

左旋氧氟沙星对小鼠结核分枝杆菌生长及细胞免疫的影响

李美忠 童新灯 乐晓华 苟继周 唐志佼 陈心春

【摘要】 目的 探讨左旋氧氟沙星对小鼠结核分枝杆菌生长、特异性细胞免疫和病理改变的影响,探讨左旋氧氟沙星联合其他免疫治疗的可行性。**方法** 38只 C57BL/6 小鼠尾静脉注射 H37Rv 结核菌(1×10^6 CFU/只),然后随机等分为两组,一组不作处理(对照组),另一组进行左旋氧氟沙星灌胃治疗(药物组),300 mg/kg,每周灌 5 d,疗程 28 d。在治疗开始后不同时间点处死小鼠,计数肺组织结核分枝杆菌菌量、观察肺组织病理变化,测定脾细胞特异性细胞因子的产生情况。**结果** 左旋氧氟沙星能有效抑制小鼠肺组织结核分枝杆菌的生长,与对照组比较,药物组小鼠服药期间细菌量减少 100 倍,停药后 30 d 仍减少 10 倍,差别有统计学意义($P < 0.05$)。同时药物治疗能减轻肺组织病理变化的程度。药物组小鼠脾细胞分泌卡介苗(BCG)特异性细胞因子 IFN- γ 、TNF- α 、IL-10 和 IL-17 水平明显高于对照组($P < 0.05$)。**结论** 左旋氧氟沙星能有效抑制小鼠结核分枝杆菌的生长,同时能改善肺组织的病理变化和促进小鼠脾细胞分泌特异性细胞因子。

【关键词】 左旋氧氟沙星;结核分枝杆菌;细胞免疫

Effects of levofloxacin on the growth and cyto-immunology of mycobacterium tuberculosis infected mice LI Mei-zhong, TONG Xin-deng, LE Xiao-hua, GOU Ji-zhou, TANG Zhi-jiao, CHEN Xin-chun. The third People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518020, China

Corresponding author: CHEN Xin-chun, Email: chenxinchun@hotmail.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of levofloxacin on the growth, cyto-immunology and pathology of mycobacterium tuberculosis infected mice and evaluate the feasibility of combining levofloxacin treatment with immune therapy. **Methods** All 38 mice (C57BL/6) were inoculated intravenously with 1×10^6 CFU mycobacterium tuberculosis (H37Rv) and randomly divided into two groups. In negative control group, mice were infected but left untreated; The other group were treated with

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2010.03.002

基金项目:国家自然科学基金(30671857)

作者单位:518020 深圳市,深圳市第三人民医院(李美忠、乐晓华、苟继周、陈心春);北京大学深圳医院(童新灯);武汉大学动物实验中心(唐志佼)

通讯作者:陈心春,Email:chenxinchun@hotmail.com

levofloxacin in a 300 mg/kg dose and were carried out five times weekly for 4 weeks. The severity of infection and effectiveness of treatment were assessed by enumeration of CFU in the spleen, gross lung lesions and determination of cytokine produced by spleen cells. **Results** Levofloxacin can effectively restrain the growth of mycobacterium tuberculosis and mitigate the pathology of infected mice. The levels of IFN- γ , TNF- α , IL-10 and IL-17 produced by spleen cells in treatment group were higher than control group. **Conclusions** Levofloxacin can restrain the growth of mycobacterium tuberculosis in mice and improve the pathology change of lung. Levofloxacin enhance the product of specific cytokine from spleen cells.

【Key words】 Levofloxacin; Mycobacterium tuberculosis; Cyto-immunology

结核病作为一种慢性传染性疾病,严重危害人们的健康,近年来已成为全球关注的公共卫生问题,据世界卫生组织统计,全球每年约有 200 万人死于结核病,约有 800 万新发病例。我国是耐多药结核的高发区^[1]。体外试验和大量的临床试验表明,喹诺酮类药物左旋氧氟沙星(levofloxacin, LFX)具有很好的抗结核活性,而且由于其不良反应少,临床上被广泛用于抗结核治疗^[1]。LFX 是第三代的全合成氟喹诺酮类抗菌药物,其抗菌效果好于第一代喹诺酮类药物。不仅如此,文献还报道 LFX 具有免疫调节作用,可以影响外周血单核细胞的细胞因子如 IL-1、TNF- α 等分泌^[2]。但 LFX 在体内对小鼠免疫功能的影响如何,目前少有报道。而且,现有资料主要是对 LFX 抗结核分枝杆菌急性感染的细菌学观察,缺乏对感染动物体内的结核分枝杆菌生长情况、病理变化的长期观察。为此,本文动态观察 LFX 治疗小鼠 120 d 的结核分枝杆菌生长情况、肺组织病理改变以及对小鼠免疫功能的影响。

材料与方法

一、实验材料

38 只 6~8 周龄的雌性 C57BL/6 小鼠,体重在 16~20 g。由武汉大学动物实验中心提供。合格证号:SCXK(鄂)003-0004。菌种:H37Rv 标准株由中国药品生物制品检验检定所提供(菌号:93009)。

主要试剂:改良罗氏培养基购于上海市肺科医院;所有流式检测试剂均为美国 eBioscience 公司产品;细胞因子 IFN- γ 、TNF- α 、IL-10 和 IL-17 试剂盒均为美国 R&D 公司产品;Con. A 为 Sigma 公司产品;BCG 为成都生物制品研究所产品。

二、实验方法

1. 动物模型的建立与分组:采用尾静脉注射方法^[3],将 38 只小鼠进行结核分枝杆菌感染。每只注射菌液 0.2 ml,含 H37Rv 标准株结核分枝杆菌 1×10^6 CFU。感染后小鼠随机分为对照组和药物组,每组各 19 只。感染后的小鼠在动物生物安全三级实验室(武汉大学 ABSL-3 实验室)IVC 笼具中饲养,观察小鼠体重及生存情况。对药物组小鼠进行左旋氧氟沙星灌胃,300 mg/kg,每周灌 5 d,疗

程为4周。

2. 脾细胞培养与细胞因子检测:在感染后的第10天和第30天,对照组和药物组各处死两只小鼠,采用颈椎脱臼法处死小鼠,用75%酒精消毒小鼠体表5 min。注意防止酒精进入小鼠的口鼻内。无菌条件下解剖小鼠,分离出脾脏和肺脏。肺脏分别进行病理检测和结核菌培养;分离单个脾细胞,70 μm 筛网过滤。脾细胞在BCG的刺激下,5% CO_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养72 h,收集培养上清进行IFN- γ 、IL-10、TNF- α 、IL-17等细胞因子的检测,具体操作严格按照试剂盒说明书。

3. 肺组织菌落计数:无菌取肺组织,称重后放入乳钵研碎,缓慢加入1ml生理盐水继续研磨均匀,再加入1 ml 4% 硫酸作用15 min,混匀后取100 μl 悬液,用生理盐水分别作 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 倍稀释,取 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 倍稀释的菌液各100 μl 分别接种到罗氏培养基,置37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中,培养18 d后计菌落数。计算出每克肺组织中的菌落数(CFU)。

4. 病理检测:切取小鼠肺脏做病理学检查,40 g/L甲醛溶液固定,常规梯度脱水、包埋、切片,进行HE染色和抗酸染色,观察肺组织病变情况和抗酸杆菌数量。

三、统计学处理

小鼠生存情况观察采用方差分析,小鼠肺组织结核分枝杆菌培养计数与脾细胞培养上清中细胞因子水平分析采用 t 检验。

结 果

一、小鼠的饲养观察

两组小鼠均有毛发凌乱不规则、活动少、精神状态、食欲差、嗜睡等状况。在接种细菌后的第4周,对照组有4只小鼠死亡(21%);而药物组没有小鼠死亡。

二、细菌计数结果

对小鼠肺组织进行结核分枝杆菌的定量培养,结果显示,在治疗的第10天,药物组的细菌计数明显低于感染对照组,而到第30天时,两组小鼠的每克肺组织结核菌数量均有增高,但对照组增高更明显(见图1~2)。

三、脾细胞培养上清中的细胞因子检测

治疗后的第10天,脾细胞培养上清中的IFN- γ 和TNF- α 水平极低,在第30天时,IFN- γ 、IL-10、TNF- α 和IL-17均有升高,而药物组升高更明显,差异具有显著性(图3)。同时,在相同的条件下将LFX作为刺激剂对小鼠脾细胞进行体外培养,实验结果却未发现这种差异。

四、病理学改变

对照组小鼠肺组织全部实性变,肺泡隔融合;间质聚集大量的淋巴细胞及大量的巨噬细胞;而药物组小鼠肺组织约50%实性变,部分肺泡隔增宽融合;间质大量的淋巴细胞聚集,巨噬细胞较多(图4)。

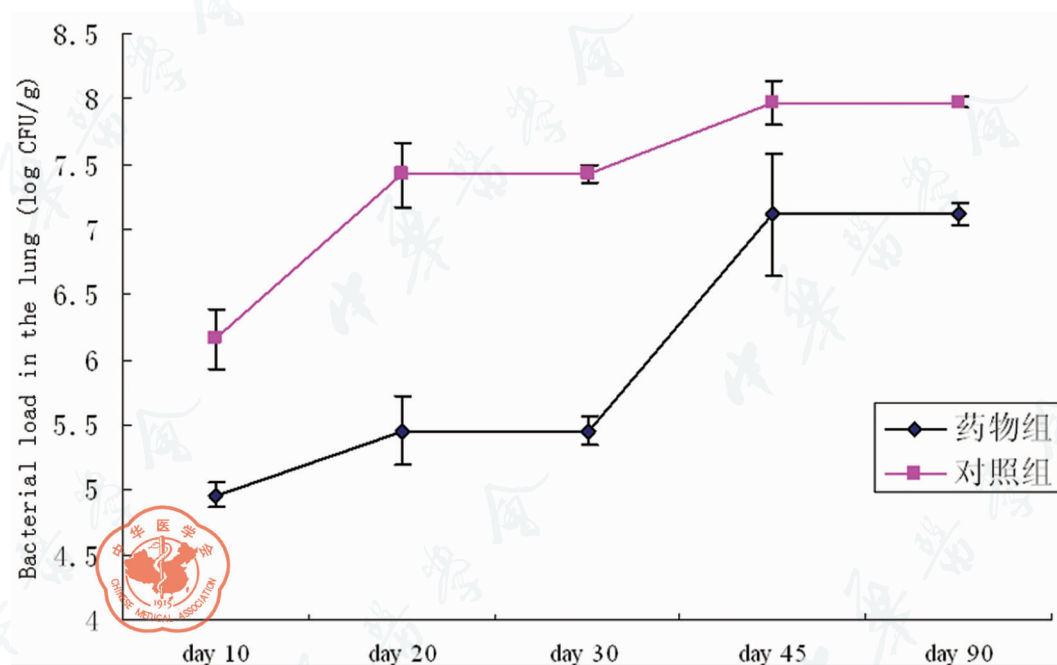


图1 小鼠肺组织结核菌定量培养结果

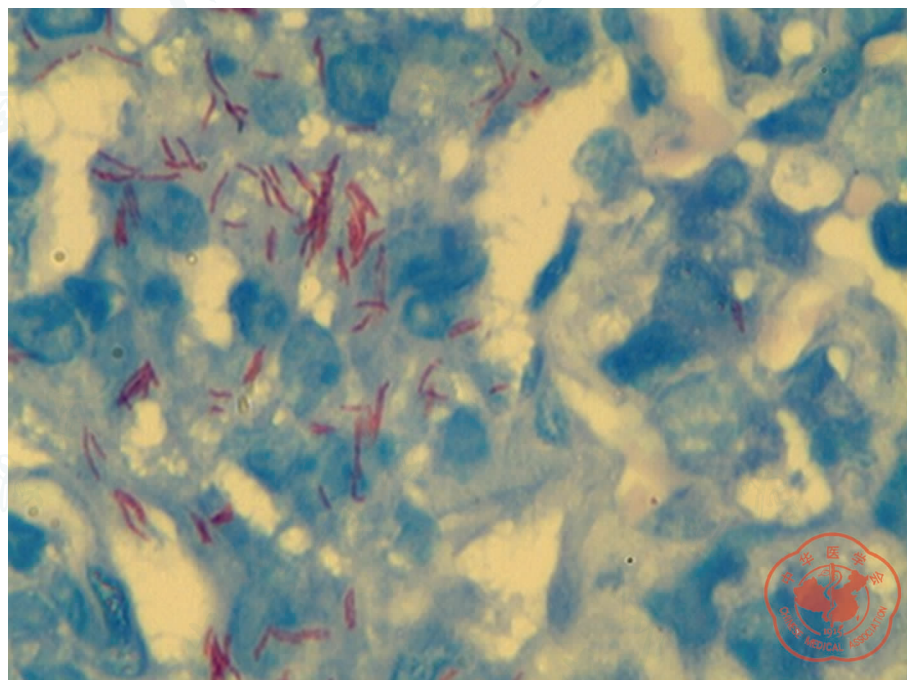


图2 小鼠肺组织病理抗酸染色(油镜 1000 ×)

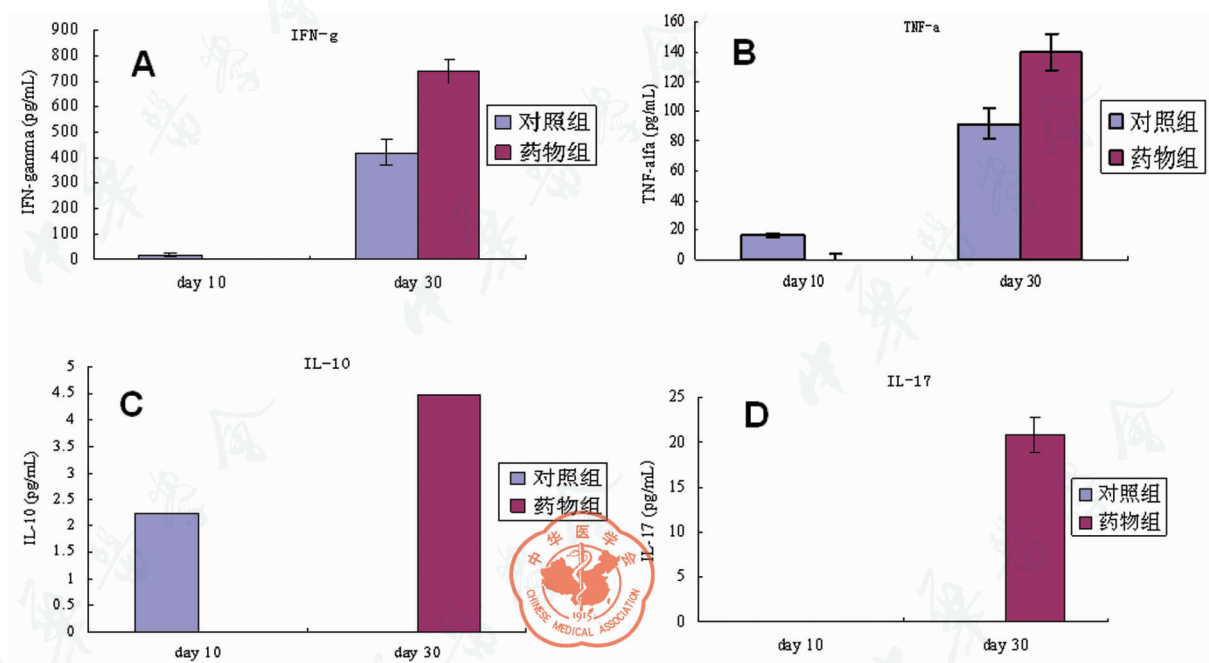


图3 脾细胞培养上清中细胞因子水平的变化情况

注: A: IFN- γ ; B: TNF- α ; C: IL-10; D: IL-17

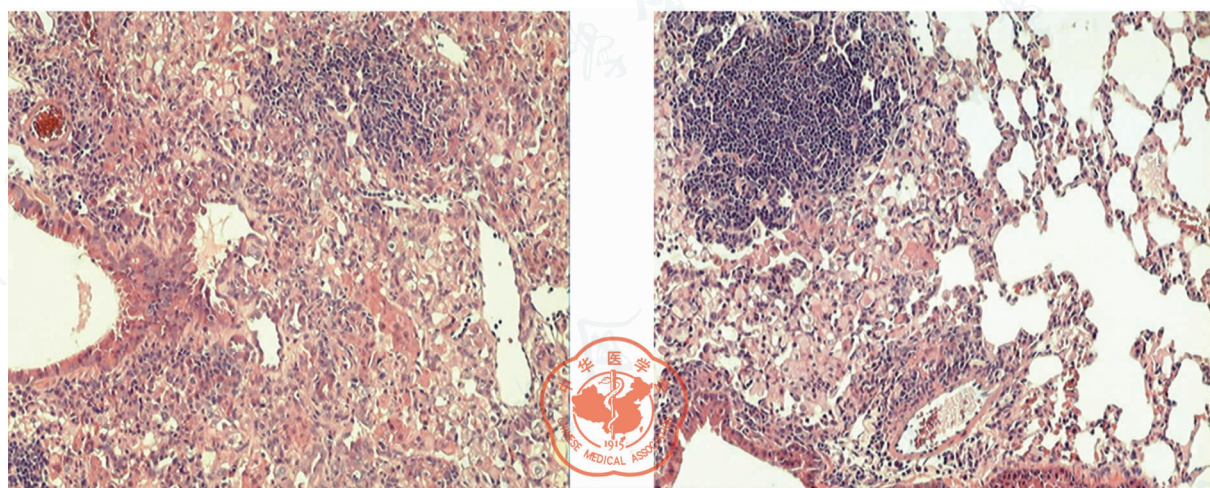


图4 小鼠肺组织病理变化(HE 100 ×)

注: 对照组小鼠肺组织全部实性变, 肺泡隔融合; 间质大量的淋巴细胞聚集及多量的巨噬细胞; 而药物组小鼠肺组织约 50% 实性变, 部分肺泡隔增宽融合; 间质大量的淋巴细胞聚集, 巨噬细胞较多

讨 论

自从证实氧氟沙星等氟喹诺酮类药物在体外有抗结核分枝杆菌活性以来, 动物实验证明了氟喹诺酮类药物治疗结核病的安全性与有效性^[4], 临床上含氧氟沙星 (OFLX) 或左旋氧氟沙星 (LFX) 的方案治疗初治、复治、尤其耐多药结核病均有良好疗效^[5,6]。结核分枝杆菌具有对氟喹诺酮产生自发突变率低的特点, 且氟喹诺酮类与其他抗结核药之间无交叉耐药性。LFX 具有这种良好的抗结核分

枝杆菌活性,有较高的安全性以及与其他抗结核物良好的协同作用,决定了其在治疗耐药性结核杆菌(MDR-TB)中的重要作用及广阔的应用前景。但是既往对LFX治疗结核的研究缺乏长期疗效的观察,尤其是长期用药后结核病灶的组织病理的变化。另外,LFX的免疫调节功能在结核病致病机理中的作用也有待观察。

本实验对小鼠肺组织进行定量培养,发现从治疗后的第10天起,两组都能培养出了结核分枝杆菌,且对照组明显高于药物组。在治疗第30天后,药物组的细菌量虽然有明显增加,但在整个观察期内均明显低于对照组。另外,肺组织的病理结果也显示,药物组在炎症细胞浸润与肺组织实变程度均优于对照组,这表明,LFX有明显抑制结核分枝杆菌生长的作用。

IFN- γ 和TNF- α 作为Th1型的细胞因子,在免疫反应过程中起到增强抗原递呈细胞的递呈能力、促进T细胞增殖活化、增强细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic lymphocyte,CTL)杀伤活性的功能。本研究的结果显示,在应用LFX治疗后,小鼠脾细胞在BCG的刺激下,产生细胞因子IFN- γ 和TNF- α 的能力大大增强,表明LFX能够促进感染结核分枝杆菌的小鼠脾细胞分泌IFN- γ 和TNF- α 等细胞因子,进而调节细胞免疫功能。而当LFX作为直接刺激物对小鼠脾细胞进行体外培养却没有发现这种差异,说明LFX的免疫调节功能不是直接作用于脾细胞,而是通过机体的免疫系统来发挥作用的,具体机制还有待深入的研究。

LFX作为第三代喹诺酮类药物,可渗入巨噬细胞内,高浓度地集中在人体肺泡巨噬细胞中,能较好地发挥细胞内外杀菌作用。它是通过作用于细菌的DNA螺旋酶,抑制DNA螺旋酶A亚单位,从而抑制细菌DNA的复制和转录达到抗菌作用的。综合所得结果,LFX除了直接作用于被巨噬细胞吞噬的结核分枝杆菌,抑制其生长与繁殖外,还可能作用于巨噬细胞的相关受体,使其产生一系列的细胞因子,如IFN- γ 和TNF- α ,通过这些细胞因子的分泌,调节相关T细胞亚群的增殖与活性,从而促进免疫系统对结核分枝杆菌的细胞免疫功能。

参 考 文 献

- 1 全国结核病流行病学抽样调查技术指导组. 第四次全国结核病流行病学抽样调查报告. 中华结核和呼吸杂志,2002,25:327.
- 2 Kitazawa T. Biphasic regulation of levofloxacin on lipopolysaccharide-induced IL-1 β production. Life Sci,2007,80:1572-1577.
- 3 黎友伦,王国治,罗永艾. 结核分枝杆菌潜伏感染动物模型及评价. 中华结核和呼吸杂志,2005,8:552-554.
- 4 Richeldi L, Covi M, Ferrara G. Clinical use of Levofloxacin in the long-term treatment of drug resistant tuberculosis. Monaldi Arch Chest Dis,2002,57:39-43.
- 5 陆宇,朱莉贞,段连山,等. 左氧氟沙星的抗结核作用研究. 中华结核和呼吸杂志,2000,23:50-54.
- 6 Mangunegoro H, Hudoyo A. Efficacy of low-dose ofloxacin in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis in Indonesia. Chemotherapy,1999,45(Suppl 2):19-25.

(收稿日期:2009-10-29)

(本文编辑:孙荣华)

李美忠,童新灯,乐晓华,等. 左旋氧氟沙星对小鼠结核分枝杆菌生长及细胞免疫的影响[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2010,4(3):244-249.