



哺乳期和生长期缺锌对大鼠免疫器官及细胞因子分泌的影响

胡艳丹¹ 卢豪¹ 李静² 卢士军² 庞伟² 杨红澎² 蒋与刚² 黄承钰¹

(1 四川大学华西公共卫生学院, 成都 610041; 2 军事医学科学院卫生学环境医学研究所, 天津 300050)

摘要:目的 观察哺乳期和生长期缺锌对大鼠免疫器官及细胞因子分泌的影响, 为探讨缺锌致机体免疫功能损伤的机制提供科学资料。方法 将 Wistar 孕鼠产仔后随机分为足锌组 (ZA)、对喂组 (PF) 和缺锌组 (ZD), 每组 10 只动物。ZA 组和 PF 组喂饲足锌饲料 (30mg/kg), ZD 组喂饲缺锌饲料 (1.0mg/kg)。23d 断乳, 各组仔鼠分别继续喂饲原饲料, 至两个月后处死。观察各组动物外观、毛发、体重和摄食量的变化; 称取胸腺、脾脏的重量并计算脏器指数; 原子吸收分光光度法检测血清、海马锌含量; 连续监测法测定血清碱性磷酸酶 (ALP) 活性; ELISA 法测定血清 IL-2 和 TNF- α 水平。结果 (1) 与 ZA 组、PF 组比较, ZD 组大鼠血清锌、海马锌含量, 血清 ALP 活性, 胸腺、脾脏重量及脏器指数均显著降低 ($P < 0.05$)。 (2) 与 ZA 组、PF 组比较, ZD 组大鼠血清 IL-2 水平明显降低; 而血清 TNF- α 水平明显升高。结论 哺乳期和生长期缺锌可明显损伤大鼠免疫器官并影响其细胞因子的分泌。

关键词: 锌缺乏; 胸腺; 脾脏; IL-2; TNF- α

锌是机体必需的一种微量元素, 可影响 RNA 聚合酶、DNA 聚合酶、碳酸酐酶等多种酶的合成及生物学活性, 进而影响机体免疫功能。研究表明缺锌可影响 T 细胞的增殖分化, 导致脾脏、胸腺萎缩, 自然杀伤细胞和胸腺激素活性降低, 并影响多种细胞因子分泌^[1]。但有关哺乳期缺锌与免疫系统关系的研究鲜见报道。本研究通过建立哺乳期和生长期缺锌大鼠模型, 观察锌缺乏对免疫器官和细胞因子分泌的影响, 为进一步阐明缺锌影响免疫系统的机制及临床上婴幼儿期、青少年期合理补锌提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 动物分组与饲养

成年 Wistar 大鼠雌性 10 只, 体重 210 ± 10 g; 雄性 5 只, 体重 270 ± 10 g。由军事医学科学院实验动物中心提供。普通饲料适应性喂养 7 天后, 雌雄 (2:1) 合笼, 合笼喂养 1 周内, 检查阴栓, 将孕鼠单笼喂养。待产仔后随机分为足锌组 (ZA)、对喂组 (PF) 和缺锌组 (ZD), 其中 ZA 组和 PF 组喂饲足锌饲料 (30mg/kg), ZD 组喂饲缺锌饲料 (1.0mg/kg), 以当日 ZD 组摄食量作为次日 PF 组的给料量。缺锌饲料的配制参照蒋与刚等^[2]的报道;

足锌饲料锌含量参照 AIN-93G 配方, 系在缺锌饲料基础上添加 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (128mg/kg)。仔鼠由母鼠授乳至 23d 断奶分笼, 每组留 10 只, 雌雄各半, 继续分别饲以足锌 (ZA 组和 PF 组) 和缺锌 (ZD 组) 饲料。动物自由饮用去离子水, 每日定时记录进食量, 每三天称重, 动物房温度控制在 $21 \pm 1^\circ C$, 光-暗周期 12h:12h。仔鼠饲养至两个月心脏取血处死。实验期间为防止锌污染, 所有笼具、饮水瓶、饲料罐等均经 0.5% EDTANa2 溶液浸泡处理。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 血清、海马锌含量

取 0.2ml 血清样品直接稀释, 用 HITACHI 公司 Z-8000 型原子吸收光谱仪测定锌含量; 取单侧海马组织称重, 约 30.0mg, 以混合酸 (硝酸:高氯酸 = 1:4) 20ml 湿化消化, 用原子吸收光谱仪测定锌含量。

1.2.2 血清碱性磷酸酶 (ALP) 活性

采用连续监测法, 按 ALP 检测试剂盒 (中生北控) 说明书要求进行测定。

1.2.3 免疫器官重量及脏器指数

动物处死后取胸腺、脾脏, 称重并计算脏器指数 (胸腺或脾脏重量/体重)。

1.2.4 检测血清中 IL-2、TNF- α 水平

采用 ELISA 法检测血清中 IL-2、TNF- α 水平,

试剂盒分别购自 R&D 公司（美国）和 Adlitteram Diagnostic Laboratories（美国），操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.3 统计分析

采用 SPSS16.0 统计软件处理数据，结果以均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间比较采用单因素方差分析， $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 缺锌对大鼠一般状况的影响

实验期间，从哺乳后期开始，ZD 组仔鼠毛发逐

渐失去光泽，活动减少，断乳后上述症状日趋明显，精神差，易激惹；毛发微黄稀疏，易脱落；60% 发生结膜炎；部分出现腹泻症状。ZA 组和 PF 组大鼠活泼，毛发乳白，有光泽。

ZD 组仔鼠断乳后摄食量一直维持在低水平 ($< 4 \text{ g/d}$)，而 ZA 组仔鼠随着实验时间的延长摄食量明显增加，到断乳后第 39 天已达到 9 g/d 以上。与 ZA 组、PF 组相比，ZD 组大鼠体重增长极其缓慢，从断乳开始就已经落后于 ZA 组和 PF 组，断乳后第 37 天甚至出现体重下降趋势。PF 组大鼠因食量受限，体重增长量低于 ZA 组（图 1，图 2）。

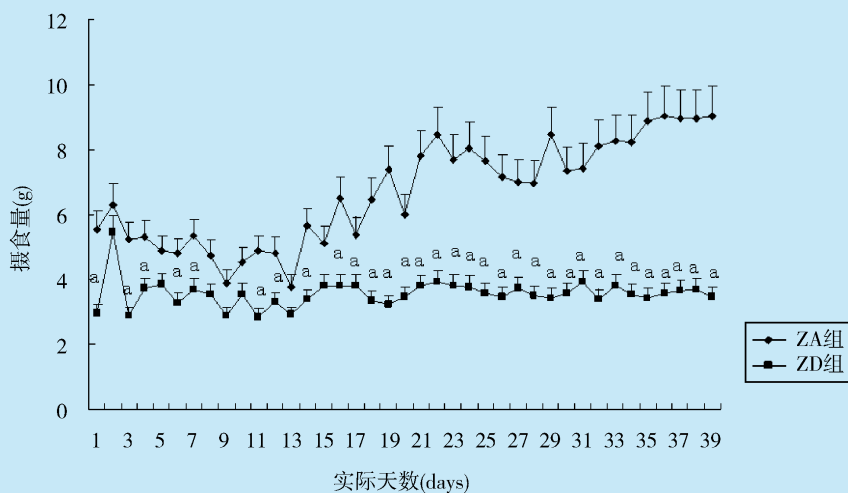


图 1 缺锌对大鼠摄食量的影响
(a 与 ZA 组比较, $P < 0.05$)

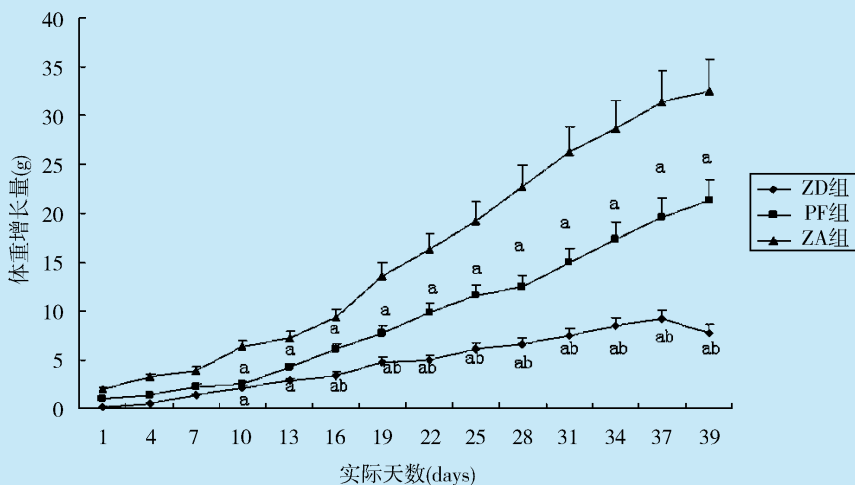


图 2 缺锌对大鼠体重的影响
(a 与 ZA 组比较, $P < 0.05$; b 与 PF 组比较, $P < 0.05$)



2.2 缺锌对大鼠血清、海马锌及血清 ALP 活性的影响

ZD 组大鼠血清、海马锌含量及血清 ALP 活性

显著低于 ZA 组和 PF 组。与 ZA 组比较, PF 组血清锌及海马锌含量显著降低;血清 ALP 活性有下降趋势,但两组间差异并无统计学意义(表 1)。

表 1 缺锌对大鼠血清、海马锌及血清 ALP 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	血清锌 (mg/L)	海马锌 ($\mu\text{g/g}$)	血清 ALP 活性 (U/L)
ZA	0.49 \pm 0.020	14.68 \pm 1.79	89.14 \pm 13.30
PF	0.43 \pm 0.042 ^a	12.19 \pm 1.04 ^a	83.17 \pm 10.09
ZD	0.20 \pm 0.040 ^{ab}	9.86 \pm 2.20 ^{ab}	49.05 \pm 7.92 ^{ab}

注: ^a 与 ZA 组比较, $P < 0.05$; ^b 与 PF 组比较, $P < 0.05$

2.3 缺锌对大鼠胸腺、脾脏的影响

实验结果显示, ZD 组大鼠胸腺、脾脏的重量及脏器指数较 ZA 组和 PF 组明显下降。PF 组胸腺、脾

脏的重量明显低于 ZA 组,但 PF 组胸腺、脾脏脏器指数与 ZA 组相比,差异无统计学意义。表明缺锌可导致大鼠免疫器官的萎缩(表 2)。

表 2 缺锌对大鼠免疫器官的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	胸腺重量 (mg)	脾脏重量 (mg)	胸腺指数 (mg/g)	脾脏指数 (mg/g)
ZA	86.47 \pm 27.27	129.10 \pm 28.13	1.33 \pm 0.30	2.00 \pm 0.22
PF	60.70 \pm 16.58 ^a	89.55 \pm 11.13 ^a	1.32 \pm 0.30	1.96 \pm 0.13
ZD	11.42 \pm 7.03 ^{ab}	42.70 \pm 15.38 ^{ab}	0.34 \pm 0.19 ^{ab}	1.28 \pm 0.31 ^{ab}

注: ^a 与 ZA 组比较, $P < 0.05$; ^b 与 PF 组比较, $P < 0.05$

2.4 缺锌对血清 IL-2、TNF- α 水平的影响

与 ZA 组和 PF 组比较, ZD 组大鼠血清 IL-2 水平明显降低;而血清 TNF- α 水平显著升高。同时,与 ZA 组比较, PF 组大鼠血清 IL-2 水平明显降低;而血清 TNF- α 水平显著升高。提示缺锌可引起大鼠血清 IL-2、TNF- α 分泌异常(表 3)。

表 3 缺锌对大鼠血清 IL-2、TNF- α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	IL-2 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
ZA	550.63 \pm 53.69	44.1718.07
PF	392.97 \pm 44.50 ^a	98.33 \pm 21.31 ^a
ZD	183.66 \pm 50.72 ^{ab}	206.67 \pm 39.17 ^{ab}

注: ^a 与 ZA 组比较, $P < 0.05$; ^b 与 PF 组比较, $P < 0.05$

3 讨论

本实验观察到,与 ZA 组和 PF 组比较, ZD 组大鼠摄食量明显减少,体重明显下降,血清锌、海马锌含量及血清 ALP 活性均显著降低。ALP 是典型

的锌依赖酶,其活性与血清锌浓度密切相关,是反映机体锌状况的敏感指标^[3]。并且实验期间 ZD 组大鼠精神萎靡,活动减少,易激惹;毛发微黄稀疏及逐渐出现明显的脱毛、腹泻、结膜炎等典型的缺锌症状。上述结果表明,哺乳期及生长期锌缺乏大鼠模型已成功建立。

胸腺是 T 淋巴细胞发育成熟场所,为中枢免疫器官,可分泌数十种胸腺素,刺激 T 细发育,促进细胞因子 IL-1、IL-2 等的分泌,对免疫功能的调节具有重要的作用。脾脏是 T、B 淋巴细胞进行免疫应答场所,为外周免疫器官。马秀玲等^[4]发现缺锌大鼠胸腺、脾脏重量明显减轻,胸腺指数明显降低,而脾脏指数没有显著改变。与马秀玲结果比较,本研究发现缺锌大鼠脾脏指数也明显降低,可能与干预时期及实验周期有关。

IL-2 属于 Th1 型细胞因子,主要由激活 CD4⁺ 的 T 细胞产生,参与介导细胞免疫反应,可促进 T 细胞增殖、分化及诱导 IFN- γ 等其它细胞因子和抗体的产生。TNF- α 是一种促炎性细胞因子,主要由巨噬细胞产生,是机体受到致病因素作用后,产生最早和最重要的细胞因子,为炎症反应的启动因子。

目前认为, IL-2、TNF- α 的表达都是由 NF- κ B 的激活所介导, 同时 TNF- α 又可作为一种刺激, 活化 NF- κ B^[5]。Henning^[6]用低锌的 FBS (胎牛血清) 培养基培养内皮细胞后, 检测到内皮细胞中 TNF- α 增加。Zoli 等^[7]发现克罗恩病、风湿性关节炎和酒精中毒病人血清锌水平降低但 TNF- α 活性增加。Bin 等^[8]用不同锌浓度培养基培养 HUT-78 (Th0)、D1.1 (Th1) 和 HL-60 细胞 (单核巨噬细胞株), 经 PMA/PHA 刺激后发现缺锌降低了 HUT-78 细胞和 D1.1 细胞 IL-2、IFN- γ 活性及 mRNA 水平, 然而却增加了 HL-60 细胞 TNF- α 、IL-1、IL-8 活性和 mRNA 水平。因此他们认为锌影响细胞因子的表达是细胞株特异性的。然而, 不久后他们用不同锌浓度的培养基培养 HUT-78 (Th0) 细胞, 发现与 15 μ M 含锌组比较, 锌浓度为 1、50、100 μ M 组 IL-2、TNF- α 活性和 mRNA 水平及 NF- κ B 活性均降低^[9]。Koropatnick^[10]也发现补锌可升高 TNF- α 的水平。目前有关锌与 TNF- α 的研究资料有限, 对于他们两者之间的关系仍存在争论。

本研究在成功建立哺乳期及生长期缺锌大鼠模型的基础上, 发现锌缺乏可致 IL-2 和 TNF- α 的分泌出现反向的变化, 即 IL-2 水平的降低但可增加 TNF- α 的活性。最新研究发现, 锌在细胞免疫、抗炎反应及抗氧化损伤中均发挥着重要作用。锌可活化 A20 (一种锌指蛋白), A20 通过 TNF- α 诱导的 TNF 信号通路抑制 NF- κ B 活性, 从而导致促炎性细胞因子和氧化应激标志物基因表达降低^[11]。由此可见, 锌对 TNF- α 活性的影响可能与 NF- κ B 通路相关。

综上所述, 本实验结果表明锌是维持机体免疫器官正常形态和功能及细胞因子活性必需的微量营养素。该结果对后续探讨缺锌影响细胞因子水平的机制有指导意义, 但锌调控细胞因子分泌的详细机制尚需进一步研究。

参考文献

[1] Falchuk KH. The molecular basis for the role of zinc in developmental biology. *Mol Cell Biochem*,

1998, 188 (1-2): 41-48.

[2] 蒋与刚, 程义勇, 王冬兰, 等. 缺锌和补锌对运动大鼠锌营养状况的影响. *营养学报*, 1995, 17 (4): 368-373.

[3] 贺文萍, 张立走, 贾丽虹, 刘兴旺. 儿童锌缺乏敏感指标的评价. *中华儿童保健志*, 1997, 5 (2): 82-84.

[4] 马秀玲, 耿战辉, 李树田, 等. 应激对缺锌大鼠免疫功能的影响. *中国公共卫生*, 2003, 19 (1): 7-9.

[5] Ananda S. Prasad. Zinc: mechanisms of host defense. *J. Nutr*, 2007, 137 (5): 1345-1349.

[6] Henning B, Meerarani P, McClain CJ. Antioxidant-like properties of zinc in activated endothelial cells. *J Am Coll Nutr*, 1999, 18 (2): 152-158.

[7] Zoli A, Altomonte LG, Caricchio R, and Magaro M. Serum zinc and copper in active rheumatoid arthritis: correlation with interleukin 1 beta and tumour necrosis factor alpha. *Clin Rheumatol*, 1998, 17 (5): 378-382.

[8] Bin Bao, Ananda S. Prasad, Frances W. J. Beck, and Michele Godmere. Zinc modulates mRNA levels of cytokines. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003, 285 (5): 1095-1102.

[9] Bin Bao, Ananda Prasad, Frances W. J. Beck, Anupam Suneja, Fazlul Sarkar Toxic effect of zinc on NF-B, IL-2, IL-2 receptor α and TNF- α in HUT-78 (Th0) cells. *Toxicology Letters* 2006, 166 (3): 222-228.

[10] Koropatnick J and Zalups RK. Effect of non-toxic mercury, zinc or cadmium pretreatment on the capacity of human mono-cytes to undergo lipopolysaccharide-induced activation. *Br J Pharmacol*, 1997, 120 (5): 797-806.

[11] Prasad AS, Bao B, Beck FWJ, Kucuk O, Sarkar FH. Antioxidant effect of zinc in humans. *Free Radic Biol Med*, 2004, 37 (8): 1182-1192.