

## NSAIDs 肠病大鼠回肠 SIgA、IL-1 $\beta$ 、IL-8、IL-10 水平及树突状细胞数的变化\*

肖源<sup>1</sup>, 车筑平<sup>2</sup>, 程华<sup>1</sup>, 杨红静<sup>3</sup>, 谭庆华<sup>4\*\*</sup>

(1. 贵州医科大学第三附属医院 消化内科, 贵州 都匀 558000; 2. 贵州医科大学附院 内镜中心, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学 临床医学院, 贵州 贵阳 550004; 4. 四川大学华西医院 消化内科, 四川 成都 610041)

**[摘要]** 目的: 探讨非甾体类消炎药(NSAIDs)肠病时SD大鼠回肠分泌型免疫球蛋白A(SIgA)、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、IL-8、IL-10水平及树突状细胞数的变化。方法: 34只清洁级SD大鼠均分为药物损伤模型组(模型组)和对照组, 模型组大鼠腹腔注射阿司匹林(100 mg/kg, 2次/d), 对照组腹腔注射等量生理盐水; 造模2周后处死大鼠, 在距回盲瓣5 cm近端肠管切取回肠段2 cm, 采用ELISA法检测大鼠回肠黏膜组织SIgA、IL-1 $\beta$ 、IL-8及IL-10水平, 免疫组织化学(IHC)检测回肠黏膜CD205阳性染色的树突状细胞数量。结果: HE染色结果显示, 模型组黏膜上皮细胞破坏, 黏膜杯状细胞减少, 隐窝结构变形, 固有腺体排列紊乱, 黏膜以及黏膜下层见大量淋巴细胞以及单核细胞; 对照组黏膜正常, 未被破坏; 免疫组织化学染色后, 与对照组比较, 模型组大鼠CD205阳性细胞增多, IOD值升高( $P < 0.05$ ); 模型组大鼠回肠黏膜SIgA降低( $P < 0.05$ ), IL-1 $\beta$ 、IL-8及IL-10增加, 树突状细胞数量增多, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论: NSAIDs肠病发生后, 回肠黏膜保护屏障受损, 体液免疫紊乱。

**[关键词]** 树突状细胞; 分泌型免疫球蛋白A; 白细胞介素; 非甾体类消炎药肠病; 大鼠, Sprague-Dawley

**[中图分类号]** R574 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2016)09-1064-04

**DOI:** 10.19367/j.cnki.1000-2707.2016.09.017

### Changes of SIgA, IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10 Levels and Dendritic Cells in Intestinal Mucosa of Rats with NSAIDs Enteropathy

XIAO Yuan<sup>1</sup>, CHE Zhuping<sup>2</sup>, CHENG Hua<sup>1</sup>, YANG Hongjing<sup>3</sup>, TAN Qinghua<sup>4</sup>

(1. Department of Digestive System, Third Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Duyun 558000, Guizhou, China;

2. Digestive Endoscopy Center, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China;

3. Department of Clinical Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 4. Department of Digestive System, West China Hospital University, Chengdu 610041, Sichuan, China)

**[Abstract] Objective:** To investigate the changes of non-steroidal anti-inflammatory drug enteropathy in SD rats with ileal SIgA, interleukin-1 $\beta$ , interleukin-8, interleukin-10 and dendritic cells change.

**Methods:** 34 SPF grade Sprague-Dawley rats were randomly divided into 2 groups in equal number. The aspirin group received intraperitoneally injections of 100 mg/kg of aspirin twice a day for 14 days, the control group received equal volume of normal saline. 5 cm from the ileocecal valve in the proximal intestine was cut off by 2 cm after constructing the model for 2 weeks and executed the rats. The levels of SIgA, IL-1 $\beta$ , IL-8 and IL-10 in ileal tissue were detected by ELISA. The quantity of CD205-positive cells in mucosa was tested by immunohistochemistry analysis. **Results:** Aspirin group compared with control group, the level of SIgA in ileal tissue of aspirin group decreased ( $P < 0.05$ ), IL-1 $\beta$ , IL-

\*[基金项目] 贵州省科技厅基金(E2011-10)

\*\*通信作者 E-mail: tanqh2007@163.com

网络出版时间: 2016-09-13 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20160913.2240.040.html>

8, IL-10 and the number of dendritic cells increased ( $P < 0.05$ ); mucosa of control group was normal and stayed intact; after IHC staining, CD205 positive cells increased in model rats, comparing with control group, observation showed increased IOD value ( $P < 0.05$ ); comparing with control group, SIgA in model group rats ileal mucosa decreased ( $P < 0.05$ ), IL-1 $\beta$ , IL-8 and IL-10 increased, dendritic cells increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** NSAIDs bowel disease would damage intestinal mucosal barrier and caused thumoral immune disorder.

[ **Key words** ] dendritic cell; secretory immunoglobulin A; Interleukin; non steroidal anti-inflammatory drug enteropathy; rats, Sprague-Dawley

随着非甾体类抗炎药 (NSAIDs) 的广泛使用, NSAIDs 肠病成为其主要的副作用之一。NSAIDs 肠病是一种以肠道蛋白丢失、肠道出血、肠黏膜炎症及通透性改变、回肠吸收障碍为临床表现的非特异性肠炎<sup>[1]</sup>。目前, NSAIDs 对胃部损害的发病机制现已阐明, 但对于肠道黏膜的损伤机制, 多数学者认为是局部及系统免疫共同作用的结果<sup>[2-3]</sup>。以 CD205 为代表的树突状细胞是肠道内重要的抗原递呈细胞, 是肠道免疫的重要参与者<sup>[4]</sup>。T 细胞被激活之后通过分泌白细胞介素-10 (IL-10) 等抑制性细胞因子, 发挥免疫抑制, 维持肠道免疫稳态; 另外 T 细胞还可以通过分泌 IL-1、IL-6 及 IL-8 等促炎因子, 释放炎性介质介导强烈的炎症反应。肠道免疫中的体液免疫的主要参与者为分泌型免疫球蛋白 A (SIgA), SIgA 是肠道黏膜屏障的第一道屏障, 它的削弱, 将导致肠道黏膜屏障功能减弱, 引起肠道免疫平衡失调, 肠道细菌移位, 蛋白丢失等反应, 导致肠道炎症的发生<sup>[5]</sup>。因此, 为探讨 NSAIDs 对肠道黏膜的损伤机制, 本研究通过观察大鼠 NSAIDs 肠病模型中 IL-1 $\beta$ 、IL-8、IL-10、SIgA 水平及树突状细胞数 (CD205), 了解 NSAIDs 时大鼠肠黏膜免疫功能的变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物及分组

清洁级 SD 大鼠 34 只 (购于贵州医科大学实验动物中心), 雌雄各半, 8 周龄, 体质量 (210  $\pm$  10) g, 饲养温度 (23  $\pm$  2)  $^{\circ}\text{C}$ , 采用自然光, 分笼饲养, 自由饮食。采用随机数字表法将大鼠均分为药物损伤组 (模型组) 和对照组, 模型组大鼠腹腔注射 100 mg/kg 精氨酸阿司匹林注射液 (海南灵康制药有限公司, 130401, 海南, 中国), 对照组大鼠腹腔注射同等剂量的生理盐水, 2 次/d, 连续 2 周。

### 1.2 方法

**1.2.1 取材** 两组大鼠禁食 24 h, 禁饮 8 h, 腹腔注射 10% 水合氯醛 (0.3 mL/100 g) 麻醉, 打开腹腔, 距回盲瓣近端 5 cm 处向近端切取回肠段 2 cm, 用 PBS 冲净肠内容物。肠管组织均分为 2 份, 一份按 1:5 的比例加入 PBS 液, 低温下制备组织匀浆, 以 3 000 r/min 离心 20 min, 取上清液测定 SIgA、IL-1 $\beta$ 、IL-8、IL-10 水平; 另一份放入 10% 中性福尔马林固定, 制作石蜡切片, 用于 HE 及免疫组化染色。通过 HE 染色观察大鼠肠道黏膜损伤情况。

**1.2.2 IL-1 $\beta$ 、IL-8、IL-10、SIgA 水平及 CD205 染色阳性树突状细胞数** 采用 ELISA 法测定 SIgA (Rat secretory immunoglobulin A SIgA ELISA Kit, 批号 E-30311, 美国 rndsystems 公司)、IL-1 $\beta$ 、IL-8 及 IL-10 水平 (试剂盒购于北京永辉, 编号 E-30418、E-30581、E-30581), 严格按 ELISA 试剂盒说明书操作。采用免疫组织化学 (IHC) 染色测定 CD205 (Rabbit Anti-CD205, 编号 bs-2565R, 北京博奥森生物技术有限公司), 一抗 -4  $^{\circ}\text{C}$  过夜 23 h, DAB 显色剂染色, 显色时间 1~2 min, 苏木素复染后, 脱水、透明, 中性树胶封片, 观察染色阳性的细胞。采用 Image Proplus 6.0 图像分析软件进行半定量分析, 计算出阳性细胞 IOD 值。

### 1.3 统计学处理

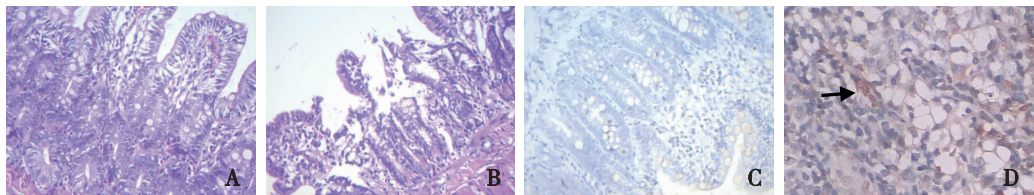
所有实验数据用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用统计软件 SPSS 19.0 进行分析。两样本均数比较采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HE 和 IHC 染色

HE 染色结果显示 (图 1A、B), 模型组黏膜上皮细胞破坏, 黏膜杯状细胞减少, 隐窝结构变形, 固有腺体排列紊乱, 黏膜以及黏膜下层见大量淋巴细

胞以及单核细胞;对照组黏膜正常,未被破坏。IHC 染色后,模型组大鼠 CD205 阳性细胞增多,与对照组比较,观察组 IOD 值升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1、图 1C、D。



注:A、C 对照组,B、D 为模型组;A、B 为 HE 染色,CD 为 IHC 染色;箭头所指为 CD205 阳性细胞

图 1 大鼠回肠组织 HE 和 IHC 染色(400 ×)

Fig. 1 Immunohistochemical staining of rat intestinal mucosa

2.2 IL-1β、IL-8、IL-10 及 SIgA 水平

ELISA 结果显示,与对照组比较,模型组肠黏膜 IL-1β、IL-8 及 IL-10 含量明显增多,SIgA 含量明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 两组大鼠回肠黏膜 CD205 IOD 值、IL-1β、IL-8、IL-10 及 SIgA 水平( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Comparison of intestinal mucosa CD205 value, IL-1β, IL-8, IL-10 and SIgA content between the two groups

指标	回肠黏膜组织	
	对照组	模型组
CD205 (IOD)	12.01 ± 0.67	20.13 ± 1.64 <sup>(1)</sup>
IL-1β (ng/L)	19.71 ± 1.26	23.07 ± 1.10 <sup>(1)</sup>
IL-8 (ng/L)	423.93 ± 17.61	477.67 ± 19.95 <sup>(1)</sup>
IL-10 (ng/L)	32.30 ± 1.65	36.40 ± 1.94 <sup>(1)</sup>
SIgA (g/L)	64.86 ± 12.31	46.82 ± 15.53 <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> 与对照组比较,  $P < 0.05$

3 讨论

随着人口老龄化的进展,NSAIDs 引起消化道损伤备受大家关注,目前,NSAIDs 引起肠道黏膜损伤机制仍不清楚,有研究表明 NSAIDs 引起肠道黏膜损害,黏膜通透性增加是其发病的主要因素之一,肠道黏膜免疫是其发病因素的重要组成部分<sup>[6]</sup>。本研究通过比较模型组以及对照组 SD 大鼠肠黏膜免疫功能的变化发现,当发生 NSAIDs 肠病时,CD205 表达增强,提示肠道免疫反应的增强,树突状细胞染色增加不仅表现在肠黏膜淋巴结内,上皮细胞也明显增多、增强,说明树突状细胞细胞可能直接和间接发挥递呈抗原的作用都在增强,但局部肠道免疫是否相应增加,还要看效应细胞的

反应情况<sup>[7]</sup>。IL-8 是一种很重要的炎症趋化因子,对中性粒细胞、T 淋巴细胞的趋化作用,可诱导它们局部释放炎性介质引起炎症反应,从而导致肠上皮细胞变性、坏死、脱落并广泛损害<sup>[8]</sup>。IL-10 是肠道内重要的抑炎因子,是下调肠道免疫反应的炎症因子,IL-1、IL-8 的释放,可减轻或者削弱肠道炎症的发生<sup>[9-10]</sup>。本实验证实,NSAIDs 肠病时,模型组肠黏膜中 IL-1β、IL-8、IL-10 水平高于对照组,说明 NSAIDs 肠病发生,IL-1β、IL-8 等促炎因子参与了疾病的进程,随着病程进展,免疫平衡被打乱,抑炎因子也释放,力求维持肠道内免疫平衡,可见在 NSAIDs 肠病时,细胞免疫参与了肠道免疫的过程。SIgA 的产生开始于小肠集合淋巴结, B 细胞中活化的浆细胞可以分泌 IgA, SIgA 释放如肠腔,可以与相应的抗原结合,抑制病原体以及细菌的增殖、中和毒素,清除食物蛋白抗原,又可以抵抗蛋白溶解酶的作用,抵御肠道黏膜被其破坏,进而保护肠道黏膜的完整性,是肠道黏膜屏障的重要组成部分,在维持肠道微生态平衡中起着决定性作用<sup>[11-13]</sup>。在本研究中,大鼠 NSAIDs 肠病发生后肠道内 SIgA 含量低于对照组( $P < 0.05$ ),表明 SIgA 在 NSAIDs 肠病时肠黏膜中的含量降低,SIgA 的合成、分泌减少,获得性体液免疫受到损害。同时肠道黏膜免疫屏障功能失调,抵御肠腔内病毒、细菌及中和肠道毒素的功能减弱,肠腔内抗原物质与效应细胞接触引起局部炎症细胞分泌多种细胞因子如 IL-1、IL-8,进一步加重了肠道炎症。

综上,NSAIDs 肠病发生后,树突状细胞数量增多,提示肠道免疫反应启动。IL-1β、IL-8 及 IL-10 增多,表明肠道内炎症因子增多,促炎因子增加,细胞免疫平衡紊乱,肠道黏膜内 SIgA 分泌明显较少,回肠黏膜保护屏障受损,体液免疫紊乱。

## 4 参考文献

- [1] 安梅,张振玉. 非甾体抗炎药相关性肠病[J]. 世界华人消化杂志, 2009(2):174-180.
- [2] 何旭东,姜红梅,王文峰,等. NSAIDs 致下消化道损伤的研究[J]. 临床消化病杂志, 2011(5):305-307.
- [3] 梁冬生. 非甾体抗炎药(NSAIDs)肠病研究概况[J]. 临床合理用药, 2009(14):115-117.
- [4] 艾国平,栗永萍,程天民. 肠黏膜免疫的构成与功能[J]. 免疫学杂志, 2000(4):82-84.
- [5] 刘冬妍,刘沛. 肠道分泌型 IgA 的成分与功能[J]. 世界华人消化杂志, 2004(12):2845-2848.
- [6] 杨红静,车筑平,李红灵,等. NSAIDs 肠病时肠道防御素变化对肠道炎症反应的影响[J]. 实用医学杂志, 2014(24):3929-3931.
- [7] 肖源,车筑平,杨红静,等. NSAIDs 肠病肠道获得性免疫的变化[J]. 免疫学杂志, 2015(9):786-789.
- [8] 李琪佳,官思聪. 溃疡性结肠炎发病机制的免疫病理学及分子病理学研究[J]. 中华消化杂志, 2000(5):324.
- [9] Uyemura K, Demer LL, Castle SC, et al. Cross-regulatory roles of interleukin (IL)-12 and IL-10 in atherosclerosis [J]. J Clin Invest, 1996(9):2130-2138.
- [10] Lakhau SE, Kirchgessner A, Hofer M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches [J]. J Transl Med, 2009(7):97-107.
- [11] Mestecky J, Russell MW, Elson CO. Intestinal IgA: novel views on its function in the defence of the largest mucosal surface[J]. Gut, 1999(1):2-5.
- [12] Mantis NJ, Forbes SJ. Secretory IgA: arresting microbial pathogens at epithelial borders [J]. Immunol Invest, 2010(4-5):383-406.
- [13] Campos-Rodríguez R, Godínez-Victoria M, Abarca-Rojano E, et al. Stress modulates intestinal secretory immunoglobulin A [J]. Front Integr Neurosci, 2013(7):86.
- (2016-06-25 收稿, 2016-08-28 修回)
- 中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 赵 毅
- 
- (上接第 1046 页)
- [11] 胡春萍,蔡雪婷,胡婷婷,等. 木犀草素诱导非小细胞肺癌细胞株 A549 凋亡和 G2 周期阻滞 [J]. 中国中药杂志, 2012(9):1259-1264.
- [12] 陈青,李开庭,田思,等. 芦荟大黄素复合光动力处理对人乳腺癌细胞抑制增殖和促进凋亡的体外观测 [J]. 第三军医大学学报, 2014(21):2162-2166.
- [13] 刘芳,杨翠军,孙黎,等. 五加皮多糖对人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡作用的研究 [J]. 时珍国医国药, 2009(5):1178-1179.
- [14] 单保恩,斯重阳,张金忠,等. 中药五加皮抗肿瘤活性成分的分选 [J]. 癌变·畸变·突变, 2004(4):203-205, 222.
- [15] 刘先宁,朱秀平,周光荣. 决明子水提液对小鼠腹腔 M( $\phi$ )吞噬能力的影响 [J]. 现代检验医学杂志, 2004(4):65.
- (2016-05-10 收稿, 2016-08-19 修回)
- 中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 刘 华
- 
- (上接第 1063 页)
- [7] 李维茹,黄沛清,简艳红. 分娩方式对乙肝病毒母婴传播的影响 [J]. 中外医疗, 2014(1):51-52.
- [8] 林玉波,辛秋扬,林小娜,等. 孕妇血清 HBV DNA 含量与母婴宫内传播的相关性研究 [J]. 中国实用医药, 2011(33):15-16.
- [9] 张鸿飞,宋清林,宋宝昆,等. 乙肝病毒的母婴传播 [J]. 中华传染病学杂志, 1985(2):131-132.
- [10] 郭飞舟,吴春龙,李俊. 新生儿 HBV 宫内感染及其血清标志物模式 [J]. 江西医学检验, 2006(5):443-454.
- [11] 王筱雯,郑九生. 乙型肝炎表面抗原阳性孕妇胎儿宫内感染相关因素分析 [J]. 中国妇幼保健, 2007(25):3530-3531.
- [12] 志莲. 新生儿脐血检测分析 HBV 宫内感染 [J]. 医学理论与实践, 2007(6):704.
- [13] 朱凤娣,高晓娟. 乙肝病毒携带孕妇母婴传播 128 例临床分析 [J]. 中国冶金工业医学杂志, 2013(5):533-535.
- [14] 闵楮明,赵伍西. 妊娠合并乙肝病毒感染对妊娠结局的影响研究 [J]. 中国实用医药, 2008(3):33-34.
- (2016-04-25 收稿, 2016-07-31 修回)
- 中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 赵 毅