

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.23.001

Pam3Csk4 预处理对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染小鼠肾脓肿影响研究*

陈益国¹, 邓林强¹, 陈 会¹, 熊章华¹, 桂晓美¹, 曾黎峰¹, 喻金梅^{2△}

(1. 江西省人民医院检验科, 南昌 330008; 2. 江西省妇幼保健院肿瘤科 南昌 330006)

[摘要] **目的** 研究 TLR2 激动剂 Pam3Csk4 预处理后耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)攻击小鼠肾脏的保护作用。**方法** 将雌性 SPF 级昆明小鼠共分为未处理正常小鼠组、生理盐水组和 Pam3Csk4 处理组 3 组, 每组 4 只。Pam3Csk4 处理组用 Pam3Csk4 尾静脉注射预处理小鼠 24 h, 每只 50 μg, 分别于 MRSA 感染 3、7 d 后观察肾脏脓肿的形成情况; 流式法检测 MRSA 攻击 12 h 后肾脏中性粒细胞的浸润; Q-PCR 法检测 MRSA 攻击 6、12 h 后小鼠肾脏肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素(IL)-6、IL-1 和 IL-10 的基因表达, 以及高迁移蛋白 B1(HGMP1)、热休克蛋白 70(HSP70)、Fcγ III 受体(FcγR III)、补体受体 3(CR3)及趋化因子 CXCL1/2 受体的表达情况。**结果** 与生理盐水组比较, Pam3Csk4 预处理能抑制 MRSA 攻击小鼠后肾脓肿的形成, 减少肾脏中性粒细胞的浸润($P < 0.01$), 降低趋化因子受体 CXCL1/2 基因的表达($P < 0.05$); Pam3Csk4 预处理小鼠肾脏 TNF-α、IL-6 和 IL-1 表达水平降低, 而 IL-10 则增加($P < 0.05$); HSP70 和 HGMP1 基因在 MRSA 感染 6 h 内两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 但 12 h 后 HSP70 和 HGMP1 基因均降低($P < 0.01$); Pam3Csk4 预处理小鼠肾脏 CR3 和 Fcγ III 受体表达水平均高于生理盐水组($P < 0.05$)。**结论** Pam3Csk4 预处理降低 MRSA 导致的炎症反应并对 MRSA 所致肾脓肿具有抑制作用。

[关键词] 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; Pam3Csk4; 肾脓肿**[中图分类号]** R392.9**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)23-3005-05

Effect of Pam3Csk4 pretreatment on murine renal abscess induced by methicillin-resistant staphylococcus aureus*

CHEN Yiguo¹, DENG Linqiang¹, CHEN Hui¹, XIONG Zhanghua¹,
GUI Xiaomei¹, ZENG Lifeng¹, YU Jinmei^{2△}(1. Department of Laboratory, Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang, Jiangxi 330008, China;
2. Department of Oncology, Jiangxi Maternal and Child Health Hospital, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effect of methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) infected murine renal abscess after pretreatment with Pam3Csk4, a TLR2 agonist. **Methods** Female SPF Kunming mice were divided into three groups with 4 cases in each group: the normal group, the saline group and the Pam3Csk4 group. The Pam3Csk4 group was pretreated with Pam3Csk4 by tail vein for 24 h, 50 μg for each one, and the formation of renal abscess was observed after 3 and 7 days of MRSA infection; flow cytometry was used to detect renal neutrophils after MRSA infected for 12 h; Q-PCR was used to detect the gene expression of tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin (IL)-6, IL-1 and IL-10 after 6- and 12-hour infection, the expression of high migration protein B1 (HGMP1), heat shock protein 70 (HSP70), Fcγ III receptor (FcγR III), complement receptor 3 (CR3) and chemokine receptor CXCL1/2. **Results** Compared with the saline group, the Pam3Csk4 group significantly inhibited the formation of renal abscess, it reduced renal neutrophil infiltration ($P < 0.01$), and decreased the expression of chemokine CXCL1/2 receptor gene ($P < 0.05$); the levels of TNF-α, IL-6 and IL-1 significantly decreased, while IL-10 increased ($P < 0.05$); there was no significant difference between the two groups in the expressions of HSP70 and HGMP1 gene within 6 h ($P > 0.05$), but they decreased after 12 h ($P < 0.01$); the expressions of CR3 and Fcγ III receptors in the Pam3Csk4 group were higher than those of the saline group ($P < 0.05$). **Conclusion** Pretreatment with Pam3Csk4 reduces the inflammatory response and inhibits renal abscess caused by MRSA.

[Key words] methicillin-resistant staphylococcus aureus; Pam3Csk4; renal abscess

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81360454)。 作者简介: 陈益国(1976—), 副主任技师, 博士, 主要从事抗感染免疫研究。

△ 通信作者, E-mail: 1049414699@qq.com。

金黄色葡萄球菌是院内感染率较高的细菌之一,自上世纪 60 年代检出第 1 株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)以来,其分离率已逐年上升,目前 MRSA 已由院内感染扩展到社区^[1-2],自 2002 年以来,耐万古霉素金黄色葡萄球菌分离逐年增加^[3],使临床用药面临严峻考验^[4]。因此,寻找免疫学治疗和预防金黄色葡萄球菌感染已成为人们关注的焦点,TLR2 受体是机体免疫系统识别革兰阳性细菌的主要模式识别受体。本课题组前期研究表明,TLR2 受体合成配基 Pam3Csk4 预处理小鼠能显著降低 MRSA 小鼠肺炎模型的病死率,并在体外能增强巨噬细胞和中性粒细胞的杀菌功能^[5-6],提示 Pam3Csk4 能增强感染动物对金黄色葡萄球菌的抵抗能力,由于金黄色葡萄球菌血流感染后,脏器脓肿是常见并发症之一,所形成脓肿可源源不断地提供感染源,是金黄色葡萄球菌感染久治不愈的常见原因之一。因此本研究拟用亚致死剂量的 MRSA 进行小鼠造模,探索 Pam3Csk4 对金黄色葡萄球菌感染后对肾脏的保护功能。

1 材料与方法

1.1 材料 18~22 g 的 SPF 级昆明(KM)小鼠购自于江西省中医药大学实验动物中心;MRSA 标准菌株(MRSA, ATCC43300)于本室保存;PE/CY5.5-anti-Gr-1, PE-anti-CD11b 来源于 biolegend 公司(美国),胶原酶 I 和 DNase 来源于美国 sigma 公司,RT-PCR 和 Q-PCR 扩增试剂盒购自 TaKaRa 公司(日本),其余试剂均为国产分析纯。Beckman 低温冷冻高速离心机、CO₂ 恒温细菌培养箱和 Q-PCR 仪(CFX96)由江西省人民医院中心实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 引物合成 由上海英韦创津公司合成下列引物序列,见表 1。

1.2.2 MRSA 制备 将 MRSA 转种于血琼脂平板,

18~24 h 后挑选单个菌落移种于 LB 培养继续培养 4~6 h 到对数期,4 ℃ 6 000×g 离心 10 min,留取沉淀,无菌 pH 7.4 PBS 洗 5 次后重悬,细菌数按照文献^[6]计算后备用。

1.2.3 肾脓肿模型 MRSA 菌悬液制备同前,将所得菌悬液稀释至每 100 μL 含 1×10⁸ CFU MRSA,尾静脉注射每只 100 μL, Pam3Csk4 预处理剂量每只 50 μg,注射体积每只 100 μL,每组动物 4 只,3、7 d 后断颈处死并收集肾脏观察小鼠脓肿个数和切片作 HE 染色,观察脓肿大小和数量、WBC 浸润情况。

1.2.4 肾脏中性粒细胞浸润流式检测 将小鼠分为未处理正常小鼠组、生理盐水组和 Pam3Csk4 处理组共 3 组,每组 4 只, Pam3Csk4 处理组按每只 50 μg 尾静脉注射 Pam3Csk4,生理盐水组注射体积每只 100 μL 生理盐水。除未处理正常小鼠组外, Pam3Csk4 或生理盐水处理 24 h 后以每只 1×10⁸ CFU 的 MRSA 尾静脉攻击,攻击小鼠攻击 12 h 后断颈处死并摘取左肾,匀浆,胰酶消化,肾中性粒细胞制备按文献^[5]方法进行,即用 10 U/mL 胶原酶 I 和 2 μg/mL 的 DNAs 消化 30 min,离心收集细胞后加入进行 PE/CY5.5 Gr-1 和 PE-anti-CD11b 室温孵育 30 min 后,1×PBS 洗 3 次,4% 多聚甲醛固定后检测。

1.2.5 肾组织 PCR 将雌性 20~22 g SPF 级的 KM 小鼠分成组,每组动物 4 只, Pam3Csk4 预处理剂量每只 50 μg。MRSA 亚致死量感染细菌量为每只 1×10⁸ CFU,尾静脉注射。攻击小鼠 6、12 h 后断颈处死并摘取左肾、匀浆。Q-PCR 按参考文献^[7]略有改动进行,按 TaKaRa 试剂盒提取总 RNA,反转录后进行 Q-PCR;反转录条件按 TakaRa 提供方法进行;Q-PCR:95 ℃ 变性 5 min,58 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,共进行 35~40 个循环。

表 1 cDNA 序列

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')	基因库编号
GADPH	TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA	TTG CTG TTG AAG TCG CAG GA	126012538
TNF-α	GCC AGG AGG GAG AAC AGA AAC T	AAG AGG CTG AGA CAT AGG CAC C	133892368
IL-6	TCC AGA AAC CGC TAT GAA GTT	TTC ATA CAA TCA GAA TTG CCA TT	13624310
IL-1	CCT TGT GCA AGT GTC TGA AGC	CTC CAC AGC CAC AAT GAG TGA	118130747
IL-10	GCA GCC TTG CAG AAA AGA GAG	TCC TGC ATT AAG GAG TCG GTT	291575143
CXCL1	TTC ACC TCA AGA ACA TCC AG	ACT TCT TTC TCC GTT ACT TGG G	229577225
CXCL2	CCA AGG GTT GAC TTC AAG AAC	GTC AGT TAG CCT TGC CTT TGT	118130527
CR3	CCA GGA ATG CAC CAA GTA CA	CTC AGG ATT AGC GAT GCT CC	198434
FCRⅢ	CAG ATG TTT CAG AAT GCA CAC	GAG TAG AAG AGT TCC CAG GGT	190570187
HSP70	TCA GGA CCC ACC ATC GAG GAG	AAC CTT GAC AGT AAT CGG TGC	124339825
HMGB1	CTC ACA GCC ATT GCA GTA CAT	AGA AGT TGA CAG AAG CAT CCG	114326547

1.3 统计学处理 用 SPSS13.0 进行统计学分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验; 计数资料用率表示, 组间采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

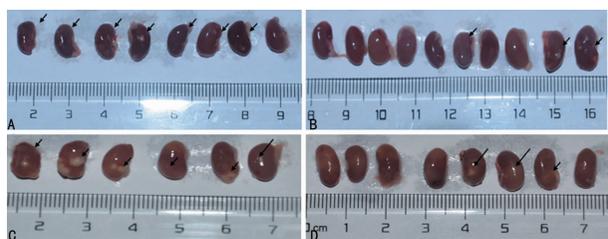
2 结 果

2.1 Pam3Csk4 预处理抑制 MRSA 导致的肾脓肿

Pam3Csk4 预处理小鼠感染 MRSA 后, 脓肿主要集中在肾脏, MRSA 感染 3、7 d Pam3Csk4 处理组脓肿肾数量少于生理盐水组 ($P < 0.05$), 见表 2, 图 1 箭头所示白色部分为肾脓肿, 生理盐水组 7 d 内 1 只小鼠出现死亡, 其余肾脏已变形且脓肿较为明显, 切片结果显示 Pam3Csk4 处理组肾脓肿的病变程度明显减轻低于生理盐水组 (切片均来自于左肾), 见图 2。肝组织未见肉眼可见脓肿, 切片也少见脓肿迹象。

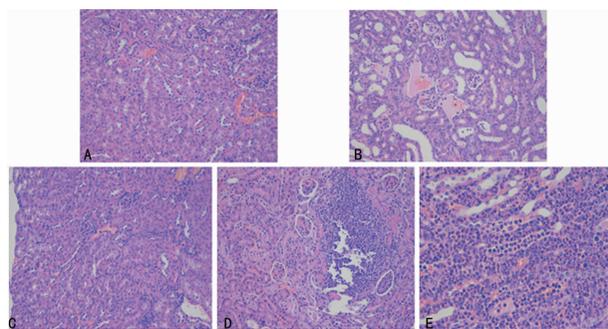
表 2 MRSA 感染后的脓肿肾个数(个)

项目	3 d		7 d	
	生理盐水组	Pam3Csk4 处理组	生理盐水组	Pam3Csk4 处理组
发生脓肿肾个数	7	3	6	3
未发生脓肿肾个数	1	5	0	5
<i>P</i>	0.031		0.041	



A: 生理盐水组 3 d; B: Pam3Csk4 处理组 3 d; C: 生理盐水组 7 d; D: Pam3Csk4 处理组 7 d

图 1 Pam3Csk4 预处理抑制 MRSA 导致的肾脓肿大体观



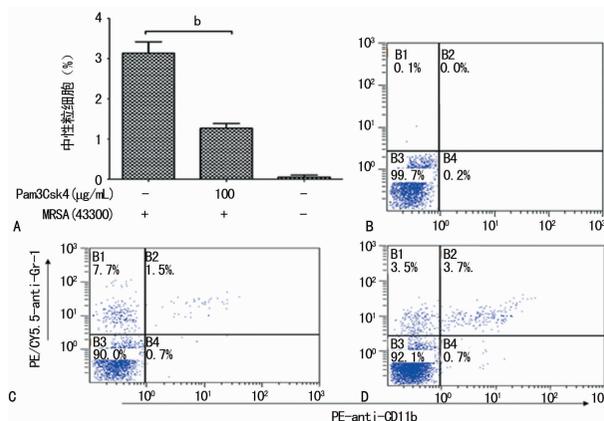
A: 正常小鼠组; B: Pam3Csk4 处理组 3 d; C: Pam3Csk4 处理组 7 d; D: 生理盐水组 3 d; E: 生理盐水组 7 d

图 2 Pam3Csk4 预处理抑制 MRSA 导致的肾脓肿切片 (HE×200)

2.2 Pam3Csk4 预处理抑制中性粒细胞的浸润 流式结果显示, MRSA 感染后 12 h, Pam3Csk4 处理组小鼠肾组织中中性粒细胞浸润为 1.5%, 低于生理盐水组 (3.7%), 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 3。

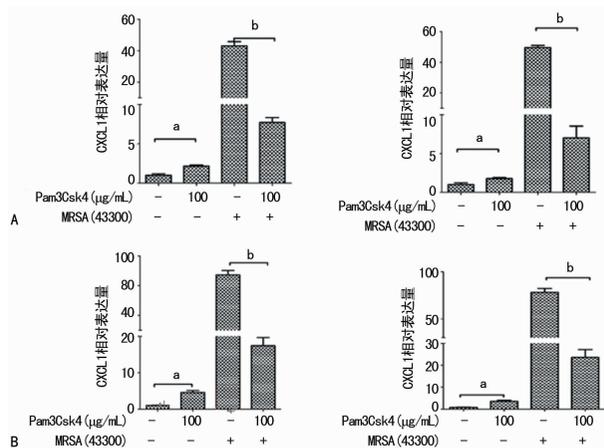
2.3 Pam3Csk4 预处理抑制小鼠肾脏 CXCL1/2 mRNA

NA 的表达 Pam3Csk4 预处理后 CXCL1/2 显著增强 ($P < 0.01$), 但 MRSA 感染 6 h 和 12 h 后, Pam3Csk4 处理组小鼠 CXCL1/2 表达均低于生理盐水组 ($P < 0.01$), 见图 4。



A: 中性粒细胞值; B: 正常小鼠组; C: Pam3Csk4 处理组; D: 生理盐水组; $b: P < 0.01$

图 3 Pam3Csk4 预处理抑制中性粒细胞的浸润



A: MRSA 感染后 6 h; B: MRSA 感染后 12 h; $a: P < 0.05$; $b: P < 0.01$

图 4 MRSA 感染后小鼠肾脏 CXCL1/2 基因表达

2.4 Pam3Csk4 预处理降低 MRSA 感染后肾脏炎症介质的释放 在感染后不同时间点, Pam3Csk4 预处理显著限制感染小鼠炎症介质 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 而促进抗炎因子 IL-10 基因表达, 见图 5。

2.5 Pam3Csk4 预处理降低小鼠肾组织 HGMP1 和 HSP70 基因表达 Pam3Csk4 预处理小鼠在 MRSA 感染 6 h 内与生理盐水组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但 12 h 能显著降低 HSP70 和 HGMP1 的基因表达, 见图 6。

2.6 Pam3Csk4 预处理增强小鼠肾组织 Fc γ R III 和 CR3 基因表达 在 6、12 h 时间点 Pam3Csk4 处理组 CR3 和 Fc γ R III 均显著高于生理盐水组, 而 CR3 在感染后 6 h Pam3Csk4 处理组与生理盐水组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 在感染 12 h 后 Pam3Csk4 处理组显著高于生理盐水组, 见图 7。

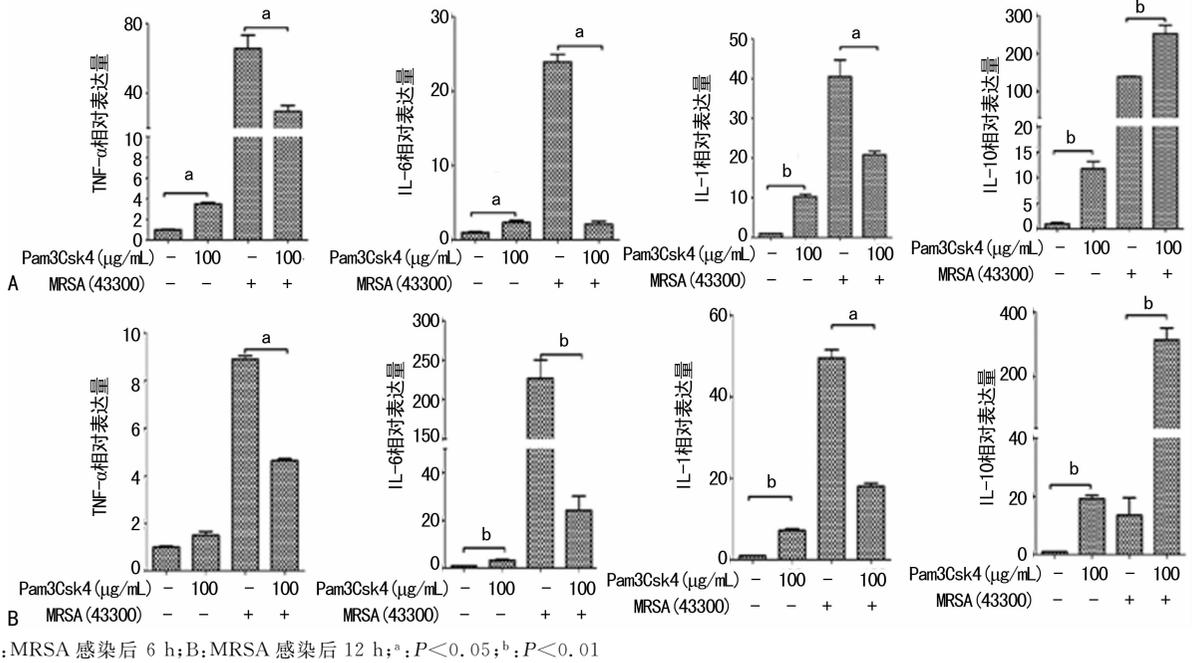


图 5 MRSA 感染后肾组织 TNF-α、IL-6、IL-1β 和 IL-10 的 mRNA 表达

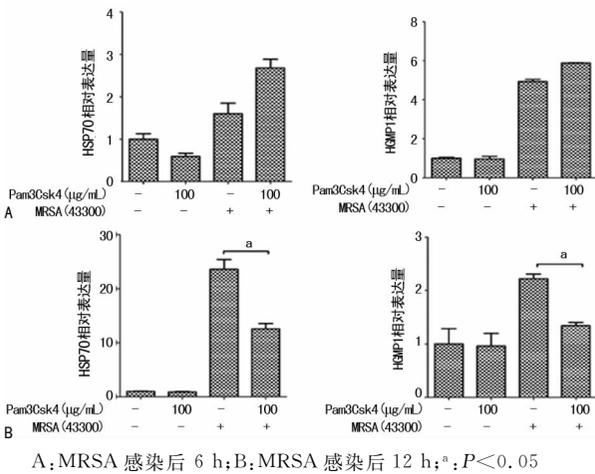


图 6 Pam3Csk4 预处理降低小鼠肾脏 HGMP1 和 HSP70 的表达

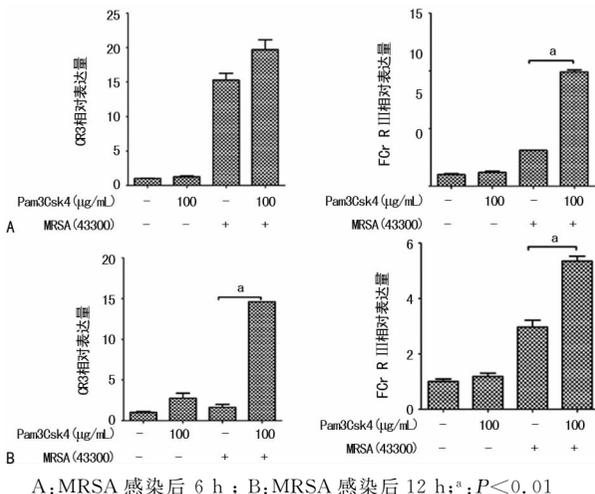


图 7 Pam3Csk4 预处理增强 FCγR III 和 CR3 的表达

3 讨论

金黄色葡萄球菌血流感染后,脏器脓肿是常见并发症之一,所形成脓肿可源源不断地提供感染源,是金黄色葡萄球菌慢性感染久治不愈的常见原因之一,因此本研究探索 Pam3Csk4 是否能抑制金黄色葡萄球菌内脏脓肿的形成;本研究结果显示,MRSA 感染小鼠,肝组织未见肉眼可见脓肿,切片也少见脓肿迹象,Pam3Csk4 预处理后,脓肿主要集中于肾脏,MRSA 感染 3 d 和 7 d 的结果显示,Pam3Csk4 处理组肾脏脓肿数量显著减少,切片结果显示其肾脓肿的病变程度明显减轻低于生理盐水处理组。

中性粒细胞是天然抗感染免疫的一线细胞^[7],当金黄色葡萄球菌侵入机体后,中性粒细胞快速聚集到感染部位,从而发挥抗感染作用,但过度的中性粒细胞浸润也会导致不同程度组织损伤和过度炎症反应^[8]。另一方面,中性粒细胞删除的小鼠也能显著降低其细菌清除率和感染动物的存活时间^[9],因此适当控制中性粒细胞的浸润具有重要意义。与以往研究^[10]一致,本研究结果表明,预处理 Pam3Csk4 减少 MRSA 感染小鼠肾脏中性粒细胞浸润。进一步研究表明,这种现象可能与降低中性粒细胞趋化因子 CX-CL1/2 及细胞表面趋化性受体表达有关,其机制可能通过限制机体中性粒细胞的浸润而抑制因过度中性粒细胞聚集而导致的过度炎症反应^[11]。本课题组前期已发表数据显示,Pam3CSK4 鼻腔滴注也能显著降低 MRSA 感染后肺部中性粒细胞的浸润^[5],但如何控制中性粒细胞的聚集量目前仍然是亟待解决的问题。

对于感染患者来说,过度的炎症反应往往是其死亡的重要因素^[12],因此本研究对小鼠感染后肾脏炎症介质的基因表达进行了检测,结果发现,Pam3Csk4 的预处理能抑制 MRSA 感染小鼠肾组织促炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的释放,并且提高抗炎症因子 IL-10 的释放,提示 Pam3Csk4 预处理能抑制 MRSA 感染导致的过度炎症反应。

HGMP1 和 HSP70 反应急性肾损伤的重要炎症指标,HGMP1 和 HSP70 的表达增加能增加肾脏的炎症反应和肾细胞的急性损伤^[13]。本研究表明,Pam3Csk4 预处理小鼠在金黄色葡萄球菌感染 6 h 内与对照组比较无显著变化,但能显著降低 12 h 后 HGMP1 和 HSP70 的 mRNA 表达,提示 Pam3Csk4 能降低金黄色葡萄球菌感染小鼠肾脏的炎症反应。

调理吞噬是机体抗菌免疫重要机制,其中调理性 Fc γ 受体分为 3 类^[14],通过结合不同的 IgG 亚型发挥调理吞噬作用,有研究报道 TLR2 激动剂处理能增强外周血单核细胞释放细胞因子和体外抗菌能力^[15]。本研究结果表明,Pam3Csk4 预处理能增强 MRSA 感染后肾 FC γ R III 基因表达,但单独 Pam3Csk4 预处理后其表达水平增加不明显,其潜在机制尚不明确。补体受体为另一类调理吞噬性受体,可通过结合与细菌结合的 C3b 和 iC3b 而发挥补体参与的杀菌作用,文献研究表明,机体感染病原微生物后补体受体的表达水平增加^[15]。因此,本研究也检测肾组织中补体受体的表达,结果表明,Pam3Csk4 预处理也能显著增强 CR3 的表达。结合上述研究结果提示,Pam3Csk4 预处理增强的细菌清除率可能与增强肾组织免疫细胞表面调理吞噬性受体表达、抑或是增强中性粒细胞等免疫细胞氧化应激、杀菌性蛋白的释放有关^[5]。

综上所述,Pam3Csk4 预处理能显著降低 MRSA 导致肾脓肿,同时抑制因 MRSA 感染所导致的过度炎症反应,降低肾损伤程度,该现象并非增加 PMN 等免疫细胞数量,可能与增强肾组织浸润的免疫细胞的吞噬功能相关。

参考文献

- [1] CHEN C J, HUANG Y C. New epidemiology of Staphylococcus aureus infection in Asia[J]. Clin Microbiol Infect, 2014, 20(7): 605-623.
- [2] MEDIAVILLA J R, CHEN L, MATHEMA B, et al. Global epidemiology of community-associated methicillin resistant Staphylococcus aureus (CA-MRSA)[J]. Curr Opin Microbiol, 2012, 15(5): 588-595.
- [3] TARAI B, DAS P, KUMAR D. Recurrent challenges for clinicians; emergence of Methicillin-Resistant staphylococcus aureus, vancomycin resistance, and current treatment options[J]. J Lab Physicians, 2013, 5(2): 71-78.
- [4] EVANGELISTA SDE S, DE OLIVEIRA A C. Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a global problem[J]. Rev Bras Enferm, 2015, 68(1): 128-135.
- [5] CHEN Y G, ZHANG Y, DENG L Q, et al. Control of methicillin-resistant staphylococcus aureus pneumonia utilizing TLR2 agonist Pam3CSK4[J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0149233.
- [6] 陈益国, 邓林强, 张咏, 等. Pam3Csk4 预处理增强巨噬细胞对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌杀菌作用[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(1): 13-18.
- [7] WANG J, ARASE H. Regulation of immune responses by neutrophils[J]. Ann N Y Acad Sci, 2014, 1319(1): 66-81.
- [8] LOFTSPRING M C, JOHNSON H L, JOHNSON A J, et al. Depletion of GR-1-Positive cells is associated with reduced neutrophil inflammation and astrocyte reactivity after experimental intracerebral hemorrhage [J]. Transl Stroke Res, 2012, 3(Suppl 1): 147-154.
- [9] ROBERTSON C M, PERRONE E E, MCCONNELL K W, et al. Neutrophil depletion causes a fatal defect in murine pulmonary Staphylococcus aureus clearance [J]. J Surg Res, 2008, 150(2): 278-285.
- [10] ALVES-FILHO J C, DE FREITAS A, SPILLER F, et al. The role of neutrophils in severe sepsis[J]. Shock, 2008, 30(Suppl 1): S3-9.
- [11] KOBAYASHI Y. The role of chemokines in neutrophil biology[J]. Front Biosci, 2008, 13(7): 2400-2407.
- [12] WIERSINGA W J, LEOPOLD S J, CRANENDONK D R, et al. Host innate immune responses to sepsis[J]. Virulence, 2014, 5(1): 36-44.
- [13] CASTOLDI A, BRAGA T T, CORREA-COSTA M, et al. TLR2, TLR4 and the MYD88 signaling pathway are crucial for neutrophil migration in acute kidney injury induced by sepsis[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e37584.
- [14] JOSHI T, BUTCHAR J P, TRIDANDAPANI S. Fc γ receptor signaling in phagocytes[J]. Int J Hematol, 2006, 84(3): 210-216.
- [15] LILIUS E M, NUUTILA J. Bacterial infections, DNA virus infections, and RNA virus infections manifest differently in neutrophil receptor expression[J]. Sci World J, 2012(1): 527347.

(收稿日期: 2018-02-06 修回日期: 2018-03-26)