DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.05.028

锌对腹腔巨噬细胞吞噬功能影响的初步研究

徐迪雄* 白家驷 吴嘉惠 张乐之** (第三军医大学附属西南医院儿科) 重庆, 400038

提 要 目的: 探讨饲料锌对腹腔巨噬细胞 (Peritoneal macrophage, PMΦ)吞噬功能的影响及其机理。方法: 建立大鼠缺锌、高锌模型,测定大鼠 PMΦ 吞噬率、吞噬指数及 cAMP、cGMP。结果:① 缺锌 (ZD)组 PMΦ 吞噬率、吞噬指数均非常显著地低于配对 (PF)组及自由喂养 (AL)组,经补锌后得以恢复;高锌 (ZE)组明显低于 AL组。② PMΦ 经体外脂多糖 (LPS)作用后胞内 cAMP含量、cAMP/cGMP水平 ZD组明显低于 PF、AL及缺锌补锌 (ZD+ AL)组;ZE组非常显著地高于 AL组。结论: 不适量锌可能通过 PMΦ 胞内 cAMP/cGMP变化而影响 PMΦ 活化,进而抑制其吞噬杀菌功能。

关键词 锌;巨噬细胞;吞噬功能
中图法分类号 R151.3

近年来的研究表明,锌对维持机体正常免疫功能具有重要作用[1]。巨噬细胞在免疫学上既是免疫效应细胞,又是免疫调节细胞,能吞噬各种病原体,介导肿瘤细胞溶解作用、细胞毒作用及增殖抑制作用等,亦能呈递抗原、激活淋巴细胞参与各种免疫反应。本实验建立大鼠缺锌、高锌模型,研究锌对腹腔 MΦ 吞噬功能影响,测定 PMΦ 胞内 cAMP、cGMP含量及 cAMP/cGMP水平,为全面了解锌影响免疫功能作用机理提供理论依据。

1 材料及方法

1.1 实验动物模型建立

断奶 1~3 d纯系 Wistar大鼠由本校实验动物中心提供。按照吴嘉惠等[2]报道方法建立大鼠缺锌、高锌模型。动物分缺锌组、缺锌配对组、自由喂养组、缺锌补锌组及高锌组。ZD、PF、AL及 ZE组喂养 4周后活杀。ZD+ AL组自由食用缺锌饲料 4周,再自由食用正常锌饲料 4周后活杀。

1.2 主要试剂

LPS(细菌脂多糖 Sigma); Zymosan(酵母多糖 ZA Sigma); RPMI-1640(GIBCO);^{3}H-cAMP、^{3}H-cGMP药盒(中国原子能研究所产品)。

金黄色葡萄球菌悬液,金黄色葡萄球菌 ATCC31240株接种于肉汤培养管中,37℃孵化 48 h,离心,冷 HBSS液洗 3次,RPMI-1640调细胞浓度至 5×10^7/ml。

1.3 大鼠腹腔巨噬细胞分离及处理

参照王宇飞等[3]报道方法获取大鼠 PMΦ,MΦ 纯度检查达 94%,2%台盼蓝排斥染色法测细胞活力达 95%,5% FBS+ RPMI-1640为 PMΦ 培养基,调细胞浓度为 5×10^6/ml,冰浴备用。

1.4 血清锌、铜、铁含量测定

用美国 IL-AA951型原子吸收分光光度计火焰法测定。

1.5 腹腔巨噬细胞吞噬功能检测

参照谢哲子[4]报道方法进行测定。将制备的 PMΦ 悬液 0.5 ml与 0.5 ml金葡菌悬液混匀,37℃孵化培养 2 h,涂片,Jenner-Giemsa染色,油镜下检测 500个 MΦ,结果以吞噬率及吞噬指数表示。

$$\text{吞噬率} = \frac{\text{阳性细胞(吞噬了细菌的 PMΦ)}}{\text{PMΦ 数}} \times 100\%$$

$$\text{吞噬指数} = \frac{\text{吞噬细菌总数}}{100\text{个 PMΦ}}$$

1.6 腹腔巨噬细胞内 cAMP、cGMP测定

取 2 ml PMΦ 悬液(5×10^6/ml),加入 LPS(终浓度 5μg/ml)作用 15 min后移入 cAMP测定管及 cGMP测定管各 1ml,样品中cAMP及 cGMP用加热法提取。测定方法见药盒说明书。

2 结果

2.1 饲料锌对血清锌、铜、铁含量影响

血清锌 ZD组最低,ZE组最高,血清铜及铁 ZD及 ZE组均降低,与 PF、AL、ZD+ AL组相比差异非常显著,见表 1。

表 1 饲料锌对血清锌、铜、铁含量的影响 ($\bar{x}\pm s$)(C_B/μmol·L^{-1})

Tab 1 Effect of dietary Zinc on the levels of serum Zinc, Copper and Ferrum ($\bar{x}\pm s$)(C_B/μmol·L^{-1})

Group	n	Zinc	Copper	Ferrum
ZD	10	9.15±0.80*	12.54±0.72*	18.71±1.77*
PF	10	13.99±1.29	14.94±1.83	30.14±2.64
AL	10	16.33±1.09	16.08±0.77	47.86±3.64
ZD+ AL	10	15.52±0.94	15.61±0.95	25.40±1.91
ZE	10	33.48±1.25△	11.88±1.13△	5.47±0.25△

*: $P<0.01$ *vs* PF, AL or ZD+ AL group; △: $P<0.01$ *vs* AL group

2.2 锌对 PMΦ 吞噬率及吞噬指数的影响

ZD及 ZE组 PMΦ 吞噬率及吞噬指数均降低,与 PF、AL、ZD+ AL组相比差异非常显著,见表 2。

* 徐迪雄,男,31岁,讲师,主治医师,硕士
** 基础医学部药理学教研室 重庆,400038

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

表 2　饲料锌对 PMΦ 吞噬率及吞噬指数的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effect of dietary Zinc on the percentage of phagocytosis and the index of phagocytosis of PMΦ ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Percentage of phagocytosis	Index of phagocytosis
ZD	10	19.1± 6.75*	126.22± 26.29*
PF	10	38.75± 7.57	197.03± 36.14
AL	10	45.70± 6.29	220.60± 51.56
ZD+ AL	10	40.56± 6.55	208.96± 50.11
ZE	10	22.78± 5.97△	132.56± 16.76△

*: $P<0.01$ *vs* PF, AL or ZD+ AL group; △: $P<0.01$ *vs* AL group

2.3　锌对腹腔巨噬细胞内 cAMP/cGMP水平的影响

ZD组 PMΦ 内 cAMP含量,cAMP/cGMP比值降低;ZE组 PMΦ 内 cAMP含量,cAMP/cGMP比值均升高,与 PF AL及 ZD+ AL组相比差异非常显著,见表 3

表 3　饲料锌对腹腔吞噬细胞内 cAMP/cGMP 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Effect of dietary Zinc on the levels of cAMP/cGMP in the cells of PMΦ ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	cAMP(pmol/10⁶cell)	cGMP(pmol/10⁶cell)	cAMP/cGMP
ZD	10	0.6557± 0.085*	0.3256± 0.0393	2.0138± 0.2902*
PF	10	1.3451± 0.190	0.4101± 0.0502	3.2799± 0.4359
AL	10	1.2064± 0.171	0.3594± 0.0337	3.3567± 0.3692
ZD+ AL	10	1.1968± 0.073	0.3742± 0.0401	3.1982± 0.3961
ZE	10	1.8745± 0.240△	0.3566± 0.0528	5.2566± 0.8940△

*: $P<0.01$ *vs* PF, Al or ZD+ AL group; △: $P<0.01$ *vs* AL group

3　讨论

本实验 ZD及 ZE组大鼠摄食总量、体重增长值均非常显著地低于 PF及 AL组,血清锌 ZD组最低,ZE组最高,血清铜及铁含量 ZD、ZE组均显著降低,大鼠缺锌及高锌模型是成功的。

本研究结果表明,ZD及 ZE组腹腔巨噬细胞的吞噬功能、吞噬指数均显著降低,说明缺锌或高锌时 PMΦ 活化均受抑,导致腹腔巨噬细胞杀菌功能降低,与 Caruso[5]报道缺锌时 MΦ 吞噬及杀伤病原体功能降低一致。MΦ 只有在被激活后才能发挥吞噬杀菌功能。MΦ 激活分为触发应答、启动兴奋及激活发展 3阶段。病原体接触到静止 MΦ 受体时作为第一信使,使胞内生成第二信使(cAMP/cGMP↑),激发胞内生理生化反应,成为应答 MΦ,再受到 LPS第二类信号刺激,迅速引起胞内 Ca^{2+} 浓度聚增,成为激发 MΦ,如激发过甚,则形成抑制性 MΦ[6]。本研究 PMΦ 胞内 cAMP浓度、cAMP/cGMP水平 ZD组明显降低,ZE组明显升高。由此推测,缺锌组 PMΦ 经 LPS作用后胞内第二信使分子 cAMP生成减少,cAMP/cGMP水平降低,导致呼吸爆发功能降低,PMΦ 活化受抑;高锌组 PMΦ 胞内 cAMP含量、cAMP/cGMP水平较高,经 LPS作用后升高的 cAMP及 cAMP/cGMP水平可能引起胞内 Ca^{2+} 浓度骤增,导致 PMΦ 激发过甚,形成抑制性 MΦ,进而抑制呼吸爆发及吞噬杀菌功能。在 MΦ 激活过程中,胞内激离钙水平升高也是细胞激活过程中一个具体机理。缺锌或高锌时 MΦ 胞内 cAMP及 cGMP变化的具体机理及 MΦ 激活时胞内游离钙变化如何,有待进一步研究。

锌缺乏可导致机体免疫功能降低已成为人们共识,过量锌摄入对免疫功能损害也已引起人们重视。本结果提示缺锌或高锌可通过 PMΦ 胞内 cAMP/cGMP水平变化而影响 MΦ 活化。同时,缺锌可导致 MΦ 膜结构损伤[7],与吞噬杀菌有关的微丝、微管发生改变[8]。高锌时细胞膜脂蛋白成份发生改变,以上变化均可影响 MΦ 活化,导致 MΦ 吞噬杀菌功能受抑,机体免疫功能降低。

参考文献

1 吴嘉惠.缺锌及高锌对免疫功能的影响.中国实用儿科杂志,1995,10(4):201

2 吴嘉惠,吴水冰,李才安.锌对免疫细胞的细胞周期影响研究.中国免疫学杂志,1994,10(5):278

3 王宇飞,冯新为.中药抗炎 6号对大鼠腹腔巨噬细胞产生 PGE,溶菌酶及 C3b受体表达的影响.中国病理生理杂志,1989,5(2):80

4 谢哲子.应用金黄色葡萄球菌和溶葡球素测巨噬细胞吞噬、杀菌功能.中华微生物学和免疫学杂志,1989,9(2):108

5 Caruso R. Alteration in the immune and nutritional status of mice by synergy between Zinc deficiecy and infection with Trypanosoma Cruz. J Nutr, 1982, 112: 1224

6 叶天星,曹雪涛 综述.巨噬细胞作用的新概念.国外医学:免疫学分册,1990,13(2):60

7 Wirth J J, Fraker P J, Kiersrzebann F. Zinc requirement for macrophage function. Immunology, 1989, 68: 114

8 唐　方,阿部博子.锌缺乏对小鼠巨噬细胞与小肠粘膜上皮细胞的影响.营养学报,1992,14(4):355

(收稿:1997-01-12;修回:1997-07-20)

(编辑　汪勤俭)

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

Effects of dietary zinc on phagocytic function of peritoneal macrophages in rats

Xu Dixiong, Bai Jiasi, Wu Jiahui, Zhang Lezhi (Department of Pediatrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To explore the effects of dietary zinc on phagocytic function of peritoneal macrophages (PMs) and its mechanism. Methods: After the models of zinc deficiency (ZD) and zinc excess (ZE) were established in rats, the phagocytic rate and index of PM and the contents of cAMP and cGMP were determined. Results: 1) The phagocytic rate and index were significantly lower in ZE group than in pair feeding (PF) and adequate libitum (AL) groups. Meanwhile, they were significantly lower in ZE group than in AL group. Supplement of zinc could return them to the normal value. 2) The content of cAMP and the level of cAMP/cGMP in PMs stimulated with LPS *in vitro* were significantly lower in ZD group than in PF, AL and ZD+ AL groups but markedly higher in ZE group than in AL groups. Conclusion: Both ZD and ZE inhibit the phagocytic and bacterium-killing functions of PMs by affecting their activation through changing the level of cAMP/cGMP in PMs.

Key words zinc; macrophage; phagocytosis; rat

大量骨质溶解症(一例报告)

Report a caes of massive osteolysis

李建福* 吴梅英 周仲安 唐康来 张怀芳 吴新军 (第三军医大学附属西南医院骨科)重庆,400038

大量骨质溶解症是极为罕见的骨病,前臂双骨同时发生者尚未见报告。我科收治一例右前臂尺、桡骨大量骨质溶解症,以人工假体变前臂为单一骨架结构,随访15个月,效果满意。

1 病例

男,15岁,以右前臂酸胀不适3年,跌伤伴活动受限1年入院。右前臂可任意被弯曲,不能持重,且呈短缩畸形,桡侧明显骨缺损约15cm,桡动脉搏动可及,诸手指屈伸正常,X线示桡骨中远段消失,残端呈毛笔尖状,皮质变薄,尺骨明显变细、脱钙、中远1/3处骨折。臂丛麻醉下切除尺骨中远段,自制人工假体(以骨水泥+髓内针——与桡骨中远段相似)植入,并与尺骨近端相结合,变前臂以单一骨架结构,术中见桡骨消失处为少量致密纤维组织,残存的桡骨及尺骨皮质薄如蛋壳。病检发现尺桡骨无任何成骨现象,骨组织中微小血管增生、扩张、充血。术后15个月随访,患者持物不受影响,可提5kg重物,X线示残存的尺骨近段无继续吸收,与假体接合处可见新骨生长。

2 讨论

发病以儿童青少年多见,病变可以发生在单一骨骼、也可跨过关节到一个或多个骨骼。更可在不相邻的骨骼发生,常在肩胛带与骨盆周围[1]。本例发生于尺桡骨者未见相同报告。

病因至今不明。外伤仅为发现本病的一个诱因,众多学者推测骨吸收与骨组织的微血管变化相关故称"血管瘤病"[2]。

本病的诊断在早期因骨质破坏虽较严重,但临床症状或功能障碍却极轻微,故难以做到早期诊断,实验室检查无诊断意义[1]。但本病的X线变化独具特色[1],主要是溶骨而无新骨或骨膜反应,这与炎症或恶性肿瘤所引起的溶骨性改变不同,早期往往在骨髓腔或骨皮质下有散在的界限不清的骨小梁吸收区,以后逐渐互相融合扩大,骨皮质变薄并逐渐消失,病变进一步发展,骨皮质逐渐向髓腔方向蹋陷,骨干变细,最后发生病理性骨折及部分骨缺损。,残存的骨干由于两侧骨皮质靠拢,其外侧如毛笔尖状,本例可见以上表现。

受累骨之病理检查必需有皮质变薄,髓腔空虚的特点,镜下典型表现为骨小梁萎缩吸收,由增生的结缔组织代替,其中贯穿着增生的裂隙状血管,分枝相互连接成沟渠状,不典型者仅可见血管增生,可呈血窦状或血管芽状伴结缔组织增生,无明显成骨反应[1,3],本例符合以上表现。

该病的治疗不仅仅是大块骨缺损的问题,由于病因和发展规律至今不明故治疗较为困难。植骨不仅病程长、代价大,尚难获得植入骨与病骨的骨性连接,且有植入骨发生溶解吸收而失败。本例以人工假体变前臂以单一骨架结构的成功治疗,提示着病变于上肢者,治疗以人工假体置换为主,若发生于下肢。为避免病变进一步发展,应首先考虑截肢,安置义肢尽快恢复功能,而位于其它部位者,在治疗并发症的基础上,施行病灶部位的处理,如不能耐受手术或难以手术者,采用支架保护。

本病的预后尚可,多数病人仅在功能方面受到不同程度的影响,仅少数因病变侵及重要器官造成死亡。

关键词 骨质溶解症;假体置换
中图法分类号 R681

参考文献

1 孙庆德,何德华,陶同康等.大量骨骨质溶解症.中华放射学杂志,1959,7(3):212
2 Hambach R. Massive osteolysis due to haem-angiomatosis. Radiology, 1958, 71(1): 43
3 韩 巽,王承武,刘 沂.大量骨质溶解症二例报告.中华病理学杂志,1991,20(3):211

(收稿:1996-09-13;修回:1997-03-12)
(编辑 刘 鹏)

* 李建福,男,34岁,主治医师,硕士

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