

海分枝杆菌菌壁蛋白组特性及对 Wistar 大鼠致病免疫学特征研究

林存智 王芳芳 曹艺巍 李海健 张华 李金凤 朱新红

【摘要】 目的 探讨海分枝杆菌菌壁蛋白组特性及对 Wistar 大鼠致病免疫学特征, 提高对海分枝杆菌致病机制的认识。方法 (1) 将临床分离的海分枝杆菌经过培养 7~10 d 后, 挑取培养的菌落, 加入到 0.9% 氯化钠液体中, 离心、PBS 冲洗、超声破碎制备菌壁蛋白。将制备好的样品蛋白进行双向电泳, 凝胶图像分析。(2) 应用 McFarland 比浊法, 制备菌液, 估计所配制的细菌剂量浓度。选取雄性 Wistar 大鼠 45 只, 数字随机法分成 3 组: 实验组 A 和 B、对照组, 每组 15 只。取菌液 0.1 ml (浓度: 3×10^8 cfu/ml) 经尾静脉注射感染 A 组, 腹腔注射感染 B 组, 对照组经尾静脉注射 0.9% 氯化钠 0.1 ml 液体。感染第 4 周后抽取尾静脉血液 1 ml, 采用 ELISA 法分别检测 3 组大鼠血清中 sIL-2R、TNF- α 和 IFN- γ 表达。结果 (1) 海分枝杆菌菌壁蛋白分子质量处于 10~100 kD, PI 值主要分布于 4.5~6.0 之间, 在 pH 4.5~5.5 之间蛋白点分布比较密集, 主要集中在偏酸性侧。(2) 实验组 A 和 B 大鼠血清中 sIL-2R、TNF- α 和 IFN- γ 表达无统计学差异 (实验组 A 和 B 之间, $t=1.39 \sim 1.91$, $P=0.065 \sim 0.174$), 分别与对照组比较均有统计学差异 (A 组与对照组比较, $t=5.98 \sim 24.08$, $P<0.05$; B 组与对照组比较, $t=3.79 \sim 27.62$, $P<0.05$)。结论 海分枝杆菌菌壁致病性蛋白在 10~100 kD 之间, Wistar 大鼠全身感染 4 周后可引起白细胞介素表达增强。

【关键词】 分枝杆菌, 海; 大鼠, Wistar; 白细胞介素类; 菌壁蛋白; 凝胶图像

Study on the character of mycobacterium marinum protein and immunology to wistar rats LIN Cun-zhi, WANG Fang-fang, CAO Yi-wei, LI Hai-jian, ZHANG Hua, LI Jin-feng, ZHU Xin-hong. Department of Respiratory Medicine, The Affiliated Hospital of Medical College Qingdao University, Qingdao 266003, China

Corresponding author: ZHU Xin-hong, Email: zhudoc@126.com

【Abstract】 Objective To explore the character of Mycobacterium marinum(M. marinum)germ wall protein and the immunology to Wistar rats, as well as improve the understanding of the pathogenic mechanism of M. marinum. **Methods** (1)The colonys of the clinical isolates of M. marinum were picked up and cultured for 7 to 10 days, added to 0.9% sodium chloride liquid, centrifuged and washed with PBS fluid, then extracted bacterial wall protein broken by ultrasound. We analyzed the M. marinum protein by two-dimensional electrophoresis and gel-image. (2) Germ liquid was made by McFarland nephelometry. Forty-five male Wistar rats were selected, and divided into three groups by numeral random, including experiment group A and B, and control group. Every group has fifteen rats. Group A were infected with 0.1 ml germ-fluid (germ density 3×10^8 cfu/ml) via tail vein, while Group B by intraperitoneal injection, but the control group only accepted 0.1 ml normal saline via tail vein. Took 1 ml blood from tail vein after infected four weeks, and assayed the expression of sIL-2R, TNF- α and IFN- γ respectively in serum by ELISA. **Results** (1)The molecular weight of M. marinum's germ wall-held proteins was between 10-100 kD, the Isoelectric Point(PI)was between 4.5-6.0. The protein points concentrate at pH 4.5-5.5, mainly in acid side. (2)The expressions of sIL-2R, TNF- α and IFN- γ had no statistical difference between group A and B($t_{A-B}=1.39-1.91$, $P=0.065-0.174$), but all of them had significant difference compared with the control group respectively($t_A=5.98-24.08$, $P<0.05$; $t_B=3.79-27.62$, $P<0.05$). **Conclusion** The pathogenic germ wall-held proteins of M. marinum are about 10-100 kD, and the expression of interleukins will increase after infected four weeks in Wistar rats.

【Key words】 Mycobacterium marinum; Rats, Wistar; Interleukins; Germ wall-held protein; Gel electrophoresis

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.15.055

作者单位: 266003 山东省, 青岛大学医学院附属医院呼吸科 (林存智、王芳芳、曹艺巍、张华、李金凤), 特检科 (李海健); 青岛市市立医院内科国际门诊 (朱新红)

通讯作者: 朱新红, Email: zhudoc@126.com

海分枝杆菌为条件致病菌, 主要存在于海水、游泳池、养鱼池或淡水中, 或寄生在鱼、虾和蟹类体表面。对人类不直接引起感染, 大多数情况下见于人体皮肤有损伤后接触海分枝杆菌, 或者皮肤受到鱼、虾或蟹的直接刺伤而导致感染, 早期全身症状表现不明显, 以局部皮肤的红肿、脓性分泌物附着、结节样改变为主, 抗炎治疗效果差。多被误诊为腱鞘炎, 早期得不到及时治疗, 如果是患者免疫力低下, 可以造成病情加重, 出现多结节样改变、皮肤溃烂, 重者甚至截肢。以往诊断为游泳池肉芽肿或鱼结核病, 现从我院确诊的 1 例海分枝杆菌手指感染的临床病例中分离培养出的海分枝杆菌菌株进行大鼠实验, 探讨海分枝杆菌胞壁致病蛋白特性及感染后引起大鼠免疫学改变。

资料与方法

一、临床资料及菌株来源

患者男, 52 岁, 渔民, 右手中指被活鱼刺伤 5 h 后, 开始红、肿、疼痛, 1 个月后皮肤破损处开始有脓液溢出, 初步诊断为“腱鞘炎”, 行手术切开引流、清扫, 给予头孢氨苄 0.5 g/次, 每日 3 次, 治疗 10 d 后未见好转, 自行停药。2 个月后再次出现黄色脓液溢出, 而且伤口面积增大。来我院行第二次手术, 术前留取脓液, 采用改良罗氏培养基, 32 °C 恒温环境避光进行培养, 7~10 d 可以看见菌落生长。经中国海洋大学水产学院病害与免疫学教育部重点实验室菌型鉴定为海分枝杆菌。手术组织病理检查结果: 考虑“皮肤结核”感染可能。

二、材料与方法

(一) 动物

选取雄性 Wistar 大鼠 45 只, 周龄 6~8 周, 平均体质量 (400±25) g, 数字随机法分成实验组 A 和 B 组、对照组, 每组各 15 只。在动物实验室内, 每组动物分别饲养, 喂食同样的鼠粮。实验鼠是由青岛市药检所和青岛市动物检验检疫所提供的健康合格的雄性 Wistar 大鼠。

(二) 实验方法

1. 菌株分离及菌液配制: 将临床分离的海分枝杆菌经过改良罗氏培养基培养 7~10 d 后, 挑取培养的菌落, 置于 0.9% 生理盐水 5 ml 中, 摇匀, 应用 McFarland 比浊法估计所配制的细菌剂量, 见表 1。

2. 海分枝杆菌胞壁蛋白制备: 用无菌 0.9% 氯化钠液体收集培养好的海分枝杆菌菌落, 6000×g 离心, 10 min, 收集沉淀。60 °C, 90 min 灭活后, 用 PBS (pH=7.4) 冲洗 2 次, 每次 6000×g 离心, 10 min。所

表 1 McFarland 比浊法估计细菌浓度

试管号	1% BaCl ₂ (ml)	1% H ₂ SO ₄ (ml)	相当于每毫升的细菌数 (亿)
1	0.1	9.9	3
2	0.2	9.8	6
3	0.3	9.7	9
4	0.4	9.6	12
5	0.5	9.5	15
6	0.6	9.4	18
7	0.7	9.3	21
8	0.8	9.2	24
9	0.9	9.1	27
10	1.0	9.0	30

得沉淀用匀浆缓冲液溶解后, 超声破碎 15 min。溶解物 27 000×g, 4 °C 离心, 20 min, 收集沉淀, 再用匀浆缓冲液冲洗, 然后 27 000×g, 离心, 20 min, 收集沉淀。沉淀用酶 PBS 缓冲液溶解, 4 °C 放置过夜后, 用匀浆缓冲液冲洗 2 次, 再用 PBS 缓冲液, pH 7.4, 冲洗 2 次, 每次 6000×g 离心, 10 min, 所得沉淀用 8 mol/L 尿素, 5% 甘油, 室温裂解 2 次, 共 2 h, 均匀混合。10 000×g 离心, 1 h, 得上清液透析浓缩, 收集浓缩液置 -20 °C 备用。Bradford 法测得样品中蛋白质质量浓度, 得到质量浓度为 0.5 mg/ml 的海分枝杆菌菌株的胞壁蛋白。

3. 双向电泳及凝胶图像分析: 样品用上样缓冲液稀释, 每根 17 cm pH 4~7 的 IPG 预制胶条中蛋白质上样量为 250 μg。样品的吸收与胶条的重泡涨同步进行, 50 V 主动水化。聚焦温度 17 °C, 聚焦电压小时数 60 kV/h。聚焦完毕后, 胶条先在平衡液 1 中平衡 15 min, 再在平衡液 2 中平衡 15 min。平衡好的 IPG 预制胶条转移到 SDS-PAGE 凝胶上, 用低熔点琼脂糖封胶液封闭, 待封胶液凝固后进行第二向垂直电泳。

电泳槽中装满电泳缓冲液, 并打开温控系统, 调节温度为 15 °C。将平衡好的 IPG 胶条浸入电极缓冲液中几秒钟。将 IPG 胶条小心的放置于 SDS 胶面上, 并轻压使 IPG 胶条与 SDS 胶面充分结合, 上面覆盖 2 ml 热的琼脂糖溶液 (75 °C), 使琼脂糖在 5 min 内凝固。其余的 IPG 胶条重复上述操作。将胶盒插入电泳槽中, 开始电泳。采用垂直的 SDS 胶电泳, 电泳过程中去除 IPG 胶条。当溴酚蓝染料迁移到胶的底部边缘即可结束电泳。电泳后的胶转移到染色盒里固定, 准备银氨染色。用 Molecular Image Fx 凝胶图像扫描后, PDQuest 软件进行图像的分析处理。

4. 血清 ELISA 检测方法: 实验 A 组经尾静脉注

射 0.1 ml 菌液, B 组经腹腔注射 0.1 ml 菌液(浓度: 3×10^8 cfu/ml), 对照组经尾静脉注射 0.9% 氯化钠 0.1 ml。感染 4 周后处死大鼠, 留取静脉血 1 ml, 采用 ELISA 方法分别检测血清中 sIL-2R、IFN- γ 和 TNF- α 。ELISA 实验方法按照试剂盒说明书进行操作, 本实验所用 sIL-2R、IFN- γ 和 TNF- α 试剂盒是由上海森雄科技实业有限公司提供。

三、统计学处理

实验数据采用 SPSS 16.0 统计软件包进行统计学处理, 并以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 各组数值方差分析后, 比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. ELISA 检测血清中细胞因子的结果: 大鼠感染 4 周后血清中 sIL-2R、TNF- α 和 IFN- γ 的分泌均较对照组有明显增加, 实验组 A 和 B 组分别与对照组比较, 差异均有统计学意义(A 组与对照组比较, $t=5.98 \sim 24.08$, $P < 0.05$; B 组与对照组比较, $t=3.79 \sim 27.62$, $P < 0.05$), 实验组 A 和 B 之间差异无统计学意义($t=1.39 \sim 1.91$, $P=0.065 \sim 0.174$), 见表 2。

表 2 外周血清中细胞因子检测结果 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	sIL-2R	TNF- α	IFN- γ
实验组 A	15	55.6 \pm 4.2 ^a	34.3 \pm 2.2 ^a	38.4 \pm 3.1 ^a
实验组 B	15	53.7 \pm 3.2 ^a	32.8 \pm 2.5 ^a	36.4 \pm 2.6 ^a
对照组	15	26.4 \pm 2.1	29.6 \pm 2.1	21.5 \pm 1.2

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$

2. 双向电泳凝胶图谱分析: 海分枝杆菌菌株细胞壁凝胶图谱中软件检测到 490 个蛋白质斑点, 分子量范围均处于 10~100 kD。细胞壁蛋白的等电点 (PI) 值主要分布于 4.5~6.0, 其中在 pH 4.5~5.5 之间蛋白分布比较密集, 5.5~6.0 之间的蛋白点比较稀疏, 偏碱性侧的蛋白几乎没有, 蛋白主要集中在偏酸性侧 (图 1)。

讨 论

海分枝杆菌为非结核分枝杆菌的一种亚型, 为条件性致病菌, 可以引起人类的感染, 尤其在海洋渔业作业人员及热带鱼观赏养殖人员, 其感染机会明显增加。高危因素为鱼类接触史, 尤其是被鱼或虾蟹类刺伤, 大部分仅表现为皮肤的感染, 局部皮肤结节、溃疡或化脓样病变, 大多持续时间较长, 抗生素治疗效果差^[1-3]。海分枝杆菌感染后病理表现为结核性肉芽肿样改变, 干酪样坏死少见, 与结核分枝杆菌在病理上

难以区别, 确诊需做菌种鉴定。海分枝杆菌在 28~32 °C 恒温环境, 改良罗氏培养基中生长良好, 需要避光培养, 7~10 d 后即可见菌落生长。

IFN- γ 作为 Th1 型细胞因子对机体起到免疫保护作用, 当有机体受到致病菌的感染时, IFN- γ 的分泌会增加。我们的实验结果表明: Wistar 大鼠受到海分枝杆菌的感染后第 4 周, 血清中 IFN- γ 的含量明显增加, 与对照组比较有明显的改变, 差异有统计学意义。但感染途径不同, 血清中并未引起 IFN- γ 分泌的差异。可能的原因经尾静脉直接进入血液, 菌壁抗原刺激循环 T 细胞致敏后分泌 IFN- γ , 而腹腔注射后通过间接途径使 T 淋巴细胞致敏, 导致 IFN- γ 分泌。Frantz 等^[4]研究认为分枝杆菌感染的小鼠可以使鼠产生 IFN- γ 增加, 这样有利于抵抗外源病原体的侵入。Guidry 等^[5]用分枝杆菌的菌体抗原成分刺激小鼠, 也可以使 IFN- γ 的分泌增加。研究结果与本研究结果基本相似。Ordway 等^[6]认为在分枝杆菌感染期间, 实验鼠分泌 IFN- γ 明显增加, 目的是保护机体免疫损伤, 阻止肉芽肿的形成。

TNF- α 前体是以跨膜蛋白的形式存在于细胞内, 在细胞外被剪切成 17 kD 的成熟形态(157 个氨基酸)。活性的 TNF- α 以三聚体的形式存在, 很多细胞都能合成 TNF- α , 包括各种免疫细胞(单核细胞、巨噬细胞、T 细胞、B 细胞、粒细胞、NK 细胞)和非免疫细胞(上皮细胞、纤维细胞、肌细胞、Kupffer 细胞等)。TNF- α 的合成受到很多因素的影响, 其生理功能最早认为是有抗肿瘤活性, 现在已明确不仅能调节肿瘤细胞的生长, 对很多细胞的生长、分化和代谢都有影响。TNF- α 是免疫宿主反应的快速反应因子, 其另一特点是在免疫疾病中有病理作用。我们研究大鼠感染海分枝杆菌 4 周后, 分泌 TNF- α 的能力增加, 与对照组大鼠血清中 TNF- α 的差异有统计学意义。TNF- α 在抗肿瘤方面发挥有效的生物学作用, 保护机体免于肿瘤的发生, 抑制肿瘤细胞或杀伤肿瘤细胞。TNF- α 作为一种炎症性细胞因子, Hwang 等^[7]认为促炎症反应因子 TNF- α 的分泌在分枝杆菌感染的小鼠是受到限制的, 以免造成组织病理学的改变。Rottman 等^[8]研究认为 IFN- γ 和 TNF- α 在控制小鼠感染分枝杆菌方面是重要的因素, 它们控制分枝杆菌的迟缓生长。IFN- γ 受体或 TNF- α 受体缺陷的小鼠, 肝脏和脾脏的损伤明显。Bhatnagar 等^[9]研究认为 BCG 感染的小鼠, 可以产生 TNF- α , 与我们的研究相一致。

细胞因子通过结合细胞表面相应的细胞因子受体而发挥生物学作用, IL-2R 为 I 型细胞因子受体家族成员, 其受体有游离的形式即可溶性细胞因子受体 (sIL-2R)。sIL-2R 可作为相应细胞因子的运载体, 也

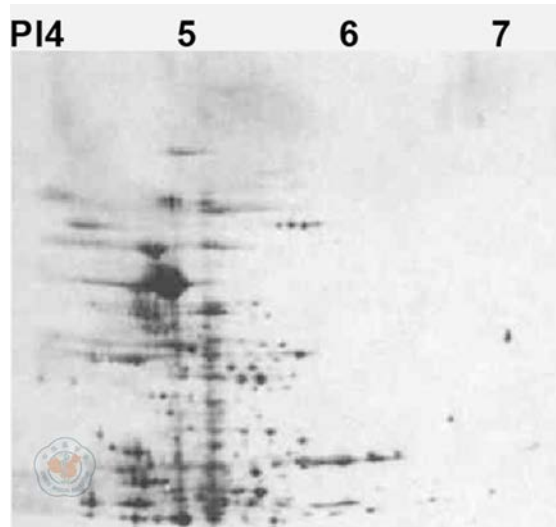


图1 细胞壁蛋白等电点 (PI) 值主要分布于4.5~6.0, 在pH 4.5~5.5之间蛋白分布比较密集, 主要集中在偏酸性侧

可与相应的膜型受体竞争配体而起到抑制作用。Chu等^[10]研究认为人类感染结核分枝杆菌后, 血清中sIL-2R的分泌会增加, 应用IL-2治疗后sIL-2R分泌会减少。本研究表明: 海分枝杆菌感染的大鼠4周后血清中sIL-2R水平明显增高, 说明大鼠体内存在免疫功能的异常, 与对照组比较sIL-2R差异有明显的统计学意义。Lawn等^[11]研究认为结核分枝杆菌感染后引起sIL-2R分泌增加, 合并HIV病毒感染后分泌降低, 可能是T淋巴细胞的激活受到损害, CD4淋巴细胞的消耗有关。与Tada等^[12]研究一致, 而且认为sIL-2R水平与C-反应蛋白水平和血沉呈现正相关, 与人血白蛋白呈负相关。Montes等^[13]提出sIL-2R分泌水平与初始和记忆T细胞亚群无关。

人感染海分枝杆菌的病例近几年来报道有增加的趋势, 对于被鱼、虾、蟹刺伤后, 或者皮肤损伤接触鱼虾或海水等可能存在海分枝杆菌的环境, 创伤经过抗感染治疗后难以愈合, 甚至有加重的趋势, 应该及时进行致病菌的培养及分离, 进一步进行菌型鉴定或组织病理学检查, 指导以后的治疗。

参 考 文 献

[1] 刘云杰, 蔡林, 张建中. 螃蟹钳伤后发生游泳池肉芽肿1例. 中国皮肤性病学杂志,2006, 20: 434-435.
 [2] 唐旭华, 何定阳, 章星琪. 夫妻共患皮肤海鱼分枝杆菌感染. 皮肤性病诊疗学杂志, 2011, 18: 47-48.
 [3] 李薇薇, 涂平, 陈伟, 等. 皮肤非结核分枝杆菌感染1例. 中国皮肤性病学杂志, 2012, 26: 55-56.
 [4] Frantz FG, Rosada RS, Turato WM, et al. The immune response to toxocarasis does not modify susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection in BALB/c mice. Am J Trop Med Hyg,2007, 77: 691-698.
 [5] Guidry TV, Hunter RL Jr, Actor JK. Mycobacterial glycolipid trehalose 6,

6'-dimycolate-induced hypersensitive granulomas: contribution of CD4+ lymphocytes. Microbiology,2007, 153: 3360-3369.
 [6] Ordway D, Higgins DM, Sanchez-Campillo J, et al. XCL1 (lymphotactin) chemokine produced by activated CD8 T cells during the chronic stage of infection with Mycobacterium tuberculosis negatively affects production of IFN-gamma by CD4 T cells and participates in granuloma stability. J Leukoc Biol,2007, 82: 1221-1229.
 [7] Hwang SA, Wilk KM, Budnicka M, et al. Lactoferrin enhanced efficacy of the BCG vaccine to generate host protective responses against challenge with virulent Mycobacterium tuberculosis. Vaccine,2007, 25: 6730-6743.
 [8] Rottman M, Catherinot E, Hochedez P, et al. Importance of T cells, gamma interferon, and tumor necrosis factor in immune control of the rapid grower Mycobacterium abscessus in C57BL/6 mice. Infect Immun,2007, 75: 5898-5907.
 [9] Bhatnagar S, Shinagawa K, Castellino FJ, et al. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response *in vitro* and *in vivo*. Blood, 2007, 110: 3234-3244.
 [10] Chu NH, Zhu LZ, Yie ZZ, et al. A controlled clinical study on the efficacy of recombinant human interleukin-2 in the treatment of pulmonary tuberculosis. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi,2003, 26: 548-551.
 [11] Lawn SD, Little F, Bekker LG, et al. Changing mortality risk associated with CD4 cell response to antiretroviral therapy in South Africa. AIDS,2009, 23: 335-342.
 [12] Tada A, Kawahara S, Horita N, et al. Serum soluble interleukin-2 receptor in patients with pulmonary mycobacterial diseases. Kekkaku,1999, 74: 499-505.
 [13] Montes J, Gambn-Deza F, Pacheco M, et al. Memory T lymphocytes during infection and tuberculosis infection and disease. Arch Bronconeumol, 1998, 34: 384-387.

(收稿日期: 2013-05-24)

(本文编辑: 戚红丹)