DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.01.023

高胆固醇饲料对豚鼠胆囊组织分泌糖蛋白的影响

别 平* 黄志强** 韩本立 段恒春 彭志明 李 昆 陈 莉 (第三军医大学附属西南医院肝胆外科)重庆,400038

提 要 目的:应用组织培养方法,了解高胆固醇饲料对豚鼠胆囊上皮细胞合成分泌糖蛋白(GP)的影响。方法:豚鼠40只,分为普通饲料组(A组)与高胆固醇饲料组(B组),饲养1周。培养胆囊组织,以^{3}H-氨基葡萄糖为底物,测定其合成分泌GP的功能;并加入氢化考的松和腹腔巨噬细胞(Mψ),观测对胆囊组织合成分泌GP的影响。结果:① B组的腹腔Mψ活力较A组明显升高。② 培养B组胆囊组织,释放入培养液中的GP含量比A组显著增加。③ 在B组胆囊组织培养液中加入氢化考的松,胆囊组织释放GP明显受抑。④ 在A组胆囊组织培养液中,加入"普Mψ",胆囊组织释放GP的水平与对照水平接近。加入"高Mψ",浓度较高时胆囊组织分泌GP增强。结论:① 高胆固醇饲料可致豚鼠胆囊组织合成分泌GP功能增强。② 高胆固醇饲料能增强豚鼠Mψ活力,可促进胆囊组织合成分泌GP。结合动物胆囊结石模型实验的结果推测,可能与豚鼠Mψ因高胆醇饲料活化,释放细胞因子TNF、IL-1等有关。

关键词 豚鼠胆囊;高胆固醇饲料;巨噬细胞;糖蛋白;豚鼠

中图法分类号 R657.41

临床研究发现胆囊胆固醇结石患者胆囊组织内巨噬细胞(Mψ)数量增加,且胆囊粘膜内主要由Mψ释放的肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素-1(IL-1)的含量较无结石者明显增加[1]。胆固醇饲料致动物胆囊结石模型的研究证实,肝脏、胆囊组织内Mψ的数量在结石形成之前即明显增多,且吞噬活跃,被活化、释放TNF、IL-1[2]。本研究应用组织培养方法,进一步了解高胆固醇饲料及活化的Mψ对胆囊上皮细胞合成分泌糖蛋白(GP)的影响。

1 材料与方法

1.1 动物

雄性豚鼠40只,平均重250 g/只,普通饲料:参照豚鼠饲养标准配制。1.2%胆固醇饲料:将胆固醇干粉加入普通饲料。按随机原则将豚鼠分为普通饲料组(n=20),高胆固醇饲料组(n=20)。均饲养1周。取胆囊前,每组用7只收集腹腔Mψ。

1.2 收集豚鼠腹腔Mψ

豚鼠饲养1周,麻醉后,注射Hanks液入腹腔,按摩腹壁数分钟,吸出Hanks液,离心(1500 r/min, 5 min, 4℃),弃上清液,破坏红细胞和去除白细胞后,再加RPMI 1640细胞培养液将Mψ浓度调至1.0×10^{7}cell/ml。

1.3 胆囊组织培养[3]

将豚鼠胆囊取下,剪碎,分装入24孔培养板小孔内,加含有10%小牛血清的199组织培养液包被。培养板倒置放入孵箱内(96% O_2、5% CO_2, 37℃),2 h后翻板,加199培养液800 μl、无同位素标记的氨基葡萄糖或^{3}H-氨基葡萄糖(购自上海核物理研究所)等,总量1.0 ml。培养时相分为4、8、16 h。

1.4 测定项目及方法

1.4.1 腹腔Mψ活力测定[4] 分别取两组的豚鼠腹腔Mψ悬液(1.0×10^{7}Mψ/ml) 200 μl,加入96孔培养板小孔内,培养48 h,离心,吸上清液180 μl弃去,加0.2%噻唑蓝50 μl,再培养5 h,最后加入二甲基亚砜150 μl,用酶联免疫测试仪(A=570 nm),测定光密度(D)值,该值表示细胞活度高低。

1.4.2 豚鼠胆囊组织分泌GP能力的测定 应用^{3}H-氨基葡萄糖掺入法[5]。在培养板翻板时加入浓度为100 μCi/ml的^{3}H-氨基葡萄糖100 μl(终浓度为10 μCi/ml)、199培养液100 μl,培养时间同上。测定上清液Bq值。

用上述相同方法,加入氢化考的松和腹腔Mψ,测定其对胆囊组织合成分泌GP的影响。

氢化考的松:在高胆固醇饲料豚鼠胆囊组织培养板翻板时,分别加入1×10^{-6}、10^{-5}、10^{-4} mol/L 3种不同浓度的氢化考的松(为终浓度)100 μl培养16 h,测定Bq值。

腹腔Mψ:在胆囊组织培养液中分别加入两组的豚鼠腹腔Mψ悬液,终浓度为1×10^3、10^4、10^5 Mψ/ml,培养16 h。另加氢化考的松(终浓度为1×10^{-4} mol/L),测定Bq值。

1.4.3 组织培养液内总蛋白的测定 应用Lowry法[6]测定上清培养液中总蛋白含量,以此为标准计算所测指标的含量。

1.5 统计分析

所有统计数据均以$\bar{x}\pm s$表示。

* 别 平,男,40岁,副教授,副主任医师,博士

** 解放军总医院肝胆外科 北京,100000

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

2 结果

2.1 腹腔 Mψ的活力

比较普通饲料与高胆固醇饲料喂养豚鼠 1周后腹腔 Mψ的活力,高胆固醇饲料组的腹腔 Mψ活力明显升高,但差异不明显 ($P < 0.05$)。

2.2 不同因素对胆囊组织分泌 GP功能的影响

2.2.1 高胆固醇饲料　培养普通饲料豚鼠胆囊组织,释放入培养液中^{3}H-GP水平随培养时间延长有明显升高趋势,各时相相差显著。培养高胆固醇饲料豚鼠胆囊组织,释放的^{3}H-GP含量各时相均比普通饲料豚鼠胆囊组织显著增加,见表 1。

表 1 胆固醇饲料对豚鼠胆囊组织分泌 GP的影响

Tab 1 Effects of high cholesterol diet on GP secretion from the gallbladder tissues of guinea pig

Group	^{3}H-GP(36Bq/mg)		
	4 h	8 h	16 h
NorD	6183± 403	9252± 479**	12505± 843**
HchD	8856± 385#	12805± 277**##	15565± 258**##

**: $P < 0.001$ *vs* 4 h in the same group; #: $P < 0.01$, $P < 0.01$, ##: $P < 0.001$ *vs* NorD

2.2.2 高胆固醇饲料+氢化考的松　在高胆固醇饲料组的培养液中加入不同浓度的氢化考的松,培养 16 h,胆囊组织释放 GP均出现明显抑制现象,氢化考的松浓度愈高抑制愈明显,见表 2。

表 2 氢化考的松对豚鼠胆囊组织分泌 GP的影响

Tab 2 Effects of hydrocortisone on GP secretion from the gallbladder tissues of guinea pig

Group	^{3}H-GP	*P*	
	(36Bq/mg)	NorD: HchD Ⅰ	HchD Ⅰ: HchD Ⅱ
NorD group	12505± 843		
HchD group Ⅰ	15565± 258	< 0.01	
HchD group Ⅱ			
+ hydrocortisone 10^{-6}	12914± 1251		< 0.01
+ hydrocortisone 10^{-5}	10344± 383	< 0.001	
+ hydrocortisone 10^{-4}	8534± 344	< 0.01	< 0.001

Incubated 16 h, Unit of hydrocortisone concentration: mol/L

2.2.3 腹腔 Mψ与氢化考的松　在普通饲料组的培养液中,分别加入两种饲料组的豚鼠腹腔 Mψ不同浓度的悬液(简称"普 Mψ"、"高 Mψ")以及氢化考的松。结果示:加入"普 Mψ",改变其浓度,对胆囊组织释放 GP的能力无明显影响。加入"高 Mψ",浓度低时,对胆囊组织分泌 GP功能无甚影响;增加浓度后,则出现明显 GP分泌增强现象。加入"高 Mψ"(10^6 Mψ/ml)及氢化考的松(10^{-4} mol/L)后,胆囊分泌的 GP水平明显下降,见表 3。

表 3 腹腔 Mψ对豚鼠胆囊组织分泌 GP的影响(36Bq/mg)

Tab 3 Effects of peritoneal Mψ on GP secretion from the gallbladder tissues of guinea pig(36Bq/mg)

Group	Peritoneal Mψ(cell/ml)		
	10^2	10^4	10^6
NorD G+"NorD Mψ"	11530± 404	11754± 265	12128± 491
NorD G+"HchD Mψ"	11594± 482	13640± 392*	14885± 315**
NorD G+"HchD Mψ" + hydrocortisone△			9449± 571#

NorD Mψ: Peritoneal Mψ of guinea pig fed with normal diet; HchD Mψ: Peritoneum Mψ of guinea pig fed with high cholesterol diet, Incubated 16 h; △: 10^{-4} mol/L; *: $P < 0.01$, **: $P < 0.001$ *vs* the corresponding concentration of "NorD Mψ",

3 讨论

本实验高胆固醇饲料饲养豚鼠 1周,取胆囊组织培养。给予^{3}H-氨基葡萄糖,掺入胆囊组织细胞合成的 GP中,测定释放至培养液内^{3}H标记的 GP水平,各时相均比普通饲料(对照)豚鼠胆囊组织的水平显著升高。实验结果表明在喂养高胆固醇饲料条件下豚鼠胆囊组织合成分泌 GP的功能明显增强。

动物胆囊结石模型实验发现胆囊及肝脏的 Mψ数量增多、吞噬功能活跃,释放细胞因子 TNF、IL-1[2]。测定高胆固醇饲料喂养 1周的豚鼠腹腔 Mψ的活力,明显高于饲养普通饲料豚鼠的水平。Fan[7]观测高胆固醇血症小鼠腹腔 Mψ的功能变化,发现 Mψ的粘着,伸展、运动等能力明显强于对照的 Mψ。研究表明高胆固醇饲料确能增强实验动物 Mψ的活力。收集喂养不同饲料的豚鼠腹腔 Mψ,加入普通饲料豚鼠胆囊组织培养液中,以此观测对豚鼠胆囊组织合成分泌 GP能力的影响。

在普通饲料豚鼠的胆囊组织培养液内加入"普 Mψ",不论浓度高低,对胆囊组织释放 GP能力无明显影响,与未加"普 Mψ"对照水平接近。而加入"高 Mψ"后,低浓度时,对胆囊组织合成分泌 GP的能力无影响;浓度为 10^6 Mψ/ml时,胆囊组织合成分泌 GP则明显增多。

结合动物胆囊结石模型实验的结果,"高 Mψ"刺激豚鼠胆囊组织合成分泌 GP功能增强,可能与豚鼠 Mψ因高胆固醇饲料活化,释放细胞因子 TNF、IL-1有关。Mψ激活后,释放氧自由基以及与花生四烯酸

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

(AA)代谢有关的酶类 氧自由基、TNF IL-1均有激活磷脂酶 A_2(PLA_2)的作用[8,9],在 PLA_2的作用下,水解组织细胞膜上的磷脂,释出 AA,后者又在酶的作用下衍生为 PGs 血栓素(TXs)、LTs,从而促进胆囊组织合成分泌 GP。

如果在培养液中另入糖皮质激素可明显减弱高胆固醇饲料及"高 Mψ"两种因素对豚鼠胆囊组织分泌糖蛋白的影响,糖皮质激素可增强高胆固醇饲料因素致活的胆囊组织内 Mψ和腹腔"高 Mψ"膜的稳定性,抑制细胞因子 TNF IL-1 PGs等释放;稳定细胞溶酶体膜,避免水解酶类逸出,一则使 PGs的前体 AA释放减少,二则降低与 AA代谢相关的 PLA_2活性,胆囊组织 PGs合成减少等,导致糖蛋白合成分泌水平下降。

本实验结果表明:高胆固醇饲料能增强豚鼠 Mψ活力,可促进胆囊组织合成分泌 GP,其作用机制可能与豚鼠 Mψ因高胆固醇饲料活化,释放细胞因子 TNF IL-等有关。

参考文献

1 别 平,黄志强,韩本立,等.人胆囊组织内巨噬细胞、肿瘤坏死因子、IL-1的含量变化与胆结石的关系.普外基础与临床杂志,1995,2(3):140

2 别 平,黄志强,王敖川,等.胆囊巨噬细胞与胆囊炎症和结石形成关系的动物实验与临床研究.第三军医大学学报,1994,16(6):425

3 Moore J R L, Turner B S, LaMont J R L. Hydrocortisone inhibits mucin secretion from guinea pig gallbladder. Am J Physiol, 1984, 247(4ptl): G427

4 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytoxicity assay. J Immunol Meth, 1983, 65(1): 55

5 LaMont J T, Turner B S, Dibenedetto D, *et al*. Arachidonic acid stimulates mucin secretion in prairie dog gallbladder. Am J Physiol, 1983, 245(1): G92

6 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, *et al*. Protein measurement with the folin reagent. J Biol Chem, 1951, 193(1): 265

7 Fan J, Yamada T, Tokunaga O, *et al*. Alterations in the functional characteristics of macrophages induced by hypercholesterolemia. Vir Chows Archiv B Cell Pathol, 1991, 61(1): 19

8 Gustafson-Svard C, Lilja I, Sjodahl R, *et al*. Cytosolic phospholipase A_2 and cyclooxygenase-2 mediate release and metabolism of arachidonic acid in tumor necrosis factor-α-primed cultured intestinal epithlial cells(INT 407). Scand J Gastroenterol, 1995, 30(10): 1000

9 Georgakopoulos E, McMenamin M, Skouteris G G. Phospholipase A_2 is activated by tumor necrosis factor-α in primary hepatocytes stimulated by deleted form of hepatocyte growth factor. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 217(3): 1263

(收稿: 1997-12-04;修回: 1998-06-03)
(编辑 仇玉福)

Effects of high cholesterol diet on glycoprotein secretion from the gall bladder in guinea pigs

Bie Ping, Huang Zhiqiang, Han Benli, Duan Hengchun, Li Kun, Chen Li. Peng Zhiming(Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To investigate the effects of high cholesterol diet on glycoprotein (GP) secretion from the gall bladder with tissue culture in guinea pigs. Methods: Forty guinea pigs were randomized into two groups, A and B. The animals in group A were fed with ordinary food and those in group B with that containing 1.2% cholesterol for one week. Then the gall bladder tissue was extracted and cultured. GP secretion from the gall bladder was observed using ^{3}H-glucosamine as a precursor. Meanwhile, Mψ was added to the culture medium to investigate its effects on GP secretion from the gall bladder. Results: The activity of peritoneum Mψ and the release of ^{3}H-glucosamine-labeled GP were significantly increased in group B as compared with those in group A. Sixteen hours after Mψ was added to the culture medium, mucin secretion had an evident increase in group B. Hydrocortisone caused a reversible dose-dependent inhibition of GP secretion from the gall bladder in group B and also inhibited the stimulatory effects of Mψ on GP secretion in group A. Conclusion: ① High cholesterol diet can induce the increase of GP secretion from the gall bladder in guinea pigs. ② Mψ can be activated by high cholesterol diet. Combining with the results of the studies on animal model of gall bladder stone, it is hypothesized that the increase in GP secretion from gall bladder might be related to the release of cytokines such as TNF, IL-1 *etc*. from Mψ activated by high cholesterol diet.

Key words gall bladder; high cholesterol diet; macrophage; glycoprotein; guinea pigs

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