文章编号:1000-5404(2007)07-0579-03

论著

缓激常泰拮抗细菌潜生体对肥大细胞激活作用的实验研究

刘俊康,吴小兰,陈 杰,徐启旺 (第三军医大学医学检验系生物波研究室,重庆 400038)

提 要:目的 观测缓激常泰拮抗细菌潜生体激活肥大细胞的作用。**方法** 以头孢呋辛钠诱导大肠杆菌产生,体外以细菌潜生体为对照,分别观测不同剂量缓激常泰对细菌潜生体激活肥大细胞的拮抗作用。**结果** 中、高剂量的缓激常泰具有显著的拮抗作用,与对照组有显著性差异。**结论** 一定剂量的缓激常泰具有稳定肥大细胞的作用。

关键词:肠易激综合征;细菌潜生体;肥大细胞
中图法分类号:R378.2;R574.02;R977.6 **文献标识码**:A

Effect of GlcNAc against activation of bacterial cryptic growth cells to mast cells

LIU Jun-kang, WU Xiao-lan, CHEN Jie, XU Qi-wang (Research Center of Bio-wave, Department of Laboratory Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To demonstrate the inhibitory effect of GlcNAc on the bacterial cryptic growth cells (CGC) activating mast cells. Methods *E. coli*. CGC was induced by Zinacef, *in vitro* taking the CGC acting on mast cells as control. The antagonistic effect of GlcNAc on mast cells activated by CGC with different dosages was demonstrated. Results The significant inhibitory effect of GlcNAc against the activation of CGC on mast cells was found as compared with controls. Conclusion Certain dosage of GlcNAc possesses the capacity of stabilizing mast cells. This has laid a foundation for elucidating the therapeutic effect of GlcNAc on irritable bowel syndrome.

Key words: irritable bowel syndrome; bacterial cryptic growth cells; mast cells

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种新近日益受到重视的功能性疾病[1],但是其发病机制仍不确切[2]。有研究认为肥大细胞在IBS的发病中可能具有重要作用[3],但仅仅停留在组织结构位置关系和肥大细胞效应与IBS症状的相互联系判断上[4],具体的作用机制尚不清楚。此间,生物波理论研究已证实细菌潜生体在IBS发病中有重要作用,并且在实验中已证实可以激活肥大细胞[5]。本研究在此基础上研究作为IBS的治疗药物,化学本质为N-乙酰氨基葡萄糖(N-Acetyl-D-glucosamine, GlcNAc)的缓激常泰(有效成分为GlcNAc)是否存在通过拮抗CGC对肥大细胞的激活作用而发挥治疗作用的机制,现将实验报告如下。

基金项目:重庆市自然科学基金(CSTC2006BB5068)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC 2006BB5068)

作者简介:刘俊康(1968-),男,山西省忻州市人,博士,副教授,主要从事生物复杂性方面的研究。电话:(023) 68752191, E-mail: liujunkang@163.com

收稿日期:2006-06-22;修回日期:2006-12-07

1 材料与方法

1.1 受试药物

GlcNAc,江苏江山制药有限公司,含量99.4%,90~110 mg/片。用双蒸水配制成含量分别为2.275、3.25、4.875 g/L的溶液。

1.2 动物

中国医学科学院北京协和医院动物研究所,Wistar大鼠30只,合格证号:SYXK11-00-0041,体质量:180~220 g,雌雄各半。全价营养颗粒饲料,自由饮水。室温(24±2)℃,相对湿度45%~60%,12 h一次明暗周期交替。

1.3 试剂和仪器

1.3.1 试剂及配制 头孢呋辛钠,葛兰素威康集团生产;戊巴比妥钠,购自北京协和医院设备科;3%的戊巴比妥纳溶液,称取300 mg戊巴比妥钠,溶解于10 ml蒸馏水中,用前临时配制;中性红染料为市售,配制成乙醇溶液备用。

1.3.2 器材 Olympus多功能显微镜,日本Olympus公司,配置有型号为UPlanFL,含10×、20×、40×、100×平场消色差镜头;原子力显微镜,日本精工公司,型号SPI3800N-SPA400,应用原子力显微镜AFM的气相模式,在该种模式下使用了100 μm Scanner, Triangle 200 nm的cantilever,及相应的探针支架。

1.4 拮抗 CGC 激活肥大细胞试验

1.4.1 肥大细胞的分离 采用大白鼠腹腔内注射 0.01 mol/L 的 PBS(pH 7.2)溶液 30 ml,轻揉腹部 5 min 后,收集腹腔渗出液于干净培养瓶中,37 ℃孵育 30 min 后以黏附法去除其中混杂的巨噬细胞,再混悬收集没有黏附瓶壁的肥大细胞,以 1 000 r/min 离心 10 min 弃去上清液,收集肥大细胞,加入适量 PBS 液,制备成密度约为 1×10^5/ml 的悬液,用于试验。

1.4.2 大肠杆菌 CGC 的诱导 分离大鼠肠道大肠杆菌,调节稀释度;采用 K-B 法以头孢呋辛钠诱导 CGC 产生,从抑菌圈边缘处收集细菌 CGC,配制成大肠杆菌 CGC 悬液,备用。

1.4.3 MC 染色盖玻片的制备 将中性红染液滴于盖玻片上,自然淌开,置 56 ℃温箱烘干,备用。

1.4.4 细菌 CGC 和 GlcNAc 对肥大细胞脱颗粒反应试验 将新制备的肥大细胞悬液分装于 5 支无菌试管中,并分别加入 PBS 液、3 种浓度 GlcNAc 溶液、细菌 CGC 悬液,37 ℃恒温箱孵育 30 min 后,分别取 1 滴于载玻片上,将滴有中性红染液的盖玻片覆盖其上,立即进行光镜观察。

1.4.5 GlcNAc 防止 CGC 对肥大细胞的激活作用测定 将新鲜制备的肥大细胞悬液分装于 4 支无菌试管中,分别加入 PBS 液、3 个浓度 GlcNAc 溶液,37 ℃恒温箱孵育 30 min 后,分别加入等量细菌 CGC 悬液,37 ℃恒温箱孵育 30 min 后,分别取 1 滴于载玻片上,将滴有中性红染液的盖玻片覆盖其上,立即进行光镜观察。

1.4.6 GlcNAc 对 CGC 引起肥大细胞脱颗粒反应的阻断作用试验 将新鲜制备的肥大细胞悬液中加入细菌 CGC 悬液,37 ℃恒温箱孵育 5 min 后,分装于 4 支无菌试管中,分别加入 PBS 液、3 种浓度 GlcNAc 溶液,37 ℃恒温箱孵育,于 5、15、30、60 min 分别取 1 滴于载玻片上,将滴有中性红染液的盖玻片覆盖其上,立即进行光镜观察。

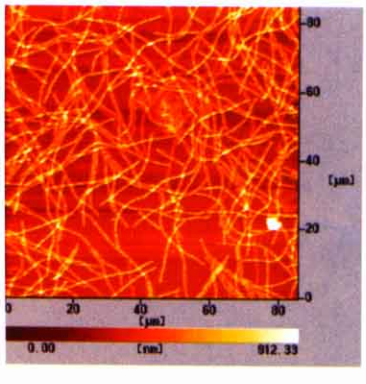
1.5 统计学分析

采用统计软件 SPMR 进行 t 检验。

2 结果

2.1 头孢呋辛钠诱导的大肠杆菌 CGC,原子力显微镜扫描观察结果

由图 1 可见,细菌 CGC 密集排列,长度 20~30 μm,宽度 1 μm。



扫描高度:584 nm。扫描面积:85 μm×85 μm

图 1 大肠杆菌 CGC 原子力显微镜扫描结果

2.2 肥大细胞脱颗粒观察结果

镜下可见细菌潜生体作用后肥大细胞颗粒逸出膜外,细胞形态不完整(图 2)。

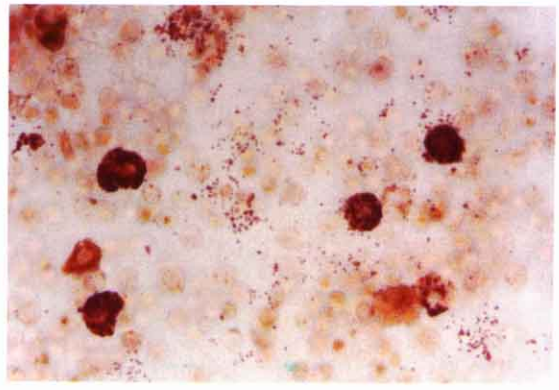


图 2 肥大细胞脱颗粒实验 (中性红染色 ×400)

图 3 可见,中性红染红肥大细胞形态正常,并未见其颗粒脱出,表明 GlcNAc 作用后能阻止 CGC 对肥大细胞的激活作用。



图 3 GlcNAc 对 CGC 引起肥大细胞脱颗粒反应的阻断作用
(中性红染色 ×400)

2.3 细菌 CGC 及 GlcNAc 对肥大细胞脱颗粒反应的影响

细菌潜生体可引起大量肥大细胞脱颗粒,与 PBS 液对照组相比差异非常显著($P<0.01$);3 个剂量 GlcNAc 实验组肥大细胞脱颗粒反应与 PBS 液对照组相比无显著性差异($P>0.05$),见表 1。

表 1 不同物质对肥大细胞脱颗粒反应试验结果[$(x\pm s)$%]

组别	脱颗粒细胞所占比例
PBS 液对照组	2±0.18
细菌 CGC 实验组	32±2.80[b]
低剂量实验组	4±0.35[a]
中剂量实验组	3±0.25
高剂量实验组	3±0.32

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 PBS 液对照组比较

2.4　GlcNAc 防止 CGC 对肥大细胞的激活作用测定结果

低、中、高 3 个剂量的 GlcNAc 提前同肥大细胞孵育 30 min，对再加入 CGC 的对肥大细胞激活作用有显著和非常显著的防止作用，并且均与 CGC 作用对照组有显著差异（$P<0.05$），见表 2。

表 2　GlcNAc 防止 CGC 对肥大细胞的激活作用测定结果

［$(\bar{x}\pm s)\%$］

组别	脱颗粒数
CGC 作用对照组	42 ±4.8
低剂量实验组	18 ±2.1[a]
中剂量实验组	8 ±0.90[b]
高剂量实验组	7 ±0.68[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 CGC 作用对照组比较

2.5　GlcNAc 对 CGC 引起肥大细胞脱颗粒反应的阻断作用试验结果

由表 3 可知，CGC 作用对照组随时间变化 60 min 时与 5 min 时相比，肥大细胞脱颗粒数量变化非常显著（$P<0.01$）；中、高剂量 GlcNAc 实验组肥大细胞脱颗粒数量随时间变化 60 min 时与 5 min 相比，无显著差异（$P>0.05$）；低剂量 GlcNAc 实验组 60 min 与 5 min 相比，脱颗粒细胞数量间有显著性差异（$P<0.05$）；60 min 时，中、高剂量 GlcNAc 实验组肥大细胞脱颗粒数量与 CGC 作用对照组相比差异非常显著（$P<0.01$），低剂量 GlcNAc 实验组和空白对照组差异显著（$P<0.05$）。表明低剂量 GlcNAc 有一定的拮抗作用，中、高剂量 GlcNAc 对 CGC 激活肥大细胞脱颗粒反应有显著阻断作用。

表 3　GlcNAc 对 CGC 引起肥大细胞脱颗粒反应的阻断作用试验结果

组别	检测时间（t/min）			
	5	15	30	60
CGC 作用对照组	18 ±2.0	30 ±3.3	45 ±4.0	53 ±5.6
低剂量实验组	16 ±1.9	23 ±2.1	26 ±2.3	35 ±3.1[a]
中剂量实验组	18 ±1.7	21 ±1.8	19 ±1.7	24 ±2.3[b]
高剂量实验组	16 ±1.2	17 ±2.6	20 ±3.4	23 ±4.5[b]

a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与 CGC 作用对照组比较

3　讨论

肥大细胞参与体内多种应激过程，可以受到众多因素的影响而激活，出现脱颗粒反应，引起血管扩张，平滑肌痉挛，和腺体分泌等一系列反应[6]。在有关 IBS 发病机制方面，脑-肠轴的研究近来受到关注，其中肥大细胞在 IBS 发病中有重要的作用受到重视[3]。

结肠作为 IBS 核心症状表达区域，肥大细胞的活动在此局部发挥关键作用。IBS 患者肠黏膜肥大细胞活化增多，采用肥大细胞稳定剂治疗后患者症状明显减轻[7]。这些无疑证实了肥大细胞与 IBS 内脏敏感性关系密切。肥大细胞可接受诸如 IgE 桥联，肠道感染，食物刺激甚至心理应激而激活，更有意义的是肠道革兰阴性杆菌通过菌丝蛋白 FimH lectin（一种 mannose 或 GlcNAc 的凝激素），与肥大细胞表面的含有甘露糖的 CD48 分子结合而激活肥大细胞，使之脱颗粒释放炎性介质[8]。这使抗菌素使用后肠道细菌转变而成的纤细丝状结构的细菌潜生体与肥大细胞之间找到了紧密联系之处。本研究结果提示细菌潜生体有可能通过激活肥大细胞而引起 IBS 相关疾状；从而充当 IBS 的一种发病原因。同时也证明了 GlcNAc 可以拮抗大肠杆菌 CGC 对肥大细胞的激活作用，这提示 GlcNAc 可能存在着这种稳定肥大细胞控制 IBS 患者症状或治疗 IBS 的作用机制。

参考文献：

[1] Gerson M J, Gerson C D, Awad R A, *et al*. An international study of irritable bowel syndrome: family relationships and mind-body attributions[J]. Soc Sci Med, 2006, 62(11): 2838 - 2847.

[2] Gilkin R J, Jr. The spectrum of irritable bowel syndrome: A clinical review[J]. Clin Ther, 2005, 27(11): 1696 - 1709.

[3] Lackner J M, Lou-Coad M, Mertz H R, *et al*. Cognitive therapy for irritable bowel syndrome is associated with reduced limbic activity, GI symptoms, and anxiety? [J]. Behav Res Ther, 2006, 44(5): 621 - 638.

[4] Dunlop S P, Jenkins D, Spiller R C. Distinctive clinical, psychological, and histological features of postinfective irritable bowel syndrome [J]. Am J Gastroenterol, 2003, 98(7): 1578 - 1583.

[5] Theoharides T C, Cochrane D E. Critical role of mast cells in inflammatory diseases and the effect of acute stress[J]. J Neuroimmunol, 2004, 146(1 - 2): 1 - 12.

[6] Carvalho R F, Ribeiro R A, Lima R C, *et al*. Angiotensin II potentiates inflammatory edema in rats: Role of mast cell degranulation[J]. Eur J Pharmacol, 2006, 540(1 - 3): 175 - 182.

[7] 杨云升，周殿元，张万岱，等. 肠易激综合征回盲部肥大细胞的研究[J]. 中华内科杂志，1997，36(4)：231 - 233.

[8] Feger F, Varadaradjalou S, Gao Z, *et al*. The role of mast cells in host defense and their subversion by bacterial pathogens[J]. Trends Immunol, 2002, 23(3): 151 - 158.

（编辑　汪勤俭）