

• 基础实验研究论著 •

干酪乳杆菌细胞壁成分构建川崎病动物模型*

张白杜, 顾晓琼[△], 夏健清, 黄 勇, 赵明光, 鲍丽娟
(广州市妇女儿童医疗中心临床检验部, 广东广州 510623)

摘要:目的 建立干酪乳杆菌细胞壁成分(LCWE)诱导的川崎病动物模型,为后续川崎病的相关研究提供实验材料。方法 LCWE 组小鼠经腹部及肌肉注射 LCWE,每只注射 0.1 mL(含 200 mg LCWE),PBS 组小鼠注射 0.1 mL PBS,分别于注射后第 1、3、28 天对小鼠进行眼眶取血,并解剖取心、肺、肝、肾、脾等脏器组织进行病理切片、HE 染色,观察组织病理变化,并对小鼠血液进行血常规检验。结果 LCWE 组在注射 LCWE 后第 1、3、28 天,WBC 逐渐上升,在注射 LCWE 后第 3 天 PLT 及 MPV 上升,第 28 天基本恢复正常。病理切片显示 LCWE 组小鼠心脏组织可见血管壁增粗且周围有炎症细胞浸润,有些可出现斑块。结论 成功建立了川崎病动物模型。

关键词:川崎病; 干酪乳杆菌; 细胞壁; 小鼠

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.21.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)21-2867-03

Establishment of mice Kawasaki disease model by *Lactobacillus casei* cell wall extract*

Zhang Baidu, Gu Xiaojiong[△], Xia Jianqing, Huang Yong, Zhao Mingguang, Bao Lijuan

(Clinical Laboratory of Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou, Guangdong 510623, China)

Abstract: Objective To establish mice models of Kawasaki disease by *Lactobacillus casei* cell wall extract(LCWE), in order to provide experimental materials for follow-up study. **Methods** LCWE group was given LCWE 0.1 mL per mouse(containing 200 mg LCWE) via abdominal intramuscular injection, PBS group was given 0.1 mL PBS per mouse. Orbital blood samples were collected respectively at the 1st, 3rd and 28th day after administration. The heart, lung, liver, kidney, spleen and other organs tissue samples were collected for pathological section, HE staining. The histopathological changes were investigated, and the routine blood test was proceeded. **Results** The WBC of LCWE group showed a trend of rising at the 1st, 3rd and 28th day after administration. PLT and MPV of LCWE group increased at the 3rd day after administration, which returned to normal levels at the 28th day after administration. The pathological section showed the blood vessel walls of heart tissue enlargement, surrounded and infiltrated by inflammatory cells infiltration, the atheromatous plaque in blood vessels occasionally. **Conclusion** The study established mice model of Kawasaki disease successfully.

Key words: Kawasaki disease; *Lactobacillus casei*; cell wall; mice

川崎病是一种主要发生在 5 岁以下婴幼儿的急性发热出疹性疾病^[1],在发达国家或地区,川崎病所致的冠状动脉并发症已取代风湿热成为小儿最常见的后天性心脏病^[2],静脉丙种球蛋白滴注(IVIG)和水杨酸制剂的及时使用可极大地降低冠状动脉病变的发生率,有 5%~6% 的患儿在 IVIG 治疗后仍可发生冠状动脉病变^[3],早期干预减少冠状动脉损伤意义重大,建立川崎病动物模型至关重要。目前国内外建立川崎病模型的动物包括小鼠、兔、猪和犬,其中小鼠常用的品系包括 C57BL/6J、C3H/HeN、CD1、DBA/2N 和 Balb/c 等,小鼠造模诱导剂主要为干酪乳杆菌细胞壁提取物和白色念珠菌提取物^[4],综合文献报道,本实验室选取成功率较高的 C57BL/6J 系小鼠作为实验动物,以干酪乳杆菌细胞壁提取物作为诱导剂,构建川崎病模型,为进一步研究川崎病治疗方法提供实验材料,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材料 实验菌株为干酪乳杆菌干酪亚种,编号 GIM1.159,购自广东省微生物研究所微生物菌种保藏中心(GIMCC)。

1.2 仪器与试剂 主要仪器:超声破碎机(Sonic & Materials

UC-100)、生物安全柜 Heal Force900、台式高速冷冻离心机(Z323K 型)、722S 分光光度计、AB104-N 型电子天平(经广州市质量技术监督局广州市计量测试所验证),BC-3000 型血常规分析仪。MRS 培养基:胰蛋白胨 10 g,牛肉膏 10 g,酵母膏 5 g,吐温-80 1 g, K₂HPO₄ 2 g, CH₃COONa 3 g, 枸橼酸三铵 2 g, 七水合硫酸镁 0.2 g, 一水合硫酸锰 0.05 g, 葡萄糖 20 g, 加水至 1 000 mL, 调节 pH 值为 6.2~6.4, 分装后 121 ℃ 高压灭菌 15 min。DNase I、RNase A 购自 Sigma 公司,胰蛋白酶购自广州威佳生物科技有限公司,均用 PBS 溶解,配成浓度为 100 mg/mL 的贮存液。蕙酮-硫酸溶液:称取 0.4 g 蕙酮溶于 200 mL 浓硫酸中,配成 0.2% 的蕙酮-硫酸溶液。蕙酮(分析纯)、无水硫酸、鼠李糖(MBCHEM)由国药集团化学试剂有限公司提供。

1.3 方法

1.3.1 干酪乳杆菌细胞壁复合成分(LCWE)的提取 (1)细菌培养:将-70 ℃冻存的干酪乳杆菌接种于 5 mL MRS 培养基中,37 ℃静置培养 1 d,取 0.5 mL 菌液接种于 50 mL MRS 液中,37 ℃培养过夜。取 10 mL 培养液接种于 500 mL MRS 液体培养基中,37 ℃培养 18~20 h。将培养液 4 ℃ 5 000 r/

* 基金项目:广东省自然科学基金资助项目(S2013010012520)。通讯作者,E-mail:guxiaojiong@163.com。

作者简介:张白杜,女,主管技师,主要从事临床检验基础研究。△ 通

min 离心 20 min, 弃上清液, 收获细菌沉淀, 并用 PBS 反复吹洗 3 次。(2) 酶消化: 称量细菌沉淀质量, 以 10 倍体积 4% 十二烷基硫酸钠(SDS)充分重悬, 然后置摇床 250 r/min 室温振荡过夜。10 000×g, 4 ℃ 离心 40 min, 弃去上清液, 沉淀用 PBS 充分吹洗 8 次。然后依次分别用 10 倍体积 250 μg/mL 的 DNase I、RNase A、胰蛋白酶 37 ℃ 消化处理干酪乳杆菌 4 h, 每一步消化后均用 PBS 吹洗 2 次, 最后一次胰蛋白酶消化后吹洗 4 次, 10 000×g, 4 ℃ 离心 40 min, 细菌沉淀 -70 ℃ 保存备用。(3) 超声破碎: 称取上述沉淀物质量, 以 4 倍体积的 PBS 重悬, 冰浴超声, 振幅 300 W, 超声 5 s, 停 4 s, 20 次为 1 个循环, 每次循环中间停 3 min; 共超声 30 个循环; 超声完成后, 菌液呈稀乳白色, 可自动滴下; 40 000×g, 4 ℃ 离心 1 h, 上清液用 0.22 μm 的滤器过滤, 即得 LCWE, 将 LCWE 分装于 1.5 mL 的 EP 管中, -80 ℃ 保存备用。取少量定量用。

1.3.2 LCWE 浓度测定 (1) 标准液的配制: 称取 0.1 g 鼠李糖溶于 10 mL 蒸馏水中配成 10 g/L 溶液, 然后连续 2 次 10 倍稀释, 至终浓度 100 mg/L, 作为标准液母液。以母液配置标准曲线浓度各浓度(0、25、50、100 mg/L)。(2) 样品稀释: 取 0.2 mL LCWE 提取液, 分别做 2、10、50 倍稀释。(3) 测定: 取 10 支 50 mL 长试管, 加入 4 mL 萘酚硫酸液, 置于冰上 5 min。然后分别加 1 mL 各浓度标准液及样品到 4 mL 萘酚硫酸液中(沿壁缓慢加入, 在冰水浴中轻轻摇动, 注意防止碳化), 沸水中煮 20 min, 冷却 30 min 后用 722S 分光光度计比色, 根据吸光度(A)值绘制标准曲线, 并计算样品 LCWE 的浓度。

1.3.3 川崎病小鼠模型的建立 C57BL/6J 小鼠经腹腔及肌

肉注射 LCWE 建立川崎病动物模型。将 30 只 C57BL/6 鼠(4~6 周龄, 雌性, 体质量 19~20 g)于实验开始当日(0 d), 随机分为 LCWE 组、PBS 组。LCWE 组经腹腔及大腿肌肉一次性注射 0.1 mL LCWE(每只 200 mg), PBS 组注射等量 PBS。密切观察小鼠的一般行为变化, 每天测量体质量, 观察水肿情况。于 LCWE 处理后的 1、3、28 d 各处死 5 只小鼠, 均以眼球取血于 EDTA 抗凝管中进行血常规检测, 剖开胸、腹腔, 分别留取心脏、肝脏和脾脏标本于甲醛中固定。采用 BC-3000 型血常规仪对小鼠血液进行血常规检测。病理学检查: 将小鼠心脏、肝脏和脾脏组织迅速置入 4% 多聚甲醛中常规固定, 经脱水、石蜡包埋、连续切片及 HE 染色后, 在光学显微镜下观察各器官组织病理变化。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件包进行统计学分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 LCWE 中鼠李糖浓度监测结果 用苯酚/硫酸比色方法测定上清液中鼠李糖的浓度作为测定 LCWE 的浓度, 样品经 50 倍稀释, 提取的 LCWE 中鼠李糖浓度为 2 g/L。

2.2 小鼠血液标本 WBC、PLT 及 MPV 结果 LCWE 组及 PBS 组分别于造模后第 1、3、28 天分别眼球取血进行 WBC、PLT 及 MPV 检验, LCWE 组在注射 LCWE 后第 1、3、28 天, WBC 呈逐渐上升; PBS 组在注射 PBS 后第 1、3、28 天, WBC 结果变化不大。LCWE 组在注射 LCWE 后第 3 天小鼠 PLT 及 MPV 升高, 第 28 天基本恢复正常, 见表 1。

表 1 小鼠血液标本 WBC、PLT 及 MPV 结果($\bar{x} \pm s$)

组别	WBC($\times 10^9/L$)			PLT($\times 10^9/L$)			MPV(fL)		
	第 1 天	第 3 天	第 28 天	第 1 天	第 3 天	第 28 天	第 1 天	第 3 天	第 28 天
PBS 组	3.6±0.31	4.0±0.44	3.8±0.21	627.0±201.0	726.0±40.3	761.0±37.7	7.33±0.15	7.03±0.60	7.70±0.10
LCWE 组	3.8±0.75	7.2±0.35	9.0±0.72	612.0±81.0*	986.0±13.8	771.0±175.0*	7.25±0.15	7.80±0.10	7.36±0.35

*: *P* < 0.01, 与 LCWE 组注射 LCWE 后第 3 天的 PLT 比较。

2.3 小鼠心脏病理结果 LCWE 模型组小鼠在注射 LCWE 后第 1 天心脏损伤不明显; 第 3 天发生严重冠状动脉损伤, 出现炎症细胞浸润; 第 28 天出现严重损伤, 表现为中膜增厚, 伴大量巨噬细胞和少量多形核白细胞(PMN)浸润, 并可见斑块形成。见图 1。

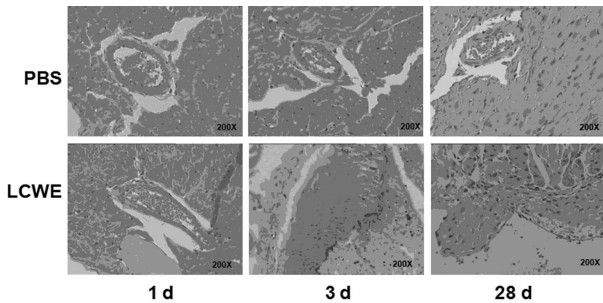


图 1 小鼠心脏病理结果

3 讨 论

川崎病治疗手段较局限, 临床研究取材困难, 川崎病动物模型的建立显得尤为重要。目前还没有公认的川崎病动物模型的建立方法, 研究认为川崎病符合感染性疾病和自身免疫性疾病两大特征, 细菌超抗原致病是引起川崎病的重要原因, 川

崎病异常的免疫激活, 是由细菌或病毒毒素以超抗原机制介导引起的^[3-5]。目前, 国内外关于川崎病动物模型方面的研究主要使用的造模因子均基于超抗原学说, 多使用 LCWE^[6]或白色念珠菌提取物(CADS)^[7]作为造模药物, 使用卡介苗(BCG)^[8]、牛血清清蛋白^[9]作为造模药物的研究较少, C57BL/6J、C3H/HeN 两个品系小鼠对 LCWE 诱导发生川崎病的易感性较高, 多采用野生雌性小鼠、4~5 周龄。鉴于此, 本实验选取野生雌性、4~5 周龄 C57BL/6J 小鼠作为造模实验动物, 采用 LCWE 作为造模药物, 为提高成功率, 同时将 LCWE 注入小鼠腹腔及肌肉构建川崎病模型。

研究结果显示, LCWE 组在注射 LCWE 后第 1、3、28 天, WBC 呈持续上升; 另外, 在注射 LCWE 后第 3 天该组小鼠的 PLT 及 MPV 升高, 第 28 天基本恢复正常, 这与临床川崎病患者 PLT 的变化规律类似。超抗原激发的免疫性损伤激活血小板发生黏附、聚集以及免疫复合物可促进组胺等活性物质的释放, 引发一系列的炎性反应, 导致动脉壁的完整性破坏形成动脉瘤和内膜增生纤维化而狭窄^[9]。因此在光镜下观察到 LCWE 组小鼠心脏血管炎的病理改变为: LCWE 模型组小鼠在注射 LCWE 后第 1 天心脏损伤不明显; 第 3 天发生严重冠状动脉损伤, 出现炎症细胞浸润; 第 28 天出现严(下转第 2871 页)

结果显示,在孕早期,PIH、HCY 水平及叶酸水平三者之间,暂未取得有统计学意义关联的数据支持($P>0.05$)。

综合国内外文献,结合本文研究结果表明:孕中期及孕晚期,孕妇血清 HCY 水平升高,其 PIH 风险明显增加;在孕中晚期进行 HCY 水平检测具有一定的临床意义。血清 HCY 浓度增高与叶酸水平下降是 PIH 的一个重要的危险因素,检测血清 HCY 和叶酸浓度可以作为评价和预测 PIH 一个敏感可信的指标,对 PIH 的诊断、治疗、疗效观察、预后有着极其重要的意义,而且对于 HCY 水平偏高者,还可以通过服用叶酸降低孕妇 HCY 水平来降低孕妇 PIH 的风险。

参考文献

[1] Herrmann W. Significance of hyperhomocysteinemia [J]. Clin Lab, 2005, 52(7/8): 367-374.

[2] Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis [J]. BMJ, 2002, 325(7374): 1202.

[3] Wang X, Qin X, Demirtas H, et al. Efficacy of folic acid supplementation in stroke prevention: a meta-analysis [J]. Lancet, 2007, 369(9576): 1876-1882.

[4] Saposnik G, Ray JG, Sheridan P, et al. Homocysteine-lowering therapy and stroke risk, severity, and disability additional findings from the HOPE 2 trial [J]. Stroke, 2009, 40(4): 1365-1372.

[5] 王拥军,刘力生,饶克勤. 我国脑卒中预防策略思考:同时控制高血压和高同型半胱氨酸水平 [J]. 中华医学杂志, 2008, 88(47): 3316-3318.

[6] 沈旭娜,黄引平,张常乐,等. 血管内皮生长因子,同型半胱氨酸与妊娠期高血压疾病的相关性研究 [J]. 实用妇产科杂志, 2007, 23

(8): 498-500.

[7] Vadachkoria S, Woelk GB, Mahomed K, et al. Elevated soluble vascular cell adhesion molecule-1, elevated homocyst(e)inemia, and hypertriglyceridemia in relation to preeclampsia risk [J]. Am J Hypertens, 2006, 19(3): 235-242.

[8] Dekker GA, Viries J, Doelitzsch PM, et al. Underlying disorders associated with severe early onset preeclampsia [J]. Am J Obstet Gynecol, 1995, 173(9): 1042-1048.

[9] Cotter AM, Molly AM. Elevated plasma homocysteine in early pregnancy: a risk factor for the development of nonsevere preeclampsia [J]. Am J Obstet Gynecol, 2003, 189(2): 391-394.

[10] Weleh GN, Loscalzo J. Homocystine and atherombosis [J]. N Engl J Med, 1998, 338(15): 1042-1050.

[11] Temple ME, Luzier AB, Kazlerad DJ. Homocysteine as risk factor for atherosclerosis [J]. Ann Pharmacother, 2000, 34(1): 57-65.

[12] Selhub J, Bagley LC, Miller J. B vitamins, homocysteine and neurocognitive function in the elderly [J]. Am J Clin Nutr, 2000, 71(2): 614-620.

[13] 罗淑贞,丁少波. 叶酸联合甲古胺对妊娠期高血压疾病患者高同型半胱氨酸血症的影响 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2004, 20(10): 606-608.

[14] 高树生,李黎. 妊娠晚期孕妇血浆叶酸和同型半胱氨酸含量的临床意义 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2002, 10(3): 62-62.

[15] 叶芳青,孙袁,蒋小亚,等. 孕妇血浆叶酸,维生素 B12 和同型半胱氨酸水平测定及临床意义 [J]. 中国妇幼保健, 2006, 21(16): 2230-2232.

(收稿日期:2014-09-28)

(上接第 2868 页)

重损伤,表现为中膜增厚,伴大量巨噬细胞和少量多形核白细胞(PMN)浸润,并可见斑块形成。PBS 组小鼠心脏血管结构正常,与文献报道一致^[10-12],此外还可观察到 LCWE 组小鼠肝脏及肾脏也表现为血管炎。

本研究结果显示,利用在 C57BL/6J 小鼠腹腔和肌肉同时注射 LCWE 可成功诱导构建血管炎模型,构建的动物模型可见 WBC 及 PLT 增加以及血管斑块形成,可用于后续川崎病的相关研究。

参考文献

[1] Onouchi Y. Molecular genetics of Kawasaki disease [J]. Pediatr Res, 2009, 65(5 Pt 2): 46-54.

[2] Sato YZ, Molkara DP, Daniels LB, et al. Cardiovascular biomarkers in acute Kawasaki disease [J]. Int J Cardiol, 2013, 164(1): 58-63.

[3] Newburger JW, Takahashi M, Gerber MA, et al. Diagnosis, treatment, and long-term management of Kawasaki disease: a statement for health professionals from the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease, Council on Cardiovascular Disease in the Young, American Heart Association [J]. Pediatrics, 2004, 114(6): 1708-1733.

[4] 田鑫,贺湘玲,方亦兵. 川崎病冠状动脉炎的动物模型研究进展 [J]. 医学临床研究, 2008, 25(1): 112-115.

[5] Nakamura Y, Yanagawa H. The worldwide epidemiology of Kawasaki disease [J]. Prog Ped Cardiol, 2004, 19(2): 99-108.

[6] Lau AC, Duong TT, Ito S, et al. Intravenous immunoglobulin and salicylate differentially modulate pathogenic processes leading to vascular damage in a model of Kawasaki disease [J]. Arthritis Rheum, 2009, 60(7): 2131-2141.

[7] Takahashi K, Oharaseki T, Yokouchi Y, et al. Administration of human immunoglobulin suppresses development of murine systemic vasculitis induced with Candida albicans water-soluble fraction: an animal model of Kawasaki disease [J]. Mod Rheumatol, 2009, 20(2): 160-167.

[8] Nakamura T, Yamamura J, Sato H, et al. Vasculitis induced by immunization with Bacillus Calmette-Guérin followed by atypical mycobacterium antigen: a new mouse model for Kawasaki disease [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2007, 49(3): 391-397.

[9] 田鑫,贺湘玲,方亦兵,等. 血小板及其调控因子在幼兔免疫性血管炎中的动态变化 [J]. 中国当代儿科杂志, 2009, 11(10): 850-853.

[10] 阮仙利,方声,罗芳,等. 川崎病患儿血小板参数的变化与冠状动脉改变的关系研究 [J]. 中国热带医学, 2008, 8(7): 1175-1176.

[11] Brahn E, Lehman TJ, Peacock DJ, et al. Suppression of coronary vasculitis in a murine model of Kawasaki disease using an angiogenesis inhibitor [J]. Clin Immunol, 1999, 90(1): 147-151.

[12] 覃丽君,牛美真,王宏伟,等. 干酪乳杆菌细胞壁成分诱导小鼠冠状动脉炎的实验研究 [J]. 实用儿科临床杂志, 2006, 21(20): 1388-1391.

(收稿日期:2014-06-11)