

肺炎链球菌感染早期IFN- β 通过调节巨噬细胞炎症反应保护宿主

曹思佳¹ 窦霄云² 卢畅¹ 马晨语¹ 刘宇思³ 廖洪一¹ 王虹^{1*}

(¹重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016; ²重庆医科大学生命科学研究院, 重庆 400016; ³中国医科大学附属第一医院检验科, 沈阳 110001)

摘要 该文旨在探讨干扰素- β (interferon- β , IFN- β)在肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, *S. pn*)感染早期对宿主炎症免疫的影响。使用外源重组IFN- β 蛋白(recombinant IFN- β , rIFN- β)预处理WT小鼠及其腹腔渗出巨噬细胞(peritoneal exudate macrophages, PEMs), 以培养基处理组作为对照。同时应用内源干扰素 α/β 受体(interferon α/β receptor, IFNAR)缺陷的小鼠以及PEMs, 以WT组为对照。各组分别暴露于D39菌株后, 通过RT-PCR和ELISA检测白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的表达水平, 并通过小鼠肺切片HE染色和肺干/湿重比评估其肺部炎症浸润和组织损伤, 以分析IFN- β 对宿主炎症反应的影响; 为分析细菌清除率, 对小鼠巨噬细胞系RAW264.7行吞噬实验、计数小鼠肺部细菌载量, 最后通过小鼠生存率分析确认IFN- β 对宿主抵抗*S. pn*的影响。结果表明, IFN- β 抑制D39诱导的IL-1 β 和TNF- α 的过度表达。与NC组比, rIFN- β 预处理提高RAW264.7细胞对*S. pn*的吞噬能力($P < 0.001$), 降低感染小鼠的肺部细菌负荷($P < 0.01$)和肺损伤评分($P < 0.05$)。而IFNAR^{-/-}感染小鼠肺部菌载量相较于WT小鼠显著升高($P < 0.001$), 持续更高水平的局部炎症反应导致其肺组织损伤加重且在9天内死亡率明显增加($P < 0.05$)。但各组小鼠体质量、肺干/湿重比和脾指数值差异无显著性($P > 0.05$)。可见, 在*S. pn*感染早期, IFN- β 通过调节巨噬细胞中促炎细胞因子的表达而维持适度的局部炎症反应, 有助于宿主清除细菌, 防止局部感染进展为致死性感染。

关键词 肺炎链球菌; 干扰素- β ; 炎症; 固有免疫

Interferon- β Protects Hosts through Modulating the Inflammatory Responses of Macrophages in the Early Stage of *Streptococcus pneumoniae* Infection

CAO Sijia¹, DOU Xiaoyun², LU Chang¹, MA Chenyu¹, LIU Yusi³, LIAO Hongyi¹, WANG Hong^{1*}

(¹Key Laboratory of Diagnostic Medicine Designated by the Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; ²Institute of Life Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

³Department of Laboratory Medicines, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract This study aimed to investigate the effect of IFN- β (interferon- β) on host inflammatory responses in the early stage of *S. pn* (*Streptococcus pneumoniae*) infection. WT (wild type) mice and their PEMs (peritoneal exudate macrophages) were pretreated with exogenous rIFN- β (recombinant IFN- β), and culture medium-treated

收稿日期: 2020-10-23 接受日期: 2020-12-15

国家自然科学基金(批准号: 31700804)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485388, E-mail: wanghongljf@cqmu.edu.cn

Received: October 23, 2020 Accepted: December 15, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31700804)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485388, E-mail: wanghongljf@cqmu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5457>

groups serve as controls. Meanwhile, endogenous IFNAR (interferon α/β receptor) deficient mice and PEMs were used, with WT counterparts as control groups. All the groups were exposed to strain D39, RT-PCR and ELISA were then used to measure the expression of IL-1 β (interleukin-1 β) and TNF- α (tumor necrosis factor- α). The pulmonary inflammatory infiltration and tissue injury were evaluated by HE-staining as well as dry/wet weight ratio in order to analyze the effect of IFN- β on host proinflammatory responses. To determine the bacterial clearance rate, phagocytosis analysis of RAW264.7 cells was carried out, and the bacterial load in lungs of infected mice was counted. Finally, the role of IFN- β on host resistance to *S. pn* was confirmed by survival rate analysis of mice. The results suggested that IFN- β inhibited the overexpression of IL-1 β and TNF- α induced by D39. Compared with the NC (negative control) groups, rIFN- β pretreatment increased the phagocytosis of *S. pn* by RAW264.7 cells ($P<0.001$) and reduced the bacterial burden in lungs ($P<0.01$) and lung injury score of infected mice ($P<0.05$). Consistently, the bacterial load in lungs of IFNAR^{-/-} mice was significantly higher than that of WT mice ($P<0.001$). Persistent higher level of local inflammation caused aggravated lung tissue damage of IFNAR^{-/-} mice and enhanced mortality within nine days ($P<0.05$). However, there were no significant differences in body weight, lung dry/wet weight ratio or spleen index among the groups. Overall, IFN- β could maintain moderate local inflammatory responses by regulating the expression of proinflammatory cytokines in macrophages in the early stage of *S. pn* infection, which helped the host to clear bacteria, preventing local infection from developing into lethal infection.

Keywords *Streptococcus pneumoniae*; interferon- β ; inflammation; innate immunity

据世界卫生组织(WHO)报道,肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, *S. pn*)是导致全球致命性传染病的第四大微生物病原体^[1]。它是一种革兰氏阳性的机会致病菌,可在人类上呼吸道黏膜表面无症状定植。*S. pn*突破鼻黏膜上皮侵入肺、脑膜、中耳腔、血液,在免疫力低下人群如儿童和老年人中引起肺炎、脑膜炎、中耳炎和败血症^[2]。

宿主对*S. pn*的免疫应答主要通过炎症反应介导。在*S. pn*脑膜炎模型中,小鼠脑匀浆中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)表达上调,蛛网膜下腔表现出炎性渗出物和单核细胞浸润增多^[3]。*S. pn*感染晚期,小鼠中耳灌洗液中TNF- α 、IL-1 β 等促炎细胞因子水平和炎症细胞量升高^[4]。众所周知,炎症是一把双刃剑。维持适当程度的炎症反应是宿主清除病原体所必需的,这涉及到复杂的免疫调节机制,而失调炎症反应将导致机体损伤甚至死亡。因此,要进一步了解和控制*S. pn*的定植、侵袭,则需要阐明该过程中宿主炎症反应的调节机制。

I型干扰素(type I interferon, IFN-I)家族包括干扰素 α/β 和其他亚型,其共同受体为干扰素 α/β 受体(interferon α/β receptor, IFNAR)^[5]。IFN-I最初被认为是抗病毒免疫中关键的调节因子,近年来,它在各种细菌感染过程中发挥的矛盾作用逐渐被阐明。结核分枝杆

菌诱导巨噬细胞和树突状细胞分泌IFN- α/β ,而IFN-I系统损害小鼠对结核分枝杆菌的免疫防御^[6-8]。此外,IFN-I协同伤寒沙门氏菌抑制小鼠固有免疫反应,促进伤寒沙门氏菌经口向远端无菌部位传播^[9]。而在发生铜绿假单胞菌或肺炎克雷伯菌感染时,IFN-I促进感染小鼠肺部细菌的清除^[10-11]。

IFN-I也被报道介导*S. pn*感染引起的免疫应答,但其发挥的作用仍不清楚。我们最近报道了*S. pn*分泌的过氧化氢和溶血素(pneumolysin, Ply)导致宿主细胞线粒体损伤,使线粒体DNA释放到细胞质,从而上调IFN-I的表达^[12-13]。几份调查流感病毒合并*S. pn*感染的研究显示,流感病毒诱导的IFN-I使宿主对*S. pn*易感^[14-15],但其他人认为,IFN-I信号缺失会加重宿主感染*S. pn*后的细菌负荷,加剧有害炎症和组织损伤^[16-17]。因此,IFN-I如何影响宿主对*S. pn*的免疫应答亟待全面的阐述。

本研究旨在前期研究的基础上,以体外感染*S. pn*的巨噬细胞为实验对象,结合小鼠肺炎模型进一步探讨IFN- β 可能对宿主抗*S. pn*感染免疫产生的影响,并为*S. pn*诱导的炎症反应提供新的见解。

1 材料和方法

1.1 实验材料

*S. pn*标准株 NCTC 7466(D39, 血清型 2)购自

国际标准菌种保藏中心; RAW264.7细胞购自中国科学院上海细胞库; 胎牛血清和青霉素-链霉素溶液购自HyClone公司; ELISA试剂盒购自Biolegend公司; RNAiso plus试剂、逆转录试剂盒和SYBR Green PCR Master试剂盒购自TaKaRa公司; PCR引物由Sangon公司合成; 鼠源重组IFN- β (recombinant IFN- β , rIFN- β)蛋白购自Sino Biological公司; 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染液购自Sigma公司。

1.2 细菌培养及菌载量计数

将保存于-80 °C冰箱的D39菌株接种在哥伦比亚血平板上, 并置于37 °C和5% CO₂培养箱中复苏, 随后在C+Y培养基中增菌培养至D₆₀₀=0.5。为计数菌载量, 将小鼠肺组织研磨均匀, 用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)进行梯度稀释后铺于血平板上, 在37 °C和5% CO₂培养箱中继续培养24 h后计数菌落。

1.3 小鼠原代腹腔巨噬细胞(peritoneal exudate macrophages, PEMs)的分离与细胞培养

PEMs的分离参考ZHANG等^[18]的方法。细胞培养在含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素溶液的DMEM培养基中, 置于37 °C和5% CO₂培养箱中。

1.4 动物实验

所有动物实验均在C57BL/6J背景上进行, 且经重庆医科大学伦理委员会批准。6~8周龄野生型和IFNAR^{-/-} C57BL/6J雌性小鼠购自重庆医科大学实验动物中心, 并在无特定病原体条件下饲养。经腹腔注射100 μ L 1.5%的戊巴比妥将小鼠麻醉后, 将30 μ L含1 \times 10⁸集落形成单位(colony forming unit, CFU) D39的菌液滴入其鼻腔, 以等体积的PBS缓冲液滴鼻作为对照。测量小鼠体质量及其脾脏质量, 以脾脏质量除以对应的体质量即得脾指数。分离小鼠肺组织, 称量得到其湿重值, 再将肺组织置于80 °C烘箱中干燥24 h后, 称量得到其干重值, 相除即得小鼠肺

干/湿重比值。

1.5 吞噬实验

为检测巨噬细胞的吞噬能力, 将RAW264.7细胞与rIFN- β 共培育过夜后感染*S. pn*(MOI=100), 感染30 min后用PBS洗涤细胞三次。细胞随后在含有庆大霉素(200 μ g/mL)的培养基中再培养30 min, 以杀死细胞外细菌。接着将细胞在100 μ L去离子水中培养15 min以充分裂解细胞, 将细胞裂解液经过梯度稀释后接种在哥伦比亚血平板上, 在37 °C和5% CO₂孵箱中孵育24 h, 计数CFU。

1.6 ELISA检测炎症因子表达水平

在无菌的匀浆器中加入1 mL预冷的PBS, 充分研磨小鼠脾脏和肺组织。将所得肺匀浆、脾匀浆和小鼠心尖部血液在4 °C下以800 \times g离心10 min, 收集上清。根据试剂盒说明书, 使用ELISA试剂盒测定IL-1 β 和TNF- α 的蛋白水平。

1.7 RT-PCR检测炎症因子转录水平

使用RNAiso plus试剂提取PEMs总RNA, 并使用逆转录试剂盒将其反转录成cDNA。利用SYBR Green II实时荧光定量系统, 以cDNA为模板进行扩增。PCR引物序列见表1。

1.8 组织病理学分析

小鼠肺组织用4%多聚甲醛在4 °C下浸泡24 h以进行固定, 在经过乙醇脱水、透明和石蜡包埋后, 用切片将其切割为6 μ m的组织切片。随后对组织切片进行HE染色, 并在光学显微镜下观察肺部组织病理学改变。参考DUAN等^[19]描述的规则, 对小鼠肺部损伤程度进行评分: 正常, 0分; 少数炎症细胞浸润, 1分; 一圈单层炎症细胞, 2分; 2~4层炎症细胞, 3分; 5~6层炎症细胞, 4分; 大于6层炎症细胞, 5分。

1.9 统计分析

所有实验至少进行三次以确保重复性, 数据以平均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。统计分析采用GraphPad Prism 6软件对两组间进行非配对*t*检验。*P*<0.05被认为差异具有统计学意义。

表1 RT-PCR引物序列

Table 1 Primer sequences for RT-PCR

基因	正向序列(5'→3')	反向序列(5'→3')
Gene	Forward sequence (5'→3')	Reverse sequence (5'→3')
<i>Gapdh</i>	CGG AGT CAA CGG ATT TGG TC	GAC AAG CTT CCC GTT CTC AG
<i>IL-1β</i>	GAG CAC CTT CTT TTC CTT CAT CTT	TCA CAC ACC AGC AGG TTA TCA TC
<i>TNF-α</i>	GCT AAG AGG GAG AGA AGC AAC TAC A	GAA GAG GCT GAG GAA CAA GCA

2 结果

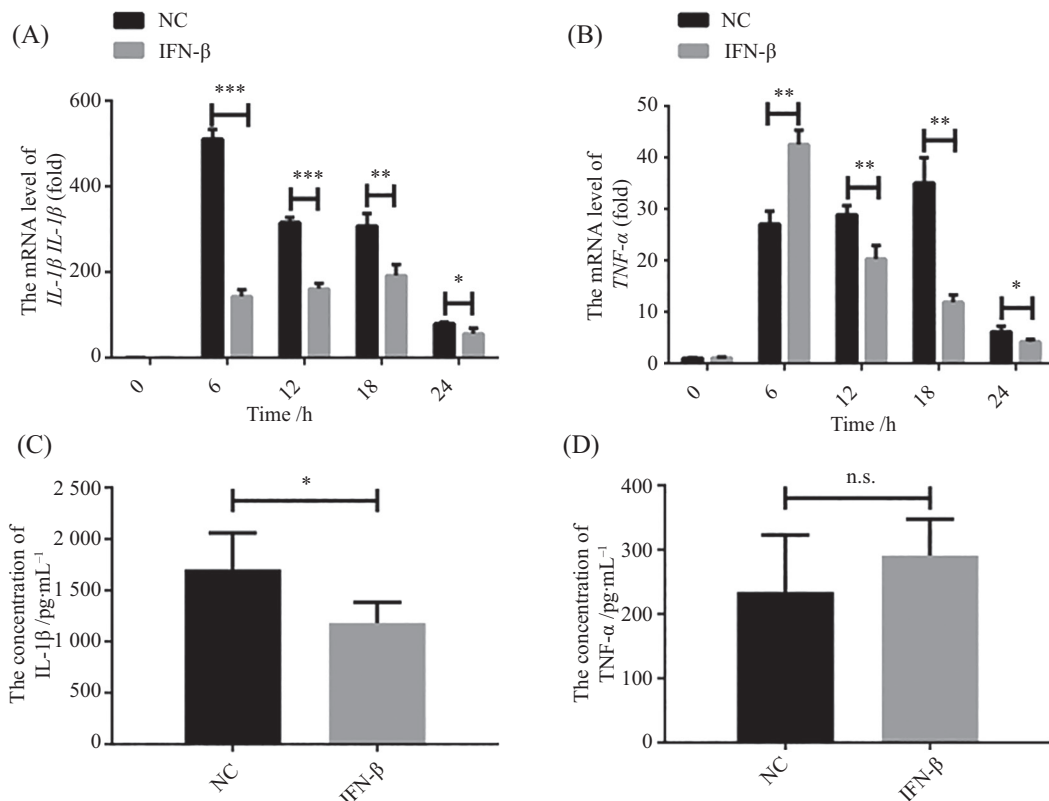
2.1 rIFN-β预处理抑制*S. pn*感染引起的过度促炎反应

为了解IFN-β在*S. pn*诱导的炎症反应中的作用,我们首先检测了rIFN-β对体外感染的巨噬细胞IL-1β和TNF-α表达的影响。D39菌株感染诱导PEMs中IL-1β和TNF-α的表达显著升高,引起细胞炎症应答反应。然而经过rIFN-β预处理的PEMs中IL-1β和TNF-α的升高水平显著低于NC组PEMs(图1A和图1B, $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$)。进一步对小鼠预先注射rIFN-β后滴鼻感染D39菌株,ELISA分析小鼠肺匀浆中IL-1β和TNF-α蛋白含量,得到了类似的结果。rIFN-β预处理显著抑制感染诱导的IL-1β的表达(图1C, $P<0.05$),但两组间TNF-α的浓度无显著差异(图1D, $P>0.05$)。此前GUARDA等^[20]和AGGARWAL等^[21]

分别报道,IFN-β预处理通过抑制LPS诱导的IL-1β的产生和下调细胞中TNF-α受体的表达而抑制促炎反应,这进一步支持了我们的结论。可见,IFN-β抑制D39菌株感染后由IL-1β和TNF-α介导的过度促炎反应。

2.2 rIFN-β处理有助于宿主清除*S. pn*

感染性炎症中常并发急性肺损伤,因此我们接着分析rIFN-β是否能够通过抑制促炎反应减轻宿主组织损伤,发现小鼠肺组织切片的HE染色结果(图2A)与其促炎细胞因子水平(图1)呈现出良好的相关性。感染D39菌株48 h后,WT小鼠肺部损伤严重,而经过rIFN-β预给药的小鼠与之相比,肺部出血水肿程度较轻、炎性细胞浸润减少,且炎症评分显著降低(图2B, $P<0.05$),但组间肺干/湿重比值不具统计学差异(图2E, $P>0.05$),此外脾指数值无显著性差异(图



A、B: 用1 mL rIFN-β(400 U/mL)预处理PEMs过夜,然后感染D39菌株(MOI=100)达指定时间,RT-PCR测定细胞中IL-1β和TNF-α mRNA水平;C、D: 每日经小鼠腹腔注射4 000 U rIFN-β,持续一周,以无菌双蒸蒸馏水为阴性对照。随后两组小鼠滴鼻感染D39菌株(1×10^8 CFU),48 h后处死小鼠,取肺组织。ELISA法检测肺匀浆中IL-1β、TNF-α的浓度($n=3\sim 5$)。n.s.: $P>0.05$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。

A,B: PEMs were pretreated with 1 mL rIFN-β (400 U/mL) overnight prior to infection with strain D39 (MOI=100) for the indicated times. The mRNA levels of IL-1β and TNF-α in PEMs were quantified by RT-PCR; C,D: mice were intraperitoneally injected with 4 000 U rIFN-β each day or sterile double distilled water as negative control for a week, followed by intranasally exposure to strain D39 (1×10^8 CFU). And then they were sacrificed and lung tissues were removed at 48 h post-infection. Concentrations of cytokines including IL-1β and TNF-α in lung homogenates were detected by ELISA ($n=3\sim 5$). n.s.: $P>0.05$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$.

图1 rIFN-β抑制*S. pn*感染诱导的促炎细胞因子的过度分泌

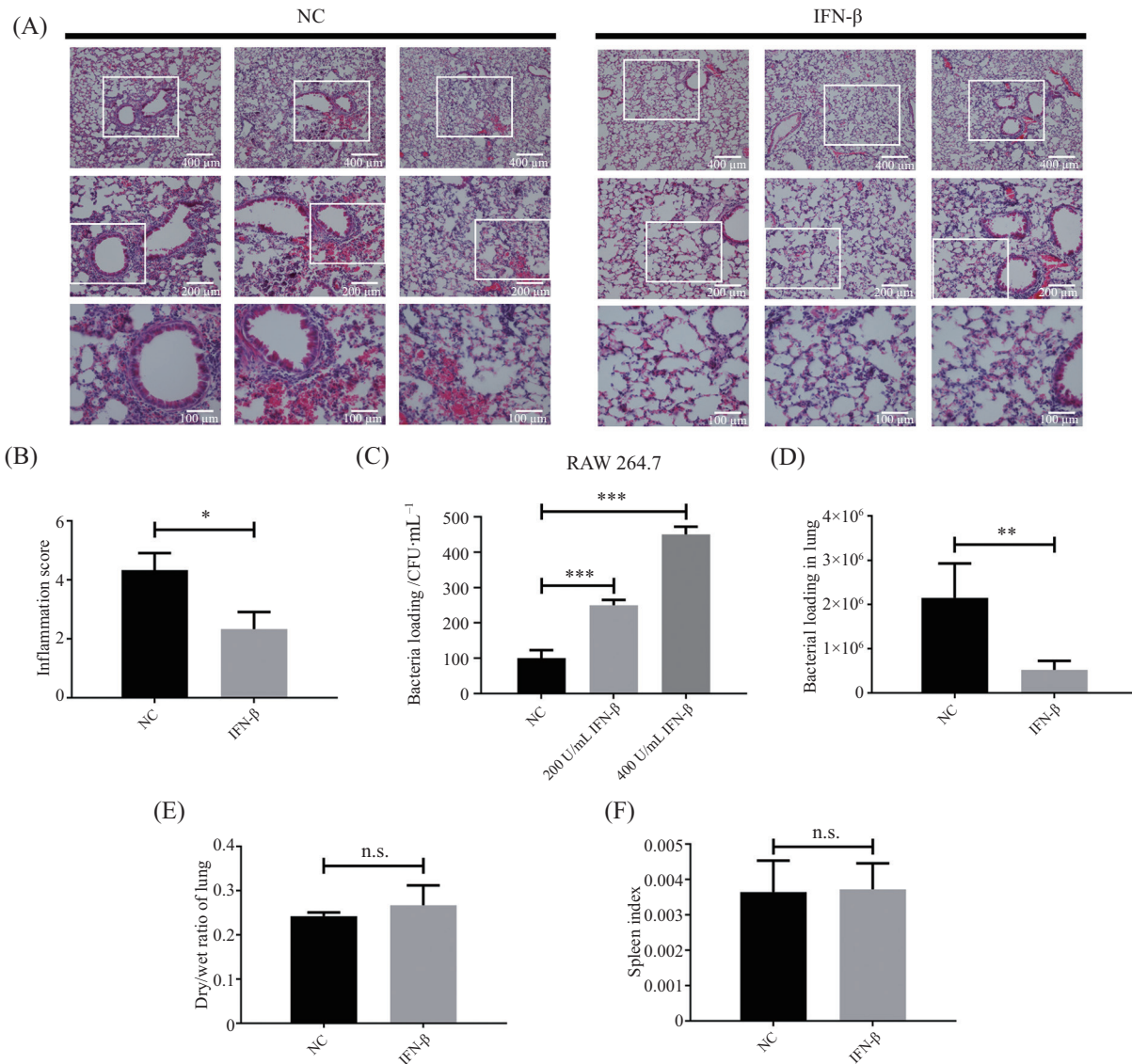
Fig.1 The overproduction of pro-inflammatory cytokines induced by *S. pn* infection is suppressed by rIFN-β

2F, $P>0.05$)。我们进一步研究rIFN- β 对宿主限制*S. pn*感染的作用,如图2C所示, rIFN- β 预处理以浓度依赖性方式提高了RAW264.7细胞对D39细菌的吞噬能力($P<0.001$)。对小鼠肺部菌载量的分析印证了吞噬实验的结果,经过rIFN- β 预处理,小鼠肺部*S. pn*的清除被极大地促进,其肺部细菌负荷仅为NC组的20%(图2D, $P<0.01$)。综上所述,IFN- β 限制*S. pn*

感染导致的炎症反应以及肺损伤,提高宿主对细菌的清除率。

2.3 IFNAR缺陷导致*S. pn*诱导的IL-1 β 和TNF- α 表达异常升高

由于IFN- β 通过与IFNAR结合发挥作用,所以IFNAR^{-/-} PEMS和IFNAR^{-/-}小鼠被用于探究IFN-I信号缺失对*S. pn*诱导的炎症反应的影响。如图3A和



A、B、D、E、F: 每日经小鼠腹腔注射rIFN- β (4 000 U),持续一周,以无菌双蒸馏水为阴性对照。D39菌株(1×10^8 CFU)感染两组小鼠48 h后,光镜下观察肺组织切片病理形态学、对肺损伤程度进行半定量评分。 $n=3\sim 5$ 。测定肺部细菌载量、肺干/湿比和脾指数。C: RAW264.7细胞分别以200 U或400 U rIFN- β 处理过夜,随后感染D39菌株(MOI=100),30 min后裂解细胞进行吞噬实验。n.s.: $P>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A,B,D,E,F: WT mice were injected with rIFN- β (4 000 U/day) or sterile double distilled water intraperitoneally each day for a week and were then infected with strain D39 (1×10^8 CFU) for 48 h. Lung pathological morphology was examined under light microscopy, and the degrees of pulmonary inflammation were semi-quantitatively graded. The bacterial number in lung, the dry/wet ratio of lung and the spleen index were measured ($n=3\sim 5$). C: RAW264.7 cells were pretreated with 200 U or 400 U rIFN- β overnight followed by challenge with strain D39 (MOI=100) for 30 min. Cells were then lysed for the bacterial phagocytosis analysis. n.s.: $P>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图2 rIFN- β 预处理提高宿主对*S. pn*的清除率

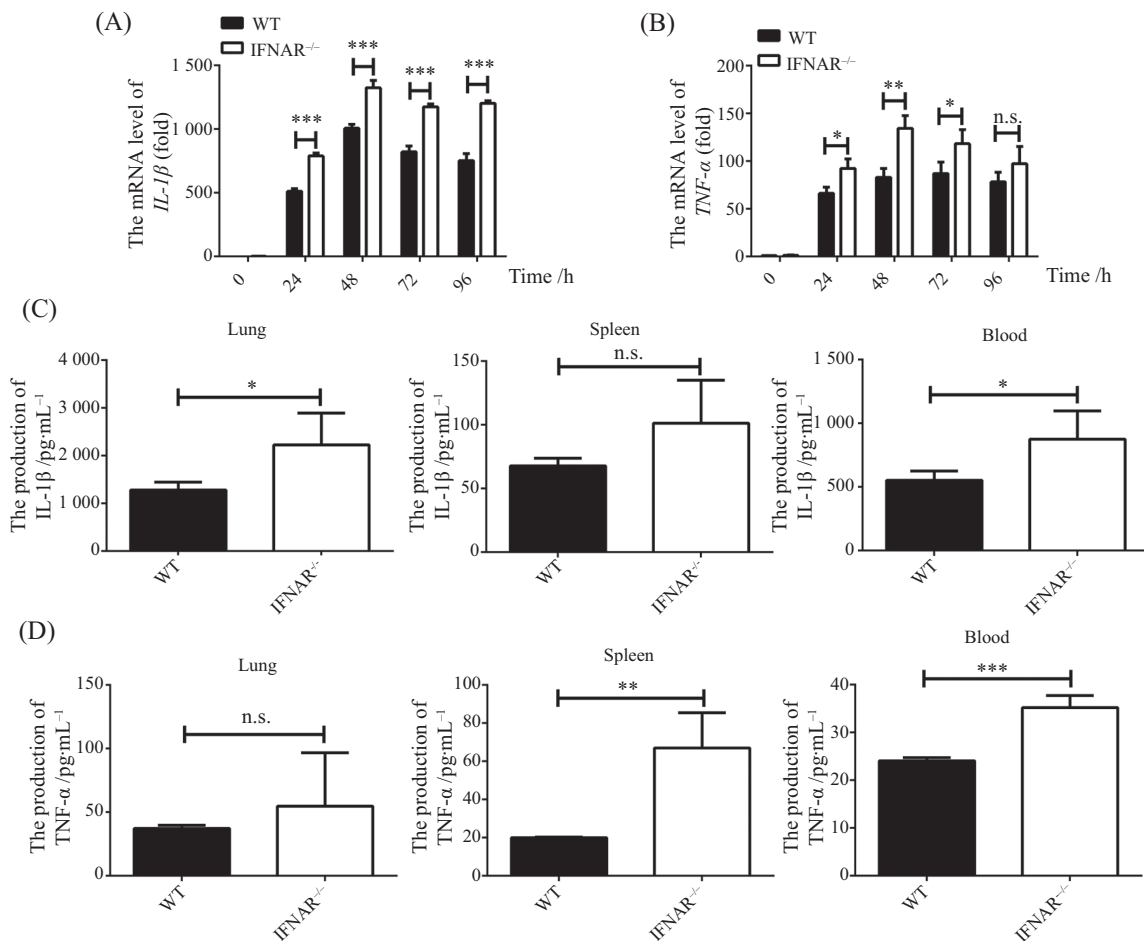
Fig.2 rIFN- β pretreatment helps to improve the *S. pn* clearance rate of hosts

图3B所示,与WT PEMs相比,感染D39菌株24 h后IFNAR^{-/-} PEMs中*IL-1β*、*TNF-α* mRNA丰度异常升高($P<0.05$, $P<0.001$),且96 h后仍维持在较高水平,而此时在WT PEMs中两者表达水平开始降低。这与之前的结果一致(图1A和图1B),表明IFN-β缺陷导致*S. pn*诱导的PEMs促炎反应异常增强。进一步检测WT和IFNAR^{-/-}小鼠感染后体内IL-1β和TNF-α的蛋白浓度,发现IL-1β在IFNAR^{-/-}组小鼠肺和血液中的表达水平显著高于WT组(图3C, $P<0.05$),其在IFNAR^{-/-}小鼠脾匀浆中的表达也呈升高趋势(图3C, $P>0.05$)。此外, TNF-α在IFNAR^{-/-}组小鼠血液、脾脏和肺匀浆中的表达也相较于WT组升高(图3D, $P<0.01$, $P<0.001$, $P>0.05$)。可见, IFNAR缺陷导致*S. pn*诱导的宿主促炎反应异常增强,可引发后续炎症

级联反应。

2.4 IFNAR敲除的小鼠感染后死亡率增加

我们进一步探讨内源IFN-I信号缺失导致的异常促炎反应对小鼠疾病转归的影响。连续监测WT和IFNAR^{-/-}小鼠感染D39菌株9天内的体质量和生存率,发现组间体质量没有明显差异(图4A, $P>0.05$)。但值得注意的是, IFNAR^{-/-}组小鼠存活率显著降低,感染5天后,有50%的IFNAR^{-/-}小鼠死于感染,而80%的WT小鼠存活(图4B, $P<0.05$)。这与LEMESSURIER等^[17]的结论一致,他们发现使用rIFN-β预处理*S. pn*感染小鼠将使其生存率提高。但LEMESSURIER同时表示IFN-I并不影响宿主肺部*S. pn*的清除率,因为在感染后的24 h至48 h,他们并未检测到WT组和IFNAR^{-/-}组小鼠之间肺部菌载量存在显著差异,这与

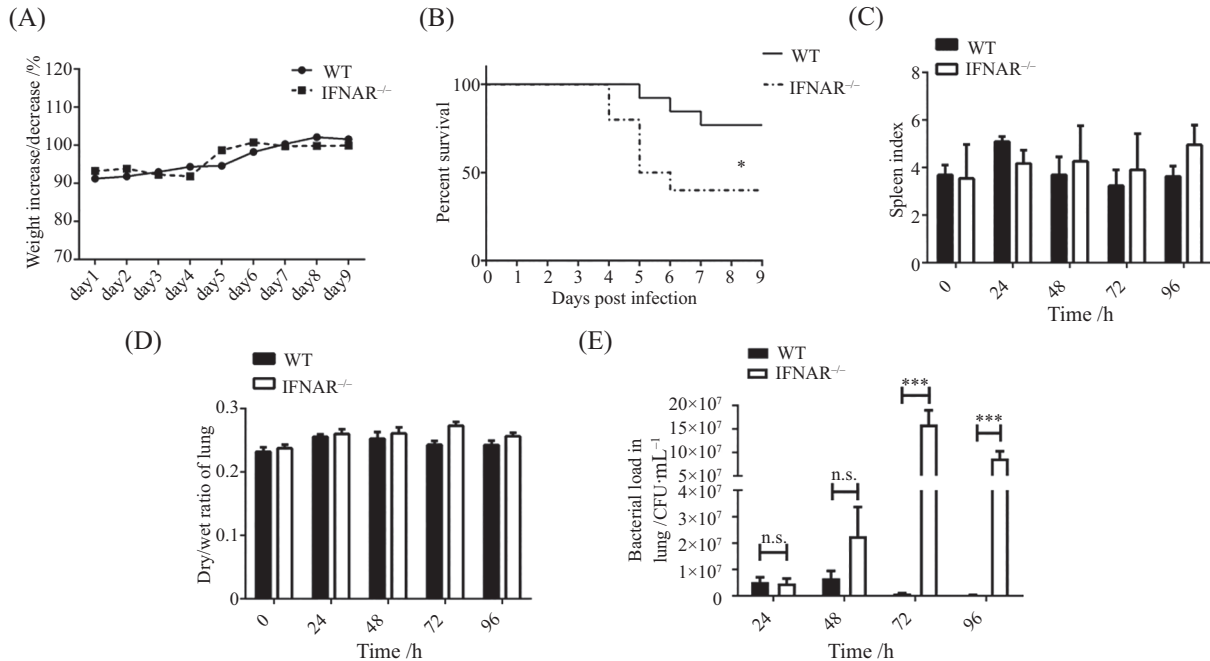


A, B: WT PEMs或IFNAR^{-/-}PEMs感染D39株(MOI=100)达指定时间后, RT-PCR测定*IL-1β*和*TNF-α* mRNA水平; C, D: WT小鼠或IFNAR^{-/-}小鼠滴鼻感染D39株(1×10^8 CFU)24 h, ELISA测定肺、血、脾中IL-1β和TNF-α的产生($n=3\sim 5$)。n.s.: $P>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A, B: WT PEMs or IFNAR^{-/-} PEMs were infected with strain D39 (MOI=100) for the indicated times. *IL-1β* and *TNF-α* mRNA levels were determined by RT-PCR; C, D: WT mice or IFNAR^{-/-} mice were intranasally exposed to strain D39 (1×10^8 CFU) for 24 h. The production of *IL-1β* and *TNF-α* in lung, blood and spleen was measured by ELISA ($n=3\sim 5$). n.s.: $P>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图3 IFNAR缺陷导致IL-1β和TNF-α过度累积

Fig.3 IFNAR deletion causes a greater abundance of IL-1β and TNF-α



A、B: 用D39株(1×10^8 CFU)滴鼻感染WT或IFNAR^{-/-}小鼠。感染后9天内,连续监测小鼠体重和存活率($n=5\sim 10$)。C、D、E: 感染至指定时间后,处死小鼠,测定脾脏指数、肺干/湿比和肺部细菌负荷($n=3\sim 5$)。n.s.: $P>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A,B: WT and IFNAR^{-/-} mice were intranasally infected with strain D39 (1×10^8 CFU). During the nine days post infection, the body weight and survival rate of mice were monitored ($n=5\sim 10$). C,D,E: after infection for the indicated times, mice were sacrificed and their lung tissues and spleens were collected and homogenated for measurement of the spleen index, the dry/wet ratio of lung and the bacterial loads in lung ($n=3\sim 5$). n.s.: $P>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图4 IFNAR缺陷导致*S. pn*感染小鼠死亡率升高

Fig 4 IFNAR deficiency results in increased mortality of *S. pn*-infected mice

我们的数据一致。然而延长感染时间至72 h和96 h后,我们发现,IFNAR^{-/-}组小鼠肺部菌载量高于WT组小鼠且差异显著(图4E, $P<0.001$)。感染后不同时间段,两组小鼠肺水肿程度、脾指数值无显著性差异(图4C和图4D, $P>0.05$)。由此可见,IFN-I抑制*S. pn*在宿主体内的复制,对宿主发挥重要的保护作用。

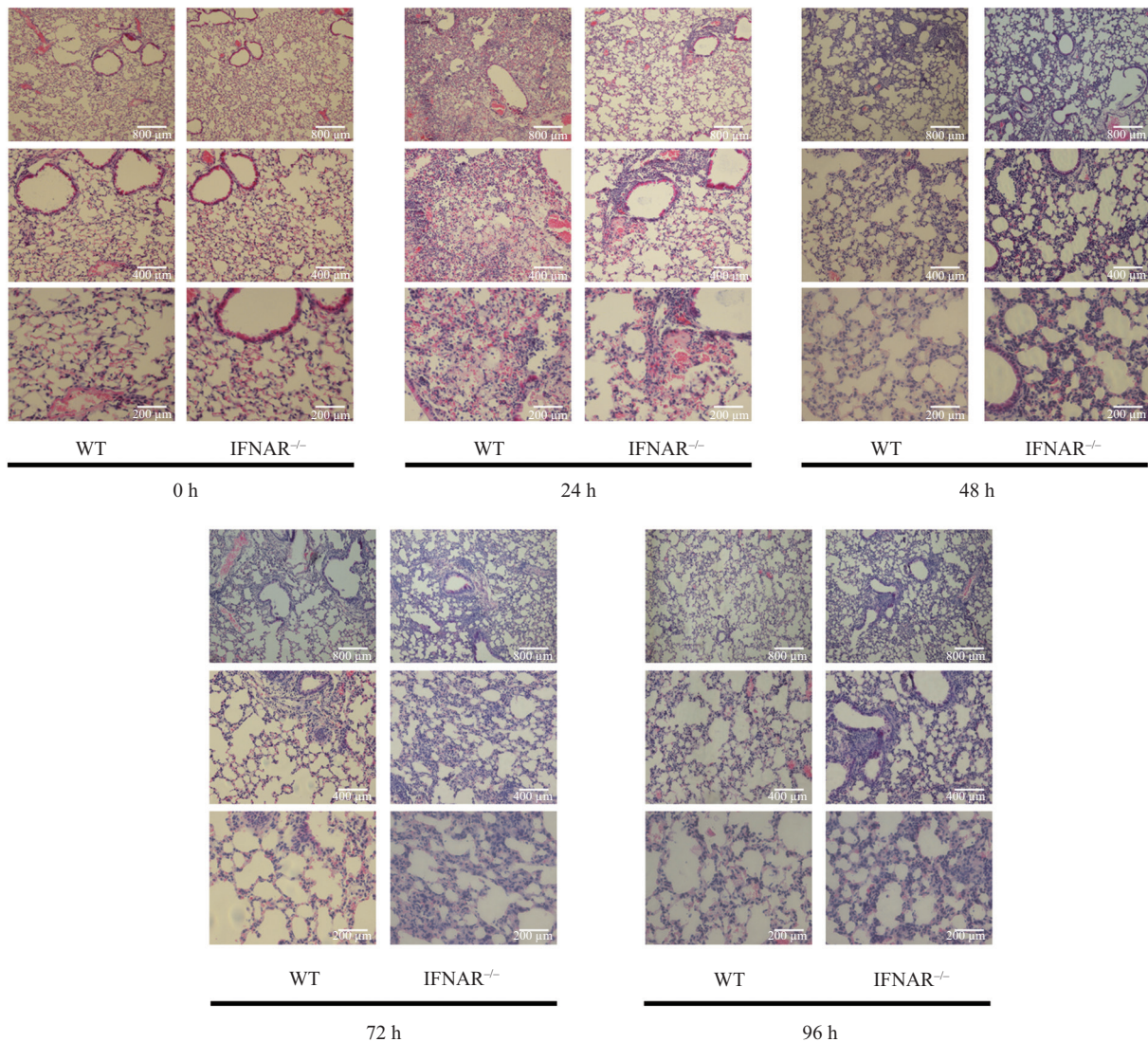
2.5 WT和IFNAR^{-/-}小鼠感染*S. pn*后的肺部病理学改变

虽然IFNAR^{-/-}小鼠感染后肺水肿程度未较WT小鼠发生明显改变(图4D),但肺部组织损伤是基础研究和临床病例中导致宿主死亡率升高的重要原因之一,因此我们进一步分析感染D39菌株的WT和IFNAR^{-/-}小鼠肺组织病理学。如图5所示,感染24 h后,两组小鼠呈现出不同程度的肺部炎症细胞浸润和出血。随后WT组小鼠肺部病变逐渐趋于缓解,提示肺部局部炎症反应得到有效控制,而IFNAR^{-/-}组小鼠肺部损伤则逐渐加剧,与其促炎细胞因子水平呈现良好的相关性(图3)。96 h后,WT小鼠肺部病理改变显著改善,而IFNAR^{-/-}小鼠表现出观察时间内最严重的组织损伤,表明其肺部炎症反应时间延长。

结果表明,IFNAR^{-/-}小鼠对*S. pn*持续高水平的炎症应答反应导致其肺部组织损伤加重。

3 讨论

我们前期研究发现,*S. pn*来源的Ply和H₂O₂导致宿主细胞线粒体损伤以及mtDNA释放,后者通过胞质STING信号通路诱导IFN- β 产生^[12-13]。IFN- β 对细菌感染免疫的调控作用是复杂的。在结核分枝杆菌和伤寒沙门氏菌感染时,IFN- β 的分泌是细菌逃避宿主免疫系统的重要策略^[8-9],而在铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯菌感染时则成为宿主抵抗细菌感染的有效机制^[10-11]。因此,我们想知道在*S. pn*感染过程中IFN-I对宿主发挥保护效应还是致病效应。有文献报道,cGAS-STING信号通路通过感测宿主细胞中异常累积的胞质DNA导致IFN-I分泌,但IFN-I的诱导对小鼠和人类抵抗*S. pn*感染来说并非必要^[22]。相反,我们证明在宿主感染*S. pn*早期,IFN- β 通过调节巨噬细胞中促炎细胞因子IL-1 β 和TNF- α 的表达而维持宿主体内适度水平的炎症反应,对于控制组织损伤、促进细菌清除和保护宿主免受致死性感染至关



用D39株(1×10^8 CFU)滴鼻感染WT和IFNAR^{-/-}小鼠不同时间后处死,肺组织被固定制作石蜡切片并行HE染色($n=5-10$)。

WT and IFNAR^{-/-} mice were intranasally infected with strain D39 (1×10^8 CFU) for the indicated times and were sacrificed. Their lung tissues were fixed, sectioned, and HE-stained ($n=5-10$).

图5 IFNAR^{-/-}小鼠感染*S. pn*后肺部病理改变持续

Fig.5 Lung pathological changes are persistent in IFNAR^{-/-} mice after *S. pn* infection

重要。

IL-1 β 和TNF- α 是重要的促炎细胞因子,两者可由巨噬细胞产生,主要作用于血管内皮细胞,可诱导趋化因子、细胞因子和内皮细胞黏附因子表达,同时招募并激活中性粒细胞、单核巨噬细胞等,后者将释放更多的炎症介质,进而引发全身炎症反应^[23]。因而IL-1 β 和TNF- α 诱发后续炎症级联反应是宿主应对病原微生物早期感染的一种保护机制,但是炎症的发生也将对宿主造成一定程度的损伤。研究表明,IL-1 β 和TNF- α 的过度产生与多种自身免疫病如类风湿性关节炎的发病机制相关^[24]。

在本研究中,*S. pn*诱导小鼠和巨噬细胞中IL-1 β

和TNF- α 表达升高,但rIFN- β 预处理组中的升高水平显著低于NC组,而IFNAR缺陷后两者的表达较WT组进一步升高(图1和图3)。此外,HE染色结果从形态学上证实,rIFN- β 给药可显著减轻由*S. pn*感染所导致的局部炎性浸润和组织结构紊乱(图2A和图2B)。而IFNAR^{-/-}小鼠在感染后期肺部组织损伤加重和死亡率增加(图5和图4B),表明IFN-I缺乏相关的促炎细胞因子上调和正常结构破坏促进了失调免疫反应和全身疾病的进展。小鼠感染48 h后,我们检测到rIFN- β 预处理显著抑制D39诱导的IL-1 β 的表达(图1C),但对TNF- α 表达的影响并不显著(图1D)。这可能是由于TNF- α 作为IL-1 β 的主要调节因子,可上

调IL-1 β 表达,因此IL-1 β 的产生通常需要更长时间的刺激,相对而言TNF- α 则在*S. pn*感染早期对炎症反应发挥显著的调节作用^[25-27]。

有报道指出,IFN- β 通过抑制IL-1 β 、TNF- α 受体的表达而抑制促炎反应。鉴于IFN- β 的抗炎特性,其可被用于自身免疫病、炎症紊乱性疾病等的治疗^[20-21]。HVID等^[28]使用IFN- β 抑制IL-1 β 的持续产生,从而减轻由沙眼衣原体感染引起的组织损伤,与我们的结论互相支持,或许可作为IFN- β 应用于临床感染性疾病治疗的依据。相反,FAN等^[29]的研究展示出IFN-I的促炎作用。IFN-I通过诱导下游干扰素刺激基因(interferon stimulated genes, ISGs)如*ISG15*表达上调进而发挥作用,ISG15可共价结合至靶蛋白使之发生ISG化^[30]。FAN等表示,IFN- β 依赖的ISG化诱导了TNF- α 等多种炎症因子表达增加,促进小鼠结肠炎及其相关的恶性进展。而ISG化是否与IFN- β 对宿主抗*S. pn*感染免疫应答的调节作用有关,这有待进一步阐明,同时也是本课题组下一步的研究重点。

我们的数据表明,IFN- β 在调节宿主促炎反应的同时也有助于*S. pn*的清除(图2D和图4E),这与LEMESSURIER等^[17]IFN-I不影响宿主对*S. pn*清除率的结论不同。LEMESSURIER表示,IFN-I通过下调血小板活化因子受体(platelet activating factor receptor, PAF receptor)调节紧密连接蛋白的表达,从而抑制*S. pn*对宿主肺上皮细胞的侵袭,缓解宿主上皮屏障的损伤,最终延缓或阻碍菌血症的进展。由于IL-1 β 和TNF- α 是上调PAF受体表达的诱导因素,所以我们推论IFN-I可能通过抑制*S. pn*诱导的宿主巨噬细胞IL-1 β 和TNF- α 的表达而限制肺上皮细胞表面PAF受体的活化。此外,他们的研究并未阐述*S. pn*与宿主巨噬细胞间的相互作用机制,而我们的数据表明,IFN- β 促进巨噬细胞吞噬细菌且呈现一定的剂量依赖性(图2C)。这些数据和我们的前期研究结果共同表明,*S. pn*通过Ply和H₂O₂损伤宿主细胞线粒体,使mtDNA释放至胞质并上调IFN- β 表达,IFN- β 在固有免疫应答阶段保护宿主上皮细胞和内皮屏障,同时促进巨噬细胞吞噬细菌、调控巨噬细胞炎症应答反应,从而有助于控制宿主肺部局部炎症,延缓或阻碍其发展为侵袭性疾病。这为*S. pn*诱导的炎症反应提供新的见解,进一步为IFN- β 成为其潜在治疗药物提供新的证据。

参考文献 (References)

- [1] ENGHOLM D H, KILIAN M, GOODSELL D S, et al. A visual review of the human pathogen *Streptococcus pneumoniae* [J]. FEMS Microbiol Rev, 2017, 41(6): 854-79.
- [2] WEISER J N, FERREIRA D M, PATON J C. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion [J]. Nat Rev Microbiol, 2018, 16(6): 355-67.
- [3] XU D, LIAN D, WU J, et al. Brain-derived neurotrophic factor reduces inflammation and hippocampal apoptosis in experimental *Streptococcus pneumoniae* meningitis [J]. J Neuroinflammation, 2017, 14(1): 156.
- [4] HUANG Y, WANG Z, JIN C, et al. TLR2 promotes macrophage recruitment and *Streptococcus pneumoniae* clearance during mouse otitis media [J]. Pediatr Res, 2016, 80(6): 886-93.
- [5] LOPEZ DE PADILLA C M, NIEWOLD T B. The type I interferons: basic concepts and clinical relevance in immune-mediated inflammatory diseases [J]. Gene, 2016, 576(1 Pt 1): 14-21.
- [6] GIACOMINI E, IONA E, FERRONI L, et al. Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response [J]. J Immunol, 2001, 166(12): 7033-41.
- [7] WEIDEN M, TANAKA N, QIAO Y M, et al. Differentiation of monocytes to macrophages switches the *Mycobacterium tuberculosis* effect on HIV-1 replication from stimulation to inhibition: modulation of interferon response and ccaat/enhancer binding protein beta expression [J]. J Immunol, 2000, 165(4): 2028-39.
- [8] MANCA C, TSENOVA L, BERGTOLD A, et al. Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN-alpha/beta [J]. P Natl Acad Sci USA, 2001, 98(10): 5752-7.
- [9] PERKINS D J, RAJAIHAH R, TENNANT S M, et al. *Salmonella typhimurium* co-opts the host type I IFN system to restrict macrophage innate immune transcriptional responses selectively [J]. J Immunol, 2015, 195(5): 2461-71.
- [10] CARRIGAN S O, JUNKINS R, YANG Y J, et al. IFN Regulatory factor 3 contributes to the host response during *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice [J]. J Immunol, 2010, 185(6): 3602-9.
- [11] IVIN M, DUMIGAN A, DE VASCONCELOS F N, et al. Natural killer cell-intrinsic type I IFN signaling controls *Klebsiella pneumoniae* growth during lung infection [J]. PLoS Pathog, 2017, 13(11): e1006696.
- [12] GAO Y, XU W C, DOU X Y, et al. Mitochondrial DNA leakage caused by *Streptococcus pneumoniae* hydrogen peroxide promotes type I IFN expression in lung cells [J]. Front Microbiol, 2019, 10: 630.
- [13] HU X X, PENG X Q, LU C, et al. Type I IFN expression is stimulated by cytosolic MtDNA released from pneumolysin-damaged mitochondria via the STING signaling pathway in macrophages [J]. Febs J, 2019, 286(23): 4754-68.
- [14] SHAHANGIAN A, CHOW E K, TIAN X L, et al. Type I IFNs mediate development of postinfluenza bacterial pneumonia in mice [J]. J Clin Invest, 2009, 119(7): 1910-20.
- [15] NAKAMURA S, DAVIS K M, WEISER J N. Synergistic stimulation of type I interferons during influenza virus coinfection promotes *Streptococcus pneumoniae* colonization in mice [J]. J Clin

- Invest, 2011, 121(9): 3657-65.
- [16] PARKER D, MARTIN F J, SOONG G, et al. *Streptococcus pneumoniae* DNA initiates type I interferon signaling in the respiratory tract [J]. *Mbio*, 2011, 2(3): e00016-11.
- [17] LEMESSURIER K S, HACKER H, CHI L, et al. Type I interferon protects against pneumococcal invasive disease by inhibiting bacterial transmigration across the lung [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9(11): e1003727.
- [18] ZHANG H, KANG L, YAO H, et al. *Streptococcus pneumoniae* endopeptidase O (PepO) elicits a strong innate immune response in mice via TLR2 and TLR4 signaling pathways [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2016, 6: 23.
- [19] DUAN W, CHAN J H P, WONG C H, et al. Anti-inflammatory effects of mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor U0126 in an asthma mouse model [J]. *J Immunol*, 2004, 172(11): 7053-9.
- [20] GUARDA G, BRAUN M, STAEHLI F, et al. Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation [J]. *Immunity*, 2011, 34(2): 213-23.
- [21] AGGARWAL B B, PANDITA R. Both type I and type II interferons down-regulate human tumor necrosis factor receptors in human hepatocellular carcinoma cell line Hep G2. Role of protein kinase C [J]. *FEBS Lett*, 1994, 337(1): 99-102.
- [22] RUIZ-MORENO J S, HAMANN L, JIN L, et al. The cGAS/STING pathway detects *Streptococcus pneumoniae* but appears dispensable for antipneumococcal defense in mice and humans [J]. *Infect Immun*, 2018, 86(3): e00849-17.
- [23] 徐珂, 郭学民, 黄鑫, 等. 小鼠CTRP6基因缺失对LPS介导的急性炎症反应的影响[J]. 中国细胞生物学学报(XU K, GUO X M, HUANG X, et al. Effect of CTRP6 deficiency on LPS-mediated acute inflammatory response in mice [J]. *Chin J Cell Biol*), 2019, 41(12): 2342-50.
- [24] SAIF D S, HEGAZY N N, ZAHRAN E S. Evaluating the efficacy of intra-articular injections of platelet rich plasma (PRP) in rheumatoid arthritis patients and its impact on inflammatory cytokines, disease activity and quality of life [J]. *Curr Rheumatol Rev*, 2020, doi: 10.2174/1573397116666201113090629.
- [25] SMOLEN J S, BREEDVELD F C, BURMESTER G R, et al. Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force [J]. *Ann Rheum Dis*, 2016, 75(1): 3-15.
- [26] LIU W, CHEN J L, LIU H, et al. Effects of meglumine cyclic adenylylate pretreatment on systemic inflammatory response syndrome induced by lipopolysaccharide in rats [J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2017, 37(3): 332-6.
- [27] PERISELNERIS J, ERCOLI G, POLLARD T, et al. Relative contributions of extracellular and internalized bacteria to early macrophage proinflammatory responses to *Streptococcus pneumoniae* [J]. *Mbio*, 2019, 10(5): e02144-19.
- [28] HVID M, BACZYNSKA A, DELEURAN B, et al. Interleukin-1 is the initiator of Fallopian tube destruction during *Chlamydia trachomatis* infection [J]. *Cell Microbiol*, 2007, 9(12): 2795-803.
- [29] FAN J B, MIYAUCHI-ISHIDA S, ARIMOTO K, et al. Type I IFN induces protein ISGylation to enhance cytokine expression and augments colonic inflammation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(46): 14313-8.
- [30] KIM Y J, KIM E T, KIM Y E, et al. Consecutive inhibition of ISG15 expression and ISGylation by cytomegalovirus regulators [J]. *PLoS Pathog*, 2016, 12(8): e1005850.