DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.02.048

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

(Olympus VANOX,AHB－LB),在每只动物的培养细胞中迅速采集5帧图像,图像用日本CL320摄像机摄取后存于CMIAS007型图像分析仪的计算机中,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),每帧图像随机选择4个KC,每只动物为20个,每组动物共100个,行阈值分割与编辑处理后,得到单个细胞的形态参数,包括细胞面积、最大径和圆形因子。细胞面积是指单个细胞镜下透射范围的大小,最大径即细胞的长度,圆形因子反映细胞接近圆的程度,几何圆形者为1.00。

1.4 KC对LPS耐受性的观察

在6孔培养板内固定KC视野,然后加入4种浓度的LPS($O_{111}B_4$型大肠杆菌中提取,Sigma),0 ng/ml、10 ng/ml、100 ng/ml和10 μg/ml,10 s后观察各细胞形态参数,图像采集、分析测量方法同上。

1.5 统计学分析

所得数据按医用统计程序集进行t检验及方差分析。

2 结果

2.1 KC形态学观察

镜下见6、12月龄KC体积较大,胞浆内颗粒多,胞膜不光滑,并有凹凸或多个板状、索状突起。18、24月龄KC体积较小,圆形呈车轮状,细胞膜较光滑、突起少。加入低浓度LPS后,各组KC膜变得不光滑,形状不规则,伪足增多,以6月龄和12月龄KC最为明显。加入高浓度的LPS后,细胞变大、变圆,可见细胞溶解碎片,以18月龄和24月龄最为明显。

2.2 KC对不同浓度LPS的耐受性

各组KC受低浓度LPS刺激后即表现为一种激活状态,KC长径变大,形状因子变小,并以6、12月龄为最明显。随着月龄的增加,这种改变的幅度越来越小,刺激前后的长径和形状因子的差值逐渐降低。随着LPS浓度的增大,各组KC都表现为一种轻度的抑制状态,细胞面积增大,长径变短,形状因子变大,以18月龄和24月龄最明显(见表1、2、3)。

表1 各组KC面积与LPS刺激的关系($\bar{x}\pm s$)

组别(月龄)	0 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml	10 μg/ml
6	568.9±37.3	504.4±38.1	516.7±26.2	658.0±46.2
12	607.4±32.1	518.5±33.1	509.3±20.8	649.7±51.0
18	409.1±20.8*	381.0±18.2*	416.8±19.1*	427.6±61.2*
24	378.5±47.1*	393.6±20.1*	420.3±14.5*	414.5±43.2*

*:与6月龄相比,$P<0.01$

表2 各组KC长径与LPS刺激的关系($\bar{x}\pm s$)

组别(月龄)	0 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml	10 μg/ml
6	33.8±1.1	39.4±1.4△△	37.2±2.6△	36.3±6.0
12	38.7±1.4	43.6±2.8△△	42.8±2.1△	40.1±6.4
18	23.9±0.9*	24.8±1.5*	26.8±2.0*	26.4±3.9*
24	20.4±1.0*	22.4±3.6*	27.2±3.1*	282.2±1.9*

*:与6月龄相比,$P<0.01$;△:与0 ng/ml相比,$P<0.05$;△△:与0 ng/ml相比,$P<0.01$

表3 各组KC形状因子与LPS刺激的关系($\bar{x}\pm s$)

组别(月龄)	0 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml	10 μg/ml
6	0.61±0.02	0.51±0.10△	0.52±0.15	0.74±0.07△
12	0.58±0.04	0.49±0.09△	0.50±0.10	0.69±0.06△
18	0.80±0.02*	0.77±0.02*	0.78±0.03*	0.79±0.04
24	0.79±0.03*	0.76±0.03*	0.82±0.04*	0.85±0.07

*:与6月龄比,$P<0.01$;△:与0 ng/ml相比,$P<0.05$

3 讨论

KC膜变形性的大小与其活性密切相关。吞噬功能活跃的KC体积大,形状不规则,具有多个突起,表面有许多丝状,板状伪足,这些伪足中有丰富的微丝,它们与细胞的信息传递代谢和功能有密切的关系[3]。

研究结果表明,老龄鼠KC体积变小而圆、胞膜较光滑、伪足和突起少,18、24月龄的KC面积明显下降,最长径变短,形状因子增大,对LPS刺激的反应性明显降低。说明老龄鼠KC代谢功能低下,缺乏活跃的吞噬能力。提示老年胆道屏障功能呈明显的老化状态,在老年急性胆道感染等应激状态下,要充分考虑老化

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

KC的上述生理特点，及时地解除毒素等因素对KC的损害，防止KC过度受损而发生功能衰竭。

关键词 胆道感染；大鼠KC；面积；长径；形状因子

中图法分类号 R575.7

参考文献

1 孙文兵，韩本立，张全周等. 老年急性重症胆管炎的救治. 中国急救医学，1992；12(2)：23

2 Praaning-Van Dalen DP，Knook DL. Quantitative determination of in vivo endocytosis by rat liver Kupffer and endothelial cells facilitated by an improvde isolation method. FEBS lett，1982；141(2)：229

3 戴建武，董 群，苏雅娴等. 巨噬细胞膜变形性与细胞骨架微丝关系的研究. 北京医科大学学报，1992；24(2)：119

（收稿：1995-09-08；修回：1995-12-24）

（编辑 沈锡庚、王 红）

流体冲击致大鼠脑损伤后组织血管密度的变化

The changes of angioarchitecture area density following fluid percussive brain injury in the rats

王 禾 鲁晓滨 廖维宏 吴宝明 刘 彦 肖 剑 杨诗球 李向东 （第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第三研究室）重庆，630042

创伤后脑损伤在平、战时均较为常见，脑外伤时局部血脑屏障(BBB)破坏，毛细血管通透性增加，导致血管源性脑水肿，研究其发生发展机理具有十分重要的意义。流体冲击致脑损伤模型具有定量准确，可精确测量，作用力单纯，重复性好等特点，近年来在国内外已广泛应用于实验性脑创伤机理方面的研究[1]。二胺基联苯胺(3'3-Diaminobenzidine，DAB)酶组化染色法可清晰地呈现中枢神经系统内的微血管，具有灵敏度高，反应稳定，结果可靠，简便易行等优点[2]。

本实验利用本室自行研制的流体冲击装置致大鼠脑中等度损伤，通过二胺基联苯胺(DAB)酶组化染色法，结合计算机图像分析技术，测量实验动物脑组织损伤后不同时相血管密度的变化，探讨颅脑创伤性损伤后微血管系统的变化特点。

1 材料与方法

1.1 模型制备

Wistar大鼠，雄性，体重180～280 g，戊巴比妥钠(40 mg/kg，ip)麻醉，常规消毒，暴露颅骨，双氧水处理颅骨表面后，于前囟至人字缝联线中点左旁开3 mm处钻一直径为2.7 mm的圆孔至软脑膜，大鼠置江湾Ⅰ型立体固定仪上固定头部，用牙托粉将流体冲击接头固定于圆孔上，注生理盐水于流体冲击装置中并排出气泡，于恒定角度使摆锤下落，经活塞中生理盐水将压力传导至冲击接头处脑组织致机械性颅脑损伤。通过压力传感－计算机检测系统同时检测压力波形，并计算波幅、波宽。

1.2 DAB染色

42只大鼠随机分为伤前、伤后即刻、1、2、4、8、24 h组，每组6只。于各时相点断头放血，迅速取出脑组织，固定于10%福尔马林液(以0.1 mol/L PBS调整pH值至7.6)中2～4 d。冰冻切片机于创伤部位冠状面切片，片厚30 μm，切片收集于孵育槽内，用PBS液洗2次，每次5 min。置切片于新鲜配制的DAB液(0.1 mol/L TBS 300 ml，pH7.6，DAB 150 mg)中，在恒温37℃下预浸30 min，然后在DAB液里再加入1.5%H_2O_2 120 ml，充分混合，切片入此液孵育20 min。PBS洗3次，捞片贴于洁净的载玻片上。用0.5%的中性红复染2 min，常规脱水、透明、封片。

1.3 图像分析

Olympus BH生物显微镜观察DAB片脑组织微血管构象(10倍)，每片分别于左、右脑对称皮层区、海马区和丘脑区固定选择6个视野，摄取图像，输入MAS-1自动图像分析仪，定量测量视野单位面积内被测血管所占面积(angioarchitecture area density，AAD，以%表示)。取6个视野平均值为每片结果。

1.4 统计分析

数据以平均值±标准差表示。均值间差异行t检验统计分析，以$P<0.05$，$P<0.01$为显著水平。

2 结果

检测流体冲击压力波形发现，压力波基本为一单峰波，波形单纯，未见明显振荡，波峰值为1.48±0.05 atm，波宽21.37±1.00 ms，致损伤作用较为单纯，具有较好的重复性(附图)。

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