

黏附分子 CD44 和 ICAM-1 在肺炎支原体感染 BALB/c 小鼠体内表达及相关机制*

邓世群¹, 赵世元², 张帮献² (1. 广西南宁市西乡塘区石埠卫生院检验科, 南宁 530008;
2. 广西医科大学附属民族医院检验科, 南宁 530001)

摘要:目的 研究黏附分子 CD44 和细胞间黏附分子 1(ICAM-1)在肺炎支原体(MP)感染的 BALB/c 小鼠模型的表达, 阐明其与 MP 感染的关系。方法 采用 MP 鼻腔滴入法建立 BALB/c 小鼠 MP 模型, 观察 MP 小鼠肺部的病理变化。采用 ELISA 法测定 5, 8, 15, 20 和 30 天 MP 感染小鼠血清和肺泡灌洗液中黏附分子 CD44 和 ICAM-1 的表达水平。结果 与模型组比较, MP 感染 BALB/c 小鼠后肺部炎症明显, MP 感染 BALB/c 小鼠后其血清和肺泡灌洗液中黏附分子 CD44 和 ICAM-1 的表达明显上调(t_5 天血清 CD44 = 53.64 ng/L, t_5 天 BALF CD44 = 144.3 ng/L; t_5 天血清 ICAM-1 = 73.72 ng/L, t_5 天 BALF ICAM-1 = 165.06 ng/L, 均 P 值 < 0.000 ; t_8 天血清 CD44 = 40.86 ng/L, t_8 天 BALF CD44 = 21.31 ng/L; t_8 天血清 ICAM-1 = 30.57 ng/L, t_8 天 BALF ICAM-1 = 19.61 ng/L, 均 P 值 < 0.000)。结论 MP 感染使小鼠黏附分子 CD44 和 ICAM-1 的表达水平升高, 用替加环素治疗 MP 小鼠后 CD44 和 ICAM-1 表达下调, CD44 和 ICAM-1 表达上调可能与 MP 肺炎的严重程度有关。

关键词:肺炎支原体; 黏附分子; CD44; 细胞间黏附分子-1

中图分类号: R-332 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2018)01-091-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2018.01.022

Expression of Adhesion Molecules CD44 and ICAM-1 in *Mycoplasma Pneumoniae* Infected BALB/c Mice and the Related Mechanisms

DENG Shi-qun¹, ZHAO Shi-yuan², ZHANG Bang-xian²

(1. Department of Clinical Laboratory, Guangxi Nanning Xixiangtang District Shibei Hospital, Nanning 530008, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the Affiliated National Hospital of Guangxi Medical University National Hospital, Nanning 530001, China)

Abstract: Objective To study the expression of adhesion molecules CD44 and ICAM-1 in BALB/c mice infected with *Mycoplasma pneumoniae* (MP) and elucidate the relationship between MP and infection. Methods BALB/c mouse MP model was established by MP nasal instillation, and the pathological changes of lung in MP mice were observed. The expression levels of adhesion molecules CD44 and ICAM-1 in serum and bronchoalveolar lavage fluid of mice infected with 5, 8, 15, 20 and 30d MP were determined by ELISA. Results Compared with the model group, MP infected BALB/c mice after lung inflammation was significantly up-regulated MP, the expression in BALB/c mice infected with the serum and bronchoalveolar lavage fluid in CD44 and adhesion molecule ICAM-1 (t_5 d serum CD44 = 53.64 ng/L, t_5 d BALF CD44 = 144.3 ng/L; t_5 d serum ICAM-1 = 73.72 ng/L, t_5 d BALF ICAM-1 = 165.06 ng/L, all $P < 0.000$; t_8 d serum CD44 = 40.86 ng/L, t_8 d BALF CD44 = 21.31 ng/L; t_8 d serum ICAM-1 = 30.57 ng/L, t_8 d BALF ICAM-1 = 19.61 ng/L, all $P < 0.000$). The *Mycoplasma pneumoniae* infection increased the expression levels of adhesion molecules CD44 and ICAM-1 in mice. Conclusion After MP mice were cured, the expression of CD44 and ICAM-1 was down regulated, and the up regulation of CD44 and ICAM-1 expression might be related to the severity of MP pneumonia.

Keywords: mycoplasma pneumonia (MP); adhesion molecule; CD44; ICAM-1

肺炎支原体(*mycoplasma pneumonia*, MP)感染主要引起支气管炎和非典型肺炎。有关 MP 感染机制还不是很明了。研究表明, MP 感染刺激巨噬细胞、肥大细胞、平滑肌细胞和上皮细胞等细胞产生相关细胞因子和黏附分子刺激气道, 使气道发生持续性炎症, 加速气道重建^[1~3]。细胞黏附分子(cell adhesion molecules CAMs)是一类能介导细胞与细胞、细胞与外基质相互黏附的糖蛋白, 在炎

症反应中, 介导白细胞与内皮细胞的黏附及跨内皮转移^[4]。有关细胞黏附分子在肺炎支原体肺炎的表达国内报道尚少。本研究通过小鼠感染模型检测血清和肺泡灌洗液(BALF)中黏附分子 CD44 和 ICAM-1 的表达, 并探讨 CD44 和 ICAM-1 的表达与 MP 感染的相关性, 为 MP 感染机制的研究提供理论基础。

1. 材料和方法

* 基金项目: 广西医疗卫生科研课题(2015066)。

作者简介: 邓世群(1964—), 男, 学士, 主管检验师, 主要从事医学检验工作及研究, E-mail: 652582452@qq.com。

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

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物: BALB/c 小鼠, SPF 级, 北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物许可证号: SCXK(京)2016-009。BALB/c 小鼠 5 周龄, 20 ± 2 g, 雌雄各半。小鼠在广西中医药大学动物实验中心饲养。

1.1.2 主要试剂: PPLO 肉汤培养基, 青岛海博生物技术有限公司提供; MP 菌液, 上海宝米生物科技有限公司提供; 替加环素, Wyeth Pharmaceuticals, Madison, NJ 提供; CD44 和 ICAM-1 试剂盒购于美国 R&D 公司。

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: MP 在每瓶 20 ml 的 SP4 肉汤于 37℃ 5%(v/v) CO₂ 培养 72 h 后, 肉汤变成橙色, 倒出上清液, 加新鲜的 SP4 肉汤 2 ml 到烧瓶, 收集贴壁存活 MP。将 MP 配成 10⁸ ~ 10⁹ CFU/ml, 加制霉菌素 (50 U/ml) 和氨苄青霉素 (1 mg/ml), 样本保存在 -80℃ 备用。

1.2.2 动物模型的建立: 实验方案由广西医科大学实验动物伦理委员会审查, 所有的动物按照实验动物的护理和使用指南处理。新购的 BALB/c 小鼠在新环境下适应 3 天。将 90 只 BALB/c 小鼠随机分为对照组、模型组和替加环素治疗组, 每组 30 只。对照组小鼠第 1 天、5 天和 8 天皮下注射无菌生理盐水 50 μl。模型组、替加环素治疗组小鼠第 1 天滴鼻接种含 1 × 10⁷ CCU/ml MP 菌液各 50 μl; 第 5 天、8 天接种含 1 × 10⁷ CCU/ml MP 菌液各 100 μl。替加环素治疗组小鼠于第 9 天起首次皮下注射替加环素 10 mg/kg (0.2 g 溶于 5 g/ml 葡萄糖注射液 0.1 ml, 即 0.05 ml/g), 以后每天按 5 mg/kg 连续 6 天皮下注射。模型组在相同时间注射等体积的生理盐水。用药期间观察各组小鼠的存活率、进食量、饮水量、活动量、精神状态、是否有竖毛、寒战、咳嗽, 口、鼻分泌物数量是否增加等。在小鼠 5, 8, 15, 20 和 30 天, 各组分别取 5 只小鼠, 用乙酰丙嗪氯胺酮按 5 mg/kg 腹腔注射麻醉小鼠后用 25 号针头将 500 μl SP4 肉汤注入肺部, 随后又将该液抽吸到注射器, BALF 离心吸上清并储存在 -80℃ 冰箱; 小鼠眼眶取血, 30 min 后离心分离血清, 血清储存在 -80℃ 冰箱。肺标本用 10 ml/dl 福尔马林溶液固定进行组织学评价。

1.2.3 指标检测

1.2.3.1 MP 小鼠情况观察: 小鼠接种 MP 后, 每天观察小鼠存活情况、进食量、饮水量、活动度、排便以及有无咳嗽等症状。

1.2.3.2 肺组织 HPS 病理评分和肺实质评分: 肺

组织经 10 ml/dl 福尔马林固定, 石蜡包埋切片, 经苏木精-伊红染色。肺组织病理学评分 (HPS) 由专业病理医师双盲镜检。HPS 分级基于细支气管支气管浸润数目, 细支气管支气管管腔渗出程度, 血管周围浸润百分率和实质性肺炎严重程度 (中性粒细胞肺泡浸润); 该 HPS 系统分值从 0 ~ 26, 分数越高代表肺组织炎性浸润程度越高。实质性肺炎的得分是基于分级的中性粒细胞肺泡浸润 (评分: 0. 没有实质性肺炎; 3. 片状实质性肺炎; 5. 片状融合实质性肺炎)。

1.2.3.3 各组小鼠 BALF 中细胞因子的检测: 采用 ELISA 法测定血清和 BALF 中 CD44, ICAM-1 等黏附分子的水平, 严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.3 统计学分析 实验数据采用 SPSS13.0 统计软件进行处理, 计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠接种情况 BALB/c 小鼠接种 MP 后第 1 天, 精神状态略差, 活动减少, 进食量和排便量减少, 无咳嗽等呼吸道症状; 第 3 ~ 5 天小鼠鼻腔出现少许分泌物并出现咳嗽; 小鼠第 8 天出现乏力, 精神状态较差, 活动减少, 进食减少, 大便稍稀, 鼻腔分泌物增多, 出现咳嗽、竖毛、发冷等症状, 说明造模成功。MP 小鼠经替加环素治疗 6 天后, 小鼠的精神状态逐渐好转, 咳嗽寒颤等症状逐渐减少, 进食和活动量逐渐增加。

2.2 各组肺组织 HE 染色和肺组织病理评分 PM 感染小鼠 5 天, 小鼠肺组织 HPS 评分和实质性肺炎评分明显升高, 到 8 天达到高峰; 用替加环素治疗肺炎支原体肺炎小鼠, 小鼠肺组织 HPS 评分和实质性肺炎评分明显降低, 与模型组比较差异有统计学意义 (HPS 评分 P = 0.035, 实质性肺炎评分 P = 0.004; 尤其是治疗 6 天后小鼠肺组织 HPS 评分和实质性肺炎评分降低非常明显与模型组比较差异有统计学意义 (HPS 评分 P = 0.002, 实质性肺炎评分 P = 0.025)。

2.3 各组小鼠血清和肺泡灌洗液 (BALF) 黏附分子 CD44 和 ICAM-1 表达水平 见表 1。BALB/c 小鼠感染 MP 5 天、8 天, 其血清和 BALF 中 CD44 和 ICAM-1 明显上升, 与对照组比较差异有统计学意义 (均 P < 0.000)。造模成功后, 用替加环素治疗感染 MP 小鼠 6 天, MP 小鼠血清和 BALF 中 CD44 和 ICAM-1 表达与模型组比较明显下调, 与模型组比较差异有统计学意义 (均 P < 0.000), MP 小鼠用替加环素治疗 12 天, 其血清和

BALF 中 CD44 和 ICAM-1 表达与模型组比较明显下调(均 $P<0.000$)。MP 小鼠用替加环素治疗 21 天,其血清和 BALF 中 CD44 和 ICAM-1 表达

与模型组比较明显下调差异有统计学意义(均 $P<0.000$)。

表 1 各组小鼠血清和肺泡灌洗液中 CD44 和 ICAM-1 表达水平($n=5$)

组 别	CD44(ng/L)				ICAM-1(ng/L)			
	血清	<i>t</i>	BALF	<i>t</i>	血清	<i>t</i>	BALF	<i>t</i>
对照组 5 天	54.5±7.6		98.5±10.3		146.1±8.6		285.2±20.3	
模型组 5 天	163.4±28.9	53.6	286.5±52.9	144.3	501.7±28.6	73.72	978.1±60.5	165.06
对照组 8 天	55.1±7.3		99.6±11.5		148.3±8.2		286.8±20.5	
模型组 8 天	186.5±30.2	40.86	320.3±58.2	21.31	652.5±72.5	30.57	1 102.3±78.6	19.61
对照组 14 天	55.8±7.8		102.7±10.5		148.9±9.2		289.1±25.2	
模型组 14 天	210.5±62.3	24.20	365.4±35.4	16.34	622.5±58.6	13.36	958.6±68.7	34.01
替加环素治疗组	105.6±19.5		199.3±10.3		483.6±49.8		654.1±65.2	
对照组 21 天	56.3±8.2		103.7±10.6		149.3±9.3		98.5±10.3	
模型组 21 天	196.5±41.2	68.45	335.9±65.7	16.07	532.5±65.1	16.11	876.5±87.2	68.54
替加环素治疗组	94.6±15.2		163.6±38.9		421.6±48.2		589.6±65.2	
对照组 30 天	57.2±8.3		102.4±10.3		146.1±8.6		98.5±10.3	
模型组 30 天	185.4±32.1	51.74	290.5±56.5	45.55	483.6±56.2	29.14	604.5±76.2	80.18
替加环素治疗组	68.5±10.5		125.8±31.5		335.4±45.7		401.3±52.4	

3 讨论 肺炎支原体(MP)是非典型肺炎的病原体,儿童和青少年容易引起其他呼吸道感染如支气管炎、毛细支气管炎、喉炎等。病人咳嗽、发烧和头痛可能持续数周,恢复缓慢。据估计,在社区获得性肺炎中肺炎支原体肺炎约占 30%。肺炎支原体肺炎四季发病并小规模流行,婴幼儿上呼吸道感染为主,青少年以支气管炎和肺炎为主,成年以肺炎多见。

肺炎支原体肺炎其发病机制尚不清楚,目前认为入侵的支原体经呼吸道上皮细胞黏附、局部宿主细胞损伤和过度的不适当的免疫反应似乎有助于肺炎支原体感染的发病机制。MP 感染刺激巨噬细胞、肥大细胞、平滑肌细胞、上皮细胞等细胞产生相关细胞因子和黏附分子刺激气道,使气道发生持续性炎症,加速气道重建。MP 对人类宿主呼吸道上皮的黏附是呼吸道上皮细胞定植和随后诱导疾病的先决条件^[5,6]。

黏附分子(adhesion molecules, AM)是由细胞产生的并在细胞表面存在,能介导细胞和细胞、细胞和基质之间相互融合的一类分子。黏附分子在炎症性炎症和免疫调节过程中起重要作用;它可参与呼吸道炎症反应,作为病毒受体介导病毒感染,调节机体免疫反应和免疫调节。在肺炎发作时,肺毛细血管内皮细胞分泌的特异黏附分子促进气道黏膜炎症细胞的聚集;而细胞因子或炎症介质反馈作用启动这些粘附分子^[7]。

黏附分子 CD44 是一种细胞表面跨膜糖蛋白

分子的未分类的黏附分子,其基本功能是参与细胞和基质之间、细胞与细胞的特异性黏连过程。CD44 分子参与细胞间的信号转导,参与肿瘤的生长、侵袭、转移,在炎症反应过程中 CD44 表达上调,与透明质酸(hyaluronan, HA)配体紧密结合^[7]。哮喘急性发作使肺部血管内皮细胞分泌 CD44 增加并释放入血,促进嗜酸性粒细胞向气道趋化可增高气道反应性、促进淋巴细胞及其他炎症因子募集,加重支气管的痉挛程度及喘息症状^[9]。

黏附分子-1,又称细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule, ICAM-1),属于免疫球蛋白超家族。ICAM-1 是炎症反应过程中的极为重要组成部分;ICAM-1 与白细胞表面的巨噬细胞分化抗原-1(macrophages differentiation antigen-1, Mac-1)和相应受体淋巴细胞功能相关抗原-1(lymphocyte function associated antigen-1, LFA-1)结合,介导炎症细胞渗出,参与炎症反应^[10];ICAM-1 表达上调使炎症细胞在气道募集和黏附,触发炎症反应^[11];此外,ICAM-1 还参与传递胞外-胞内信号,使胞内蛋白磷酸化、诱导蛋白激酶和转录因子活化,从而产生大量的生物学活性。博来霉素(bleomycin, BLM)上调大鼠肺纤维化模型血清中黏附分子 ICAM-1,与其配体结合促使嗜酸性粒细胞向气道内趋化,参与了肺泡炎症反应、气道高反应性及气道结构重建^[12]。

本实验采用与人基因结构相似的 BALB/c 小鼠作为造模对象, BALB/c 小鼠的遗传背景为近交

系, 亲近繁殖, 遗传基因更纯, 个体差异小, 对 MP 敏感。本实验研究结果表明, 在 MP 感染 5~8 天, 小鼠血清和 BALF 中 CD44, ICAM-1 水平明显升高 ($P < 0.01$), MP 感染 14 天, 小鼠血清和 BALF 中 CD44, ICAM-1 水平升高到最高值 ($P < 0.01$), 随着病情的发展, 肺组织的持续纤维化, 小鼠血清和 BALF 中 CD44, ICAM-1 水平持续下降; 用替加环素治疗 MP 感染小鼠后, 小鼠血清和 BALF 中 CD44, ICAM-1 水平明显下降, 与模型组比较差异非常显著 ($P < 0.01$), 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 BALF 中 CD44, ICAM-1 水平与 MP 感染程度有关。其作用机制可能是当肺炎支原体感染时, 入侵的支原体经呼吸道上皮细胞黏附, CD44 调节细胞游走, 可通过促进淋巴细胞在肺泡和肺间质内浸润, 引起外周血淋巴细胞数量及功能异常、淋巴细胞亚群间比例失衡, 并上调炎症因子 IGF-1, TNF- α , IL-1 β , IL-8 加剧炎症反应程度, 嗜酸性粒细胞在气道过度聚集引起多种炎症介质表达上调, 其中 PAF 水平增高可致细支气管收缩。ICAM-1 机制可能与其配体融合促使嗜酸性粒细胞向气道内趋化、浸润并释放 PAF, 参与炎症反应。

综上所述, MP 感染 BALB/c 小鼠后其血清和 BALF 中黏附分子 CD44, ICAM-1 表达上调, CD44, ICAM-1 可能参与 MP 感染的病理生理过程, 引起机体炎症。MP 感染后 CD44, ICAM-1 表达下调可能成为判断 MP 感染预后指标之一。

参考文献:

- [1] 许有才, 赵世元. IL-3 在肺炎支原体感染小鼠体内的表达及相关机制[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(4): 102-104.
Xu YC, Zhao SY. Expressions of interleukin-3 and their mechanisms in mice infected by *Mycoplasma pneumoniae*[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(4): 102-104.
- [2] 许有才, 赵世元, 陈秀荣. 肺炎支原体感染对 BALB/C 小鼠体内 IL-18 表达的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(22): 3221-3222, 3226.
Xu YC, Zhao SY, Chen XR. Influence of *Mycoplasma pneumoniae* infection on the expression of IL-18 in BALB/C mice[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2015, 36(22): 3221-3222, 3226.
- [3] 李腾达, 龙曙萍, 徐贵霞, 等. CD26/DPP4 对隐球菌脑膜炎患者 CD4⁺T 细胞及相关细胞因子的影响与临床意义[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(5): 38-41.
Li TD, Long SP, Xu GX, et al. Affection of CD26/DPP4 on CD4⁺T cells and relative cytokines in patients with cryptococcal meningitis and its clinical significance[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(5): 38-41.
- [4] 邹丽萍, 王伟, 张艳丽, 等. 黏附分子 CD62P 和 CD44 在毛细支气管炎患儿外周血中的表达及意义[J]. 中国当代儿科杂志, 2015, 17(11): 1200-1203.
Zou LP, Wang W, Zhang YL, et al. Expression and significance of adhesion molecules CD62P and CD44 in peripheral blood of infants with bronchiolitis[J]. Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2015, 17(11): 1200-1203.
- [5] Yamasaki Y, Yamada H, Nozaki T, et al. Unusually high frequency of autoantibodies to PL-7 associated with milder muscle disease in Japanese patients with polymyositis/ dermatomyositis[J]. Arthritis Rheum, 2006, 54(6): 2004-2009.
- [6] Richardson CC, Dromey JA, McLaughlin KA, et al. High frequency of autoantibodies in patients with long duration type 1 diabetes[J]. Diabetologia, 2013, 56(11): 2538-2540.
- [7] Lin HW, Lin SC. Environmental factors association between asthma and acute bronchiolitis in young children-a perspective cohort study[J]. Eur J Pediatr, 2012, 171(11): 1645-1650.
- [8] Murai T. Lipid raft-mediated regulation of hyaluronan-CD44 interactions in inflammation and cancer[J]. Front Immunol, 2015, 6: 420.
- [9] 李 羚, 杨 莉, 唐 珩, 等. 黏附分子 CD44 在哮喘气道炎症反应中的作用[J]. 中国当代儿科杂志, 2009, 11(2): 142-145.
Li L, Yang L, Tang H, et al. Role of CD44 on airway inflammatory response in rats with asthma[J]. Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2009, 11(2): 142-145.
- [10] 都兴华, 苏泽轩, 丁泓文, 等. CD44 在大鼠肾缺血再灌注损伤中的表达及意义[J]. 中华实验外科杂志, 2015, 32(6): 1259-1260.
Dou XH, Su ZX, Ding HW, et al. CD44 expression and significance in rats with renal ischemia-reperfusion injury[J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2015, 32(6): 1259-1260.
- [11] Li Z, Burns AR, Smith CW. Lymphocyte function-associated antigen-1-dependent inhibition of corneal wound healing[J]. Am J Pathol, 2006, 169(5): 1590-1600.
- [12] 王玉红. 黏附分子 CD31, CD54 在博来霉素致大鼠肺纤维化中的表达[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2010.
Wang YH. Expression of adhesion molecules CD31 and CD54 in bleomycin induced pulmonary fibrosis in rats[D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2010.

收稿日期: 2017-08-02

修回日期: 2017-09-29