

低氘水对小鼠免疫调节作用的研究

连 璐 丛峰松 蔡东联 曲 丹 林 宁 王 洁

摘 要 **目的** 探讨低氘水(deuterium-depleted water, DDW)对小鼠免疫调节作用的实验研究。**方法** 实验组小鼠以低氘水作为饮用水,对照组饮自来水,饲养6周,分别测定免疫蛋白IgG、IgM的含量,脾脏指数和胸腺指数(mg/g),脾淋巴细胞增生能力,迟发型变态反应,NK细胞活性以及T细胞亚群CD4⁺和CD4⁺/CD8⁺的变化,观察低氘水对小鼠非特异性免疫和特异性免疫功能的影响。**结果** 低氘水能显著提高IgM,脾脏指数的水平和CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺的含量。**结论** 低氘水对小鼠非特异性免疫和特异性免疫功能具有一定的增强作用。

关键词 低氘水 IgG IgM 迟发型变态反应 NK细胞活性 CD4⁺ 免疫调节

Effect of Deuterium Depleted Water on Immunomodulating in Mice. Lian Lu, Cong Fengsong, Cai Donglian, Qu Dan, Lin Ning, Wang Jie. Department of Clinical Nutrition, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract Objective To evaluate the immunomodulating effects of deuterium-depleted water(DDW) in normal mice. **Methods** All of the mice were divided into 2 groups;the experimental group which accepted DDW as the water,and the control group. After 6 weeks, IgG, IgM, thymus index, spleen index, the proliferation of spleen lymphocytes, the activity of NK cell,CD4⁺,CD4⁺/CD8⁺ and dinitrofluorobenzeneinduced delayed type hypersensitivity test(DTH) were employed to evaluate the immunomodulating effects of DDW on non-specific and specific immunologic function of normal mice. **Results** DDW increased the level of IgM, spleen index, CD4⁺ and CD4⁺/CD8⁺. **Conclusion** DDW improves non-specific and specific immunologic function of normal mice.

Key words DDW; IgG; IgM; DTH; The activity of NK cell; CD4⁺; Immunomodulating

早在1974年,重氢就被研究其对于人的衰老以及健康的作用。过高浓度的重水会显著减少小鼠存活时间,这可能和其导致有丝分裂过程的停滞有关^[1]。也有理论认为重氢可以改变参与DNA反应的酶分子的形状,从而影响生命过程的正常进行,引发各种疾病。而25%~35%的重水却表现出一定的抗肿瘤特性,抑制肿瘤生长,延长小鼠存活期,且该浓度范围的重水可使实验组小鼠接受Co辐射的致死率显著少于对照组^[2,3]。富含氢的水也可促进糖脂代谢,从而预防和延迟胰岛素抵抗和2型糖尿病^[4]。

低氘水的研究非常少,我项目组率先在国内进行这方面的探索。先在体外用0.0025%、0.0050%和0.0105%体积分数的低氘水对A549和HLF-1细胞进行培养,结果显示相比正常培养液,DDW对肺癌细胞增生有抑制作用,而对正常细胞的生长无显著抑

制,其中以0.0050%浓度效果最明显。利用流式细胞仪检测其细胞周期,推测可能是由于DDW将肿瘤细胞阻滞在S期,且促进肿瘤细胞凋亡而达到抑制癌细胞的恶性增长。体内试验也同样证明了DDW的抑瘤作用^[5]。同时低氘水对于衰老模型小鼠的抗氧化能力也有一定正向调节作用,它可以提高超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)含量,增加Na-K-ATP酶活力和总抗氧化能力(T-AOC),降低单胺氧化酶(MAO),丙二醛(MDA)的含量。本实验从多方面研究0.0050%的DDW对正常小鼠免疫调节的影响。

材料与方法

1. 试剂和试验动物:0.0050%的低氘水,由上海交通大学生命科学技术学院提供。实验所需试剂及试剂盒均由上海达为科生物科技有限公司提供。清洁级ICR纯系雄性小鼠,体质量20±2g,由中国科学院上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。

2. 方法:(1)动物培养::将16只ICR雄性小鼠随机分成两组,正常饲养,对照组饮用自来水,实验组饮用DDW,喂养6周。(2)对小鼠免疫器官指数的影响:上述小鼠培养后,颈椎脱臼处死,解剖剥取胸腺和脾脏,称重,计算小鼠胸腺指数和脾指数:胸腺指数=胸腺重×1000/体重;脾指数=脾重×

作者单位:200433 上海,第二军医大学长海医院临床营养科(连璐、蔡东联、曲丹、林宁、王洁);200240 上海交通大学生命科学技术学院(丛峰松)

通讯作者:丛峰松,电子信箱:fscong@sjtu.edu.cn;蔡东联,电子信箱:nutrition1226@sina.com

1000/体重。(3)对小鼠血清 IgG、IgM 水平的影响:取上述小鼠,将其眼眶放血,分离血清,分别按试剂盒说明书方法测定 IgG、IgM 含量。(4)MTT 法测定 ConA 刺激的小鼠脾淋巴细胞增生功能:无菌取脾,置于盛有适量无菌 Hanks 液的平皿中,用镊子轻轻将脾撕碎,制成单细胞悬液。经 200 目筛网过滤,用 Hanks 液洗 3 次,每次离心 10min (1000r/min)。然后将细胞悬浮于 1ml 的完全培养液中,用台盼蓝染色(0.1ml 0.6% 台盼蓝 + 0.1ml 1.7% NaCl 液 + 0.2ml 细胞悬液,混匀),计算细胞存活率(应在 95% 以上),调整细胞浓度为 5×10^5 个/毫升。将 5×10^5 个/毫升脾细胞悬液加入到 96 孔培养板中,200 微升/孔,每孔加 1 μ l 的 ConA 液(相当于 5 μ g/ml),置 5% CO₂,37℃ 培养 72h,在培养结束前 4h,于培养板各孔内加入 MTT 液(5mg/ml)10 微升/孔,继续培养 4h。离心(1000r/min)10min 弃上清,各孔内加入 150 μ l 的 DMSO,溶解 10min,用酶标测定仪在波长 490nm 处测 OD 值。淋巴细胞的增生能力用加 ConA 孔的光密度值减去不加 ConA 孔的光密度值表示。计算刺激指数:刺激指数 = OD_{实验}/OD_{对照}。(5)迟发型变态反应(DTH):取 16 只 ICR 雄性小鼠,分组和培养方法同动物培养方法,在饲养第 30 天时,将小鼠腹部去毛,范围为 3cm $\times$ 3cm,将 10g/L DNFB 均匀涂抹于上,隔日加强 1 次。第 40 天时将 10g/L DNFB 均匀涂抹于小鼠右耳进行攻击,使局部产生迟发型变态反应,攻击 24h 后,颈椎脱臼处死小鼠,剪下左右耳壳,用打孔器取下直径 8mm 的耳片,称取质量,以左右耳片重量之差做为肿胀度,比较各组的差别。(6)对小鼠 NK 细胞活性的影响:如上制脾细胞悬液,取靶细胞和效应细胞各 100 μ l(效靶比 50:1),加入 U 型 96 孔培养板中,靶细胞自然释放孔加靶细胞和培养液各 100 μ l,靶细胞最大释放孔加靶细胞和 2.5% Triton 各 100 μ l;上述各项均设 3 个平行孔,置 5% CO₂,37℃ 培养 4h,然后将 96 孔培养板以 1500r/min 离心 5min,每孔吸取上清 100 μ l 置平底 96 孔培养板中,同时加入 LDH 基质液 100 μ l,反应 10min,每孔加入 1mol/L 的

HCL30 μ l,在酶标仪 490nm 处测定 OD 值。NK 细胞活性(%) = [(反应孔 OD - 自然孔 OD)/(最大释放孔 OD - 自然释放孔)] $\times$ 100%。(7)外周血 T 淋巴细胞及其亚群 CD4⁺ 和 CD4⁺/CD8⁺ 的变化:取上述培养小鼠的外周抗凝血,加入 PBS 液做倍比稀释,常规分离淋巴细胞。用 PBS 将细胞调至 1×10^6 个/毫升的浓度待用。取 50 μ l 的细胞悬液至于流式管中,加入 20 μ l CD4⁺ 和 CD8⁺ 抗体,避光温室反应 20min,PBS 洗去上清后,再加入 PBS 液 100 μ l,制成细胞悬液。用未标记的样品做对照,用流式细胞仪检测 T 细胞亚群含量。

3. 统计学处理:所有数值均以均数 $\pm$ 标准差表示,运用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析,组间比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 作为数理统计差异显著性的评价。

结 果

1. 细胞免疫:(1)低氘水对小鼠淋巴细胞增生功能的影响:用 MTT 法测定 ConA 刺激的小鼠淋巴细胞增生,结果表明实验组和对照组 OD 值没有显著差异。(2)低氘水对小鼠迟发型变态反应的影响:用 DNFB 攻击小鼠两耳,结果表明实验组和对照组两耳质量差值没有显著差异。(3)低氘水对 NK 细胞活性的影响:用 LDH 法测 NK 细胞活性,实验组和对照组没有显著差异。

2. 体液免疫:(1)低氘水对小鼠血清中 IgG、IgM 水平的影响:结果显示低氘水可以显著提高血清中 IgM 的含量(*P* < 0.01),IgG 的含量有提高但没有统计学意义。

3. 非特异性免疫:(1)低氘水对小鼠免疫器官指数的影响:表 1 显示低氘水对脾脏指数有非常显著的提高(*P* < 0.01),对胸腺指数的提高没有显著差异性。

表 1 低氘水对小鼠免疫调节作用研究

组别	OD 值	耳质量差(g)	脾脏指数	胸腺指数	NK 活性(U/L)	IgG (μ g/ml)	IgM (μ g/ml)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
NS	0.38 $\pm$ 0.01	0.032 $\pm$ 0.013	3.45 $\pm$ 0.28	1.01 $\pm$ 0.08	1842.69 $\pm$ 560.50	3.78 $\pm$ 0.23	0.97 $\pm$ 0.05	54.04 $\pm$ 9.19	45.10 $\pm$ 9.56	1.27 $\pm$ 0.48
DDW	0.38 $\pm$ 0.01	0.024 $\pm$ 0.004	3.93 $\pm$ 0.35 **	1.05 $\pm$ 0.15	1653.36 $\pm$ 579.51	3.84 $\pm$ 0.55	1.10 $\pm$ 0.10 * *	67.69 $\pm$ 7.83 *	31.84 $\pm$ 8.50 *	2.31 $\pm$ 0.84 *

与对照组相比较,**P* < 0.05,***P* < 0.01

4. 低氘水对小鼠 T 细胞亚群 CD4⁺ 和 CD8⁺ 变化的影响:运用流式细胞术对 T 细胞亚群的数值进行测量,如图所示,左上角区域中红点代表 CD4⁺,左下角区域中红点代表 CD8⁺,实验组中 CD4⁺ 和 CD4⁺/CD8⁺ 的含量显著高于对照组(*P* < 0.05),而 CD8⁺ 的含量则显著低于对照(*P* < 0.05)。

讨 论

机体的免疫主要分为两个部分,分别是非特异性免疫和特异性免疫,而特异性免疫又包括体液免疫和

细胞免疫。血清 IgG、IgM 是机体体液免疫的分子基础,发挥着特异性免疫的防护作用,同时可激活补体传统途径,参与机体的非特异性免疫^[6]。胸腺和脾脏是机体重要的免疫器官。胸腺是 T 淋巴细胞发育分化成熟的场所,能不断地向外周淋巴器官和组织提供分化成熟的 T 淋巴细胞,维持机体正常的细胞免疫功能,并影响体液免疫功能。脾脏是机体内最大的免疫器官,是机体合成和分泌抗体的重要场所。脾脏和胸腺质量的改变可反映出受试物对免疫系统的刺激

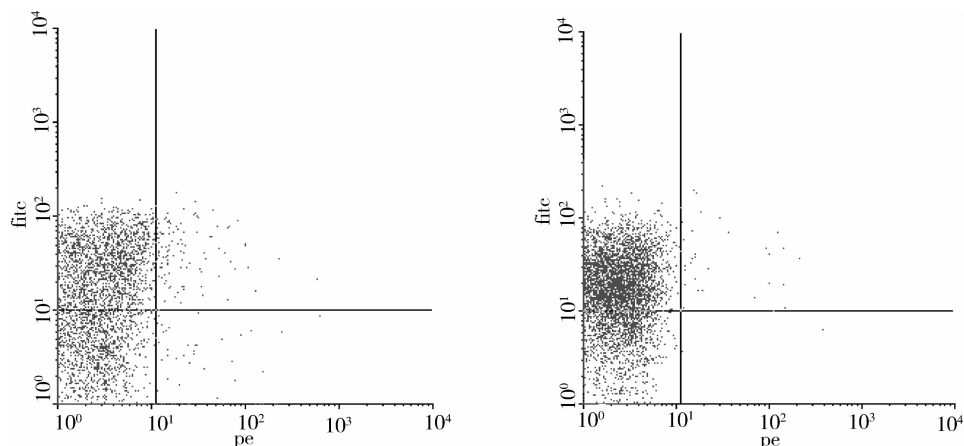


图1 流式细胞术测 T 细胞亚群含量。

左图为对照组,右图为实验组

作用。衡量机体细胞免疫功能的实验有淋巴细胞增生实验,迟发型变态反应和 NK 细胞活性检测。脾淋巴细胞最初由中枢免疫器官迁来,靠抗原的刺激而增生,从而达到增强免疫的作用。迟发型变态反应是由特异性致敏效应 T 细胞介导的细胞免疫反应,其中的 T 细胞在移植物排斥、移植物抗宿主病、自身免疫和肿瘤免疫等方面起着关键作用^[7]。NK 细胞是细胞免疫的非特异性成分,不需抗原致敏或抗体辅助,就能直接杀伤肿瘤细胞,处于机体抗肿瘤、抗感染的第一道防线。

本实验正是通过上述实验方法,试图全面分析低氘水对正常小鼠免疫调节作用的影响。结果中脾脏指数(3.93 ± 0.35)及血清 IgM(1.10 ± 0.10)的显著提高($P < 0.01$)提示低氘水有一定增强免疫力的作用。但在其他指标,特别是细胞免疫的 3 个指标中,实验组与对照组均无统计学差异,这可能是由于免疫调节药物对于免疫功能衰竭的动物可取得免疫刺激的效果,但对免疫功能正常者则难以显示免疫增强效应。如益气生津方对正常大鼠 NK 活性影响的试验中,空白水组为(45.75 ± 13.12)%,而高中低剂量药物组数值分别为(43.43 ± 7.08)%, (41.24 ± 12.72)%, (41.24 ± 12.72)%,显示服药对脾 NK 细胞活性影响不显著($P > 0.05$)^[8]。又如,蛤仔多糖对正常小鼠脾指数的影响没有统计学差异,且低中剂量在胸腺指数的指标上呈现免疫抑制作用(3.96 ± 0.56) vs (4.91 ± 0.41) ($P < 0.05$)^[9]。

鉴于上述细胞免疫的阴性结果,本实验深入地对 T 细胞亚群进行了分析。T 淋巴细胞来源于骨髓造血淋巴样干细胞,按其表面分子和功能的不同,可将

其分为不同亚群。其中 CD4 细胞和 CD8 细胞是功能相异的 2 个亚群,CD4⁺ 结合 MHC - II 类分子,而 CD8⁺ 结合 MHC - I 类分子,它们通过细胞间的直接接触或通过释放细胞因子导致或抑制效应,是免疫应答在双向调控下表现出适当的强度。2 个亚群细胞比例的失调就会产生免疫功能失常,正常成年人的 CD4⁺/CD8⁺ 的比值在 1.7 ~ 2.0 之间,比值的降低可能反映机体易感性一时性的增加。本研究结果显示实验组 CD4⁺ 水平显著升高(67.69 ± 7.83)% ($P < 0.05$), CD4⁺/CD8⁺ 比值也升至(2.31 ± 0.84)% ($P < 0.05$)。这提示低氘水对正常小鼠可能具有增强辅助 TCR 识别结合抗原和参与 T 细胞活化信号转导的能力,但在 T 细胞增生、分化、转化上的实质性帮助不显著。

综上所述,低氘水对正常小鼠具有一定提高免疫力的效用。依据国家《保健食品检验与评价技术规范》(2003 年版),后一步实验可对低氘水的免疫功能做进一步研究,在实验动物的上可以使用免疫低下小鼠模型或植瘤小鼠模型,使结果更明显,更具有临床意义,在实验内容上可以增加抗体生成细胞测定,血清溶血素的测定和碳粒廓清实验,以取得更为全面的评价结果。

参考文献

- 1 GweEross PR and Spindel W. Heavy water inhibition of cell division: an approach to mechanism [J]. Annals New York Academy of Science, 1962, 10(102):500 - 522
- 2 Hughes AM, Tollbert BM, lonberg - Holm K, et al. The effect of deuterium oxide on survival of mice with ascites tumor [J]. Biochimica Biophysica Acta, 1958, 28, 58 - 61
- 3 Laissue JA, Bally E, Joel DD, et al. Protection of mice from whole - body gamma radiation by deuteration of drinking water [J]. Radiat Res, 1983, 96(1):59 - 64

- 4 Sizuo Kajiyama, Goji Hasegawa, Mai Asano *et al.* Supplementation of hydrogen – rich water improves lipid and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes or impaired glucose tolerance [J]. *Nutrition Research*, 2008 28:137 – 143
- 5 丛峰松, 张亚茹, 石中媛, 等. 低氘水对肺癌细胞增殖的抑制作用及可能的机制 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2009, 16 (5): 485 – 489
- 6 韩超, 肖柳英, 张丹. 复方女贞益母黄芪汤对小鼠免疫功能影响的实验研究 [J]. *中药材*, 2008, 31 (7): 1036 – 1038
- 7 徐叔云, 卞如濂, 陈修, 等. 药理试验方法学 [M]. 2 版, 北京: 人民卫生出版, 1991: 1228
- 8 张华莹, 曹洪欣, 于友华, 等. 益气生津方对大鼠免疫机能的影响 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2009, 15 (6): 428 – 429
- 9 范秀萍, 吴红棉, 王娅楠, 等. 菲律宾蛤仔糖胺聚糖的免疫活性研究 [J]. *食品科学*, 2008, 29 (4): 85 – 87
- (收稿: 2010 – 03 – 07)
- (修回: 2010 – 05 – 31)

多层螺旋 CT 冠状面重建图像用于尘肺诊断的标准研究与临床应用

张玉敏

摘要 **目的** 利用多层螺旋 CT 的密度分辨率高、成像受控因素少的特点, 探讨用多层螺旋 CT 冠状面重建图像取代高千伏胸片诊断尘肺。**方法** 对 100 例已经确诊为尘肺病患者的同期高千伏胸片和多层螺旋 CT 冠状面重建图像与尘肺标准片进行对照性研究, 分析尘肺病在多层螺旋 CT 冠状面重建图像上诊断标准。**结果** 本组资料中 56 例在高千伏胸片上诊断 I 期尘肺, 而在多层螺旋 CT 冠状面重建图像上有 49 例符合 I 期尘肺诊断标准、有 5 例符合尘肺病观察对象、有 2 例符合 II 期尘肺诊断标准; 39 例在高千伏胸片上诊断 II 期尘肺, 而在多层螺旋 CT 冠状面重建图像上只有 31 例符合 II 期尘肺诊断标准、有 6 例符合 I 期尘肺诊断标准、有 2 例符合 III 期尘肺诊断标准; 5 例在高千伏胸片上诊断 III 期尘肺, 在多层螺旋 CT 冠状面重建图像上 5 例全部符合 III 期尘肺诊断标准。本组资料中各期尘肺病在高千伏胸片上小阴影的显示远不如多层螺旋 CT 冠状面重建图像上显示精确, 特别是对 I、II 期尘肺病诊断有明显差异 ($P < 0.01$)。**结论** 多层螺旋 CT 冠状面重建图像是高千伏胸片诊断尘肺病的有效补充, 比高千伏胸片诊断尘肺病更为可靠。

关键词 尘肺 诊断标准 多层螺旋 CT 冠状面重建

Clinical Application of Multi – slice CT Coronal Reconstruction Image in the Diagnostic Criteria of Pneumoconiosis. Zhang Yumin. *Department of Radiology, Lai Gang Hospital of Tai Shan Medical College, Shandong 271126, China*

Abstract Objective To investigate the clinical application of Multi – slice CT (MSCT) coronal reconstruction image substituting for the high kilovolt radiography in the diagnostic criteria of pneumoconiosis. **Methods** We compared the high kilovolt radiography with MSCT coronal reconstruction in 100 patients with pneumoconiosis and analyzed the diagnostic standards of pneumoconiosis on MSCT coronal reconstruction. **Results** Among 100 patients, 56 cases were diagnosed as I – stage pneumoconiosis on the high kilovolt radiography, while on MSCT coronal reconstruction image, 49 cases as I – stage and 5 cases as the observed objects of pneumoconiosis, 2 cases as II – stage pneumoconiosis. 39 cases were in II – stage pneumoconiosis on the high kilovolt radiography, while on MSCT coronal reconstruction image, 31 cases in II – stage pneumoconiosis and 6 cases in II – stage pneumoconiosis, 2 cases in III – stage pneumoconiosis. 5 cases of 100 patients were in III – stage pneumoconiosis both on the high kilovolt radiography and on MSCT coronal reconstruction image. It was more precise of displaying small shadows on MSCT coronal reconstruction than high kilovolt radiography in every phase, especially I and II stage in which the difference of pneumoconiosis diagnoses was very definite ($P < 0.01$). **Conclusion** MSCT coronal reconstruction is the effective supplement to the high kilovolt radiography in the diagnose of pneumoconiosis, and is more reliable in pneumoconiosis diagnosing.

Key words Pneumoconiosis; Diagnostic criteria; Multi – slice CT; Coronal reconstruction

尘肺病是患者在职业活动中长期吸入生产性粉尘滞留肺内而引起的以肺组织弥漫性纤维化为主的全身性疾病。尘肺病的诊断目前是以高千伏标准胸

片为标准, 结合职业史和病变的表现进行尘肺的命名和分级。尘肺的诊断涉及国家劳保规定和职业病待遇, 政策性强, 诊断时必须严格执行国家尘肺病的诊断标准。但是高千伏胸片在拍摄过程中受控因素太