

DOI:10.13350/j.cjpb.230608

• 论著 •

CD300a 表达对大肠埃希菌介导的尿路感染患者病情进展的影响及作用机制分析

赵展*, 王海波, 朱千三

(温州市中医院泌尿外科, 浙江温州 325608)

【摘要】 目的 分析 CD300a 表达对大肠埃希菌介导的尿路感染患者病情进展的影响及作用机制。方法 选取 2021 年 1 月至 2022 年 12 月本院收治的大肠埃希菌尿路感染患者 75 例, 均为女性, 根据患者病情转归、病情进展分为研究组 (病情转归, 41 例) 和对照组 (病情进展 34 例), 观察两组患者尿道分泌物 CD300a mRNA 和 CD300a 蛋白表达及细菌负担, 比较两组患者血液中性粒细胞、PCT、CRP、WBC 表达并分析 CD300a RNA、CD300a 与感染指标相关性。另选取 6~8 周龄雌性小鼠 16 只, 建立 α -溶血素缺乏的 UPEC 菌株 C93 和 α -溶血素充足的 UPEC 菌株 CFT073 感染模型, 均分为常规组和 CD300a 敲除组, 观察两组大鼠中性粒细胞表达及相关功能, 分析 CD300a 对尿路感染大鼠中性粒细胞清除功能的影响及作用机制。结果 研究组患者 CD300a mRNA 和 CD300a 蛋白表达水平均显著高于对照组 (均 $P < 0.05$); 研究组患者细菌负担, 中性粒细胞、PCT、CRP、WBC 表达水平均显著低于对照组 (均 $P < 0.05$); Pearson 分析显示, CD300a mRNA 和 CD300a 蛋白相对表达量均与细菌负担, 中性粒细胞、PCT、CRP、WBC 表达呈负相关 (均 $P < 0.05$); 流式细胞术检测小鼠中性粒细胞表达 CD300a。敲除组模型鼠尿液及膀胱组织中性粒细胞水平及细菌负荷均高于常规组 (均 $P < 0.05$); 中性粒细胞氧化破裂能力强于常规组, 敲除组 UPEC 吞噬能力低于常规组 (均 $P < 0.05$), 流式细胞术检测 fitc 标记珠粒染色强度常规组低于敲除组 ($P < 0.05$)。常规组小鼠感染 α -溶血素缺乏的 UPEC 菌株 C93 和 α -溶血素充足的 UPEC 菌株 CFT073 后, CFT073 诱导的 CD300a 配体水平显著升高 ($P < 0.05$)。感染 CFT073 后敲除组小鼠膀胱中的细菌负荷显著高于常规组 ($P < 0.05$); 感染 C93 后两组小鼠细菌负荷差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 CD300a 表达与 UPEC 介导的尿路感染患者病情进展具有相关性, 其高表达通过提高中性粒细胞吞噬作用增强机体对 UPEC 的清除能力, 其中 α -溶血素是表达 CD300a 的中性粒细胞清除 UPEC 的关键。

【关键词】 尿路感染; 大肠埃希菌; CD300a; 病情进展; 作用机制

【中图分类号】 R378.21

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)06-0662-05

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Jun;18(6):662-666, 671.]

Effect and mechanism analysis of CD300a expression on disease progression in patients with *Escherichia coli* - mediated urinary tract infection

ZHAO Zhan, WANG Haibo, ZHU Qiansan (Urology Department of Wenzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wenzhou 325608, Zhejiang, China) *

【Abstract】 **Objective** To analyze the effect of CD300a expression on the progression of urinary tract infection mediated by *Escherichia coli* and its mechanism. **Methods** Seventy-five patients with *Escherichia coli* urinary tract infection admitted to our hospital from January 2021 to December 2022, all female, were divided into study group (disease outcome, 41 cases) and control group (disease progression, 34 cases) according to the outcome and progress of the patients. The expressions of CD300a mRNA and CD300a protein in urethral secretions and bacterial burden in the two groups were observed. The expressions of neutrophils, PCT, CRP and WBC in blood of the two groups were compared, and the correlation between CD300a RNA, CD300a and infection indexes was analyzed. Sixteen female mice aged 6 to 8 weeks were selected to establish infection models of α -hemolysin-deficient UPEC strain C93 and α -hemolysin-adequate UPEC strain CFT073, which were divided into conventional group and CD300a knockout group. The expression and related functions of neutrophils in the two groups were observed. To analyze the effect and mechanism of CD300a on neutrophil clearance in rats with urinary tract infection. **Results** The expression levels of CD300a mRNA and CD300a protein in study group were significantly higher than those in control group (all $P < 0.05$). The bacterial burden, expression levels of neutrophil, PCT, CRP and WBC in study group were significantly lower than those in control group (all $P < 0.05$). Pearson analysis showed that the relative expression levels of CD300a mRNA and CD300a protein were negatively correlated with bacterial burden, neutrophils, PCT, CRP and WBC (all $P < 0.05$). CD300a expression in mouse

* **【通讯作者 (简介)】** 赵展(1993-), 男, 浙江乐清人, 硕士, 住院医师, 从事泌尿外科结石方面研究。E-mail: zhangm11162@163.com

neutrophils was detected by flow cytometry. Neutrophil levels and bacterial load in urine and bladder in knockout group were higher than those in conventional group (all $P < 0.05$). The oxidative rupture capacity of neutrophils was stronger than that of the conventional group, the phagocytic capacity of UPEC in the knockout group was lower than that in the conventional group (all $P < 0.05$), and the intensity of FITC-labeled beads detected by flow cytometry in the conventional group was lower than that in the knockout group ($P < 0.05$). After infection with α -hemolysin-deficient UPEC strain C93 and α -hemolysin-sufficient UPEC strain CFT073, the CD300a ligand level induced by CFT073 was significantly increased in the conventional group ($P < 0.05$). The bacterial load of bladder in knockout group was significantly higher than that in conventional group after CFT073 infection ($P < 0.05$). There was no significant difference in bacterial load between the two groups after C93 infection ($P > 0.05$). **Conclusion** The expression of CD300a is correlated with the progression of UPEC mediated urinary tract infection. The high expression of CD300a enhances the clearance ability of UPEC by increasing neutrophilic phagocytosis, in which α -hemolysin is the key to the clearance of UPEC by neutrophils expressing CD300A.

【Key words】 urinary tract infection; *Escherichia coli*; CD300a; progression of disease; mechanism of action

致病性大肠埃希菌(UPEC)是临床常见的尿路感染细菌,也是造成复发性尿路感染(rUTI)的主要原因。有研究报道 UPEC 是 30% 以上医源性感染及 80% 以上社区感染的主要致病菌^[1]。目前已发现 UPEC 可通过多种机制在膀胱中建立感染并逃脱清除。UPEC 主要致病机制为分泌 α -溶血素毒素,诱导膀胱上皮细胞死亡^[2-3]。虽然通常可用抗生素治疗,但近三分之一的女性会反复出现 UTI^[4]。UTI 感染可引起人体触发大量快速的免疫反应,其特征是细胞因子和趋化因子分泌增高以及各种类型的免疫细胞在膀胱中积聚^[5],并在对抗 UPEC 中发挥重要作用^[6]。CD300a 是一种在髓系上表达的抑制性受体,其已知配体是磷脂酰丝氨酸(PS)和磷脂酰乙醇胺(PE)^[7]。通过受体的抑制信号以各种机制介导对死亡细胞的免疫耐受。本研究旨在进一步了解 CD300a 表达对 UPEC 介导的尿路感染患者病情的影响及作用机制。

对象和方法

1 研究对象

选取本院 2021 年 1 月至 2022 年 12 月收治的大肠埃希菌尿路感染女性患者 75 例,依据患者病情转归、病情进展分为研究组(病情转归,41 例),对照组(病情进展 34 例)。纳入标准:(1)经细菌培养确诊尿路感染;(2)年龄 ≥ 18 岁。排除标准:(1)严重肝肾功能障碍;(2)已进行抗菌治疗者;(3)合并阴道炎等其他妇科炎症性疾病者;(4)合并其他器官、系统感染者;(5)合并恶性肿瘤等严重疾病者。本研究经医院伦理委员会审批。

另选取 6~8 周龄的雌性小鼠 16 只,体质量 100~150 g,购于上海杰思捷实验动物有限公司,动物生产许可证号:SCXK(沪)2020-0004。

2 方法

2.1 患者标本采集 常规方法采集患者尿道分泌物,

用于实验室检测。另取患者外周静脉血,用以检测 WBC 和中性粒细胞,以及 PCT、CRP。

2.2 细菌负担检测 为了计算细菌负担,对获取的样本进行裂解,每孔添加 20 μ L 的 5% Triton X-100。裂解一组孔的细胞以确定细胞外或细胞内细菌的总数。细胞总数使用电子显微镜观察并计数,以本院同期无尿路感染患者细菌检出总数为参考标准,计算患者细菌总数与无感染患者细菌数百分比。该内容不够完整,应作修改。

2.3 逆转录定量聚合酶链反应 使用 miRNeasy Mini Kit 提取患者尿道分泌物总 RNA,按照 PrimeScript RT 试剂盒说明逆转录成 cDNA,然后使用 ABI7500 定量 PCR 仪器按 SYBR Premix Ex TaqTM II 试剂盒(RR820A;Takara;日本)说明书进行荧光定量聚合酶链反应(PCR)。CD300a mRNA 和 β -catenin 的引物由 Takara 公司设计合成。使用相对定量方法($2^{-\Delta\Delta Ct}$)计算 CD300a 相对于 β -catenin 的 mRNA 表达。细胞试验采用相同程序。

2.4 目标蛋白的 Western blot 检测 标本于 4 $^{\circ}$ C RIPA 缓冲液中均质化,3 000 r/min(离心半径 15 cm)离心 15 min,取上清液(全细胞裂解液)进行 10% SDS-PAGE 电泳(电泳 80 V 30 min 和 120 V 60 min),然后电转移到聚偏二氟乙烯膜。用 5% 脱脂奶粉室温封闭膜 1 h,然后加入 CD300a 抗体 4 $^{\circ}$ C 过夜,洗膜;加入适当稀释的辣根过氧化物酶偶联二抗,室温孵育 1 h,洗膜后使用增强型化学发光检测系统,观察蛋白反应条带。试验以 β -catenin 表达水平作为内源参考并用于标准化,根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 CD300a mRNA 相对表达量。

2.5 小鼠试验

2.5.1 尿路感染模型建立及细菌负荷测定 将 6~8 周龄雌性小鼠在置管前用氯胺酮和 xylazine 麻醉,然后接种 50 μ L 含 10^8 UPEC 的 PBS。试验分为未敲除

CD300a 常规组和 CD300a 敲除组, 每组 8 只。

取小鼠膀胱组织标本, 使用 Fastprep (MP Biomedicals, 美国) 均质后作连续稀释, 并铺于 MacConkey 板(以色列 Novamed 公司产品), 37 °C 孵育过夜, 并对菌落进行计数。

2.5.2 膀胱和尿液免疫浸润的定量和表征 取均质的膀胱组织, 通过淋巴系统离心纯化 (StemCells Technologies) 白细胞, 采用抗小鼠 Ly6G-APC 和抗小鼠 CD11b-FITC (BioLegend; 安诺伦生物科技有限公司; 中国) 对中性粒细胞进行鉴定。取小鼠尿液, 离心法提取中性粒细胞, 用抗小鼠 Ly6GAPC 染色鉴定。

2.5.3 小鼠中性粒细胞纯化 于小鼠腹腔注射 Zymosan A (Sigma-aldrich, 美国) 200 μg , 次日用肝素化(美国 Sigma 公司产品) 注射器心脏穿刺采血。用 5 体积含 0.5% BSA 的 PBS 稀释血液, 并进行不连续组织 (Sigma) 梯度 (1.077 和 1.119) 处理, 通过低渗裂解除红细胞 (RBC)。

2.5.4 吞噬试验 用 PBS \times 1 稀释 FITC 标记珠粒, 用 1 μg CD300a Ig 融合蛋白冰孵育 1 h, PBS \times 1 洗涤 2 次后用 APC 偶联抗人 Fc 抗体 (Jackson ImmunoResearch, 美国) 染色, 采用流式细胞仪 (FACS) 检测 Ig 融合蛋白的珠粒结合。取 10^5 个中性粒细胞悬浮在 OptiMEM 0.5% FBS 中, 并补充 FITC 标记的珠子 (1:100; 美国 Cayman Chemicals 公司产品) 或表达 CFT073 的 GFP, 37 °C 下孵育 30 (珠粒和表达 CFT073 的 GFP)、90 和 120 min (表达 CFT073 的 GFP), 然后用抗小鼠 Ly6G APC (Biolegend, 美国) 清洗和染色, 吞噬作用通过流式细胞术确定为 Ly6G + FITC + 或 GFP + 细胞的百分比。该内容不够完整, 应作修改。

2.5.5 氧化破裂试验 取 2×10^5 中性粒细胞镀于含 50 $\mu\text{mol/L}$ 鲁米诺 (Sigma) 的 Hank's 平衡盐溶液中。中性粒细胞被 phorbol 12-肉豆蔻酸 13-乙酸酯 (PMA, 10 nmol/L 和 100 nmol/L) 或甲酰蛋氨酸-亮氨酸-苯丙氨酸 (fMLP, 10 nmol/L 和 100 nmol/L) 刺激产生 H_2O_2 , 使用 Tecan f200 微孔板发光仪每 10 min 测量一次发光。

2.5.6 Ig 融合蛋白的产生 提取小鼠白细胞 cDNA, PCR 扩增编码受体细胞外部分的序列。CD300a 胞外部分 PCR 引物: 5'-CCCAAGCTTGCCGCCACCAT-GTGGCTGCCTTGGGCTCTG-3' (包括一个 HindIII 切位点) 和 5'-GAAGATCTGAGTTCACCACCT-CCTCAGT-3' (包括一个 BglII 酶切位点)。将 PCR 扩增片段克隆到含人类 IgG1 Fc 部分的哺乳动物表达载体中。用该结构物转染 293T 细胞, 用蛋白 G 柱纯化表达蛋白质。

2.5.7 CD300a Ig 对吞噬作用的中和试验 FITC 标记珠用 PBS \times 1 稀释, 然后加入 CD300a Ig 融合蛋白 (每孔分别为 3、5、7 和 10 μg), 冰上孵育 1 h; 加入 PBS \times 1 和 10^5 个中性粒细胞在 OptiMEM 中悬浮, 用 0.5% FBS 洗涤 2 次; 培养板置 37 °C 孵育 30 min, 洗涤后用抗小鼠 Ly6G APC 染色, 采用流式细胞术检测 Ly6G + FITC + 细胞的吞噬率。

2.5.8 UPEC CD300a Ig 染色 CFT073 培养后用无菌 PBS \times 1 冲洗培养物 3 次, 使 A_{600} 值为 1。将 10^6 个细菌分成 96U 孔, 在增加 CD300a Ig 融合蛋白浓度的冰块上孵育 1 h。然后用 APC 偶联的抗人 Fc 抗体对细菌进行清洗和染色。Ig 融合蛋白的 UPEC 结合通过 FACS 评估。

2.6 统计学处理 采用 SPSS23.0 统计软件, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用独立样本 t 检验; 使用 Pearson 模型进行相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 两组患者 CD300a mRNA 和 CD300a 蛋白相对表达量比较

研究组患者 CD300a mRNA、CD300a 蛋白相对表达量分别为 1.92 ± 0.24 和 1.81 ± 0.22 , 对照组分别为 1.06 ± 0.13 和 1.15 ± 0.1 , 差异均有统计学意义 (t 值分别为 19.720 和 15.010, 均 $P < 0.01$)。

2 两组患者细菌负担, 中性粒细胞表达, 以及 PCT、CRP、WBC 表达水平比较

研究组细菌负担以及中性粒细胞、PCT、CRP、WBC 表达水平分别为 $(161.24\pm 20.39)\%$ 、 $(1.81\pm 0.39)\mu\text{g/L}$ 、 $(1.56\pm 0.48)\mu\text{g/L}$ 、 $(8.01\pm 1.49)\text{mg/L}$ 和 $(10.07\pm 1.84)\times 10^9/\text{L}$, 对照组分别为 $(194.08\pm 21.25)\%$ 、 $(2.34\pm 0.51)\mu\text{g/L}$ 、 $(3.25\pm 0.62)\mu\text{g/L}$ 、 $(10.53\pm 1.76)\text{mg/L}$ 和 $(11.24\pm 2.06)\times 10^9/\text{L}$, 差异均有统计学意义 (t 值分别为 6.786、4.973、12.990、6.612、2.569, 均 $P < 0.05$)。

3 患者 CD300a mRNA 和 CD300a 蛋白的表达与细菌负担以及 PCT、CRP、WBC 表达的相关性

Pearson 分析显示, 大肠埃希菌尿路感染患者 CD300a mRNA 和 CD300a 蛋白相对表达量与细菌负担, 中性粒细胞表达, 以及 PCT、CRP、WBC 的表达呈负相关 (均 $P < 0.05$) (表 1)。

4 小鼠尿路 UPEC 负荷及中性粒细胞水平

流式细胞仪检测小鼠中性粒细胞表达 CD300a (图 1)。表 2 显示, 敲除组尿液及膀胱组织中中性粒细胞水平和细菌负荷均显著高于常规组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 大肠埃希菌尿路感染患者 CD300a mRNA 和 CD300a 蛋白的表达与细菌负担,中性粒细胞表达,以及与 PCT,CRP,WBC 表达的相关性
Table 1 Correlation between CD300a mRNA and CD300a protein expression and bacterial burden, neutrophil expression, and PCT, CRP, and WBC expression in patients with E. coli urinary tract infection

指标 Index	CD300a mRNA		CD300a 蛋白 cd300a protein	
	相关系数 Correlation index	P	相关系数 Correlation index	P
细菌负担	-0.646	<0.01	-0.583	<0.01
中性粒细胞	-0.517	<0.01	-0.436	<0.01
PCT	-0.603	<0.01	-0.568	<0.01
CRP	-0.447	<0.01	-0.402	<0.01
WBC	-0.584	<0.01	-0.513	<0.01

表 2 小鼠尿路 UPEC 负荷及中性粒细胞水平比较
Table 2 Comparison of urinary tract UPEC load and neutrophil level in mice

组别 Group	细菌负荷 (Log ₁₀ CFU) Bacterial load (Log ₁₀ CFU)	膀胱中性粒细胞 (10 ³ 个/视野) Bladder neutrophils (10 ₃ PCS/field of view)	尿液中性粒细胞 (10 ³ /mL) Urine neutrophils
常规组 (n=8)	5.14±0.68	0.92±0.10	138.41±14.25
敲除组 (n=8)	6.21±0.73	4.84±0.83	493.66±54.58
t	3.034	20.557	17.813
P	0.01	<0.01	<0.01

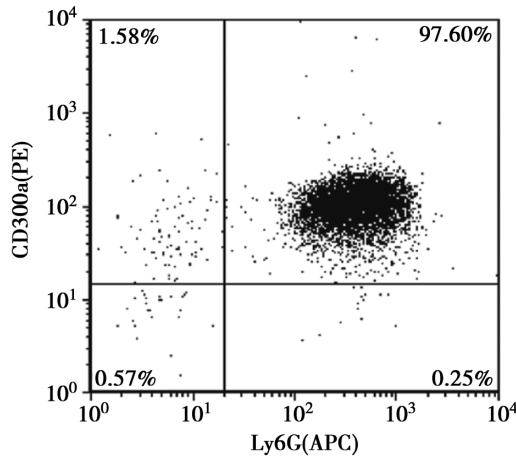


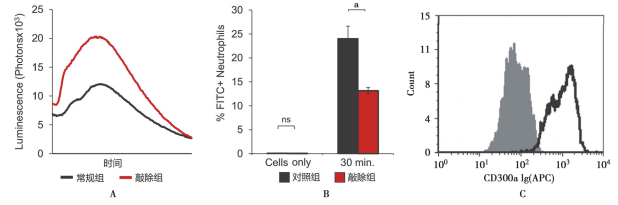
图 1 流式细胞术检测结果
Fig. 1 Results of flow cytometry

5 氧化破裂及吞噬作用试验结果

图 2 显示,敲除组中性粒细胞氧化破裂能力强于常规组,敲除组 UPEC 吞噬能力低于常规组(均 $P < 0.05$);流式细胞术检测常规组 FITC 标记珠染色强度常规组低于敲除组($P < 0.05$)。

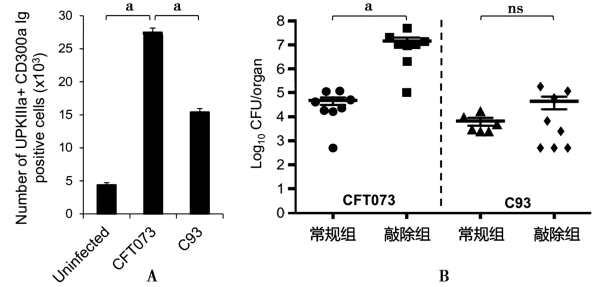
6 α -溶血素对中性粒细胞 UPEC 清除能力的影响

常规组小鼠感染 α -溶血素缺乏的 UPEC 菌株 C93 和 α -溶血素充足的 UPEC 菌株 CFT073 后, CFT073 诱导 CD300a 配体水平显著升高($P < 0.05$)。感染 CFT073 后敲除组小鼠膀胱中的细菌负荷显著高于常规组($P < 0.05$);感染 C93 后两组小鼠的细菌负荷差异无统计学意义($P > 0.05$)(图 3)。



A 氧化破裂试验曲线 B 两组中性粒细胞吞噬能力比较 ($P < 0.05$) C 流式细胞术检测荧光强度(黑色:敲除组,灰色:常规组)
图 2 氧化破裂及吞噬作用试验结果

Fig. 2 Results of oxidative rupture and phagocytosis tests



A 感染 C93 和 CFI073 小鼠 CD300a 表达水平比较 B 感染 C93 和 CFI073 小鼠细菌负荷比较。

图 3 人工感染 C93 和 CFI073 小鼠 CD300a 配体水平及细菌负荷
Fig. 3 CD300a ligand levels and bacterial load in artificially infected C93 and CFI073 mice

讨论

尿路感染是病原体在尿路中生长、繁殖而引起的感染性疾病,中性粒细胞在免疫防御和清除 UPEC 介导的尿路感染中起重要作用。CD300a 是一种结合磷脂酰丝氨酸和磷脂酰乙醇胺的抑制性受体,存在于凋亡细胞的细胞膜上。CD300a 与磷脂酰丝氨酸和磷脂酰乙醇胺结合,也被称为“自噬”信号,介导对死亡细胞的免疫耐受。但目前对其研究多集中于恶性肿瘤等领域,关于大肠埃希菌介导的尿路感染相关研究尚少。

本研究发现,病情转归的 UPEC 尿路感染患者 CD300a mRNA、CD300a 升高,且与患者细菌负担,中性粒细胞表达,以及 PCT、CRP、WBC 表达呈负相关(均 $P < 0.05$),证实 CD300a 在 UPEC 引起的尿路感染病情进展中起重要作用,但仅针对资料分析,研究组患者 CD300a 表达更高,而中性粒细胞水平较低。正常情况下,中性粒细胞具有病菌清除能力,因此认为对照组在中性粒细胞表达水平更高的前提下应表现出更低的细菌负荷。由此推测,在 UPEC 引起的尿路感染患者中,其 CD300a 低表达可能引起中性粒细胞聚集,但会损伤中性粒细胞病菌清除能力,从而出现表现出高水平中性粒细胞表达但无法缓解感染症状的情况。

通过动物试验进一步观察 CD300a 对 UPEC 引起的尿路感染中性粒细胞功能影响,以期能阐明其作用机制。中性粒细胞表达抑制性受体 CD300a,并在清除

UTIs 中发挥主要作用^[8-9], 因此推测 CD300a 敲除小鼠在清除 UPEC 感染方面较未敲除 CD300a 小鼠更有效。为了验证以上假设, 本研究在两组雌性小鼠经尿道内接种 CFT073(急性肾盂肾炎分离物), 感染后 24 h 采集膀胱标本, 评估细菌负荷。结果显示, CD300a 敲除小鼠膀胱中的细菌负荷明显加重。由于免疫细胞在减少感染细菌负荷方面发挥重要作用^[10-12], 进一步推测敲除组小鼠中细菌负荷的增加可以通过局部免疫细胞的减少, 特别是中性粒细胞的减少来解释。因此, 本研究检测了感染小鼠膀胱和尿液中的中性粒细胞水平。结果显示, 敲除组小鼠膀胱和尿液中的中性粒细胞数量与常规组小鼠相比明显增高, 表明缺乏 CD300a 抑制受体的中性粒细胞在受感染的膀胱中大量聚集, 但其清除 UPEC 感染的能力受损。为了更好地阐释感染膀胱中敲除组中性粒细胞的大量积累不会导致细菌负荷减少, 本研究对敲除小鼠中性粒细胞在体外清除细菌的能力进行了评估。过氧化氢的产生, 也称为氧化破裂, 是中性粒细胞清除细菌的关键机制^[13-15]。因此, 本研究测试了敲除组中性粒细胞在存在或不存在不同刺激时产生 H₂O₂ 的能力, 结果显示敲除组中性粒细胞与常规组相比具有更高的氧化破裂能力。

尽管 CD300a 敲除的中性粒细胞具有较高的氧化破裂潜能, 但其对细菌的清除能力受损, 因此假设 CD300a 缺陷中性粒细胞无法清除尿路感染可能与其吞噬能力有关。为了测试这种能力, 本研究用 FITC 标记的 IgG 包被小球孵育常规组或敲除组中性粒细胞, 使用流式细胞仪检查吞噬作用。结果显示, cd300a 缺失中性粒细胞的吞噬能力与常规组相比明显下降。为了证明减弱的吞噬能力确实依赖于 CD300a, 生成了一种嵌合融合蛋白, 由 CD300a 受体的细胞外部分与人免疫球蛋白的 Fc 部分融合而成, 称为 CD300a Ig。FITC 标记小珠被 CD300a Ig 染色呈阳性, 表明标记小珠上存在 CD300a 的表面配体。由于珠粒含有 CD300a 配体, 且 KO 中性粒细胞表现出吞噬能力受损, 因此推断用 CD300a Ig 嵌合蛋白阻断表面配体将模拟 KO 表型, 从而导致 WT 中性粒细胞对 FITC 标记珠粒的吞噬能力降低。以上表明 CD300a 在嗜中性粒细胞吞噬中起作用, 但不能直接识别 UPEC。在缺乏 CD300a 的情况下, 中性粒细胞仍具有较高的氧化破裂能力, 但吞噬功能受损。

UPEC 编码孔隙形成毒素 α -溶血素, 该毒素可诱导膀胱上皮细胞死亡^[16]。本研究推测 CD300a 缺陷的中性粒细胞清除病原体能力受损。为了验证这一假设, 使用 α -溶血素缺乏的 UPEC 菌株 C93 和 α -溶血素充足的 UPEC 菌株 CFT073 感染小鼠, 结果显示与接种 PBS 或 C93 的小鼠相比, CFT073 诱导 CD300a 配

体水平显著升高。

本研究中使用表达 C93 和 CFT073 的 GFP 在常规组和敲除组小鼠中诱导 UTI, GFP-c93 感染的常规组和敲除组小鼠 GFP 阳性膀胱上皮细胞无显著差异, 敲除组小鼠 GFP-cft073 阳性膀胱上皮细胞数量与常规组小鼠相比显著升高。为了证明由 CD300a 与中性粒细胞接触介导的死亡细胞的清除确实会导致膀胱细菌负荷的降低, 本研究用 CFT073 或 C93 感染常规组或敲除组小鼠, 当感染 CFT073 时, 敲除组小鼠膀胱中的细菌负荷明显高于常规组。但是, 当敲除组小鼠接种 C93 时, 膀胱中的细菌负荷与常规组小鼠持平, 这表明 α -溶血素对于表达 CD300a 的中性粒细胞清除 UPEC 具有关键作用。

中性粒细胞在抵御大量病原体的第一道防线中发挥重要作用, 如吞噬病原体。本研究结果展示了抑制受体 CD300a 在中性粒细胞吞噬作用中的新作用, 特别是在中性粒细胞介导的 upec 诱导的 UTI 清除过程。缺乏抑制性受体 CD300a 的小鼠在 UTI 时膀胱内的细菌负荷显著增加。本研究证明 CD300a 敲除中性粒细胞具有较高的氧化破裂能力, 但吞噬能力受损。这种损伤的分子基础尚未完全确定, 有待进一步研究。这种由受体介导的有缺陷的吞噬作用干扰了中性粒细胞清除 UPEC 感染的能力, 并导致体内更高的细菌负荷。中性粒细胞表型的显著变化突出了 CD300a 在中性粒细胞功能中的重要作用。本研究结果进一步表明, UPEC 诱导细胞死亡的 α -溶血素对于 cd300a 介导的感染部位膀胱上皮细胞的清除至关重要。

综上所述, 尿 CD300a 表达与 UPEC 介导的尿路感染患者病情进展具有相关性, CD300a 高表达通过增加中性粒细胞吞噬能力增强患者 UPEC 清除能力, 而 α -溶血素是表达 CD300a 的中性粒细胞清除 UPEC 的关键。

【参考文献】

- [1] Modgil V, Kaur H, Mohan B, et al. Molecular, phylogenetic and antibiotic resistance analysis of enteroaggregative *Escherichia coli*/uropathogenic *Escherichia coli* hybrid genotypes causing urinary tract infections[J]. Indian J Med Microbiol, 2020, 38(3): 421-429.
- [2] Verma V, Kumar P, Gupta S, et al. α -Hemolysin of uropathogenic *E. coli* regulates NLRP3 inflammasome activation and mitochondrial dysfunction in THP-1 macrophages[J]. Sci Reps, 2020, 10(1): 12653.
- [3] Zhang XY, Huang DY, Cai XW. Bis-molybdopterin guanine dinucleotide modulates hemolysin expression under anaerobiosis and contributes to fitness *in vivo* in uropathogenic *Escherichia coli* [J]. Mol Microbiol, 2021, 116(4): 1216-1231.

体重胎儿、新生儿窒息)发生率均高于对照组孕妇,不同分组孕妇的产后出血发生率对比差异无统计学意义。王莉等^[14]研究发现,妊娠期高血压组、子痫前期组、重度子痫前期组的早产率、剖宫产率、胎盘早剥率均高于正常对照组。有关研究发现,妊娠期高血压疾病受多种因素影响,高龄、孕前肥胖或超重、高血压疾病家族史、妊娠期糖尿病、孕期不良情绪等均是导致妊娠高血压的高危因素^[15]。通过本次研究,可以更好地掌握妊娠期高血压孕妇的肠道菌群特点,丰富妊娠期高血压干预临床经验。通过改善妊娠期高血压患者相关指标,减轻患者心理及身体负担,提高患者生活质量,改善临床治疗效果。不仅可以给患者家庭节省医疗费用,还为社会节约了医疗资源,对降低妊娠期高血压发病率、提高患者生命安全具有重要意义。

【参考文献】

- [1] Sebastian DJ, Sanchez SC. From the intestinal flora to the microbiome[J]. Rev Esp Enferm Dig, 2018, 110(1): 51-56.
- [2] Yan X, Jin J, Su X, et al. Intestinal flora modulates blood pressure by regulating the synthesis of intestinal-derived corticosterone in high salt-induced hypertension[J]. Circ Res, 2020, 126(7): 839-853.
- [3] Hutcheon JA, Lisonkova S, Joseph KS. Epidemiology of pre-eclampsia and the other hypertensive disorders of pregnancy[J]. Best Practice Res Clin Obstet Gynaecol, 2017, 25(5): 391-403.
- [4] Tang WHW, Kitai T, Hazen SL. Gut microbiota in cardiovascular health and disease[J]. Circ Res, 2017, 120(7): 1183-1196.
- [5] 中华医学会妇产科学分会妊娠期高血压疾病学组. 妊娠期高血压疾病诊治指南(2015)[J]. 中华妇产科杂志, 2015, 50(10): 721-728.
- [6] Wang Q, Garritr GM, Tiedje JM, et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(16): 5261-5267.
- [7] 于晋然. 常州地区妊娠期高血压疾病患者膳食营养状况调查[D]. 青岛大学, 2021.
- [8] Abdelazez A, Muhammad Z, Zhang QX, et al. Production of a functional frozen yogurt fortified with bifidobacterium spp[J]. Bio Med research international, 2017, 1(1): 643-648.
- [9] Pluznick J. A novel SCFA receptor, the microbiota, and blood pressure regulation[J]. Gut Microbes, 2014, 5(2): 202-207.
- [10] 朱玮, 范荆阳, 薛庆节, 等. 人体肠道菌群与高血压的研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2021, 33(9): 1109-1112.
- [11] Kim S, Goel R, Kumar A, et al. Imbalance of gut microbiome and intestinal epithelial barrier dysfunction in patients with high blood pressure[J]. Clin Sci, 2018, 132(6): 701-718.
- [12] 覃雪, 白学松. 肠道菌群及其代谢产物短链脂肪酸与中老年高血压人群心血管风险水平的相关性研究[J]. 实用预防医学, 2023, 30(1): 43-48.
- [13] 陈慧青, 罗建权, 龚金玉, 等. 肠道菌群在高血压及其药物治疗中的作用研究进展[J]. 中中药学, 2022, 20(1): 140-145.
- [14] 王莉, 赵霞, 吴莎, 等. 妊娠期高血压疾病 300 例妊娠结局分析[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2021, 37(5): 588-591.
- [15] 管群, 林伟芳, 葛佩佩. 妊娠期高血压疾病发病的危险因素分析[J]. 中国妇幼保健, 2021, 36(4): 884-886.
- [1] Sebastian DJ, Sanchez SC. From the intestinal flora to the microbiome[J]. Rev Esp Enferm Dig, 2018, 110(1): 51-56.
- [2] Yan X, Jin J, Su X, et al. Intestinal flora modulates blood pressure by regulating the synthesis of intestinal-derived corticosterone in high salt-induced hypertension[J]. Circ Res, 2020, 126(7): 839-853.
- [3] Hutcheon JA, Lisonkova S, Joseph KS. Epidemiology of pre-eclampsia and the other hypertensive disorders of pregnancy[J]. Best Practice Res Clin Obstet Gynaecol, 2017, 25(5): 391-403.
- [4] Tang WHW, Kitai T, Hazen SL. Gut microbiota in cardiovascular health and disease[J]. Circ Res, 2017, 120(7): 1183-1196.
- [4] 潘允琪, 李运改, 王坚疆, 等. 复发性尿路感染患者致病性大肠埃希菌分子分型、毒力基因及药物敏感性分析[J]. 检验医学, 2022, 37(2): 141-145.
- [5] Isaacson B, Hadad T, Glasner A, et al. Stromal cell-derived factor 1 mediates immune cell attraction upon urinary tract infection[J]. Cell Rep, 2017, 20(1): 40-47.
- [6] 王建业, 陈列松, 吴移谋. 细菌逃逸中性粒细胞杀伤机制的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2022, 38(1): 89-94.
- [7] Cao Y, Ao T, Wang X, et al. CD300a and CD300f molecules regulate the function of leukocytes [J]. Internat Immunopharmacol, 2021, 93: 107373.
- [8] Dekkema GJ, Abdulahad WH, Bijma T, et al. Urinary and serum soluble CD25 complements urinary soluble CD163 to detect active renal anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis: a cohort study[J]. Nephrol Dial Transplant, 2019, 34(2): 234-242.
- [9] Borrego F. The CD300 molecules: an emerging family of regulators of the immune system[J]. J Am Soc Hematol, 2013, 121(11): 1951-1960.
- [10] 钱俊安, 张琳, 杨萌, 等. 免疫抑制细胞在膀胱肿瘤微环境中的免疫抑制作用机制及特异性治疗研究进展[J]. 山东医药, 2022, 62(24): 107-110.
- [11] 欧兴坤, 李文柱. 粪肠球菌诱导的铜绿假单胞菌重组疫苗诱导小鼠的保护力及细胞免疫应答[J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(4): 430-434.
- [12] 刘玉霞, 尹雁丽, 冯涛, 等. UPEC 尿路感染外周血 NLRP3 和 NLR4 及下游细胞因子水平[J]. 中华医院感染学杂志, 2021, 31(15): 2282-2286.
- [13] 尹晓雪, 刘彦虹. 中性粒细胞胞外诱捕网的产生及其作用的研究[C]. 北京: 中国免疫学会第九届全国免疫学学术大会论文集, 2014: 358-358.
- [14] 李黎, 冯潇宇, 王敏华. 中性粒细胞/淋巴细胞比值及降钙素原对糖尿病酮症酸中毒患者合并细菌感染的预测价值研究[J]. 中国全科医学, 2021, 24(6): 669-673.
- [15] 吴朝霞, 方寅飞, 徐浩. 中性粒细胞 CD64 指数联合降钙素原检测在恶性血液病合并血流细菌感染早期诊断及预后判断中的价值[J]. 中国卫生检验杂志, 2021, 31(9): 1089-1092.
- [16] Nagamatsu K, Hannan TJ, Guest RL, et al. Dysregulation of *Escherichia coli* α -hemolysin expression alters the course of acute and persistent urinary tract infection[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(8): E871-880.

【收稿日期】 2023-01-13 【修回日期】 2023-03-29

【收稿日期】 2023-02-13 【修回日期】 2023-04-20

(上接 666 页)