

肺炎链球菌荚膜多糖加重 C57BL/6 小鼠中耳炎的炎症应答和中耳组织损伤

项云,周爱娥,王维,王磊,黄益飞,
金春芳,王子萌,尹一兵,何於娟

(重庆医科大学检验医学院、临床检验诊断学教育部重点实验室,重庆 400016)

【摘要】目的:研究肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, *S.pn*)荚膜多糖(capsular polysaccharide, CPS)对 C57BL/6 小鼠急性中耳炎的炎症应答和组织损伤的作用。**方法:**首先通过同源重组的方式构建 TIGR4 Δ *cps* 菌株,然后经鼓膜穿刺,分别接种 5 μ l 耳的 TIGR4 和 TIGR4 Δ *cps* 于 C57BL/6 小鼠的双侧中耳腔,对照组采用相同方法接种等体积无菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)。观察小鼠发病情况,分别于感染后 1、3、5 d 制备中耳组织切片,HE 染色观察中耳组织损伤及炎性细胞浸润变化,同时收集中耳灌洗液(middle ear lavage fluids, MELF),检测 MELF 中细菌载量、炎性细胞数量和细胞因子含量。**结果:**成功构建了 TIGR4 Δ *cps* 菌株。与 TIGR4 组相比, TIGR4 Δ *cps* 组小鼠中耳上皮的损伤更轻,中性粒细胞募集减少(第 1 天时 $P=0.004$;第 3 天时 $P=0.000$;第 5 天时 $P=0.000$), MELF 中细胞因子 TNF- α 和 IL-6 水平更低(第 1 天时 $P=0.076$ 、 $P=0.000$;第 3 天时 $P=0.002$ 、 $P=0.003$;第 5 天时 $P=0.000$ 、 $P=0.000$),但细菌清除更快(第 1 天时 $t=2.659$, $P=0.029$;第 3 天时 $t=3.717$, $P=0.006$)。**结论:**在 *S.pn* TIGR4 致小鼠急性中耳炎过程中, CPS 具有加重炎症应答和组织损伤,并导致宿主对 *S.pn* 的清除减慢的作用。

【关键词】肺炎链球菌;荚膜多糖;急性中耳炎

【中图分类号】R764.21

【文献标志码】A

【收稿日期】2015-03-01

Streptococcus pneumoniae capsular polysaccharide aggravate inflammation and tissue injury in acute otitis media of C57BL/6 mice

Xiang Yun, Zhou Aie, Wang Wei, Wang Lei, Huang Yifei,

Jin Chunfang, Wang Zimeng, Yin Yibing, He Yujuan

(Key Laboratory of Diagnostic Medicine Founded by Ministry of Education,
College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To study the effects of *Streptococcus pneumoniae* (*S.pn*) capsular polysaccharide (CPS) on acute otitis media of C57BL/6 mice. **Methods:** TIGR4 Δ *cps* strain was built by homologous replacement construction. Wild TIGR4 (5 μ l/ear) or TIGR4 Δ *cps* was respectively inoculated into bilateral ear cavity by puncturing the tympanic membrane; an equal amount of sterile phosphate buffered saline (PBS) was injected into the control group. The status of mice was detected every day; inflammation of middle ear epithelia that deal with wild TIGR4 or TIGR4 Δ *cps* was observed through HE staining on 1, 3, 5 d after inoculation. The role of CPS in cell recruitment and bacterial clearance was observed by cell counts and clonal formation unit counts, and the inflammatory cytokines in the middle ear lavage fluid (MELF) were measured to compare the level of inflammation. **Results:** TIGR4 Δ *cps* mutant strain was constructed successfully. Compared with those of TIGR4 group, mice inoculated with TIGR4 Δ *cps* showed lighter damage of middle ear epithelial, lower level of TNF- α and IL-6 in MELF (1 d: $P=0.076$, $P=0.000$; 3 d: $P=0.002$, $P=0.003$; 5 d: $P=0.000$, $P=0.000$), fewer recruited neutrophils (1 d: $P=0.004$; 3 d: $P=0.000$; 5 d: $P=0.000$), and faster bacterial clearance (1 d: $t=2.659$, $P=0.029$; 3 d: $t=3.717$, $P=0.006$). **Conclusion:** In the mice model of *S.pn* induced acute otitis media, CPS exacerbates inflammation and tissue injury, and delays clearance of bacteria.

【Key words】 *Streptococcus pneumoniae*; capsular polysaccharide; acute otitis media

作者介绍:项云, Email: xiangyuncqh@163.com,

研究方向:微生物与免疫。

通信作者:何於娟, Email: yujuanhe@cqmu.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:csfc81373151);重庆市自然科学基金资助项目(编号:cstc2012jjA0035);重庆市教委科学技术研究资助项目(编号:KJ130313)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150617.2236.006.html>
(2015-06-17)

肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, *S.pn*)是导致社区获得性肺炎、菌血症、脑膜炎和急性中耳炎的最常见病原菌^[1]。荚膜多糖(capsular polysaccharide, CPS)作为 *S.pn* 最关键的毒力因子之一^[2],在 91 种血清型中普遍存在,在细菌黏附、定植、抵抗宿主固有免疫和适应性免疫方面均有重要作用^[3-5]。

急性中耳炎是儿童最常见的感染性疾病之一, *S.pn* 的感染率高达 27%~52%^[6]。但是,一直以来,受限于小鼠中耳炎模型构建困难, *S.pn* 致中耳炎的病理机制尚不十分清楚。迄今,关于 *S.pn* CPS 的研究主要致力于肺炎、脑膜炎等模型中,在中耳炎致病中的作用国内外尚无报道。Shainheit 等^[7]研究发现, *S.pn* 的 CPS 在不同的解剖部位,会因环境因素的影响和自身生存的需要而呈现不同的表达水平,故其在不同的疾病模型中致病机理也可能不同。因此,在成功构建了 C57BL/6 小鼠中耳炎动物模型^[8]的前提下,进一步研究 CPS 在急性中耳炎中的致病机制显得十分必要。

为了研究 CPS 在 *S.pn* 性中耳炎发病过程中的作用,本研究采用基因同源重组技术成功构建了 TIGR4 Δ *cps* 菌株,通过比较野生菌和 *cps* 缺陷菌在致 C57BL/6 小鼠急性中耳炎中的炎症应答反应,探讨其在 *S.pn* 性中耳炎发病过程中的作用。

1 材料及方法

1.1 实验动物

健康、耳廓反射灵敏的 SPF 级 C57BL/6 小鼠(由重庆医科大学动物中心提供),雌雄各半,6~8 周龄,体质量 16~18 g,经耳窥镜检查证实无自发性中耳炎。小鼠随机分为 TIGR4 组、TIGR4 Δ *cps* 组和 PBS 对照组,每组 40 只,实验前适应性饲养 1 周,并经耳窥镜检查证实无外耳道及中耳感染。

1.2 菌株

TIGR4、R6 均购于英国国家典型培养物保藏中心(NCTC), D39 Δ *cps* 为本室前期构建^[9], TIGR4 Δ *cps* 菌株由本室通过同源重组技术构建。

1.3 主要试剂

DNA 提取试剂盒(Tiangen 公司),胶回收试剂盒(Invitrogen 公司),哥伦比亚血平板(重庆庞通公司),半合成培养基 C+Y(实验室按标准方法配制),配制 Western blot 所需试剂(上海生工生物有限公司),兔抗 *S.pn* 荚膜一抗(丹麦血清研究所),HRP 标记的山羊抗兔二抗(中杉金桥),苏木素-伊红染色液(上海宏兹实业有限公司),白细胞介素 6(interleukin 6, IL-6)和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)

ELISA 检测试剂盒(美国 Bio-Rad 公司)。根据 GenBank 中登录的 NC_008533.1(313231..323668),即参考 *cps2A-2H* 及其上下游基因序列设计引物 P1、P2,四环素抗性基因 *tet* 的上、下游引物参照文献^[10]报道的序列,由生工生物工程有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 基因引物序列

Tab.1 Primer sequence of gene

引物名称	引物序列
P1	5' - GTCAAATAAGCGTCTGGATTATTAG -3'
P2	5' - ATATTAATATTTTTCTCTGTTTGAT -3'
<i>tet</i>	上游:5' - CCGGGCCCCAAAATTTGTTTGAT -3' 下游:5' - TCCCAAAGTTGATCCCTAACGA -3'

1.4 TIGR4 Δ *cps* 缺陷菌的构建及鉴定

1.4.1 TIGR4 Δ *cps* 缺陷菌的构建 参照文献^[11-12]方法,以本课题组前期构建的 D39 Δ *cps* (以四环素抗性基因 *tet* 同源替代 *cps2A-2H*)为模板,以 P1、P2 引物 PCR 扩增含 *tet* 基因的目的片段,胶回收该片段,1 份用于转化,1 份用于生工生物工程有限公司测序。取 -80 °C 保存的 TIGR4 菌株 200 μ l 培养于 CTM 培养基[10 ml C+Y 中含 1 mmol/L 的 CaCl₂ 和 2 g/L 的牛血清白蛋白(BSA)]中,当细菌达到一定密度(A_{550 nm} = 0.08~0.10)时,加入感受态刺激肽(competence-stimulating peptide, CSP),37 °C 孵育 10 min,加入含 *tet* 基因的目的片段,混匀,冰上放置 30 min,37 °C 孵育 100 min,然后铺于含四环素(2.5 mg/L)的血平板上,37 °C 孵育培养 24~48 h,挑取血平板上的转化菌落,于含四环素(2.5 mg/L)的 C+Y 培养基中增菌,保存并提取 DNA。缺陷菌株的 PCR 鉴定:分别以 TIGR4、TIGR4 Δ *cps* 的基因组 DNA 为模板,用 *tet* 引物扩增 *tet* 基因(1 400 bp);用 P1、P2 扩增目的基因(2 438 bp)。

1.4.2 Western blot 检测 CPS 的表达水平 将培养至 A_{600 nm} 为 0.4~0.5 的 R6、TIGR4、TIGR4 Δ *cps* 菌液各 30 ml 离心集菌,裂解后,产物经 8%SDS-PAGE 分离,转移至聚偏二氟乙烯膜上,于 5%的 BSA 37 °C 封闭 2 h;兔抗 *S.pn* CPS 一抗(1:2 000 稀释),4 °C 孵育过夜;0.05%TBST 洗膜 4 次,每次 15 min;在 HRP 标记的羊抗兔二抗(1:5 000 稀释)中,37 °C 孵育 1 h;0.05% TBST 洗膜 4 次,每次 15 min;Enlight TM Western 特异发光检测试剂盒化学发光成像。

1.4.3 透射电镜观察荚膜形态变化 将 R6、TIGR4、TIGR4 Δ *cps* 菌株,分别接种于哥伦比亚血平板,37 °C,5%CO₂ 孵箱中培养 12 h,集菌,4 °C,9 000 g 离心 10 min,弃上清,缓慢加入 1.3 ml 4%戊二醛固定液,送重庆医科大学电镜中心进行透射电镜检查。

1.5 *S.pn* 细菌悬液的制备

TIGR4 和 TIGR4 Δ *cps* 分别接种于哥伦比亚血平板,37 °C,5%CO₂ 活化培养 16~18 h。挑取适量菌落形成单位(colony forming unit, CFU)转种于 C+Y 培养基中,待其 A_{600 nm} 增至

0.6~0.8 时,集菌,用无菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)调 A_{600nm} 至 0.5, PBS 洗菌 2 次, PBS 重悬,制成 2×10^8 CFU/ml 的细菌悬液备用。

1.6 造模方法

C57BL/6 小鼠经腹腔注射 1.5%戊巴比妥全身麻醉后,清理双侧外耳道,用 75%乙醇消毒外耳道及耳廓周围,微量加样针吸取 2×10^8 CFU/ml TIGR4 或 TIGR4 Δcps 菌悬液 5 μ l (约含细菌 10^6 CFU),经鼓膜穿刺接种入中耳腔。对照组用相同方法注入等量无菌 PBS。每天称量小鼠体质量至造模后第 7 天,观察小鼠发病情况。

1.7 苏木精-伊红(HE)染色

于建模后 1、3、5 天各时间点每组随机取出 3 只 C57BL/6 小鼠,行心脏取血,取双侧听泡,4% 多聚甲醛 4 $^{\circ}$ C 冰箱内固定 24 h, 10% 乙二胺四乙酸(EDTA)溶液脱钙致骨软化(约 1 个月),经梯度脱水后,石蜡包埋,水平位连续切片(厚度 5 μ m),常规 HE 染色,光镜下观察中耳黏膜增生及炎症细胞浸润情况。

1.8 中耳灌洗液(middle ear lavage fluids, MELF)细胞及细菌计数

造模后 1、3、5 天各时间点每组随机取 5 只小鼠,无菌条件下心脏取血,无菌 PBS 灌洗中耳腔收集 MELF,约 50 μ l/耳。取 5 μ l/只小鼠 MELF 用于细菌计数,系列稀释后,于哥伦比亚血平板铺板,37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 培养过夜,计数血平板上细菌菌落; MELF 350 g 离心 5 min,收集上清于 -80 $^{\circ}$ C 保存, 1% BSA-PBS 溶液重悬细胞,加入红细胞裂解液冰上处理 10 min 后, 1% BSA-PBS 洗两次, 1% BSA-PBS 100 μ l/只小鼠重悬细胞,取 10 μ l 用于牛鲍计数板充池计数炎症细胞数量。

1.9 细胞因子测定

MELF 经 350 g 离心 5 min,收集上清, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。按照试剂盒说明书操作,检测 MELF 中 IL-6、TNF- α 水平。

1.10 统计学处理

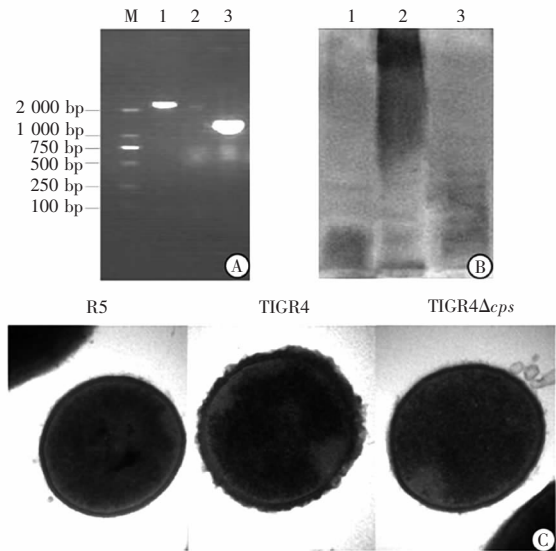
采用 SPSS 19.0 软件进行统计学处理。计量资料数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组均数间比较采用两独立样本 t 检验,3 组间比较采用单因素方差分析,其两两比较采用 LSD- t 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 TIGR4 Δcps 缺陷菌的构建及鉴定

以本室自建保存的 D39 Δcps 的 DNA 为模板,引物 P1、P2 扩增含 *tet* 基因的目的片段,胶回收该片段,经同源重组后,含 *tet* 基因的目的片段替代了 TIGR4 野生菌株基因组上的 *cps* 基因,四环素血平板筛选出 *cps* 缺陷菌株。PCR 鉴定缺陷菌株:采用 P1、P2 扩增缺陷菌株,可见约 2 438 bp 的目的片段;采用 *tet* 引物扩增缺陷菌株,可见约 1 400 bp 的 *tet* 基因片段,而扩增野生菌株无该片段(图 1A)。胶回收缺陷菌株扩

增的目的片段,测序结果显示该片段序列正确(图略)。Western blot 检测 TIGR4 和 TIGR4 Δcps 的 CPS 水平,以无荚膜 R6 血清型 *S.pn* 为对照,显示 TIGR4 Δcps 缺陷菌的 CPS 较 TIGR4 明显减少(图 1B)。透射电镜观察野生菌和缺陷菌的荚膜形态学变化,与野生菌比较,缺陷菌的荚膜明显变薄,缺陷菌荚膜厚度近似无荚膜的 R6 菌株(图 1C)。上述结果表明成功构建了 TIGR4 Δcps 缺陷菌。体外实验检测野生菌和 *cps* 缺陷菌单个菌落生长情况,结果显示生长曲线基本一致(图略),提示构建 *cps* 缺陷菌株未影响 TIGR4 的生长。



A. PCR 鉴定 TIGR4 Δcps 缺陷菌株; M. Marker; 1. TIGR4 Δcps 扩增目的片段; 2. TIGR4WT 扩增 *tet* 片段; 3. TIGR4 Δcps 扩增 *tet* 片段; B. Western blot 检测 CPS 的表达水平; 1. R6; 2. TIGR4; 3. TIGR4 Δcps ; C. 透射电镜观察荚膜的形态学变化(120 000 \times)

图 1 TIGR4 Δcps 缺陷菌株鉴定

Fig.1 Analysis of *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 Δcps

2.2 TIGR4 和 TIGR4 Δcps 中耳炎的小鼠体质量比较

体质量变化如表 2、图 2 所示, *S.pn* 接种后第 1 天体质量均显著下降,第 2 天至第 4 天 TIGR4 组比 TIGR4 Δcps 组体质量降低幅度更大,并伴随竖毛、弓背和体温下降的症状,第 5 天开始体质量回升,症状缓解。不同时间点的体质量水平有差异 ($F=40.204, P=0.000$),不同处理因素对体质量水平影响有差异 ($F=3.629, P=0.040$),时间与处理存在交互作用 ($F=6.245, P=0.000$),在观察的病程中, *S.pn* 处理组体质量下降幅度均大于 PBS 对照组。

2.3 TIGR4 和 TIGR4 Δcps 中耳炎的中耳组织损伤比较

对中耳组织切片行 HE 染色,结果如图 3 所示,高倍镜下可见, PBS 组小鼠中耳上皮于第 1 天有轻度损伤,第 3 天已开始恢复,第 5 天基本恢复正常;而 TIGR4 组和 TIGR4 Δcps 组中耳上皮的损伤均比 PBS 组小鼠严重。TIGR4 组和 TIGR4 Δcps 组第 1 天上皮黏膜均开始增厚,上皮细胞排列紊乱,但

表 2 小鼠接种 PBS, TIGR4 或 TIGR4 Δcps 后体质量变化结果 ($\bar{x} \pm s, g, n=10$)

Tab.2 Changes in weight of mice inoculated with PBS, TIGR4 or TIGR4 Δcps ($\bar{x} \pm s, g, n=10$)

分组	第 0 天	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
PBS组	16.72 \pm 0.98	16.19 \pm 0.99	16.64 \pm 0.74	16.56 \pm 0.39	16.71 \pm 0.62	16.93 \pm 0.68	17.25 \pm 0.64	17.40 \pm 0.43
TIGR4组	17.01 \pm 1.03	14.96 \pm 1.02	14.40 \pm 1.60	14.79 \pm 1.88	14.76 \pm 1.68	15.77 \pm 1.55	16.01 \pm 1.35	15.97 \pm 1.25
TIGR4 Δcps 组	17.06 \pm 1.39	15.33 \pm 1.05	15.34 \pm 1.23	15.92 \pm 1.48	15.95 \pm 1.49	16.65 \pm 1.30	16.60 \pm 1.35	16.73 \pm 1.34
F 时间, P 时间				40.204	0.000			
F 处理, P 处理				3.629	0.040			
F 交互, P 交互				6.245	0.000			

TIGR4 组的上皮黏膜较 TIGR4 Δcps 组增厚明显, 黏膜下炎症细胞的募集明显多于缺陷组, 骨质破坏也更严重, 表明 CPS 加重了中耳组织损伤。

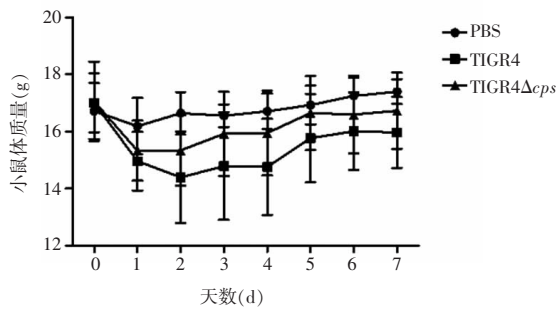


图 2 小鼠接种 PBS, TIGR4 或 TIGR4 Δcps 后体质量变化结果 ($n=10$)

Fig.2 Changes in weight of mice inoculated with PBS, TIGR4 or TIGR4 Δcps ($n=10$)

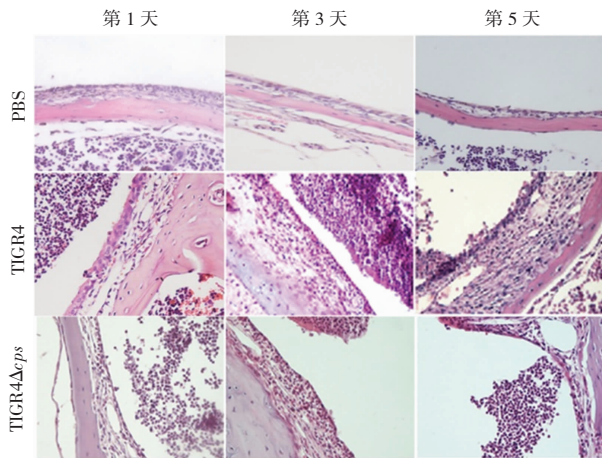


图 3 中耳组织切片 HE 染色 (400 \times)

Fig.3 HE staining of sections of middle ear tissue (400 \times)

2.4 TIGR4 和 TIGR4 Δcps 中耳炎的细菌清除比较

对 MELF 进行细菌铺板计数 CFU, PBS 组小鼠在整个病程中均未检测到细菌, 实验组结果如表 3 所示, TIGR4 与 TIGR4 Δcps 均于接种后第 5 天被完全清除, 但在第 1 天和第 3 天, TIGR4 组的细菌载量明显高于 TIGR4 Δcps 组, 表明 TIGR4 Δcps 更易被宿主清除。

表 3 小鼠接种 S.pn 后 MELF 中的 CFU ($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 CFU of MELF from Mice inoculated with S.pn ($\bar{x} \pm s$)

分组	例数 (n)	第 1 天	第 3 天
TIGR4组	5	1 200.00 \pm 564.98	484.00 \pm 258.22
TIGR4 Δcps 组	5	360.00 \pm 424.03	48.00 \pm 46.04
t 值		2.659	3.717
P 值		0.029	0.006

2.5 TIGR4 和 TIGR4 Δcps 中耳炎的炎症细胞募集比较

小鼠接种 PBS, TIGR4, TIGR4 Δcps 后第 1, 3, 5 天的组织切片进行 HE 染色, 如图 4 所示, PBS 组中耳腔内中性粒细胞的募集均较少, TIGR4 组募集的炎症细胞数量明显多于 TIGR4 Δcps 组。同时, 对 MELF 细胞计数, 如表 4 结果显示, 灌洗液中的炎症细胞在接种后第 3 天达峰值, TIGR4 组募集的炎症细胞数量明显多于 TIGR4 Δcps 组。流式细胞术分类计数结果显示 >95% 炎症细胞为中性粒细胞 (图略)。

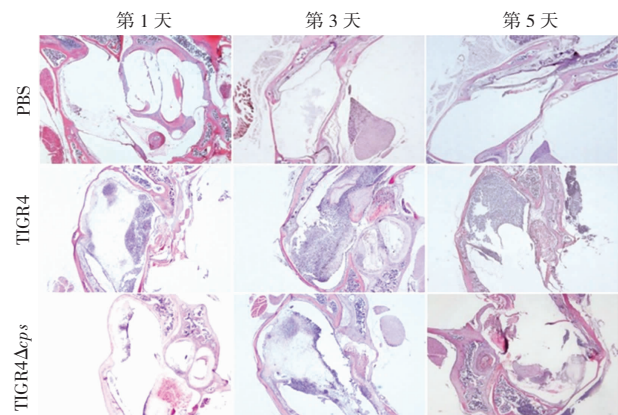


图 4 中耳腔的炎症细胞募集 (HE 染色 40 \times)

Fig.4 Recruitments of inflammatory cells in middle ear cavity (HE staining 40 \times)

2.6 TIGR4 和 TIGR4 Δcps 中耳炎的 TNF- α 和 IL-6 表达差异比较

炎症细胞因子检测结果见表 5、表 6。TIGR4 组和 TIGR4 Δcps 组的 MELF 中 TNF- α 的表达在第 3 天达高峰, IL-6 的表达在第 1 天达高峰, 但 TIGR4 组 MELF 中的 TNF- α 水平和 IL-6 水平均明显高于 TIGR4 Δcps 组。

表 4 MELF 中炎症细胞计数 ($\bar{x} \pm s, \times 10^4$)

Tab.4 Counts of inflammatory cells in MELF ($\bar{x} \pm s, \times 10^4$)

分组	例数 (n)	第 1 天	第 3 天	第 5 天
PBS组	5	3.30 ± 0.21	8.35 ± 1.58	5.95 ± 1.43
TIGR4组	5	5.50 ± 0.39	25.15 ± 2.00	16.85 ± 2.29
TIGR4 Δcps 组	5	4.65 ± 0.49	16.85 ± 2.06	10.60 ± 2.13
F 值		42.200	98.805	38.029
P 值		0.000	0.000	0.000
PBS 组与 TIGR4 组比较: P_1 值		0.000	0.000	0.000
TIGR4 组与 TIGR4 Δcps 组比较: P_2 值		0.004	0.000	0.000

表 5 MELF 中 TNF- α 的表达差异 ($\bar{x} \pm s, pg/ml$)

Tab.5 Differential expressions of TNF- α in MELF ($\bar{x} \pm s, pg/ml$)

分组	例数 (n)	第 1 天	第 3 天	第 5 天
PBS组	5	44.73 ± 5.81	37.30 ± 4.67	33.29 ± 7.46
TIGR4组	5	59.67 ± 14.98	169.11 ± 22.63	94.37 ± 9.34
TIGR4 Δcps 组	5	47.65 ± 5.44	129.17 ± 16.72	65.69 ± 8.75
F 值		3.267	84.267	63.857
P 值		0.074	0.000	0.000
PBS 组与 TIGR4 组比较: P_1 值		0.033	0.000	0.000
TIGR4 组与 TIGR4 Δcps 组比较: P_2 值		0.076	0.002	0.000

表 6 MELF 中 IL-6 的表达差异 ($\bar{x} \pm s, pg/ml$)

Tab.6 Differential expressions of IL-6 in MELF ($\bar{x} \pm s, pg/ml$)

分组	例数 (n)	第 1 天	第 3 天	第 5 天
PBS组	5	389.57 ± 88.65	235.20 ± 71.17	138.88 ± 40.75
TIGR4组	5	5 258.44 ± 343.11	2 557.09 ± 260.71	2 342.92 ± 348.66
TIGR4 Δcps 组	5	3 610.22 ± 320.75	1 975.04 ± 152.23	934.44 ± 118.37
F 值		402.644	227.559	228.306
P 值		0.000	0.000	0.000
PBS 组与 TIGR4 组比较: P_1 值		0.000	0.000	0.000
TIGR4 组与 TIGR4 Δcps 组比较: P_2 值		0.000	0.003	0.000

3 讨论

急性中耳炎是全球普遍的健康问题。*S.pn* 是中耳炎的常见致病菌之一,因其定植于鼻咽部,极易上行至中耳腔导致中耳炎的发生。CPS 是 *S.pn* 重要的毒力因子,据文献报道,在 *S.pn* 引起的脑膜炎模型^[13]中,有荚膜的 TIGR4 的半数致死剂量 LD₅₀ 为 2×10^2 CFU,而无荚膜的 TIGR4 突变菌株 FP23 的 LD₅₀ 大于 10^7 CFU。因 TIGR4 是中耳炎的敏感血清型,因此选择 TIGR4 菌株构建急性中耳炎模型。本研究采用同源重组的方式构建 TIGR4 Δcps 缺陷菌,经测序及 PCR 技术、Western blot 检测及电镜等鉴定构建成功,为后续研究打下基础。

CPS 在细菌的定植和侵袭中发挥重要的作用^[7]。在鼻咽部,CPS 能促进 *S.pn* 通过黏液层,以逃避宿主的免疫细胞^[14];一旦 *S.pn* 穿过黏液层后,CPS 会表达减少,以暴露细菌潜在的表面分子,促进其与上皮细胞的结合和生物膜形成^[15]。全身的血液感染中,*S.pn* 又必须增加 CPS 的表达,以逃避补体介导的调理吞噬^[16]。可见,CPS 在不同的解剖部位,会因生存的需要而表达不同的水平,而由其引起的致病机理也可能不同。迄今,在 *S.pn* 性中耳炎模型中,鲜有 CPS 的致病机制研究。

研究发现,CPS 能够阻止宿主与 *S.pn* 磷壁酸的接触,发挥抗吞噬作用,是 *S.pn* 有力的保护屏障^[3,5]。本研究发现 TIGR4 缺失 *cps* 后,对炎症细胞的募集能力明显下降。虽然缺陷菌组募集的中性粒细胞减

少,但在中耳腔中细菌的载量也明显下降,其原因可能为 TIGR4 缺失荚膜后,暴露黏附分子,更易与细胞接触,易于被炎症细胞杀灭,因而抵抗免疫杀伤的能力下降。

CPS 能降低支气管管腔中黏液的隔离作用,导致 *S.pn* 更易到达上皮表面,引起组织损伤^[17]。本研究也发现,TIGR4 与 TIGR4 Δ *cps* 构建小鼠的急性中耳炎后,观察小鼠整体状况,野生组的发病情况比缺陷组严重。比较中耳腔局部的上皮损伤程度,野生组对上皮的损伤较缺陷组明显严重。也有研究表明,中性粒细胞在杀菌过程中,释放多种杀菌性物质及细胞因子,以利于清除异物,但同时也造成组织损伤^[18]。本实验对 MELF 中的炎性细胞因子 TNF- α 和 IL-6 进行测定,结果显示 TIGR4 野生组的这 2 种细胞因子均较高,与 TIGR4 Δ *cps* 组比较差异具有统计学意义。野生组募集的中性粒细胞更多,释放的细胞因子也相应升高,这可能是导致野生组中耳上皮的严重损伤的重要原因之一。

综上所述,在小鼠的 *S.pn* 急性中耳炎中,TIGR4 缺失 *cps* 后,中耳腔中募集的细胞减少,灌洗液中的炎性细胞因子 IL-6、TNF- α 降低,导致缺失 *cps* 后,对中耳上皮及骨质的损伤减轻,但更易被宿主清除。本研究的结果提示,*S.pn* 的 CPS 作为重要的毒力因子,对中耳炎的发生和发展起着重要作用。因此,对 CPS 进行更深入的研究,以便从发病机制上开发新的治疗途径,可能具有一定的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines[J]. Nature Med, 2005, 11(s4): 45-53.
- [2] Roth A, Reichmann P, Hakenbeck R. The capsule of *Streptococcus pneumoniae* contributes to virulence in the insect model *Manduca sexta* [J]. J Mol Microbiol Biotechnol. 2012, 22(5): 326-334.
- [3] Keller LE, Jones CV, Thornton JA, et al. PspK of *Streptococcus pneumoniae* increases adherence to epithelial cells and enhances nasopharyngeal colonization[J]. Infect Immun, 2013, 81(1): 173-181.
- [4] Winkelstein JA. The role of complement in the host's defense against *Streptococcus pneumoniae*[J]. Rev Infect Dis, 1981, 3(2): 289-298.
- [5] Hanson BR, Runft DL, Streeter C, et al. Functional analysis of the CpsA protein of *Streptococcus agalactiae*[J]. J Bacteriology, 2012, 194(7): 1668-1678.
- [6] Von Unge M, Decraemer WF, Buytaert JA, et al. Evaluation of a model for studies on sequelae after acute otitis media in the Mongolian gerbil[J]. Acta Otolaryngol, 2009, 129(3): 261-267.
- [7] Shainheit MG, Mulé M, Camilli A. The core promoter of the capsule operon of *Streptococcus pneumoniae* is necessary for colonization and invasive disease[J]. Infect Immun, 2014, 82(2): 694-705.
- [8] 周爱娥, 王维, 项云, 等. 小鼠急性中耳炎模型的建立[J]. 激光杂志, 2013, 34(4): 105-109.
- [9] 王一平. 转化缺失的无荚膜肺炎链球菌作为活疫苗候选菌株的安全性及保护效果评价研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2013.
- [10] 张雪梅, 尹一兵, 孟江萍, 等. 肺炎链球菌 comX 基因可影响细菌毒力基因表达[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(8): 688-691.
- [11] Trzcinski K, Thompson CM, Lipsitch M. Construction of otherwise isogenic serotype 6B, 7F, 14, and 19F capsular variants of *Streptococcus pneumoniae* strain TIGR4[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(12): 7364-7370.
- [12] Ali F, Lee M E, Lannelli F, et al. *Streptococcus pneumoniae*-associated human macrophage apoptosis after bacterial internalization via complement and Fc γ receptors correlates with intracellular bacterial load[J]. J Infect Dis, 2003, 188(8): 1119-1131.
- [13] Peppoloni S, Ricci S, Orsi CF, et al. The encapsulated strain TIGR4 of *Streptococcus pneumoniae* is phagocytosed but is resistant to intracellular killing by mouse microglia[J]. Microbes and Infection, 2010, 12(12-13): 990-1001.
- [14] Nelson AL, Roche AM, Gould JM, et al. Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance[J]. Infect Immun, 2007, 75(1): 83-90.
- [15] Sanchez CJ, Kumar N, Lizcano A, et al. *Streptococcus pneumoniae* in biofilms are unable to cause invasive disease due to altered virulence determinant production[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e28738.
- [16] Kim JO, Weiser JN. Association of intrastain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with the virulence of *Streptococcus pneumoniae*[J]. J Infect, 1998, 177(2): 368-377.
- [17] Nelson AL, Roche AM, Gould JM, et al. Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance[J]. Infect Immun, 2007, 75(1): 83-90.
- [18] Zhang P, Summer WR, Bagby GJ, et al. Innate immunity and pulmonary host defense[J]. Immunol Rev, 2000(173): 39-51.

(责任编辑:冉明会)