



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.02.012
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.02.012
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(2):216-220.

· 基础研究 ·

不同胆汁引流方式对梗阻性黄疸兔血清内毒素与免疫功能的影响

周春献¹, 陈钟², 徐东风¹, 杨群英¹

(1. 南通大学附属吴江医院介入科, 江苏 吴江 215200; 2. 南通大学附属医院 普通外科, 江苏 南通 226021)

摘要

目的: 探讨不同胆汁引流方式对梗阻性黄疸兔血清内毒素与免疫功能的影响。

方法: 将36只新西兰白兔随机均分为假手术组、外引流组、内引流组。外引流组与内引流组先建立可逆型梗阻性黄疸模型, 7 d后解除梗阻, 分别行胆汁外引流与内引流; 假手术组按相同时间间隔行2次假手术。各组分别于造模前、造模后7 d、引流术后7 d采血, 检测肝功能指标、血清内毒素水平、血中CD4⁺CD25⁺调节性T细胞的比例。

结果: 假手术组各时间点各项指标均无明显变化(均 $P>0.05$); 造模后7 d, 外引流组与内引流组血清胆红素、转氨酶、内毒素水平均较造模前明显升高, 血CD4⁺CD25⁺调节性T细胞比例较造模前明显降低(均 $P<0.05$); 行引流术7 d后, 外引流组与内引流组肝功能指标、内毒素水平、CD4⁺CD25⁺调节性T细胞比例均较造模后7 d明显恢复, 但内引流组后两项指标的恢复程度均明显优于外引流组(均 $P<0.05$)。

结论: 胆汁内引流较胆汁外引流更有利于梗阻性黄疸内毒素清除与机体免疫功能快速恢复。

关键词

胆汁淤积; 引流术; 内毒素血症; T淋巴细胞, 调节性
中图分类号: R657.4

Influence of different biliary drainage methods on serum endotoxin and immune function in rabbits with obstructive jaundice

ZHOU Chunxian¹, CHEN Zhong², XU Dongfeng¹, YANG Qunying¹

(1. Department of Interventional Radiology, Affiliated Wujiang Hospital, Nantong University, Wujiang, Jiangsu 215200, China; 2. Department of General Surgery, Affiliated Hospital, Nantong University, Nantong, Jiangsu 226021, China)

Abstract

Objective: To investigate the influence of different biliary drainage methods on serum endotoxin level and immune function in rabbits with obstructive jaundice.

Methods: Thirty-six New Zealand rabbits were equally randomized into sham operation group, external drainage group and internal drainage group. Rabbits in external drainage group and internal drainage group underwent establishment of reversible obstructive jaundice model, followed by obstruction removal and then internal and

基金项目: 江苏省医学创新团队与领军人才基金资助项目(LJ201134)。

收稿日期: 2014-09-28; 修订日期: 2015-01-20。

作者简介: 周春献, 南通大学附属吴江医院主治医师, 主要从事肝胆疾病方面的研究。

通信作者: 陈钟, Email: chenz9806@163.com

external biliary drainage respectively at 7 d after model was established, while those in sham operation group were subjected to two sham operations with the same time interval. Blood samples were collected before and 7 d after model establishment, and 7 d after drainage as well, and then the liver function parameters, serum endotoxin level and the ratio of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in peripheral blood were determined.

Results: No significant change was noted in any of the indexes at any time point in sham operation group (all $P>0.05$). In external drainage group and internal drainage group at 7 d after model establishment, the serum levels of bilirubin, transaminase and endotoxin were all increased, but the ratios of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells were decreased significantly compared with the levels before model establishment. At 7 d after drainage, the liver function parameters, serum endotoxin level, and ratio of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells were all significantly recovered in either external drainage group or internal drainage group compared with those at 7 d after model establishment, but the degrees of recovery of the latter two parameters in internal drainage group were greater than those in external drainage group (all $P<0.05$).

Conclusion: Internal biliary drainage for obstructive jaundice is more beneficial than external biliary drainage in eliminating endotoxin and accelerating recovery of immune function.

Key words: Cholestasis; Drainage; Endotoxemia; T-Lymphocytes, Regulatory

CLC number: R657.4

目前恶性梗阻性黄疸的根治性方法是外科手术。然而研究^[1-2]表明梗阻性黄疸患者术后易发生腹腔出血、胆瘘、腹腔内感染、肝肾功能衰竭等并发症,这可能与患者黄疸后肝肾功能受损、免疫功能低下有关。Maki等^[3]建议梗阻性黄疸患者进行外科根治性手术前宜先行胆汁外引流术,以恢复肝功能和免疫功能^[2]。但关于术前减黄目前仍有争议^[4-6]。本研究建立可逆型梗阻性黄疸兔模型,通过观察胆汁内外引流前后血清内毒素和血CD4⁺CD25⁺调节性T细胞的变化,来探讨梗阻性黄疸胆汁内外引流对机体免疫功能的作用,为临床选择胆汁引流方式提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

新西兰白兔36只,雌雄不限,体质量2.0~2.5 kg,由南通大学动物实验中心提供。分笼单独饲养,常规饲料喂养,自由进食与饮水,维持环境温度15~20℃。动物购回后适应性饲养1周,无异常表现后开始造模。

1.2 可逆型梗阻性黄疸模型的建立

采用盐酸赛拉嗪(0.3 mL/kg)+地西洋(1 mg/kg)(肌注)麻醉成功后,动物平卧固定,正中切口进腹,充分暴露后游离胆总管,切断胆总管后分别向肝与十二指肠方向插入硅胶管(静脉输液针

上的硅胶管),两端用5-0的丝线在胆总管处双重缝扎固定;3-0丝线缝合腹膜及肌层,留置针的夹闭器夹闭硅胶管并缝于皮下^[7]。术后肌注盐酸环丙沙星(5 mg/kg)预防感染。

1.3 实验分组与处理

实验新西兰大白兔随机分为3组:假手术组、外引流组、内引流组,每组12只。麻醉成功后,动物平卧固定,腹部正中切口进腹,充分暴露后游离胆总管,假手术组用5-0丝线打松结,但并不结扎和切断胆管,术后第7天,麻醉后去除部分缝线后再次重新缝合。外引流组先建立可逆型梗阻性黄疸模型,造模后第7天,麻醉后去除部分缝线暴露夹闭器和硅胶管,剪断硅胶管引至体外并固定形成胆汁外引流,再重新缝合切口。内引流组建立可逆型梗阻性黄疸模型后第7天,麻醉后去除部分缝线暴露夹闭器和硅胶管,去除夹闭器后恢复胆汁内引流,再重新缝合切口。

1.4 观察指标

分别于造模前、造模后第7天、引流术后第7天,股静脉抽血2 mL,1 mL置于无热源离心管中,以3 000 r/min进行离心,5 min后分离出血清,检测血清内毒素和总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)、谷丙转氨酶(ALT);1 mL置入一次性使用真空采血管(EDTA.K2,2.0 mg/mL)中,当天即用流式细胞仪检测CD4⁺CD25⁺调节性T细胞的比例。采血后静脉内推注生理盐水2 mL。

1.4.1 血清内毒素 使用兔内毒素 Elisa 试剂盒（上海研域化学试剂有限公司），严格按试剂盒说明书采用固相夹心法酶联免疫吸附法（ELISA）检测血清中血清内毒素水平。

1.4.2 肝功能测定 使用日立 7600 全自动生化分析仪检测血清 TBIL、DBIL、ALT。

1.4.3 血 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞比例 使用试剂有：淋巴细胞分离液（北京鼎国昌盛生物技术有限公司），Anti-Rabbit CD4 FITC（Antigenix 公司），Purified Mouse Anti-Rabbit CD25（BD Pharmingen 公司），Alexa Flour 647 donkey anti-mouse IgG（Life Technologies 公司），严格按试剂盒说明书对样本进行标记，标记后的样本经 BD FACSCalibur 流式细胞仪分析，Cellquest 软件获取与分析数据，记录阳性细胞百分率。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据分析，所有数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间比较采用单因素方差分析， $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组动物死亡情况

假手术组无动物死亡；外引流组造模后有 2 只动物死亡，行外引流后无动物死亡；内引流组造模后有 1 只动物死亡，内引流后无死亡情况；各组死亡动物解剖可见大量黄色腹水，考虑为胆瘘致腹膜炎。

2.2 一般情况及肝功能改变

外引流组与内引流组建立可逆型梗阻性黄疸模型后 3 d 出现黄疸，表现为兔耳及巩膜黄染，行胆汁内外引流后，兔耳及巩膜黄染情况明显好转；假手术组兔耳及巩膜未见黄染。

假手术组各肝功能指标各时间点差异均无统计学意义（均 $P > 0.05$ ）；造模后第 7 天，外引流与内引流组肝功能指标较造模前明显增高（均 $P < 0.05$ ），但两组之间差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）；引流术后第 7 天，外引流与内引流组肝功能指标均较造模后第 7 天明显下降（均 $P < 0.05$ ），且均与造模前水平差异无统计学意义（均 $P > 0.05$ ）（表 1）。

表 1 各组不同时间肝功能指标

Table 1 Liver function parameters in each group at different time points

组别	TBIL (μmol/L)			DBIL (μmol/L)			ALT (U/L)		
	造模前	造模后 7 d	引流术后 7 d	造模前	造模后 7 d	引流术后 7 d	造模前	造模后 7 d	引流术后 7 d
假手术组	2.9 ± 0.7	3.0 ± 0.7	3.3 ± 0.8	2.1 ± 0.6	2.3 ± 0.6	2.5 ± 0.7	40.9 ± 8.6	44.9 ± 8.3	42.8 ± 5.6
外引流组	2.8 ± 0.8	61.1 ± 6.6 ¹⁾	4.7 ± 2.3 ²⁾	2.0 ± 0.5	50.6 ± 6.4 ¹⁾	3.8 ± 2.0 ²⁾	41.6 ± 7.9	80.4 ± 17.3 ¹⁾	50.1 ± 12.6 ²⁾
内引流组	2.8 ± 0.7	60.4 ± 7.8 ¹⁾	4.0 ± 1.8 ²⁾	2.1 ± 0.6	48.8 ± 7.6 ¹⁾	3.2 ± 1.5 ²⁾	43.8 ± 8.6	83.1 ± 15.3 ¹⁾	47.3 ± 7.2 ²⁾

注：1) 与造模前比较， $P < 0.05$ ；2) 与造模后 7 d 比较， $P < 0.05$

Note: 1) $P < 0.05$ vs. value before model establishment; 2) $P < 0.05$ vs. value at 7 d after model establishment

2.3 各组血清内毒素水平的变化

假手术组血清内毒素水平各时间点差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）；造模后第 7 天，外引流与内引流组血清内毒素水平较造模前明显增高（均 $P < 0.05$ ），但两组升高程度无统计学差异（ $P > 0.05$ ）；引流术后第 7 天，外引流与内引流组血清内毒素水平较造模后第 7 天明显下降（均 $P < 0.05$ ），但内引流组下降程度大于外引流组（ $P < 0.05$ ），基本恢复至造模前水平（ $P > 0.05$ ）（表 2）。

2.4 各组血 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞比例的变化

假手术组 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞比例各时间点差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）；造模后第 7 天，外引流组与内引流组 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞比例较造模前明显下降（均 $P < 0.05$ ），但两组降低程

度无统计学差异（ $P > 0.05$ ）；引流术后第 7 天，外引流组与内引流组 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞比例较造模后第 7 天明显升高（均 $P < 0.05$ ），但内引流组升高程度大于外引流组（ $P < 0.05$ ），基本恢复至造模前水平（ $P > 0.05$ ）（表 3）。

表 2 各组不同时间血清内毒素水平 (pg/mL)

Table 2 Serum endotoxin levels in each group at different time points (pg/mL)

组别	造模前	造模后 7 d	引流术后 7 d
假手术组	5.5 ± 0.7	5.6 ± 0.9	4.9 ± 0.9
外引流组	5.4 ± 0.7	52.6 ± 6.8 ¹⁾	9.3 ± 1.4 ^{1),2)}
内引流组	5.2 ± 0.6	56.8 ± 5.4 ¹⁾	5.7 ± 0.9 ²⁾

注：1) 与造模前比较， $P < 0.05$ ；2) 与造模后 7 d 比较， $P < 0.05$

Note: 1) $P < 0.05$ vs. value before model establishment; 2) $P < 0.05$ vs. value at 7 d after model establishment

表3 各组不同时间 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞比例 (%)
Table 3 Ratio of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in each group at different time points (%)

组别	造模前	造模后 7 d	引流术后 7 d
假手术组	8.7 ± 0.9	9.0 ± 0.9	9.2 ± 0.9
外引流组	8.8 ± 0.8	5.7 ± 0.9 ¹⁾	6.7 ± 1.0 ^{1),2)}
内引流组	8.6 ± 0.7	5.5 ± 0.7 ¹⁾	8.7 ± 0.8 ²⁾

注: 1) 与造模前比较, $P < 0.05$; 2) 与造模后 7 d 比较, $P < 0.05$

Note: 1) $P < 0.05$ vs. value before model establishment; 2) $P < 0.05$ vs. value at 7 d after model establishment

3 讨论

3.1 梗阻性黄疸时血清内毒素的变化

梗阻性黄疸时胆汁不能顺利排入肠道, 导致肠道胆汁酸、免疫球蛋白等缺乏, 可引起肠道革兰氏阴菌过度生长, 产生大量内毒素, 引起肠道黏膜损伤和门静脉内毒素血症^[8]。内毒素经过门静脉到达肝脏, 大量的内毒素合并高胆红素血症可抑制Kupffer细胞吞噬功能, 使大量内毒素无法清除直接进入体循环形成全身内毒素血症, 加剧高胆红素血症引起的全身各个脏器损伤。本研究发现梗阻性黄疸模型建立后肝功能指标和血清内毒素水平较假手术组明显增高, 与文献^[2,9]报告一致。

3.2 梗阻性黄疸时血 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞的变化

调节性T细胞是具有调节免疫反应的淋巴细胞亚群, 主要通过抑制自身反应性T细胞来介导免疫耐受和缓冲炎症反应^[10]。正常情况下调节性T细胞维持在一定水平, 以维持机体的免疫平衡。本实验结果显示梗阻性黄疸模型建立后血CD4⁺CD25⁺调节性T细胞的比例较假手术组明显降低。CD4⁺CD25⁺调节性T细胞明显减少, 可造成免疫抑制能力的缺失, 从而可能会导致许多不同的免疫相关疾病^[11]。梗阻性黄疸时血清IL-6和TNF- α 等促炎症因子水平增高, 调节性T细胞水平降低时分泌IL-10、TGF- β 等炎症抑制因子减少, 减弱了炎症抑制作用, 可加重靶器官损伤。另外有研究表明活化巨噬细胞具有很强的抗炎潜能, 参与免疫调节、组织再塑、寄生虫杀伤和肿瘤诱导, 调节性T细胞能促进活化巨噬细胞的诱导^[12], 调节性T细胞的下调会导致替代性活化巨噬细胞的减少, 导致一系列的免疫功能变化。由此可见调节性T细胞的下降可导致机体免疫功能低下。

3.3 梗阻性黄疸时血清内毒素变化与血 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞变化的关系

梗阻性黄疸时兔血CD4⁺CD25⁺调节性T细胞下降, 可能是高胆红素血症和内毒素血症共同作用的结果: (1) 内毒素可改变机体的T细胞的免疫平衡。有研究^[13]表明内毒素可导致CD4⁺/CD8⁺T细胞比例下降, CD4⁺T细胞比例减少, CD8⁺T细胞比例增多。另有研究^[14]发现内毒素的上升可引起Th1/Th2T细胞平衡发生变化, 即Th1细胞分泌IFN- γ 和IL-2减少, Th2细胞分泌功能基本不受影响, 而IL-2是T细胞生长因子(TCRF), 可促进T淋巴细胞的增殖。CD4⁺T细胞比例减少和IL-2水平下降会导致CD4⁺CD25⁺调节性T细胞减少。(2) 抗原识别反应可使调节性T细胞数量增加, 抑制活性增强, 并向抗原所在的组织聚集^[15]。梗阻性黄疸时内毒素水平增加, 导致各个器官内抗原识别反应增强。(3) CD25是IL-2受体的 α 链, 梗阻性黄疸时患者外周血淋巴细胞IL-2的活性明显下降, IL-2R表达阳性率明显降低^[16], 说明胆红素可导致CD25水平下调, 间接地使调节性T细胞减少。

3.4 胆汁内外引流前后血清内毒素、血 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞的变化及意义

研究^[17-19]发现血清内毒素水平与手术创伤程度、术后SIRS及术后并发症发生率相关。此外, 手术创伤可以活化中性粒细胞和单核巨噬细胞分泌大量的促炎症因子, 如IL-6、TNF- α 等, 高水平的促炎症因子可以导致器官损伤。调节性T细胞的减少导致其分泌的IL-10、TGF- β 等炎症抑制因子减少, 炎症抑制作用减弱, 靶器官损伤可加重。

本研究发现胆道梗阻解除后血清内毒素水平明显下降, CD4⁺CD25⁺调节性T细胞比例升高, 说明减黄有助于改善细胞免疫功能。有研究^[20]表明单纯胆汁外引流对细胞免疫的改善不如胆汁外引流加胆汁酸喂养, 而胆汁内引流在改善细胞免疫时更快且效果更好, 这可能与自分泌的胆汁更好的改善了机体肝功能、营养情况和血液状态。说明胆汁重新进入肠道恢复胆盐肝肠循环的重要性。Sano等^[21-22]发现肠内胆盐也是维持机体免疫的重要组成部分, 其中胆盐能有效分解对细胞免疫有抑制作用的内毒素, 胆汁还有助于提高梗阻性黄疸时肠黏膜内T淋巴细胞数量, 抑制肠道内革兰氏阴性细菌的过度繁殖, 减少内毒素的产生, 维持肠道黏膜屏障的完整性, 减少了梗阻性黄疸时细菌移位的发生率。本实验结果提示, 胆汁内引流在降低血清内毒素、升高CD4⁺CD25⁺调节性T细胞

比例方面优于胆汁外引流，因此梗阻性黄疸条件下应尽可能采用胆汁内引流的方式解除黄疸。

参考文献

- [1] Wang ZK, Xiao JG, Huang XF, et al. Effect of biliary drainage on inducible nitric oxide synthase, CD14 and TGR5 expression in obstructive jaundice rats[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(15):2319-2330.
- [2] 刘凌云, 卢永刚, 何沙, 等. 梗阻性黄疸患者免疫功能的变化[J]. *中国普通外科杂志*, 2012, 21(8):996-999.
- [3] Maki T, Sato T, Kakizaki G, et al. Pancreatoduodenectomy for periampullary carcinomas. Appraisal of two-stage procedure[J]. *Arch Surg*, 1966, 92(6): 825-833.
- [4] van der Gaag NA, Rauws EA, van Eijck CH, et al. Preoperative biliary drainage for cancer of the head of the pancreas[J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(2):129-137.
- [5] Qiu YD, Bai JL, Xu FG, et al. Effect of preoperative biliary drainage on malignant obstructive jaundice: a meta-analysis[J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(3):391-396.
- [6] Fang Y, Gurusamy KS, Wang Q, et al. Pre-operative biliary drainage for obstructive jaundice[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2012, 9: CD005444. doi: 10.1002/14651858.CD005444.
- [7] 周春献, 徐东风, 陈钟. 一种新的可逆型梗阻性黄疸兔模型的建立[J]. *南通大学学报:医学版*, 2014, 34(4):267-270.
- [8] 蒋永军, 张培建, 骆小江, 等. 不同胆汁引流方式对梗阻性黄疸大鼠肠黏膜屏障功能的影响及机制[J]. *中国普通外科杂志*, 2013, 22(22):153-158.
- [9] Chou MH, Chuang JH, Eng HL, et al. Endotoxin and CD14 in the progression of biliary atresia[J]. *J Transl Med*, 2010, 8:138. doi: 10.1186/1479-5876-8-138.
- [10] Peterson RA. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression[J]. *Toxicol Pathol*, 2012, 40(2):186-204.
- [11] McMurchy AN, Levings MK. Suppression assays with human T regulatory cells: a technical guide[J]. *Eur J Immunol*, 2012, 42(1): 27-34.
- [12] Tiemessen MM, Jagger AL, Evans HG, et al. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(49):19446-19451.
- [13] 李克志. 丹红注射液对大鼠阻塞性黄疸CD4、CD8表达影响的实验研究[D]. 大理:大理学院, 2012:17-18.
- [14] Lauw FN, ten Hove T, Dekkers PE, et al. Reduced Th1, but not Th2, cytokine production by lymphocytes after in vivo exposure of healthy subjects to endotoxin[J]. *Infect Immun*, 2000, 68(3):1014-1018.
- [15] Katz SC, Ryan K, Ahmed N, et al. Obstructive jaundice expands intrahepatic regulatory T cells, which impair liver T lymphocyte function but modulate liver cholestasis and fibrosis[J]. *J Immunol*, 2011, 187(3):1150-1156.
- [16] 李延光, 邹声泉. 当归对阻塞性黄疸患者淋巴细胞IL-2活性和IL-2R表达的影响[J]. *中国普通外科基础与临床杂志*, 2007, 14(4):456-458.
- [17] Kanczkowski W, Chatzigeorgiou A, Samus M, et al. Characterization of the LPS-induced inflammation of the adrenal gland in mice[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2013, 371(1/2):228-235.
- [18] Calvano SE, Coyle SM. Experimental human endotoxemia: a model of the systemic inflammatory response syndrome?[J]. *Surg Infect (Larchmt)*, 2012, 13(5):293-299.
- [19] Jones C, Badger SA, Black JM, et al. The use of antiendotoxin peptides in obstructive jaundice endotoxemia[J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2012, 24(3):248-254.
- [20] Mok KT, Wang BW, Chang HC, et al. External biliary drainage plus bile acid feeding is not equal to internal drainage in preserving the cellular immunity following prolonged obstructive jaundice[J]. *Dig Dis Sci*, 2001, 46(9):1864-1870.
- [21] Sano T, Ajiki T, Takeyama Y, et al. Internal biliary drainage improves decreased number of gut mucosal T lymphocytes and MAdCAM-1 expression in jaundiced rats[J]. *Surgery*, 2004, 136(3):693-699.
- [22] Liu YJ, Mao EQ, Ouyang B, et al. Effect of biliary tract external drainage on cytokine expression and histomorphology of intestine, liver, and lung in rats with hemorrhagic shock[J]. *Crit Care Med*, 2009, 37(10):2800-2806.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 周春献, 陈钟, 徐东风, 等. 不同胆汁引流方式对梗阻性黄疸兔血清内毒素与免疫功能的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(2):216-220. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.02.012
Cite this article as: ZHOU CX, CHEN Z, XU DF, et al. Influence of different biliary drainage methods on serum endotoxin and immune function in rabbits with obstructive jaundice[J]. *Chin J Gen Surg*, 2015, 24(2):216-220. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.02.012