

嗜水气单胞菌侵袭力与宿主细胞信号转导和骨架的关系

储卫华 陆承平*

(南京农业大学 农业部动物疫病诊断与免疫重点实验室 南京 210095)

关键词 嗜水气单胞菌, 侵袭, 信号转导, 细胞骨架

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2003)06-0817-04

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, Ah)是淡水鱼暴发性败血症的主要病原,该菌能够引致淡水鱼等的败血症和人的腹泻等^[1]。嗜水气单胞菌有多种致病因子,如毒素、蛋白酶、S 层蛋白等^[2],还发现它具有侵袭作用,有报道嗜水气单胞菌分离株能侵袭 HEp-2 细胞^[3]。但对于鱼源菌株的侵袭特性知之甚少。仅有一些报道认为嗜水气单胞菌能引致细胞病变^[4,5]。

细菌侵袭细胞,进入细胞内受到保护。在一些情况下可以通过细胞屏障,如肠上皮细胞、血-脑屏障等。细菌对细胞的侵袭起始于细菌对上皮细胞的粘附,紧接着是细菌的内化(Internization)和繁殖,会引起细胞的溶解和组织的损伤。病原菌的侵入除与细菌表面成分有关外,还与细胞表面受体、细胞骨架以及信号转导等机制有关^[6]。细胞内信号转导的发生是由于细胞膜上一个或多个受体接受外界的刺激而触发的,在许多情况下包括酪氨酸蛋白激酶、酪氨酸蛋白磷酸化酶的活化、Ca²⁺ 浓度的改变以及细胞骨架的重排。本试验以 HEp-2 细胞作为体外模型,对嗜水气单胞菌我国分离鱼源株 J-1 的侵袭机制进行探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, Ah) J-1 株为陈怀青等^[7]从患细菌性败血症的病鱼中分离而得。它对鲫鱼和小鼠有致病性,可产生 HEC 毒素和胞外蛋白酶,对 HEp-2 细胞(人乳头瘤上皮细胞系,由江苏省卫生防疫站史智扬先生提供)可致细胞病变。Ah J-1 株按 1% 接种量接种于 LB 肉汤中,37℃ 150r/min 培养过夜。试验前,培养物用 PBS(137mmol/L NaCl, 2.7mmol/L KCl, 4.3mmol/L Na₂HPO₄, 1.4mmol/L KH₂PO₄, pH7.2)洗涤 3 次,离心,去上清,用不含抗生素的 10% 灭活犊牛血清(Calf serum, CS) MEM 稀释到所需浓度。

主要试剂:染料木黄酮(Genistein), Tyrphostin47, Staurosporine, Sodium orthovanadate, Nifedipine, Verapamil HCl, 细胞松弛素 D(Cytochalasin D, CD)均为 Sigma 公司产品。

1.2 细胞培养

长成单层的 HEp-2 细胞,用 0.025% 的胰酶消化,以 10⁵ 个细胞/孔接种 24 孔板,37℃ 5% CO₂ 条件下静置培养成单层,每孔约 2 × 10⁵ 个细胞。

1.3 侵袭率测定

24 孔板长成单层的 HEp-2 细胞,用 PBS 洗涤 3 次,每孔加入稀释的菌液 5μL,感染比约为 1:10,37℃ 5% CO₂ 条件下静置培养 2h。

* 通讯作者。Tel/Fax 86-25-4396517, E-mail: lucp@njau.edu.cn

作者简介:储卫华(1972-),男,江苏东台人,讲师,博士,研究方向为病原微生物与免疫学。E-mail: chuweihua2002@yahoo.com.cn

收稿日期:2003-01-06,修回日期:2003-07-07

1.3.1 庆大霉素裂解培养法^[8] 取上述接种细菌的 HEp-2 细胞,倾去孔中液体,用 PBS 洗涤 3 次,按每孔加入 1mL 含 100 μ g/mL 庆大霉素的 10% 犊牛血清的 MEM(Calf serum modified Eagle medium ,CSMEM),37℃ 继续孵育 30min ,以杀死胞外的细菌,再用 PBS 洗涤 3 次。阴性对照为不加细菌的 10% CSMEM HEp-2 细胞(不含抗生素)。将感染 Ah J-1 的 HEp-2 单层细胞每孔加入 1% Triton X-100 的 PBS 500 μ L ,用巴氏吸管吹打,然后每孔吸取 100 μ L 滴在 TSA(主要成分为胰蛋白胨 15.0g、大豆胨 5.0g、磷酸氢二钾 9.3g、磷酸二氢钾 3.7g、琼脂 16.0g、蒸馏水 1000mL ,调 pH7.3)琼脂平板上,涂布,37℃ 培养 24h ,计数。

1.3.2 侵袭阳性的判断标准:参照 Janda 等^[9]的方法,庆大霉素裂解法计数,平板计数每孔大于 100 为阳性。

1.3.3 侵袭率的计算:侵袭率 = 裂解液中细菌数/接种细菌数 \times 100%

1.4 信号转导抑制剂对 Ah J-1 株侵袭力的影响

染料木黄酮等抑制剂及其浓度见表 1。除 Sodium orthovanadate 溶于纯水外,其他化学试剂均按说明预溶于二甲亚砜(DMSO)中,临用前,用含 10% 犊牛血清的 MEM 稀释到所需浓度。侵袭测定参照 Leung 和 Finlay 方法^[10]稍加改进。24 孔板中长成单层的 HEp-2 细胞用 PBS 洗涤 3 次,加入信号转导抑制剂,37℃ 作用 30min ,再加入细菌,37℃ 孵育 2h ,倾上清, PBS 洗涤 3 次,加入含 100 μ g/mL 的庆大霉素的 10% CSMEM 1000 μ L 37℃ 孵育 30min ,再加入含 1% Triton X-100 的 PBS 1mL 裂解细胞,取 100 μ L 滴在 TSA 琼脂平板上,涂布,37℃ 培养 24h ,计数。每一药物实验重复 3 次,取其平均值。

1.5 细胞骨架对 Ah J-1 株侵袭的影响

细胞松弛素 D 以 0.5mg/mL 溶于 DMSO 中制成母液。使用时用含有 10% 犊牛血清抗生素的 MEM 稀释成所需浓度(0.5 ,1.0 ,2.5 ,4.0 μ g/mL),分别处理 HEp-2 单层细胞,37℃ 作用 1h ,再与 Ah J-1 株感染,以下步骤同细菌侵袭率测定。整个过程中始终要维持一定的 CD 浓度,同时设未处理的以及用 DMSO 处理的 HEp-2 细胞作为对照。重复 3 次,取其平均值。

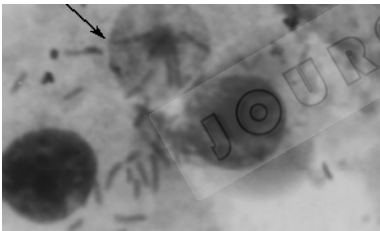


图 1 Ah J-1 株对 HEp-2 细胞的侵袭(1000 \times)
箭头所示为细菌在胞浆内。

2 结果

2.1 Ah J-1 对 HEp-2 细胞的侵袭

用庆大霉素裂解培养计数法检测 Ah J-1 ,其侵袭率超过了 0.1% ,达到 0.2% 左右,而阴性对照裂解液中无细菌生长,表明 Ah J-1 株侵袭 HEp-2 细胞。通过姬姆萨染色,显微镜观察,HEp-2 细胞胞浆内有内化的细菌,有些细菌正穿越细胞膜进入胞内(图 1)。

2.2 信号转导抑制剂对 Ah J-1 株对 HEp-2 侵袭力的影响

信号转导抑制剂染料木黄酮和 Tyrphostin 47 能够抑制 Ah J-1 株的侵袭,而 Staurosporine 和 Sodium orthovanadate 能够促进 Ah J-1

的内化, Ca²⁺ 阻断剂 Nifedipine 和 Verapamil HCl 对 Ah J-1 株的侵袭影响不大(表 1)。

表 1 信号转导抑制剂对 Ah J-1 株侵袭的影响

试剂	类别	浓度/ μ mol/L	侵袭率/%
MEM	对照	—	100
DMSO(0.4%)	溶剂	—	101.6
Genistein	酪氨酸蛋白激酶抑制剂	100	34
Tyrphostin47	酪氨酸蛋白激酶抑制剂	100	60
Staurosporine	蛋白激酶 C 抑制剂	0.005	141.3
Sodium orthovanadate	酪氨酸蛋白磷酸化酶抑制剂	10	134
Nifedipine	Ca ²⁺ 通道阻断剂	1	99
Verapamil HCl	Ca ²⁺ 通道阻断剂	10	103.6

2.3 细胞骨架对 Ah J-1 株侵袭力的影响

用细胞松弛素 D 处理细胞能显著抑制 Ah J-1 株对 HEp-2 细胞的侵袭。只要很小浓度的细胞松弛素 (0.1μg/mL)就能影响其内化。0.1~4.0μg/mL 的细胞松弛素 D 的抑制率为 61.2%~89.4%(图 2)。而用 DMSO 处理细胞后,侵袭试验所获得的细菌率变化不大,差异不显著。

2.4 染料木黄酮浓度对 Ah J-1 株侵袭力的影响

随染料木黄酮的浓度的增高,Ah J-1 株对 HEp-2 细胞的侵袭力降低,当其浓度为 10μmol/L 时对 Ah J-1 的侵袭力几乎无影响,而当其浓度为 250μmol/L 时,其侵袭力为对照组的 31.8%(图 3)。

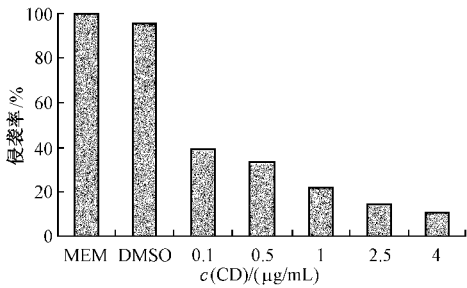


图 2 CD 对 Ah J-1 侵袭力的影响

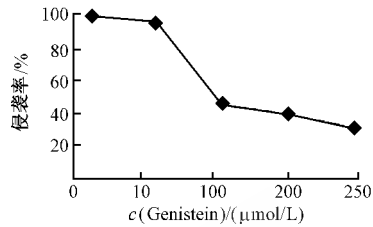


图 3 genistein 浓度对 Ah J-1 株侵袭力的影响

3 讨论

致病性细菌的毒力取决于侵袭力和毒素两方面,而细菌的侵袭力又由细菌的粘附和侵袭、繁殖与扩散以及对宿主防御机能的抵抗诸因素构成。嗜水气单胞菌具有粘附上皮细胞的能力^[11],且粪源菌株对 HEp-2 细胞有侵袭力^[3]。鉴于嗜水气单胞菌菌株间的毒力差异较大,作为我国的鱼源代表株 J-1 株的侵袭机制如何,是否与国外分离株相似,则是本试验所要回答的问题。

本试验中通过各种信号转导抑制剂和细胞松弛素对细胞作用,研究信号转导以及细胞骨架对 J-1 株侵袭 HEp-2 细胞的影响。染料木黄酮和 Tyrphostin 47 是酪氨酸蛋白激酶的抑制剂,能抑制 J-1 株的内化,这与其他鱼类病原菌的内化机制相似^[12],而 Staurosporine 和 Sodium orthovanadate 都能促进细菌的内化,表明蛋白激酶 C、酪氨酸蛋白磷酸化酶参与 J-1 株的内化过程。细胞松弛素 D 能抑制 J-1 株的内化,使 HEp-2 的细胞骨架的微丝发生了重排。而 Ca²⁺ 通道抑制剂作用后对细菌内化几乎无影响,可以推断在 Ca²⁺ 信号转导的作用不大。这些符合 Tan 等^[13]观察的嗜水气单胞菌鱼源株侵袭引起细胞形态的变化所得的结果。

根据以上结果可以推断,嗜水气单胞菌的侵袭过程首先是细菌通过其表面的黏附素,如 S-蛋白、外膜蛋白、菌毛、脂多糖等与细胞表面受体发生作用,接着就触发细胞的一系列信号转导级联反应,包括酪氨酸蛋白激酶、蛋白激酶 C 的活化以及细胞微丝微管的重排,从而使细菌进入细胞内,进而繁殖,产生胞外产物,损害细胞。

参 考 文 献

[1] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述. 水产学报, 1992, 16(3) 282~288.

[2] Ysabel S, Alicia E T, Juan L, et al. Virulence properties and enterotoxin production of *Aeromonas* strains isolated from fish. *Infection and Immunity*, 1998, 56 3258~3293.

[3] Malcolm A L, Valerie B, Barbara J C. Invasion of HEp-2 cells by fecal isolates *Aeromonas hydrophila*. *Infection and Immunity*, 1985, 47 680~683.

[4] Leung K Y, Lim T M, Lam T J, et al. Morphological changes in carp epithelia cells infected with *Aeromonas hydrophila*. 1

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

- Fish Dis* , 1996 , **19** :167 ~ 174.
- [5] Low K W , Goh S G , Lim T M , *et al* . Actin rearrangements accompanying *Aeromonas hydrophila* entry into cultured fish cells. *J Fish Dis* , 1998 , **21** :55 ~ 66.
- [6] Rosenshine I , Finlay B B . Exploitation of host signal transduction pathways and cytoskeletal functions by invasive bacteria. *BioEssays* , 1993 , **15** :17 ~ 24.
- [7] 陈怀青 , 陆承平 . 家养鲤科鱼暴发性传染病的病原研究 . 南京农业大学学报 , 1991 , **14** (4) :87 ~ 91.
- [8] 顾天钊 , 陆承平 , 陈怀青 . 鲍氏不动杆菌鳊鱼分离株的侵袭特性 . 中国兽医学报 , 2000 , **20** (5) :465 ~ 470.
- [9] Janda J M , Abbott S L , Oshiro L S . Penetration and replication of *Edwardsiella* spp. in HEP-2 cells. *Infection and Immunity* , 1991 , **59** :154 ~ 161.
- [10] Leung K Y , Finlay B B . Intracellular replication is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium* . *Proc Natl Acad Sci USA* , 1991 , **88** :11470 ~ 11474.
- [11] Neves M S , Nunes M P , Milhomem A M . *Aeromonas* species exhibit aggregative adherence to HEp-2 cells. *J Clin Microbiol* , 1994 , **32** :1130 ~ 1131.
- [12] Wang X H , Oon H L , Ho G W P , *et al* . Internalization and cytotoxicity are important virulence mechanism in *Vibrio*-fish epithelial cell infections. *Microbiology* , 1998 , **144** :2987 ~ 3002.
- [13] Tan E , Low K W , Wang W S F , *et al* . Internalization of *Aeromonas hydrophila* by fish epithelial cells can be inhibited with a tyrosine kinase inhibitor. *Microbiology* , 1998 , **144** :299 ~ 307.

Invasion of *Aeromonas hydrophila* in Cells Involving Signal Transduction and Cytoskeleton

Chu Weihua Lu Chengping *

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

Abstract : Invasion of *Aeromonas hydrophila* strain Ah J-1 isolated from diseased fish to cultured HEp-2 cells monolayer was evaluated by the recovery of gentamycin-resistant (Gm^r) bacteria from Triton X-100 cell lysates. The invasive efficiency (IE) could reach to 0.2% at 37°C . In addition , potential signal transduction pathways that precede bacterial internalization were studied by using signal transduction inhibitors. Bacterial internalization of Ah J-1 involved microfilaments and protein tyrosine kinase since cytochalasin D (an inhibitor of microfilament polymerization) and genistein (an inhibitor of protein tyrosine kinase) prevented internalization. Staurosporin (a protein kinase C inhibitor) and Sodium orthovanadate (a protein tyrosine phosphatase inhibitor) accelerated internalization of Ah J-1 into HEp-2 cells.

Key words : *Aeromonas hydrophila* , Invasion , Signal transduction , Cytoskeleton ,

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