

# 慢性镉诱导小鼠巨噬细胞的吞噬功能活性抑制研究

单潇潇,周娟,陈龙,赵洁明

(南京师范大学生命科学学院生化与生物制品研究所,江苏南京210097)

**[摘要]** 选用60只健康雌性ICR小鼠,随机分为对照组、低剂量氯化镉组(L-Cd组)、高剂量氯化镉组(H-Cd组),每组20只。对照组每天给予普通全价饲料,L-Cd和H-Cd组分别饲喂含镉2和10 mg/kg的全价饲料,连续9周。分别在第3、6、9周观察小鼠腹腔巨噬细胞吞噬率和吞噬指数的变化,并检测血浆TNF- $\alpha$ 水平。结果显示,在整个实验期内,L-Cd和H-Cd组腹腔巨噬细胞吞噬率明显低于对照组,且随剂量增加和时间的延长而明显下降,而吞噬指数虽较对照组下降但无显著差异;血浆TNF- $\alpha$ 水平变化不明显。提示慢性镉染毒诱发小鼠巨噬细胞吞噬功能低下。

**[关键词]** 镉,小鼠,巨噬细胞,肿瘤坏死因子- $\alpha$

**[中图分类号]** Q343.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2006)01-0080-04

## Study on Inhibition of Phagocytic Function Activity in Macrophages of Chronic Cd-induced Mice

Shan Xiaoxiao, Zhou Juan, Chen Long, Zhao Jieming

(Institute of Biochemistry and Biological Product, School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

**Abstract:** Sixty healthy female ICR mice are chosen and divided randomly into control group, low dose CdCl<sub>2</sub> group (L-Cd group) and high dose CdCl<sub>2</sub> group (H-Cd group). During nine week experimental period, the common complete diet is orally provided daily in control group, and the mice in L-Cd and H-Cd groups are given the diets with 2 and 10 mg of Cd per kg feed, respectively. Changes of phagocytic rate and phagocytic index of macrophages in abdominal cavity of animals are investigated in the 3<sup>rd</sup>, 6<sup>th</sup> and 9<sup>th</sup> weeks, respectively, with the analysis of plasma TNF- $\alpha$  level. The results show that during the entire experimental period, phagocytic rates in macrophages of L-Cd and H-Cd groups reduce significantly as compared with that of control group, and drop significantly with dosage increase and temporal elongation of Cd exposure. No obvious differences are observed though the phagocytic indice are lower in Cd-exposed groups than in control group. The levels of plasma TNF- $\alpha$  among all groups remain unchanged. It is suggested that chronic cadmium exposure induces the defect of macrophage functional activity in mice.

**Key words:** cadmium, mouse, macrophage, tumor necrosis factor- $\alpha$

## 0 引言

单核/巨噬细胞和树突状细胞在低等和高等生物的免疫应答中均发挥重要作用。成熟的单核细胞主要分布在血液中,而单核细胞进一步分化形成的巨噬细胞则分布十分广泛,几乎存在于全身所有表皮和黏膜下组织,这种分布特性决定了其在防御感染、自身稳定和免疫监视中起着重要作用。肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )是巨噬细胞分泌的最重要的细胞因子,其可以作用于巨噬细胞表面的TNF-R,刺激巨噬细胞分泌其他细胞因子,同时,TNF- $\alpha$ 还能促进许多与抗感染免疫应答有关的基因表

收稿日期:2005-03-09.

基金项目:江苏省重点实验室开放基金资助项目(KJS01072).

作者简介:单潇潇,1980—,硕士研究生,主要从事动物免疫生理学的学习和研究. E-mail: shosholuck@163.com

通讯联系人:陈龙,1964—,博士,教授,主要从事免疫生理学与生物化学教学与研究. E-mail: lchen@njnu.edu.cn

达<sup>[1-2]</sup>。为此,本研究采用经食物慢性镉染毒,观察低、高剂量氯化镉诱导的小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能活性和血浆中TNF- $\alpha$ 水平变化,旨在探讨慢性镉诱导的病理生理发生发展过程中非特异性免疫细胞活性变化,为进一步揭示镉对人类的免疫毒性作用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

60只健康、体重 $24.04 \pm 0.18$  g的成年雌性ICR小鼠,由南京医科大学实验动物中心提供,经1周适应性饲养后,随机分成对照组、低剂量氯化镉组(L-Cd组)、高剂量氯化镉组(H-Cd组),每组20只。实验过程中,对照组饲喂普通全价饲料,低、高镉组分别饲喂含镉2和10 mg/kg饲料的全价饲料,进行慢性镉染毒实验,连续9周。小鼠自由采食、饮水,饲养过程中,每天换水,隔日换垫料,环境温度 $20 \sim 25^\circ\text{C}$ 。

### 1.2 样品采集和处理

分别于实验后第3、6、9周上午9:00,对各组小鼠称重,并从各组取已编号的6只小鼠,摘眼球采集血样2 mL,迅速放入含有肝素钠(1:500)的塑料管内,混匀,然后将血液置 $4^\circ\text{C}$ 离心( $3\,000$  r/min, 20 min),取出血浆置 $-20^\circ\text{C}$ 保存用于指标测定。

### 1.3 测定指标和方法

巨噬细胞吞噬功能:取洗涤3次的5%鸡红细胞生理盐水悬液,每只小鼠腹腔注射1 mL,1 h后,再腹腔注射生理盐水1 mL,脱臼处死,轻轻按摩腹部1 min,吸取腹腔液1 mL置试管内, $37^\circ\text{C}$ 孵育30 min, $1\,000$  r/min离心10 min,弃去上清液0.5 mL,然后吸取2滴沉渣涂片,甲醇固定,Wrights-Giemsa染色。油镜下计数100个巨噬细胞中吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数目,计算出吞噬百分率,同时观察计数每个巨噬细胞所吞噬的鸡红细胞数,求出吞噬指数。

血浆TNF- $\alpha$ :放射免疫分析法,试剂盒由中国人民解放军总医院放射免疫研究所提供,严格按说明书方法进行。

### 1.4 数据处理

以平均值 $\pm$ 标准误(Mean $\pm$ SEM)表示,用Statistica软件对数据作Students't检验,确定差异显著性。

## 2 结果

### 2.1 小鼠表现

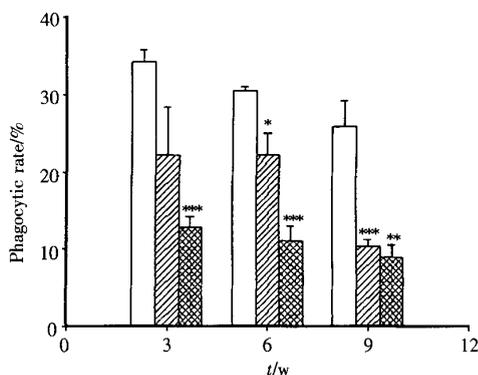
在实验过程中,高剂量镉组小鼠在染毒后期出现腹胀、毛色紊乱等表现,在实验第7和8周分别死亡1只,剖检发现,小鼠肝脏有紫黑色斑点,脾脏有白色斑点。在整个实验期内,各组小鼠体重均随周龄增长而上升,但组间无显著差异。

### 2.2 慢性镉诱导小鼠巨噬细胞吞噬率的变化

在整个实验期内,镉诱导小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬率明显低于对照组,且随剂量增加和时间的延长而明显下降(图1)。

### 2.3 慢性镉诱导小鼠巨噬细胞吞噬指数的变化

由表1可见,在整个实验期里,L-Cd和H-Cd组小鼠腹腔巨噬细胞吞噬指数均低于对照组,但无显著差异。



Data are presented as mean $\pm$ SEM,  $n=6$ .

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs control group.

□ Control, ▨ L-Cd, ▩ H-Cd

图1 慢性镉诱导小鼠巨噬细胞吞噬率的变化

表1 慢性镉诱导小鼠巨噬细胞吞噬指数的变化 ( $n=6$ , Mean $\pm$ SEM)

Index	Group	Post-treatment with CdCl <sub>2</sub>		
		3 w	6 w	9 w
Phagocytic index (RBC/macrophage)	Control	1.64 $\pm$ 0.09	1.58 $\pm$ 0.09	1.36 $\pm$ 0.12
	L-Cd	1.39 $\pm$ 0.11	1.42 $\pm$ 0.14	1.38 $\pm$ 0.08
	H-Cd	1.58 $\pm$ 0.15	1.35 $\pm$ 0.15	1.27 $\pm$ 0.05

### 2.4 慢性镉诱导小鼠血浆 TNF- $\alpha$ 水平变化

表 2 显示,在整个实验期,血浆 TNF- $\alpha$  水平各组间无明显差异.

表 2 慢性镉诱导小鼠血浆 TNF- $\alpha$  水平变化 ( $n=6$ , Mean  $\pm$  SEM)

Index	Group	Post-treatment with CdCl <sub>2</sub>		
		3 w	6 w	9 w
TNF - $\alpha$ / (ng/mL)	Control	0.73 $\pm$ 0.11	0.93 $\pm$ 0.18	0.85 $\pm$ 0.10
	L-Cd	0.62 $\pm$ 0.06	0.87 $\pm$ 0.13	0.80 $\pm$ 0.11
	H-Cd	0.86 $\pm$ 0.13	0.79 $\pm$ 0.24	0.81 $\pm$ 0.12

## 3 讨论

本研究显示,整个实验期内对照组和低镉组动物采食、活动、外观特征均比较正常,高镉组小鼠在实验前期也无异常表现,但染毒后期出现腹胀、毛色素乱等变化,在实验第 7 和 8 周分别死亡 1 只. 各组动物生长发育没有明显差异. 提示本实验采用的慢性镉染毒方式温和,也未见迅速广泛诱导机体多种系统器官机能活动障碍.

随着现代工业的迅猛发展,镉污染的问题已日益严重化. 上世纪中期日本爆发了由镉引起的“骨痛病”事件,此后,诸如此类的事件时有发生,并引起国际的共同关注. 镉是环境中最常见且不易消除的重金属污染物,它在环境中虽然含量很低,但经食物链富集可达相当高的浓度,且在机体内生物半衰期长达 10~35 年<sup>[3,4]</sup>. 1972 年,FAO/WHO 把镉列为第三位优先研究的食品污染物,1974 年联合国环境规划局将其定为重点污染物,后美国毒物管理委员会(ATSDR)将其列为第六位危机人类健康的有毒物质. 镉被人体吸收进入血液后可迅速与血浆白蛋白等成分结合,并随血流分布到各器官,对人和动物具有多器官、组织、细胞毒性<sup>[5]</sup>. 已有研究证实,镉是一种免疫抑制物<sup>[6]</sup>. 巨噬细胞是一种重要的多功能免疫细胞,不仅能吞噬老化细胞、细胞碎片、细菌、精子,还是重要的抗原识别提呈细胞. 正常巨噬细胞在不同的组织中表现为不同形式,如肝脏 Kupffer 细胞<sup>[7]</sup>、肺泡巨噬细胞、脾脏中的游走及固定巨噬细胞、胸腹膜腔巨噬细胞等<sup>[1]</sup>. 当巨噬细胞被激活后,可分泌 TNF- $\alpha$ 、NO 及 PGE2 等大量生物活性介质,这些生物介质参与广谱杀瘤作用,在巨噬细胞的免疫功能中发挥重要作用<sup>[8,9]</sup>. 因此,巨噬细胞的杀伤活性是衡量其功能状态的重要指标<sup>[10]</sup>. 有实验报道,饮水染镉能抑制年老的 BDF1 雌鼠巨噬细胞免疫功能<sup>[11]</sup>,腹腔注射 0.3~1.2 mg/kg 的 CdCl<sub>2</sub> 染毒小鼠腹腔灌洗液中巨噬细胞总数减少<sup>[12]</sup>;体外实验证明,培养的鼠巨噬细胞(RAW 246.7)暴露在 CdO(25,50 mg)或 CdCl<sub>2</sub>(30,40 mmol/L)下 2~24 h 内,其噬菌能力随着时间的推移逐步下降<sup>[13]</sup>. 本研究结果显示,不同剂量镉染毒小鼠巨噬细胞吞噬率均显著低于对照组,而吞噬指数与对照组相比降低但无显著差异,说明慢性镉负荷导致机体巨噬细胞功能活性低下,影响机体的非特异性免疫功能. 有研究分析认为,镉致巨噬细胞免疫毒性机制可能与镉引起巨噬细胞凋亡和坏死有关. 凋亡的发生一般认为是细胞内钙离子浓度增加,使核酸内切酶激活,在核小体连接处将 DNA 链切断所致. Lomann 等的研究表明,镉可引起细胞内游离钙离子浓度增加<sup>[14]</sup>,吴静等人推测低浓度镉通过此途径病理性的引起巨噬细胞凋亡<sup>[15]</sup>;而镉在较高浓度时,有可能引起磷脂酶的广泛活化而导致细胞坏死<sup>[16]</sup>.

TNF- $\alpha$  是由单核-巨噬细胞分泌的细胞因子. 成熟的单核细胞主要分布在血液中,而单核细胞进一步分化形成的巨噬细胞则分布十分广泛,几乎存在于全身所有表皮和黏膜下组织,这种分布特性决定了其在防御感染、自身稳定和免疫监视中起着重要作用. 在机体发生炎症反应时,血液中和组织中单核-巨噬细胞被激活可产生并释放大量诸如自由基、PGs、LTs、TXs、TNF- $\alpha$ 、IL-1 等,其中一个最关键因子可能就是其分泌的 TNF- $\alpha$ . 它可进一步介导吞噬细胞分泌包括自由基在内各种活性分子,进而发挥杀伤作用. 但是,如果机体内致病因素不能及时地遏制或清除,体内这些分子可能就会产生过量,造成正常组织的伤害,起致炎作用. 它们作为炎症介质在加重局部炎症的同时,还可通过循环引起远处组织损伤,严重者导致多系统器官障碍、衰竭<sup>[11,17]</sup>. 因此,检测体液和组织中 TNF- $\alpha$  水平的变化,可以很好地了解和评价机体病理生理反应状态. 有研究认为,镉对巨噬细胞的吞噬和分泌功能均有影响,另有实验显示,低浓度镉使得 IL-1、TNF- $\alpha$  的 mRNA 的表达量增高,而高镉组表达量没有明显变化<sup>[18,19]</sup>. 本研究结果表明,在整个实验期,慢性镉染毒后血浆中 TNF- $\alpha$  水平变化不明显,由此也可进一步说明,慢性镉染毒没有对机体产生剧烈损伤和表现多系统器官障碍,可能与没有诱导 TNF- $\alpha$  过量释放有关.

综上所述,经食物慢性镉染毒诱发小鼠巨噬细胞的吞噬功能低下,并有剂量效应和时间效应,但由于染毒的剂量和方式的温和性,其血浆中的 TNF- $\alpha$  含量并未有明显变化。

#### [参考文献]

- [1] Chen L, Zhou J, Gao W, et al. Action of NO and TNF- $\alpha$  release of rats with cadmium loading in mediating malfunction of multiple system organs[J]. 生理学报, 2003, 55(5):535—540.
- [2] 金伯泉. 细胞和分子免疫学[M]. 2版. 北京:科学出版社, 2001: 480—492.
- [3] 张铤, 薛彬, 魏雪涛, 等. 镉免疫毒性机理的初步探讨[J]. 中国环境科学, 1999, 19(6): 530—535.
- [4] 王世俊. 金属中毒[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 1988.
- [5] 徐莉春, 王沐沂, 王心如. 镉对大鼠精子运动能力影响的体外实验研究[J]. 环境与健康, 2000, 17(2):67—69.
- [6] 薛彬, 刘湛, 雷智明. 镉对小鼠免疫毒性的研究[J]. 中国环境科学, 1995, 15(10):76—78.
- [7] Sauer J M, Waalkes M P, Hooser S B, et al. Suppression of kupffer cell function prevents cadmium induced hepatocellular necrosis in the male sprague-dawley rat[J]. Toxicology, 1997, 121(2): 155—164.
- [8] Vredevoe D, Levy L, Knutson D, et al. Recovery of the murine mononuclear phagocytic system following chronic exposure to cadmium[J]. Environ Res, 1985, 37(2):373—382.
- [9] Mullins D W, Walker T M, Burger C J, et al. Taxol-mediated changes in fibrosarcoma induced immune cell function; modulation of antitumor activities[J]. Cancer Immunol Immunother, 1997, 45(1):20—28.
- [10] Orshach R B, Russel S W. A specific sequence of stimulation is required to induce synthesis of the antimicrobial molecule nitric oxide by mouse macrophage[J]. Infect Immunol, 1992, 60(5):2133—2135.
- [11] Blakley B R. The effect of cadmium chloride on the immune response in mice[J]. Can J Comp Med, 1985, 49(1):104—108.
- [12] 魏雪涛, 薛彬, 张铤. 氯化镉对小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响[J]. 中华预防医学杂志, 1998, 32(3):159—161.
- [13] Goering P L, Kuester R K, Neale A R, et al. Effects of particulate and soluble cadmium species on biochemical and functional parameters in cultured murine macrophages[J]. In Vitro Mol Toxicol, 2000, 13(2):125—136.
- [14] Lomann R D, Beyersmann D. Cadmium and Zinc mediated changes of the Ca<sup>2+</sup>-dependent endonuclease in apoptosis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1993, 190(3):1097—1103.
- [15] 吴静, 范青堂, 程学敏, 等. 镉对巨噬细胞毒性及 DNA 损伤作用的研究[J]. 中国公共卫生学报, 1999, 18(6):356—358.
- [16] 周晓, 张侠, 刘世杰, 等. 镉与镍对豚鼠肺泡巨噬细胞膜的联合毒性研究[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1997, 15(1):14—17.
- [17] 朱善良, 陈龙, 高伟, 等. CCl<sub>4</sub> 致小鼠肝损伤中几种免疫介质含量变化的研究[J]. 实验生物学报, 2004, 37(1): 50—54.
- [18] Marth E, Barth S, Jelovcan S. Influence of cadmium on the immune system. Description of stimulating reactions[J]. Cent Eur J Public Health, 2000, 8(1):40—44.
- [19] Harstad E B, Klaassen C D. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -null mice are not resistant to cadmium chloride - induced hepatotoxicity[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2002, 179(3): 155—162.

[责任编辑:孙德泉]