维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)08-0839-04

抗生素诱导小鼠肠道菌群失调对免疫功能和 Toll 样受体 2、4 基因表达的影响

刘崇海,杨锡强,刘恩梅,赵晓东,刘 玮,王莉佳

(重庆医科大学附属儿童医院免疫实验室,重庆 400014)

【摘 要】目的:探讨抗生素诱导小鼠肠道菌群失调后对机体免疫功能和 Toll 样受体 2、4 的影响。方法:60 只 BALB/c 小鼠分为 2 组:抗生素组和对照组,抗生素组连续 7 天口服头孢哌酮,7 天后经口给予白色念珠菌。结果:抗生素组小鼠肠道内肠杆菌、肠球菌、双歧杆菌、乳酸杆菌较对照组减少,白色念珠菌增加;脾指数、PHA 诱导的淋巴细胞转化率、迟发型变态反应、抗体生成细胞数和脾脏的 TLR2 和 TLR4 基因表达水平均低于对照组。结论:抗生素诱导肠道菌群失调后小鼠免疫功能和 TLR2、TLR4 mRNA 表达均降低。

【关键词】抗生素;肠道菌群;免疫功能;Toll 样受体

【中国图书分类法分类号】R322 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-12-15

Influence of intestinal flora dysregulation induced by antibiotic on immunity and toll-like receptor 2,4 gene expression in mice

LIU Chonghai, et al

(*Laboratory of Immunology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effects of intestinal flora dysregulation induced by antibiotic on immune function and toll-like receptor (TLR) 2,4. *Methods*: Sixty BALB/c mice were divided into two groups: antibiotic and control group. The mice in antibiotic group were treated with cefoperazone orally for consecutive 7 days. After 7 days, mice were inoculated with Candida albicans. *Results*: The quantity of Enterobacteriaceae, Enterococcus, Bifidobacterium and Lactobacillus in antibiotic therapy group was significantly lower than that in the control group. The quantity of Candida albicans increased in the antibiotic therapy group. Spleen index, lymphocytic transformation rate induced by PHA, delayed-type hypersensitivity and the number of antibody secreting cells, the gene expression of TLR2 and TLR4 mRNA in spleen were lower than those in the control group. *Conclusions*: The intestinal flora dysregulation induced by antibiotic may decrease the immune function and toll-like receptor 2,4 gene expression in mice.

【Key words】 Antibiotic; Intestinal flora; Immunity function; Toll-like receptor

肠道正常菌群所形成的庞大而复杂的微生态系统对机体有重要的生理意义,包括抵御病原体入侵、刺激机体免疫器官的成熟、激活免疫系统及参与合成多种维生素、调节物质代谢等作用。当肠道菌群出现菌群失调时,对机体会产生诸多不良影响。Toll 样受体(Toll-like receptor,TLR)是天然免疫中重要的模式识别受体[1],通过信号传导途径,激活多种前炎性因子,参与抗感染的炎症过程。目前对肠道菌群失调后的适应性免疫状态研究较多,但肠道菌群失调后 TLR 的改变研究较少。因此我们采用临床上常用的头孢哌酮诱导小鼠肠道菌群失调,观察小鼠免疫功能以及 TLR2 和 TLR4 基因表达的变化。

作者介绍:刘崇海(1976-),男,讲师,博士生,主要研究方向:哮喘发病和预防。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级雌性 BALB/c 小鼠共 60 只,3 周龄,由重庆医科大学实验动物中心提供并代养,按实验要求随机分 2 组,每组 30 只。

1.2 主要实验材料

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2.1 白色念珠菌 临床分离并鉴定的白色念珠菌由重庆医科大学附属儿童医院检验科提供,实验前 5 天将白色念珠菌接种在沙氏培养基上,置于 37℃培养箱中培养,待长成明显菌落后,收集培养基表层白色念珠菌,PBS 洗 3 次,用血球计数池计数并将白色念珠菌调整为 10^9CFU/ml 浓度,4℃保存备用。

1.2.2 绵羊红细胞(SRBC) 无菌取绵羊红细胞 10ml,加肝素钠抗凝,用生理盐水洗涤 3 次,每次 2000r/min 10min 离心,除去其中的纤维蛋白和血小板等。离心后弃上清液,取适量 SRBC 用生理盐水配成 2%和 20%浓度的细胞悬液,4℃保存备用。

1.2.3 补体 5 只成年豚鼠经乙醚麻醉后,暴露股动脉,经股动脉取血,分离血清,混合后分装,置 -70℃保存备用。使用时用 SA 缓冲液(含巴比妥酸 0.406g/L,$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.1g/L,$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.2g/L,氯化钠 8.38g/L,碳酸氢钠 2.5g/L,巴比妥钠 0.3g/L)1:10 稀释。

1.2.4 肠球菌、肠杆菌、双歧杆菌、乳酸杆菌和白色念珠菌选择性培养基 EMB、EC、BS、LBS 和沙氏培养基均由本实验室配制。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型建立 60 只小鼠分 2 组:头孢哌酮(海南斯达制药有限公司)加白色念珠菌处理组(简称抗生素组)和对照组,抗生素组连续口服抗生素头孢哌酮 7 天,25mg/(只·天),第 7 天经口给予白色念珠菌 1 次,50μl/只,促进小鼠肠道内菌群失调。第 8 天每组 10 只小鼠取盲肠内容物做细菌、真菌培养计数和脾指数及植物血凝素(PHA)诱导的小鼠淋巴细胞转化实验,剩下 20 只用于迟发型变态反应和抗体生成细胞数的测定。对照组小鼠用等量生理盐水代替抗生素、白色念珠菌和 SRBC 进行实验。

1.3.2 肠道细菌培养计数 小鼠断颈后暴露盲肠,取盲肠内容物 0.1g,加 0.9ml 稀释液,在涡旋器上 200r/min 振荡 10min,均质化的标本为 10^{-1} 稀释度,取此稀释度标本 0.1ml 加入稀释液 0.9ml 混匀,该稀释度为 10^{-2} 稀释度,如此次第稀释到 10^{-6} 稀释度。取 EMB、EC、LBS、BS 和沙氏培养基分别作肠杆菌、肠球菌、乳酸杆菌、双歧杆菌和白色念珠菌培养和计数。取 10^{-4}、10^{-5}、10^{-6} 3 个稀释度,每次取 10μl 标本液滴种于培养基上,每个稀释度接种 3 个滴液,以便计算均值。将 BS 和 LBS 培养基放入厌氧罐中采用 Gaspak 厌氧法培养,37℃厌氧培养 48~72h,将 EMB、EC 和沙氏培养基放入 37℃孵箱需氧培养,24~48h 后观察结果。选择菌落数在 10~50 个的稀释度进行菌落计算,结果以 Log 的菌落形成单位 /g(CFU/g)表示。菌株的鉴定:根据菌落形态特征、Gram 染色、镜下菌体形态及生化反应进行鉴别(由检验科人员完成)。

计算公式:CFU/g= 每一稀释度平均菌落数 × 稀释倍数 / 滴种体积(ml)

1.3.3 脾指数测定 小鼠断颈前测其体重,断颈后分离小鼠脾脏,用电子天平称脾脏重量,脾指数 = 脾脏重量 / 小鼠体重。

1.3.4 PHA 诱导的小鼠淋巴细胞转化实验(MTT 法) 小鼠断颈后浸入 75%的酒精消毒,无菌条件下取脾,用小弯剪在 300 目不锈钢筛网上剪碎脾脏,制成单个细胞悬液,PBS 液洗 3 次,每次 1500r/min 10min 离心。将洗过 3 次的细胞悬浮于 2ml 的 1640 培养液中,用台盼兰染色计数活细胞数,活细胞应在 95%以上,将细胞数调整为 2×10^6/ml。每份细胞悬液分 2 孔加入 12 孔培养板中,2ml/孔,其中一孔加 100μl PHA 使 PHA 终浓度为 5μg/ml,另外一孔不加 PHA 刺激作为对照。将培养板放入含有 5%CO_2 的 37℃培养箱中培养 72h,培养结束前 4h,每孔弃去培养液 1.5ml,加入 1.5ml 不含小牛血清的 1640 培养液,同时加入 MTT(5mg/ml)100μl/孔,孵箱中继续培养 4h。培养结束后弃去培养液,每孔加入二甲基亚砜 150μl,吹打混匀,使紫色结晶完全溶解,分别装到 96 孔平底培养板中,每孔分装 3 孔作为平行样,在酶标仪上比色。

转化值 = 加 PHA 刺激的 OD 值 - 不加 PHA 刺激的 OD 值。

1.3.5 检测迟发型变态反应(Delayed-type hypersensitivity, DTH) 实验第 7 天用 2%SRBC 腹腔注射,每只小鼠注射 0.2ml,4 天后,用游标卡尺测量左后足跖厚度,然后于测量部位皮下注射 20%SRBC 进行激发,每只小鼠注射 10μl。注射后于 48h 用游标卡尺测量左后足跖厚度,同一部位检测 3 遍。

DTH(mm)= 激发后足跖厚度 - 激发前足跖厚度

1.3.6 抗体生成细胞数的测定(定量溶血分光光度测定法[2]) 实验第 7 天用 2%SRBC 腹腔注射,每只小鼠注射 0.2ml,4 天后,取小鼠脾脏制成单个脾细胞悬液,用 SA 缓冲液配成 2×10^7/ml。在试管中加入脾细胞悬液 1ml(对照管用 SA 缓冲液 1ml 代替)、0.2%SRBC 1ml、1:10 补体 1ml,充分混匀,置 37℃水浴中温育 1h,取出用 3000r/min 10min 离心,吸取上清液用分光光度计测 413nm 的 OD 值。

1.3.7 小鼠脾脏 TLR2 和 TLR4 表达水平检测 按 Trizol 使用说明提取脾组织总 RNA,核酸定量仪定量后取 1ug RNA 逆转录合成 cDNA 进行 PCR。小鼠 β-actin 上游引物序列为 5'-ACCAACTGGGACGACATGGAGAAGATC-3',下游引物序列为 5'-TAGCCACGCTCGGTCAGGATCTTCAT-3',退火温度为 59℃,产物为 366bp;TLR2 上游引物序列为 5'-TCAAAAGTCGATCGGCGACAT-3',下游引物序列为 5'-TACCCAGCTCGCTCATCACGT-3',退火温度为 60℃,产物为 340bp;TLR4 上游引物序列为 5'-CAAGAACATAGATCT-GAGCTTCAACCC-3',下游引物序列为 5'-GCTGTCCAATAG GGAAGCTTTCTAGAG-3',退火温度为 62℃,产物为 278bp。产物用 1.5%琼脂糖电泳,凝胶成像系统扫描,Quantity one V4.4 软件进行定量分析。

1.4 统计方法

所有数据采用 SPSS11.0 统计软件分析,各组检测结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组比较采用两样本的 t 检验,$P<0.05$ 为差

维普资讯 http://www.cqvip.com

异,有统计学意义。

2 结 果

2.1 肠道菌群培养计数

小鼠肠道内细菌计数结果如表 1，抗生素组小鼠肠道内肠杆菌、肠球菌、双歧杆菌、乳酸杆菌较对照组减少,白色念珠菌增加($P<0.01$),表明肠道菌群的种类、数量和比例发生异常变化,偏离正常的生理组合,转变为病理性组合状态,出现肠道菌群失调。

2.2 免疫功能指标的检测(表 2)

抗生素组小鼠的脾指数、PHA 诱导的小鼠淋巴细胞转化率、迟发型变态反应(DTH)、抗体生成细胞数的测定结果均低于对照组($P<0.01$),说明抗生素诱导肠道菌群失调后小鼠免疫功能降低。

2.3 脾脏 TLR2 和 TLR4 基因表达水平

小鼠脾脏 β-actin、TLR2 和 TLR4 的 PCR 产物电泳结果如图 1,以 β-actin 为参照,用 Quantity one 软件进行定量分析各组 TLR 表达水平(见表 3),结果显示抗生素组小鼠脾脏的 TLR2 和 TLR4 基因表达水平均较对照组低($P<0.05$)。

表 1 肠道菌群数量($\log10^n/g$)

组别	肠球菌	肠杆菌	双歧杆菌	乳酸杆菌	白色念珠菌
对照组	7.139 ± 0.083	7.405 ± 0.051	8.420 ± 0.065	7.155 ± 0.089	0
抗生素组	6.199 ± 0.052	6.334 ± 0.046	7.368 ± 0.063	6.445 ± 0.032	5.337 ± 0.079
t 值	30.38*	49.32*	36.56*	23.72*	213.0*

注:$n=10$,*$P<0.01$

表 2 免疫功能指标的检测

组别	脾指数	淋巴细胞转化实验(OD)	DTH(mm)	抗体生成细胞数(OD)
抗生素组	0.0035 ± 0.0002	0.0086 ± 0.0016	0.094 ± 0.013	0.193 ± 0.004
对照组	0.0055 ± 0.0008	0.0147 ± 0.0020	0.152 ± 0.021	0.215 ± 0.007
t 值	2.23*	2.11*	2.13*	2.13*

注:$n=10$,*$P<0.01$

3 讨 论

正常情况下，肠道菌群与机体保持着和谐、稳定的平衡状态。肠道固有菌群的持续刺激被认为是免疫成熟所必需的。当肠道正常菌群的种类、数量和比例发生异常变化,偏离正常的平衡状态,转变为病理性组合状态,即为菌群失调。导致肠道菌群失调的原因主要有饮食改变、疾病和抗生素的使用。临床上最为常见的原因是抗生素的不合理使用,特别是广谱抗生素的长时间应用。由于国内外并没有抗生素诱导肠道菌群失调动物模型的金标准,我们参照 Noverr MC[3]等采用的方法建立了肠道菌群失调动物模型,选用临床上常用的头孢菌素类抗生素处理小鼠,并经口给予白色念珠菌,进一步促进其菌群失调,参照梁庆红等[4]所采用的方法判断小鼠肠道菌群失调动物模型建立是否成功。实验发现经头孢哌酮和白色念珠菌处理的小鼠肠道菌群结构发生了改变,表现在肠道内肠杆菌、肠球菌、双歧杆菌和乳酸杆菌数量下降,白色念珠菌数量上升,同时小鼠出现腹泻、皮毛凌乱无光泽,体重下降等表现[5],说明抗生素导致小鼠肠道菌群失调动物模型建立成功。Noverr MC[3]等采用类似方法建立了肠道菌群失调动物模型，发现停用抗生素后 12 天小鼠仍处于肠道菌群失调状态,说明这种肠道菌群失调动物模型比较稳定。

Oyama N[6]等连续 7 天给 3 周大小的 BALB/c 小鼠用卡那霉素导致小鼠肠道菌群失调,发现血清中总 IgG1 和 IgE 升高,IgG2 水平降低,脾细胞体外经抗 CD3 抗体刺激后 IL-4 分泌增加而 IFN-γ 降低,提示肠道菌群对免疫系统有明显影响。相关研究表

维普资讯 http://www.cqvip.com

明,肠道菌群失调后,小鼠脾脏巨噬细胞前体细胞、T 淋巴细胞的数量减少,脾脏溶血空斑数减少,巨噬细胞吞噬率降低[4,7]。我们在抗生素诱导小鼠肠道菌群失调动物模型的基础上检测了脾指数、反映细胞免疫功能的 DTH、PHA 诱导的小鼠淋巴细胞转化实验和反映体液免疫功能的抗体生成细胞数的测定,结果表明抗生素组小鼠的脾指数、PHA 诱导的小鼠淋巴细胞转化率、迟发型变态反应(DTH)、抗体生成细胞数的测定结果均低于对照组,说明由于缺乏肠道正常菌群的刺激和营养作用,影响了外周免疫器官的正常功能,机体的免疫功能下降。



注:中间条带是 maker,maker 左侧 3 个条带为对照组,右侧 3 个条带为抗生素组,每组从左至右分别是 β-actin、TLR2 和 TLR4 的 PCR 结果。

图 1 β-actin、TLR2 和 TLR4 的 PCR 结果

表 3 TLR2 和 TLR4 定量分析结果

组 别	TLR2/β-actin	TLR4/β-actin
抗生素组	0.45±0.11	0.52±0.11
对照组	0.64±0.12	0.63±0.12
t 值	2.10*	2.10*

注:n=10,*P<0.01

TLR 是一类可激活人体天然免疫,在感染早期发挥保护性作用的重要膜受体家族,目前在人类发现 10 种 TLR,在小鼠上发现 11 种 TLR,有限的 TLR 家族成员可对相对广泛的病原微生物进行识别,并通过胞质的 TLR 功能区向胞内传递信号,引起一系列免疫反应,它们在天然免疫中可发挥重要的抗感染免疫功能,并与免疫耐受、特异性抗感染免疫以及一些疾病相关。其中 TLR2 主要识别脂蛋白和肽聚糖,这些配体广泛存在于 Gram 阳性菌及支原体上[8]。TLR4 主要识别 Gram 阴性菌细胞膜上的 LPS,它是引起对 LPS 应答的主要受体[9]。我们实验发现,肠道菌群失调后,TLR2 和 TLR4 mRNA 的表达水平较对照组降低,分析原因可能是抗生素使用后,肠道菌群数量明显减少,机体免疫系统受到的菌群刺激减少,免疫压力减小;同时抗生素诱导肠道菌群失调,使脾脏缺乏肠道正常营养作用。由于 TLR 基因表达水平下降,有可能影响其下游的适应性免疫功能。但是抗生素诱导肠道菌群失调后是否对其他 TLR 产生影响以及 TLR 表达的改变如何影响适应性免疫有待于进一步研究。

综上所述,我们采用抗生素诱导肠道菌群失调,小鼠出现免疫应答能力降低,TLR2 和 4 基因表达水平下降,为抗生素使用导致肠道菌群失调对机体免疫功能影响提供了实验依据,提示在临床工作中要高度重视抗生素的合理使用,减少大剂量、广谱抗生素的长时间使用,重视微生态平衡,避免和减少肠道菌群失调对机体产生的不良影响。

(作者现单工作单位:川北医学院附属医院儿科,四川 637000)

参 考 文 献

[1] Kuroishi T,Tanaka Y,Sakai A,et al. Human parotid saliva contains soluble toll-like receptor(TLR)2 and modulates TLR2-mediated interleukin-8 production by monocytic cells[J]. Mol Immunol, 2007;44(8):1979-1986.

[2] 刘建文,施用晖,乐国伟.外源质粒 DNA 经胃肠道途径对小鼠免疫功能的影响[J]. 世界华人消化杂志,2004;12(11):2614-2617.

[3] Noverr MC,Noggle RM,Toews GB,et al. Role of antibiotics and fungal microbiota in driving pulmonary allergic responses[J]. Infect Immun, 2004;72(9):4996-5003.

[4] 梁庆红,张 琳,段恕诚,等.肠道菌群失调对小鼠免疫和造血功能状态的影响[J]. 中华儿科杂志,2004;42(9):708-711.

[5] 刘崇海,杨锡强,王莉佳,等.屋尘螨诱导肠道菌群失调小鼠变应性气道反应模型的建立[J]. 重庆医科大学学报,2007;32(1):40-43,58.

[6] Oyama N,Sudo N,Sogawa H,et al. Antibiotic use during infancy promotes a shift in the T(H)1/T(H)2 balance toward T(H)2-dominant immunity in mice[J]. J Allergy Clin Immunol,2001;107(1):153-159.

[7] Nicaise P,Gleizes A,Sandre C,et al. Influence of intestinal microflora on murine bone marrow and spleen macrophage precursors [J]. Scand J Immunol,1998;48(6):585-591.

[8] Kaisho T,Akira S. Toll-like receptor function and signaling[J]. J Allergy Clin Immunol,2006;117(5):979-987.

[9] Butchar JP,Parsa KV,Marsh CB,et al. Negative regulators of toll-like receptor 4-mediated macrophage inflammatory response[J]. Curr Pharm Des,2006;12(32):4143-4153.