

# Peyer's 结淋巴细胞对结肠上皮细胞屏障功能的影响\*

陈洁<sup>1\*\*</sup> 高杰英<sup>1</sup> 曾丽玲<sup>2</sup> 徐鹏辉<sup>1</sup> 钟耀华<sup>2</sup> 陈小章<sup>2\*\*\*</sup>

1. 军事医学科学院微生物流行病学研究所免疫室, 北京 100071; 2. 香港中文大学上皮细胞生物学研究中心, 香港

**摘要** 为探讨粘膜上皮细胞与淋巴细胞相互作用的机制, 利用 Caco-2 上皮细胞(系)与新鲜分离的小鼠 Peyer's 结淋巴细胞共培养模型, 采用短路电流检测单层上皮细胞跨上皮电阻(TER)的变化, 半定量 RT-PCR 方法检测上皮细胞间的紧密连接相关蛋白 ZO-1 和 ZO-2 mRNA 的表达以及 ELISA 方法测定相关细胞因子 mIL-6 和 hIL-8 的变化. 结果表明, Peyer's 结淋巴细胞可以较好地维持上皮的屏障功能, 但当痢疾杆菌 F2a-12 脂多糖(LPS)作用后, 却使跨上皮电阻明显降低. 细胞因子 mIL-6 和 hIL-8 在不同共培养情况下的差异表达, 揭示淋巴细胞与上皮细胞间的“对话”包括细胞间的直接接触作用.

**关键词** Caco-2 细胞 Peyer's 结淋巴细胞 共培养 跨上皮电阻(TER)

肠粘膜上皮细胞(IEC)是有极性的柱状上皮细胞, 具有消化、吸收、分泌和屏障等重要生理功能; 此外, 粘膜上皮含有占体内 80% 的免疫细胞和免疫分子<sup>[1,2]</sup>, 因此成为机体最大的免疫组织, IEC 通过对粘膜免疫细胞的不同刺激信号来调节肠粘膜的各种免疫反应, 在粘膜的天然和获得性免疫防御机制中发挥重要作用. 研究表明, 上皮细胞与免疫细胞不仅在组织学定位上密切相关, 而且在生理及病理状态下, 两者存在着复杂的“对话”机制, 它是粘膜免疫研究的重要前沿领域, 是探索粘膜免疫独特性与规律的突破口. 因此, 在体外建立一种稳定的上皮细胞与淋巴细胞共培养体系, 以此进行上皮细胞的生理学特性及其免疫调节作用的研究, 是进一步探索肠上皮细胞免疫应答机制的前提和基础. 同时利用痢疾杆菌 F2a-12 LPS 作为抗原, 观察 LPS 在共培养体系中的作用, 为揭示上皮细胞与淋巴细胞之间的“对话”提供实验基础, 为研究粘膜免疫防御机制提供依据.

## 1 材料与方法

将来源于人的 Caco-2 上皮细胞 ( $3 \times 10^5$ /

0.2 mL)与新鲜分离的 BALB/c 小鼠(SPF 级, 6~8 周, 雌性)的 Peyer's 结淋巴细胞( $5 \times 10^6$  或  $1 \times 10^6$ ) 分别上下或混合共培养<sup>[3]</sup>, 并以单独培养的 Caco-2 上皮细胞作为对照.

在共培养第 6, 8 天, 利用短路电流检测仪(DVC-1000; World Precision Instruments Inc., New Haven, CT, USA)进行跨上皮电阻(trans-epithelial electrical resistance, TER)的检测<sup>[3]</sup>.

收集共培养第 6 天 Caco-2 单层细胞, 常规 TRIZOL 法抽提总 RNA, 反转录为 cDNA 后, 分别以 ZO-1, ZO-2 引物<sup>[4]</sup>作 PCR 扩增, 以  $\beta$ -actin 作为内对照, 检测 ZO-1, ZO-2 mRNA 的表达.

分别收集共培养第 6 天各组细胞培养液, 用 ELISA 试剂盒(BIOSOURCE)检测 mIL-6 和 hIL-8 两种细胞因子.

共培养第 4 天, 在滤膜的 Caco-2 单层细胞顶端加入痢疾杆菌 F2a-12 LPS( $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ /滤膜), 继续共培养 48 h 后进行短路电流检测跨上皮电阻.

上述实验结果以平均值  $\pm$  标准差表示, 两样本均差  $t$  检验分析,  $P < 0.05$  为显著性差异,  $P < 0.01$  为极显著性差异.

2002-10-24 收稿, 2002-12-2 收修改稿

\* 国家杰出青年基金资助项目(批准号: 30029002)

\*\* 现地址: 山西医科大学生物教研室, 太原 030001

\*\*\* 联系人, E-mail: hsiaocch@cuhk.edu.hk

## 2 结果与讨论

### 2.1 Peyer's 结淋巴细胞对上皮细胞极性(紧密连接)的维持及单层上皮细胞完整性和屏障功能的影响

上皮细胞屏障功能是依靠位于细胞间顶端的紧密连接(tight junctions, TJs)来完成的, 其紧密程度则可由跨上皮电阻(TER)来反映. 本研究建立了 Caco-2 上皮细胞(系)与新鲜分离的小鼠 Peyer's 结

淋巴细胞共培养模型, 对上皮细胞 TER 检测的结果(图 1)表明: 无论是上下共培养或混合共培养, 在共培养第 6 天, 共培养组与对照之间上皮细胞的 TER 没有明显差异, 但在第 8 天, 对照组 TER 明显下降, 共培养组的 TER 仍维持较高水平, 两组之间有显著性差异( $P < 0.01$ ). 提示与淋巴细胞共育可以较好地维持上皮屏障功能, 对 Caco-2 上皮细胞生长有促进和防止老化的作用.

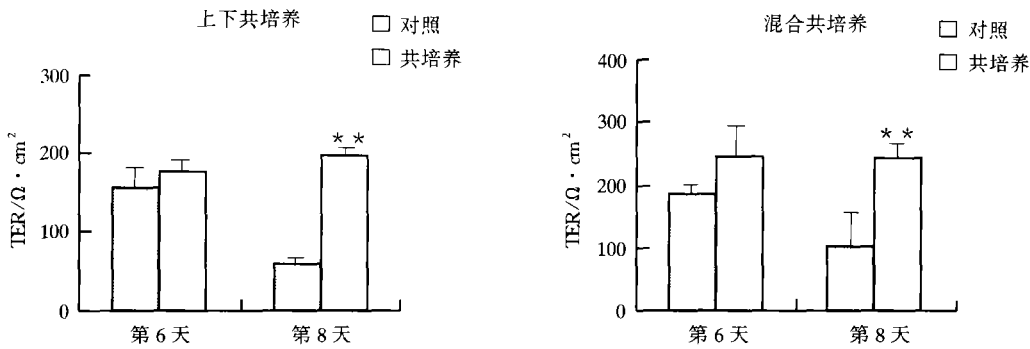


图 1 Caco-2 与 PPL 共培养不同时间 TER(Ω·cm<sup>2</sup>)的变化

进一步用半定量 RT-PCR 检测紧密连接相关蛋白 ZO-1 和 ZO-2 mRNA 的表达, 结果(图 2)显示: 两种共培养组中 ZO-1 的表达均比单独 Caco-2 上皮细胞对照组明显升高, 进一步证实淋巴细胞对上皮

细胞的生长以及极性(紧密连接)的维持有重要作用; 而 ZO-2 的表达在各组间没有明显差异; 提示淋巴细胞影响 Caco-2 细胞间紧密连接的作用对象主要是 ZO-1.

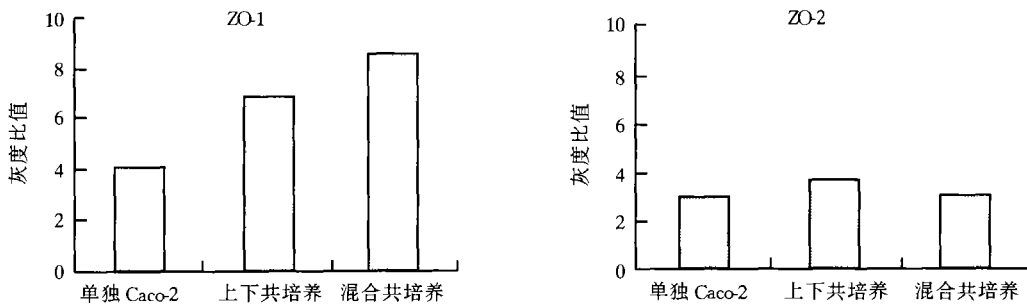


图 2 紧密连接相关蛋白 ZO-1 和 ZO-2 的 RT-PCR 半定量检测结果

### 2.2 不同共培养方式(细胞接触与否)影响共育细胞相关细胞因子的分泌

因为淋巴细胞和上皮细胞的来源不同, 在共培养第 6 天, 用 ELISA 对培养液中小鼠 mIL-6 和人 hIL-8 两种细胞因子进行检测. 结果(图 3)显示, 在混合共培养组中, mIL-6 的相对含量明显高于其

他各组, 其差别十分显著( $P < 0.05$ ); 而该组的 hIL-8 相对含量却明显低于上下共培养组, 其差别非常明显( $P < 0.05$ ). 说明上皮细胞与淋巴细胞直接接触与否诱导的细胞因子在量和类别上均有差别, 提示在共培养体系中上皮细胞与淋巴细胞的相互作用不仅包括各种细胞因子的分泌, 而且还有上皮细胞与淋巴细胞间的直接接触作用.

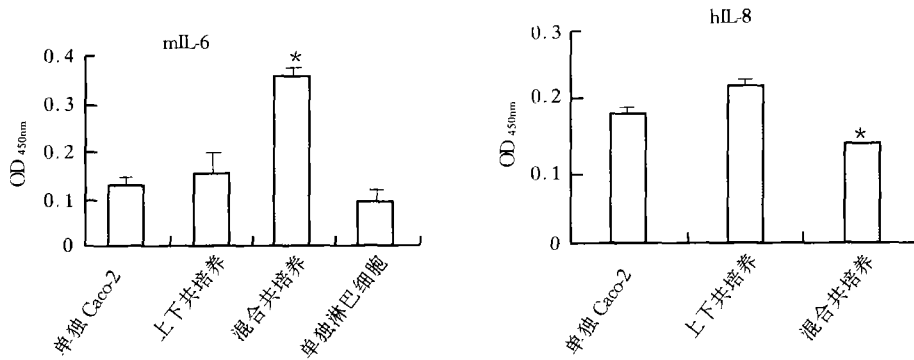


图3 ELISA 检测细胞因子的结果

### 2.3 痢疾杆菌 F2a-12 LPS 降低共育上皮细胞的屏障功能

如前所述, 上下共培养和混合共培养组的 TER 比单独 Caco-2 对照组明显升高. 但是, 当用 LPS 预处理 48 h 后, 两种共培养组 TER 均下降, 与各自对照比较都有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 而单独 Caco-2 细胞 TER 则没有明显的变化(图 4); 说明共育不仅提高了 Caco-2 细胞的屏障功能, 也增加了对 LPS 刺激的敏感性, 提示 LPS 可降低淋巴细胞相关的上皮屏障功能.

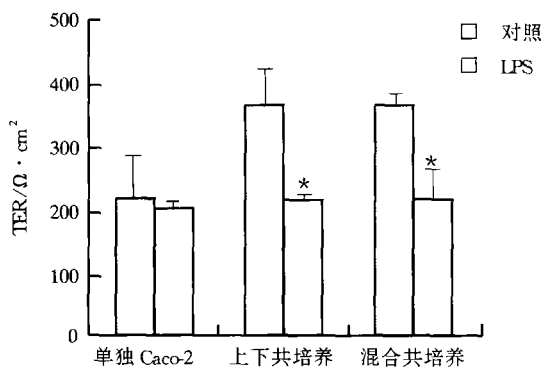


图4 痢疾杆菌 F2a-12 LPS 对 Caco-2 单层细胞作用 48 h 的 TER 变化

总之, 我们在建立的人结肠癌上皮细胞(系) Caco-2 与 Peyer's 结淋巴细胞共培养模型上, 观察到共培养体系中 Peyer's 结淋巴细胞可影响上皮细胞的屏障功能, 并且在不同的共培养(上下共培养与混合共培养)条件下, 以及在正常和感染(LPS)情况下存在着差别; 上皮细胞与淋巴细胞的“对话”, 不仅通过细胞因子的释放, 而且还有细胞与细胞之间的直接接触作用. 我们认为该结果更符合粘膜上皮的生理状态. 目前有关文献[5, 6]报道的共培养

体系中的淋巴细胞均采用外周血淋巴细胞(包括巨噬细胞, 单核粒细胞或白细胞等), 且与上述各种淋巴细胞共育后均导致上皮细胞 TER 下降. 而我们实验中的淋巴细胞来源于肠道粘膜部位的集合淋巴小结(Peyer's 结), 结果显示 Peyer's 结淋巴细胞在正常情况下可以较好地维持上皮细胞的完整性和屏障功能, 只有在感染时才使上皮屏障功能下降; 这与通常所观察到的生理现象相符. 上皮细胞与不同部位(外周血或粘膜)的淋巴细胞共育对其屏障功能的影响存在差异, 可能也反映出系统免疫与粘膜免疫的不同, 说明上皮细胞与淋巴细胞之间存在着复杂的相互关系. 因此, 本研究为进一步探讨淋巴细胞与上皮细胞相互关系, 以及粘膜免疫防御机制奠定了实验基础.

### 参 考 文 献

- Holmgren J, et al. Mucosal immunity: Implications for vaccine development. *Immunobiology*, 1992, 184(2~3): 157
- 高杰英. 粘膜免疫向免疫学提出的新问题. *上海免疫学杂志*, 2000, 20(5): 257
- Chen J, et al. Effect of trans-epithelial electrical resistance of intestine epithelial cell by lymphocyte of Peyer's patch in the co-culture system. *US Chin J Microbiol Immunol*, 2002, 4(2): 47
- Youakim A, et al. Interferon decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin. *Am J Physiol*, 1999; 276: G1279
- Taylor C T, et al. Changes in barrier function of a model intestinal epithelium by intraepithelial lymphocytes require new protein synthesis by epithelial cells. *Gut*, 1997, 40: 634
- McKay D M, et al. Superantigen activation of immune cells evokes epithelial (T84) transport and barrier abnormalities via IFN-gamma and TNF alpha: Inhibition of increased permeability, but not diminished secretory responses by TGF-beta2. *J Immunol*, 1997, 159(5): 2382