DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.06.018

老化对肝脏枯否细胞骨架结构及其吞噬功能的影响*

孙文兵 韩本立 彭志明 戢 强 李 昆 陈 娟 王槐志 马瑞亮 (第三军医大学附属西南医院肝胆外科中心) 重庆, 630038

提 要 以肌动蛋白、肌球蛋白和波形蛋白3种细胞骨架要份为指标,研究了6、12、18和24月龄大鼠肝脏枯否细胞(KC)骨架成份的改变,并分析了这种改变与吞噬功能变化的关系。结果表明,随着月龄的增加,KC骨架成份的分布明显改变,含量明显降低,以24月龄组为显著,3种骨架成份分别降为6月龄组的68.0%、84.9%和75.5%,而且这种降低与吞噬功能改变呈明显的正相关。结果提示,KC老化时细胞骨架呈明显的老化状态,这可能是老化的KC功能降低的机理之一。

关键词 老化;枯否细胞;细胞骨架;吞噬功能;大鼠

中图法分类号 R329.24

肝脏枯否细胞(KC)是机体免疫监视机理组成部份,其功能老化被认为与老化机体感染和恶性肿瘤的易感性有密切关系[1]。细胞骨架系统是KC吞噬功能的重要结构。研究老化对它的影响有助于进一步阐明KC老化时吞噬功能降低的机理。本研究探讨老化KC骨架结构的改变及其与吞噬功能改变的关系,旨在为进一步研究KC老化的机理开辟新的途径。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

Wistar大鼠,四川省中药研究所动物室提供,雌雄不拘。每隔6个月进行繁殖,一次获得4组,即6、12、18和24月龄组。每组6只,共24只。

1.2 KC的分离与培养

按文献[2]中的方法进行。1%戊巴比妥钠腹腔内注射麻醉(30 mg/kg),经门静脉插管以15 ml/min的速度向肝脏灌注37℃的Hanks液(含EDTA 1 mmol/L、NaCl 0.83%、KCl 0.05%、HEPES 10 mmol/L,不含Ca^{2+}、Mg^{2+},pH 7.4),同时行下腔静脉插管供灌注液流出和胶原酶循环。灌注5 min后肝脏颜色变白,再以0.05%胶原酶(Type Ⅳ, Sigma)灌注至肝脏弹力下降,表面出现细小液泡时剥去包膜,取下肝脏,剪成2~3 mm^3的组织块,37℃水浴振摇5 min,60μm不锈钢网过滤后成为细胞悬液,4℃,50×g离心40 s,3次,去除HC,低渗法除红细胞,得非实质肝细胞。37℃、95% O_2、5% CO_2条件下用RPMI 1640培养液(含10%小牛血清、HEPES 15 mmol/L、胰岛素0.05 U/ml、L谷酰氨15 mmol/L、青霉素100 IU/ml、链霉素100μg/ml)培养30 min,去未贴壁细胞,得贴壁KC。聚苯乙烯乳珠吞噬功能检查,KC纯度>95%;台盼蓝染色,细胞活性>90%。

1.3 KC骨架成份的分布特点和含量测定

1.3.1 肌动蛋白 根据G-肌动蛋白与鬼笔毒环肽(Phalloidin)具有强亲合力的特点,采用TRITC标记的鬼笔毒环肽(Sigma)行KC肌动蛋白分布特点的观察和含量测定[3]。

1.3.2 肌球蛋白和波形蛋白 应用抗肌球蛋白抗体和抗波形蛋白抗体(均为Sigma产品)行免疫组化染色[4]。将每一标本用40倍物镜(Olympus VANOX, AHB-LB)采集5幅图像,用Panasonic CL320摄像机摄取后存于CMIAS007型图像分析仪计算机中。每幅图像随机选择4个KC,采用真彩色图像分析系统(空军总医院生物医学工程研究所研制)行阈值分割及编辑处理。两种蛋白成份含量用细胞平均灰度表示。

1.4 KC吞噬功能的定量测定

采用文献[5]中的方法进行。将KC接种于6孔培养皿,2×10^6个/孔,培养液为含10%小牛血清的RPMI 1640,6 h后加入聚苯乙烯乳珠(D 1.1μm, Sigma),1.7×10^8个/孔,60 min后用RPMI 1640漂洗3次,然后在相差倒置显微镜下(SXJ-D,重庆光学电器厂)进行KC内聚苯乙烯乳珠计数,把所吞聚苯乙烯乳珠数量表示为其吞噬功能。每批培养细胞中随机选取20个KC计数,每组动物观察5只,共100个。

1.5 统计学处理

采用医用统计程序集(上海科技出版社)行方差分析和相关分析。

2 结果

2.1 不同月龄组KC肌动蛋白、肌球蛋白和波形蛋白的分布特点

6月龄组和24月龄组KC肌球蛋白和波形蛋白的组织化学观察见附图。如附图所见:6月龄组KC较大,呈扁平状,表面有许多伪足,肌球蛋白集中于伪足及其周围,肌动蛋白在胞质

* 全军"八五"攻关项目

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

和伪足区域都可看到。波形蛋白阳性纤维遍布整个胞质,而且在核周围亦有集聚。24月龄组 KC明显变小、变圆,伪足数量减少,肌动蛋白荧光强度明显变弱,肌球蛋白和波形蛋白组织化学染色亦明显变淡。



附图 6月龄(a b)和 24月龄(c d)KC肌球蛋白和波形蛋白的分布特点 (ABC× 400) a c:肌球蛋白;b d:波形蛋白

Fig Distribution of myosin and vimentin of 6-month-old (a, b) and 24-month-old (c, d) Kupffer cells (ABC× 400) a and c: myosin; b and d: vimentin

2.2 各组 KC3种骨架成份定量测定

随着月龄的增加,3种细胞骨架成份均呈明显降低的趋势。18和 24月龄组均明显低于 6月龄组,并以 24月龄组为甚。3种骨架成份分别降为 6月龄组的 68.0%、84.9%和 75.5%(P均 <0.01),见附表。

附表 各月龄组 KC 3种骨架成份含量($\bar{x}\pm s$)

Table The content cytoskeletons of 3 kinds of Kupffer cell in different age groups ($\bar{x}\pm s$)

Age (month)	Actin ($n=6$) [w_B/ng(phalloidin)·μg^{-1}(protein)]	Myosin ($n=5$) (grey scale)	Vimentin ($n=5$) (grey scale)
6	8.63± 0.60	134.88± 8.14	137.50± 5.71
12	8.24± 0.53	141.46± 5.18	129.91± 7.01
18	6.20± 0.71**	121.89± 7.52*	118.13± 13.54*
24	5.87± 0.49**	114.45± 5.09**	103.08± 8.41**

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* 6 month

2.3 各组 KC吞噬功能

6、12、18和 24月龄组 KC吞噬功能分别为(19.6± 2.1)个、(20.8± 2.1)个、(12.7± 1.5)个和(8.6± 2.3)个。与 6月龄组比较,18和 24月龄组明显降低($P<0.05$)。

2.4 相关性分析

各组 KC肌动蛋白、球蛋白和波形蛋白含量的改变与吞噬功能的改变呈明显的正相关,r值分别为 0.96($P<0.05$)、0.99($P<0.01$)和 0.95($P<0.05$)。

3 讨论

老化是指机体随着生存时间的增长发生的生理机能进行性降低,它在许多老年医学现象的发生和发展中起着决定性的作用[6]。因此,老化机理的探讨亦日益受到人们的重视。

KC是机体单核巨噬细胞系统的主要组成部分,在机体感染创伤等应激并发症转归的过程中发挥着重要的作用。研究表明,KC老化时功能降低是老化宿主主内毒素血症时病理生理改变更加明显的重要原因[7]。因此,探讨 KC老化时功能降低的机理具有十分重要的意义。

本实验以 24月龄大鼠作为老化大鼠模型,该月龄段大鼠的机体老化程度相当于人类的 65岁~ 75岁,与我国制定的老年人标准基本吻合,所以它是研究老化 KC的理想模型[2]。

KC吞噬活动发生的机理尚不完全明确。现已证实,KC吞噬的前提是细胞壁皱折和伪足的形成,后者又被认为是通过细胞骨架结构介导的,在细胞骨架结构中,Ca^{2+}和钙调蛋白(CaM)参与的肌动蛋白和肌球蛋白的相互作用对于 KC吞噬功能起着重要作用[8],具体地讲,细胞内 Ca^{2+}浓度的变化导致 Ca^{2+} CaM活性复合物的形成,后者激活依赖 Ca^{2+} CaM的蛋白激酶使肌球蛋白轻链磷酸化形成磷酸化肌球蛋白,后者与肌动蛋白结合作用引起细胞膜和伪足的运动,形成吞噬活动。

波形蛋白是又一重要的细胞骨架成份,它存在于中胚层起源的所有细胞,在胞质内以放射状排列,形成肌动球蛋白系统和各细胞器得以按序排列的框架结构,当细胞受外力损伤时,它们通过张力的变化可使细胞保持一定的形态,免受外界损伤因素的侵害。

对 KC骨架结构分布特点的研究结果表明,6月龄组 KC肌动球蛋白结构多分布于细胞皱折或伪足周围,波形蛋白的分布遍布整个胞质;老化 KC肌动球蛋白系统的分布较为弥散,而且浓度明显降低,波形蛋白

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

着色也明显变淡。

结果还表明,KC老化时骨架成份含量明显降低,而且与 KC吞噬功能的改变呈明显的正相关,表明老化 KC骨架系统亦呈明显的老化状态。提示作为动力发生器的肌动球蛋白系统和作为细胞框架支撑物的波形蛋白的损害是老化 KC吞噬功能降低的重要机理。

参考文献

1 Brouwer A, Parker S G, Hendriks H F *et al*. Production of eicosanoids and cytokines by Kupffer cells from young and old rats stimulated by endotoxin. Clin Sci, 1995; 88: 211

2 孙文兵,韩本立,彭志明等.肝脏枯否细胞老化模型的建立和评价.中华老年医学杂志, 1995; 14: 357

3 Wulf E, Deboben A, Bautz A *et al*. Fluorescent phallotoxin, a tool for the visualization of cellular actin. Proc Natl Acad Sci USA, 1979; 76: 4498

4 Hirose M, Watanabe S, Ueno T *et al*. Pertussis toxin-induced redistribution of cortical actomyosin and inhibition of phayocytosis in rat Kupffer cells. J Gastroenterol Hepatol, 1993; 8: 348

5 孙文兵,韩本立,陈 娟等.老化对肝脏枯否细胞吞噬功能及受损易感性的影响.中华实验外科杂志, 1995; 12: 263

6 Albright J W, Albright J F. Ageing alters the competence of the immune system to control parasitic infection. Immunol Lett, 1994; 40: 279

7 Knook D L, Brouwer A. Kupffer cells and the acute phase response: the effect of aging. Immunol Invest, 1989; 18: 339

8 Bretscher A. Microfilament structure and function in the cortical cytoskeleton. Ann Rev Cell Biol, 1991; 7: 337

(收稿: 1996-03-25;修回: 1996-11-08)

(编辑 冷怀明)

Effects of aging on cytoskeleton system and phagocytic function of Kupffer cells in rats

Sun Wenbing, Han Benli, Peng Zhiming, Ji Qiang, Li Kun, Chen Juan, Wang Huaizhi, Ma Ruiliang (Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract The changes of the cytoskeleton system of Kupffer cells (KCs) in rats with various ages 6, 12, 18 and 24 months respectively were investigated using actin, myosin and vimentin as indices and the relationship between these changes and those of the phagocytc function of KCs was also studied. It was found that the distribution of the three components of the cytoskeleton system mentioned above were significantly changed and their contents remarkably decreased. The most significant changes were found in KCs of 24-month-old rats, that is to say, the contents of the three components were respectively decreased to 68.0%, 84.9% and 75.5% of those in KCs of 6-month-old rats. These decrements were positively correlated with the changes of phagocytic function of KCs. Our findings suggest that the cytoskeleton system of KCs in aged rats presents an evident status of senescence, which may be one of the mechanisms for the decrease of phagocytic function of KCs in aged rats.

Key words aging; Kupffer cell; cytoskeleton; phagocytic function; rat

椎管内肠源性囊肿一例报告

Report a case of enterogenous intraspinal cysts

林江凯 李 强 王宪荣 (第三军医大学附属西南医院脑外科) 重庆, 630038

椎管内肠源性囊肿较少见,作者遇到 1例,报告如下。

患者,女, 15岁。因腰背痛 1年,双下肢感觉异常、无力半年入院,病程中症状曾减轻。查体: 双下肢肌力II 级,肌强力高, T_{10}以下感觉减退,下腹壁反射弱,下肢腱反射亢进,双侧 Babinski征阳性。MRI示: $T_{8,9}$椎间隙平面硬脊膜下长 T_1、长 T_2 病变,与脑脊液信号一致,边缘锐利, 1.2 cm× 1.0 cm,考虑为脊髓前方囊肿性病变。在全麻下行后入路椎管探查,术中发现囊肿位于脊髓腹侧,与脊髓轻度粘连,包膜较蛛网膜厚略混浊,囊内为无色清亮液体,切除大部分囊壁,术后运动,感觉逐日好转,至一周时症状消失,双下肢肌力V 级。病理报告: 肠源性囊肿。复查 MRI,病变消失,脊髓前方压迹基本消失。

(下转 524页)

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