

分枝杆菌噬菌体 Chy3 对人气道上皮细胞 16HBE 生长及功能的影响

熊 欣,甘易玲,徐 莉,江莉莎,张 莉,郭述良
(重庆医科大学附属第一医院呼吸内科,重庆 400016)

【摘要】目的:探讨不同滴度的分枝杆菌噬菌体 Chy3 对人气道上皮细胞 16HBE 生长及功能的影响。**方法:**不同滴度噬菌体 Chy3 作用于人气道上皮细胞后,采用倒置显微镜观察细胞生长形态变化,CCK-8 法检测细胞存活率,流式细胞仪检测细胞凋亡率,ELISA 法检测细胞上清液中细胞因子分泌水平,RT-PCR 和 Western blot 分别检测上皮细胞黏蛋白 MUC5AC mRNA 和蛋白表达水平。**结果:**不同滴度噬菌体 Chy3 作用于人气道上皮细胞一段时间后,细胞的生长形态、存活率、凋亡率、细胞因子分泌水平以及黏蛋白 MUC5AC 表达与正常组比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论:**分枝杆菌噬菌体 Chy3 无论高低滴度对体外培养人气道上皮细胞生长和功能均无明显影响,有较好的安全性。

【关键词】分枝杆菌噬菌体;人气道上皮细胞;安全性;白细胞介素-6/白细胞介素-8;MUC5AC

【中图分类号】R329.2*8

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-10-30

Effects of mycobacteriophage Chy3 on growth and function of human airway epithelial cell 16HBE

Xiong Xin, Gan Yiling, Xu Li, Jiang Lisha, Zhang Li, Guo Shuliang

(Department of Respiratory and Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the effects of different titers of mycobacteriophage Chy3 on growth and function of human airway epithelial cell 16HBE. **Methods:** Inverted microscope was used to observe cellular morphology after applying different titers of mycobacteriophage Chy3. Cell viability and apoptosis rates were analyzed by CCK-8 assay and flow cytometry. Additionally, the secretion levels of IL-6/IL-8 in cell culture supernatant were detected by ELISA. RT-PCR and Western blot were performed to detect MUC5AC mRNA and protein expression. **Results:** There was no difference in cellular morphology, cell viability, apoptosis rate, secretion levels of IL-6/IL-8, MUC5AC mRNA and protein expression between cells treated with different titers of Chy3 and normal controls ($P>0.05$). **Conclusion:** Neither high nor low titer of mycobacteriophage Chy3 exerts effects on growth and function of human airway epithelial cell 16HBE in vitro, therefore mycobacteriophage has better security.

【Key words】mycobacteriophage; human airway epithelial cells; security; interleukin-6/interleukin-8; MUC5AC

近年来,全球耐药结核菌的数量不断增多,尤其是耐多药结核病(multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB)和广泛耐药结核病(extensively drug-resistant TB, XDR-TB)的出现使一线结核病药物无法达到满意的治疗效果。1951年, Gardner 和 Weiser 首次分离出分支杆菌噬菌体,此后相继发现了对结核分枝杆菌有裂解作用的分支杆菌噬菌体 D29、

TM4^[1],已被国外研究者注册过专利。本课题组前期分离和鉴定了新的具有裂解结核分枝杆菌能力的噬菌体,命名为 Chy3,并初步发现其可能具有复苏休眠结核菌的作用,有望成为具有自主知识产权的新型复苏和裂解结核分枝杆菌的临床生物制剂。已有研究表明噬菌体到达肺部最有效的途径是通过雾化和滴鼻方式,呼吸道为其必经之路。噬菌体本身是一种病毒,通过呼吸道给药是否会损伤气道上皮细胞,其生物安全性是应用于临床前必须解决的问题。本实验旨在观察噬菌体 Chy3 对体外培养人气道上皮细胞生长及功能的影响,初步评估噬菌体通过气道给药的生物安全性。

作者介绍:熊 欣, Email: Guoshuliang111@yeah.net,
研究方向:呼吸系统疾病的基础与临床研究。

通信作者:郭述良, Email: guosl999@sina.com。

基金项目:国家“十二·五”科技重大专项基金资助项目(编号: 2012ZX10003009);国家临床重点专科专项经费资助项目(卫办医政函[2012]949号)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000271.html>

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

人气道上皮细胞 16HBE 由广州医科大学呼吸疾病研究所惠赠, 分枝杆菌噬菌体 Chy3 为本实验室培养, 胎牛血清购自 Gibco 公司, DMEM 培养基、胰蛋白酶、PBS 均购自 Hyclone 公司, CCK-8 购自广州奕源生物公司, Annexin V/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自凯基公司, 人白细胞介素 (interleukin, IL)-6、IL-8 ELISA 试剂盒购自博士德公司, RNAiso Plus、逆转录试剂盒、Tag 酶、DNA maker 均购自 TaKaRa 公司, MUC5AC、GAPDH 引物合成自上海生物工程有限公司, 兔抗人 MUC5AC 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司, 山羊抗兔 IgG 二抗购自中杉金桥公司。

1.2 方法

1.2.1 人气道上皮细胞株 16HBE 培养 16HBE 细胞株在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中, 于 37℃ 5%CO₂ 孵箱常规培养, 倒置显微镜下定时观察细胞生长状态, 隔天换液 1 次, 待细胞长满培养瓶的 80%~90% 左右, 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。实验所用均为处于对数生长期良好的细胞。

1.2.2 倒置显微镜观察细胞生长形态的变化 取对数生长期的 16HBE 细胞消化后制成 1×10^5 个/ml 细胞悬液, 接种于 6 孔细胞培养板中, 每孔 1 ml。待细胞过夜贴壁用显微镜拍照后, 实验组加入噬菌体 Chy3 使每孔终浓度分别为 10^0 和 10^7 pfu/ml, 终体积为 2 ml, 以噬菌体缓冲液为阴性对照孔放入 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱培养, 分别于 24、48 h 后倒置显微镜拍照观察噬菌体 Chy3 对细胞生长形态的影响。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞增殖活性 取对数生长期的 16HBE 细胞消化后制成 1×10^5 个/ml 细胞悬液, 接种于 96 孔培养板中, 每孔 100 μ l。待过夜贴壁后实验组加入噬菌体 Chy3 使每孔终浓度分别为 10^0 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 pfu/ml, 终体积为 200 μ l, 以噬菌体缓冲液为阴性对照孔, 均设置 3 个复孔, 放入 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱培养。分别干预 12、24、36、48、72 h 后, 每孔加入 20 μ l CCK-8 溶液后放入 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱孵育 1.5 h, 用酶标仪于 450 nm 波长处检测吸光度 (absorbance, A) 值。细胞存活率 = $(A_{\text{给药组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{正常组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。其中给药组为实验干预组, 正常组为未做任何干预组, 空白组为单纯加入 CCK-8 溶液所检测 A 值。

1.2.4 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡比例变化 将对数生长期细胞悬液以 5×10^4 个/孔接种于 24 孔细胞培养板中, 细胞贴壁后实验组加入噬菌体 Chy3 使每孔终浓度分别为 10^0 、 10^7 、 10^5 pfu/ml, 终体积为 1 ml, 阴性对照组加入相应的噬菌体缓冲液, 均设置 3 个复孔。放入细胞培养箱中培养 48 h 后, 用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 加入含血清的培养基终止消化后, 用枪头反复吹打使细胞脱落收集于 1.5 ml 的 EP 管中, 1 000 r/min 离心 8 min, 用 PBS 洗涤 2 次。用 500 μ l 的 Binding Buffer 悬浮细胞, 加入 5 μ l Annexin V-FITC 混匀后再加入 5 μ l 碘化丙啶混匀, 室温避光反应 10 min, 即刻用于流式细胞仪检测。

1.2.5 ELISA 法检测细胞 IL-6、IL-8 分泌水平 将对数生长期细胞悬液以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔细胞培养板中, 细胞

贴壁后实验组加入噬菌体 Chy3 使每孔终浓度分别为 10^0 、 10^7 、 10^5 pfu/ml, 终体积为 2 ml, 将噬菌体缓冲液组设为阴性对照组, LPS 组设为阳性对照组 (LPS 为革兰阴性菌细胞壁脂多糖, 终浓度为 10 mg/L), 干预 48 h 后收集细胞上清液, 3 000 r/min, 离心 20 min, 取上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书操作, 测上清液细胞因子 IL-6、IL-8 的含量。

1.2.6 RT-PCR 半定量检测细胞 MUC5AC mRNA 的表达 将对数生长期细胞悬液以 3×10^5 个/瓶接种于培养瓶中, 细胞贴壁后实验组加入噬菌体 Chy3 使每孔终浓度分别为 10^0 、 10^7 、 10^5 pfu/ml, 终体积为 3 ml, 将噬菌体缓冲液组设为阴性对照组, LPS 组设为阳性对照组 (LPS 终浓度为 10 mg/L), 干预 48 h 后按说明书提取细胞总 RNA, 并按照 Takara 逆转录试剂盒说明书合成 cDNA, -20℃ 保存备用。引物为: MUC5AC (F: 5'-TCAACGGAGACTGCGAGTACAC-3', R: 5'-CTTGATGGCCTTGGAGCA-3', 扩增长度为 130 bp), GAPDH (F: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3', R: 5'-TCCACCCTGTTGC-TGTA-3', 扩增长度为 491 bp)^[2]。内参和目的基因的 PCR 反应分管进行, PCR 体系如下: 由 Taq DNA 聚合酶、dNTP 混合物、MgCl₂ 以及反应缓冲液配成的 2 倍浓度的混合物 25 μ l, cDNA 4 μ l, 引物 (F) 2 μ l, 引物 (R) 2 μ l, ddH₂O 17 μ l, 共 50 μ l 体系。反应条件: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 30 s, 60℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 60 s, 30 次循环, 72℃ 再延伸 5 min 将扩增产物 110 V 下行 2% 琼脂糖凝胶电泳。应用凝胶成像系统分析扫描, 以 MUC5AC/GAPDH 条带扫描量比值为 MUC5AC mRNA 在 16HBE 细胞中的相对表达量。

1.2.7 Western blot 检测细胞 MUC5AC 蛋白的表达 将对数生长期细胞悬液以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔细胞培养板中, 细胞贴壁后实验组加入噬菌体 Chy3 使每孔终浓度分别为 10^0 、 10^7 、 10^5 pfu/ml, 终体积为 2 ml, 将噬菌体缓冲液组设为阴性对照组, LPS 组设为阳性对照组 (LPS 终浓度为 10 mg/L), 干预 48 h 后用缓冲液处理收集蛋白, 测量蛋白浓度, 根据蛋白浓度计算所需上样量, 保证每样品孔蛋白量一致, 电泳后转膜至 PVDF 膜, 根据蛋白分子量裁剪 PVDF 膜, 置入相应一抗 (抗体稀释浓度为 1:1 000) 4℃ 孵育过夜, 洗膜后置入二抗 (抗体稀释浓度为 1:1 000) 孵育 2 h, 蛋白印记检测仪中曝光, 计算光密度值。以 MUC5AC/GAPDH 条带光密度比值为 MUC5AC 蛋白在 16HBE 细胞中的相对表达量。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析, 所有数据均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组数据间比较采用单因素方差分析, LSD-*t* 检验; 两组间数据比较采用独立样本 *t* 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 Chy3 对人气道上皮细胞生长形态的影响

高滴度 (10^9) 和中滴度 (10^7) 噬菌体 Chy3 作用人气道上皮细胞一段时间后, 和正常组比较对细胞生长形态影响不明显, 细胞呈卵圆形, 铺路石样改变, 分布均匀, 贴壁牢固, 包膜光滑完整, 边界清晰。如图 1 所示。

表 1 CCK-8 法检测 16HBE 细胞增殖存活率结果
Tab.1 Viability of 16HBE cells detected by CCK-8 assay

分组 (pfu/ml)	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h	$F_{处理}$	$P_{处理}$	
1×10^9	98.637 ± 1.217	98.760 ± 0.850	98.267 ± 1.581	98.997 ± 0.956	98.816 ± 0.744	2.791	0.053	
1×10^8	98.790 ± 2.254	98.387 ± 0.492	99.156 ± 1.006	99.213 ± 0.418	99.060 ± 1.185			
1×10^7	98.203 ± 0.522	98.710 ± 0.710	98.353 ± 0.916	98.967 ± 1.199	99.033 ± 1.198			
1×10^6	99.837 ± 1.276	99.020 ± 0.767	98.370 ± 1.518	98.933 ± 1.477	98.901 ± 0.679			
1×10^5	99.740 ± 1.804	99.110 ± 2.023	98.523 ± 1.481	99.100 ± 0.989	98.763 ± 0.537			
噬菌体缓冲液	99.263 ± 0.900	98.247 ± 0.970	98.800 ± 0.416	98.920 ± 0.732	99.097 ± 0.621			
正常组	100	100	100	100	100			
$F_{时间}$		0.551					$F_{交互} = 0.327$	$P_{交互} = 0.998$
$P_{时间}$		0.699						

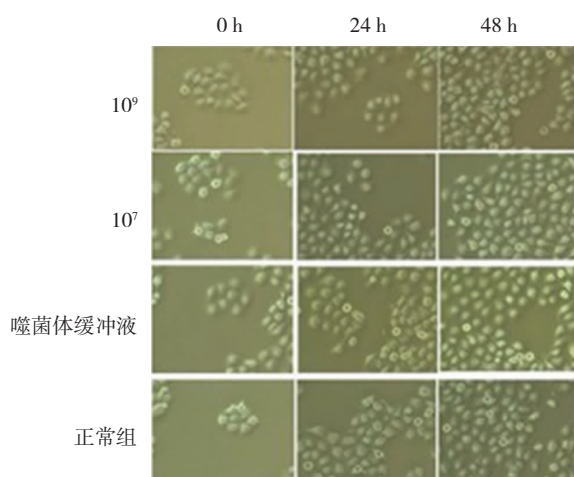


图 1 倒置显微镜观察 16HBE 细胞生长形态的变化 (100 ×)

Fig.1 16HBE cell morphology observed by inverted microscope (100 ×)

2.2 Chy3 对人气道上皮细胞增殖活性的影响

不同滴度的噬菌体作用人气道上皮细胞 16HBE 不同时间 12、24、36、48、72 h 后, 各组细胞的存活率如下表 1、图 2 所示, 采用重复测量方差分析, 作用时间对人气道上皮细胞增殖存活率无明显影响 ($F=0.551, P=0.699$); 噬菌体滴度对人气道上皮细胞增殖存活率亦无明显影响 ($F=2.791, P=0.053$); 作用时间和作用浓度之间不存在交互作用 ($F=0.327, P=0.998$)。说明噬菌体 Chy3 不同滴度及不同干预时间对体外培养的人气道上皮细胞增殖活性无明显影响。

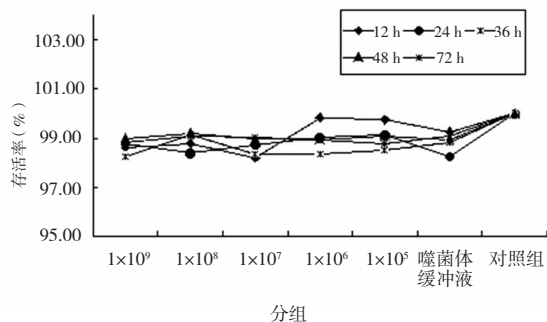


图 2 CCK-8 法检测 16HBE 细胞增殖存活率结果

Fig.2 Viability of 16HBE cells detected by CCK-8 assay

2.3 Chy3 对人气道上皮细胞凋亡率的影响

流式细胞仪检测细胞凋亡结果显示: 高滴度 (10^9)、中滴度 (10^7)、低滴度 (10^5) 组和噬菌体缓冲液阴性组比较凋亡率无明显差别, 各实验组和正常组凋亡率比较差异也无统计学意义 ($P>0.05$) (表 2、图 3), 说明噬菌体 Chy3 对人气道上皮细胞凋亡无明显影响。

表 2 Annexin V/PI 双染法检测 16HBE 细胞凋亡率结果

Tab.2 Apoptosis of 16HBE cells detected by V/PI double staining

分组	$\bar{x} \pm s (\%)$
1×10^9	9.92 ± 0.21
1×10^7	9.31 ± 0.71
1×10^5	9.13 ± 0.65
噬菌体缓冲液	9.67 ± 0.66
正常组	10.11 ± 0.32
F 值	1.662
P 值	0.234

2.4 Chy3 对人气道上皮细胞 IL-6、IL-8 分泌水平的影响

用高 (10^9)、中 (10^7)、低 (10^5) 滴度 Chy3 处理人气道上皮细胞 16HBE 48 h 后, 由表 3 结果显示, 实验组细胞上清液中 IL-6、IL-8 分泌水平较正常组比较均无明显差异 ($P>0.05$), LPS 阳性对照组与正常组比较细胞因子水平明显升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

2.5 Chy3 对人气道上皮细胞 MUC5AC mRNA 及蛋白表达的影响

高 (10^9)、中 (10^7)、低 (10^5) 滴度 Chy3 实验组作用人气道上皮细胞 48 h 后, MUC5AC mRNA 及蛋白相对表达量与噬菌体缓冲液组比较无明显差异 ($P>0.05$), 与正常组比较差异也无统计学意义 ($P>0.05$), 但 LPS 阳性对照组与正常组比较表达量明显升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。表明噬菌体 Chy3 对人气道上皮细胞 MUC5AC mRNA 及蛋白表达均无明显影响。见表 4、图 4、图 5。

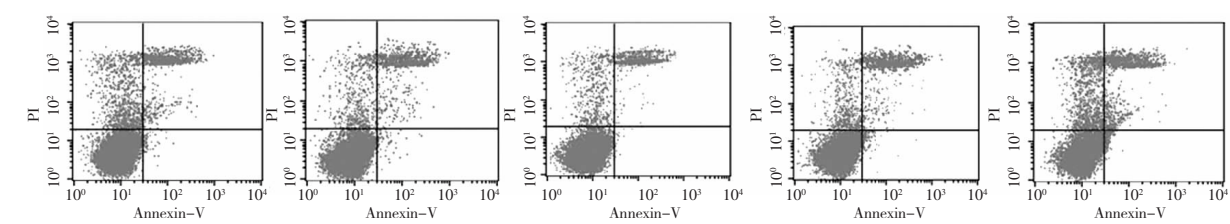


图 3 噬菌体 Chy3 作用 16HBE 细胞 48 h 流式图

Fig.3 Flow chart of 16HBE cell after phage Chy3 treatment for 48 h

表 3 16HBE 细胞上清中细胞因子分泌水平结果及 16HBE 细胞 MUC5AC mRNA 完全组、蛋白相对表达量的测定结果				
Tab.3 Secretion levels of cytokines in 16HBE cell supernatant detected by ELISA				
分组	IL-6	IL-8	MUC5AC/GAPDH mRNA	MUC5AC/GAPDH 蛋白
1 × 10 ⁹	61.68 ± 1.39 ^a	1.513 ± 0.008 ^a	15.65 ± 1.100 ^a	61.75 ± 1.453 ^a
1 × 10 ⁷	62.26 ± 0.73 ^a	1.520 ± 0.012 ^a	15.57 ± 1.199 ^a	63.78 ± 1.534 ^a
1 × 10 ⁵	61.94 ± 2.26 ^a	1.523 ± 0.013 ^a	15.48 ± 1.211 ^a	61.91 ± 0.454 ^a
噬菌体缓冲液	60.98 ± 1.33	1.515 ± 0.008	15.79 ± 1.168	62.20 ± 1.191
正常组	63.30 ± 1.08	1.522 ± 0.009	15.59 ± 1.115	63.73 ± 0.414
F 值	1.034	0.559	0.030	2.401
P 值	0.436	0.698	0.998	0.119

注:a,与正常组比较,P>0.05;b,与正常组比较 P<0.05

表 4 正常组和 LPS 组 16HBE 细胞上清中细胞因子分泌水平结果及 16HBE 细胞 MUC5AC mRNA 完全组、蛋白相对表达量的测定结果				
Tab.4 Relative expression of MUC5AC mRNA and protein in 16HBE cells				
分组	IL-6	IL-8	MUC5AC/GAPDH mRNA	MUC5AC/GAPDH 蛋白
正常组	63.30 ± 1.08	1.522 ± 0.009	15.590 ± 1.115	63.730 ± 0.414
LPS组	86.73 ± 3.75 ^b	1.719 ± 0.013 ^b	18.920 ± 1.102 ^b	74.010 ± 1.947 ^b
t 值	10.413	20.895	3.678	8.948
P 值	0.000	0.000	0.021	0.001

注:a,与正常组比较,P>0.05;b,与正常组比较 P<0.05

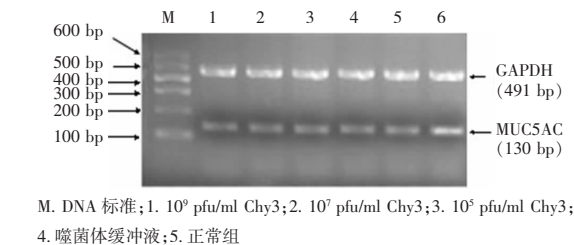


图 4 16HBE 细胞 MUC5AC mRNA 的表达

Fig.4 Expression of MUC5AC mRNA in 16HBE cells

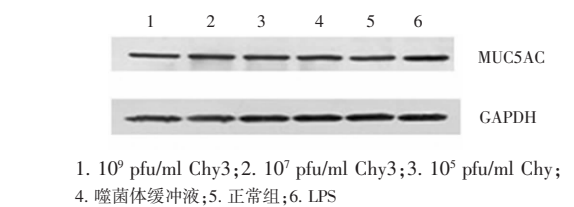


图 5 16HBE 细胞 MUC5AC 蛋白的表达

Fig.5 Expression of MUC5AC protein in 16HBE cells

3 讨 论

细菌耐药问题逐渐加剧,在急需开发新型抗菌药物、新技术和新方法的压力下,噬菌体因其具有裂解宿主菌能治疗感染性疾病的能力而被人们重新重视。噬菌体比抗生素具有更多潜在的优势:高度特异性、低耐药性及低毒副作用等^[3-6]。噬菌体本身是一种病毒,且变异性大,某些种类的噬菌体还携带有毒力基因,因此噬菌体用于临床结核病治疗前其安全性必须解决。早在 20 世纪已有将噬菌体直接用于结核病患者安全性的报道^[7],当时因内毒素蓄积引起受试者发热等不良反应而中止了实验,这也可能与当时噬菌体制剂制备条件和技术限制等有关,使噬菌体对结核病的疗效和安全性问题未得到解决。Merril 等^[8]后来研究发现,鼠伤寒沙门氏菌噬菌体 Argol、Argo3 粗制颗粒注射小鼠后会引起小鼠产生临床症状(毛发不顺等)甚至死亡,分析注

射液发现其内毒素水平为 5×10^5 EU/ml, 但经氯化铯密度梯度离心纯化后可显著降低内毒水平, 小鼠没有发生任何不良反应。近年来高健奇^[9]、郭亭亭^[10]等分别用小鼠超声雾化吸入结核分枝杆菌噬菌体 D29 和分枝杆菌噬菌体鸡尾酒 (D29+33D+TM4) 评价噬菌体对肺组织的影响, 均具有较好的安全性。由杨文慧^[11]和梁梅^[12]的研究表明噬菌体到达肺部最理想的途径是通过气道给药, 其中气道是噬菌体到达肺部的必经之路, 因此噬菌体对气道的生物安全性也是其用于临床之前急待解决的问题。但目前国内外对噬菌体与气道上皮细胞的相互作用研究甚少, 还未见噬菌体对气道上皮细胞安全性的相关报道。分枝杆菌噬菌体 Chy3 是本课题组前期分离和鉴定的新的具有裂解结核分枝杆菌能力的噬菌体, 属长尾噬菌体科, 基因组全长为 40 070 bp, G+C=66.86%, 基因平均长度为 667 bp, 基因密度为 0.97, GL33、GL34 分别编码 LysB 和 LysA, 基因组中未发现 holin 基因和编码阻遏蛋白的基因, 即 Chy3 为裂解性噬菌体。其头部为多面立体对称, 最佳 MOI 为 1.1×10^{-4} 。其宿主谱较广, 能裂解 MS mc2155、结核菌标准株 H37Rv、大部分临床分离耐药结核菌株、耐药牛结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌^[13], 是有望成为具有自主知识产权的新型裂解结核分枝杆菌的临床生物制剂。本实验是首次探讨新结核分枝杆菌噬菌体 Chy3 体外对人气道上皮细胞生长及功能的影响。

作为第一道天然屏障, 起着抵抗外来病原菌的作用, 故也最容易受病毒、细菌等侵犯。它不仅具有物理屏障功能, 还有化学屏障功能, 受刺激或者应激反应时能分泌多种细胞因子 (如 IL、肿瘤坏死因子、趋化因子等)^[14]和黏蛋白, 从而参与局部炎症反应过程, 引起气道阻塞。IL-6 在正常气道上皮细胞分泌极少, 但在受刺激后分泌表达增加, 主要功能是促进 T、B 细胞增殖分化, 参与炎症反应, 导致机体发热等。IL-8 属于趋化因子, 主要功能是趋化并激活中性粒细胞, 趋化嗜碱性粒细胞及 T 细胞, 刺激血管生成, 其中 MUC5AC 是最主要的黏蛋白^[17]。

本实验研究结果显示, 从低滴度到高滴度 Chy3 分别作用人气道上皮细胞不同时间, 对细胞的生长形态和活性不会产生明显影响, 表明 Chy3 对人气道上皮细胞的物理屏障影响不大。不同滴度 Chy3 作用气道上皮细胞一段时间后对其炎症因子的释放和黏蛋白的表达也无明显影响, 表明 Chy3 并不会刺激气道上皮细胞产生炎症反应和过度分泌黏液蛋白, 对上皮细胞的化学屏障基本无明显影响。初步判定噬菌体 Chy3 体外对人气道上皮细胞有较好的安全。由于结核病是一个长疗程治疗过程, 故噬菌体对结核病的治疗是反复、多次、长时间的给药方式, 并且体外培养细胞与人正常气道紧密结构存在

明显差异性, 因此噬菌体对气道组织是否一定安全, 有待进一步动物实验。

综上所述, 新结核分枝杆菌噬菌体 Chy3 作用于人气道上皮细胞一段时间后, 对其生长及功能无明显影响, 表明 Chy3 对气道上皮细胞有较好的安全性, 为下一步动物实验和以后成为具有自主知识产权的治疗结核病的新型生物制剂奠定了一定的基础。

参 考 文 献

- [1] Ford ME, Sarkis GJ, Belanger AE, et al. Genome structure of mycobacteriophage D29: implications for phage evolution[J]. J Mol Bio, 1998, 279(1): 143-164.
- [2] Wang X, Li Q, Zhou X, et al. Triiodothyronine represses MUC5AC expression by antagonizing Sp1 binding to its promoter in human bronchial epithelial HBE16 cells[J]. J Biomed Biotechnol, 2012(2012): 648170.
- [3] 赵庆友, 朱瑞良. 噬菌体制剂的研究现状及发展前景[J]. 中国兽药杂志, 2010, 44(7): 40-43.
- [4] Sheehan MM, Garcia JL, Lopez R, et al. Analysis of the camlytic domain of the lysin the lactococcal bacteriophage Tuc2009 by chimeric gene assembling[J]. FEM Mic Lett, 1996, 140(1): 23-28.
- [5] Loeffler JM, Nelson D, Fischetti VA. Rapid killing of streptococcus pneumoniae with a bacteriophage cell wall hydrolase[J]. Science, 2001, 294(5549): 2170-2172.
- [6] Fischetti VA. Novel method to control pathogenic bacteria on human mucous membranes[J]. Ann N Y Acad Sci, 2003(987): 207-214.
- [7] Sugita K, Tsuda T, Sakakibara T, et al. Studies on the bacteriophage susceptibility against mycobacterium tuberculosis. 1. the difference in lysis range of mycobacteriophage propagated on various host strains[J]. Yokohama Med Bull, 1965, 16(6): 229-235.
- [8] Merrill CR, Biswas B, Carlton R, et al. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(8): 3188-3192.
- [9] 高健齐. 小鼠超声雾化吸入结核分枝杆菌噬菌体 D29 生物安全性的初步研究[J]. 医学综述, 2010, 16(15): 2397-2399.
- [10] 郭亭亭. 分枝杆菌噬菌体鸡尾酒制剂应用于耐药结核病治疗的探索性研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2012: 98-120.
- [11] 杨文慧. 分枝杆菌噬菌体 D29 应用于耐药结核病治疗的探索性研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2009: 37-53.
- [12] 梁梅. 噬菌体 D29 不同途径给入在小鼠体内的代谢分布[J]. 中国新药与临床杂志, 2012(5): 272-276.
- [13] 刘平. 分枝杆菌噬菌体的生物学特性及基因组学研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2012: 38-44.
- [14] 谢尔凡, 扬宗成. 气道上皮细胞与炎症介质[J]. 中国实验与临床免疫学杂志, 1995(4): 47-48.
- [15] 陈慰峰. 医学免疫学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 67.
- [16] Burvall K, Palmberg L, Larsson K. Effects by 8-bromo-cyclicAMP on basal and organic dust-induced release of interleukin-6 and interleukin-8 in A549 human airway epithelial cells[J]. Respir Med, 2003, 97(1): 46-50.
- [17] Zhong T, Perelman JM, Kolosov VP, et al. MiR-146a negatively regulates neutrophil elastase-induced MUC5AC secretion from 16HBE human bronchial epithelial cells[J]. Mol Cell Biochem, 2011, 358(1-2): 249-255.

(责任编辑: 冉明会)