

不同剂量 LPS 诱导肝 Kupffer 细胞 释放 TNF 的体外研究*

王 涛 汪江淮 陈惠孙 刘 韧 蒋建新 刁有芳 田昆仑 王正国

(第三军医大学野战外科研究所 重庆, 630042)

已有研究表明, 由脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 产生的内毒素休克动物其循环血中肿瘤坏死因子 (Tumor Necrosis Factor, TNF) 活性的升高是一短暂的过程^[1]。体外培养的巨噬细胞尽管持续维持 LPS 的刺激, 最终也将停止 TNF 的合成和分泌^[2]。TNF 主要由单核/巨噬细胞系统产生, 而肝 Kupffer 细胞是巨噬细胞的主要组成成分。但是, 有关不同剂量 LPS 刺激诱导肝 Kupffer 细胞分泌释放 TNF 的动力学变化特征, 以及这种变化特征与内毒素/感染性休克时循环血中 TNF 变化之间的相互关系尚未得到证实。本实验观察不同剂量 LPS 在体外对肝 Kupffer 细胞释放 TNF 的作用, 以及对肝 Kupffer 细胞 TNF 释放动力学特点的影响。

材 料 和 方 法

一、主要试剂和仪器

胶原酶 (IV 型, Sigma), 胰蛋白酶 (1:125, Sigma), RPMI 1640 (GIBCO), 放线菌素 D (Sigma), 重组鼠 TNF (4×10^7 U/mg, Genzyme), LPS (血清型 O₂₆B₆, DIFCO)。低速冷冻离心机 (ZK-380 型, HERMLE), 酶标自动分析仪, CO₂ 培养箱。

二、肝 Kupffer 细胞的分离和培养^[3,4]

取 200 g 左右 Wistar 大鼠, 性别不拘, 禁食过夜。3% 戊巴比妥钠 (3 mg/100 g 体重) 腹腔麻醉后, 2% 碘酒和 75% 酒精消毒皮肤。颈总动脉插管并肝素化 (80 u/100 g 体重)。腹正中切口, 门静脉插管并连接至电子蠕动泵的输出端, 经门静脉向肝脏灌注预温的 HEPES 缓冲液 500 ml。待肝脏变白后, 再灌注预温的 0.025% 胶原酶液 300 ml。取下肿胀变白的肝脏, 冷

HEPES 缓冲液洗涤两次, 再加 HEPES 液 80 ml, 用吸管吹打使肝细胞分散, 80—100 目尼龙滤布过滤。过滤的细胞悬液 50 g 离心 2 min, 弃沉淀。将上清反复用 50 g, 2 min 离心两次和 500 g, 3 min 离心一次, 留取沉淀加冷 RPMI 1640 培养液 500 g, 3 min 离心两次, 弃上清, 沉淀用培养液悬浮至所需浓度。按上述方法分离的肝非实质细胞 (包括 Kupffer 细胞、内皮细胞、纤维细胞、储脂细胞) 约占分离细胞总数的 99% 以上, 而肝 Kupffer 细胞又占肝非实质细胞总数的 40% 以上^[3]。而肝 Kupffer 细胞又占肝非实质细胞总数的 40% 以上^[3]。台盼蓝染色检查细胞存活率 >95%。

细胞悬液按 1×10^6 个细胞接种至 24 孔细胞培养板上, 37℃、5% CO₂ 培养 30 min, 弃去未贴壁细胞 (主要为内皮细胞、纤维细胞、储脂细胞), 更换 RPMI 1640 培养液继续培养 4 小时后, 按实验分组继续培养至各预定时限。

三、培养上清液 TNF 活性测定

按放线菌素 D 处理 L 929 靶细胞法^[5]。

四、实验分组和步骤

体外实验分为下列四组: 生理盐水对照组 (N=8), 低剂量 LPS (终浓度 50 ng/ml) 组 (N=8), 中剂量 LPS (终浓度 100 ng/ml) 组 (N=8), 高剂量 LPS (终浓度 150 ng/ml) 组 (N=8)。置 37℃、5% CO₂ 继续培养, 并于 LPS 加入前、后各个预定时间相取培养上清测定 TNF。加入 LPS 后 6 小时, 弃培养上清, 用培养液洗涤三次, 再加入 LPS, 使各组终浓度均为 100 ng/ml。置 37℃、5% CO₂ 继续培养, 并于再加入 LPS 后各个预定时间相取上清测定 TNF。对照组除加入等量生理盐水代替 LPS 外, 培养条件和时间同 LPS 组。

所有计量资料经统计学方法处理, 以 $\bar{X} \pm SD$ 表示。

* 国家自然科学基金资助项目。

结 果

加入 LPS 后 1 小时, 三组 Kupffer 细胞培养上清液中均可测到 TNF 活性, 3 小时达到峰值, 以后基本维持在该水平。其中 100 和 150 ng/ml 两组上清液 TNF 活性在加入 LPS 后 2 小时起明显高于 50 ng/ml 组 ($P < 0.01$), 3 小时的峰值分别较 50 ng/ml 组高 82% 和

101% ($P < 0.01$), 而 150 ng/ml 组与 100 ng/ml 组相比, 上清液 TNF 活性虽稍有升高, 但并无明显差异 ($P > 0.05$)。再次加入 LPS 100 ng/ml 后 2 小时, 只有 50 ng/ml 组培养上清液中有 TNF 活性升高, 但幅度较前明显下降 ($P < 0.01$), 100 和 150 ng/ml 两组培养上清液中则没有测到 TNF 活性(表)。

表 不同剂量 LPS 对肝 Kupffer 细胞释放 TNF 的作用 (ng/ml)

组 别	给 予 LPS 前	第一次给予 LPS 后					第二次给予 LPS (100 ng/ml) 后				
		1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	6 hr	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	6 hr
对照	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
50 ng/ml	—	0.25± 0.09	0.49± 0.12	0.83± 0.19	0.85± 0.17	0.82± 0.16	—	0.21± 0.07	0.34± 0.10	0.52± 0.11	0.57± 0.10
100 ng/ml	—	0.41± 0.13	1.08± 0.24**	1.51± 0.33**	1.52± 0.30**	1.52± 0.25**	—	—	—	—	—
150 ng/ml	—	0.39± 0.21	1.19± 0.32**	1.67± 0.31**	1.65± 0.33**	1.61± 0.29**	—	—	—	—	—

1. 与 50 ng/ml 组相比 ** $P < 0.01$; 2. “—” 示未测出 TNF 活性。

讨 论

TNF 主要由单核/巨噬细胞系统产生, 其中巨噬细胞是产生 TNF 的主要场所, 肝 Kupffer 细胞则是机体巨噬细胞的最大组成部分。在已知能刺激巨噬细胞产生 TNF 的物质中, LPS 的作用最强。它能同时激活巨噬细胞 TNF 基因的转录和翻译, 促进 TNF 合成和分泌^[6]。

体内一次给予 LPS 造成内毒素休克时, 其循环血中 TNF 的升高只是一持续 2~4 小时快速而短暂的过程, 此时即使再给予 LPS, 也不能引起循环血中 TNF 的再次升高^[1]。然而我们已往的研究发现实验性败血症/感染性休克和临床败血症/感染性休克时, 血浆 TNF 的出现、升高、消失与静脉一次输注 LPS 造成的内毒素休克具有不同的动力学过程^[7]。国外也有类似的临床败血症休克病人的研究报告^[8]。因此, 有必要探讨不同剂量 LPS 对巨噬细胞分泌释放 TNF 的特征, 及其与内毒素/感染性休克时循环血中 TNF 变化之间的关系。

本实验结果显示, 三种 LPS 剂量与 Kupffer 细胞一起孵育后, 培养上清液中 TNF 水平均显著升高, 但 50 ng/ml LPS 组 TNF 水平较 100 ng/ml 和 150 ng/ml LPS 两组低 82—101%。6 小时后三组再加入 LPS 100 ng/ml, 结果只有 50 ng/ml LPS 组培养上清液中 TNF 水平又复升高。上述结果说明, 肝 Kupffer 细胞在较大剂量 LPS 刺激下能够合成并释放大量的 TNF, 但对 LPS 的再次刺激不再起反应。而 Kupffer 细胞在小剂量 LPS 刺激下, 尽管合成释放的 TNF 水平较低, 但对 LPS 的再次刺激能够再起反应。

从本实验结果我们可以看出, LPS 在体外诱导肝 Kupffer 细胞释放 TNF 在一定范围内具有剂量依赖关系, 并有一定的时间反应性, 表现为高剂量的 LPS 能够引起 TNF 的大量而短暂的合成释放; 而低剂量的 LPS 虽然引起 TNF 呈较低水平的合成释放, 但保留了 Kupffer 细胞对 LPS 的再次反应能力。可能正是这种 TNF 产生细胞——单核/巨噬细胞系统对不

同剂量 LPS 的反应特点, 决定了内毒素、败血症、感染性休克时循环血中 TNF 变化的不同动力学过程。当然, 这一假设尚需要更为深入和系统的研究来加以证实。

摘 要

本实验观察了不同剂量 LPS 诱导大鼠肝 Kupffer 细胞释放 TNF 的作用。加入 LPS 后 1 小时, 三种剂量 LPS 组 Kupffer 细胞培养上清中均可测到 TNF 活性, 3 小时达到峰值。100 和 150 ng/ml LPS 组 TNF 活性高于 50 ng/ml 组 ($P < 0.01$), 而 100 和 150 ng/ml 两组之间无明显差异 ($P > 0.05$)。再次加入 LPS (终浓度 100 ng/ml), 只有 50 ng/ml LPS 组培养上清液中有 TNF 活性检出, 但幅度明显下降 ($P < 0.01$)。上述结果提示 LPS 在体外诱导肝

Kupffer 细胞释放 TNF 在一定范围内具有剂量依赖关系, 且呈一定的时间反应性。

参 考 文 献

- [1] Zuckerman SH, et al., 1989 *Eur J Immunol.*, 19: 301
- [2] Sayers TJ, et al., 1987 *J Immunol.*, 137: 2935.
- [3] Doolittle RL, et al., 1981 *Lab Invest.*, 45: 558.
- [4] Mazuski JE, et al., 1988 *Arch Surg.*, 123: 340.
- [5] Flick DA, et al., 1984 *J Immunol Methods.*, 68: 167.
- [6] Beutler B, et al., 1986 *Science*, 232: 977.
- [7] 汪江淮、王正国, 1992 第三军医大学学报, 14: 101.
- [8] Offner F, et al., 1990 *J Lab Clin Med.*, 116: 100.

绵羊体外受精卵的体外发育及冷冻保存研究

刘东军 张锁链 庞也非 薛晓先 虞洪武 海青兰 斯 琴 旭日干

(内蒙古大学实验动物研究中心 呼和浩特, 010021)

近年来, 随着家畜体外受精技术的不断发展, 已开始逐步应用于生产, 而体外受精卵的体外发育及其冷冻保存是该技术应用于生产的关键环节, 因而引起了众多研究者的关注。自从绵羊体外受精技术成功以来^[1,2], 国外一些学者对绵羊体外受精卵体外发育条件进行了探讨^[3,4], 旭日干等^[5]在研究中得到了较高的发育率, 可直接在体外条件下培养至孵化囊胚阶段。但到目前为止, 有关绵羊体外受精卵冷冻保存研究尚未见报道。本文主要探索了绵羊体外受精卵在不同培养条件下的发育能力, 并对发育至桑椹胚~囊胚期的体外受精胚进行了冷冻保存。

材 料 和 方 法

一、卵母细胞的采集和成熟培养

将采自屠宰场的绵羊卵巢置于 37℃ 无菌生理盐水中, 12 小时内带回实验室。用装有 18 号针头的注射器从卵巢表面 2—5 mm 的卵泡内吸取卵母细胞, 吸卵液为含有 3 mg/ml BSA 的 PBS 液, 并加入少量肝素。将回收的卵母细胞置于含有 20 μg/ml HCG (日本持田制药株式会社)、0.1 μg/ml 17β-雌二醇 (E_2 , Sigma)、10% FCS (fetal calf serum, 胎牛血清) 或 NSS (normal steer serum, 阉牛血清, 本中心自制), 并以 10 mM Hepes (Sigma) 缓冲的 M 199 (Gibco) 培养液中, 在 39℃, 5% CO₂ 培养箱内培养 24 小时。

二、精子的获能及授精处理

实验所用新鲜精液采自本中心饲养的种公羊。将