论著

文章编号:1000-5404(2006)05-0462-03

唾液酸相关物质对盐酸致伤大鼠气管铜绿假单胞菌感染的抑制作用

黄 勇,钱桂生,徐顺贵 (第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037)

提 要:目的 探讨唾液酸双糖、特异性植物凝集素及唾液酸酶对盐酸致伤大鼠气管铜绿假单胞菌感染的抑制作用。**方法** 大鼠气管内滴入盐酸致伤,接种分别含唾液酸双糖(唾液酸α2,3-半乳糖、唾液酸α2,6-N-乙酰氨基半乳糖)、特异性植物凝集素(Maackia amurensis agglutinin, MAA; Sambucus nigra agglutinin, SNA)及唾液酸酶(特异性α2,3-唾液酸酶和非特异性唾液酸酶)的铜绿假单胞菌混合液,分别在30 min和48 h后处死动物,完整取气管称重、匀浆后做细菌定量培养。**结果** 唾液酸α2,3-结构的双糖、凝集素和唾液酸酶都能明显减少铜绿假单胞菌接种30 min后气管粘附的菌落数,而只有双糖和唾液酸酶能显著减少接种48 h后气管的菌落数;唾液酸α2,6-结构的相关物质没有类似的作用。**结论** 唾液酸α2,3-结构相关物质能干预铜绿假单胞菌在气管的粘附/繁殖,双糖和唾液酸酶的作用更明显。

关键词: 唾液酸相关物质;大鼠;气管;铜绿假单胞菌感染

中图法分类号: R63; R643; R977.6 **文献标识码:** A

Inhibition of sialic acid related substances on *Pseudomonas aeruginosa* infection in rat trachea vulnerated by hydrochloric acid

HUANG Yong, QIAN Gui-sheng, XU Shun-gui (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate whether sialic acid disaccharides, specificity agglutinins and neuramidinases could inhibit *Pseudomonas aeruginose* infection in rat trachea vulnerated by hydrochloric acid. **Methods** One hundred and forty male Wistar rats were vulnerated by hydrochloric acid through intratracheal instillation and then inoculated by *Pseudomonas aeruginose* admixed Sial α2,3-Gal, Sial α2,6-GalNAc, Maackia amurensis agglutinin, Sambucus nigra agglutinin, specificity α2,3-neuramidinase or non-specificity neuramidinase respectively. Thirty minutes and 48 h after inoculation, whole trachea of 8 rats in each group was weighed, homogenated, and quantitative bacterial culture was performed while whole trachea of another 2 was fixed in 10% methanol, embedded with paraffin and HE stained. **Results** Sial α2,3-related disaccharide, agglutinin and neuramidinases could decrease colony count of trachea 30 min after inoculation remarkably. But only Sial α2,3-Gal and neuramidinases could obviously decrease colony count 48 h later. Sial α2,6-related substrances have not analogical effects. **Conclusion** Sial α2,3-related substrances could interfere *Pseudomonas aeruginose* binding/multiplication in the trachea, especially Sial α2,3-Gal and neuramidinase.

Key words: sialic acid related substrances; rat; trachea; *Pseudomonas aeruginose* infection

气道黏膜表面覆盖着一层黏液毯,是其下面上皮细胞的保护性生理屏障,可以防止脱水,吸附、捕获吸入的微粒、病原体等,并随着有规律的黏液纤毛运动,起到廓清的作用。其主要成分是上皮杯状细胞和黏膜下腺体细胞分泌的一种大分子糖蛋白——粘蛋白,而上皮细胞的外表面本身也有各种形式的糖复合物。这些糖复合物在保护细胞免受机械、化学损伤和介导细胞与其他细胞及细胞外物质的特异性识别中起着重要的作用[1]。铜绿假单胞菌是一种常见的条件致病菌,免疫低下和气道局部受损的患者对其尤为敏感。细菌要引起气道的感染,必然与上述糖复合物发生一系列的相互作用,其末端唾液酸结构的作用也备受关注。本研究以气管内滴入盐酸致伤大鼠为模型,分别用唾液酸双糖竞争性抑制、植物凝集素特异性封闭及唾液酸酶(又称神经氨酸酶)水解相应唾液酸的方法,从三个方面同时观察对受损气管铜绿假单胞菌感染的抑制作用,希望对以后的抗感染治疗有一定的提示意义。

作者简介: 黄 勇(1970-),男,四川省资中县人,博士研究生,主治医师、讲师,主要从事气道分泌与调控方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68755320 E-mail: yhuang@mail.tmmu.com.cn

通讯作者: 钱桂生,电话:(023)68755603, E-mail: qiangs@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2005-12-28; **修回日期:** 2006-01-12

1　材料与方法

1.1　细菌与干预物

对数生长期的铜绿假单胞菌株 ATCC27853 用 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline，PBS）调整到浊度为 0.5 麦氏单位，继续稀释 50 倍，分别与等体积 10 mmol/L PBS（对照组）；20 mmol/L 唾液酸双糖（德国 Lectinity 公司）——唾液酸 α2,3-半乳糖（Sial α2,3-Gal）、唾液酸 α2,6-N-乙酰氨基半乳糖（Sial α2,6-GalNAc）；特异性植物凝集素（2 mg/ml Sial α2,3-结构特异性的 Maackia amurensis agglutinin，MAA；200 μg/ml Sial α2,6-结构特异性的 Sambucus nigra agglutinin，SNA，美国 Sigma 公司）；160 mU/ml 肺炎链球菌源性 α2,3-特异性唾液酸酶和霍乱弧菌源性非特异性唾液酸酶（美国 Sigma 公司）混匀待用。

1.2　动物实验步骤

体质量为 180 g 左右的雄性 Wistar 大鼠 140 只（第三军医大学野战外科研究所实验动物中心提供），按 30 min、48 h 两个时相点分别分 7 组，每组 10 只。2.5 ml 1% 氯胺酮腹腔注射麻醉，仰卧位固定四肢及上门齿，用自制“L”型拉钩，暴露声门，直视下将静脉留置针插入声门稍下方，缓慢注入 100 μl 0.05 mol/L HCl；30 min 后再分别注入 100 μl 上述混合液；又 30 min 后第一批大鼠股动脉放血，局部消毒后迅速完整分离气管，从声门下至隆突完全离断，在灭菌生理盐水中适当洗涤，取出后称重，重新加入 2 ml 灭菌生理盐水中，彻底匀浆，取 150 μl 并 10 倍稀释 2 次，共 3 个 100 μl 样品分别与 10 ml 灭菌后冷却至 40～50℃的 1% Luria-Bertani 琼脂培养基混匀后铺板，37℃细菌孵箱中孵育 36 h 后计数菌落；另一批大鼠继续清洁饲养，48 h 后按前述方法处理。每组取 2 只大鼠，处理方法不变，气管离断后 10% 甲醛固定，石蜡包埋，HE 染色。

1.3　统计学分析

细菌计数单位为菌落形成单位（clonal formation unit，cfu）。采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS v12.0 软件做 t 检验。

2　结果

2.1　病理学改变

显微镜下盐酸致伤大鼠气管内接种细菌后，气管上皮部分脱落，纤毛缺失或倒伏，炎症细胞浸润，杯状细胞和分泌性腺体细胞出现不同程度的增生，48 h 组更为明显（图 1）。各组间病理学改变无明显差异。

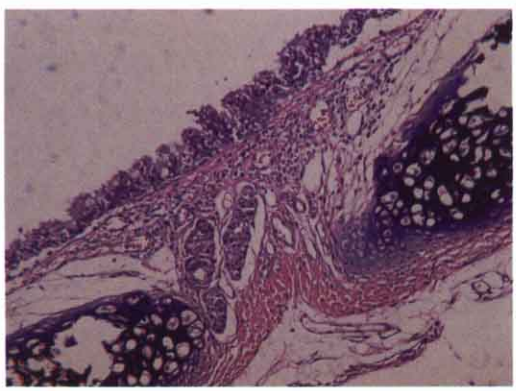


图 1　盐酸致伤大鼠气管内接种细菌 48 h 后的病理改变　（HE×100）

2.2　气管菌落计数

针对唾液酸 α2,3-结构的双糖 Sial α2,3-Gal、特异性植物凝集素 MAA 及唾液酸酶都能明显地减少铜绿假单胞菌接种 30 min 后气管粘附的菌落数，而只有双糖 Sial α2,3-Gal 和唾液酸酶能显著减少接种 48 h 后气管的菌落数。而针对唾液酸 α2,6-结构的双糖和特异性植物凝集素 SNA 均没有明显抑制作用。特异性 α2,3-唾液酸酶和非特异性唾液酸酶在 2 个时相点的抑制作用大致相当，彼此间无统计学差异（$P>0.05$）（表 1）。

表 1　大鼠气管菌落计数（$n=8$，$\times 10^2$cfu/g，$x \pm s$）

组别	30 min	48 h
对照组	34.29 ± 4.60	1 939.95 ± 266.34
双糖		
Sial α2-3Gal	12.30 ± 1.18[b]	1 635.93 ± 162.63[a]
Sial α2-6GalNAc	30.26 ± 3.87	1 781.60 ± 206.94
凝集素		
MAA	27.32 ± 3.95[b]	1 865.77 ± 271.81
SNA	31.20 ± 2.68	1 920.85 ± 307.42
唾液酸酶		
α2,3-	28.43 ± 5.42[a]	1 679.83 ± 205.09[a]
非特异性	25.61 ± 3.87[b]	1 686.40 ± 159.02[a]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较

3　讨论

在炎症过程中，细菌产物的刺激可以导致上皮细胞表面的糖复合物及杯状细胞、黏膜下腺体细胞分泌的粘蛋白增多，尤其是后者，糖基化程度也明显增加，其末端的唾液酸化和硫酸化备受关注，并被认为可以反映感染的严重程度[1-3]。在感染的初期，细菌被吸入气道后又被上皮细胞表面的黏液层所捕获，粘附于粘蛋白上；细菌在局部定植；逐渐有细菌渗透到上皮细胞表面，与膜糖复合物结合，作用于上皮细胞并进一步繁殖，使感染深化。铜绿假单胞菌的菌毛、鞭毛蛋白及部分外膜蛋白都是其粘附素，可以特异性地识别相应的糖基化结构，其中粘蛋白的唾液酸化 Lewis X、3-硫酸化 Lewis X、6-硫酸唾液酸化 Lewis X 等糖抗原是其主要的受体，而上皮细胞表面则是以岩藻糖 α1,3-和无唾液酸糖复合物更为侧重[1,4,5]。

以往对唾液酸与铜绿假单胞菌相互作用的研究都比较分散，更少见到体内的研究结果。气道粘蛋白末端唾液酸化主要以 Sial α2,3-Gal 和 Sial α2,6-GalNAc 的形式出现，α2,3-唾液酸化结构在感染时明显增多，也是铜绿假单胞菌主要的唾液酸结合位点[1,5]。针对该细菌对受损的气道上皮敏感，本研究以气管内滴入盐酸导致大鼠气管受损，再接种细菌以研究对其粘附和繁殖的影响因素。两种唾液酸双糖 Sial α2,3-Gal 和 Sial α2,6-GalNAc 竞争性抑制气道粘蛋白及上皮表面膜糖复合物中唾液酸糖受体与细菌的结合；植物凝集素 MAA 特异性结合糖复合物中的 Sial α2,3-结构，

以封闭细菌可结合的相应糖受体，而 SNA 也特异性地封闭了 Sial α2,6-结构；唾液酸酶亦可水解相应结构，从三个方面同时观察了抑制作用。因为没有 α2,6-特异性唾液酸酶，而采用了比较 α2,3-特异性唾液酸酶和非特异性唾液酸酶作用效果的方法。在本研究中，对应唾液酸 α2,3-结构的双糖 Sial α2,3-Gal、特异性植物凝集素 MAA 和两种唾液酸酶都能显著地减少铜绿假单胞菌接种 30 min 后气管粘附的菌落数，特异性 α2,3-唾液酸酶和非特异性唾液酸酶在抑制程度上没有差异，而对应唾液酸 α2,6-结构的双糖、凝集素均没有明显作用，提示在细菌粘附于气管的环节主要是以唾液酸 α2,3-结构为相应受体。双糖的抑制作用似乎更强一些，也有唾液酸酶尚未充分起作用的因素。只有 Sial α2,3-Gal 双糖和唾液酸酶能减少接种细菌 48 h 后气管的菌落数，两种唾液酸酶的作用强度仍没有显著差异。根据文献报道和本研究中的病理学观察，此时已基本形成了感染，各种试剂并没有导致气管病理学形态的差异。尽管注入的稀盐酸、细菌及干预物均有可能进入支气管和肺组织，但因本研究主要是针对气管，且存在难以控制的其他影响因素，故未做支气管和肺组织的相关研究。

综合上述结果，针对唾液酸 α2,3-结构的寡糖和唾液酸酶在抑制铜绿假单胞菌粘附于气管和繁殖上都有显著的作用。由于分泌型粘蛋白和上皮细胞表面糖复合物的细菌受体还各有侧重，特异性双糖的前景似乎更为看好，如果加以研究开发，可以为抗菌提供新的途径。从理论上讲，唾液酸酶水解了末端的唾液酸后，暴露了其下面的糖基，如果这些糖基对细菌的结合能力更强，细菌在局部的粘附及感染应该更严重。比如使用硫酸酯酶就存在类似的情况[1,2,6]，而唾液酸酶并非如此，可能与只存在硫酸唾液酸化，而不存在唾液酸硫酸化糖复合物有一定关系，这也说明唾液酸基比硫酸基更适合做抑制作用研究的靶点。特异性植物凝集素封闭以后的抑制作用不佳，除了提示糖基封闭剂抑制效果差外，也可能是因为这些植物凝集素尚不能完全封闭相应糖基。

参考文献：

[1] ROUSSEL P, LAMBLIN G. The glycosylation of airway mucins in cystic fibrosis and its relationship with lung infection by Pseudomonas aeruginosa[J]. Adv Exp Med Biol, 2003, 535: 17-32.

[2] DEGROOTE S, MAES E, HUMBERT P, *et al*. Sulfated oligosaccharides isolated from the respiratory mucins of a secretor patient suffering from chronic bronchitis[J]. Biochimie, 2003, 85(3-4): 369-379.

[3] MARSHALL L J, PERKS B, BODEY K, *et al*. Free secretory component from cystic fibrosis sputa displays the cystic fibrosis glycosylation phenotype[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2004, 169(3): 399-406.

[4] LILLEHOJ E P, KIM H, CHUN E Y, *et al*. Pseudomonas aeruginosa stimulates phosphorylation of the airway epithelial membrane glycoprotein Muc1 and activates MAP kinase[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004, 287(4): L809-L815.

[5] MORELLE W, SUTTON-SMITH M, MORRIS H R, *et al*. FAB-MS characterization of sialyl Lewis x determinants on polylactosamine chains of human airway mucins secreted by patients suffering from cystic fibrosis or chronic bronchitis[J]. Glycoconj J, 2001, 18(9): 699-708.

[6] KING S J, HIPPE K R, GOULD J M, *et al*. Phase variable desialylation of host proteins that bind to streptococcus pneumoniae *in vivo* and protect the airway[J]. Mol Microbiol, 2004, 54(1): 159-171.

（编辑 栗 嘉）

（上接461页）

是一个很强的损伤因子，反流性食管炎症状的缓解和损伤黏膜的愈合均高度依赖于胃酸控制[3]。故抑酸治疗被公认是治疗反流性食管炎的主要方法之一。

但研究显示，反流性食管炎虽与胃酸有关，但仅有5%～28%的患者胃酸增多。因此对部分中、重度反流性食管炎患者，单用质子泵抑酸剂不能达到内镜下食管炎愈合。考虑可能与单纯性抑酸不能改善食管与胃的动力、不能根本上阻止反流有关，同时强力制酸又可延缓胃排空，导致食管与胃酸的长时间接触。因此对中、重度反流性食管炎患者在进行抑酸治疗的同时，加强促胃动力治疗是必要的。促动力药物均能加快胃排空，减少胃食管反流，增强食管的清除力，同时增加 LES 张力，增强抗反流屏障。

莫沙比利是强效选择 5-羟色胺（5-HT4）受体激动剂，通过兴奋肌肉神经丛的 5-HT4 受体，刺激乙酰胆碱释放，从而加强食管和胃肠道蠕动，增加 LES 压力，以减少胃酸性内容物食管反流及其在食管暴露时间，使反流性食管炎症状缓解，并促进损伤黏膜愈合。本研究联合应用奥美拉唑与莫沙比利，治疗中，重度反流性食管炎的症状控制有效率和内镜有效率分别为92.6%和86.4%，与单纯应用奥美拉唑相比差异有显著性差异（$P<0.05$）。说明在使用抑酸剂的同时合用胃肠动力药莫沙比利可以显著改善其治疗反流性食管炎的效果。

关键词：奥美拉唑；莫沙比利；反流性食管炎
中图法分类号：R571.053 文献标识码：B

参考文献：

[1] AVIDAN B, SONNENBERG A, SCHNELL T G, *et al*. Acid reflux is a poor predictor for severity of erosive reflux esophagitis[J]. Dig Dis Sci, 2002, 47(11): 2565-2573.

[2] INOUE H, IMOTO I, TAGUCHI Y, *et al*. Reflux esophagitis after eradication of Helicobacter pylori is associated with the degree of hiatal hernia[J]. Scand J Gastroenterol, 2004, 39(11): 1061-1065.

[3] 吴小平，浅奇荫. 胃酸抑制与反流性食管炎的愈合[J]. 中华消化杂志，2003，23(3)：178-179.

（编辑 张大春）