硫丹对小鼠红细胞免疫功能的影响

张 蒙 周显青*

(首都医科大学基础医学院实验动物学系 北京 100069)

摘要: 为了探讨有机氯农药硫丹对小鼠(Mus musculus)红细胞免疫功能的影响, 设计了体内、外两组实验。体内实验: 将40只小鼠随机分成4组, 灌胃硫丹的量依次为: 0、0.14、1.16、6.14 mg/(kg·d)。灌胃25 d后, 取血测定红细胞的免疫功能。体外实验: 将9只小鼠的红细胞分别与不同浓度的硫丹在体外培养, 实验设空白对照组、溶剂丙酮组和4个不同浓度硫丹组, 其6组实验所用硫丹的量依次为: 0、0.5、10、20、40 μg/mL。体外培养2 h后, 测定红细胞免疫粘附能力。结果表明, 在活体实验中, 随着硫丹浓度的增加, 小鼠红细胞C3b受体花环率(ratio of C3b rosetting, C3bRR)明显下降, 依硫丹灌胃浓度由低到高, 其C3bRR依次为71.78%、61.80%、41.96%、41.33%; 而循环免疫复合物花环率(ratio of immune complexes rosetting, ICRR)随着硫丹浓度升高而升高, 分别为61.69%、61.31%、71.86%、91.42%。红细胞促NK细胞活性的功能在各组间没有显著差异。硫丹6.14 mg/(kg·d)组小鼠红细胞对T淋巴细胞免疫粘附促进能力较其他3组明显降低。血浆中红细胞天然免疫促进因子活性在1.16 mg/(kg·d)组和6.14 mg/(kg·d)组较0 mg/(kg·d)组明显降低。与溶剂丙酮组相比, 血浆中红细胞天然免疫抑制因子活性在0.14 mg/(kg·d)组明显下降, 而在6.14 mg/(kg·d)组却明显升高。离体红细胞经硫丹处理后其C3bRR显著降低, 4个硫丹处理组依其浓度由低到高, C3bRR依次为: 61.14%、51.56%、51.06%、41.44%; 而ICRR却显著升高, 分别为61.69%、61.31%、71.86%、91.42%。这表明, 硫丹能抑制小鼠红细胞免疫粘附能力和红细胞对T淋巴细胞的正向调节功能, 降低血浆中红细胞天然免疫促进因子活性, 而对抑制因子活性影响比较复杂, 低剂量时起抑制作用, 而高剂量时能促进其活性。

关键词: 硫丹; 红细胞免疫; ICR小鼠

中图分类号: Q14, R392 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2010)01-250-09

Effect of Endosulfan on Immune Function of Erythrocytes in Mice

ZHANG Meng ZHOU Xian-Qing*

(Department of Laboratory Animal Science, School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract: To investigate the effects of organ chlorine pesticide) endosulfan on erythrocyte immune functions in mice, in vivo and in vitro experiments were designed. A total of 40 mice were randomly divided into 4 groups in in vivo experiment. They were gavaged with endosulfan at levels of 0, 0.14, 1.16, and 6.14 mg/(kg·d) for 25 days, respectively. Blood was then collected to determine the immune functions of erythrocytes. In In vitro experiment, the erythrocytes from 9 mice were incubated with different concentrations of endosulfan: 0(control), 0(acetone, dissolvent), 5, 10, 20, and 40 μg/mL, respectively. The immune adherent capacity of the erythrocyte was determined after culturing for 2 hours in vitro. In vivo experiment showed that the ratio of erythrocyte-C3b

基金项目 国家自然科学基金项目(No. 30970454);

* 通讯作者, E-mail: xianqingzhou@yahoo.com.cn;

第一作者介绍 张濛, 男, 硕士研究生; 研究方向: 实验动物学; E-mail: copdog@sina.com。

收稿日期: 2009-06-22, 修回日期: 2009-12-18

rosetting(C3bRR) significantly decreased, while the ratio of immune complexes rosetting(ICRR) increased with the increase of endosulfan dosage. There was no significant difference among the 4 groups in the activity of regulating NK cells by erythrocytes. The activity of regulating T cell adhering function by erythrocytes in 61.4 mg/(kg·d) group was significantly lower compared with other three groups. The activity of erythrocyte natural adhering enhancing factor in plasma remarkably reduced in 11.6 mg/(kg·d) group and 61.4 mg/(kg·d) group compared with that of the control group. The activity of erythrocyte natural adhering inhibitory factor decreased in 0.1.4 mg/(kg·d) group, but increased in 61.4 mg/(kg·d) group. In vitro, the C3bRR of erythrocytes declined, while the ICRR ascended with the increase of endosulfan concentration. These results suggest that endosulfan inhibits the erythrocyte immune adherent function and the positive regulating function of T cells by erythrocytes, and decreases the immune-enhancing activity of erythrocyte. The results also show that the effects of endosulfan on inhibitory factor activity are complicated: it inhibits the activity of inhibitory factor at the low dosage, while improves the activity of inhibitory factor at the high dosage.

Key words: Endosulfan; Erythrocyte immune; Mouse

硫丹(endosulfan)是一种高毒有机氯农药,目前已被列为持久性有机污染物(persistent organic pollutants, POPs),但因杀虫谱广、杀虫效果好的特点,我国仍在生产、使用,而且随着其他有机氯农药的禁用,硫丹的用量还有增加的趋势[1]。

目前研究证明,硫丹能够引起人(Homo sapiens)和动物体内多种生化指标的改变:它能促进斑马鱼(Danio rerio)肝、脑组织中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性,降低乙酰胆碱脂酶(acetylcholinesterases, AChE)活性[2];抑制红鳟鱼(Oncorhynchus mykiss)离体肾上腺细胞分泌氢化可的松,降低谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)活性,引起氧化应激[3];减少人神经细胞株 SH-SY5Y和肺细胞株 A549热休克蛋白 HSP27、HSP72/73、HSP90表达量,增加肺细胞株 A549葡萄糖调解蛋白 78(glucose regulated protein, GRP78)表达量[4]。此外,硫丹对免疫系统也存在广泛的影响。它对哺乳类动物免疫应答的影响是双向性的,即在低剂量时表现出免疫增强效应[5],高剂量或长时间暴露则表现为免疫抑制作用[6]。硫丹能增强转录因子 NF-κb的活性,导致小鼠离体腹膜巨噬细胞分泌的 IL-1β、IL-6和 TNF-α等炎症因子增加[7];引起体外人 T淋巴细胞白血病细胞的凋亡[8]。但迄今未见对红细胞免疫功能影响的研究报道。

红细胞(red blood cell, RBC/erythrocyte)免疫是脊椎动物非特异性免疫系统的重要组成部分,其活性受到生物进化水平、环境因素、药物等众多因素影响[9]。RBC免疫功能对环境和药物因素的改变较为敏感,是检测机体健康状况的一个重要指标[10]。有研究表明,B-内啡肽低浓度时对人 RBC免疫功能起促进作用,高浓度时则起抑制作用[11]。微量硒能促进中华鳖(Trionyx sinensis)RBC免疫功能[12]。但关于硫丹与机体 RBC免疫功能之间的关系迄今不清楚。鉴于此,我们设立了体内、外两组实验来研究不同浓度硫丹对 ICR(institute of cancer research/CD-1)品系小鼠 RBC免疫功能的影响,以探讨硫丹与小鼠红细胞免疫之间的关系,为硫丹的红细胞免疫毒性研究提供基础数据,为硫丹的环境危险性评价和保障生态环境安全提供科学依据;同时也可为环境中生物以及人群的暴露,提供血液无创伤性生物检测的标志物,这对于环境和生物监测都有重要意义。

1 材料与方法

1.1.1 实验动物及饲养驯化 实验用清洁级雄性 ICR小鼠(4~5周龄)购自北京维通利华实验动物技术有限公司,供给源许可证号:SCXK-2002-0003。每 5只小鼠饲养于 26 cm@15 cm@15 cm的鼠笼内。温度控制在(22±2)℃,相对湿度为 40%±5%,自然光照,全天

候通风, 更换垫料 2次 /周。自由饮水和进食。实验所用饲料为北京科澳协力有限公司生产的全价颗粒饲料, 该饲料营养成分为: 粗蛋白 2016%, 脂肪 4116%, 碳水化合物 53117%, 粗纤维 4192%, 灰分 715%, 水分 9165%。在此条件下驯化适应 10 d后, 开始实验。实验所用硫丹 (纯度 96%)由江苏快达农化股份有限公司赠送, 溶剂玉米油为中粮食品营销有限公司生产。

112　实验设计　体内实验: 将体重 22～30 g的雄性 ICR小鼠 40只随机分成 4组, 每组 10只, 笼内小鼠用苦味酸进行标记。参考 Varayoud等[13]和朱心强[14]的实验, 设计 4组硫丹灌胃浓度: 0 mg/(kg# d)、014 mg/(kg# d)、116 mg/(kg# d)和 614 mg/(kg# d)。将硫丹溶解在玉米油中, 每天进行灌胃, 对照组每天灌胃玉米油, 以便给予同样的操作。其他实验条件与驯化时相同。连续灌胃 25 d后, 眼球取血, 分离血细胞和血浆, 待检测。

体外实验: 另取 9只 4～5周龄雄性 ICR健康小鼠 (体重 20～28 g), 适应环境 10 d后取小鼠尾静脉血, 待检测。

113　实验方法

11311　血液样品的处理　血液样品用枸橼酸抗凝剂抗凝。活体实验血样离心分离血浆, 将待测血浆分成两份, 一份放 58e 水浴 30 min制成灭活血浆, 另一份放室温为未灭活血浆。剩余血细胞加原样本两倍体积 Hanks液稀释后, 用小鼠淋巴细胞分离液分离 (天津灏洋生物制品科技有限公司生产), 所得淋巴细胞经 Hanks洗涤离心两次后再用含有 10% 小牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司)的 RPMI21640培养基 (美国 GIBICO公司)配成 1 @10^8 个 /ml备用, 下层 RBC用生理盐水 (normal sodium, NS)洗涤离心 3次后配成 1125 @10^7 个 /ml悬液备用。体外实验血样用 NS洗涤离心 3次, RBC计数后配成 1125 @10^7 个 /ml悬液待用。

11312　酵母菌的制备　酵母菌 (安琪公司生产食用活酵母)用 NS溶解, 高温灭活、定性滤纸过滤后分成两份, 第一份加入等量小鼠血清 (北京莱博生物实验材料研究所), 37e 水浴致敏 30 min, 离心洗涤一次为致敏酵母, 第二份加入 NS洗涤一次制成未致敏酵母, 两组计数后均配成 1 @10^8 个 /ml悬液备用。

11313　小鼠红细胞免疫粘附能力的测定　依照郭峰等的方法[15-16], 向 50 L lRBC悬液中分别加入补体致敏酵母菌、未致敏酵母菌 50 L, 37e 水浴 30 min, 加入戊二醛 25 L l固定后用 100 L lNS稀释, 取 100 L l涂片, 每个样品涂片两张, 做两个平行。甲醇固定, 结晶紫染色。结合 1个及以上酵母菌的 RBC作为一个花环, 高倍镜计数 200个 RBC, 按公式算出 C3b受体花环形成率 (ratio of C3b rosetting C3bRR)和免疫复合物花环形成率 (ratio of immune complexes rosetting ICRR)。C3bRR = (结合 1个及以上致敏酵母菌的 RBC /200) @100%; ICRR = (结合 1个及以上未致敏酵母菌的 RBC /200) @100%。

11314　小鼠红细胞促 NK细胞活性功能的测定　根据郭峰等的方法[17], Hela细胞 (首都医科大学分子生物学实验室李洋同学惠赠)经胰酶消化后, 用含有 10% 小牛血清的 RPMI21640培养基配成 1 @10^6 个 /ml悬液, 小鼠淋巴细胞用含有 10% 小牛血清的 RPMI21640培养基配成 1 @10^6 个 /ml。实验组: Hela细胞 6 L l, 单个核细胞 12 L l, RBC 3 L; 自然释放组: Hela细胞 6 L l, RBC 3 L; 最大释放组: 215% Triton 15 L l, Hela细胞 6 L l, RBC 3 L; 各组总体积均为 30 L; 不足部分用含 10% 小牛血清的 RPMI21640培养液补足。加完后置 37e 5% CO_2 培养箱孵育 18 h, 2 000 r/min离心, 吸取上清, 用双蒸水稀释 10倍后加入全自动血生化仪 (意大利生产 EOS2bravo Forte2优霸 360全自动生化分析仪), 测定乳酸脱氢酶 (LDH)活性 (U /L), LDH试剂盒购自中生北控生物科技股份有限公司。根据不同组中 LDH活性计算 NK细胞活性, 公式如下: NK活性 (%) = (实验组 LDH活性 - 自然释放组 LDH活性) /(最大释放组 LDH活性 - 自然释放组 LDH活性) @100%。

11315　小鼠红细胞促 T淋巴细胞粘附功能的

测定　依照郭峰等的方法[17], Hela细胞经胰酶消化、NS洗涤离心后配成 1@10^6 个 /ml悬液, 加等体积小鼠血清混匀, 置 37e 水浴 30 min。取出后用 NS洗涤离心两次, 为致敏 Hela细胞。经小鼠淋巴细胞分离液分离所得的单个核细胞用 NS洗涤离心配成 1@10^7 个 /ml, RBC配成 1@10^8 个 /ml。实验孔: RBC 25 Ll,致敏 Hela细胞 50 Ll;对照孔: NS 25 Ll,致敏 Hela细胞 50 Ll;37e 水浴 30 min。然后向各管中加入淋巴细胞 50 Ll混匀, 置 37e 水浴 1 h, 再放 4e 过夜。第二天取出加 0125%戊二醛 25 Ll,涂片瑞氏染色。计数 100个 Hela细胞, 粘附 1个及以上淋巴细胞为一花环。RBC对 T淋巴细胞免疫粘附功能促进率 = (实验组花环率 - 对照组花环率) /对照组花环率 @100%。

11316　小鼠血浆中细胞天然免疫促进因子和抑制因子活性的测定　参照郭峰等的方法[18219], 分别将灭活血浆、未灭活血浆和 NS各 75 Ll与 RBC悬液 50 Ll混合后, 再加入补体致敏酵母菌悬液 50 Ll混匀, 37e 水浴 30 min后取出, 加入 NS 125 Ll,戊二醛 50 Ll混匀, 每管取 100 Ll水平涂片、风干、甲醛固定、瑞氏染色。光学显微镜下计数 200个 RBC, 结合 1个及以上酵母菌的 RBC作为一个花环。按公式计算促进率和抑制率, 以 C3b受体花环促进率代表促进因子活性、以 C3b受体花环抑制率代表抑制因子活性: RBC C3b受体花环促进率 = (灭活血浆组花环率 - NS组花环率) /NS组花环率 @100%; RBC C3b受体花环抑制率 = (灭活血浆组花环率 - 室温血浆花环率) /灭活血浆组花环率 @100%。

11317　离体红细胞免疫粘附能力的测定　参考 Ayub等[20]和 Skandrani等[4]的实验, 确定 4组硫丹浓度梯度: 5 Lg/ml, 10 Lg/ml, 20 Lg/ml, 40 Lg/ml。设置 NS、溶剂丙酮 2个对照组。依照郭峰的方法[15-16], 向 RBC 50 Ll中分别加入 NS、丙酮及 4组不同浓度硫丹, 37e 水浴 2 h。分别加入致敏、未致敏酵母菌, 37e 水浴 30 min, 以检测 C3b花环率和 IC花环率。加入戊二醛 25 Ll固定后用 100 Ll NS稀释, 取 100 Ll涂片, 每个样品涂片 2张, 做 2个平行。甲醇固定, 结晶紫染色。结合 1个及以上酵母菌的 RBC作为一个花环, 高倍镜计数 200个 RBC, 按以下公式计算 C3b花环率 (C3bRR)和 IC花环率 (ICRR), C3bRR = (结合 1个及以上致敏酵母菌的 RBC/200) @100%; ICRR = (结合 1个及以上未致敏酵母菌的 RBC/200) @100%。

114　统计学分析　实验数据经 SPSS 1210软件分析, 体内实验: 组间比较采用单因素方差分析 (ONE WAY ANOVA), 组间差异采用 LSD (Least Significant Difference Procedure)多重比较分析; 体外实验: NS组与丙酮组之间采用配对 t2检验 (Paired2samples t2test), 丙酮组与各硫丹组之间采用随机区组设计的方差分析 (TWO WAY CLASSIFICATION ANOVA/Univariate), 组间差异采用 LSD多重比较分析。差异显著性均以 $P < 0105$ 为标准, 所有结果均以平均值 ?标准误来表示。

2　结　果

211　小鼠红细胞免疫粘附能力的变化　单因素方差分析结果显示, 硫丹能使 C3bRR降低 ($F = 431478$, $P < 0101$)。LSD多重比较表明, 硫丹 014 mg/(kg# d)组 C3bRR较 0 mg/(kg# d)组显著下降, 硫丹 116 mg/(kg# d)组、614 mg/(kg# d)组较 0 mg/(kg# d)组和 014 mg/(kg# d)组 C3bRR显著下降。硫丹能使 ICRR显著升高 ($F = 801839$, $P < 0101$), 硫丹 014 mg/(kg# d)组 ICRR与 0 mg/(kg# d)组间没有明显差异, 硫丹 116 mg/(kg# d)组、614 mg/(kg# d)组 ICRR较 0 mg/(kg# d)组和 014 mg/(kg# d)组明显上升, 硫丹 614 mg/(kg# d)组 ICRR较其他 3组明显上升 (图 1)。

212　红细胞对 NK细胞活性调节作用的变化　硫丹没有引起小鼠 RBC对 NK细胞活性调节作用的明显变化 ($F = 01249$, $P > 0105$)。3个实验组与对照组之间 RBC对 NK细胞活性的调节作用没有明显差异 (图 2)。

213　红细胞对 T淋巴细胞免疫粘附调节作用的变化　硫丹明显抑制了小鼠 RBC对其 T淋

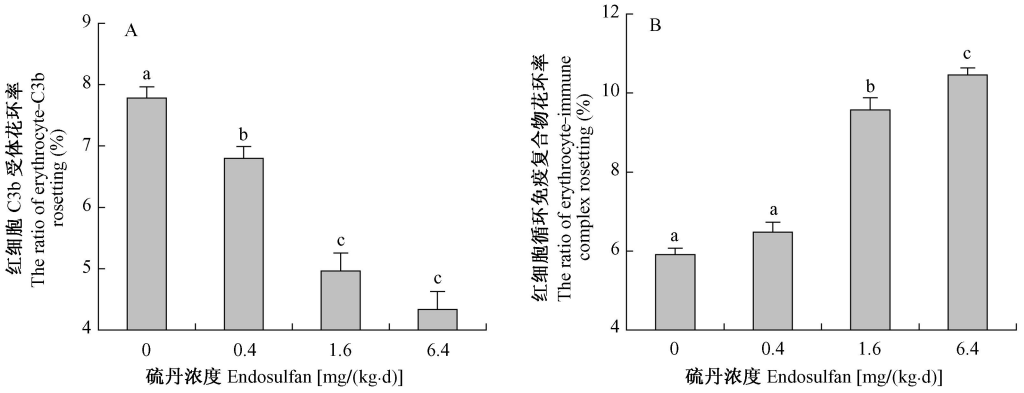

图 1　硫丹对小鼠红细胞 C3b受体花环率(A)和循环免疫复合物花环率(B)的影响(Mean? SE)

Fig 1　The effect of endosulfan on the ratio of C3b rosetting(A) and immune complexes rosetting(B) in vivo

不含有相同字母的各浓度组间有显著差异(P < 0105, LSD多重比较)。

Columns with different letters were significantly different among groups as revealed by LSD (Least Significant Difference Procedure) (P < 0105).

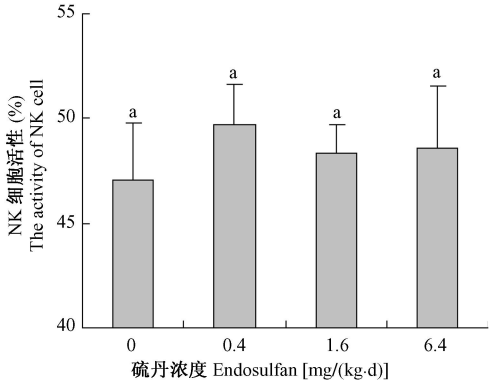

图 2　硫丹对小鼠红细胞调节 NK细胞活性的影响(Mean? SE)

Fig 2　The effect of endosulfan on the NK cell activity regulation by erythrocyte in mice

不含有相同字母的各浓度组间有显著差异(P < 0105, LSD多重比较)。

Columns with different letters were significantly different among groups as revealed by LSD (Least Significant Difference Procedure) (P < 0105).

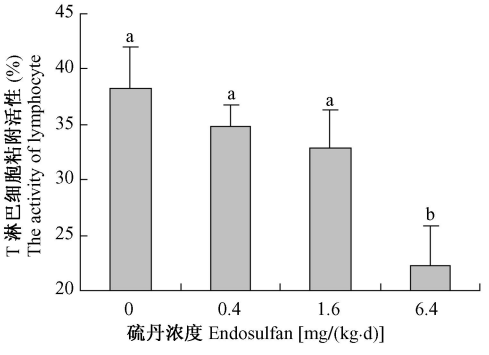

图 3　硫丹对小鼠红细胞促 T淋巴细胞免疫粘附功能的影响(Mean? SE)

Fig 3　The effect of endosulfan on the T lymphocyte activity regulation by erythrocyte in mice

不含有相同字母的各浓度组间有显著差异(P < 0105, LSD多重比较)。

Columns with different letters were significantly different among groups as revealed by LSD (Least Significant Difference Procedure) (P < 0105).

巴细胞免疫粘附的调节作用($F = 41295$, $P < 0105$)。硫丹 0 mg/(kg# d)组、014 mg/(kg# d)组和 116 mg/(kg# d)组间 RBC对 T淋巴细胞免疫粘附调节作用没有差异,而硫丹 614 mg/(kg# d)组与其他 3组相比,其 RBC对淋巴细胞免疫粘附调节作用显著下降(图 3)。

214　血浆中红细胞天然免疫粘附促进因子和抑制因子活性的变化　硫丹使小鼠红细胞天然免疫粘附促进因子的活性明显降低($F = 31079$, $P < 0105$),促进因子的活性随着硫丹剂量的增加逐渐降低,硫丹 116 mg/(kg# d)组和 614 mg/(kg# d)组较 0 mg/(kg# d)组促进因子的活性明显下降,其他各组间没有显著差异

(图 4)。硫丹对红细胞天然免疫粘附抑制因子活性有显著影响 (F = 71961, P < 0101), 硫丹 014 mg/(kg# d)组抑制因子活性与 0 mg/(kg# d)组相比明显降低 (P < 0105), 而在硫丹 614 mg/(kg# d)组其活性却升高, 明显高于 0 mg/(kg# d)组和 014 mg/(kg# d)组 (P < 0105), 硫丹 116 mg/(kg# d)组与 0 mg/(kg# d)组间硫丹对抑制因子活性没有差异, 但高于硫丹 014 mg/(kg# d)组 (图 4)。

215　硫丹对小鼠离体红细胞免疫粘附功能的影响　溶剂丙酮组 C3bRR、ICRR 与空白组相比均没有明显差异 (其 t值和P值依次为: t=

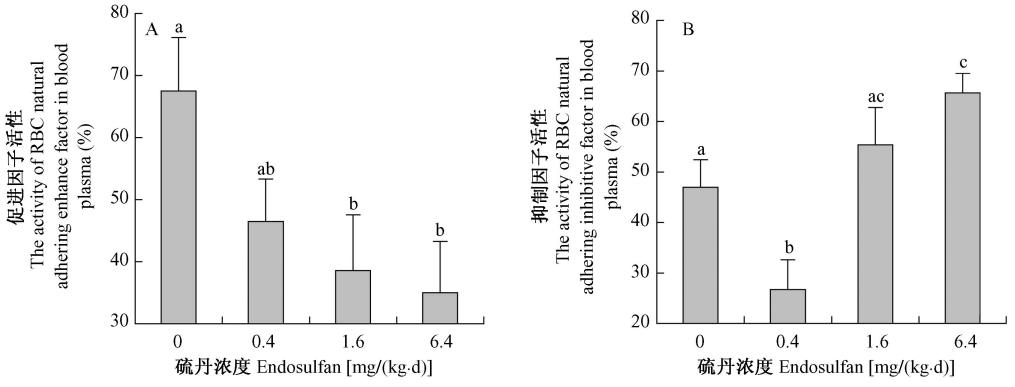

图 4　硫丹对小鼠红细胞天然免疫促进因子 (A)和抑制因子活性 (B)的影响 (Mean? SE)

Fig 4　The effect of endosulfan on the activity of erythrocyte natural adhering enhance factor(A) and inhibitory factor(B) in mice

不含有相同字母的各浓度组间有显著差异 (P < 0105, LSD多重比较)。

Columns with different letters were significantly different among groups as revealed by LSD (Least Significant Difference Procedure) (P < 0105).

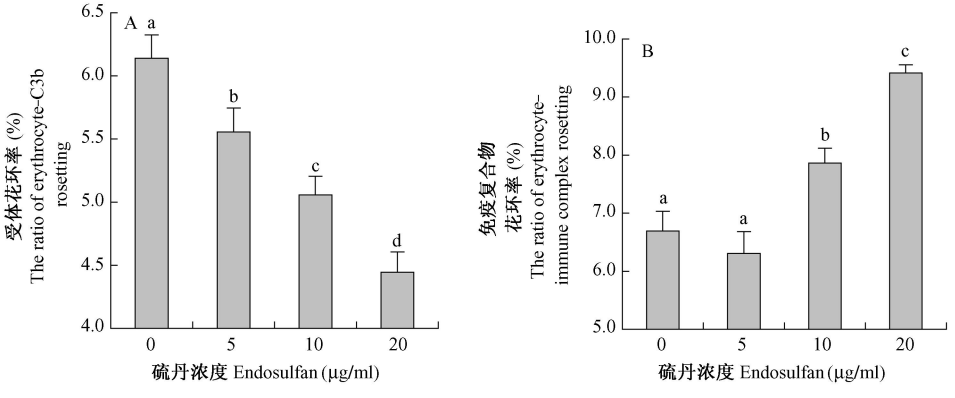

图 5　硫丹对小鼠离体红细胞 C3b受体花环率 (A)和循环免疫复合物花环率 (B)的影响 (Mean? SE)

Fig 5　The effect of endosulfan on the ratio of C3b rosetting(A) and immune complexes rosetting(B) in vitro

不含有相同字母的各浓度组间有显著差异 (P < 0105, LSD多重比较)。

Columns with different letters were significantly different among groups as revealed by LSD (Least Significant Difference Procedure) (P < 0105).

- 21061, P > 0105; t= 11155, P > 0105), 这说明溶剂丙酮在该浓度下对 C3bRR 和 ICRR 实验结果没有明显影响。随机区组设计的方差分析表明, 硫丹使小鼠离体红细胞 C3bRR 明显降低 (F = 311544, P < 0101), 多重比较表明, 硫丹 5 Lg/ml组 C3bRR 明显低于溶剂丙酮组, 硫丹 10

Lg/ml组 C3bRR明显低于溶剂丙酮组和 5 Lg/ml组,硫丹 20 Lg/ml组 C3bRR明显低于其他3组;硫丹使小鼠离体红细胞 ICRR明显上升(F = 451428, P < 0101),多重比较表明,硫丹 5 Lg/ml组 ICRR与溶剂丙酮组间没有显著差异,硫丹 10 Lg/ml组和 20 Lg/ml组 ICRR明显高于溶剂丙酮组和 5 Lg/ml组,而硫丹 20 Lg/ml组 ICRR又较 10 Lg/ml组显著升高(图 5)。40 Lg/ml组 RBC大量减少,无法计数其 C3bRR和 ICRR。

3 讨 论

311 硫丹对小鼠红细胞免疫粘附功能的影响

RBC免疫功能的发挥主要依赖其细胞膜上Ñ型补体受体(complement receptor I, CR1/CD35)。CR1是一种单链膜糖蛋白,配体有 C3b、C4b、iC3b、iC4b,其中以 C3b的亲和力最强[21]。CR1经 C3b与 IC结合,并作为因子 I的协同因子在细胞膜 DAF和血清中 H因子共同参与下使 C3b降解为 iC3b。C3b水解为 iC3b后导致 IC与 CR1亲和力降低至少 1 000倍,而肝脾吞噬细胞上有对 iC3b、C3dg高亲和力的受体,IC通过 C3b的降解从 RBC上解离,再通过降解产物 iC3b连接到肝脾吞噬细胞,从而达到清除 IC的目的[22]。本研究表明,硫丹能使小鼠红细胞 C3bRR减少而 ICRR增多。这可能是由于 CR1受体被 C3b大量占据,被占据的受体不能再与致敏酵母中的 C3b结合,导致了 C3bRR的下降;而 CR1上结合的 C3b却能直接粘附未致敏酵母,从而导致 ICRR上升,使 RBC不能有效发挥清除 IC的功能,RBC免疫功能出现继发性降低。

硫丹还能抑制细胞膜上的 Na^+/K^+ 2ATP酶和 Ca^{2+}/Mg^{2+} 2ATP酶的作用,使细胞内 Ca^{2+} 离子浓度发生改变,从而诱导细胞凋亡[1]。RBC双凹圆盘状结构有赖于胞膜内外 Na^+ 浓度差异来维持,其对细胞内外 Na^+ 离子浓度的改变比较敏感,Na^+/K^+ 2ATP酶受到抑制后,细胞内 Na^+ 离子浓度升高可使 RBC水肿甚至破裂。本研究表明,体外培养时 40 Lg/ml组 RBC大量减少。这可能与细胞膜上 Na^+/K^+ 2ATP酶被抑制,RBC水肿、破裂有关。另外,RBC膜上 CR1的分布有两种形式,即散在分布和集簇分布,而成簇分布的 CR1活性比单独受体活性要强[23],RBC水肿后膜结构发生改变可能引起膜上受体的分布改变,使成簇分布的 CR1变成散在分布,从而也可能导致 RBC免疫粘附功能的下降。

312 硫丹对小鼠红细胞调节其他免疫细胞功能的影响

RBC不仅本身具有多种非特异性免疫功能,还参与其他免疫细胞功能的调节。RBC能增强 NK细胞的细胞毒效应,该过程发生在 NK细胞与靶细胞结合后、溶解靶细胞前的短暂时间内,并且依赖 Ca^{2+} 的存在[24]。RBC胞质中存在一种 NK细胞增强因子(natural killer cell enhancing factor, NKEF),是一种小分子二聚体蛋白,能显著增强 NK细胞毒效应,在抗肿瘤、感染及保护机体重要蛋白、DNA等分子免遭氧化剂损伤中起重要作用[25]。但是何原因导致 RBC释放 NKEF或者使 NKEF在 RBC膜表面表达增加,而增强 NK细胞毒性,目前尚不清楚。本实验结果显示,硫丹并不影响 RBC对 NK细胞毒性的调节作用。

Arosa等[26]报道,RBC是 T淋巴细胞的活性调节器,它可促进人外周血 T细胞的存活并能抑制其激活介导的细胞死亡和氧化应激。RBC对 T淋巴细胞免疫粘附肿瘤细胞能力的调节主要通过 RBC膜上广泛分布的淋巴细胞功能相关抗原23(lymphocyte function associated antigen23, LAF23/CD58)与 T细胞上的 CD2分子相互作用,促进淋巴细胞免疫粘附补体调理过的肿瘤细胞形成花环。LAK23和 CD2之间的相互作用是 E玫瑰花环形成和淋巴细胞活化的主要途径[25]。本实验结果显示,高剂量硫丹能明显降低小鼠 RBC对 T淋巴细胞免疫粘附癌细胞的花环率,这说明硫丹能抑制小鼠 RBC对其 T淋巴细胞免疫粘附的调节作用。

313 硫丹对小鼠血清中红细胞免疫粘附促进因子和抑制因子的影响

RBC免疫粘附作用的强弱不仅与 RBC补体受体数目及活性有关,

还与血浆中存在的 RBC免疫粘附调节物质有关。血浆中存在的 RBC免疫粘附促进因子, 是一种耐热因子, 58e 30 min条件下, 不能使其失活[18]。本研究表明, 硫丹能够明显抑制血浆促进因子的活性, 并且有剂量依存关系, 即随硫丹浓度增大, 血浆促进因子活性逐渐降低。血浆中还存在一种不耐热的糖蛋白, 具有 RBC免疫粘附抑制作用, 58e 水浴 30 min可使其失活[19]。本研究结果显示, 硫丹在低剂量条件下能够使血浆中抑制因子活性降低, 而在高剂量时却促进抑制因子活性。硫丹低剂量时, 抑制因子活性的降低可能是机体对促进因子、RBC免疫功能降低作出的一种代偿反应, 以抑制因子活性的降低来拮抗促进因子、RBC免疫功能的降低。而随着硫丹剂量的增加, 机体由代偿逐渐向失代偿发展, 血浆中促进因子活性不断下降, 抑制因子活性逐渐上升, 导致机体 RBC免疫功能大幅度降低。

综上所述, 硫丹能抑制小鼠红细胞免疫粘附能力和红细胞对 T淋巴细胞免疫粘附的正向调节功能, 降低血浆中红细胞免疫粘附增强因子活性, 而对抑制因子活性影响比较复杂, 低剂量时起抑制作用, 而高剂量时能促进其活性。

参　考　文　献

[1] 任南琪, 张晓丹, 周广红, 等. 硫丹致生精细胞凋亡及其机制研究. 环境科学, 2008, 29(2): 386- 390.

[2] 胡国成, 甘炼, 吴天送, 等. 硫丹对斑马鱼的毒性效应. 动物学杂志, 2008, 43(4): 1- 6.

[3] Dorval J, Leblond V S, Hontela A. Oxidative stress and loss of cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) exposed in vitro to endosulfan, an organochlorine pesticide. Aquatic Toxicology, 2003, 63: 229- 241.

[4] Skandrani D, Gaubin Y, Beau B, et al. Effect of selected insecticides on growth rate and stress protein expression in cultured human A549 and SH2SY5Y cells. Toxicology in Vitro, 2006, 20: 1378- 1386.

[5] Wade M, Foster W, Younglai E, et al. Effects of subchronic exposure to a complex mixture of persistent contaminants in male rats: systemic, immune, and reproductive effects. Toxicological Sciences, 2002, 67: 131- 143.

[6] Abadin H, Chou C, Llados F. Health effects classification and its role in the derivation of minimal risk levels: immunological effects. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2007, 47: 249- 256.

[7] Han E H, Hwang Y P, Kim H G, et al. Inflammatory effect of endosulfan via NF2JB activation in macrophages. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 355: 860- 865.

[8] Kannan K, Holcombe R F, Jain S K, et al. Evidence for the induction of apoptosis by endosulfan in a human T2cell leukemic line. Mol Cell Biochem, 2000, 205(1/2): 53- 66.

[9] 苏金旋. 红细胞的免疫功能及影响因素. 齐齐哈尔医学院学报, 2005, 26(11): 1319- 1320.

[10] 郭峰. 红细胞免疫的研究和意义. 自然杂志, 2002, 24(5): 268- 273.

[11] 孙志扬, 过宗南, 赵孟尧, 等. B2内啡肽对正常人红细胞免疫功能的调控实验研究. 上海免疫学杂志, 1994, 14(4): 199- 200.

[12] 刘至治, 蔡完其, 季高华, 等. 几种免疫增强剂对中华鳖红细胞数量及免疫功能的影响. 上海水产大学学报, 2006, 15(1): 1- 6.

[13] Varayoud J, Monje L, Bernhardt T, et al. Endosulfan modulates estrogen2dependent genes like a non2uterotrophic dose of 17B2estradiol. Reproductive Toxicology, 2008, 26: 138- 145.

[14] 朱心强. 硫丹的体内雌激素样作用研究. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2001.

[15] 郭峰, 虞紫茜, 赵中平. 红细胞免疫功能的初步研究. 中华医学杂志, 1982, 62(12): 715- 716.

[16] 郭峰. 红细胞免疫及其调节功能测定方法. 免疫学杂志, 1990, 6(1): 60- 65.

[17] 郭峰, 钱宝华, 张乐之. 现代红细胞免疫学. 上海: 第二军医大学出版社, 2002.

[18] 郭峰, 姚广金, 孟祥英, 等. 血清中红细胞免疫粘附促进因子的测定. 上海免疫学杂志, 1988, 8(6): 440- 441.

[19] 郭峰, 张延东. 血清对红细胞免疫粘附抑制作用的测定. 上海免疫学杂志, 1987, 7(3): 133- 135.

[20] Ayub S, Verma J, Das N. Effect of endosulfan and malath2on on lipid peroxidation, nitrite and TNF2a release by rat peritoneal macrophages. International Immunopharmacol2gy, 2003, 3: 1819- 1828.

[21] Fearon D. Identification of the membrane glycoprotein that is the C3b receptor of the human erythrocyte, polymorphonuclear leukocyte, B lymphocyte, and monocyte. The Journal of Experimental Medicine, 1980, 152(1): 20- 30.

[22] Kalli K, Ahearn J, Fearon D. Interaction of iC3b with

recombinant isotypic and chimeric forms of CR21 Journal of Immunology, 1991, 147: 590- 594

[23] Ng Y, Schifferli J, Walport M. Immune complexes and erythrocyte CR1 (complement receptor type 1): effect of CR1 numbers on binding and release reactions Clinical and Experimental Immunology, 1988, 71(3): 481- 485

[24] 曹广文, 杜平. 红细胞对淋巴细胞和细胞素的某些调节作用与机理. 国际免疫学杂志, 1990, (6): 300- 303.

[25] 王海滨. 红细胞产生的 NK细胞增强因子及其生物学作用. 国外医学肿瘤学分册, 1999, 26(3): 141- 144

[26] Arosa F A, Pereiva C F, Fonseca A M. Red blood cells as modulators of T cell growth and survival. Curr Phann Des, 2004, 10(2): 191- 201

江苏省发现长尾鸭

长尾鸭 (Clangula hyemalis)属于雁形目鸭科海鸭亚科 (Merginae)。分布于北半球的广大区域, 繁殖地位于北极、阿拉斯加、加拿大北部、欧亚大陆北部地区, 主要生境是苔原地带的池沼, 也见于海边和山区的湖泊, 在水边的陆地营巢。沿北美的东西海岸、欧亚大陆北部的海岸迁徙和越冬。在东亚地区的迁徙路线上种群数量稀少, 我国沿海关于其迁徙和越冬的报道较少, 在辽宁、河北、福建等地有分布记录。

2009年 2月 28日, 在江苏省连云港市前三岛的车牛山岛附近海域 (35b04cN, 119b21cE), 乘船进行鸟类考察时发现长尾鸭 2只, 并拍摄了照片 (图 1)。所拍摄的个体体背及翅褐色; 头顶黑色, 颈侧具有黑斑, 其余白色; 腹白色, 前胸与颈部相连处环绕黑斑。根据5中国鸟类野外手册6等相关资料描述, 判断为雌性非繁殖羽。

长尾鸭距离车牛山岛的一个小岛约 40~ 50 m处海面上游荡, 船靠近后惊飞。根据发现的时间和羽毛的特征, 初步判断长尾鸭为连云港附近海域的冬候鸟, 为江苏省鸟类新纪录种。

图 1 长尾鸭 (Clangula hyemalis)

鲁长虎[1] 雷 铭[2] 章 麟[2] 韩永祥[2] 袁 屏[2]

([1] 南京林业大学 南京 210037; [2] 江苏野鸟会 南京 210018)

基金项目 江苏省环保厅/鸟类物种资源调查专项0资助。