

苦参碱对慢性铜绿假单胞菌生物膜 肺部感染大鼠的免疫保护作用

郭向华^{1*}, 郭润华², 宋志军³, 黄培春¹

(1. 广东医学院病理生理学教研室, 广东 东莞 523808; 2. 解放军 411 总医院, 上海 200083;
3. 丹麦哥本哈根大学医院临床微生物科, DK-2100)

[摘要] 目的: 探讨苦参碱对慢性铜绿假单胞菌(PA)生物膜肺部感染大鼠的免疫保护作用及其机制。方法: 由支气管内直接注入 PA(菌种为 PAO579)藻酸盐微粒(1×10^9 CFU/mL), 建立慢性 PA 生物膜感染模型, 并于术后第 2 d 开始给予苦参碱注射液(Mat, $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)或灭菌生理盐水(NS) ip, 每天 1 次, 连续治疗 14 d。2 周后评估各组的肺部细菌学、病理学、肺部细胞因子白介素(IL-4), 干扰素(IFN-)反应的变化。结果: PA 感染 2 周后, 苦参碱可显著减轻肺部大体观病理改变($P < 0.001$), 肺脓肿发生率明显低于模型组($P < 0.001$)。镜检发现有 80% 的动物已由急性炎症(以多形核白细胞浸润为主)逆转慢性炎症(以单个核细胞浸润为主), 显著高于模型组的比例($P < 0.05$); 苦参碱治疗组肺组织匀浆 PA 菌落计数仅为模型组 1/20($P < 0.001$), PA 检出率仅为 50%($P < 0.05$), 肺部细菌清除速度显著加快; 另外, 与模型组比较, 苦参碱治疗 2 周后感染动物肺部 IL-4 水平明显下调($P < 0.001$), 而肺部 IFN- 水平显著升高($P < 0.001$)。结论: 以上结果提示苦参碱能够诱导肺部 Th1 型免疫反应, 加快 PA 生物膜肺炎大鼠肺部的细菌清除及减轻肺部病理损伤, 因而对 PA 生物膜肺感染大鼠具有免疫保护作用。

[关键词] 苦参碱; 铜绿假单胞菌; 细菌生物膜; 肺部感染

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)08-0185-04

Effects of Matrine on Immune Protection in A Rat Model of Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Pneumonia

GUO Xiang-hua^{1*}, GUO Run-hua², SONG Zhi-jun³, HUANG Pei-chun¹

(1. Department of Pathophysiology, Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China;
2. 411 People's Liberation Army General Hospital, Shanghai 200083, China;
3. Department of Clinical Microbiology, University Hospital of Copenhagen, DK-2100, Denmark)

[Abstract] **Objective:** To observe the immune protection of matrine (Mat) on a rat model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* (PA) biofilm pneumonia. **Method:** Rats were challenged intratracheally with alginate embedded PA strain PAO579 in the concentration of 1×10^9 colony-forming units per milliliter (CFU·mL⁻¹). Mat or sterile normal saline (NS) was injected intraperitoneally once a day for two weeks starting on the second day after challenge. Two weeks post intratracheal challenge with PA, parameters were evaluated. **Result:** Two weeks after challenge, the Mat-treated group showed a significantly milder pathological changes in lung ($P < 0.001$), and lower lung abscess incidence compared to the model group ($P < 0.001$). Furthermore, a remarkable improved bacterial clearance ($P < 0.001$) and a shift from an acute type to a chronic type of lung inflammation were found in the Mat-treated group compared to the model group. 80% animals have returned to a chronic type of lung inflammation after Mat treatment which were much higher than that in the model group ($P < 0.05$). The lung cells from the Mat-treated

group produced more interferon-gamma(IFN-) ($P < 0.001$), but less interleukin-4(IL-4) ($P < 0.001$) as compared to the model group. These results indicate that Mat has an effect of inducing Th1 type of immune response.

Conclusion: Mat treatment significantly reduced pathological changes in lung and enhanced lung bacterial clearance, which might be associated with a shift of local immune responding type from a Th2 like to Th1 like. This might provide a better immune protection to the rats with chronic *P. aeruginosa* biofilm lung infection.

[Key words] matrine; *Pseudomonas aeruginosa*; bacterial biofilm, lung infection

铜绿假单胞菌(PA)是导致慢性肺部感染的主要致病菌之一,在感染过程中常可产生以藻酸盐多糖为主要成分的生物膜(biofilm, BF),造成该菌感染的反复发作及迁延难治^[1]。目前,国内外对铜绿假单胞菌生物膜的抑制作用主要集中在抗生药的研究方面,但中草药对 BF 的影响报道很少,尤其是对体内 BF 的影响更是罕见。因此我们采用 Pedersen SS 等^[2]建立的慢性 PA 生物膜肺部感染动物模型用于本实验研究,通过观察中药苦参碱(matrine, Mat)对 PA 生物膜肺炎大鼠肺部细菌学、病理学改变及肺部细胞因子表达的情况,探讨其对铜绿假单胞菌 BF 感染大鼠的免疫保护作用及其机制,以便为中草药临床免疫防治 PA 生物膜肺部感染提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 动物 雌性健康 Wistar 大鼠 60 只,5 周龄,体重(120 ± 10) g[广西医科大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(桂) 20030003]; 实验菌株 铜绿假单胞菌 PAO579(丹麦哥本哈根大学临床微生物科提供);苦参碱 购自宁夏博尔泰利股份公司(规格: 10 mL: 100 mg/ 支,批号 40040909);安慰剂 0.9% 灭菌生理盐水(NS)。

1.2 PA 海藻酸盐微菌珠悬液(SAB) 的制备 方法详见文献^[2]。PA 可产生藻酸盐并可在其中良好生长。

1.3 动物分组和给药方法 将 60 只清洁级大鼠随机分为 4 组,分别是:苦参碱治疗组(Mat + PA, 予 PA 肺部攻击后给予苦参碱 ip) 20 只;苦参碱对照组(Mat-PA, 无 PA 感染,仅给予苦参碱 ip) 10 只;模型组(NS + PA, 予 PA 肺部攻击后给予灭菌生理盐水) 20 只;正常组(NS-PA, 无 PA 感染,仅给予灭菌生理盐水 ip) 10 只。给药方法如下:在动物肺炎模型制作的第 2 天开始 ip 给药,苦参碱组给予苦参碱注射液 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每天 1 次,共 2 周;模型组和正常组按 $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给予灭菌生理盐水,治疗时间方法同苦参碱组。

1.4 动物模型制作^[2] 常规麻醉后行气管切开术,用一弯曲钝圆头长针向左支气管深部注入 0.1 mL SAB;缝合伤口,精心饲养。2 周后处死动物,检测各项指标。

1.5 观察指标

1.5.1 肺部细菌学检查^[3] 动物肺脏用组织匀浆机(中国上海产)制成匀浆,涂盘计数菌落。结果以菌落形成单位(CFU) $\cdot \text{mL}^{-1}$ 匀浆乘以肺匀浆的 mL 数表示,即 CFU/肺。

1.5.2 肺部大体病理改变 包括肺脓肿、出血、粘连、实变、不张、水肿等病理改变。用 4 级分类法表示上述病理改变的发生率和严重程度, 级: 正常; 级: 充血、肿胀, 10 mm^2 以下的肺不张; 级: 胸膜粘连及 $10 \sim 40 \text{ mm}^2$ 的实变或不张; 级: 肺脓肿或 $> 40 \text{ mm}^2$ 的实变或不张。

1.5.3 肺部组织病理观察 苦参碱治疗组与模型组分别取 10 只动物的肺脏检查,常规石蜡切片用苏木精-伊红染色。镜下肺病理分 4 级, 级: 正常; 级: 小灶性炎症改变; 级: 大范围的炎症区域内夹杂正常肺组织; 级: 严重的炎症改变(组织变形、坏死) 或整个肺叶以上的炎症反应。另外镜下观察病灶内浸润的炎症细胞,以多形核白细胞(PMN) 浸润为主的反应为急性炎症(PMN 90%),而以单个核细胞(MN) 浸润为主的反应(MN 90%) 为慢性炎症^[4]。全部过程采用双盲法进行。

1.5.4 肺部细胞因子检测 采用 ELISA 药盒检测各组动物肺组织匀浆上清液中的白介素 4(IL-4) 和干扰素 (IFN-) 两种细胞因子。

1.6 统计学处理 计量资料用 Mann-Whitney U Test 检验处理,计数资料用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 肺部细菌学检查 如表 1 所示,肺部 PA 感染 2 周后,苦参碱治疗组的 PA 检出率为 50%,比模型组降低了一半($P < 0.05$)。苦参碱治疗组的肺匀浆 PA 菌落计数也显著低于模型组($P < 0.002$),后者

比前者高 20 倍之多。

表 1 PA 感染 2 周后大鼠肺部细菌学变化 (n = 10)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	菌落计数 (CFU/肺) [中位数 (范围)]	肺部 PA 检出率/%
Mat + PA	100	1.9 × 10 ³ (0.0 ~ 2.7 × 10 ⁵) ²⁾	50 ¹⁾
NS + PA	—	5.3 × 10 ⁵ (4.1 × 10 ² ~ 6.9 × 10 ⁶)	100

注:与模型组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01, ³⁾ P < 0.001 (下同);
Mat + PA: 苦参碱治疗组; NS + PA: 模型组 (下同)。

2.2 肺部大体观病理 PA 感染 2 周后, 苦参碱治疗组的肺部大体观病理比模型组明显减轻 (P < 0.001), 见表 2。其中苦参碱治疗组病变属 ~ 级的动物数明显多于模型组 (P < 0.05, P < 0.01), 而属 级病变的动物数及肺脓肿发生率均显著低于模型组 (P < 0.001)。

表 2 PA 感染 2 周后大鼠肺部大体病理改变的比较 (n = 20) n (%)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	病变级别			肺脓肿
		+	+	+	
Mat + PA	100	5 (25) ¹⁾	11 (55) ²⁾	4 (20) ³⁾	3 (15) ³⁾
NS + PA	—	0 (0)	2 (10)	18 (90)	17 (85)

表 4 PA 感染两周后各组大鼠肺部细胞因子测定结果比较 (n = 10) 中位数 (范围)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	IL-4 /pg·mL ⁻¹	IFN- /pg·mL ⁻¹
Mat + PA	100	93.7 (31.2 ~ 187.5) ³⁾	320.3 (160.2 ~ 379) ^{3, 6)}
NS + PA	—	359.3 (250 ~ 437.5) ⁵⁾	29.2 (11.5 ~ 53.8) ⁵⁾
Mat-PA	100	70.36 (45.7 ~ 101.2) ⁴⁾	58.42 (39.7 ~ 101.3) ⁴⁾
NS-PA	—	125 (93.7 ~ 218.7)	115.69 (63.7 ~ 127.3)

注:与正常组比较⁴⁾ P < 0.05, ⁵⁾ P < 0.01; 与苦参对照组比较⁶⁾ P < 0.01; Mat-PA: 苦参对照组; NS-PA: 正常组。

3 讨论

机体的免疫反应可根据免疫细胞分泌的细胞因子不同, 大致划分为 Th1 型和 Th2 型反应。Th1 型反应以 IFN- 的大量产生为特征, 兴奋细胞免疫; 而 Th2 型反应则是以大量 IL-4 的分泌为特征, 主要介导体液免疫。现已证实, PA 生物膜肺部感染所诱发的免疫反应是以 Th2 型为主^[3], 若将 Th2 型反应向 Th1 型转化则有助于 PA 的清除, 保护肺组织和促进肺部炎症的消退^[4-5]。

苦参系药用豆科植物苦参的根, 有抗菌、抗肿瘤、免疫调节等多种生物活性作用。苦参碱是苦参型生物碱的主要活性成分, 在治疗慢性肝炎和肝纤维化等方面已得到广泛应用, 但对 PA 生物膜肺部

2.3 组织病理学检查 PA 感染两周后, 模型组 80% 的动物表现为急性炎症反应, 在 PA 藻酸盐微生物珠周围有大量的 PMN 浸润, 相反, 苦参碱治疗组 80% 的动物已逆转为慢性炎症明显高于模型组 (P < 0.05), 病灶周围代之以大量的 MN 浸润。镜检发现, 模型组肺组织破坏严重, 脓肿, 肺实变、出血明显。而苦参碱治疗组肺部炎症反应显著减轻, 镜下病理以 ~ 级为主, 属于 IV 病变的动物数明显低于模型组 (P < 0.001), 结果见表 3。

表 3 PA 感染 2 周后大鼠肺部组织病理学比较 (n = 10) n (%)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	慢性炎症	病变级别		
			+	+	+
Mat + PA	100	8 (80) ¹⁾	6 (60) ¹⁾	3 (30)	1 (10) ²⁾
NS + PA	—	2 (20)	0 (0)	2 (20)	8 (80)

2.4 肺部细胞因子检测结果 见表 4。肺部 PA 感染两周后, 与正常组比较, 模型组的 IFN- 水平明显降低 (P < 0.01), 而 IL-4 水平显著升高 (P < 0.01); 同时, 苦参碱治疗组肺部 IFN- 水平显著高于模型组 (P < 0.001), 而 IL-4 水平明显降低 (P < 0.001); 此外, 苦参碱对照组的 IL-4 水平和 IFN- 水平均低于正常组 (P < 0.05)。

感染的影响尚未见报道。本实验利用苦参碱来观察其对实验性 PA 生物膜肺部感染模型的免疫保护作用。结果发现, PA 感染 2 周后, 模型组的 PA 检出率为 100%, 肺部 IL-4 明显增高, 而 IFN- 的产生显著降低; 病理学检查发现肺组织破坏严重, 镜下观察主要表现为急性炎症反应, 病灶中有大量的 PMN 积聚, 这些结果显示了 PA 感染诱发了较明显的 Th2 型反应, 与文献报道一致^[3]。而苦参碱治疗 2 周后, PA 肺部感染大鼠的大体观病理改变明显改善, 肺脓肿发生率显著降低, 镜检肺部炎症也逆转为慢性为主, 提示苦参碱有助于减轻肺组织的病理损伤; 此外, 细菌学检测显示苦参碱治疗还可明显促进肺部细菌的清除。苦参碱治疗组与模型组比较肺部的

IL-4 水平明显降低, IFN- γ 水平显著提高。这些结果表明苦参碱治疗能成功地将感染机体的 Th2 型反应扭转为 Th1 型反应。而苦参碱加快 PA 感染动物肺部细菌的清除及减轻肺部病理损伤显然与此有关。IFN- γ 是 Th1 型反应最具代表性的细胞因子, 它是吞噬细胞和 NK 细胞重要的活化因子, 能显著增强它们对病原微生物的吞噬杀菌能力。所以苦参碱治疗组的 IFN- γ 水平的升高无疑会有助于加快肺部 PA 的清除。

细胞因子 IL-4 是 Th2 型反应的代表性因子。国外学者研究发现外周血产生高水平 IL-4 的 PA 肺感染患者在 4 年间反复感染的频率显著高于其他患者^[3], 而体内低表达 IL-4 的 PA 肺感染小鼠的细菌清除率提高且肺部病理损伤明显减轻^[6]。显然, 过强的 IL-4 反应对于 PA 感染机体不利。本实验观察到苦参碱可以抑制肺部 IL-4 的分泌, 即: 抑制 Th2 型反应, 介导 Th1 型免疫反应, 因而增强了实验动物对 PA 生物膜肺部感染的抵抗力。值得注意的是, 从本实验结果中, 我们发现苦参碱对照组的肺部的 IL-4、IFN- γ 水平均较正常组降低, 提示苦参碱对机体的细胞免疫具有双向调节作用, 这本身也符合中草药免疫调节的特点。

总之, 本研究证实苦参碱能够通过升高肺部 IFN- γ 水平, 降低 IL-4 的水平, 来调控 PA 感染机体的免疫反应, 即诱导以 Th1 型为主的免疫反应, 从而加快 PA 生物膜肺炎大鼠肺部细菌的清除及减轻肺

部病理损伤, 因而对 PA 生物膜肺炎大鼠具有较好的免疫保护作用。

[参考文献]

- [1] Hoiby N, Krogh J H, Moser C, et al. *Pseudomonas aeruginosa* and the *in vitro* and *in vivo* biofilm mode of growth[J]. *Microbes Infect*, 2001, 3(1) : 23.
- [2] Pedersen S S, Shand G H, Hansen B L, et al. Induction of experimental chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection with *P aeruginosa* entrapped in alginate microspheres[J]. *APMIS*, 1990, 98(3) : 203.
- [3] Moser C, Kjaergaard S, Pressler T, et al. The immune response to chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis patients is predominantly of the Th2 type[J]. *APMIS*, 2000, 108(5) : 329.
- [4] Song Z J, Johansen H K., Faber V, et al. Ginseng treatment enhances bacterial clearance and decreases lung pathology in athymic rats with chronic *P. aeruginosa* pneumonia[J]. *APMIS*, 1997, 105(6) : 438.
- [5] Johansen H K, Hougen H P, Rygaard J, et al. Interferon-gamma (IFN-gamma) treatment decreases the inflammatory response in chronic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in rats[J]. *Clin Immunol*, 1996, 103(2) : 212.
- [6] Modlin R L, Nutman T B. Type 2 cytokines and negative immune regulation in human infection[J]. *Curr Opin Immunol*, 1993, 5(4) : 511.

[责任编辑 聂淑琴]