

迟缓爱德华氏菌对 HEp-2 细胞的侵袭特性*

马 勋 欧阳志明 陈怀青 陆承平** 夏晓勤

(南京农业大学动物医学院 南京 210095)

摘 要 用细胞裂解计数法及超薄切片电镜观察法分析了迟缓爱德华氏菌侵袭 HEp-2 细胞的基本特性。在 15 株来源各异的迟缓爱德华氏菌中,有 6 株细菌具有对 HEp-2 细胞的侵袭能力。细菌侵入细胞后,主要位于空泡内。侵入细胞内的迟缓爱德华氏菌不仅可在细胞内增殖,而且可从细胞内释放出来。用细胞松弛素破坏微丝后可抑制其侵袭作用,而且表现出剂量依赖关系,而用秋水仙素破坏微管后不影响其侵袭力。这表明在迟缓爱德华氏菌对 HEp-2 细胞的侵袭过程中,细胞骨架中有微丝的参与,未发现微管的参与。

关键词 迟缓爱德华氏菌,侵袭,增殖,细胞骨架

分类号 R378

迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*, Et) 的感染谱甚广,是一种重要的人兽共患病的病原菌,特别是它引起我国养殖鳊鱼及中华鳖的急性流行性败血症,导致严重的经济损失。Et 还是爱德华氏菌属中唯一感染人的成员,可引起人类的胃肠炎及脑膜炎、肝脓肿、蜂窝织炎、骨髓炎和败血症等,其致病性已日益受到重视。迄今为止,Et 的毒力因子及致病机制尚不清楚。尤其是 Et 与沙门氏菌、志贺氏菌及耶尔森氏菌等同为肠道病原菌,是否也具有对上皮细胞的侵袭能力,出现了相互矛盾的报道。Ullah 等用经典的 Sereny 试验及 HeLa 细胞侵袭试验,证明从鳊鱼及鲢鱼分离的 19 株 Et 均无侵袭力^[1],而 Marques 等则发现所测的全部 12 株 Et 均能侵袭 HeLa 细胞^[2],Et 究竟有无侵袭力,亟需澄清。

侵袭是内化的一种特殊表现形式,是病原细菌与宿主细胞相互作用的结果^[3,4]。不仅与细菌表面的外膜蛋白等成份有关^[5],而且与细胞表面的整合素受体、细胞骨架及细胞内信号转导等均有密切的联系^[6]。特别是细胞骨架在细菌侵袭过程中处于核心地位^[7]。侵袭时牵涉到细胞骨架的何种成员,亦有待阐明。本试验以 HEp-2 细胞作为体外模型,详细分析了 Et 的侵袭特性。

1 材料和方法

1.1 细菌菌株

在所用的 15 株 Et 菌株中,DSM30052 号参考菌株 (= ATCC 15947) 系从德国菌种收藏中心引进,德国吉森大学 Baljer 教授惠赠。其余 14 株均为国内临床分离菌株,其中人源

* 江苏省“九·五”攻关项目(项目编号 BE96427)。

** 通讯作者

收稿日期:1996-12-25

菌株 1 株、鳖源菌株 5 株、鳗源菌株 8 株(表 1)。所有试验菌株均按 1% 接种量接种于 LB 肉汤中, 37℃ 静置培养过夜。试验前用无菌 PBS 洗涤 3 次, 最后用不含抗生素而含 1% 胎牛血清(FCS, Gibco 公司)的 MEM 稀释成 2×10^6 CFU/ml 菌液待用。

1.2 细胞

本试验采用的细胞为 HEp-2, 江苏省卫生防疫站郑理先生提供。正常情况下用含 10% FCS-MEM 营养液培养; 每周传代 2 次。试验时将 HEp-2 细胞单层用胰酶消化, 按每孔 10^5 个细胞的密度加至 24 孔细胞培养板中, 置 37℃ 5% CO₂ 饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养 18 h, 即长成单层, 每孔约含 2×10^5 个细胞。

1.3 侵袭试验

采用细胞裂解计数法进行^[8]。24 孔细胞培养板中的 HEp-2 细胞单层用无菌 PBS 洗 3 遍, 每孔加入 500 μl 菌液, 然后置 37℃ 5% CO₂ 培养箱中孵育 2 h, 吸去菌液后, 用 PBS 洗 10 遍, 接着每孔加入 1 ml 含 100 μg/ml 庆大霉素的营养液, 37℃ 5% CO₂ 培养箱中继续孵育 2 h。再用 PBS 洗 5 遍, 最后每孔加入 500 μl 含 1% Triton X-100 的 PBS, 室温作用 5 min, 迅速加入 500 μl PBS, 用巴氏吸管吹打, 取样系列稀释, 涂布营养琼脂平板, 置 37℃ 培养 48 h, 进行细菌计数。每孔能获得 1000 CFU 者判为阳性, 表明该菌具有侵袭力。

1.4 电镜观察

基本步骤同侵袭试验, 即加入感染细菌, 孵育、洗涤, 用庆大霉素处理, 洗涤。细菌侵袭后的 HEp-2 细胞用胰酶消化, 离心去上清液, 细胞沉淀用 2.5% 戊二醛固定, 作超薄切片, 醋酸铀染色。用 Hitachi JEM100-XC 透射电镜观察。

1.5 破坏微丝

进行侵袭试验前, 将 24 孔细胞培养板中的 HEp-2 细胞用不同浓度的细胞松弛素 B(Sigma 公司)或细胞松弛素 D(Sigma 公司)处理 30 min, 以破坏细胞的微丝。随后进行侵袭试验, 但在整个过程中始终有相应浓度的细胞松弛素存在。细胞松弛素采用二甲基亚砜(DMSO, Sigma 公司)预先配成母液, 而后用 1% FCS-MEM(不含抗生素)稀释成不同浓度的使用液。

1.6 破坏微管

用 DMSO 将秋水仙素配制成母液, 而后用不含抗生素的 1% FCS-MEM 稀释成不同的浓度, 预先处理 24 孔板中的 HEp-2 细胞 30 min, 再进行侵袭试验。

2 结果

2.1 Et 对 HEp-2 细胞的侵袭力

用细胞裂解计数法分析 15 株 Et 的侵袭力, 结果有 6 株细菌获得的菌落数超过了接种量的 0.1%, 即大于 10^3 CFU, 显示出 HEp-2 细胞的侵袭力(表 1)。同时, DSM30052 株侵袭 HEp-2 细胞后作超薄切片, 电镜观察可见细胞空泡内有许多细菌(图 1)。

2.2 侵袭动力学分析

在侵袭试验中, 细菌感染细胞后, 改换含庆大霉素的营养液, 分别孵育 2、4、6、8 和 10 h, 洗涤后再用 1% Triton X-100 裂解细胞, 进行细菌计数。发现 Et DSM30052 和 22 号株侵袭 HEp-2 细胞后, 在细胞内均有一定程度的增殖, 在 6 h 达到高峰, 随后胞内菌数又下

表1 迟缓爱德华氏菌对HEp-2细胞的侵袭作用

Table 1 Invasion to HEp-2 cells of *E. tarda*

菌株 Strain	宿主 Host	来源 Source	获得菌落数 Obtained Progeny (CFU/well)	结果 Result
DSM30052	人粪 Human feces	德国 Germany	1593±47	+
22	鳗 Eel	广东 Guangdong	1280±32	+
115	人 Human	上海 Shanghai	680±22	-
121	中华鳖 Soft-shelled turtle	福建 Fujian	3003±42	+
122	中华鳖 Soft-shelled turtle	福建 Fujian	4000±12	+
123	中华鳖 Soft-shelled turtle	福建 Fujian	1377±29	+
203	鳗 Eel	湖北 Hubei	760±16	-
205	鳗 Eel	湖北 Hubei	547±15	-
751	鳗 Eel	江苏 Jiangsu	0	-
753	中华鳖 Soft-shelled turtle	福建 Fujian	843±19	-
756	中华鳖 Soft-shelled turtle	福建 Fujian	1753±20	+
D6	鳗 Eel	广东 Guangdong	0	-
M8	鳗 Eel	广东 Guangdong	0	-
M10	鳗 Eel	广东 Guangdong	0	-
M11	鳗 Eel	广东 Guangdong	0	-

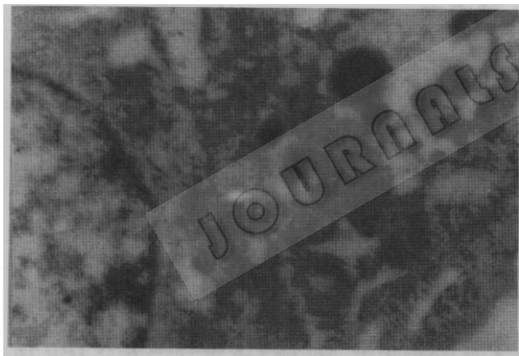


图1 Et侵袭HEp-2细胞的电镜观察

Fig.1 Electron microscopy of thin-section of HEp-2 cells, showing internalized *E. tarda*

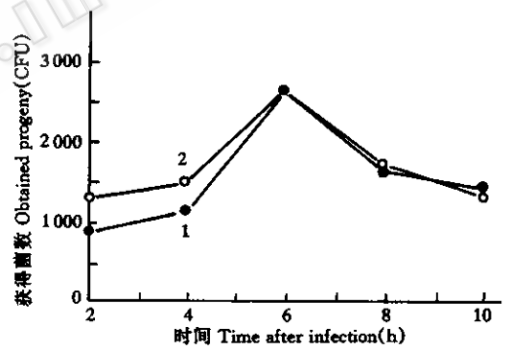


图2 Et的侵袭动力学

Fig.2 Kinetics of internalization of *E. tarda*

1. Et DSM30052; 2. Et 22 strain.

降(图2)。

2.3 细胞松弛素对Et侵袭作用的影响

用细胞松弛素B和细胞松弛素D处理细胞,均能显著抑制Et DSM30052株对HEp-2细胞的侵袭。0.1~5.0 μg/ml的细胞松弛素D的抑制率为63.6%~94.5%(图3),2.5~10 μg/ml的细胞松弛素B的抑制率为42%~81.6%(图4)。而相同浓度的DMSO处理细胞后,侵袭试验所获得的细菌数虽然也有所下降,但差异不显著。

2.4 秋水仙素对Et侵袭作用的影响

用0.25~100 μmol/L的秋水仙素处理HEp-2细胞后,Et DSM30052株的侵袭菌数

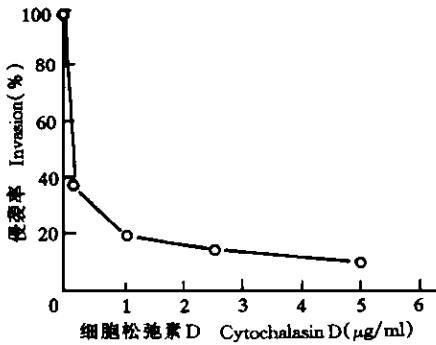


图3 细胞松弛素D对Et DSM30052株侵袭的影响

Fig.3 Effect of cytochalasin D on internalization of *E. tarda*

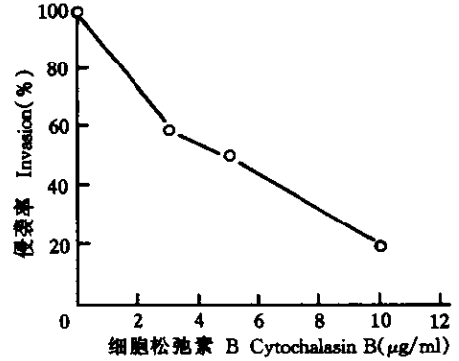


图4 细胞松弛素B对Et DSM30052株侵袭的影响

Fig.4 Effect of cytochalasin B on internalization of *E. tarda*

虽有所下降,但差异不显著,表明秋水仙素不能抑制其侵袭(图5)。

3 讨论

侵袭是许多病原细菌重要的毒力特征。新近发现,志贺氏菌等肠道致病菌的感染离不开对肠上皮细胞的侵袭过程,对上皮细胞的侵袭是这些肠道菌重要的毒力机制。而同为肠道菌的Et,究竟有无毒力,国外报道不一,国内则未见报道。本试验采用国际公认的侵袭模式细胞HEp-2细胞作为指示细胞,用标准的细胞裂解计数法分析了15株Et的侵袭力,结果发现仅有部分(40%)Et有侵袭力。这一结果与Janda等的报道相符^[9]。但是Marques等发现所有Et均有侵袭力,而Ullah等的结果^[11]则正好与此相反。引起这些相互矛盾结果的原因可能与不同的菌株来源及接种剂量等有关。

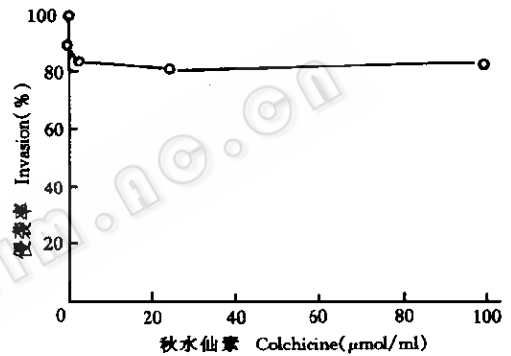


图5 秋水仙素对Et DSM30052株侵袭的影响

Fig.5 Effect of colchicine on internalization of *E. tarda*

细胞裂解计数法的前提是庆大霉素等氨基糖苷类抗生素不能通过细胞膜。加入庆大霉素后,仅能杀死细胞外的细菌,去除庆大霉素后,裂解细胞,使进入胞内的细菌释放出来,即可通过平板计数法测定细胞内细菌的数量。本试验所有15株Et对庆大霉素都高度敏感,庆大霉素处理2h后细胞营养液中亦无细菌存在,说明平板计数的结果是胞内细菌数的真实反映。

沙门氏菌、耶尔森氏菌侵袭细胞后直接在空泡内增殖,而志贺氏菌则通过其细胞接触性溶血素的作用从空泡内逸出,在细胞质中增殖^[4]。Janda等发现Et侵袭HEp-2细胞后,可在细胞质中繁殖,并推测该菌的细胞结合性溶血素起着类似志贺氏菌细胞接触性溶血素的作用^[9]。然而,本试验电镜观察表明,Et主要位于细胞的空泡内,且同一空泡内有多个菌体,而在胞质中未见。据此推测Et是在空泡内增殖的。

Et对HEp-2细胞的侵袭,需要细胞微丝的参与,因为用细胞松弛素D和细胞松弛素B

处理细胞后,可显著抑制该菌的侵袭,特别是 $5\mu\text{g} / \text{ml}$ 细胞松弛素 D 的抑制率高达 94.5%。Janda 等亦发现这两种细胞松弛素可抑制 Et 的侵袭^[9],但发现破坏微管的秋水仙素也能抑制 Et 的侵袭,抑制率达 60%,而本试验中未能证实微管在 Et 侵袭中的作用。尽管如此,本试验的结果足以表明,细胞骨架在细胞侵袭过程中的作用至关重要。

参 考 文 献

- [1] Ullah M A, Aral T. *Fish Pathol*, 1983, 18(1):65~70.
- [2] Marques L R M, Toledo M R F, Silva N P *et al. Curr Microbiol*, 1984, 10(1):129~132.
- [3] Finlay B B, Falkow S. *Microbiol Rev*, 1989, 53(2):210~230.
- [4] Falkow S, Isberg R R, Portnoy D A. *Ann Rev Cell Biol*, 1992, 8:333~363.
- [5] 陈怀青,陆承平. 国外医学微生物学分册,1996,19(1):16~19.
- [6] Bliska J B, Galan J E, Falkow S. *Cell*, 1993, 73(5):903~920.
- [7] Isberg R R, Nhieu T V. *Ann Rev Genet*, 1994, 27:395~422.
- [8] Falkow S, Small P, Isberg R *et al. Rev Infect Dis*, 1987, 9(suppl):450~455.
- [9] Janda J M, Abbott S L, Dshiro L S. *Infect Immun*, 1991, 59(1):154~161.

INTERNALIZATION AND REPLICATION OF *EDWARDSIELLA TARDA* IN HEP-2 CELLS

Ma Xun Ouyang Zhiming Chen Huaqing Lu Chengping Xia Xiaoqin

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract It is demonstrated that *Edwardsiella tarda* possesses the ability to invade cultured epithelial HEP-2 cells by both lysis-counting assay and thin-section electron microscopy. Among fifteen strains of *E. tarda*, 6 strains internalized into HEP-2 cells and located mainly in vesicles. After internalization, the bacteria replicated in the host cells and then released into medium. Pretreatment of the HEP-2 cells with various concentration of cytochalasin D ($0.1\sim 5.0\mu\text{g} / \text{ml}$) or cytochalasin B ($2.5\sim 10.0\mu\text{g} / \text{ml}$) significantly reduced the amount of internalized bacteria in a dose-dependent manner. While pretreatment of HEP-2 cells with $0.25\sim 100\mu\text{mol} / \text{L}$ colchicine did not show any effect on the invasiveness of *E. tarda*. This strongly indicates that microfilaments are required for the internalization of *E. tarda* into HEP-2 cells and that microtubules are not involved in the entrance of *E. tarda* into HEP-2 cells.

Key words *Edwardsiella tarda*, Internalization, Replication, Cytoskeleton