

参考文献

- [1] 徐钱, 杨旭, 杨光涛, 等. 不同浓度甲醛致小鼠肾细胞 DNA 损伤效应研究[J]. 环境科学学报, 2007 27(2): 276-281.
- [2] 刘英帅, 鲁志松, 杨继文, 等. 甲醛致人血淋巴细胞 DNA-蛋白质交联作用的定量研究[J]. 湖北预防医学杂志, 2004 15(4): 4-7.
- [3] 施健, 朱士新, 童智敏, 等. 甲醛对职业接触工人健康效应的流行病学调查[J]. 中国职业医学, 2006 33(3): 237-238.
- [4] Malek FA, Moritz KU, Fanghane J, et al Effect of a single inhalative exposure to formaldehyde on the open field behavior of mice

- [J]. Int J Hyg Environ Health 2004 207(2): 151.
- [5] 周砚青, 王昆, 杨光涛, 等. 甲醛致大鼠脑细胞 DNA 损伤的初步研究[J]. 公共卫生与预防医学, 2006 17(6): 5-7.
- [6] 周建华, 胡晓磐, 徐瑛, 等. 甲醛致淋巴细胞 DNA 交联作用的体内外实验研究[J]. 工业卫生与职业病, 2004 30(6): 360-363.
- [7] 陆肇红, 时锡金, 周建华, 等. 苯与甲醛致小鼠睾丸细胞 DNA 损伤联合作用[J]. 中国公共卫生, 2006 22(12): 1498-1499.

收稿日期: 2009-10-21

(解学魁编校)

文章编号: 1001-0580(2010)04-0464-02

中图分类号: R512.6

文献标志码: A

【实验研究】

NF- κ B 对小鼠冠状病毒性肝炎致病作用*

晁漪澜¹, 林培政², 罗炳德¹, 李华峰², 万为人¹, 郭进强¹

摘要: 目的 探讨肝脏核因子 κ B (NF- κ B) 和血清辅助性 T 淋巴细胞 (Th1/Th2) 细胞因子方面对小鼠冠状病毒性肝炎的致病机制。方法 采用 4 周龄雄性 BALB/c 小鼠, 以鼠肝炎冠状病毒 (MHV-A59) 和大肠埃希菌作为生物致病因子, 建立 MHV-A59 鼠肝炎模型和大肠埃希菌鼠肝炎对照模型, 以正常健康小鼠为空白对照, 采用免疫组化法检测小鼠肝脏 NF- κ B 表达 [吸光度 (A) 值], ELISA 法检测小鼠血清白介素-4 (IL-4)、干扰素- γ (IFN- γ) 水平。结果冠状病毒模型组、大肠埃希菌对照小鼠肝脏 NF- κ B 表达分别为 A=0.305 A=0.245, 外周血 Th1/Th2 (IFN- γ /IL-4) 比值分别为 (2.17 \pm 0.16), (2.09 \pm 0.06) pg/mL, 均比正常组有明显升高, 差异有统计学意义 (P<0.05 或 P<0.01), 但冠状病毒模型组升高更明显。结论 肝脏 NF- κ B 表达增强及血清 Th1/Th2 细胞因子失衡可能是小鼠冠状病毒性肝炎的致病机制之一。

关键词: 鼠肝炎冠状病毒; 致病机制; 肝脏核因子 κ B; 血清辅助性 T 淋巴细胞

Expression of NF- κ B and Th1/Th2 in mice with mouse hepatitis virus infection CHAO Yi-lan, LIN Pei-zheng, LUO Bing-de, et al Department of Child and Adolescent Health School of Tropical Medicine and Public Health Southern Medical University (Guangzhou 510515, China)

Abstract: Objective To study expressions of NF- κ B and T helper 1 (Th1)/T helper 2 (Th2) in mice with mouse hepatitis virus (MHV) infection. Methods Four weeks old BALB/c male mice were divided into three groups randomly: control group, MHV model group and Bacillus coli group. The expression of NF- κ B in mouse liver tissue was analyzed with immunohistochemistry. The level of interleukin-4 (IL-4) and interferon gamma (IFN- γ) in mouse serum were detected with ELISA. Results The expressions of NF- κ B and Th1/Th2 (IFN- γ /IL-4) of MHV group and Bacillus coli group increased obviously compared to that of control group (P<0.05 or P<0.01). Conclusion The increased expression of NF- κ B in mouse liver and the disequilibrium of Th1/Th2 in serum are one of pathogenic mechanisms of mouse hepatitis.

Key words: MHV-A59; Pathogenic mechanism; NF- κ B; Th1/Th2

病毒性肝炎与 NF- κ B 表达的关系十分密切。Toll 样受体 (TLRs) 是宿主细胞识别各种病原微生物的受体^[1], 核因子 κ B 是其中炎症反应的中枢因子, 在机体的炎症、免疫反应等方面发挥重要作用; 细胞因子是 NF- κ B 所调控基因的表达产物, 介导和调节免疫应答和炎症反应^[2]; 许多疾病的发生也与 Th1/Th2 类细胞失衡相关^[3]。为探讨冠状病毒性肝炎与肝脏核因子 κ B (NF- κ B) 和血清辅助性 T 淋巴细胞 (Th1/Th2) 细胞因子的关系, 本研究建立冠状病毒鼠肝炎模型与大肠埃希菌鼠肝炎模型, 结合 MHV-A59 的嗜肝性特征, 从小鼠肝脏 NF- κ B 表达水平和血清 Th1/Th2 细胞因子 [血清白介素-4 (IL-4)、干扰素 (IFN- γ)] 比值变化进行观察。现将结果报告如下。

* 基金项目: 国家自然科学基金; 广东省联合基金 (U0632009)

作者单位: 1 南方医科大学公共卫生与热带医学学院儿少卫生学系, 广州 510515 2 广州中医药大学

作者简介: 晁漪澜 (1988-), 女, 内蒙古人, 硕士在读, 研究方向为发热的病理生理学。

通讯作者: 罗炳德, 林培政

1 材料与方法

1.1 材料 (1) 动物与饲料: 清洁级 BALB/c 雄性小鼠, 4 周龄, 体重 (13 \pm 2) g (南方医科大学动物实验中心, 动物合格证号: NO. 0030668); 普通饲料 (南方医科大学动物实验中心); 内生热饲料 (广东省医学实验动物中心) 配方: 80% 基础饲料 + 8% 蜂蜜 + 12% 猪油。(2) 试剂与仪器: NF- κ B 一抗 (美国 Santa cruz 公司); NF- κ B 二抗, 二氨基联苯胺 DAB 显色试剂盒 (上海西唐科技有限公司); IL-4 原装试剂盒、IFN- γ 原装试剂盒 (上海轩昊试剂公司, IL-4 批号: A1010A0104U, IFN- γ 批号: A1010A0123U)。BX50 型显微镜 (日本 OLYMPUS 公司); Powerwave HT 型酶标仪 (美国 Biotek 公司); JD801 数码医学显微图像分析系统 (江苏省捷达科技发展有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及造模 根据文献 [4] 造模。将 BALB/c 小鼠 18 只随机分为正常组、冠状病毒模型组和大肠埃希菌对照组, 每组 6 只。正常组予以普通饲料, 自由饮水及自然环境饲养。模型组和肠菌组小鼠先予以内生热饲料, 自由饮水和自

然环境饲养;至第 10 d 分别予以腹腔注射 MHV-A59 0.5 mL (浓度为 $10^{-5.5}$) 和大肠埃希菌 (浓度为 10^9 /mL) 0.4 mL/10 g 灌胃感染 1 次,第 12 d 上午分别重复给药 1 次。感染后第 1 3 5 d 上午放入气候模拟舱内,温度 (32 ± 0.5) °C,相对湿度 (60 ± 5)%;最后 1 次出气候模拟舱时造模完毕。动物出现明显的倦怠嗜卧、耸毛、大便烂、进食少、体重减轻、舌质黯红或黄腻为造模成功。

1.2.2 取材及样本预处理 取材前动物禁食不禁水 12 h 将小鼠肝脏右叶放入多聚甲醛中固定,放入 4 °C 环境中保存待测;摘眼球取血,静置 30 min 后,1 500 r/min 离心 15 min 取上清液保存于 4 °C,待测。

1.2.3 肝脏 NF- κ B 表达的检测 采用免疫组化法^[5]染色,脱水,透明,封片。每张切片分别在显微镜下放大 200 倍,随机选取视野,对其中有代表意义的阳性结果进行拍照,并用图像分析系统,分析平均吸光度 (A) 值。

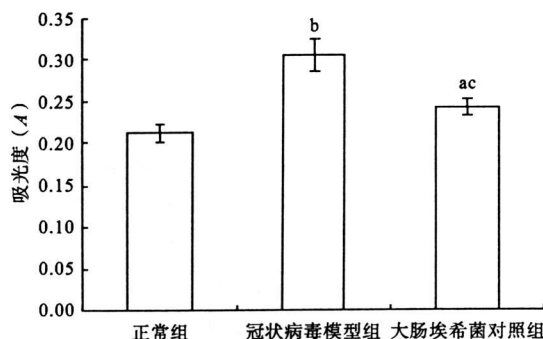
1.2.4 血清 IFN- γ 、IL-4 水平检测 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法。试剂盒平衡至室温 ($20 \sim 25$ °C),严格按说明书操作。

1.3 统计分析 使用 SPSS 11.5 软件进行 F 分析及 χ^2 检验。

2 结果

2.1 小鼠肝脏 NF- κ B 表达 (图 1) 图 1 可见,2 个感染组与正常组比较,肝脏 NF- κ B 表达均升高,差异有统计学意义 (分

别 $P < 0.05$ $P < 0.01$),其中冠状病毒模型组比大肠埃希菌组升高更明显 ($P < 0.01$)。



注:与正常组比较, a $P < 0.05$ b $P < 0.01$;与冠状病毒模型组比较, c $P < 0.01$

图 1 各组小鼠肝脏 NF- κ B 表达的吸光度值

2.2 小鼠肝脏 NF- κ B 表达的光镜观察 (图 2) 图 2 可见,病毒和细菌感染后的小鼠肝细胞中均可见 NF- κ B 的活化和阳性表达,其中冠状病毒模型组比大肠埃希菌对照组的阳性表达更为明显。阳性细胞主要为浸润于病灶中的炎性细胞,活化的 NF- κ B 表达于细胞核中,呈棕黄色颗粒。

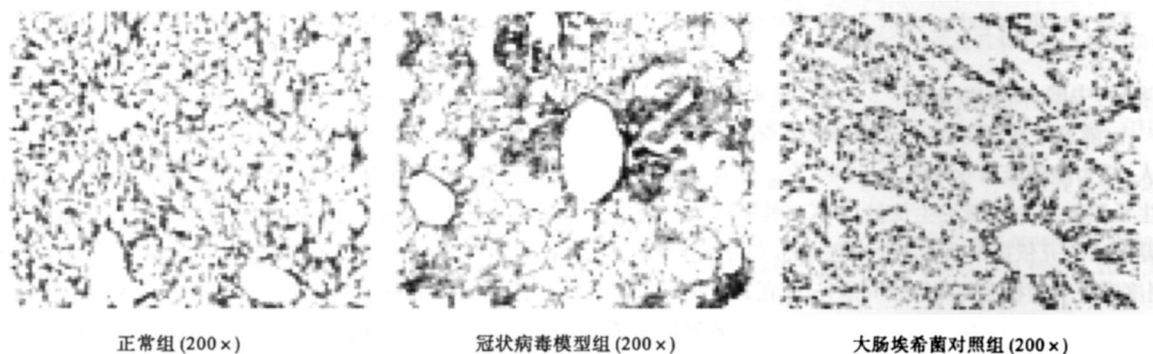


图 2 小鼠肝脏 NF- κ B 的表达

2.3 小鼠血清 Th1/Th2 比值变化 (表 1) 表 1 可见,2 个感染组与正常组比较,IL-4 含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$),而 IFN- γ 含量均升高,差异有统计学意义 ($P < 0.01$ $P < 0.05$);与正常组比较,冠状病毒模型组、大肠埃希菌对照组 IFN- γ /IL-4 比值均升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$ $P < 0.01$),但前者比后者升高更明显。

表 1 不同组别外周血 Th1/Th2 比值变化 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	IL-4	IFN γ	IFN γ /IL-4
正常组	3752.12 \pm 46.01	7135.08 \pm 65.90	1.90 \pm 0.02
冠状病毒模型组	3921.27 \pm 284.44	8030.48 \pm 375.40 ^b	2.17 \pm 0.16 ^b
大肠埃希菌对照组	3603.80 \pm 118.01 ^c	7675.58 \pm 437.68 ^a	2.09 \pm 0.06 ^a

注:与正常组比较, a $P < 0.05$ b $P < 0.01$;与冠状病毒模型组比较, c $P < 0.01$ 。

3 讨论

本实验结果显示,2 种病原感染组小鼠肝脏 NF- κ B 表达均比正常组升高,而冠状病毒模型组比大肠埃希菌对照组升高更明显,提示冠状病毒性肝炎与 NF- κ B 的过度表达有关。MHV-A59 嗜肝性可能是造成 2 种病原感染组小鼠肝脏 NF- κ B 表达有明显差异的原因。同时,与正常组比较,冠状病毒模型组、大肠埃希菌对照组小鼠血清 IFN- γ /IL-4 比值升高差

异有统计学意义,而前者比后者升高更明显,表明冠状病毒性肝炎与 Th1/Th2 失衡有关。有研究表明,小鼠被病毒感染后,TLR 表达明显升高,从而会诱导细胞中 NF- κ B 过度活化^[6]。结合本实验结果,推测病毒感染小鼠 TLR 的表达量增加,其下游基因 NF- κ B 过度活化,导致血清中 IFN- γ 含量增加,IFN- γ /IL-4 比值升高,Th1/Th2 向 Th1 漂移,细胞免疫占优势,而造成肝脏的损伤可能是小鼠冠状病毒性肝炎的致病机制之一。

参考文献

- [1] 杨晶,姜德建,张一帅,等. Toll 样受体与心脏疾病 [J]. 中国药理学通报, 2008 24(9): 1121-1123.
- [2] 李淑珍,王素萍,原琛利,等. 孕妇 HBV 感染与胎盘组织 TLR3 表达关系 [J]. 中国公共卫生, 2008 24(2): 129-131.
- [3] 龚力菲. 医学免疫学 [M]. 北京: 科学出版社, 2000 78 81 83 155 248.
- [4] 阎翔,郭明阳. 建立温病湿热证动物模型方法探讨 [J]. 成都军区医院学报, 2003 5(6): 37.
- [5] 王明月,屠冠军. 白细胞介素及金属蛋白酶在退变腰椎间盘表达 [J]. 中国公共卫生, 2009 25(2): 164-166.
- [6] Zhang D, Zhang G, Mathew S et al. A Toll like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria [J]. Science, 2004 303 (5663): 1522-1526.

收稿日期: 2009-07-21

(孔繁学编辑 蔡天德校对)