DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.01.007

缺锌及补锌对儿童淋巴细胞 IL-2, IL-2R系统功能的影响研究*

万志红** 糜漫天 杨家驹 杨镇洲 石元刚 陈学存*** Sandsstead HH**** (第三军医大学预防医学系营养卫生学教研室) 重庆, 400038

提 要 目的: 了解不同补锌方法对缺锌儿童淋巴细胞功能的影响。方法: 140名儿童随机分为试验组(加锌,加微量营养素,锌加微量营养素)和对照组,测定各组儿童 IL-2, IL-2R系统的免疫功能。结果: 3种补锌方法均提高缺锌儿童血清锌浓度,淋巴细胞分泌 IL-2量增多,mIL-2R表达增加及培养上清中 sIL-2R含量增多。其中锌加微量营养素效果最好。结论: 锌通过 IL-2系统介导引起淋巴细胞活化。锌和微量营养素单独使用均可增强儿童免疫功能,联合应用效果最佳,为临床缺锌儿童补锌提供了科学依据。

关键词 缺锌儿童; 淋巴细胞; IL-2; IL-2R
中图法分类号 R151

锌缺乏(Zinc deficiency)是一个世界性问题。在对中国北京的儿童调查中发现有30%儿童存在锌缺乏,而大部分农村儿童情况更为严重,每日摄入锌量仅为RDA(膳食营养供给量标准)的50% (儿童锌 RDA为10 mg)[1,2]。锌缺乏严重影响儿童的生长发育及免疫功能,其机理尚不清楚。由于人体研究的复杂性,国内外研究锌缺乏多为动物实验,或研究少数儿童和缺锌严重病儿的大剂量补锌试验。补锌方法及效果的大规模人体现场实验研究国内外均未见报道。本实验选择重庆市郊区儿童140人为研究对象,分组观察不同补锌方法对儿童淋巴细胞 IL-2系统功能的影响,以探讨锌缺乏影响免疫功能的机制,并寻找一种儿童体内补锌的最佳方法。

1 材料与方法

1.1 对象和分组

选择地理条件、经济文化水平、生活及饮食习惯基本一致某小学学前班0~7岁儿童140人,男女各半,随机分成4组,实验组每组40人,对照组20人,实验前体检无明显慢性疾病。1组: 对照组(Control); 2组: 微量营养素(M); 3组: 锌+微量营养素(Zn+M); 4组: 锌(Zn)。实验3组药片外形一致,成分不同。实验采用双盲法,每人每日一片,按时口服,对照组服安慰剂。实验过程中禁服一切营养补剂。实验时间为10周。

1.2 膳食调查和血清锌测定

从140名儿童中任意抽取25名儿童,连续调查3 d膳食,算出每日摄入营养素量,以了解受试儿童膳食中营养素含量。

按原子吸收分光光度法测定所有受试儿童血清锌浓度。

1.3 主要指标及方法

每组儿童随机选10~12人,于实验开始前和10周后分别抽取静脉血1~2 ml,肝素抗凝,用淋巴细胞分离液按常规方法分离单个核细胞进行实验。

1.3.1 IL-2活性测定 参照文献[3,4]方法稍作改动。

1.3.2 细胞膜白介素-2受体(mIL-2R)表达测定 取PHA活化的细胞,用 Hanks液洗2遍,调浓度为1×10⁶cells/ml,取细胞悬液100μl于尖底离心管中,加入鼠抗人 IL-2R抗体(1:10) 200μl,混匀,置4℃水浴30 min,含2%小牛血清,0.1% NaN_3的D-Hanks洗3次,每次离心1000 r/min 5 min弃上清,留沉淀细胞,每孔加入 FITC标记的羊抗鼠 IgG(1:16) 200μl置4℃水浴30 min,用含2%小牛血清,0.1% NaN_3的 D-Hanks液洗3次,离心弃上清,沉淀细胞用 Hanks液1 ml悬浮,避光,在流式细胞上测定10⁴个细胞,计算阳性细胞数。结果以阳性细胞百分数表示。

1.3.3 可溶性白介素-2受体(sIL-2R)测定[5] 取 IL-2诱生法收集的培养上清,按 sIL-2R试剂盒说明书进行测定(ELT-SA法),结果以 u/ml表示。

药片部分组成成分,见表1。3组包括表中全部成分,2组不含锌,4组单纯加锌不含其它成分。

* 本研究获国际锌、铅基金会及 Trasher基金会资助
** 万志红,女,27岁,实习研究员,硕士 *** 中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所 北京, 100000
**** Preventive Medical and Community Health Division of Health Nutrition, The University of Texas Medical Branch, Galveston, USA

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

表 1　药片成分

Tab 1　Contents of treatments

Ingredients	Amount	Source
Zinc	16 mg	Zinc Citrate
Copper	1 mg	Cu Gluconate
Selenium	20μg	Se yeast
Iodine	90μg	KI
Floride	1 mg	NaF
Manganese	1.5 mg	Mn Citrate
Molybdenim	30μg	Mo AA Chelate
Chromium	30μg	GTF Cr
Retinol	2500 IU	Retinol Acetrate
Cholecalciferol	400 IU	Cholecalciferol
Phytonadione	20μg	Phytonadione
a-Tocopherol	7 mg	DLa-Tocopherol
Thiamine	0.9 mg	Thiamine Monitrate
Pyridoxine	1.1 mg	pridoxine Hydrochloride
Riboflavin	1.1 mg	Riboflavin
Niacin	12 mg	Niacin
Folic Acid	35 mg	Folic Acind
Cyanocobalamin	1μg	Cyanocobalamin

Provided by the General Nutrition Products Company USA

2　结果

2.1　膳食调查结果(表略)

膳食调查发现儿童每日锌摄入量为 6.965 mg,远未达到每日 10 mg的膳食供给量标准,且大部分锌来源于粮食类和奶蛋类,粮食中的植酸干扰锌的吸收,而牛奶,鸡蛋白锌的吸收率较低[6]。这表明,膳食中锌缺乏和锌吸收率不高是儿童缺锌的重要因素。同时发现儿童可能有其它营养素,如 VitA, VitB1,蛋白质等的缺乏。

2.2　儿童血清锌的变化

正常儿童血清锌浓度为 89± 13μg/100 ml[6]。从结果分析,受试儿童的血清锌浓度远远低于正常值,在儿童没有其它影响血清锌浓度的疾病条件下,血清锌可以反映儿童体内锌水平。3个实验组的血清锌均高于各自的基础值($P < 0.05$),对照组无改变。而 Zn+ M组血清锌浓度最高,M组次之,Zn组最低,见表 2。

虽然受试儿童无明显缺锌症状,但从膳食调查和血清浓度结果分析,该受试儿童有边缘锌缺乏。

表 2　补锌对儿童血清锌浓度的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effect of zinc supplementation on children's serum zinc concentration ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Serum zinc concentrationm (μg/100 ml)	
		Baseline	Final
Control	20	70.10± 12.00	79.60± 12.70
M	35	65.50± 14.20	108.30± 24.30△△
Zn+ M	37	70.66± 14.90	129.35± 24.90△△
Zn	40	67.70± 13.40	84.60± 13.70△

△: $P < 0.05$,△△: $P < 0.01$ *vs* baseline respectively

2.3　白介素-2变化

实验前各组儿童淋巴细胞经 PHA刺激后的 IL-2量差异不明显(分别 3.652± 0.67; 3.704± 0.72; 3.762± 0.90; 3.69± 0.61)。实验 10周后,3个实验组 PHA刺激产生的 IL-2均显著增高($P < 0.05$)。而且 Zn+ M组效果最为显著(为 5.786± 0.41),优于 Zn组和 M组(分别为 5.178± 0.49; 5.124± 0.98; $P < 0.05$),Zn组和 M组之间差异无显著性。

2.4　细胞膜白介素-2受体表达的变化

流式细胞分析显示,与对照组相比较,实验组 mIL-2R表达显著增加($P < 0.05$),Zn+ M的作用显著高于 Zn组和 M组($P < 0.05$),而 M组与 Zn组的作用相互比较差别不显著,见表 3

表 3　细胞膜白介素-2受体表达的($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Changes of membrane IL-2 receptor expression ($\bar{x}\pm s$)

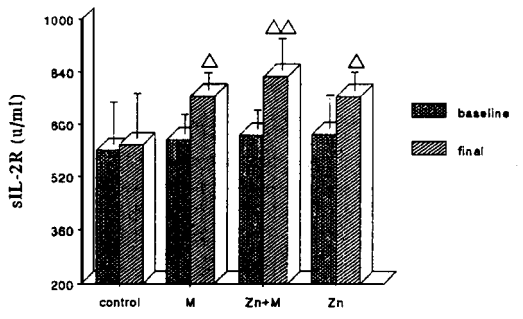
Group	n	mIL-2R(%)	
		Baseline	Final
Control	10	24.69± 1.14	26.14± 3.35
M	10	23.94± 2.81	34.94± 2.38△*
Zn+ M	10	22.79± 1.88	39.94± 1.72△*#
Zn	10	22.93± 2.54	36.47± 1.79△*

△: $P < 0.01$ *vs* baseline respectively;* : $P < 0.01$ *vs* control;# : $P < 0.05$ *vs* M

2.5　可溶性白介素-2受体(sIL-2R)的变化

实验组培养上清中可溶性介素 2受体浓度增加($P < 0.05$),Zn+ M组比 Zn组和 M组 sIL-2R升高更为显著($P < 0.01$)。Zn组和 M组之间差异不明显,见附图。

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



附图 可溶性白介素-2受体的变化

Fig Changes of sIL-2R production

△: $P < 0.05$, △△: $P < 0.01$ *vs* baseline respectively

3 讨论

IL-2是一种多肽生长因子,可刺激淋巴细胞增殖分化。抗原或有丝分裂原刺激可以使上的小淋巴细胞从 $G_0 \rightarrow G_1$期,诱导 IL-2产生和 IL-2R表达,而 IL-2R和 IL-2结合后,又可以诱导细胞周期从 $G_1 \rightarrow$ S期,促命名淋巴细胞增殖分化。因此,在淋巴细胞活化中 IL-2和 IL-2R起着重要作用。锌可能通过 IL-2, IL-2R系统介导增强淋巴细胞免疫功能的作用。 Miller[7]在研究中发现并非所有淋巴细胞对锌有依赖性,只有 CD_4细胞对锌的刺激敏感,而 Tanaka[8]也证实锌刺激的 CD_4^+细胞增殖明显。 CD_4^+细胞有诱导和增强免疫应答的作用,主要功能是分泌淋巴因子如 IL-2 本实验结果表明实验组均可以显著提高儿童淋巴细胞分泌 IL-2的能力,锌组和微量营养素组差异不明显,但锌+ 微量营养素组对 IL-2分泌增强效果最明显。因此,锌可能通过活化 CD_4^+ T淋巴细胞分泌 IL-2参与增强免疫应答的作用。

锌引起淋巴细胞增殖活化分泌 IL-2增加,但 IL-2必须与高亲和力的 IL-2R结合才能发挥作用。本实验用细胞仪检测淋巴细胞膜高亲和力 IL-2R表达,结果显示:实验组儿童淋巴细胞膜 IL-2受体表达显著高于对照组,在 3个实验组中,锌组与微量营养素组无显著差别,而锌+ 微量营养素组受体表达率最高。淋巴细胞受刺激 20 min蛋白激酶(PKC)浓度增加, 2 h后即可检测出 IL-2受体表达增加,已证实锌是 PKC的组成部分,可以引起淋巴细胞 PKC转位活化。而 PKC在淋巴细胞增殖中发挥着重要作用[9]:增强细胞从 $G_0 \rightarrow G_1$期,增强 IL-2R表达,增强辅助 T淋巴细胞分泌 IL-2,促使 IL-2和 IL-2R结合引起细胞从 $G_1 \rightarrow$ S期增殖。因此推测本实验补锌后,淋巴细胞 IL-2R表达增加, IL-2分泌增加,淋巴细胞增殖,可能与锌促进 PKC活化有关。

sIL-2R是来自细胞 mIL-2R的可溶性形式,可由抗原或有丝分裂原刺激的免疫活性细胞,尤其是 T淋巴细胞产生并释放入血清或培养上清。在本实验中,对照组 sIL-2R含量较低,经锌刺激后 sIL-2R含量明显增高,且锌+ 微量营养素组含量最高。 mIL-2R的表达是 T淋巴细胞活化增殖所必需的,有研究显示在一定时间内随着 mIL-2R表达的增加,产生 sIL-2R随之增加。后者在一定程度上可以反映淋巴细胞增殖状态[5, 10]。

综上所述,补充锌和补充微量营养素后均提高儿童血清锌含量,锌可以使淋巴细胞分泌 IL-2增加, mIL-2R表达增加,通过 IL-2系统介导增强淋巴细胞增殖功能。而锌+ 微量营养素既补充了锌的来源,又使肠道中锌的吸收率增加,因此锌和微量营养素联合使用免疫增强效果最好。因此我们建议对缺锌儿童应在补锌同时补充其它微量营养素,这样才能更有效地改善因缺锌引起的免疫功能低下。

参考文献

1 Sandstead H H. Zinc deficiency: A public health problem. Am J Dis Child, 1991; 145(8): 835

2 陈褚建.儿童锌代谢.营养状况评价与需要量.国外医学:卫生学分册, 1996; 23(3): 149

3 曲卫敏.陈 京.促甲状腺激素释放激素对荷瘤鼠 NK和 IL-2活性的影响.上海免疫学杂志, 1996; 16(3): 152

4 Driessen C. Inductionon of cytokines by zinc ions in human peripheral blood monoclear celes and separated moncyts. Lymphokine Cytokine Res, 1994; 13(1): 15

5 富 宁,王桂兰,王 莉. sIL-2R释放与 T细胞活化的相关性研究.免疫学杂志, 1994; 19(1): 20

6 朱莲珍主译校.人和动物的微量元素营养.青岛:青岛出版社, 1994: 413~ 420

7 Miller G G, Strittmatter W J. Identification of human T cell that repuir zinc for grow. Scand J Immunol, 1992; 36(2): 269

8 Tanaka Y, Shiozawa S, Morimoto I *et al*. Role of zinc in interleukin2 (IL-2) mediated T cell activation. Scand J Immunol, 1990; 31(6): 547

9 Droge W. Protein kinase c in T-cell regulation. Immuno Today, 1986; 7(11): 340

10 Shahabuddin S. Expression and release of IL-2 receptor and production of IL-2 by activated T lymphocyte subsets. J Clin Lab Immunol, 1991; 36(1): 37

(收稿: 1996-08-29;修回: 1997-10-24)

(编辑 汪勤俭)

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

Effects of zinc deficiency and supplementation on functions of lymphocytic IL-2 and IL-2R systems in preschool children

Wan Zhihong, Mi Mantian, Yang Jiaju, Yang Zhengzhou, Shi Yuangang, Chen Xuecun, Sandstead HH (Department of Nutrition and Food Hygiene, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To investigate the effects of three regimens of zinc supplementation on lymphocytic function in preschool children. Methods: One hundred and forty preschool children were randomized into four groups according to the regimens of zinc supplementation: zinc group (ZG), micronutrient group (MG), zinc+ micronutrient group (ZMG) and control group (CG). On the 10th day after the supplementation, the immune functions of lymphocytic IL-2 and IL-2R systems were measured in all the children. Results: The concentration of serum zinc, production of lymphocytic IL-2, content of soluble IL-2R and expression of membrane IL-2R were all significantly increased in the three experimental groups as compared to the control. Meanwhile, the supplementation of zinc+ micronutrient was the best method among the three. Conclusion: Zinc activates lymphocytes through IL-2 and IL-2R systems. Zinc or micronutrient along can enhance immune functions in children, but zinc+ micronutrient is the best. These provide a scientific method for zinc intervention in children.

Key words zinc deficiency; lymphocyte; interleukin-2; interleukin-2 receptor; preschool child

严重烧伤大鼠肾脏热休克蛋白的表达及其细胞保护作用

Expression of heat shock protein and its cytoprotection effects in rat kidney after severe burns

刘 理* 杨宗城 黎 鳌 吴 军 罗向东 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所) 重庆, 400038

严重烧伤后缺血-再灌流损伤是烧伤后多脏器功能障碍的重要原因。如何防止烧伤后缺血再灌流损伤是目前重要的研究课题。热休克蛋白 (HSPs)是一种应激蛋白,在从原核细胞到人类都呈现出高度保守性,并在损伤性因素作用下快速合成。现在已经证明: 热休克蛋白参与许多重要的生理学过程,包括新合成多肽的移位、蛋白质的成熟、折叠和降解。由于应激反应是细胞在应激条件下的一种基本防御机制,而且热休克蛋白已经被发现对热应激和其他应激模型 (如心肌缺血再灌注损伤)有细胞保护作用。因此在肾缺血再灌注损伤中它也可能存在细胞保护作用。帮本实验旨在观察严重烧伤大鼠肾脏热休克蛋白的表达及其对细胞的保护作用。

根据实验目的,采用 RT-PCR和原位杂交观察肾脏 HSP72 mRNA变化;用免疫印迹和免疫细胞化学观察蛋白质表达的变化和分布。在热预处理与非预处理组,通过观察氧化应激、细胞凋亡、细胞骨架和阻离子位点的变化来了解热休克蛋白的细胞保护功能。

结果与总结:① 烧伤早期大鼠肾脏热休克蛋白表达是逐渐增加的,到 24 h,其 mRNA和蛋白质均处于高表达水平。② 热预处理后大鼠肾脏热休克蛋白的表达峰值是在 6~ 12 h,在 24 h其表达水平仍比正常对照高。③ HSP72在近曲小管、远曲小管、集合管和髓袢上皮细胞均有分布。主要存在于细胞浆中。④ 热预处理后大鼠肾脏 MDA含量低于烧伤组; SOD CAT Na^+-K^+ ATPase活性高于烧伤组。提示热预处理增强了细胞的抗氧化能力。⑤ 热预处理后大鼠肾脏 G-actin含量高于烧伤组;上皮细胞微绒毛脱落减少,提示热预处理对细胞骨架的保护作用。⑥ 热预处理大鼠肾小管上皮细胞阴离子位点没有明显下降,提示热预处理有抑制阴离子位点减少的作用。

关键词 烧伤;肾脏;热休克蛋白;反转录聚合酶链式反应
微丝;凋亡自由基;阴离子位点

中图法分类号 R644

(收稿: 1997-11-26;修回: 1998-01-06)

(编辑 王 红)

* 刘 理 男, 35岁,主治医师,讲师,博士研究生,现在附属新桥医院肾内科 重庆, 400037

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