DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.01.018

TNF-α 对放烧复合伤小鼠骨髓细胞 IL-3R调节作用的研究

黄定德* 程绍钧** 罗成基 张广运** 郭朝华 (第三军医大学预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所) 重庆,400038

提 要 目的: 研究重组人肿瘤坏死因子α(TNF-α)对放烧复合伤小鼠骨髓有核细胞(BMNC) IL-3R的调节作用。方法: 以放烧复合伤小鼠为模型,观察一次性静脉注入不同剂量的 TNF-α 对 BMNC增殖的影响及 10万 U TNF-α对 IL-3Rα表达及功能、BMNC数量的调节作用。结果:① 静注不同剂量的 TNF-α对放烧复合伤小鼠 BMNC增殖的影响不一;② 10万 U的 TNF-α 1、3 d上调放烧复合伤小鼠 IL-3Rα的平均含量(对阳性率及功能无明显影响),而致 BMNC数量明显降低; 7 d时恢复至对照组水平;③ 10万 U TNF-α 1、3 d致放烧复合伤小鼠 BMNC计数明显降低。结论: 10万 U TNF-α在体内虽能上调放烧复合伤小鼠 IL-3Rα的平均含量而刺激造血,但可能因其同时激活造血调控网络整体效应却抑制骨髓造血。

关键词 放烧复合伤;肿瘤坏死因子α;受体,白介素-3;造血调控;骨髓有核细胞;小鼠
中图法分类号 R818.74

白细胞介素-3(IL-3)刺激造血的功能能否发挥及其强弱,在很大程度上取决于靶细胞膜上白细胞介素3受体(IL-3 receptor, IL-3R)质和量的状况。IL-3R的表达及功能受多种细胞因子的调节。肿瘤坏死因子α(TNF-α)对造血具有双向调节作用[1-3],对 IL-3R的调节也因剂量、作用时间的不同而异[4]。国内对 IL-3R的研究仅见一篇报道[5]。TNF-α 对造血的双向调节作用是否与其对 IL-3R的调节有关尚不完全清楚,放射损伤后 TNF-α 对 IL-3R的调节作用国内外均未见报道。本研究以放烧复合伤小鼠为模型,观察 TNF-α 对 BMNC IL-3Rα表达、功能的调节及其对 BMNC数量的影响,为放烧复合伤后细胞因子治疗提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物及致伤

昆明种健康小鼠,雌雄各半,体重 20~30 g,本校实验动物中心提供。^{60}Coγ源 6 Gy一次性全身照射动物,总剂量 6 Gy,剂量率 11.31~12.32 Gy/min。照后 30 min内致 15% Ⅲ度烧伤。所有动物伤后立即腹腔注射无菌生理盐水 2 ml,创面不作处理。

1.2 动物分组

随机分为 2组① TNF-α 处理组: 伤后立即尾静脉一次性注射 TNF-α;② 对照组: 伤后立即尾静脉一次性注射生理盐水。各组均分为注射后 1、3、7 d共 3个时相点。

1.3 试剂

TNF-α: 北京北路园生物技术有限公司产品,10万 U/支;兔抗小鼠 IL-3Rα多抗: 美国 Santa Cruz公司产品;过氧化物酶标记的链霉卵白素染色试剂盒(Streptavidin/Peroxidase, SP试剂盒): 北京中山生物技术有限公司产品;转染 mIL-3 cDNA的 NIH3T3细胞培养上清(简称含 mIL-3的上清)。

1.4 粒-单系造血祖细胞(CFU-GM)培养

按参照文献[6]方法进行。刺激因子为含 mIL-3的上清。第5天计数 CFU-GM,以> 50个细胞为一集落。

1.5 BMNC的 ^{3}H-TdR参入实验

培养条件同上,总培养时间 72 h,终止培养前 8 h加入 ^{3}H-TdR 37KBq/孔。8 h后收集细胞,液闪仪测计数率。

1.6 IL-3Rα的免疫组织化学法

BMNC涂片,参照 SP试剂盒说明书及文献[7]方法进行。分别计数阳性率、测定单位目标面积的平均光密度(简称平均光密度,真彩色医学图像分析系统中进行)。用阳性率及平均光密度(Average optical density, AOD)对 IL-3Rα的表达半定量。

1.7 统计分析

数据以 $\bar{x}\pm s$表示。采用 Microsoft excel 97软件中的单因素方差分析法进行。

2 结果

2.1 一次性静注不同剂量的 TNF-α 对放烧复合伤小鼠 BMNC增殖的影响

TNF-α 剂量分别为 1×10^4、5×10^4、1×10^5、2×10^5 U, 3 d

* 黄定德,男,28岁,助教,硕士,现在第三军医大学医学检验系核医学教研室工作
** 第三军医大学医学检验系核医学教研室

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

后活杀并观察: 1× 10^4 U组 CFU-GM产率、^{3}H-TdR参入量无明显变化,5× 10^4及 1× 10^5 U组二者明显升高,而 2× 10^5 U组明显降低;各剂量组 BMNC数量均显著下降,见图 1

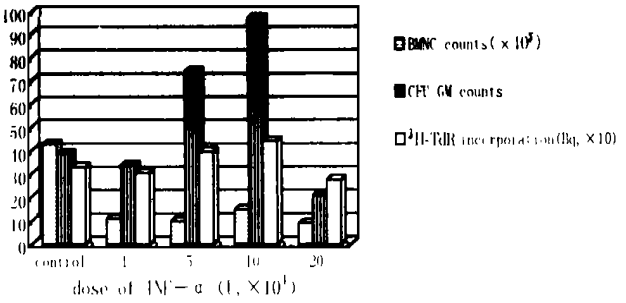


图 1　不同剂量 TNF-α对放烧复合伤小鼠 BMNC增殖的影响

Fig 1　Effects of different doses of TNF-α on the proliferation of BMNC after combined irradiation-burn injury in mice

2.2　一次性静注 TNF-α 10万 U对放烧复合伤小鼠 IL-3Rα表达的影响

注射后 1 3 d,IL-3Rα的 AOD明显高于相应的对照组($P < 0.05$),7 d时与对照组差别不明显;阳性率与对照组差异不明显,见表 1

表 1　10万 U TNF-α对放烧复合伤小鼠 IL-3Rα的 AOD值和阳性率的影响(n= 6)

Tab 1　Effects of 1× 10^5 U TNF-α on the AOD and positive rate of IL-3Rα subunit in BMNC after combined irradiation-burn injury in mice (n= 6)

Group		Time after TNF-α treatment		
		1 d	3 d	7 d
TNF-α	AOD	0.14± 0.030	0.11± 0.036	0.10± 0.039
	Positive rate	0.49± 0.072	0.46± 0.065	0.50± 0.074
Control	AOD	0.09± 0.023	0.075± 0.010	0.087± 0.024
	Positive rate	0.46± 0.028	0.52± 0.059	0.48± 0.069

*: $P < 0.05$ *vs* control

2.3　一次性静注 TNF-α 10万 U对放烧复合伤小鼠 IL-3R功能的影响

注射后 1 3 d,BMNC的 CFU-GM产率及^{3}H-TdR参入量明显升高,7 d时恢复至对照组水平,见表 2　BMNC的^{3}H-TdR参入量与 IL-3Rα AOD的比值,即^{3}H-TdR参入量(Bq)/AOD在各时相点与相应的对照组差异不明显,见表 3(用 BMNC的 CFU-GM产率/AOD的值表示受体功能所得结果与前基本一致,本文未列出)

表 2　10万 U TNF-α对放烧复合伤小鼠 BMNC增殖的影响(n= 6)

Tab 2　Effects of 10^5 U TNF-α on the proliferation of BMNC after combined irradiation-burn injury in mice (n= 6)

Group		Time post TNF-α treatment		
		1 d	3 d	7 d
TNF-α	^{3}H-TdR incorporation(Bq)	168.3± 25.3**	205.8± 106.9*	195.2± 40.5
	CFU-GM count	49± 9*	58± 17*	59± 22
Control	^{3}H-TdR incorporation(Bq)	133.6± 7.8	117.1± 25.4	157.9± 26.8
	CFU-GM count	34± 14	39± 16	43± 19

*: $P < 0.05$,**: $P < 0.01$ *vs* control

表 3　10万 U TNF-α对放烧复合伤小鼠 BMNC ^{3}H-TdR参入量(Bq)/AOD的影响(n= 6)

Tab 3　Effects of a single injection of 1× 10^5 U of TNF-α on the ^{3}H-TdR incorporation(Bq)/AOD value of BMNC after combined irradiation-burn injury in mice (n= 6)

Group	Time after TNF-α treatment		
	1 d	3 d	7 d
TNF-α	1370.2± 324.5	1823.3± 596.7	1780.2± 693.5
Control	1352.9± 257.9	1595.7± 478.0	1483.9± 558.7

2.4　一次性静注 10万 U TNF-α对放烧复合伤小鼠 BMNC数量的影响

注射后 1 3 d BMNC数量明显低于相应的对照组,但 7 d时与对照组无明显差别,见表 4

表 4　10万 U TNF-α对放烧复合伤小鼠 BMNC数量的影响(n= 6)

Tab 4　Effects of a single injection of 10^5 U of TNF-α on the BMNC count after combined irradiation-burn injury in mice (n= 6)

Group	Time after TNF-α treatment		
	1 d	3 d	7 d
TNF-α	47± 15*	18± 5*	38± 12
Control	67± 9	42± 14	49± 18

*: $P < 0.01$ *vs* control

3　讨论

IL-3R由α和β两个亚单位组成。α为 IL-3R特有,能与 IL-3以低亲和力特异结合,从而起动受体激

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

活过程;β为 IL-3 GM-CSF和 IL-5共用,不能单独与 IL-3结合,但能与 α共同构成高亲和力受体,并参与受体后信号转导[8,9]。IL-3只有与其靶细胞膜上的 IL-3Rα特异结合后才能发挥其刺激造血的作用。TNFα主要由单核细胞、T细胞、内皮细胞分泌,近年来发现它是造血调控的主要因素之一:对造血具有双向调节作用,即 TNFα对不同的骨髓细胞系调节作用不一,不同剂量的 TNFα对造血的调节不一,在体与离体结果不一。Jacobsen等[4]认为:TNFα刺激造血作用是通过上调 GM-CSFR和 IL-3R的表达而介导的,它对造血的调控是正向抑或负向取决于集落刺激因子的种类和 TNFα的浓度。

结果表明,静注不同剂量的 TNFα对放烧复合伤小鼠 BMNC的 CFU-GM产率及^{3}H-TdR参入量的影响不同。本实验条件下,BMNC的 CFU-GM产率及^{3}H-TdR参入量的多少与 IL-3R的表达或功能密切相关,即静注 TNFα 1万 U后 3 d,放烧复合伤小鼠 IL-3R的表达或功能无明显变化,5万 U和 10万 U可能上调 IL-3R,而 20万 U则可能起下调作用。各剂量组 BMNC数量均明显低于对照组,表明该剂量 TNFα对放烧复合伤小鼠骨髓的造血功能在整体水平上可能起抑制作用。

本研究在免疫组化的基础上,用 IL-3Rα的阳性率及平均光密度(可反映每个阳性细胞 IL-3Rα的平均含量)来反映 IL-3Rα的蛋白表达量。进一步研究证实,10万 U TNFα在体内 1~3 d内能明显上调放烧复合伤小鼠 IL-3R的平均含量,对阳性率的影响不明显;相应地,BMNC对 mIL-3的增殖反应(^{3}H-TdR参入量及 CFU-GM产率)在 1~3 d内较对照组明显升高。表明 TNFα在体内可以通过上调 IL-3R的平均含量(非阳性率)来增加 BMNC对 IL-3的增殖能力。

在定量 mIL-3作用下,BMNC的^{3}H-TdR参入量及 CFU-GM产率可视为 BMNC对 mIL-3的反应能力。也就是说,^{3}H-TdR参入量或 CFU-GM产率与 IL-3R的平均含量的比值可间接反映 IL-3R的功能。静注 10万 U TNFα后放烧复合伤小鼠 IL-3R的功能在各时相点无明显改变,表明 TNFα在体内可能是通过上调 BMNC IL-3R的平均含量而非其功能来影响造血的。虽然 10万 U TNFα能上调 IL-3R的平均含量而刺激骨髓造血,但它可能同时因影响其它细胞因子及其受体而对骨髓造血起抑制作用,且其抑制作用强于 IL-3的刺激作用。所以本实验条件下,静注 TNFα后 1~3 d BMNC数量明显低于对照组。提示我们:因为 TNFα对造血调节的双向性,应综合考虑各方面的因素,密切注意其用量及用药时间,慎重使用 TNFα。TNFα在体内的半衰期只有 8.5 min,在正常动物,静注 TNFα 10万 U后 8 h,血清中的 TNFα水平已检测不出[10]。本实验表明:静注 10万 U TNFα后 3 d,其对放烧复合伤小鼠 IL-3R平均含量的上调作用及对 BMNC数量的抑制作用仍十分明显,直至用药后 7 d才基本恢复至对照组水平。表明 TNFα对造血的调控可能主要是通过激活体内造血调控网络而发挥间接调节作用。

参考文献

1 Rusten L S, Jacobsen F W, Lesslauer W, *et al*. Bifunctional effects of tumor necrosis factor α on the growth of mature and primitive human hematopoietic progenitor cells: involvement of p55 TNF receptors. Blood, 1994, 83(11): 3152

2 Jacobsen F W, Rothe M, Rusten L, *et al*. Role of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor: inhibition of early hematopoiesis. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(22): 10695

3 蒋 伟,罗成基.肿瘤坏死因子 α对放烧复合伤粒-单系造血作用的实验研究.第三军医大学学报,1997,19(3):234

4 Jacobsen S E, Ruscetti F W, Dubios C M, *et al*. TNFα directly and indirectly regulates hematopoietic progenitor cell proliferation: Role of colony-stimulating factor receptor modulation. J Exp Med, 1992, 175(6): 1759

5 梁旭阳,李树浓,陈 俊.免疫介导小鼠再生障碍性贫血与白细胞介素 3及其受体的关系.中华血液学杂志,1993,14(4):174

6 杨景山 主编.医学细胞化学与细胞生物学技术.北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1995.112~6

7 蔡文琴,王伯 主编.实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术.成都:四川科学技术出版社,1994.8~144

8 Kitamura T, Sato N, Arai K I, *et al*. Expression cloning of the human IL-3 receptor cDNA reveals a share β subunit for the human IL-3 and GM-CSF receptors. Cell, 1991, 66(6): 1165

9 Kitamura T, Miyajima A. Functional reconstitution of the human interleukin 3 receptor. Blood, 1992, 80(1): 84

10 Krammer S M, Carver M E. Serum free *in vitro* bioassay for the detection of tumor necrosis factor. J Immunol Methods, 1986, 93(2): 201

(收稿:1998-09-10;修回:1998-12-11)

(编辑 冷怀明)

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

Regulative effects of recombinant human tumor necrosis factor α on interleukin 3 receptor of bone marrow nucleated cells after combined radiation-burn injury in mice

Huang Dingde, Cheng Shaojun, Luo Chengji Zhang Guangyun, Guo chaohua(Department of Radiation Medicine, Faculty of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To investigate the effects of recombinant human tumor necrosis factor α (RHTNF-α) on interleukin 3 receptor (IL-3R) of bone marrow nucleated cells (BMNCs) after combined radiation-burn injury in mice. Methods: After the combined radiation-burn injury was inflicted on the mice, the effects of RHTNF-α at different doses on proliferation of BMNCs and the regulative effects of a single injection of 10^5 U of RHTNF-α on the expression and function of IL-3Rα and BMNC counts were determined. Results: ① Different doses of RHTNF-α exerted different effects on the proliferation of BMNCs *in vivo*. ② The mean content of IL-3Rα was up-regulated on the 1st and 3rd d but recovered to the normal on the 7th d after the injection of 10^5 U of RHTNF-α. ③ The single injection of 10^5 U of RHTNF-α caused a rapid decrease in BMNC counts on the 1st day after injection and the counts remained low up to the 3rd. Conclusion: A single injection of 10^5 U of RHTNF-α can up-regulate the expression of IL-3R of BMNCs after combined radiation-burn injury, which stimulates hematopoiesis. However, it causes a significant decrease in BMNC counts because of the effects of the hematopoietic network.

Key words combined radiation-burn injury; tumor necrosis factor α; IL-3 receptor; bone marrow nucleated cell; mouse

食管小细胞癌 1例报告

A case report of small-cell carcinoma of the esophagus

李 军* 王明荣 (第三军医大学附属西南医院心胸外科) 重庆, 400038

食管小细胞癌(临床报道)较为少见,现将收治的 1例报告如下。

1 临床资料

某男, 43岁,因下咽梗噎伴吞咽疼痛 1月,于 1996年 1月入院(病程中无明显恶心、呕吐及食欲减退等症状)。查体:颈软,锁骨上及腋窝淋巴结不肿大。胸腹部无阳性体征。食管吞钡拍片提示:食管中段见一长约 5 cm狭窄段,局部管壁僵硬,扩张受限,粘膜紊乱、中断。胃镜检查提示:食管中段鳞状上皮增生。其它检查未发现肝、肺远处转移,诊断为食管中段鳞癌。在全麻下行剖胸探查,术中见肿瘤位于奇静脉上方 2 cm处,长约 2.5 cm× 2.0 cm× 2.0 cm,外侵不明显;区域无淋巴结转移。顺利切除肿瘤,行胃食管左颈部吻合术,术后进普食通畅,无梗阻疼痛。病理报告:食管小细胞神经内分泌癌,出院两月后因腹胀、腹痛再次入院检查,腹部 CT提示肝内多个圆形低密度影,考虑食管癌术后肝内转移。给予卡铂 500 mg静滴,西艾克 3 mg静滴全身化疗一次后症状缓解出院。

2 讨论

日前已知食管小细胞癌的形态学及生物学特征与肺小细胞癌甚为相似。吴名耀等[1]报道从 1 473例食管癌组织切片中发现小细胞癌 30例,其全由小细胞组成,瘤细胞胞浆较少,胞核染色深。细胞常排列成密集片状、带状。免疫组化染色其神经内分泌标记率较高,显示本癌属于 APUD系统肿瘤。食管小细胞癌发病年龄以 50~ 60岁多见,男女比例为 3.8~ 4∶ 1 其临床表现与常见的鳞癌和腺癌相似,肿瘤大体类型及 X线表现为蕈伞型及腔内型,明确诊断一般靠术中切除病灶送组织学病检。术前胃镜检查可明确粘膜病变及向腔内生长情况,对诊断具有提示作用。彩超检查对肿瘤浸润深度,观察周围脏器浸润转移方面有独到之处,对提高诊断及判断病期准确率有明显效果。彭开桂等[2]报告食管小细胞癌在可评价疗效的 131例中,中位生存期和 1年生存率较之鳞癌和腺癌均差,全组仅为 7.6个月和 29%。单独放疗、化疗及手术治疗效果均较差,治疗失败原因主要是远处转移。本例患者手术切除病灶后 2月入院化疗即发现已有肝脏多个转移病灶,故我们认为食管小细胞癌治疗应建立在早期诊断及开展综合治疗,即积极手术,术后早期联合化疗放疗,以延长生存期,提高治疗效果。

关键词 食管肿瘤;小细胞癌
中图法分类号 R735.1

参考文献

1 吴名耀,吴贤英,沈 健.食管小细胞癌的组织学病理及神经内分泌研究.临床与实验病理学杂志, 1995, 11(4): 275
2 彭开桂,葛 霞.原发性食管小细胞癌 5例报告及文献综合分析.肿瘤防治研究, 1994, 21(5): 305

(收稿: 1998-01-13;修回: 1998-11-06)
(编辑 汪勤俭)

* 李 军,男,25岁,医师,学士

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