

· 基础论著 ·

内毒素对大鼠肥大细胞脱颗粒 释放肿瘤坏死因子- α 的影响

王沁芳 赵龙凤 郝彦琴 李红

【摘要】 目的 通过体外分离培养大鼠腹腔肥大细胞(RPMC),进而探讨内毒素(ETX)对 RPMC 脱颗粒释放 TNF- α 的影响。**方法** 将悬浮培养的 RPMC 分为 5 组:(1)无 ETX 处理组;(2) 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ETX 处理组;(3) 1 $\mu\text{g/ml}$ ETX 处理组;(4) 2 $\mu\text{g/ml}$ ETX 处理组;(5) 4 $\mu\text{g/ml}$ ETX 处理组。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,收集 RPMC 上清,用放射免疫分析法测定培养上清中 TNF- α 的水平。**结果** 不同浓度 ETX 处理组与无 ETX 处理组相比 RPMC 脱颗粒现象明显;不同浓度 ETX 处理组刺激 RPMC 释放 TNF- α 的量均高于无 ETX 处理组($P < 0.05$),与 ETX 剂量依赖性不明显($P > 0.05$),给予 1 $\mu\text{g/ml}$ ETX 处理时 TNF- α 的释放量最高。**结论** ETX 体外可刺激 RPMC 脱颗粒,释放 TNF- α ,但与 ETX 剂量依赖性不明显,由此可推测内毒素可通过刺激 RPMC 释放 TNF- α 参与肝纤维化的发生发展。

【关键词】 肥大细胞;内毒素;肿瘤坏死因子- α

Influence of endotoxin on mast cell degranulation and secretion of TNF- α

ZHAO Long-feng, WANG Qin-fang, HAO Yan-qin, LI Hong. Department of Infectious Diseases, First Clinical Medical College, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China

Corresponding author: WANG Qin-fan, Email: qinfang1234@163.com

【Abstract】 Objective To explore the influence of endotoxin on mast cell degranulation by isolating and culturing rat peritoneal mast cells in vitro. **Methods** After collecting the supernatant of RPMCs treated with various concentrations of ETX (0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 4 $\mu\text{g/ml}$ respectively), the TNF- α activity in supernatant was detected. **Results** Compared to the no ETX group, RPMCs in ETX groups showed a obvious degranulation, and the TNF- α activity detected in the supernatant of RPMCs in ETX groups increased significantly ($P < 0.05$), which was not significantly dependent on the dose of ETX ($P > 0.05$). The TNF- α activities detected in the supernatant of RPMCs in 1 $\mu\text{g/ml}$ ETX group was the highest. **Conclusions** ETX can stimulate RPMCs to release TNF- α by the degranulation in vitro, which is not significantly dependent on the dose of ETX.

作者单位:030001 太原,山西医科大学第一临床医学院感染病科

通讯作者:王沁芳 Email:qinfang1234@163.com

【Key words】 Mast cell; Endotoxin; TNF- α

肝纤维化是由多种因素共同作用而发生的一个复杂的病理过程。在肝纤维化的过程中,肥大细胞在肝组织中聚集、增殖、释放颗粒和所含介质,发挥生物学作用,参与了肝纤维化的病理生理过程^[1]。而 TNF- α 是肥大细胞脱颗粒释放的重要细胞因子之一,其可以激活多种炎症细胞,并诱导其它细胞因子如 IL-1、IL-6、IL-8 的产生和释放,使炎症信号进一步放大,产生级联放大作用^[2]。研究表明,肝纤维化时均伴有肠源性内毒素血症(intestinal endotoxemia, IETM),内毒素的主要成分为脂多糖(lipopolysaccharide, LPS),在体内可以产生强大的生物学效应^[3]。而关于 IETM 与肥大细胞的相互作用关系尚不清楚。本研究探讨了 ETX 对肥大细胞脱颗粒释放 TNF- α 的影响,为研究肝纤维化的病理机制提供实验基础。

材料和方法

一、实验动物

健康 Wistar 大鼠(清洁级),雄性,36 只,体重 200g ~ 250 g,山西医科大学实验动物中心提供。

二、主要试剂和仪器

Percoll 分离液购自 Pharmacia 公司,ETX、L-谷氨酰胺、甲苯胺蓝购自 Sigma 公司,胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司,CO₂ 培养箱为 THERMO ELECTRON CORPORATION 3111, KDC-40HR 低速离心机购自科大创新股份有限公司中佳分公司,倒置显微镜为 OLYMPUS-CKX41。

三、肥大细胞的分离和培养

1. 大鼠腹腔肥大细胞的分离:依据相关文献^[4],将正常 Wistar 大鼠断颈处死,然后将大鼠身体(除头部)酒精浸泡,将动物四肢固定于操作台,腹腔注射 RPMI 1640 液 15 ml,轻按摩腹部 2 min,打开腹腔,吸取腹腔冲洗液,1500 r/min 离心 10 min,弃上清,取细胞悬液缓慢加入 30%:80% 的 Percoll 梯度分离液中,2500 rpm 离心 15 min, PBS 液洗两次(4 °C, 1500 r/min 离心 10 min),收集 30% 和 80% 交界处细胞,镜下计数,调细胞浓度至 $5 \times 10^6 \sim 6 \times 10^6$ /ml。台盼蓝染色活力大于 95%,甲苯胺蓝染色纯度大于 90%,置于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中培养备用。

2. 细胞活力鉴定:取细胞悬液 50 μ l,加入 5 μ l 的 0.4% 台盼蓝染液,混匀染色 2 min,滴于载玻片上显微镜下观察,死细胞呈深蓝色,活细胞不着色。按公式计算细胞存活率:细胞存活率(%) = 活细胞数/细胞总数 $\times 100\%$

3. 细胞纯度鉴定:取 50 μ l 细胞悬液加入 5 μ l 体积的甲苯胺蓝染液中,染色 3 min ~ 5 min,滴于载玻片上,在显微镜下观察并计数,肥大细胞呈紫红色。

四、细胞分组与处理方法

分离出的 MC,鉴定其活力和纯度后,将悬浮培养的 RPMC 分为 5 组,每组 15

个标本,并加入不同浓度的 ETX:(1) 无 ETX 处理组;(2) 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ETX 处理组;(3) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ETX 处理组;(4) 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ETX 处理组;(5) 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ETX 处理组。在 37℃ 下孵育 2 h,再次进行活力及纯度的鉴定,收集培养的 RPMC 上清待测。

五、统计学处理

数据为计量资料,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析和 t 检验进行统计分析。

结 果

一、ETX 对 RPMC 脱颗粒的形态学影响

RPMC 甲苯胺蓝染色显示:细胞体积较大,形态多呈圆形、椭圆形,染色呈紫红色,偶可见细胞脱颗粒。加入不同浓度 ETX 孵育 2 h 后,肥大细胞脱颗粒明显,在 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ETX 处理组中细胞脱颗粒现象最明显(图 1,2)。

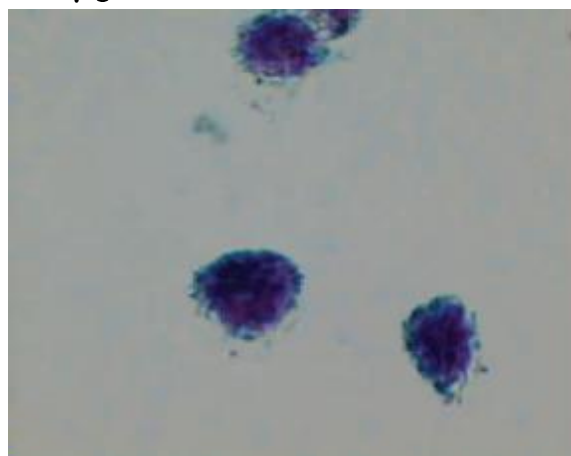


图 1 甲苯胺蓝染色:无 ETX 处理组 ($\times 400$)

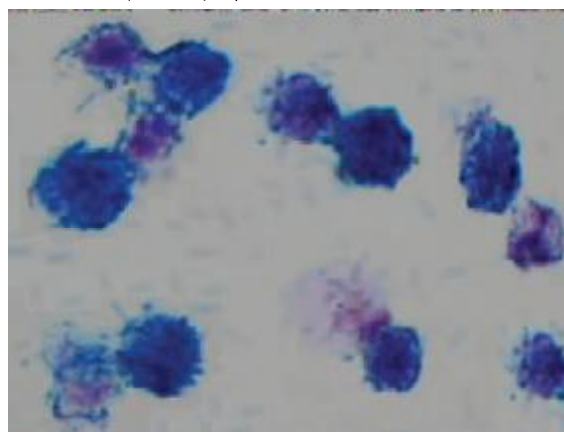


图 2 甲苯胺蓝染色:1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ETX 处理组 ($\times 400$)

二、ETX 对 RPMC 存活率的影响

各组 RPMC 的细胞存活率均在 90% 以上,且各组间无显著性差异 ($P > 0.05$),说明 ETX 对 RPMC 的存活无明显影响(见表 1)。

三、ETX 对 RPMC 脱颗粒释放 $\text{TNF-}\alpha$ 的影响

不同浓度 ETX 处理 RPMC 后 $\text{TNF-}\alpha$ 的释放水平均高于无 ETX 处理组,其差别具有统计学意义 ($P < 0.05$),但不同浓度 ETX 处理组之间差异不明显 ($P > 0.05$)(表 1)。

表 1 各组 RPMC 存活率和培养上清中 $\text{TNF-}\alpha$ 含量的测定 ($\bar{x} \pm s$)

组别	RPMC 存活率	$\text{TNF-}\alpha$ (ng/ml)
对照组	93.20 ± 7.60	0.81 ± 0.02
ET ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
0.5	93.70 ± 4.80	$0.88 \pm 0.10^*$
1.0	93.50 ± 8.90	$0.95 \pm 0.70^*$
2.0	94.10 ± 9.10	$0.87 \pm 0.46^*$
4.0	93.80 ± 9.80	$0.82 \pm 0.32^*$

注:与对照组相比, $*P < 0.05$

讨 论

肝纤维化是各种慢性肝病发展为肝硬化的中间环节。肝纤维化的发病机制尚未完全清楚,但肝星状细胞激活并转化为肌成纤维细胞和成纤维细胞,通常被认为是肝纤维化发生发展的核心环节^[5]。而肝纤维化的同时均伴有 IETM,后者可影响肝纤维化的进程,导致疾病进展。

近年来,国内外很多研究表明,肥大细胞也参与肝纤维化过程^[6]。贾晋斌等^[7]研究证实在慢性肝纤维化过程中,肥大细胞数目增加与纤维化严重性呈正相关,并且部分肥大细胞胞体增大,出现较多脱颗粒现象。

肥大细胞来源于骨髓 CD34⁺ 细胞,通过血液运输到机体的各个部位,并在局部分化成熟。肥大细胞能产生、储存和释放许多具有不同调节活性的介质,其中 TNF- α 是肥大细胞释放的重要细胞因子之一,TNF- α 可吸引中性粒细胞,使其产生超氧负离子,促使枯否细胞与单核细胞发生呼吸爆发,释放氧自由基,并能诱导肝窦内皮细胞和肝细胞大量表达细胞间粘附分子-1,TNF- α 还能诱导 IL-1、IL-6、IL-8 的产生,并使其处于高活性状态,加重炎症反应和肝细胞的损害,造成肝脏炎症持续存在,以上均可加重肝细胞损伤,促进肝纤维化的发展。有研究表明,随着肝炎程度及肝纤维化程度加重,TNF- α 水平也随之升高^[8]。TNF- α 还可以反映肥大细胞活化、脱颗粒及相关细胞因子的合成和分泌强度,是肥大细胞活化及脱颗粒的重要标志。

本实验通过用不同浓度 ETX 作用于体外培养的 RPMC 进行研究发现:不同浓度 ETX 均可刺激 RPMC 释放 TNF- α ,其释放量与 ETX 剂量依赖性不明显。不同浓度 ETX 对 RPMC 的存活率无明显影响。可见 ETX 通过刺激肥大细胞脱颗粒释放介质促进肝纤维化,并且肥大细胞所释放的 TNF- α 在肝纤维化中发挥重要的作用。由此推测抗内毒素治疗与抑制肥大细胞功能均可以阻断肝纤维化进程,且具有协同作用,为临床抗肝纤维化治疗提供新的思路。

参 考 文 献

- 1 Franceschini B, Ceva-Grimaldi G, Russo C. The complex functions of mast cells in chronic human liver diseases. Dig Dis Sci. 2006, 51:2248-56.
- 2 Xie J, Lin M, Liu A, et al. Determination of TNF-alpha and endotoxemia in patients with chronic liver diseases. Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao, 1999, 24:164-6.
- 3 韩德五. 肠源性内毒素血症与肝病-肝衰竭的 IETM 学说. 北京: 中国科学技术出版社, 2004:248-249.
- 4 郭薇, 陈玉川, 刘水平, 等. 肥大细胞体外脱颗粒的检测方法. 中国病理生理杂志, 2002, 18:1023-1024.
- 5 D'Amico G, Garcia Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. Hepatology, 2006, 44:217-231.
- 6 Farrel DJ, Hines JE, Walls AF, et al. Intrahepatic mast cells in chronic liver disease. Hepatology, 1995, 22:1175-1181.
- 7 贾晋斌, 韩德五, 崔慧林, 等. 肥大细胞在肝纤维化发生发展过程中的作用及其与 TNF- α 的关系. 中华肝病杂志, 1998, 6:235-237.
- 8 苏是苍, 李承彬, 胡勤明. 慢性乙肝肝纤维化不同分期 TNF- α 、NO 和内毒素水平变化. 标记免疫分析与临床, 2006, 13:131-133.

(收稿日期:2007-01-08)

(本文编辑:吴淑玲)