论著

文章编号:1000-5404(2005)12-1256-03

重组人白细胞介素-11对放射后小鼠肠道粘膜免疫系统的保护作用的实验研究

钟 波,徐 辉,粟永萍,冉新泽,王连友 (第三军医大学预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,烧伤、创伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要: 目的 探讨重组人白细胞介素-11(rhIL-11)对放射后肠道粘膜免疫功能的保护作用。**方法** 采用^{60}Coγ射线12 Gy全身电离辐射致轻度肠型放射病的小鼠动物模型,用PP、IEL计数,免疫酶联吸附、细菌培养、血浆内毒素测定等方法,观察rhIL-11对肠道粘膜免疫系统的保护作用。**结果** rhIL-11能增加全肠PP结,IEL数量,提高肠粘液中sIgA的含量,降低肠源性感染的发生,降低血浆内毒素的含量。**结论** rhIL-11对放射后肠道粘膜免疫系统具有一定的保护作用。

关键词: rhIL-11;电离辐射;肠道;粘膜免疫
中图法分类号: R322.45; R392.11; R818 **文献标识码**: A

Protection of intestinal mucosal immune function by recombinant human interleukin -11 after radiation injury in mice

ZHONG Bo, XU Hui, SU Yong-ping, RAN Xin-ze, WANG Lian-you (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effects of recombinant human interleukin-11 (rhIL-11) on immune function of intestinal mucosa after radiation in mice. **Methods** Eighty male BALB/c mice were divided into normal group, irradiation group and rhIL-11 treatment group. Except the normal group, the mice were irradiated with ^{60}Co γ-ray of 12 Gy. The rhIL-11 treatment group was subcutaneously injected 125 μg/kg rhIL-11 twice a day till death. PP knot in entire intestine and IEL in intestinal mucosa and the colony in bacterial cultures were counted. The sIgA in intestinal mucosa and serum endotoxin were detected. **Results** rhIL-11 increased sIgA, PP, IEL, and reduced the incidence of enterogenous infection. **Conclusion** rhIL-11 has protective effects on the immune function of intestinal mucosa after radiation injury in mice.

Key words: interleukin-11; radiation injury; intestinal mucosal immunity

肠道粘膜免疫系统是肠道屏障的重要组成部分,与肠道上皮细胞相互作用,相互影响,在保护肠道免受细菌,病毒等微生物的粘附和入侵,防止异物的吸收,起到第一道防线的作用[1]。肠道淋巴细胞对辐射具有高度的敏感性,辐射导致肠道免疫功能受抑,肠道内细菌移位,继发肠源性感染、脓毒血症,导致多器官功能不全,后者是急性放射病抢救失败的一个重要原因。因此,寻找能对肠道粘膜免疫系统有保护作用的新方法,新措施具有重要意义。rhIL-11是一个多功能的细胞因子,具有促进造血,保护上皮,调节免疫的功能[2]。因此,本研究观察了rhIL-11对轻度肠型放射病肠道粘膜免疫系统的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级BALB/c小鼠80只,单雄性,8~10周龄,体质量(22±3)g,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 试剂来源

rhIL-11由军事医学科学院罗庆良教授惠赠(北京医进生物

基金项目:国家自然科学基金资助重点资助项目(30230360),国家自然科学基金资助面上项目(30270422)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30230360, 3027042)

作者简介:钟 波(1976-),男,四川省内江市人,硕士研究生,医师,主要从事电离辐射与肠道粘膜免疫关系方面的研究。电话:(023)68752280
通讯作者:徐 辉,电话:(023)68752280,E-mail: xuhui@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2005-06-05;**修回日期**:2005-06-10

技术有限公司);羊抗鼠 IgA 及羊抗鼠 IgA 辣根过氧化酶交联物购自 Sigma 公司;血液内毒素定量检测试剂盒为上海伊华医学科技有限公司产品。

1.3　致伤与分组

用$^{60}Co\gamma$ 射线全身一次照射 12 Gy(照射量率为 0.767 Gy/min)致轻度肠型放射病。实验设正常组(N),放射组(R),治疗组(T)。每组取 8、24、48、72 h 4 个时相点。治疗组在照射后 30 min 内皮下给予 rhIL-11 125 μg/kg(rhIL-11 工作液浓度 6.25 μg/ml,生理盐水溶解),2 次/d,连续给药,直到动物死亡。正常对照组注射等量的生理盐水。

1.4　检测指标和方法

1.4.1　小鼠全肠 PP 结计数

1.4.2　肠粘膜 IEL 计数

取十二指肠屈氏韧带后空肠起始部 2 cm 长肠段,PBS 液冲洗后,10% 中性甲醛固定,送石蜡切片,HE 染色,光镜观察。HE 染色的小肠横截面在光镜下观察,计数整个横截面绒毛及隐窝上皮细胞数,同时计数其间的 IEL 数,取百分比,即 IEL/1 000 个肠上皮细胞(以正常组为 100% 进行比较)。

1.4.3　细菌培养

8、72 h 点各组取 5 只动物,取心血(B)、肝(L)、脾(S)、肠系膜淋巴结(MLN),麦康凯培养基培养,37 ℃,培养 24 h,计数菌落数目。

1.4.4　小肠粘液 sIgA 测定

取靠近回盲部 15 cm 的肠段,平铺于滤纸上,纵行剖开,用生理盐水反复冲洗肠腔表面,用载玻片轻刮粘膜表面粘液置 Eppdeffer 管内,加入 0.5 ml 0.01 mol/L PBS 充分混匀,10 000 r/min 离心 15 min,取上清置 4℃冰箱待测。用新鲜配制 0.85 mol/L pH 9.6 碳酸盐缓冲液,将羊抗鼠 IgA 的抗血清稀释 200 倍包被 44 孔酶联板,100 μl/孔,4 ℃过夜。倒弃包被液,PBS-Tween20 pH 7.4 洗涤 3 次,每次 3 min(以下简称洗涤);加入 0.01 mol/L pH 7.4 含 10% 小牛血清的 PBS-Tween20 封闭液室温封闭 30 min,200 μl/孔,洗涤;加入 1∶100 的待测粘液,100 μl/孔,37 ℃孵育 1 h,洗涤;加入 1∶2 000 的羊抗鼠 IgA 抗体-HRP 交联物,100 μl/孔,37 ℃孵育 1 h,洗涤;加入 OPD-H_2O_2 显色系统,37 ℃,反应 15~30 min;2 mol/L H_2SO_4 50 μl 终止反应,立即在 Bio-Rad 酶标仪上读取 D 值,波长为 495 nm,以包被液作空白对照,PBS pH 7.4(10% 小牛血清)作阴性对照。

1.4.5　血浆内毒素含量的检测

颈椎脱臼处死动物后立即无菌剖腹,经门静脉抽血注入去热源的肝素抗凝管中,1 000 × g 离心 5 min,吸取血浆备测,内毒素微量检测采用鲎试剂盒,按照说明书要求严格操作。

1.5　统计学处理

所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,经 SPSS 10.0 统计软件分析,组间比较采用 t 检验。

2　结果

2.1　rhIL-11 对全肠 PP 结的影响

12 Gy 照射后小鼠全小肠 PP 结数目明显减少,突出肠浆膜程度降低,分叶减少,甚至整个 PP 结消失。24 h 单纯照射组 PP 结计数下降到照前的 50% 以下,至 72 h 下降到不足 20%。治疗组则下降的趋势明显减慢,下降程度低,24 h 为照前的 70%,72 h 大于 40%,二者存在显著差异($P < 0.01$)。详见表 1。

2.2　rhIL-11 对 IEL 计数的影响

12 Gy 照射后,IEL 数量迅速减少,24 h 降低到照前的 55%,48 h 降低到 40%。与单纯照射组相比较,治疗组的减少程度降低,这种趋势在 24、48 h 表现明显,二者具有显著差异($P < 0.05$),见表 1。

表 1　rhIL-11 对照射后小鼠全小肠 PP 结、IEL 计数的影响($n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1　The changes of total intestinal PP and IEL(%) by rhIL-11 after radiation in mice ($n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

Groups	Radiation		rhIL-11 treatment	
	PP	IEL	PP	IEL
Normal	8.50 ± 0.40	100	8.50 ± 0.40	100
8 h	7.50 ± 0.52	72.99 ± 24.15	8.00 ± 0.55	78.56 ± 18.26
24 h	4.00 ± 0.43	55.56 ± 24.17	6.40 ± 0.84**	67.82 ± 14.56*
48 h	2.00 ± 0.84	43.29 ± 20.13	4.20 ± 0.59*	52.45 ± 20.18*
72 h	1.5 ± 0.55	—	3.60 ± 0.84**	—

The IEL in normal group is (41.24 + 3.26)/1 000 IEC, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, *vs* radiation

2.3　rhIL-11 对肠道细菌移位的影响

细菌培养实验结果显示,rhIL-11 能降低肠道细菌移位的发生率,减少细菌移位的数量。12 Gy 单纯照射后早期即发生肠道细菌移位,8 h 发生率为 60%(3/5),72 h 细菌移位率为 80%(4/5)。各器官中以肠系膜淋巴结最多,脾脏次之,肝脏再次之,心血最少。治疗组 8 h 细菌移位发生率为 40%(2/5),72 h 发生率为 60%(3/5),单纯照射组与治疗组差异非常显著($P < 0.01$)。在细菌数量上,rhIL-11 能减少各器官的细菌的数量,以肠系膜淋巴结,脾脏差异显著($P < 0.01$),见表 2。

表 2　rhIL-11 对 12 Gy 全身电离辐射小鼠肠道细菌移位的影响(菌落/g, $n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2　Colony count of translocated bacteria in liver, spleen, mesenteric lymph node and blood of mice (colony/g, $n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

Groups	Radiation				Treatment			
	Mesenteric lymph node	Liver	Spleen	Blood	Mesenteric lymph node	Liver	Spleen	Blood
8 h	969 ± 26	246 ± 56	687 ± 45	59 ± 12	624 ± 45**	168 ± 32**	428 ± 44**	23 ± 9*
72 h	3635 ± 122	658 ± 87	4056 ± 98	102 ± 24	2412 ± 86**	347 ± 22**	3654 ± 86**	58 ± 10**

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, *vs* radiation

2.4 小肠粘液中 sIgA 的变化

照射后 8 h 和 72 h，小肠粘液中 sIgA 的 $D(495)$ 迅速降低，且恢复缓慢。与正常对照组相比较差异非常显著（$P<0.01$），而治疗组 Dλ 值均较单纯对照组明显升高（$P<0.01$），见表 3。

2.5 rhIL-11 对血浆内毒素的影响

12 Gy 单纯照射后 8 h，血浆内毒素水平开始上升，至 72 h 时达到最高峰，为正常小鼠对照值的 338%。而 rhIL-11 治疗组能够明显降低血浆内毒素水平，72 h 时为正常小鼠对照值的 131%，差异非常显著（$P<0.01$），见表 3。

表 3 小肠粘液中 sIgA 及血浆内毒素含量的变化比较（%，$n=5$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 3 The changes of sIgA in small intestine (%) and endotoxin in blood (EU/L, $n=5$, $\bar{x}\pm s$)

Groups	Radiation		rhIL-11 treatment	
	sIgA	Endotoxin	sIgA	Endotoxin
Normal	100	55 ± 8	100	55 ± 8
8 h	48.2 ± 0.72	78 ± 12	59.6 ± 0.54*	65 ± 7*
72 h	56.4 ± 0.36	186 ± 26	86.8 ± 0.27**	72 ± 23**

The $D(495)$ of sIgA in normal group is 0.465 + 0.04, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* radiation

3 讨论

肠道是重要的消化吸收器官，正常人体肠道粘膜面积约为 400 m^2。在生理状况下，肠道内含有大量包括大肠杆菌在内的寄生菌群。肠道上皮机械屏障、肠道菌群、肠道粘膜免疫系统，相互影响，相互作用，共同维持肠道微生态的平衡[1,3]。研究表明机体遭受严重创伤（如烧伤）后，由于肠道内细菌移位而发生肠源性感染[4,5]。肠道内正常菌群已成为严重创伤时最大的细菌感染来源，而严重创伤时，肠道粘膜免疫系统的变化是发生肠源性感染的中心环节之一，肠道粘膜免疫系统对电离辐射高度敏感。IL-11 是一个重要的免疫调节因子，因此研究电离辐射对肠道粘膜免疫系统的影响及 IL-11 对损伤后粘膜免疫系统的保护作用，对于降低肠源性感染的发生具有重要意义。

本实验结果表明全身电离辐射致肠道粘膜免疫系统的各组成部分受到严重损伤，表现为 PP 结数目减少，每 100 个上皮细胞内 IEL 数量减少。照射后 IEL/100 数 8 h 即减少为照前的 72%，24 h 为正常 55%，48 h 下降到 40%，而 rhIL-11 治疗能够有效升高 PP、IEL 的数量，提示 rhIL-11 提高了肠道粘膜免疫系统对肠腔内抗原的反应能力，增强了抗原呈递能力[5]。我们还观察到 12 Gy 全身电离辐射后小鼠血浆内毒素含量升高，小鼠肠系膜淋巴结、脾脏、肝脏、和心血麦康凯培养有细菌长出，8 h 发生率为 60%，72 h 肠道内细菌移位发生率达 80%。而 rhIL-11 治疗组，各项指标均较单纯照射组有好转。实验结果证实 rhIL-11 能减轻电离辐射对肠道粘膜免疫系统的损伤，降低肠源性感染的发生率以及血浆内毒素含量。因此，rhIL-11 对肠道粘膜免疫系统具有保护作用。

Steven 等[6]证实，rhIL-11 可以减少 32% 体表Ⅲ度烧伤大鼠肠道细菌的移位，减少骨髓抑制。Steven 等[6]发现中性粒细胞减少小鼠给予口服 rhIL-11 可以减少肠道内细菌移位，降低血浆内毒素水平；联合运用 rhIL-11、G-CSF 可增强肠道抗感染的能力，明显减少绿脓杆菌经灌胃后细菌移位率，降低死亡率。Ellis 等[7]发现在放化疗的病人中，rhIL-11 可以减少肠道细菌移位，减少肠源性感染。Chang 等[8]发现，rhIL-11 可以增强骨髓抑制患者对 B 型链球菌的抵抗能力，本实验结果与上述研究结果相吻合。但 rhIL-11 对电离辐射肠道粘膜免疫系统保护作用的机制尚少见文献报道，有待进一步的研究。

参考文献：

[1] 艾国平，粟永萍，刘晓宏，等. 放射损伤合并烧伤肠源性感染发生特点的实验研究[J]. 第三军医大学学报，1997，19(5)：405－407.

[2] Du X, Williams D A. Interleukin-11: review of molecular, cell biology, and clinical use[J]. Blood, 1997, 89(11): 3897－3908.

[3] Kim J K, Takahashi I, Kai Y, *et al*. Influence of enterotoxin on mucosal intranet: selective inhibition of extrathymic T cell development in intestinal intraepithelial lymphocytes by oral exposure to heat-labile toxin[J]. Eur J Immunol, 2001, 31(10): 2960－2969.

[4] Schindel D, Maze R, Liu Q, *et al*. Interleukin-11 improves survival and reduces bacterial translocation and bone marrow suppression in burned mice [J]. J Pediatr Surg, 1997, 32(2): 312－315.

[5] Murai M, Yoneyama H, Ezaki T, *et al*. Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction[J]. Nat Immunol, 2003, 4(2): 154－160.

[6] Steven M, Keith J C Jr, Jhung J, *et al*. Orally administered recombinant human interleukin-11 is protective in experimental neutropenic sepsis[J]. J Infect Dis, 2003, 187(1): 70－76.

[7] Ellis M, Zwaan F, Hedstrom U, *et al*. Recombinant human interleukin 11 and bacterial infection in patients [correction of] with haematological malignant disease undergoing chemotherapy: a double-blind placebo-controlled randomised trial [J]. Lancet, 2003, 361(9345): 275－280.

[8] Chang M, Williams A, Ishizawa L, *et al*. Endogenous interleukin-11 (IL-11) expression is increased and prophylactic use of exogenous IL-11 enhances platelet recovery and improves survival during thrombocytopenia associated with experimental group B streptococcal sepsis in neonatal rats[J]. Blood Cells Mol Dis, 1996, 22(1): 57－67.

（编辑 张大春）