

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2013.05.003

· 论 著 ·

口服 IL-12 重组双歧杆菌对柯萨奇 B3 病毒诱导 BLAB/c 小鼠心肌炎的影响

陈 重, 刘宝兰, 赖春霞, 阳 晋, 范晓宁, 余治健, 邓启文

(深圳市医院感染诊治新技术研究重点实验室 广东医学院附属深圳南山医院, 广东 深圳 518052)

【摘 要】 目的 构建白细胞介素(IL)-12 基因重组双歧杆菌(pBBADs-IL-12 转化双歧杆菌), 观察 pBBADs-IL-12 转化双歧杆菌是否对柯萨奇 B3 病毒(CVB3)诱导的小鼠心肌炎具有治疗作用。方法 构建小鼠 IL-12(mIL-12)基因的 pBBADs-IL-12 表达载体, 转化双歧杆菌, 体外通过酶联免疫吸附试验及 Western 免疫印迹验证重组双歧杆菌工程菌在 L-阿拉伯糖诱导下 mIL-12 的表达。选取 BLAB/c 小鼠 30 只, 腹腔内注射 CVB3 感染剂量, 14 d 后形成病毒性心肌炎, 将感染的小鼠随机分成 IL-12 组、绿荧光蛋白(GFP)组及生理盐水组。IL-12 组给予口服 pBBADs-IL-12 转化双歧杆菌; GFP 组给予口服 pBBADs-GFP 转化双歧杆菌; 生理盐水组给予腹腔注射无菌 PBS (1 次/d)。所有小鼠均在治疗 14 d 后取心脏标本观察心肌病理变化, 检测心肌病毒滴度, 荧光定量 PCR 分析 Th1 细胞因子水平。结果 治疗 14 d 后, HE 染色显示 IL-12 组小鼠心肌炎程度较 GFP 组和生理盐水组明显减轻; IL-12 组小鼠心脏炎症病变百分比为 $(18 \pm 5)\%$, 心肌的病毒滴度为 (2.89 ± 0.18) pfu/g, 显著低于 GFP 组[分别为 $(31 \pm 6)\%$ 和 (4.83 ± 0.14) pfu/g]及生理盐水组[分别为 $(32 \pm 9)\%$ 和 (4.80 ± 0.15) pfu/g], 差异有统计学意义(均 $P < 0.01$); IL-12 组小鼠心脏 γ -干扰素 [(2.27 ± 0.15) pg/mL] 和肿瘤坏死因子- α [(3.05 ± 0.17) pg/mL] 水平显著高于 GFP 组[分别为 (1.32 ± 0.11) pg/mL 和 (2.37 ± 0.16) pg/mL] 及生理盐水组[分别为 (1.38 ± 0.11) pg/mL 和 (2.37 ± 0.12) pg/mL], 差异有统计学意义(均 $P < 0.01$)。结论 此次研究成功构建了一种新型表达 mIL-12 的双歧杆菌载体, 口服 IL-12 转化双歧杆菌对 CVB3 病毒诱导的小鼠心肌炎具有较好疗效。

【关 键 词】 双歧杆菌; 白细胞介素-12; 柯萨奇 B3 病毒; 心肌炎; 肠道病毒属

【中图分类号】 R542.2⁺1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-9638(2013)05-0330-07

Bifidobacterium as an oral delivery carrier of interleukin-12 for the treatment of coxsackievirus B3-induced myocarditis in the BALB/c mice

CHEN Zhong, LIU Bao-lan, LAI Chun-xia, YANG Jin, FAN Xiao-ning, YU Zhi-jian, DENG Qi-wen (Key Laboratory of New Technology Research on Hospital Infection Diagnosis and Treatment, the Affiliated Shenzhen Nanshan Hospital of Guangdong Medical College, Shenzhen 518052, China)

【Abstract】 Objective To develop a novel oral delivery system for interleukin-12 (IL-12) using genetically engineered *Bifidobacterium longum* (*B. longum*) as the carrier and further evaluate the efficacy of IL-12-expressed *B. longum* on the coxsackievirus B3 (CVB3)-induced myocarditis in mice. **Methods** A mIL-12 gene expression vector pBBADs-IL-12 for *B. longum* was constructed and transformed into *Bifidobacterium*, the expression of mIL-12 in the engineered *B. longum* was identified in vitro by Western Blot and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) after L-arabinose induction. BLAB/c mice were inoculated i. p. with infectious dose of CVB3 for fourteen days and were divided randomly into three groups. The IL-12 group and green fluorescent protein group (GFP group) were

【收稿日期】 2012-08-29

【基金项目】 深圳市科技局重点项目 (No. 200801020; No. 201001023); 深圳市南山区科技局项目 (No. 2011008)

【作者简介】 陈重(1985-), 男(汉族), 广东省潮州市人, 医师, 主要从事微生态及细菌耐药性研究。

【通讯作者】 邓启文 E-mail: qiwendeng@hotmail.com

orally administered with pBBADs-IL-12 and pBBADs-GFP transformed *B. longum* for fourteen days respectively after the inoculation of the virus; saline group was administered i. p. with sterile PBS. All animals were killed in day 14 of treatment, and the murine hearts were dissected aseptically for hematoxylin-eosin (HE) staining, viral titer and RNA extraction for Th1 cell cytokines quantification. **Results** After 14 days of treatment, HE staining revealed that the severity of virus-induced myocarditis in IL-12 group was reduced compared with that of GFP group and saline group; the percentage of cardiac pathological lesions and CVB3 titers in IL-12 group was $(18 \pm 5)\%$ and (2.89 ± 0.10) pfu/g respectively, which was significantly lower than that of GFP group $([31 \pm 6]\%, [4.83 \pm 0.14]$ pfu/g) and saline group $([32 \pm 9]\%, [4.80 \pm 0.15]$ pfu/g), respectively (all $P < 0.01$); levels of interferon- γ (IFN- γ) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in cardiac tissue and supernatants of IL-12 group was (2.27 ± 0.15) pg/mL and (3.05 ± 0.17) pg/mL, respectively, which was significantly higher than that of GFP group $([1.32 \pm 0.11]$ pg/mL, $[2.37 \pm 0.16]$ pg/mL) and saline group $([1.38 \pm 0.11]$ pg/mL, $[2.37 \pm 0.12]$ pg/mL), respectively (all $P < 0.01$). **Conclusion** A novel oral delivery system of *Bifidobacterium* for murine IL-12 has been successfully established. Oral administration of mIL-12-transformed *B. longum* may play a therapeutic role in the treatment of CVB3-induced myocarditis in the mice.

[Key words] *Bifidobacterium*; interleukin-12; coxsackievirus B3; myocarditis; enterovirus

[Chin Infect Control, 2013, 12(5):330-335, 359]

白细胞介素 (IL)-12 是由 p35 和 p40 亚基通过二硫键连接而成的异二聚体细胞因子。研究^[1]数据表明, IL-12 能上调 NK 细胞及 T 细胞产生的 γ -干扰素 (IFN- γ) 水平, 并促进 T 细胞向 Th1 细胞分化。此外, 在固有性和获得性免疫过程中, 传染病患者体内早期产生的 IL-12 具有的广泛影响已有报道^[2-3]。近年来, 越来越多的研究^[4-10]证实了 IL-12 在痘病毒、乙型肝炎病毒、黏液瘤病毒及支原体等引起的传染病治疗过程中均有至关重要的作用, 特别是在柯萨奇 B3 病毒 (coxsackievirus B3, CVB3) 性心肌炎中, IL-12 通过促进心脏 IFN- γ 产生, 巨噬细胞及中性粒细胞生成, 起到延缓小鼠病毒性心肌炎进展的作用^[11]。同时, 外源性 IL-12 在 B 组柯萨奇病毒感染过程中可抑制免疫病理过程, 从而导致疾病向慢性进展^[12]。因此, 在 CVB3 性心肌炎感染中, 患者早期口服 IL-12, 可作为替代方式促进免疫病理过程的发展。目前, 注射途径仍是 IL-12 进入机体的主要方式, 但对于患者而言, 长期使用静脉注射或肌肉注射 IL-12 并不容易。近年, Elías-López 等^[13]报道转基因蕃茄表达 IL-12 治疗早期及晚期结核杆菌感染, 可以减轻患者肺组织的损伤程度; Salvatore 等^[14]证实鼻内给药 IL-12 可用于治疗支原体感染。这些研究表明, 新的给药途径, 如口服或鼻内给药, 能更好地促进 IL-12 在体内的释放。双歧杆菌属是人类远端空肠、回肠、结肠的主要益生菌, 对人类健康大有裨益, 包括预防感染、免疫调节及结肠癌的预防等。近年来, 基因工程改造转化的双歧杆菌已被用作癌症基因治疗及肠道疾病的多种

细胞因子外源基因表达载体^[15-19]。因此, 双歧杆菌或许可以作为肠道表达和分泌 IL-12 合适的载体。本研究旨在构建一种口服给药的表达 IL-12 的双歧杆菌, 评估制备的口服 IL-12 重组双歧杆菌对 CVB3 诱导的小鼠心肌炎的治疗效果。

1 材料与方法

1.1 试剂与器材 小鼠 IL-12 (mIL-12), 由上海英俊公司合成; 基因脉冲发生器和脉冲控制仪, 购自 Bio-Rad 公司; 绿荧光蛋白 (GFP) 来源于 pEGFP-N1 质粒; mIL-12 ELISA Kit 购自美国 Rapidbio 公司; Trizol 试剂盒购自 Invitrogen 公司; 蛋白酶抑制剂 (含 1 mmol/L 苯甲基磺酰基氟化物、10 mmol/L EDTA 及含 1.5 μ mol/L 抑肽酶的 2 mL PBS); 培养基包括 BL 琼脂平板 (Nissui)、MRS 培养基、DMEM 培养基及 RPMI 1640 基础培养基。

1.2 载体的构建 大肠埃希菌-双歧杆菌穿梭表达质粒载体 pBBAD/Xs 参考文献^[18]构建。pBBAD/Xs 包含胞外木聚糖酶 (XynF) 信号肽序列 (Xs) 和从双歧杆菌扩增得到的启动子。GFP 基因表达载体 (pBBADs-GFP) 通过在 pBBAD/Xs 的 NcoI 位点和 XbaI 位点之间插入 GFP 构建而成, 小鼠 IL-12 表达载体 (pBBADs-IL-12) 通过 pBBADs-GFP 质粒在 Bpi I 位点和 Xba I 位点间将 GFP 替换 mIL-12 构建而成, 其目的基因的表达由 L-阿拉伯糖诱导。mIL-12 的氨基酸序列为 Val-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Pro-Gly-Val-Gly^[13]。质粒均被转化入

大肠埃希菌,构建的质粒均通过双酶切及测序验证准确性。

1.3 双歧杆菌的培养、转化及基因的诱导表达与鉴定 转化的双歧杆菌在 MRS 培养基中 37℃ 厌氧培养至对数生长期中期后,转移至 MRS 液体培养基继续培养 24~48 h;随后,双歧杆菌培养液经 4℃, 5 000 g 离心。收集沉淀物,吹打并用含 0.2% L-阿拉伯糖 MRS 肉汤稀释至 $(2.5\sim 3.0)\times 10^7/\text{mL}$ 。为保证培养物中的实际有效菌量,取 10 μL 菌悬液加入含 100 mg/L 氨苄西林的 BL 琼脂平板,经过 24 h 厌氧培养后进行菌落计数。双歧杆菌 NCC 2705、重组质粒 pBBADs-IL-12 及 pBBADs-GFP 参照文献[18]通过电转化制备,使用基因脉冲发生器及脉冲控制仪进行。细菌接种于含 0.05% 的 L-半胱氨酸和 100 mg/L 氨苄西林的 MRS 培养基(1.5%)中,37℃ 厌氧培养 2 d;挑选单克隆菌落,置于 MRS 肉汤培养基中培养。通过聚合酶链反应(PCR)扩增检测目的基因(IL-12 或 GFP)片段及测序鉴定转化菌。转化双歧杆菌在含 100 mg/L 氨苄西林的 MRS 培养基中培养,当 OD_{605} 达 0.6 时,加入 L-阿拉伯糖诱导目的基因表达。经 0.2% 的 L-阿拉伯糖诱导后,分别在 6、12、18、24、48 h 收集培养上清液及细菌颗粒,储存于 -70℃,用于 IL-12 的酶联免疫吸附试验(ELISA)及 Western 免疫印迹(Western Blot)鉴定。其 IL-12 的浓度根据 mIL-12 ELISA Kit 操作规程进行,检测限为 600 pg/mL。细菌上清液及颗粒裂解出的蛋白质经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及电转化转移到硝酸纤维素膜上,重组的 mIL-12 采取 Western Blot 验证其表达水平。

1.4 细胞与病毒株 CVB3 原始病毒株由暨南大学生物医药研究所惠赠^[20]。非洲绿猴肾(Vero)细胞在含有 8% 小牛血清的 DMEM 培养基中培养,融合培养的 Vero 细胞感染 CVB3 病毒,37℃ 孵育至观察到完全的细胞病变效应(一般在 3~5 d),收集培养基,细菌碎片经沉淀、离心、去上清后分装,置于 -80℃ 保存。

1.5 小鼠模型构建及干预和分组 选取 4 周大的雄性 BLAB/c 小鼠 30 只,体重 (15.0 ± 0.5) g。在 5×10^6 50% 组织细胞感染量(TICD50)的浓度下给小鼠腹腔内注射 CVB3 感染剂量,感染 CVB3 的小鼠 14 d 后形成病毒性心肌炎。将感染小鼠随机分为 3 组(每组各 10 只),分别是 IL-12 组、GFP 组及生理盐水组。IL-12 组:给予口服 pBBADs-IL-12 转化双歧杆菌;GFP 组:给予口服 pBBADs-GFP 转化

双歧杆菌;生理盐水组:给予腹腔注射无菌 PBS (1 次/d)至感染后 14 d。重组菌,使用结核菌素注射器及 20 号橄榄尖钢鼻饲管,通过口腔及食道,每天 2 次给予小鼠治疗剂量。所有小鼠均在治疗 14 d 后,使用乙醚麻醉处死。取其心脏标本,标本一半用于病毒滴度水平、细胞因子水平定量分析及总 RNA 提取;另一半用于 HE 染色观察心肌病理变化。另外,手术切除脾脏分离单核细胞(mononuclear cells, MNCs),同时收集每只小鼠的血液及肠内容物标本。此研究经南方医科大学伦理委员会审批并通过。

1.6 血清及肠内容物的 mIL-12 定量分析 收集小鼠血液标本,4℃ 5 000 g 离心,弃上清后置于 -20℃ 保存备用。切除小鼠的小肠及结肠,清洗肠道,在室温下加入蛋白酶抑制剂培养整个肠道 10 min。收集肠内容物并于 4℃ 4 000 g 离心 30 min,将上清液置于 -20℃ 保存。肠内容物上清液中的 mIL-12,使用 mIL-12 ELISA kit 进行 ELISA 检测。

1.7 小鼠心肌病理学分析、病毒滴度定量 HE 染色参照标准方法进行。心肌病变占心脏范围由传统含等距点 121 网格的 point-counting 方法测定^[21]。采用表面分布比例,估算局灶性心肌炎受累的病变范围。每张 HE 染色计数验证面积比例,3 个视野取平均值。在受累的心脏组织中,心肌病变分布相对均匀,故心肌损害的表面比例被认为是可代表整个心脏组织的病理变化。取心尖组织 0.5 mg,经无菌处理后在 2 mL 的 PBS 中混匀,上清经冻融 3 个循环,6 000 g 离心 8 min,后经 RPMI 1640 基础培养基培养,并依次进行 10 倍稀释;Vero 细胞在培养板汇合生长,与上述稀释液混匀,37℃ 孵育 3 h 后,单层固定在 10% 福尔马林磷酸盐缓冲液中,结晶紫染色后观察斑块数量。采用标准斑块形成检测病毒滴度。

1.8 细胞因子的转录定量分析 使用 Trizol 试剂盒提取心脏组织总 RNA,按照试剂盒提供的操作规程逆转录生成 cDNA。实时定量 PCR 检测 IFN- γ 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 的转录水平(内参管家基因 β -肌动蛋白)。反应体系为:94℃ 预变性 2 min, 94℃ 变性 20 s, 58℃ 退火 20 s, 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环。所有 PCR 重复进行一次。使用 ABI Prism 7900 荧光定量 PCR 仪分析扩增产物, β -肌动蛋白作为内参照用于平衡每个样品总 RNA 量的差异。IFN- γ 、TNF- α 和管家基因 β -肌动蛋白引物参照文献[21]合成。

1.9 统计学分析 应用 SPSS 11.0 软件对数据进行单因素方差分析。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为

差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pBBADs-IL-12 转化双歧杆菌表达及分泌 mIL-12 水平 在选取的 5 个时间点内, 上清液中 mIL-12 水平明显高于细菌颗粒中的水平。上清液及颗粒中的 mIL-12 水平均在前 12 h 呈上升趋势, 后 12 h 又呈逐渐下降趋势(见图 1)。上清液及颗粒中均有 mIL-12 的诱导表达, 而未经 L-阿拉伯糖诱导的转化双歧杆菌无 mIL-12 目的片段(图 2, 第 6 泳道)。



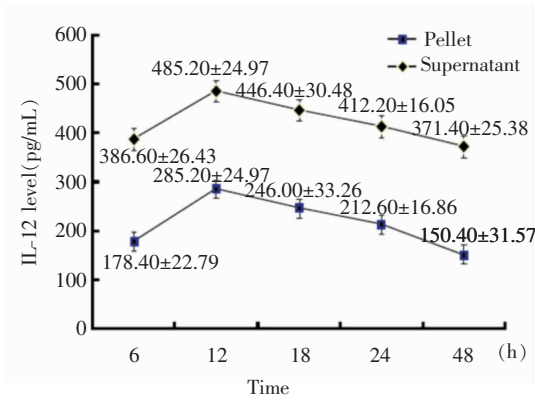
A band of IL-12 was shown in culture supernatant and cell pellet of *B. longum* transformed with pBBADs-IL-12 plasmid after 0.2% L-arabinose induction. Lane 1—3: culture supernatant after 6 h, 12 h and 18 h induction, respectively; Lane 4—5: cell pellet after 6 h and 12 h induction, respectively; Lane 6: culture supernatant of IL-12-transformed *B. longum* before induction.

图 2 Western Blot 验证 mIL-12 的表达

Figure 2 Western Blot analysis of mIL-12 expression in vitro

2.2 心肌病理和病毒复制水平检测 HE 染色显示, IL-12 组小鼠心肌炎症程度较 GFP 组和生理盐水组明显减轻, 见图 3。mIL-12 组小鼠心肌炎症范围占心脏部分的百分比及心脏组织病毒滴度水平显著低于 GFP 组及生理盐水组 ($P < 0.01$), 见图 4。

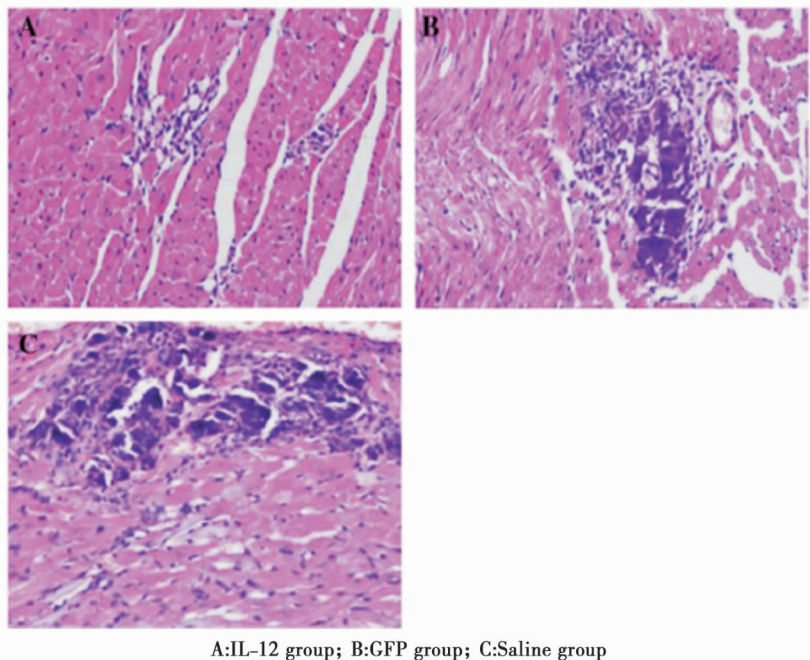
2.3 IFN- γ 及 TNF- α 转录水平检测 IL-12 组小鼠心脏 IFN- γ 和 TNF- α 水平显著高于 GFP 组及生理盐水组(均 $P < 0.01$, 见图 5A、B); mIL-12 组小鼠脾脏单核细胞上清液中的 IFN- γ 及 TNF- α 水平显著高于 GFP 组及生理盐水组(均 $P < 0.01$, 见图 5C、D)。



ELISA in vitro after 0.2% L-arabinose induction at different time

图 1 ELISA 检测重组 pBBADs-IL-12 转化双歧杆菌表达的 mIL-12 水平曲线

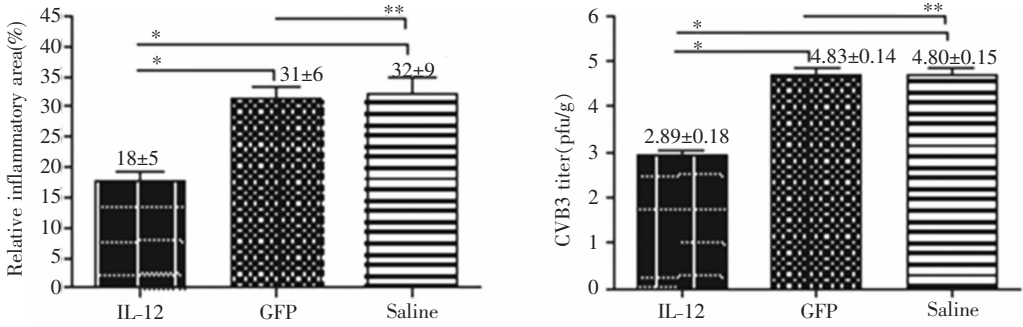
Figure 1 Recombinant IL-12 expression analysis



A:IL-12 group; B:GFP group; C:Saline group

图 3 各组小鼠病毒性心肌炎心肌病变严重程度(HE 染色)

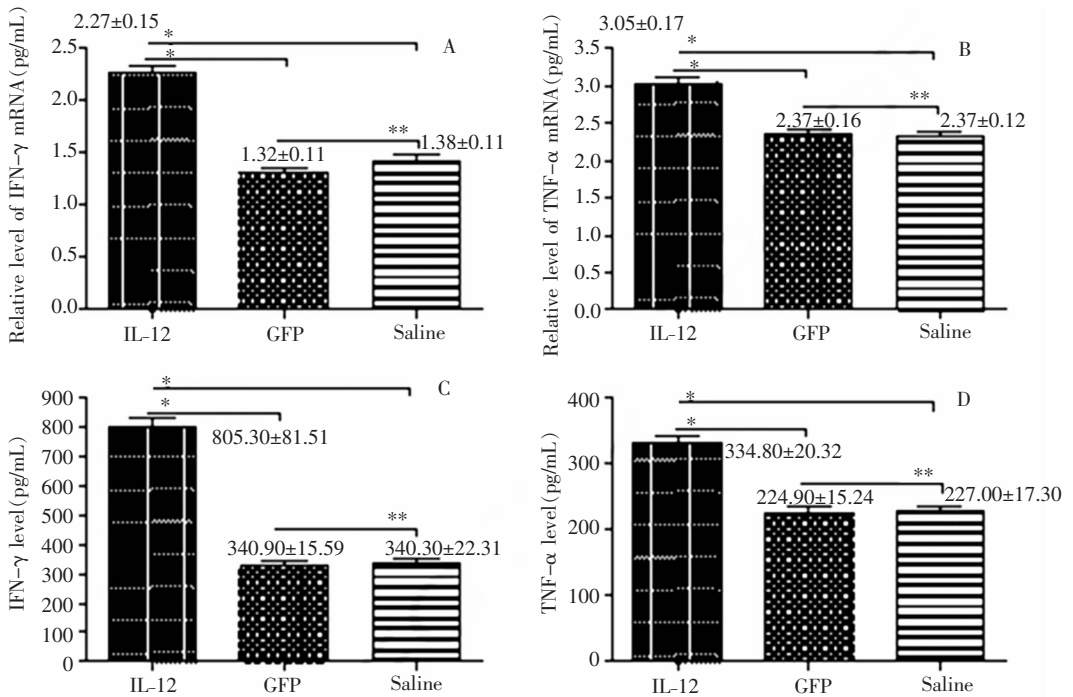
Figure 3 The severity of virus-induced myocarditis in each group (HE staining)



* :IL-12 group vs GFP group and saline group, respectively $P < 0.01$; * * :GFP group vs saline group, $P > 0.05$

图 4 各组小鼠心脏炎症病变比例、病毒滴度的表达

Figure 4 The percentage of cardiac pathological lesions and CVB3 titers in each group



* :IL-12 group vs GFP group and saline group, respectively, $P < 0.01$; * * :GFP group vs saline group, $P > 0.05$

图 5 各组小鼠 IFN-γ 和 TNF-α 的表达

Figure 5 Levels of IFN-γ and TNF-α in cardiac tissues and supernatants of each group

3 讨论

以往研究已证实,通过静脉、腹腔或皮下注射 mIL-12 对家兔及人类有治疗作用。本研究经重组双歧杆菌为载体表达 IL-12 的新型口服给药方法,口服 IL-12 转化双歧杆菌的小鼠,其肠内容物上清液及细胞颗粒中均检测到 IL-12。同时,我们证实 BALB/c 小鼠经口服 IL-12 转化双歧杆菌后(12 h),血清及肠道内容物中的 IL-12 浓度明显升高,提示重组菌得以在肠道内表达及吸收 IL-12。说明重组

的 IL-12 转化双歧杆菌可在肠道内作为 IL-12 基因表达及分泌的合适载体,可作为新型 IL-12 口服给药载体,用于疾病的治疗。

CVB3 属小 RNA 病毒科中的肠病毒,是急性病毒性心肌炎主要病原体之一。心肌炎的致病过程表现为起始的病毒感染、自然免疫反应和最终的心肌结构功能的重构^[22]。传统的理论认为,CD4+ Th1 细胞在病毒感染的获得性免疫过程中起着至关重要的作用,它通过分泌 IFN-γ 和 TNF-α 有效清除入侵的病毒;检测辅助性 T 细胞相关的两种细胞因子

(IFN- γ 和 TNF- α) 水平的表达与分泌, 评估口服 pBBADs-IL-12 转化双歧杆菌对心肌的免疫刺激作用, IL-12 通过刺激 IFN- γ 和 TNF- α 的分泌起到协同控制感染的作用。研究^[6,11]报道, CVB3 病毒性心肌炎中 IL-12 或 IL-12 受体缺失可促进疾病的发展及病毒的复制。本研究 IL-12 组小鼠(口服 IL-12 转化双歧杆菌)心脏的病理炎症及病变坏死区域显著减轻, 心脏病毒滴度水平明显降低, 提示此重组转化双歧杆菌可能部分通过抑制 CVB3 早期病毒感染阶段的病毒复制来改善心肌炎症。同时, IL-12 转化双歧杆菌能上调 Th1 细胞相关细胞因子即 IFN- γ 和 TNF- α , 同时也增加了脾脏淋巴细胞中 IFN- γ 和 TNF- α 的分泌, 说明此重组双歧杆菌制剂能在抑制病毒过程中提高 CD4+ Th1 细胞的表达。

基因转化双歧杆菌已作为外源基因传递载体, 成功应用于多种疾病的治疗^[5,15-19]。双歧杆菌对人类健康有很多益处, 包括预防感染、免疫调节作用, 这提示双歧杆菌在胃肠道疾病中可能是人体肠道基因表达合适的载体。为此, 我们构建了 mIL-12 转化双歧杆菌, 它具有两方面的优势, 即肠道内的强定植能力和生理传播作用^[18,23]。本研究中, IL-12 转化双歧杆菌对治疗小鼠 CVB3 病毒性心肌炎的疗效得到证实, 但仍需进一步实验评估 IL-12 转化双歧杆菌是否可添加于益生菌的酸奶或饮食中, 以及它是否可应用于治疗患病病毒性心肌炎的高危人群。

综上所述, 我们通过构建大肠埃希菌-双歧杆菌穿梭载体, 采用这种新型 IL-12 转化双歧杆菌口服给药方式对 mIL-12 在小鼠体内、外的表达进行了分析, 证实了口服给药 IL-12 转化双歧杆菌对 CVB3 诱导小鼠心肌炎的治疗效果, 但仍需更多研究来探讨此种新的给药方式在患者中的临床应用价值。

[参考文献]

[1] Rodriguez-Madoz J R, Liu K H, Quetglas J I, *et al.* Semliki forest virus expressing interleukin-12 induces antiviral and antitumoral responses in woodchucks with chronic viral hepatitis and hepatocellular carcinoma[J]. J Virol, 2009, 83(23): 12266 - 12278.

[2] Ruan S, McKinley L, Zheng M, *et al.* Interleukin-12 and host defense against murine *Pneumocystis pneumonia* [J]. Infect Immun, 2008, 76(5): 2130 - 2137.

[3] Hama Y, Kurokawa M, Imakita M, *et al.* Interleukin-12 is a primary cytokine responding to influenza virus infection in the respiratory tract of mice[J]. Acta Virol, 2009, 53(4): 233 - 240.

[4] Wang Y, Chaudhri G, Jackson R J, *et al.* IL-12p40 and IL-18 play pivotal roles in orchestrating the cell-mediated immune response to a poxvirus infection[J]. J Immunol, 2009, 183(5): 3324 - 3331.

[5] Berraondo P, Prieto J, Gonzalez-Aseguinolaza G. Advances in interleukin-12 gene therapy for acquired liver diseases [J]. Curr Gene Ther, 2009, 9(2): 62 - 71.

[6] Kapil P, Atkinson R, Ramakrishna C, *et al.* Interleukin-12 (IL-12), but not IL-23, deficiency ameliorates viral encephalitis without affecting viral control[J]. J Virol, 2009, 83(12): 5978 - 5986.

[7] Rigopoulou E I, Suri D, Chokshi S, *et al.* Lamivudine plus interleukin-12 combination therapy in chronic hepatitis B: antiviral and immunological activity[J]. Hepatology, 2005, 42(5): 1028 - 1036.

[8] Seet B T, Johnston J B, Brunetti C R, *et al.* Poxviruses and immune evasion[J]. Annu Rev Immunol, 2003, 21: 377 - 423.

[9] Stanford M M, Barrett J W, Gilbert P A, *et al.* Myxoma virus expressing human interleukin-12 does not induce myxomatosis in European rabbits[J]. J Virol, 2007, 81(22): 12704 - 12708.

[10] Nolt D, Flynn J L. Interleukin-12 therapy reduces the number of immune cells and pathology in lungs of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Infect Immun, 2004, 72(5): 2976 - 2988.

[11] Fairweather D, Yusung S, Frisancho S, *et al.* IL-12 receptor beta 1 and Toll-like receptor 4 increase IL-1 beta- and IL-18-associated myocarditis and coxsackievirus replication[J]. J Immunol, 2003, 170(9): 4731 - 4737.

[12] Potvin D M, Metzger D W, Lee W T, *et al.* Exogenous interleukin-12 protects against lethal infection with coxsackievirus B4[J]. J Virol, 2003, 77(15): 8272 - 8279.

[13] Elias-López A L, Marquina B, Gutiérrez-Ortega A, *et al.* Transgenic tomato expressing interleukin-12 has a therapeutic effect in a murine model of progressive pulmonary tuberculosis [J]. Clin Exp Immunol, 2008, 154(1): 123 - 133.

[14] Salvatore C M, Fonseca-Aten M, Katz-Gaynor K, *et al.* Intranasal interleukin-12 therapy inhibits *Mycoplasma pneumoniae* clearance and sustains airway obstruction in murine pneumonia[J]. Infect Immun, 2008, 76(2): 732 - 738.

[15] Li X, Fu G F, Fan Y R, *et al.* Bifidobacterium adolescentis as a delivery system of endostatin for cancer gene therapy: selective inhibitor of angiogenesis and hypoxic tumor growth[J]. Cancer Gene Ther, 2003, 10(2): 105 - 111.

[16] Reyes Escogido M L, De leon Rodriguez A, Barba de la Rosa A P. A novel binary expression vector for production of human IL-10 in *Escherichia coli* and *Bifidobacterium longum* [J]. Biotechnol Lett, 2007, 29(8): 1249 - 1253.

[17] Moon G S, Pyun Y R, Park M S, *et al.* Secretion of recombinant pediocin PA-1 by *Bifidobacterium longum*, using the signal sequence for bifidobacterial α -amylase[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(9): 5630 - 5632.

3 讨论

PDCA 循环又称“戴明环”，是由美国质量管理专家戴明提出的一种科学、有效解决问题的方法。其涵盖了前馈控制、同期控制、反馈控制 3 个环节，上一级管理循环是下一级管理循环的依据，下一级管理循环又是对上一级管理循环的保证，以滚雪球方式不断循环，一阶段终点即为新循环的起点，环环相连，螺旋上升，形成持续改进的长效机制，对管理目标实行持之以恒的干预^[6]。在 2011 年三级综合医院评审标准实施细则中，引入了 PDCA 循环管理，要求通过质量管理计划的制订及组织实现的过程，对各项医疗质量和安全管理实现持续改进^[7]。在循环实施初期，很多医生担心不使用抗菌药物会发生感染，引来医疗纠纷；有些患者认为与其感染后使用抗菌药物，不如一开始就使用以减少风险和痛苦。针对医患的担忧，本研究用数据说明 I 类切口手术不使用抗菌药物的可行性，并强调抗菌药物管理的重要性和卫生部整治的决心，向患者宣教滥用抗菌药物的危害性。通过一段时间的强效管理，I 类切口手术不使用抗菌药物并未增加术后感染率，大大增强了临床医生的信心，也使他们后期更加积极地配合。

本院应用 PDCA 循环管理对 I 类切口手术预防用药进行规范后，I 类切口手术预防用药率逐步下降，接近卫生部 2011 年《全国抗菌药物临床应用专项整治活动方案》中 I 类切口手术预防性用药不

超过 30% 的要求。外科医生合理使用抗菌药物的意识普遍增强，I 类切口手术预防性用药指征、预防性用药时间和选药逐步规范，不合理用药现象得到控制。术后预防用药时间较前规范，但仍有提升的空间，在下一个循环管理中应将重点放在术后用疗程的控制上，着重加强医务人员无菌操作的意识，以减少手术感染机会；积极与临床医生探讨切口感染判断标准、延长用药指征等学术问题，以减少盲目延长疗程的不良习惯。

综上所述，通过 PDCA 循环管理，在规范抗菌药物合理应用中取得显著成效，经验值得推广。

[参考文献]

- [1] Frederrick S, Southwick. 感染性疾病临床短期教程[M]. 郑明华, 译. 天津: 天津科技翻译出版公司, 2011: 1.
- [2] 黎小妍, 张平. 围手术期抗菌药物应用现状及对策分析[J]. 中国处方药, 2012, 10(3): 33-36.
- [3] 李宝珍, 平宝华, 关仙花. I 类切口手术预防使用抗菌药物的调查分析[J]. 中国感染控制杂志, 2009, 8(2): 122-123.
- [4] 罗圣平, 陆向红, 罗晓波, 等. 株洲市区二级以上医院外科清洁手术预防性应用抗菌药物调查分析[J]. 中国医院用药评价与分析, 2011, 11(7): 586-590.
- [5] 中华医学会外科学分会, 中华外科杂志编辑委员会. 围手术期预防应用抗菌药物指南[J]. 中华外科杂志, 2006, 44(23): 1594-1596.
- [6] 方芸. PDCA 在医院临床药学管理中的应用[J]. 中国药房, 2009, 20(7): 519-521.
- [7] 中华人民共和国卫生部. 三级综合医院评审标准实施细则(2011 年版)[S]. 北京, 2011.

(上接第 335 页)

- [18] Long R T, Zeng W S, Chen L Y, et al. *Bifidobacterium* as an oral delivery carrier of oxyntomodulin for obesity therapy: inhibitory effects on food intake and body weight in overweight mice[J]. Int J Obes (Lond), 2010, 34(4): 712-719, 427.
- [19] Yao J, Wang J Y, Lai M G, et al. Treatment of mice with dextran sulfate sodium-induced colitis with human interleukin-10 secreted by transformed *Bifidobacterium longum* [J]. Mol Pharm, 2011, 8(2): 488-497.
- [20] Wang Y F, Wang X Y, Ren Z, et al. Phyllaemblicin B inhibits coxsackie virus B3 induced apoptosis and myocarditis[J]. Anti-

viral Res, 2009, 84(2): 150-158.

- [21] Yuan J, Yu M, Lin Q W, et al. Th17 cells contribute to viral replication in coxsackievirus B3-induced acute viral myocarditis [J]. J Immunol, 2010, 185(7): 4004-4010.
- [22] Dennert R, Crijns H J, Heymans S. Acute viral myocarditis [J]. Eur Heart J, 2008, 29(17): 2073-2082.
- [23] Deng Q, Zeng W, Yu Z. Signal peptide of Arabinosidase enhances secretion of interferon-alpha2b protein by *Bifidobacterium longum* [J]. Arch Microbiol, 2009, 191(9): 681-686.