 阳性细胞平均灰度值在海洛因依赖第 24 天之后较 NCG 和 SCG 各组及 HDG1、HDG2 组显著下降,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2。



(1) 与本组内 NCG、SCG 各组比较 $P < 0.05$

图 2 各组大鼠胃窦黏膜中 CD4、CD8、IL-2 阳性细胞平均灰度值

Fig. 2 The average gray degree of CD4, CD8 and IL-2 positive cells in gastric antrum of rats in each group

3 讨论

CD4 淋巴细胞和 CD8 淋巴细胞参与了机体病毒免疫、抗肿瘤免疫等作用,在正常人体内的比例约为 2^[7-8]。CD4 是辅助性 T 细胞的表面标志,CD8 是杀伤性 T 细胞的表面标志。在免疫应答过程中,CD8⁺T 细胞发挥细胞毒作用,特异性直接杀伤靶细胞;CD4⁺T 细胞具有协助体液免疫和细胞免疫的功能。两者既相互联系、相互促进,又相互制约。其中任何一方异常、免疫调节失衡,即可出现病理状态^[9]。

研究发现阿片类物质对机体免疫系统有抑制作用^[10]。对海洛因依赖患者外周血的检测也发现,CD4 淋巴细胞数较正常值降低,CD4/CD8 的比值 < 1 ^[11-12]。本实验结果 CD4 淋巴细胞数随着海洛因依赖天数的增加而逐渐减少,免疫染色变浅,表明海洛因能加速 CD4 淋巴细胞凋亡使细胞数量减少,与 Yin 等^[13]报道相符。CD8 淋巴细胞数及免疫染色强度在海洛因依赖初期变化不明显,从第 24 天起细胞数增多,免疫染色逐渐加深,推测可能与 CD8 淋巴细胞具有抑制 T 细胞活性,对免疫应答有负调节效应有关,CD4/CD8 比值的降低也提

示胃黏膜免疫防御功能下降^[14]。本实验中,海洛因依赖大鼠胃窦 IL-2 细胞的细胞数减少,免疫反应强度减弱,与 Li HY 等^[15]的报道相符,表明 CD4 淋巴细胞数量减少,产生细胞因子 IL-2 的能力减弱。而 IL-2 能促进淋巴细胞的增殖,IL-2 分泌的减少,对 CD4 淋巴细胞的增殖造成了影响^[16]。在海洛因依赖期间,胃窦黏膜免疫功能受到严重损伤,这也是海洛因滥用者容易受病毒、细菌感染而出现相关临床并发症的原因之一。

4 参考文献

- [1] Dimitrijević I, Kalezić N, Ristić J, et al. Digestive system damage caused by substance abuse[J]. Acta Chir Iugosl, 2008(55):133-138.
- [2] Adam DF, Ella F, Qasim A. Opioids and the Gastrointestinal Tract - A Case of Narcotic Bowel Syndrome and Literature Review[J]. J Neurogastroenterol Motil, 2013(19):94-98.
- [3] Panchal SJ, Müller-Schwefe P, Wurzelmann JI. Opioid-induced bowel dysfunction: prevalence, pathophysiology and burden[J]. Int J Clin Pract, 2007(61):1181-1187.
- [4] Smith PM, Garrett WS. The gut microbiota and mucosal T cells[J]. Front Microbiol, 2011(2):111.
- [5] 冯静, 费瑜, 孟晓萍. CD4⁺和 CD8⁺T 淋巴细胞与动脉粥样硬化相关性研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011(19):707-710.
- [6] 夏白娟, 梁文妹, 李一欣, 等. cd4、cd8 和 il-2 在海洛因戒断、复吸大鼠胃窦的表达[J]. 世界华人消化杂志, 2013(21):1589-1594.
- [7] Rehmann B. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence[J]. J Clin Invest, 2009(7):1745-1754.
- [8] Zamarron BF, Chen W. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression[J]. Int J Biol Sci, 2011(7):651-658.
- [9] 刘阳, 马涛, 武昕. CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞浸润与外阴上皮内非瘤样病变的相关性[J]. 中国医科大学学报, 2010(7):561-563.
- [10] Feng P, Wilson QM, Meissler JJ, et al. Increased sensitivity to Salmonella enterica serovar Typhimurium infection in mice undergoing withdrawal from morphine is associated with suppression of interleukin-12[J]. Infect Immun, 2005(12):7953-7959.
- [11] 徐靖, 张勇, 石向东, 等. HIV 阳性的海洛因依赖者戒毒前后 120 天 CD4⁺T 变化[J]. 中国药物滥用防治杂志, 2008(14):91-93.

(下转第 252 页)

- (6):581-589
- [8] Rappelli P, Addis MF, Carta F, et al. *Mycoplasma hominis* parasitism of *Trichomonas vaginalis* [J]. *Lancet*, 1998 (9136):1286.
- [9] Xiao JC, Xie LF, Fang SL, et al. Symbiosis of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* may link metronidazole resistance in vitro [J]. *Parasitol Res*, 2006(1):123-130.
- [10] 刘晓东, 温雯静, 薛长贵. 阴道毛滴虫与人型支原体共生对铁氧还蛋白基因影响 [J]. *生物医学工程学杂志*, 2011(4):800-803.
- [11] 杨森, 刘素英, 王黎, 等. 阴道毛滴虫与人型支原体共生对 AP33 基因序列的影响 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2013(11):979-981, 996.
- [12] 王频佳, 谢成彬. 人型支原体共生与阴道毛滴虫甲硝唑耐药性的关系 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2012(3):210-213.
- [13] 谢成彬, 王频佳, 吴雨露, 等. 人型支原体共生对甲硝唑临床治疗阴道毛滴虫感染的影响 [J]. *现代妇产科进展*, 2013(6):461-464.
- [14] Fiori PL, Diaz N, Cocco AR, et al. Association of *Trichomonas vaginalis* with its symbiont *Mycoplasma hominis* synergistically upregulates the in vitro proinflammatory response of human monocytes [J]. *Sex Transm Infect*, 2013(6):449-54.
- (2014-12-28 收稿, 2015-02-20 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 刘 华

(上接第 244 页)

- [12] 况应敏, 朱月春, 况颖, 等. 青少年吸毒者免疫细胞、细胞因子和生长激素的改变 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2007(23):821-823.
- [13] Yin D, Mufson RA, Wang R, et al. Fas-mediated cell death promoted by opioids [J]. *Nature*, 1999 (397):218.
- [14] 武冬梅, 李素清, 狄晓艳, 等. SO₂ 衍生物对 C57BL/6 小鼠肝脏 T 细胞亚群 CD4⁺/CD8⁺ 的影响 [J]. *生态毒理学报*, 2010(5):351-355.
- [15] Li HY, Zhang R, Cui CL, et al. Damage of splenic T lymphocyte proliferation and differentiation and its normalization by electroacupuncture in morphine-dependent mice mode [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2011(2011):424092.
- [16] Ahn G, Park E, Lee WW, et al. Enzymatic extract from *Ecklonia cava* induces the activation of lymphocytes by IL-2 production through the classical NF- κ B pathway [J]. *Marine Biotechnology*, 2011(13):66-73.
- (2015-01-07 收稿, 2015-02-23 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 周 凌

(上接第 248 页)

- [11] Louvet A, Teixeira CF, Chobert MN, et al. Cannabinoid CB₂ receptors protect against alcoholic liver disease by regulating Kupffer cell polarization in mice [J]. *Hepatology*, 2011(4):1217-1226.
- [12] Munoz S J, Chanez Cardenas ME. A review on hemeoxygenase-2: focus on cellular protection and oxygen response [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014(14):167-192.
- [13] Manganaris GA, Goulas V. Berry antioxidants: small fruits providing large benefits [J]. *J Sci Food Agric*, 2014(5):825-833.
- [14] 王豫萍, 程明亮, 张宝方. 蓝莓对急性肝损伤大鼠抗氧化能力的影响 [J]. *肝脏*, 2012(9):633-635.
- (2015-01-04 收稿, 2015-02-17 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 周 凌