

补硒治疗慢性肝病患者 PBMC 功能紊乱的临床价值

和水祥¹, 苒新明¹, 李红霞¹, 刘恩岐², 李长顺¹

(西安交通大学: 1. 第一医院消化内科; 2. 医学院实验动物中心, 陕西西安 710061)

摘要:目的 探讨应用口服补硒方法纠正慢性肝病患者外周血单个核细胞(PBMC)免疫功能紊乱的临床价值。方法 患者口服补硒(200~300 μg·d⁻¹) 8~12周后分离 PBMC, 分别对比观察硒作用前后 PBMC 膜流动性、白细胞介素 2 受体(IL-2R)表达及其分泌 IL-2 活性、过氧化脂质丙二醛(MDA)含量的变化, 并结合体外 PBMC 培养实验结果, 探讨其可能机制。结果 口服补硒治疗后, 患者 PBMC 膜流动性、IL-2R 表达及其分泌 IL-2 活性均显著提高, 血中 LPO 含量显著减少, 与未补硒组比较差别均有显著性意义($P < 0.05$; $P < 0.01$)。体外培养患者的 PBMC 外加硒作用后上述指标呈相似变化。结论 口服补硒可纠正慢性肝病患者 PBMC IL-2 系统的功能紊乱, 其机制可能与抑制 PBMC 膜的脂质过氧化损伤, 维护膜的流动性有关。

关键词: 硒; 白细胞介素 2; 膜流动性; 慢性肝炎

中图分类号: R512.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-8259(2003)06-0621-03

The changes and significance of peripheral blood mononuclear cell membrane fluidity, interleukin-2 production and interleukin-2 receptor expression in chronic hepatitis patients supplemented with selenium

He Shuixiang, Chang Xinming, Li Hongxia, Liu Enqi, Li Changshun

(Department of Internal Medicine, First Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

ABSTRACT: Objective To study the effects of selenium on the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) membrane fluidity and the function of patients with chronic hepatitis. Methods PBMC pretreated with selenium ($1.156 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) for 6 hours in vivo or extracted directly from the patients after taking Se-yeast continuously for 8~12 weeks (200 μg of selenium one day) were exposed to Con-A for 48 hours. The membrane fluidity, interleukin-2 (IL-2) production and interleukin-2 receptor (IL-2R) expression of PBMC and the malondialdehyde (MDA) concentration in medium and plasma were determined. Results The PBMC membrane fluidity, IL-2 production and IL-2R expression of the patients with chronic hepatitis were significantly decreased and the MDA concentration in medium or plasma were significantly increased ($P < 0.01$). Both in vivo and vitro, administration of selenium could reverse the parameters above ($P < 0.05$). Conclusion Supplementing selenium can suppress the membrane lipid peroxidation of PBMC, maintain the membrane fluidity and improve the PBMC function of patients with chronic hepatitis.

KEY WORDS: selenium; interleukin 2; membrane fluidity; chronic hepatitis

目前认为,体内微量元素硒的缺乏或硒水平低下、脂质过氧化反应增强在慢性肝病肝细胞损伤中起重要作用,并可能与其免疫功能低下有关^[1,2]。我们以前的体外研究证实,预防性补硒可提高细胞的抗氧化能力,维护离体人胎肝细胞的超微结构和慢性肝病患者 PBMC 膜流动性及其功能表达^[3-5]。但临床补

硒治疗对慢性肝病患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)功能的影响尚不清楚。Roy^[6]等研究认为,饮食补硒可以增强人 PBMC 对抗原的刺激应答和增殖分化能力。本文通过体外实验和临床治疗,对比观察补硒后慢性肝病患者 PBMC 膜流动性、白细胞介素 2 (interleukin 2, IL-2) 及其受体(interleukin-2 receptor, IL-2R)系统的变化,进一步探讨补硒治疗对慢性肝病患者细胞免疫功能的影响及其机制。

收稿日期:2003-02-26 修回日期:2003-05-15

基金项目:院科研基金项目(No. 95-049)

作者简介:和水祥(1964-),男(汉族),副教授。研究方向:慢性肝病发病机制与防治。

1 材料和方法

1.1 研究对象 45例慢性肝病患者均为本院1997~2000年住院患者。男38例,女7例,年龄21~52岁。其中慢性肝炎30例,肝炎肝硬化15例,HBsAg均阳性。诊断符合1990年上海全国病毒性肝炎学术会议修订标准。另以20例健康献血员作正常对照。

1.2 体外实验 取上述对象空腹肘静脉血,常规分离PBMC,悬于RPMF1640培养基中,调整细胞浓度为 $1 \times 10^6 \text{ L}^{-1}$,移入24孔培养板中,每孔1 mL。患者PBMC随机分为:对照组;加硒组。健康献血员为正常对照组。组内加入亚硒酸钠(终浓度 $1.156 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硒),其余组加等量培养液,孵育6h,换液漂洗2次,重孵PBMC于RPMF1640培养基中待测。

1.3 临床治疗观察 患者分为两组,常规组:给口服联苯双脂、复方益肝灵,个别静滴强力宁、清开灵;补硒组:常规治疗基础上加服硒酵母或硒多糖(每日200~300 μg),连用8~12周。治疗开始及结束后分别采血分离PBMC和血浆待测。

1.4 IL-2 诱生及活性测定 各组PBMC加入Con-A($5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,Sigma产品),置37 $^{\circ}\text{C}$,5%(体积分数) CO_2 条件下培养48h。以MTT法测定IL-2活性,以 $1 \times 10^3 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 表示。

1.5 IL-2R 的测定 收集各组诱生IL-2后细胞,洗涤3次,涂片,丙酮固定,间接免疫荧光法测定IL-2R表达(Tac $^+$ 单克隆抗体,武汉生物制品研究所产品),表1 硒对离体培养PBMC膜流动性及IL-2系统的影响

Table 1 Effects of selenium on IL-2 activity, IL-2R expression and membrane fluidity of PBMC of patients with chronic hepatitis *in vitro*

Group	<i>n</i>	<i>r</i>	IL-2 activity / $1 \times 10^3 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$	Tac $^+$ expression / %	MDA / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
Normal control	20	0.142 \pm 0.009	72.96 \pm 11.36	60.58 \pm 10.56	0.92 \pm 0.05
Chronic hepatitis	22	0.167 \pm 0.008	42.26 \pm 9.55	31.05 \pm 5.09	1.45 \pm 0.08
Se protection	23	0.148 \pm 0.010*	60.32 \pm 15.24*	48.06 \pm 5.22*	1.20 \pm 0.09*

* $P < 0.01$ vs. chronic hepatitis group

表2 补硒治疗前后患者血浆MDA、PBMC膜流动性及其功能表达

Table 2 Effects of selenium on IL-2 activity, IL-2R expression and membrane fluidity of PBMC of patients with chronic hepatitis *in vivo*

Group	<i>n</i>	<i>r</i>	IL-2 activity / $1 \times 10^3 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$	Tac $^+$ expression / %	LPO / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	
Regular therapy	Before	22	0.168 \pm 0.007	43.22 \pm 9.25	31.24 \pm 5.20	7.36 \pm 4.15
	After	18	0.160 \pm 0.007	49.45 \pm 15.25	35.12 \pm 6.49	6.15 \pm 3.85
Taking Se	Before	23	0.167 \pm 0.008	42.26 \pm 9.55	31.05 \pm 5.09	7.36 \pm 4.08
	After	18	0.152 \pm 0.009*	60.32 \pm 13.28*	46.05 \pm 4.46*	5.02 \pm 2.50*

* $P < 0.01$ vs. regular therapy group

以阳性细胞百分率表示。

1.6 脂质过氧化反应的测定 取各组诱生IL-2后培养上清液,微量荧光法测定脂质过氧化反应的代谢产物丙二醛(malondialdehyde,MDA)的含量,以 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 表示;患者血浆中过氧化脂质(lipid peroxide,LPO)的测定采用硫代巴比妥酸法,以 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 表示。

1.7 膜流动性的测定 用荧光偏振法。各组细胞悬于RPMF1640培养基中,细胞浓度为 $1 \times 10^6 \cdot \text{L}^{-1}$ 。加等量 $2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的荧光探针DPH(Sigma产品),于25 $^{\circ}\text{C}$ 温育30min,在MPF-4型荧光分光光度计上,432nm(发射光)/362nm(激发光)条件下,测定荧光偏振度(r),并计算成微粘度(r)。 r 值与膜流动性呈反比。

1.8 统计学处理 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行 t 检验、方差分析及直线相关分析。

2 结果

2.1 硒对离体培养慢性肝病患者PBMC膜流动性及其功能的影响 患者PBMC经硒作用后膜流动性、IL-2R表达及其分泌IL-2活性均显著提高,培养上清液中MDA含量则显著减低,与未补硒组比较差别均有显著性意义($P < 0.05$, $P < 0.01$,表1)。

2.2 补硒治疗前后慢性肝病患者PBMC膜流动性及IL-2系统的变化 口服补硒患者PBMC膜流动性、IL-2R表达及其分泌IL-2活性均显著恢复,血清中MDA含量显著下降,而对照组患者上述指标则无明显变化(表2),与体外实验结果相似。

3 讨 论

大量动物实验及体外研究证实, 自由基可损伤淋巴细胞, 引发细胞膜的脂质过氧化反应, 破坏其结构完整性和流动性, 进而抑制其表面标志的表达和免疫学功能, 导致细胞免疫功能紊乱。本文发现, 慢性肝病患者 PBMC 产生 IL-2 活性、膜上 IL-2R 表达百分率及其膜流动性一致性下降, 而其 PBMC 培养液中 MDA 含量和患者血中 LPO 水平均增高, 呈相反变化。初步提示慢性肝病患者体内异常增强的脂质过氧化反应亦可导致患者 PBMC 膜流动性下降, 进而导致慢性肝病患者 PBMC 免疫功能紊乱。

我们前期的体外实验研究发现, 硒对培养的慢性肝病患者 PBMC 膜流动性及其功能表达均有积极保护作用^[4,5]。本文临床实验结果显示, 预防性口服补硒可明显降低慢性肝病患者血中 LPO 水平, 维持患者 PBMC 的流动性, 同时显著提高其 IL-2 分泌活性和 IL-2R 表达百分率, 与梁华平^[7]等在小鼠烧伤模型上及龚谔芬^[8]等在镍作业人群中研究的结论相似, 进一步证实临床补硒治疗有助于纠正慢性肝病患者 PBMC 的功能紊乱, 这对促进患者的肝功能的彻底恢复具有积极意义。

现在研究认为, 硒主要通过以下两个途径影响免疫细胞的功能^[9,10]: 一方面, 硒可能直接在 mRNA 转录水平影响免疫活性细胞表面某些受体, 如 IL-2R、转铁蛋白受体等表达; 另一方面与硒的抗氧化作用有关。硒和含硒酶可抑制细胞膜脂质过氧化损伤, 保护细胞的结构及膜的流动性, 维护细胞的功能表达。本文体内、体外补硒组 PBMC 在 IL-2 分泌活性和 IL-2R 表达百分率提高的同时, 均伴有膜流动性恢复和 LPO 或 MDA 含量的减少, 提示抗氧化、维持膜流动

性可能是补硒治疗能纠正慢性肝病患者 PBMC IL-2 系统紊乱的机制之一。

参考文献:

- [1] Loguercio C, De Girolamo V, Federico A, et al. Relationship of blood trace elements to liver damage, nutritional status, and oxidative stress in chronic nonalcoholic liver disease [J]. Biol Trace Elem Res, 2001, 81(3): 245 - 254.
- [2] Tulek N, Saglam SK, Saglam M, et al. Soluble interleukin-2 receptor and interleukin-10 levels in patients with chronic hepatitis B infection [J]. Hepatogastroenterology 2000, 47(33): 828 - 831.
- [3] 和水祥, 舒昌杰, 谢蔚玫, 等. 硒防护离体人胚肝细胞脂质过氧化损伤的初步观察 [J]. 中华预防医学杂志, 1996, 29(3): 165 - 167.
- [4] 和水祥, 李红霞, 裴新明, 等. 硒对慢性乙型肝炎患者 PBMC 功能的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 1999, 7(8): 658.
- [5] 李长顺, 和水祥, 刘恩歧, 等. 硒对慢性肝病患者外周血单个核细胞膜流动性的影响 [J]. 西安交通大学学报(医学版), 2003, 24(2): 131 - 132.
- [6] Roy M, Kiremidjian-Schumacher L, Wishe HI, et al. Supplementation with selenium restores aged-related decline in immune cell function [J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1995, 209(4): 369 - 375.
- [7] 梁华平, 王国正. 维生素 E 对创伤小鼠 T 细胞功能以及脂质过氧化和膜流动性的影响 [J]. 中国药理学通报, 1996, 12(1): 47 - 49.
- [8] 龚谔芬, 尹玉麟, 朱茂祥, 等. 补硒对镍作业人员脂质过氧化损伤和细胞免疫功能变化的保护研究 [J]. 卫生研究, 1994, 23(6): 324 - 327.
- [9] Foster LH, Sumar S. Selenium in health and disease: a review [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 1997, 37(3): 211 - 228.
- [10] Kiremidjian-Schumacher L, Roy M. Selenium and immune function [J]. Z Ernahrungswiss, 1998, 37(Supp11): 50 - 56.

(编辑 邱 芬)

(上接第 612 页)

本研究基于反义基因药物合成简单、价格相对较便宜, 且毒性小等特点, 针对 c-myc mRNA 第 2 外显子起始码 AUG 及其后 4 个密码子设计合成了正义链、错配链及反义链寡核苷酸, 并行硫代磷酸化修饰, 观察了他们对肾癌细胞的生长抑制作用。实验结果发现, 正义链、错配链对肾癌细胞的生长抑制作用较小, ASODN 对肾癌细胞的生长抑制作用具有剂量效应相关性和时间效应相关性。MTT 法测定细胞生长抑制百分率结果显示, 用 $12 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ASODN 在作用 48 h 时抑制率最高。流式细胞仪的检测结果提

示, c-myc ASODN 能够有效地抑制瘤细胞从 G_1 期进入 S 期, 提示 c-myc ASODN 具有细胞周期特异性地抑制肾癌细胞生长的作用。

参考文献:

- [1] 丁一, 俞李章, 李鸣, 等. 人肾颗粒细胞癌细胞(GRC-1)的建立及其生物学特性 [J]. 中华泌尿外科杂志, 1995, 16(1): 3.
- [2] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养 [M]. 第 1 版. 北京: 世界图书出版社, 1996. 200 - 213.
- [3] Heiktila R, Schwab G, Wichstrom E, et al. A c-myc antisense oligodeoxynucleotide inhibits entry into S phase but no progress from G_0 to G_1 [J]. Nature, 1987, 325(2): 445.

(编辑 卓选鹏)