

[文章编号] 1000-4718(2009)01-0183-03

金黄色葡萄球菌肠毒素对小鼠慢性哮喘模型的抗炎作用*

李 华¹, 刘金保^{2△}, 陆 丽², 董伟华², 沈守星²(¹ 南方医科大学基因工程研究所, 广东 广州 510515; ² 广州医学院病理生理教研室, 广东 广州 510182)

[摘要] 目的: 用金黄色葡萄球菌肠毒素 A(SEA)和肠毒素 B(SEB)干预幼年小鼠, 观察它们对小鼠慢性哮喘气道炎症的影响以及对气道内相关细胞因子水平的调节作用。方法: 实验组中 BALB/c 小鼠在出生后 1 周开始腹腔注射 0.1 mL SEA 或 SEB(浓度 1 mg/L), 隔天注射, 共 7 次。其它小组注射相同剂量生理盐水对照。BALB/c 小鼠出生后 4 周建立哮喘模型, 实验组和模型组分别在 0、7 和 14 d 用卵白蛋白(OVA)腹腔注射致敏, 在 28 d 开始隔天 OVA 雾化激发哮喘, 共 7 次, 末次激发后 24-48 h 内取支气管肺泡灌洗液(BALF), 进行嗜酸性粒细胞和总白细胞计数, 其余 BALF 离心 -70 °C 冻存检测细胞因子, 固定肺组织做病理切片分析。结果: SEA 组和 SEB 组小鼠肺组织炎症反应轻于模型组, BALF 中嗜酸性粒细胞数量少于模型组 ($P < 0.05$); SEA、SEB 组 BALF 中 Th1 细胞因子干扰素- γ (IFN- γ) 高于模型组 ($P < 0.05$); 而 Th2 细胞因子白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-5(IL-5)和嗜酸性粒细胞趋化因子(eotaxin)均低于模型组 ($P < 0.01$)。结论: 早期感染 SEA、SEB 可以减少小鼠慢性哮喘支气管肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞的数量, 可能通过调节 Th1/Th2 细胞因子比值减轻气道中的哮喘炎症反应。

[关键词] 葡萄球菌, 金黄色; 肠毒素类; 哮喘; 细胞因子类

[KEY WORDS] Staphylococcus aureus; Enterotoxins; Asthma; Cytokines

[中图分类号] R562.2*5 **[文献标识码]** A

目前, 科学家们根据流行病学调查和动物实验提出一个新的观点: 细菌感染对哮喘的发作具有双向调节作用, 同样的细菌抗原既可以加剧也可以抑制过敏性免疫反应, 这主要取决于机体接触抗原的时机。当一种微生物诱导的 Th1 反应出现在机体发生过敏原诱导的 Th2 过敏性免疫反应之前, 则这种 Th1 反应就具有保护作用^[1,2]; 反之, 如果微生物诱导的 Th1 反应出现在机体发生过敏原诱导的 Th2 过敏性免疫反应之后, 则这种 Th1 反应就会加剧过敏性反应的发生^[3,4]。另外, 细菌抗原对机体的作用还与抗原的剂量及接触次数有关。本实验室前期的研究发现一些细菌(如金黄色葡萄球菌、大肠杆菌)及细菌抗原蛋白(PPD)可以通过调节 Th1/Th2 细胞因子的比值减缓哮喘豚鼠的气道炎症和减少肺泡内嗜酸性粒细胞的渗出^[5-7]。继续研究发现金黄色葡萄球菌的外毒素之一肠毒素 B(staphylococcal enterotoxin B, SEB)也可以减缓豚鼠急性哮喘的症状^[8], 因此本实验在小鼠出生后早期给予金黄色葡萄球菌肠毒素 A(staphylococcal enterotoxin A, SEA)和 SEB, 通过病理组织切片观察和 ELISA 方法检测肺泡中细胞因子水平, 进一步探讨细菌抗原对哮喘的干预作用, 为哮喘的防治提供一个新的研究方向。

材 料 和 方 法

1 主要试剂

SEA、SEB(1mg)购自军事医学科学院微生物流行病学研究所; 卵清蛋白(OVA, Grade III)为 Sigma 产品; 小鼠细胞因子 ELISA 试剂盒购自 eBioscience; 小鼠 Eotaxin ELISA 试剂盒购自 Endogen。

2 动物分组及处理

健康清洁级 1 周 BALB/c 小鼠 48 只, 雌雄不限, 由广东中医药大学实验动物中心提供, 随机分为 4 组, 正常对照组、模型组、SEA 组、SEB 组各 12 只。SEA 组和 SEB 组 BALB/c 小鼠在出生后 1 周开始腹腔注射 0.1 mL SEA 或 SEB(浓度 1 mg/L), 隔天注射, 共 7 次。其它组小鼠注射相同剂量生理盐水作为对照。BALB/c 小鼠出生后 4 周建立哮喘模型, 实验组和模型组分别在 0、7 和 14 d 用卵白蛋白(OVA)腹腔注射致敏, 在第 28、30、32、34、36、38 和 40 d 用 OVA 雾化 1 h 激发, 末次激发后 24-48 h 内取材。

3 取材与检测

3.1 支气管肺泡灌洗 每组小鼠各取 9 只摘眼球放血颈椎脱臼处死, 仰卧位固定, 气管插管, 肺泡灌洗生理盐水 0.6 mL

[收稿日期] 2007-10-29 [修回日期] 2008-03-06

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30170402); 广州市教育局基金资助项目(No. 1009)

△ 通讯作者 Tel: 020-81340337; E-mail: liujinbao1@yahoo.com.cn

×3次,每次灌洗反复缓慢抽吸3次,记录每次的回收量(回收率应>80%),Ep管收集全部的支气管肺泡灌洗液(brochoalveolar lavage fluid, BALF),4℃ 1500 r/min离心10 min,上清液-70℃保存待测细胞因子;细胞沉淀用1 mL生理盐水溶液重悬,用稀释液稀释后分别计数细胞总数和嗜酸性粒细胞。并计算嗜酸性粒细胞百分比。

3.2 肺组织病理检查 每组小鼠各3只摘眼球放血颈椎脱臼处死,开胸取出肺组织,置于4%多聚甲醛固定液中固定24 h以上。常规取材、脱水、石蜡包埋、制备石蜡切片,HE染色。

3.3 小鼠BALF中细胞因子的检测 ELISA法检测细胞因子IFN-γ、IL-4、IL-5和嗜酸性粒细胞趋化因子(eotaxin),IFN-γ、IL-4、IL-5、eotaxin检测灵敏度下限分别为15 ng/L、4 ng/L、4 ng/L和8 ng/L。

4 统计学处理

采用SPSS 11.0软件进行统计分析。数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间比较采用单因素方差分析。

结 果

1 小鼠BALF中细胞计数

与对照组小鼠相比,模型组细胞总数、Eos百分比与Eos绝对计数均显著升高($P < 0.05$);与模型组相比,SEA组和SEB组细胞总数、Eos百分比与Eos绝对计数减少,接近对照

组,见表1。

表1 4组小鼠BALF中细胞计数及比值

Tab 1 Total white blood cells and eosinophil counts in the BALF of mice in four groups($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

Group	Total WBC ($\times 10^8/L$)	Percentage of Eos(%)	Eos ($\times 10^8/L$)
Normal	6.30 ± 2.64	0 ± 0	0 ± 0
Model	16.00 ± 3.52*	12.00 ± 3.10*	1.99 ± 0.56*
SEA infection	14.53 ± 5.49	8.00 ± 1.26#	1.19 ± 0.57#
SEB infection	13.84 ± 3.29	5.00 ± 2.24#	0.75 ± 0.40#

* $P < 0.05$ vs normal group; # $P < 0.05$ vs model group.

2 小鼠肺组织病理改变

对照组小鼠支气管、小支气管、伴行小动脉及肺泡结构清晰,气道纤毛上皮排列整齐,气管/血管周围无炎性细胞浸润、无充血水肿;模型组小鼠支气管、细支气管上皮下和小血管周围可见明显炎性细胞浸润,以Eos浸润为主,气道上皮结构紊乱,部分有脱落,上皮下充血水肿明显,肺泡间质增厚,亦可见炎性细胞浸润。SEA组和SEB组的肺组织炎症改变较模型组相对逐渐减轻,镜下可见支气管、细支气管和伴行小血管周围炎症细胞浸润程度减少,充血水肿状况改善,气道上皮结构趋于正常,见图1。

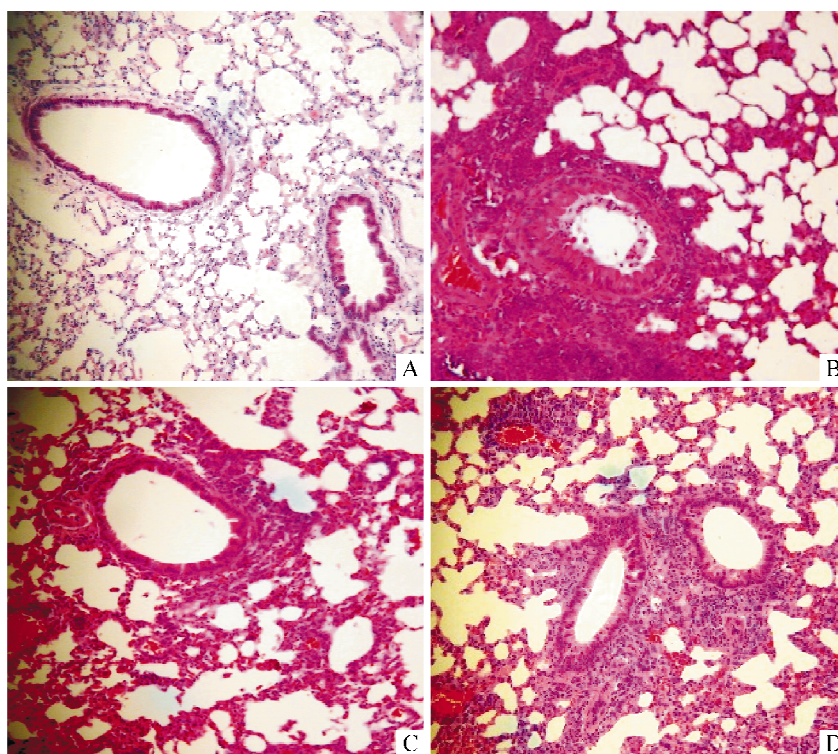


Fig 1 Histological changes of lung in mice from four groups (HE, ×200). A: normal group; B: model group; C: SEA infection group; D: SEB infection group.

图1 4组动物肺组织学变化

3 小鼠支气管肺泡灌洗液中细胞因子浓度测定

结果显示对照组BALF中IL-4、IL-5和eotaxin浓度明

显低于模型组,而IFN-γ浓度则显著高于模型组。SEA组和SEB组的BALF中IL-4、IL-5和eotaxin浓度也明显低于

模型组,而 IFN- γ 浓度高于模型组,见表 2。

表 2 4 组小鼠 BALF 中细胞因子浓度测定

Tab 2 Levels of cytokines in the BALF of mice in four groups ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Group	IFN- γ (ng/L)	IL-4 (ng/L)	IL-5 (ng/L)	Eotaxin (ng/L)
Normal	42.68 \pm 7.56	21.53 \pm 5.83	19.87 \pm 8.38	14.72 \pm 4.81
Model	15.23 \pm 4.64*	67.25 \pm 17.21*	114.66 \pm 16.32*	31.74 \pm 2.86*
SEA infection	31.53 \pm 8.89 [#]	32.71 \pm 9.32 [#]	25.35 \pm 7.85 [#]	19.61 \pm 4.00 [#]
SEB infection	34.16 \pm 6.82 [#]	24.06 \pm 6.23 [#]	21.62 \pm 9.15 [#]	21.09 \pm 4.87 [#]

* $P < 0.01$ vs normal group; [#] $P < 0.01$ vs model group.

讨 论

许多研究表明,刚出生小鼠的免疫系统倾向于 Th2 型反应,而 Th1 型反应相对较弱,新生小鼠是向 Th1 型还是向 Th2 型反应发展,与抗原递呈细胞的不同,佐剂的存在以及给予抗原剂量的多少有关^[9]。本实验通过早期小剂量多次给予小鼠腹腔注射金黄色葡萄球菌肠毒素(SE),研究 SE 对小鼠模型气道内慢性炎症的影响。SE 是一组具有高度生物学活性的蛋白质,在免疫学中现已被确认是一种典型的超级抗原(superantigen, SA_g)。作为免疫抗原物质,只需极微量(ng 水平)就可刺激大量 T 细胞增殖并使之产生多种细胞因子,目前许多科学家们利用 SE 的这种特性来研究 SE 对肿瘤、感染性疾病及其它疾病的防治。小剂量 SE 可诱导较弱的 Th1 反应,再次接种可引起记忆型 Th1 细胞的“二次免疫反应”,从而促进新生小鼠向 Th1 反应发展^[10]。实验利用 ELISA 方法检测各组小鼠 BALF 中 IL-5 和 eotaxin 浓度,发现 SEA 组和 SEB 组中两者的浓度均低于模型组($P < 0.01$),和正常对照组接近,特别是 IL-5 浓度降低明显,表示早期小剂量多次注射 SE 可以抑制 OVA 雾化小鼠的肺组织分泌 IL-5 和 eotaxin,从而减少局部 Eos 的渗出和炎症反应。镜下观察各组小鼠病理切片,我们发现早期小剂量多次注射 SE 超抗原可以在一定程度上缓减由 OVA 致敏激发的小鼠气道炎症的发生,提示早期预防性多次给予小鼠小剂量 SEA 或 SEB 可以缓减哮喘发作症状和减轻哮喘气道炎症反应,其作用机制可能与 SE 早期刺激小鼠免疫系统发育,调节 Th1/Th2 平衡,抑制炎

症介质的产生有关,但其作用机制尚不清楚,有待进一步深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] Kilpi T, Kero J, Jokinen J, et al. Common respiratory infections early in life may reduce the risk of atopic dermatitis[J]. Clin Infect Dis, 2002, 34(5): 620-626.
- [2] Noverr MC, Huffnagle GB. The microflora hypothesis of allergic diseases[J]. Clin Exp Allergy, 2005, 35(12): 1511-1520.
- [3] Forsthuber T, Yip HC, Lehmann PV. Induction of TH1 and TH2 immunity in neonatal mice[J]. Science, 1996, 271(5256): 1728-1730.
- [4] Power CA, Wei G, Bretscher PA. Mycobacterial dose defines the Th1/Th2 nature of the immune response independently of whether immunization is administered by the intravenous, subcutaneous, or intradermal route[J]. Infect Immun, 1998, 66(12): 5743-5750.
- [5] 陈江华,刘金保,陆丽,等.发病前细菌感染抑制过敏性哮喘发作的实验研究[J].中国病理生理杂志, 2006, 22(10): 2053-2054, 2058.
- [6] 刘金保,钟南山,李树浓,等. PPD 对豚鼠实验性哮喘气道炎症的作用[J]. 免疫学杂志, 2000, 18(5): 350-352.
- [7] 刘金保,钟南山,李树浓,等. PPD 对 TH1 细胞的在体调节及对卵蛋白致敏小鼠气道炎症的影响[J]. 免疫学杂志, 2002, 18(6): 443-446.
- [8] 李华,陆丽,刘金保,等.金黄色葡萄球菌肠毒素 B 对豚鼠哮喘模型 Th1/Th2 细胞因子的影响[J]. 免疫学杂志, 2006, 22(3): S139-S141.
- [9] Marchant A, Goetghebuer T, Ota MO, et al. Newborns develop a Th1 type immune response to mycobacterium bovis bacillus calmette guerin vaccination[J]. J Immunol, 1999, 163(4): 2249-2255.
- [10] Saloga J, Lack G, Bradley K, et al. Inhibition of the development of immediate hypersensitivity by staphylococcal enterotoxin B[J]. Eur J Immunol, 1994, 24(12): 3140-3147.

(上接第 179 页)

- [6] Yamamoto K, Yamamoto M, Akazawa K, et al. Decrease in elastin gene expression and protein synthesis in fibroblasts derived from cardinal ligaments of patients with prolapsus uteri[J]. Cell Biol Int, 1997, 21(9): 605-611.
- [7] Szauder KM, Cao T, Boyd CD, et al. Lysyl oxidase in development, aging and pathologies of the skin[J]. Pathol Biol, 2005, 53(7): 448-456.
- [8] Maki JM, Sormunen R, Lippo S, et al. Lysyl oxidase is

essential for normal development and function of the respiratory system and for the integrity of elastic and collagen fibers in various tissues[J]. Am J Pathol, 2005, 167(4): 927-936.

- [9] Kobak W, Lu J, Hardart A, et al. Expression of lysyl oxidase and transforming growth factor beta 2 in women with severe pelvic organ prolapse[J]. J Reprod Med, 2005, 50(11): 827-831.