

· 论 著 ·

[文章编号]1000-8861(2013)03-0195-05

阻断交感神经对青年和老龄小鼠小肠 T 淋巴细胞活性的影响

柯妍妍, 朱 琪*, 刘文杰*, 林锦清, 李 清, 王 娟

[摘 要] 目的 探究交感神经在青年和老龄小鼠中对小肠 T 淋巴细胞的免疫调控机制。方法 选用健康的 3 月龄和 18 月龄的雄性昆明小鼠, 腹腔注射六羟多巴胺, 通过石蜡切片和 HE 染色观察上皮内淋巴细胞的数量, MTT 法测定小肠 T 淋巴细胞的增殖, ELISA 试剂盒测定小肠 T 淋巴细胞分泌 IL-2、IL-4 水平。结果 阻断交感神经后, 2 个年龄组上皮内淋巴细胞数量均减少, 老龄组尤为突出。青年小鼠 T 淋巴细胞增殖在处理第 5、10 天出现下降, 老龄小鼠在第 3 天至第 15 天均显著下降, 其中第 5 天下降 39.4% ($P < 0.01$)。青年小鼠损毁交感神经后主要引起淋巴细胞分泌 IL-4 含量降低, 而老龄小鼠主要引起 IL-2 降低。结论 损毁交感神经可导致青年和老龄小鼠小肠 T 淋巴细胞活性下降, 老龄组下降幅度大, 恢复周期长。

[关键词] 交感神经; 年龄; T 淋巴细胞; 小肠; 小鼠

[中图分类号] R392.9

[文献标识码] A

Effects of sympathetic nerve on the activity of intestinal T lymphocyte in young and aged mice

KE Yanyan¹, ZHU Qi², LIU Wenjie³, LIN Jinqing², LI Qing², WANG Juan⁴

1. Department of Microbiology and Immunology, Xiamen Medical College, Xiamen 361008, China; 2. Hepatobiliary Department of Internal Medicine, Second Fuzhou Hospital, Fuzhou 350007, China; 3. School of Pharmaceutical Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 4. Department of Internal Medicine, Third Hospital of Pingdu, Pingdu 266753, China

*Corresponding Author: ZHU Qi, E-mail: kwj3@tom.com; LIU Wenjie, E-mail: wjliu@xmu.edu.cn

[Abstract] We aimed to investigate the effect of sympathetic nerve on intestinal T lymphocyte activity of adult and aged mice. The healthy 3-month-old and 18-month-old mice were used to construct sympathectomy mouse model by injecting 6-OHDA intraperitoneally. The number of intraepithelial lymphocytes (IEL), the T lymphocyte proliferation and the production of both IL-2 and IL-4 were studied by HE staining, MTT, and ELISA methods, respectively. The results showed that the numbers of IEL were decreased in both of young and aged mice, especially in the aged mice. In young mice, the T lymphocyte proliferation decreased at 5th and 10th days after 6-OHDA injection; in aged mice, the T lymphocyte proliferation decreased from the 3rd day to the 5th day (decreased by 39.4%, $P < 0.01$) after 6-OHDA injection. And the IL-4 production in the lymphocyte supernatant decreased mainly in young treated mice, but the IL-2 production decreased mainly in aged treated mice. The results suggested that sympathectomy could reduce the activity of intestinal T lymphocyte in both young and aged mice. The activity decrease is more obvious and the recovery period is longer in aged mice.

[Key words] Sympathetic nerve; Age; T lymphocyte; Intestine; Mouse

近年来, 老年人与肠道有关的感染性疾病和肿瘤的发病率与死亡率明显增加, 由于单纯靠体外应用药物治疗疾病有许多不良影响, 研究如何维持肠道自身免疫平衡和提高其免疫力已逐渐成为热点问题。

小肠及其相关淋巴组织含有机体 70%~80% 的免疫细胞^[1], 能够帮助消化道抵御病原的侵袭, 随着神经-内分泌-免疫学理论的提出, 神经对免疫调控作用已经受到广泛关注。前期研究表明交感神经能够通过调控成年小鼠脾脏^[2]和小肠^[3]的 T 细胞活性而影响全身及小肠局部细胞免疫水平。随着年龄增长, 交感神经对小肠肠壁肌层的支配逐渐减少, 进而影响胃肠功能^[4]。但是, 在增龄的情况下交感神经对于小肠免疫学变化的研究尚不完善, 并且其对老龄动物免疫的调控是否与青年小鼠一致, 此方面资料匮乏。本研究应用

基金项目: 福州市科技司[榕科 2011(106)号]

作者单位: 361008, 厦门医学高等专科学校微生物学与免疫学教研室(柯妍妍); 350007, 福州市第二医院肝胆内科(朱 琪, 林锦清, 李 清); 361005, 厦门大学药学院(刘文杰); 266753, 山东省平度市第三人民医院内科(王 娟)

*通信作者: 朱 琪, Tel: 0591-88039222, E-mail: kwj3@tom.com; 刘文杰, Tel: 0592-2187227, E-mail: wjliu@xmu.edu.cn

六羟多巴胺(6-OHDA)化学性损毁交感神经,建立交感神经损毁模型,探索交感神经在青年和老龄小鼠小肠的细胞免疫调节水平,以期交感神经退行性变化与小肠免疫力改变提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及交感神经损毁方法 选用健康的雄性昆明小鼠48只(3月龄和18月龄的各24只),2种月龄的小鼠均随机分为对照组和实验组(每组12只)。本文中3月龄的小鼠定义为青年小鼠,18月龄小鼠定义为老龄小鼠^[5]。小鼠自由采食、饮水,光照制度为14L:10D。正常饲养7d后,进行如下处理:采用腹腔注射六羟多巴胺(购自Sigma公司),剂量为100 mg/kg 体重(BW),溶于含0.01%抗坏血酸的灭菌生理盐水中,注射前新鲜配制,连续注射5d,每天1次。对照组以同样方式及时间给予相同剂量的抗坏血酸灭菌生理盐水。

1.2 组织切片及常规HE染色 停药后第1,3,5,10,15,30天将小鼠颈椎脱臼处死,剖腹,取空肠中段3cm,生理盐水冲洗内容物后,用4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液(pH7.4)固定24h以上,石蜡包埋,制备连续横断切片,厚6 μm,每隔15张取1张。通过HE染色显示上皮内淋巴细胞。统计方法为各段小肠取10张切片,每张切片中选取5根柱状细胞排列整齐且最长的肠绒毛,分别统计每100个柱状上皮细胞中分布的上皮内淋巴细胞的数量。

1.3 T淋巴细胞增殖的测定 无菌取小鼠肠道,用消化液消化后分别进行40%和70% Percoll(购自Sigma公司)的梯度离心,分离出小肠固有层淋巴细胞^[6],通过台盼蓝鉴定细胞活力,活力>90%,调整细胞数为 2×10^6 /ml。用四甲基偶氮唑盐(MTT)法测定小肠固有层淋巴细胞对T淋巴细胞刺激源ConA(伴刀豆球蛋白A,购自Sigma公司)的增殖反应。将细胞悬液分别加入96孔培养板中,每孔加100 μl,再分别加入ConA,使其终质量浓度为6 μg/ml,完全培养基补充总容量至120 μl,置5% CO₂,37 °C培养72h。培养结束前4h,加入0.5% MTT 10 μl/孔,继续培养4h。培

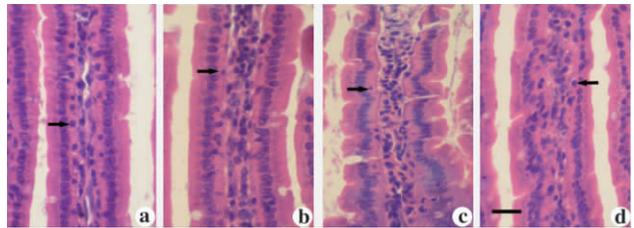
养结束后,每孔加入100 μl 10% SDS(十二烷基硫酸钠)及0.01 mol/L HCl 溶液,继续培养2h,使紫色结晶完全溶解,最后用酶标仪(BLO-RAD公司)在570 nm 波长处测定光密度(OD)值。

1.4 细胞因子的测定 在方法1.3中,固有层淋巴细胞37 °C培养72h后,将细胞上清液收集,使用双抗夹心ELISA法(酶联免疫吸附)测定上清液中的细胞因子IL-2、IL-4(试剂盒购于RB公司),在酶标仪450 nm 处读取OD值。按标准曲线计算出各样品中细胞因子的含量,单位以pg/ml表示。

1.5 统计学分析 应用SPSS 11.0 统计软件对测量数据进行Independent-Samples *t* test 分析。实验结果用平均数±标准差表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 阻断交感神经后青年和老龄小鼠空肠上皮内淋巴细胞数量变化 小肠上皮内淋巴细胞(IEL)存在于小肠上皮内(图1)。统计结果表明,经6-OHDA处理后第1天,青年和老龄鼠的上皮内淋巴细胞分别与同月龄对照组相比均无显著差异;在青年小鼠,空肠段的IEL数量在第5天与其对照组相比减少了22.8%,差异显著($P < 0.05$),在第10、15天,IEL与对照组相比在统计学上无显著差异。老龄小鼠 IEL 数量在第3、5、10天分别比其对照组降低了29.9%、30.2%、23.8%,差异显著($P < 0.05$)(表1)。



Arrows show intraepithelial lymphocyte in jejunum. bar=20 μm. a) 3-month-old mice in control group; b) 18-month-old mice in control group; c) 3-month-old mice on 5th day after 6-OHDA; d) 18-month-old mice on 5th day after 6-OHDA.

图1 青年与老龄小鼠的空肠上皮内淋巴细胞

Fig 1 Intraepithelial lymphocytes in jejunum of adult and old mice

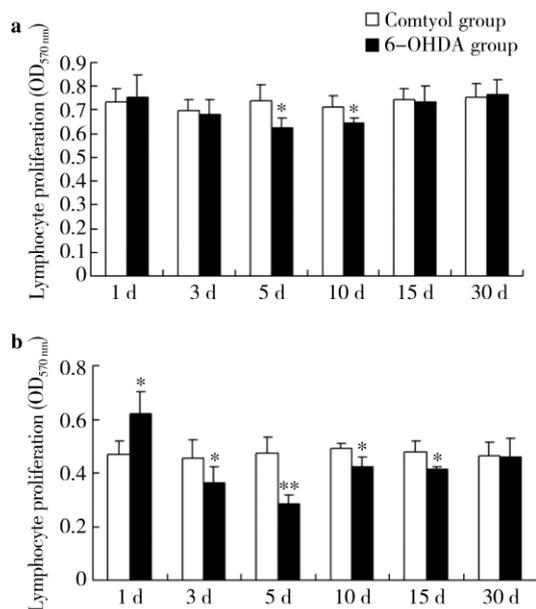
表1 阻断交感神经后3月龄和18月龄小鼠空肠上皮内淋巴细胞数量变化

Tab 1 The number of intraepithelial lymphocyte in jejunum 3-month-old and 18-month-old mice After

Group	1 st day		3 rd day		5 th day		10 th day		15 th day		30 th day	
	3-month-old	18-month-old	3-month-old	18-month-old	3-month-old	18-month-old	3-month-old	18-month-old	3-month-old	18-month-old	3-month-old	18-month-old
Control group	17.6±2.1	15.7±2.6	18.2±2.9	16.7±2.5	18.9±2.3	15.9±3.4	17.8±3.2	16.4±2.3	17.4±2.4	16.1±3.5	18.6±2.8	15.4±3.2
6-OHDA group	16.8±2.8	15.1±3.3	17.5±3.6	11.7±3.7 ^a	14.6±1.6 ^a	11.1±2.9 ^a	16.2±3.8	12.5±1.6 ^a	16.7±2.1	15.3±2.2	17.9±3.3	16.1±3.6

6-OHDA group. a) $P < 0.05$, vs control in the same age group. Data are represented as mean±SEM.

2.2 阻断交感神经后青年和老龄小鼠小肠 T 淋巴细胞增殖的变化 青年小鼠经 6-OHDA 处理后,用 ConA 诱导的小肠固有层 T 淋巴细胞增殖率在阻断后第 5 天和第 10 天与对照组相比,分别下降了 15.3% 和 9.1% ($P < 0.05$) (图 2a)。老龄小鼠在处理后的第 1 天, T 淋巴细胞增殖上升了 32.9% ($P < 0.05$),但在第 3、5、10、15 天均低于对照组,其中在第 5 天极显著,低于对照组 39.4% ($P < 0.01$) (图 2b)。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs control.

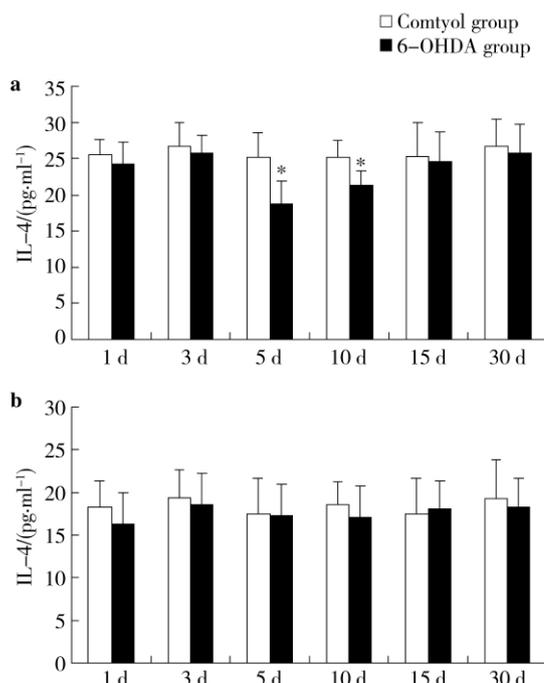
图 2 6-OHDA 处理后 3 月龄(a)和 18 月龄(b)小鼠小肠不同时期 T 淋巴细胞增殖率的变化

Fig 2 Intestinal T lymphocyte proliferation of 3-month-old (a) and 18-month-old (b) mice on different days after 6-OHDA injection

2.3 阻断交感神经后青年和老龄小鼠小肠淋巴细胞 IL-2 和 IL-4 的变化 在细胞因子含量的检测中,青年小鼠 IL-4 的量在第 5、10 天比对照组分别下降了 25.5%、15.2%,差异显著 ($P < 0.05$) (图 3a);老龄小鼠 IL-4 的量在各个时期阻断前后均无显著变化 (图 3b)。青年小鼠 IL-2 在阻断后第 5 天比对照组下降了 12.6% ($P < 0.05$),其他时间 IL-2 无显著变化 (图 4a);老龄小鼠阻断交感神经后,IL-2 在第一天显著升高,比对照组升高了 11.8%,在随后的第 3、5、10、15 天中却呈下降趋势,分别比对照组降低了 21.1%、24.1%、17.0%、13.3% ($P < 0.05$) (图 4b)。

3 讨论

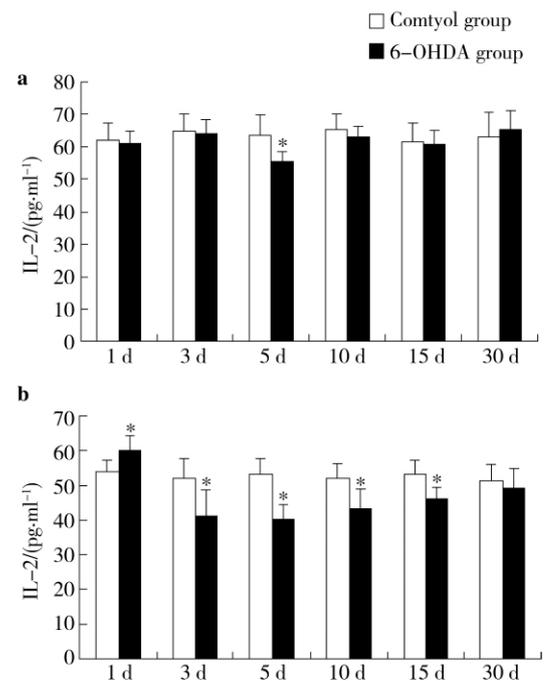
化学性阻断交感神经的作用原理是当 6-OHDA 被去甲肾上腺素(NA)能受体摄取后,被传输至交感神经末梢,发生自体氧化,形成毒性分子,导致交感神经



* $P < 0.05$, vs control.

图 3 6-OHDA 处理后 3 月龄(a)和 18 月龄(b)小鼠小肠不同时期淋巴细胞培养液中 IL-4 含量的变化

Fig 3 The IL-4 level in the culture supernatant of intestinal lymphocyte from 3-month-old (a) and 18-month-old (b) mice in different days after 6-OHDA injection



* $P < 0.05$, vs control.

图 4 6-OHDA 处理后 3 月龄(a)和 18 月龄(b)小鼠小肠不同时期淋巴细胞培养液中 IL-2 含量的变化

Fig 4 The IL-2 level in culture supernatant of intestinal lymphocyte from 3-month-old (a) and 18-month-old (b) mice in different days after 6-OHDA injection

末梢损毁,但是此阻断效果是可逆的,随着停药时间推移会逐渐恢复^[7]。因此我们在注射 6-OHDA 后选择了具有代表性的不同时期观察小肠内相应指标的变化。IEL 是散在分布于肠绒毛上皮细胞之间特殊的一群淋巴细胞,它们是一个庞大的 T 细胞群体,是小肠抵抗感染的第一道防线。本研究中,老龄对照组 IEL 数量在阻断后各时期均低于青年对照组,这可能与老龄机体胸腺功能退化有关。阻断交感神经后,青年小鼠在阻断后第 5、10 天,老龄小鼠在第 3、5、10、15 天,IEL 数量均少于同龄对照组;青年小鼠在第 15 天,老龄小鼠在第 30 天 IEL 的数量与同龄对照组无显著差异,说明化学性损毁外周交感神经在一定程度上降低了青年和老龄小鼠的肠黏膜屏障功能,并且老龄小鼠的下降幅度更明显,恢复周期更长。

本实验表明,老龄对照组的 T 淋巴细胞增殖能力比青年对照组低,并且损毁交感神经后,两者 T 淋巴细胞的增殖状况不同:在青年小鼠,在损毁后小肠 T 淋巴细胞增殖能力在阻断后的前 3 天没有显著变化,到了第 5 天才出现下降,但下降幅度与老龄组相比较小,并且下降持续的时间较短,在阻断后的第 15 天便恢复到正常水平。在老龄小鼠,交感神经损毁后第 1 天,T 淋巴细胞增殖能力显著上升,到了第 3 天却显著下降,直到损毁后第 30 天才恢复正常水平。这种差异可能是青年和老龄小鼠在应对交感神经调控缺失的代偿能力的不同导致的。青年小鼠能够快速通过上调肾上腺儿茶酚胺和增加靶淋巴器官的 β 肾上腺素能受体的密度来应对 NA 的缺失^[8]。而在老龄小鼠,在交感神经损毁第一天表现出 T 淋巴细胞增殖能力显著增高,这可能是由于淋巴细胞上 β 肾上腺素能受体的密度和儿茶酚胺摄取能力在老龄小鼠较青年小鼠高而导致的^[9],当阻断交感神经后,机体自发的进行反馈调节,小肠内 T 淋巴细胞增殖能力呈现短暂的升高,但是由于机体的衰老,小肠内的 NA 含量下降,对 NA 缺失的的代偿机制则不及青年小鼠,随着 NA 缺失时间的增加,T 淋巴细胞增殖能力在第 3 天显著下降,这种趋势一直持续到交感神经阻断后的第 30 天,经过机体的代偿调控才逐渐恢复。在青年组和老年组,IEL 和 T 淋巴细胞活性均在交感神经阻断后第 5 天下降最明显,可能是由于神经阻断后在第 5 天机体 NA 缺失的幅度达到最大,但是机体自身的代偿机制没有及时发挥作用导致的。以上结果表明,交感神经对小肠固有层 T 淋巴细胞活性有促进作用,阻断交感神经对青年和老龄小鼠的作用效果和作用时间上有差别,老龄小鼠的 T 淋巴

细胞增殖能力下降幅度更大,而且恢复时间更长。

IL-2、IL-4 分别属于 Th1 型、Th2 型细胞分泌的细胞因子,这 2 种细胞因子均为 T 辅助性淋巴细胞(Th)分泌,Th1 细胞因子主要介导细胞免疫反应、炎症反应、迟发性变态反应;Th2 型细胞因子主要介导 B 细胞增殖、抗体的产生,促进小肠内 IgA 的分泌。青年小鼠与老龄小鼠在损毁交感神经后的小肠淋巴细胞因子分泌亦有不同,阻断交感神经之后第 5 天,青年小鼠 T 淋巴细胞分泌 IL-4 显著减少,IL-2 差异不显著。在老龄小鼠,交感神经损毁则主要影响小肠 T 淋巴细胞 IL-2 的生成,对 IL-4 的调控则不明显,这说明交感神经对青年和老龄小鼠的小肠 T 细胞免疫可能有 2 种不同的调节机制,造成这种差异的原因可能与 T 细胞表面的肾上腺素能受体有关,肾上腺素能的 α 和 β 受体均能调节机体 T 细胞的功能。 β 2-肾上腺素能受体仅在 Th1 细胞上表达,而在 Th2 细胞上不表达^[10],而老龄小鼠淋巴细胞的 β -肾上腺素能受体的密度要高于青年小鼠,因此交感神经对 Th1 细胞因子 IL-2 的调控在老龄小鼠比青年小鼠更加明显。青年组和老年组的 IL-2、青年组的 IL-4 在交感神经阻断后第 5 天下降最明显,这可能跟 T 淋巴细胞的活性降低相关。

综上所述,随着小鼠月龄的增大,交感神经对小肠的支配退化性减少^[4],老龄小鼠小肠细胞免疫水平较青年小鼠低,在交感神经阻断后第 3 天更为突出,恢复时间更长,说明交感神经能够对青年和老龄小鼠小肠 T 细胞活性有正向调控作用,阻断交感神经对老龄鼠小肠细胞 T 细胞活性的影响比青年小鼠更大。世界卫生组织公布的资料表明,老龄人因胃肠道感染性疾病导致的死亡率是年轻人的 400 倍,并且 60 岁以上的老龄病人中有 25% 的是胃肠炎患者,其中有 85% 的人死于腹泻^[11]。另据报道,人类小肠切除术后感染率为 13.9%^[12],老人术后 48-72 h 是并发脓毒症的高发时间^[13],老龄人在肠道手术后,溃疡的发病率是年轻人的 3 倍^[14]。本实验的结果可为研究老年小肠免疫功能变化提供部分理论依据。临床工作者也可通过考虑交感神经调控因素,加强改善老龄人的肠道免疫功能,并采用合理的治疗方案。

【参考文献】

- [1] Straub RH, Wiest R, Strauch UG, et al. The role of the sympathetic nervous system in intestinal inflammation [J]. Gut, 2006, 55(11): 1640-1649.
- [2] 柯妍妍, 刘文华, 王金秋, 等. 化学阻断交感神经对脾脏形态学的影响及其抗氧化机制的研究 [J]. 免疫学杂志,

- 2012, 28(9): 787-791.
- [3] Yanyan K, Wenjie L, Zixu W, et al. The Role of sympathectomy on the distribution of intraepithelial lymphocyte, mast cell, IgA⁺, CD4⁺ and CD8⁺ cell in intestine of mice[J]. Asian J Anim Vet Adv, 2011, 6(9): 935-943.
- [4] 崔宏力, 李非, 曾艳芳, 等. 大鼠空肠形态学及肠壁交感神经的增龄变化[J]. 中国老年学杂志, 2007, 27(19): 1849-1853.
- [5] Riedl K, Riedl R, Gabain A, et al. The novel adjuvant IC31 strongly improves influenza vaccine-specific cellular and humoral immune responses in young adult and aged mice[J]. Vaccine, 2008, 26(27/28): 3461-3468.
- [5] Fukatsu K, Nagayoshi H, Maeshima Y, et al. Fish oil infusion reverses 5-fluorouracil-induced impairments in mucosal immunity in mice[J]. Clin Nutr, 2008, 27(2): 269-275.
- [7] Madden KS, Stevens SY, Felten DL, et al. Alterations in T lymphocyte activity following chemical sympathectomy in young and old Fischer 344 rats[J]. J Neuroimmunol, 2000, 103(2): 131-145.
- [8] Pesic V, Plecas Solarovic B, Radojevic K, et al. Long-term [beta]-adrenergic receptor blockade increases levels of the most mature thymocyte subsets in aged rats[J]. Int Immunopharmacol, 2007, 7(5): 674-686.
- [9] Ackerman KD, Bellinger DL, Felten SY, et al. Psychoneuroimmunology[M]. CA: Academic, 1991. 72-114
- [10] Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, et al. The sympathetic nerve—an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system [J]. Pharmacol Rev, 2000, 52(4): 595-638.
- [11] Schmucker DL, Thoreux RL. Aging impairs intestinal immunity[J]. Mech Ageing Dev, 2001, 122(13): 1397-1411.
- [12] 王宇, 方丹, 杨燕, 等. 胃肠道手术内源性感染的预防[J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(17): 1611-1611.
- [13] 田鲜美, 刘清泉, 江其敏. 老年人术后并发脓毒症的相关因素分析[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14(4): 204-204.
- [14] 杨昆宪, 瑞生, 贾玲. 老年人肠道手术后应激性溃疡分析[J]. 江苏医药, 2002, 28(1): 14-14.

(收稿日期:2012-12-03;修回日期:2013-01-15)

(编辑 汤玉瑜)