

人脐带间充质干细胞对耐亚胺培南铜绿假单胞菌生长的抑制作用

刘晓虹^{1,2} 杨浩鸣¹ 郑璇儿¹ 杨淑梅¹ 杨杰¹

【摘要】目的 探讨人脐带间充质干细胞(hUCMSCs)是否抑制耐亚胺培南铜绿假单胞菌(IRPA)的生长。**方法** 将IRPA菌液加入hUCMSCs细胞悬液中设为实验组,将IRPA菌液加入成纤维细胞细胞悬液中为对照组,共培育6 h后采用平板计数法对两组IRPA进行计数并比较;采用蛋白免疫印记技术和酶联免疫法检测两组共培育上清液中抗菌肽LL-37(Cathelicidin/LL-37)及人β防御素2(HBD-2)。**结果** 实验组中的细菌集落数(CFU)低于对照组,差异具有统计学意义[(2.63 ± 0.58) × 10⁶ CFU/ml vs. (3.69 ± 0.91) × 10⁶ CFU/ml, *t* = 19.93, *P* = 0.031]。实验组共培育液中抗菌肽LL-37和HBD-2浓度高于对照组,差异具有统计学意义[抗菌肽LL-37: (7.99 ± 0.45) ng/ml vs. (0.18 ± 0.04) ng/ml, *t* = 78.30, *P* = 0.007; HBD-2: (249.38 ± 14.19) pg/ml vs. (1.00 ± 0.58) pg/ml, *t* = 78.23, *P* = 0.009]。**结论** 人脐带间充质干细胞对耐亚胺培南铜绿假单胞菌生长起抑制作用,其可能通过分泌抗菌肽LL-37和HBD-2来实现。

【关键词】 人脐带间充质干细胞;耐亚胺培南铜绿假单胞菌;抗菌肽LL-37;人β防御素2

Inhibitory effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) against *Pseudomonas aeruginosa* Liu Xiaohong^{1,2}, Yang Haoming¹, Zheng Xuaner¹, Yang Shumei¹, Yang Jie¹. ¹Department of Neonatology, Guangdong Women and Children's Hospital, Guangzhou 510000, China; ²Department of Neonatology, Zhuhai People's Hospital, Zhuhai 519000, China

Corresponding author: Yang Jie, Email: Jieyang0830@163.com

【Abstract】 Objective To investigate inhibitory effect of the human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) on the growth of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (IRPA). **Methods** IRPA added into hUCMSCs were collected as the experimental group; while the IRPA co-cultured with fibroblast were taken as the control group. After 6 hours of co-cultivation, colony forming units (CFUs) of IRPA were counted in each group using plate counting method. Then the levels of Cathelicidin/LL-37 and human β-defensin 2 (HBD-2) in cultured medium were detected by Western-blot and ELISA. **Results** The CFUs of IRPA in experimental group were less than those in control groups, with significant differences (2.63 ± 0.58) × 10⁶ CFU/ml vs. (3.69 ± 0.91) × 10⁶ CFU/ml; *t* = 19.93, *P* < 0.05). Cathelicidin/LL-37 and hBD2 in experimental group were higher than those of experimental group [Cathelicidin/LL-37: (7.99 ± 0.45) ng/ml vs. (0.18 ± 0.04) ng/ml; *t* = 78.30, *P* = 0.007; HBD-2: (249.38 ± 14.19) pg/ml vs. (1.00 ± 0.58) pg/ml; *t* = 78.23, *P* = 0.009]. **Conclusions** hUCMSCs plays an inhibitory role on the growth of IRPA. The possible mechanism is that hUCMSCs could produce antimicrobial peptide: Cathelicidin/LL-37 and hBD2.

【Key words】 Human umbilical cord mesenchymal stem cells; Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; Cathelicidin/LL-37; Human β-defensin 2

铜绿假单胞菌为条件致病菌,是医院感染的主要病原菌之一^[1]。目前治疗铜绿假单胞菌感染最

有效的是碳青霉烯类抗菌药物。但耐碳青霉烯类抗菌药物中铜绿假单胞菌逐渐增加,给临床抗感染治疗造成极大难度^[2]。

人抗菌肽具有抗细菌、真菌及病毒方面的广谱效应,还具有招募炎症细胞及促进固有免疫反应和适应性免疫反应的作用^[3],人类的抗菌肽家

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2018.01.019

基金项目:广州市科学研究专项项目(No.2060404)

作者单位:510000广州市,广东省妇幼保健院新生儿科¹;519000珠海市,珠海市人民医院新生儿科²

通信作者:杨杰,Email:jasjie_yang@163.com

族包括两大类：防御素（defensin）^[4]和抗菌肽（Cathelicidin）^[5]。美国学者Krasnodembskaya等^[6]将骨髓间充质干细胞与细菌共培养，发现菌落的生长受到抑制，同时在培养基的上清液中检测到抗菌肽Cathelicidin/LL-37。人脐带间充质干细胞不仅保持了间充质干细胞的生物学特性，还具有采集方便、安全、伦理学争议少等优点^[7]。

本研究将人脐带间充质干细胞与耐亚胺培南铜绿假单胞菌共培养，以成纤维细胞作为对照组，比较培育后IRPA的菌落数目；采用蛋白免疫印记技术和酶联免疫法检测两组Cathelicidin/LL-37及人β防御素2（human β-defensin 2, HBD-2）共培育上清液中的浓度。通过体外实验证实人脐带间充质干细胞对耐亚胺培南铜绿假单胞菌生长具有抑制作用，从而探讨人脐带间充质干细胞在耐药菌感染中的抑制作用，现报道如下。

材料与方法

一、实验材料

1. 人脐带间充质干细胞悬液：人脐带间充质干细胞传代至第5代时，用0.25%胰酶（美国Gibco公司）消化，离心（1 000 r/min，离心半径 $r = 10$ cm），用无菌磷酸盐缓冲溶液清洗3次，再用0.5 ml细胞培养基[RPMI培养基（美国Hyclone公司）+ 5%胎牛血清（fetal bovine serum, FBS）（美国Gibco公司）]重悬细胞，计数细胞后调整细胞浓度至 $1 \times 10^6/\text{ml}$ ^[8]。

2. 耐亚胺培南铜绿假单胞菌悬液：本实验所用菌株由本院检验科提供，菌株为本院肺炎患者的痰液标本所分离，药敏试验结果提示对亚胺培南耐药。菌株低温保存，每次实验前进行复苏，转种，用无菌生理盐水配成0.5个麦氏单位浓度（ $0.5 \times 10^8/\text{ml}$ ）。

二、实验方法

1. 共培育：分别取0.5 ml上述制备的IRPA菌液，实验组中将IRPA菌液加入hUCMSCs细胞悬液中（1 ml，浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ ），对照组中将IRPA菌液加入成纤维细胞悬液中（1 ml，浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ ），充分混匀后将样本放置于37 °C、5% CO₂的培养箱孵育6 h，采用平板计数法^[9]进行菌落数计算。

2. 平板计数法计数菌落：经过6 h共培育后，混匀每份样本并从中取10 μl进行倍比稀释（分别

为1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64和1:128），分别从每个稀释度中取10 μl，涂布于自配的牛肉膏蛋白胨琼脂平板上（上海，哈灵生物有限公司），并做好标记。涂好后将平板倒置于37 °C细菌培养箱中培养48 h。选取菌落数为25~250个的平板，用放大镜观察，记录并计算该稀释度平板平均菌落数及每份样本的细菌浓度^[10]。

3. Cathelicidin/LL-37和HBD-2水平的测定：共培育后的两组标本的混悬液经过离心，细胞过滤器过滤，按照Cathelicidin/LL-37 ELISA试剂盒（荷兰Hycult Biotech公司）及HBD-2 ELISA试剂盒（美国Phoenixpeptided公司）说明书所载方法，分别对两组冻干标本进行Cathelicidin/LL-37和HBD-2的水平进行测定。

4. Cathelicidin/LL-37及HBD-2的蛋白表达检测：首先应用二辛可酸（bicinchoninic acid, BCA）法蛋白浓度定量试剂盒（百泰克公司）进行两组混悬液标本的初步定量，按甘氨酸十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（tricine sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Tricine-SDS-PAGE）方法进行配胶、上样、电泳^[11]。转膜至聚偏二氟乙烯（polyvinylidene fluoride, PVDF）膜（0.22 μm）；5%脱脂奶粉封闭2 h后，4 °C过夜孵育一抗（抗-人β防御素4/2：1 μg/ml）和抗-人内源性抗菌肽/LL-37/FALL39（0.1 μg/ml、美国R&D公司）及二抗（1:5000，博奥森公司），然后根据高灵敏化学发光检测试剂盒（康为世纪公司）进行发光，显影，定影及凝胶图像的分析。

三、统计学处理

采用SPSS 19.0软件进行统计学分析，实验组与对照组的IRPA菌落数目及两种抗菌肽Cathelicidin/LL-37和HBD-2的水平为计量资料且呈正态分布，以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间的比较采用成组设计资料的 t 检验，以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、人脐带间充质干细胞对铜绿假单胞菌生长的抑制

实验组中的耐亚胺培南铜绿假单胞菌的菌落数目（colony-forming unit, CFU）为（ 2.63 ± 0.58 ） $\times 10^6/\text{ml}$ ，低于对照组的耐亚胺培南铜绿假单

胞菌的菌落数目 $(3.69 \pm 0.9) \times 10^6/\text{ml}$, 差异具有统计学意义 ($t = 19.93$ 、 $P = 0.031$)。

二、两组Cathelicidin/LL-37和HBD-2水平

ELISA方法对两组共培育后的样本进行检测, 得到共培育后样本中的两种抗菌肽Cathelicidin/LL-37和HBD-2的水平, 实验组中Cathelicidin/LL-37水平为 $(7.99 \pm 0.45) \text{ ng/ml}$, 对照组为 $(0.18 \pm 0.04) \text{ ng/ml}$, 差异具有统计学意义 ($t = 78.3$ 、 $P = 0.007$); 实验组中HBD-2水平为 $(249.38 \pm 14.19) \text{ pg/ml}$, 对照组为 $(1.00 \pm 0.58) \text{ pg/ml}$, 差异具有统计学意义 ($t = 78.23$ 、 $P = 0.009$)。

三、共培育上清液的Cathelicidin/LL-37及HBD-2的蛋白表达

Cathelicidin/LL-37蛋白表达如图1示, 箭头1为对照组, 未见明显条带, 箭头2为实验组, 在4 500 Da处可见明显的条带, 提示实验组有Cathelicidin/LL-37蛋白表达, 而对照组无Cathelicidin/LL-37蛋白表达。本实验也对HBD-2进行了Western blot分析, 但未检测到HBD-2蛋白表达。

讨 论

感染性疾病是目前危害人类健康的主要疾病, 也是造成人类死亡的重要疾病之一, 而细菌是引起感染性疾病的主要病原体。目前对抗细菌最有效的方法就是应用抗菌药物, 抗菌药物是临床上治疗感染性疾病应用最广泛的药物^[12], 然而抗菌药物也是我国目前滥用最严重的一类药物^[13], 滥用抗菌药物最严重的危害即导致细菌产生耐药性突变^[14], 二重感染耐药菌株急剧增加, 难治性感染越来越多, 极端顽固的抗药菌种类不断涌现^[15]。近年来,

随着三代头孢菌素的广泛使用, 产超广谱 β -内酰胺酶菌的主要病原体如铜绿假单胞菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和耐万古霉素肠球菌均为临床治疗棘手的医院感染病原菌^[16]。有研究对某院2005年至2009年新生儿病房铜绿假单胞菌感染状况及耐药性进行了5年监测^[17], 结果表明铜绿假单胞菌的分离率逐年升高, 自2005年的1.19%增至2009年的5.16%; 对常用的13种抗菌药物耐药率均升高, 且呈现多重耐药。国外研究也发现^[18], 在新生儿病房发生的感染性疾病中, 革兰阴性菌占分离致病微生物的70.8%, 其中铜绿假单胞菌占11.3%, 且发现对碳青霉烯类耐药的铜绿假单胞菌株。有研究发现新生儿院内感染患儿的气道分泌物的培养结果中有44.1%为耐亚胺培南铜绿假单胞菌^[19]。耐药菌株逐年增加, 尤其是泛耐药菌株的出现, 必须找到除抗菌药物外的其他有效对抗细菌的方法。

抗菌肽是一类具有抗菌活性的碱性多肽物质, 其抗菌机理一般是通过作用于细菌的细胞膜蛋白引起凝聚、失活, 破坏细胞膜完整性并产生穿孔现象, 造成细胞内容物溢出胞外而死亡。人类抗菌肽有两大类家族: 人类防御素和Cathelicidin/LL-37。本研究旨在研究对抗细菌的新方法, 实验组是将人脐带间充质干细胞与铜绿假单胞菌共培育, 并设立对照组。结果发现与对照组相比, 实验组铜绿假单胞菌的生长受到了明显的抑制。分析可能是人脐带间充质干细胞可对IRPA的刺激产生某种抑制其生长的物质, 从而对IRPA的生长起到抑制作用。随后我们对共培育后的混悬液进行Cathelicidin/LL-37及HBD-2的检测, 结果发现实验组中的抗菌肽水平较对照组显著升高。此结果提示了人脐带间充质干细胞通过分泌抗菌肽对耐亚胺培南铜绿假单胞菌的生长起抑制作用。抗菌肽是生物体内经诱导产生的一种具有广谱抗菌活性的小分子多肽, Krasnodembkaya等^[6]通过实验证实了骨髓间充质干细胞在受到大肠埃希菌刺激后能分泌出Cathelicidin/LL-37, 并对其他细菌的生长起到明显的抑制作用。Byfield等^[20]研究发现抗菌肽LL-37能增加肺泡上皮细胞外基质的刚度, 从而减少跨膜渗透, 防止铜绿假单胞菌通过上皮细胞侵入。Suzuki等^[21]发现LL-37能抑制脂多糖诱导的内皮细胞凋亡, 从而减轻了致命的败血症/内毒素所导致的休克。Cirioni等^[22]通过建立中性粒细胞减少的铜绿假单胞菌败血症的小鼠模型, 发现使用LL-37能显著降低中性粒细胞凋亡的发生, 该研

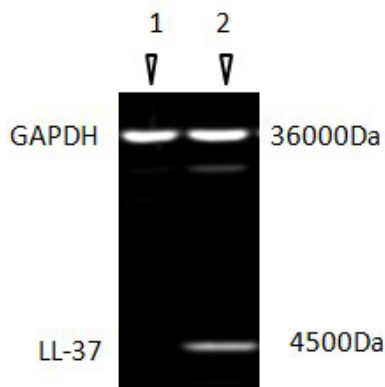


图1 Western-blot检测两组的LL-37的蛋白表达

究认为LL-37是一种很有前途的治疗严重铜绿假单胞菌感染的方法;本研究结果与上述结果相一致。但胎盘和脐带来源的间充质干细胞与骨髓间充质干细胞相比,具有分化潜力大、增殖能力强、免疫原性低、取材方便、无道德伦理问题的限制、易于工业化制备等特征,有可能成为最具临床应用前景的多能干细胞^[23]。

随着耐药菌株的不断增加,尤其是出现泛耐药菌株,有必要研究其他的抗感染措施。本实验探讨人脐带间充质干细胞的抗菌作用,具有一定的价值。人脐带间充质干细胞应用于临床的抗感染治疗研究在不断进行,如近期有报道人脐带间充质干细胞能通过分泌LL-37,从而有助于环丙沙星对金黄色葡萄球菌的抑菌作用^[24];也有报道称人脐带间充质干细胞通过分泌HBD-2对大肠埃希菌具有抑菌作用^[25],人脐带间充质在临床中的应用很多,前景也很广阔^[26],但人间充质干细胞应用在临床中仍会面对很多问题,例如人脐带间充质干细胞的分离、保存等也需要耗费大量经费,人脐带间充质干细胞可否应用于个体的抗感染治疗,是否存在排异反应和异种蛋白的过敏反应等,尚待深入研究。

参 考 文 献

- [1] Maoulainine FM, Elidrissi NS, Chkil G. Epidemiology of nosocomial bacterial infection in a neonatal intensive care unit in Morocco[J]. Arch Pediatr,2014,21(9):938-943.
- [2] 黄瑞玉,穆小萍,张德纯,等.新生儿病房铜绿假单胞菌感染状况及耐药性的5年监测[J].中国微生态学杂志,2010,22(5):43-45.
- [3] Bandurska K, Berdowska A, Barczyńska-Felusiak R. Unique features of human cathelicidin LL-37[J]. Biofactors,2015,41(5):289-300.
- [4] Zhao L, Lu W. Defensins in innate immunity[J]. Curr Opin Hematol,2014,21(1):37-42.
- [5] Teclé T. Defensins and cathelicidins in lung immunity[J]. Innate Immun,2010,16(3):151-159.
- [6] Krasnodembskaya A, Song Y, Fang X, et al. Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37[J]. Stem Cells,2010,28(12):2229-2238.
- [7] Ishige I, Nagamura-Inoue T, Honda MJ, et al. Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord[J]. Int J Hematol,2009,90(2):261-269.
- [8] 谷鸿喜主编.细胞培养技术[M].北京:北京大学医学出版社,2012:37-92.
- [9] Clais S, Boulet G, Van Kerckhoven M, et al. Comparison of viable plate count, turbidity measurement and real-time PCR for quantification of *Porphyrromonas gingivalis*[J]. Lett Appl Microbiol,2015,60(1):79-84.
- [10] 管远志主编.医学微生物学实验技术[M].北京:化学工业出版社,2006:84.
- [11] 曹佐武.有效分离1 kDa小肽的Tricine-SDS-PAGE方法[J].中国生物工程杂志,2004,(1):74-76.
- [12] Wang Z, Zhang H, Han J. Deadly sins of antibiotic abuse in China[J]. Infect Control Hosp Epidemiol,2017,38(6):758-759.
- [13] Cars O. Securing access to effective antibiotics for current and future generations. Whose responsibility?[J]. Ups J Med Sci,2014,119(2):209-214.
- [14] Sundqvist M. Reversibility of antibiotic resistance[J]. Ups J Med Sci,2014,119(2):142-148.
- [15] Ghodhbane H, Elaidi S, Sabatier JM, et al. Bacteriocins active against multi-resistant Gram negative bacteria implicated in nosocomial infections[J]. Infect Disord Drug Targets,2015,15(1):2-12.
- [16] Vaez H, Moghim S, Nasr Esfahani B, et al. Clonal relatedness among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from ICU-hospitalized patients[J]. Crit Care Res Pract,2015,2015:983207.
- [17] 黄瑞玉,穆小萍,张德纯,杨杰,等.新生儿病房铜绿假单胞菌感染状况及耐药性的5年监测[J].中国微生态学杂志,2010,22(5):466-468.
- [18] Bas AY, Demirel N, Zenciroglu A, et al. Nosocomial blood stream infections in a neonatal intensive care unit in Ankara, Turkey[J]. Turk J Pediatr,2010,52(5):464-470.
- [19] Onguru P, Erbay A, Bodur H, et al. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors for nosocomial infections[J]. J Korean Med Sci,2008,23(6):982-987.
- [20] Byfield FJ, Kowalski M, Cruz K, et al. Cathelicidin LL-37 increases lung epithelial cell stiffness, decreases transepithelial permeability, and prevents epithelial invasion by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. J Immunol,2011,187(12):6402-6409.
- [21] Suzuki K, Murakami T, Kuwahara-Arai K, et al. Human antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 suppresses the LPS-induced apoptosis of endothelial cells[J]. Int Immunol,2011,23(3):185-193.
- [22] Cirioni O, Ghiselli R, Tomasinsig L, et al. Efficacy of LL-37 and granulocyte colony-stimulating factor in a neutropenic murine sepsis due to *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Shock,2008,30(4):443-448.
- [23] 韩忠朝.脐带间充质干细胞的生物学特性及其临床应用前景[C]//第三届“全国再生医学(干细胞与组织工程)学术研讨会”第二届“血管外科与组织工程专题研讨会”论文集,2007:115-118.
- [24] 周彪,屠华雷,巴特,等.人脐带间充质干细胞培养上清液与环丙沙星体外联合应用对金黄色葡萄球菌的作用[J].中华烧伤杂志,2017,33(6):355-360.
- [25] Sung DK, Chang YS, Sung SI. Antibacterial effect of mesenchymal stem cells against *Escherichia coli* is mediated by secretion of beta-defensin-2 via toll-like receptor 4 signalling[J]. Cell Microbiol,2016,18(3):424-436.
- [26] Miura Y. Basics and clinical application of human mesenchymal stromal/stem cells[J]. Rinsho Ketsueki,2015,56(10):2195-2204.

(收稿日期:2017-02-27)

(本文编辑:孙荣华)

刘晓虹,杨浩鸣,郑璇儿,等.人脐带间充质干细胞对耐亚胺培南铜绿假单胞菌生长的抑制作用[J/CD].中华实验和临床感染病杂志(电子版),2018,12(1):94-97.