DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.03.001

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*

论著

徐 辉** 程天民 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:探讨辐射损伤对肠粘膜免疫的影响。方法:小鼠分别受 3 Gy、8 Gy、12 Gy全身照射后 8 h至 15 d 6个时相,分离全小肠上皮细胞内淋巴细胞(Intraepithelial lymphocyte, IEL),用佛波酯、ConA联合rhIL-2刺激,以^{3}H-TdR参入的计数值反映增殖活力。结果:① 3种剂量组 IEL增殖活力下降明显,都表现出以伤后 8 h下降,72 h达低值,然后逐渐回升的过程;12 Gy组的抑制出现更早(8 h),程度更重;两种刺激剂的变化态势相同。② 正常小鼠分离的 IEL经体外照射 1 Gy~ 10 Gy亦导致增殖活力下降;3 Gy和 8 Gy同一剂量的整体和离体照射相比较,对增殖活力抑制程度无明显的差异。结论:3种剂量的照射都造成肠粘膜免疫功能的下降,导致肠道屏障功能的削弱。

关键词 放射损伤;粘膜免疫;上皮内淋巴细胞;细胞增殖

中图法分类号 R818.02

肠粘膜免疫在机体抵抗消化道微生物及抗原入侵方面起着十分重要的作用。粘膜免疫系统按其组成成分可分为 3部分:散在于肠上皮细胞间的淋巴细胞(Intraepithelial lymphocyte, IEL),存在于固有层内的淋巴细胞(Lamina propria lymphocyte, LPL),以及位于肠壁的集合淋巴集结(Peyer's patches, PP)。其中 IEL有独特的功能,表现在它既能调节粘膜免疫功能,又能够对肠上皮细胞的增殖以及与免疫相关分子的表达起调节作用[1]。目前对粘膜免疫的研究主要集中在粘膜疾病方面,而对放射损伤下粘膜免疫功能变化迄今国内外尚缺乏整体研究的资料。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

佛波酯(PMA)、ConA和 PHA购自 Sigma公司,Percoll购自 Pharmacia公司,Anti-CD$_3$购自宝灵曼公司。

1.2 动物照射和分组

由本校动物中心提供的健康昆明种小鼠,体重 20 g~ 25 g,随机分为对照组、3 Gy、8 Gy、12 Gy照射组。小鼠装入特制的有机玻璃盒内,放在距源心 1.5 m处,用^{60}Coγ射线进行一次性全身照射,照射剂量率 0.589 Gy/min,照后自由进水食。各剂量组分别于照后 8 h、24 h、48 h、72 h,7 d和 15 d共 6个时相点活杀,取全小肠。

1.3 小鼠全小肠 IEL的分离培养及体外照射

参照 Mosley法[2]并加以改进,分 3个步骤进行,即分离肠组织、粘膜层细胞的分离、将 IEL从肠上皮细胞中分离。按上述方法分离正常小鼠全小肠 IEL,RPMI1640调为 2× 10^6/ml,转入 EP管,封口胶封好,^{60}Coγ射线照射,剂量分为 1 Gy、3 Gy、5 Gy、8 Gy和 10 Gy。

1.4 IEL增殖活力的检测[3,4]

2× 10^6/ml IEL 100μl加入 96孔平底培养板内,重复 3孔,与不同浓度刺激物 PHA, ConA, PMA、rhIL-2单独或联合培养,每孔总体积 200μl,在 37℃ 5% CO_2孵箱内培养 72 h,培养结束前 18 h每孔加入 1μCi ^{3}H-TdR,对照组不加刺激物。用多头细胞样品收集器将细胞收集到 49# 玻璃纤维滤膜上,80℃烤干 30 min,放入闪烁瓶,加 5 ml闪烁液,稳定过夜后,用液闪仪测每分钟计数率。闪烁液配方为 1 000 ml二甲苯中含 PPO 4 g、POPOP 0.1 g。结果以刺激前后每分钟计数的差值率(1 cpm = 24.6 Bq)来表示 IEL受刺激后的增殖活力。

1.5 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。

2 结果

2.1 正常小鼠分离 IEL对几种刺激剂的增殖反应

IEL对各种刺激剂的增殖反应和外周血中的 T细胞存在很大的差异,通过 PHA、ConA、PMA及 rhIL-2 4种因素不同浓度的比较,从表 1看出,PMA 5 ng、ConA 10μg分别复合 rhIL-2 2500 U/ml时,IEL的增殖反应达最大,详见表 1。

2.2 小鼠受 3种剂量全身照射后增殖活力的变化

3种剂量照射后 IEL的增殖活力受到抑制的变化规律基本一致,都表现为先下降后回升的过程。两种刺激剂刺激后在伤后不同时间的变化趋势一致。伤后 8 h即有下降,随后继续下降,至 72 h为最低值,7 d显示回升,15 d接近正常值水平,详见表 2。

2.3 正常小鼠分离的 IEL受体外照射后增殖活力的变化

正常小鼠分离的 IEL在接受 1 Gy的体外照射后其增殖活

* 全军"九五"指令性攻关项目,No. 96L045

** 徐 辉,女,33岁,讲师,博士

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

力下降为对照值的 42.12% ($P < 0.01$),3 Gy~ 10 Gy照射后,增殖活力仅为对照值的 24.15% ~ 8.18%,说明射线引起 IEL损伤是严重的,见表 3 不同剂量的组间比较表明,PMA刺激组 IEL增殖活力的下降 3 Gy明显低于 1 Gy, 10 Gy低于 8 Gy,但在 3 Gy~ 8Gy之间差异不显著。提示 IEL增殖活力与体外受照剂量在一定范围内存在相关性。

为了比较 IEL在体和离体情况下受相同剂量照射后增殖活力变化方面的差异,将整体照射 3 Gy和 8 Gy后 72 h与体外照射 3 Gy和 8 Gy的变化相比较,见表 4 经方差分析比较,发现 ConA[b]刺激组 8 Gy离体照射时的抑制与整体照射相比差异显著($P < 0.05$),余组间差异不明显。比较结果表明 PMA[a]刺激组 3 Gy和 8 Gy照射时,在体和离体间差异并不显著,反映出整体照射已经引起 IEL增殖活性的抑制,离体照射 IEL并不加重这种抑制作用。

表 1 正常小鼠分离的 IELs对各种刺激剂的增殖反应 (cpm△× 10^3)

Tab 1 The effects of several activators to IELs freshly isolated from normal mice (cpm△× 10^3)

activator /incorporation		n	Count× 10^3
	Control	16	160.465± 0.101
IL-2	500 U/ml	5	4.435± 0.458
	1000 U/ml	5	7.398± 1.142
	2500 U/ml	5	23.083± 2.309
PHA	50μg/ml	5	2.822± 0.417
	100μg/ml	5	2.679± 0.696
ConA	5μg/ml	5	2.68± 0.201
	10μg/ml	5	5.960± 1.058
	15μg/ml	5	1.819± 0.456
PMA	5 ng/ml	5	1.42± 0.022
	10 ng/ml	5	1.523± 0.473
	15 ng/ml	5	0.526± 0.103
IL-2 2500 U/ml+	PMA5 ng/ml	5	36.308± 3.353
IL-2 2500 U/ml+	ConA10 ug/ml	5	29.412± 0.831

△: 1 cpm= 24.6 Bq

表 2 不全剂量全身照射 IELs增殖活力的变化 (cpm△× 10^3)

Tab 2 Changes of IELs proliferation activities after whole body irradiation at different doses (cpm△× 10^3)

Group	n	3 Gy		8 Gy		12 Gy	
		PAM[a]	ConA[b]	PMA[a]	ConA[b]	PMA[a]	ConA[b]
Control	10	36.308± 3.353	29.412± 0.831	36.308± 3.351	29.412± 0.831	36.308± 3.353	29.412± 0.831
8 h	5	33.293± 2.813	26.925± 1.677	28.806± 1.016*	22.814± 1.972*	26.562± 1.394*	24.391± 1.431
24 h	5	26.578± 2.147*	24.207± 1.343	26.164± 1.355*	20.943± 1.311*	16.784± 1.030**	14.766± 0.953**
48 h	5	24.228± 1.673*	20.832± 0.946*	16.257± 2.267**	15.704± 1.632**	11.298± 1.694**	7.823± 0.780**
72 h	5	10.545± 1.289**	8.975± 1.714**	7.685± 0.746**	7.954± 1.577**		
7 d	5	26.545± 0.995*	22.555± 1.397*	24.842± 1.375*	19.871± 1.600*		
15 d	5	30.536± 0.804	28.739± 1.040	28.255± 1.393*	21.084± 1.268*		

*: $P < 0.05$,**: $P < 0.01$ *vs* control group; PMA[a] means rhIL-2 2500 U/ml+ PMA 5 ng/ml; ConA[b] means rhIL-2 2500 U/ml+ ConA10μg/ml; △: 1 cpm= 24.6 Bq

表 3 正常小鼠分离的 IELs体外照射增值活力的变化 (cpm△× 10^3)

Tab 3 Changes of proliferation activities of IELs isolated from normal mice after different dose irradiation *in vitro* (cpm△× 10^3)

	n	PMA[a]	ConA[b]
Control	10	36.308± 3.353	29.412± 0.831
1Gy	5	15.293± 1.371**##	8.160± 1.186**##
3Gy	5	8.768± 0.297**#	8.212± 2.400**
5Gy	5	9.043± 1.593**	6.880± 1.554**
8Gy	5	5.805± 1.962**	4.460± 0.841**
10Gy	5	2.971± 0.129**#	1.772± 1.157**#

△: 1 cpm= 24.6 Bq; *: $P < 0.05$,**: $P < 0.01$ *vs* control group;#: $P < 0.05$,##: $P < 0.01$ *vs* previous group

表 4 整体和离体照射后 IELs增殖活性变化比较 (cpm△× 10^3)

Tab 4 Changes of IELs proliferation activities *in vivo* and *in vitro* (cpm△× 10^3)

Dose	n	PMA[a]		ConA[b]	
		in vivo	*in vitro*	*in vivo*	*in vitro*
3Gy	5	10.545± 1.289	8.768± 0.297	8.975± 1.714	8.212± 2.400
8Gy	5	7.685± 0.746	5.805± 1.962	7.954± 1.577	4.460± 0.841#

*: $P < 0.05$ *vs* previous group; △: 1 cpm= 24.6 Bq

3 讨论

肠粘膜屏障是机体对抗肠道微生物及有害物质进入体内的第一道防线,肠粘膜免疫系统主要包含 3个部位,即肠壁淋巴集结、固有层及上皮内淋巴细胞。研究发现粘膜免疫系统中 IEL有非常独特的作用,表现在两个方面: IEL是整个机体免疫系统中与外来微生物及抗原最接近的免疫细胞,也是最先发生免疫反应的细胞; IEL与肠上皮细胞间存在相互的免疫生理调节, IEL功能状态的正常与否直接影响粘膜免疫屏障的完整[5,6]。包括放射损伤在内的多种致伤因素都可能造成肠粘膜免疫屏障的破坏,使机体对病原体和外来抗原的敏感性增加,引起肠源性感染等损害的发生,加重致伤效应或延迟恢复过程。

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[7]。目前尚未见到整体照射对 IEL功能影响的研究

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

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[8]。对 IEL的研究发现,IEL对刺激剂的反应性明显的低于外周血淋巴细胞,而且人和小鼠还存在很大差别。文献报道采用佛波酯(PMA)能够使其激活,因为 PMA能够直接激活细胞内的蛋白酶 C,引起钙离子内流,加入 IL-2能够提高细胞成活率,并加强其对刺激剂的反应[9,10],本实验结论与之相符合。本实验发现,3种剂量全身照射都引起 IEL增殖活力不同程度的下降,表现出照后 8 h下降,到 48 h~ 72 h达低值,随后缓慢回升的过程。表明射线引起 IEL增殖能力的抑制。3种剂量的组间比较发现,仅在 48 h PMA刺激的 12 Gy组明显低于 3 Gy和 8 Gy组,其余各时相点各剂量之间无显著性差异,这表明在 3 Gy~ 12 Gy的剂量范围内,IEL增殖活性的下降与剂量无显著性相关。

全身照射所致细胞功能改变,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的增殖活力,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。闵锐等[11]发现一定剂量的电离辐射可引起 T细胞表面 TCR基因的突变或重排,造成 T细胞表面 TCR/CD_3复合物表达减少,并认为是引起功能损伤和抑制的重要因素。有关辐射损伤引起 IEL表面活性分子表达改变的研究将更好地阐明损伤机制。

在相关的实验中已经观察到 3 Gy、8 Gy、12 Gy照射引起小肠 IEL数量减少(待发表),在本实验观察到 IEL的增殖活力受到明显抑制,表明 3 Gy、8 Gy、12 Gy剂量的照射造成小肠 IEL功能的损害。我室最近研究发现放射损伤造成固有层内 IgA^+ 细胞数量明显减少,这说明射线在造成肠上皮细胞损伤的同时也导致粘肠膜免疫屏障的损害。

参考文献

1 Robijn R J, Logtenberg T, Wiegman L J J M *et al*. Intestinal T lymphocytes. Scand J Gastroenterol Suppl, 1995; 30 (Suppl) 212 23

2 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: 19

3 Mowat A M, McInnes I B, Parrott D M V. Functional properties of intra-epithelial lymphocytes from mouse small intestine. IV. Investigation of the proliferative capacity of IEL using phorbol ester and calcium ionophore. Immunology, 1989; 66: 398

4 Viney J L, MacDonald T T. Lymphokine secretion and proliferation of intraepithelial lymphocytes from murine small intestine. Immunology, 1992; 77: 19

5 McKay D M, Perdue M H. Intestinal epithelial function: The case for immunophysiological regulation. Cells and mediators (first of two parts). Digestive Diseases and Science, 1993; 38: 1377

6 Croitoru K, Ernst P B. Leukocytes in the intestinal epithelium: an unusual immunological compartment revisited. Reg Immunol, 1992; 4: 63

7 Goodman T, Lefrancois L. Intraepithelial lymphocytes: Anatomical site, not T cell receptor form, dictates phenotype and function. J Exp Med, 1989; 170: 1569

8 林飞卿,余传霖,何球藻.医学基础免疫学.上海:上海医科大学出版社,1992: 39~ 52

9 Dillon S B, MacDonald T T. Functional characterization of Con A-responsive Lyt2-positive mouse small intestinal intraepithelial lymphocytes. Immunology, 1986; 59: 389

10 Ernst P B, Petit A, Befus A D *et al*. Murine intestinal intraepithelial lymphocytes. II. Comparison of freshly isolated and cultured intraepithelial lymphocytes. Eur J Immunol, 1985; 15: 216

11 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 C_{25}表达的影响.第二军医大学学报,1994; 15: 417

(收稿: 1998-01-19;修回: 1998-03-21)

(编辑　张大春)

Changes in proliferative activity of small intestinal intraepithelial lymphocytes after radiation injury in mice*

Xu Hui, Cheng Tianmin, Su Yongping (Department of Radiation Medicine, Faculty of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To explore the effects of radiation injury on intestinal mucosal immunity. Methods: Kunming strain mice were given whole-body irradiation of ^{60}Co γ-ray at doses of 3Gy, 8 Gy and 12 Gy.

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

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

In the periods of 8 h~ 72 h and 7 d~ 15 d after irradiation, IELs were isolated from irradiated mice and stimulated with PMA or ConA in combination with rIL-2 to determine the incorporation of ^{3}H-TdR serving as the index to reflect proliferative activity of intestinal intraepithelial lymphocytes. **Results**:① The amount of ^{3}H-TdR incorporation to IELs was gradually decreased with time prolongation. All the 3 groups showed similar type of changes decreasing at 8 h, reaching the lowest level at 48 h~ 72 h post-irradiation, rising again and still not returning to normal on the 15th day. ② The proliferative activity of the IELs isolated from normal mice received ^{60}Co γ-ray at 1 Gy~ 10 Gy was also decreased. **Conclusion**: The irradiation at the three doses causes the decrease of intestinal mucosal immunity to result in damage of mucosal immune barrier.

Key words radiation injury; mucosal immunity; intraepithelial lymphocyte; proliferation; mouse

科研简报

杀菌性/通透性增加蛋白功能区结构模拟肽的分子设计、筛选及鉴定*

The designing screening and identification of bactericidal/permeability increasing protein (BPI) modeling peptides

郑 江** 肖光夏 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所) 重庆, 400038

我们根据杀菌性/通透性增加蛋白(BPI)分子的晶体结构,应用计算机技术对BPI分子的三维结构进行分析并确定其功能区结构,模拟和设计了10个BPI功能区结构模拟肽分子。通过固相多肽化学合成、筛选及鉴定,在10个模拟肽分子中,筛选到1个具有强效的杀菌和中和内毒素(LPS)活性的模拟肽分子。我们对筛选出的模拟肽——BDN进行了系列的体内外杀菌和中和LPS生物活性的研究。

1 BDN体外杀菌能力鉴定

BDN不仅对G⁻细菌有杀菌活性,而且对4株野生耐药金黄色葡萄球菌和1株标准金黄色葡萄球菌有杀菌活性。与BPI比较,BDN的抗菌谱更广、对大肠杆菌(J5)的杀菌活性更强。

2 BDN体外中和LPS能力的鉴定

基质显色法鲎试验测定结果显示BDN对LPS具有直接中和作用。当BDN浓度为6.25 μg/ml时,能将1000 pg/ml LPS中和至30 pg/ml;当BDN浓度为12.5 μg/ml时,几乎能完全中和1000 pg/ml LPS,提示BDN具有强大的中和LPS的能力。

3 BDN体外抗菌实验

BDN的杀菌活性可因菌种、细菌接种量、培养基中pH值和血清蛋白浓度不同而有所不同。BDN在与细菌作用0.5 h~ 2 h区间内的杀菌活性最强。BDN对G⁻细菌的杀菌特性与BPI很近似。

4 BDN对细菌形态的影响

透射电镜和扫描电镜的图片显示,BDN与细菌作用之后,5 min就可引起细菌外膜结构的破坏,30 min后可见细菌完全裂解。

5 BDN体内拮抗LPS作用的实验研究

BDN(5 mg/kg~ 10 mg/kg)对LPS(20 mg/kg)攻击的小鼠有明显的保护作用;于LPS攻击同时或短时间内给药效果最好,30 min后给药效果不显著;而预防性给药(LPS攻击前10 s至1 h)有显著的保护作用。与BPI比较,BDN在体内的半衰期明显长于BPI,对LPS攻击小鼠的保护作用优于BPI。

综上,BDN不仅保留了BPI中和LPS的特性,而且分子量小,比BPI本身还具有更强的杀菌活性、更广的抗菌谱,对LPS攻击小鼠具有更强的保护作用。由于BDN直接、快速作用于细菌外膜和LPS本身,因而有可能及时阻断细菌/内毒素介导的炎性瀑布反应。因此,对BDN进行深入研究,有广阔的应用前景。

关键词 杀菌性/通透性增加蛋白;模建;多肽
中图法分类号 R516
(收稿: 1998-04-17;修回: 1998-05-27)
(编辑 刘 鹏)

* 全军"九五"攻关项目, No. 96M093 全军"九五"指令性攻关项目, No. 96L042及重庆市科委院士基金资助
** 郑 江 男, 37岁, 主治医师, 讲师, 博士研究生

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