

· 论 著 ·

铜绿假单胞菌肺炎鼠动物模型中炎性介质浓度分析

于柏峰,谷海瀛[△],赵振东,翟英超

(海南省人民医院输血科,海口 570311)

摘要:目的 观测炎症指标白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素 8(IL-8)及核基质蛋白-2(MMP-2)浓度在铜绿假单胞菌小鼠肺炎模型肺部炎症及肺纤维化进程中的变化。方法 建立铜绿假单胞菌慢性感染的动物模型,用 ELISA 方法检测其肺泡灌注液中 IL-1 β 、IL-8 及血清 MMP-2 浓度,对其引起的相关炎性反应进行分析。结果 铜绿假单胞菌慢性感染引起的炎性反应峰值在感染后的 2~3 d。结论 铜绿假单胞菌感染引起的炎性反应在一定程度上引起肺纤维化。

关键词:模型;动物;假单胞菌;铜绿;肺纤维化

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.02.011

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)02-0129-02

Analysis of concentrations of inflammatory mediator in rats with cystic fibrosis of lung caused by pseudomonas aeruginosa

Yu Bofeng, Gu Haiying[△], Zhao Zhendong, Zhai Yingchao

(People's Hospital of Hainan Province, Haikou 570311, China)

Abstract: Objective To analyze its inflammatory response and its degree of cystic fibrosis(CF) of lung caused by Pseudomonas aeruginosa by detecting the interleukin IL-1 β , IL-8 and MMP-2. **Methods** Established chronic bronchial infection mice model that was inoculated with P. A. -laden beads, and analyzed its inflammatory response by detecting the cytokines IL-1 β , IL-8 and MMP-2. **Results** The mice did have detectable levels of circulating matrix metalloproteinase-2(MMP-2) after infection with P. A. Interleukin mL-1 β , IL-8 and MMP-2 concentrations peaked at 2-3 d after inoculation. **Conclusion** It can initiate a certain degree of pulmonary fibrosis on the basis of the pulmonary inflammation.

Key words: models, animal; pseudomonas aeruginosa; pulmonary fibrosis

铜绿假单胞菌(pseudomonas aeruginosa, PA)是引起人类感染的传统致病菌,也是医院内呼吸道感染的常见病原菌之一。由其引起的感染具有难治性、高耐药性和高病死率的特点,在院内感染和临床抗感染治疗中占有极其重要的地位^[1]。感染后引发炎症反应,在炎症反应的基础上,会引起一定程度的肺纤维化^[2]。本研究应用 PA 引起的慢性呼吸道感染的鼠动物模型,通过检测其肺泡灌注液中白细胞介素-1 β (IL-1 β),白细胞介素 8(IL-8)以及血清中核基质蛋白-2(MMP-2)浓度变化,对由其引起的炎症反应及肺纤维化程度进行研究,为由此菌引起疾病的诊断和治疗提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与主要试剂 6~8 周龄雌性昆明小鼠(清洁级标准,体质量 26~32 g)由海南省人民医院实验动物中心负责饲养,所有的小鼠处于自然活动状态。IL-1 β 、IL-8 及 MMP-2 检测试剂盒由美国 R&D Systems 公司提供。

1.2 菌株配制^[3] 将标准菌株 PA27853(来自于军事医学科学院菌种保藏中心)接种到血平板,选取经过对数生长期的标准菌株 27 853 单个菌落接种到 2 mL TSB 中,37 °C、18 h 扩增。菌液浓度用 10 倍稀释的 TSB 琼脂培养基评估。用麦氏比浊管比浊,相当于 0.5 个麦氏单位(大约 1.3×10^8 CFU/mL)。

1.3 实验动物分组情况 将 55 只小鼠分为 3 组:A 组 25 只,经支气管接种无菌琼脂糖珠悬液 50 μ L;B 组 25 只,经支气管接种富含 PA 琼脂糖珠悬液 50 μ L;C 组 5 只,不接种,作为健康对照组。

1.4 感染实验动物 小鼠气管切开,分别注入 50 μ L 有 PA 或无菌琼脂糖珠悬液。立即竖起小鼠,保持 2 min,使菌液流入肺内,小鼠有类似呛咳反应。切开伤口不做处理,自然愈合。对照组小鼠只做切口不接种。

1.5 标本的采集及处理 分别于接种后 1、2、3、5、7 d 用 10% 乙醚麻醉小鼠后,先经心脏取血,血清标本收集贮存于 -80 °C 冰箱中用于 MMP-2 及 IL-1 β 、IL-8 浓度检测。用 7 号有斜面的静脉采血针进行肺泡灌注,分 3 次,每次灌注 1.0 mL 无菌 PBS,收集回收液,总回收液要大于 2 mL,用于 IL-1 β 、IL-8 浓度检测

1.6 标本检测 应用酶联免疫定量技术检测 IL-1 β 、IL-8 及 MMP-2,严格按照说明书进行。

1.7 统计学处理 所有数据均用 Excel 及 SAS8.0 统计软件分析处理。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,每组不同时间点的标本检测结果的差异用方差分析处理,各检测指标峰值间差异用方差分析处理,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 IL-1 β 、IL-8 浓度 B 组比 C 组中炎性介质浓度明显升高,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。而 A 组与 C 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。IL-1 β 、IL-8 浓度在接种 PA (B 组) 2~3 d 肺泡灌注液中浓度达到高峰,与接种无菌琼脂(A 组)肺泡灌注液中炎性介质峰值比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。两种细胞因子在接种 7 d 后接近正常水平。血清中未检测到 IL-1 β 及 IL-8,仅有极少数小鼠有低水平表达(数据未显示),见表 1、2。

[△] 通讯作者,电话:(0574)8760959;E-mail:guhaying@nbu.edu.cn。

2.2 血清中 MMP-2 浓度 B 组血清中 MMP-2 峰值与 A 组峰值比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 A 组与 C 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。B 组 MMP-2 浓度在第 3 天达峰值, 见表 3。

表 1 小鼠肺泡灌注液中 IL-1 β 浓度 ($\bar{x} \pm s$)

取样时间(d)	A 组		B 组		C 组	
	n	IL-1 β (ng/mL)	n	IL-1 β (ng/mL)	n	IL-1 β (ng/mL)
1	4	75.5 \pm 21.3	4	555.4 \pm 5.9	5	62.5 \pm 13.4
2	5	97.0 \pm 10.7 Δ	5	105.7 \pm 23.9	—	—
3	5	59.3 \pm 11.3	5	122.3 \pm 29.2* Δ	—	—
5	4	61.4 \pm 14.9	3	94.4 \pm 11.0	—	—
7	3	58.9 \pm 11.5	4	77.9 \pm 6.5	—	—

Δ : $P < 0.05$, 与 C 组比较; * : $P < 0.05$, 与 A 组峰值比较。—: 表示无数据。

表 2 小鼠肺泡灌注液中 IL-8 浓度 ($\bar{x} \pm s$)

取样时间(d)	A 组		B 组		C 组	
	n	IL-8(ng/mL)	n	IL-8(ng/mL)	n	IL-8(ng/mL)
1	4	23.4 \pm 6.1	4	26.3 \pm 4.6	5	20.9 \pm 5.8
2	5	18.6 \pm 2.7	5	88.2 \pm 14.1 Δ	—	—
3	5	17.7 \pm 6.3	5	89.6 \pm 15.2* Δ	—	—
5	4	17.4 \pm 4.8	3	26.9 \pm 8.4	—	—
7	3	17.8 \pm 3.1	4	21.2 \pm 10.6	—	—

Δ : $P < 0.05$, 与 C 组比较; * : $P < 0.05$, 与 A 组峰值比较。—: 表示无数据。

表 3 小鼠血清中 MMP-2 浓度 ($\bar{x} \pm s$)

取样时间(d)	A 组		B 组		C 组	
	n	MMP-2(ng/mL)	n	MMP-2(ng/mL)	n	MMP-2(ng/mL)
1	4	8.4 \pm 1.6	4	8.7 \pm 1.6	5	8.9 \pm 2.4
2	5	9.4 \pm 2.4	5	18.2 \pm 5.2	—	—
3	5	9.9 \pm 5.4	5	21.7 \pm 11.7* Δ	—	—
5	4	6.2 \pm 0.76	3	8.6 \pm 1.6	—	—
7	3	7.1 \pm 1.4	4	7.9 \pm 2.6	—	—

Δ : $P < 0.05$, 与 C 组比较; * : $P < 0.05$, 与 A 组峰值比较。—: 表示无数据。

3 讨论

炎症是机体对外来刺激产生的一种病理反应过程, IL-1 β 、IL-8 等是已知的各种炎症反应的起始^[4], 它们可促进炎症细胞的聚集、活化和炎症介质的释放^[5], 并具有趋化作用, 产生炎症反应。IL-1 β 可直接作用于下丘脑体温调节中枢, 引起发热, 增强炎症反应, 促进机体对外来异物的清除; IL-8 也可使中性粒细胞和内皮细胞粘连, 使急性炎症反应增强。本研究证实, PA 引起的肺部炎症反应使肺泡灌注液中 IL-1 β 、IL-8 在感染后迅速增加, 在 2~3 d 达到峰值, 5~7 d 恢复正常。

在本实验中, 两组小鼠血清中均未检测到 IL-1 β 、IL-8, 分析原因可能是血中浓度太低, 另外因为酶联免疫法只能检测游离的细胞因子, 对结合至细胞或受体的细胞因子不能测出; 也可能与本研究采用方法的灵敏度、实验动物的炎症反应水平在

阈值以下有关。这与 Brown 等^[6]报道相同, 因为从信号功能上看, 虽然细胞因子很像内分泌激素, 但细胞因子大多数是释放在细胞周围短距离传递信号, 而内分泌是分泌至血液远距离传递, 这些分泌在局部的细胞因子常常不能在血中测出其浓度。但 Matthys 和 Billiau^[7]在 1997 年指出, 恶病质很少归因于一种细胞因子单独作用, 而是多组细胞因子的共同作用。他们认为, 即使某种独立的细胞因子在系统中未被检测到, 但它已经有足够的数量充当增效剂引起炎症反应。

致病性 PA 感染容易导致肺纤维化, 从而导致微循环系统的阻断和损伤^[5], 进而引起患者肺部更严重的感染^[8]。蛋白酶和抗蛋白酶的失衡是肺气肿形成的机制之一^[9]; 肺纤维化另一个主要原因是基底膜的降解, 而金属基质蛋白酶(MMPs)几乎能降解所有的细胞外基质(ECM)。目前, 有学者认为除了中性粒细胞弹性蛋白酶外, MMPs 家族在肺纤维化中起的重要作用不可忽视^[10]。

MMPs 是一组具有相同功能、结构高度同源、依赖锌离子的肽链内切酶的总称, MMPs 在转录、分泌、激活和活化后等水平上受到严格调控。其中 MMP-2 主要表达于肺泡巨噬细胞、淋巴细胞和支气管上皮细胞, MMP-2 能溶解基底膜中 IV 型胶原、明胶、层粘蛋白和 ECM, 导致肺纤维化。有实验证实, 检测 MMP-2 可观测肺纤维化的进展程度^[11]。本实验检测了动物模型血清中 MMP-2 浓度, 观察由 PA 感染引起的肺部炎症变化及肺纤维化的进展程度。

通过检测动物模型肺泡灌注液 IL-1 β 、IL-8 及血清中 MMP-2 浓度变化, 证实由 PA 慢性感染引起的炎症反应在 2~3 d 达到峰值, 并在肺部炎症基础上引起肺部一定程度的囊性纤维化, 与相关研究^[12]及临床进程相符, 为临床诊断、治疗及该菌的致病性研究提供了依据。

参考文献:

- [1] 季海生, 朱德全. 重症监护病房病原菌耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(1): 103-106.
- [2] Smith EE, Buckley DG, Wu Z, et al. Genetic adaptation by pseudomonas aeruginosa to the airways of cystic fibrosis patients[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(22): 8487.
- [3] Starke JR, Edwards C, Langston CJ, et al. A mouse model of chronic pulmonary infection with pseudomonas aeruginosa and pseudomonas cepacia[J]. Pediatr Res, 1987, 22(6): 698-702.
- [4] Noah TL, Black PW, Cheng RE, et al. Nasal and bronchoalveolar lavage fluid cytokines in early cystic fibrosis[J]. J Infect Dis, 1997, 175(3): 638-647.
- [5] Drews J. Immunopharmacology. Principles and perspectives[M]. Berlin, Germany: Springer-Verlag KG, 1990, 66-71: 209-237.
- [6] Brown MA, Morgan WJ, Finley PR, et al. Circulating levels of tumor necrosis factor and interleukin-1 in cystic fibrosis[J]. Pediatr Pulmonol, 1991, 10(2): 86-91.
- [7] Matthys P, Billiau A. Cytokines and cachexia[J]. Nutrition, 1997, 13(9): 763-770.

3 结 论

COPD 的发病机制目前尚未完全明了,普遍认为 COPD 是以气道、肺实质和肺血管的慢性炎症为特征,其中细胞因子在 COPD 发病过程中起重要作用。

IL-8 主要由单核-巨噬细胞产生,主要生物学活性是吸引和激活中性粒细胞,定向游走到反应部位并释放一系列活性产物,导致机体局部的炎症反应。Babušyte^[2]等研究证实 IL-8 水平在 COPD 患者的痰及肺泡灌洗液中显著升高。Eickmeier 等^[3]亦发现 IL-8 和 IL-13 在 COPD 患者中的表达显著增高。本研究结果显示血浆中 IL-8 及 IL-13 在 COPD 呼吸衰竭时显著增高,而应用机械通气治疗 72 h 后患者血氧饱和度等肺功能指标明显改善后又显著下降,与 COPD 缓解期相比无显著差异。

IL-13 与机体的炎症反应和免疫调节等过程有关,Crosby^[4]等研究发现 IL-13 在肺组织受损后的表达显著增高,炎症反应最终导致了 COPD 的形成。动物实验研究转基因成年鼠时发现,IL-13 过表达可使鼠肺容积扩大,黏液分泌增多,最终导致肺气肿的形成^[5]。Bowles 等^[6]发现在马的气道阻塞模型中,外周血 IL-13 水平升高。本研究结果显示 COPD 急性加重期患者血浆 IL-13 浓度明显增高,IL-13 可能参与了 COPD 发病机制并在其发病过程中加重了呼吸道炎症进程,在应用机械通气治疗 72 h 后,随患者症状的明显好转,血液中 IL-13 浓度显著下降,与稳定期差异不明显。

IL-18 是新近发现的一种细胞因子,是多种免疫性疾病的重要发病因子,Imaoka 等^[7]在实验中发现 IL-18 的过表达参与了 COPD 的发病进程。Biet 等^[8]研究发现 IL-18 不仅可以诱导 T 细胞产生 IFN- γ ,还可以促进其他细胞因子如 TNF- α 、IL-8 及 GM-CSF 等的生成。Hoshino 等^[9]研究亦证实 IL-13 及 IL-18 在 COPD 患者中的表达显著增高,在 COPD 进程中有重要作用。本研究结果显示 IL-18 浓度在 COPD 急性加重期明显升高,应用呼吸机辅助通气改善缺氧、病情好转后其浓度又显著下降。

本研究发现血浆中的 IL-8、IL-13 及 IL-18 浓度在 COPD 患者急性呼吸衰竭时显著增高,在应用机械通气开始治疗 1 h 时下降不明显,随着通气氧合功能的改善,这些细胞因子浓度显著下降,当机械通气治疗 72 h 后患者各项生命体征相对稳定时,血液中 IL-8、IL-13 及 IL-18 浓度与 COPD 稳定期差异不明显,因此认为 IL-8、IL-13、IL-18 这些细胞因子及其之间的相互作用,参与了 COPD 气道炎症过程,检测血浆 IL-8、IL-13、

IL-18 浓度可作为临床判断 COPD 患者病变的严重程度及活动性指标之一。

参考文献:

- [1] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2007, 25(8):453-460.
- [2] Babušyte A, Jeroch J, Stakauskas R, et al. The effect of induced sputum and bronchoalveolar lavage fluid from patients with chronic obstructive pulmonary disease on neutrophil migration in vitro[J]. Medicina (Kaunas), 2010, 46(5):315-322.
- [3] Eickmeier O, Huebner M, Herrmann E, et al. Sputum biomarker profiles in cystic fibrosis (CF) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and association between pulmonary function[J]. Cytokine, 2010, 50(2):152-157.
- [4] Crosby LM, Waters CM. Epithelial repair mechanisms in the lung[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2010, 298(6):L715-731.
- [5] Zheng T, Zhu Z, Wang Z, et al. Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase and cathepsin-dependent emphysema[J]. J Clin Invest, 2000, 106(9):1081-1093.
- [6] Bowles KS, Beadle RE, Mouch S, et al. A novel model for equine recurrent airway obstruction[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2002, 87(3/4):385-389.
- [7] Imaoka H, Hoshino T, Takei S, et al. Interleukin-18 production and pulmonary function in COPD[J]. Eur Respir J, 2008, 31(2):287-297.
- [8] Biet F, Loch C, Kremer L. Immunoregulatory functions of interleukin 18 and its role in defense against bacterial pathogens[J]. J Mol Med, 2002, 80(3):147-162.
- [9] Hoshino T, Kato S, Oka N, et al. Pulmonary inflammation and emphysema: role of the cytokines IL-18 and IL-13[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2007, 176(1):49-62.

(收稿日期:2010-08-25 修回日期:2010-10-25)

(上接第 130 页)

- [8] Imai K, Dalal SS, Chen ES, et al. Human collagenase(matrix metalloproteinase-1) expression in the lungs of patients with emphysema[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(3 Pt 1):786-791.
- [9] Finlay GA, O'Driscoll LR, Russell KJ, et al. Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1997, 156(1):240-247.
- [10] 陈小菊,程德云. 金属基质蛋白酶与慢性阻塞性肺疾病[J]. 临床肺科杂志, 2003, 8(5):419-421.
- [11] Delcaux C, d'Ortho MP, Delacourt C, et al. Gelatinases in epithelial lining fluid of patients with adult respiratory distress syndrome[J]. Am J Physiol, 1997, 272(3 Pt 1):L442-451.
- [12] 谷海瀛. 铜绿假单胞菌鞭毛功能的影响因素及其致病性[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2008, 28(12):1149-1151.

(收稿日期:2010-02-18 修回日期:2010-06-09)