

头功铁药散对 A 型魏氏梭菌 α 毒素的 mRNA 表达及损伤小鼠免疫功能的影响^①

赖建彬, 彭诗, 刘娟, 朱兆荣, 郭志兴

西南大学(荣昌校区)动物医学系, 重庆 荣昌 402460

摘要: 探讨自拟处方头功铁药散对 A 型魏氏梭菌 α -毒素损伤小鼠免疫功能的影响, 并检测了 α 毒素 mRNA 表达的情况. 检测小鼠部分免疫功能; 荧光定量 RT-PCR 法检测 α 毒素基因 mRNA 表达的变化. 结果显示, 与模型组相比, 头功铁药散能拮抗 α -毒素对小鼠的损伤, 极显著提高小鼠免疫器官指数及巨噬细胞的吞噬能力($p < 0.01$); 与细菌模型组相比, 头功铁药散能极显著降低 α 毒素基因表达($p < 0.01$). 推测头功铁药散可通过提高小鼠免疫功能, 并下调 α 毒素基因表达, 从而减少 α -毒素对小鼠的损伤.

关键词: 头功铁药散; A 型魏氏梭菌; 免疫功能; α 毒素

中图分类号: S851.3

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2015)03-0065-06

A 型魏氏梭菌病, 又称 A 型产气荚膜梭状芽孢杆菌, 是由英国人学者首先从一具腐败的人尸体产生气泡的血管中分离得到的, 并以 Welchii 命名为魏氏梭菌^[1]. A 型魏氏梭菌是人畜气性坏疽和人食物中毒的主要病原^[2-3], 可引起多种动物发病. 该菌主要产生的 α -毒素具有卵磷脂酶 C 和鞘磷脂酶两种毒性, α -毒素进入血液循环后造成毒血症和重要组织器官的损害与衰竭, 导致机体免疫力降低, 甚至引起动物死亡^[4]. 本病主要以急性腹泻、排黑色水样或胶冻样粪便、盲肠浆膜出血斑和胃粘膜出血、溃疡为主要特征. 中兽医学认为, 该病为湿热毒邪内侵, 蕴聚肠道, 致使气机不畅, 损伤脉络而致, 最后阴竭阳亡, 治宜清热燥湿、凉血止痢, 兼健脾扶正. 根据治则选用白头翁、十大功劳、铁苋菜、山药等组成头功铁药散, 方中白头翁、十大功劳苦寒清热燥湿, 解毒止痢, 铁苋菜具有清热解毒收敛止血共为主药. 山药补脾益气; 大黄泻火化湿, 具有攻积导滞的功效, 防止热毒淤滞; 地榆凉血止血; 车前子引湿下出, 共为辅药^[5]. 本试验探究头功铁药散的抗菌抗毒素功能及对动物免疫功能的影响, 以期为临床防治该病提供理论基础.

1 材料与方法

1.1 试验动物及分组

健康无病昆明系小白鼠 50 只, 雌、雄各半, 体质量(20 ± 2) g, 购自西南大学荣昌校区实验动物科.

1.2 试剂与试验药物

厌氧培养基(北京中海生物科技有限公司产品); 胎牛血清(Gibco); 脂多糖(Sigma2880, 2072B67); 刀

① 收稿日期: 2013-06-04

基金项目: 农业部国家公益行业(农业)科技专项经费(20130304-05).

作者简介: 赖建彬(1987-), 男, 福建龙岩人, 硕士研究生, 主要从事临床兽医学研究.

通信作者: 朱兆荣, 副教授.

豆蛋白 A(北京绑定泰克生物技术公司, 20080306); MTT(Sigma14024); Trizol(上海生工); DL 500 Marker, DEPC, MMLV 第一链 cDNA 合成试剂盒; α -毒素引物、16sRNA 引物、即用 PCR 扩增试剂盒(大连宝生物工程有限公司); 西班牙琼脂糖 Agarose Biowest GENE TECH(ShangHai) Company Ltd.; 乙醇、氯仿、TAE 等常用试剂。

根据中兽医药理论, 由白头翁、十大功劳、铁苋菜、山药、大黄、地榆、车前子等 8 味中药组成头功铁药散, 所有单味中药购自重庆市荣昌县万和大药房。取 100 g 该中药复方按 1:10 比例添加蒸馏水浸泡 2 h, 武火加热沸腾后用文火继续加热 30 min, 过滤取药液, 滤渣添加 5 倍蒸馏水继续煎煮 30 min, 合并 2 次滤液离心去沉淀, 旋转蒸发仪浓缩至 100 mL, 相当于生药量 1 g/mL 的药液, 调节 pH 值至 7.2, 灭菌备用^[6]。

1.3 主要仪器

TU-1800PC 型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); SE-2000 型 Noink 倒置显微镜(日本 Noink 公司); 电泳仪(BG-POWER600i 型, Baygene Biotech Company Ltd.); 凝胶成像仪(BIO-RAD 公司); Mini Opticon Real Time PCR(美国 BIO-RAD 公司); 菲恰尔 GL-16A 冷冻离心机(上海菲恰尔分析仪器有限公司)。

1.4 菌种

A 型魏氏梭菌标准菌株, 编号 CVCC1128, 购自中国兽药监察所。

1.5 α -毒素的粗提、检测及对小鼠 LD_{50} 的测定^[1]

将 A 型魏氏梭菌接种于厌氧肉肝汤培养基, 37 °C、120 r/min 振荡培养 4~6 h 后, 离心收集上清, 室温下加入固体硫酸铵至饱和度为 60%, 4 °C 静置 12 h, 4 500 r/min 离心 10 min 收集沉淀, 沉淀用 0.9% NaCl 溶液溶解, 然后用透析袋脱盐、过滤, 即得粗提的 α -毒素, 用紫外分光光度计 260 nm 测 OD 值。 α -毒素体积质量分数(mg/mL): $1.45A_{280} \sim 0.74A_{260}$; 小鼠皮下注射 α -毒素, 4 d 后观察病理变化^[7]。分别对各组小鼠腹腔注射 α -毒素, 测定 LD_{50} 。

1.6 动物分组处理

50 只健康昆明系小白鼠随机分成 5 组, 即空白对照组、模型组及头功铁药散高、中、低剂预防组, 每组 10 只。按体质量 0.02 mL/g 腹腔注射 α -毒素建立动物模型^[1]。空白组灌服生理盐水, 高、中、低预防组分别为每 20 g 小鼠灌服 0.5 g, 0.25 g, 0.125 g, 每天 1 次, 连续 14 d, 第二天用 α -毒素攻毒。观察记录小鼠精神状态, 处死解剖, 观察小鼠内脏组织器官的病理变化^[8]。

1.7 对小鼠部分免疫功能的影响

1.7.1 脾脏、胸腺指数^[9]

将各组供试小鼠称质量, 处死, 取脾脏和胸腺用预冷生理盐水漂洗, 再用滤纸吸干水分, 称质量, 计算脏器指数: 脾脏指数=脾脏质量(mg)/小鼠体质量(g), 胸腺指数=胸腺质量(mg)/小鼠体质量(g)。

1.7.2 T、B 淋巴细胞增殖^[10]

将小鼠处死, 无菌条件下制备脾淋巴细胞悬液, 分别用刀豆蛋白和脂多糖诱导 T、B 淋巴细胞增殖, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱下培养 3 d, 用 MTT 法测定脾脏 T、B 淋巴细胞增殖。

1.7.3 巨噬细胞吞噬能力^[11]

试验各组小鼠于末次给药 1 h 后尾静脉注射体积分数为 25% 的印度墨汁, 然后分别于 2, 10 min 进行眼球后静脉丛取血 20 μ L。按下式计算廓清指数 K 及吞噬系数(校正吞噬指数)。碳粒廓清指数

$$K = \frac{\lg A_2 - \lg A_{10}}{T_1 - T_2}$$

A_2, A_{10} 分别为 2, 10 min 的吸光值, K 值经体质量及肝脾质量换算后, 得

$$\text{吞噬指数} = \text{体质量} / (\text{肝质量} + \text{脾质量}) \times K^{1/3}$$

$T_{10}=10\text{ min}$, $T_2=2\text{ min}$.

1.8 对 A 型魏氏梭菌 α -毒素 mRNA 表达的影响

1.8.1 分组培养

将 A 型魏氏梭菌液接种于厌氧肉肝汤培养液中, 38 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h, 再接种于鲜血培养基中, 厌氧培养 24 h, 挑取典型菌落接种在厌氧肉肝汤培养液中. 将细菌接入 10 只厌氧肉肝汤培养液的试管中, 其中 5 管为药物组, 加入头功铁药散使药液终体积质量分数为 0.055 g/mL, 其余 5 管作细菌组, 不加药物, 43 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h.

1.8.2 引物设计及总 mRNA 提取

参考 GenBank 已发表的 A 型魏氏梭菌 α -毒素和 16sRNA 基因的部分序列, 由上海生工合成 2 对高特异性引物, 引物如表 1. 按 Trizol 提取试剂盒说明书进行 α -毒素总 mRNA 的提取, 其质量由 A260/A280 比值和 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定.

表 1 引物序列及扩增片段长度

基 因	引 物 序 列	扩增长度/bp	登 录 号
α -毒素	F: 5'-GCTTCAATTAGGTTCTACTTATCCAG-3'	143	EU848493.1
	R: 5'-TCAACGGCAGTAACATTAGCAG-3'		
16sRNA	F: 5'-CTGAGTACCTGAACCGGCATCT-3'	150	L76261.1
	R: 5'-GAGACAGCCAGGAGAAGTCAAAC-3'		

1.8.3 荧光定量 RT-PCR

操作按照试剂盒说明书进行, α -毒素和 16sRNA 检测结果根据各自的标准曲线由计算机软件计算后给出.

1.9 数据处理

结果用 SPSS19.0 进行统计分析和显著性检验, 用 $\overline{X} \pm SD$ 表示.

2 结 果

2.1 α -毒素 LD₅₀ 测定结果

试验结果计算出所提 α -毒素体积质量分数为 0.456 mg/mL, α -毒素对小白鼠的半致死剂量(LD₅₀)为 0.283 mg/mL. 各试验组攻毒 30 min 后, 小鼠均出现怕冷、扎堆、精神萎靡、不愿活动等症状, 72 h 内小鼠出现死亡, 死亡率达 50%. 剖解死亡小鼠可见组织广泛出血, 肾脏充血肿胀, 脾脏、肝脏淤血、肿胀, 并可见坏死灶. 预防中剂量组和高剂量组小鼠死亡率为 10%.

2.2 对脾脏指数及胸腺指数的影响

表 2 显示, 模型组小鼠胸腺指数降低, 与空白对照组比较差异具有统计学意义($p<0.05$), 头功铁药散预防给药各剂量组的小鼠脾脏指数和胸腺指数有所提高, 且高剂量组与模型组比较, 差异具有统计学意义($p<0.05$).

表 2 头功铁药散对小鼠脾脏指数和胸腺指数的影响($n=10$)

组 别	胸腺指数	脾脏指数
空白对照组	4.299 $\pm$ 0.431	2.159 $\pm$ 0.369
模型组	3.734 $\pm$ 0.228 ^{Δ}	2.135 $\pm$ 0.048
头功铁药散低剂量组	3.817 $\pm$ 0.279	2.232 $\pm$ 0.042
头功铁药散中剂量组	4.403 $\pm$ 0.352 ^{$*$}	2.131 $\pm$ 0.203
头功铁药散高剂量组	4.201 $\pm$ 0.208	2.984 $\pm$ 0.032 ^{$*$}

注: 模型组与空白组比较, Δ 为 $p<0.05$, $\Delta\Delta$ 为 $p<0.01$; 预防组的 3 种剂量组与模型组比较, $*$ 为 $p<0.05$, $**$ 为 $p<0.01$. 下同.

2.3 对小鼠 T、B 淋巴细胞增殖与巨噬细胞吞噬能力的影响

由表 3 可知,模型组小鼠脾脏 T、B 淋巴细胞增殖,巨噬细胞吞噬能力降低,与空白对照组相比,差异具有统计学意义($p<0.05$);头功铁药散可促进小鼠脾脏 T 淋巴细胞增殖,与模型组比较,差异具有统计学意义或极具有统计学意义($p<0.05$ 或 $p<0.01$);各组 B 淋巴细胞增殖差异并不具有统计学意义($p>0.05$).头功铁药散提高巨噬细胞的吞噬能力,与模型组比较,中剂量和高剂量组差异极具有统计学意义($p<0.01$).

表 3 头功铁药散对小鼠 T、B 淋巴细胞增殖与巨噬细胞吞噬能力的影响($n=10, OD=450$)

组 别	T 淋巴细胞增殖	B 淋巴细胞增殖	巨噬细胞吞噬能力
空白对照组	0.369±0.008	0.365±0.022	5.498±0.155
模型组	0.416±0.02 ^Δ	0.407±0.034	4.800±0.153 ^Δ
预防低剂量组	0.420±0.01	0.427±0.051	5.500±0.361 [*]
预防中剂量组	0.463±0.054 [*]	0.418±0.064	5.633±0.252 ^{**}
预防高剂量组	0.478±0.036 ^{**}	0.411±0.024	5.670±0.382 ^{**}

2.4 对 A 型魏氏梭菌 α-毒素 mRNA 表达的影响

2.4.1 定量标准曲线的建立

图 1 和图 2 分别是 $10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}$ 拷贝的 α-毒素和 16sRNA 基因质粒标准品的实时荧光定量 PCR 标准曲线,回归系数分别为 0.997 和 1.000,显示出极好的线性关系.

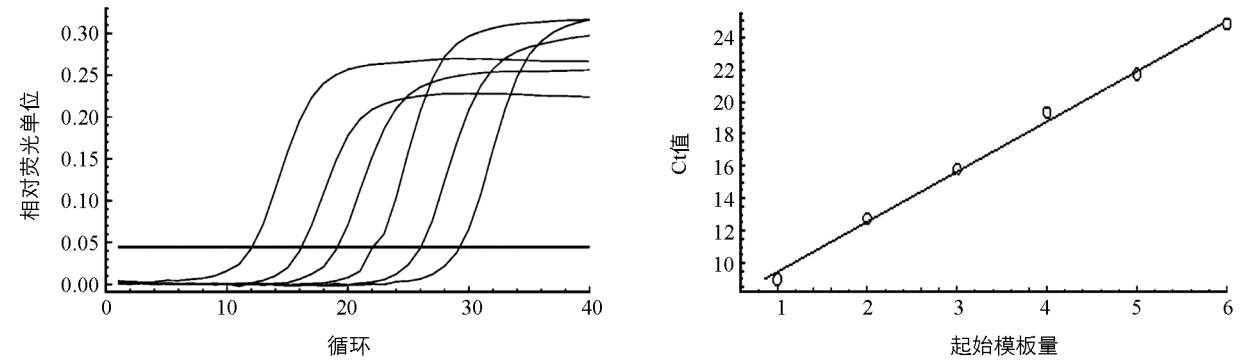


图 1 α-毒素基因的实时荧光定量 PCR 标准曲线

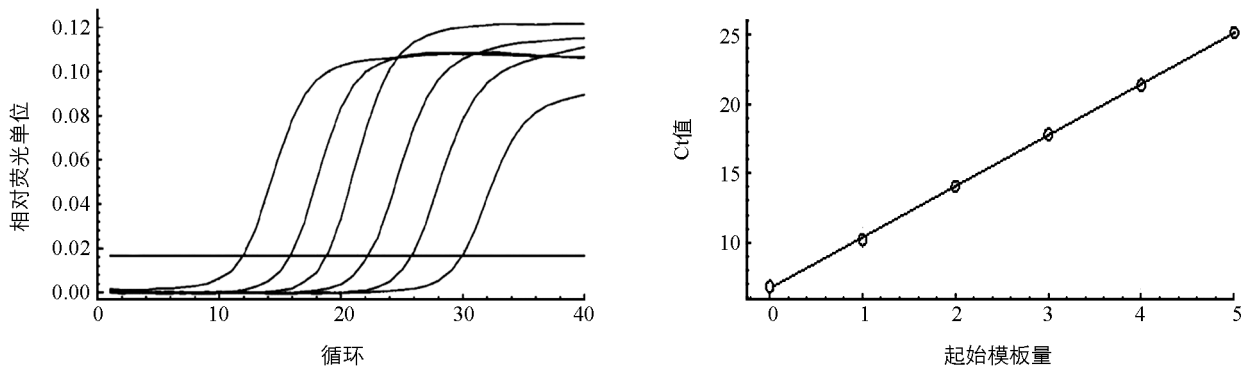


图 2 16sRNA 基因的实时荧光定量 PCR 标准曲线

2.4.2 A 型魏氏梭菌 α-毒素 mRNA 表达情况的比较(图 3)

试验结果显示,经系统自动分析溶解曲线,产物的 Tm 值较为均一,说明实时荧光定量 PCR 反应特异性良好;头功铁药散组 A 型魏氏梭菌 α-毒素 mRNA 表达量减少,与细菌组比较差异极具有统计学意义($p<0.01$).

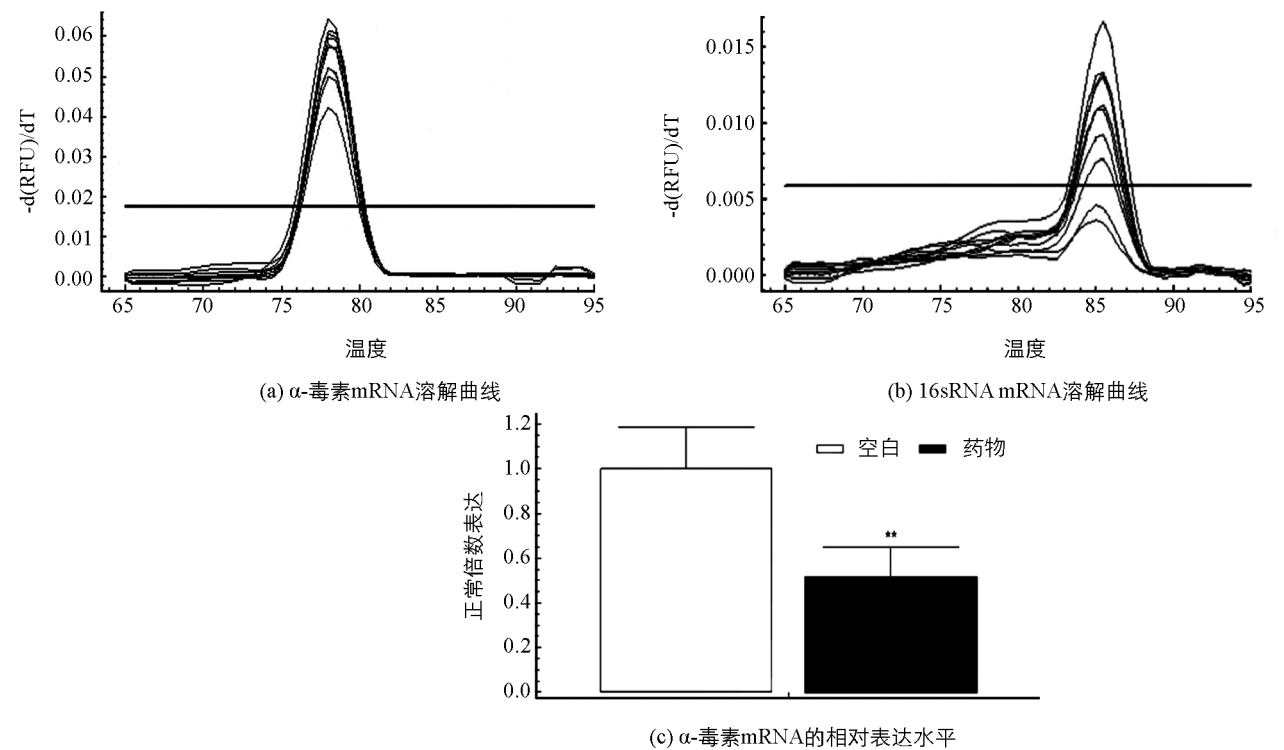


图 3 A 型魏氏梭菌 α -毒素 mRNA 表达情况的比较

3 分析与讨论

1) A 型魏氏梭菌 α 毒素是该菌的主要毒力因子, α 毒素具有细胞毒性、溶血活性、致死性、皮肤坏死性、血小板聚集和增加血管渗透性^[12], 粗提的 A 型魏氏梭菌 α -毒素攻毒死亡的小鼠主要是以出血变化为主, 胃粘膜和肠黏膜脱落、出血, 实质性器官充血、出血. 本试验所提取的标准 A 型魏氏梭菌 α -毒素攻毒后小鼠临床症状与相关文献报道结果^[13]一致.

2) A 型魏氏梭菌主要引起动物血痢, 中医辨证为毒热内侵, 损伤气机, 最后阴竭阳亡, 治则宜邪正兼顾, 以清热燥湿、凉血止痢为主, 兼扶正健脾, 现代研究, 白头翁含有 19 种成分, 分属于羽扇豆烷和齐墩果烷型, 具有增强免疫、抗议肿瘤、抗氧化、抗炎等作用^[14]; 十大功劳含有小檗碱、药根碱、巴马汀等成分, 具有广谱抗菌、抗病毒、扩张血管等作用^[15]; 铁苋菜含鞣质、糖类、有机酸等成分, 具有抑菌、平喘等作用^[16]. 本试验结果显示头功铁药散对 A 型魏氏梭菌 α -毒素损伤的小鼠具有一定的预防作用.

3) 胸腺是机体重要的淋巴器官, 产生 T 淋巴细胞, 为周围淋巴器官正常发育和机体免疫所必需; 脾脏为最大的免疫器官, 是机体细胞免疫与体液免疫的中心, 其中含有大量的 B 淋巴细胞和一些 T 淋巴细胞. 淋巴细胞增殖是免疫反应的初始阶段, 反应机体免疫应答的强度. T 淋巴细胞是淋巴细胞的主要组分, 产生细胞免疫应答, 具有多种生物学功能, 如产生细胞因子, 辅助或抑制 B 细胞产生抗体^[17]. B 淋巴细胞则介导体液免疫应答产生抗体, 在一些疾病的发生发展中起着重要作用. 单核巨噬细胞是机体非特异性免疫系统的重要组成部分^[18].

本试验中, 小鼠的胸腺指数提高且中剂量组效果最佳, 而脾脏指数在高剂量组中有显著差异; T 淋巴细胞增殖升高, B 淋巴细胞增殖不明显, 说明头功铁散对小鼠免疫功能的影响可能是通过对中枢免疫系统作用产生的.

4) α -毒素是一种依赖于 Zn^{2+} 的多功能金属酶, 具有两种生物酶活性, 分别是卵磷脂 C 酶和鞘磷脂酶, 能够同时水解卵磷脂和鞘磷脂. α -毒素依靠这两种酶水解细胞膜上的磷脂双分子层, 破坏细胞的完整性, 致使细胞的渗透压改变, 细胞破裂^[19]. 因此, 减少 α -毒素可较少其对动物的损伤. 本试验显示, 头功铁药散可下调 A 型魏氏梭菌 α -毒素基因的表达, 减少 α -毒素产生.

4 结 论

头功铁药散可增加免疫功能,抑制 A 型魏氏梭菌 α 毒素基因的表达,减少 A 型魏氏梭菌 α -毒素分泌,拮抗 A 型魏氏梭菌 α -毒素对小鼠机体的损伤,从而保护动物。

参考文献:

- [1] 于晓霞. SDS-PAGE 等三种方法对产气荚膜梭菌的比较鉴定及类毒素疫苗的初步研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2007.
- [2] 蔡宝祥. 家畜传染病学 [M]. 4 版. 北京: 中国农业出版社, 2001: 257.
- [3] ROOD J I. Virulence, Genes of *Clostridium Perfringens* [J]. *Annu Rev Microbial*, 1998, 52(2): 333—360.
- [4] 柴同杰, 马瑞华, 常维山, 等. 产气荚膜梭状芽胞杆菌病的流行与致病机制 [J]. *中国预防兽医学报*, 2001, 23(1): 70—72.
- [5] 胡元亮. 兽医中药学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2007.
- [6] 秦 华, 王建强. 中药不同配方对鸡感染性球虫卵囊的杀灭作用 [J]. *西南师范大学学报: 自然科学版*, 2007, 32(2): 88—92.
- [7] 陈 奇. 中药药理研究方法学 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- [8] 王苗利, 蔡玉梅. 感染 A 型产期荚膜梭菌小鼠体内 α 毒素的分布及定位 [J]. *动物医学进展*, 2011, 32(10): 19—23.
- [9] 许弟群, 王人卫, 曹 芳. 人参皂甙 Rg1 对大负荷运动训练小鼠免疫功能的影响 [J]. *西南师范大学学报: 自然科学版*, 2011, 36(5): 192—196.
- [10] 杜 娟, 张金叶, 田 甜, 等. 紫外线诱导家蚕胚胎细胞 BmE-SWU1 的凋亡研究 [J]. *西南大学学报: 自然科学版*, 2009, 31(8): 8—12.
- [11] 袁思霓, 张 峰. 银耳多糖的提取及其对小鼠免疫功能的影响 [J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(26): 90—91.
- [12] 吴信法. 兽医细菌学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.
- [13] 周才琼, 张宝勇. 印度人参根提取物体内抗氧化作用研究 [J]. *西南大学学报: 自然科学版*, 2008, 30(12): 111—115.
- [14] 钟长斌, 李 祥. 白头翁的化学成分及药理作用研究述要 [J]. *中医药学刊*, 2003, 21(8): 1338—1339.
- [15] 董 雷, 杨晓虹, 刘银燕, 等. 十大功劳属植物的药理作用研究进展 [J]. *中国现代药物应用*, 2007, 1(6): 71—75.
- [16] 王晓岚, 鞠辉军, 王晓红. 铁苋菜属药用植物的化学成分和药物活性研究 [J]. *研究进展*, 2008, 5(15): 20—21.
- [17] 李世光, 潘 乐. 同种异体骨移植后 T 淋巴细胞的分布与变化 [J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(18): 3391—3394.
- [18] 易金娥, 袁莉芸, 文利新. 桦木酸对小鼠淋巴细胞及巨噬细胞的影响分析 [J]. *畜牧兽医学报*, 2011, 42(1): 124—130.
- [19] 许崇波. A 型产气荚膜梭菌 d 毒素分子生物学的研究进展 [J]. *宁夏大学学报: 自然科学版*, 2002, 23(2): 188—192.

Effects of Tougong Tiejiao Powder on the Gene Expression of α -Toxin mRNA and the Immunity Dysfunction of Mice Affected by α -Toxin of *Clostridium welchii* Type A

LAI Jian-bin, PENG Shi, LIU Juan,
ZHU Zhao-rong, GUO Zhi-xing

Department of Veterinary Medicine, Southwest University (Rongchang Campus), Rongchang Chongqing 402460, China

Abstract: In a study reported in this paper, the effects of TouGong TieYao Powder, a medicine developed by the authors, on the immune function of mice injured by the exotoxin of *Clostridium welchii* Type A were investigated and the expression of α toxin mRNA was detected with fluorescence quantitative RT-PCR. Compared with the model group, Tougong Tiejiao Powder helped to antagonize the injure caused by exotoxin of *C. welchii* and improve the weight index of spleen and thymus, and highly significantly ($p < 0.01$) enhanced the phagocytic function of macrophages. Compared with the bacterial group, Tougong Tiejiao Powder highly significantly ($p < 0.01$) decreased the gene expression of α -toxin. Conclusion: Tougong Tiejiao Powder may improve the immune function of mice by decreasing the expression of α -toxin gene and reducing the injure by exotoxin of *C. welchii*.

Key words: Tougong Tiejiao Powder; *Clostridium welchii* Type A; immune function; α -toxin

责任编辑 夏 娟

