

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2017.06.018

论著·实验研究

重组融合蛋白 IL-18 对金黄色葡萄球菌感染小鼠 免疫相关炎症因子表达的影响

陈晨 陈强 李岚 余晓君 柯江维 何美娟 周红平 杨文萍 王文杏

(江西省儿童医院呼吸内科, 江西 南昌 330000)

[摘要] **目的** 观察重组融合蛋白 IL-18 对金黄色葡萄球菌(SA)感染后小鼠体内免疫相关炎症因子表达的影响,探讨 IL-18 在体内防御 SA 感染的可能机制。**方法** 将 40 只 SPF 级雌性 BLAB/c 小鼠随机分为对照组、SA 感染组、免疫组和干预组。采用鼻腔接种 SA 液建立 SA 感染小鼠模型,免疫组和干预组均在建模前以 IL-18 滴鼻,但免疫组不予 SA 接种,对照组以 PBS 进行替代处理。采用 ELISA 法测定各组小鼠血液及支气管肺泡灌洗液(BALF)中 IL-4、干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子(TNF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、IgM 的浓度。实时荧光定量 PCR 技术检测各组小鼠肺组织中巨噬细胞炎症蛋白(MIP)-1 α 和 MIP-2 β mRNA 表达水平。**结果** 与对照组相比,SA 感染组和免疫组小鼠血清及 BALF 中 IL-4、G-CSF、IgM 浓度,以及肺组织中 MIP-1 α 、MIP-2 β mRNA 含量均升高($P<0.05$);SA 感染组小鼠血清及 BALF 中 IFN- γ 水平降低,TNF 水平升高($P<0.05$);免疫组小鼠血清及 BALF 中 IFN- γ 水平升高($P<0.05$)。与 SA 感染组相比,干预组小鼠血清及 BALF 中 IL-4、IFN- γ 、G-CSF、IgM 浓度,以及肺组织中 MIP-1 α mRNA 含量均升高,血清及 BALF 中 TNF 水平,以及肺组织中 MIP-2 β mRNA 含量均降低($P<0.05$)。除血清 IFN- γ 水平外,其余上述指标在干预组小鼠中均高于对照组($P<0.05$)。**结论** 重组融合蛋白 IL-18 经黏膜免疫小鼠,可改变 SA 感染后小鼠血清及 BALF 中炎症因子,以及肺组织中 MIP-1 α 、MIP-2 β mRNA 的表达水平,从而促进机体的抗感染免疫反应,增强了机体清除病原体的能力。
[中国当代儿科杂志, 2017, 19(6): 705-711]

[关键词] IL-18; 金黄色葡萄球菌; 炎症因子; 巨噬细胞炎症蛋白; 小鼠

Effects of recombinant fusion protein interleukin-18 on expression of immune-inflammatory factors in mice infected with *Staphylococcus aureus*

CHEN Chen, CHEN Qiang, LI Lan, YU Xiao-Jun, KE Jiang-Wei, HE Mei-Juan, ZHOU Hong-Ping, YANG Wen-Ping, WANG Wen-Xing. Department of Respiratory Medicine, Children's Hospital in Jiangxi Province, Nanchang 330000, China (Chen Q, Email: jx-cq@163.com)

Abstract: Objective To observe the effects of recombinant fusion protein interleukin (IL)-18 on the expression of immune-inflammatory factors in the mice infected with *Staphylococcus aureus* (SA), and to investigate the mechanism of action of IL-18 in defense of SA infection *in vivo*. **Methods** A total of 40 specific pathogen-free female BLAB/c mice were randomly divided into four groups: control, SA infection, immunized, and intervention. A mouse model of SA infection was established by nasal inoculation with SA liquid. The immunized group and the intervention group were intranasally given IL-18 before SA modeling, and then the SA infection group and the intervention group received the nasal inoculation with SA liquid; the control group was treated with phosphate buffered saline instead. The levels of IL-4, interferon (IFN)- γ , tumor necrosis factor (TNF), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), IgM in the serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of mice were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. The expression of macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α mRNA and MIP-2 β mRNA in the lung tissue of mice were determined by real-time fluorescent quantitative PCR. **Results** Compared with the control group, the SA infection group and the immunized group had significantly higher levels of IL-4, G-CSF, and IgM in the serum and BALF and expression of MIP-1 α mRNA and MIP-2 β mRNA in the lung tissue ($P<0.05$); the SA infection group had a significantly lower level of

[收稿日期] 2016-12-15; [接受日期] 2017-04-06

[作者简介] 陈晨,女,硕士,医师。

[通信作者] 陈强,女,主任医师。

IFN- γ and a significantly higher level of TNF in the serum and BALF ($P<0.05$); the immunized group had a significantly higher level of IFN- γ in the serum and BALF ($P<0.05$). Compared with the SA infection group, the intervention group had significantly higher levels of IL-4, IFN- γ , G-CSF, and IgM in the serum and BALF and expression of MIP-1 α mRNA in the lung tissue. In contrast, the intervention group showed a significantly lower level of TNF in the serum and BALF and expression of MIP-2 β mRNA in the lung tissue ($P<0.05$). All the above indicators in the intervention group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$), except the serum level of IFN- γ . **Conclusions** In the mice infected with SA, the recombinant fusion protein IL-18 by mucosal immunity can affect inflammatory factors in the serum and BALF and the expression of MIP-1 α mRNA and MIP-2 β mRNA in the lung tissue to promote the anti-infective immune response and enhance the ability to clear pathogens.

[Chin J Contemp Pediatr, 2017, 19(6): 705-711]

Key words: IL-18; *Staphylococcus aureus*; Inflammatory factor; Macrophage inflammatory protein; Mice

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, SA) 是一种具有多种毒力因子的革兰阳性球菌^[1], 是儿童社区及医院感染的重要病原菌, 近年来感染率逐年增高^[2]。其中尤其是耐甲氧西林 SA 感染严重危害了儿童的身体健康。

SA 能够通过直接对抗吞噬作用^[3]、抑制补体介导的调理作用^[4-5]、免疫杀伤作用^[6]和竞争性抑制趋化作用^[7]来对抗人体的免疫防御。还能通过腺苷合成酶 (ADSA) 接受机体感染葡萄球菌过程中的分子信号, 使细胞外腺苷总量急剧增加, 降低抗菌肽对它的识别^[8]。并且, SA 能够分泌具有强抗氧化性的类胡萝卜素, 加强其抗氧化能力^[9]。SA 在逃避宿主免疫反应的同时, 还能不断释放毒素及侵袭性酶类, 是造成慢性迁徙性感染的主要原因^[10]。

重组融合蛋白 IL-18 由小鼠 IL-18 重组表达质粒并应用原核表达系统获得, 具有生物活性。有研究指出, IL-18 能够上调干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 介导的细胞免疫反应, 增加血清中肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、粒细胞集落刺激因子 (granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)、巨噬细胞炎性蛋白 (macrophage inflammatory protein, MIP) 的水平, 以及增加 / 恢复中性粒细胞计数, 从而提高中性粒细胞功能, 增强细胞的吞噬活性, 对胞外菌进行吞噬^[11]; 而且能够上调 IgM 抗体介导的体液免疫应答和中性粒细胞介导的免疫反应, 增加免疫细胞的募集和活化, 增强补体介导的调理作用, 进一步对胞外菌进行破坏, 并协同细胞免疫反应对胞外菌进行进一步吞噬^[12]。

目前江西省地区儿童 SA 感染的耐药率逐年上升, 本课题组前期对 2009 年 1 月至 2012 年 12 月在江西省儿童医院住院的 SA 侵袭性感染患儿分离的 161 株 SA 进行了研究, 发现 SA 对青霉素及红

霉素有较高的耐药性, 耐甲氧西林 SA 的检出率逐年升高^[13]。重组融合蛋白 IL-18 作为一种有活性的细胞因子, 能否成功通过鼻腔免疫进入机体, 干预 SA 对免疫的防御机制, 以降低 SA 的致病力、耐药率和儿童的病死率? 本研究旨在通过观察重组融合蛋白 IL-18 干预后 SA 所致的免疫相关炎症因子的变化, 了解重组融合蛋白 IL-18 在体内防御 SA 感染的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

6~8 周龄 SPF 级雌性 BLAB/c 小鼠 40 只, 体重 16~18 g, 购于江西中医学院实验动物中心。在室温下分笼饲养, 每只鼠笼安置 5 只小鼠, 进食平衡饲料, 自由饮水, 光线充足, 空气中相对湿度约为 47%, 室内保持通风。

1.2 主要试剂

重组融合蛋白 IL-18 (北京义翘神州生物技术有限公司)、IL-4、IFN- γ 、TNF、G-CSF、IgM ELISA 试剂盒 (武汉 Elabscience 生物技术有限公司)、总 RNA 提取试剂盒、逆转录及 RT-qPCR 试剂盒 (美国 Promega 公司)、PCR 引物 (上海捷瑞生物公司)、SA 标准株 (ATCC-29213) (江西乐悠生物科技有限公司)。

1.3 实验动物分组

将 40 只小鼠随机分为对照组、SA 感染组、IL-18 免疫组 (简称免疫组)、SA 感染 +IL-18 干预组 (简称干预组); 每组 10 只。

1.4 实验动物模型的建立

参照文献^[14]建立动物模型。对照组: 实验第 1 周每天每只小鼠 20 μ L PBS 滴鼻, 于实验第 8 天继续以 20 μ L PBS 滴鼻。SA 感染组: 实验第 1 周

每天每只小鼠 20 μ L PBS 滴鼻, 于实验第 8 天鼻腔接种 1.5×10^6 CFU/mL SA 液 20 μ L。免疫组: 实验第 1 周每天每只小鼠 20 μ L 重组融合蛋白 IL-18 滴鼻, 于实验第 8 天以 20 μ L PBS 滴鼻。干预组: 实验第 1 周每天每只小鼠 20 μ L 重组融合蛋白 IL-18 滴鼻, 于实验第 8 天鼻腔接种 1.5×10^6 CFU/mL SA 液 20 μ L。

1.5 小鼠全血标本的采集及方法

感染后第 3 天采用戊巴比妥钠腹腔注射将小鼠麻醉, 仰卧固定于实验台上, 于颈部正中作一长约 3 cm 的纵行切口, 钝性分离左侧颈总动脉, 穿刺取各组小鼠动脉血 3 mL, 置于普通管中, 放置于 4℃ 冰箱中备用。

1.6 小鼠支气管肺泡灌洗液标本的获取

采集小鼠血液标本后, 以 Y 型管作为气管插管, 以 400 μ L 生理盐水灌洗全肺, 每只小鼠回收支气管肺泡灌洗液 (BALF) 约 1.2 mL。

1.7 小鼠肺组织标本的获取

收集完小鼠血液及 BALF 标本后, 此时小鼠仍处于麻醉状态, 迅速打开胸腔, 分离出小鼠肺组织, 用无菌器械剪切成任何一边均未超过 0.5 cm 的组织块, 放入预先盛有 RNAlater 样本保存液的标本留取瓶中, 置于 4℃ 冰箱中过夜, 让样本保存

液充分渗透入组织块中, 后放入 -20℃ 冰箱中长期冻存, 用于 RT-qPCR 检测肺组织中 MIP-1 α 和 MIP-2 β mRNA 的含量。

1.8 ELISA 法测定小鼠血清及 BALF 中 IL-4、IFN- γ 、TNF、G-CSF、IgM 含量

取 3 mL 全血经 3000 r/min 离心 10 min 后分离出血清, 置于 -80℃ 冰箱中备用。实验开始前将各组血清及各试剂平衡至室温, 提前打开酶标仪电源, 设置好检测程序, 预热仪器, 450 nm 波长测量各孔的光密度值 (OD 值)。按照试剂盒使用说明书配置所需试剂, 严格按照操作步骤分别测定小鼠血清中 IL-4、IFN- γ 、TNF、G-CSF、IgM 的含量。

1.9 RT-qPCR 法测定小鼠肺组织中 MIP-1 α 和 MIP-2 β mRNA 水平

取 171 mg 肺组织块加入 1 mL RNA 组织裂解液, 按照组织总 RNA 提取试剂盒说明书进行总 RNA 提取。取总 RNA 2 μ L, 按照逆转录试剂盒说明书合成 cDNA 后进行荧光定量 PCR 扩增。反应体系 (50 μ L): cDNA 10 μ L, GoTaq qPCR Master Mix 25 μ L, 上下游引物各 1 μ L, Nucleasa-free 水 13 μ L。反应条件: 95℃ 1 min; 94℃ 15 s, 57℃ 30 s, 72℃ 45 s, 40 个循环; 再接融解曲线。引物序列及扩增片段长度见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 检测用引物序列

基因	序列号	引物序列 (5' $\rightarrow$ 3')	产物长度 (bp)
GAPDH	XM_001477455.1	Forward: TGCAGTGGCAAAGTGGAGATTGTTG Reverse: GGTCTCGCTCCTGGAAGATGGTGAT	175
MIP-1 α	NM_011337.2	Forward: AAGATTCCACGCCAATTCATCG Reverse: CAGGCATTTCAGTCCAGGTCAGT	158
MIP-2	NM_009140.2	Forward: CACCAACCACCAGGCTACAGGG Reverse: GGGCTTCAGGCTCAAGGCAAAC	191

1.10 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件对实验数据进行统计学分析。符合正态分布的计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK- q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组融合蛋白 IL-18 对小鼠血清及 BALF 中 IL-4 水平的影响

SA 感染组、免疫组及干预组小鼠血清及 BALF 中 IL-4 水平均较对照组增高 ($P < 0.05$)。干

预组小鼠血清及 BALF 中 IL-4 水平较 SA 感染组增高 ($P<0.05$)。SA 感染组小鼠血清及 BALF 中 IL-4 水平较免疫组增高 ($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组小鼠血清及 BALF 中 IL-4 水平比较
($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	<i>n</i>	血清	BALF
对照组	10	28 ± 6	39 ± 4
SA 感染组	10	85 ± 4 ^a	108 ± 5 ^a
免疫组	10	62 ± 7 ^{a,b}	93 ± 5 ^{a,b}
干预组	10	115 ± 5 ^{a,b,c}	145 ± 6 ^{a,b,c}
<i>F</i> 值		401.970	720.591
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05

注: a 示与对照组相比, $P<0.05$; b 示与 SA 感染组相比, $P<0.05$; c 示与免疫组相比, $P<0.05$ 。

2.2 重组融合蛋白 IL-18 对小鼠血清及 BALF 中 IFN- γ 水平的影响

SA 感染组、干预组小鼠血清 IFN- γ 水平均较对照组降低 ($P<0.05$)；免疫组小鼠血清 IFN- γ 水平较对照组、SA 感染组、干预组均增高 ($P<0.05$)；干预组小鼠血清 IFN- γ 水平较 SA 感染组增高 ($P<0.05$)。免疫组、干预组小鼠 BALF 中 IFN- γ 水平较对照组和 SA 感染组均增高 ($P<0.05$)；SA 感染组小鼠 BALF 中 IFN- γ 水平较对照组降低 ($P<0.05$)；免疫组小鼠 BALF 中 IFN- γ 水平低于干预组 ($P<0.05$)。见表 3。

表 3 各组小鼠血清及 BALF 中 IFN- γ 水平比较
($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	<i>n</i>	血清	BALF
对照组	10	110 ± 9	91 ± 10
SA 感染组	10	75 ± 7 ^a	76 ± 6 ^a
免疫组	10	146 ± 11 ^{a,b}	139 ± 13 ^{a,b}
干预组	10	94 ± 9 ^{a,b,c}	189 ± 12 ^{a,b,c}
<i>F</i> 值		116.192	230.603
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05

注: a 示与对照组相比, $P<0.05$; b 示与 SA 感染组相比, $P<0.05$; c 示与免疫组相比, $P<0.05$ 。

2.3 重组融合蛋白 IL-18 对小鼠血清及 BALF 中 TNF 水平的影响

SA 感染组、干预组小鼠血清及 BALF 中 TNF 水平均较对照组和免疫组增高 ($P<0.05$)。免疫

组小鼠血清及 BALF 中 TNF 水平与对照组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。干预组小鼠血清及 BALF 中 TNF 水平较 SA 感染组均降低 ($P<0.05$)。见表 4。

表 4 各组小鼠血清及 BALF 中 TNF 水平比较
($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	<i>n</i>	血清	BALF
对照组	10	175 ± 7	176 ± 6
SA 感染组	10	203 ± 10 ^a	195 ± 8 ^a
免疫组	10	179 ± 7 ^b	178 ± 7 ^b
干预组	10	189 ± 7 ^{a,b,c}	189 ± 8 ^{a,b,c}
<i>F</i> 值		26.161	14.431
<i>P</i> 值		>0.05	>0.05

注: a 示与对照组相比, $P<0.05$; b 示与 SA 感染组相比, $P<0.05$; c 示与免疫组相比, $P<0.05$ 。

2.4 重组融合蛋白 IL-18 对小鼠血清及 BALF 中 G-CSF 水平的影响

SA 感染组、免疫组及干预组小鼠血清及 BALF 中 G-CSF 浓度均较对照组明显增高 ($P<0.05$)。干预组小鼠血清及 BALF 中 G-CSF 浓度较 SA 感染组和免疫组增高 ($P<0.05$)。SA 感染组小鼠血清及 BALF 中 G-CSF 浓度较免疫组增高 ($P<0.05$)。见表 5。

表 5 各组小鼠血清及 BALF 中 G-CSF 水平比较
($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	<i>n</i>	血清	BALF
对照组	10	39 ± 20	31 ± 16
SA 感染组	10	144 ± 26 ^a	179 ± 22 ^a
免疫组	10	105 ± 18 ^{a,b}	144 ± 28 ^{a,b}
干预组	10	225 ± 25 ^{a,b,c}	280 ± 23 ^{a,b,c}
<i>F</i> 值		118.675	201.738
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05

注: a 示与对照组相比, $P<0.05$; b 示与 SA 感染组相比, $P<0.05$; c 示与免疫组相比, $P<0.05$ 。

2.5 重组融合蛋白 IL-18 对小鼠血清及 BALF 中 IgM 水平的影响

SA 感染组、免疫组及干预组小鼠血清及 BALF 中 IgM 浓度均较对照组升高 ($P<0.05$)。干预组小鼠血清及 BALF 中 IgM 浓度均较 SA 感染组和免疫组升高 ($P<0.05$)。SA 感染组小鼠血清及

BALF 中 IgM 浓度较免疫组升高 ($P<0.05$)。见表 6。

表 6 各组小鼠血清及 BALF 中 IgM 水平比较
($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	n	血清	BALF
对照组	10	1 337 ± 126	3 926 ± 62
SA 感染组	10	1 845 ± 97 ^a	5 086 ± 67 ^a
免疫组	10	1 597 ± 83 ^{a,b}	4 787 ± 68 ^{a,b}
干预组	10	2 149 ± 88 ^{a,b,c}	5 926 ± 44 ^{a,b,c}
F 值		120.439	1 835.595
P 值		<0.05	<0.05

注: a 示与对照组相比, $P<0.05$; b 示与 SA 感染组相比, $P<0.05$; c 示与免疫组相比, $P<0.05$ 。

2.6 重组融合蛋白 IL-18 对小鼠肺组织中 MIP-1 α 和 MIP-2 β mRNA 水平的影响

SA 感染组、干预组及免疫组小鼠肺组织中 MIP-1 α 及 MIP-2 β 含量均较对照组增高 ($P<0.05$)。免疫组小鼠肺组织中 MIP-1 α 及 MIP-2 β 含量均较 SA 感染组和干预组降低 ($P<0.05$)。SA 感染组 MIP-1 α 含量低于干预组, 而 MIP-2 β 含量高于干预组 ($P<0.05$)。见表 7。

表 7 各组小鼠肺组织中 MIP-1 α 和 MIP-2 β mRNA 水平比较
($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MIP-1 α mRNA	MIP-2 β mRNA
对照组	10	46 ± 6	44 ± 10
SA 感染组	10	99 ± 14 ^a	207 ± 27 ^a
免疫组	10	63 ± 18 ^{a,b}	55 ± 10 ^{a,b}
干预组	10	105 ± 12 ^{a,b,c}	67 ± 14 ^{a,b,c}
F 值		197.368	226.514
P 值		<0.05	<0.05

注: a 示与对照组相比, $P<0.05$; b 示与 SA 感染组相比, $P<0.05$; c 示与免疫组相比, $P<0.05$ 。

3 讨论

SA 作为一种共生菌, 能够造成人体不同部位同时感染。鼻前庭是 SA 最常见的菌群定值部位, 约 20% 人口鼻前庭菌群定值是永久的^[15-16]。通常定植于鼻前庭的 SA 并不致病, 但当机体免疫功能下降时, SA 将透过黏膜防御体系, 引起包括各类皮肤软组织感染和致死性的感染性疾病。因而机体的免疫系统对病原体的识别和清除功能对预防

SA 感染具有重要意义。

Th1 和 Th2 细胞可释放 IFN- γ 和 IL-4 两种炎症介质, 两者表达水平的变化可间接反映机体的免疫状态及机体感染后炎症的发展趋势, 而两者的分泌失衡也能导致气道炎性损伤。IL-18 作为一种促炎性细胞因子, 本身能诱导表达 IL-18 受体 (IL-18R) 的细胞产生 CXC 和 CC 型化学趋化因子, 引起巨噬细胞、单核细胞、成纤维细胞释放 IL-18^[17]。而 IL-18 的释放能进一步诱导 Th1 细胞和 NK 细胞产生 IFN- γ ^[18]。IFN- γ 能在炎症反应中增加天然免疫细胞的杀伤活性^[19], 但当 IFN- γ 分泌不足时能进一步加重气道的炎性损伤^[20]。本研究中, SA 感染组、干预组小鼠血清 IFN- γ 虽较对照组降低, 但免疫组小鼠血清 IFN- γ 较对照组增高。而在 BALF 中, 免疫组、干预组小鼠 BALF 中 IFN- γ 均较对照组增高, 且免疫组小鼠 BALF 中 IFN- γ 较 SA 感染组增高。由此可见重组融合蛋白 IL-18 能够增加 IFN- γ 在血清及 BALF 中的浓度, 维持 IFN- γ 与其他细胞因子的平衡, 进一步增加机体感染 SA 后免疫细胞的杀伤活性, 这与国外的相关研究一致^[21]。IL-4 能够调控巨噬细胞释放细胞因子, 增加体内巨噬细胞吞噬 SA 的能力^[19]。SA 感染组、免疫组、干预组小鼠血清及 BALF 中 IL-4 浓度均较对照组增高。且 SA 感染组小鼠血清及 BALF 中 IL-4 浓度较免疫组增高。说明重组融合蛋白 IL-18 不仅能提高 IL-4 在血清及 BALF 中的浓度, 并且能够降低 SA 感染后小鼠血清及 BALF 中的 IL-4 浓度, 使其与 IFN- γ 维持稳态, 协同增加机体对 SA 的杀伤作用。

IL-18 能够通过 MyD88 信号参与 IgM、IgG 等免疫球蛋白的产生环节, 并且能够激活免疫系统, 早期产生抗体反应, 进一步的释放 IgM、IgG^[22]。本研究中, 免疫组和干预组小鼠血清及 BALF 中 IgM 浓度均较对照组增高。TNF 参与机体抗菌防御的多种机制, 包括对中性粒细胞招募, 增强中性粒细胞对血管的附着力^[23]; 有研究表明, 在机体感染 SA 早期, TNF 能够特异性的识别 SA 抗原, 激活机体的免疫系统引起 TNF 释放 TNFR1 受体, 从而进一步增加体内 TNF 含量, 增强机体对抗炎性反应的初始阶段^[24]。当 TNF 水平达到一个峰值, 能诱发气道上皮细胞产生大量细胞因子^[25], TNF 在清除细菌的过程中起着至关重要的作用,

但过高水平的 TNF 可能导致组织损伤、器官衰竭和死亡^[26]。抑制内源性 TNF 能增加 SA 感染的病死率^[27]。本研究中, SA 感染组和干预组小鼠血清及 BALF 中 TNF 浓度均较对照组增高, 但免疫组血清及 BALF 中 TNF 浓度均较对照组无明显改变, 干预组小鼠血清及 BALF 中 TNF 均较 SA 感染组降低。这表明 IL-18 能够增高 SA 感染后机体血液及 BALF 中 TNF 的浓度, 从而加强对 SA 的清除作用, 也与国外的相关报道一致^[28]。

MIP-1 α 、MIP-2 β 分属于趋化因子 CC 家族和 CXC 家族, IL-18 能够诱导 IL-18R 表达 MIP-1 α 、MIP-2 β , 从而明显加强炎症免疫反应细胞的趋化活性, 进一步调节效应细胞的功能。MIP-1 α 能作用于 NK 细胞, 从而增加肺内巨噬细胞对 SA 的吞噬功能; MIP-2 β 能特异性作用于中性粒细胞, 进一步趋化和激活中性粒细胞^[29]。G-CSF 由巨噬细胞产生, 能通过影响细胞表面黏附分子的表达, 特异性活化中性粒细胞, 进一步趋化炎症反应^[30]。本研究中 SA 感染组、免疫组、干预组小鼠血清及 BALF 中 G-CSF 均较对照组明显增高。SA 感染组、免疫组、干预组小鼠肺组织中 MIP-1 α 、MIP-2 β 含量均较对照组增高, 这表明重组融合蛋白 IL-18 能增高 SA 感染后体内 G-CSF 的含量以及肺组织内 MIP-1 α 、MIP-2 β 的 mRNA 表达水平, 从而进一步增加巨噬细胞对 SA 的吞噬功能, 这些结果也与国外的报道一致^[31-32]。

本研究发现重组融合蛋白 IL-18 经鼻腔黏膜免疫可以明显提高 TNF、G-CSF、IgM 相关炎症因子的表达水平, 并且增加 MIP-1 α 、MIP-2 β 在肺组织中的表达, 促进机体抗感染免疫反应, 从而增强了机体清除病原体的能力。因而推测, 调节 IFN- γ 、IL-4、G-CSF 和 IgM 等炎症因子表达可能是重组融合蛋白 IL-18 增强小鼠抗感染能力的重要机制。

[参 考 文 献]

- [1] Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(9): 629-641.
- [2] Seil JT, Webster TJ. Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature[J]. *Int J Nanomedicine*, 2012, 7: 2767-2781.
- [3] Peterson PK, Verhoef J, Sabath LD, et al. Effect of protein A on staphylococcal opsonization[J]. *Infect Immun*, 1977, 15(3): 760-764.
- [4] Cunnion KM, Zhang HM, Frank MM. Availability of complement bound to *Staphylococcus aureus* to interact with membrane complement receptors influences efficiency of phagocytosis[J]. *Infect Immun*, 2003, 71(2): 656-662.
- [5] Cunnion KM, Lee JC, Frank MM. Capsule production and growth phase influence binding of complement to *Staphylococcus aureus*[J]. *Infect Immun*, 2001, 69(11): 6796-6803.
- [6] Kitur K, Parker D, Nieto P, et al. Toxin-induced necroptosis is a major mechanism of *Staphylococcus aureus* lung damage[J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11(4): e1004820.
- [7] de Haas CJ, Veldkamp KE, Peschel A, et al. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent[J]. *J Exp Med*, 2004, 199(5): 687-695.
- [8] Thammavongsa V, Kern JW, Missiakas DM, et al. *Staphylococcus aureus* synthesizes adenosine to escape host immune responses[J]. *J Exp Med*, 2009, 206(11): 2417-2427.
- [9] Liu CI, Liu GY, Song Y, et al. A cholesterol biosynthesis inhibitor blocks *Staphylococcus aureus* virulence[J]. *Science*, 2008, 319(5868): 1391-1394.
- [10] Tuchscher L, Medina E, Hussain M, et al. *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection[J]. *EMBO Mol Med*, 2011, 3(3): 129-141.
- [11] Kinoshita M, Shinomiya N, Ono S, et al. Restoration of natural IgM production from liver B cells by exogenous IL-18 improves the survival of burn-injured mice infected with *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *J Immunol*, 2006, 177(7): 4627-4635.
- [12] Kuranaga N, Kinoshita M, Kawabata T, et al. Interleukin-18 protects splenectomized mice from lethal *Streptococcus pneumoniae* sepsis independent of interferon-gamma by inducing IgM production[J]. *J Infect Dis*, 2006, 194(7): 993-1002.
- [13] Qiao Y, Ning X, Chen Q, et al. Clinical and molecular characteristics of invasive community-acquired *Staphylococcus aureus* infections in Chinese children[J]. *BMC Infect Dis*, 2014, 14: 582.
- [14] 陈凌, 郭盛, 郝春莉, 等. 重组融合蛋白白细胞介素-17F/His 对肺炎链球菌感染小鼠免疫相关炎症因子表达的影响[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2014, 29(4): 255-260.
- [15] Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections[J]. *Lancet Infect Dis*, 2005, 5(12): 751-762.
- [16] Bogaert D, van Belkum A, Sluijter M, et al. Colonisation by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in healthy children[J]. *Lancet*, 2004, 363(9424): 1871-1872.
- [17] Morel JC, Park CC, Kumar P, et al. Interleukin-18 induces rheumatoid arthritis synovial fibroblast CXC chemokine production through NF κ B activation[J]. *Lab Invest*, 2001, 81(10): 1371-1383.
- [18] Yoshimoto T, Tsutsui H, Tominaga K. IL-18, although antiallergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine released by basophils[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(24): 13962-13966.

- [19] Kang DH, Weaver MT. Airway cytokine responses to acute and repeated stress in a murine model of allergic asthma[J]. *Bio Psychol*, 2010, 84(1): 66-73.
- [20] Truyen E, Coteur L, Dilissen E, et al. Evaluation of airway inflammation by quantitative Th1/Th2 cytokine mRNA measurement in sputum of asthma patients[J]. *Thorax*, 2006, 61(3): 202-208.
- [21] Pagès F, Lazar V, Berger A, et al. Analysis of interleukin-18, interleukin-1 converting enzyme (ICE) and interleukin-18-related cytokines in Crohn's disease lesions[J]. *Eur Cytokine Netw*, 2001, 12(1): 97-104.
- [22] Enoksson, SL, Grasset EK, Hägglöf T, et al. The inflammatory cytokine IL-18 induces self-reactive innate antibody responses regulated by natural killer T cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(51): E1399-E1407.
- [23] Lorente JA, Marshall JC. Neutralization of tumor necrosis factor in preclinical models of sepsis[J]. *Shock*, 2005, 24 Suppl 1: 107-119.
- [24] Fournier B, Philpott DJ. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2005, 18(3): 521-540.
- [25] Gómez MI, Lee A, Reddy B, et al. *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1[J]. *Nat Med*, 2004, 10(8): 842-848.
- [26] Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis[J]. *N Engl Med*, 2003, 348(2): 138-150.
- [27] Fei Y, Wang W, Kwiecinski J, et al. The combination of a tumor necrosis factor inhibitor and antibiotic alleviates staphylococcal arthritis and sepsis in mice[J]. *J Infect Dis*, 2011, 204(3): 348-357.
- [28] Biet F, Loch C, Kremer L. Immunoregulatory functions of interleukin 18 and its role in defense against bacterial pathogens[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2002, 80(3): 147-162.
- [29] Lomas-Neira JL, Chung CS, Wesche DE, et al. In vivo gene silencing (with siRNA) of pulmonary expression of MIP-2 versus KC results in divergent effects on hemorrhage-induced, neutrophil-mediated septic acute lung injury[J]. *J Leukoc Biol*, 2005, 77(6): 846-853.
- [30] Semerad CL, Christopher MJ, Liu F, et al. G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow[J]. *Blood*, 2005, 106(9): 3020-3027.
- [31] Dallaire F, Ouellet N, Bergeron Y, et al. Microbiological and inflammatory factors associated with the development of pneumococcal pneumonia[J]. *J Infect Dis*, 2001, 184(3): 292-300.
- [32] Rijneveld AW, van den Dobbelsteen GP, Florquin S, et al. Roles of interleukin-6 and macrophage inflammatory protein-2 in pneumolysin-induced lung inflammation in mice[J]. *J Infect Dis*, 2002, 185(1): 123-126.

(本文编辑: 万静)