DOI:10.16016/j.1000-5404.1998.04.001

小鼠全身辐射后对小肠上皮内淋巴细胞形态及功能的影响*

论著

徐 辉** 程天民 粟永萍 肖桃元*** 林 远 艾国平 (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**:探讨放射损伤对肠粘膜免疫的影响。**方法**:小鼠全身照射12 Gy为模型,于照后8、24、48 h取材光电镜观察,同时分离全小肠上皮内淋巴细胞(IEL),检测其细胞增殖活力、细胞毒力,并检测IEL培养上清中TNF-α、TGF-β浓度的变化。**结果**:①12 Gy全身照射引起IEL数量减少,变性坏死的IEL能够造成相紧贴的肠上皮细胞损害。②12 Gy全身照射后IEL增殖活力和细胞毒力下降。③12 Gy全身照射后IEL分泌TNF-α、TGF-β增多。**结论**:12 Gy全身照射引起肠粘膜免疫功能下降,导致肠道屏障功能削弱。

关键词 放射损伤;肠粘膜;小肠上皮内淋巴细胞
中图法分类号 R818.023

肠上皮内淋巴细胞(Intraepithelial lymphocyte, IEL)是粘膜免疫系统中与肠腔内抗原发生最直接接触的免疫细胞,与肠上皮细胞之间存在相互的免疫生理调节,这使其在粘膜免疫中发挥着独特的作用[1]。包括放射损伤在内的多类损伤及粘膜疾病都能够造成肠粘膜结构的破坏,导致肠源性感染的发生。肠上皮干细胞及肠壁淋巴细胞本身都是辐射敏感细胞。在放射损伤时小肠粘膜免疫系统的IEL数量及功能状态的变化还不很清楚。本实验以小鼠12 Gy全身辐射为模型,研究全身辐射对小肠IEL形态、数量及功能的影响。

1 材料与方法

1.1 动物

昆明种雄性小鼠,体重20 g±5 g,本校实验动物中心提供。

1.2 照射和实验条件

$^{60}Co\gamma$射线照射源,剂量率0.589 Gy/min,12 Gy全身照射,照后自由进水食,照后8、24、48 h 3个时相点取材。

1.3 试剂

Percoll购自Pharmacia,PMA购自Sigma公司,anti-CD_3购自宝灵曼公司,TNF-α检测试剂盒购自北京军事医学科学院,LDH试剂盒购自宝灵曼公司。

1.4 小肠粘膜IEL计数及电镜观察[2]

小鼠活杀在距屈氏韧带下5 cm处剪取2 cm肠段,分别用10%中性福尔马林、3%戊二醛固定。光镜下观察HE染色的小肠横截面,高倍镜下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/100个肠上皮细胞。

1.5 小肠上皮内淋巴细胞的分离

参照Mosley法[3]并加以改进,主要分3个步骤进行,即分离肠组织、粘膜层细胞的分离、从肠上皮细胞中分离IEL。同法分离正常小鼠全小肠IEL,RPMI 1640调为2×10^6/ml。

1.6 IEL增殖功能测定[4]

2×10^6/ml IEL 100 μl加入96孔平底培养板内,重复3孔,加入PMA 5 ng复合rhIL-2 2500U/ml刺激培养,每孔总体积200 μl。其培养和测定方法见文献[4],结果以每孔每分钟计数来表示IEL受刺激后的增殖活力。

1.7 IEL细胞毒功能测定[5]

各组分离的IEL调整到2×10^6/ml加入Anti-CD_3(1 μg/ml)诱导培养48 h,96孔平底培养板每孔加靶细胞100 μl(含Raji细胞1×10^4个/孔),按效靶比(10~50):1的比例加100 μl IEL细胞悬液,重复3孔。加完将培养板放在37℃5% CO_2培养箱中孵育4.5 h,最大释放孔加入100 μl含2% Triton X-100的培养基,自发释放孔加入100 μl培养基代替。注意为保证实验结果的准确性,对每一效应细胞浓度都设有自发释放对照组。反应结束后,培养板在250 g离心10 min将细胞沉淀,每孔吸上清100 μl转入另一96孔板中,采用LDH测定来反映细胞毒力,LDH试剂盒购自宝灵曼公司,按说明书操作。反应结束后在492nm酶标仪测定每孔吸光度(D_λ值),以特异释放率来表示细胞毒力大小。按下列公式计算特异释放率:

$$\text{特异释放率}(\%)=\frac{\text{特异性释放 } D_\lambda-\text{自发性释放 } D_\lambda}{\text{最大释放 } D_\lambda-\text{自发性释放 } D_\lambda}\times100$$

1.8 IEL培养上清中TNF-α和TGF-β含量的测定

同时收集(PMA5ng+rhIL-2 2500 U/ml)刺激培养后72 h的培养上清,离心后装入EP管,作好标记,封口胶封口,-70℃冰箱保存,用于细胞因子检测。TNF-α含量测定采用ELIAS试剂盒,按说明书进行。TGF-β含量的检测采用CCL-64细胞生长抑制法[6]。

1.9 统计学分析

所有数据均以$\bar{x}\pm s$表示,以t检验进行统计学处理。

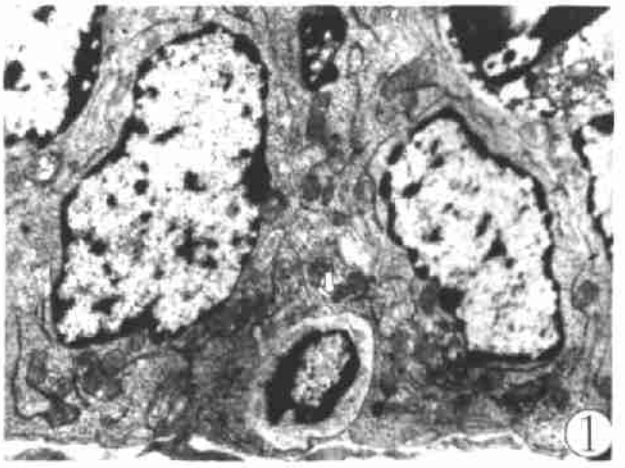
* 全军"九五"指令性攻关项目,No. 96L045
** 徐辉,女,34岁,讲师,博士 *** 基础医学部中心实验室

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

2 结果

2.1 辐射对小肠粘膜IEL形态及数量的影响

电镜观察见正常小鼠IEL位于肠上皮细胞之间，靠近基底部，细胞某些部分与上皮细胞呈犬牙交错状，但两种细胞分界清晰，胞膜没有融合。12 Gy照射后8 h见有的IEL发生变性坏死，而此时肠上皮细胞整体上仍保持相对正常的超微结构，见图1。局部放大后见IEL核异染色质边集，部分核膜溶解，淋巴细胞局部有芽突形成突入肠上皮细胞内一侧胞膜溶解，与该侧相紧贴的肠上皮细胞胞膜也有消融现象，使两种细胞的胞浆在该处融接，详见图2。



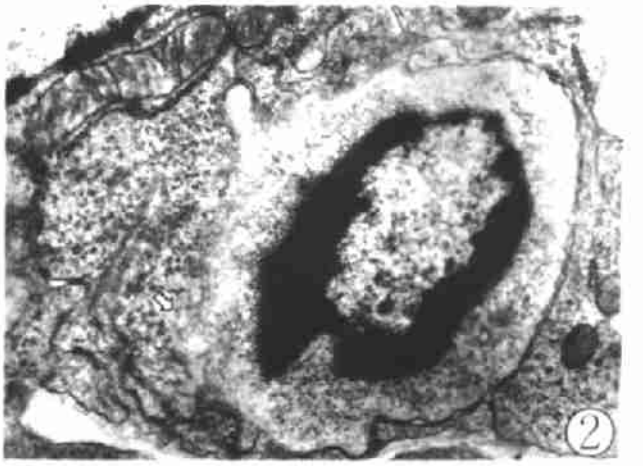


图1 12 Gy照射后8 h肠上皮内淋巴细胞变性坏死 (TEM×5 000)

Fig 1 Degeneration and necrosis of IEL at 8 h after 12 Gy whole body Y-ray irradiation (TEM×5 000)

图2 图1局部放大 (TEM×15 000)

Fig 2 Local amplification of Fig 1 (TEM×15 000)

12 Gy全身辐射后小鼠小肠粘膜IEL计数呈明显的下降趋势，见图3。照后8 h即下降，48 h达低值为正常对照值的43.29%($P<0.01$)；72 h因肠粘膜上皮细胞坏死脱落严重，粘膜层不完整不能准确计数。伤后72 h开始出现小鼠死亡并进入死亡高峰，96 h后全部死亡。

2.2 辐射对小肠IELs增殖活力、细胞毒力及TNF-α和TGF-β分泌的影响

小鼠受到12 Gy全身辐射后小肠IELs增殖活力及细胞毒力受到明显抑制，表现为伤后8 h下降，48 h达低值。伤后72 h因小肠粘膜上皮细胞坏死脱落严重，无法获得足够量的IELs，故无相应数据。IELs自身分泌TNF-α和TGF-β却有增高趋势，表现为伤后8 h升高，48 h达峰值，见附表。

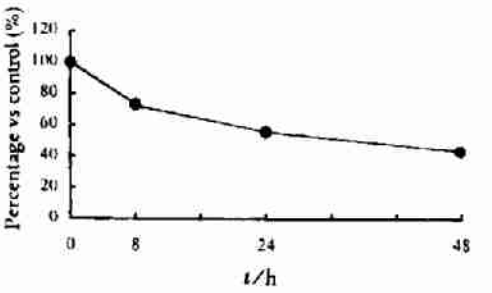


图3 伤后小肠粘膜IELs计数的变化

Fig 3 Changes of IELs counts after 12 Gy whole body ^{60}CoY-ray irradiation

附表 伤后小肠粘膜IEL功能的变化

Table Changes of IELs functions after 12 Gy whole body ^{60}CoY-ray irradiation

Duration after irradiation(t/h)	n	Proliferation activity (A/Bq)×10^3	Cytotoxic activity(20∶1)(%)	TNF-α(ρ_B/ng·ml^{-1})	TGF-β(ρ_B/ng·ml^{-1})
Control	8	5313±491	46.85±7.61	0.97±0.16	0.68±0.19
8	5	3886±204	33.65±7.52	2.23±0.47*	1.55±0.72*
24	5	2456±151*	18.65±9.61*	2.06±0.30*	2.68±0.63*
48	5	1653±248*	17.36±8.93*	3.21±0.30*	3.24±0.41*

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control

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

3　讨论

肠道不仅是消化器官，同时又是淋巴细胞含量最多的脏器。肠上皮细胞和肠壁淋巴细胞均为辐射敏感细胞。IEL 来源于骨髓造血干细胞和小肠 PP 的淋巴细胞前体[7]，肠粘膜内 IEL 数量减少，可由于来源减少和在上皮层内破坏两方面因素所引起。

电镜观察发现正常肠上皮细胞与 IEL 常紧密相贴，有些部分呈"犬牙交错"状，IEL 可有"牙突"状突起伸入上皮细胞内，这成为两种细胞间进行信息和物质交流的超微结构基础。12 Gy 照射后发现坏死的 IEL 一侧核膜、胞膜消失，该处的上皮细胞膜也消失，两者胞浆相融接，而上皮细胞的整体超微结构仍保持基本正常的状态，这种现象提示照射后 IEL 在受损害以至坏死的过程中，对相紧贴的上皮细胞施加了有害的影响（局部胞膜消溶）。

IEL 具有两方面的功能：①受各种刺激后发生增殖并引发细胞因子的分泌，通过细胞因子起作用；②通过其自身的细胞毒性作用保护粘膜免受病原菌的侵害[8]。目前尚未见到整体照射对 IEL 功能影响的研究报道。淋巴细胞的增殖能力是其功能的重要表现形式，T 细胞受有丝分裂原、细菌抗原等刺激发生增殖反应，并分化为效应细胞的过程多伴随着细胞因子的分泌。IEL 的细胞毒作用是其抗感染的重要手段之一。细胞毒性功能的下降会导致 IEL 对抗外来细菌、病毒和抗原入侵的能力下降[9]。本实验发现，12 Gy 全身辐射引起 IEL 增殖活力和细胞毒力的明显下降，都表现出照后 8 h 下降，到 48 h 达低值，表明射线引起 IEL 增殖和细胞毒能力的抑制。

T 细胞在增殖过程中能够分泌多种细胞因子，这些细胞因子是 T 细胞免疫生理调节功能得以实施的物质基础。射线损伤引起 IEL 细胞因子分泌的改变，必然会影响到粘膜免疫状态以及对肠上皮细胞的生理调节功能。在本实验中观察到 12 Gy 全身辐射引起小鼠小肠 IEL 培养上清中 TNF-α 和 TGF-β 因子分泌增多，以伤后 48 h 达高峰。IEL 能够分泌多种细胞因子包括 IL-2、IL-3、IL-5、IL-6、GM-CSF、IFN-γ、TNF-α 和 TGF-β 等，这些细胞因子可以起多种作用，归结为两个方面：①作用于粘膜免疫系统，刺激淋巴细胞的增殖并指导 B 细胞的分化，尤其是 sIgA 的合成和装配；②作用于肠上皮细胞，调节其增殖和分化以及 MHC-II 的表达，并能够影响肠上皮细胞的生理特性以及吸收、转运功能[10]。TGF-β 刺激肠上皮细胞分泌 IL-6，IL-6 是吸引淋巴细胞向上皮层移居的趋化因子[11]，由此推测放射损伤后 IEL 培养上清中 TGF-β 增多可能是一种自身的补偿作用，籍以吸引淋巴细胞向上皮层移居，以改善射线造成的 IEL 减少。

全身照射细胞功能改变，主要是射线对细胞直接和间接作用的结果。射线是通过哪些途径影响 IEL 的增殖和细胞毒力，目前尚无研究报道。射线的电离作用造成细胞 DNA 合成受抑是可能的原因之一，另外射线造成的 T 细胞膜表面活性分子表达的改变也是引起增殖受抑的可能因素[12]。IEL 数量的减少，必然会导致肠上皮 IEL 整体功能的削弱，从而影响肠上皮的屏障功能。因此，受照后 IEL 数量减少和功能受损是全身放射损伤时肠道屏障功能削弱的重要原因之一。

参考文献

1 McGowan I, Anthony C, Graham-Radford S *et al*. Advances in mucosal immunology. Gastroenterol Clin North America, 1997; 26(2): 145

2 Ferguson A, Murray D. Quantitation of intraepithelial lymphocytes in human jejunum. Gut, 1971; 12(10): 988

3 Mosley R L, Klein J R. A rapid method for isolating murine intestinal intraepithelial lymphocytes with high yield and purity. J Immunol Methods, 1992; 156(1): 19

4 徐　辉，程天民，粟永萍. 放射损伤小鼠小肠上皮内淋巴细胞增殖活力变化的实验研究. 第三军医大学学报，1998; 20(3): 187

5 Guy-Grand D, Malassis-Seris M, Briottet C *et al*. Cytotoxic differentiation of mouse gut thymodependent and independent intraepithelial T lymphocytes is induced locally: Correlation between functional assays presence of perforin and granzyme transcripts and cytoplasmic granules. J Exp Med, 1991; 173(6): 1549

6 虞冠华，许祥裕，丁树标. 转化生长因子-β 的测定. 上海免疫学杂志，1995; 12(2): 116

7 Peter B E, Befus A D, Bienenstock J. Leukocytes in the intestinal epithelium: an unusual immunological compartment. Immunol Today, 1986; 7(1): 50

8 Goodman T, LeFrancois L. Intraepithelial lymphocytes: Anatomical site, not T cell receptor form, dictates phenotype and function. J Exp Med, 1989; 170(5): 1569

9 Evans C M, Phillips A D, Walker-Smith J A *et al*. Activation of lamina propria T cells induces crypt epithelial proliferation and goblet cell depletion in cultured human fetal colon. Gut, 1992; 33(2): 230

10 Lionetti P, Breese E, Braegger C P *et al*. T-cell activation can induce either mucosal destruction or adaptation in cultured human fetal small intestine. Gastroenterology, 1993;

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

105(2):373

11 McGee D W, Beagley K W, Aicher W K *et al*. Transforming growth factor-β and IL-1 act in synergy to enhance IL-6 secretion by the intestinal epithelial cell line IEC-6. J Immunol, 1993;151(2):970

12 闵 锐,程天民,罗成基等.电离辐射对人T淋巴细胞TCR、CD_3、CD_{18}及CD_{25}表达的影响.第二军医大学学报,1994;15(5):417

(收稿:1998-03-05;修回:1998-06-15)

(编辑 张大春)

The effects of 12 Gy whole body irradiation on small intestinal intraepithelial lymphocyte characters and function*

Xu Hui, Cheng Tianmin, Su Yongping, Xiao Taoyuan, Lin Yuan, Ai Guoping (Research Institute of combined Injury, Faculty of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To explore the characteristics of intestinal mucosal immunity after radiation injury. **Methods**: Kunming strain mice were given whole body irradiation of γ-ray from ^{60}Co of doses 12 Gy. 8、24、48 h after irradiation were the time points of observation. **Results**: ① Number of IEL in small intestinal mucosa of irradiated mice decreased from 8 h. The intestinal epithelial cell just contacted with the damaged IEL become degenerated. ② The proliferation and cytotoxic activity of IEL were significantly decreased from 8 h, reaching lowest level at 48 h post-irradiation. ③ The TNF-α and TGF-β concentrations of the supernatant of cultured IEL isolated from irradiated mice were elevated at 8 h, reaching the peak at 48 h. **Conclusion**: The results indicated that the function of intestinal mucosal immunity barrier was seriously damaged by 12 Gy whole body irradiation injury.

Key words radiation injury; intestinal mucosal immunity; intraepithelial lymphocyte

* This project was supported by the "Ninth five" obligatory budget of PLA, No. 96L045

经纤维支气管镜取出支气管内铁钉一例

个案与短篇

Removal of foreign body (a nail) in the bronchus with fiberoptic bronchoscope——A case report

刘 平* 熊 玮 沈渝菊 (第三军医大学附属西南医院呼吸内科) 重庆,400038

患者男,29岁,纤支镜号:4117;因异物吸入反复咳嗽、咳脓痰1年来院门诊。患者1994年10月表演"气功"时吞入铁钉一颗,未吐出,随后出现刺激性咳嗽、痰中带血,纤支镜检见异物位于右主支气管下端,试图取出未成功。随后经常咳嗽,咳脓痰或脓血痰,曾多次到外地治疗无效,建议手术探查,因患者无力承担巨额医疗费而拒绝。1995年9月来我院门诊,胸片提示右肺门下方有一长条形钉状金属异物,次日在常规局麻下经口腔插入Olympus $BF\text{-}P_{10}$型纤支镜,见右主支气管下端内侧壁被一黑褐色异物阻塞管腔约1/2,表面附有灰白色脓苔及肉芽组织,用活检钳钳出少许黑褐色铁锈,异物固定不动,然后用双关节细胞勺轻轻松动铁钉四周,再用鳄嘴型活检钳钳住铁钉近端,随纤支镜一起退出,取出一长7 cm,直径3 mm的异物。

讨论

气管、支气管异物吸入,婴幼儿占90%以上,因配合欠佳,多在全麻下用硬质气管镜取异物[1];而成人异物吸入较少见,术中能与术者良好配合,只要操作熟练,在无特殊异物钳的情况下,用局麻加常规器械互相配合,同样可经纤支镜取出异物,避免开胸手术,减轻病人痛苦和经济负担。

关键词 纤维支气管镜;支气管异物

中图法分类号 R768.13

参考文献

1 尚小邻,林产涛,岳海清等.气管、支气管异物取出术1268例报告.临床耳鼻咽喉科杂志,1997;11(8):361

(收稿:1997-12-12;修回:1998-05-27)

(编辑 汪勤俭)

* 刘平,男,41岁,副主任医师,副教授,硕士

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