DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.03.013

烧伤后肠粘液抑制大肠杆菌粘附肠上皮培养细胞能力下降的研究*

白晓东** (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所) 重庆, 400038
刘贤华 粟永萍 (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: 对烧伤后肠粘液中 IgA下降与肠粘液抗细菌粘附肠上皮的屏障功能变化的关系进行观察。方法: 酶联免疫法检测烧伤后 30 min、1 h、6 h、24 h肠粘液 IgA水平; 采用玻片生长小肠上皮细胞单层培养模型观察大肠杆菌粘附及烧伤后相应各时相肠粘液抗粘附作用。结果: 烧伤后肠粘液抑制大肠杆菌外粘附肠上皮细胞的能力下降且与肠粘液 IgA下降有关。结论: 烧伤造成肠粘液 IgA水平下降与肠粘液屏障功能下降密切相关。

关键词 灼伤; 粘液 IgA; 细菌粘附
中图法分类号 R644

肠道粘液层覆盖于肠腔表面, 构成了阻挡肠腔菌侵入肠壁的首道屏障。烧伤后粘液中 IgA呈下降趋势[1,2], 但这种下降是否造成肠粘液屏障功能下降以至肠上皮细胞表面细菌粘附增多, 是令人感兴趣的问题。本研究利用大鼠小肠上皮细胞体外培养模型对烧伤后不同时相肠粘液屏障作用进行观察, 并分析肠粘液 IgA下降与此变化的关系。

1 材料与方法

1.1 动物分组及烧伤

昆明种健康雄性小鼠 50只, 分设正常对照组 (10只) 及烧伤组 (40只)。采用凝固汽油燃烧法致小鼠 25% TBSAIII度烧伤 (病理切片证实)。烧伤组动物分别于伤后 30 min、1 h、6 h、24 h脱颈活杀, 每次 10只。

1.2 肠粘液提取

参考 Paul等[3]方法加以改良。4℃环境下 (冷室中), 活杀小鼠。取完整小肠; 平铺于滤纸上纵行剖开。用 4℃、0.01 mol/L、pH7.4 PBS液反复冲洗肠腔面, 以除去杂质。用玻片轻刮肠腔表面 (经病理切片证实未伤及肠粘膜), 微量注射器定量吸取刮取物 0.1 ml, 加入 4.9 ml 0.01 mol/L pH7.4 PBS液中充分混匀, 反复低温离心, 取上清。再经 0.22μm滤膜过滤除菌后, 置于 4℃环境中备用。

1.3 肠粘液 IgA含量测定

采用我室方法[1], 经酶联免疫双抗体夹心法测定粘液中 IgA含量, 结果以吸光度值 D_{λ} 半定量表示。粘液标本稀释度为 1:2000, 10% 小牛血清为阴性对照, 底物液 (邻苯二胺-H_2O_2液) 为空白对照。试剂: 包被抗体为羊抗鼠 IgA (Sigma公司), 酶标抗体为羊抗鼠 IgA-HRP (Sigma公司)

1.4 培养小肠上皮细胞被细菌粘附及肠粘液的抗粘附作用

1.4.1 肠上皮细胞单层培养 IEC-6细胞株, 常规传代, 制成细胞悬液后, 使之沿盖玻片生长, 细胞单层长满盖玻片后取出备用。

1.4.2 细菌粘附及抗粘附[4] 大肠杆菌 O_{111} (B4)株增菌至 (10^7~10^8) cfu/ml, 与上述单层培养细胞在 37℃下作用 60 min, 取出盖玻片 PBS液冲洗 10次, 去除未结合的细菌, 固定、甲胺蓝染色。在高倍镜下随机视野计数 200个细胞, 观察被细菌粘附的细胞数 (NA):

$$\text{粘附率} = \frac{NA}{200} \times 100\%$$

平均粘附率为 5次计数粘附率平均所得。

将正常及烧伤后上述制备小肠粘液 1 ml经 1:2稀释后分别与大肠杆菌混合作用 30 min (37℃), 离心收集细菌, 再重复上述粘附过程, 计算平均粘附率。

1.4.3 肠上皮细胞细菌粘附透射电镜观察 取玻片生长的肠上皮细胞, 经与大肠杆菌孵育后, 2.5% 戊二醛固定, 倒置包埋, 切片后 2000EX型透射电镜观察、照相记录。

1.5 数据统计

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPLM软件包中 Fitd fitm程序做方差分析及相关分析。

2 结果

2.1 烧伤后肠粘液 IgA的含量变化

正常对照小鼠肠粘液中 IgA含量为 2.32± 0.29 (D_{λ})。伤后 30 min、1 h、6 h、24 h为 2.51± 0.14 (D_{λ})、1.76± 0.29 (D_{λ})、1.49± 0.18 (D_{λ})、1.06± 0.41 (D_{λ})。其中伤后 1 h、6 h、24 h的水平

* 国家自然科学基金资助项目, No. 392907001
** 白晓东, 男, 28岁, 主治医师, 讲师, 硕士
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

显著低于正常对照组($P < 0.05$)。

2.2　肠上皮培养细胞细菌粘附,见图 1

2.2.1　电镜结果　　在无粘液作用组及正常粘液组,大肠杆菌粘附细胞后,均可导致后者发生变性,甚至胞浆溶解、形成裸核,见图 2

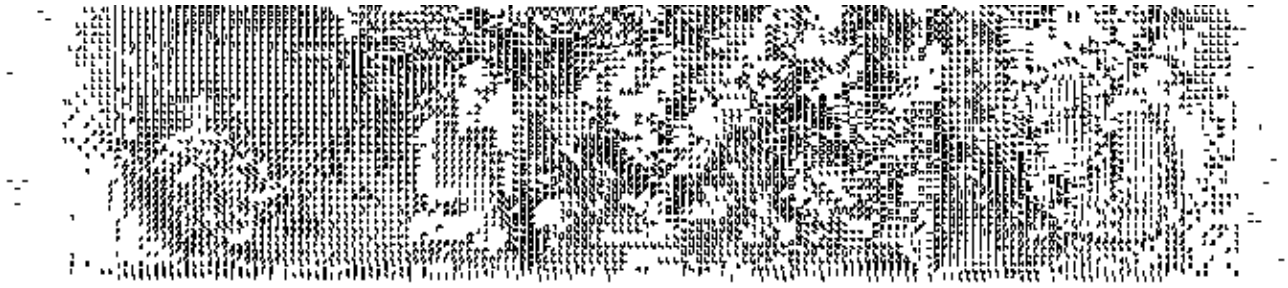


图 1　细菌粘附肠上皮培养细胞　(TEM× 396)

Fig 1　Bacterial adherion of bacteria to cultured intestinal epithelial cells (IEC-6)　(TEM× 396)

图 2　透射电镜示细菌粘附肠上皮细胞　(TEM× 39 000)

Fig 2　Electron micrograph of bacterial adherence with IEC-6 cells　(TEM× 39000)

2.2.2　肠上皮细胞细菌粘附率　　在无粘液作用下,肠上皮细胞细菌平均粘附率(以下简称粘附率)为 0.86± 0.11;经正常对照组肠粘液作用后,粘附率为 0.53± 0.12,低于无粘液作用组;经 30 min、1 h、6 h、24 h粘液作用后,粘附率分别为 0.46± 0.10、0.69± 0.14、0.58± 0.04、0.8l± 0.05 其中伤后 24 h粘液抑制作用最低,粘附率最高(显著高于正常对照组)。

2.3　粘液 IgA含量与粘附率相关分析

相关系数 $r = -0.85$,二者显著负相关 $P < 0.05$,提示粘液中 IgA含量变化与细菌粘附肠上皮有关。

3　讨论

分泌性 IgA存在于粘液中,构成了肠道粘膜免疫的抗体屏障。IgA能中和病毒、毒素和酶等生物活性物质,其最主要的作用是阻止细菌对肠上皮细胞表面的吸附[3]。而细菌一旦粘附细胞后,粘液及 IgA保护作用就不十分明显。IgA含量减少,肠道细菌移位(肠源性感染)发生率升高,提示 IgA含量减少,削弱了 IgA杀菌、抑菌、阻止细菌粘附肠上皮的作用[1,2]。由于体内模型观察细菌粘附肠上皮较困难,本研究利用肠上皮单层玻片培养模型观察细菌粘附及粘液抗粘附作用。虽然目前有关肠粘液分泌性 IgA与肠腔菌之间的作用机制尚未完全阐明[5],但据本实验结果,有一点可以肯定,烧伤造成了肠粘液 IgA水平普遍下降,与此同时体外模型观察肠粘液抑制细菌粘附肠上皮的能力下降,二者烧伤后时相变化相似,且呈相关关系。提示烧伤后肠粘液 IgA下降是造成细菌粘附增多的因素之一。

参考文献

1 白晓东,粟永萍,刘贤华.严重烧伤后肠粘液成份变化与肠源性感染的关系.中华整形烧伤外科学杂志,1996;12(2):91

2 于　勇,田慧民,盛志勇.大鼠烫伤后肠道免疫屏障损伤的实验研究.中华整形烧伤外科学杂志,1996;12(2):87

3 Paul S C, Richard R, Victor J C. Relationship between the mouse colonizing ability of a human fecal E coli strain and it ability to bind a specific mouse colonic mouse gel protein. Infection and Immmun, 1983; 40(1): 62

4 邬光慧,韩志涛,吴　蔚.糖在细菌致病中介导作用的研究:糖对肠道菌粘附和侵袭 Hela细胞的作用.中华微生物学和免疫学杂志,1986;6(5):276

5 Bos N A, Bun J C, Popma S H *et al*. Monoclonal immunoglobulin A derived from peritoneal B cells is encoded by both germ line and somatically mutated V H genes and is reactive with commmensal bacteria. Infect and Immun, 1996; 64(2): 616

(收稿: 1997-03-05;修回: 1997-06-11)

(编辑　汪勤俭)

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

Inhibitory effects of intestinal mucus on bacterial adherence to cultured intestinal epithelial cells after burns*

Bai Xiaodong, Liu Xianhua, Su Yongping (Research Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, 400038)

Abstract Objective: To investigate the relationship between intestinal mucus IgA contents and intestinal mucus barrier change after burns. Methods: Detection of IgA contents at different time phases after burns with ELISA. Bacterial adherence to cultured epithelial cells and intestinal mucus inhibitory effets on it were observed *in vitro*. Results: The intestinal mucus barrier function was declined, which was associated with decrease of intestinal mucus IgA contents after burns. Conclusion: The decrease of intestinal mucus IgA contents is one of the reasons for why the intestinal mucus barrier function is declined after burns.

Key words burns; mucus IgA; bacterial adherence

* This project was support by the National Science Foundation of China, No. 392907001

脱屑性间质性肺炎——附 2例尸检报告

Desquamative interstitial pneumonia Report of two autopsy cases

孔祥英** 欧文振*** (第三军医大学附属西南医院小儿科) 重庆, 400038
陈聪连 刘友生 (第三军医大学基础医学部病理解剖学教研室) 重庆, 400038

脱屑性间质性肺炎(DIP)少见,虽近年来陆续有报道,但因其发病急骤,病情进展快,病死率高且可突然死亡,给临床诊断带来困难。我院近来收治 2例均死亡,现报告如下。

例 1,男性, 80 d,因哭闹 5 h,气促伴发绀 2 h于 1993年 9月 28日 16时入院。患儿于当日上午 11时许吃奶时阵阵哭吵逐渐加重,拒食伴轻咳,约 14时哭闹加剧,出现全身青紫,呼吸急促,冷汗多,哭声渐减弱,即来求治,以"发绀待查"收容。第 1胎第 1产,足月顺产,产重 3. 5 kg

体温 36. 5℃ (肛),呼吸 60次 /min,心率 90次 /min,精神萎靡,反应差,发育营养好。鼻翼扇动三凹症明显,颜面及全身皮肤青紫,唇周发绀,左臂近肘关节处有一直径 0. 5 cm之小脓点,四肢冷,皮肤花斑纹,脉细弱。颈软,双肺呼吸音略粗,未闻及罗音。外周血白细胞 18. 4× 10^9 /L,中性 0. 55,淋巴 0. 45;胸片示双肺纹理增多。

诊断为:① 感染性休克;② 多脏器功能衰竭。立即给以吸氧、抗生素抗炎、抗休克、激素、强心等治疗,病情进行性加重,于当晚死亡。

例 2,男性, 15 d,因咳嗽口吐白沫 1 d于 1995年 1月 29日入院。患儿于入院前 1 d受凉而出现咳嗽、鼻阻、流涕,无发热,腹泻,伴食欲减退。入院当日咳嗽加重、呻吟,口吐白沫,呕吐。第 1胎 1产,足月顺产,产重 2. 5 kg 体温 37. 5℃ (肛),呻吟,全身皮肤无黄染、鼻翼扇动、唇周发绀,呼吸 60次 /min,双肺呼吸音粗,闻及痰鸣及中粗湿罗音,外周血白细胞 15. 0× 10^9 /L,中性 0. 57,淋巴 0. 43

入院诊断为新生儿肺炎伴心衰,经吸氧、抗炎、强心以及能量营养心肌、血管活性药物等治疗,病情渐好转,呼吸困难,肺部罗音消失。但于 2月 5日上午 11时突然出现颜面青紫、唇周发绀,解水样便 1次且出现牙关紧闭、四肢张力增高,全身皮肤发绀,四肢及腹部皮肤呈花斑纹,呼吸 40次 /min,双肺呼吸音粗,未闻罗音,心率 180次 /min 立即给吸氧、地塞米松 1 mg iv 西地兰强心等处理,患儿发绀缓解,面色渐红润,但四肢及腹部皮肤仍呈花斑状,体温 38. 5℃,又解大便 1次,含粘液及少许血性物,白细胞 4~ 5 红细胞 3~ 4 脓球 0~ 1,考虑患儿有消化道感染伴感染性休克,即给予扩容、纠酸、血管活性药物、加抗炎并输血治疗无效,于 2月 6日 6时死亡。

尸检所见:例 1,大体观察:肺呈暗红色,可见弥漫性小出血斑点,质地变硬,切面为暗红色,挤压有血性液体流出。气管粘膜呈暗红色,气管腔内有少量灰黄色液体。镜检见肺充血,肺泡间隔增宽,毛细血管扩张充血,肺泡腔含多量水肿液。脱落的II型肺泡上皮、巨噬细胞,其中部分含有含铁血黄素颗粒,透明膜不典型,肺内支气管型粘膜上皮多呈剥落,充填支气管腔内,有的充填肺泡腔内,部分肺泡腔内可见较多红细胞。病理诊断:脱

(下转 223页)

** 孔祥英,女, 53岁,主任医师,教授 *** 进修生

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