DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.02.018

缺锌高锌时血浆肿瘤坏死因子的变化

吴嘉惠 汪江淮* 吴水冰 (第三军医大学西南医院儿科) 630038

提 要 本文通过建立缺锌(ZD)、高锌(ZE)大鼠模型,研究缺锌、高锌时血浆肿瘤坏死因子(TNF)的变化。结果表明:(1)ZD、ZE组的血浆TNF非常显著低于配对(PF)组和自由喂养(AL)组;(2)ZD、ZE组的骨髓和脾脏细胞增殖指数(PI)均非常显著低于PF和AL组;(3)ZD、ZE组的腹腔巨噬细胞吞噬指数非常显著低于PF和AL组;(4)正常锌(PF、AL)组血清TNF与骨髓、脾脏细胞的PI呈正相关;与腹腔巨噬细胞吞噬指数呈正相关;与血清锌、铜含量呈正相关;ZE组血浆TNF与骨髓、脾脏细胞的PI呈负相关。指示机体在锌状态正常时,骨髓、脾脏细胞增殖功能活跃,其产生的细胞因子TNF量也高;而高锌时,细胞增殖活性受抑制,TNF低于正常。

关键词 锌/缺乏;高锌*;肿瘤坏死因子/分析

中图法分类号 R730.3

TNF是细胞因子簇中的重要成员之一,不仅对多种肿瘤细胞具有杀灭作用,而且在免疫和炎症、感染性休克、恶病质、细胞生长调节等方面,均有重要的作用[1]。近年来,关于这方面的报道较多,但锌对TNF的影响,国内外尚未见报道。本文通过缺锌、高锌大鼠模型,观察其血浆TNF变化,并通过TNF与骨髓、脾脏细胞的增殖反应,以及血清锌铜含量的相关性分析,来探讨其对TNF的影响。

1 材料和方法

1.1 动物及饲料

断奶1~3 d雄性纯系Wistar大鼠,体重60~80 g,随机分成4组,每组10只。(1)ZD组自由食用缺锌饲料,参照Marray配方[2],含锌量<2 ppm;(2)PF组食用含锌铜饲料(在缺锌饲料中加硫酸锌,使含锌量为100 ppm),进食量同ZD组;(3)AL组自由食用含锌饲料;(4)ZE组自由食用高锌饲料(缺锌饲料中加硫酸锌,使锌含量达1 000 ppm)。上述4组饲养4周后活杀。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 微量元素测定:采用美国IL-AA951型原子吸收分光光度计测定饲料锌,及血清、毛发、股骨锌、铜含量。

1.2.2 几种组织细胞的流式细胞仪测定

1.2.2.1 细胞混悬液制备:取脾脏2 g,剪碎后加入Hank液2 ml,经组织匀浆器搅动,使组织内细胞逸出。用1640液冲出股骨骨髓。液体经200目铜网滤去残渣,再用4号针头抽吸使细胞分散,显微镜下观察已成单个细胞,调整细胞浓度为2×10^6/ml,经300目尼龙网过滤后,用70%冷乙醇固定。

1.2.2.2 染色及测定:检测前弃去乙醇液,PBS清洗一遍后,加RNA酶50 μl,37℃温育30 min后,放入冰浴中止酶作用。碘化丙啶(50 μg/ml)染色,避光15 min即可止机测定。再用美国Becton-Dickinson公司FACS440型流式细胞仪。每个样品收集约10 000个细胞数据,计算机根据数据自动绘图。

1.2.3 腹腔中巨噬细胞吞噬功能测定:参照谢哲子[3]吞噬功能实验法测定,略加改良。

1.2.4 血浆肿瘤坏死因子测定:采用L-929细胞生物学活性法[4],略加改良。将消化传代的L929细胞,加待测血浆在511型酶标分析仪上测定L929细胞的溶解度,结果以U/ml表示。1 U定义为导致50% L929细胞溶解的TNF水平。检测敏感线为40 U/ml,并与重组鼠TNF校准(1 U=1.67 pg γTNF),以抗TNF血清中和试验证实。

2 结果

2.1 锌对体重增长值和饲料效价的影响

各组大鼠实验前体重无显著差异,饲养4周后,ZD和ZE组体重增长值151.7±11.4 g和155.3±14.7 g非常显著地低于PF和AL组(203.8±10.3 g和293.1±11.1 g),ZD和ZE组的饲料效价0.21±0.01和0.21±0.02非常显著低于PF和AL组(0.29±0.01和0.30±0.02)。

2.2 饲料锌对血清、毛发、股骨锌的影响

血清、毛发、股骨锌均以ZD最低(16.1±2.9 μmol/L、173.4±9.4、82.9±10.0 μg/g);ZE组最高(74.6±5.6 μmol/L、446.6±12.2、404.8±5.8 μg/g),ZD、ZE与PF、AL组间均有非常显著地差异。

2.3 锌对血浆肿瘤坏死因子的影响

ZD、ZE组血浆TNF非常显著低于PF、AL组(表1)。

* 第三军医大学野战外科研究所

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

表1　缺锌、高锌时血浆肿瘤坏死因子含量($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Changes of plasma TNF during zinc dificiency and excess

Group	n	TNF (U/ml)
ZD	10	90±28
PF	10	190±46※
AL	10	180±23※
ZE	10	106±32

※：$P<0.01$，compared with ZD

2.4　锌对骨髓、脾脏细胞增殖指数的影响

ZD、ZE 组的骨髓细胞、脾总细胞及 T 淋巴细胞的增殖指数均非常显著地低于 PF 和 AL 组(表2)。

表2　缺锌、高锌时骨髓和脾脏细胞增殖指数($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　The effects of zinc on proliferative index of marrow cells and splenocytes

Group	n	PI of marrow cells★	PI of splenocytes★	
			total numbers	T-cells
ZD	10	0.21±0.04	0.22±0.02	0.31±0.03
PF	10	0.31±0.03※	0.30±0.03※	0.55±0.09※
AL	10	0.29±0.03※	0.29±0.02※	0.66±0.04※
ZE	10	0.21±0.02	0.22±0.02	0.29±0.03

※：$P<0.01$，compared with ZD

★：PI(proliferative index)$=\dfrac{S+G_2+M}{G_0/G_1+S+G_2+M}$

2.5　饲料锌对血清锌、铜含量及中性粒细胞吞噬指数的影响

ZD 组的血清锌、铜、中性粒细胞吞噬指数均非常显著地低于 PF、AL 组；ZE 组的血清锌特高，而血清铜与中性粒细胞吞噬指数却非常显著地低于 PF 和 AL 组(表3)。

表3　缺锌、高锌时血清锌、铜含量及腹腔吞噬细胞吞噬指数($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　The effects of dietary zinc on serum zinc, copper contents and phagocytic index of abdominal

Group	n	Serum Zn	Serum Cu	Phagocytic index★
ZD	10	0.115±0.05	0.163±0.05	125.8±28.7
PF	10	0.181±0.09※	0.257±0.03※	194.5±41.0※
AL	10	0.226±0.04※	0.212±0.03※	215.3±66.6※
ZE	10	0.387±0.07※	0.174±0.09	138.8±12.9

※：$P<0.01$，compared with ZD

★：Phagocytic index$=\dfrac{\text{Sum of phagocytosis}}{\text{No. of positive cells}}\times 100\%$

2.6　肿瘤坏死因子与某些指标的相关性分析

ZD 组 TNF 与各指标均无相关性。PF 与 AL 组 TNF 与中性粒细胞吞噬指数、骨髓、脾脏 T 淋巴细胞增殖率和血清锌、铜含量呈正相关，但 ZE 组 TNF 与骨髓、脾脏 T 淋巴细胞增殖指数呈负相关(表4)。

表4　肿瘤坏死因子与某些指标的相关性

Tab 4　Relationship of TNF with several indices

Index	ZD		PF		AL		ZE	
	r	P	r	P	r	P	r	P
Phagocytic index of granulocytes	0.46	>0.05	0.44	>0.05	0.98	<0.01	−0.42	>0.05
PI of marrow cells	0.44	>0.05	0.83	<0.05	0.52	>0.05	−0.84	<0.05
PI of splenocytes	0.42	>0.05	0.98	<0.01	0.66	>0.05	−0.92	<0.01
PI of T-cells	0.50	>0.05	0.98	<0.01	0.98	<0.01	−0.85	<0.05
Serum Zn	0.56	>0.05	0.82	<0.05	0.98	<0.01	−0.40	>0.05
Serum Cu	0.62	>0.05	0.82	<0.05	0.70	>0.05	−0.36	>0.05

3　讨论

本文 ZD、ZE 组的体重、体重增长值、饲料效价[5]均非常显著低于 PF、AL 组。ZD 组的血清、股骨、毛发锌非常显著地低于 PF、AL 组，ZE 组则相反。证实缺锌、高锌动物模型是成功的。

锌是必需微量元素，参与 DNA 聚合酶、RNA 聚合酶和生长激素的合成，与胸腺嘧啶核苷酸激酶的活性密切相关[6]。因此，缺锌或高锌时，核酸蛋白质合成受抑制，生长激素减少，影响全身组织器官生长发育和细胞的增殖分化。ZD、ZE 组的骨髓、脾脏细胞、T 淋巴细胞的增殖指数，以及外周血中性粒细胞的吞噬指数均非常显著地低于 PF、AL 组。提示机体锌正常时，能促进细胞增殖。反之，缺锌、高锌时，则抑制细胞增殖及中性粒细胞的吞噬功能。

血浆 TNF 主要由激活的单核－巨噬细胞产生[7]。

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

细菌脂多糖是最强烈的刺激剂，而病毒、真菌、寄生虫、肿瘤细胞膜成分、外周血淋巴细胞、多形核粒细胞、NK细胞及TNF本身和多种细胞因子包括IL-1、IL-2、IL-6、α-INF、G-INF均可诱发TNF的产生[8,9]。本文缺锌和高锌时血浆TNF水平降低，而机体锌含量正常时，TNF保持较高水平。提示缺锌或过量锌时，抑制TNF产生，适量锌促进TNF生成。

相关性分析发现，机体锌正常时，血浆TNF含量与骨髓、脾脏细胞增殖指数及外周血中性粒细胞吞噬指数呈正相关。但机体含锌过量时，血清TNF含量与骨髓、脾脏淋巴细胞增殖指数呈负相关。提示机体在锌状况正常时，骨髓及脾脏淋巴细胞的增殖功能活跃，其产生的细胞因子TNF量也高，而高锌时其细胞增殖活性受抑，TNF量低于正常。

TNF的生物活性作用很多，包括对肿瘤细胞有选择性的抗细胞毒作用，有调节炎症和免疫反应的作用如促进中性粒细胞、单核细胞的趋化、游走、吞噬、产生IL-1、IL-2、IL-6，对骨髓细胞、T、B淋巴细胞、胸腺细胞有促进增殖分化的作用[1]。TNF是针对创伤、炎症、肿瘤的一种应答反应，在维持机体的内环境稳定方面，起着重要的作用[9]。

本文结果证实，这种应答反应要在单核/巨噬细胞、骨髓细胞、脾脏淋巴细胞正常增殖分化情况下才能完成。高锌抑制了上述细胞的增殖分化，致不能产生正常量的TNF。

参考文献

1 Spriggs D. Induction of tumor necrosis factor expression and resistance in a human breast tumor cell line. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84: 6583

2 Marray EJ, Messer HH. Turnover of bone zine during normal and accelerated bone loss in rat. J Nutr, 1981, 111: 1641

3 谢哲子。应用金黄色葡萄菌和溶葡球菌素测定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)：108～110

4 Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE. Human tumor necrosis factor: production, purification and characterization. J Biol Chen, 1985, 260: 2345

5 刘志诚，于守详。营养与食品卫生学。北京：人民卫生出版社，1988. 14

6 孔祥瑞。必需微量元素的营养生理及临床意义。合肥：安徽科学技术出版社，1982. 210～259

7 Tracey KJ, Lowry SF, Fahey TJ. Cachectin/tumor necrosis factor induces lethal septic shock and stress hoamone recporses in the dog. Surg Gynecol Obstet, 1967, 164: 415

8 Moldawer IL, Rogy MA, Lowry SF. The of cytokiner in cancer cachexia. JFEN, 1992, 16: 43

9 Kasid A. Cytokines regulation of tumor necrosis factor-alpha and -beta (lymphotoxin)-messenger RNA experssion in human peripheral blood mononuclear cells. Cancer Res, 1990, 50: 5072

(收稿：1993-08-24；修回：1994-01-24)

Changes of plasma TNF in dietary zinc deficient and zinc excessive conditions in rats

Wu Jiahui, Wang Jianghuai, Wu Shuibing (Department of Pediatrics, Southwest Hospital, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract The effects of dietary zinc on the plasma level of tumor necrosis factor (TNF) were observed in rats. It was found that 1. the plasma level of TNF was significantly lower in zinc deficient (ZD) and zinc excessive (ZE) groups than in paired feeding (PF) and freely feeding (AL) groups; 2. the proliferative index of marrow cells and splenocytes was significantly lower in the ZD and ZE groups than in PF and AL groups; 3. the phagocytic index of abdominal phagocytes was significantly lower in ZD and ZE groups than in PF and AL groups; 4. the plasma TNF level was positively correlated with the proliferative index of marrow cells and splenocytes and the serum level of zinc and copper in PF and AL groups; and 5. the plasma TNF level was negatively correlated with the proliferative index of marrow cells and splenocytes in ZE group. These findings indicate that adequate dietary zinc contributes greatly to the proliferation of marrow cells and splenocytes, which in turn results a normal plasma level of TNF and the production of TNF is suppressed in both zinc deficient and excessive conditions.

Key words zinc/DC; zinc-excessive*; tumor necrosis factor/AN

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