

· 短篇论著 ·

# 脆弱类杆菌内毒素/脂多糖对正常人外周血单核细胞分泌肿瘤坏死因子 $\alpha$ 和白细胞介素 $1\beta$ 的影响

马铮铮 任利成 黄晓元

感染和脓毒性休克,至今仍然是严重烧(创)伤或大手术后患者面临的严重问题,是影响创面愈合的关键因素<sup>[1]</sup>。此时患者免疫力下降,厌氧菌所致脓毒症的发生率呈上升趋势,脆弱类杆菌等条件致病菌在其中占较大比例,成为严重烧伤常见的并发症和死亡原因之一。

以往多选择大肠杆菌 LPS 进行观察研究,对于脆弱类杆菌 LPS 的相关报道较少。脆弱类杆菌是人体微生物群落重要的组成部分,是临床检出率最高的厌氧菌之一<sup>[2]</sup>。本研究以脓毒症为出发点,结合敏感检测技术,拟观察脆弱类杆菌 LPS 在烧伤感染中的变化和作用,探讨其可能的机制。

## 1 材料与与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

标准脆弱类杆菌 NCTC9343 购自美国模式菌种收集中心。RPMI 1640 培养基、N-2-羟基哌嗪乙磺酸(HEPES)、新生牛血清(NCS)购自美国 HyClone 公司, TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  ELISA 试剂盒购自深圳晶美生物技术有限公司,瑞氏染液购自上海新中化学科技有限公司,淋巴细胞分离液(相对密度 1.077)购自北京鼎国昌盛生物科技有限责任公司。恒温细胞培养箱购自德国 Heraeus 公司,倒置相差显微镜购自日本 Olympus 公司,2100 型酶标仪购自美国 Awareness 公司,DU-800 型紫外分光光度仪购自美国 Beckman 公司。

### 1.2 样本来源及细胞实验

**1.2.1 样本来源** (1)对标准脆弱类杆菌 NCTC9343 进行常规复苏,接种至实验前 24 h 内新鲜配制并于厌氧环境下预还原的厌氧菌液体培养基中,37℃ 培养 72 h。采取改良酚水法<sup>[3]</sup>提取脆弱类杆菌 LPS。经鲎试验检测其活性,以无热原水和 LPS 工作标准品分别作阴性和阳性对照检验其效价,制备成 1 g/L 的溶液备用。(2)采集 6 例健康成年志愿者外周静脉血 10 mL,置入去热原的乙二胺四乙酸抗凝试管中,密度梯度离心法获取末次离心细胞,重新悬浮于 RPMI 1640 培养液中,其内含含有体积分数 10% NCS、2 mmol/L 谷氨酰胺、25 mmol/L HEPES,常规培养过夜。细胞计数,锥虫蓝染色提示活细胞比例为 95% ~ 98% [(96  $\pm$  4)%],瑞氏染色提示细胞纯度为 94% ~ 98% [(94  $\pm$  3)%]。

**1.2.2 细胞实验** (1)将单核细胞接种于 24 孔培养板,  $1 \times 10^6$  个/孔,按照随机数字表法分为 6 个部分。分别加入终浓度为 0(正常对照)、0.1、1.0、10.0、100.0、1000.0 ng/mL 的 LPS,每种浓度 LPS 设 6 个复孔。细胞常规培养 24 h,分别收集样本离心,将上清液装入 Eppendorf 管备用。(2)将单核细胞接种于 24 孔培养板,  $1 \times 10^5$  个/孔,按照随机数字表法分为 5 个部分。加入终浓度为 1000.0 ng/mL 的 LPS 分别作用 0(加入 LPS 后即刻)、4、8、16、24 h(每个时相点设 6 个复孔),收集样本进行离心,将上清液装入 Eppendorf 管备用。

### 1.3 检测指标

按照 ELISA 试剂盒说明书操作,检测不同浓度 LPS 和同一浓度 LPS 作用不同时间的单核细胞上清液,记录 TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  含量。

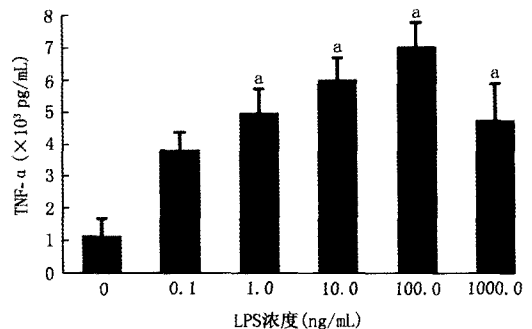
### 1.4 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 17.0 统计软件,行秩和检验(Kruskal-Wallis 法),Nemenyi 法进行组间多重比较。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度 LPS 对单核细胞分泌 TNF- $\alpha$ 的影响

单核细胞培养液中 TNF- $\alpha$  的浓度随着脆弱类杆菌 LPS 浓度的增加而升高,当 LPS 浓度达 100.0 ng/mL 时,培养液中 TNF- $\alpha$  浓度达峰值;LPS 浓度增至 1000.0 ng/mL 时,培养液中 TNF- $\alpha$  浓度虽下降但仍保持于较高水平。与 0 ng/mL LPS 比较,1.0、10.0、100.0、1000.0 ng/mL 的 LPS 作用下, TNF- $\alpha$  含量均明显增加( $\chi^2$  值为 1.59 ~ 22.98,  $P$  值均小于 0.05)。见图 1。



注:与 0 ng/mL LPS 作用时(正常对照)比较,\* $P < 0.05$

图 1 不同浓度脆弱类杆菌 LPS 对单核细胞分泌 TNF- $\alpha$  的影响

### 2.2 不同浓度 LPS 对单核细胞分泌 IL-1 $\beta$ 的影响

单核细胞培养液中 IL-1 $\beta$  的浓度随着脆弱类杆菌 LPS 浓度的增加而升高,当 LPS 浓度达 100.0 ng/mL 时,培养液

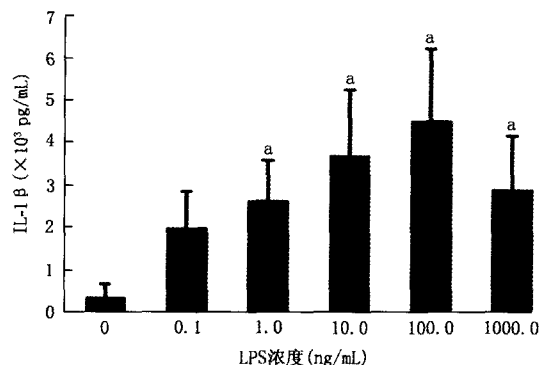
DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2012.04.020

基金项目:国家自然科学基金(30471785)

作者单位:423000 湖南省郴州市第一人民医院烧伤整形外科(马铮铮);中南大学湘雅医院烧伤重建外科(任利成、黄晓元)

通信作者:黄晓元,410008, Email: huxzhong@ yahoo. com. cn, 电话:0731-84327198

中 IL-1 $\beta$  浓度达峰值; LPS 浓度增至 1000.0 ng/mL 时, 培养液中 IL-1 $\beta$  浓度虽下降但仍保持在较高水平。与 0 ng/mL LPS 比较, 1.0、10.0、100.0、1000.0 ng/mL 作用下, IL-1 $\beta$  含量明显增加( $\chi^2$  值为 2.70 ~ 17.34,  $P$  值均小于 0.05)。见图 2。

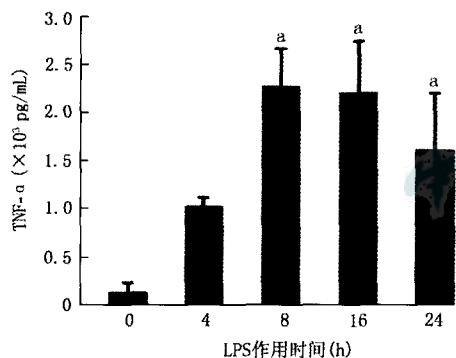


注: 与 0 ng/mL LPS 作用时(正常对照)比较, \* $P$  < 0.05

图 2 不同浓度脆弱类杆菌 LPS 对单核细胞分泌 IL-1 $\beta$  的影响

### 2.3 同一浓度 LPS 作用不同时间对单核细胞分泌 TNF- $\alpha$ 的影响

当脆弱类杆菌 LPS 浓度为 1000.0 ng/mL 时, 作用 4 h 单核细胞上清液中 TNF- $\alpha$  含量显著增加, 8 h 达峰值, 之后稍有下降但仍保持在较高水平。与作用 0 h 比较, 1000.0 ng/mL LPS 作用 8、16、24 h 时 TNF- $\alpha$  含量明显增加( $\chi^2$  值为 1.81 ~ 15.48,  $P$  值均小于 0.05)。见图 3。

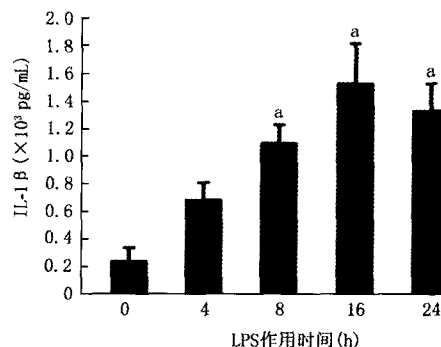


注: 与作用 0 h(加入 LPS 后即刻)比较, \* $P$  < 0.05

图 3 1000.0 ng/mL 脆弱类杆菌 LPS 作用不同时间诱导单核细胞分泌 TNF- $\alpha$  的含量比较

### 2.4 同一浓度 LPS 作用不同时间对单核细胞分泌 IL-1 $\beta$ 的影响

当脆弱类杆菌 LPS 浓度为 1000.0 ng/mL 时, 作用 4 h 单核细胞上清液中 IL-1 $\beta$  含量显著增加, 16 h 达峰值, 之后虽下降但仍保持在较高水平。与作用 0 h 比较, 1000.0 ng/mL LPS 作用 8、16、24 h 时 IL-1 $\beta$  含量显著增加( $\chi^2$  值为 1.39 ~ 18.74,  $P$  值均小于 0.05)。见图 4。



注: 与作用 0 h(加入 LPS 后即刻)比较, \* $P$  < 0.05

图 4 1000.0 ng/mL 脆弱类杆菌 LPS 作用不同时间诱导单核细胞分泌 IL-1 $\beta$  的含量比较

这是机体持续自我放大、自身破坏的炎症过程, 是诱发脓毒症的根本原因。由此导致一系列渐进性加重的病理生理改变, 如感染性休克、急性呼吸窘迫综合征、弥漫性血管内凝血(DIC)、营养代谢障碍等, 又成为发生 MODS 的重要诱因<sup>[4]</sup>。尽管外科手段和抗生素研发已取得相当进展, 却很难遏制上述不良预后, 脓毒症仍是目前临床的治疗难题。

革兰阴性菌是引起人和实验动物感染并最终导致脓毒症的主要因素, LPS 是所有革兰阴性菌胞壁外膜层所共有的主要成分, 也是其主要致病成分<sup>[5]</sup>。LPS 能够激活炎性细胞, 激发天然免疫系统的高效活化, 在机体感染早期即可发挥作用。

脆弱类杆菌 LPS 与传统意义上的 LPS(如大肠杆菌 LPS)存在结构和功能上的显著不同。大肠杆菌类脂 A 脂肪酸链仅含 12 ~ 14 个 C 原子, 脆弱类杆菌类脂 A 的脂肪酸链含 15 ~ 17 个 C 原子; 大肠杆菌类脂 A 结构中, 每 1 个 D-氨基葡萄糖双糖结构均与 6 个脂肪酸链相连, 脆弱类杆菌类脂 A 由 4 ~ 5 个脂肪酸链相连。虽然脆弱类杆菌致病能力不如大肠杆菌强<sup>[6]</sup>, 但仍然是临床严重感染病例中常见的致病菌, 在重症脓毒症患者血液中检出率较高<sup>[7]</sup>。在临床厌氧菌感染中, 类杆菌占 1/3 以上, 其中脆弱类杆菌占 1/2<sup>[8]</sup>。随着广谱抗生素的大量使用, 脆弱类杆菌感染发病率呈上升趋势并更加耐药<sup>[9-10]</sup>。

研究表明, 机体对 LPS 的识别需要 LPS 结合蛋白(LBP)和 CD14 的参与, Toll 样受体 4(TLR4)参与 LPS 信号的胞内传递<sup>[11]</sup>。血循环中的 LPS 通过脂质 A 区域与血清中的 LBP 结合, 形成高亲和力的 LBP-LPS 复合物, 具有将 LPS 转运至单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞等免疫细胞膜上与 CD14 结合的能力, 并与细胞表面 CD14 结合形成复合物。复合物与 TLR4 富含亮氨酸重复序列的胞外区结合, 借助于活化的 TLR4, 后者在辅助受体 MD-2 的帮助下, 通过酪氨酸蛋白激酶激活胞内转接蛋白骨髓分化因子, 并与其相互作用, 通过 NF- $\kappa$ B 途径靶基因转录。实际上 NF- $\kappa$ B 是包括 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  在内的多种炎症因子的转录调节因子, NF- $\kappa$ B 介导多种炎症因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、胞间黏附分子 1(ICAM-1)、IL-6 等的表达<sup>[12-13]</sup>, 并进一步诱发机体

### 3 讨论

烧(创)伤或严重感染引起内源性炎症介质(TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-12)失控, 产生细胞因子级联效应(cytokine cascade)。

的特异性免疫应答。研究显示,脆弱类杆菌 LPS 通过 TLR4—CD14—MD-2 途径发挥促炎效应<sup>[14]</sup>。

单核巨噬细胞系统活化,炎症因子和抗炎因子的平衡,是启动脓毒症并决定感染预后的关键<sup>[15]</sup>。本实验中单核细胞在脆弱类杆菌 LPS 诱导下,可在 4 h 时大量分泌 TNF-α 和 IL-1β,分别在 8 h 和 16 h 达峰值并维持在较高水平,证实其反应快速而持续。TNF-α 出现高峰的时间稍早于 IL-1β,推测是单核细胞受到 LPS 刺激后首先介导分泌 TNF-α。TNF-α 是一种多功能的细胞因子,也是其他炎症介质大量释放的启动因子,能激活多形核白细胞、内皮细胞、单核巨噬细胞等多种效应细胞,可在细胞水平、亚细胞水平上诱导其过度释放,进而产生瀑布效应,导致全身炎症反应综合征。TNF-α 和 IL-1β 是 NF-κB 调控基因的表达产物<sup>[16]</sup>,也是 NF-κB 的激活物,可从不同环节并以不同方式参与体内炎症反应和组织损伤过程<sup>[17]</sup>。TNF-α 和 IL-1β 通过 NF-κB 途径可以诱导 IL-1、IL-4、IL-6、IL-8 及其自身大量释放<sup>[18]</sup>,并且激活中性粒细胞、单核巨噬细胞系统和内皮细胞,引起次级炎症介质如血小板激活因子、磷脂酶 A2 等过度产生。

单核细胞产生 TNF-α 和 IL-1β 的效应随着 LPS 的浓度增高而增加,但在较高浓度 LPS 中,TNF-α 和 IL-1β 含量反而有所下降。提示 LPS 诱导 TNF-α 的产生在一定范围内呈剂量依赖关系,严重创伤早期机体内 LPS 浓度与血清 TNF-α 水平呈正相关。感染初期 LPS 可引起机体发热、血管扩张、血管通透性增加、中性粒细胞增多、补体激活、血压下降等病理生理反应,LPS 信号在翻译水平上调节 TNF 的表达,具有增加 TNF mRNA 稳定性、延长其半衰期的作用,促进 TNF-α 的释放。机体通过释放促炎因子 TNF-α、IL-1β、iNOS、ICAM-1、IL-6 等,趋化中性粒细胞发挥抗炎作用。当感染加重时,一方面 LPS 通过下调炎症因子、巨噬细胞表面的清道夫受体及其胞核内 mRNA 表达,上调抗炎因子如 TGF-β、IL-4、IL-10 等以及其他内源性介质抑制机体免疫<sup>[19]</sup>,抑制单核细胞人类白细胞 II 类抗原的表达,以及单核巨噬细胞在内毒素刺激下产生 TNF-α 等炎症介质的能力<sup>[20]</sup>,并导致 DIC 及 MOF;另一方面,过度释放的炎症介质和高浓度的 LPS 可诱导单核细胞凋亡<sup>[21]</sup>、显著抑制 IL-2 的释放<sup>[22]</sup> 以及补体裂解产物 C5a 大量增加,也是加重机体免疫抑制的因素。

### 参考文献

[1] Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med*, 2008,36(1):296-327.

[2] Bengualid V, Singh H, Singh V, et al. An increase in the incidence of anaerobic bacteremia: true for tertiary care referral centers but not for community hospitals?. *Clin Infect Dis*, 2008,46(2):323-324.

[3] 宋宏新,刘晓阳,李宏.改良热酚水法制备大肠杆菌 O157: H7 脂多糖抗原的研究. *食品科学*,2006,27(10):273-275.

[4] 姚咏明,栾樱译.提高对创伤感染及其并发症的认识. *临床急*

疹杂志,2011,12(6):361-364.

[5] Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton IR. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect*,2002,4(8):837-851.

[6] Patrick S, Houston S, Thacker Z, et al. Mutational analysis of genes implicated in LPS and capsular polysaccharide biosynthesis in the opportunistic pathogen *Bacteroides fragilis*. *Microbiology*, 2009, 155 Pt 4:1039-1049.

[7] 张业龙,田社民,李允.15 年严重烧伤患者感染细菌变迁及耐药情况分析. *医药论坛杂志*,2007,28(11):77-79.

[8] Karlowsky JA, Walkty AJ, Adam HJ, et al. Prevalence of antimicrobial resistance among clinical isolates of *Bacteroides fragilis* group in Canada in 2010-2011: CANWARD surveillance study. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012,56(3):1247-1252.

[9] Snyderman DR, Jacobus NV, McDermott LA, et al. Update on resistance of *Bacteroides fragilis* group and related species with special attention to carbapenems 2006-2009. *Anaerobe*, 2011, 17(4):147-151.

[10] Galvão BP, Meggersee RL, Abratt VR. Antibiotic resistance and adhesion potential of *Bacteroides fragilis* clinical isolates from Cape Town, South Africa. *Anaerobe*, 2011,17(4):142-146.

[11] Wang ZQ, Xing WM, Fan HH, et al. The novel lipopolysaccharide-binding protein CRISPLD2 is a critical serum protein to regulate endotoxin function. *J Immunol*, 2009,183(10):6646-6656.

[12] Rao P, Hayden MS, Long M, et al. IκappaBβ acts to inhibit and activate gene expression during the inflammatory response. *Nature*, 2010,466(7310):1115-1119.

[13] Rossol M, Heine H, Meusch U, et al. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit Rev Immunol*, 2011,31(5):379-446.

[14] Mancuso G, Midiri A, Biondo C, et al. *Bacteroides fragilis*-derived lipopolysaccharide produces cell activation and lethal toxicity via toll-like receptor 4. *Infect Immun*, 2005,73(9):5620-5627.

[15] Andaluz-Ojeda D, Bobillo F, Iglesias V, et al. A combined score of pro- and anti-inflammatory interleukins improves mortality prediction in severe sepsis. *Cytokine*, 2012,57(3):332-336.

[16] Xu J, Itoh Y, Hayashi H, et al. Dihydrotestosterone inhibits interleukin-1α or tumor necrosis factor α-induced proinflammatory cytokine production via androgen receptor-dependent inhibition of nuclear factor-κB activation in rheumatoid fibroblast-like synovial cell line. *Biol Pharm Bull*, 2011,34(11):1724-1730.

[17] 蒲运刚,于湘友.脓毒症细胞核因子 kappa B 信号转导研究进展. *中国误诊学杂志*,2011,11(30):7331-7333.

[18] 陈洁,姜虹,朱也森.血必净对内毒素休克大鼠心肌 TNF-α 变化的影响. *中国医药导刊*,2009,11(6):1020-1022.

[19] Cohen-Poradosu R, McLoughlin RM, Lee JC, et al. *Bacteroides fragilis*-stimulated interleukin-10 contains expanding disease. *J Infect Dis*, 2011,204(3):363-371.

[20] 陈敏英.全身炎症反应综合征调控与多器官功能不全综合征防治. *临床外科杂志*,2004,12(11):657-658.

[21] 周捷,黄晓元.脆弱类杆菌脂多糖(LPS)对正常人外周血单个核细胞分泌 IL-10 及凋亡的影响. *中国现代医学杂志*,2010,20(9):1324-1327.

[22] 周捷,黄晓元,任利成,等.脆弱类杆菌脂多糖对正常人外周血单个核细胞分泌白细胞介素的影响. *中华烧伤杂志*,2003,19(2):82-85.

(收稿日期:2011-11-22)

(本文编辑:王旭)