

IL-3 在肺炎支原体感染小鼠体内的表达及相关机制*

许有才¹, 赵世元² (1. 广西大新县人民医院检验科, 广西大新 532300;
2. 广西医科大学附属民族医院检验科, 南宁 530001)

摘要:目的 研究 IL-3 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 36 只 BALB/c 裸鼠, 随机分为 3 组, 分别为对照组、MP 感染组和克拉霉素组, 每组 12 只。用 PPLO 肉汤培养基 MP, 将成功培养的 MP 鼻腔滴入裸鼠建立 MP 感染模型。治疗组用克拉霉素连续治疗 8 天, 收集并分离血清, 取其肺组织, 收集肺泡灌洗液, 采用 ELISA 法测定小鼠血清和肺泡灌洗液中 IL-3 水平, 肺部组织用中性甲醛固定 HE 染色, 观察 MP 感染小鼠肺的病变程度。结果 成功建立 MP 感染小鼠模型, 病理组织学观察结果显示, MP 感染 BALB/c 小鼠后炎症明显, 克拉霉素治疗 BALB/c 小鼠炎症逐渐减轻。模型组血清和肺泡灌洗液中 IL-3 分别为 96.4 ± 8.3 ng/L 和 60.9 ± 6.5 ng/L, 与对照组比较 (203.1 ± 14.5 ng/L, 96.3 ± 12.6 ng/L), MP 感染组小鼠血清和肺泡灌洗液中 IL-3 水平明显降低 ($t_{血清} = 19.50$, $t_{肺泡} = 17.20$, P 值均 < 0.01), 用克拉霉素治疗后, 小鼠血清和肺泡灌洗液中 IL-3 明显升高, 分别为 175.6 ± 12.5 ng/L 和 85.6 ± 10.2 ng/L, 差异有统计学意义, $t_{血清} = 17.41$, $t_{肺泡} = 14.62$, P 值均 < 0.01)。结论 肺炎支原体感染使小鼠 IL-3 水平降低, 克拉霉素治疗有一定疗效, IL-3 表达可能与 MP 肺炎严重程度有关。

关键词:肺炎支原体; 白细胞介素 IL-3; 克拉霉素

中图分类号: R375.2; R-332 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)04-102-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.04.029

Expressions of Interleukin-3 and Their Mechanisms in Mice Infected by *Mycoplasma Pneumoniae*

XU You-cai¹, ZHAO Shi-yuan²

(1. Department of Clinical Laboratory, Daxin County People's Hospital
in Guangxi, Guangxi Daxin 532300, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the Affiliated
National Hospital of Guangxi Medical University National Hospital, Nanning 530001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expressions of interleukin-3 in BALB/c mice infected by *mycoplasma pneumonia* (MP) and to clarify the relationship between IL-3 and MP infection. **Methods** Total 36 BALB/c mice were randomly divided into control group, MP infection group and clarithromycin treatment group. MP infection models were established with the method of dripping cultured MP into nasal cavity of mice. ELISA method was used to assay the levels of IL-3 in the serum of the mice and bronchoalveolar lavage fluid in various groups. The lung tissue was fixed in formalin for sections, HE staining was performed for the observation of histological changes. **Results** The MP-infected mouse models were established successfully and MP strains were dripped into the respiratory system of mice. As showed in histopathological observation results, significantly increased after MP infection and then gradually decreased after clarithromycin treatment. The ELISA results showed that the level of serum and bronchoalveolar lavage fluid of IL-3 of the mice in MP infection group were 96.4 ± 8.3 ng/L and 60.9 ± 6.5 ng/L. Compared with the control group (203.1 ± 14.5 ng/L, 96.3 ± 12.6 ng/L), serum and bronchoalveolar lavage fluid of mice infected with MP in IL-3 levels were significantly lower ($t_{serum} = 19.50$, $t_{balf} = 17.20$, $P < 0.01$), and after treatment with clarithromycin, serum and bronchoalveolar lavage fluid of IL-3 significantly increased, respectively (175.6 ± 12.5 ng/L and 85.6 ± 10.2 ng/L, $t_{serum} = 17.41$, $t_{balf} = 14.62$, $P < 0.01$), the difference was statistically significant. **Conclusion** IL-3 levels were decreased in *mycoplasma pneumonia* mice. Clarithromycin treatment had effect on *mycoplasma pneumonia* infection. The expression level IL-3 may be related to the severity degree of MP infection.

Keywords: *mycoplasma pneumonia* (MP); interleukin-3; clarithromycin

肺炎支原体 (*mycoplasma pneumonia*, MP) 是一种较小的非寄生细菌, 它缺乏最典型的细菌细胞壁肽聚糖。MP 感染引起支气管炎和非典型肺炎, 还会导致一些肺外症状如脑膜炎/脑炎和关节炎。

儿童和青少年为易感人群。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^[1]。研究显示白细胞介素 (interleukin-3, IL-3) 能够促进 T 细胞和 B 细胞的增殖和分

* 基金项目: 广西医疗卫生科研课题 (Z2014029)。

作者简介: 许有才 (1968—), 男, 主管检验师, 主要从事医学免疫研究及检验工作, Tel: 13768810313, E-mail: dxwsj2008@163.com。

通讯作者: 赵世元 (1965—), 男, 主任技师, 主要从事药物开发研究, Tel: 13978647518, E-mail: zhaoshiyuan_1105@163.com。

化,参与免疫应答^[2]。IL-3 的表达与 MP 感染相关未见报道。在本研究通过小鼠感染模型检测肺泡灌洗液和血清中 IL-3 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 实验材料

1.1.1 实验动物:36 只 SPF 级 BALB/c 小鼠,5 周龄,20±2 g,雌雄各半,SPF 级,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:SCXK(京)2006-009。

1.1.2 主要试剂:PPLO 肉汤培养基购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-3ELISA 试剂盒:上海逸哈生物科技专业供应 ELISA 试剂盒,货号:SU11236。

1.1.3 仪器:酶标仪,上海科华生产,型号:MK3。

1.2 实验方法

1.2.1 MP 的培养:按 PPLO 肉汤培养液:胎牛血清=5:1 配制。取配好的培养液 100 ml 加 100 μ l 菌液于 37℃,5% (v/v) CO₂ 培养,每日观察培养液的颜色变化和液体浑浊变化,传代培养三天,配成 1×10^{-7} CCU/ml 菌液待使用。

1.2.2 动物模型的建立:36 只小鼠随机分为对照组、MP 感染组和抗生素治疗组,对照组小鼠第 0 天接种无菌生理盐水各 50 μ l;第 5,8 和 9 天接种无菌生理盐水各 100 μ l。MP 感染组、抗生素治疗组小鼠第 0 天接种含 1×10^{-7} CCU/ml MP 菌液各 50 μ l;第 5,8 和 9 天接种含 1×10^{-7} CCU/ml MP 菌液各 100 μ l。治疗组小鼠于第 9 天起皮下注射克拉霉素 10 mg/kg(0.2 g 溶于 5 ml/dl 葡萄糖注射液 0.1 ml,即 0.05 ml/g),连续 8 天,观察各组小鼠表现如小鼠存活、进食、饮水、活动度、精神状态差,有无竖毛寒战、咳嗽、口鼻分泌物有无增

多。

1.2.3 支气管肺泡灌洗液:在 MP 感染模型建立后的第 8 天,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。

1.2.4 小鼠血清的采集:各组小鼠眼球取血,室温 30 min 后以 3 000 r/min 离心 10 min,分离血清置 -20℃ 冰箱保存待测。

1.2.5 IL-3 检测:检测前 1 h 将待测标本室温溶解,严格按说明书检测。

1.3 统计学分析 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理,各组小鼠血清中 IL-3 水平用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。

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 感染组和抗生素治疗组小鼠第 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。于第 8 天和第 9 天接种时乙醚麻醉后小鼠口鼻分泌物明显增加、进食与活动度明显低于对照组克拉霉素治疗组。小鼠经阿奇霉素治疗后精神状态逐渐好转,咳嗽、竖毛等症状逐渐减轻、消失,进食、活动度逐渐恢复。

2.2 各组小鼠肺组织病理形态学 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,在支气管和血管周围和肺泡间质有大量淋巴细胞和巨噬细胞浸润;克拉霉素治疗组小鼠第 7 天的肺组织出现中度炎症改变:可见肺泡间质稍有增宽,在支气管、血管周围有少量淋巴细胞和巨噬细胞,见图 1。

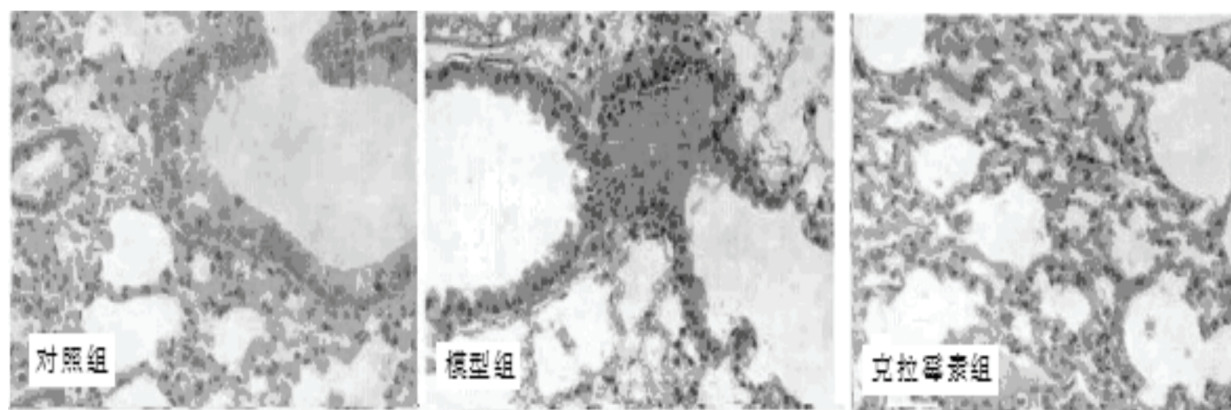


图 1 各实验组 BALB/c 小鼠肺组织病理学结果($\times 400$)

2.3 各组小鼠血清和肺泡灌洗液中 IL-3 表达水平 MP BALB/c 小鼠模型小鼠血清和肺泡灌洗

液中 IL-3 表达明显下降,与对照组比较差异有统计学显著性意义($t_{\text{血清}} = 19.50$, $t_{\text{肺泡}} = 17.20$, $P < 0.01$);用克拉霉素治疗感染小鼠 8 天,小鼠血清和肺泡灌洗液中 IL-3 表达水平明显升高,与模型组比较,差异有统计学显著性意义($t_{\text{血清}} = 17.41$, $t_{\text{肺泡}} = 14.62$, $P < 0.01$),结果见表 1。

表 1 小鼠血清和肺泡灌洗液中 IL-3 表达水平 [$n=12$, ($\bar{x} \pm s$) ng/L]

组别	血清	支气管肺泡灌洗液
对照组	203.1 \pm 14.5	96.3 \pm 12.6
模型组	96.4 \pm 8.3	60.9 \pm 6.5
克拉霉素组	175.6 \pm 12.5	85.6 \pm 10.2

3 讨论 目前肺炎支原体(MP)发病的确切机制仍未清楚。近年来细胞因子在 MP 感染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、巨噬细胞和某些其它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,其重要的功能在宿主防御细菌、病毒感染以及其它伤害刺激^[3]。它们可以启动并激活炎症细胞和其它免疫应答,调节 T 细胞或 B 细胞的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^[4]。机体任何组织对于感染或其它伤害引起炎症反应过程极其复杂,其目的达到稳态和组织损伤的恢复^[5]。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- γ 以及肿瘤坏死因子;另一类是抗炎细胞因子,如 IL-10 和转化生长因子 β (TGF- β)^[6]。

IL-3 是由多种类型的细胞产生,包括 TH 细胞、NK 细胞、肥大细胞,具有显著的免疫调节作用,IL-3 的主要功能是促进造血干细胞增殖和分化,它主要通过增殖 T 细胞对 IL-2 的敏感性来实现的,在 IL-2 的作用下,促进 B 细胞的增殖和分化,并诱导、激活 B 细胞分泌免疫球蛋白^[7]。它也可以刺激肥大细胞组胺分泌^[3]。因为 IL-3 发展与生存及作用很可能与肥大细胞和血液嗜碱性粒细胞功能相关,它可以参与免疫反应、寄生虫和过敏反应^[8]。IL-3 的分泌受各种应激如手术应激、创伤、出血、环境应力(渗透压冲击,紫外辐射,热休克)以及甚至精神障碍等因素的调节^[9]。IL-3 在肺炎支原体感染中的作用尚不明确。Hoek 等^[10]研究发现高浓度的 MP 感染的啮齿动物血液中肥大细胞反应较低,而 IL-3 mRNA 表达急增。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。研究结果表明,MP 感染小鼠后,其肺泡灌洗液和血清的 IL-3 水平明显降低,与正常对照组比较差异有统计学显著性意义($P < 0.01$);用克拉霉素治疗感染 MP 小鼠后,小鼠肺泡灌洗液和血清 IL-3 水平明显升高,与模型组比较差异有统计学显著性意义($P < 0.01$)。表明 IL-3 的表达与 MP 感染程度有关。

综上所述,IL-3 参与 MP 感染的病理生理发展,引起机体损害。MP 感染后 IL-3 出现高表达可作为判断 MP 感染预后指标之一。

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 proinflammatory cytokines; in vitro PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* co-infection model [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2011, 79(1/2): 115-127.
- [3] Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. Immunology [M]. New York: W. H. Freeman and Company, 2010.
- [4] Toews GB. Cytokines and the lung [J]. Eur Respir J Suppl, 2011(34): 3s-17s.
- [5] Nathan C. Points of control in inflammation [J]. Nature, 2012(420): 846-852.
- [6] 宋星宇, 车广华, 高航, 等. 肿瘤坏死因子 α 在肺炎支原体感染小鼠主要脏器和血清中的表达及其相关机制 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2013, 39(6): 1195-1200.
- [7] Song XY, Che GH, Gao H, et al. Expressions of tumor necrosis factor- α in main organs and serum of mice infected by *Mycoplasma pneumoniae* and their mechanisms [J]. Journal of Jilin University (Medicine Edition), 2013, 39(6): 1195-1200.
- [8] Olmos G, Prieto A, Herraez A, et al. Quantitation of apoptosis induction by etoposide or hydroxyurea in mouse interleukin 3-dependent lymphoma cells [J]. In Vivo, 2012, 19(2): 455-464.
- [9] Lantz CS, Boesiger J, Song CH, et al. Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites [J]. Nature, 1998, 392(6671): 90-93.
- [10] Bessler H, Bergman M, Salman H. Interleukin-3 and stress [J]. Biomed Pharmacother, 2000, 54(6): 299-304.
- [11] Hoek KL, Cassell GH, Duffy LB, et al. *Mycoplasma pneumoniae*-induced activation and cytokine production in rodent mast cells [J]. J Allergy Clin Immunol, 2002, 109(3): 470-476.

收稿日期: 2015-01-06

修回日期: 2015-02-05