·论 著·

雾化吸入金葡素诱导主动性免疫防护降低兔金黄色葡萄球菌的感染效应

简黎，叶永斌，郭子文，张农惠，李宏伟，邱大发，许晓军
中山市人民医院 血液内科，广东 中山 528403

摘要：目的 探索雾化吸入金葡素（staphylococcin）是否诱导主动性免疫防护以降低兔金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）的感染效应。**方法** 将金黄色葡萄球菌感染的新西兰大白兔模型 30 只（雌雄各半，平均体质量 2.45 kg）随机分为对照组、雾化组，每组 15 只。对照组采用生理盐水进行雾化吸入，雾化组采用生理盐水＋金葡素雾化吸入，每天 1 次，共 20 d。ELISA 法检测各组兔模型采用干预因素处理前后血清 IgG 抗体滴度，碱性磷酸酶－抗碱性磷酸酶桥联酶染色法（APAAP 法）检测 T 细胞亚群 $CD4^+$、$CD8^+$ T 淋巴细胞比例和 $CD4^+/CD8^+$ 比值的变化。**结果** 雾化组处理后兔血清 IgG 抗体滴度显著高于对照组，差异有统计学意义（$\chi^2=18.945\ 1$，$P<0.01$）。同时，雾化组 $CD4^+$ T 淋巴细胞比例显著高于对照组（$t=2.134\ 0$，$P<0.01$），$CD4^+/CD8^+$ 比值也明显高于对照组（$t=5.298\ 3$，$P<0.05$）。**结论** 雾化吸入金葡素能有效诱导金黄色葡萄球菌感染的兔产生主动性免疫防护，降低金黄色葡萄球菌感染的效应。

关键词： 金葡素；金黄色葡萄球菌；免疫防护
中图分类号： R-33；R392.5；R378.11 **文献标志码：** A **文章编号：** 1005-376X（2020）03-0260-04
DOI 编码： 10.13381/j.cnki.cjm.202003003

Aerosol inhalation of staphylococcal enterotoxin for inducing active immune protection reduces infection effect of *Staphylococcus aureus* in rabbits

JIAN Li*, YE Yongbin, GUO Ziwen, ZHANG Nonghui, LI Hongwei, QIU Dafa, XU Xiaojun
** Department of Hematology, Zhongshan Hospital of Sun Yat-Sen University & People's Hospital of Zhongshan, Zhongshan, Guangdong* 528403, *China*
Corresponding author: GUO Ziwen, E-mail: yongbiny1984@163.com

Abstract: Objective To explore whether aerosol inhalation of staphylococcal enterotoxin induces active immune protection to reduce the infection effect of *Staphylococcus aureus* in rabbits. **Methods** A total of 30 New Zealand white rabbit models (half male and half female, with average body weight of 2.45 kg) infected with *Staphylococcus aureus* were randomly divided into control group or atomization group. The control group was treated with normal saline via aerosol inhalation, while the atomization group was given inhalation of normal saline and staphylococcal enterotoxin, once a day for 20 days. ELISA was used to detect serum IgG antibody titer before and after the intervention in each group. Alkaline Phosphatase Anti Alkaline Phosphatase (APAAP) staining method was adopted to detect the changes of T cell subset $CD4^+$, $CD8^+$ T lymphocyte ratio and $CD4^+/CD8^+$ ratio. **Results** The serum IgG antibody titer after treatment in the atomization group was significantly higher than that in the control group, with significant difference ($\chi^2=18.945\ 1$, $P<0.01$). The proportion of $CD4^+$ T lymphocytes in the atomization group was significantly higher than that in the control group ($t=2.134\ 0$, $P<0.01$), so was the $CD4^+/CD8^+$ ratio ($t=5.298\ 3$, $P<0.05$). **Conclusion** Aerosol inhalation of staphylococcal enterotoxin can effectively induce active immune protection in rabbits infected with *Staphylococcus aureus*, thereby reducing the effect of *Staphylococcus aureus* infection.

Key words: Staphylococcal enterotoxin; *Staphylococcus aureus*; Immune protection

基金项目： 中山市科技计划（2014A1FC037）；中山市科技计划（2016B1023）；广东省医学科学技术研究基金（A2016043）
作者简介： 简黎（1969-），女，本科，从事血液系统疾病的研究，E-mail：baiselili4664@163.com
通信作者： 郭子文（1969-），男，本科，从事血液系统疾病的诊治、造血干细胞移植，E-mail：yongbiny1984@163.com

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

临床上，免疫功能发育不全的儿童、免疫功能退化的老年人、受到大的创伤者、肿瘤患者、接受器官和组织移植的患者都有可能发生机会性感染，其中以金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）（金葡菌）感染发生的频率最高，并常导致感染性死亡。金黄色葡萄球菌滤液制剂（filter preparation of *Staphylococcus aureus*），简称金葡素（staphylococcin），是一种从高效、低毒的金葡菌变异株代谢产物中提取的生物制剂[1-4]，研究报道该生物制剂具有广泛的生物活性，包括增强细胞免疫和体液免疫应答[5-7]，还有报道注射用金葡素与化疗药物联合具有较好的抗肿瘤疗效，同时可以促进肿瘤患者化疗后免疫功能的恢复[8-11]。本研究采用金葡菌感染的新西兰大白兔模型探讨雾化吸入金葡素是否诱导主动性免疫防护以降低兔呼吸道金葡菌的感染效应，以期为临床金葡菌感染的治疗和肿瘤化疗后患者感染的预防提供实验数据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 选取 4 月龄健康新西兰大白兔 30 只［南方医科大学实验动物中心，实验动物许可证：SYXK（粤）－0056］，雌雄各半，平均体质量 2.45 kg，随机分为对照组、雾化组，每组 15 只。根据前期预实验数据，对照组每只兔采用 2 mL 生理盐水进行雾化吸入，雾化组每只兔采用 2 mL 生理盐水＋金葡素（0.2 mL/kg）雾化吸入。由于兔的生理结构与人不同，因此，实验采用本课组自制改良的雾化器进行雾化。

1.2 实验试剂 金黄色葡萄球菌滤液制剂，简称金葡素（每支 1 mL，含肠毒素 C 10 ng/mL）（沈阳协合集团，国药准字 S19990010），0.9% NaCl 注射液（双鹤药业，国药准字 H34023609），ELISA 试剂盒（赛默飞，中国上海），羊抗兔 IgG、HRP 酶标二抗 IgG（上海鼎国生物技术有限公司），兔抗 CD4、CD8 抗体和二抗（Bio-Techne 公司），PBS、吐温 20、96 孔酶标板、丙酮等（广州莱兹生物有限公司），小牛血清（杭州四季青）。

1.3 IgG 抗体滴度检测 对照组：生理盐水进行雾化，雾化组：生理盐水＋金葡素进行雾化，每天 1 次，处理 20 d 后分离各组血清，对照组和雾化组每只兔血清设 5 个复孔，采用间接 ELISA 法检测各组兔血清中 IgG 抗体滴度，最终 IgG 抗体滴度取各组平均值，同时设一个质控标本用于不同批次标本结果的校正。操作步骤：（1）用 pH 值 9.6 的碳酸盐缓冲液将金葡素液做 1 ∶ 100 稀释，然后包被 96 孔酶标板，4 ℃过夜；（2）以 15% 小牛血清 PBST（1‰ 吐温 20）进行封闭；（3）样本血清用含 5% 小牛血清的 PBST 稀释 100 倍后进行加样；（4）加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体（1 ∶ 5 000）；（5）加入邻苯二胺底物及 H_2O_2，避光显色；（6）用 2 mol/L 的 H_2SO_4 终止反应。结果用 490 nm 波长的酶标仪（Labsystems Dragon）检测各孔吸光度（*A* 值）。

1.4 $CD4^+$、$CD8^+$ T 淋巴细胞比例和 CD4/CD8 比值检测 对照组：生理盐水进行雾化，雾化组：生理盐水＋金葡素进行雾化，每天 1 次，处理 20 d 后分离各组血液标本，采集的对照组和雾化组血液样本采用 $CD4^+$、$CD8^+$ 免疫磁珠标记后进行分离，分离后的细胞进行细胞爬片，采用 APAAP 法检测各组 $CD4^+$、$CD8^+$ T 淋巴细胞比例及 $CD4^+/CD8^+$ 比值。操作步骤：（1）取经过固定的细胞爬片；（2）纯丙酮固定 5 min，空气中干燥 10 min，TBS 浸洗 5 min；取出玻片仔细擦干，用蜡笔在细胞周围划一圆圈；（3）在圆圈内滴加抗 CD4、CD8 抗体 20 μL，放湿盒内 4 ℃过夜，TBS 浸洗 5 min，吸干；（4）滴加二抗 10 μL，放湿盒内 37 ℃温育 30 min，TBS 浸洗 5 min，吸干；（5）滴加 APAAP 复合物 10 μL，放湿盒内 37 ℃，30 min，TBS 浸洗 5 min，吸干；（6）滴加底物显色液 10 μL（临用前配制，取底物溶液 1 mL 加坚固红 1 mg，充分溶解后使用），放湿盒内 37 ℃温育 30 min，TBS 浸洗 5 min，擦片；（7）加 Mayer 苏木精复染 1 min，用自来水冲洗，空气中干燥；（8）高倍镜下观察：以细胞膜上或胞浆着红色为阳性细胞，无色者为阴性细胞，并计算 $CD4^+$、$CD8^+$ T 淋巴细胞百分率。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。计数资料采用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，不同组间兔血清抗体滴度比较采用卡方检验，$CD4^+$、$CD8^+$ T 淋巴细胞比例差异采用 *t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 间接 ELISA 法检测兔血中 IgG 抗体滴度差异 对照组和雾化组处理 20 d 后，采集兔血清，间接 ELISA 法测定 IgG 抗体滴度，所有 ELISA 实验采用 5 复孔进行检测，实验重复 3 次以上，抗体滴度取平均值。批间校正：标本校正值为待测标本平均 *A* 值/质控标本平均 *A* 值。结果显示，对照组采用生理盐水进行雾化后，兔血清中 IgG 抗体滴度平均为 1 ∶（23 140±238），雾化组采用生理盐水＋金葡素雾化吸入后血清中 IgG 抗体滴度平均为 1 ∶（52 180±125），雾化组兔血清 IgG 抗体滴度显著高于对照组，差异有统计学意义（$\chi^2=18.945\ 1$，$P<0.01$）。该结果表明生理盐水＋金葡素雾化吸入可以有效诱导金葡菌感染的兔进行体液免疫应答。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2 APAAP 法检测雾化吸入金葡素对兔 T 淋巴细胞亚群的影响 对照组和雾化组处理 20 d 后，取兔血液标本，采用 APAAP 法检测对照组和雾化组 $CD4^+$、$CD8^+$ T 淋巴细胞比例及 $CD4^+/CD8^+$ 比值的差异。结果显示，对照组采用生理盐水进行雾化后，$CD4^+$、$CD8^+$ T 淋巴细胞比例平均值分别为 (23.45±1.23)%、(19.37±1.14)%，$CD4^+/CD8^+$ 比值平均为 1.21±1.08；雾化组采用生理盐水＋金葡素雾化吸入后，$CD4^+$、$CD8^+$ T 淋巴细胞比例平均值分别为 (78.56±2.41)%、(22.68±1.57)%，$CD4^+/CD8^+$ 比值平均为 3.46±1.54；雾化组 $CD4^+$ T 淋巴细胞比例显著高于对照组 ($P<0.01$)，同时，雾化组 $CD4^+/CD8^+$ 比值也明显高于对照组 (表 1)。该结果表明生理盐水＋金葡素雾化吸入可以有效诱导金葡菌感染的兔进行细胞免疫应答。

表 1 对照组和雾化组处理 20 天后兔血液中 T 细胞亚群的变化 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	T 细胞亚群		CD4/CD8
		$CD4^+$(%)	$CD8^+$(%)	
雾化组	15	78.56±2.41	22.68±1.57	3.46±1.54
对照组	15	23.45±1.23	19.37±1.14	1.21±1.08
t 值		2.134 0	12.327 0	5.298 3
P 值		<0.01	>0.05	<0.05

3 讨 论

金葡菌是导致临床难治性感染的主要病原菌之一，在感染的病原谱中，金葡菌感染的发生率最高，呼吸的空气和血液循环都可成为金葡菌感染的途径，滥用抗生素使金葡菌极易产生耐药性，尤其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的出现，让临床治疗金葡菌感染陷入了困境，病死率也逐年增加[12]。在过去的 50 年中，青霉素族药物对金葡菌具有良好的杀灭作用，挽救了数以亿计患者的生命，由于青霉素族药物的良好效果，导致了对青霉素族药物依赖和泛用，造成了耐甲氧西林金葡菌的出现和传递，当前突出的问题是耐药性金葡菌感染的无药可治和致死性。因此，寻求一种有效的治疗策略是当前迫切需要解决的问题，近年来，利用金葡菌抗原进行主动性免疫，降低感染率的研究在动物模型上获得了较好的效果[13-16]。

3.1 雾化吸入金葡素诱导兔产生免疫应答 目前用于基础研究和临床治疗的金葡素大多为注射制剂，在本研究中，我们采用雾化吸入金葡素的方式进行研究，以扩大对金葡菌感染的兔呼吸系统黏膜作用范围，探讨其是否能诱导金葡菌感染的兔产生主动性免疫应答。IgG 是含量最多的血清免疫球蛋白，而血清免疫球蛋白水平在一定程度上反映机体的体液免疫功能状态。本研究结果显示，雾化吸入金葡素后，兔血清 IgG 抗体滴度显著高于对照组，表明金葡素雾化吸入可以有效诱导金葡菌感染的兔进行体液免疫应答。大量研究表明，金葡菌感染的发生与免疫功能紊乱密切相关，机体在产生炎症反应的同时还伴有免疫功能低下，这可能是导致临床抗炎治疗失败的原因之一。国外学者 Bone[17] 报道机体感染时也存在免疫抑制。Giamarellos-Bourboulis 等[18] 发现在机体发生感染时就存在免疫抑制，表明机体感染最初为免疫低反应。当前的观点认为，机体发生感染时既可能存在免疫亢进，也可能存在免疫抑制，机体是处于一种复杂的免疫紊乱和失衡状态。因此，重建患者的免疫平衡稳态在感染的治疗中非常重要。$CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 淋巴细胞是机体内重要的免疫应答细胞，$CD4^+$ T 细胞主要协助 B 细胞进行分化和产生抗体，参与和促进细胞介导的免疫应答，而 $CD8^+$ T 细胞则主要参与细胞的杀伤和抑制作用，分析 $CD4^+/CD8^+$ 的比值可初步评估机体的免疫状态，该值增大提示免疫应答的正调节占优势[19]。因此，本研究对雾化吸入金葡素后兔的细胞免疫应答进行了进一步的研究，实验结果显示，雾化吸入金葡素后，$CD4^+$ T 淋巴细胞比例显著高于对照组，此外，$CD4^+/CD8^+$ 比值也明显高于对照组，表明金葡素雾化吸入可以有效诱导金葡菌感染的兔产生细胞免疫应答。

3.2 雾化吸入金葡素对免疫应答产生的影响 金葡素是从金黄色葡萄球菌培养物的过滤液中提取制备的一种生物反应调节剂，其主要有效成分是 C 型金葡菌肠毒素 (staphylococcal enterotoxin, SEC)[20]，该毒素分子可以完整形式和抗原提呈细胞上的 MHC-II 抗原结合后与 T 淋巴细胞表面的 TCR 分子结合，刺激 T 细胞活化[21-23]、增殖[24-25]，从而参与机体免疫应答。目前用于治疗的金葡素绝大多数为注射制剂，金葡素注射制剂对于短期感染患者的治疗有积极意义。但另一方面，有相当一部分患者在使用金葡素注射制剂的过程中会产生轻度到中度等不同程度的发热，同时，在注射部位产生红肿、疼痛等也会使得患者对金葡素注射制剂治疗的依从性下降。在本研究中，我们采用生理盐水＋金葡素雾化吸入的方式对感染金葡菌的新西兰兔进行了研究，发现生理盐水＋金葡素雾化吸入组干预后兔血清中的 IgG 抗体滴度、$CD4^+$ T 淋巴细胞比例以及 $CD4^+/CD8^+$ 比值都明显高于生理盐水雾化组，表明采用雾化吸入的方式也能使感染金葡菌的新西兰兔产生免疫应答，包括体液免疫应答和细胞免疫应答。当然，本研究结果存在一些不足，首先是实验

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

动物样本量比较少，可能会存在一定的统计学误差；其次动物模型与人体的免疫环境不同，对临床的治疗安全性和效果还有待进一步的研究。

综上所述，雾化吸入金葡素能有效诱导金葡菌感染的兔产生主动性免疫防护，从而可达到降低金葡菌感染的目的，是一种新型治疗方法。该治疗方法对于一些不能耐受注射制剂的患者来说可能受益。目前本科室已经用雾化吸入金葡素对急性白血病化疗后患者进行辅助治疗，我们将在以后的报道中详细阐述。

参考文献

[1] Mu P, Dong B, Liang P, et al. Clinical research on ultrasonically guided intrahepatic injections of HAS in interventional treatment of liver carcinomas[J]. J Buon, 2016, 21(6): 1394-1397.

[2] Schelin J, Susilo YB, Johler S. Expression of staphylococcal enterotoxins under stress encountered during food production and preservation[J]. Toxins, 2017, 9(12): 401.

[3] Benkerroum N. Staphylococcal enterotoxins and enterotoxin-like toxins with special reference to dairy products: an overview [J]. Crit Rev Food Sci & Nutr, 2017, 58(12): 1.

[4] Tuffs SW, Haeryfar SMM, Mccormick JK. Manipulation of innate and adaptive immunity by staphylococcal superantigens [J]. Pathogens, 2018, 7(2): 53.

[5] **梁荣，陈梓宏，余忠华. 高聚金葡素对放疗后鼻咽癌患者细胞免疫功能影响[J]. 肿瘤预防与治疗**, 2003, 16(4): 221-222.

[6] Pinto M, Torten M, Birnbaum SC. Suppression of the in vivo humoral and cellular immune response by staphylococcal enterotoxin B(SEB)[J]. Transplantation, 1978, 25(6): 320-303.

[7] Bi SG, Das R, Zelazowska E, et al. The cellular and molecular immune response of the weanling piglet to staphylococcal enterotoxin B[J]. Exp Biol & Med, 2009, 234(11): 1305-1315.

[8] **田卫东，汤炜，李声伟，等. 高聚金葡素联合化学药物治疗口腔癌的疗效与免疫功能观察[J]. 口腔颌面外科杂志**, 2001, 11(1): 45-48.
TIAN Weidong, TANG Wei, LI Shengwei. Signification of peripheral blood immune changes in treatment for oral cancer with(HAS) and chemotherapy[J]. Chin J Oral Maxillofac Surg, 2001, 11(1): 45-48. (in Chinese)

[9] Tian XL, Yan Z, Chen J, et al. Clinical application of highly agglutinative staphylococcin in cancer treatment updates of the literature[J]. Eur Rev Med & Pharmacolog Sci, 2016, 20 (12): 2718.

[10] Yu QT, Meng ZB. Treatment of advanced breast cancer with a combination of highly agglutinative staphylococcin and vinorelbine-based chemotherapy[J]. Eur Rev Med & Pharmacolog Sci, 2016, 20(16): 3465.

[11] **甘岫云，雍凌，孙红. 高聚生(高聚金葡素)对肿瘤患者免疫细胞的影响[J]. 中国肿瘤临床**, 2000, 27(10): 799-800.

[12] Fauci AS, Morens DM. The perpetual challenge of infectious diseases[J]. N Engl J Med, 2012, 366(5): 454-461.

[13] Sürmeli M, Maçin S, Akyön Y, et al. The protective effect of *Lactobacillus plantarum* against meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: an experimental animal model[J]. J Wound Care, 2019, 28(Suppl 3b): S29-S34.

[14] Kane TL, Carothers KE, Lee SW. Virulence factor targeting of the bacterial pathogen *Staphylococcus aureus* for vaccine and therapeutics[J]. Curr Drug Targets, 2018,19(2):111-127.

[15] Zhang Z, Abdel-Razek O, Wang G. A mouse model for ocular surface *Staphylococcus aureus* infection[J]. Curr Protocols Mouse Biol, 2017, 7(1): 55-63.

[16] Reizner W, Hunter JG, O'Malley NT, et al. A systematic review of animal models for *Staphylococcus aureus* osteomyelitis [J]. Eur Cells & Mater, 2014, 27(20): 196.

[17] Bone RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome(MODS) [J]. Ann Intern Med, 1996, 125(8): 680.

[18] Giamarellos-Bourboulis EJ, Tsaganos T, Spyridaki E, et al. Early changes of $CD4^+$ positive lymphocytes and NK cells in patients with severe gram negtive sepsis[J]. Crit Care, 2006, 10(6): R166.

[19] Biondo PD, Goruk S, Ruth MR, et al. Effect of CVT-E002 (COLD-fX) versus a ginsenoside extract on systemic and gut-associated immune function[J]. Int Immunopharmacol, 2008, 8(8): 1134-1142.

[20] Bohach GA, Fast DJ, Nelson RD, et al. Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses[J]. Crit Rev Microbiol, 1990, 17(4): 251-272.

[21] Rudolph ME, Mcarthur MA, Barnes RS, et al. Differences between pediatric and adult T cell responses to *in vitro* staphylococcal enterotoxin B stimulation[J]. Front Immunol, 2018, 9: 498.

[22] Busbee PB, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Natural indoles, indole-3-carbinol and 3,3′-diindolymethane, inhibit T cell activation by staphylococcal enterotoxin B through epigenetic regulation involving HDAC expression[J]. Toxicol & Appl Pharmacol, 2014, 274(1): 7-16.

[23] He Y, Sun Y, Ren Y, et al. The T cell activating properties and antitumour activity of Staphylococcal enterotoxin-like Q [J]. Med Microbiol Immunol, 2019, 208(6): 781-792.

[24] Zhou J, Liu L, Xu M, et al. T-cell proliferation and antitumour activities of a truncated mutant of staphylococcal enterotoxin C2 with decreased cytokine secretion[J]. J Med Microbiol, 2013, 62(Pt 3): 451.

[25] Oehme I, Neumann F, Bösser S, et al. Transgenic overexpression of the Caspase-8 inhibitor FLIP short leads to impaired T cell proliferation and an increased memory T cell pool after staphylococcal enterotoxin B injection[J]. Eur J Immunol, 2005, 35(4): 1240-1249.

收稿日期：2019-05-22 **修回日期**：2019-07-10 **本文编辑**：李兵

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net