

【论著】

脂多糖及伴刀豆球蛋白 A 诱导脾淋巴细胞增殖 试验方法用于免疫毒性评价的可行性研究

侯粉霞, 杨慧芳, 鱼涛

(中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所, 北京 100050)

【摘要】目的 研究脂多糖(LPS)及伴刀豆球蛋白 A(ConA)诱导脾淋巴细胞增殖试验的两种方法用于免疫毒性评价的可行性。**方法** 雄性 Wistar 大鼠 40 只, 体重 180 ~ 200 g, 随机分为对照组和 2, 5, 10 mg/kg 环磷酰胺染毒组, 每组 10 只大鼠, 各剂量组每日灌胃染毒 1 次, 连续 28 d, 对照组给予生理盐水。染毒结束后 24 h, 断头处死大鼠, 取脾脏, 制浓度为 3×10^6 个/ml 的脾细胞悬液, 用 MTT 方法进行 LPS 及 ConA 诱导脾淋巴细胞增殖试验。**结果** 10 mg/kg 环磷酰胺染毒组大鼠的 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞的增殖能力(吸光度值, 分别为 0.032 ± 0.037 和 0.028 ± 0.050) 低于对照组的 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞的增殖能力(分别为 0.124 ± 0.093 和 0.458 ± 0.320), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** LPS 及 ConA 诱导脾淋巴细胞增殖试验的两种方法用于免疫毒性评价具有可行性。

【关键词】 环磷酰胺; 细菌脂多糖; 伴刀豆球蛋白 A; 脾淋巴细胞增殖

[中图分类号] R 994.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7164(2007)06-0336-04

Feasibility of Test Procedures of Lipopolysaccharide-induced and Concanavalin A-induced Rat Splenocyte Proliferation in Assessment of Immunotoxicity

HOU Fen-xia, YANG Hui-fang, YU Tao

(National Institute of Occupational Health & Poison Control,

Chinese Center for Disease Control & Prevention, Beijing 100050 China)

【Abstract】Objective To show the feasibility of test procedures of lipopolysaccharide(LPS)-induced and concanavalin A(ConA)-induced rat splenocyte proliferation in assessment of immunotoxicity. **Methods** 40 male Wistar rats with body weight of 180 ~ 200 g were randomly and equally divided into control group and groups of 2, 5, and 10 mg/kg cyclophosphamide. The rats were exposed to cyclophosphamide by gavage once a day successively for 28 days. Normal saline was given to the control group. 24 hours after the ending of the exposure, the rats were sacrificed by decapitation and their spleens were excised and prepared into spleen single cell suspension of 3×10^6 cells/ml. LPS-induced and ConA-induced splenocyte proliferation was determined by MTT assay. **Results** LPS-induced and ConA-induced splenocyte proliferation in the group of 10mg/kg cyclophosphamide (absorbance: 0.032 ± 0.037 and 0.028 ± 0.050 , respectively) were significantly lower than those of the control group (0.124 ± 0.093 and 0.458 ± 0.320 , respectively), $P < 0.05$. **Conclusions** The results showed that the test procedures of LPS-induced and ConA-induced splenocyte proliferation are feasible to be used in immunotoxicity assessment.

【Key words】 Cyclophosphamide; Lipopolysaccharide; Concanavalin A; Splenocyte proliferation

随着化学品在人类生产和生活中越来越广泛地应用, 化学品安全已经引起了世界各国高度重视。研究证明, 许多化学物, 如: 二噁英、多氯联苯、多溴联苯、苯、甲苯、二甲苯、石棉、二氧化氮、臭氧以及铅、镉等重金属对人体都具有免疫毒性。对化学品进行免疫毒性评价是化学品安全管理不可

忽略的一个环节。美国环境保护局对农药和有毒物质免疫毒性评价程序及方法提出了明确的要求, 并且在 1996 年就已经形成了一套规范的免疫毒性试验指南^[1~3]。在我国, 无论是药品、工业化学品还是农药, 其安全性评价程序中并未对免疫毒性评价提出明确的要求。但是, 与世界逐步接轨将是不可避免的趋势, 应尽快建立切实可行的符合规范要求

[作者简介] 侯粉霞(1966 -), 女, 副研究员。

的免疫毒性评价方法。脂多糖(LPS)及伴刀豆球蛋白 A(ConA)诱导脾淋巴细胞增殖试验两种方法分别用于评价 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞增殖能力,前者可反映体液免疫功能,后者可反映细胞免疫功能。为探讨这两种方法的可行性,以便为我国化学品免疫毒性评价方法的建立提供依据,同时也拟确定环磷酰胺经口染毒引起 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞增殖能力降低的工作剂量,为今后开展这两项试验提供实验数据,我们用环磷酰胺对雄性大鼠进行 28 d 经口染毒以评价环磷酰胺对 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞增殖能力的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

注射用环磷酰胺,国药准字 H31021703,上海华联制药有限公司生产,批号为 040301。RPMI1640 细胞培养液,ConA、LPS、噻唑兰(MTT)、Hanks 液均为 Amresco 试剂。小牛血清、2-巯基乙醇(2-ME)、青霉素、链霉素、盐酸、异丙醇、PBS 缓冲液(pH 7.2~7.4)均为国产试剂。主要仪器有高压灭菌器、超净工作台、无菌过滤器、手术器械、200 目筛网、24 孔培养板、37 恒温孵箱和酶标仪。

1.2 动物分组及处理

雄性 Wistar 大鼠 40 只,体重 180~200 g,购自中国医学科学院实验动物研究所,合格证号为 scxk(京)2005-0013,随机分为对照组和低(2 mg/kg)、中(5 mg/kg)、高(10 mg/kg)剂量环磷酰胺染毒组(环磷酰胺经口 LD₅₀ 为 160 mg/kg),每组 10 只。动物饲养于本所清洁级动物房,合格证号为 SYXK(京)2005-0023,每笼 5 只,自由摄取饲料和饮水。动物于染毒前观察 3 d,确认健康后开始试验。

低、中、高剂量环磷酰胺染毒组大鼠经灌胃染毒不同剂量的环磷酰胺(注射用环磷酰胺用生理盐水稀释,浓度分别为 0.5、1.0、2.0 mg/ml),1 次/d,连续 28 d,灌胃容积为 5 ml/kg,对照组仅灌胃等量的生理盐水。整个染毒过程中每周称量 1 次大鼠的体重,并按体重调整灌胃容积。于末次染毒 24 h 后处死动物,进行 LPS 及 ConA 诱导脾淋巴细胞增殖试验。

1.3 LPS 及 ConA 诱导脾淋巴细胞增殖试验

1.3.1 试剂配制及保存 完全培养液: RPMI1640 培养液过滤除菌,用前加入 10% 小牛血清,1% 谷氨酰胺(200 mmol/L),青霉素(100 U/ml),链霉

素(100 μg/L)及 2-巯基乙醇(5×10^{-5} mol/L),用无菌的 HCl(1 mol/L)或 NaOH(1 mol/L)调 pH 值至 7.0~7.2。4 保存。LPS 溶液:用双蒸水配制成浓度为 400 μg/ml 的溶液,过滤除菌,在低温冰箱(-20)保存。ConA 液:用双蒸水配制成 100 μg/ml 的溶液,过滤除菌,在低温冰箱(-20)保存。无菌 Hanks 液:用 NaHCO₃ 调 pH 值 7.2~7.4,过滤除菌。MTT 液:用 pH 值 7.2 的 PBS 配制浓度为 5 mg/ml 的 MTT 溶液,现用现配。酸性异丙醇溶液:在 96 ml 异丙醇中加入 4 ml 的 HCl(1 mol/L),用前配制。

1.3.2 制备脾细胞悬液 无菌取脾,置于盛有适量无菌 Hanks 液平皿中,用镊子轻轻将脾磨碎,制成单个细胞悬液,经 200 目筛网过滤,用 Hanks 液洗 2 次,每次离心 10 min(1 000 r/min)。然后将细胞悬浮于 5 ml 的完全培养液中,用台盼蓝染色计数活细胞数(应在 95% 以上),调整细胞浓度为 3×10^6 个/ml。

1.3.3 淋巴细胞增殖反应(MTT 法) 将每一份脾细胞悬液分 3 孔加入 24 孔培养板中,每孔 1 ml。一孔作为对照孔,另外两孔分别加 50 μl LPS 和 50 μl ConA 液,并置 5% CO₂, 37 孵箱中培养 72 h。培养结束前 4 h,每孔轻轻吸去上清液 0.7 ml,然后加入 0.7 ml 不含小牛血清的 RPMI1640 培养液,同时还加入 MTT(5 mg/ml) 50 μl/孔,继续培养 4 h。培养结束后,每孔加入 1 ml 酸性异丙醇,吹打均匀,使紫色结晶完全溶解^[4-5]。用酶标仪以 570 nm 波长测定吸光度值。

1.4 统计学处理

B 淋巴细胞的增殖能力用加 LPS 孔吸光度减去对照孔吸光度表示;T 淋巴细胞的增殖能力用加 ConA 孔吸光度减去对照孔吸光度表示。

低、中、高剂量染毒组大鼠的体重、B 淋巴细胞增殖能力、T 淋巴细胞增殖能力与对照组比较,采用单因素方差分析、检验各组均数差异是否具有统计学意义;检验水准为 $P < 0.05$ 。应用 SPSS for Windows 11.5 统计软件进行数据统计及分析。

2 结果

2.1 环磷酰胺对大鼠体重的影响

低剂量染毒组大鼠的体重与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),中、高剂量染毒组大鼠的体重在染毒第 3 周、第 4 周低于对照组(表 1),说明 5、10 mg/kg 环磷酰胺染毒 28 d 可对大鼠体重产生明显的影响。

表1 环磷酰胺连续28 d经口染毒对雄性大鼠体重的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	染毒剂量 (mg/kg)	动物数	体重(g)			
			第1周	第2周	第3周	第4周
对照组	0	10	271.1 ±10.7	305.2 ±16.9	353.8 ±22.6	386.0 ±27.3
低剂量组	2	10	264.3 ±13.5	303.4 ±15.8	339.3 ±17.7	366.9 ±22.8
中剂量组	5	10	264.5 ±11.2	301.1 ±18.9	334.2 ±21.8*	348.1 ±23.4*
高剂量组	10	10	256.0 ±12.3	298.8 ±19.2	318.5 ±23.3*	337.2 ±26.1*

注: 经 t 检验, 与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

2.2 环磷酰胺对 LPS 及 ConA 诱导脾淋巴细胞增殖能力的影响

10 mg/kg 环磷酰胺连续28 d经口染毒可引起

大鼠的 LPS 及 ConA 诱导脾淋巴细胞增殖能力降低 ($P < 0.05$, 表2)。

表2 环磷酰胺连续28 d经口染毒对雄性大鼠的 LPS 及 ConA 诱导脾淋巴细胞增殖能力的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	染毒剂量 (mg/kg)	动物数	LPS 诱导脾细胞 增殖能力(吸光度)	ConA 诱导脾淋巴细胞 增殖能力(吸光度)
对照组	0	10	0.124 ±0.093	0.458 ±0.320
低剂量组	2	10	0.079 ±0.038	0.315 ±0.152
中剂量组	5	10	0.063 ±0.136	0.313 ±0.236
高剂量组	10	10	0.032 ±0.037*	0.028 ±0.050*

注: 经 t 检验, 与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

3 讨论

LPS 是一种非胸腺依赖性抗原, 不需要辅助性 T 淋巴细胞的作用, 可直接刺激 B 淋巴细胞增殖, 分化为产生抗体的浆细胞, 并分泌 IgM 等抗体。ConA 属于一种有丝分裂原, 可刺激静止的 T 淋巴细胞增殖活化, T 细胞活化后, 可参与相关的细胞免疫过程。免疫毒性化学物可能会影响 LPS 诱导的 B 淋巴细胞增殖过程或 ConA 诱导的 T 淋巴细胞增殖过程, 从而影响 B 或 T 淋巴细胞的增殖能力, 进一步影响体液免疫或细胞免疫功能。本研究采用已知的免疫抑制剂环磷酰胺对大鼠进行连续28 d经口染毒, 证明 LPS 及 ConA 诱导脾淋巴细胞增殖试验两种方法的可行性。结果表明, 10 mg/kg 环磷酰胺可引起大鼠的 LPS 及 ConA 诱导脾淋巴细胞增殖能力明显降低, LPS 及 ConA 诱导脾淋巴细胞增殖试验两种方法用于评价化学品的免疫毒性具有可行性。此外, 今后在开展这两项试验时, 10 mg/kg 环磷酰胺可考虑用于阳性对照组的染毒剂量。

脾淋巴细胞的增殖程度可采用不同的方法进行评价, 如, MTT 法、 ^3H -胸腺嘧啶掺入法、荧光

标记流式细胞仪分析法等。本试验采用 MTT 法, 通过吸光度值来反映增殖的细胞数和功能状态, 具有灵敏度高、重复性好、操作简便、经济、快速等优点, 同时也避免了 ^3H -胸腺嘧啶掺入法的放射性污染问题。流式细胞分析法对仪器要求高, 不易普遍推广。

脾细胞活性直接影响实验结果。脾细胞培养前的细胞活率应大于 95%, 同时应严格注意无菌操作及严格控制细胞培养条件, 否则培养 72 h 后的脾细胞活率将受到影响, 所测定的吸光度值也将降低。另外, LPS 和 ConA 的活性和浓度很重要, 过低不能刺激足够的细胞增殖, 过高会抑制细胞增殖。不同来源和不同批次的 LPS 和 ConA 的刺激活性可能不同, 试验前应通过预实验确定 LPS 和 ConA 的最适浓度。本试验证明, 当脾细胞浓度为 3×10^6 个/ml 时, LPS 和 ConA 的最佳终浓度分别为 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

本研究说明 LPS 及 ConA 诱导脾淋巴细胞增殖试验的两种方法用于评价化学品的免疫毒性具有可行性, 可为我国化学品免疫毒性评价方法的建立提供参考。

【论著】

胸水 ProGRP 及 CEA 联合检测在肺癌并发恶性胸腔积液诊断中的价值

刘运秋, 兰璇, 高维东, 邹吉敏, 耿贺梅, 唐晓霞

(华北煤炭医学院附属开滦医院, 河北 唐山 063000)

【摘要】目的 探讨胸水胃泌素前体释放肽片断 31 - 98 (Pro GRP) 及癌胚抗原 (CEA) 单项及联合检测对肺癌所致恶性胸腔积液的诊断价值。**方法** 采用酶联免疫吸附实验对 33 例小细胞肺癌 (SCLC) 所致的恶性胸腔积液患者 (SCLC 组)、36 例非小细胞肺癌 (NSCLC) 所致的恶性胸腔积液患者 (非 SCLC 组) 及 32 例良性胸腔积液患者 (良性胸腔积液组) 进行胸水 Pro GRP、CEA 检测, 比较胸水 Pro GRP、CEA 单项及联合检测对恶性胸腔积液的诊断价值。**结果** 在 SCLC 组、NSCLC 组和良性胸腔积液组胸水 Pro GRP 测定的阳性率分别为 90.91%, 2.78% 和 3.00%, 在 SCLC 组、NSCLC 组和良性胸腔积液组胸水 CEA 测定的阳性率分别为 45.45%, 83.33% 和 12.00%。胸水 Pro GRP 单项检测、CEA 单项检测、Pro GRP + CEA 联合检测 (按序列实验) 和 Pro GRP + CEA 联合检测 (按平行实验) 诊断 SCLC 所致的恶性胸腔积液的 Youden 指数分别为 0.877 8, 0.048 3, 0.483 9 及 0.751 9; 诊断 NSCLC 所致的恶性胸腔积液的 Youden 指数分别为 -0.003 5, 0.708 3, 0.135 4 及 0.673 6; 诊断肺癌所致的恶性胸腔积液的 Youden 指数分别为 0.251 2、0.402 2, 0.307 0 及 0.711 1。**结论** Pro GRP 和 CEA 分别为染煤矿区职工 SCLC 和 NSCLC 所致的恶性胸腔积液较有价值的胸水肿瘤标志物; 胸水 Pro GRP + CEA 联合检测 (按平行试验) 对肺癌所致的恶性胸腔积液有较高的诊断价值。

【关键词】 胸腔积液; 肿瘤标志物; Pro GRP; CEA; 诊断

[中图分类号] R 734.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7164(2007)06-0339-04

Significance of Combinatory Detection of Hydrothorax Progastrin Releasing Peptide and Carcino-embryonic Antigen in Diagnosis of Lung Cancer Complicated with Malignant Pleural Effusion

LIU Yun-qiu, LAN Xuan, GAO Wei-dong, ZOU Ji-min, GENG He-mei, TANG Xiao-xia

(Affiliated Kailuan Hospital, North China Coal Medical College, Tangshan 063000 China)

【Abstract】Objective To study the clinical significance of combinatory detection and detection alone of the hydrothorax progastrin releasing peptide (Pro GRP) and carcino-embryonic antigen (CEA) in diagnosis of malignant pleural effusion induced by lung cancer. **Methods** By the ELISA (enzyme linked immunosorbent

参考文献:

- [1] The Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (OPPTS), United States Environmental Protection Agency. Biochemicals Test Guidelines OPPTS 880.3550 Immunotoxicity [M]. Washington DC: The U. S. Government Printing Office, 1996. 1 - 9.
- [2] The Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (OPPTS), United States Environmental Protection Agency. Biochemicals Test Guidelines OPPTS 880.3800 Immunotoxicity [M]. Washington

- DC: The U. S. Government Printing Office, 1996. 1 - 4.
- [3] United States Environmental Protection Agency. Code of Federal Regulations, Title 40, Volume 28, Part 799, Subpart H, Sec. 799.9780, TSCA immunotoxicity [M]. Washington DC: The U. S. Government Printing Office, 2002. 1 - 11.
- [4] Lee JK, Ryu MH, Byun JA. Immunotoxic effect of α -chlorolactic acid on murine splenocyte and peritoneal macrophage function in vitro [J]. Toxicology, 2005, 210: 175 - 187.
- [5] 中华人民共和国卫生部编. 保健食品功能学评价程序与检验方法规范 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 23 - 24.

[作者简介] 刘运秋 (1963 -), 男, 副主任医师, 副教授。

(收稿日期: 2006 - 07 - 20)