

钙信号转导途径介导肺炎链球菌 侵袭人肺Ⅱ型上皮细胞

尹一兵 徐邦牢 罗进勇 朱 旦 孟江萍

(重庆医科大学检验系 重庆 400016)

摘 要 用 F-actin 特异性 FITC-phalloidin 荧光染料,观察肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)作用 A₅₄₉ 细胞前后的 F-actin 细胞骨架重排情况;用细胞松弛素 D 预处理 A₅₄₉ 细胞,观察肺炎链球菌对 A₅₄₉ 细胞的侵袭率;使用 Datrolene 预处理 A₅₄₉ 细胞,观察其与 F-actin 细胞骨架重排百分率间是否存在剂量依赖关系;用 Fura-2/AM 荧光探针负载 A₅₄₉ 细胞后测定肺炎链球菌粘附 A₅₄₉ 细胞后的胞内 Ca²⁺ 浓度。结果发现肺炎链球菌作用 A₅₄₉ 细胞后,F-actin 细胞骨架呈块状、丝状聚集,而细胞松弛素 D 可明显降低肺炎链球菌对 A₅₄₉ 细胞的侵袭率;肺炎链球菌粘附 A₅₄₉ 细胞后胞内 Ca²⁺ 高于对照;Datrolene 可部分抑制 A₅₄₉ 细胞 F-actin 细胞骨架重排,且与 F-actin 细胞骨架重排百分率间存在量效关系。以上结果提示肺炎链球菌可通过 Ca²⁺ 细胞信号转导途径触发 A₅₄₉ 细胞 F-actin 细胞骨架重排,进而导致肺炎链球菌侵袭 A₅₄₉ 细胞。

关键词 肺炎链球菌 肺Ⅱ型上皮细胞(A₅₄₉) 细胞骨架 信号转导 侵袭

中图分类号 R378.1 **文献标识码** A **文章编号** 1001-6209(2003)06-0788-05

肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)是一种常见的革兰氏阳性致病菌,临床发病率和死亡率均较高^[1]。肺炎链球菌是一种侵袭性细菌,但致病机理尚不十分清楚,有文献资料报道,肠致病性大肠埃希氏菌(Enteropathogenic *Escherichia coli*,EPEC)及沙门氏菌(*Salmonella*)等^[2,3]革兰氏阴性致病菌粘附宿主细胞可使胞内 Ca²⁺ 浓度增加,由此触发 F-actin 细胞骨架重排,进而侵袭宿主细胞。Ca²⁺ 除具有信号转导功能外,还具有直接参与由细胞内肌动蛋白(Actin)引起的兴奋-收缩耦联效应这一重要的生理功能。基于此,本文旨在探讨肺炎链球菌是否通过钙信号转导触发 F-actin 细胞骨架重排,进而侵袭 A₅₄₉ 细胞,这将为最终阐明肺炎链球菌的致病机理提供科学的理论依据,为开发新一代治疗肺炎链球菌感染性疾病的药物提供新思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和细胞株:肺炎链球菌Ⅲ型标准菌株 CMCC(B)31203,购自中国科学院菌种保藏中心。肺Ⅱ型上皮细胞(A₅₄₉)购自中国科学院上海细胞研究所细胞库。

1.1.2 主要试剂:C+Y 半合成肺炎链球菌培养基,含酵母抽提物^[4],TSAB 血平板;RP-

基金项目 国家自然科学基金资助(30170050)

作者简介:尹一兵(1956-),男,重庆市人,硕士,副教授,主要从事细菌致病的分子机制的研究。Tel:86-23-68485658 Fax:86-23-68485005 E-mail:yibingyin@21cn.com

收稿日期 2003-01-31,修回日期 2003-08-01

MI1640 细胞培养基,用于培养 A_{549} 细胞,购自 GIBCOFCS;FCS 购自杭州四季青生物工程材料研究所,特级,无支原体;胰酶购自 Serva,溶于的 PBS(0.1mmol/L, pH 7.4),浓度为 0.25%;FITC-Phalloidin、Fura-2/AM、Datrolene、I 型胶原酶、细胞松弛素 D 均购自 Sigma。

1.2 肺炎链球菌培养

将肺炎链球菌接种于 C + Y 培养基中,37℃,水浴静置培养至对数生长中后期($OD_{620} = 0.4$ 约 10^8 CFU/mL),用于整个实验时,先离心(2500r/min, 10min),再用预冷的 PBS(0.1mmol/L, pH 7.4)洗 3 次,不含双抗 RPMI1640 培养液体悬浮至 10^8 CFU/mL 浓度。

1.3 F-actin 的 FITC-Phalloidin 荧光染色

1.3.1 肺炎链球菌作用后:将 A_{549} 细胞接种于带小块盖玻片的 24 孔培养板板孔中,每孔约 1mL,细胞浓度约 2×10^4 /mL,待单层生长后,吸出孔内培养液,用 PBS 冲洗 3 次,加入 10 μ L 肺炎链球菌菌液,然后加入不含双抗的 RPMI1640 培养液 1mL,轻轻混匀,37℃,温育 2h,吸出孔内液体,夹出小盖玻片,用 PBS(0.1mmol/L, pH 7.4)轻轻冲洗 5 次,4%多聚甲醛室温固定 15min,去固定液,用 PBS 轻轻冲洗 5 次,沥干水份,避免干燥,将其置于干净的载玻片上,每张盖玻片上加 10 μ L FITC-Phalloidin 荧光染料,室温潮湿暗盒中静置 40min 后,洗去染料,用 PBS 冲洗 5 次,沥干,用无荧光软布擦净其背面,放在洁净无荧光载玻片上,荧光显微镜下观察 F-actin 重排情况,同时设不受肺炎链球菌感染的 A_{549} 细胞为对照。

1.3.2 信号传导抑制剂 Datrolene 预处理 A_{549} 细胞后:同 1.3.1,只是在加入肺炎链球菌前,分别加入预先用 RPMI1640 稀释混匀成梯度浓度的抑制剂预处理 A_{549} 细胞 30min,再加入肺炎链球菌继续作用 2h,荧光镜下观察。

1.3.3 F-actin 的重排计分标准^[5]:荧光镜下显示典型 F-actin 聚集结构者计 1 分,非典型者计 0.5 分,没有发生聚集者计 0 分,每张盖玻片计数 200 个细胞,则 F-actin 重排百分率(%) = 总计分/200 \times 100。

1.4 侵袭 A_{549} 细胞实验

1.4.1 肺炎链球菌侵袭 A_{549} 细胞实验: A_{549} 细胞培养和肺炎链球菌处理同 1.3.1,待肺炎链球菌作用于 A_{549} 细胞 2h 后,加入含 1% FCS,10U/mL 青霉素,200U/mL 庆大霉素的 RPMI1640 培养液,37℃,孵育 1h,吸出孔内液体,用无菌 PBS(0.1mmol/L, pH 7.4)洗 3 次,加入 100 μ L 0.25% 胰酶使贴壁细胞悬浮,再加入 400 μ L 0.025% TritonX-100 裂解细胞 3min,10 倍稀释后吸取 100 μ L 涂布 TSAB 平板^[6],37℃,培养过夜,计数菌落数,肺炎链球菌侵袭入 A_{549} 细胞内的个数 = 平板上计数的菌落数/每培养孔的细胞数。

1.4.2 细胞松弛素 D 对肺炎链球菌侵袭入 A_{549} 细胞的作用:同 1.4.1,只是在加入肺炎链球菌前,用不同浓度的细胞松弛素 D 处理 A_{549} 细胞 2h,再加入肺炎链球菌继续温育 2h,计数侵入 A_{549} 细胞的肺炎链球菌数。为了证实细胞松弛素 D 不作用于肺炎链球菌,将肺炎链球菌用不同浓度的细胞松弛素 D 预先作用 2h,用无菌 PBS(0.1mmol/L, pH 7.4)洗 3 次,将其作用于不经细胞松弛素 D 处理的 A_{549} 细胞,计数侵入 A_{549} 细胞的肺炎链球菌数。

1.5 A_{549} 细胞内 $[Ca^{2+}]$ 测定

1.5.1 A_{549} 细胞内 $[Ca^{2+}]$ 测定:用 0.25% 胰酶消化贴壁单层 A_{549} 细胞,D-Hank's 液洗 3 次,2mL 负载液悬浮细胞,加入 10 μ L Fura-2/AM 溶液,37℃水浴避光振荡 40min,用含 0.2%

BSA 的 D-Hank 's 液洗 3 次 ,用细胞内钙测定液悬浮细胞 ,用台盼蓝染色检查细胞活力 > 90%^[7] ,并调整细胞数至 2×10^6 /mL ,分别扫描标准品及负载后细胞悬液的激发波长和发射波长以判断负载是否成功 ,选择负载后细胞悬液的激发波长和发射波长为测定波长 ,胞内 $[Ca^{2+}]$ 由下式计算 $[Ca^{2+}](nmol/L) = K_d \times (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$ 式中 K_d 为 Fura-2/ Ca^{2+} 的解离常数 ,在 37℃ 时为 224nmol/L ,F 为在不同条件下测定的荧光强度值 ; F_{max} 为加入终浓度为 0.1% TrtonX-100 后的最大荧光强度值 ; F_{min} 为在 F_{max} 基础上再加入终浓度为 5mmol/L EGTA 时的最小荧光强度值。

1.5.2 肺炎链球菌作用于 A_{549} 细胞内 $[Ca^{2+}]$ 测定 :将 A_{549} 细胞接种于 24 孔培养板板孔 ,接种密度为 2×10^4 /孔 ,单层贴壁(约 5×10^5 /孔)后 ,吸出孔内液体 ,各孔加入无双抗 RPMI1640 培养液 1mL 及 10 μ L 肺炎链球菌菌液(约 10^8 CFU/mL)的混合液 ,37℃ ,5% CO₂ 分别温育 30、60、90min ,收集 12 孔细胞于一塑料试管中。收集细胞方法 :在温育后 ,用无菌 PBS(0.1mol/L , pH7.4)洗涤细胞 6 次 ,以去掉未粘附细菌 ,用含 0.25% 胶原酶 I 的 RPMI1640 温育消化细胞 10min ,含 5% FCS 的 PBS(0.1mmol/L , pH 7.4)洗 2 次后 ,负载、洗涤细胞^[3]及测定计算 $[Ca^{2+}]$ 的方法同 1.5.1。

1.6 统计学处理

结果以 $\bar{X} \pm SD$ 表示 ,组间比较用两样本均数的秩和 t 检验 ,进行相关系数的计算。

2 结果

2.1 肺炎链球菌作用后肺 II 型上皮细胞(A_{549})F-actin 细胞骨架重排情况

肺炎链球菌作用 A_{549} 细胞后 ,F-actin 经特异性荧光染色剂 FITC-phalloidin 染色呈深黄绿色块状、丝状改变 ,并聚集在胞核周围(图版 I -A) ,对照细胞无上述变化 ,呈现均匀黄绿色荧光外观。

2.2 F-actin 重排与肺炎链球菌侵袭 A_{549} 细胞的关系

细胞松弛素 D 预处理肺炎链球菌后 ,肺炎链球菌对未经细胞松弛素 D 处理的 A_{549} 侵袭率无显著差异(表 1) ,提示细胞松弛素 D 不作用于肺炎链球菌。用细胞松弛素 D 预处理 A_{549} 细胞前后的侵袭情况 ,结果(表 2)显示 :F-actin 细胞骨架重排抑制剂细胞松弛素 D 可明显减低肺炎链球菌对 A_{549} 细胞的侵袭 ,而且其浓度增加为 0.25 μ g/mL 时 ,未得到可测的侵袭数。提示 :F-actin 细胞骨架重排可导致肺炎链球菌侵袭 A_{549} 细胞。

表 1 细胞松弛素 D 预处理肺炎链球菌后对 A_{549} 的侵袭

Table 1 Invasion of *S. pneumoniae* to by pretreated A_{549} with cytochalasin D

c (Cytochalasin D) (μ g/mL)	0	0.1	0.25	0.5
Number of invasion (CFU/well)	145 \pm 31	143 \pm 28	141 \pm 26	138 \pm 30

表 2 细胞松弛素 D 预处理 A_{549} 细胞前后的侵袭

Table 2 Invasion of *S. pneumoniae* to A_{549} before and after pretreat A_{549} with cytochalasin D

c (Cytochalasin D) (μ g/mL)	0	0.1	0.25	0.5
Number of invasion (CFU/well)	152 \pm 31	19 \pm 10*	0*	0*

* * : $n < 0.001$
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

2.3 钙信号转导在 F-actin 细胞骨架重排中的作用

2.3.1 Fura-2/AM 标准液和负载后 A_{549} 细胞悬液扫描: 扫描结果: Fura-2/AM 标准液和负载后 A_{549} 细胞悬液的激发波长分别为 375nm 和 350nm, 发射波长为 485 和 485nm。

2.3.2 静息状态 A_{549} 细胞 $[Ca^{2+}]_i$: 静息状态下, 细胞外 $[Ca^{2+}]_o$ 为 1.3mmol/L 时, A_{549} 胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 为 194.1 ± 17.4 nmol/L ($n = 4$); 测定液中含 Ca^{2+} 并加入 0.1mmol/LEGTA 时, A_{549} 细胞的胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 为 166.6 ± 20.8 nmol/L ($n = 4$); 二者比较 $P > 0.05$, 无显著性意义。

2.3.3 肺炎链球菌作用于 A_{549} 细胞后胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 测定: $[Ca^{2+}]_i$ (图版 I -B) 测定结果只反映肺炎链球菌作用于 A_{549} 胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 水平, 因为用荧光探针 Fura-2/AM 负载肺炎链球菌 (约 10^7 CFU/mL) 后, 获得的荧光强度值仅为 0.1, 可忽略不计。结果提示: 肺炎链球菌粘附 A_{549} 细胞 30min 后胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 显著增加, 比对照组约高 3 倍, 且逐渐达到饱和。

2.3.4 Ca^{2+} 抑制剂 Datrollene 对 F-actin 细胞骨架重排的抑制作用: 图版 I -C 提示: 信号转导抑制剂可抑制 F-actin 细胞骨架重排, 且 Datrollene 与 F-actin 细胞骨架重排抑制率间存在剂量依赖关系。

3 讨论

病原菌侵袭宿主细胞是传染过程建立的重要环节, 病原菌常可借助宿主细胞 F-actin 细胞骨架的高度可塑性及运动功能而侵袭细胞^[8]。肺炎链球菌具有较强的侵袭力, 但肺炎链球菌是否通过改变 F-actin 细胞骨架而侵袭宿主细胞尚不清楚。

本研究证实完整的肺炎链球菌可触发 A_{549} 细胞 F-actin 细胞骨架重排, 并首次描述肺炎链球菌触发 A_{549} 细胞 F-actin 细胞骨架重排的形态学特征。为进一步研究 F-actin 细胞骨架重排在肺炎链球菌侵袭 A_{549} 细胞中的作用, 我们用不同浓度的 F-actin 细胞骨架重排抑制剂细胞松弛素 D 预处理 A_{549} 细胞, 发现随抑制剂浓度增大, 侵袭数明显降低, 并在浓度为 $0.25 \mu\text{g/mL}$ 时, 未得到可测的侵袭数, 提示: F-actin 细胞骨架重排在肺炎链球菌侵袭 A_{549} 细胞中起着非常显著的作用, 它可直接影响肺炎链球菌侵袭 A_{549} 细胞。

通过测定胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 发现 3 个时间点的胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 均比对照组约高 3 倍, 这说明肺炎链球菌作用于 A_{549} 细胞, 可引起胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化; 用 Ca^{2+} 信号转导抑制剂 datrollene 预处理 A_{549} 细胞后, 发现 F-actin 细胞骨架重排百分率与该抑制剂间存在剂量依赖关系, 二者变化呈高度负相关, 相关系数为 $r_{Ca^{2+}} = -0.86$ 。由此提示: 肺炎链球菌粘附 A_{549} 细胞可使胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 增加, 从而可触发钙信号转导, 导致 F-actin 细胞骨架发生重排。其可能的机制是: 肺炎链球菌粘附 A_{549} 细胞后持续作用于 A_{549} 细胞, 导致 A_{549} 细胞膜钙通道开放概率增加, Ca^{2+} 内流增多, 从而使胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 增加。 Ca^{2+} 再影响多种微丝肌动蛋白 (actin) 结合蛋白活性, 因此肺炎链球菌很可能通过钙信号转导使多种微丝肌动蛋白结合蛋白活性发生变化, 活性变化大小与 F-actin 细胞骨架重排百分率成比例。

综上所述结果分析, Ca^{2+} 参与了 F-actin 细胞骨架的重排过程, 肺炎链球菌通过 Ca^{2+} 信号转导途径触发 A_{549} 细胞 F-actin 细胞骨架重排, 进而侵袭 A_{549} 细胞, 胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 超负荷, 可直接导致 A_{549} 细胞不可逆坏死。

参 考 文 献

- [1] Gillespie S H. Aspects of pneumococcal infection including bacterial virulence , host response and vaccination . *J Med Microbiol* , 1989 , **28** : 237 ~ 248 .
- [2] Dytoc M , Fedorko L , Sherman P M. Signal transduction in human epithelial cells infected with attaching and effacing *Escherichia coli* in vitro . *Gastroenterology* , 1994 , **106** : 1150 ~ 1161 .
- [3] Philpott D J , Ismaili A , Dytoc M T. Increased adherence of *Escherichia coli* RDEC-1 to human tissue culture cells results in the activation of host signaling pathways . *J Infect Dis* , 1995 , **172** : 136 ~ 143 .
- [4] Paton J C. Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae* : the role of pneumococcal proteins . *Annu Rev Microbiol* , 1993 , **47** : 89 ~ 115 .
- [5] Lacks S A. Study of genetic material determining an enzyme activity in pneumococcus . *Biochem Biophys Acta* , 1960 , **39** : 508 ~ 517 .
- [6] Yother J , White J M. Novel Surface attachment mechanism of the *Streptococcus pneumoniae* protein PspA . *J Bacteriol* , 1994 , **176** (10) : 2976 ~ 2985 .
- [7] 刘振伟. 用 Fura-2 测定缺氧时海马细胞内游离钙离子浓度的变化 . 细胞生物学杂志 , 1994 , **16** (3) : 141 ~ 143 .
- [8] Cossart P. Subversion of the mammalian cell cytoskeleton by invasion bacteria . *J Clin Invest* , 1997 , **99** : 2307 ~ 2311 .

Ca²⁺ Signaling Pathways Associated with the Invasion of *Streptococcus pneumoniae* to Type II Pneumocytes

Yin Yibing* Xu Banglao Luo Jinyong Zhu Dan Meng Jiangping

(Department of Clinical Biochemistry , Faculty of Laboratory Medicine ,
Chongqing University of Medical sciences , Chongqing 400016 , China)

Abstract : Labelled F-actin with FITC-phalloidin , we observed F-actin rearrangements by *Streptococcus pneumoniae* adhesion of type II pneumocytes (A₅₄₉). Invasion of *S. pneumoniae* to A₅₄₉ cells was determined by pretreating A₅₄₉ cells with cytochalasin D. To investigate whether F-actin rearrangements can be blocked by Ca²⁺ inhibitors , A₅₄₉ cells were pretreated with Ca²⁺ inhibitors dantrolene . A₅₄₉ cells were loaded with Fura-2/AM to determine the concentration of cytosolic free calcium by *S. pneumoniae* adhesion of A₅₄₉ cells after 30 , 60 , 90 minutes respectively . Intact *S. pneumoniae* can promote F-actin rearrangements . Cytochalasin D is able to prevent *S. pneumoniae* invasion of A₅₄₉ cells . *S. pneumoniae* adhesion of A₅₄₉ cells increased cytosolic free calcium after 30 , 60 , 90 minutes . Ca²⁺ inhibitors dantrolene block F-actin rearrangements dose dependently . It suggested *S. pneumoniae* can provoke F-actin rearrangements through Ca²⁺ signaling pathways , which will further lead to *S. pneumoniae* invasion of A₅₄₉ cells .

Key words : *Streptococcus pneumoniae* , Type II pneumocyte , Cytoskeletal rearrangement , Signal transduction , Invasion