DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.06.015
第16卷第6期 第三军医大学学报 Vol,16,No.6
1994年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec.1994

胆囊巨噬细胞与胆囊炎症和结石形成关系的动物实验与临床研究*

别 平 黄志强** 王救川 韩本立 杨可祯 段恒春 王加文 李 昆 (第三军医大学西南医院肝胆外科中心) 630038

提 要 收集人体胆囊63份,其中16无结石为非结石组,47例为胆囊胆固醇结石患者为结石组。测定胆囊组织内巨噬细胞(Mφ)数量,并测定肿瘤坏死因子(TNF)和、白细胞介素-1(IL-1)的含量。结果:结石组胆囊组织内Mφ数量明显高于非结石组;且结石组胆囊粘膜TNF、IL-1的含量亦显著高于非结石组。为进一步证实巨噬细胞与胆囊的炎症反应和结石形成之间的关系,应用动物实验,将82只兔分为普通饲料(对照)组、1.2%胆固醇饲料(HChD)1、2、4周组、强的松1、4周组(喂HChD,同时服强的松1 mg/kg/d)。饲以HChD的兔于第2周有6/15只出现结石,4周则11/14只有结石。而从第1周开始,胆囊组织内巨噬细胞(Mφ)数量即显著升高(与对照比,$P<0.001$),且吞噬功能活跃;并随时间延长,胆囊组织出现炎症反应。强的松组的胆囊组织内Mφ数量明显减少(与对照比,$P>0.05$),炎症反应轻,仅4/15只出现结石(4周)。结果提示脂类代谢紊乱、"成石性胆汁"可激活胆囊组织的Mφ;活化的Mφ与胆囊的炎症反应及结石形成有着内在联系。

关键词 巨噬细胞;胆囊炎;胆结石
中图法分类号 R575.62

胆囊结石病人的胆囊多伴有不同程度的炎症反应,巨噬细胞(Mφ)及其释放的细胞因子在细胞功能调节中起着重要的作用,且与炎症的发生发展有着密切的联系[1]。本文通过对胆囊结石患者胆囊组织Mφ、肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素-1(IL-1)含量的测定;应用动物胆囊结石模型,除外感染因素,动态观察胆囊Mφ数量的变化、炎症反应及结石形成情况,分析它们之间的关系。

1 材料与方法

1.1 人体胆囊标本的收集

取人体胆囊63份:无结石的胆囊16份(肾移植供体胆囊10份、右肝血管瘤患者胆囊6份),为非结石组;胆囊结石患者的胆囊47份(无结石嵌顿)为结石组。剥取胆囊部分底体部粘膜上皮及固有层(简称胆囊粘膜)。送胆囊组织及胆囊胆汁作细菌定量检查,均无细菌生长。

1.2 动物及饲料

健康成熟家兔94只,体重2.0~2.9 kg,其中雄性45只、雌性49只。普通饲料:参照家兔饲养标准配制。1.2%胆固醇饲料(HChD):按1.2∶100比例,将胆固醇干粉加入普通饲料。

1.3 动物分组与饲养

随机分为6组,对照组喂普通饲料1周($n=12$)、将其视为HChD0周组。HChD1、2、4周组(分别$n=13$、15、14)。强的松1、4周组(分别$n=13$、15),喂HChD、同时给服强的松(1 mg/kg/d)。另HChD分别喂养兔1、3、5日,共12只,各时相点4只(只用作组织学观测和Mφ定量)。

1.4 临床资料观测指标

1.4.1 人体胆囊Mφ数量

1.4.1.1 试剂:L19(抗人体组织中Mφ)单克隆抗体由武汉生物制品研究所提供,抗生物素-生物素-过氧化酶复合物(ABC)药盒系美国Vector Laboratories产品。

1.4.1.2 胆囊标本免疫组化染色[2]:将胆囊标本制成冰冻切片,采用ABC免疫组化法染色。并作空白、替换及抑制对照试验。

1.4.1.3 Mφ定量测定:应用LEICA公司MP-20型真彩色自动图象分析仪,对胆囊组织切片ABC免疫组化染色阳性的细胞进行测定,其量换算成相对面积,即任意单位(Arbitrary Unit,AU),同时对所测视野Mφ计数。

1.4.2 人体胆囊粘膜TNF的含量:采用Hesse[3]双抗体夹心法(ELISA)测定TNF含量。TNF测定药盒购自军事医学科学院。

1.4.3 胆囊粘膜IL-1:采用胸腺细胞增殖检测法[4]。C_3H/HeJ小鼠购自第三军医大学动物所,IL-1。标准品购自美国Promega公司,氚标胸腺嘧啶脱氧核苷(^3H-TdR)为上海核物理研究所产品。测定胆囊粘膜匀浆上清液的蛋白含量[5],IL-1含量以u/mg蛋白表示。

1.5 动物模型观测指标

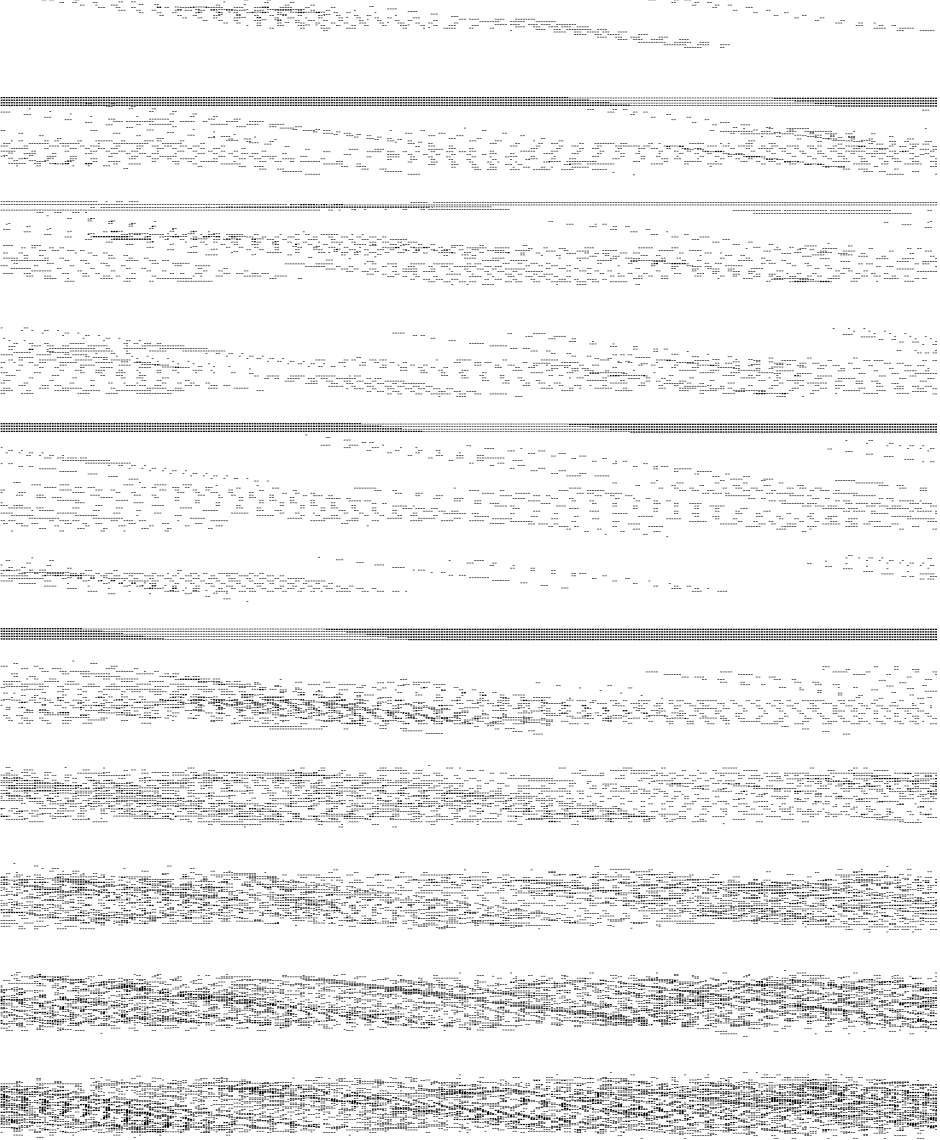
1.5.1 胆囊胆汁胆固醇结晶及结石鉴定:肉眼观察胆汁内有粗大颗粒,光镜下观察为致密大团块,即为结石。光镜下观察胆汁内的胆固醇结晶,其定量等级按Juniper制定的标准划分[6]。

1.5.2 胆囊组织形态学观察:处死家兔,取胆囊组织分别制成光镜切片(HE染色)和电镜切片,在光镜和透射电镜下观察。

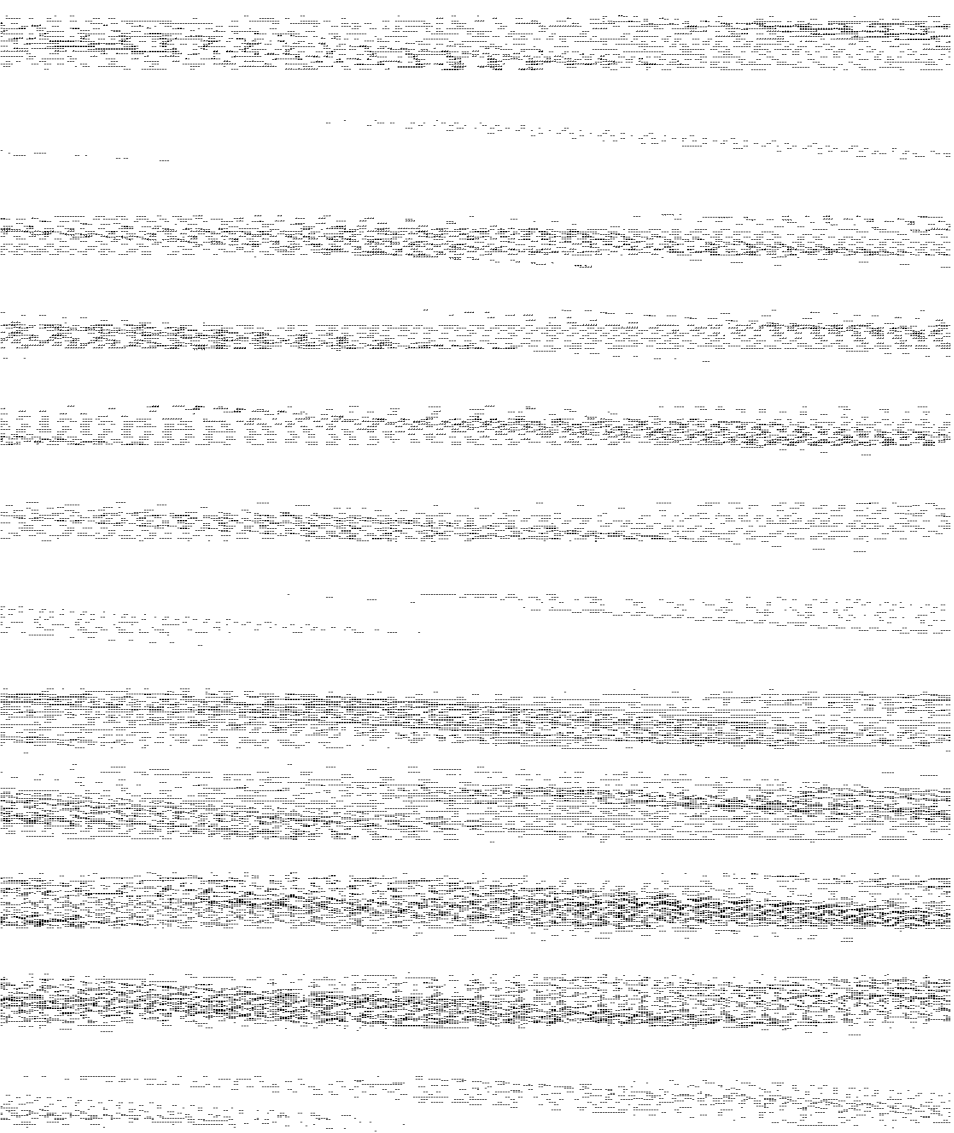
1.5.3 胆囊Mφ定量:每组5只兔,采用胶性碳吞噬法[7],取胆囊组织,切片,红色淡染。用MP-20型真彩色自动图像分析仪

* 全军中青年科研课题资助项目
** 解放军总医院肝胆外科

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



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



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

3 讨论

临床研究发现，结石组胆囊组织内Mφ数量、胆囊粘膜主要由Mφ释放的TNF、IL-1含量明显高于非结石组，表明在结石形成过程中，胆囊组织内Mφ数量增多，并活化释放出细胞因子。动物模型实验，HChD喂养家兔，在早期胆囊组织内Mφ数量即明显增多，且吞噬功能活跃，提示Mφ被活化。取胆囊标本时，吸胆汁做细菌定量培养，均无细菌生长，可认为胆囊组织内Mφ的活化与细菌感染关系不大。并发现在胆囊结石形成之前胆囊逐渐出现明显的组织学改变：胆囊粘膜上皮增生，粘膜间质内炎细胞浸润等；电镜观察可见胆囊上皮细胞间隙增宽，细胞腔侧线粒体及分泌颗粒显著增多。有学者用组织化学方法PAS染色此模型的胆囊组织，上皮细胞内的分泌颗粒呈阳性反应，示上皮细胞合成分泌粘蛋白(MP)功能增强[8]。

有关胆囊结石形成的早期，胆囊组织内Mφ数量及功能的变化，尚未见报道。其Mφ被活化的机理不清楚，可能与HChD引起的脂类代谢失衡、肝脏分泌的"成石性胆汁"中某些胆汁酸成分和溶血卵磷脂(LysoLC)等对胆囊粘膜上皮有毒性作用、损伤粘膜有关。且Mφ可直接吞饮或经低密度脂蛋白(LDL)受体结合LDL、吞噬脂类，Mφ过多的摄入脂质及脂蛋白可被激活。

分析胆囊组织Mφ活化与胆囊的炎症反应、结石形成之间的关系，可能由于Mφ活化，氧化酶系统即被激活，产生氧自由基[9]；同时Mφ释放TNF、IL-1等细胞因子，具有趋化中性粒细胞的作用，致炎细胞浸润，并刺激其释放髓过氧化物酶，"呼吸爆发"产生超氧化物。氧自由基活跃过度，可导致组织、细胞损伤，引起炎症反应。此外，氧自由基可激活磷脂酶A_2(PLA_2)[10]，PLA_2使胆囊上皮细胞膜磷脂及胆汁内磷脂发生水解，释放出花生四烯酸(AA)，进而转化为PGs等，现已证实PGs与胆囊粘膜上皮合成MP功能亢进有关[11]，后者对胆囊结石的形成有着重要的促进作用。

服用强的松的动物胆囊组织内Mφ数量在正常对照水平范围，结石形成率低，可能主要是通过以下几点发挥作用：1. 抑制单核细胞转化为Mφ。2. 抑制Mφ释放细胞因子，减轻氧自由基的活动及胆囊的炎症反应。3. 是PLA_2的抑制剂[12]，减少AA转化为PGs等。最终起到减轻胆囊组织的炎症反应、降低胆囊上皮细胞合成分泌MP功能、抑制结石形成。

本文通过临床研究结合动物模型实验，结果提示：由于脂类代谢紊乱、"成石性胆汁"激活胆囊局部组织内的Mφ，后者与胆囊组织的炎症反应、上皮细胞合成分泌MP功能亢进及结石形成有着密切取系。胆囊组织内Mφ在结石形成过程中的具体激活机理、以及作用尚待深入研究。

参考文献

1 Nathan CF, Murray HW, Cohn ZA. The macrophage as an effector cell. N Engl J Med, 1980, 303: 622～626

2 Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabled antibody (PAP) procedures. J Histochem Cytochem, 1981, 29: 577～580

3 Hesse DG, Tracey KJ, Fong Y, et al. Cytokine appearance in human endotoxermia and primate bacteremia. Surg Gynecol Obstet, 1988, 166: 147～153

4 Mizel SB, Mizel D. Purification to apparant homogeneity of murine interleukin 1. J Immunol, 1981, 126, 834～837

5 Lorry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, 1951, 193: 265～275

6 Juniper K, Burson EN. Biliary tract studies Ⅰ. the significance of biliary crystals. Gastroenterology, 1957, 32: 175～211

7 Holman JM Jr., Rikkers LF. Biliary obstruction and host defense failure. J Surg Res, 1982, 32: 208～213

8 Lee SP, Scott AJ. The evolution of morphologic changes in the gallbladder before stone formation in mice fed a cholesterol-cholic acid diet. Am J Pathol, 1982, 108: 1～8

9 Sasada M, Masakura S. Oxygen radicak generation and, microbicidal activity of human macrophages. In: Reichards S, et al (eds). Progress in Leukocyte Bilogy vol 4. New York: Alan R Liss Inc, 1985: 505～512

10 Bomalaski JS, Steiner MR, Simon PL, et al. IL-1 increase phospholipase A_2 activity expression of phospholipase A_2 activating protein, and release of linoleic acid from the murine T helper cell line EL-4. J Immunol, 1992, 148: 155～160

11 别 平，孟宪钧，黄志强，等. 前列腺素环磷酸腺苷在胆囊结石形成中的作用. 中华外科杂志，1987，25：339～342

12 Flower RJ, Blackwell GJ. Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of phospholipase A2 inhibitor which prevents prostaglandin generation. Nature, 1979, 278: 456～459

(收稿：1994-10-22；修回：1994-11-11)

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

The relationship of macrophages with gallbladder inflammation and gallstone formation

Bie Ping, Huang Zhiqing, Wang Aochuan, Han Benli, Yang Kezhen, Duan Hengchun, Wang Jiawen, Li Kun
(Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract Sixty-three human gallbladders were collected, among which 16 were normal bladders (no-stone group) and 47 inflammed ones with cholesterol stones (stone group). Every gallbladder was examined to determine the macrophage count and the level of tumor necrosis factor (TNF) and interleukin 1 (IL-1). It was found that the macrophage count was significantly larger and the level of TNF and IL-1 mainly secreted by the macrphages, was significantly higher in the stone group than in the no-stone group.

In order to clarify further the relationship of macrophage with gallbladder inflammation and gallstone, experiments were done in rabbits which were randomized into the control group taking ordinary food and high cholesterol diet (H-ChD) group taking a diet containing 1.2% cholesterol. At the end of 2 weeks, abundant cholesterol crystals emerged in thebile of H-ChD group and gallstones were found in 6 out of the 15 rabbits. There was a high incidence of gallstone (11/14) of rabbits after 4 weeks of H-ChD feeding.

As early as 7 days after H-ChD feeding, the macrophage count was significantly increased ($P<0.001$ vs the control) and their phagocytosis was enhanced. Inflammatory reaction and epithelial cell proliferation of the gallbladder occurred a little later.

The rabbits to which prednisone 1 mg/kgday was administered for 1 or 4 weeks showed a normal macrophage count and slight inflammatory reaction without significant epithelial proliferation was found in their gallbladder. Gallstone was found only in 4/15 rabbits after prednisone administration for 4 weeks.

These findings suggest that macrophages in the gallbladder can be activated as a result of lipid metabolic disorder and the "lighogenic bile" and they play a role in the gallbladder inflammation and stone formation.

Key words macrophage; inflammation; gallstone

针刺治疗小儿高热惊厥30例

Thirty cases report of accupuncture therapy of hyperpyretic convulsion

徐 明 (第三军医大学新桥医院针灸科) 630037
徐长城 (河北省廊坊市52809部队门诊部) 102800

惊厥是儿科常见急症之一,当上呼吸道感染、急性扁桃腺炎、流感等急性感染性疾病伴高热时发生的惊厥为高热惊厥。1974～1993年,笔者采用针刺辅以中药治疗高热惊厥30例,疗效较好,现报道如下。

1 临床资料

30例均系上呼吸道感染患儿,其中男18例,女12例。发病年龄3个月至5岁半;惊厥均发生在发热后12～24h之内,体温38.5～40℃之间;惊厥持续时间资料不全,未统计。

2 临床表现及体征

惊厥之前,常有发热、呕吐、烦燥不安[1]。惊厥发作时突然意识丧失、口唇青紫、四肢抽动。有时伴有目睛上视、口吐白沫、颈项强直、角弓反张。查体常发现心音亢进、脉搏细弱,偶见瞳孔缩小。

3 治疗方法

3.1 针刺

惊厥发作时,首先用0.5寸毫针迅速针刺印堂、身柱、大椎、曲池、人中等穴施泻法[2],不留针,十二井穴以三棱针或毫针点刺放血;人中穴针尖向上斜刺,平补平泻,持续运针至症状改善。印堂、身柱善治小儿急慢惊风;大椎、曲池清泄邪热;人中通调督脉止搐醒神;十二井穴引热下行,平衡阴阳。使用本方,能退热止惊停搐。

3.2 中药方剂

针刺后,服中药。取黄连6 g、黄芩6 g、防风5 g、天麻5 g、

(下转436页)

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