DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.02.054
第24卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 2
230 2002年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2002

3 讨论

人类在漫长的进化过程中，从海洋走向陆地，从对海水温度的适应转为对当前体温的依赖，实际上，外界生存条件的变化塑造了生物的功能和形态。亚低温作为一种特殊的刺激条件，对多种形式的中枢神经系统损伤具有一定的保护作用。[2~5] 关于其作用机制，人们已从多方面进行探讨，目前较为明确的机制包括以下几个方面：低温可以降低机体或细胞的代谢率从而减少能量需求，可以减少兴奋性神经递质的释放，减少离子的流动，减轻血管通透性的改变，抑制NO合酶的活性，减轻水肿并降低血脑屏障的破坏。还有人注意到亚低温可以减少TBI后急性期中性粒细胞的局部聚集和IL-6的释放，试图从免疫学的角度对亚低温的保护作用作出评价[6]。星形胶质细胞对神经元的功能具有支持和保障作用，胶质细胞的存活对中枢神经功能的维持具有重要意义。由于在神经细胞的生存活动中，神经营养因子的重要作用是无庸置疑的，作者联想到亚低温对神经细胞的保护作用可能与亚低温条件下神经营养因子对神经细胞的作用发生变化有关。神经细胞表面神经营养因子受体的上调可以放大神经营养因子对神经细胞的促存活和生长的作用。本研究的结果初步证实了这一推论。

关键词：亚低温；trkB；星形胶质细胞

中图法分类号：R339.55 文献标识码：B

参考文献：

[1] Macarthy K D, Vellis J D E. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue[J]. J Cell Biology, 1980, 85: 890—902.
[2] Trescher W H, Ishiwa S, Johnston M V. Brief post-hypoxic-ischemic hypothermia markedly delays neonatal brain injury[J]. Brain Dev, 1997, 19(5): 326—338.
[3] Bramlett H M, Dietrich W D, Green E J, *et al*. Chronic histopathological consequences of fluid-percussion brain injury in rats: effects of post-traumatic hypothermia[J]. Acta Neuropathol Berl, 1997, 93(2): 190—199.
[4] Cruz J. Hypothermia and brain injury letter: comment[J]. J Neurosurg, 1997, 86(5): 911—914.
[5] Barone F C, Feuerstein G Z, White R F. Brain cooling during transient focal ischemia provides complete neuroprotection[J]. Neurosci Biobehav Rev, 1997, 21(1): 31—44.
[6] Aibiki M, Maekawa S, Ogura S, *et al*. Effect of moderate hypothermia on systemic and internal jugular plasma IL-6 levels after traumatic brain injury in humans[J]. J Neurotrauma, 1999, 16(3): 225—233.

（编辑 陈聪连）

经验交流

文章编号：1000-5404(2002)02-0230-02

^{60}Co γ射线全身照射后小鼠肠道内白色念珠菌定植的实验观察

Colonization of *Candida albicans* in intestine of mice after whole-body exposure to ^{60}Co irradiation

许川山[1]，孙华明[2]，薛国文[2]，冷泰俊[2]（第三军医大学：[1]附属新桥医院康复科，重庆 400037；[2]预防医学系流行病学教研室，重庆 400038）

白念珠菌正常存在于人体表与腔道中，属于条件致病菌，当正常菌群失调或抵抗力降低时则引起致病，而定植是感染的第一步。本实验观察了预先口饲白色念珠菌的昆明种小鼠经^{60}Co γ射线不同剂量全身一次性照射后不同时点肠道白色念珠菌定植情况，以期为^{60}Co γ射线照射后引起内源性感染的防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物来源与分组

健康昆明种小白鼠120只（第三军医大学实验动物中心提供），雄性，体重(20±5)g，随机抽取30只作本实验动物肠道白色念珠菌带菌情况调查，余90只随机分为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ三组，每组30只。

1.2 白色念珠菌的来源与接种方法

白色念珠菌由西南医院皮肤科惠赠（保存菌种1933株），首先转种于沙堡氏液100 ml中，振荡培养（37 ℃，150 r/min）24 h，离心洗涤3次，配成2×10^6 CFU/ml的白色念珠菌菌悬液（无菌蒸馏水配制），按每只小鼠5 ml/d，连续喂养3 d后^{60}Co源照射。

1.3 钴源

由第三军医大学预防医学系防原医学教研室提供。距离150 cm，剂量率为64.29 rad/min，总剂量分别为0、4.5及6 Gy。

1.4 细菌标本的采集

各实验组分别于照射后第1、3、5、7、9天随机抽取5只动物，75%酒精中浸泡5 min后，行断颈处死，无菌操作下，取盲肠内容物置于已称重的含还原剂的1 ml稀释液中，称重备用。

1.5 细菌的培养

取上述盲肠内容物10倍称释，根据初步镜检计数选择适当稀释度，各稀释度取0.1 ml，重复接种3个含2,3,5-氯化二苯四氮唑(TTC)琼脂培养平板，用L棒涂布均匀，37 ℃培养48 h，观察白色念珠菌生长情况并计算菌落数。

1.6 白色念珠菌的鉴定

TTC平板培养呈无色或淡红色，玉米培养查厚膜孢子，血清培养3 h行芽管试验。并按下列公式进行定量计数：肠道内容物含菌量(CFU/g)=菌落数×10×相应稀释度。

作者简介：许川山(1969—)，男，湖南省洞口县人，硕士，主治医师，主要从事激光生物学效应方面的研究，发表论文20余篇。电话：(023)68755000-74688

收稿日期：2000-04-10；修回日期：2000-07-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.7　白色念珠菌肠道定植定性观察

取第 9 天小鼠盲肠, 高压冲掉粘膜残物。置于 Bouins' 液中固定, 常规石蜡包埋, 切片, HE 染色, 糖原 PAS 染色, Olympus 多功能显微镜观察。电镜标本置于 3% 戊二醛磷酸缓冲液中固定, 常规制样, 电镜 AMR-1 000B 扫描观察并摄影。

1.8　统计学处理

实验资料采用裂区设计统计分析, 显著性水准取 $\alpha=0.05$。

2　结果

2.1　正常昆明种小鼠肠道白色念珠菌定植情况

随机抽取实验小鼠 30 只进行盲肠内容物的真菌培养及肠道电镜扫描观察, 结果均未发现白色念珠菌, 见图 1A。表明在正常生理状态下, 实验所用健康昆明小鼠肠道无白色念珠菌定植。

2.2　^{60}Co 照射后不同时相点各组实验小鼠肠道白色念珠菌定植情况

裂区设计见表 1, 统计结果见表 2。

由表 2 可见各小鼠间肠道白色念珠菌定植相差不显著($P>0.05$), 表明所选小鼠的均衡性较好。而各实验组观察时间及剂量与时间的交互作用相差非常显著($P<0.01$), 并显示两实验组白色念珠菌肠道定植随照射后时点的延长和辐照剂量的增大而渐增多, 对照组却减少。

2.3　照射后第 9 天小鼠肠道念珠菌定植的定性观察

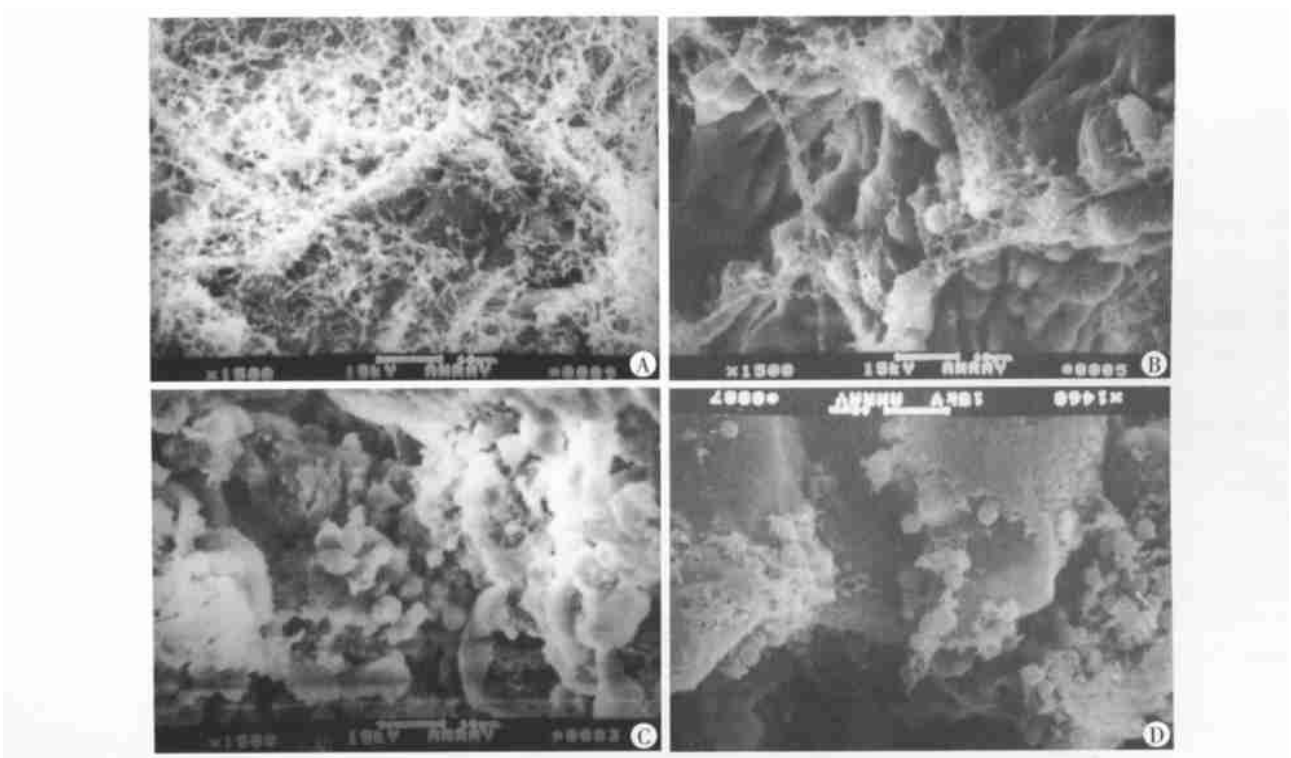
肠道组织 HE. PAS 染色发现辐射组小鼠肠道有较多红染的椭圆孢子且有发芽现象, 电镜扫描更形象地显示白色念珠菌定植肠道的状况, 见图 1B ~ D。

表 1　小鼠肠道白色念珠菌定植状况(lg*x*, CFU/g)

剂量(Gy)	^{60}Co 辐照后时相(d)	每只鼠盲肠白色念珠菌定植量的对数值				
		1	2	3	4	5
0	1	4.8060	4.7166	4.8330	4.7555	4.8000
	3	4.7326	4.8342	4.8462	4.7494	4.8146
	5	3.8135	3.8816	3.8575	3.8060	3.6471
	7	3.4136	3.4809	3.3831	3.3265	3.4062
	9	2.8087	2.7952	2.8471	2.7742	2.8319
4.5	1	4.9343	4.9547	4.9181	4.9343	4.9031
	3	4.9589	4.8816	5.1682	4.8487	5.0216
	5	5.1449	4.9910	5.2603	5.1945	4.9937
	7	5.5494	5.5687	5.6173	5.5107	5.4860
	9	5.9138	5.7975	5.8893	5.7732	5.8164
6.0	1	4.9717	5.2340	5.0766	4.9903	5.1741
	3	5.1945	5.3124	5.3589	5.3809	5.2562
	5	5.5075	5.4533	5.5302	5.4942	5.3969
	7	5.8001	5.7731	5.8274	5.8462	5.8106
	9	6.5454	6.3187	6.4481	6.5205	6.4328

表 2　白色念珠菌计数的裂区设计方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	*F* 值	*P* 值
区组(动物间)	0.0459	4	0.0115	2.452	>0.05
照射剂量(A)	40.8214	2	20.4107	4305.16	<0.01
误差(a)	0.0379	8	0.0047		
照射时间(B)	0.5582	4	0.1395	26.26	<0.01
交互影响(AB)	23.3911	8	2.2389	550.30	<0.01
误差(b)	0.2554	48	0.0053		
总计	65.1095	74			



A: 正常健康小鼠　(× 1 500); B: 预饲白色念珠菌未行 ^{60}Co 照射　(× 1 500); C: 预饲白色念珠菌后行 4.5 Gy ^{60}Co 照射　(× 1 500); D: 预饲白色念珠菌后行 6.0 Gy ^{60}Co 照射　(× 1 460)

图 1　小鼠盲肠白色念珠菌定植扫描电镜结果

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

肠道是白色念珠菌感染、播散的中心器官，而白色念珠菌对肠粘膜的粘附和定植是感染和播散的重要生态学因素[1~3]。可见白色念珠菌感染播散机理的明确阐明有待于定植生态学基础研究的深入。为此我们首先对正常小鼠肠道白色念珠菌携带状况进行了调查，肠道真菌培养和电镜扫描检查结果均未发现有白色念珠菌粘附与定植，与文献[4]报道一致，表明在正常生理状态下，实验所用健康昆明种小鼠肠道无白色念珠菌定植，即白色念珠菌不是鼠体内的常居菌。为使白色念珠菌在小鼠肠道定植成为内源性菌而存活一段时间，我们先喂养成年小鼠白色念珠菌3 d，再用^{60}Co γ射线作不同剂量全身照射。辐照后第1、3、5、7、9天肠道白色念珠菌培养结果表明：各实验组均有白色念珠菌存在，且正处于增殖状态。肠道组织切片HE、PAS及扫描电镜(SEM)都同样证实了这一现象存在，尤其是电镜扫描更形象地展示了大量的白色念珠菌粘附于肠粘膜。裂区统计分析显示各小鼠间白色念珠菌定植无显著性异($P>0.05$)，认为本实验所采用的接种方法确保了小鼠间白色念珠菌的稳定定植。

生理状态下，肠道微生态之间、肠粘膜粘液层、肠上皮细胞及细胞间的紧密连接、上皮下基底膜及肠淋巴组织等共同构成肠道特有的抗感染屏障，一般不发生肠源性感染。γ射线辐射导致肠道机械屏障的损害、全小肠上皮内淋巴细胞数量减少和功能降低所造成的肠粘膜免疫功能的下降可能为白色念珠菌肠源性感染的发生提供了条件[5,6]。本实验观察到两辐射照组白色念珠菌肠道定植量随辐射后时点的延长和辐照剂量的增大而增多，而对照组却减少($P<0.01$)。可见，^{60}Co γ射线全身一次性照射削弱了小鼠对抗白色念珠菌肠道定植的能力，促进了白色念珠菌肠道粘附与定植。但具体机制有待深入探讨。

关键词：^{60}Co辐射；白色念珠菌；定植
中图法分类号：R379.4；R811.5 文献标识码：B

参考文献：

[1] Kennedy M J, Rogers A L, Yancy R J. Environmental alteration and phonotypic regulation of Candida albicans adhesion to plastic[J]. Infect Immun, 1989, 57(12): 3 876—3 881.
[2] 郭 力，肖光夏，张雅萍，等. 烫伤和应用抗生素与肠道白色念珠菌移位的实验研究[J]. 中华创伤杂志，1991，7(4)：198—200.
[3] Skoutelis A, Lianou P, Marselou O, *et al*. Differences in adherence to buccal epithelial cells, in phagocytosis and killing by neutrophils between human and nonhuman strains of candida albicans[J]. J Infect, 1995, 30(1): 17—21.
[4] 陈 敏，朱 忠. 抗生素和抗癌药物对白色念珠菌定居小鼠肠道和播散的影响[J]. 中国人兽共患杂志，1992，8(6)：26—28.
[5] 艾国平，粟永平，刘晓宏，等. 放烧复合伤小鼠小肠粘膜免疫变化与肠源性感染关系的研究[J]. 中华放射医学与防护杂志，1999，19(1)：15—17.
[6] 徐 辉，程天民，粟永萍，等. 全辐射对小鼠小肠上皮内淋巴细胞功能影响的实验研究[J]. 中华放射医学与防护杂志，1999，19(1)18—21.

（编辑 薛国文）

经验交流

文章编号：1000-5404(2002)02-0232-02

奥曲肽对SGC-7901细胞中Bcl-2和Bax基因的调控作用

Regulatory effects of octreotide on expressions of Bcl-2 and Bax genes in SGC-7901 cells

唐卓斌，刘为纹 （第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心，重庆 400038）

我们以前研究发现奥曲肽可诱导人胃癌细胞株SGC-7901细胞凋亡，但其作用机制目前国内外未见报道。为此，我们就奥曲肽对SGC-7901细胞中Bcl-2和Bax基因的调控作用进行了研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

奥曲肽由瑞士Sandoz药厂惠赠，人胃癌细胞株SGC-7901由本科培养，逆转录试剂盒Asccess RT-PCR System(A1250)购自Promega公司，TripureTM Isolation Reagent kit购自德国宝灵曼公司，2400型PCR循环仪为美国Perkin-Elmer公司产品，紫外线凝胶成像系统为美国Bio-Rad公司产品。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR检测Bax和Bcl-2 mRNA表达 选择对数生长期SGC-7901细胞，以4.5×10^8个/L浓度接种于6孔培养板中，每孔1.5 ml，待其生长至对数生长期，每孔加入终浓度为1×10^{-7} mol/L的奥曲肽，继续无血清培养6、12、24、48 h后提取RNA，按宝灵曼RNA提取试剂盒说明书操作，设未处理的胃癌细胞为空白对照。采用25 μl逆转录反应体积，内含RNA模板2 μl、5× Buffer 5 μl、dNTP 0.5 μl、$MgSO_4$ 1 μl、Bax、Bcl-2、GAPDH引物各1.5 μl、Tfl酶0.5 μl、AMV酶0.5 μl，用水补至25 μl，2400型PCR仪扩增反应参数为：48 ℃ 45 min→94 ℃ 2 min→94 ℃ 30 s，60 ℃ 40 s，68 ℃ 1 min(35 cycles)→68 ℃ 7 min。PCR扩增产物在1.5%琼脂糖凝胶上电泳。

1.2.2 流式细胞仪检测Bax和Bcl-2蛋白表达 消化收集经1×10^{-7} mol/L奥曲肽作用12 h后的SGC-7901细胞，PBS清洗两次，加入1∶100稀释的一抗100 μl，在37℃恒温水浴中温育30 min，PBS洗2次，然后加入1∶20稀释的FITC标记的二抗100 μl，37℃水浴30 min，PBS洗两次，离心去上清，除去未结合的多余荧光抗体。加入1.0 ml PBS，经200目滤网过滤，上机检测。测量数据及图形输入计算机，应用相应程序软件进行资料处理，测定前以鸡血红细胞标准样品调整仪器的*CV*值在5%以

作者简介：唐卓斌(1966—)，男，河北省邯郸市人，博士，主治医师，主要从事胃癌的发病机制及其防治研究，发表论文10余篇。电话：(023)68754000-73055

收稿日期：2000-06-15；修回日期：2001-10-13

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net