

去势大鼠脾脏巨噬细胞 IL-1、TNF α 和 IL-6 的分泌

章明放 姚智 樊继援 赵秀兰 张乃鑫 谭郁彬

摘要 20只雌性大鼠分为切除双侧卵巢单组(去势组)和假性切除对照组(假去势组),术后第26周末,取各组大鼠脾脏制备巨噬细胞,用MTT法检测其在细菌脂多糖刺激下IL-1、TNF α 和IL-6分泌水平。结果表明,大鼠去势后第26周末,脾脏巨噬细胞的IL-1分泌水平显著高于假去势对照组($P < 0.05$),TNF α 和IL-6分泌水平较假去势对照组增加,但无显著性差异。此提示脾脏巨噬细胞IL-1、TNF α 和IL-6分泌水平的改变与雌激素减少密切相关,有可能在骨质疏松的骨丢失相对缓慢时期以IL-1分泌增多为主要特征。

关键词 骨质疏松 脾脏巨噬细胞 IL-1、TNF α 和 IL-6 大鼠

Changes in interleukin-1 (IL-1), tumor necrotic factor- α (TNF α) and interleukin-6 (IL-6) secretion from spleen macrophages in ovariectomized rats

Zhang Mingfang, Yao Zhi, Fan Jiyuan, Zhao Xiumin, Zhang Naixin and Tan Yubin

Department of Pathology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract The effects of some cytokines produced mainly by macrophage system cells on mechanism of estrogen-deficiency induced bone loss have attracted a widespread attention. To investigate the changes of IL-1, TNF α and IL-6 secretion, 20 female Wistar rats, weighing 183 $\pm$ 12g, were randomly divided into ovariectomized group (OVX) and sham-operated group, and sacrificed at 26 weeks after operation. Serum estradiol was determined by radioimmunoassay. IL-1, TNF α and IL-6 activities released from lipopolysaccharide-stimulated spleen macrophages were determined by MTT method.

IL-1 secretion from LPS-stimulated spleen macrophages in OVX rats was significantly higher than that in sham-operated rats. Simultaneously, TNF α and IL-6 were also increased, though not significantly. The results suggest that IL-1, TNF α and IL-6 increases were closely related with estrogen deficiency, and the significant increase in IL-1 secretion may be a major characteristic during the relative slow period of bone loss after ovariectomy.

Key words Osteoporosis Spleen macrophages Interleukin-1 Interleukin-6 Tumor necrotic factor- α Rats

已知雌激素减少是绝经后骨质疏松的主要原因,但雌激素通过何种机制影响骨代谢仍未阐明。近年来,主由单核巨噬细胞分泌的某些细胞因子在骨代谢及骨质疏松发病机制中的作用引起广泛关注。本文用去势大鼠脾脏巨噬细胞

检测其分泌白细胞介素1(IL-1)、肿瘤坏死因子(TNF α)和白细胞介素6(IL-6)的改变,探讨其在骨质疏松中的作用

1 材料和方法

1.1 动物实验 20只平均体重183($\pm$ 12)克雌性Wistar大鼠,随机分为切除双侧卵巢组(OVX组,10只)和假性切除双侧卵巢对照组

作者单位:300070,天津医科大学病理学教研室(章明放 赵秀兰 张乃鑫);免疫学教研室(姚智);天津市内分泌研究所(樊继援 谭郁彬)

(sham-OVX 组, 10 只)。OVX 组在乙醚麻醉下, 背部进路切除双侧卵巢, sham-OVX 组只行单纯开腹术。实验期间, 各组大鼠自由摄食标准固体饲料和饮用自来水。术后第 26 周末, 大鼠经股动脉放血处死, 取血清用放免法测雌二醇水平。

1.2 脾脏巨噬细胞制备:参照 Sato 等^[1]方法, 无菌条件下取大鼠脾脏, 浸在 Hank's 液中剪碎并经细胞筛研磨后弃去组织碎块, 含细胞的液体离心(1000r/min, 10 分钟)二次后弃去上清液。加入含 10% 胎牛血清(FCS, 中国医科院血液学研究所产品)的 RPMI 1640 培养液(美国 Gibco 公司产品)混匀后置 37℃、5% CO₂ 孵育箱过夜后, 清洗去除非粘附细胞即获脾脏巨噬细胞。收集巨噬细胞, 用含 10% FCS 的 RPMI 1640 培养液调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml, 加入 24 孔培养板, 同时加入细菌脂多糖(LPS, 北京生物制品所产品, 20μg/ml), 置 37℃、5% CO₂ 孵育箱培养 48 小时后收集上清液待测。

1.3 IL-1、TNF α 和 IL-6 活性测定:测定用 Wehi 164.13 细胞株、LBRM₁-IA₁ 和 HT 2 细胞株和 KD₁ 细胞株均为北京医科大学陈慰峰教授惠赠。标准品人重组 IL-1(hrIL-1, 1×10^5 U/ml)、人重组 IL-6(hrIL-6, 1×10^5 U/ml)、人重组 TNF α (hrTNF α , 1×10^5 U/ml)和人重组 IL-2(hrIL-2, 5×10^5 U/ml)均为美国 DNAX 分子和细胞生物研究所赠送。四甲基偶氮唑盐(MTT)为美国 Sigma 公司产品。

TNF α 活性测定参照 Mosmann 的 MTT 方法^[2]。取 TNF α 敏感的 Wehi164.13 细胞(5×10^4 个/ml), 置于 96 孔培养板内(100μl/孔), 然后加入倍比稀释的 hrTNF α 或待测上清液, 37℃、5% CO₂ 条件下培养 40 小时, 离心弃上清, 加入 MTT 液(100μl/孔)再培养 4 小时, 离心弃上清后加入盐酸异丙醇(1:300, 100μl/孔), 振荡 15 分钟后用酶标仪检测 OD 值(波长 570nm)。绘制标准曲线并求出样品 TNF α 活性单位, 结果以 U/ml 表示。详细方法可参阅文献^[3]。IL-6 活性测定用 KD₁ 细胞(1×10^6 个/ml), hrIL-6 做标准品, 步骤同 TNF α 测定。IL-1

活性测定用 IL-1 敏感的 LBRM₁-IA₁ 细胞(1×10^4 个/ml), 加入 96 孔板(50μl/孔), 再加入植物血凝素(PHA, 广州国工所产品, 50μl/孔), 加入倍比稀释 hrIL-1 或样品, 37℃、5% CO₂ 培养 24 小时。取各孔上清移入另一 96 孔板中, 加入 HT 2 细胞(1×10^4 个/ml, 100μl/孔), 37℃、5% CO₂ 培养 20 小时, 其余步骤同 TNF α 活性测定。

1.4 统计学处理 检测数据用双侧 *t* 检验比较两组有无显著性差异。

2 结果

血清雌二醇水平及 IL-1、TNF α 和 IL-6 活性测定结果见附表。

OVX 组大鼠去势第 26 周末, 血清雌二醇水平显著低于 sham-OVX 组大鼠($P < 0.01$)。OVX 组大鼠脾脏巨噬细胞分泌 IL-1 水平显著高于 sham-OVX 组大鼠($P < 0.05$)。OVX 组大鼠的 TNF α 和 IL-6 水平较 sham-OVX 组大鼠增高, 但无统计学上显著性差异。

附表 血清雌二醇(E₂)和脾脏巨噬细胞 IL-1、TNF α 和 IL-6 分泌水平测定结果($\bar{x} \pm s$)

组别	E ₂ (pg/ml)	IL-1(U/ml)	TNF α (U/ml)	IL-6(U/ml)
OVX	2.27 ± 2.48**	26.15 ± 6.54*	11.66 ± 3.16	18.36 ± 6.03
	8.18 ± 3.06	17.32 ± 3.51	8.24 ± 1.53	11.67 ± 2.52

、、* $P < 0.05$, * $P < 0.01$, 两组 $n = 10$

3 讨论

主要由单核巨噬细胞系来源的细胞分泌的 IL-1、TNF α 和 IL-6 是近年来逐渐被认识的几种具有激素样作用的活性物质, 在体液和骨髓微环境中通过自分泌或旁分泌与骨代谢密切相关^[4]。雌激素减少致骨转换率加快, 骨吸收超过骨形成, 骨量减少。在此过程中, 破骨细胞数量增多和活性增强已得到证实。在破骨细胞生成、增生、分化、成熟过程及活化过程中, IL-1、TNF α 和 IL-6 发挥重要作用。雌激素抗骨吸收的作用据推测就是抑制了 IL-1、TNF α 和 IL-6

及某些参与骨吸收的细胞因子的分泌^[4]。而骨丢失加速,骨量减少正是由于这种抑制作用的解除。

雌性大鼠去势后短期内(<8周)脾脏巨噬细胞或骨髓基质细胞 IL-1、TNF α 和 IL-6 分泌增加已有报道,且给予雌激素替代治疗或 IL-1 受体拮抗剂(IL-1ra)或抗 IL-6 抗体(20F3)可减缓或完全阻断雌激素减少所致的骨丢失^[1,6,7]。至于去势较长时间后这些因子的分泌情况尚未见报道。

本实验结果表明,雌性大鼠去势第 26 周末,脾脏巨噬细胞 IL-1 分泌水平显著高于相应的对照组大鼠,TNF α 和 IL-6 分泌亦有某种程度的增加。此与该时期骨吸收增加的形态学结果相一致^[8],表明骨丢失与这些细胞因子分泌水平增高的某种内在联系。

以往的研究多侧重一种细胞因子分泌的改变,IL-1、TNF α 和 IL-6 三者间的相互作用机制仍不清楚。目前认为雌激素减少后 IL-1 和 TNF α 首先增加,其在刺激破骨细胞成熟和破骨作用增强的同时,诱导并促进 IL-6 的分泌,IL-6 再进而促进破骨细胞的成熟。本实验中,TNF α 和 IL-6 增加程度低于 IL-1,是否表明在骨丢失相对缓慢时期这三种细胞因子非一致性显著增加,而以 IL-1 的增加为主要特征,或由于 IL-6 分泌水平相对降低反馈性促使 IL-1 分泌增多,以经常补充寿命只有 2.5 天、不断更新

的破骨细胞。

IL-1、TNF α 和 IL-6 的详细作用机理和相互作用机制仍需更多的研究,本实验只是一次性测定,有必要动态观测某种因子在较长时间内的分泌规律并探讨其相互调节作用。

参 考 文 献

- 1 Sato F, Ouchi Y, Masuyama A, et al. Effects of estrogen replacement on insulin-like growth factor I concentration in serum and bone tissue and on interleukin 1 secretion from spleen macrophages in oophorectomized rats. *Calcif Tissue Int*, 1993, 53: 111.
- 2 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Med*, 1983, 65: 55.
- 3 李会强, 姚智, 赵瑾莹等. IL-2、IL-6 及 TNF α MTT 检测方法的建立. *天津第二医学院学报*, 1993, 3: 4.
- 4 Wallach S, Avroli LV, Feinblatt JD. Cytokines and bone metabolism. *Calcif Tissue Int*, 1993, 53: 293.
- 5 Manolagas SC, Jilka RL. Cytokines, hematopoiesis, osteoclastogenesis, and estrogens. *Calcif Tissue Int*, 1992, 50: 199.
- 6 Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, et al. Increased osteoclast development after estrogen loss; mediation by interleukin-6. *Science*, 1992, 257: 88.
- 7 Kimble RB, Vannice JL, Bloedow DC, et al. Interleukin-1 receptor antagonist decreases bone loss and bone resorption in ovariectomized rats. *J Clin Invest*, 1994, 93: 1959.
- 8 Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, et al. Long-term effects of ovariectomized and aging on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int*, 1989, 45: 360.

首届全国类风湿病研讨会征文

中国老年学学会老年医学委员会类风湿专业委员会定于 1996 年 10 月 14—18 日在南京召开首届中医、中西医结合类风湿学术研讨会。会上将进行优秀论文评奖,一等奖 1000 元(2 名),二等奖 500 元(4 名),优秀奖 200 元(10 名)。**征文内容:**类风湿性关节炎,强直性脊柱炎,红斑狼疮,硬皮病,皮炎,干燥综合症,骨关节病,银屑病性关节炎,痛风性关节炎等疾病的中医、中西医结合临床治疗经验,文献综述,理论与临床研究的新进展,实验研究思路与方法,非药物疗法,针灸,按摩及其他疗法,新药的检测与推广。**征文要求:**一律用稿纸抄写清楚或打印,全文在 3200 字以内,每文附 400 字摘要,来稿经专家评审具有学术或推广价值的论文编入论文集,已公开发表的论文请勿投寄,恕不退稿。来稿时详细写明作者的单位、姓名、职称、通讯地址、邮编,截稿日期 1996 年 7 月 15 日。征文请寄:北京朝阳区劲松 5 区 501 楼 北京劲松医院国际类风湿病治疗中心,邮编:100021 张莹 收,电话:(010)67781752。如有厂家参展,请与金信爱主任联络,电话:01064294508 传真:01064294508;01064271059。