DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.04.022

锌对大鼠胸腺、脾脏淋巴细胞增殖功能影响的研究

徐迪雄 吴嘉惠 (第三军医大学附属西南医院儿科) 重庆,630038
魏 文 (军事医学科学院基础研究所) 北京,100000
张乐之 (第三军医大学基础部药理学教研室) 重庆,630038

提 要 从哺乳期开始建立大鼠缺锌(ZD)和高锌(ZE)模型,应用流式细胞术(FACS)研究微量元素锌对胸腺、脾脏淋巴细胞增殖功能的影响。结果表明:(1)ZD组和ZE组胸腺、脾脏静止期(G_0、G_1期)细胞明显增高,而增殖期(S+G_2+M期)细胞及增殖指数明显降低,与自由喂养组(AL)及配对组(PF)相比差别非常显著。(2)ZD组及ZE组胸腺、脾脏细胞内RNA及蛋白质含量降低;细胞内cAMP含量及cAMP/cGMP比值明显增高,脾脏细胞内cGMP含量明显降低,与AL组及PF组比较差别非常显著。结果提示:不适量锌可通过影响胸腺、脾脏淋巴细胞内环核苷酸水平,影响正常的细胞合成,使细胞周期正常进行受阻,胸腺、脾脏淋巴细胞增殖受抑,机体免疫功能降低。

关键词 锌;胸腺;脾脏;淋巴细胞增殖
中图法分类号 R591.1

近年来,对锌与免疫功能关系的研究已日趋深入。研究表明,锌对维持机体正常免疫功能具有重要作用,锌缺乏可导致机体免疫功能降低,但过量锌摄入亦可抑制机体免疫功能[1]。胸腺是中枢免疫器官,是T淋巴细胞分化成熟的场所,脾脏是外周免疫器官,是T、B淋巴细胞进行免疫应答的场所。研究锌对胸腺、脾脏淋巴细胞增殖功能的影响,对于阐明锌与免疫功能的关系及其作用机制有重要意义。本文通过建立大鼠缺锌(Zinc deficiency,ZD)及高锌(zinc excessive,ZE)模型,旨在研究锌对胸腺、脾脏淋巴细胞增殖功能的影响,并对其作用机理进行了探讨,为临床合理补锌提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物模型建立

由本校实验动物中心提供的纯系同批Wistar健康临产孕鼠8只,随机分为3组,第1、2组各为2只,第3组为4只,待产仔后分别饲以缺锌饲料(参考Flanagan[2]配方,锌含量低于2 mg/kg)、高锌饲料(在缺锌饲料中加入硫酸锌,锌含量为1000 mg/kg)、正常锌饲料(在缺锌饲料中加入硫酸锌,锌含量为100 mg/kg)。仔鼠由母鼠授乳至28 d后断奶分笼,留用雄鼠。ZD组仔鼠10只,进食缺锌饲料;ZE组仔鼠,进食高锌饲料,正常饲料组仔鼠20只,分为自由喂养组(Adequate libitum,AL)10只,自由进食正常锌饲料,缺锌配对组(Pair feeding,PF)10只,进食正常锌饲料,进食量控制为ZD组大鼠前一天进食量。严格控制环境中锌污染,于50日龄行股动脉放血处死大鼠进行各项指标测定。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 微量元素锌、铜、铁测定 美国IL-AA951型原子吸收分光光度计火焰法测饲料锌,血清锌、铜、铁。

1.2.2 胸腺、脾脏淋巴细胞周期及细胞内相对RNA、蛋白质含量测定 胸腺、脾淋巴细胞悬液制备方法参见文献[3]。将ConA刺激培养后的脾淋巴细胞用淋巴细胞分离液分出单个核细胞。用完全RPMI-1640液(USA GIBCO)调细胞浓度为1×10^7/ml,70%冷乙醇固定,RNA酶消化,碘化丙啶(PI Sigma)染色,流式细胞仪(FACS-440型,USA)上测细胞周期。再加入异硫氰酸荧光素(FITC)染色测细胞内相对蛋白质含量。RNA测定用甲基绿(MG 北京化学试剂厂)-哌若宁(PY Fluka进口分装产品)荧光染色法测定[4]。每个样品收集1万个细胞,测定结果以频道分布组方图表示,计算机处理后得细胞周期G_0/G_1、S、G_2/M期百分比及细胞内相对RNA、蛋白质含量。

1.2.3 胸腺、脾脏淋巴细胞内cAMP及cGMP测定 ^3H标记的cAMP、cGMP药盒为北京原子能研究所1994年产品。样品处理参照李柏青[5]等报道方法。cAMP测定用活性碳法,cGMP测定用微孔滤膜法。含量以每10^7个细胞中所含cAMP或cAGMP pmol表示。

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;铜、铁含量ZD及ZE组均降低,与AL组及PF组比较有非常显著差异(表1)。

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

表1　饲料锌对血清锌、铜、铁含量影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effect of dietary zinc on concentration of serum zinc, copper and ferrum ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Zinc (10^{-9} g/ml)	Copper (10^{-9} g/ml)	Ferrum (10^{-9} g/ml)
ZD	10	594.5±52▲	833±46.0▲	1248±99▲
PF	10	909.2±84	943.7±117	1674±137
AL	10	1061.4±71	1039±79	2085±204
ZE	10	2174±81▲	743.7±49▲	341±40.0▲

▲: $P<0.01$ *vs* PF and AL groups

2.2　锌对胸腺、脾脏重量、胸腺、脾脏增长指数的影响

ZD、ZE 组胸腺、脾脏重量、胸腺、脾脏增长指数均非常显著地低于 AL 组及 PF 组(表2)。

2.3　锌对胸腺、脾脏淋巴细胞周期的影响

ZD、ZE 组胸腺细胞、脾淋巴细胞静止期(G_0/G_1期)细胞明显增高，而增殖期($S+G_2+M$ 期)细胞及增殖指数明显降低，与 AL 组及 PF 组比较有非常显著性差异(表3、4)。

2.4　锌对胸腺、脾脏淋巴细胞内 RNA 及蛋白质含量的影响

ZD、ZE 组胸腺、脾脏淋巴细胞内相对 RNA 及蛋白质含量非常显著地低于 AL 组及 PF 组(表5)。

表2　饲料锌对胸腺、脾脏重量的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effect of dietary zinc on weights of thymus and spleen ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Thymus weight (g)	Thymus index	Spleen weight (g)	Spleen index
ZD	10	0.341±0.073▲	1.408±0.334▲	0.856±0.147▲	3.043±0.546▲
PF	10	1.432±0.076	3.976±0.431	1.897±0.136	5.761±0.387
AL	10	1.574±0.049	4.046±0.514	1.973±0.148	5.841±0.537
ZE	10	0.364±0.061▲	1.404±0.371▲	0.764±0.137▲	3.036±0.471▲

▲: same as Tab 1; thymus (spleen) index$=\frac{\text{thymus (spleen)}}{\text{body weight}}\times 10^3$

表3　锌对胸腺细胞周期的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Effect of dietary zinc on cell cycle of thymocytes ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	G_0/G_1(%)	S (%)	G_2/M (%)	Proliferative index
ZD	10	80.41±3.86▲	8.57±2.21▲	11.02±1.80	0.196±0.0386▲
PF	10	65.10±4.74	24.91±2.79	10.22±2.10	0.351±0.0482
AL	10	66.41±3.75	22.19±1.76	11.42±2.47	0.336±0.0375
ZE	10	78.43±5.10▲	9.31±1.74▲	12.26±2.71	0.217±0.0417▲

▲: same as Tab 1; proliferative index$=\frac{S+G_2+M}{G_0+G_1+S+G_2+M}$

表4　锌对脾淋巴细胞细胞周期的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 4　Effect of dietary zinc on cell cycle of splenocytes ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	G_0/G_1(%)	S (%)	G_2/M (%)	Proliferative index
ZD	10	79.56±3.482▲	13.0±2.1▲	7.44±1.2▲	0.204±0.04▲
PF	10	59.81±3.190	22.0±3.7	18.20±1.1	0.402±0.05
AL	10	58.73±4.381	25.0±4.6	16.19±1.3	0.389±0.04
ZE	10	79.37±2.794▲	12.7±4.1▲	8.31±1.4▲	0.206±0.03▲

▲: same as Tab 1; proliferative index$=\frac{S+G_2+M}{G_0+G_1+S+G_2+M}$

表5　锌对胸腺、脾脏细胞内 RNA 及蛋白质含量的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 5　Effect of dietary zinc on RNA and protein concentrations of cells in thymus and spleen ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Thymus		Spleen	
		RNA	Protein	RNA	Protein
ZD	10	50.57±1.86▲	52.91±5.81▲	78.46±2.09▲	103.67±5.78▲
PF	10	65.41±1.95	73.29±4.95	104.06±4.23	131.64±7.70
AL	10	66.20±2.92	79.79±5.59	101.93±4.20	129.69±8.58
ZE	10	51.43±2.07▲	54.76±4.37▲	84.36±4.71▲	97.74±6.47▲

▲: same as Tab 1

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

2.5 锌对胸腺、脾脏淋巴细胞内 cAMP 及 cGMP 含量的影响

ZD、ZE 组胸腺、脾脏淋巴细胞内 cAMP 含量、cAMP/cGMP 比值明显升高，脾淋巴细胞内 cGMP 含量降低，与 AL 组及 PF 组相比差别非常显著(表6、7)。

表6 锌对胸腺细胞内 cAMP、cGMP 含量的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 6 Effect of dietary zinc on cAMP and cGMP concentrations of thymocytes ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	cAMP (pmol/10^7)	cGMP (pmol/10^7)	cAMP/cGMP
ZD	10	1.3815±0.3374▲	0.1422±0.0232	9.7614±1.8461▲
PF	10	0.4035±0.0694	0.1472±0.0207	2.9827±0.5504
AL	10	0.3879±0.0761	0.1488±0.0231	2.2887±0.6673
ZE	10	1.4067±0.0864▲	0.1474±0.0248	0.5434±0.7768▲

▲: same as Tab 1

表7 锌对脾淋巴细胞内 cAMP、cGMP 含量的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 7 Effect of dietary zinc on cAMP and cGMP concentrations of splenocytes ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	cAMP (pmol/10^7)	cGMP (pmol/10^7)	cAMP/cGMP
ZD	10	1.4329±0.2779▲	0.1893±0.0498▲	7.6714±0.9740▲
PF	10	0.9317±0.1122	0.3494±0.0490	2.7159±0.5159
AL	10	0.8264±0.0765	0.3573±0.0421	2.3463±0.4281
ZE	10	1.3761±0.2401▲	0.1461±0.0397▲	9.4189±0.5761▲

▲: same as Tab 1

3 讨论

从大鼠哺乳期开始建立缺锌和高锌模型，结果发现：ZD 组及 ZE 组大鼠摄食总量、食物效价及体重增长值均非常显著地低于 AL 组及 PF 组，血清锌 ZD 组最低，ZE 组最高；铜、铁含量 ZD 组及 ZE 组均降低，说明饲料锌缺乏可导致血清锌、铜及铁降低，而过量锌摄入可导致低铜、低铁。

发现 ZD 组及 ZE 组大鼠胸腺、脾脏重量，胸腺、脾脏增长指数均非常显著地低于 AL 组及 PF 组，提示不适量锌特异性抑制了胸腺、脾脏发育，导致胸腺、脾脏萎缩。胸腺萎缩明显降低了胸腺激素活性及 T 淋巴细胞活性、脾脏的缩少削弱了体液免疫和免疫应答反应。

细胞增殖动力学研究发现，细胞周期分为 G_0/G_1 期、S 期及 G_2/M 期，$S+G_2+M$ 期在细胞周期中所占比例反映了细胞的增生及分化状态，细胞周期的正常进行是细胞增殖及分化的前提。本研究应用流式细胞仪研究锌对胸腺、脾淋巴细胞细胞周期的影响，较 ^{3}H-TdR 掺入法更客观、准确反映细胞增殖动力学变化。结果表明，缺锌或高锌使绝大部分胸腺、脾脏淋巴细胞停滞积聚在 G_0/G_1 期，说明不适量锌抑制了胸腺、脾脏淋巴细胞细胞周期正常进行，导致细胞增殖及分化受阻。

细胞内核酸及蛋白质正常合成是细胞增殖的物质基础，而正常的细胞合成对细胞周期顺利进行是必不可少的[6]。细胞内 RNA 及蛋白质与特殊荧光素结合后可发出荧光，应用流式细胞仪测定荧光强度可反映出细胞内 RNA 及蛋白质相对含量。本研究显示 ZD 组及 ZE 组胸腺、脾脏淋巴细胞中 RNA 及蛋白质含量非常显著地低于 AL 组及 PF 组，说明不适量锌抑制了胸腺、脾脏淋巴细胞内核酸及蛋白质正常合成，导致细胞周期正常进行受阻。锌影响正常细胞合成机理是：缺锌降低了与核酸合成有关酶的活性[7]；抑制了细胞的激活、信号转导、核酸转录及基因表达。高锌影响正常的细胞合成与高锌导致低铜、低铁有关[8]。

cAMP 及 cGMP 是被公认的胞内信使分子，对淋巴细胞增殖及细胞周期具有调控作用[9]。对免疫细胞而言，细胞内 cAMP 含量及 cAMP/cGMP 比值升高，则 DNA 合成减少，细胞增殖及分化受抑；cGMP 则具有促有丝分裂活性，它能促进淋巴细胞 DNA 合成，促进淋巴细胞增殖。本研究发现缺锌或高锌时，胸腺细胞内 cGMP 含量组间虽无显著性差异，但 cAMP 含量、cAMP/cGMP 比值 ZD 组及 ZE 组均非常显著地高于 AL 组及 PF 组，ZD 组及 ZE 组脾淋巴细胞内 cAMP 含量、cAMP/cGMP 比值升高，cGMP 含量降低，与 AL 组及 PF 组比较有非常显著性差异。说明不适量锌可通过影响胸腺、脾脏淋巴细胞内 cAMP 及 cGMP 水平，使细胞内 DNA 合成减少，从而抑制了细胞周期正常进行及细胞增殖。

参考文献

1 Chandra RK. Excessive intake of zinc impairs immune responses. JAMA, 1984; 252: 1443

2 Flanagan PR. A model to produce zinc defiency in rats and its use to demonstrate that dietary phytate increase the excretion of endogenous zinc. J Nutr, 1984; 114: 493

3 左连富，王凤荣，张祥宏等. 流式细胞术样品制备技术. 北京：华夏出版社，1991：97～101

4 武爱国，王良绪，陈萍生. 流式细胞计对急性白血病细胞 RNA 含量测定及其临床意义. 北京医科大学学报，1990；22(5)：361

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

5 李柏青，杨贵贞. 小鼠胸腺上皮细胞培养上清的生物学活性. 中华微生物学与免疫学杂志，1989；9(4)：222
6 王龙贵. 细胞周期阻断剂作用分子基础. 细胞生物学杂志，1986；8(2)：53
7 Wu FY, Wu CW. The role of zinc in DNA and RNA polymerases. In: Sigel M ed. Metal ions in biological system. New York: Marcel Dekker. 1983：157～192
8 Dunn MA. Metallothionein. Pro Soc Exp Biol Med，1986；185：107
9 夏邦顺，杨贵贞. 信息越膜控制与免疫调节. 医学与哲学，1989；1：15

(收稿：1994-11-11；修回：1995-05-18)

The effects of dietary zinc on the proliferation of thymocytes and splenocytes in rats

Xu Dixiong, Wei Wen, Zhang Lezhi, Wu Jiahui (Department of Pediatrics, Southwest Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract The effects of dietary zinc on the proliferation function of thymocytes and splenocytes were observed in zinc-deficient (ZD), zinc-excessive (ZE), adequate libitum (AL) and pair fed (PF) rats with flow cytometric analysis (FACS). The findings were as follows:

(1)The total cells number of the thymus, spleen in G_0/G_1 phases were much higher in ZD and ZE groups than in PF and AL groups, and the total cells number in S, G_2 and M phases were lower in the former than in the latter.

(2)The RNA and protein contents in thymocytes and splenocytes in ZD and ZE groups were significantly lower than those in PF and AL groups, the levels of cAMP and the cAMP/cGMP ratio in thymocytes and splenocytes in ZD and ZE groups were significantly higher than those in PF and AL groups, the levels of cGMP in splenocytes were lower in former than in latter.

It was concluded that both zinc deficiency and zinc excessive could suppress the normal proceeding of cell cycle and the proliferation of thymocytes and splenocytes by mainly affecting the levels of cAMP and cGMp and the cell synthesisof thymus and spleen, leading to the reducing of the immunity functions of organisms.

Key words zinc; thymocytes; splenocytes; cell proliferation

****

(上接 317 页)

2 讨论

Jonsson 等[1]首先于1952年描述主动脉"漏斗征"，李益群等[2]认为，漏斗征的形成与未闭导管分流处的血液动力学有关，由于导管分流处管腔横截面骤然增大，血流速度减慢，血流对邻近管壁的压强增大，从而造成血管分叉处主动脉局部扩张，形如漏斗状，投影于正位片上即为主动脉弓与肺动脉段间的凹陷缩小或消失，并见主动脉弓与降主动脉的移行区下移，亦称漏斗征。少数病例因未闭导管较粗，分流量较大，左心室增大，可造成心脏稍向右旋转，正位片上可见主动脉弓与肺动脉段间出现另一弧状突起[3]，为漏斗征的另一少见 X 线表现，本组仅3例有此种表现。

李益群氏分析动脉导管未闭的主动脉造影片提出，不论年龄大小、未闭导管类型如何，导管附着之主动脉局部管腔均可见有不同程度的漏斗状扩张，本组6例造影片亦有同样表现。经心脏大血管模型的模拟病理改变观察也提示了未闭导管附着之主动脉局部的扩张，是形成正位平片上漏斗征的关键病理基础改变。并非为以往教科书[4]所提及的，漏斗征是由于漏斗形未闭侍管投影所致。本组105例平片上可见漏斗征者，有67例术中见未闭导管为圆柱型。而28例术中见导管为漏斗型者，平片上又未能显示漏斗征，这也进一步说明了漏斗征并非为漏斗型导管投影所致。手术及造影所见主动脉局部漏斗样扩张为何远远高于 X 线平片所见呢？我们经过多方位的模型观察认为，心脏投照体位影响较大。当有动脉导管未闭而还未产生肺动脉高压时，以左心室增大为主的心脏呈稍微左前斜样旋转，因此影响了漏斗征的显示，如投照时给予体位上的人工纠正(即右前斜5°)可能阳性显示率能明显提高。平片主动脉漏斗征的阳性率亦受未闭导管粗细、走向及平片摄影条件等影响，如导管粗、前后走向及高仟伏摄片则阳性率增加，反之则低。

部分术后复查的动脉导管未闭症患者，虽然肺血及心脏大小已恢复正常，但主动脉漏斗征依然可见，这也提示已形成的主动脉漏斗样扩张改变较恒定，并进一步说明，绝大多数的主动脉漏斗征并非为漏斗状未闭导管投影而致，因手术后未闭导管已结扎。

关键词 动脉导管未闭；主动脉漏斗征
中图法分类号 R541.1

参考文献

1 Junsson G, Saltzman CF. Infundibulum of the patent ductus arteriosus studied by thoracic aortography. Acta Radiol，1952；37：445
2 李益群，刘玉清，蒋世良. 动脉导管未闭症 X 线诊断的几个问题. 中华放射学杂志，1981；15(2)：111
3 上海第一医学院《X 线诊断学》编写组. 见：胸部 X 线诊断学. 第一册，. 上海：上海人民出版社，1978：279
4 刘玉清. 临床心脏 X 线诊断学. 北京：北京出版社，1981：151

(收稿：1995-02-06；修回：1995-05-13)

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