

巨噬细胞产生一种糖蛋白包括可溶性 sTNF- $\alpha$  和膜相关性 mTNF- $\alpha$ , 属于Ⅱ型膜蛋白, 以三聚体的形式发挥作用的。TNF- $\alpha$  通过与靶细胞膜上的肿瘤坏死因子受体 TNFR 结合实现细胞毒性、抗病毒、免疫调节等生物学功能。同时, TNF- $\alpha$  作为细胞死亡因子之一参与细胞凋亡调节, 又作为一种炎症介质, 能增加血神经屏障的通透性<sup>[5]</sup>, 刺激中性粒细胞, 使其黏附在血管内皮细胞上, 产生超氧化物释放溶酶体酶, 增加补体受体的表达。本次结果表明 CSF 可以激活单核-巨噬细胞产生 TNF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  是调节血循环中白细胞的主要因素之一, 也是外周粒细胞在光学油镜下可见到异常增粗颗粒原因之一。这与停用 CSF 后外周循环中白细胞总数急剧下降相符。IL-4 是由活化 T 淋巴细胞分泌的, 促进 B 淋巴细胞增殖和分泌抗体; 诱导单核细胞分泌 CSF, 增强粒细胞介导的吞噬、杀伤活性和 ADCC 作用同时抑制单核细胞分泌 TNF、IL-1、IL-6。本次研究结果中 IL-4 升高的幅度不明显, 提示 CSF 对 T 淋巴细胞的激活不明显, 与细菌感染机制不同, 这与机体处于非应激状态有关, 为的是稳定内环境, 达到负反馈作用, 进一步调节骨髓细

## • 临床研究 •

# 胆红素对小胶质细胞 BV-2 表面分子 Toll 样受体 4 mRNA 表达的影响\*

关小勇, 李雪丽<sup>△</sup>, 陈华干, 高干

(柳州市妇幼保健院检验科, 广西柳州 545001)

**摘要:** 目的 探讨不同浓度胆红素对小鼠小胶质细胞系 BV-2 表面分子 Toll 样受体 4(TLR4)mRNA 表达的影响。方法 体外培养小鼠细胞系, 加入不同浓度的胆红素孵育 1 h, 再加入脂多糖(LPS)刺激 24 h, 收集小鼠细胞, 提取 RNA 进行逆转录, 利用 TLR4 的特异性引物进行 DNA 扩增, 观察不同组别 TLR4 mRNA 表达的水平。结果 LPS 对照组与空白对照组比较 TLR4 mRNA 的表达没有显著差异; 而两者与 4 个不同浓度的胆红素干预组比较有差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。4 个不同浓度的胆红素干预组两两比较小胶质细胞系 BV-2 表面分子 TLR4 mRNA 的表达随着胆红素浓度的增高呈现逐渐降低趋势。结论 胆红素可抑制 BV-2 表面分子 TLR4 的表达, 且随着胆红素浓度的升高, 抑制作用越明显。

**关键词:** 胆红素; 小胶质细胞; Toll 样受体 4; mRNA

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.17.041

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2015)17-2552-03

新生儿高胆红素血症以非结合胆红素为主, 可引起胆红素脑病, 遗留神经系统后遗症<sup>[1]</sup>。小胶质细胞是神经胶质细胞的一种, 约占全部胶质细胞的 5%, 起到类似巨噬细胞的作用, 是中枢神经系统中的第一道, 也是最主要的一道免疫防线<sup>[2]</sup>。Toll 样受体(TLRs)是机体重要的天然免疫受体分子之一, 主要表达于单核巨噬细胞, 可识别革兰阴性细菌细胞壁成分脂多糖(LPS), 启动信号传导, 介导天然免疫<sup>[3]</sup>。有研究对新生儿黄疸的原因进行调查发现, 母婴同室前引起新生儿高胆红素血症的主要原因是感染<sup>[4]</sup>。新生儿感染性疾病如肺炎、脐炎、眼结膜炎、脓疱疹等, 其内毒素即 LPS, 以及产生的细胞因子可以抑制肝脏功能, 使红细胞破坏产生溶血, 加重新生儿黄疸的程度<sup>[4]</sup>。因此, 本研究拟通过观察经胆红素孵育后小胶质细胞系在 LPS 刺激后 BV-2 表面分子 TLR4 mRNA 的表达情况, 探讨胆红素对小胶质细胞免疫功能的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 小鼠小胶质细胞系购自上海桥社生物科技公司, 二甲基亚砜(DMSO)购自美国 Sigma 公司, 胎牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司, RPMI1640 基础培养基为 Gibco 公司产品, 胆红素为 Fluka 公司生产脂溶性的非结合胆红素

的分裂和释放速度。

## 参考文献

- [1] 石小玲. 集落刺激因子对造血的调控作用及其检测的临床意义 [J]. 实用医技杂志, 2007, 14(15): 2091-2092.
- [2] 白黎智, 邢嵘, 路小光, 等. 创伤患者血浆肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、白细胞介素-4 动态变化及其意义 [J]. 中国实用医药, 2007, 2(15): 22-24.
- [3] 刘江红, 李小松, 叶静. 糖皮质激素对多发性硬化患者血清肿瘤坏死因子- $\alpha$  和白介素-4 水平的影响 [J]. 临床神经病学杂志, 2010, 23(2): 105-106.
- [4] 兰海霞, 博晓真, 新燕, 等. 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子的研究进展 [J]. 临床儿科杂志, 2005, 23(12): 895-896.
- [5] Ramkalawan H, Wang YZ, Hurbungs A, et al. Pioglitazone, PPAR $\gamma$  agonist, attenuates experimental autoimmune neuritis [J]. Inflammation, 2012, 35(4): 1338-1347.

(收稿日期: 2015-03-18)

(UBC), 清蛋白为 Sigma 公司产品, RNAisoPlus 总 RNA 提取试剂盒、SYBR Green Real-time PCR 试剂盒为 TaKara 公司产品, 逆转录试剂盒购自 Fermentas 公司, 引物合成由 Invitrogen 公司完成。其余所用试剂为国产分析纯。

**1.2 主要仪器** 低温高速离心机为美国 Beckman 公司生产的 AvantiTM30, CO<sub>2</sub> 恒温培养箱为 Thermo 公司产品, PCR 分析仪为美国 ABI 生产, 型号为 Veriti96。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 细胞培养** 实验用小鼠小胶质细胞株 BV-2 为贴壁细胞, 复苏 BV-2 细胞, 置于 RPMI-1640 培养液(含 10% 胎牛血清, 100 U/mL 青霉素和链霉素)中, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 根据细胞代谢情况, 1~2 d 换液, 至指数生长期收集细胞悬液, 细胞计数板计算细胞数, 以 RPMI-1640 培养液调整成  $1 \times 10^5$ /mL 细胞悬液备用。

**1.3.2 实验分组** 制备好的细胞悬液接种于 24 孔塑料培养板, 分为 6 个组。空白对照组和 LPS 对照组只加调整好的细胞液使反应体系为 1 mL; 4 个不同浓度的胆红素干预组加入

\* 基金项目: 广西壮族自治区卫生厅自筹经费课题项目(Z2013601)。

△ 通讯作者, E-mail: gxy6688@163.com。

UBC, 调整其反应体系中 UBC 的浓度分别为 25、50、100、200  $\mu\text{mol/L}$ , 整个反应体系为 1 mL。6 个组避光孵育 1 h, 弃掉上清液, 加入 LPS 溶液 (1 000  $\mu\text{g/mL}$ ), 其中空白对照组只加入完全培养基 2 mL, 其余组均加入 1.98 mL 培养基和 0.02 mL LPS 溶液, 反应体系为 2 mL, LPS 终浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$ , 混匀。在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 24 h。

### 1.3.3 细胞总 RNA 的提取

按照 RNAisoPlus 总 RNA 提取试剂盒的操作说明进行<sup>[5]</sup>。

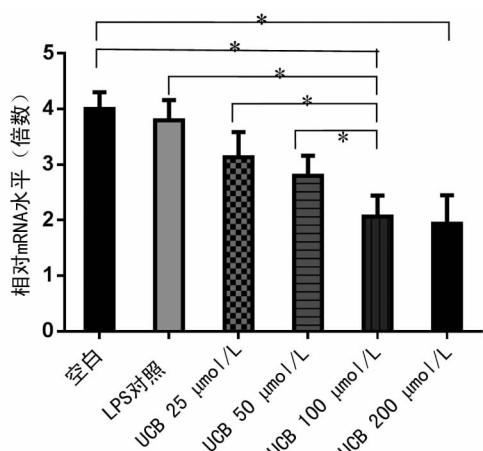
**1.3.4 逆转录** 在冰上分别加入 1  $\mu\text{g}$  的 RNA 模板和 1  $\mu\text{L}$  oligo (dT)18 primer, 用水补至 12  $\mu\text{L}$ , 65  $^{\circ}\text{C}$ , 5 min。于冰上冷却后, 分别加入 4  $\mu\text{L}$  5X Reaction Buffer、1  $\mu\text{L}$  RNase Inhibitor、2 mL 10 mmol/L dNTP Mix 和 1  $\mu\text{L}$  M-MuLV Reverse Transcriptase, 轻轻混匀稍稍离心后, 置于 PCR 仪中 42  $^{\circ}\text{C}$  60 min, 然后 70  $^{\circ}\text{C}$  5 min 终止反应。

**1.3.5 Real-time PCR** 在 25  $\mu\text{L}$  反应体系中, 分别加入 12.5  $\mu\text{L}$  SYBR Green PCR Mix、10.5  $\mu\text{L}$  灭菌水、0.5  $\mu\text{L}$  P1、0.5  $\mu\text{L}$  P2 和 1  $\mu\text{L}$  cDNA 模板, 参照文献<sup>[5]</sup>加入 TLR4 引物 (506 bp) 上游: 5'-TGG ATA CCG TTT CCT TAT AAG-3', 下游: 5'-GAA ATG GAG GCA CCC CTT C-3', 内参 GAPDH (220 bp)。混匀并稍稍离心后, 置于 Rotor-Gene 3000 荧光定量 PCR 仪中, 按如下条件进行 Real-time PCR: 94  $^{\circ}\text{C}$ , 10 min, 40 个循环 (94  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s; 57  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s; 72  $^{\circ}\text{C}$ , 60 s)。扩增产物用 Rotor-Gene6000 software1.7 系统分析结果。

**1.4 统计学处理** 各项实验重复 3 次, 所得数据采用 SPSS17.0 统计软件进行统计学处理。两组间比较使用 t 检验, 多个样本间的两两比较使用 One-way ANOVA,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

图 1 的结果显示, LPS 对照组与空白对照组比较 TLR4 mRNA 的表达虽然略低, 但两者差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 而两者与 4 个不同浓度的胆红素干预组比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 且胆红素浓度越高差异就越显著。4 个不同浓度的胆红素干预组两两比较小胶质细胞系 BV-2 表面分子 TLR4 mRNA 的表达随着胆红素浓度的增高呈逐渐降低趋势, 可见胆红素可对小胶质细胞系 BV-2 表面分子 TLR4 mRNA 的表达起抑制作用, 且抑制作用的强弱与胆红素的浓度呈正相关。



## 3 讨 论

中枢神经系统是机体免疫机制的特殊区域, 缺乏淋巴系统, 并有血脑屏障的保护。小胶质细胞是脑内的驻留型巨噬细胞。一些神经病理学研究表明激活的小胶质细胞在神经退化类疾病的发病机制中起着重要作用。许多生理或病理因素如血压的突然变化、免疫刺激和外伤、非结合胆红素的侵入等均可导致血脑屏障破坏、通透性升高, 使血循环中的物质渗入引起中枢神经系统的病理性改变<sup>[6]</sup>。TLR4 是模式识别受体的一个重要成员, 随着研究的深入, 发现 TLR4 在促进细胞因子的合成与释放, 引发炎症反应, 促进免疫细胞的成熟和分化, 以及抗感染、调节免疫应答等方面起到重要的作用<sup>[7]</sup>。

新生儿黄疸多为生理性黄疸, 呈良性经过, 如病理性黄疸胆红素浓度过高会产生细胞毒作用, 早产儿由于血脑屏障及免疫功能不全更易发生高胆红素血症及胆红素脑病<sup>[1]</sup>。胆红素不仅有神经毒性, 对免疫系统亦有明显的抑制作用<sup>[8]</sup>。本研究结果显示, 没加入 UBC 孵育的 LPS 对照组与空白对照组比较, LPS 对照组 TLR4 mRNA 的表达虽然略低, 但两者没有显著差异。而小鼠小胶质 BV-2 细胞在不同浓度的胆红素孵育后再经 LPS 刺激, TLR4 的表达明显受到抑制, 且浓度越高抑制作用就越明显, 可见在感染和高胆红素的共同作用下, 中枢神经系统的免疫功能可能会受到更大的抑制, 从而导致黄疸患儿的免疫力低下更易并发感染。脓毒症、严重的高胆红素血症、细菌感染可以看作核黄疸的高危因素<sup>[4]</sup>。胆红素在 LPS 协同下抑制 TLR4 表达的机制可能是: 胆红素首先损伤小鼠小胶质细胞细胞膜, 致 TLR4 受体结构破坏、数量减少和功能丧失, 识别 LPS 的能力下降<sup>[9]</sup>; 接着胆红素破坏线粒体, 使细胞氧化磷酸化过程受阻, 从而干扰能量代谢, 氨基酸合成蛋白质减少<sup>[10]</sup>; 然后胆红素破坏细胞核, 最终影响 TLR4 的转录与合成。

综上所述, 高浓度胆红素对小胶质细胞 BV-2 表面分子 TLR4 的表达有明显抑制作用, 在临幊上对严重高胆红素血症患儿应早期进行干预, 改善患儿的免疫功能, 并发感染患儿及早产儿由于血脑屏障破坏、通透性升高更易发生胆红素毒性损伤, 治疗更应积极。

## 参考文献

- 马琳, 江莲. 新生儿黄疸与免疫功能的研究进展[J]. 河北医药, 2011, 33(18): 2831-2833.
- Yao L, Kan EM, Lu J, et al. Toll-like receptor 4 mediates microglial activation and production of inflammatory mediators in neonatal rat brain following hypoxia: role of TLR4 in hypoxic microglia [J]. J Neuroinflammation, 2013, 10(1): 23.
- 刘会领, 陈敏, 陈昌辉. Toll 样受体 4 介导的革兰阴性细菌免疫应答研究进展[J]. 实用儿科临幊杂志, 2008, 23(10): 790-793.
- 老白杨, 饶斯清, 汪李虎. 新生儿高胆红素血症的病因分析[J]. 华南预防医学, 2006, 12(3): 65-66.
- Yang D, Liu B, Hou X, et al. Pre-treatment with Mycobacterium avium-derived lipids reduces the macrophage response to interferon  $\gamma$  in BCG-vaccinated mice[J]. J Med Microbiol, 2013, 62 (Pt 7): 980-987.
- Briles D. The evolving landscape of neurotoxicity by unconjugated bilirubin: role of glial cells and inflammation[J]. Front Pharmacol, 2012, 3(1): 88.
- 张宇, 孙瑞利, 胡锦跃. Toll 样受体 4 信号转导研究进展[J]. 国际

\*:  $P < 0.05$ , 两组之间比较差异有统计学意义。

图 1 不同浓度胆红素作用后 TLR4 mRNA 的表达情况

- 病理科与临床杂志,2009,29(1):32-36.  
 [8] Watchko JF. Hyperbilirubinemia and bilirubin toxicity in the late preterm infant[J]. Clin Perinatol, 2006, 33(4):839-852.  
 [9] Alexandra Brito M, Silva RF, Brites D. Bilirubin toxicity to human erythrocytes:a review[J]. Clin Chim Acta, 2006, 374 (1/2): 46-56.

- [10] 裴雪梅,陈昌辉,牛会琴,等.不同浓度胆红素对新生儿脐血单核细胞形态结构的影响[J].医学研究生学报,2009,22(5):496-499.

(收稿日期:2015-07-08)

## • 临床研究 •

性病患者中淋球菌感染的流行病学调查及耐药性研究<sup>\*</sup>黄健<sup>1</sup>,黄美容<sup>2△</sup>,黄洋<sup>3</sup>,黄娅娅<sup>1</sup>,於薇<sup>1</sup>

(遵义医学院附属医院:1. 医学检验科;2. 输血科;3. 皮肤科,贵州遵义 563003)

**摘要:**目的 了解遵义地区性病患者中淋球菌的感染及耐药情况。方法 统计2013年6月1日至2013年12月31日该院性病门诊患者中淋球菌的感染率,以及感染患者的性别、年龄特征。采用琼脂稀释法测定临床分离的淋球菌菌株对青霉素、阿奇霉素、大观霉素、头孢曲松钠、四环素及环丙沙星的最低抑菌浓度,同时检测菌株产 $\beta$ -内酰胺酶情况。结果 820例性病门诊患者中共检出65例淋球菌感染者,感染率为7.93%;药敏结果显示淋球菌对环丙沙星、四环素、青霉素有较高的耐药率;对阿奇霉素、大观霉素、头孢曲松钠的敏感性较好。结论 淋球菌仍然是造成该地区性病患者感染的主要病原菌之一,中青年男性是淋球菌感染的高危群体,在该地区推荐采用头孢曲松钠、阿奇霉素、大观霉素单独或联合使用治疗淋球菌感染。

**关键词:**性病患者; 淋球菌; 感染率; 耐药率

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.17.042

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)17-2554-02

淋球菌是性传播疾病淋病的唯一病原体,其主要引起泌尿生殖系统的化脓性感染,可导致前列腺炎、盆腔炎、输卵管炎等严重并发症<sup>[1]</sup>。根据世界卫生组织(WHO)统计资料显示,每年全球约有6 200万新增淋病患者<sup>[2]</sup>。目前,淋球菌感染仍是严重威胁公共卫生安全的一种重要的性传播疾病。近年来,淋球菌对抗菌药物的耐药性不断增加,给淋病治疗带来了严峻挑战<sup>[3]</sup>。由于淋球菌的感染情况及耐药性在不同地区、不同人群间呈现一定的差异,因此有必要定期对一定区域内淋球菌感染及耐药情况进行监测<sup>[4]</sup>。目前,遵义地区淋球菌感染及耐药情况相关调查资料较少,故本研究拟对本院性病门诊就诊患者中淋球菌感染情况进行调查,并对分离的淋球菌菌株行最小抑菌浓度(MIC)检测,以期为本地区淋病的预防和治疗提供流行病学资料。

## 1 材料与方法

1.1 菌株来源 2013年6月1日至2013年12月31日本院性病门诊患者中分离的淋球菌65株,淋球菌ATCC49226标准菌株为本室保存。

1.2 试剂 青霉素、大观霉素、四环素、阿奇霉素、环丙沙星购自上海生工生物工程股份有限公司;头孢曲松钠购自海口奇力制药股份有限公司; $\beta$ -内酰胺酶检测纸片购自梅里埃公司。

1.3 方法 根据2013年本院性病门诊登记的患者就诊资料,统计淋球菌的感染率及感染者的年龄、性别特征。淋球菌MIC及 $\beta$ -内酰胺酶检测采用WHO推荐的琼脂稀释法测定菌株的MIC<sup>[5]</sup>,每个菌株均行 $\beta$ -内酰胺酶纸片检测,药敏判断标准参照美国临床实验室和标准化协会(CLSI)2012年标准。

1.4 统计学处理 采用SPSS19.0软件进行数据处理及统计学分析。

## 2 结 果

2.1 性病患者中淋球菌感染率及年龄、性别特征 2013年6月1日至2013年12月31日本院皮肤科性病门诊820例就诊

患者中淋球菌感染者共65例,感染率为7.93%,部分患者同时合并有衣原体、支原体感染。感染者主要以20~<50岁男性为主,其中20~<30岁男性感染率最高,见表1。

表1 淋球菌患者年龄与性别特征[n(%)]

年龄	男	女
<20岁	3(4.6)	0(0)
20~<30岁	28(43.0)	23(31)
30~<40岁	16(24.6)	0(0)
40~<50岁	12(18.5)	0(0)
≥50岁	4(6.2)	0(0)

2.2 淋球菌对抗菌药物的MIC结果 参与检测的65株淋球菌菌株对环丙沙星、四环素耐药率较高,对青霉素的耐药率已达到了67.7%;对阿奇霉素、大观霉素的耐药率均小于5.0%,未发现头孢曲松钠耐药的菌株,见表2。对淋球菌的耐药模式分析发现,本次调查中淋球菌以对青霉素、环丙沙星和四环素三种抗菌药物同时耐药的多重耐药株为主,其次是同时对环丙沙星和四环素耐药菌株,见表3。

表2 淋球菌对常见的6种抗菌药物耐药率[n(%)]

抗菌药物	耐药
环丙沙星	63(96.9)
四环素	60(92.3)
青霉素	44(67.7)
阿奇霉素	2(3.1)
大观霉素	1(1.5)
头孢曲松钠	0(0.0)

\* 基金项目:贵州省科技厅资助项目(2012GZ80958);遵义医学院硕士启动基金项目(Zc220130401)。△ 通讯作者, E-mail:meirong2003@126.com。