

肺炎链球菌磷壁酸胆碱成分介导细菌的侵袭

尹一兵 周东耀 张雪梅 孟江萍 康格非

(重庆医科大学医学检验系 重庆 400016)

摘 要 :分析肺炎链球菌细胞壁胆碱成分在其侵袭宿主细胞的过程中的作用。通过肺炎链球菌对人脐静脉内皮细胞的侵袭实验,观察血小板活化因子受体(PAF-R)拮抗剂 BN 52021 对肺炎链球菌侵袭率的变化,以及乙醇胺取代细胞壁胆碱后肺炎链球菌侵袭率的变化。研究发现受体拮抗剂 BN 52021 处理活化血管内皮细胞后,肺炎链球菌的侵袭率显著降低($P < 0.01$),乙醇胺取代肺炎链球菌细胞壁成份中的胆碱同样降低了细菌对活化内皮细胞的侵袭($P < 0.01$)。实验表明肺炎链球菌可能是通过脂磷壁酸和磷壁酸的胆碱成分与内皮细胞表面的血小板活化因子受体结合来介导侵袭作用的。

关键词 肺炎链球菌,侵袭,血小板活化因子受体(PAF-R)

中图分类号 :Q93 **文献标识码** :A **文章编号** :0001-6209(2004)03-0369-04

肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)可粘附于人的鼻咽部^[1],一般不出现临床症状。如果机体自身状态发生改变或伴有其他疾病,肺炎链球菌就会成为条件致病菌,从粘附部位下行到肺,与肺泡上皮细胞及毛细血管内皮细胞发生作用,引起大叶性肺炎。细菌甚至可入血,引发败血症及肺炎链球菌性脑膜炎等并发症,死亡率大大增加^[2]。有文献报道^[3,4]:鼻粘膜上皮细胞表面含有 GlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal 糖基,它是肺炎链球菌粘附的受体,而静息期(Resting)血管内皮细胞表面含 GalNAc β 1 \rightarrow 3(β 1 \rightarrow 4)Gal 结构,也可被肺炎链球菌特异识别。但是,在炎症时,血管内皮细胞表面结构发生巨大变化,出现一些新的受体。其中,就包括血小板活化因子受体(Platelet activating factor receptor, PAF-R),它能与 PAF 结合,介导 PAF 的炎症反应^[5]。肺炎链球菌的磷壁酸和脂磷壁酸与 PAF 具有相同的磷酸胆碱基团,它们也能与 PAF-R 结合^[6]。但是,这些壁成分与 PAF-R 结合后能否介导细菌粘附侵袭,目前还不清楚。此外,PAF-R 的一个重要特征就是它与 PAF 结合后,很快发生“内化”(Internalization)作用而进入细胞内^[7],但目前对于 PAF 内化作用方面的研究较少。肺炎链球菌的脂磷壁酸和磷壁酸与 PAF-R 结合是否也会发生“内部化”作用而进入细胞内,现在知之甚少。本研究组已建立了肺炎链球菌粘附细胞的模型^[8],为本课题的进行提供了一个良好的研究平台。基于以上

背景,本研究着重探讨细胞因子激活血管内皮细胞后(1)肺炎链球菌对活化的内皮细胞的侵袭及其与 PAF 受体的关系。(2)血小板活化因子受体拮抗剂及蛋白质合成抑制剂对肺炎链球菌侵袭的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

PAF 受体拮抗剂 BN 52021 及溶剂,由法国 IHB 研究所 Braquet, P 博士惠赠;白介素-1(IL-1)100 万 U/支,购自北京邦定生物工程公司;肿瘤坏死因子(TNF- α)10 万 U/支,购自北京邦定生物工程公司;肺炎链球菌标准 SIII 型菌株,中国医学科学院菌种保存中心;人脐静脉内皮细胞由本实验室分离培养。

1.2 人脐静脉内皮细胞的分离培养

参照安 静^[9]等方法,略加改进。无菌取新鲜脐带 20cm~25cm,去掉破损或有夹痕部分。无菌 D-Hanks 液后复冲洗,去除脐静脉中的淤血。静脉两端插上去尖端的大号针头,然后用止血钳夹紧。从一端将 0.25%的胰酶灌入,当另一端有胰酶流出时为止。30℃水浴消化 5min,连续 3 次,每次收集消化液于盛有 1640(含 15%小牛血清,终止消化)的离心管内。4℃1500g 离心 10min,去上清,再以无菌 D-Hanks 液洗 2 次。加入含 15%小牛血清的 1640,混匀并调整细胞浓度为 2×10^5 /mL。取 2mL 接种于直径为 4cm 的小培养皿中,37℃5%CO₂ 培养 48h,更换

基金项目 国家自然科学基金资助项目(30170050)

作者简介 尹一兵(1956-),男,重庆人,教授,硕士。主要从事肺炎链球菌致病和细菌自然转化相关的分子机理研究。Tel 86-23-68485658;

E-mail: yibingyin@21cn.com

收稿日期 2003-04-25,修回日期 2004-01-09

1640 培养基后继续培养。一般在第 4 天细胞就完全融合,可以用于粘附侵袭试验。

1.3 肺炎链球菌对活化内皮细胞侵袭作用的分析

内皮细胞经 IL-1(100U/mL) TNF-α(100 U/mL) 活化 4h 后 ,PBS 洗 5 次。加入用无血清无双抗的 1640 稀释的肺炎链球菌(5×10^7 CFU/ml),作用 45min 后用 PBS 洗 3 次 ,分别按 A、B 两种方法进行不同处理。

A. 加入 0.5% Triton X-100 溶解细胞 10min ,收集溶解液离心 20min(5000g),去上清。加入 1mL 无血清无双抗的 1640 培养液 ,混匀后再用无血清无双抗的 1640 培养液连续 2 次 20 倍稀释 ,取 100μL 涂血平板 ,置 37℃ 培养箱培养 48h ,计数菌落数。即可得到粘附和侵袭的细菌总数。

B. 先加入含庆大霉素(500U/mL) 青霉素(10U/mL)的 1640 培养基与内皮细胞作用 90min , 25℃。充分杀死细胞外粘附的细菌 ,无菌 PBS 洗 5 次 ,再按方法 A 处理。即可得到侵袭入细胞的肺炎链球菌数 ,计算侵袭率。

侵袭率 = $\frac{\text{侵袭的细菌总数}}{\text{粘附和侵袭的细菌总数}} \times 100\%$ 。

1.4 环己亚胺和 BN 52021 对细菌侵袭的影响

内皮细胞活化后 ,先经蛋白质合成抑制剂环己亚胺(0.1mmol/L)和血小板活化因子受体拮抗剂 BN

52021(100μg/mL)处理 30min ,PBS 洗 3 次后再按方法 1.3 处理。观察而二者对肺炎链球菌侵袭的影响。

1.5 乙醇胺取代细胞壁胆碱对细菌侵袭的影响

肺炎链球菌在不含胆碱而含乙醇胺(20μg/mL) 的 C + Y 培养基中生长 ,按方法 1.3 处理 ,分析侵袭作用。

1.6 数据统计处理

采用完全随机设计的方差分析。组内两两比较用 q 检验

2 结果

2.1 肺炎链球菌对活化内皮细胞的侵袭

实验结果表明 ,肺炎链球菌对活化内皮细胞的粘附率增加 ,侵袭作用则大大增强。静息期 ,粘附的肺炎链球菌很少发生侵袭 ,侵袭率不到 0.2%。而内皮细胞经 IL-1 活化后可使肺炎链球菌侵袭率提高 15 倍以上 ,达到 1.8%。TNF-α 可使侵袭率提高 20 倍以上 ,达到 2.5% ,结果表明(表 1) ,TNF-α 对肺炎链球菌侵袭的促进作用比 IL-1 略强($P < 0.05$) ,这可能是 TNF-α 对内皮细胞的直接损伤大 ,炎症反应程度严重 ,有利于细菌侵袭。结果提示 :细胞因子刺激内皮细胞表达新的表面受体与肺炎链球菌侵袭有关。

表 1 不同因素对肺炎链球菌侵袭的影响(CFU/瓶 $\bar{X} + S, n = 3$)

Table 1 The effect of different factors on pneumococcal invasion to HUVEC cells(CFU/bottle , $\bar{X} + S, n = 3$)

Group	Without antibiotics	With antibiotics	BN52021 + antibiotics	Cycloheximide + antibiotics	Ethanolamine + antibiotics	Trypsin + antibiotics
Resting state	(510 ± 94) × 10 ³	723 ± 186 [#]	679 ± 128	807 ± 141	658 ± 83	591 ± 95
Activated by IL-1 (100U/mL)	(834 ± 162) × 10 ³	(140 ± 34) × 10 ^{2*}	(37 ± 11) × 10 ^{2★}	(56 ± 20) × 10 ^{2★}	761 ± 127 [★]	(147 ± 26) × 10 ²
Activated by TNF-α (100U/mL)	(762 ± 137) × 10 ³	(190 ± 49) × 10 ^{2△}	(55 ± 18) × 10 ^{2▲}	(69 ± 17) × 10 ^{2▲}	813 ± 202 [▲]	(179 ± 23) × 10 ²

* , △ : $P < 0.01$ compared to # ; ★ , $P < 0.01$ compared to * ; ▲ , $P < 0.01$ compared to △ .

2.2 受体拮抗剂 BN 52021 及环己亚胺对肺炎链球菌侵袭的抑制作用

用血小板活化因子受体拮抗剂 BN 52021 处理活化的血管内皮细胞 ,可显著降低肺炎链球菌的侵袭($P < 0.01$) ,结果见表 1。BN 52021 是一种天然的萜类化合物 ,它能与血小板活化因子受体特异地结合。提示 :BN 52021 可能是占据了肺炎链球菌的侵袭受体 ,阻断侵袭因子与受体的结合。环己亚胺是一种蛋白质合成抑制剂 ,它可抑制细胞因子刺激内

皮细胞表达新的蛋白质受体。本实验发现 :环己亚胺可以降低肺炎链球菌对活化内皮细胞的侵袭(表 1)。提示 :环己亚胺可能抑制了内皮细胞合成新的受体蛋白 ,从而影响了肺炎链球菌的侵袭作用。

2.3 细胞壁磷酸胆碱基团和表面蛋白质对肺炎链球菌侵袭的影响

本实验发现 :乙醇胺取代肺炎链球菌细胞壁成份中的胆碱可以降低细菌对活化内皮细胞的侵袭作用($P < 0.01$) ,结果见表 1。结果提示 :磷酸胆碱基

团与肺炎链球菌粘附、侵袭活化的内皮细胞密切相关。

2.4 电镜观察

本研究用透射电镜观察到:内皮细胞中有肺炎链球菌侵入。有单个细菌,有成对细菌,还可见到3个细菌被包在囊泡内(图1)。肺炎链球菌菌体着色深,有些细菌的细胞壁清晰可见。粘附的细菌与内皮细胞的膜紧密相连。内皮细胞形态完整。从电镜照片中还可见到正处于侵袭过程中的肺炎链球菌,此时的内皮细胞膜局部出现凹陷(图2)。

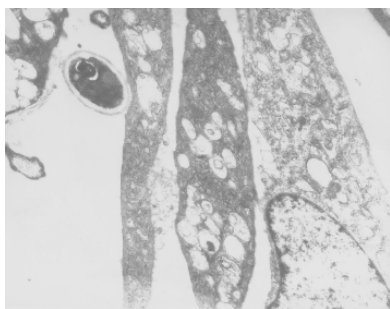


图1 肺炎链球菌侵袭 $\text{TNF-}\alpha$ 激活的内皮细胞的透射电镜照片(12000 \times)

Fig.1 Photo of pneumococcal invasion to HUVEC activated by $\text{TNF-}\alpha$ screened by transmission electron microscope (12000 \times)

The bacteria was invading to a HUVEC cell. The bacteria was in good shape with intact cell wall. A little part of it immersed in cell. The cell was in good shape and formed a part concavity.

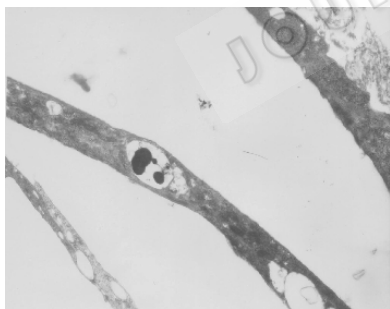


图2 肺炎链球菌侵袭 IL-1 激活的内皮细胞的透射电镜照片(8000 \times)

Fig.2 Photo of pneumococcal invasion to HUVEC activated by IL-1 screened by transmission electron microscope (8000 \times)

One and a pair of bacterium were surrounded in vesicle of HUVEC cell.

The cell wall of bacterium was invisible. The cell was in good shape.

3 讨论

人的呼吸道上皮细胞表面含有 $\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow 3\text{Gal}$ 糖结构,血管内皮细胞表面含有 $\text{GalNAc}\beta 1\rightarrow 3(\beta 1\rightarrow 4)\text{Gal}$ 糖结构,它们都是肺炎链球菌粘附的受体。但是,这种静息期的粘附很少引起侵袭^[10]。肺炎链球菌是一种条件致病菌,宿主细胞表面结构的改变可

能是细菌侵袭的一个重要原因。

血小板活化因子受体(PAF-R)广泛分布于人内皮细胞、肺上皮细胞、白细胞、血小板等,但一般情况下很少表达。如果受LPS或细胞因子 IL-1 、 $\text{TNF-}\alpha$ 等PAF-R表达促进剂的刺激,则可以大量表达,并分布到细胞膜表面,与PAF结合,参与PAF对细胞的炎症反应。由于细胞株为永生代细胞,其基因表达调控显然有别于正常细胞,本研究需要调节PAF的表达,因此选用原代细胞作为实验对象。

PAF-R与配基结合后,很快发生“内部化”作用而进入胞内。肺炎链球菌壁成份:磷壁酸、脂磷壁酸的结构与PAF的结构中都含有相同的活性基团——磷酸胆碱^[11],肺炎链球菌通过该基团与活化的内皮细胞表面的PAF-R结合,从而发生粘附作用。纯化的磷壁酸、脂磷壁酸及脱酰基脂磷壁酸可阻断细菌的这种粘附作用。肺炎链球菌与PAF受体的结合相当于一个大配基与受体结合,细菌可随受体的“内部化”作用而进入细胞内。因此,肺炎链球菌的侵袭可能不是主动过程,而是一个被动过程。用细胞松弛素D抑制宿主细胞骨架结构:微丝、微管的运动,也可阻止肺炎链球菌进入细胞^[12],也证明了这一点。电镜结果也发现:进入细胞内的肺炎链球菌有的还与内陷的细胞膜连在一起,而宿主细胞的结构却完好无损。以前认为:肺炎链球菌是非细胞内寄生菌。但本研究证实:它能在血管内皮细胞内存活,可逃避抗生素和宿主免疫系统的杀伤。

国外也有对肺炎链球菌细胞壁成分在其侵袭宿主时的作用机理研究^[13],但主要侧重于细胞壁的蛋白成分研究,而对于侵袭过程还不甚清楚。实验结果提示:肺炎链球菌的侵袭与磷壁酸和脂磷壁酸的结构特征密切相关。侵袭作用是通过磷壁酸和脂磷壁酸的磷酸胆碱基团与PAF受体结合,在增加粘附的基础上随受体内陷而进入细胞内。宿主细胞自身状态的改变直接影响到细菌粘附或侵袭,静息期以粘附为主,激活后则有利于侵袭。本实验用环己酰胺抑制宿主细胞表面受体蛋白质的合成,也可抑制肺炎链球菌的粘附和侵袭。同时,实验还发现:脱乙酰基的脂磷壁酸(ΔLTA)也能与PAF受体结合,抑制肺炎链球菌对活化内皮细胞的粘附,阻止肺炎链球菌的侵袭。已经证实 ΔLTA 不能刺激单核巨噬细胞产生 IL-6 及 PGE_2 ,不会直接引起炎症反应。利用这一特性,将 ΔLTA 与免疫增强剂结合,有可能开发出新一代的抗肺炎链球菌感染的疫苗。

PAF受体拮抗剂 RN-2021 一种天然的萜类化合物

物,它能与 PAF 受体特异结合,阻断由 PAF 引起的炎症反应^[14]。本实验用 BN52021 处理活化后的内皮细胞,既可抑制肺炎链球菌的粘附作用,又可大大降低细菌的侵袭。这可能是 BN52021 与 PAF 受体结合后占据了肺炎链球菌的粘附受体之缘故。结果提示肺炎链球菌可能是通过脂磷壁酸和磷壁酸与内皮细胞表面的血小板活化因子受体结合来介导侵袭作用的。PAF 受体拮抗剂除具有抗炎作用外,还有抗肺炎链球菌感染的作用,因此可能具有良好的医用前景。

参 考 文 献

- [1] Austrian R. Some aspects of the pneumococcal carrier state. *J Anti-microb Chemother*, 1986, **18** (suppl A): 35 – 45.
- [2] Pennington J E. Treating respiratory infections in the era of cost control. *Am Fam Physician*, 1986, **33** (2): 153 – 160.
- [3] Andersson B, Dahmen J, Frejd T, *et al.* Identification of an active disaccharide unit of a glycoconjugate receptor for pneumococcal attaching to human pharyngeal epithelial cell. *J Exp Med*, 1983, **158**: 559 – 570.
- [4] Cundell D R, Juomanen E I. Receptor specificity of *S. pneumoniae* to human type II pneumocytes and vascular endothelial cell in vitro. *Microb Pathog*, 1994, **17** (6): 361 – 374.
- [5] Chao W, Olson M S. PAF: receptors and signal transduction. *Biochem J*, 1993, **292**: 617 – 643.
- [6] Fischer W, Behr T, Hartmann R, *et al.* Teichoic acid and lipoteichoic acid of *S. pneumoniae* possess identical chain structures. *J Biochem*, 1993, **215**: 851 – 857.
- [7] Gerard N P, Gerard C. Receptor-dependent internalization of platelet-activating factor. *J Immunol*, 1994, **152**: 793 – 800.
- [8] 黄 彬,尹一兵,康格非.肺炎链球菌表面蛋白在体外介导细菌粘附小鼠巨噬细胞.中华微生物和免疫学杂志,1998, **14** (9): 389.
- [9] 安 静.胎儿脐静脉内皮细胞培养.第三军医大学学报,1990, **11** (3): 102 – 104.
- [10] Cundell D R, Gerard N P, Gerard C, *et al.* *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature*, 1995, **377**: 435 – 438.
- [11] Cabellus C, MacIntyre D E, Forrest M, *et al.* Differing roles for PAF during inflammation of the lung and subarachnoid space. *Clin Invest*, 1992, **90**: 612 – 618.
- [12] Talbot U M, Paton A W, Paton J C. Uptake of *S. pneumoniae* by respiratory epithelial cells. *Infect Immun*, 1996, **64** (9): 3772 – 3777.
- [13] Shani-Sekler M, Lifshitz S, Hillel I, *et al.* Initial steps in *Streptococcus pneumoniae* interaction with and pathogenicity to the host. *Adv Exp Med Biol*, 2000, **479**: 61 – 71.
- [14] Ko W, Lang D, Hawes A S, *et al.* PAF antagonism attenuates platelet and neutrophil activation and reduces myocardial injury during coronary reperfusion. *J Surg Res*, 1993, **55** (5): 504 – 515.

Choline of Pneumococcal Cell Wall Mediated *Streptococcus pneumoniae* Invasion to Activated HUVEC

YIN Yi-Bing* ZHOU Dong-Yao ZHANG Xue-Mei MENG Jiang-Ping KANG Ge-Fei

(Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: To study the effect of the choline in pneumococcal cell wall on its invasion of HUVEC. By invasion experiment to examine the invasion rate of activated HUVEC by *S. pneumoniae*, when pneumococcus were administrated with BN52021, which is a platelet-activating factor receptor (PAF-R) antagonist or choline in pneumococcal culture was substituted with ethanolamine. It was observed that platelet activating factor receptor antagonist BN52021 and the substitution of choline with ethanolamine in culture blocked the invasion to HUVEC. It was demonstrated that the choline in pneumococcal cell wall was the critical site of pneumococci binding to PAF-R. And pneumococci invade HUVEC with the PAF-R internalization.

Key words *Streptococcus pneumoniae*, Invasion, Platelet activating factor receptor

Foundation item: National Natural Sciences Foundation of China (30170050)

* Corresponding author. Tel 86-23-68485658; E-mail: yibingyin@21cn.com

Received date 04-25-2003