

基于活性氧/硫氧还蛋白结合蛋白通路探讨紫草素对布鲁氏菌感染小鼠的保护作用[△]

贾永利*, 杨新明#, 张培楠, 孟宪勇, 胡长波(河北北方学院附属第一医院骨外科, 河北 张家口 075000)

中图分类号 R96 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2021)07-0796-05

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2021.07.006

摘要 目的:基于活性氧(ROS)/硫氧还蛋白结合蛋白(TXNIP)通路探讨紫草素对布鲁氏菌感染小鼠的保护作用。方法:将BALB/C小鼠随机分为五组,即对照组、模型组、紫草素组(50 mg/kg)、N-乙酰半胱氨酸(NAC)组(ROS抑制剂NAC 20 mg/kg)以及紫草素+NAC组(紫草素50 mg/kg+ROS抑制剂NAC 20 mg/kg)。除对照组外,其余组腹腔注射布鲁氏菌液构建小鼠感染模型。相应药物处理后,测定五组小鼠肝脾指数,检测腹腔积液及脾脏中载菌量,以酶联免疫吸附法检测血清 γ 干扰素(IFN- γ)、白细胞介素6(IL-6)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平,免疫球蛋白G(IgG)和免疫球蛋白M(IgM)水平,以ROS检测试剂盒检测血液中ROS水平,以蛋白免疫印迹法检测血液中TXNIP表达。结果:与对照组比较,模型组小鼠的肝脏指数、脾脏指数、腹腔积液载菌量及脾脏载菌量,血清IFN- γ 、IL-6及TNF- α 水平,IgG、IgM水平,血液中ROS水平和TXNIP蛋白表达水平显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,紫草素组、NAC组和紫草素+NAC组小鼠的肝脏指数、脾脏指数、腹腔积液载菌量及脾脏载菌量,血清IFN- γ 、IL-6及TNF- α 水平,IgG、IgM水平,血液中ROS水平及TXNIP蛋白表达水平显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与紫草素组及NAC组分别比较,紫草素+NAC组小鼠上述指标水平均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论:紫草素可降低布鲁氏菌感染小鼠的载菌量,减轻免疫炎症反应,对小鼠起到保护作用。

关键词 ROS/TXNIP通路;紫草素;布鲁氏菌;小鼠;保护作用

Protective Effect of Shikonin on Mice Infected by *Brucella* Based on Reactive Oxygen Species/Thioredoxin Interacting Protein Pathway[△]

JIA Yongli, YANG Xinming, ZHANG Peinan, MENG Xianyong, HU Changbo (Dept. of Orthopaedic Surgery, the First Hospital Affiliated to Hebei North University, Hebei Zhangjiakou 075000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To probe into the protective effect of shikonin on mice infected by *brucella* based on reactive oxygen species (ROS)/thioredoxin interacting protein (TXNIP). METHODS: BALB/C mice were randomly divided into five groups, including control group, model group, shikonin group (50 mg/kg), N-acetylcysteine (NAC) group (20 mg/kg of ROS inhibitor NAC) and paclitaxel+NAC group (50 mg/kg of paclitaxel, 20 mg/kg of ROS inhibitor NAC). Except for the control group, the mouse infection model was constructed by intraperitoneal injection of *Brucella* liquid in the rest groups. After corresponding drug treatment, the liver and spleen indicators of mice in each group were measured, the bacterial load in peritoneal effusion and spleen were detected, levels of serum interferon γ (IFN- γ), interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor α (TNF- α), immunoglobulin G (IgG) and immunoglobulin M (IgM) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay, the ROS level in blood was detected by ROS assay kit, and the expression of TXNIP in blood was detected by protein immunoblotting. RESULTS: Compared with the control group, the liver indicator, spleen indicator, bacterial load in peritoneal effusion and spleen, serum IFN- γ , serum IL-6, serum TNF- α , IgG and IgM levels, ROS level and expression level of TXNIP protein of mice in the model group were significantly higher, with statistically significant differences ($P < 0.05$). Compared with the model group, the liver indicator, spleen indicator, bacterial load in peritoneal effusion and spleen, serum IFN- γ , serum IL-6, serum TNF- α , IgG and IgM levels, ROS level and expression level of TXNIP protein of mice in the shikonin group, NAC group and paclitaxel + NAC group were significantly lower, with statistically significant differences ($P < 0.05$). Compared with shikonin group and NAC group, the above indicators in paclitaxel+NAC group were significantly lower,

△ 基金项目:河北省2019年度医学科学研究课题计划项目(No. 20190120);2018年度河北省卫生健康技术研究暨成果转化重点项目(No. zh2018014);2018年度河北省医学适用技术跟踪项目(No. G2018074)

* 主治医师, 硕士。研究方向:布鲁氏菌脊柱炎诊治工作。E-mail:jiayongli342@163.com

通信作者:主任医师。研究方向:脊柱、创伤、关节疾病诊治工作。E-mail:yxm11200@126.com

with statistically significant differences ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: Shikonin can reduce the bacterial load of *Brucella* in infected mice, alleviate immune inflammatory response, and play a protective role for mice.

KEYWORDS ROS/TXNIP pathway; Shikonin; *Brucella*; Mice; Protective effect

布鲁氏菌病是一种常见的人畜共患病,因布鲁氏菌感染引起。布鲁氏菌为革兰阴性胞内寄生菌,主要有消化道、呼吸道及皮肤接触等多种感染途径,可导致动物不育、流产,严重降低畜牧业经济效益,并可造成患者心、肝、脑及泌尿等全身器官和或(系统)病变,导致盗汗、浑身无力和发热,极大威胁人们的生命健康^[1-3]。布鲁氏菌能引发人类机体严重的免疫炎症反应,细胞免疫及体液免疫均参与其中,布鲁氏菌感染机体后,可激活免疫细胞,促使其合成分泌炎症因子,引发炎症;还可诱导机体免疫系统生成免疫球蛋白 G(IgG)、免疫球蛋白 M(IgM),形成免疫复合物,进一步激发免疫效应,促使炎症进展^[4-6]。免疫炎症反应是机体受到外界刺激时发生的复杂病理过程,活性氧(ROS)/硫氧还蛋白结合蛋白(TXNIP)通路是参与介导该过程的主要信号,减少 ROS 的产生,可下调 TXNIP 表达,抑制炎症反应,预防细菌感染引起的急性肺损伤,因此,抑制 ROS/TXNIP 通路可作为布鲁氏菌病的潜在治疗手段^[7]。紫草素是提取自紫草的天然活性成分,具有良好的抗菌、消炎作用,能显著抑制金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌及白色念珠菌等多种常见菌的生长,并可减少炎症因子释放,减轻炎症损伤,缓解脂多糖诱导的小鼠肺损伤^[8-9]。因此,推测紫草素对布鲁氏菌病也可能有较好的治疗作用。本研究基于 ROS/TXNIP 通路对紫草素保护布鲁氏菌感染小鼠的作用进行探讨,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器:Multiskan FC 型酶标仪购自上海腾名生物科技有限公司;Mini-PROTEAN Tetra 型蛋白电泳仪、Trans-Blot Turbo 型蛋白快速转膜仪购自美国 Bio-Rad 公司;TD-4M 型低温高速离心机购自济南来宝医疗器械有限公司;GenoSens 2000 Touch 型系列凝胶成像系统购自上海勤翔科学仪器有限公司。

1.1.2 实验细菌:布鲁氏菌购自美国菌种保藏中心,批号 25840。

1.1.3 药品与试剂:紫草素(原料药,纯度 $\geq 98\%$)购自上海乔羽生物科技有限公司,批号为 QY-0022;布鲁氏菌液体培养基、选择性培养基购自青岛海博生物技术有限公司,批号为 HB7027、HB0315-1;ROS 抑制剂 N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)(批号为 ab143032)、小鼠 IgG 酶联免疫吸附试剂盒(批号为 ab151276)、小鼠 IgM 酶联免疫吸附试剂盒(批号为 ab215085)、小鼠 γ 干扰素(IFN- γ)酶联免疫吸附试剂盒(批号为 ab100689)、小鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α)酶联免疫吸附试剂盒(批号为 ab100713)、小鼠白细胞介素 6(IL-6)酶联免疫吸附试剂盒(批号为 ab222274)、兔源 GAPDH 一抗(批号为 ab9485)、兔源 TXNIP 一抗(批号为 ab263899)及羊抗鼠二抗(批号为 ab188865)购自美国 Abcam 公司;ROS 测定试剂盒购自上海雅吉生物科技有限公司,批号为 E004;全血总蛋白

提取试剂盒购自上海贝博生物试剂公司,批号为 BB-31967-1;BCA 试剂盒、化学发光试剂购自上海经科化学科技有限公司,批号为 JK-201、JK-305;RIPA 裂解液购自上海碧云天公司,批号为 P0013K。

1.1.4 实验动物:SPF 级 BALB/C 小鼠购于河北省实验动物中心,雌雄不限,10 周龄,体重 22~26 g,动物生产许可证号为 SCXK(冀)2019-0001,动物使用许可证号为 SYXK(冀)2019-0009,动物质量合格证号为 LD501134。在河北北方学院附属第一医院动物实验室中饲养,室内温度约 25 $^{\circ}$ C、相对湿度约 50%,保持安静,良好通风。

1.2 方法

1.2.1 小鼠模型的建立及分组处理:将 BALB/C 小鼠随机分为对照组、模型组、紫草素组(50 mg/kg)、NAC 组(ROS 抑制剂 NAC 20 mg/kg)、紫草素+NAC 组(紫草素 50 mg/kg+ROS 抑制剂 NAC 20 mg/kg),每组 16 只。除对照组外,其余组构建布鲁氏菌感染小鼠模型。参照文献^[10]操作,将布鲁氏菌种涂布接种在布鲁氏菌选择培养基上培养,72 h 后挑取单个、光滑的菌落,接种在液体培养基中,继续培养 72 h,吸取菌液 1 ml,以 12 000 r/min 离心后以 PBS 缓冲液漂洗布鲁氏菌沉淀,以 PBS 缓冲液重悬,采用麦氏比浊法计数,并稀释菌液为 5.0×10^6 CFU/ml,每只小鼠腹腔注射该菌液 200 μ l 建立感染小鼠模型,对照组 16 只小鼠腹腔注射 PBS 缓冲液 200 μ l。以 0.9%氯化钠溶液溶解紫草素和 NAC,分别制备成 5 mg/ml 的紫草素溶液^[11]、2 mg/ml 的 NAC 溶液^[12]、紫草素和 NAC 的混合溶液(紫草素、NAC 质量浓度分别为 5、2 mg/ml),紫草素组、NAC 组和紫草素+NAC 组小鼠每日以 10 ml/kg 剂量的相应溶液灌胃,模型组和对照组小鼠每日以相同剂量的 0.9%氯化钠溶液灌胃,均每日灌胃 1 次,共进行 14 d。

1.2.2 标本采集及小鼠肝脾指数测定:末次灌胃给药 24 h 后,称量五组小鼠体重后,脱颈处死,从腹主动脉取血 5 ml,其中每组 8 只小鼠的血液于 4 $^{\circ}$ C 下,以 3 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液置于 Ep 管中;剩余 8 只小鼠的血液,取 2 ml 进行 ROS 水平检测;剩余 3 ml 以全血总蛋白提取试剂盒提取总蛋白后,采用 BCA 试剂盒测量其浓度(步骤按照各自试剂盒说明书进行),血清与血中总蛋白均放置于 -80 $^{\circ}$ C 储存,以备后续实验使用。取血后,每组随机选择 8 只小鼠取出肝脏和脾脏,称其重量,计算肝脾指数,脏器指数=脏器湿重/体重 $\times 100\%$;剩余 8 只小鼠吸取腹腔积液 1 ml,称重后,然后取脾脏组织 1 g,加入 RIPA 裂解液 2 ml,匀浆后,以 3 000 r/min 离心,取上清液,和腹腔积液一起置于 4 $^{\circ}$ C 储存备用。

1.2.3 小鼠腹腔积液、脾脏载菌量测定:取“1.2.2”项下腹腔积液和脾脏组织样品液各 10 μ l 涂布接种在布鲁氏菌选择培养基上培养,72 h 后观察菌落形成情况,进行细菌计数,载菌量以 CFU/g 表示。

1.2.4 血清 IFN- γ 、IL-6、TNF- α 、IgG 及 IgM 水平测定:取

“1.2.2”项下血清,4℃下解冻,以酶联免疫吸附法按照试剂盒的操作步骤测定血清 IFN- γ 、IL-6、TNF- α 、IgG 及 IgM 水平。

1.2.5 血液中 ROS 水平、TXNIP 蛋白水平检测:使用 ROS 测定试剂盒测量“1.2.2”项下全血 ROS 水平,具体步骤按照试剂盒说明书进行。取出血液蛋白样品液,各样本分别取 20 μ l,110 V 恒定电压下电泳,然后以同样电压湿转,将分离蛋白转印至聚偏二氟乙烯膜上,采用 5% 浓度的脱脂奶粉室温孵育 2 h,行封闭处理,以稀释比为 1:2 000 的兔源 TXNIP、GAPDH 一抗溶液于 4℃下孵育过夜,以 TBST 缓冲液漂洗 3 次,加入稀释比为 1:5 000 的羊抗鼠二抗溶液室温孵育 2 h,以 TBST 缓冲液漂洗 3 次,使用化学发光试剂使蛋白条带显色,使用凝胶成像仪拍照,最终以 Quantity One 软件分析图像,得出 TXNIP 蛋白的相对表达量。

1.3 统计学方法

以 SPSS 24.0 软件统计分析实验数据,计量数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较行单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK-q 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 五组小鼠肝脾指数比较

与对照组比较,模型组小鼠的肝脏和脾脏指数明显升高;与模型组比较,紫草素组、NAC 组及紫草素+NAC 组小鼠的肝脏和脾脏指数明显降低;与紫草素组及 NAC 组分别比较,紫草素+NAC 组小鼠的肝脏和脾脏指数均明显降低,上述差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 五组小鼠肝脾指数比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Comparison of liver and spleen indicators of mice among 5 group ($\bar{x}\pm s$)

组别	肝脏指数	脾脏指数
对照组($n=8$)	5.12 \pm 0.40	0.53 \pm 0.10
模型组($n=8$)	8.63 \pm 0.73 ^a	1.48 \pm 0.23 ^a
紫草素组($n=8$)	6.74 \pm 0.45 ^b	0.99 \pm 0.16 ^b
NAC 组($n=8$)	6.72 \pm 0.47 ^b	0.97 \pm 0.17 ^b
紫草素+NAC 组($n=8$)	5.35 \pm 0.49 ^{abcd}	0.59 \pm 0.11 ^{abcd}

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$;与紫草素组相比,^c $P<0.05$;与 NAC 组相比,^d $P<0.05$

Note: vs. control group, ^a $P<0.05$; vs. model group, ^b $P<0.05$; vs. shikonin group, ^c $P<0.05$; vs. NAC group, ^d $P<0.05$

2.2 五组小鼠腹腔积液载菌量比较

与对照组比较,模型组小鼠腹腔积液载菌量明显升高;与模型组比较,紫草素组、NAC 组及紫草素+NAC 组小鼠腹腔积液载菌量明显降低;与紫草素组及 NAC 组分别比较,紫草素+NAC 组小鼠腹腔积液载菌量均明显降低,上述差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

2.3 五组小鼠脾脏载菌量比较

与对照组比较,模型组小鼠脾脏载菌量明显升高;与模型组比较,紫草素组、NAC 组及紫草素+NAC 组小鼠脾脏载菌量明显降低;与紫草素组及 NAC 组分别比较,紫草素+NAC 组小鼠脾脏载菌量均明显降低,上述差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

2.4 五组小鼠血清 IFN- γ 、IL-6 及 TNF- α 水平比较

与对照组比较,模型组小鼠血清 IFN- γ 、IL-6、TNF- α 水平

表 2 五组小鼠腹腔积液载菌量比较($\bar{x}\pm s$,CFU/g)

Tab 2 Comparison of bacterial load in peritoneal effusion of mice among 5 group ($\bar{x}\pm s$,CFU/g)

组别	腹腔积液载菌量
对照组($n=8$)	0.00 \pm 0.00
模型组($n=8$)	5.13 \pm 1.34 ^a
紫草素组($n=8$)	2.64 \pm 0.65 ^b
NAC 组($n=8$)	2.72 \pm 0.62 ^b
紫草素+NAC 组($n=8$)	0.56 \pm 0.13 ^{abcd}

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$;与紫草素组相比,^c $P<0.05$;与 NAC 组相比,^d $P<0.05$

Note: vs. control group, ^a $P<0.05$; vs. model group, ^b $P<0.05$; vs. shikonin group, ^c $P<0.05$; vs. NAC group, ^d $P<0.05$

表 3 五组小鼠脾脏载菌量比较($\bar{x}\pm s$,CFU/g)

Tab 3 Comparison of bacterial load in spleen of mice among 5 group ($\bar{x}\pm s$,CFU/g)

组别	脾脏载菌量
对照组($n=8$)	0.00 \pm 0.00
模型组($n=8$)	5 038.13 \pm 720.52 ^a
紫草素组($n=8$)	2 697.47 \pm 389.53 ^b
NAC 组($n=8$)	2 708.76 \pm 406.28 ^b
紫草素+NAC 组($n=8$)	29.68 \pm 5.33 ^{abcd}

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$;与紫草素组相比,^c $P<0.05$;与 NAC 组相比,^d $P<0.05$

Note: vs. control group, ^a $P<0.05$; vs. model group, ^b $P<0.05$; vs. shikonin group, ^c $P<0.05$; vs. NAC group, ^d $P<0.05$

明显升高;与模型组比较,紫草素组、NAC 组及紫草素+NAC 组小鼠血清 IFN- γ 、IL-6 及 TNF- α 水平明显降低;与紫草素组及 NAC 组分别比较,紫草素+NAC 组小鼠血清 IFN- γ 、IL-6、TNF- α 水平均明显降低,上述差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 4。

表 4 五组小鼠血清 IFN- γ 、IL-6 及 TNF- α 水平比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 4 Comparison of serum IFN- γ , IL-6 and TNF- α levels of mice among 5 group ($\bar{x}\pm s$)

组别	IFN- γ /(ng/L)	IL-6/(pg/ml)	TNF- α /(ng/L)
对照组($n=8$)	789.34 \pm 97.36	103.43 \pm 20.03	198.74 \pm 30.16
模型组($n=8$)	1 568.65 \pm 348.03 ^a	260.36 \pm 45.17 ^a	450.73 \pm 60.87 ^a
紫草素组($n=8$)	1 107.61 \pm 274.02 ^b	180.96 \pm 31.01 ^b	310.45 \pm 46.12 ^b
NAC 组($n=8$)	1 116.58 \pm 280.73 ^b	191.02 \pm 34.76 ^b	319.27 \pm 43.96 ^b
紫草素+NAC 组($n=8$)	801.02 \pm 100.14 ^{abcd}	119.34 \pm 23.47 ^{abcd}	210.01 \pm 30.47 ^{abcd}

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$;与紫草素组相比,^c $P<0.05$;与 NAC 组相比,^d $P<0.05$

Note: vs. control group, ^a $P<0.05$; vs. model group, ^b $P<0.05$; vs. shikonin group, ^c $P<0.05$; vs. NAC group, ^d $P<0.05$

2.5 五组小鼠血清 IgG、IgM 水平比较

与对照组比较,模型组小鼠血清 IgG、IgM 水平明显升高;与模型组比较,紫草素组、NAC 组及紫草素+NAC 组小鼠血清 IgG、IgM 水平明显降低;与紫草素组及 NAC 组分别比较,紫草素+NAC 组小鼠血清 IgG、IgM 水平均明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 5。

2.6 五组小鼠血液中 ROS 水平和 TXNIP 蛋白表达水平比较

与对照组比较,模型组小鼠血液中 ROS 水平和 TXNIP 蛋白表达水平明显升高;与模型组比较,紫草素组、NAC 组及紫草素+NAC 组小鼠血液中 ROS 水平和 TXNIP 蛋白表达水平明显降低;与紫草素组及 NAC 组分别比较,紫草素+NAC 组

表5 五组小鼠血清IgG、IgM水平比较($\bar{x}\pm s, \mu\text{g/ml}$)

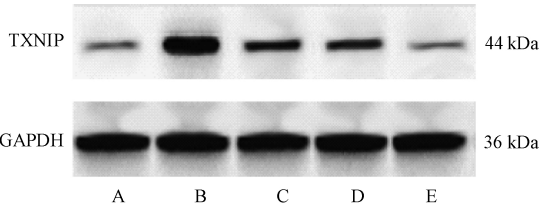
Tab 5 Comparison of serum IgG and IgM levels of mice among 5 group ($\bar{x}\pm s, \mu\text{g/ml}$)

组别	IgG	IgM
对照组(n=8)	1 876.23±123.42	302.36±40.05
模型组(n=8)	2 680.42±241.37 ^a	820.36±54.03 ^a
紫草素组(n=8)	2 203.15±205.23 ^b	580.67±43.12 ^b
NAC组(n=8)	2 214.54±208.78 ^b	589.23±46.17 ^b
紫草素+NAC组(n=8)	1 890.01±109.05 ^{abcd}	313.49±42.74 ^{abcd}

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$;与紫草素组相比,^c $P<0.05$;与NAC组相比,^d $P<0.05$

Note: vs. control group, ^a $P<0.05$; vs. model group, ^b $P<0.05$; vs. shikonin group, ^c $P<0.05$; vs. NAC group, ^d $P<0.05$

小鼠血液中 ROS 水平和 TXNIP 蛋白表达水平均明显降低,上述差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 1、表 6。



A. 对照组; B. 模型组; C. 紫草素组; D. NAC 组; E. 紫草素+NAC 组

A. control group; B. model group; C. Shikonin group; D. NAC group; E. Shikonin+NAC group

图 1 蛋白免疫印迹检测五组小鼠血液中 TXNIP 蛋白表达

Fig 1 Expression of TXNIP protein in blood of mice in 5 groups detected by protein immunoblotting

表 6 五组小鼠血液中 ROS 水平和 TXNIP 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 6 Comparison of ROS level and expression level of TXNIP protein in blood of mice among 5 group ($\bar{x}\pm s$)

组别	ROS/(U/ml)	TXNIP/GAPDH
对照组(n=8)	291.73±0.40	0.09±0.02
模型组(n=8)	504.64±0.72 ^a	0.93±0.23 ^a
紫草素组(n=8)	422.59±0.46 ^b	0.54±0.17 ^b
NAC组(n=8)	416.62±0.47 ^b	0.52±0.15 ^b
紫草素+NAC组(n=8)	301.80±0.42 ^{abcd}	0.10±0.03 ^{abcd}

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$;与紫草素组相比,^c $P<0.05$;与NAC组相比,^d $P<0.05$

Note: vs. control group, ^a $P<0.05$; vs. model group, ^b $P<0.05$; vs. shikonin group, ^c $P<0.05$; vs. NAC group, ^d $P<0.05$

3 讨论

本研究通过腹腔注射布鲁氏菌菌液制备布鲁氏菌感染小鼠模型,结果显示,感染小鼠的肝脏指数、脾脏指数、腹腔积液载菌量及脾脏载菌量显著升高,血清 IFN- γ 、IL-6、TNF- α 、IgG 和 IgM 水平显著升高,表明布鲁氏菌在小鼠体内生长,并引发免疫炎症反应,造成肝脾肿大受损,说明模型建立成功。

紫草素为天然药物紫草的主要活性成分,具有抑菌、抗炎、抗肿瘤和抗病毒等多种药理作用,可破坏细菌细胞膜完整性,抑制白色念珠菌、大肠埃希菌和蜡状芽孢杆菌等多种菌株生长,并可阻止心肌缺血再灌注引发的炎症发生,降低机体氧化应激水平,减轻心肌梗死小鼠的心肌损伤^[11,13-14]。由此推测,紫草素也可能抑制布鲁氏菌生长,并通过减轻炎症改善布

鲁氏菌病的临床症状。本研究以紫草素灌胃布鲁氏菌感染模型小鼠,结果显示,紫草素可降低布鲁氏菌感染小鼠的肝脏指数、脾脏指数、腹腔积液载菌量和脾脏载菌量,降低布鲁氏菌感染小鼠血清 IFN- γ 、IL-6、TNF- α 、IgG 和 IgM 水平,表明紫草素可抑制布鲁氏菌在小鼠体内生长繁殖,降低炎症因子及抗体水平,减轻细胞和体液免疫应答,抑制炎症发生及进展,缓解肝脾器官损伤。

ROS/TXNIP 通路是机体中调控炎症反应的重要信号通路,机体受到细菌感染、缺血及缺氧等外界刺激时,ROS 大量产生,促进 TXNIP 表达,诱导下游 NOD 样受体蛋白 3 炎症信号激活,导致炎症发生;NAC 是 ROS 清除剂,可降低 ROS 水平,下调 TXNIP 蛋白表达,进而抑制炎症反应发生及进展^[15-17]。因此,ROS/TXNIP 可作为布鲁氏菌病的潜在治疗靶点。本研究结果显示,小鼠感染布鲁氏菌后,体内 ROS/TXNIP 处于激活状态,而紫草素可下调 ROS 水平和 TXNIP 蛋白表达水平,表明 ROS/TXNIP 通路参与调控布鲁氏菌感染的病理过程,下调该通路蛋白表达,可减轻感染小鼠的临床症状;NAC 与紫草素作用相似,均可抑制 ROS/TXNIP 激活,减轻炎症,降低小鼠肝脾损伤;进一步研究结果显示,紫草素及 NAC 联合应用,可进一步降低布鲁氏菌感染小鼠的肝脏指数、脾脏指数、腹腔积液载菌量和脾脏载菌量,降低血清 IFN- γ 、IL-6、TNF- α 、IgG 和 IgM 水平,降低血液中 ROS 水平、TXNIP 蛋白表达水平,相比紫草素、NAC 单独处理,作用更强,表明两者联合应用具有协同作用,可更有效地抑制小鼠体内布鲁氏菌繁殖生长,减少炎症因子及抗体合成分泌,抑制细胞和体液免疫应答,减轻炎症,改善小鼠症状。

综上所述,紫草素具有明显的抗布鲁氏菌作用,可抑制布鲁氏菌在动物体内生长,减轻机体免疫应答,抑制炎症反应,缓解肝脾器官损伤,改善细菌感染症状,为布鲁氏菌病的临床治疗提供了新的思路,抑制 ROS/TXNIP 通路激活可能是其药理机制之一。但本研究还未使用该通路激动剂进行对照验证,需后续深入研究,改善其不足。

参考文献

- [1] Sun HL, Ma CJ, Du XF, et al. Soluble IL-2R α correlates with imbalances of Th1/Th2 and Tc1/Tc2 cells in patients with acute brucellosis[J]. Infect Dis Poverty, 2020, 9(1): 92.
- [2] Xie S, Zhou Y, Zheng R, et al. Childhood pneumonia due to brucellosis: A case report[J]. Medicine, 2019, 98(27): e16247.
- [3] Cotterill GG, Cross PC, Merkle JA, et al. Parsing the effects of demography, climate and management on recurrent brucellosis outbreaks in elk[J]. J Appl Ecol, 2020, 57(2): 379-389.
- [4] Hashemi SH, Esna-Ashari F, Nemat Gorgani F, et al. Increased serum levels of hepcidin and C-reactive protein in patients with brucellosis[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2018, 112(11): 509-512.
- [5] Jindan RA, Saleem N, Shafi A, et al. Clinical interpretation of detection of IgM anti-Brucella antibody in the absence of IgG and vice versa; a diagnostic challenge for clinicians[J]. Pol J Microbiol, 2019, 68(1): 51-57.

(下转第 803 页)