

# 3Gy 全身辐射对小鼠小肠粘膜上皮内淋巴细胞数量和功能的影响

徐 辉 程天民 栗永萍 闫国和 林 远 古德全

(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)

**摘要** 采用昆明种小鼠 3Gy 全身照射为模型, 分离培养照后 8h~15d 共 6 个时相点全小肠粘膜上皮内淋巴细胞, 并对其数量、细胞增殖活力、细胞毒力、TNF- $\alpha$  和 TGF- $\beta$  分泌水平进行检测。结果表明小肠上皮内淋巴细胞数量显著下降, 增殖活力和细胞毒力明显受抑, 表现为照后 8h 下降, 72h 达低值。上皮内淋巴细胞分泌 TNF- $\alpha$  和 TGF- $\beta$  显著增多, 表现为照后 8h 增高, 72h 达峰值。小肠上皮内淋巴细胞数量减少和功能降低成为全身放射损伤时造成肠粘膜免疫屏障功能受损的一个重要原因。

**关键词** 辐射, 粘膜免疫, 上皮内淋巴细胞

肠上皮内淋巴细胞 (IEL) 是肠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, 这使其在肠粘膜免疫中发挥着独特的作用<sup>[1]</sup>。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清楚。本实验以小鼠 3Gy 全身照射为模型, 研究全身照射对小肠 IEL 数量及功能的影响。

## 1 材料与 方法

### 1.1 动物

昆明种小鼠: 雄性, 20 $\pm$ 5g, 第三军医大学实验动物中心提供。

### 1.2 照射条件

$^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线照射源, 剂量率 0.589 Gy/min, 3Gy 全身照射。在照后自由进水进食。照后 8、24、48、72h, 7d 和 15d 共 6 个时相点进行观察。

### 1.3 试剂

Percoll(Pharmacia), PMA(Sigma), anti-CD3(宝灵曼)。

### 1.4 外周血白细胞、血小板计数和血红蛋白含量测定

各时相点活杀小鼠时取股动脉血, 分别进行白细胞、血小板计数, 计数后换算成正常对照值的百分数, 同时用分光光度法测定血红蛋白含量。

全军医药卫生“九五”指令性攻关课题, No.96L045

收稿日期: 初稿 1998-04-14, 修回 1998-06-23

### 1.5 小肠粘膜 IEL 计数<sup>[2]</sup>

HE 染色的小肠横截面在光镜下观察,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。

### 1.6 小肠上皮内淋巴细胞的分离

参照 Mosley 法<sup>[3]</sup>并加以改进,主要分三个步骤进行,即分离肠组织、分离粘膜层细胞、分离肠上皮细胞层中的 IEL。由此分离正常小鼠全小肠 IEL, RPMI1640 调为  $2 \times 10^6/\text{mL}$ 。

### 1.7 IEL 增殖功能和细胞毒力测定<sup>[4,5]</sup>

$100\mu\text{L } 2 \times 10^6/\text{mL}$  IEL 加入 96 孔平底培养板内,重复 3 孔,加入 PMA 5ng 复合 rhIL-2 2500U/mL 刺激培养,每孔总体积  $200\mu\text{L}$ 。在  $37^\circ\text{C } 5\% \text{CO}_2$  孵箱内培养 72h,培养结束前 18h 每孔加入  $3.7 \times 10^4 \text{Bq } ^3\text{H-TdR}$ ,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 号玻璃纤维滤膜上, $80^\circ\text{C}$  烤 30min,放入闪烁瓶,加 5mL 闪烁液,稳定过夜后,用液闪仪 (LKB1217,瑞典) 测 cpm 计数。结果以 cpm/孔 来表示 IEL 受刺激后的增殖活力。

各组分离的 IEL 调整到  $2 \times 10^6/\text{mL}$  加入 Anti-CD3( $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 诱导培养 48h,96 孔平底培养板每孔加靶细胞  $100\mu\text{L}$ (含 Raji 细胞  $1 \times 10^4$  个/孔),按效靶比 10:1~50:1 的比例加  $100\mu\text{L}$  IEL 细胞悬液,重复 3 孔。加完将培养板放在  $37^\circ\text{C } 5\% \text{CO}_2$  培养箱中孵育 4.5h,最大释放孔加入  $100\mu\text{L}$  含 2%Triton X-100 的培养基,自发释放孔加入  $100\mu\text{L}$  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 250g 离心 10min 将细胞沉淀,每孔吸上清液  $100\mu\text{L}$  转入另一 96 孔板中,采用宝灵曼公司 LDH 试剂盒测定上清液中 LDH 活力来反映细胞毒力,按说明操作。

### 1.8 IEL 培养上清液中 TNF- $\alpha$ 和 TGF- $\beta$ 含量的测定

收集 (PMA 5ng+rhIL-2 2500U/mL) 刺激培养后 72h 的培养上清液,离心后装入 EP 管,作好标记,封口胶封口,  $-70^\circ\text{C}$  冰箱保存,用于细胞因子检测。TNF- $\alpha$  含量测定采用 ELISA 试剂盒 (北京军事医学科学院产品),按说明进行。TGF- $\beta$  含量的检测采用 CCL-64 细胞生长抑制法<sup>[6]</sup>。

### 1.9 统计学分析

所有数据均以平均值  $\pm$  标准差表示,以  $t$  检验进行统计学处理。

## 2 结 果

### 2.1 辐射对小鼠外周血白细胞、血小板计数和血红蛋白含量的影响

3Gy 全身辐射后小鼠外周血白细胞、血小板计数和血红蛋白含量下降明显,并随照后时间延长而逐渐回升,详见表 1。受照后整体伤情结合外周血像改变,均表明 3Gy 全身辐射造成小鼠中度骨髓型急性放射损伤。

### 2.2 辐射对小肠粘膜 IEL 数量的影响

3Gy 全身辐射后小鼠小肠粘膜 IEL 计数呈明显的下降趋势 (见图 1)。照后 8h 即下降,72h 达最低值,为正常对照值的 49.23% ( $p < 0.01$ ),7d 回升,15d 为正常对照值的 78.35%。

### 2.3 辐射对小肠 IEL 增殖活力、细胞毒力及 TNF- $\alpha$ 和 TGF- $\beta$ 分泌的影响

辐射后小肠 IEL 增殖活力及细胞毒力受到明显抑制,表现为伤后 8h 下降,72h 达最低值,持

续到伤后 15d 仍未恢复正常。IEL 自身分泌 TNF- $\alpha$  和 TGF- $\beta$  却有增高趋势，表现为伤后 8h 升高，72h 达峰值，持续增高到伤后 15d 仍未恢复正常的变化趋势（见表 2）。

Tab.1 Changes of murine peripheral blood WBC, PC counts and Hb concentration after 3Gy total body  $\gamma$ -ray irradiation vs control group (%)

| Time post injury | WBC                            | PC                             | Hb                             |
|------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Control          | 100 $\pm$ 10.8                 | 100 $\pm$ 14.2                 | 100 $\pm$ 16.7                 |
| 8h               | 73.6 $\pm$ 39.7                | 84.2 $\pm$ 13.4                | 98.7 $\pm$ 15.4                |
| 24h              | 68.1 $\pm$ 45.2                | 75.8 $\pm$ 19.6                | 73.4 $\pm$ 20.1                |
| 48h              | 33.3 $\pm$ 16.7 <sup>(2)</sup> | 30.0 $\pm$ 13.6 <sup>(1)</sup> | 85.7 $\pm$ 31.2                |
| 72h              | 39.8 $\pm$ 20.1 <sup>(2)</sup> | 30.8 $\pm$ 23.1 <sup>(1)</sup> | 57.1 $\pm$ 10.3 <sup>(2)</sup> |
| 7d               | 58.3 $\pm$ 19.8 <sup>(2)</sup> | 12.5 $\pm$ 13.4 <sup>(2)</sup> | 89.2 $\pm$ 23.5                |
| 15d              | 81.2 $\pm$ 21.3                | 15.0 $\pm$ 12.3 <sup>(2)</sup> | 94.3 $\pm$ 21.0                |

Note:  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$  for control group;  $n=5$  for other group <sup>(1)</sup> $p < 0.05$ , <sup>(2)</sup> $p < 0.01$  vs control group

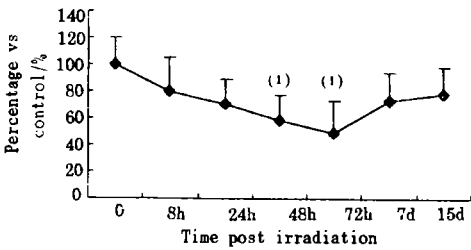


Fig.1 Changes of IEL number after 3 Gy total body  $\gamma$ -ray irradiation <sup>(1)</sup> $p < 0.05$

Tab.2 Changes of IEL functions after 3Gy total body  $\gamma$ -ray irradiation

| Time post injury | Proliferation activity/cpm      | Cytotoxic activity(20:1)/%       | TNF- $\alpha$ /ng mL <sup>-1</sup> | TGF- $\beta$ /ng mL <sup>-1</sup> |
|------------------|---------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| Control          | 36308 $\pm$ 3353                | 46.85 $\pm$ 7.61                 | 0.97 $\pm$ 0.16                    | 0.68 $\pm$ 0.19                   |
| 8h               | 33293 $\pm$ 2813                | 37.34 $\pm$ 9.14                 | 2.09 $\pm$ 0.42 <sup>(2)</sup>     | 0.86 $\pm$ 0.12                   |
| 24h              | 26578 $\pm$ 2147 <sup>(1)</sup> | 22.75 $\pm$ 8.65 <sup>(2)</sup>  | 2.88 $\pm$ 0.27 <sup>(2)</sup>     | 1.22 $\pm$ 0.23 <sup>(1)</sup>    |
| 48h              | 24228 $\pm$ 1673 <sup>(1)</sup> | 19.52 $\pm$ 9.07 <sup>(2)</sup>  | 3.56 $\pm$ 0.43 <sup>(2)</sup>     | 1.64 $\pm$ 0.37 <sup>(2)</sup>    |
| 72h              | 10545 $\pm$ 1289 <sup>(2)</sup> | 11.81 $\pm$ 5.78 <sup>(2)</sup>  | 4.57 $\pm$ 0.39 <sup>(2)</sup>     | 2.97 $\pm$ 0.84 <sup>(2)</sup>    |
| 7d               | 26545 $\pm$ 995 <sup>(1)</sup>  | 21.12 $\pm$ 10.21 <sup>(2)</sup> | 3.91 $\pm$ 0.24 <sup>(2)</sup>     | 2.03 $\pm$ 0.69 <sup>(2)</sup>    |
| 15d              | 30536 $\pm$ 804                 | 28.21 $\pm$ 9.38 <sup>(1)</sup>  | 4.01 $\pm$ 0.62 <sup>(2)</sup>     | 1.86 $\pm$ 0.32 <sup>(2)</sup>    |

Note:  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$  for control group;  $n=5$  for other group, <sup>(1)</sup> $p < 0.05$ , <sup>(2)</sup> $p < 0.01$  vs control group

2 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，是由来源减少和在上皮层内破坏两方面因素所引起的。

IEL 具有两方面的功能，一是受多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；二是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 的细胞毒性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，3Gy 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 8h 下降，到 72h 达低值，随后缓慢回升的过程。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。本实验观察到小鼠 3Gy 全身辐射引起小肠 IEL 培养上清液中 TNF- $\alpha$  和 TGF- $\beta$  因子分泌增多, 以伤后 72h 为高峰, 持续到 15 天尚未恢复。IEL 能够分泌多种细胞因子, 包括 IL-2、IL-3、IL-5、IL-6、GM-CSF、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  和 TGF- $\beta$  等, 这些细胞因子可以起多种作用, 归结为两个方面: 第一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, 尤其是血清 IgA 的合成和装配; 第二作用于肠上皮细胞, 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<sup>[10,11]</sup>。TGF- $\beta$  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<sup>[12]</sup>, 另有文献报道 TGF- $\beta$  可以上调 IEL 细胞表面  $\alpha_E \beta_7$  分子表达, 而  $\alpha_E \beta_7$  是淋巴细胞进入上皮层的关键粘附分子<sup>[13]</sup>, 由此推测放射损伤后 IEL 培养上清液中 TGF- $\beta$  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。

从实验结果发现, 数量及功能(增殖活力和细胞毒力)的变化都有着相似的趋势, 即以受照后 8h 下降, 持续至 72h 达最低值, 随后缓慢回升。提示放射损伤造成 IEL 数量减少、结构破坏与其功能受抑有着内在的紧密联系。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<sup>[14]</sup>。全身辐射损伤后 IEL 数量的减少以及增殖活力、细胞毒力受抑, 必然会导致肠上皮 IEL 整体功能的削弱, 从而成为肠道粘膜免疫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.* Gastroenterol Clin North Am, 1997, 26(2):145~173
- 2 Ferguson A, Murray D. Gut, 1971, 12(12):988~994
- 3 Mosley R L, Klein J R. J Immunol Meth, 1992, 156(1):19~26
- 4 徐 辉, 程天民, 粟永萍. 第三军医大学学报, 1998, 20(3):187~190
- 5 Guy-Grand D, Malassis-Seris M, Briottet C *et al.* J Exp Med, 1991, 173(6):1549~1552
- 6 虞冠华, 许祥裕, 丁树标. 上海免疫学杂志, 1995, 12(2):116~117
- 7 Klein J R. J Exp Med, 1996, 184(4):1203~1206
- 8 Guy-Grand D, Vassalli P. Curr Opin Immunol, 1993, 5(2):247~252
- 9 Evans C M, Phillips A D, Walker-Smith J A *et al.* Gut, 1992, 33(2):230~235
- 10 Guy Grand D, Cuenod Jabri B, Malassis Seris M *et al.* Eur J Immunol, 1996, 26(9):2248~2256
- 11 Taguchi T, Aicher W K, Fujihashi K *et al.* J Immunol, 1991, 147(11):3736~3744
- 12 McGee D W, Beagley K W, Aicher W K *et al.* J Immunol, 1993, 151(2):970~978
- 13 Parker C M, Cepek K L, Russell G J *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(5):1924~1928
- 14 闵锐, 程天民, 罗成基等. 第二军医大学学报, 1994, 15(5):417~422

## THE EFFECTS OF 3Gy TOTAL BODY IRRADIATION ON MOUSE INTESTINAL INTRAEPITHELIAL LYMPHOCYTES' NUMBER AND FUNCTIONS

XU Hui CHENG Tianmin SU Yongping YAN Guohe LIN Yuan Gu Dequan

(*Research Institute of Combined Injury, Faculty of Preventive Medicine, Third Military Medical University,  
Chongqing 400038*)

**ABSTRACT** To explore the characteristics of intestinal mucosal immunity after radiation injury, IEL number, proliferation activity, cytotoxic activity as well as the TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  concentrations of supernatant of cultured IEL were studied using IEL freshly isolated from whole small intestine of Kunming strain mice received 3Gy total body  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -ray irradiation. The proliferation activity, cytotoxic activity as well as the number of IEL in small intestinal mucosa were significantly decreased at 8h post-irradiation, reaching lowest level at 72h. The TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  concentrations of supernatant of cultured IEL isolated from irradiated mice were elevated at 8h, reaching peak at 72h. That the decrease in number and functions of IEL may play an important role in the damage intestinal mucosal immunity barrier after total body irradiation.

**KEYWORDS** Radiation, Mucosal immunity, Intraepithelial lymphocyte