

猪链球菌 2 型溶菌酶释放蛋白诱导上皮细胞融合和凋亡

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)溶菌酶释放蛋白(MRP)的致病作用迄今不明,为此,以 HEp-2 细胞为上皮细胞体外模型,将纯化的 MRP 溶液和细胞共孵育,光镜观察,发现 MRP 可诱导细胞发生两种典型形态学变化:一是诱导细胞融合形成多核巨细胞,随后巨细胞发生凋亡;二是诱导单个细胞凋亡。透射电镜观察和流式细胞分析确证 MRP 具有诱导上皮细胞凋亡的功能,凋亡率达 18%。证明 MRP 可单独作为 SS2 的毒力因子。

关键词:猪链球菌 2 型,溶菌酶释放蛋白,细胞融合,细胞凋亡

中图分类号:Q932 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2003)03-0407-06

猪链球菌病是猪的主要传染病之一,其病原体猪链球菌有 35 个血清型,其中 2 型(*Streptococcus suis* type 2, SS2)是毒力最强、危害最严重、流行最广泛的型之一^[1,2]。SS2 主要可引起猪和人的脑膜炎、败血症及突发性死亡,是一种重要的人畜共患病病原体,故引起世界范围内的高度重视。我国于 1998 年曾在江苏省暴发流行^[3]。136kD 的溶菌酶释放蛋白(Muramidase released protein, MRP)是 SS2 的胞壁大分子糖蛋白,其表达和菌株的致病力显著相关,是 SS2 重要的毒力因子之一^[1-5]。

毒力因子及其致病机理是疫病防治的理论基础,从而成为研究的焦点。国内外均已对 MRP 进行过大量研究^[6,7],但迄今为止,究竟 MRP 在 SS2 致病过程中有何作用,未见有报道。本试验以 HEp-2 为模型,研究 MRP 对上皮细胞的致病作用,旨在探明 MRP 和 SS2 毒力相关的机理所在。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

HEp-2 细胞系本实验室保存,用含 10% 无支原体新生犊牛血清(Gibico) 2mmol/L L-Gln 的 RPMI1640(Gibico)常规方法培养,营养液中不加抗生素。

1.2 MRP 的纯化

SS2 江苏分离株 HA9801(MRP⁺)系姚火春等分离并保存^[3]。用 THB(Todd hewitt broth)血平板复苏菌株,37℃培养 24 h,挑单菌落接种于 THB 肉汤,培养 18 h,再按 1%量接种于 6 000 mL THB 肉汤,培养 18 h 后 6 000 r/min 离心收集并超声波裂解菌体,然后

基金项目:国家 973 项目子课题(G1999011906)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-25-4396517;E-mail:lcup@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;E-mail:zqyzyi@yahoo.com.cn

收稿日期:2002-08-16,修回日期:2002-11-25

40000 r/min离心,取沉淀即为细胞壁,用溶菌酶降解细胞壁后得 MRP 粗提物,后者再经 pH3 ~ 10 和 pH3 ~ 5 连续两次制备电泳(The rotofor system, BIO RAD)得电泳纯 MRP,其纯化过程中不加防腐剂和蛋白酶抑制剂。4℃静置后蛋白沉淀析出,弃上清,将沉淀用 0.1 mol/L PBS (pH7.4) 配制成 0.4 mg/mL 的原液,用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌。

1.3 光镜观察

用 RPMI1640 完全营养液稀释 MRP 原液制成 40 μ g/mL 和 4 μ g/mL 的工作液,两种浓度的 MRP 溶液同时同法进行试验。给长满单层的 HEp-2 细胞(内置盖玻片)换上 MRP 溶液,置 37℃ 分别孵育 1、2、3、4、5、6、7、8、9、11 和 12 h,到设定时间后,分别用镊子夹出盖玻片,PBS 充分洗涤,用甲醇:冰乙酸(3:1)固定,Giemsa 染色,镜检。用 RPMI1640 完全营养液同倍稀释配制 MRP 原液用的 PBS(0.1 mol/L, pH7.4)作阴性对照。

1.4 透射电镜观察

参照 Nizet 等的方法^[8]。将 40 μ g/mL 的 MRP 工作液加入长满单层的 HEp-2 细胞(不加盖玻片),37℃ 孵育 5 h,PBS 充分洗涤,用无菌细胞刮刮下细胞,1 000 r/min 离心 5 ~ 10 min,弃上清,沿管壁给细胞沉淀中加入 3% 戊二醛 4℃ 固定 1 h,将细胞铲离管底,换新固定液继续固定过夜。离心除去固定液,PBS 充分洗涤,给细胞团块上加一滴 2% 琼脂,冷却,使形成琼脂块。1% 锇酸 4℃ 后固定 2 h,梯度酒精脱水,环氧树脂 37℃ 包埋过夜,60℃ 固化 48 h,干燥。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 流式细胞仪检测

参照周剑锋等的方法进行^[9]。将 40 μ g/mL 的 MRP 工作液加入长满单层的 HEp-2 细胞,37℃ 孵育 5 h,用无菌细胞刮刮下,0.1 mol/L PBS (pH7.4)洗两遍,加 10 mL 70% 冷乙醇(-20℃)固定 48 h,3 000 g 离心 5 min,弃上清,加入 10 mL 0.2 mol/L 柠檬酸盐缓冲液(pH7.8),置 37℃ 水浴 1 h,以抽提断裂的小分子量 DNA,离心收集细胞,用 PBS 洗涤,加 RNA 酶 200 μ L(1 mg/mL)作用 1 h,再加 800 μ L 碘化砒啶(PI)染色液(100 μ g/mL,0.1 mol/L PBS 配制),4℃ 避光染色 30 min,用流式细胞仪(Vantage SE)检测分析。用 RPMI1640 完全营养液 1:10 稀释配置 MRP 原液用的 0.1 mol/L PBS (pH7.4)作阴性对照。

2 结果

2.1 MRP 诱导 HEp-2 细胞融合和凋亡的光镜观察

MRP 可致 HEp-2 细胞出现两种典型的形态及染色特性的改变,即诱导细胞融合和凋亡,凋亡在融合巨细胞和单个细胞均很明显。低浓度(4 μ g/mL)和高浓度(40 μ g/mL)时所引起变化相同,但高浓度时变化更明显。阴性对照的细胞形态染色特性均完全正常。

细胞融合早期(2 ~ 4 h),核仁结构消失,细胞核嗜酸,染成均匀鲜红色(图 1 A)。中期细胞核嗜酸性消失,核仁结构恢复(图 1 B)。晚期巨细胞,或是核染色质极度浓缩凝聚,染成深紫色,伴有胞膜吐泡(图 1 A)或者核染色质分裂成块(图 1 C)。

单个细胞的凋亡早期,细胞仍保持贴壁的多边形形态,细胞膜有明显吐泡现象,细胞核的嗜酸性极强,核仁结构消失,呈均匀鲜红色(图 1 D)。中期,细胞变圆,与邻周细胞脱离,细胞膜完整,或有吐泡现象或没有,核的轮廓可辨,胞浆明显浓缩,嗜碱(图 1 E)。晚

期细胞极度浓缩,嗜碱性极强,染成深紫色,胞内无可辨结构,或者核质边移,贴在细胞膜下呈环形(图 1 F,C)。

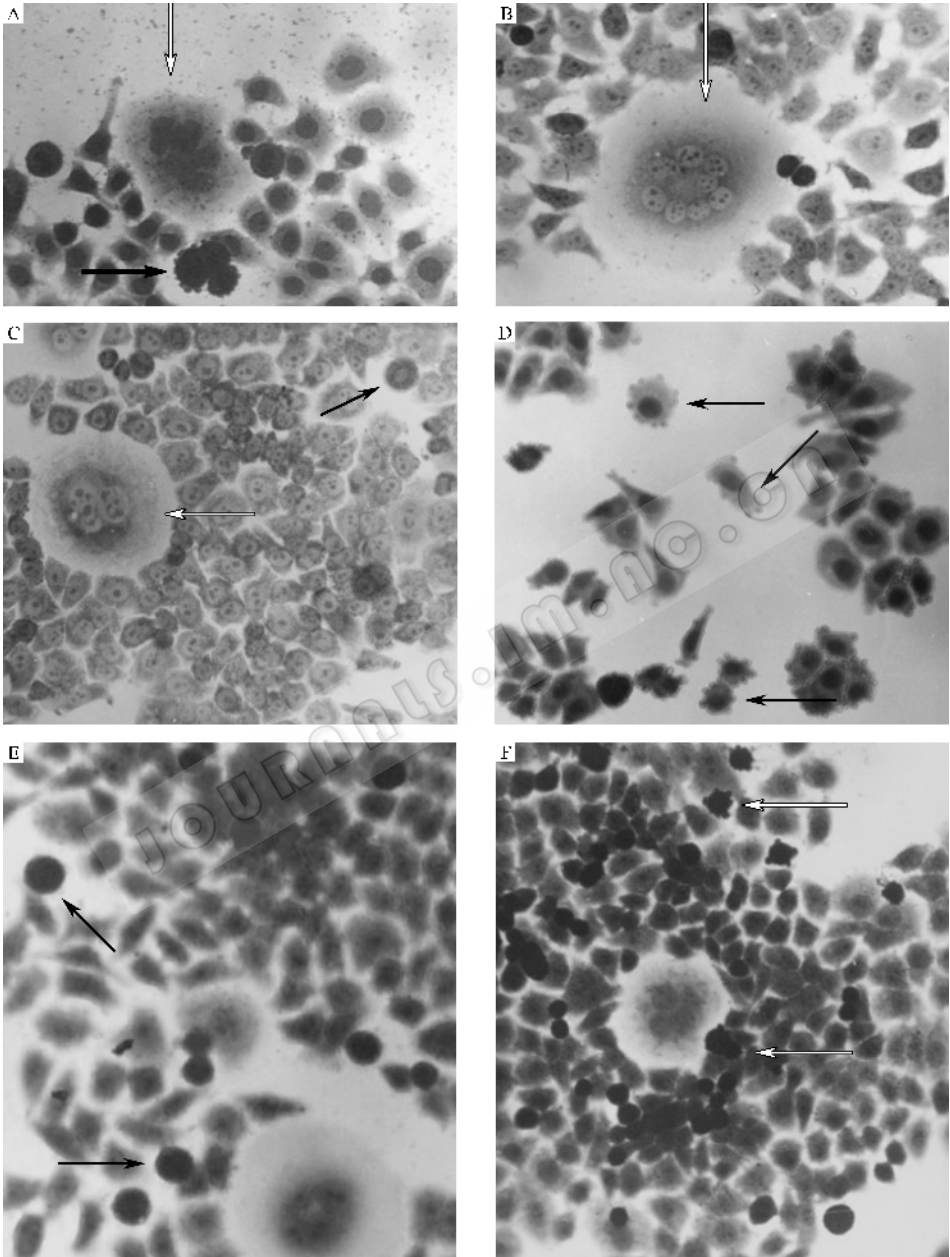


图 1 MRP 诱导 HEp-2 细胞融合和凋亡的光镜观察(MRP 浓度为 40μg/mL ,Giemsa 400 ×)

Fig.1 Light micrograph showing apoptosis of HEp-2 cells induced by MRP

- A :Fused cell at early stage(⇔);Fused cell at later stage(→);B :Fused cell at middle stage(⇔);
C :Fused cell at later stag(⇔);Apoptosis of single cell at later stage(→);
D :Apoptosis of single cell at early stage(→);E :Apoptosis of single cell at middle stage(→);
F :Apoptosis of single cell at later stage(⇔).

细胞的形态变化对 MRP 浓度有依赖关系 ,首先 ,融合细胞所含核的数目和 MRP 的浓度正相关 ,其次是细胞所发生的主要变化和 MRP 的浓度相关。低浓度时 ,主要变化为细胞融合 ,高浓度时细胞融合和凋亡变化均非常明显。

2.2 透射电镜观察

40 $\mu\text{g/mL}$ 的 MRP 作用 5 h 的 HEp-2 细胞呈现出典型的凋亡形态改变 :染色质凝聚、碎裂成块分散于整个胞浆 ,或边缘化 ,向胞膜靠拢 ,胞膜微绒毛减少或失去微绒毛(图 2)。

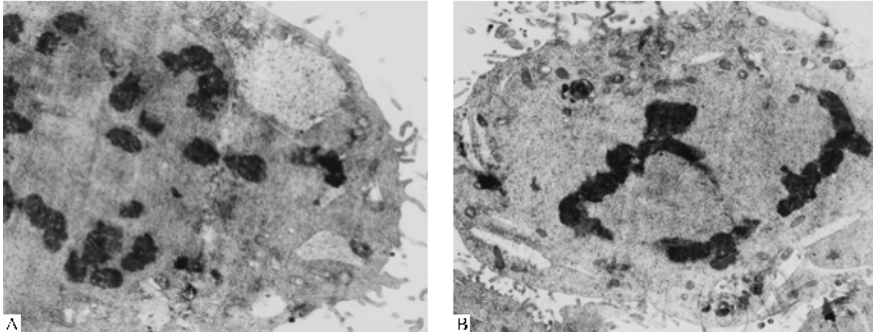


图 2 MRP 诱导 HEp-2 细胞凋亡的电镜观察

Fig.2 Electromicrograph showing apoptosis of HEp-2 cells induced by MRP

- A. Nucleus fragmentation of apoptotic cell(3500 \times);
- B. Outward translocation of chromatin of apoptotic cell (3000 \times).

2.3 流式细胞仪分析

流式细胞仪对 MRP 作用 5 h 的细胞染色体的倍体分析表明 :亚 G0/G1 期细胞占 18% ,G1 期细胞占 64.5% ,S 期占 12.5% ,G2/M 期占 4.6%。直方图出现明显的凋亡细胞特异的亚 G1 峰 ,即 AP 峰 ,阴性对照细胞仅有 0.5% 的 AP 峰(图 3A 和图 3B)。

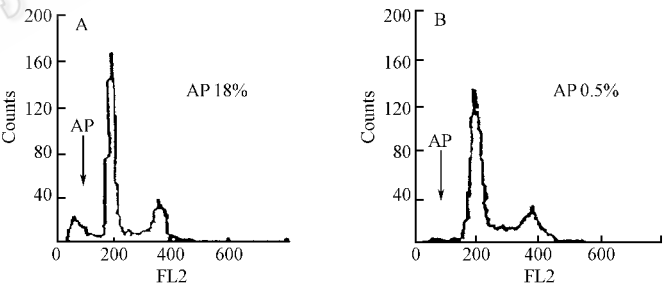


图 3 MRP 诱导 HEp-2 细胞凋亡的流式细胞分析图

Fig.3 FCM analysis showing apoptosis as 18% HEp-2 cells coincubed with MRP

- A. Apptosis of HEp-2 cells coincubated with MRP ;
- B. Negative control without MRP.

3 讨论

在细胞水平上研究病原菌及其毒力因子的致病机理是细胞微生物学研究的主要手段 ,国外已在 SS2 全菌水平上研究了其对上皮及血管内皮细胞的黏附作用^[10,11] ,但提纯的 MRP 对细胞的作用尚未见研究报道。

本研究首次发现 MRP 具有诱导上皮细胞融合和凋亡功能,此作用可使本来致密的细胞结构破坏,从而使上皮细胞结构失去其屏障作用,是 SS2 感染过程中突破扁桃腺和大脑血脑屏障的关键机制之一。血脑屏障有两条主要通路:血-脑通路由脑微血管内皮细胞构成,血-脑脊液屏障由脉络丛上皮细胞构成。从本试验结果推断,脉络丛应该是 SS2 致脑膜炎时突破大脑屏障的通路之一。有报道 SS2 致脑膜炎时,大脑实质并没有发现有病变,而无论是自然感染还是实验感染猪,经长期的菌血症后,均有脉络丛刷状缘的细胞损伤,脑室中也有纤维素和炎性细胞浸润^[12],佐证了作者的推断。

SS2 感染后即使及时地用大剂量的抗生素治疗,也不能阻止其严重的后遗症发生,主要表现为失明、失聪及共济失调^[13]。肺炎链球菌感染致纤维素性肺炎的原因被认为是该病原诱导肺上皮细胞持续性的凋亡所致^[14]。A 群链球菌致脑膜炎后遗症的主要原因也被认为是诱导脑细胞凋亡所致^[15]。MRP 诱导细胞凋亡后,有大量细胞核和细胞碎片被释放到周围组织环境中,使大量吞噬细胞聚集,其清除过程导致实质器官发生严重的炎症反应,进而产生症状和后遗症。至于 MRP 是否能直接诱导脑神经细胞的凋亡,从而直接导致症状和后遗症,尚有待研究。确证 MRP 诱导细胞凋亡和 SS2 致脑膜炎及其后遗症的关系是 MRP 致病机理研究的另一重要内容。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] Berthelot-Herault F, Morvan H, Keribin A M, et al. Production of muramidase-released protein(MRP), extracellular factor(EF) and sulysin 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.
- [3] 姚火春, 陈国强, 陆承平. 猪链球菌 1998 分离株病原特性鉴定. 南京农业大学学报, 1999, **22**(2):67~70.
- [4] Vecht U, Wisselink H J, Jellema M L, et al. Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. *Infect Immun*, 1991, **59**(9):3156~3162.
- [5] Luque I, Tarradas C, Astorga R, et al. The presence of muramidase released protein and extracellular factor protein in various serotypes of *Streptococcus suis* isolated from diseased and healthy pigs in Spain. *Res Vet Sci*, 1999, **66**(1):69~72.
- [6] 欧 瑜, 陆承平. 检测猪链球菌 2 型毒力相关蛋白 ELISA 法的建立. 南京农业大学学报, 2001, **24**(2):94~97.
- [7] 欧 瑜, 陆承平. 猪链球菌 2 型国内分离株毒力相关蛋白的分析. 微生物学报, 2002, **42**(1):105~109.
- [8] Nizet V, Kim K S, Stins M, et al. Invasion of brain microvascular endothelial cells by group B *Streptococci*. *Infect Immun*, 1997, **65**(11):5074~5081.
- [9] 周剑锋, 陈 燕, 李崇渔, 等. 一种可检测细胞凋亡多项指标的样品处理. 癌症, 1997, **16**(4):248~250.
- [10] 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.
- [11] Lalonde M, Segura M, Lacouture S, et al. Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and different epithelial cell lines. *Microbiology* 2000, **146**(Pt8):1913~1921.
- [12] Williams A E, Blakemore W E. Pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus suis* type 2. *J Infect Dis*, 1990, **162**(2):474~481.
- [13] Arends J P, Zanen H C. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. *Rev Infect Dis*, 1988, **10**(1):131~137.
- [14] Kazzaz J A, Horowitz S, Xu J, et al. Differential patterns of apoptosis in resolving and nonresolving bacteria pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, **161**(6):2043~2050.
- [15] Von Moering M, Wellmer A, Michel U, et al. Transcriptional regulation of caspases in experimental pneumococcal meningitis. *Brain Pathol*, 2001, **11**(3):282~295.

Fusion and Apoptosis of Epithelial Cells Induced by Muramidase Released Protein of *Streptococcus suis* Type 2

Zeng Qiaoying^{1,2} Lu Chengping^{1*}

(¹ Key Laboratory of Animal Disease Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agric Univ, Nanjing 210095, China)

(² Department of Animal Medicine, Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070, China)

Abstract : The pathogenic role of muramidase released protein (MRP) a virulence factor of *Streptococcus suis* type 2 (SS2) is poorly understood. The purified MRP was co-incubated with HEp-2 cells to determine the effect of MRP on epithelial cells. Under light microscope, two principal morphologic changes were observed. Firstly, the cells were fused to form syncytia and a apoptosis followed. Secondly, single cell was also induced to apoptosis at high level as 18%, which was verified by transmission electron microscopy and flow cytometry. It showed that MRP alone was capable of a virulence factor of SS2.

Key words : *Streptococcus suis* type 2, Muramidase released protein, Apoptosis, Cell fusion

Foundation item : Key Project of Chinese National Fundamental Research and Development (G1999011906)

* Corresponding author. Tel/Fax 86-25-4396517 ;E-mail :lucp@njau.edu.cn

Received date 08-16-2002

《微生物学报》稿件撰写要求(增补)

从 2003 年起,为增加信息量和规范化,凡投稿我刊请注意对以下几方面进行适当的补充:

1. 中英文脚注

中文脚注(正文首页下方)

基金项目:.....(项目编号)

* 通讯作者. Tel 86- Fax 86- E-mail :

作者简介:姓名(出生年-),性别(民族),籍贯,职称,学位及研究方向. E-mail :

(指的是第一作者)

收稿日期 2003-01-20,修回日期 2003-04-20

英文脚注(英文摘要下方)

Foundation item :.....(项目编号)

* Corresponding author. Tel 86- Fax 86- E-mail :

Received date 01-31-2003

2. 参考文献

补充所引论文的题目,其它要求请详见刊登在 2003 年第 1 期上的“投稿须知”。

3. 英文摘要

用第三人称概述研究的目的、方法、结果和讨论,也可以加入自己的一些观点。要求语法正确,句子通顺,最好请英文较好的专家审阅定稿后再投来。