DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.02.015

锌对大鼠免疫器官细胞周期的影响

徐迪雄 吴嘉惠 魏 文* (第三军医大学西南医院儿科) 630038

提 要 在本实验中观察到缺锌(ZD)组大鼠胸腺、脾脏及骨髓细胞中,静止期(G_0/G_1期)细胞明显增多,增殖期($S+G_2+M$期)细胞明显减少,与配对(PF)组及自由喂养(AL)组相比有非常显著的差异,缺锌补锌(ZD+AL)组达正常水平。表明缺锌使免疫器官细胞周期正常进行受阻,抑制了免疫器官细胞增殖分化,从而降低了机体免疫功能。

关键词 锌;胸腺;脾;骨髓;细胞周期
中图法分类号 R329.28

锌是机体必需的微量元素之一,在机体内的含量仅次于铁而占第二位。锌对机体正常免疫功能维持具有重要作用。有关锌对免疫器官细胞周期影响的研究国内外报道较少。通过建立缺锌大鼠模型,应用流式细胞术(Flow cytometry,FCM)方法,观察了缺锌对胸腺、脾脏及骨髓细胞周期的影响,进一步阐明了缺锌对免疫器官细胞增殖分化影响的机理,为临床上缺锌防治提供理论参考及依据。

1 材料与方法

1.1 动物模型建立

由本校实验动物中心提供的纯系Wistar健康临产孕鼠8只,随机分为二组,产仔后分别饲以缺锌饲料(参考Flanagan配方[1],锌含量小于0.308 μmol/g)正常锌饲料(在缺锌饲料中加入硫酸锌,使其含锌量为15.4 μmol/g)。仔鼠由母鼠授乳至28 d后断奶并分笼。严格控制环境中锌污染。缺锌饲料组仔鼠共20只,继续进食缺锌饲料3周后半数活杀,余半数作缺锌恢复试验,进食正常锌饲料2周后活杀。正常锌饲料喂养组仔鼠分为自由喂养组10只,自由进食正常锌饲料;缺锌配对组10只,进食正常锌饲料,进食量控制为缺锌组大鼠前一天进食量。于50日龄处死大鼠进行各项指标测定。

1.2 单细胞悬液制备

胸腺、脾脏及骨髓细胞悬液制备方法参见文献[2]。将用ConA刺激培养的脾淋巴细胞用淋巴细胞分离液分出单核细胞。调细胞浓度为1×10^7/ml,单细胞悬液入75%冷乙醇固定。

1.3 细胞周期测定

将乙醇固定的单细胞悬液离心去上清,PBS液洗2遍,RNA酶消化,碘化丙啶(PI,50 μg/ml)染色,流式细胞仪(FACS-440型,USA)测细胞周期,测量结果以频道分布组方图表示,每个样品收集约1万个细胞,计算机处理后计算细胞周期中G_0/G_1、S、G_2/M期百分比。

* 军事医学科学院基础研究所

2 结果

2.1 缺锌对外周血白细胞数的影响

ZD组白细胞总数及淋巴细胞数均非常显著地低于PF及AL组,ZD+AL组达正常水平。见表1。

表1 缺锌对外周血白细胞数的影响($\bar{x}\pm s$)
Tab 1 Effect of dietary zinc defiency on the numbers of leukocytes in rats ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	The numbers of Leukocytes (10^9/L)	The numbers of Lymphocytes (10^9/L)
ZD	10	8.04±1.35	4.32±0.274
PF	10	13.74±2.78★	10.40±3.96★
AL	10	13.67±2.64★	9.74±3.31★
ZD+AL	10	13.78±3.31★	10.20±4.01★

★: $P<0.01$, *vs* ZD group

2.2 缺锌对胸腺、脾脏及骨髓细胞周期的影响

ZD组胸腺、脾脏及骨髓静止期细胞(G_0/G_1期)非常显著地高于PF、AL及ZD+AL组,而增殖期细胞($S+G_2+M$期)及增殖指数均非常显著地低于PF、AL及ZD+AL组。见表2、3、4。

表2 缺锌对胸腺细胞周期的影响($\bar{x}\pm s$)
Tab 2 Effect of dietary zinc defiency on the cell cycle of thymocytes in rats ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Thymocytes (%)			Proliferative index
		G_0/G_1	S	G_2/M	
ZD	10	85.1±3.4	11.0±1.2	4.0±0.9	0.16±0.04
PF	10	68.0±3.6★	19.0±3.1★	13.0±2.1★	0.32±0.02★
AL	10	64.1±2.4★	22.0±2.9★	14.0±1.4★	0.36±0.04★
ZD+AL	10	69.0±4.6★	20.0±3.1★	11.0±2.0★	0.31±0.03★

★: Same as Tab 1;

proliferative index $=\frac{S+G_2+M}{G_0/G_1+S+G_2+M}$

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

表3 缺锌对脾淋巴细胞周期的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Effect of dietary zinc defiency on the cell cycle of splenic lymphocytes in rats ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Splenic cells(%)			Proliferative index
		G_0/G_1	S	G_2/M	
ZD	10	78.0±5.1	14.0±2.1	8.0±1.2	0.22±0.03
PF	10	54.0±3.6★	32.0±3.7★	14.0±1.1★	0.46±0.04★
AL	10	49.0±2.7★	35.0±4.6★	16.0±1.3★	0.51±0.02★
ZD+AL	10	54.2±4.1★	31.6±3.1★	14.2±1.0★	0.45±0.03★

★: Same as Tab 1;

proliferative index $=\frac{S+G_2+M}{G_0/G_1+S+G_2+M}$

表4 缺锌对骨髓细胞周期影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 4 Effect of dietary zinc defiency on the cell cycle of bone marrow cells in rats ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Bone marrow cells(%)			Proliferative index
		G_0/G_1	S	G_2/M	
ZD	10	78.4±3.1	11.2±2.3	10.4±1.7	0.216±0.04
PF	10	63.0±2.4★	18.7±3.0★	18.3±1.5★	0.370±0.04★
AL	10	59.0±2.2★	19.0±2.7★	22.0±1.9★	0.410±0.05★
ZD+AL	10	61.3±3.4★	20.7±2.4★	18.0±2.3★	0.387±0.04★

★: Same as Tab 1;

proliferative index $=\frac{S+G_2+M}{G_0/G_1+S+G_2+M}$

3 讨论

本文通过建立大鼠缺锌模型,ZD 组大鼠的摄食总量、饲料效价、体重增长值及血清锌含量均非常显著地低于 PF、AL 及 ZD+AL 组,证实缺锌动物模型是成功的。本研究发现 ZD 组白细胞总数,特别是淋巴细胞总数明显减少,说明缺锌抑制了白细胞,特别是淋巴细胞产生,与文献报道一致[3]。胸腺是 T 淋巴细胞发育成熟场所,骨髓是造血干细胞发育分化的场所,均为中枢免疫器官,脾脏是 T、B 淋巴细胞进行免疫应答场所,为外周免疫器官。机体组织,特别是胸腺、脾脏及骨髓细胞细胞分裂旺盛,对缺锌特别敏感,一旦缺锌,最先受累。本文应用流式细胞术研究缺锌对胸腺、脾脏及骨髓细胞周期的影响,较^{3}H-TdR 掺入法更准确、更客观反映细胞动力学变化。结果发现 ZD 组胸腺、脾脏及骨髓静止期细胞明显增高,而增殖期细胞及增殖指数明显降低,ZD+AL 组达正常水平。说明缺锌使细胞周期正常进行受阻,直接影响了淋巴细胞增殖。但通过补锌可恢复正常。

锌影响免疫器官细胞周期作用机理是:细胞胞内 DNA、RNA 及蛋白质正常合成对细胞周期顺利进行是必不可少的[5],缺锌破坏了正常的细胞合成;在 DNA 合成以后过程中,锌可通过染色质凝缩调节细胞有丝分裂,或有丝分裂梭状体装配成微管蛋白过程,缺锌时,这种调节作用受到影响[6];同时,细胞内 cAMP 及 cGMP 对细胞周期具有调控作用,锌可通过对腺苷酸环化酶及胞内磷酸二酯酶作用而影响 cAMP 水平[7]。

总之,锌是细胞增殖分化的必需物质。机体缺锌时,免疫器官细胞周期正常进行受阻,细胞增殖分化受抑,白细胞总数,特别是淋巴细胞总数降低,从而使胸腺、脾脏萎缩,机体免疫功能降低,但通过补锌可恢复正常。

参考文献

1 Flanagan PR. A model to produce zinc defiency in rats and its use to demonstrate that dietary phytate increase the excretion of edogeous. J Nutr,1984;114:483~502

2 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

3 Jambon B. Thymulin and zinc contents of the thymus glands of malnourish children. Am J Nutr,1986;48:335~342

4 Mercalli ME. Zinc defiency ad thymus ultrastructure in rats. Nutr Res,1984;4:665~671

5 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):53~57

6 王 夔,主编. 生命科学的微量元素(下卷). 北京:中国计量出版社,1992:128~129

7 Henkin RI. Zinc in taste function. Biological Trace Elemets Research,1984;6:263~280

(收稿:1994-10-06;修回:1994-12-12)

Effects of zinc deficiency on the cell cycle of immune organs in rats

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

Abstract The cell cycle of the thymus, spleen and bone marrow was studied in zinc deficient (ZD), pair fed (PF), freely fed (AL) and ZD+AL rats. It was found that the quiescent cells (G_0/G_1 phase) were signif-

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

icantly increased and the proliferative cells (S+G_2+M phase) decreased in the thymus, spleen and bone marrow of the ZD rats than in those of PF, AL and ZD+AL rats. It is concluded that zinc deficiency could inhibit the normal proliferation and division of the cells of the immune organs and consequently the immune functions are suppressed which can only be restored by the administeration of sufficient amount of zinc in the diet.

Key words zinc; thymus gland; bone marrow; cell cycle

肝门血流阻断法术中B超诊断肝内血管瘤

Intraoperative B-ultrasonography by blocking hepatotropic flow for diagnosis of intrahepatic caverous hemagiomas

顾红光 陈 敏 (第三军医大学西南医院肝胆外科中心) 630038

肝巨大血管瘤或靠近肝包膜的血管瘤由于手术中可以被压缩,诊断不困难。但少数位于肝实质内的小血管瘤手术中看不见,摸不着,难以与早期原发性肝癌鉴别。我们采用肝门血流阻断法术中B超诊断肝内小血管瘤2例,方法简便,实用,文献中尚未见报道,现报告如下。

例一,患者女性,54岁。因右上腹隐痛3个月,1993年4月22日入院。B超发现右肝直径1.5cm圆形,减弱回声区,边界清楚,无晕圈。CT提示肝Ⅵ段直径1.2 cm占位,考虑肝血管瘤。因病人有肝炎史,HBsAg(+),抗-HBC(+),AFP(-),临床不能排除早期肝癌。1993年5月29日手术中见肝表面有细结节,视,触诊未发现肿块。术中B超发现肝Ⅵ段直径1.5 cm稍减弱回声区。用细尿管紧束肝蒂,阻断入肝血流,轻轻挤压肝脏,再次B超检查肝内减弱回声区消失。诊断为肝血管瘤,行肝Ⅵ段切除,术后病理证明为肝海绵状血管瘤,痊愈出院。

例二,患者女性,45岁。因肝区间歇性隐痛半年,B超发现肝占位,1993年5月31日入院。B超,CT检查均提示肝Ⅴ段4 cm×5 cm椭圆形病灶,边界清楚。因患者有肝炎史,抗-HBe及抗-HBc(+),3年前B超查体肝脏未见异常。1993年6月10日手术中见肝外观正常,未扪及肿块。术中B超见肝内4 cm×5 cm稍减弱回声区,边界清楚。用细尿管紧束肝十二指肠韧带,阻断入肝血流,轻轻挤压肝脏,再次B超检查见病灶缩小至2 cm×3 cm。行肝Ⅴ段血管瘤局部切除,病理证实为肝血管瘤。术后半年随访无症状。

讨论

肝海绵状血管瘤是一种常见的肝脏良性肿瘤,发展缓慢,女性稍多于男性,一般无特异性临床表现,中年以后可出现肝区胀痛。近年由于影像诊断技术发展,术前大多可明确诊断。但少数病例B超,CT图像与早期原发性肝癌相似,难以鉴别。肝脏海绵状血管瘤B超图像60%以上表现为高回声型,B超诊断准确率达90%。低回声型约为10~20%,图像有时酷似肝癌,B超诊断符合率仅70%。血管瘤低回声的原因尚不清楚,可能因瘤内血窦相对较大,窦壁较薄,减少了超声的散射而使回声降低[1]。

我国是原发性肝癌高发区,对肝内低回声病灶要警惕早期肝癌,当临床上鉴别困难时我们主张定期B超随访,严密观察,必要时手术探查。手术中肝血管瘤大多可通过视,触诊确诊。位于肝实质内的小血管瘤可借助术中B超诊断。Choji[2]在术中B超检查时,用手或探头压迫肝脏,发现肝血管瘤回声反射明显减弱,肿块消失。而原发性肝癌,继发性肝癌及肝内再生结节无此现象。有人[2]将近肝表面或肝组织薄弱区出现的肿瘤消失现象称之"消失症"(Disappearing sign)。压迫肝脏对肝实质中心的血管瘤不能出现消失症。肝门血流阻断法术中B超对肝实质中的血管瘤也有明显作用。该方法简便,有一定实用价值,但本组病例较少,有待进一步观察。

关键词 血管瘤;术中B超

中图法分类号 R732.2

参考文献

1 王文平,徐智章,丁 红等.低回声肝血管瘤的B超诊断.中华超声影像学杂志,1993;2(4):151

2 Choji K, Shinohara M, Nojima T, et al. Significant reduction of the echogenicity of the Compressed cavernous hemangioma. Acta Radiologica, 1988;29(3):317

(收稿:1994-01-19;修回:1994-11-22)

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