

• 实验研究 •

人 β -防御素-2 基因预防感染性结石的实验研究

赵利江¹ 刘春¹

【摘要】 目的:通过对膀胱感染性结石大鼠膀胱灌注脂质体包裹的人 β -防御素-2 重组真核表达载体 (pCAGG-hBD2), 观察人 β -防御素-2(hBD2) 基因对感染性结石的预防作用。**方法:**选择健康成年雄性 SD 大鼠 40 只, 随机分为实验组与对照组。实验组膀胱灌注 pCAGG-hBD2 250 μ l, 对照组经同法给予等量空载体 (pCAGG)。2 天后, 两组均随机处死 3 只大鼠, 利用小动物成像仪观察重组 hBD2 在 SD 大鼠膀胱黏膜的表达; 转染成功后, 两组均膀胱内置入含菌 (奇异变形杆菌) 聚乙烯管异物, 分别于 24、48、72 小时收集尿液, 进行尿液菌落计数、白细胞计数。30 天处死全部大鼠获取膀胱组织, 观察结石的形成情况及膀胱组织病理学变化。**结果:**实验组大鼠置入含菌 (奇异变形杆菌) 聚乙烯管异物 24、48、72 小时后, 尿液中奇异变形杆菌菌落总数、尿白细胞计数均显著低于对照组, 组间比较差异均有统计学意义 ($P < 0.001$); 实验组和对照组不同时间大鼠尿液中奇异变形杆菌菌落总数及尿白细胞计数差异有统计学意义。对照组大鼠的尿路组织主要表现为肾输尿管膀胱的炎症改变, 膀胱内有感染性结石的形成; 实验组大鼠的尿路组织病理学无明显变化, 膀胱内无结石生成。**结论:**重组 hBD2 基因对奇异变形杆菌致泌尿系感染性结石有预防作用。

【关键词】 感染性结石; 人 β -防御素-2; 基因预防

doi:10.13201/j.issn.1001-1420.2014.06.026

【中图分类号】 R691.4 **【文献标识码】** A

Preventive effect of human beta-defensin-2 gene on infection stones in rat models

ZHAO Lijiang LIU Chun

(First Clinical Medical College of Shanxi Medical University, Taiyuan, 030001, China)

Corresponding author: LIU Chun, E-mail: sxtlyiuchun@126.com

Abstract Objective: To observe therapeutic efficacy of human β -defensin-2 (hBD2) gene on infection stones caused by proteus mirabilis in rat models. **Method:** Forty Sprague-Dawley rats were randomly divided into an experimental group and a control group. The experimental group were administered 250 μ l recombinant pCAGG-hBD2 and control group were administered vector pCAGG intravesically respectively. Two days later, three rats of both groups were randomly sacrificed respectively in order to assay the expression of recombinant hBD2 in rats of bladder mucosa by small animal imaging. Then, rats of both groups were infected via proteus mirabilis inoculation with a polyethylene pipe, which had been contaminated by the proteus mirabilis. At 24, 48 and 72 h post-inoculation we collected urine samples from each rat for bacterial titers determined and WBC counted. All rats were sacrificed one month later, the bladders were aseptically removed and bisected for observing the formation of stones and histological analysis. **Result:** Numbers of bacterial colony-forming unit in urine from hBD2 gene treated urinary tract infection stone in experimental rats were significantly lower than those from the control vector administered rats at 24, 48, and 72 h after infection ($P < 0.001$). The amount of WBC in urine was significantly less in experimental group than in the control group. In addition, the histopathologic changes were mainly inflammatory changes for kidney, ureter and bladder in control group. Infection stones formation in bladder was found in control group. No changes or stone formation in kidney, ureter and bladder were found in experimental group. **Conclusion:** The successful inhibition of urinary tract infection stone formation progression could be obtained with hBD2 gene therapy.

Key words infection stone; human β -defensin-2; genetic prevention

感染性结石又称鸟粪石 (struvite calculus), 是指由可产生脲酶的微生物感染所引起的结石, 主要由磷酸镁铵和碳磷灰石组成^[1], 约占尿路结石总数的 15%^[2]。感染性结石复发率高, 主要原因是感

染不能及时有效的控制, 因此, 有效控制感染是预防感染性结石的关键所在。抗生素治疗周期较长, 长期使用会使体内细菌耐药或菌群失调, 因此, 积极寻求一种有效预防感染性结石的方法具有重要的临床意义。

防御素 (Defensins) 是生物体内产生的一类内

¹ 山西医科大学第一临床医学院 (太原, 030001)
通信作者: 刘春, E-mail: sxtlyiuchun@126.com

源性抗生素肽,具有独特的抗菌活性、抗病毒活性以及抗肿瘤活性。人 β -防御素-2(human β -defensin-2, hBD2)是第一个被发现的呈诱导型表达的抗菌肽,主要在感染刺激后的皮肤和黏膜组织中表达。体外研究显示 hBD2 具有广谱高效的杀菌活性,对多种病原微生物有直接强烈的杀伤作用,同时能够与幼稚树突状细胞和记忆 T 细胞相结合,发挥炎症趋化及间接免疫激活作用^[3]。

有学者利用基因转染的方法在气道及唾液腺体表达外源性的 hBD2,证实了 hBD2 的体内杀菌活性^[4-6]。也已有学者利用泌尿系感染(Urinary tract Infections, UTIs)大鼠动物模型,观察了脂质体介导 hBD2 转基因对尿路致病性大肠埃希菌所致 UTIs 的防治作用^[7]。本文利用 SD 大鼠动物模型对重组 hBD2 在泌尿系感染中的防护作用进行研究。

1 资料与方法

1.1 实验材料

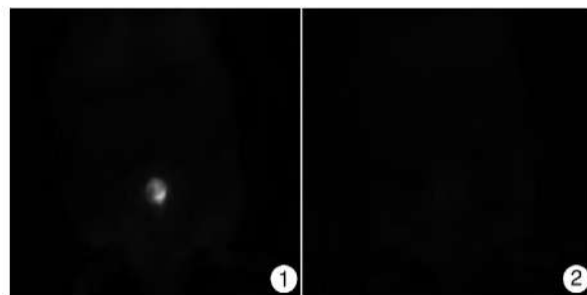
选择健康成年雄性 SD 大鼠,体重 180~200 g (山西医科大学动物实验中心提供),大鼠均在山西医科大学动物实验中心清洁级饲养室饲养,恒温、空调、12 小时昼夜更替。所有大鼠均可自由获取食物及饮水,室温(20 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度 50%~60%。

脂质体介导的重组真核表达载体 pCAGG-hBD2(上海艾博思生物科技有限公司提供);奇异变形杆菌(山西医科大学微生物室提供)。

脂质体包裹的 hBD2 重组真核表达载体灌注量根据体外试验结果选择最佳配置比例给药:在 250 μl 无血清、无双抗的 1640 培养基中稀释 3 μg 重组质粒 DNA 和 9 μg 脂质体,充分混匀,室温放置约 30 min,制成 DNA-脂质体混合物,并用异硫氰酸荧光素(FITC)进行标记。

1.2 实验方法

重组 hBD2 多肽预处理:为排除非健康实验动物对实验结果的影响,大鼠适应性饲养 1 周。实验动物 40 只,随机分为实验组和对照组。实验前禁止饮水 12 小时,以 10%水合氯醛腹腔注射麻醉。仰卧位固定于手术台上,尿道口消毒,硬膜外导管导尿,灌注稀盐酸 0.6 mmol/L^[8],保留 20 min,每 5 min 侧翻 90 $^{\circ}$,以确保膀胱壁黏膜上皮层均匀受损。以磷酸盐缓冲液(PBS)清洗膀胱,经逆行膀胱灌注给予脂质体包裹的 hBD2 重组真核表达载体 pCAGG-hBD2,给药后禁止饮水,保留硬膜外导管 2 小时。继续禁止饮水,4 小时后正常饲养。对照组经同法给予等量空载体(pCAGG)。2 天后,两组均随机处死 3 只大鼠,利用小动物成像仪(塞恩思科技有限公司提供)观察重组 hBD2 在 SD 大鼠膀胱黏膜的表达(图 1①、②),转染成功后制备感染性结石动物模型。



①实验组,②对照组

图 1 两组成像仪观察重组 hBD2 在膀胱黏膜的表达

菌液及异物制备:①在孵育奇异变形杆菌 24 小时后的血琼脂平板上挑出单个菌落,用 5 ml 盐水制成悬液。②在充足光线下,背对着有白色背景与黑色比对线条的卡片,将接种管与 0.5 号麦氏标准管行目测比较,并将菌悬液调至 0.5 麦氏浊度,此时的菌悬液内培养物大约含 $(1\sim 2)\times 10^8$ CFU/ml。③再将菌悬液用生理盐水按 1:10 稀释,获得 1×10^7 CFU/ml 的菌液。④取聚乙烯管(长 4 mm,直径 0.5 mm),浸泡于 1×10^7 CFU/ml 的细菌菌悬液中,置于恒温箱中共同培养 8 小时以上。

模型制备:转染成功后两组大鼠均以 25%乌拉拉 1.0 g/kg 腹腔注射麻醉,腹部皮肤备皮后以 1.5%碘伏消毒。麻醉后于下腹正中切开腹腔,提起膀胱,使用无菌 G18 穿刺针于膀胱顶部穿刺入膀胱,经穿刺针内腔,使用推杆将有奇异变形杆菌污染的两端打圆滑的聚乙烯管推入膀胱。之后关闭腹腔,术后 6 小时恢复进食、进水。以上各组大鼠白天均投以充足的普通饲料,并自由饮水。造模后 24、48、72 小时收集尿液,进行尿液菌落计数、白细胞计数。30 天处死全部大鼠获取膀胱组织,观察结石形成情况及膀胱组织病理学变化。

菌落计数:接菌后 24、48、72 小时用无菌 EP 管收集尿液,各取 100 μl 分别均匀涂抹血培养基和麦康凯培养基,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 细菌培养箱内培养 24 小时,进行菌落计数。

尿白细胞计数:接菌后 24、48、72 小时用无菌 EP 管收集尿液,采用全制动尿沉渣分析仪(UF-50)进行尿白细胞计数,每份样品均重复计数 3 次。

标本的获取:30 天以过量麻醉方法将各组大鼠全部处死,将大鼠肾脏、输尿管和膀胱行剥离术,提起大鼠膀胱底部,分离致尿道近端剪断,取出肾脏、输尿管及膀胱后,观察脏器大小、表面色泽及结石形成的情况。

获取的肾脏、输尿管及膀胱标本立即置于 4%多聚甲醛固定 24 小时,石蜡包埋,切片(4 μm 厚),行苏木精和伊红染色。

1.3 统计学处理

应用 SPSS17.0 软件进行统计分析;定量资料

用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,各指标、各时间点各组之间的比较采用不等距重复测量的方差分析;检验水准以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

奇异变形杆菌感染后 24 小时,实验组大鼠尿液中的奇异变形杆菌活菌数目平均值为对照组相应标本中活菌数目的 74.87%。随着时间的延长,实验组大鼠上述标本中的活菌数目进一步减少,而对照组大鼠的尿液活菌数目却明显增加(表 1、2)。

表 1 组别和时间因素对各组大鼠尿液中奇异变形杆菌活菌菌落计数的影响

变量	组别		时间		交互效应	
	F 值	P 值	F 值	P 值	F 值	P 值
菌落计数	692.871	<0.001	41.210	<0.001	101.003	<0.001

表 2 感染后不同时间各组大鼠尿液中奇异变形杆菌活菌菌落计数

组别	例数	24 h	48 h	72 h
实验组	17	5.87±1.03 ¹⁾	4.76±0.59 ¹⁾²⁾	1.68±1.09 ¹⁾²⁾³⁾
对照组	17	7.84±0.52	8.07±0.53	8.76±0.67 ²⁾³⁾

¹⁾与对照组比较 $P<0.05$; ²⁾与同组 24 h 比较 $P<0.05$; ³⁾与同组 48 h 比较 $P<0.05$

由表 1 得知,各组别与各时间点之间大鼠尿液中奇异变形杆菌活菌菌落计数存在交互效应($F=101.003, P<0.001$);实验组与对照组大鼠尿液中奇异变形杆菌活菌菌落计数差异有统计学意义($F=692.871, P<0.001$);不同时间点之间大鼠尿液中奇异变形杆菌活菌菌落计数差异有统计学意义($F=41.210, P<0.001$)。

膀胱灌注原位转染 hBD2 基因明显抑制尿液的炎症反应,与对照组比较,实验组大鼠的尿液白细胞计数于感染后 24 小时起明显减少,组间比较差异有统计学意义(表 3、4)。

表 3 组别和时间因素对各组大鼠尿液白细胞计数的影响

变量	组别		时间		交互效应	
	F 值	P 值	F 值	P 值	F 值	P 值
白细胞计数	26778.903	<0.001	375.633	<0.001	734.622	<0.001

由表 3 得知,各组别与各时间点之间大鼠尿液白细胞计数存在交互效应($F=734.622, P<0.001$);实验组与对照组大鼠尿液白细胞计数差异有统计学意义($F=26778.903, P<0.001$);不同时间点之间大鼠尿液白细胞计数差异有统计学意义($F=375.633, P<0.001$)。

造模术后无大鼠死亡,术后 30 天,以过量麻醉

表 4 各组大鼠尿液白细胞计数

组别	例数	24 h	48 h	72 h
实验组	17	25.62±5.44 ¹⁾	13.42±2.89 ¹⁾²⁾	9.97±3.74 ¹⁾²⁾³⁾
对照组	17	166.31±6.16	235.49±10.67 ²⁾	261.99±5.48 ²⁾³⁾

¹⁾与对照组比较 $P<0.05$; ²⁾与同组 24 h 比较 $P<0.05$; ³⁾与同组 48 h 比较 $P<0.05$

方法处死全部大鼠。肉眼观察,实验组的肾脏、输尿管无明显变化,膀胱内无结石生成。对照组大鼠的双侧肾脏明显增大、质暗肿胀,肾表面可见数量不等的微小脓肿,个别肾脏可见较大脓肿突出肾脏表面。肾切面肾盂扩大,黏膜充血、肿胀,肾盂内可见脓性分泌物。输尿管肿胀,内见炎症分泌物。膀胱表面的黏液层被破坏,膀胱壁明显增厚,膀胱表面粗糙糜烂,散在溃疡,局部可见到粟粒样脓肿。膀胱内见结石样物质。

对照组大鼠的组织病理学变化为肾小管细胞发生混浊肿胀,管腔内有红细胞及白细胞管型,肾间质有水肿,部分纤维化。输尿管上皮中度增生,管腔中见大量中性粒细胞,周围间质中见中性粒细胞以及成纤维细胞。膀胱组织血管广泛性扩张充血,大量炎细胞浸润,并有组织细胞坏死,膀胱移行上皮呈广泛性增生。实验组在感染后未见到明显的炎细胞浸润与膀胱黏膜损伤。

3 讨论

感染性结石生长速度较快,常能迅速填满肾盂和肾大盏。患者的肾功能丧失率、结石复发率和病死率较高,故临床上又称为“恶性”结石病。如果不给予治疗,感染性结石容易导致肾功能恶化及致命的尿源性败血症^[9]。感染性结石形成的先决条件是解脲酶微生物引起的持续性尿路感染^[2,10]。近年来随着临床抗生素的滥用,使体内细菌耐药或菌群失调,因此积极寻求一种有效预防感染性结石的方法具有重要的意义。防御素是生物体内产生的一类内源性抗微生物肽,具有独特的抗菌活性、抗病毒活性以及抗肿瘤活性,目前尚无病原菌对防御素产生耐药性的报道。hBD2 是防御素家族的成员之一,通过抗微生物活性方面的研究显示出它在黏膜防御中发挥着重要的作用,具有广谱的抗菌活性,是机体防御病原微生物入侵的重要介质。同时 hBD2 在器官的上皮细胞具有高的表达,其在器官局部募集未成熟树突状细胞和记忆性 T 细胞发挥 hBD2 在天然免疫和获得性免疫中的双重作用,提高组织器官抗感染能力^[11]。

奇异变形杆菌及其解脲酶产物对尿路的病理损害可能既造成了尿路感染,又参与了此后的结石生成。有研究证实, hBD2 真核表达载体 pCAGG-

hBD2 体外转基因表达的 hBD2 具有很强的抗菌活性^[12]。动物实验结果显示脂质体介导 hBD2 基因体内转染膀胱上皮细胞后能获得高效表达^[13]。本研究通过利用建立感染性结石大鼠模型,进一步探讨基因转染表达的 hBD2 在其体内能否发挥抗感染作用。结果显示,与经逆行膀胱灌注体内转染表达的 hBD2 实验组大鼠比较,对照组大鼠尿液奇异变形杆菌活菌数目明显增多,差异有显著性,随时间的延长对照组活菌数目逐渐升高,实验组逐渐减少,说明 hBD2 基因对奇异变形杆菌具有很强的抗菌活性,其防治方式主要与直接杀菌作用有关。对照组大鼠的尿液白细胞计数与实验组大鼠比较明显增多,差异有显著性,随时间的延长对照组尿液白细胞计数逐渐升高,实验组逐渐减少,此外对照组大鼠经病理学检测见肾小管细胞混浊肿胀、肾间质水肿、部分纤维化、输尿管上皮增生、膀胱组织大量炎细胞浸润并有组织细胞坏死等炎症改变,膀胱内有感染性结石的形成;实验组大鼠的肾脏、输尿管无明显变化,膀胱内无结石生成。说明体内转染的 hBD2 可通过抑制病原菌的生长,进而抑制由感染引发的后续炎症反应,进一步证实重组 hBD2 基因对奇异变形杆菌致泌尿系感染性结石有预防作用。

有研究表明,hBD2 主要分布于人体皮肤粘膜组织,在人体的口腔、鼻、眼、中耳道、皮肤、呼吸道、肺、消化道、肾、泌尿生殖道等均有发现,在炎症、艾滋病、肿瘤等损害中浓度较高^[11,14~17]。进一步研究证实 hBD2 基因对人体感染性结石的防护作用将成为今后的实验重点。

[参考文献]

- 1 吴阶平主编. 吴阶平泌尿外科学[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 2005: 782.
- 2 Thomas B, Tolley D. Concurrent urinary tract infection and stone disease: pathogenesis, diagnosis and management[J]. Nat Clin Pract Urol, 2008, 5(12): 668—675.
- 3 Diamond G, Beckloff N, Weinberg A, et al. The roles of antimicrobial peptides in innate host defense[J]. Curr Pharm Des, 2009, 15: 2377—2392.
- 4 Yin C, Dang HN, Gazor F, et al. Mouse salivary glands and human beta-defensin-2 as a study model for antimicrobial gene therapy: technical considerations[J]. Int J Antimicrob Agents, 2006, 28: 352—360.
- 5 Huang G T, Zhang H B, Kim D, et al. A model for antimicrobial gene therapy: demonstration of human beta-defensin-2 antimicrobial activities in vivo[J]. Hum Gene Ther, 2002, 13: 2017—2025.
- 6 Shu Q, Shi Z, Zhao Z, et al. Protection against pseudomonas aeruginosa pneumonia and sepsis-induced lung injury by overexpression of beta-defensin-2 in rats[J]. Shock, 2006, 26: 365—371.
- 7 赵俊丽, 王俭勤, 王志平. 人 β -防御素-2 基因治疗大鼠泌尿系感染的实验研究[J]. 中华泌尿外科杂志, 2011, 32(12): 846—849.
- 8 Lin L F, Zhu G, Yoo J J, et al. A system for the enhancement of adenovirus mediated gene transfer to uro-epithelium[J]. J Urol, 2002, 168: 813—818.
- 9 Preminger G M, Assimos D G, Lingeman J E, et al. Chapter 1: AUA guideline on management of staghorn calculi: diagnosis and treatment recommendations[J]. J Urol, 2005, 173(6): 1991—2000.
- 10 Healy K A, Ogan K. Pathoophysiology and management of infectious staghorn calculi[J]. Urol Clin North Am, 2007, 34(3): 363—374.
- 11 廖伟, 钱桂生. 人 β -防御素-2 研究进展[J]. 重庆医学, 2005, 34(1): 135—137.
- 12 李娟, 唐玲珊, 陈新年等. 人 β -防御素-2 基因表达及其抗菌活性[J]. 中国公共卫生, 2007, 23: 1082—1084.
- 13 赵俊丽, 王俭勤, 王志平. 脂质体介导人 β -防御素-2 基因转染膀胱上皮的实验研究[J]. 医学分子生物学杂志, 2011, 8: 56—60.
- 14 武庆平, 姚尚龙. 上皮组织抗菌肽- β 防御素[J]. 国外医学(麻醉学与复苏分册), 2002, 23(5): 297—299.
- 15 Markeeva N, Lysovskiy I, Zhuravel E, et al. Involvement of human beta-defensin-2 in proliferation of transformed cells of human cervix[J]. Ecp Oncol, 2005, 27(4): 308—313.
- 16 Braff M H, Gallo R L. Antimicrobial peptides an essential component of the skin defensive barrier[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2006, 306: 91—110.
- 17 旷燕飞, 曾昭武, 杨志波. 人 β -防御素-2 基因在衣原体感染女性生殖道组织中的表达[J]. 医学临床研究, 2006, 23(9): 1372—1374.

(收稿日期: 2014-01-06)

敬告作者

本刊实行的是文章作者负责制,但本刊对文章有修改权。经本刊编辑修改过的文章发给作者,而经作者校对认可后的校样十分重要,本刊将以此作为文章刊发的最终依据。因此,提请广大作者注意,校对后的纸质校样稿签名认可后请用快递尽快寄回编辑部。

谢谢合作!

《临床泌尿外科杂志》编辑部