DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.01.001

重组人白细胞介素-4对几类损伤时受损小肠粘膜免疫功能的促恢复作用*

论著

艾国平** 粟永萍 刘晓宏 程天民 冉新泽 (第三军医大学预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所)重庆,400038

提要 目的:探讨重组人白细胞介素-4(rhIL-4)对放射损伤合并烧伤时肠粘膜免疫功能障碍的调节作用。方法:采用小鼠15%的Ⅲ度烧伤、8 Gy放射损伤及两伤复合的动物模型,用免疫酶联吸附、免疫组化和细菌培养等方法,观察了rhIL-4对肠道粘膜免疫的调控作用。结果:rhIL-4能增加小肠固有层中分泌IgA的浆细胞数量,提高肠粘液中sIgA的含量,降低肠源性感染的发生。结论:rhIL-4对恢复肠道粘膜免疫功能,降低肠源性感染的发生是有效的。

关键词 放烧复合伤;肠粘膜免疫;白细胞介素-4;浆细胞;肠源性感染
中图法分类号 R818.8

肠道淋巴组织不仅是机体系统免疫的重要组成部分,而且与呼吸道、泌尿生殖道及某些外分泌腺(如唾液腺、乳腺等)等的粘膜下淋巴组织共同构成一个相对独立的粘膜免疫系统,在保护肠道免受细菌、病毒等微生物的粘附和入侵,阻止异物的吸收,起着第一道防御的作用[1]。烧伤后肠粘液中sIgA的减低是导致肠源性感染的一个重要因素[2]。淋巴细胞对辐射具有高度敏感性,在放射损伤合并烧伤的条件下肠相关性淋巴组织更易受损,肠源性感染的发生更为严重[3]。如何促进损伤后粘膜免疫功能的恢复,降低肠源性感染的发生,本文进行了以下研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物

昆明种健康雄性小鼠110只,体重20~25 g,由本校实验动物中心提供。

1.2 致伤与分组

用^{60}Coγ射线全身一次照射8 Gy(照射量率为56.3~58.2 cGy/min)致急性放射损伤;用3%凝固汽油燃烧背部皮肤致15%的Ⅲ度烧伤(病理切片证实);烧后30 min内照射致放烧复合伤。实验设正常(N)、放射(R)、烧伤(B)、复合伤(C)等4个对照组和放射防治(RT)、烧伤防治(BT)、复合伤防治(CT)等3个防治组。每组设6 h和72 h 2个时相点。防治组6 h取材者于伤前2、1、0 d腹股沟皮下注射1次IL-4 0.05 ml(6 000U);72 h取材者伤后连续给药3 d,正常对照组注射等量生理盐水。每组5~8只动物。

1.3 检测指标和方法

1.3.1 肝(L)、脾(S)、肠系膜淋巴结(MLN)细菌培养 用LB和麦康凯培养基,37℃孵育24 h计数菌落数量。

1.3.2 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 pH9.6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,100μl/孔,4℃过夜。倒弃包被液,PBS-Tween20 pH7.4洗涤3次,每次3 min(以下简称洗涤);加入0.01 mol/L pH7.4含10%小牛血清的PBS-Tween20封闭液室温封闭30 min,200μl/孔,洗涤;加入1∶100的待测粘液,100μl/孔,37℃孵育1 h,洗涤;加入1∶2 000的羊抗鼠IgA抗体-HRP交联物,100μl/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 50μl中止反应,立即在Bio-Rad酶标仪上读取D_x值,波长为495 nm,以包被液作空白对照,PBS pH7.4(10%小牛血清)作阴性对照。

1.3.3 卷肠切片,浆细胞免疫组化观测 按S-P试剂盒说明改进后进行,光镜观察、照相,计数10根绒毛中的浆细胞数,换算出平均每根绒毛内的浆细胞数(以正常组为100%进行比较)。

1.3.4 统计学处理 用哈佛统计软件,进行双因素方差分析及均数间的显著性差异检验。

1.4 试剂来源

rhIL-4由军事科学院八所朱厚础教授提供;羊抗鼠IgA及羊抗鼠IgA辣根过氧化酶交联物购自Sigma公司,S-P试剂盒购自迈新公司。

2 结果

2.1 伤后用rhIL-4防治肠道移居细菌培养结果

放射损伤、烧伤及复合伤均可导致肠道细菌移居,以复合伤最为严重,放射损伤次之,烧伤较轻;在肝脏、脾脏和肠系膜淋巴结中,以肠系膜淋巴结细菌移居数量最多;肝脏最少;用rhIL-4防治后细菌的移居数量较未防治对照组明显减少($P<0.01$),表明rhIL-4能有效地降低肠道细菌移居,见表1

* 国家自然科学基金资助项目,No.39670289 全军"九五"指令性课题
** 艾国平 女,28岁,助教,博士研究生
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1 肝、脾、肠系膜淋巴结细菌培养结果 (菌落 /克)

Tab 1 Colony counter of translated bacteria in L, S MLN (colony/g)

Group	6 h			72 h		
	L	S	MLN	L	S	MLN
B	1178± 183	2119± 238	3561± 159	882± 60	1140± 66	1954± 132
BT	211± 19**	302± 7**	808± 36**	100± 9**	273± 19**	349± 22**
R	1674± 187	1696± 100	3226± 98	932± 40	1408± 100	2078± 102
RT	194± 9**	291± 13**	821± 17**	92± 8**	317± 24**	379± 12**
C	3897± 123	5196± 204	9180± 393	1866± 332	2259± 137	3471± 193
CT	814± 44**	332± 14**	915± 48**	387± 12**	1025± 53**	771± 23**

** : $P < 0.01$ *vs* relative untreatment groups

2.2 小肠粘液中 sIgA的变化

伤后 6 h和 72 h,小肠粘液中 sIgA的 D_A 值均降低,与正常对照比较相差非常显著 ($P < 0.01$);而用 rhIL-4防治后 sIgA的 D_A 值较各组对照组明显升高 ($P < 0.01$),见表 2

2.3 小肠 IgA免疫组化观测

用 IgA单抗可特异显示分泌 IgA的浆细胞,与 IgA起反应的浆细胞主要分布于小肠固有层和淋巴滤泡中,呈棕褐色颗粒状,见图 1 伤后 6和 72h,浆细胞数量明显减少,见图 3;而用 IL-4防治后浆细胞数量明显增多 ($P < 0.01$),见表 3,图 4,阴性对照未见阳性信号,见图 2

表 2 小肠粘液中 sIgA变化的比较 (%)

Tab 2 The change of sIgA in small intestine(%)

Groups	6 h	72 h
B	48.3± 6.2**	57.8± 4.5**
BT	84.5± 9.8△△	101.7± 5.6△△
R	52.3± 4.9**	61.7± 3.3**
RT	90.4± 0.89△△	106.1± 10.7△△
C	59.6± 7.2**	57.0± 11.7**
CT	104.4± 6.4△△	106.1± 8.7△△

The D_A of sIgA in normal group is 0.465± 0.04;** : $P < 0.01$ *vs* normal group;△△: $P < 0.01$ *vs* relative no treatment groups



图 1 正常小肠固有层 IgA的浆细胞 (S-P× 100)

Fig 1 Secretory-IgA plasma cells in the normal intestinal lamina propria(S-P× 100)

图 2 免疫组化的阴性对照 (S-P× 100)

Fig 2 Negative control of immunohistochemistry(S-P× 100)

图 3 放射损伤后浆细胞数量明显减少 (S-P× 100)

Fig 3 Secretory-IgA plasma cells reduced after radiation(S-P× 100)

图 4 用 IL-4治疗后浆细胞数量增加 (S-P× 100)

Fig 4 Secreatory-IgA plasma cells increased when treated with rhIL-4(S-P× 100)

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

表 3　小肠固有层浆细胞数量变化的比较(%)

Tab 3　The change of plasma cells in lamina propia of small intestine (%)

Group	6 h	72 h
B	46.1±4.5**	53.2±4.1**
BT	76.1±6.2**△	93.5±7.7**△
R	43.2±4.5**	54.4±4.7**
RT	75.0±4.5**	35.5±7.1**△△
C	34.1±4.0**	46.1±5.9**
CT	70.1±5.7**	80.5±6.5**△△

The numbers of plasma cells in normal group are 17.25 ± 1.85;* : $P < 0.05$,** : $P < 0.01$ *vs* normal group; △: $P < 0.05$, △△: $P < 0.01$ *vs* relative no treatment groups

3　讨论

本实验证实,烧伤、放射损伤及放烧复合伤能导致肠道细菌发生移居,细菌的移居与肠道肠粘液中 sIgA的降低密切相关;肠上皮细胞及肠道淋巴组织均对辐射具有高度辐射敏感性,与单纯烧伤相比,放射损伤和放烧复合伤肠上皮损伤更为严重,加之射线对淋巴细胞的直接抑制,肠道淋巴细胞数量减少,相应合成分泌 IgA的浆细胞数量也减少,sIgA含量降低,肠源性感染加重。经 rhIL-4防治后增加了肠固有层中分泌 IgA的浆细胞数量,提高了粘液中 sIgA的含量,降低了肠源性感染的发生率,减轻了感染程度,表明 rhIL-4可促进受损的肠粘膜免疫功能的恢复,减少肠源性感染的发生。

浆细胞分泌的二聚体 IgA与上皮细胞分泌的 SC片段结合为 sIgA,是外分泌液抗体中的主要组成成分,由于其不易被一般的蛋白酶破坏,与粘液、多种酶、蛋白质等在呼吸道、肠道、泌尿道、生殖道的表面形成一道天然的保护屏障,在对抗感染、肿瘤、过敏及某些肠道疾病的发生发展中起重要作用[4]。IgA由浆细胞合成分泌,浆细胞由 B淋巴细胞增殖、分化而来,B淋巴细胞的增殖、分化受 T细胞及其分泌的多种细胞因子如 TGF-β、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6及 IL-10等的调控[1,5]。其中 IL-4具有特殊重要的作用。IL-4是 1982年 Howard[6]发现 T细胞培养上清中有一种促进 B细胞增殖的因子,称 B细胞生长因子-1(BCGF-1),1986年被正式命名为 IL-4。Murray等[7]报道在体外培养的 B细胞中单独加入 IL-4并不能增加 IgA的量,但可促进淋巴细胞的转换;在加入 IL-5的条件下可使 IgA的分泌量提高 4~5倍。机体在损伤的情况下由于淋巴细胞受损,其分泌的细胞因子相对减少,给予机体补充一些必需的细胞因子,有利于机体内细胞因子之间的相互作用。有学者报道 IL-4能通过激活酪氨酸蛋白激酶的途径促进上皮细胞株(HT29)分泌多聚 IgA受体—SC片段,形成 sIgA[4]。我们给予小鼠体内注射 rhIL-4可增加固有层中浆细胞的数量,粘液中 sIgA的含量也提高,表明 IL-4在调节淋巴细胞增殖和分化以及形成 sIgA的过程中起着重要的作用,其具体的机理尚有待于进一步阐明。

参考文献

1 Brandtzaeg P. The Role of humoral mucosal immunity in the induction and maintenance of chronic airway infections. Am J Respir Crit Care Med, 1995, 151(4): 2081

2 白晓东,粟永萍,刘贤华.严重烧伤后粘液成份的改变及其与肠源性感染的关系. 中华整形烧伤外科杂志, 1996, 12(2): 90

3 艾国平,粟永萍,刘晓宏,等.放射损伤合并烧伤后肠源性感染发生特点的实验研究.第三军医大学学报, 1997, 19(5): 17

4 Gerene M Denning. IL-4 and INFγ Synergistically Increase Total Polymeric IgA Receptor Levels In Human Intestinal Epithelial Cells. the Journal of Immunology, 1996, 156(4): 4807

5 Brandtzaeg P. Molecular and aspects of the secretory immunoglobin system. APMIS, 1995, 103(1): 1

6 Howard M. Identification of a T cell derived B cell growth factor distinct from interleukin-2. J Exp Med, 1982, 15(3): 914

7 Murray P D, Bouglas T, Susan L, *et al*. Interleukin 5 and 4 produced by Peyer's Patch T cells selectively enhance IgA expression. J Immunol, 1987, 139(8): 2669

(收稿: 1998-05-26;修回: 1998-12-11)

(编辑　冷怀明)

Recovery of impaired intestinal mucosal immune function by recombinant human interleukin-4 in several types of injuries in mice*

Ai Guoping, Su Yongping, Liu Xiaohong, Chen Tianmin, Ran Xinze (Department of Radiation Medicine, Faculty of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract　Objective: To investigate the regulative effects of recombinant human interleukin-4 (rhIL-4)

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39670289

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

on intestinal mucosal immune dysfunction after radiation, burn and combined radiation-burn injuries. **Methods**: After the models of 15% TBSA full-thickness skin burn, 8Gy-radiation and combined radiation-burn injuries were established in mice, the regulative effects of rhIL-4 on intestinal mucosal immune dysfunction were observed with immunohistochemistry, ELISA and bacterial culture. **Results**: rhIL-4 increased the number of IgA-secreting plasma cells in the lamina propria and quantity of mucous sIgA and reduced the incidence of enterogenous infection. **Conclusion**: rhIL-4 is effective for promoting the recovery of mucosal immune function and decreasing the incidence of enterogenous infection.

Key words combined radiation-burn injury; intestinal mucosal immune; recombinant human interleukin-4; sIgA; plasma cell; enterogenous infection

个案与短篇

小儿重症肌无力危象误诊 1例

A case of myasthenia cravis crisis misdiagnosed in childhood

桂 芹* (第三军医大学附属西南医院儿科) 重庆, 400038

患儿男, $1^3/_{12}$,因全身发绀和突然意识丧失半小时入院。无误服药物史,既往无惊厥病史,无感冒发热病史,间断服用鱼肝油和钙剂。入院查体: 体温 37.6℃,脉搏 128次/min,呼吸 24次/min。发育营养正常,意识不清(压眶有反应)。唇周发绀,全身皮肤发绀,未见明显黄染和皮疹。咽微充血,扁桃体不肿大,颈软,心腹未见异常,呼吸浅表,呼吸呈叹息样呼吸,肺部闻及痰鸣音,未闻及干湿罗音。克氏征、布氏征阴性,巴彬氏基征阴性。化验检查: 血、尿、大便常规正常; 血生化: 血糖正常,血钙 2.03 mmol/L,血磷 2.70 mmol/L,肾功能检查正常,腰穿检查和头部 CT检查未见异常。心电图检查: 窦性心动过速。考虑为低钙抽搐。给予吸氮、吸氧, 10%葡萄糖酸钙和地塞米松以及抗炎药物治疗。入院后 30 min患儿清楚,神萎,无明显发绀。入院后 2 h患儿突然出现呼吸骤停,意识丧失,口唇及全身发绀,由 120次/min逐渐下降到 50次/min,立即给予吸痰,胸外按压,口对口人工呼吸,阿拉明和山梗茶碱静脉推注。仔细追问病史,患儿于生后 8月发现左眼不能完全睁开,夜间明显,晨起时稍好转。在儿童医院诊断为重症肌无力,给予吡啶斯的明口服至今。入院前漏服一次吡啶斯的明。查体: 患儿四肢肌无力,腱反射消失。根据病史、诊断患儿为重症肌无力危象。立即给予新斯的明 0.4 mg肌注,氢化可的松静滴。患儿呼吸、心率逐渐恢复,意识清醒。第 2天改用吡啶斯的明口服和氢化可的松静滴。查血免疫球蛋白: IgG 4.67 g/L, IgA: 0.67 g/L, IgM: 1.48 g/L。胸部 CT: 胸腺肿大,胸腺增生,胸腺瘤待排。用上述药物继续治疗 7 d后患儿病情好转出院。建议其坚持口服吡啶斯的明,转胸外科作胸腺切除术。

讨论

重症肌无力是一种神经肌肉接头间递质功能障碍的慢性病。现已明确,其发病是对突触后乙酰胆碱(Ach)受体的自身免疫所致[1]。重症肌无力儿童型最常见,发病年龄高峰在生后第二年及第三年,发病最小年龄为 6月[2]。重症肌无力危象诱因常有反复感染、创伤、精神打击,低钠血症,脱水酸中毒或不规则用药史,主要表现为呼吸肌无力所致的严重呼吸功能不全状态,或因声带外展力弱所出现的发作性青紫及喘鸣而导致呼吸衰竭。而表现为突然呼吸停的病例少见。本例患儿发病年龄较小,生后 8个月出现症状,原用吡啶斯的明,此次发生危象的诱因仅因发病前一天漏服一次抗胆碱酯酶药物,未有明显感染、创伤病史,使机体乙酰胆碱水平下降,从而导致神经肌肉接头处乙酰胆碱量减少,先引起呼吸衰竭。出现低氧血症,全身发绀,意识不清,经急救吸氧后以及地塞米松静滴后,虽未服抗胆碱酯酶药物,但患儿呼吸逐渐恢复正常,神志清楚,缺氧改善,无进行性呼吸困难,考虑可能与给予地塞米松治疗有关,但终因未及时补充抗胆碱酯酶药物,导致呼吸骤停,因此提高对本病例的认识是重症肌无力危象抢救成功的关键。

关键词 重症肌无力; 误诊

中图法分类号 R746.1

参考文献

1 张 澍 主编. 现代儿科学. 北京: 人民军医出版社, 1998. 706~708

2 吴瑞萍, 胡亚美, 江载芳 主编. 诸福棠实用儿科学. 北京: 人民卫生出版社, 1996. 1729~1732

(收稿: 1998-10-10; 修回: 1998-12-01)

(编辑 冷怀明)

* 桂 芹, 女, 34岁, 主治医师, 硕士

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