DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.03.019
第23卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 3
290 2001年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)03-0290-03

电离辐射对小鼠腹腔巨噬细胞阴离子通道活动的影响及康复新对其的作用

舒崇湘[1],叶本兰[2],程天民[1],萧家思[2] (第三军医大学:[1]预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所;[2]基础医学部生理学教研室;重庆 400038)

提 要:目的 探讨电离辐射对小鼠腹腔巨噬细胞阴离子通道活动的影响及康复新对其的作用。方法 采用电生理膜片钳离子单通道记录方法。结果 用调理的zymosan刺激腹腔巨噬细胞后,阴离子通道开放的阳性率在受照射组显著减少,且受刺激至通道开放的时间间隔显著延长。受照射组较正常对照组通道开放概率显著降低、开放时间常数缩短而关闭时间常数延长,康复新对正常对照组离子通道活动的影响不显著,但可使照射组的通道开放有一定程度的加强。结论 电离辐射抑制巨噬细胞膜上阴离子通道的开放可能是其抑制巨噬细胞功能的一个重要途径。康复新可减弱电离辐射的这一抑制作用。

关键词:辐射;巨噬细胞;阴离子通道;康复新
中图法分类号:R392.12;R818 文献标识码:A

Effects of irradiation and W_{11}-a_{12} on anion-selective channel of mouse peritoneal macrophage

SHU Chong-xiang, YE Ben-lan, CHENG Tian-min, XIAO Jia-si (Institute of Combined Injury, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effects of irradiation and W_{11}-a_{12}, a kind of repair-promoting drug, on anion-selective channel in membranes of mouse peritoneal macrophage. Methods The activity of anion-selective channel was recorded from cell-attached patches with patch clamp techniques. Results The effects of irradiation on anion-selective channel in membranes of peritoneal macrophage included: ①decreasing the mean number of activated channels by the presence of zymosan; ②prolonging the mean time from stimulus to the opening of channels; ③depressing the opening of channels by decreasing open-state probability, shortening open-time and prolonging close-time. The effects of irradiation could partly be depressed by W_{11}-a_{12}. Conclusion Irradiation will depress the anion-selective channel of peritoneal macrophage, which may be an important way to depress the function of macrophage.

Key words: irradiation; macrophage; anion-selective channel; W_{11}-a_{12}

巨噬细胞(Macrophage, MΦ)在机体的防御功能与创伤修复中起着重要作用,如进行处理抗原参与免疫反应、清除衰老死亡的细胞、分泌多种细胞因子、参与创伤修复等[1],在这些过程中,均伴有膜离子通道的活动。在众多的离子通道中,阴离子通道的活动尤其被人们所重视。该离子通道活动与MΦ的激活有关,而且与吞噬功能活动过程中细胞内钙浓度增高相偶联,阴离子通道的活动可在一定程度上反映MΦ功能状态[2]。故本实验以氯离子为载体,探讨电离辐射对MΦ阴离子通道活动的影响及康复新对其的作用,以期对电离辐射后MΦ功能状态变化的机制有进一步的认识。

1 材料与方法

1.1 实验细胞的制备及实验分组

实验动物:健康昆明种小白鼠20~22 g,由本校动物中心提供。

腹腔MΦ的制备:断离颈椎处死动物,腹腔注射RPMI-1640培养基3 ml,揉动其腹腔,1 min后抽出腹腔液体,冲洗出的细胞用RPMI-1640离心洗涤2次后制成细胞悬液,置入放有小块盖玻片的平皿内,37 ℃温育1 h,弃除未贴壁细胞,备用。

实验分组:细胞分为正常对照组与照射组,其中各组又分为空白对照与康复新作用组。细胞照射:用^{60}Co γ射线照射6 Gy。康复新由云南省大理医学院药理教研室提供,用等渗盐水配成10 mg/ml,4 ℃保存备用。

1.2 仪器设备

膜片钳实验装置:微电极拉制器及微电极抛光仪(PP-83,日本成茂)、膜片钳放大器(CEZ-2200,日本光电)、倒置显微镜、微电极操纵器(SM-21,日本成茂)、数/模转换器(Digidata 1200,美国),pClamp 6.0软件(美国Axon)。

1.3 电极的制备

乏极化电极与玻璃微管电极的制备按Hamill等方法进行。

1.4 实验用溶液

1.4.1 高钾高氯溶液(mmol/L) KCl 145、$MgCl_2$ 1.13、HEPES 20、pH 7.3、TEA 50。

1.4.2 高钠高氯溶液(mmol/L) NaCl 145、$MgCl_2$ 1.13、HEPES 20、pH 7.3、TEA 50。

1.4.3 高钾低氯溶液(mmol/L) K-asp 70、KCl 75、$MgCl_2$ 1.13、HEPES 20、pH 7.3、TEA 50。

1.4.4 盐桥液 KCl 1mol/L、琼脂1 g/L、pH 7.3。

1.4.5 按常规方法调理zymosan,用高钾高氯溶液稀释,应用浓度为100 μg/ml。

由于巨噬细胞膜的静息电位变化范围较大[(-20)~

基金项目:国家"973"重点基础研究项目(G1999054205);重庆市科委院士基金资助项目(98-5081)

作者简介:舒崇湘(1958-),男,安徽省石台县人,博士,副教授,曾从事放射损伤复合创伤方面的研究,发表论文16篇,现在附属大坪医院野战外科研究所放疗科,重庆 400042。电话:(023)68757346

收稿日期:2000-07-19;修回日期:2000-10-16

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(－80)mV], 为避免该特性的影响, 实验中未特别注明时, 电极液与细胞浴液均采用对称性高钾溶液。

1.5　通道电流的记录与数据处理

在倒置显微镜下选择贴壁良好、表面光洁的细胞以 cell-attached 形式与微管电极在室温下(20～22 ℃)形成高阻封接。记录细胞受 zymosan 刺激后通道激活出现通道电流的时间及通道活动状况。

实验由 pclamp6.0.1 计算机软件中 Fatchex 程序进行 gap-free 连续采样。用 Fetchan 与 pstat 程序进行数据处理并用 SPMR 医学统计软件中 PDA-2 程序作单因素方差分析及 t 检验。

2　结果

2.1　Zymosan 激活的巨噬细胞阴离子通道的性质

正常小鼠腹腔巨噬细胞在电极液与细胞液为对称性高钾高氯溶液中封接后 10 min 内无自发通道开放, 见图 1A, 当加入 zymosan 100 μg/ml 后, 出现通道电流, 见图 1B。

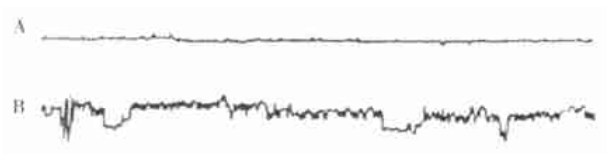


图 1　**Zymosan** 激活的小鼠腹腔巨噬细胞阴离子通道的活动

Fig 1　Activation of anion channels by zymosan particles in membranes of mouse peritoneal macrophage

A: Without zymosan particles; B: With 100 μg/ml zymosan particles

图 2A 为 zymosan 激活细胞后, 电压钳制在－10 mV, 电极液与细胞液为对称性高钾高氯溶液时的通道电流活动。电极液中高钾高氯溶液被高钠高氯溶液取代后, 通道活动无显著变化, 见图 2B。电极液中高钾高氯溶液被高钾低氯溶液取代后, 通道开放显著城少, 通道电流也减小, 见图 2C, 而细胞浴液中高钾高氯溶液被高钾低氯溶液取代后, 通道开放显著增加, 通道电流加大, 见图 2D。钳制电位水平较低时, 膜片中记录到的通道电流与钳制电压有较好的线性关系, 通道平均电导为 400 pS, 该通道活动不被 TEA 所阻断。

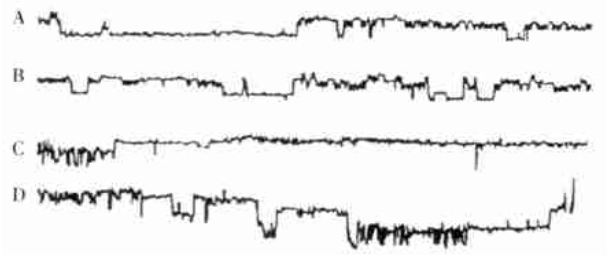


图 2　**Zymosan** 激活的小鼠腹腔巨噬细胞在不同电极液或细胞浴液中的阴离子通道活动

Fig 2　Effects of different electrolyte on the anion channel activated by zymosan particles in membranes of mouse peritoneal macrophage

A: The pipette solution and bath solution were high-K and high-Cl solution; B: The pipette solution was replaced by high-Na and high-Cl solution; C: The pipette solution was replaced by high-K and low-Cl solution; D: The bath solution was replaced by high-K and low-Cl solution

2.2　电离辐射对巨噬细胞阴离子通道激活的影响

受照射后细胞通道激活数较对照组明显减少, 且加入 zymosan 至被激活的平均间隔时间也显著延长, 见表 1。

表 1　电离辐射对 **zymosan** 激活的小鼠腹腔巨噬细胞阴离子通道激活的影响

Tab 1　Effect of radiation on the activation of anion channels by zymosan particles in the membranes of mouse peritoneal macrophage

Group	Number of experiments	Number of activated patches	Mean delay after stimulation (t/min)
Control	15	11(73%)	5.33±1.09
Radiation group	25	13(52%)	7.96±1.34 **

**: $P<0.01$ *vs* control

2.3　电离辐射对 MΦ 阴离子通道开放活动的影响及康复新的作用

6 Gy 照射组通道开放显著减少, 主要表现为通道开放概率减少, 平均开放时间常数缩短, 平均关闭时间常数延长, 但单位电导不变; 照射后加入康复新组较未加康复新组相比, 通道开放增加, 但与正常对照组相比仍显著减少。而正常对照组加康复新后通道活动的变化不显著, 见表 2。

表 2　电离辐射对 **zymosan** 激活的小鼠腹腔巨噬细胞阴离子通道开放活动的影响及康复新的作用

Tab 2　Effect of radiation and W_{11}-a_{12} on the anion channels activated by zymosan particles in membranes of mouse peritoneal macrophage

Group	I(pA)	τ_o(t/ms)	τ_c(t/ms)	Po
C	4.013±0.054	5.494±0.154	135.45±18.51	0.232±0.054
C+K	3.907±0.025	5.742±0.120	126.64±14.88	0.249±0.062
R	3.988±0.030	2.633±0.098 **	223.47±19.89 **	0.089±0.008 **
R+K	4.029±0.067	4.256±0.105 **##	186.13±17.85 **#	0.159±0.025 **##

C: Control; K: W_{11}-a_{12}; R: Radiation group; I: Mean amplitude of channel current; τ_o: Mean constant open time; τ_c: Mean constant of closed time; Po: Open probability; **: $P<0.01$ *vs* C; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* R

3　讨论

3.1　通道性质的鉴别

本实验结果显示, 采用新鲜分离的小鼠腹腔 MΦ 记录不到离子流, 说明新鲜分离的小鼠腹腔 MΦ 处于静息状态, 而受调理的 zymosan 刺激后, MΦ 被激活, 同时产生膜电流。

当在电极液中加入钾离子通道阻断剂 TEA 50 mmol/L, 不能阻断通道活动, 表明该通道为非钾离子通道。用高钠溶液代替高钾溶液, 通道活动无明显变化, 表明该通道活动不受阳离子种类的影响。在电极液中高钾高氯溶液被高钾低氯溶液代替后, 通道离子

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

流显著减弱,而细胞浴液中高钾高氯溶液被高钾低氯溶液代替后,通道离子流则加强,表明该离子通道是以氯离子为载体的阴离子通道。且该通道的电导与文献[2]报道的巨噬细胞膜阴离子通道电导一致。

3.2 电离辐射及康复新对通道活动的影响及其意义

MΦ的功能状态是调控伤后机体修复的重要因素,放射损伤可致的MΦ的吞噬功能与分泌功能降低[3]。而MΦ功能活动的正常有赖于膜电流活动的正常。因此,研究电离辐射对MΦ细胞膜通道活动的影响对进一步探讨放射损伤后巨噬细胞功能抑制的机制是十分必要的。

虽然MΦ的离子通道种类繁多,但这些通道的分布与MΦ的种类、成熟度、功能状态等密切相关[2,4]。MΦ被激活时,大电导的阴离子通道是被激活的唯一的通道类型[2],因此,该通道的活动引起人们的重视。Kolb HA等人对新鲜分离的小鼠MΦ在zymosan调理下的通道活动进行研究,也证实阴离子通道是该条件下能记录到的唯一通道,虽然zymosan浓度的变化对通道激活的数量无影响,但可影响该通道被激活的间隔时间[2]。这些资料表明MΦ的阴离子通道活动与细胞激活密切相关。本实验用调理的zymosan激活MΦ后记录到阴离子通道开放的阳性率为73%,这一结果与文献报道的实验结果接近。在受照射后,记录到的阴离子通道开放率显著减少,且加入zymosan后至细胞被激活出现通道电流的时间间隔也显著延长,表明:电离辐射抑制了MΦ膜上阴离子通道的开放,从而抑制MΦ的激活。此外,对被激活的通道,受照射组也较正常对照组通道开放概率显著降低,平均开放时间常数缩短,而平均关闭时间常数延长,这也从另一个侧面表明了电离辐射对MΦ激活的抑制作用。电离辐射对MΦ膜阴离子通道活动的影响可能是其抑制MΦ功能的一个重要方面。至于阴离子通道的激活与MΦ功能激活之间的详细机制尚在研究之中。

康复新对正常对照组离子通道活动的影响不显著,但可使受照射组的通道开放有一定程度的加强,在一定程度上逆转了电离辐射对MΦ离子通道活动的抑制作用作用。结合我们以前的实验结果[5,6]:康复新可明显促进合并放射损伤的伤口愈合,提示康复新的促愈作用可能与其促进MΦ离子通道开放而促使细胞功能激活有关。

(致谢:云南省大理医学院李树楠教授惠赠康复新原药供本课题使用,谨致谢意!)

参考文献:

[1] 高玉民.人类MΦ功能的研究[A].见:李景泰 著.临床医学分子生物学现状和未来[M].北京:中国科技出版社,1993.64-171.

[2] Elaine K G. Ion channels in leukocytes[J]. Physiol Rev, 1997, 71(3): 775-811.

[3] 宋述强,程天民.电离辐射对创伤愈合的影响及治疗进展[J].国外医学:军事医学分册,1995,12(3):164-167.

[4] 张祝山,朱思明.MΦ的膜电流[J].生理科学进展,1996,27(1):76-78.

[5] 舒崇湘,程天民.康复新对单纯皮肤创面和合并全身放射损伤时的促愈作用[J].第三军医大学学报,1999,21(2):164-168.

[6] 舒崇湘,程天民.5 Gy全身照射对创面几种愈合成份的影响及康复新的促愈作用[J].中华创伤杂志,1999,15(5):331-334.

(编辑 潘式文)

(上接289页)

后,见囊腔位于巩膜层间,囊腔内为淡黄色透明液体,约0.5 ml,11点位角膜缘可见1.5 mm宽的全层裂口,一端与前房相通,另一端与囊腔相通。刮除裂口边缘的上皮细胞,间断缝合裂口和球结膜切口。病理检查:送检灰白色扁平组织1块,大小约0.8 cm×0.5 cm×0.2 cm。镜下观察:送检查组织为增生的纤维组织,其间可见一囊腔,囊壁可见出血及散在淋巴细胞和浆细胞浸润。病理诊断:(右眼)巩膜层间囊肿。术后随访10个月,巩膜囊肿无复发。

2 讨论

外伤性巩膜囊肿多发生于靠近角膜缘的前部巩膜,缓慢增大,前缘通常止于角膜缘,可环绕角膜缘1周,也可出现多发性囊肿。偶见囊肿与前房相通。外伤性巩膜囊肿发生的确切机制尚不清楚,一种可能是,角膜缘或巩膜伤口未缝合或仅由结膜覆盖,结膜或角膜上皮沿未愈合的伤口边缘向内生长,形成囊肿的衬里。另一种可能是,巩膜外伤后,从结膜上皮带入的上皮细胞分化形成囊肿的衬里,衬里与其来源的上皮不相通。本例巩膜囊肿的形成,可能是由于角膜缘伤口的存在,上皮细胞沿伤口边缘向巩膜内生长,另一方面,前房水渗入囊肿内,两种因素作用下,囊腔形成并缓慢增大。由于囊腔内生物环境的改变,囊肿衬里的上皮细胞消失。尽管由于眼科显微手术的普及和对眼球穿通伤处理技术的改进,外伤性巩膜囊肿已非常少见,眼科医生仍然应该想到外伤后发生巩膜囊肿的可能。

关键词:巩膜;外伤性囊肿
中图法分类号:R730.269 文献标识码:B

参考文献:

[1] Prost M. A traumatic cyst of the sclera[J]. Int Ophthalmol, 1991, 15(3): 229-232.

(编辑 郭建秀)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net