本文引用:马玉龙,邓保国,刘秀兰,等. 肺炎支原体感染对小鼠干扰素 γ 和白细胞介素-4 的影响[J]. 新乡医学院学报,2014,31(8):609-611.

【基础研究】

肺炎支原体感染对小鼠干扰素 γ 和白细胞介素-4 的影响

马玉龙[1], 邓保国[1], 刘秀兰[2], 黄青松[1]
(1. 新乡医学院微生物学教研室,河南　新乡　453003;2. 新乡医学院第一附属医院神经外科监护室,河南　卫辉　453100)

摘要:　目的　探讨肺炎支原体(MP)感染对小鼠干扰素-γ(IFN-γ)和白细胞介素-4(IL-4)的影响,研究 MP 感染 Th1/Th2 免疫应答状况。**方法**　60 只小鼠随机分为实验组与对照组,每组 30 只。实验组建立 MP 感染小鼠模型,对照组小鼠滴鼻吸入等量磷酸盐缓冲液,分别在 3、5、7、14、21 d 取小鼠肺组织,测量肺指数及肺泡灌洗液中 IFN-γ 和 IL-4 水平。**结果**　2 组小鼠不同时间点肺指数比较差异均有统计学意义($P<0.01$)。实验组小鼠 3 d 时肺泡灌洗液中 IFN-γ 水平较对照组显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。实验组小鼠 3、5、7 d 肺泡灌洗液中 IL-4 水平与对照组比较均有所升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。2 组小鼠 3、5、7 d 时 IFN-γ/IL-4 比值比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论**　MP 感染后以 Th2 介导的免疫反应为主,IFN-γ/IL-4 失衡是 MP 感染发病的危险因素之一。

关键词:　肺炎支原体;干扰素-γ;白细胞介素-4
中图分类号: R375　**文献标志码:** A　**文章编号:** 1004-7239(2014)08-0609-03

Effect of *Mycoplasma pneumoniae* infection on interferon-γ and interleukin-4 in mice

MA Yu-long[1], DENG Bao-guo[1], LIU Xiu-lan[2], HUANG Qing-song[1]
(1. *Department of Microbiology, Xinxiang Medical University, Xinxiang* 453003, *Henan Province, China*; 2. *Department of Neurosurgery, Intensive Care Unit, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui* 453100, *Henan Province, China*)

Abstract:　Objective　To investigate the effect of *Mycoplasma pneumoniae*(MP) on the interferon(IFN)-γ and interleukin(IL)-4 in mice and study the Th1/Th2 immune response status after MP infection. **Methods**　Sixty mice were randomly divided into experimental group and control group, with 30 mice in each group. The mice of experimental group were infected MP and the mice of control group were given equal volume phosphate buffered saline. The lung of mice were taken at 3, 5, 7, 14, 21 d in the two groups and the lung index and cytokine in alveolar lavaga fluid were detected. **Results**　There was statistic difference of lung index at different time point between the two groups($P<0.01$). The level of IFN-γ in alveolar lavaga fluid at 3 d in experimental group was significantly higher than that in control group($P<0.05$). The IL-4 level in alveolar lavaga fluid of experimental group was significantly higher than that in control group at 3, 5, 7 d($P<0.05$). There was statistic difference of the ratio of IFN-γ/IL-4 between the two groups at 3, 5, 7 d($P<0.05$). **Conclusions**　Th2-mediated immune response is the mainly immune response after MP infection. IFN-γ/IL-4 imbalance is one of the risk factors for the disease.

Key words:　*Mycoplasma pneumoniae*; interferon-γ; interleukin-4

肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*, MP)是引起小儿下呼吸道感染的主要致病菌之一。MP 感染与肺炎、哮喘等多种疾病有关,近年来其发病年龄明显提前,且存在混合感染现象[1]。Th 细胞可以反映机体的免疫功能状态,特别是 Th1/Th2 细胞的比例是影响细胞免疫及体液免疫的关键,其所分泌的干扰素-γ(interferon-γ, IFN-γ)和白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)水平的高低,可反映 Th1 及 Th2 的免疫应答情况。MP 感染后机体免疫的动态变化尚无定论,目前倾向于 MP 黏附、直接侵入及直接造成细胞损伤、免疫炎症反应。为探讨 MP 感染后机体的免疫状态,本研究建立 *BALB/C* 小鼠模型,通过对 IFN-γ 及 IL-4 的动态检测,了解其免疫应答情况,为进一步制定预防和治疗方案提供基础。

1　材料与方法

1.1　实验动物及分组　选用 *BALB/C* 小鼠 60 只,4~6 周龄,体质量(17.3±3.5)g,雌雄各半,分笼饲养。小鼠购自郑州大学医学院实验动物中心,MP 菌株为新乡医学院保存菌株。随机将 60 只小鼠分为实验组与对照组,每组 30 只。小鼠 IFN-γ、IL-4 酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自南京凯基生物有限公司。

1.2　MP 感染动物模型制备　将小鼠放于清洁动

DOI:10.7683/xxyxyxb.2014.08.004
收稿日期:2014-04-08
作者简介:马玉龙(1977-),男,河南商丘人,硕士,助教,主要从事病原生物学教学与科研工作。

物室,分笼饲养。100 g · L^{-1}水合氯醛 0.05 mL 腹腔注射麻醉小鼠,对实验组小鼠用 0.02 mL 的 10^{11} CCU · L^{-1} MP 菌液小鼠滴鼻接种,对照组小鼠滴鼻吸入等量磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)。正常饮食饮水,并观察饮食饮水情况及精神状态。聚合酶链反应检测肺泡灌洗液中 MP 阳性为造模成功。

1.3 肺指数的计算和细胞因子的测定 设 3、5、7、14、21 d 5 个时间点,每个时间点对 2 组各 6 只小鼠进行取材,取小鼠肺组织,用 0.5 mL 生理盐水对肺组织进行灌洗 3 次,每次灌洗后收集灌洗液,用 ELISA 试剂盒测定肺泡灌洗液中 IFN-γ、IL-4 水平。测量肺质量,计算肺指数(肺指数 = 肺质量/体质量 ×100%)。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用方差分析,两两比较采用 LSD 检验,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠一般情况及不同时点肺指数变化 实验组小鼠逐渐出现肺炎症状和体征,从第 3 天开始出现较为明显的症状,毛发蓬乱、光泽度下降,饮食饮水减少,精神状态差,体质量无明显变化,5 d 后症状缓解,10 余天后上述症状消退,体质量上升;对照组小鼠较为活泼,食欲良好,体质量逐步增加。2 组小鼠不同时间点肺指数比较差异均有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

表 1 2 组小鼠不同时间点肺指数比较

Tab. 1 Comparison of lung index of rats at different time point between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	3 d	5 d	7 d	14 d	21 d
对照组	30	0.82 ± 0.05	0.84 ± 0.07	0.92 ± 0.07	0.85 ± 0.04	0.88 ± 0.03
实验组	30	2.63 ± 0.07	2.85 ± 0.04	3.12 ± 0.04	2.01 ± 0.05	1.13 ± 0.03
t		51.54	61.07	66.84	44.38	14.43
P		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

2.2 2 组小鼠肺泡灌洗液中 IFN-γ、IL-4 水平比较 结果见表 2。实验组 3 d 时肺泡灌洗液中 IFN-γ 水平较对照组显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。实验组 3、5、7 d 肺泡灌洗液中 IL-4 含量与对照组比较均有所升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 2 组小鼠不同时间点肺泡灌洗液中 IFN-γ 与 IL-4 水平比较

Tab. 2 Comparison of IFN-γ and IL-4 levels in alveolar lavage fluid of rats at different time point between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	3 d	5 d	7 d	14 d	21 d
对照组	30					
IFN-γ/(ng · L^{-1})		176.03 ± 19.92	175.21 ± 3.27	170.69 ± 6.38	169.91 ± 4.67	166.02 ± 12.05
IL-4/(ng · L^{-1})		44.40 ± 1.80	43.27 ± 4.93	42.95 ± 5.62	45.15 ± 6.39	45.55 ± 4.04
实验组	30					
IFN-γ/(ng · L^{-1})		181.57 ± 10.72[a]	177.10 ± 5.66	170.33 ± 21.81	170.01 ± 16.21	168.62 ± 11.58
IL-4/(ng · L^{-1})		66.50 ± 9.18[a]	86.09 ± 6.75[a]	88.67 ± 5.65[a]	57.50 ± 16.36	45.86 ± 4.54

注:与对照组比较[a] $P < 0.05$。

2.3 2 组小鼠肺泡灌洗液中 IFN-γ/IL-4 比值比较 结果见表 3。2 组小鼠 3、5、7 d 时 IFN-γ/IL-4 比值比较差异均有统计学意义($P < 0.05$);14、21 d 时 2 组小鼠 IFN-γ/IL-4 比值比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 3 2 组小鼠肺泡灌洗液中不同时间点 IFN-γ/IL-4 比值比较

Tab. 3 Comparison of the ratio of IFN-γ/IL-4 in alveolar lavage fluid of rats at different time point between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	3 d	5 d	7 d	14 d	21 d
对照组	30	4.74 ± 2.14	4.13 ± 0.34	4.02 ± 0.47	3.82 ± 0.52	3.83 ± 0.45
实验组	30	2.78 ± 0.45	2.04 ± 0.15	1.91 ± 0.15	3.13 ± 0.79	3.88 ± 0.43
t		2.19	13.78	10.47	1.79	0.19
P		<0.05	<0.05	<0.05	>0.05	>0.05

3 讨论

MP 感染主要通过呼吸道飞沫传播,平时多散发,全年均可发病[2]。MP 是引起儿童呼吸道疾病常见的病原微生物之一,近年来 MP 感染发病率呈明显上升趋势,而且部分患者病情严重,常累及多个系统[3-4]。MP 长期存在可诱导细胞因子的释放,引起神经递质的紊乱[5]。MP 感染具有周期性趋势,每隔 3 ~4 a 发病率增加[6]。目前,关于 MP 肺炎的发病机制尚不完全清楚,多数研究认为 MP 感染可对机体产生免疫抑制,导致 T 细胞亚群失调。一般动物模型与人感染在上述方面有一定的相似性[7]。IFN-γ 和 IL-4 是由 Th1 和 Th2 产生的细胞因子,IFN-γ 可辅助细胞免疫应答,IL-4 辅助体液免疫应答,正常情况下 Th1/Th2 亚群维持着动态平衡,对机体产生免疫保护作用;一旦一些因素引起 Th1/Th2 失衡,则会产生有害免疫,导致疾病发生[8]。

本研究对小鼠进行滴鼻感染,建立 MP 模型,测定肺泡灌洗液中 IFN-γ、IL-4 水平,结果显示,3 d 时 2 组小鼠肺泡灌洗液中 IFN-γ 水平比较差异有统计学意义;随着感染时间的增加,实验组小鼠 IFN-γ 水平逐渐下降,至 14 d 时与对照组比较差异无统计学意义;3、5、7 d 时肺泡灌洗液中 IL-4 水平与对照组比较均有所增高,提示 MP 感染后存在 T 细胞亚群

失调,随着感染时间增加,Th1 受到抑制,Th2 变化不明显;实验组小鼠肺指数 3、5、7 d 升高明显,随着病程延长肺指数逐渐下降;提示随着感染时间的延长,肺质量逐渐增加,肺部炎性病变程度越严重;恢复期开始肺指数逐渐下降,病变缓解。

MP 能黏附在宿主呼吸道上皮细胞表面受体上,还可诱发自身免疫抗体,最终产生免疫效应[9]。免疫紊乱是 MP 感染反复发作的主要原因,IL-4 可使免疫系统向 Th2 依赖的过敏反应方向发展,IFN-γ 则与 IL-4 相反,其抑制 Th2 细胞增殖,对 IgE 有下调作用[10]。本研究发现,实验组小鼠第 3 天肺泡灌洗液中 IFN-γ、IL-4 水平均有所升高,随着感染时间的延长,IL-4 水平持续增高,IFN-γ 水平有所降低;提示 MP 感染后机体主要以 Th2 介导的免疫反应为主。2 组小鼠 IFN-γ/IL-4 比值第 3、5、7 天比较,差异有统计学意义;2 组小鼠 14、21 d IFN-γ/IL-4 比值比较差异无统计学意义;提示 MP 感染对机体造成的免疫功能紊乱持续时间较长,其远期预后仍有待进一步探讨。

参考文献:

[1] 韩玉芳,魏琴,冯艳广,等. 新乡市小儿肺炎支原体、肺炎衣原体感染情况[J]. 实用儿科临床杂志,2012,27(10):731-785.

[2] 王佳贺,牛慧彦,白雪,等. 3 种肺炎支原体感染检测方法的临床效果比较[J]. 新乡医学院学报,2011,28(1):51-53.

[3] Zhao F,Liu G,Wu J,*et al*. Surveillance of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in Beijing,China,from 2008 to 2012[J]. *Antimicrob Agents Chemother*,2013,57(3):1521-1523.

[4] 杨风华,王华,张俊梅,等. 儿童肺炎支原体感染相关性脑梗死[J]. 实用儿科临床杂志,2012,27(24):1869-1873.

[5] 陈江鱼,赵宏伊,李杰,等. 儿童抽动障碍与病原微生物感染及其免疫的相关性[J]. 实用儿科临床杂志,2012,27(19):1536-1537.

[6] Nguipdop-Djomo P,Fine P E M,Halsby K D,*et al*. Cyclic epidemics of *Mycoplasma pneumoniae* infections in England and Wales from 1975 to 2009:time-series analysis and mathematical modelling[J]. *Lancet*,2013,382:S78.

[7] 黄晓红,龚铭,李桃,等. 肺炎支原体感染大鼠模型的建立及治疗研究[J]. 南方医科大学学报,2009,29(11):2219-2221.

[8] Furuhashi K,Shirai T,Suda T,*et al*. Inflammatory markers in active pulmonary tuberculsis association with Th1/Th2 and Tc1/Tc2 balance[J]. *Kekkaku*,2012,87(1):1-7.

[9] You S Y,Jwa H J,Yang E,*et al*. Effects of Methylprednisolone pulse therapy on refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in Children[J]. *Allergy Asthma Immunol Res*,2014,6(1):22-26.

[10] 陈志敏. 肺炎支原体与支气管哮喘[J]. 临床儿科杂志,2011,29(8):701-704.

(本文编辑:孟　月　英文编辑:孟　月)

(上接第 608 页)

参考文献:

[1] Vollmar B,Menger M D. Intestinal ischemia/reperfusion:microcirculatory pathology and functional consequences[J]. *Langenbecks Arch Surg*,2011,396(1):13-29.

[2] Mallick I H,Yang W X,Winslet M C,*et al*. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury[J]. *Dig Dis Sci*,2004,49(9):1359-1377.

[3] 梁忠平,劳学军,何文芳,等. 高氧液对大鼠肝移植的保护作用[J]. 中国组织工程与临床康复,2010,14(18):3247-3251.

[4] 张彬,刘慧杰,朱绍辉,等. 氢水联合缺血后处理对大鼠小肠缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 新乡医学院学报,2014,31(5):333-337,342.

[5] 刘国华,梁培岳. 缺血预处理联合缺血后处理对肺移植中缺血再灌注肺损伤的影响[J]. 中国组织工程研究,2012,16(5):839-842.

[6] 李恒昌,许立新,李知平,等. 依达拉奉后处理联合远隔缺血后处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响[J]. 中华麻醉学杂志,2013,33(1):99-102.

[7] Chiu C J,McArdle A H,Brown R,*et al*. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological,hemodynamic,and metabolic reappraisal[J]. *Arch Surg*,1970,101(4):478-483.

[8] Xu H,Xing J,Cao W,*et al*. Clinical application of hyperoxygenated genated solution supplernentation oxygen supply in new ways to prevent and reduce hypoxic injury[J]. *Int J Anesth*,2010,31(1):52-55.

[9] Hahn J Y,Song Y B,Kim E K,*et al*. Ischemic postconditioning during primary percutaneous coronary intervention:the effects of postconditioning on myocardial reperfusion in patients with ST-segment elevation myocardial infarction randomized trial[J]. *Circulation*,2013,128(17):1889-1896.

[10] Zhang B,Zhao Y,Bao L,*et al*. Protective effects of remote limb preconditioning on ischemia reperfusion injury in rats liver[J]. *J Gastroen Hepatol Res*,2013,2(9):791-794.

[11] Xin P,Zhu W,Li J,*et al*. Combined local ischemic postconditioning and remote perconditioning recapitulate cardioprotective effects of local ischemic preconditioning[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*,2010,298(6):1819-1831.

[12] 袁勇,郭皓,张毅,等. 缺血后处理对大鼠小肠缺血再灌注损伤的保护作[J]. 重庆医学,2011,40(24):2410-2412.

[13] Liu K X,Li Y S,Huang W Q,*et al*. Immediatc postconditioning during reperfusion attenuates intestinal injury[J]. *Intensive Care Med*,2009,35(5):933-942.

[14] Thomas S,Satoshi K,Mex B,*et al*. Roles of nuclearfactor-κB in postischemic liver[J]. *Hepatol Res*,2008,38(5):429-440.

[15] Cutm I C,Perrelli M C,Cavalieri B,*et al*. Micmvescular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic precongditioning[J]. *Free Radic Biol Med*,2002,33(9):1200-1208.

[16] Xin P,Zhu W,Li J,*et al*. Combined local ischemic postconditioning and remote perconditioning recapitulate cardioprotective effects of local ischemic preconditioning[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*,2010,298(6):1819-1831.

[17] Ikizceli I,Yurumez Y,Avsarogullari L,*et al*. Effect of interleukin-10 on pancreatic damage caused by organophosphote poisoning[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*,2005,42(3):260-264.

(本文编辑:徐自超　英文编辑:徐自超)