

猪链球菌 2 型对扁桃腺上皮细胞的黏附和侵袭作用

曾巧英^{1,2} 陆承平^{1*}

(¹ 南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室 南京 210095)

(² 甘肃农业大学动物医学院 兰州 730070)

摘 要 猪链球菌 2 型(SS2)是重要的人畜共患病病原体,溶菌酶释放蛋白(MRP)是 SS2 的主要毒力因子之一。用天然表达 MRP 的江苏分离株 HA9801 和不表达 MRP 的上海分离株 SH006444,研究 SS2 对仔猪扁桃腺上皮细胞的黏附和侵袭作用。黏附计数结果表明,HA9801(MRP⁺)和 SH006444(MRP⁻)均能对扁桃腺上皮细胞高水平黏附。扫描和透射电镜均观察到 HA9801 的高水平黏附现象,黏附部位是细胞膜和细胞微绒毛,并观察到细胞膜上有链球菌正处于内化过程中。裂解计数结果表明,HA9801 有低度侵袭力,SH006444 未检测到侵袭力。结果提示,扁桃腺是 SS2 的定殖器官和感染门户,MRP⁺ 菌株黏附后直接侵入细胞内是其穿过扁桃腺上皮细胞屏障的机制之一。

关键词 SS2, 细胞黏附, 细胞侵袭

中图分类号 Q93 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(2004)04-0523-03

猪链球菌 2 型(SS2)是重要的人畜共患病病原体,主要感染人和仔猪,实验动物中,豚鼠、Balb/c 小鼠和兔均易感^[1],主要引起脑膜炎、肺炎、心内膜炎、关节炎、败血症及突发性死亡等,引起世界范围内高度重视。溶菌酶释放蛋白(Muramidase-released protein,MRP)是 SS2 的胞壁大分子糖蛋白,是 SS2 的主要毒力因子之一^{〔2,3〕}。SS2 在扁桃腺中的带菌率很高^[4],推测其致病过程开始于对扁桃腺的定殖,由此侵入血流,随血流扩散到机体多种器官引起多种病症^[5],但 SS2 对扁桃腺上皮细胞的确切作用目前仍然不明。本试验研究 SS2 对仔猪扁桃腺上皮细胞的黏附和侵袭作用,旨在从细胞水平上探明 SS2 突破扁桃腺屏障建立感染的机制。

1 材料和方法

1.1 细菌培养

SS2 江苏分离强毒株 HA9801(MRP⁺)系姚火春等^[6]分离保存,上海分离株 SH006444(MRP⁻)和 B 群链球菌 00002 系上海兽医站刘佩红兽医师惠赠。用 THB 血平板复苏菌株,37℃ 培养 24h,挑单菌落接种于 THB 肉汤,培养 18h,再按 1% 量接种于 THB(Todd Hewitt Broth)肉汤,培养 12h 后,经 6000r/min 离心 15min,0.1mol/L PBS(pH7.4)洗两遍并制成 1×10^8 CFU/mL 菌悬液。

1.2 细胞培养

仔猪扁桃腺上皮细胞为自行培养,系原代分离纯化后经 SV40-T 抗原转化,HEp-2 细胞系本实验室保存,作为人源细胞参照。所有细胞培养于 24 孔板,用 2mmol/L L-Glu-10% NCS-RPMI1640(Gibco)营养液、置 37℃、5% CO₂、饱和湿度下

培养,营养液中不加抗生素,待长满单层后用于试验,试验时 HEp-2 细胞每个处理设 6 个重复,扁桃腺上皮细胞 3 个重复,整个试验重复两次进行。

1.3 黏附和侵袭记数试验

给上述两种活力旺盛的各孔单层细胞换新营养液并加入菌悬液,使其终浓度为 1×10^7 CFU/mL,置 37℃ 孵育 2h(黏附计数)或分别 2、3、4、5、6h(侵袭计数),弃培养液,PBS 洗涤,然后按下列程序操作:在黏附记数试验时,用 0.1% 胰酶-0.02% EDTA 消化使细胞脱下,用 RPMI1640 完全营养液 0.5mL 制成悬液并做 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 的递倍稀释,各稀释度取 100μL 接种 THB 平板,37℃ 培养 48h,记录平均菌落数;在侵袭记数试验时,加含 100μg/mL 庆大霉素的营养液 37℃ 继续孵育 2h,PBS 洗涤,再加 300μL 含 1% Triton X-100 的 PBS,室温 5min,并用巴氏吸管吹打,直接取样涂布 THB 平板,37℃ 培养 48h,记录菌落数。设 B 群链球菌 00002 株为阳性对照^[7],细胞营养液为阴性对照。HA9801 和 SH006444 两菌株同法进行。

1.4 HA9801 黏附和侵袭仔猪扁桃腺上皮细胞的电镜观察

方法同黏附记数试验,扫描电镜用细胞在细胞板内加经鼠尾胶原包被的盖玻片,在加入 HA9801 菌液黏附孵育 2h 后,小心夹取盖玻片,常规方法固定制片,用 HitachiS-3000N 扫描电镜观察。透射电镜用细胞不加盖玻片,和 HA9801 菌液共孵育 2h(观察黏附)或 5h(观察侵袭)后,PBS 充分洗涤,用无菌细胞刮刮下细胞,1000g 离心 5~10min,弃上清,3% 戊二醛 4℃ 固定细胞沉淀 1h 后换新固定液继续固定过夜,离心除去固定液,PBS 充分洗涤,加一滴 2% 琼脂使形成琼脂

基金项目:国家'973 项目"子课题(G1999011906)

* 通讯作者。Tel/Fax:86-25-84396517;E-mail:lucp@njau.edu.cn

作者简介:曾巧英(1968-),女,副教授,博士,研究方向为预防兽医学。Tel:86-931-7631229;Fax:86-931-7631220;E-mail:zqyziyi@yahoo.com.cn

收稿日期:2003-09-10,修回日期:2004-02-13

块,常规方法固定,超薄切片,枸橼酸铅和醋酸铀双重重金属染色, JM101 透射电镜下观察。

1.5 统计分析

本试验所有测试结果采用方差分析 F 检验进行统计学分析,以 $P < 0.05$ 为差异显著,以 $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 SS2 对扁桃腺上皮细胞的黏附作用

2.1.1 黏附计数试验 HA9801 和 SH006444 对仔兔扁桃腺和 HEp-2 均具有黏附力,且在两细胞间无显著差异 ($P > 0.05$)。HA9801(MRP^+) 的黏附菌数显著高于 SH006444(MRP^-) ($P < 0.05$)。

2.1.2 电镜观察 扫描电镜观察扁桃腺上皮细胞表面有大量球菌成簇黏附,清晰可见排列呈单个、成双或短链(图 1)。

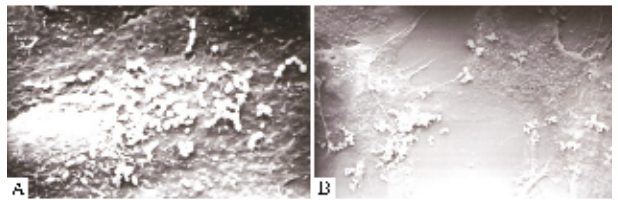


图 1 HA9801 黏附仔兔扁桃腺上皮细胞的扫描电镜观察 (A. 3700 × , B. 1600 ×)

Fig.1 Scanning electron micrograph demonstrating HA9801 adhering to tonsil epithelial cells from neonatal rabbit (A. 3700 × , B. 1600 ×)

透射电镜观察,黏附 2h,扁桃腺上皮细胞形态正常,活力旺盛,细胞微绒毛稠密,细胞表面有球菌高密度黏附,菌体椭圆形,单或双球菌,紧密结合于细胞膜或细胞表面微绒毛上,有的被微绒毛紧紧包裹正处于内化过程中(图 2-A)。黏附 5h,被黏附的细胞表面微绒毛脱落,胞膜吐泡,有明显的凋亡迹象(图 2-B)。

2.2 SS2 对仔兔扁桃腺上皮细胞的侵袭力

侵袭计数结果表明,菌液浓度为 1×10^7 CFU/mL,孵育时间为 5h 时,HA9801 对仔兔扁桃腺上皮细胞有低度侵袭力(低于 1 CFU/5000 个细胞),每个细胞孔中仅有 10 ~ 20CFU,孵育时间为 2、3、4、6h 时,均未发现有细菌侵袭;SH006444 对上述两种细胞均无侵袭力。对照菌株 B 群链球菌 00002 株对仔兔扁桃腺上皮细胞的侵袭力低于 HEp-2 细胞。透射电镜观察孵育 5h 的扁桃腺上皮细胞,发现被细胞膜紧紧包裹的链球菌,正处于内化过程中,但胞内未观察到链球菌的存在(图 2-C、D)。

3 讨论

扁桃腺上皮细胞难以培养,因此和 SS2 相互作用的研究尚未见报道。本试验首次采用经 SV40 - T 抗原转化的原代扁桃腺上皮细胞,发现 SS2 可对其高水平黏附,且有低度侵袭力,该结果从细胞水平上证明,扁桃腺是 SS2 的定殖器官和感染门户,提示 MRP^+ SS2 菌株首先黏附于扁桃腺上皮细胞,然后直接侵入细胞内是其穿过扁桃腺上皮细胞屏障的机制之一。该结果印证了如下试验,Clifton-Hadley 将 SPF 猪和 SS2 感染猪混养进行的同居感染试验,从同居 2h 开始就能在

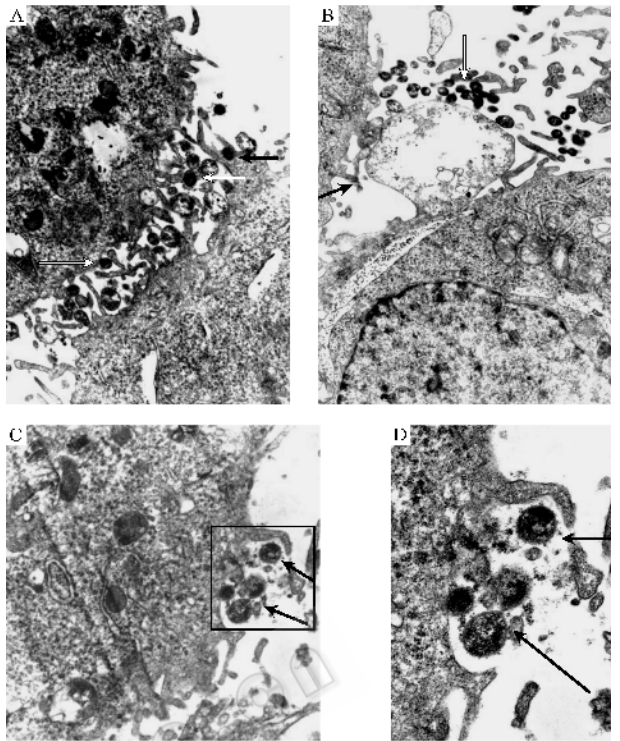


图 2 HA9801 黏附仔兔扁桃腺上皮细胞的透射电镜观察

Fig.2 Transmission electron micrograph demonstrating HA9801 adhering to tonsil epithelial cells from neonatal rabbit

A. Showing HA9801 adhering to cell membrane (arrow) or cell microvilli (arrowhead) or being enclosed in cell microvilli (arrowhead) (3000 ×); B. Showing the budding of cell membrane (arrow) being adhered by HA9801 (arrowhead) (7000 ×) and D (15000 ×). Showing HA9801 being internalized by cell membrane (arrow).

扁桃腺中分离到 SS2 菌株,随后在血液中分离到 SS2 菌株,最后发病时,在大脑实质和脑脊液或肺脏组织等均能分离到 SS2 菌株;从同居、发病直至死亡的整个过程中,均能从扁桃腺分离出 SS2 菌株,而在鼻腔、消化道、泌尿生殖道中均未分离到,据此认为扁桃腺是 SS2 的定殖器官和感染门户^[5,8,9,10]。

透射电镜观察到细胞膜上正处于内化过程中的链球菌,表明进入细胞内是在 SS2 黏附后发生,且侵袭计数表明 HA9801(MRP^+) 对扁桃腺上皮细胞和 HEp-2 细胞均有低度侵袭力,对澄清以往关于 SS2 是否具有侵袭能力的争议提供了新的证据。没有发现侵入到胞内的细菌,是因为侵袭率低,观察细胞数目有限。Norton 等^[7]曾用相差荧光显示法观察到 SS2 侵袭到 HEp-2 细胞内,但裂解计数法未检测到,而 Charland 没有发现侵袭现象^[11]。作者认为各研究小组的试验结果的差异可能和不同的试验条件有关,SS2 的侵袭不是一个偶然的事件。

本研究中 SH006444(MRP^-) 对扁桃腺上皮细胞和 HEp-2 细胞均没有侵袭力,但天然或人工敲除 *mvp* 基因所得的 MRP^- 菌株和 MRP^+ 菌株在临床上具有相同的致病力^[12],提示 MRP^- 菌株存在其它突破机体的扁桃腺防御屏障的未知机制。肺炎链球菌和脑膜炎奈瑟菌黏附细胞后,可导致非溶血素相关性的细胞间隙增大,细胞间连接破坏,细菌得以从细胞间隙穿过^[13,14], MRP^- 菌株是否有此机制,有待研究。

参 考 文 献

- [1] Robertson I D , Blackmore D K . Experimental studies on the comparative infectivity and pathogenicity of *Streptococcus suis* type 2 . *Epidemiol Infect* , 1990b , **105** :479 – 484 .
- [2] Wisselink H J , Smith H E , Stockhofe-Zurwieden N , et al . Distribution of capsular types and production of muramidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries . *Vet Microbiol* , 2000 , **74** (3) :237 – 248 .
- [3] Berthelot-Herault F , Morvan H , Keribin A M , et al . Production of muramidase-released protein (MRP) , extracellular factor (EF) and suilysin by field isolates of *Streptococcus suis* capsular types 2 , 1/2 , 9 , 7 and 3 isolated from swine in France . *Vet Res* , 2000 , **31** (5) :473 – 479 .
- [4] Clifton-Hadley F A , Alexander T J , Enright M R , et al . Monitoring herds for *Streptococcus suis* type 2 by sampling tonsils of slaughter pigs . *Vet Rec* , 1984 , **115** (22) :562 – 564 .
- [5] Gottschalk M , Segura M . The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis* : the unresolved questions . *Vet Microbiol* , 2000 , **76** (3) :259 – 272 .
- [6] 姚火春 陈国强 陆承平 . 链球菌 1998 分离株病原特性鉴定 . 南京农业大学学报 , 1999 , **22** (2) :67 – 70 .
- [7] Norton P M , Rolph C , Ward P N et al . Epithelial invasion and cell lysis by virulent strains of *Streptococcus suis* is enhanced by the presence of suilysin . *FEMS Immunol Med Microbiol* , 1999 , **26** :25 – 35 .
- [8] Clifton-Hadley F A , Alexander T J . The carrier site and carrier rate of *Streptococcus suis* type II in pigs . *Vet Rec* , 1980 , **107** (2) :40 – 41 .
- [9] Clifton-Hadley F A . Studies of *Streptococcus suis* type 2 infection in pigs . *Vet Res Commun* , 1984 , **8** (3) :217 – 227 .
- [10] Clifton-Hadley F A , Alexander T J , Upton I , et al . Further studies on the subclinical carrier state of *Streptococcus suis* type 2 in pigs . *Vet Rec* , 1984 , **114** (21) :513 – 518 .
- [11] Charland N , Nizet V , Rubens C E , et al . *Streptococcus suis* serotype 2 interactions with human brain microvascular endothelial cells . *Infect Immun* , 2000 , **68** (2) :637 – 643 .
- [12] Smith H E , Vecht U , Wisselink H J , et al . Mutants of *Streptococcus suis* type 1 and 2 impaired in expression of muramidase – released protein and extracellular protein induce disease in newborn germfree pigs . *Infect Immun* , 1996 , **64** :4409 – 4412 .
- [13] Virji M , Alexandrescu C , Ferguson D J P , et al . Variation of the expression of pili : the effect on adherence of *Neisseria meningitis* with cultured human endothelial cells . *Mol Microbiol* , 1992 , **6** :1271 – 1279 .
- [14] Geelen S , Bhattacharyya C , Tuomanen E . The cell wall mediates pneumococcal attachment to and cytopathology in human endothelial cells . *Infect Immun* , 1993 , **61** :1538 – 1543 .

Adhesion and Invasion of *Streptococcus suis* Type 2 to Tonsil Epithelial Cells from Neonatal Rabbit

ZENG Qiao-Ying^{1,2} LU Cheng-Ping^{1*}

(¹ Key laboratory of Animal Disease Diagnostic and Immunology , Ministry of Agriculture , Nanjing Agricultural University , Nanjing 210095 , China)

(² Faculty of Animal Medicine , Gansu Agricultural University , Lanzhou 730070 , China)

Abstract : *Streptococcus suis* type 2 (SS2) is one of the most important zoonotic pathogens world-wide . Muramidase-released protein (MRP) is a key virulence factor of SS2 . In this paper , both SS2 strains , HA9801 , naturally with MRP expression , isolated from Jiangsu province and SH006444 , without MRP , from Shanghai , were used to study adhesion and invasion of SS2 to tonsil epithelial cells from neonatal rabbit . Adhesion counting assay demonstrated high adhesive levels of both strains . Scanning and transmission electron microscope observation further showed a dense adhering of HA9801 at cellular membrane and microvilli , and HA9801 cells were being internalized by the cell membrane . Lysis counting assay revealed a weak invasion of HA9801 and no invasion of SH006444 to tonsil epithelial cells from neonatal rabbit . Findings of this study suggested , firstly , the tonsil served as the colonizing site and an entrance of SS2 in establishment of infection ; secondly , the direct invasion into epithelial cells following their adhesion was one of their mechanisms of breaking through the tonsil epithelial cell barrier .

Key words : *Streptococcus suis* type 2 , Cell adhesion , Cell invasion