DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.10.003
第23卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 10
1136 2001年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)10-1136-03

^{60}Co γ射线辐射小鼠免疫功能改变及与肠道白色念珠菌定植关系的实验研究

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

提 要:目的 探讨^{60}Co辐照后免疫功能改变及其与白色念珠菌肠道定植的关系。方法 预先口饲白色念珠菌悬液,3 d后行^{60}Co一次全身照射(剂量分别为0、4.5及6.0 Gy)后第9天采用MTT法测定小鼠腹腔中性粒细胞杀菌功能及脾T淋巴细胞的增殖活性的同时,定量研究小鼠肠道白色念珠菌的定植。结果 辐射后第9天两辐照组(4.5、6.0 Gy)的腹腔中性粒细胞杀菌率、脾T淋巴细胞增殖活性显著低于对照组(0 Gy)($P<0.01$)。而白色念珠菌的肠道定植量(对数值)显著高于对照组($P<0.01$)。相关分析显示,中性粒细胞杀菌率及脾T淋巴细胞增殖活性均与白色念珠菌的肠道定植量呈负相关($P<0.01$)。结论 ^{60}Co γ射线一次全身辐照削弱了小鼠脾T淋巴细胞增殖活性,降低了腹腔中性粒细胞杀菌力,促进了白色念珠菌的肠道定植,为其内源性感染创造了条件。

关键词:^{60}Co辐照;中性粒细胞;T淋巴细胞;白色念珠菌;细菌定植
中图法分类号:R379.4;R392.12;R818 文献标识码:A

Experimental study on the relationship between immunocompromise and colonization of *C. albicans* in the intestine of mice after ^{60}Co irradiation

XU Chuan-shan, SUN Hua-ming, XUE Guo-wen, LENG Tai-jun, (Department of Rahibilation, Xinqao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract Objective To explore the relationship between immunocompromise and the colonization of *C. albicans* in intestine of mice after ^{60}Co irradiation. Methods Thirty mice were randomly divided into three groups namely control (0 Gy), 4.5 Gy and 6 Gy ^{60}Co irradiation. *C. albicans* suspeusion was given to the mice orally for 3 days. Poulation level of *C. albicans* in the cecal content, capacity of polymorphonuclear leucocytes (PMNL) killing *C. albicans* and T lymphocyte proliferation were determined quantialtively by MTT methods on the 9th day after radiation. Results Capacity of PMNL killing *C. albicans* of the two irradiation groups decreased to 37.68%(4.5 Gy), 26.84%(6 Gy) respectively and T lymphocyte proliferation decreased to 1.518, 1.320 respectively, both were significantly lower than that of control (0 Gy)($P<0.01$), while colonized *C. albicans* increased by 1-2 order of magnitude. Correlation analysis showed that negative relationship exist between PMNL killing capacity/T lymphocyte proliferation and colonized population of *C. albicans* in intestine of mice. Conclusion The decrease of capacity of PMNL killing *C. albicans* and T lymphocyte proliferation after irradiation increase the durability of intestine to *C. albicans* and promote the colonization of *C. albicansin* intestine of mice.

Key words: ^{60}Co irradiation; PMNL; T-lymphocyte; *C. albicans*; colonization of bacteria

内源性真菌作为条件致病菌引起的感染播散及高死亡率已成为当今军事医学核武器伤和临床放射治疗等防护中的一个较为棘手的问题。为适应核武器伤及临床放射治疗伤医学防护的需要,本研究采用^{60}Co辐照作为创伤因素,观察了^{60}Co辐射后小鼠免疫功能改变及与肠道白色念珠菌定植的关系,以期为辐射损伤后内源性真菌感染的防治提供实验资料。

1 材料与方法

1.1 动物来源与分组

健康昆明系小白鼠30只(第三军医大学实验动物中心提供),雄性,体重(20±2)g,用随机数字表法,随机分为3组(0、4.5、6.0 Gy),每组10只。

作者简介:许川山(1968-),男,湖南省洞口县人,硕士,主治医师,主要从事医院内感染及光动力学治疗方面的研究,发表论文20篇。电话:(023)68752286

收稿日期:2000-09-11;修回日期:2001-04-19

1.2 动物的处理

首先接种白色念珠菌(西南医院皮肤科保存菌株1 933株)于沙堡氏液(Sabourands solution, 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的白色念珠菌悬液,按每只鼠5 ml/d,连续喂养3 d后$^{60}C0$辐照。^{60}Co源由第三军医大学防原医学教研室提供。距离150 cm,剂量率为0.6429 Gy/min。总剂量分别为0、4.5及6 Gy。

1.3 标本的采集、培养及细菌的鉴定和计数

于照射后第9天,在75%酒精中浸泡5 min后,行断颈处死实验鼠,无菌操作下取盲肠内容物,置于已称重的1 ml稀释液中,并行10倍稀释,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个含氯化三苯基四氮唑(Triphenyl tetrazolium chloride, TTC)的沙氏葡萄糖琼脂平板(TTC平板),37 ℃培养48 h,TTC平板培养呈无色或淡红色,查厚膜孢子,芽管试验鉴定,计算菌落数并定量:肠道内容物含菌量(CFU/g)=菌落数×10×相应稀释度,含菌量取对数值进行统计学分析。

1.4 腹腔中性粒细胞(Polymorphonuclear leucocytes, PMNL)杀伤白色念珠菌功能测定

于照射后第8天,小鼠腹腔注射5%灭菌淀粉液1 ml,第9

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

天行断颈处死实验鼠, 无菌操作下剖腹, 完全 1640 液冲洗腹腔 4～5 ml, 收集洗液于 10 ml 无菌带盖离心管中, 1 000 r/m 离心 10 min, 弃上清液, 用完全 1640 液配成 2× 10^6 CFU/ml 的胞悬液。台盼蓝排斥法测活细胞数> 95%, Wright 氏染色中性粒细胞占 80%。按一定胞菌比例(10∶1)将完全 1640 培养液配制的 100 μl 细胞悬液(2× 10^6 CFU/ml)和菌悬液 10 μl(2× 10^6 CFU/ml, 已经 37 ℃ 10%混合人血清调理 20 min)加入 55 孔酶标板孔内, 设三复孔, 同时每板设三个空白孔, 即不含细胞孔。振荡 20 s, 参照文献[1] 采用 MTT 比色法测定: 一板置 4 ℃(0 h), 另一板置 37 ℃ 5%的 CO_2 作用 1 h, 两板同时离心(2 500 r/min× 10 min), 弃上清液, 每孔加入 0.3%去氧胆酸钠溶液 20 μl 及沙保氏培养液 100 μl, 置 26 ℃培养 11 h, 每孔加入四甲基偶氮唑盐(Methyl thiazolyl tetrazolium, MTT, 5 mg/ml 以 pH 7.2 的 PBS 配制), 振荡 20 s, 置37 ℃ 作用 3 h, 每孔加入 40 mmol/L HCl-异丙醇 100 μl, 混匀, 待蓝紫色结晶溶解后, 用 GXM-202 型酶标光度计, 波长为 550 nm, 测 D_{550} 值。结果以杀菌率(%)= [D_{550}(4 ℃)－ D_{550}(37 ℃)] / D_{550}(4 ℃)× 100%表示。

1.5　淋巴细胞增殖活性的测定

无菌操作下取脾脏, 置于 200 目不锈钢网筛内轻轻研磨, 完全 1640 液冲洗 5 ml, 4 号针头抽取单个细胞悬液, 水平离心 1 500 r/min× 5 min, 洗涤 3 次, 用完全 1640 液配成 5× 10^6 CFU/ml 的胞悬液, 台盼蓝染色活细胞大于 95%。参照文献[2] 采用 MTT 法测定: 取 100 μl 淋巴细胞悬液和 100 μl ConA(5 μg/ml, 用 1640 液配制)加入 96 孔培养板各孔中, 并设不加 ConA 的自发转化孔, 均作 3 个复孔, 5% CO_2, 37 ℃培养 72 h, 于各孔中加入 10 μl MTT 液(5 mg/ml), 具体检测方法同 1.4 部分。结果以增殖活性= ConA 刺激孔 D_{550}均值/ 无 ConA 刺激孔 D_{550}均值表示。

1.6　统计学处理

所有资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 t 检验和相关分析。

2　结果

2.1　^{60}Co 辐照 各组小鼠肠道白色 念珠菌 定植情况

全身辐照后第 9 天, 4.5 Gy 和 6.0 Gy 两辐照组小鼠肠道白色念珠菌肠道定植(对数值)的均数与 0 Gy 组相比, 相差非常显著(P< 0.01), 见表 1, 提示白色念珠菌肠道定植量随照射剂量的增加而增多。

2.2　^{60}Co 辐照 后小 鼠腹腔中性粒细胞杀伤白色 念珠菌功能的改变

4.5 Gy 和 6.0 Gy 全身辐照后第 9 天小鼠腹腔中性粒细胞杀伤白色念珠菌的百分率分别降为 37.68%和 26.84%, 显著低于对照组(0 Gy)的 50.32%(P< 0.01), 见表 1。提示随辐照剂量加大, 小鼠体内中性粒细胞杀伤白色念珠菌的功能显著下降。

2.3　^{60}Co 辐照 后小 鼠脾淋巴细胞 增殖活 性的改变

4.5 Gy 和 6.0 Gy ^{60}Co 辐射后第 9 天小鼠 T 淋巴细胞增殖活性明显下降, 分别降为 1.518、1.320, 显著低于对照组(0 Gy)的 2.039(P< 0.01), 见表 1, 提示随着照射剂量增大, 小鼠脾 T 淋巴细胞增殖活性亦渐下降。

2.4　^{60}Co 辐照 后小 鼠免疫功能的改变与肠道白色 念珠菌 定植的关系

以白色念珠菌肠道定植量的对数值为自变量, 分别以中性粒细胞杀菌率和脾 T 淋巴细胞增殖活性为因变量进行相关分析, 相关系数分别为－0.8340、－0.9850, 相关系数显著性检验显示相关有非常显著性(P< 0.01)。表明照射后小鼠体内中性粒细胞杀菌功能及脾 T 淋巴细胞增殖活性与肠道白色念珠菌定植呈显著性负相关。

表 1　辐照后小鼠肠道白色念珠菌定植、中性粒细胞杀伤功能及脾细胞增殖活性的观察

Tab 1　Colonization of *C. albicans* in the cecal contents, capacity of polymorphonuclear leucocytes killing *C. albicans* and response of lymphocytes from mouse spleen to ConA on the 9th day after irradiation

Radiation dose (Gy)	n	Colonization of *C. albicans*	*C. albicans* killed (%)	T lymphocytes proliferation (D_{550})
Control (0)	10	2.8114±0.0420	50.32±4.40	2.039±0.04
4.5	10	5.8471±0.0600 *	37.68±4.97 *	1.518±0.05 *
6.0	10	6.4521±0.0087 *	26.84±6.70 *	1.320±0.04 *

*: P< 0.01 *vs* control (0 Gy)

3　讨论

电离辐射后, 由于骨髓造血机制受损, 势必影响到中性粒细胞的数量和功能[3,4]。然而, 中性粒细胞的功能包含了吞噬和杀伤两个含义, 但归根到底取决于其杀伤功能的强弱。本研究采用 MTT 法观察到 4.5 Gy 和 6.0 Gy 全身辐照后第 9 天小鼠腹腔中性粒细胞杀伤白色念珠菌的百分率分别降为 37.68%和 26.84%, 显著低于对照组(0 Gy)的 50.32%(P< 0.01), 表明^{60}Co辐射后小鼠中性粒细胞杀伤白色念珠菌的功能严重受损。T 淋巴细胞作为体内主要的免疫活性细胞, 除主行细胞免疫功能外, 亦协助参与体液免疫, 在抗感染、发挥免疫监视防止肿瘤发生等方面起着重要作用。而静态细胞活化与增殖是 T 淋巴细胞发挥各种功能的前提与条件。因此, 研究 T 淋巴细胞转化、增殖活性, 对了解辐射后宿主的免疫状况, 意义深远。闵锐等[5]的研究报道大于或等于 1 Gy 的电离辐射即可使 T 淋巴细胞产生明显的增殖抑制。我们的研究也发现 4.5 Gy 和 6.0 Gy ^{60}Co 辐射后小鼠脾 T 淋巴细胞增殖活性明显下降, 分别降为 1.518、1.320, 显著低于对照组(0 Gy)的 2.039(P< 0.01)。可见, ^{60}Co 辐照不仅削弱了宿主中性粒细胞杀伤白色念珠菌的功能, 而且降低了 T 淋巴细胞增殖活性。

辐照后机体免疫功能受到损伤或破坏, 抵御病原菌侵袭的能力降低, 极易发生感染及其播散。定植是感染发生的关键, 是第一步, 而定植又是一个重要的生态现象[6～8]。因此本研究在预先口饲白色念珠菌的昆明系小鼠经^{60}Co γ 射线一次全身不同剂量照射后的第 9 天, 着重观察了辐射后小鼠腹腔中性粒细胞杀伤白色念珠菌的功能和脾 T 淋巴细胞的增殖活性的改变与白色念珠菌肠道定植量的关系。结果显示两辐照组小鼠肠道白色念珠菌定植呈数量级递增, 明显高于对照组(0 Gy)(P< 0.01), 相关分析示其与辐照后小鼠中性粒细胞杀菌功能及脾 T 淋巴细胞增殖活性呈显著性负

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

相关(相关系数分别为－0.8340，－0.9850，$P<0.01$)，可见辐射后机体内中性粒细胞杀菌功能和T淋巴细胞增殖活性的下降促进了白色念珠菌的肠道定植。提示中性粒细胞和T淋巴细胞作为小鼠体内重要的抗定植因子在防止辐射后白色念珠菌的肠道定植及抗感染方面起着非常重要的作用。当然，肠道壁的机械屏障功能、肠粘膜免疫及肠道菌群等在影响白色念珠菌肠道定植中的作用也不可忽视[9,10]。因此，在这浩翰的微生态世界里，欲明确阐明^{60}Co辐照后内源性真菌感染发生的机制，还有待深入探讨。

参考文献：

[1] 邱 娟. 吞噬细胞杀伤白色念珠菌的测定方法[J]. 福建医学院学报, 1989, 23(4): 364－366.
[2] 付本辉, 谢之荣, 邓碧芳, 等. MTT比色法检测肿瘤患者的淋转功能及其条件分析[J]. 中国实验临床免疫学杂志, 1994, 6(2): 30－32.
[3] Reeves G I, Ainsworth E J. Description of the chronic radiation syndrome in humans irradiated in the former Soviet Union[J]. Radiat Res, 1995, 142(2): 242－243.
[4] 舒崇湘, 陈宗荣, 董 燕. 大鼠5 Gy γ射线照射后嗜中性粒细胞吞噬细胞功能的变化[J]. 中华放射医学与防护杂志, 1992, 12(3): 166－170.
[5] 闵 锐, 程天民, 罗成基, 等. 电离辐射对T淋巴细胞激活增殖能力的影响[J]. 中华放射医学与防护杂志, 1994, 14(4): 229－236.
[6] Fanello S, Bouchara J P, Jousset N, *et al*. Nosocomial candida albicans acquisition in a geriatric unit: epidemiology and evidence for person to person transmission[J]. J Hosp Infect, 2001, 47(1): 46－52.
[7] Pfaller M A. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs and mode of transmission[J]. Clin Infect Dis, 1996, 22(1): 89－94.
[8] Bende C M, St Sauver J, Clarson S, *et al*. Epithelial adhesion in yeast species: Correlation with surface expression of the integrin analog[J]. J Infect Dis, 1995, 17(16): 1 660－1 663.
[9] Allan M, Joanne L V. The anatomical basis of intestinal immunity[J]. Immunol Rev, 1997, 156(1): 145－166.
[10] 王军平, 胡川闽, 粟永萍, 等. 用mRNA差异显示法进行小鼠肠上皮细胞辐射损伤相关基因的克隆[J]. 中华放射医学与防护杂志, 1999, 19(6): 372－374.

(编辑 冯崇英)

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2001)10-1138-01

食道静脉曲张破裂出血急诊套扎术的手术配合

Clinical experience of emergency endoscopic ligation in treating rupture of esophageal varicosis

李向红, 杨建民, 王振华, 彭贵勇, 杨仕明, 向国春 (第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心, 重庆 400038)

食道静脉曲张破裂出血是肝硬化门脉高压最严重的并发症之一，首次出血病死率高达50%～70%，反复出血发生率为80%[1]，内镜下食道静脉曲张结扎治疗是近年开展的治疗食道静脉曲张破裂出血的新方法。我科自2000年9月以来在择期行食道静脉套扎术的基础上，开展了急诊出血期的食道静脉曲张套扎治疗，取得了满意的效果，现将我们进行这一手术的配合情况报告如下。

1 临床资料与方法

本组18例病人均经电子胃镜检查证实为食道静脉曲张破裂出血，男14例，女4例，平均年龄51.3岁，胃镜示重度食道静脉曲张14例，中-重度食道静脉曲张4例，红色征均为阳性，出血量为中-重度。

1.1 术前准备

1.1.1 病人准备 ①禁食4 h。②检查心电图，出、凝血时间，血常规并交叉配血。③建立双静脉输液通道，一通道滴注生长抑素或垂体后叶素以降低门静脉压力，另一通道补充血容量。

1.1.2 设备准备 ①用OLYMPUS GIF-230或240型电子胃镜；②美国MICROVASIVE5连发套扎器。③专用内窥镜吸引器。④去甲肾上腺素20 mg＋生理盐水250 ml，50 ml空针3付。⑤抢救物品：三腔二囊管、氧气、石蜡油、弯盘等。

1.2 手术配合

1.2.1 首先插入胃镜检查确定食道静脉曲张的程度，确定有无胃底静脉曲张及活动性食道静脉曲张破裂出血点，排除食道曲张静脉破裂出血以外的出血源，如胃底静脉破裂出血，溃疡出血等，确定最先结扎的位置，然后拔出胃镜。

1.2.2 安装结扎器 ①揭开活检孔道阀门处橡皮盖，循活检孔插入与旋转手柄连接的牵引钢丝。②固定旋转手柄于活检孔道阀门上。③将载有5枚橡皮圈的塑料帽上的尼龙线固定于牵引钢丝末端。④一人将塑料帽上的小红旗方向对准活检孔道出口，另一人向外拉牵引钢丝至塑料帽近胃镜先端部，然后去掉小红旗，撕开塑料帽外的包装薄膜，稳妥安装塑料帽在胃镜先端部。⑤将牵引钢丝拉紧，固定于旋转手柄上。⑥将辅助吸管固定于旋转手柄上。

1.2.3 套扎 进镜至食道下段，视野不清时用去甲肾上腺素稀释液通过辅助吸管注入食道至观察清楚，结扎的顺序是先结扎出血的静脉，自齿状线上螺旋式自下而上逐条结扎曲张静

(下转1142页)

作者简介：李向红(1970－)，女，湖南省岳阳市人，主管护师。电话：(023) 68754678

收稿日期：2001-06-02；修回日期：2001-08-15

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