

转器处理的大肠杆菌抗生素敏感突变株的数量与处理时间呈正相关,微重力环境下连续培养 30 天后头孢他定敏感度增强株的突变率为 0.5%,培养 60 天后突变率增至 55%,而 120 天达到了 65%。Searles 等^[15]研究低剪切微重力环境下白色念珠菌的生长变化,发现随微重力暴露时间的延长,菌株繁殖增快,结构变异,C 白菌毒力增强,对两性霉素 B 的耐药性增大,分析认为其归因于白色念珠菌毒力相关表型对微重力环境的迅速适应。本研究结果与前者接近。最低抑菌浓度是传统的抗生素敏感度试验检测项目,通常需要菌液和抗生素共同孵育 16 ~ 24h,在此过程中,模拟微重力环境下形成的耐药性有可能发生作用,这可能是本实验研究中未能检测到最低抑菌浓度变化的主要原因^[7]。无论由于微重力环境下微生物的抗生素敏感突变株形成,还是因为微生物对微重力环境产生适应和耐受,这种截然相反的表现结果进一步说明了微重力环境下微生物变化/变异以及抗生素敏感度的多样性和复杂性。

我国即将开展空间站长期太空飞行,研究太空失重或模拟失重对微生物抗生素敏感度影响及其作用机制,不仅为阐明微生物与人类之间的相互作用以及航天任务中航天员感染治疗等一系列科学问题提供理论依据,而且还对空间微生物安全监控等都具有普遍的指导意义。

参考文献

- 1 Foster JS, Khodadad CL, Ahrendt SR, *et al.* Impact of simulated microgravity on the normal developmental time line of an animal - bacteria symbiosis[J]. *Sci Rep*, 2013,3:1340
- 2 黄玉玲,杨建武,易勇,等. 微重力及太空飞行对微生物影响的研究进展[J]. *北京生物医学工程*, 2014, 33(1):102 - 106
- 3 Taylor GR. Recovery of medically important microorganisms from Apollo astronauts[J]. *Aerosp Med*, 1974,45(8):824 - 828
- 4 Crabbé A, De Boever P, Van Houdt R, *et al.* Use of the rotating wall

- vessel technology to study the effect of shear stress on growth behaviour of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 [J]. *Environ Microbiol*, 2008,10(8):2098 - 2110
- 5 Crabbé A, Schurr MJ, Monsieurs P, *et al.* Transcriptional and proteomic responses of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to spaceflight conditions involve Hfq regulation and reveal a role for oxygen [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2011,77(4):1221 - 1230
- 6 CLSI document M100 - S22. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty - second informational supplement [R]. Wayne, PA: USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012
- 7 Hensley DM. Maintenance of antimicrobial susceptibility of acinetobacter baumannii in modeled microgravity [J]. *Clin Lab Sci*, 2010,23(2):84 - 88
- 8 马筱玲,李庆,翟志敏. 流式细胞术检测抗生素最低抑菌浓度 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2004,24(1):36 - 39
- 9 方向群,张杜超,刘长庭. 微重力对病原菌毒力和抗生素敏感性影响的研究进展 [J]. *航天医学与医学工程*, 2012,25(3):220 - 224
- 10 Abbes S, Trabelsi H, Amouri I, *et al.* Methods for studying the in vitro susceptibility of *Candida* spp. to antifungals [J]. *Ann Biol Clin: Paris*, 2012,70(6):635 - 642
- 11 Rosenzweig JA, Abogunde O, Thomas K, *et al.* Spaceflight and modeled microgravity effects on microbial growth and virulence [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010,85(4):885 - 891
- 12 尹焕才,薛小平,杨慧,等. 模拟微重力环境下细菌生物学效应的初步研究 [J]. *航天医学与医学工程*, 2009,22(5):341 - 346
- 13 Lynch SV, Mukundakrishnan K, Benoit MR, *et al.* *Escherichia coli* biofilms formed under low - shear modeled microgravity in a ground-based system [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006,72(12):7701 - 7710
- 14 Dornmayr - Pfaffenhuemer M, Legat A, Schwimbersky K, *et al.* Responses of haloarchaea to simulated microgravity [J]. *Astrobiology*, 2011,11(3):199 - 205
- 15 Searles SC, Woolley CM, Petersen RA, *et al.* Modeled microgravity increases filamentation, biofilm, formation, phenotypic switching, and antimicrobial resistance in *Candida albicans* [J]. *Astrobiology*, 2011,11(8):825 - 836

(收稿日期:2014 - 02 - 05)

(修回日期:2014 - 02 - 24)

黄芪糖蛋白对佐剂性关节炎大鼠 Foxp3 表达的影响

赵俊云 杨向竹 牛欣 薛惠清 冯前进 周然

摘要 目的 探讨黄芪糖蛋白对佐剂性关节炎大鼠外周血及脾组织中 Foxp3 表达的影响。方法 大鼠分组建模,1 周后给药治疗,3 周后取材,采用流式细胞术和免疫组化法分别检测各组大鼠外周血淋巴细胞亚群与脾组织中 Foxp3 的表达水平。结

基金项目:国家“十二五”科技支撑计划基金资助项目(2011BA107B01);北京市青年英才计划项目(2014YETP0793)

作者单位:100029 北京中医药大学(赵俊云、杨向竹、牛欣);030024 太原,山西中医学院(薛惠清、冯前进、周然)

果 流式检测结果显示黄芪糖蛋白可显著增加佐剂性关节炎大鼠外周血淋巴细胞中 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 细胞的比例 ($P < 0.01$), 免疫组化分析结果显示黄芪糖蛋白可显著提高佐剂性关节炎大鼠脾组织中 Foxp3 的表达水平 ($P < 0.01$)。结论 黄芪糖蛋白在体内可通过提高 Foxp3 的表达水平来增强机体的免疫耐受。

关键词 黄芪糖蛋白 佐剂性关节炎 Foxp3 免疫耐受

[中图分类号] R285 [文献标识码] A

Effects of Glycoproteins from Astragalus membranaceus on Expression of Foxp3 in Adjuvant Arthritis Rats. Zhao Junyun, Yang Xiang-zhu, Niu Xin, et al. Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract Objective To explore the effects of glycoproteins from Astragalus membranaceus on expression of Foxp3 in peripheral blood and spleen of adjuvant arthritis rats. **Methods** Adjuvant arthritis model was established for one week and glycoproteins from Astragalus membranaceus were used to treat adjuvant arthritis rats for two weeks. Flow cytometry was applied to examine the lymphocyte subsets of peripheral blood and immunohistochemical technique was used for detecting the expression of Foxp3 in spleens. **Results** The results of experiments above showed that glycoproteins from Astragalus membranaceus improved expression of Foxp3 in peripheral blood and spleen of adjuvant arthritis rats ($P < 0.01$). **Conclusion** This study demonstrated that glycoproteins from Astragalus membranaceus may improve immune tolerance by up-regulated Foxp3 expression in vivo.

Key words Glycoprotein from Astragalus membranaceus; Adjuvant arthritis; Foxp3; Immune tolerance

从膜荚黄芪的干燥根中通过水浸提法分离得到了一种糖蛋白性质均一的组分, 命名为黄芪糖蛋白 (Huangqi glycoprotein, HQGP)。体外实验结果显示 HQGP 可显著抑制正常小鼠脾 T 淋巴细胞的增殖, 体内实验结果显示 HQGP 可明显改善佐剂性关节炎大鼠的关节肿胀^[1,2]。Foxp3 是一种具有抑制 T 细胞表达细胞因子能力的转录因子, 可发挥调节细胞免疫的重要功能, 引发机体的免疫耐受^[3,4]。本研究旨在探讨 HQGP 对佐剂性关节炎 (adjuvant arthritis, AA) 大鼠外周血及脾组织中 Foxp3 表达的影响及 HQGP 免疫抑制活性的作用机制。

材料与方法

1. 实验动物: 雄性 Wistar 大鼠, 体质量 180 ~ 220g, 购自中国医学科学院实验动物研究所, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2009-0007。实验前分笼适应性喂养 1 周。

2. 主要试剂: HQGP 为自制; 弗氏完全佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA) 购自 Sigma 公司; 雷公藤甲素 (Triptolide, TP) 购自中国药品检定所; 流式一抗 anti-rat CD4FITC、anti-rat CD25PE、anti-ratFoxp3Alexa Fluor647 购自 Biologend 公司; 免疫组化一抗 Anti-rat Foxp3 购自北京博奥森生物技术公司。

3. 主要仪器: 离心机、流式细胞仪、恒温干燥箱、切片机、光学显微镜。

4. 动物模型建立与给药处理: 大鼠按体重完全随机分成 6 组, 适应性喂养 1 周后, 参考文献[5], 模型组与各治疗组于右后足跖皮内注射 0.1ml CFA, 正常组同位置同法注射等量生理盐水。建模前测右后踝关节周长 (以第五趾为标准), 建模后每周测 1 次右后踝关节周长和体重, 每天观察大鼠全身关

节红肿、皮下结节、红斑等情况。建模 1 周后开始给药治疗。正常组和模型组大鼠按 2.5ml/kg 经腹腔注射生理盐水, TP 组大鼠按 40ng/kg 经腹腔注射 TP; HQGP 治疗组分别按低、中、高剂量 1.0、5.0、10.0mg/kg 经腹腔注射 HQGP。注射体积均为 2.5ml/kg, 共治疗 2 周。

5. 大鼠外周血淋巴细胞亚群检测: 治疗结束后, 腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉各组大鼠, 腹主动脉取血, 采用流式细胞术检测外周血中 $CD4^+$ 、 $CD4^+CD25^+$ 、 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 等淋巴细胞亚群比例。

6. 大鼠脾组织 Foxp3 表达水平检测: 取各组大鼠脾组织, 以 4% 多聚甲醛溶液固定, 经冲洗、修块、脱水、透明、包埋、切片等处理, 制备厚度为 4 μ m 的石蜡切片, 苏木素-伊红染色观察脾组织形态, 免疫组化法检测脾组织中 Foxp3 蛋白的表达水平。

7. 图像分析与数据统计: 统计光学显微镜 100 倍物镜下, 5 个视野中 100 个细胞内 Foxp3 表达阳性细胞数。计数资料数据均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 SPSS 19.0 统计软件中 one-way ANOVA 分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. HQGP 增加 AA 大鼠外周血 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 细胞的比例: 模型组大鼠外周血 $CD4^+$ 与 $CD4^+CD25^+$ 细胞比例较正常组大鼠均显著升高 ($P < 0.01$), HQGP 降低 AA 大鼠外周血 $CD4^+$ 与 $CD4^+CD25^+$ 细胞比例, 但不显著。模型组大鼠 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 细胞比例较正常组显著降低 ($P < 0.01$), HQGP 增加该比例, 且仅高剂量组差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 详见表 1。

表 1 大鼠外周血淋巴细胞亚群 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	CD4 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺
	占淋巴细胞比例 (%)	占淋巴细胞比例 (%)	占 CD4 ⁺ 细胞比例 (%)
正常组	10.427 ± 2.829	1.561 ± 0.936	1.550 ± 0.933
模型组	24.563 ± 8.899 ^{ΔΔ}	3.204 ± 0.605 ^{ΔΔ}	0.731 ± 0.316 ^Δ
TP 组	18.805 ± 7.116	0.791 ± 0.336	0.879 ± 0.486
HQGP 低剂量组	18.978 ± 4.929	2.719 ± 1.452	1.121 ± 0.394
HQGP 中剂量组	14.662 ± 6.616	2.141 ± 0.959	1.165 ± 0.907
HQGP 高剂量组	13.664 ± 6.443	1.963 ± 1.386	1.815 ± 0.755 ^{**}

与正常组比较, ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{**} $P < 0.01$

2. HQGP 提高 AA 大鼠脾脏中 Foxp3 的表达水平: 免疫组化检测结果显示, 与正常组相比, 模型组大鼠脾组织中 Foxp3 表达显著下降 ($P < 0.01$), HQGP 各剂量组大鼠脾组织 Foxp3 表达显著上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 详见表 2。

表 2 大鼠脾脏中 Foxp3 的表达 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	Foxp3 阳性细胞比例 (%)
正常组	11.464 ± 3.752
模型组	4.941 ± 0.892 ^Δ
TP 组	10.743 ± 1.073 ^{**}
HQGP 低剂量组	7.708 ± 1.043 [*]
HQGP 中剂量组	10.530 ± 1.484 ^{**}
HQGP 高剂量组	11.700 ± 1.805 ^{**}

与正常组比较, ^Δ $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

讨 论

Foxp3 是具有免疫抑制功能的免疫调节细胞的重要标志, Foxp3⁺ 调节性 T 细胞是机体保持内环境稳定的关键因素, 在维持机体免疫耐受状态、控制感染、抗移植排斥反应以及肿瘤免疫中发挥着重要作用^[6,7]。本研究中模型组大鼠外周血淋巴细胞亚群检测显示, T 细胞尤其是活化的 T 细胞占淋巴细胞的比例均显著升高, 而在 Foxp3⁺ 调节性 T 细胞的比例显著下降, 反映了 AA 大鼠外周血 T 细胞的增殖与活化缺乏 Foxp3⁺ 调节性 T 细胞的调节。模型组大鼠脾组织 Foxp3 蛋白的表达水平显著降低, 说明其调节性 T 细胞的发育受到抑制, 因而使外周血调节性 T 细胞比例降低, 致使对外周血 T 细胞活化的抑制作用减弱, 使得外周血 T 细胞出现异常的增殖与活化, 最终导致炎症的发生^[8,9]。黄芪糖蛋白体内给药两周可

提高 Foxp3 的表达水平, 并增加调节性 T 细胞的比例, 表明黄芪糖蛋白在体内可能通过刺激 Foxp3 的表达, 使机体调节 T 细胞的发育, 进一步减少炎症性细胞因子的表达, 最终起到抑制细胞免疫的作用。

黄芪糖蛋白是一种来源于植物中的天然大分子成分, 前期研究显示其具有免疫抑制的活性, 本研究探讨了其对免疫系统的药理作用机制, 后续还将选用其他类型的免疫性疾病的细胞和动物模型进一步分析其免疫抑制作用的特点。

参考文献

1 杨向竹, 赵俊云, 薛慧清, 等. 黄芪糖蛋白对小鼠脾淋巴细胞的体外作用[J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(23): 92-95

2 赵俊云, 刘亚明, 冯前进, 等. 黄芪糖蛋白对佐剂性关节炎大鼠外周血细胞因子及关节滑膜组织形态学的影响[J]. 上海中医药杂志, 2010, 44(5): 78-80

3 Andersen MH. FOXP3 - specific immunity[J]. Onco Immunology, 2013, 2(10): e262471 - e262472

4 Regateiro FS, Chen Y, Kendal AR, et al. Foxp3 expression is required for the induction of therapeutic tissue tolerance[J]. J Immunol, 2012, 189(8): 3947 - 3956

5 Moudgil KD, Kim P, Brahn E. Advances in rheumatoid arthritis animal models[J]. Curr Rheumatol Rep, 2011, 13(5): 456 - 463

6 Alzabin S, Williams RO. Effector T cells in rheumatoid arthritis: lessons from animal models[J]. FEBS Lett, 2011, 585(23): 3649 - 3659

7 Bromberg J. TNF - α trips up Treg cells in rheumatoid arthritis[J]. Nat Med, 2013, 19(3): 269 - 270

8 Sarkar S, Fox DA. Regulatory T cells in rheumatoid arthritis[J]. Curr Rheumatol Rep, 2008, 10(5): 405 - 412

9 Woodman I. Rheumatoid arthritis: TNF disables TREG - cell function through FOXP3 modification[J]. Nat Rev Rheumatol, 2013, 9(4): 197

(收稿日期: 2014 - 03 - 03)

(修回日期: 2014 - 03 - 04)