

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001746

轻型链球菌缓解铜绿假单胞菌感染小鼠模型的炎症反应及机制的初步探讨

侯 婷¹, 余加林¹, 艾 青¹, 贺 雨¹, 肖 洒¹, 谭 琪¹, 王 利¹, 胡 坤¹, 李秋平¹, 尹一兵², 宋 超³

(1. 重庆医科大学附属儿童医院新生儿中心、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿科学重庆重点实验室、儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地, 重庆 410014; 2. 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 400014; 3. 浙江大学医学院附属儿童医院, 杭州 310003)

【摘要】目的:探讨轻型链球菌(*Streptococcus mitis*, *S.mitis*)在铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PAO1)感染小鼠模型中缓解炎症作用及可能机制。**方法:**将野生型和 TLR2 基因缺陷型小鼠随机分为 4 组, 每组 20 只, 通过气管内注入铜绿假单胞菌(PAO1 组)、轻型链球菌(*S.mitis* 组)、铜绿假单胞菌+轻型链球菌混合菌液(PAO1+*S.mitis* 组)和生理盐水(PBS 组)建立模型, HE 染色观察肺组织病理学改变, ELISA 检测肺泡灌洗液中炎症因子白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的表达, 计数肺泡灌洗液细胞总数及细胞分类。**结果:**野生型小鼠中肺组织病理学显示: PAO1 组肺泡间隙增宽明显, 有大量炎症细胞浸润, PAO1+*S.mitis* 组炎症较 PAO1 组稍轻, *S.mitis* 组和 PBS 组肺组织结构正常, 基本未见炎症细胞浸润; 肺泡灌洗液中 PAO1 组 IL-6 和 TNF- α 的含量高于 PAO1+*S.mitis* 组($P=0.032$, $P=0.007$), *S.mitis* 组和 PBS 组仅有少量表达; PAO1 组 BALF 细胞总数及中性粒细胞计数均较 PAO1+*S.mitis* 组、*S.mitis* 组和 PBS 组增加(均 $P<0.05$)。TLR2 基因缺陷型小鼠中肺组织病理学显示: PAO1 组和 PAO1+*S.mitis* 组均有肺泡间隙增宽, 炎症细胞浸润, 肺泡灌洗液中 PAO1 组和 PAO1+*S.mitis* 组 IL-6 和 TNF- α 的表达没有统计学差异($P=1.000$, $P=1.000$), *S.mitis* 组和 PBS 组仅有少量表达; PAO1 组和 PAO1+*S.mitis* 组支气管肺泡灌洗液细胞总数及中性粒细胞计数没有统计学差异($P=1.000$, $P=1.000$)。**结论:**轻型链球菌可缓解铜绿假单胞菌炎症反应与 TLR2 有关。

【关键词】新生儿; 铜绿假单胞菌; 轻型链球菌

【中图分类号】R722.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-01-04

A preliminary study for the mechanism of *Streptococcus mitis* in mouse model of *Pseudomonas aeruginosa* infection

Hou Ting¹, Yu Jialin¹, Ai Qing¹, He Yu¹, Xiao Sa¹, Tan Qi¹, Wang Li¹,
Hu Kun¹, Li Qiuping¹, Yin Yibing², Song Chao³

(1. Department of Neonatology, the Children's Hospital of Chongqing Medical University; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing; Chongqing International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders; 2. Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnosis of Education Ministry, Department of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University; 3. The Children's Hospital of Zhejiang University School of Medicine)

【Abstract】Objective: To investigate the alleviation of inflammatory effects and mechanisms of *Streptococcus mitis* in infection with

作者介绍: 侯 婷, Email: hoting0425@foxmail.com,

研究方向: 新生儿感染与免疫。

通信作者: 余加林, Email: yujialin486@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81571483); 国家临床重点专科建设项目经费资助项目(编号: 卫办医政函 2011-873); 儿童医院临床研究资助项目(编号: [2014]254-lcyj 2014-11)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180522.1614.056.html>
(2018-05-25)

Pseudomonas aeruginosa. **Methods:** Wild-type C57BL/6 and TLR2^{-/-} mice were randomly assigned into 4 groups (20 in each group). They were treated with an intratracheal instillation of *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1 group), *Streptococcus mitis* (*S.mitis* group), *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus mitis* (PAO1+*S.mitis* group), and phosphate-buffered saline (PBS group), respectively. The mice were sacrificed at 48 h after instillation; the pathological changes in lung tissues were ex-

ained with hematoxylin-eosin (HE); the levels of IL-6 and TNF- α in broncho-alveolar lavage fluid (BALF) were evaluated by ELISA; the total cell counts and neutrophil counts in the BALF were quantified. **Results:** In wild-type C57BL/6 mice, the bronchi and blood vessels in PAO1 group was infiltrated by a large number of inflammatory cells and was complicated with alveolar septum thickening. The pathological changes were milder in PAO1+S.mitis group than in PAO1 group, while there was no significant pathological changes in lung tissue in PBS group and S.mitis group. The levels of IL-6, TNF- α were significantly higher in PAO1 group than that in PAO1+S.mitis group ($P=0.032$, $P=0.007$). The total number of BALF cells and neutrophils in PAO1 group was the highest among the four groups ($P<0.05$). In TLR2^{-/-} mice, alveolar septum thickening and the infiltration of inflammatory cells was observed in PAO1 group and PAO1+S.mitis group. No statistically significant difference in the expression of IL-6, TNF- α , total number of BALF cells and neutrophils in PAO1 group and PAO1+S.mitis group (all $P=1.000$) was observed. **Conclusion:** *Streptococcus mitis* can alleviate the inflammatory response of *Pseudomonas aeruginosa* and is related to TLR2.

【Key words】newborn; *Pseudomonas aeruginosa*; *Streptococcus mitis*

随着机械通气在新生儿重症监护室 (neonatal intensive care unit, NICU) 的使用, 危重新生儿的存活率明显提高, 但因机械通气引起的并发症呼吸机相关性肺炎 (ventilator-associated pneumonia, VAP) 严重影响新生儿的预后, 其中极低出生体重早产儿并发 VAP 更为常见^[1]。NICU 中 VAP 的发生率为 8.1%~57.1%, 病死率高达 32.2%^[2-4]。本课题组前期对机械通气患儿气管导管表面的细菌微生物进行二代测序检测, 发现 VAP 患儿气管导管 (endotracheal tube, ETT) 表面不仅存在铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌等常见致病菌, 还常常同时存在轻型链球菌^[5]。国外研究也证实, ETT 表面是由多种细菌组成的微生态结构^[6-7]。轻型链球菌是人体口咽中存在的常见正常菌, 几乎不具有致病性^[8-9]。本课题组前期发现: 接受呼吸机治疗的新生儿呼吸道分泌物中伴有轻型链球菌患儿从气管插管到发生 VAP 的潜伏期更长, 肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中白细胞浸润减少 (待发表资料), 本文拟通过动物实验以证明该现象, 并用 TLR2 基因缺陷小鼠来初步探讨可能的发生机制, 为新生儿 VAP 的防控提供新研究途径。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

脑心浸出液培养基 (BHI 培养基, 青岛日水生物技术有限公司), 白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA) 检测试剂盒 (北

京四正柏生物科技有限公司)。紫外分光光度计 UV-1700 (苏州, 岛津)。快速瑞姬氏染液 (南京建成科技有限公司)。

1.2 细菌菌株

铜绿假单胞菌野生株 (PAO1) 为本实验室保存, 轻型链球菌标准株购于 ATCC (编号 ATCC49456); 铜绿假单胞菌和轻型链球菌冻存菌株从 -80 °C 冰箱取出, 铜绿假单胞菌 37 °C、200 r/min 震荡培养过夜复苏, 轻型链球菌 37 °C、5%CO₂ 培养过夜复苏。三分法划线, 分别挑取铜绿假单胞菌和轻型链球菌单菌落于 BHI 培养基中 12~14 h, 紫外分光光度计测定 600 nm 处吸光度 (absorbance, A) 值。

1.3 实验动物

SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 80 只, 6~8 周龄, 体质量 18~22 g, 将小鼠随机分为铜绿假单胞菌组 (PAO1)、轻型链球菌组 (S.mitis 组)、铜绿假单胞菌+轻型链球菌组 (PAO1+ S.mitis 组) 和生理盐水组 (PBS 组), 每组 20 只。实验动物购于重庆医科大学动物中心。TLR2 基因缺陷小鼠由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赠送, 繁殖饲养于重庆医科大学附属儿童医院动物中心。

1.4 动物模型制作

C57BL/6 小鼠在重庆医科大学附属儿童医院适应性饲养 2 d, 根据文献建立肺部感染小鼠模型^[10], 10% 水合氯醛 3~5 mL/kg 腹腔注射麻醉小鼠, 固定头部和四肢, 充分暴露颈部。以颈部皮肤的切口为中心由内向外严格消毒, 消毒 3 次。使用手术剪剪开小鼠颈部的皮肤, 切口长度约 1 cm, 钝性分离皮下脂肪、肌肉、气管周围筋膜, 最终充分暴露气管。微量注射器从喉状软骨处插入气管内, 缓慢注入 PAO1 菌液 (PAO1 组, $A_{600\text{nm}}=0.05$, 约 1×10^8 CFU/mL, 50 μ L), S.mitis 菌液 (S.mitis 组, $A_{600\text{nm}}=0.05$, 约 1×10^8 CFU/mL, 50 μ L)、PAO1+S.mitis 菌液 (PAO1+S.mitis 组, $A_{600\text{nm}}=0.1$, 约 2×10^8 CFU/mL, 25 μ L PAO1+25 μ L S.mitis) 和 PBS 缓冲液 (PBS 组 50 μ L)。注射完毕后竖立小鼠 30 s, 保证菌液均匀分布于小鼠两肺内。间断缝合颈部皮肤伤口, 碘伏消毒皮肤切口及切口周围皮肤,

将小鼠放入笼中,待其自然苏醒。

1.5 支气管肺泡灌洗液的灌取及细胞计数

手术后 48 h 用 10% 水合氯醛麻醉小鼠,眼球取血后断颈处死,仰卧位固定,充分暴露气管和胸腔,结扎左侧肺门,留置针从喉状软骨处插入气管适宜深度并固定,用预冷无菌 PBS 进行右肺支气管肺泡灌洗,每次 0.5 mL,一共 3 次,回收率至少 80%。4 ℃ 下 2 500 r/min 离心 5 min,上清液分装保存于 -80 ℃。剩余细胞沉淀中加入 1 mL 无菌 PBS 混匀后取 20 mL 作细胞总数计数,计数后再次 2 500 r/min、4 ℃ 离心 5 min,弃上清后取细胞沉渣涂片,晾干后行 Gimsa 染色细胞分类计数。

1.6 肺组织病理学观察

BALF 灌取后,剪下左侧肺组织放置于中性甲醛固定 24 h 以上,常规脱水、石蜡包埋,切成 4 μm 薄片,60 ℃ 烤箱烤 48 h 后进行苏木素-伊红染色,镜下观察肺组织病理状态。

1.7 ELISA 法检测 IL-6 和 TNF-α 的表达

取 -80 ℃ 冻存备用的 BALF 上清,按 ELISA 试剂盒推荐步骤测定 BALF 中 IL-6、TNF-α 的含量。TNF-α 试剂盒灵敏度为 3.9 pg/mL,IL-6 试剂盒灵敏度为 4 pg/mL。

1.8 统计学处理采用

SPSS 20.0 软件包分析统计,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,正态方差齐性资料比较采用单因素方差分析,正态方差不齐资料比较时使用 Kruskal-Wallis 检验,组间比较使用 Dunn-Bonferroni 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 小鼠的一般情况

小鼠建模苏醒后,野生型小鼠和 TLR2 基因缺陷型小鼠

中 PAO1 组、PAO1+S.mitis 组表现为精神倦怠,呼吸急促,口唇发绀,活动及进食均减少,行动迟缓。S.mitis 组和 PBS 组在苏醒后呼吸稍促,无发绀,能正常进食与活动。

2.2 肺组织病理学检查结果

光镜下见野生型小鼠中 PBS 组(图 1A)和 S.mitis 组(图 1B)肺组织结构正常,无炎症细胞浸润。单独铜绿假单胞菌组(图 1C)中肺泡间隙明显增宽,炎症细胞浸润多。铜绿假单胞菌伴轻型链球菌混合感染组(图 1D)肺泡间隔增宽和炎症细胞浸润均较铜绿假单胞菌组减轻。TLR2 基因缺陷型小鼠中 PBS 组(图 1E)和 S.mitis 组(图 1F)肺组织结构完整,未见炎症细胞浸润。PAO1 组(图 1G)和 PAO1+S.mitis 组(图 1H)均有肺泡间隔增宽,炎症细胞浸润。

2.3 肺泡灌洗液炎症因子的表达水平

在野生型小鼠中,与 PBS 组小鼠相比,S.mitis 组小鼠 IL-6 和 TNF-α 的表达没有统计学差异($P=1.000$, $P=1.000$);与 PBS 组小鼠相比,PAO1 组小鼠和 PAO1+S.mitis 组小鼠 IL-6 的表达明显升高($P=0.000$, $P=0.000$),TNF-α 的表达也明显升高($P=0.000$, $P=0.002$);与 PAO1 组的小鼠相比,PAO1+S.mitis 组小鼠 IL-6 和 TNF-α 的表达明显下降($P=0.032$, $P=0.007$)。在 TLR2 基因缺陷小鼠中,与 PBS 组相比,S.mitis 组小鼠 IL-6 和 TNF-α 的表达没有统计学差异($P=1.000$, $P=1.000$);与 PBS 组相比,PAO1 组小鼠和 PAO1+S.mitis 组小鼠 IL-6 和 TNF-α 表达均升高($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$);与 PAO1 组的小鼠相比,PAO1+S.mitis 组小鼠 IL-6 和 TNF-α 的表达无统计学差异($P=1.000$, $P=1.000$),见表 1。

2.4 肺泡灌洗液细胞总数及分类计数结果

在野生型小鼠中,与 PBS 组小鼠相比,S.mitis 组的 BALF 细胞总数和中性粒细胞差异无统计学意义($P=1.000$, $P=$

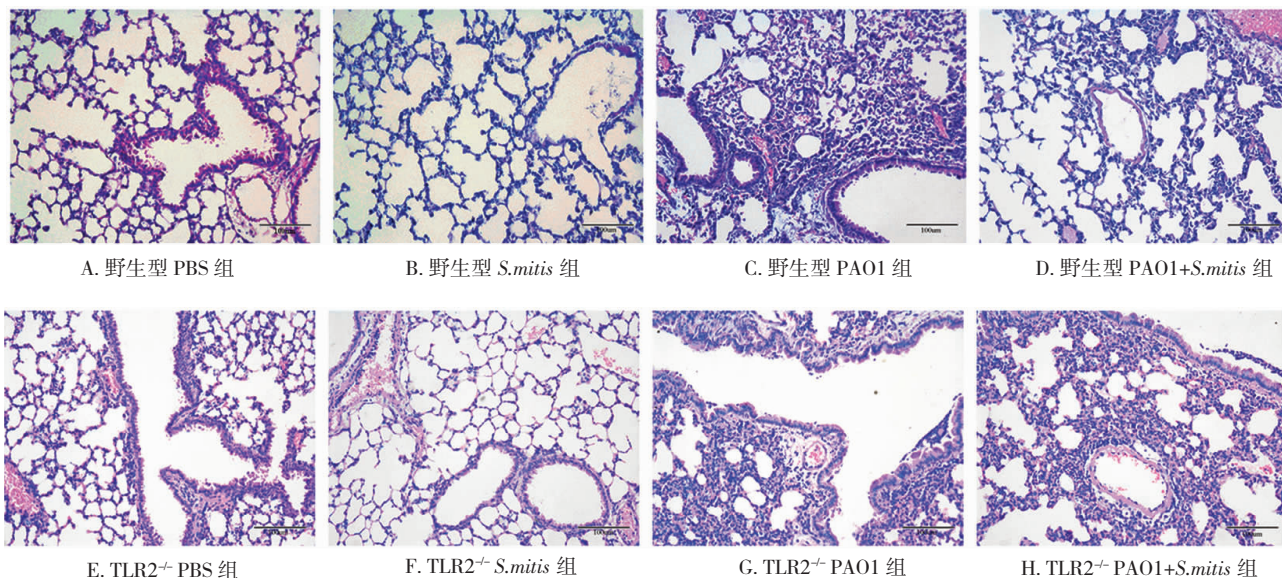


图 1 各组小鼠肺组织病理形态改变 (200 ×)

1.000);与 PBS 组小鼠相比,PAO1 组小鼠和 PAO1+*S.mitis* 组小鼠细胞总数明显升高($P=0.000$, $P=0.001$),中性粒细胞计数也明显升高($P=0.000$, $P=0.000$);与 PAO1 组的小鼠相比,PAO1+*S.mitis* 组的小鼠细胞总数和中性粒细胞计数下降($P=0.036$, $P=0.046$)。在 TLR2 基因缺陷小鼠中,与 PBS 组相比,*S.mitis* 组的 BALF 细胞总数和中性粒细胞差异无统计学意义($P=$

1.000, $P=0.177$);与 PBS 组小鼠相比,PAO1 组小鼠和 PAO1+*S.mitis* 组小鼠细胞总数和中性粒细胞计数升高($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$);与 PAO1 组小鼠相比,PAO1+*S.mitis* 组小鼠细胞总数和中性粒细胞计数没有统计学差异($P=1.000$, $P=1.000$)(表 2)。各组小鼠肺泡灌洗液细胞沉渣 Gimsa 染色结果如图 2 所示。

表 1 各组小鼠肺泡灌洗液 IL-6 和 TNF- α 的表达 (pg/mL)

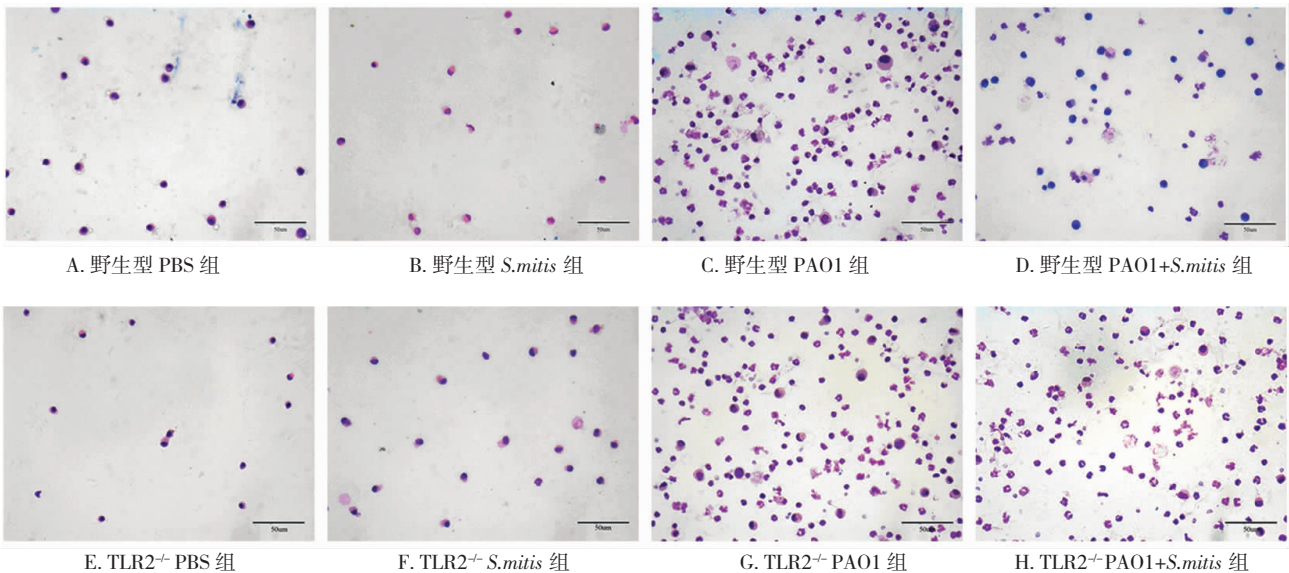
组别	例数	野生型小鼠		TLR2 基因缺陷小鼠	
		IL-6	TNF- α	IL-6	TNF- α
PBS 组	20	29.09 $\pm$ 13.56	26.39 $\pm$ 4.37	21.71 $\pm$ 10.26	17.63 $\pm$ 3.48
<i>S.mitis</i> 组	20	31.79 $\pm$ 16.61 ^a	27.57 $\pm$ 3.53 ^a	21.19 $\pm$ 13.13 ^a	17.24 $\pm$ 4.45 ^a
PAO1 组	20	749.27 $\pm$ 256.62 ^b	533.35 $\pm$ 338.05 ^b	473.58 $\pm$ 449.30 ^b	162.51 $\pm$ 162.09 ^b
PAO1+ <i>S.mitis</i> 组	20	127.28 $\pm$ 55.20 ^{cd}	54.10 $\pm$ 36.02 ^{ce}	402.33 $\pm$ 435.56 ^{cd}	162.61 $\pm$ 162.40 ^{cd}
H 值		65.670	54.133	57.718	51.639
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注:a,与 PBS 组比较, $P=1.000$;b,与 PBS 组比较, $P=0.000$;c,与 PBS 组比较, $P=0.002$;d,与 PAO1 组比较, $P=0.032$;e,与 PAO1 组比较, $P=0.007$;f,与 PAO1 组比较, $P=1.000$

表 2 各组小鼠肺泡灌洗液细胞总数和中性粒细胞、吞噬细胞、淋巴细胞分类计数 ($\times 10^5/\text{mL}$)

组别	例数	野生型小鼠				TLR2 基因缺陷型小鼠			
		细胞总数	中性粒细胞	吞噬细胞	淋巴细胞	细胞总数	中性粒细胞	吞噬细胞	淋巴细胞
PBS 组	20	1.804 $\pm$ 0.773	0.132 $\pm$ 0.094	1.549 $\pm$ 0.634	0.123 $\pm$ 0.090	1.704 $\pm$ 0.613	0.110 $\pm$ 0.043	1.461 $\pm$ 0.553	0.133 $\pm$ 0.075
<i>S.mitis</i> 组	20	1.860 $\pm$ 0.936 ^a	0.164 $\pm$ 0.091 ^a	1.612 $\pm$ 0.852 ^a	0.083 $\pm$ 0.075	1.880 $\pm$ 0.932 ^a	0.292 $\pm$ 0.180 ^b	1.394 $\pm$ 0.666	0.193 $\pm$ 0.152 ^a
PAO1 组	20	17.286 $\pm$ 8.949 ^c	12.133 $\pm$ 6.770 ^c	4.456 $\pm$ 2.288 ^c	0.697 $\pm$ 0.467	9.810 $\pm$ 4.089 ^c	6.611 $\pm$ 2.754 ^c	2.039 $\pm$ 0.906	1.160 $\pm$ 0.785 ^c
PAO1+ <i>S.mitis</i> 组	20	5.192 $\pm$ 1.883 ^{bd}	2.761 $\pm$ 0.964 ^{cd}	2.155 $\pm$ 0.571 ^e	0.277 $\pm$ 0.250	10.646 $\pm$ 4.689 ^d	7.090 $\pm$ 3.140 ^d	2.541 $\pm$ 1.057 ^e	1.015 $\pm$ 0.585 ^d
H 值		61.957	66.977	31.757	6.971	59.382	64.060	21.110	54.850
P 值		0.000	0.000	0.000	0.073	0.000	0.000	0.000	0.000

注:a,与 PBS 组比较, $P=1.000$;b,与 PBS 组比较, $P=0.177$;c,与 PBS 组比较, $P=0.000$;d,与 PBS 组比较, $P=0.001$;e,与 PAO1 组比较, $P=0.036$;f,与 PAO1 组比较, $P=0.046$;g,与 PAO1 组比较, $P=0.013$;h,与 PAO1 组比较, $P=0.015$;i,与 PAO1 组比较, $P=1.000$

图 2 Gimsa 染色观察小鼠 BALF 细胞沉渣 (400 $\times$)

3 讨 论

VAP是新生儿重症监护室中机械通气患儿常见的并发症,VAP的发生与气管导管表面的生物膜密切相关。本课题组和国内外都有研究发现生物膜并非单纯的一种细菌导致的感染,其内往往是多种细菌共存形成的复杂微环境,有较强抗生素耐药性、导致细菌免疫逃逸,并源源不断地释放浮游细菌至下呼吸道,造成感染迁延不愈^[11]。据美国疾病预防控制中心统计,65%的细菌感染都与生物膜有关^[12-13]。如何阻止生物膜的形成和清除其内部病原菌是目前临床治疗中最关键和棘手的问题。

近期研究主要是针对气管导管表面常见的单一细菌比如铜绿假单胞菌的致病、抗生素抵抗的研究^[14],不能反映生物膜内多种共存细菌的相互影响和作用。本课题组前期对VAP和非VAP患儿气管导管表面的生物膜进行二代测序发现,气管导管表面均是多种细菌共存的微环境,并且轻型链球菌常与致病菌铜绿假单胞菌相伴。轻型链球菌作为人类口咽常见定植菌,通常在出生后的1~3 d内就存在于人的口咽部,几乎不具有致病性^[15]。

基于对生物膜内多种细菌共存的认识,本实验采用生物膜中常伴的2种细菌铜绿假单胞菌和轻型链球菌两种细菌在野生型C57BL/6小鼠建立混合感染模型,探索两者在肺部感染中的作用。研究发现,轻型链球菌组和PBS组小鼠炎症因子、肺泡灌洗液细胞总数的计数和中性粒细胞的计数均没有统计学差异。铜绿假单胞菌伴轻型链球菌混合感染组较单独铜绿假单胞菌组肺部炎症病理表现稍轻,为进一步证实轻型链球菌的作用,本课题组检测了肺泡灌洗液中炎症因子IL-6和TNF- α 的表达,发现IL-6和TNF- α 的表达在铜绿假单胞菌伴轻型链球菌混合感染组中亦下降;IL-6、TNF- α 是常见的促炎因子,能激活免疫细胞,诱导炎症介质,放大局部和全身炎症反应。铜绿假单胞菌伴轻型链球菌混合感染组小鼠肺泡灌洗液细胞总数的计数和中性粒细胞的计数也均低于铜绿假单胞菌组。这些结果

提示轻型链球菌几乎不引起炎症反应和中性粒细胞聚集,铜绿假单胞菌可导致小鼠肺部炎症因子的表达升高和中性粒细胞聚集。当有铜绿假单胞菌伴轻型链球菌混合感染时,炎症反应下降,中性粒细胞聚集减少。说明在铜绿假单胞菌伴轻型链球菌混合感染中轻型链球菌有降低炎症反应和中性粒细胞聚集的作用。

轻型链球菌作为口咽部常存革兰阳性细菌,主要被宿主的Toll样受体2(Toll-like receptor 2, TLR2)识别。TLRs作为模式识别受体家族,是参与非特异性免疫(天然免疫)的一类重要蛋白质分子,也是连接非特异性免疫和特异性免疫的桥梁^[16-18]。TLR2可以通过招募中性粒细胞和吞噬细胞清除细菌^[19]。在TLR2^{-/-}小鼠中,轻型链球菌组和PBS组小鼠炎症因子、肺泡灌洗液细胞总数计数和中性粒细胞计数也没有统计学差异。铜绿假单胞菌伴轻型链球菌混合感染组和单独铜绿假单胞菌组小鼠的炎症反应和中性粒细胞聚集并无统计学差异,但是铜绿假单胞菌伴轻型链球菌混合感染组和单独铜绿假单胞菌组小鼠的炎症反应比轻型链球菌组和PBS组高。说明野生型小鼠轻型链球菌在与铜绿假单胞菌混合感染中降低炎症反应和中性粒细胞聚集的作用,与TLR2有关。

本课题组在对铜绿假单胞菌生物膜慢性感染小鼠7 d的研究中发现,由轻型链球菌产生的自诱导分子-2(AI-2)可以作为重要分子促进铜绿假单胞菌生物膜形成和增加气管内插管大鼠模型中促炎细胞因子分泌^[20]。与本实验不同在于建立的动物实验模型不同。本实验进行的是浮游铜绿假单胞菌感染48 h的急性期感染研究。轻型链球菌一方面促进铜绿假单胞菌生物膜的形成,其具体机制主要是增加生物膜的密度感应系统,另一方面缓解机体免疫反应,使致病菌如铜绿假单胞菌伺机形成生物膜,最终形成免疫逃逸。本研究探讨的急性肺炎模型因模型有差异、讨论的时相不同,故结论不同。

综上所述,轻型链球菌在缓解铜绿假单胞菌感染中有减少炎症因子的产生和中性粒细胞的浸润的作用,其机制与TLR2有关。

参 考 文 献

- [1] Thatrimontrichai A, Rujeerapaiboon N, Janjindamai W, et al. Outcomes and risk factors of ventilator-associated pneumonia in neonates[J]. *World J Pediatr*, 2017, 13(4):328–334.
- [2] Garland JS. Strategies to prevent ventilator-associated pneumonia in neonates[J]. *Clin Perinatol*, 2010, 37(3):629–643.
- [3] Tan B, Xian-Yang X, Zhang X, et al. Epidemiology of pathogens and drug resistance of ventilator-associated pneumonia in chinese neonatal intensive care units: a meta-analysis[J]. *Am J Infect Control*, 2014, 42(8):902–910.
- [4] Tan B, Zhang F, Zhang X, et al. Risk factors for ventilator-associated pneumonia in the neonatal intensive care unit: a meta-analysis of observational studies[J]. *Eur J Pediatr*, 2014, 173(4):427–434.
- [5] Li H, Song C, Liu D, et al. Molecular analysis of biofilms on the surface of neonatal endotracheal tubes based on 16s rna pcr-dgge and species-specific pcr[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(7):11075–11084.
- [6] Cairns S, Thomas JG, Hooper SJ, et al. Molecular analysis of microbial communities in endotracheal tube biofilms[J]. *PLoS One*, 2011, 6(3):e14759.
- [7] Pan Y, Du L, Ai Q, et al. Microbial investigations in throat swab and tracheal aspirate specimens are beneficial to predict the corresponding endotracheal tube biofilm flora among intubated neonates with ventilator-associated pneumonia[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(2):1450–1458.
- [8] Man WH, de Steenhuijsen Piters WA, Bogaert D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15(5):259–270.
- [9] Diaz PI, Dupuy AK, Abusleme L, et al. Using high throughput sequencing to explore the biodiversity in oral bacterial communities[J]. *Mol Oral Microbiol*, 2012, 27(3):182–201.
- [10] Caron E, Desseyn JL, Sergeant L, et al. Impact of fish oils on the outcomes of a mouse model of acute pseudomonas aeruginosa pulmonary infection[J]. *Br J Nutr*, 2015, 113(2):191–199.
- [11] Hoiby N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections[J]. *APMIS*, 2017, 125(4):272–275.
- [12] Boisvert AA, Cheng MP, Sheppard DC, et al. Microbial biofilms in pulmonary and critical care diseases[J]. *Ann Am Thorac Soc*, 2016, 13(9):1615–1623.
- [13] Mulcahy LR, Isabella VM, Lewis K. Pseudomonas aeruginosa biofilms in disease[J]. *Microb Ecol*, 2014, 68(1):1–12.
- [14] van Delden C, Köhler T, Brunner-Ferber F, et al. Azithromycin to prevent pseudomonas aeruginosa ventilator-associated pneumonia by inhibition of quorum sensing: A randomized controlled trial[J]. *Intensive Care Med*, 2012, 38(7):1118–1125.
- [15] Kirchherr J, Bowden G, Cole M, et al. Physiological and serological variation in streptococcus mitis biovar 1 from the human oral cavity during the first year of life[J]. *Arch Oral Biol*, 2007, 52(1):90–99.
- [16] Bao L, Yu J, Zhong H, et al. Expression of toll-like receptors in t lymphocytes stimulated with N-(3-oxododecanoyl)-l-homoserine lactone from pseudomonas aeruginosa[J]. *Apms*, 2017, 125(6):553–557.
- [17] Di Stefano A, Ricciardolo FLM, Caramori G, et al. Bronchial inflammation and bacterial load in stable COPD is associated with TLR4 overexpression[J]. *Eur Respir J*, 2017, 49(5):1602006.
- [18] Israel L, Wang Y, Bulek K, et al. Human adaptive immunity rescues an inborn error of innate immunity[J]. *Cell*, 2017, 168(5):789–800.
- [19] Shin HS, Lee JH, Paek SH, et al. Pseudomonas aeruginosa-dependent upregulation of thr2 influences host responses to a secondary staphylococcus aureus infection[J]. *Pathog Dis*, 2013, 69(2):149–156.
- [20] Wang Z, Xiang Q, Yang T, et al. Autoinducer-2 of streptococcus mitis as a target molecule to inhibit pathogenic multi-species biofilm formation in vitro and in an endotracheal intubation rat model[J]. *Front Microbiol*, 2016, 7:88.

(责任编辑:冉明会)