

• 论 著 •

## 肺炎支原体感染对 BALB/c 小鼠体内 IL-18 表达的影响\*

许有才<sup>1</sup>, 赵世元<sup>2△</sup>, 陈秀荣<sup>3</sup>

(1. 广西大新县人民医院检验科, 广西崇左 532300; 2. 广西医科大学附属民族医院, 广西南宁 530001; 3. 崇左市食品药品监督管理局, 广西崇左 532200)

**摘要:**目的 探讨 IL-18 在 BALB/c 小鼠肺炎支原体(MP)感染模型肺泡灌洗液和血清中的表达, 阐明其与 MP 感染的关系。方法 72 只 BALB/c 小鼠, 随机分为 3 组, 分别为对照组、MP 感染组和治疗组, 每组 24 只。用 PPLO 肉汤培养基培养 MP, 将成功培养的 MP 滴入小鼠鼻腔建立 MP 感染模型。治疗组于模型建立的第 5 天使用克拉霉素治疗。MP 感染模型建立后的第 1、5、9 天收集 3 组小鼠的眼球血及肺泡灌洗液, 检测 IL-18 表达水平。分别于接种后 3、7、14、21、30 d 从 3 组中各取 1 只小鼠, 完整分离肺组织, 制作病理切片以观察 MP 感染小鼠肺的病变程度。结果 病理切片显示, 对照组小鼠肺组织无炎症反应, 肺泡结构均匀清楚; MP 感染组小鼠肺组织出现重度炎症改变; 治疗组小鼠第 7 天的肺组织出现中度炎症改变。MP 感染组及治疗组在建模后第 1、5、9 天时血清和肺泡灌洗液中 IL-18 表达水平较对照组均明显上升, 差异有统计学意义( $t_{1天} = 10.08, t_{5天} = 9.14, t_{9天} = 10.59, P < 0.05$ )。治疗组第 5、9 天血清和肺泡灌洗液中 IL-18 表达水平均明显低于 MP 感染组, 差异均有统计学意义( $t_{5天} = 12.96, t_{9天} = 7.95, P < 0.05$ )。结论 MP 感染使小鼠 IL-18 水平降低, 克拉霉素治疗有一定疗效, IL-18 表达可能与 MP 肺炎严重程度有关。

**关键词:**肺炎支原体; 白介素-18; 克拉霉素

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.22.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)22-3221-03

**Influence of Mycoplasma pneumoniae infection on the expression of interleukin-18 in BALB/c mice\***Xu Youcai<sup>1</sup>, Zhao Shiyuan<sup>2△</sup>, Chen Xiurong<sup>3</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Daxin County People's Hospital, Chongzuo, Guangxi 532300, China; 2. the Affiliated National Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530001, China; 3. Chongzuo City Food and Drug Administration, Chongzuo, Guangxi 532200, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the expression of interleukin(IL)-18 in BALB/c mice serum and bronchoalveolar fluid infected by mycoplasma pneumonia(MP) and to clarify the relationship between IL-18 and MP infection. **Methods** A total of 72 BALB/c mice were randomly divided into control group, MP infection group and treatment group, each group with 24 mice. MP infection models were established with ripping cultured MP into nasal cavity of mice. Clarithromycin was used at the fifth day in the treatment group. The blood of eyeball and bronchoalveolar lavage fluid were collected at the first, fifth, ninth day in the three groups, and detected IL-18. At the third, seventh, forth, twenty-first, 30th day, one mice was selected to isolate lung tissue, and make pathological section to observe lesion degree. **Results** Pathological section indicated that lung tissue of mice in the control group had no inflammatory response, but lung tissue in the MP infection group had serious inflammatory response, lung tissue in the treatment group at seventh day had mild inflammatory response. Compared with that of the control group, the IL-18 in the serum and bronchoalveolar lavage fluid significantly increased at the first, fifth, ninth day, the differences were statistically significant( $t_{first day} = 10.08, t_{fifth day} = 9.14, t_{ninth day} = 10.59, P < 0.05$ ). The IL-18 levels in the serum and bronchoalveolar lavage fluid at fifth day and ninth day in the treatment group were significantly lower than those of the MP infection group( $t_{fifth day} = 12.96, t_{ninth day} = 17.95, P < 0.05$ ). **Conclusion** MP infection causes IL-18 level increasing, it is effective to treat with clarithromycin, and IL-18 might correlate with pneumonia severity.

**Key words:** mycoplasma pneumonia; interleukin-18; clarithromycin

肺炎支原体(MP)感染引起支气管炎和非典型肺炎, 还可导致一些肺外感染, 如脑膜炎和关节炎等。MP 感染促进细胞因子、炎症介质和各种生长因子的释放, 从而引起炎症和免疫反应<sup>[1]</sup>。细胞因子在 MP 感染的各种细胞类型的分泌过程中可能发挥关键作用。白介素(IL)-18 是多种细胞分泌的细胞因子, 由活化的单核巨噬细胞和树突状细胞产生和分泌, 具有多种免疫调节作用<sup>[2]</sup>。IL-18 的表达与 MP 感染的相关研究鲜有

报道。本研究通过小鼠感染模型检测肺泡灌洗液和血清中 IL-18 的表达, 阐明其与 MP 感染的关系, 为 MP 感染机制的研究提供理论基础。

**1 材料与方法**

**1.1 实验动物** 72 只无特定病原体(SPF)级 BALB/c 小鼠, 5 周龄, (20.0±2.0)g, 雌、雄各 36 只, 均购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物许可证编号为 SCXK(京)2006-009。

\* 基金项目:广西医药卫生科研课题项目(Z2015066)。作者简介:许有才,男,主管检验师,主要从事医学检验研究。△ 通讯作者, E-mail: zhaoshiyuan\_1105@163.com。

72 只小鼠随机分为对照组、MP 感染组和治疗组, 每组各 24 只。

**1.2 仪器与试剂** MK3 酶标仪由上海科华生物工程股份有限公司生产。PPLO 肉汤培养基基于青岛海博生物技术有限公司, MP 菌液购于上海宝米科生物科技有限公司。阿奇霉素购于辉瑞制药有限公司, 小鼠 IL-18 ELISA 试剂盒由 Santa Cruz Biotechnology 公司提供, 批号为 SC11236。

**1.3 方法**

**1.3.1 MP 的培养** PPLO 肉汤培养基 5 份加 1 份胎牛血清配制。取配好的培养基 100 mL, 加 100  $\mu$ L 菌液, 于 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养, 每日观察培养基的颜色变化和液体浑浊变化, 传代培养 3 d。配成  $1 \times 10^{-7}$  CCU/mL 菌液待用。

**1.3.2 动物模型的建立** 对照组小鼠试验开始第 1 天接种无菌生理盐水各 50  $\mu$ L; 第 5、8 和 9 天接种无菌生理盐水各 100  $\mu$ L。MP 感染组、治疗组小鼠第 1 天接种含  $1 \times 10^{-7}$  CCU/mL MP 菌液各 50  $\mu$ L; 第 5、8 和 9 天接种含  $1 \times 10^{-7}$  CCU/mL MP 菌液各 100  $\mu$ L。治疗组小鼠于第 5 天起皮下注射克拉霉素 10 mg/kg(0.2 g 溶于 5% 葡萄糖注射液 0.1 mL, 即 0.05 mL/g), 连续 8 d, 观察各组小鼠表现如小鼠存活、进食、饮水、活动度、精神状态等, 有无竖毛寒战、咳嗽, 口鼻分泌物有无增多。

**1.3.3 支气管肺泡灌洗液** 在 MP 感染模型建立后的第 1、5、9 天, 各组抽取 12 只小鼠分别采用气管插管法, 用 1.0 mL 生理盐水灌洗肺组织 2 次, 回收灌洗液, 记录灌洗液的量。

**1.3.4 小鼠血清的采集** 于 MP 感染模型建立后的第 1、5、9 天各组中抽取 12 只小鼠眼球取血, 室温 30 min 后以 3 000 r/min 离心 10 min, 分离血清置 -20  $^{\circ}$ C 冰箱保存待测。检测前 1 h 将待测标本室温溶解, 严格按说明书检测。

**1.3.5 病理切片标本采集** 分别于接种后 3、7、14、21、30 d 从 3 组中取 5 只小鼠(每次取 1 只), 完整分离心肺组织, 结扎右肺支气管, 迅速取下右中肺叶组织, 置于中性甲醛中, 其他右肺组织放入 EP 管中 -80  $^{\circ}$ C 冻存。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS19.0 软件进行数据处理及统计学分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 小鼠接种情况** 小鼠接种后全部存活, 对照组小鼠进食、饮水和活动度等无明显改变, 状态良好。MP 感染组和治疗组小鼠第 1 天精神状态略差, 活动度降低、进食和排便减少, 未见咳嗽等呼吸系统症状; 第 3 天精神状态有所好转, 鼻部出现少许分泌物; 第 6 天精神状态较差、活动度降低、进食减少、大便略稀、鼻部分泌物基本同前, 并出现咳嗽、竖毛和寒战等症状。第 8 和 9 天接种时, MP 感染组和治疗组与对照组比较, 乙醚麻醉后小鼠口鼻分泌物明显增加、进食与活动度明显降低。与 MP 感染组相比, 治疗组小鼠第 5 天经克拉霉素治疗后精神状态逐渐好转、咳嗽、竖毛等症状逐渐减轻、进食、活动度逐渐恢复。

**2.2 3 组小鼠肺组织病理形态学变化** 病理切片显示, 对照组小鼠肺组织无炎症反应, 肺泡结构均匀清楚; MP 感染组小鼠肺组织出现重度炎症改变, 肺泡出现大量的渗出物, 肺泡间质增宽, 在支气管、血管周围及肺泡间质有大量淋巴细胞和巨噬细胞浸润; 治疗组小鼠第 7 天的肺组织出现中度炎症改变, 可见肺泡间质稍增宽, 在支气管、血管周围有少量淋巴细胞和巨噬细胞。见图 1。

**2.3 3 组小鼠血清和肺泡灌洗液中 IL-18 表达水平** MP 感染组及治疗组在建模后第 1、5、9 天时血清和肺泡灌洗液中 IL-18 表达水平较对照组均明显上升, 差异有统计学意义( $t_{1天} = 10.08, t_{5天} = 9.14, t_{9天} = 10.59, P < 0.05$ )。治疗组第 5、9 天血清和肺泡灌洗液中 IL-18 表达水平均明显低于 MP 感染组, 差异均有统计学意义( $t_{5天} = 12.96, t_{9天} = 7.95, P < 0.05$ )。

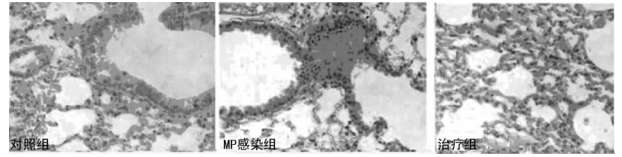


图 1 3 组小鼠肺组织病理学结果 (×400)

表 1 小鼠血清和肺泡灌洗液中 IL-18 表达水平 (ng/L)

组别	n	血清 IL-18	支气管肺泡灌洗液 IL-18
第 1 天			
对照组	12	540.1 ± 89.3	596.3 ± 112.6
MP 感染组	12	693.6 ± 162.8*	760.9 ± 186.5*
治疗组	12	677.3 ± 77.4*	756.2 ± 44.9*
第 5 天			
对照组	12	551.4 ± 85.3	602.8 ± 122.2
MP 感染组	12	756.4 ± 182.7*	812.2 ± 186.3*
治疗组	12	664.2 ± 72.1*△	758.2 ± 168.4*△
第 9 天			
对照组	12	545.5 ± 87.6	612.8 ± 115.8
MP 感染组	12	863.4 ± 223.9*	889.2 ± 195.1*
治疗组	12	602.3 ± 89.3*△	658.7 ± 125.3*△

\*:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; △  $P < 0.05$ , 与 MP 感染组比较。

**3 讨 论**

目前 MP 发病的确切机制仍未清楚。近年来细胞因子在 MP 感染中的作用已得到广泛关注。细胞因子是一组由激活的淋巴细胞、巨噬细胞和其他细胞分泌的小信号分子。细胞因子是体液和细胞介导的免疫反应的重要组成部分, 并由靶细胞膜上特定受体发挥生物学作用, 其重要的功能在于防御细菌、病毒感染以及其他伤害刺激<sup>[3]</sup>。它们可以启动并激活炎症细胞和其他免疫应答, 调节 T 细胞或 B 细胞介导的免疫激活和分化, 以及启动和调节修复过程, 这对炎症消除至关重要<sup>[4]</sup>。机体任何组织对感染或其他伤害引起的炎症反应过程极其复杂, 其目的是达到稳态和组织损伤的恢复<sup>[5]</sup>。但是, 如果调节不适当, 有的炎症可因白细胞、淋巴细胞或胶原沉积等成为慢性的组织损伤。根据它们的性质, 细胞因子分两类, 一类是炎症前细胞因子, 如 IL-1、IL-6、干扰素- $\gamma$  及肿瘤坏死因子; 另一类是抗炎细胞因子, 如 IL-10 和转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ )<sup>[6]</sup>。

IL-18 属于 IL-1 家族成员之一, 它的成熟依赖半胱天冬-1<sup>[7]</sup>。起初命名为干扰素- $\gamma$  诱导因子, 其重要的功能之一是作为靶 T 细胞诱导干扰素- $\gamma$  产生和促进 I 型细胞因子的反应。IL-18 也可以增强 NK 细胞的细胞毒作用<sup>[8]</sup>, 并通过提高细胞表面 FasL 的表达而增强 Fas 介导的细胞毒作用, 参与免疫调节反应, 并通过介导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤血管形成等机制杀伤或抑制肿瘤<sup>[8]</sup>。IL-18 被认为是一种炎症前期的多效能炎症性细胞因子, 主要由活化的单核巨噬细胞和(下转第 3226 页)

multidrug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Georgia [J]. *Inter J Myc*, 2013, 2(2): 73-78.

[2] 王黎霞, 成诗明, 陈明亭, 等. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[J]. *中国防痨杂志*, 2012, 63(8): 485-508.

[3] 中国防痨协会. 结核病诊断细菌学检验规程[J]. *中国防痨杂志*, 1996, 18(3): 127-134.

[4] Yu XL, Wen ZL, Chen GZ, et al. Molecular characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated from south-central in China[J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 2014, 67(4): 291-297.

[5] Yao C, Zhu T, Li Y, et al. Detection of *rpoB*, *katG* and *inhA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Chongqing as determined by microarray[J]. *Clin Mic Inf*, 2010, 16(11): 1639-1643.

[6] 李桂莲. 天津市耐药结核病危险因素及结核分枝杆菌耐药分子机制研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2010.

[7] Lu J, Jiang S, Ye S, et al. Sequence analysis of the drug-resistant *rpoB* gene in the *Mycobacterium tuberculosis* L-form among patients with pneumoconiosis complicated by tuberculosis[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(4): 1325-1330.

[8] Singhal R, Myneedu VP, Arora J, et al. Detection of multi-drug resistance & characterization of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from North-Eastern States of India using GenoType MTBDRplus assay[J]. *Indian J Med Res*, 2014, 140(4): 501-506.

[9] Adikaram CP, Perera J, Wijesundera SS. Geographical profile of *rpoB* gene mutations in rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Sri Lanka[J]. *Mic Drug Res*, 2012, 18(5): 525-530.

[10] Ahmad S, Mokaddas E, Fares E. Characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* iso-

lates from Kuwait and Dubai[J]. *Diagn Mic Inf Dis*, 2002, 44(3): 245-252.

[11] Ramaswamy SV, Dou SJ, Rendon A, et al. Genotypic analysis of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Monterrey, Mexico[J]. *J Med Mic*, 2004, 53(Pt 2): 107-113.

[12] Ben Kahla I, Marzouk M, Henry M, et al. Molecular characterization of isoniazid- and rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Central Tunisia[J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2011, 15(12): 1685-1688.

[13] Bahrmand AR, Titov LP, Tasbiti AH, et al. High-level rifampin resistance correlates with multiple mutations in the *rpoB* gene of pulmonary tuberculosis isolates from the Afghanistan border of Iran[J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(9): 2744-2750.

[14] Albert H, Bwanga F, Mukkada S, et al. Rapid screening of MDR-TB using molecular line probe assay is feasible in Uganda[J]. *BMC Inf Dis*, 2010, 10(10): 41.

[15] Barnard M, Albert H, Coetzee G, et al. Rapid molecular screening for multidrug-resistant tuberculosis in a high-volume public health laboratory in South Africa[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 177(7): 787-792.

[16] Tekwu EM, Sidze LK, Assam JP, et al. Sequence analysis for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from the central region of Cameroon[J]. *BMC Mic*, 2014, 14(1): 113.

(收稿日期: 2015-06-28)



(上接第 3222 页)

树突状细胞产生和分泌, 具有多种免疫调节作用, 已证明 IL-18 与关节炎、肺损伤、肠炎等疾病有关, 且主要通过中和抗体发生作用<sup>[9]</sup>。

本实验采用与人基因结构非常相似的 BALB/c 小鼠作为造模对象, 因为该小鼠对 MP 敏感, 遗传背景清晰。本研究结果表明, 在 MP 感染初期, 小鼠血清、肺泡灌洗液中 IL-18 水平明显升高; 随着病情的发展, 肺组织的持续纤维化, 血清中 IL-18 表达逐步升高。在 MP 感染后期, 血清和肺泡灌洗液的 IL-18 水平增加, 用克拉霉素治疗感染 MP 小鼠后, 小鼠血清和肺泡灌洗液 IL-18 水平明显下降, 与模型组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 肺组织病理检查可见肺部炎症减轻。表明 MP 感染小鼠后其血清和肺泡灌洗液 IL-18 表达与 MP 感染程度有关。

综上所述, IL-18 参与 MP 感染的病理、生理发展, 引起机体损伤。MP 感染后 IL-18 表达下降到一定值可作为判断 MP 感染得到有效控制的标志, 其具体机制有待进一步研究。

参考文献

[1] Jacobs E. *Mycoplasma pneumoniae*: now in the focus of Clinicians and epidemiologists[J]. *Eurosurveillance*, 2012, 17(6): 1-3.

[2] Thanawongnuwech R, Young TF, Thacker BJ, et al. Differential

production of pro-inflammatory cytokines: in vitro PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* co-infection model[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2011, 79(2): 115-127.

[3] Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. *Kuby Immunology*[M]. New York: W H Freeman and Company, 2000.

[4] Toews GB. Cytokines and the lung inflammation[J]. *Am Rev Respir Dis*, 2011, 141(3): 765-788.

[5] Nathan C. Points of control in inflammation[J]. *Nature*, 2012, 420(1): 846-852.

[6] Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. *Kuby Immunology*[M]. New York: W. H. Freeman and Company, 2000.

[7] Pirhonen J, Sareneva T, Kurimoto M, et al. Virus infection activates IL-1 beta and IL-18 production in human macrophages by a caspase-1-dependent pathway[J]. *Immunol*, 1999, 162(11): 7322-7329.

[8] Volin MV, Koch AE. Interleukin-18: a mediator of inflammation and angiogenesis in rheumatoid arthritis[J]. *J Inter Cyt Res*, 2011, 31(10): 745-751.

[9] Dinarello CA. Interleukin-18, a pro-inflammatory cytokine[M]. *Eur Cytokine Netw*, 2012, 11(3): 483-486.

(收稿日期: 2015-07-08)