

• 论 著 •

Th17 免疫细胞受细菌生物膜影响后水平变化的研究

景 阳, 王宇娟[△], 刘 晖, 张 文, 杨晓蓉

(陕西省人民医院耳鼻喉科, 西安 710068)

摘要:目的 探讨辅助性 T 细胞 17(Th17)和白细胞介素(IL)-17 受细菌生物膜影响引起水平变化的意义。方法 选取 2015 年 1—12 月肺泡灌洗液标本 261 例进行细菌培养与鉴定,分别检测健康人群、生物膜细菌感染人群及非生物膜细菌感染人群外周血和肺泡灌洗液的 Th17 细胞表达率和 IL-17 细胞因子,并进行分析比较。结果 生物膜感染人群肺泡灌洗液中 Th17 细胞表达率及 IL-17 细胞因子水平与非生物膜感染人群比较差异有统计学意义($P < 0.05$);而这 2 组外周血与健康人群外周血的 Th17 细胞表达率及 IL-17 细胞因子水平之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 细菌生物膜可以刺激机体感染局部 Th17 细胞表达水平和 IL-17 细胞因子水平升高,而并未引起全身免疫反应,具有临床指导意义。

关键词:细菌生物膜; 辅助性 T 细胞 17; 白细胞介素-17

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.08.014 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)08-1082-03

Research of change on Th17 cell level affected by bacterial biofilm

JING Yang, WANG Yujuan[△], LIU Hui, ZHANG Wen, YANG Xiaorong

(Department of ENT, Shanxi Provincial People's Hospital, Xi'an, Shaanxi 710068, China)

Abstract: **Objective** To investigate the significance of Th17 cell and IL-17 level change affect by bacterial biofilm. **Methods** Two hundreds and sixty-one specimens of alveolar lavage fluid from January to December 2015 were selected to conduct bacterial culture and identification. The Th17 cell expression rate and IL-17 cytokine of peripheral blood and alveolar lavage fluid were detected in healthy population, patients with and without biofilm bacterial infection. Then the analysis and comparison were performed. **Results** The Th17 cell expression rate and IL-17 cytokine level had statistical difference between the patients with biofilm bacterial infection and the patients with non-biofilm bacterial infection ($P < 0.05$); however there are no statistical differences in the Th17 cell expression rate and IL-17 cytokine level of peripheral blood between these two groups and healthy population ($P > 0.05$). **Conclusion** Bacterial biofilm could stimulate the increase of Th17 cell expressing level and IL-17 cytokine level in infected part, but could not cause the systemic immunoreaction, which has a clinical guiding significance.

Key words: bacterial biofilm; Th17 cell; IL-17

细菌生物膜形成是适应外界环境的表现,细菌形成生物膜后对抗菌药物等外界刺激产生一定的抵抗性,从而使机体感染不断加重,较难根除,使感染慢性化、复杂化^[1-2]。关于受细菌生物膜感染后机体如何产生免疫反应及反应程度,目前相关报道较少。有研究指出,细菌生物膜感染诱发了辅助性 T 细胞 17(Th17)细胞增殖及白细胞介素(IL)-17 细胞因子表达水平增强。但也有报道称,生物膜并未引起机体显著的免疫反应^[3]。本研究主要探讨 Th17 免疫细胞受细菌生物膜影响的变化及临床意义。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 选取本院 2015 年 1—12 月肺泡灌洗液标本 261 例,铜绿假单胞菌及鲍曼不动杆菌源于上述肺泡灌洗液标本(细菌由肺泡灌洗液中培养分离)中第一代分离菌株。

1.2 仪器与试剂 仪器:美国 BD 公司生产的 FACS Canto 流式细胞仪、全自动酶免仪工作站为山东博科公司所生产。试剂:Biolegend 公司人 Th17 流式检测试剂盒;Biolegend 公司 CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺/Treg 一步法流式检测试剂盒;佛波酯、离子霉素均购于 Sigma 公司;莫能霉素购于 Biolegend 公司;IL-17 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒为 Biosource 公司生产,自行配置结晶紫染液。

1.2 方法

1.2.1 IL-17 的检测 肺泡灌洗液标本的获取严格按照无菌操作,肺泡灌洗液经无菌纱布过滤,共 4 次,然后注入 10 mL 的无菌试管中,按照 2 000 r/min 离心 15 min,取上清液,检测 IL-17 水平,取离心后沉淀物用于检测 Th17 细胞及细菌培养。除此之外,还需检测患者和健康对照人群的外周血的 Th17 细胞及 IL-17 的水平。

1.2.2 细菌培养与鉴定 无菌条件下取少量肺泡灌洗液离心后沉淀物,用于细菌培养,将标本分别接种于 2 种培养平板,分别为血琼脂平板和麦康凯培养平板,第 2 日进行细菌鉴定,以了解生物膜的形成能力(经鉴定后剔除非铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌的标本结果)。

1.2.3 细菌生物膜形成能力的检测 原理:结晶紫与细菌生物膜结合而不被脱色液洗脱,然后检测结晶紫吸光度大小,从而定量细菌生物膜。使用细菌标准比浊管,分别将 2 种细菌菌液调整到 0.5 麦氏浊度,每个菌的 3 个复孔分别加入菌液 10 μ L,取 1 个空白对照孔加培养液 10 μ L,保持 37 $^{\circ}$ C,培养 48 h;每个菌的 3 个复孔中分别加入 0.25 g/L 的结晶紫染液 150 μ L,在室温下保持 20 min;然后用 0.9%的氯化钠溶液冲洗至少 5 次,空气中晾干;每个复孔分别加入 95%乙醇 300 μ L,在

室温下保持 10 min,达到脱色目的;使用比色法检测每孔脱色液在 570 nm 处的吸光度(A_{570})值,从而计算出各个菌的 A_{570} 值。

1.2.4 检测 Th17 细胞和 IL-17 分别检测肺泡灌洗液标本、对应患者的外周血及人群外周血的 Th17 细胞和 IL-17。

1.5 统计学处理 以 SPSS19.0 软件进行统计学分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料采用例数或率表示,组间比较采用 χ^2 检验;以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细菌培养结果 肺泡灌洗液标本共培养所需细菌 117 株,其中铜绿假单胞菌 62 株(占 52.99%),鲍曼不动杆菌 55 株(占 47.00%)。

2.2 细菌生物膜形成能力检测结果 117 株细菌 A_{570} 值的分布范围为 0.18~2.14, A_{570} 值 1.5 及以下的细菌作为弱生物膜形成菌(共 23 株),对应人群纳入非生物膜感染组; A_{570} 值 1.5 以上的细菌作为强生物膜形成菌(共 29 株),其对应人群纳入生物膜感染组。

2.3 各组外周血 Th17 细胞和血清 IL-17 水平比较 见表 1。外周血 Th17 细胞生物膜感染组与非生物膜感染组比较差异无统计学意义($P=0.502$),与健康对照组比较差异无统计学意义($P=0.829$);非生物膜感染组与健康对照组比较差异无统计学意义($P=0.477$);外周血血清 IL-17 生物膜感染组与非生物膜感染组比较差异无统计学意义($P=0.224$),与健康对照组比较差异无统计学意义($P=0.115$);非生物膜感染组与健康对照组比较差异无统计学意义($P=0.838$)。

表 1 各组外周血 Th17 细胞和血清 IL-17 水平($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	Th17 细胞(%)	IL-17(pg/mL)
生物膜感染组	29	0.60±0.17	109.7±20.4
非生物膜感染组	23	0.57±0.16	101.1±20.5
健康对照组	23	0.55±0.15	100.0±21.3

2.4 各组肺泡灌洗液 Th17 细胞和 IL-17 水平 见表 2。生物膜感染组与非生物膜感染组肺泡灌洗液 Th17 细胞比较差异有统计学意义($P=0.001$);生物膜感染组对非生物膜感染组肺泡灌洗液 IL-17 比较差异有统计学意义($P=0.005$)。

表 2 不同试验组肺泡灌洗液 Th17 细胞和 IL-17 水平($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	Th17 细胞(%)	IL-17(pg/mL)
生物膜感染组	28	1.36±0.26	158.2±30.7
非生物膜感染组	24	1.12±0.20	135.5±23.7
<i>t</i>		3.682	2.946
<i>P</i>		0.001	0.005

3 讨 论

细菌生物膜是细菌在外界环境刺激下产生的一种复杂结构。细菌常常趋向于固体表面,形成群落,从而形成一种生物膜,这是细菌一种保护性生长方式,其形成具有多样性^[4]。据保守估计,人类感染性疾病 80.00% 以上与细菌生物膜有

关^[5]。非细菌生物膜感染多数是由于游离单一细菌致病,对抗菌药物的耐药性不强,在感染部位较易被清除干净,感染易被控制。细菌生物膜的形成所引起的感染较难控制,可能是由于细菌生物膜对抗菌药物耐药性极强,甚至可以逃避宿主的免疫反应,在感染部位难以彻底清除所致。Jang 等^[6]研究发现,大多数鼓膜通风管表面布满大量的铜绿假单胞菌生物膜,考虑铜绿假单胞菌生物膜是鼓膜置管术后形成难治性耳漏的主要原因。目前研究发现,细菌生物膜不再局限于一种细菌,往往发现多种细菌甚至与真菌联合形成生物膜。由于不同菌属之间相互作用,细菌适应环境的能力不同,其可在宿主多部位形成生物膜,并形成更加复杂的结构,从而使感染具有不同于单一感染的特点,往往更难控制和治疗。有研究发现,在假牙导致口腔炎的检查时发现,所检查大部分口腔炎患者存在金黄色葡萄球菌和白假丝酵母菌共同感染,导致感染不断复发可能是其形成更加复杂的生物膜^[7]。有学者认为,细菌生物膜并未引起宿主的免疫反应,但也有学者认为,细菌生物膜诱导了宿主炎症因子的升高,且炎症因子加快了宿主细菌生物膜的生长^[8]。

Th17 细胞亚群是独立于辅助性 T 细胞 1(Th1)和辅助性 T 细胞 2(Th2)亚群,主要分泌 IL-17、IL-17F、IL-22 及 IL-21^[9-10]。虽然不能完全肯定 Th17 细胞是主要致病因素,但是通过某些自身免疫性疾病、感染性疾病、过敏疾病及肿瘤研究发现, Th17 及相关细胞因子发挥着重要作用^[11-12]。Pene 等^[13]发现,取牛皮癣患者皮损处获得的 Th 细胞,显示出显著 Th17 表型。Kirkham 等^[14]进行风湿性关节炎调查中发现, Th17 细胞表面的 RANKL 表达可以诱导破骨细胞的生成,从而促进软骨和骨的破坏和再吸收。对于胃溃疡、牙周炎等细菌性的感染, IL-17 表达水平升高,提示可能炎症反应刺激 Th17 细胞分泌了较多 IL-17。有研究发现,在肺癌脑转移患者外周血的 Th17 细胞增多,血浆和脑脊液中 IL-17 均升高^[15],提示肺癌脑转移的发生发展可能与 Th17 和 IL-17 有关。

Th17 细胞和 IL-17 在自身免疫性疾病、过敏性疾病等相关领域已经取得一定成果。但在感染性疾病,尤其是在慢性感染疾病研究方面并未有太多的研究成果^[16]。本研究发现,细菌生物膜形成只是引起了机体局部免疫反应,以及 Th17 细胞、IL-17 的变化,而并未引起全身系统的免疫反应。可能的机制是细菌生物膜刺激局部机体 Th17 细胞产生,从而使 IL-17 细胞因子增多,中性粒细胞聚集,较多的中性粒细胞损伤感染机体组织。所以,笔者推测,如果降低机体免疫反应,有可能减轻机体的局部感染,甚至可以防止机体感染的慢性化。但是,对于细菌生物膜如何诱发 Th17 细胞增殖和 IL-17 升高,还需要进一步研究。细菌生物膜与 IL-17/Th17 细胞的研究将会为感染性疾病的控制和治疗提供依据和支持。

参考文献

[1] 刘青,苏欣,施毅.肺炎链球菌生物膜形成的调节[J].中国感染与化疗杂志,2013,13(2):150-154.
[2] 雷霞,黄正,伍津津.光动力对细菌生物膜的作用研究进展[J].中华皮肤科杂志,2014,47(4):299-301.
[3] Wood AJ,Fraser JD,Swift S,et al. Intramucosal bacterial microcolonies exist in chronic rhinosinusitis without inducing a local immune response[J]. Am J Rhinol Allergy,

2012,26(4):265-270.

[4] 施德仕,邵海枫. 细菌生物膜感染的研究进展[J]. 医学研究生学报,2011,24(12):1319-1323.

[5] Simion M, Kim DM, Pieroni S, et al. Bacterial biofilm morphology on a failing implant with an oxidized surface: a scanning electron microscope study[J]. Int J Periodontics Restorative Dent, 2016,36(4):485-488.

[6] Jang CH, Cho YB, Jang YS, et al. Antibacterial effect of electrospun polycaprolactone/Polyethylene oxide/vancomycin nanofiber mat for prevention of periprosthetic infection and biofilm formation[J]. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2015,79(8):1299-1305.

[7] Chopde N, Jawale B, Pharande A, et al. Microbial colonization and their relation with potential cofactors in patients with denture stomatitis[J]. J Contemp Dent Pract, 2012,13(4):456-459.

[8] 刘晓斐,石云,邹全明,等. Th17 细胞及 IL-17 在病原微生物感染中的研究进展[J]. 中国免疫学杂志,2009,25(9):854-857.

[9] Lastic AL, Rodi M, Mouiaki A. Effect of dendritic cell state and antigen-presentation conditions on resulting T-cell phenotypes and Th cytokine profiles[J]. Immunobiology, 2016,221(8):862-870.

[10] Imperatore N, Rispo A, Capone P, et al. Gluten-free diet not influence the occurrence and the Th1/Th17-Th2 nature of immune-mediated diseases in patients with coeliac disease[J]. Dig Liver Dis, 2016,48(7):740-744.

[11] 王国钺,王小芳,汪磊,等. 细菌生物膜对 TH17 免疫细胞的刺激作用[J]. 中国免疫学杂志,2015,31(1):36-39.

[12] 岳睿. Th17 细胞在免疫相关血液系统疾病发病机制中的作用[J]. 医学综述,2015,21(1):12-14.

[13] Pene J, Chevalier S, Preisser L, et al. Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated TH17 lymphocytes[J]. J Immunol, 2008,180(11):7423-7430.

[14] Kirkham BW, Wasko MC, Hsia EC, et al. Effects of golimumab an anti-tumour necrosis factor- α human monoclonal antibody, on lips and makers of inflammation[J]. Ann Rheum Dis, 2014,73(1):161-169.

[15] 何改平,张彬,张宝文,等. 肺癌脑转移患者 TH17 细胞和 IL-17 水平变化的研究[J]. 中国肺癌杂志,2013,16(9):476-481.

[16] 袁睿,韦嘉. IL-17/Th17 细胞在感染性疾病总的作用研究进展[J]. 医学综述,2013,19(13):2322-2324.

(收稿日期:2016-12-18 修回日期:2017-01-09)

(上接第 1081 页)

引起多种促炎细胞因子的释放,诱导单核细胞、巨噬细胞进一步释放 IL-1 β 等炎性因子,加重局部炎性反应及牙周组织破坏程度^[10-11]。受到损伤或刺激时,小胶质细胞 CX3CR1 的表达上调,CCL11 的黏附作用也刺激 IL-1 β 等促炎细胞因子的释放,引起炎性介质的释放,最终导致组织的破坏。活化的 RAGE 还可激活所附着的细胞产生关键的 MMP 等介质, HMGB2 进一步促进 MMP 降解软骨细胞外基质及基底膜成分,破坏牙周组织。

本研究未能从组织学上证明 HMGB2、HMGB1、CX3CL1、CCL11 在牙周组织中的表达,需进一步研究,将有助于牙周分子靶向治疗的研究。

综上所述,牙周炎患者血清及龈沟液中 MMP-4、MMP-5、HMGB2、HMGB1、CX3CL1、CCL11 及 IL-1 β 均显著上升,趋势呈一致性,共同参与牙周炎的发病过程,并在其发生发展中发挥着重要作用。

参考文献

[1] 单炜. 高迁移率族蛋白 B1 与牙周病及糖尿病伴牙周病关系研究进展[J]. 中国实用口腔杂志,2014,7(9):561-565.

[2] Cifcibasi E, Kantarci A, Badur S, et al. Impact of metronidazole and amoxicillin combination on matrix metalloproteinases-1 and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases balance in generalized aggressive periodontitis[J]. Eur J Dent, 2015,9(1):53-59.

[3] 孙建琴,陈红英,姚忠红. 电针配合威灵仙关节腔内注射

对大鼠膝关节炎 MMPs 及 HA 的影响[J]. 中国中医急症,2016,25(5):791-794.

[4] 魏佳琦,柳宏志,王天祥. 咬合创伤对 OVX 小鼠牙周组织中 HMGB1 表达的影响[J]. 口腔医学研究,2016,32(6):575-579.

[5] 侯聪聪,刘宏斌,肖湖南,等. 高迁移率族蛋白 B1 与自噬的关系[J]. 解放军医学院学报,2016,37(6):671-673.

[6] 唐国栋,杨国夫. HMGB2 与骨性关节炎相关性的研究进展[J]. 中国矫形外科杂志,2015,23(13):1199-1201.

[7] 刘红梅,李梦迪,毛燕南,等. 趋化因子 CX3CL1/CX3CR1 生物轴促进铂类药物诱导卵巢癌细胞凋亡的研究[J]. 临床肿瘤学杂志,2016,21(5):390-396.

[8] 崔占琴,李文静,刘焕. 自锁托槽矫治器对慢性广泛型牙周炎正畸治疗患者龈沟液中 IL-1 β 和 TNF- α 表达的影响[J]. 河北医药,2016,38(10):1445-1449.

[9] 李雨衡,王文,罗层,等. 电针抑制脊髓内趋化因子 CX3CL1 表达减轻炎性痛的实验研究[J]. 神经解剖学杂志,2016,32(2):169-173.

[10] 路涛,司梦雅,邹金波. 1 趋化因子 CCL11、D-二聚体水平在荨麻疹中的变化及其意义[J]. 中国热带医学,2016,16(6):594-596.

[11] 林梅,张冬雪,刘志强,等. 慢性牙周炎患者血清 IL-33、TNF- α 、IL-6 的检测及意义[J]. 首都医科大学学报,2016,37(3):255-259.

(收稿日期:2016-12-19 修回日期:2017-01-10)