DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.02.047

参考文献

1 孙士勇译.DNA探针技术.北京:科学出版社,1992:10

2 蔡文琴,王伯沄 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,1994:422

3 苏慧慈.原位杂交.北京:中国科学技术出版社,1994:74

(收稿:1995-06-17;修回:1995-12-20)

(编辑 冷怀明、汪勤俭)

肝癌病人手术前后NK细胞、mIL-2R、sIL-2R、TNF水平的检测

Detetion of NK cell, mIL-2R, sIL-2R and TNF in patients with liver carcinoma before and after operation

黄兴玉 张援平 蔡学敏 刘倩予 (第三军医大学附属西南医院检验科) 重庆,630038

本文对肝癌病人手术前后外周血NK细胞活性,膜白细胞介素-2受体(mIL-2R)表达,可溶性白细胞介素-2受体(sIL-2R)和TNF水平进行了检测,初步探讨了肝癌手术前后细胞免疫功能的变化,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 研究对象

原发性肝癌30例,均经病理切片证实。男24例,女6例。年龄30~68岁。全部在手术前采血,其中10例在手术后3周采血复查。正常对照组为我院健康献血员30例。男18例,女12例,年龄20~39岁。

1.2 试剂及方法

1.2.1 NK细胞活性 肝素抗凝全血用淋巴细胞分层液分离出淋巴细胞作为效应细胞,K_{562}细胞株(重庆医科大学病生教研室提供)作为靶细胞。采用LDH释放法[1]测定NK细胞活性。

1.2.2 mIL-2R表达 肝素抗凝全血经适量PHA诱导激活淋巴细胞,按常规分离淋巴细胞收集单个核细胞,洗涤后手工涂片,采用免疫酶标(ABC)组化法(美国VECTOR产品),IL-2R单抗(Tac)(卫生部武汉生物制品所)光镜下计数200个以上细胞,算出阳性细胞百分率。

1.2.3 血清sIL-2R测定 采用夹心ELISA法[2],(第四军医大学试剂盒),酶标仪490 nm测吸光度,根据计算机拟合方程采用双对数直线回归求出血清sIL-2R含量。

1.2.4 血清TNF测定 采用双抗体夹心法(军事医学科学院试剂盒),490 nm测吸光度,根据计算机拟合方程采用指数回归求出待测血清TNF含量。

1.2.5 统计学处理 用第三军医大学数学教研室医用数理统计程序包,所得数据经微机处理。

2 结果

肝癌病人的NK细胞活性、mIL-2R表达明显低于正常对照组。sIL-2R、TNF水平明显高于正常对照组。

10例肝癌病人手术后3周NK细胞活性和mIL-2R有不同程度升高,高于术前,低于正常对照组。sIL-2R和TNF有不同程度下降,但未恢复至正常水平(见附表)。

附表 肝癌病人与正常人NK细胞活性、mIL-2R、sIL-2R、TNF水平变化比较($\bar{x}\pm s$)

项目	正常对照组	肝癌病人组	
		手术前($n=30$)	手术后($n=10$)
NK细胞活性(%)	35.57±11.14	19.85±9.22△△	28.22±13.45△*
mIL-2R (%)	45.99±9.87	22.76±6.75△	32.02±10.34△*
sIL-2R (μ)	36.85±17.24	90.08±31.51△△	50.11±22.17△
TNF (μg/L)	0.91±0.23	4.586±1.824△△	2.82±0.85△

△:与正常对照比较 $P<0.05$;△△:与正常对照比较 $P<0.01$;*:手术后与手术前对照比较 $P<0.05$

3 讨论

NK细胞在机体免疫监控中占有重要地位,其活性高低与肿瘤的发生发展密切相关[3]。它是机体抗肿瘤生长,扩散和转移的自然防御系统。许多研究发现,恶性肿瘤病人外周NK细胞数量减少,活性降低[4]。本

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

研究也发现肝癌病人NK细胞活性显著低于正常，术后3周NK细胞活性有不同程度上升，与文献报道结果一致。IL-2通过淋巴细胞表面IL-2R结合，诱导T淋巴细胞增殖，促进NK细胞细胞活性，诱生LAK细胞，促进B细胞分泌抗体，而肝癌病人其mIL-2R表达显著低于正常对照组（$P<0.05$），使肿瘤细胞逃避机体的免疫监视；mIL-2R表达的不足在肝癌病人细胞免疫抑制机理中起着重要作用。同时肝癌病人NK细胞活性明显低于正常对照组，表明机体细胞免疫功能低下，不能对恶性肿瘤进行有效杀伤。术后NK细胞、mIL-2R有不同程度升高，表明术后机体细胞免疫功能有所恢复，升高程度同病情及预后的关系有待随访后进一步研究。

TNF主要由激活的单核巨噬细胞产生，脂多糖、肿瘤细胞等均是合成TNF的激活剂。其生物活性主要为杀伤某些肿瘤细胞，抗感染和免疫调节等。文献[5]报道，恶性肿瘤病人外周血单核细胞产生TNF的能力增强，血浆TNF水平升高。本文的结果显示，肝癌病人TNF水平明显高于对照组，并且同sIL-2R水平呈显著正相关，其机理可能与免疫功能失调有关。由于局部的抗原递呈能力增强，导致局部的免疫耐受消失，造成对自身抗原的识别，同时释放大量的细胞因子，细胞因子又可以增强局部的抗原递呈能力，这种恶性循环可能促进了肿瘤的发生。

关键词 NK细胞；膜白细胞介素-2受体；可溶性白细胞介素-2受体；肿瘤坏死因子；肝癌

中图法分类号 R735.7

参考文献

1 王甫厚，陈绍先，郭彩云等. LDH释放测定NK细胞毒的方法学研究. 中国免疫学杂志，1990；6：115

2 孙 忱，朱 勇，金伯全等. 一种检测可溶性白细胞介素-2受体夹心ELISA的建立. 中国免疫学杂志，1991；7(6)：359

3 Podolsky DK. Inflammatory bowel discasc. N Eng Med, 1991：3

4 Baumann MA, Milson TJ, Patrick CW *et al*. Correlation of circulating natural killer cell count with prognosis in large cell lymphoma. Cancer, 1986；57：2309

5 Nara K, Odaglri H, Fujii M *et al*. Increased production of tumor necrosis factor and prostaglandin E_2 by their plasma. Cancer Immunol Immunother, 1987；25：126

（收稿：1995-07-11；修回：1995-12-20）

（编辑 冷怀明、汪勤俭）

老化及内毒素对枯否细胞的膜变形性和反应性影响的初步实验研究

Preliminary experimental study on the effect of ageing and LPS on the alternations of morphology of cell membrane of Kupffer's cell

彭志明 孙文兵 韩本立 段恒春 李 昆 （第三军医大学附属西南医院肝胆外科中心）重庆，630038

老年急性胆道感染肝衰发病率高[1]，枯否细胞（KC）老化在其中的机理尚待进一步探讨。本研究旨在探讨老化对离体KC的膜变形性及其对内毒素（LPS）刺激的反应性的影响，为揭示老年急性胆道感染的病理生理特征提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物喂养与分组

Wistar大鼠，四川省中药研究所动物室提供，专人饲养，雌雄不拘。采用每6个月繁殖的方式，一次获得四组不同月龄的大鼠，即6、12、18和24月龄四组。每组5只，共20只。

1.2 KC的分离与培养

参考Praaning－Van Dafen等[2]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15ml/min的速度向肝脏灌注预温至37℃的D－Hanks液（含EDTA 1 mmol/L、NaCl 0.83%、KCl 0.05%、HEPE 10 mmol/L，不含Ca^{2+}、Mg^{2+}、pH7.4），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肝脏颜色变白，再以0.05%胶原酶（Type Ⅳ，Sigma）继续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℃水浴中振摇10 min使细胞脱落，60 μm不锈钢网过滤后成为细胞悬液，4℃、50×g离心5 min，3次，去除肝细胞，低渗法去除红细胞。37℃、95%O_2、5%CO_2条件下用RPMI 1640（GIBCO）培养30 min，培养液中含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 u/ml、链霉素100 μg/ml，培养6 h后去未贴壁细胞，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 细胞面积、最大径与圆形因子测定

将6孔培养板（纽约）培养的贴壁KC置于20倍物镜下

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