

含药血清作用巨噬细胞感染模型对抗结核药物活性的评价

钱中清^{1,2}, 吕静竹¹, 戴军², 邓学端²

[摘要]目的: 建立含药血清作用结核杆菌感染巨噬细胞模型的抗结核杆菌药物活性检测方法, 探讨该方法在评价抗结核杆菌药物活性中的应用。方法: 以结核杆菌感染小鼠腹腔巨噬细胞, 加入低剂量或高剂量异烟肼给药小鼠的含药血清共同培养数天后, 破碎巨噬细胞释放可能仍存活的细菌, 体外培养后检查形成的菌落数, 评价异烟肼的抗结核活性, 并与传统最低抑菌浓度试验进行比较。结果: 培养数天后, 低剂量和高剂量异烟肼含药血清组菌落生成数均低于空白对照组 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$)。结论: 应用含药血清及感染巨噬细胞模型可对抗结核药物活性作出较客观的评价结果。

[关键词] 抗结核剂; 模型; 生物学; 异烟肼; 结核杆菌; 含药血清; 巨噬细胞

[中国图书资料分类法分类号] R 978.3 R 318 [文献标识码] A

Drug containing serum and infected macrophage model by Mycobacterium tuberculosis for evaluation of activity of anti-tubercular agents

QIAN Zhongqing², LÜ Jingzhu¹, DAI Jun², DENG Xue-duan²

(1. Department of Aetiology and Immunology Anhui Science and Technology University, Huainan 232001;

2. Department of Microbiology and Immunology Kunming Medical College, Kunming 650031, China)

[Abstract] Objective: To find a method of evaluating anti-Mycobacterium tuberculosis (TB) medicine using medicine containing serum and infected macrophage model and investigate its practicability and merits. Methods: By using the culture system constituting with serum containing isoniazid and infected macrophages, the numbers of the survival TB were confirmed through the clones of semiculture after these cells were cultured with serum containing isoniazid for several days, then the isoniazid's activity in this culture system was reflected and compared with the MIC. Results: The survival TB clones in the groups of low dose and high dose of isoniazid containing serum were remarkably fewer than those in the control ($P < 0.05 - P < 0.01$). Conclusions: The medicine's function of anti-Mycobacterium tuberculosis can be objectively evaluated by using medicine containing serum and infected macrophage model.

[Key words] anti-tubercular agents; models; biological; isoniazid; tubercle bacillus; containing medicine serum; macrophage

结核病是人类主要传染病之一。近年来耐药及多重耐药菌株 (multiple drugs resistant bacillus tuberculosis MDR-TB) 的出现, 对现有的抗结核药物提出了严峻挑战^[1]。研究开发新的有效抗结核药物成为当务之急。目前在抗结核药物研究中, 对药物抗菌活性的评价方法, 主要仍是依据传统的最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 测定方法及动物实验, 但这些方法在抗结核药物研究

和开发方面都存在不同的缺陷^[1]。1983年田代真一在中药研究中提出“含药血清学方法”, 目前在药物研究中得到较多应用^[2], 文献报道较多。20世纪80年代中期, 国外学者建立巨噬细胞感染模型用于评价抗结核药物的活性, 该方法目前在国内还鲜见报道。本研究中, 我们根据结核杆菌的胞内寄生特点, 结合上述两种研究方法的优点, 建立抗结核药物含药血清及巨噬细胞感染模型的评价方法, 并以已知抗结核药物异烟肼, 结合传统 MIC 方法, 探讨含药血清及巨噬细胞感染模型在抗结核药物活性评价中的应用。

1 材料与方法

1.1 实验菌株 标准菌株 H₃₇Rv 人型结核分枝杆菌购自云南省疾病预防控制中心, 在改良罗氏培养

[收稿日期] 2005-05-10

[作者单位] 1 安徽理工大学医学院 病原与免疫学教研室, 安徽淮南 232001; 2 昆明医学院 微生物暨免疫学教研室, 云南昆明 650031

[作者简介] 钱中清 (1975—), 男, 博士研究生 (该论文为硕士研究生时完成), 讲师, 研究方向: 抗微生物天然药物及免疫药理学研究。

[11] Ferlito A, Parridge M, Brennan J, et al. Lymph node micrometastases in head and neck cancer [J]. Acta Otolaryngol 2001; 121(6): 660-665.

[12] Maeda K, Chung YS, Ogawa Y, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma [J]. Cancer 1996; 77(5): 858-863.

[13] Tsujii M, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential [J]. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94(7): 3336-3340.

[14] 丁新民, 韩一平, 刘忠令, 等. 非小细胞性肺癌微血管密度和 B3 蛋白的检测及其临床意义 [J]. 第二军医大学学报, 2000; 21(9): 865-867.

基生长 2周后用于实验。

1.2 试验药物与试剂 异烟肼(山东新华制药厂产品,批号:2002023)。RPMI1640培养液(σ gma)。小牛血清(σ gma)。改良罗氏培养基(购自云南省疾病预防控制中心)。

1.3 动物 健康昆明种小鼠,体重 18~22 g(雌雄各半),购自中国医学科学院昆明生物研究所实验动物中心。

1.4 方法

1.4.1 实验分组及含药血清的制备^[3] 小鼠 48只,雌雄各半。随机分为 6组:低剂量异烟肼血清组、高剂量异烟肼血清组、含相等于 MIC均数浓度异烟肼组、高剂量异烟肼含药组、空白对照组及血清对照组,每组 8只。试验前 12 h禁食。用药组小鼠以成人临床用量 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的 20和 30倍给药。其中,低剂量异烟肼血清组为 $0.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,高剂量异烟肼血清组为 $0.15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,每只小鼠分别以 $0.2 \text{ ml}/10 \text{ g}$ 体重用量,一次灌胃给药。血清对照组则以等量生理盐水灌胃。灌胃 60 min后,无菌操作下摘眼球取血,2 000 r/min离心 10 min,分离血清,56℃、30 min灭活备用。含药组分别以 1640培养液配成上述各相应血清组的灌胃浓度备用,含相等于 MIC均数浓度异烟肼组以 1640培养液配成浓度为异烟肼 MIC值均数 0.11 mg/L ,用药方法同上。空白对照组培养液不加异烟肼或血清。

1.4.2 巨噬细胞感染模型的建立^[4] 取小鼠腹腔巨噬细胞,并以低温差速贴附法纯化后,以 1640培养液制成 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 细胞悬液,加入 24孔板,每孔 1 ml,置 37℃、5% CO_2 培养箱,每 3天更换一次培养液。培养 4天后以无抗生素含 $10^7/\text{ml}$ 结核杆菌的 1640培养液感染巨噬细胞,继续在上述条件下培养 4 h后,以无抗生素 1640培养液轻轻洗涤培养孔 3次,以去除细胞外细菌,金胺 O染色,荧光显微镜下观察巨噬细胞吞噬细菌情况。

1.4.3 含药血清及巨噬细胞感染模型的使用^[5,6]

将含 10%备用含药血清的 RPMI1640培养液及其它各组含药培养液各 1 ml加入上述感染巨噬细胞。低剂量、高剂量异烟肼血清和血清对照组每组 8只小鼠中,每只小鼠的血清对应加入 1孔感染巨噬细胞,每组 8孔。其它各组也设相应 8孔。继续在上述条件下培养 6天后,用含 0.1%皂素的无菌蒸馏水轻轻洗涤每孔,使细胞分离并破裂,溶解产物随之平铺于改良罗氏培养基,每孔细胞溶解产物对应一块培养基,每实验组 8块培养基,置 CO_2 培养箱中,停止供给 CO_2 ,并保持培养箱内湿度。培养 4周后观察记数每孔对应培养基上的细菌菌落数。

1.4.4 异烟肼 MIC试验 参见文献^[7]。

1.5 统计学方法 采用 Poisson分布资料的 χ^2 检验。

2 结果

2.1 MIC试验结果 异烟肼在 0.014 mg/L 浓度即出现明显的抑菌现象,其 MIC均数为 0.11 mg/L 。

2.2 含药血清及感染巨噬细胞模型评价结果 各异烟肼含药血清组菌落生成数均低于空白对照组 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$);低剂量、高剂量异烟肼血清组及空白溶液组菌落生成数亦均低于空白血清组 ($P < 0.01$),MIC药液组与 T组差异无显著性 ($P > 0.05$) (见表 1)。

表 1 不同实验组作用感染巨噬细胞后存活菌的菌落形成总数比较

分组	n	菌落	μ^a	P
低剂量血清组	8	46**	3.65	< 0.01
高剂量血清组	8	37**	4.56	< 0.01
MIC药液组	8	71*	1.35	> 0.05
高剂量药液组	8	45**	3.73	< 0.01
空白溶液组	8	96	0.59	> 0.05
空白血清组	8	88	—	—

Δ 均与空白血清组比较;与空白溶液组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

由于结核病耐药菌株的出现,结核病与 HIV感染的并发,结核病控制系统的减弱,以及移民的增长等因素,使得结核病在全球范围内再次卷土重来,以至 WHO于 1993年宣布“全球结核病紧急状态”。在我国,肺结核发病率更是继病毒性肝炎之后居第二位,死亡数继狂犬病后也居第二位,且居发病率明显上升病种的第五位。其中耐多药结核病(MDR-TB)是结核病中最为严重的一种,由于其对多种抗结核药物耐药,故治疗极为困难。加之该病传播快,病情发展迅速,病死率高达 37%,在合并 HIV感染者中,病死率高达 72%~89%。因此,采用有效的方法筛选、评价抗结核药物是十分重要的^[8]。

目前,在筛选和评价抗结核药物的体外抑菌试验中,主要还是采用传统的 MIC方法,此种方法存在两大弊端:(1)药物尤其是中药,在体内的代谢过程复杂。比如,药物在体内经代谢后结构改变,活性可能也随之丧失,细胞的转运机制可能影响其在细胞内的有效浓度,同时,药物在穿过胞膜时有可能遭受化学修饰,细胞内外 pH变化等都可能影响药

物的活性发挥。因此,受试药物和细菌直接作用的体外实验,即使可以证实药物在体外有抗菌活性,也不能证明其在体内具有同等的抗菌活性。(2)结核杆菌为胞内寄生菌,药物必须能进入细胞才能发挥作用,这是采用体外 MIC法所不能反映出来的。

本研究中建立的含药血清及巨噬细胞感染模型的药物活性评价方法,结合了近年国际上比较成熟的中药血清药理学方法及巨噬细胞感染模型,克服了传统 MIC方法的上述两大弊端。理论上,它既能通过实验药物的含药血清真实地反映药物在体内的实际药代情况,又能通过巨噬细胞感染模型反映药物对细胞内寄生菌和宿主细胞间的相互作用情况。

从本研究中得出的结果可以看出,同一批号的已知抗结核药物异烟肼,在用传统方法确定其 MIC后,我们以异烟肼人体临床用量的 20倍和 30倍剂量,给小鼠灌胃给药后采集的含药血清(低剂量血清组及高剂量血清组),均能使感染细胞中的细菌存活数,在含药血清和感染细胞共培养数天后显著低于对照组 ($P < 0.01$)。说明应用含药血清及巨噬细胞感染模型可以对异烟肼的抗结核活性作出较为敏感的反映和评价。同时通过该模型,还可以反映出许多通过 MIC值所无法得到的信息。例如,通过改变培养液中的含药量,或通过改变小鼠的灌胃药量而改变加入培养液中含药血清的含药量。这样在它们与感染细菌的巨噬细胞共培养过程中,动态观察细胞的形态,即可观察到不同浓度药物组及含药血清组对细胞形态和活力的影响。由此反映出药物的有效浓度与其对细胞的毒性作用间的相互关系,据此可以寻找杀菌效能最大而细胞毒性最小的药物浓度,为动物实验或体内实验提供参考。

由实验结果还可看到,以含异烟肼浓度为 MIC值均数的培养液(MIC药液组),直接与感染细胞共培养相同时间,其结果与其低剂量血清组进行比较,发现前者的细菌存活数明显高于后者 ($P < 0.01$),而细胞形态和活力却明显弱于后者。因而可以推测,在体内异烟肼经肝脏等代谢处理后,其血清有效成分浓度可能要远高于其在细胞内的浓度,且浓度至少在高于 MIC时,这些有效成分才能通过细胞膜

屏障,在细胞内富集达到有效的杀菌或抑菌浓度。同时,在经肝脏等代谢处理后,血清药物有效成分的细胞毒性也大大降低。在高剂量血清组同高剂量含药组的比较中这一点同样得到反映。

由此可见,含药血清与巨噬细胞感染模型组成的这种药物活性评价体系,具有体内实验的真实性和可靠性及体外实验的可控性和直观性。所以能够通过它反映出用传统 MIC试验所无法获得的实验药物的相关信息。理论上,由含药血清与感染细菌后的细胞构建的这种体外评价体系,在实际应用中可以广泛应用于针对诸多体内寄生菌或病毒的药物筛选和活性评价研究。又因为该模型是基于含药血清同感染细菌后的细胞及其中的细菌在体外的相互作用,既可以避开对传统中药进行复杂的分离纯化过程,又可以排除体内复杂代谢的干扰,先确定和筛选肯定的体内抗菌活性成分,再考虑以后的药物植化分析,从而可以避免许多盲目的无效成分的筛选试验,并能获得更为接近体内效应的结果。因此可见,该评价体系在抗细胞内寄生菌甚至抗病毒中药活性研究中具有一定的优点。

[参 考 文 献]

- [1] 钱中清,邓学端. 中药抗结核研究进展[J]. 昆明医学院学报, 2004, 25(1): 100-102
- [2] 张 良,徐 立,袁冬萍,等. 中药血清药理学方法的研究进展[J]. 南京中医药大学学报(自然科学版), 2002, 18(4): 254-256
- [3] 詹红生. 含药血清实验方法及其在中药新药研制中的应用展望[J]. 浙江中医学院学报, 2000, 24(2): 79-81
- [4] 谢建平,李 瑶,乐 军,等. 结核杆菌诱导人巨噬细胞肿瘤坏死因子受体相关信号传导元件的表达谱[J]. 中华传染病杂志, 2003, 21(4): 256-259
- [5] Skjinner P S, Fumei S J, Jacobs M R, et al. A bone marrow derived murine macrophage model for evaluating efficacy of antimycobacterial drugs under relevant physiological conditions [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1994, 38(11): 2557-2563
- [6] 韩 俭,于红娟,吴勇杰,等. 中药血清药理学方法学研究——抗菌试验含药血清处理方案的研究[J]. 中国药理学与临床, 2002, 18(1): 47-48
- [7] 徐叔云,卞如濂,陈 修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002, 1: 712-1713.
- [8] 何家荣主编. 实用结核病学[M]. 北京:科学技术文献出版社, 2000, 6

简 讯

在中国高等学校自然科学学报研究会开展的“高校科技期刊先进集体”及“高校科技期刊优秀主编(主任)”评选活动中,本学报荣获“高校科技期刊先进集体”称号,马启研究员荣获“高校科技期刊优秀主任”称号。