维普资讯 http://www.cqvip.com

第23卷 第3期 重庆医科大学学报 Vol.23 No.3
1998 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1998

新生儿B细胞功能与细胞因子

儿科学院 陈 实* 吴仕孝 李成荣 杨锡强

提 要 检测18例健康新生儿脐血T细胞(TL)产生白细胞介素4(IL-4)及IL-6水平同时，观察IL-4、IL-6及IL-10对B细胞(BL)功能即葡萄球菌A蛋白(SAC)诱导的BL增殖功能与免疫球蛋白G(IgG)合成的影响。结果发现新生儿TL产生的IL-4及IL-6水平显著低于成人并与其BL功能低下呈显著正相关。IL-4、IL-6及IL-10可不同程度地纠正新生儿低下的BL功能。本文提示TL产生的IL-4、IL-6及IL-10等调节因子不足可能是新生儿BL功能低下的重要原因之一。

关键词 新生儿；细胞因子；B淋巴细胞；免疫球蛋白G
中图分类号 R725

新生儿抗体反应低下(Neonatal inability of antibody response，NIAR)是其易于感染的重要因素之一。NIAR的机理尚不十分清楚。已知T辅助细胞(TH)在BL合成Ig过程中可通过分泌多种细胞因子(Cytokines，CK)起重要调节作用[1,2]。迄今国内外在NIAR中对ck的研究多为单一的活性观察，未确切解释TH及其ck对NIAR的影响。本文以IL-4、IL-6及IL-10代表TH的部分功能，观察新生儿TL及CK分泌水平及其对BL增殖与IgG合成的影响，探讨NIAR的机理。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1健康新生儿 18名足月顺产新生儿为研究对象，平均胎龄38^{+1}周，平均产重3.25公斤，男10名，女8名。其父母无异常妊娠史、无血制品及免疫增强或抑制剂用药史。

1.1.2 健康成人 20例健康成人为对照，平均年龄31岁，男11例，女9例。采血前四周内无血制品及免疫增强或抑制剂用药史。

采集肝素化新生儿脐血或成人外周血

1.2 实验方示

1.2.1 BL增殖反应 按常规分离脐血单个核细胞(CBMC)，调细胞浓度至1×10^6/ml，取100μl加入55孔板(重复三孔)。除空白孔外每孔加入SAC(最适浓度为0.005%v/v)，以RPMI补足每孔200ml，37℃、5%CO_2条件下培养72小时，培养结束前16小时加入^3H-TDR，结束后收集细胞进行液闪计数。

1.2.2体外SAC诱导的BL合成IgG的测定 常规分离CBMC，用两次AET花球形成法分离B细胞，调细胞浓度至1×10^6/ml，取1ml加入试管，每管加入SAC(最适浓度为0.005%v/v)，37℃、5%CO_2条件下培养10天，收集上清液。IgG测定采用我室建立的ELISA22抗体夹心法。

1.2.3 TL培养上清液(Tsup)的制备采用略加改良的Ruscetti法[3]，收集Tsup备用，以PHA(广州医药工业研究所)作为TL的丝裂原。

1.2.4 不同CK对BL功能的影响 BL培养系统中分别加入成人Tswp、人IL-4、IL-4单抗(北京医科大学)、IL-6、IL-6单抗(军事医学科学院)及IL-10(Biosource，USA)，观察其对SAC诱导的BL增殖及体外IgG合成的影响。

1.2.5 Tsup中CK水平测定 用IL-6 ELISA测定试剂盒测定(Biosource，USA)测定IL-6水平。IL-4单抗双面夹心ELISA法测定IL-4水平。

1.3 统计学处理 所有数据以OXSTAT-II数据统计软件贮存、转换及运算，结果以$\bar{x}\pm s$表示。

2 结果

2.1 CK对BL增殖反应的影响(表) 所有新生儿SAC诱导的BL增殖反应能力均低于成人$\bar{x}-1s$，但在加放成人Tsup后PI显著增高。IL-4单抗或IL-6单抗可阻断成人Tsup对新生儿BL增殖促进作用。补充IL-4、IL-6及IL-10可部分纠正新生儿低下的BL增殖水平。

* 男，1963-07月出生，副教授，博士研究生

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 B细胞增殖反应及体外IgG产生水平

诱导物及分组	例数	BL增殖 PI($\bar{x}\pm s$)	t	IgG水平 ($\bar{x}\pm s$ ng/ml)	t
新生儿:					
①SAC	18	1.66±0.53		123±63	
②SAC+Tsup	14	2.41±0.62	3.6756**	736±119	18.8142**
③SAC+Tsup+IL-4单抗	10	1.32±0.58	1.5731	127±39	0.1893
④SAC+IL-4	10	2.06±0.53	2.1503*	329±106	6.4955**
⑤SAC+Tsup+IL-6单抗	8	1.81±0.84	0.6872	149±55	0.9585
⑥SAC+IL-6	12	2.08±0.56	2.0859*	187±70	2.6142*
⑦SAC+IL-10	15	2.13±0.62	2.3179**	180±69	2.4747*
成人:SAC	20	4.71±1.00	11.5826	1347±287	19.0438**

Tsup为成人T细胞培养上清液.所有t值为与①项比较所得。
*$P<0.05$. **$P<0.01$

2.2 CK对BL体外产生IgG的影响(表) 新生儿SAC诱导的BL体外产生的IgG水平显著低于成人。成人Tsup可使新生儿合成IgG低下得到明显纠正,但可被IL-4单抗及IL-6单抗阻断,补充IL-4、IL-6及IL-10亦可部分纠正新生儿低下的BL IgG 产生水平。

2.3 Tsup中的CK水平 新生儿Tsup中IL-4(154±44 u/ml)及IL-6(310±47pg/ml)明显低于成人(723±267u/ml及373±52pg/ml),是t值分别为5.5751及3.3410,P值均<0.01。新生儿Tsup中IL-4及IL-6水平降低除均与其BL增殖能力低下呈显著正相关关系(r分别为0.7728及0.7848,P均<0.05)外,亦均与其BL产生IgG水平降低呈显著正相关关系(r分别为0.8913及0.9429,P均<0.05)。

3 讨论

本组资料发现,新生儿低下BL的BL功能可在适当的条件下得到不同程度纠正,提示新生儿BL仍具有较大的增殖及产生Ig的潜力。我们也曾观察到,新生儿BL表达的CD_{40}水平与成人接近(资料未列出),表明新生儿BL功能低下并非BL内在缺陷所致,而其它因素异常可能参与了NIAR的发生。已知BL合成Ig主要受TH的调节,分泌多种CK并改变BL增殖及Ig合成能力是TH的重要调节方式之一[1,2]。本组资料观察到,新生儿低下的BL增殖及IgG合成能力可被正常成人Tsup明显纠正,单抗阻断及CK补充实验进一步表明,这种纠正作用是通过IL-4、IL-6及IL-10实现的。另一方面,CK水平检测证实新生儿Tsup中IL-4及IL-6水平显著低于成人,且与新生儿BL功能低下一致,表明新生儿TL产生的IL-4、IL-6及IL-10水平低下可能是其BL缺乏CK的调节作用而致殖及Ig合成不足的重要原因之一。大量研究已肯定人类TH存在TH_1及TH_2两种亚群,前者主要分泌IL-2、IFN-γ及TNF,参与迟发型变态反应有关的炎症反应并介导细胞免疫应答;后者主要分泌IL-4、IL-6及IL-10,诱导和调节BL合成Ig[4-6]。本文新生儿Tsup中IL-4、IL-6及IL-10水平低下,因而推测其TH_2亚群功能不足并因此引起BL增殖及Ig合成能力降低,导致NIAR发生。

参考文献

1.杨锡强,沈 锦.国外医学儿科分册 1990;4:228
2.涂文伟,杨锡强.国外医学儿科分册 1993;20:228
3.Ruscetti FW:Immunol 1977;119:131
4.David FF,Matha WB,Tim RM et al:Exp Med 1989;170:2081
5.Susan LS,Linda MB,Michael B.et al. Immunol Rev 1991;123:115
6.Richard SJ,Joues RA,Roberts BE.et al. Clin Exp Immunol 1990;81:149

(收稿日期 1997-08-28)

维普资讯 http://www.cqvip.com

Effects of cytokines on function of neonatal B lymphocytes

Chen shi, et al
Department of Immunology, College of Pediatrics

Levels of IL-4 and IL-6 produced by T Lymphocytes(TL) were evaluated in 18 cases of neonatal cord blood. Furthermore, the effects of IL-4, IL-6 and IL-10 on proliferation and IgG production of B lymphocyte(BL) stimulated with Sac were investigatde. The results showde that levets of IL-4 and IL-6 in neonatde were lower than those in adults, and the lowered levels of IL-4 and IL-6 were correlatde with decreased proliferation and Ig production of BL in newborns. Supplement of recombinant IL-4, IL-6 an ' IL-10 can rectify the dysfunction of neonatal BL. Our studies suggest that cytokines insufficiently produced by TL may be an important factor in the lowerde function of neonatal BL.

KEY WORDS Newborns; Cytokines; B lymphosytes; IgG

R329.2 (3)

222-225

小肠粘膜上皮细胞原代培养最适条件的研究

儿科学院外科 伍 烽* 金先庆 吴仕孝 李 镜 王 珊 许嘉陵

提 要 本文定量研究了小肠粘膜上皮细胞原代培养方法的最适条件。Wistar系胎鼠小肠制备成小肠绒毛细胞团悬液，接种于处理后的24孔培养板，采用MTT显色法定量研究影响小肠上皮细胞贴壁生长的各种因素。结果显示培养液质量、培养时间、CO_2浓度、肠绒毛细胞团接种浓度、胎牛血清浓度和加药时间是影响肠上皮细胞贴壁生长的主要因素，并得到了上述因素的最适培养条件。上述研究结果可为体外探讨细胞生长因子和肠营养素对肠上皮细胞结构、功能、生长和分化的影响提供了一种可靠、定量的研究手段。

关键词 小肠；上皮细胞；原代培养；培养条件
中图分类号 R329.2

小肠粘膜上皮细胞是肠道的主要功能细胞。本文在建立大鼠小肠上皮细胞的原代培养方法及其生物学鉴定这一前期工作基础上，采用MTT显色法定量研究影响小肠上皮细胞贴壁生长的各种因素，旨在探讨小肠粘膜上皮细胞原代培养的最适条件。

1 材料和方法

1.1 小肠上皮细胞原代培养[1]

孕龄17－19天Wistar系大鼠(由本校实验动物中心提供)为实验动物，剖宫产术取出胎仔，75%乙醇浸泡消毒10分钟，取出全部胎仔小肠，经机械和胶原酶H(宝灵曼，德国)消化，半沉淀法离心后制成小肠绒毛细胞团悬液，单个绒毛细胞团悬浮于DMEM(GIBCO，美国)培养液中，该培养液同时含胎牛血清(长春生物制品研究所)，10万u/L青霉素和0.1g/L链霉素(华北制药厂)。小肠绒毛细胞团定量接种于用鼠尾胶原处理后的24孔培养板(Linbro，美国)中，4孔为一组，每孔1.5ml，置37°C，二氧化碳孵箱(Shel－Lab，美国)内培养。

1.2 MTT显色法测定肠上皮细胞的生长和增殖[2]

24孔板培养一定时间后，弃培养液，贴壁生长的肠上皮用DMEM液冲洗两次，每孔加入500μl DMEM液和0.5%四甲基偶氮唑盐(Sigma，美国，简称MTT)50μl，再培养4小时，弃液，加入二甲亚砜(MDSO，北京化工厂)200μl，

*男，1962—09出生，副教授