

## 肠球菌溶血及非溶血菌株对小鼠巨噬细胞表达 TNF- $\alpha$ 的影响

强华, 郑晓辉, 林建银

(福建医科大学病原生物学系, 福州 350004)

**摘要:** 【目的】探讨肠球菌溶血菌株及非溶血菌株对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 表达 TNF- $\alpha$  的影响。

【方法】用多粘菌素 B 抑制排除内毒素污染对实验的影响。肠球菌溶血菌株、非溶血菌株各 11 株, 以菌/细胞比 30 : 1 感染 RAW264.7 细胞 1 h, 加入 200  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素继续培养 24 h, 分别于感染后 3、6、9、24 h, 用 ELISA 方法检测不同观测点细胞培养液中肿瘤坏死因子 TNF- $\alpha$  的含量, 并用逆转录-聚合酶链反应方法 (RT-PCR) 比较肠球菌溶血、非溶血菌株感染 6 h 后 TNF- $\alpha$  mRNA 表达的差异。【结果】未感染的 RAW264.7 细胞培养液中检测不到 TNF- $\alpha$ 。肠球菌溶血菌株感染组细胞培养上清液中各观测点的 TNF- $\alpha$  的平均含量 (pg/mL) 均比非溶血菌株性组高。经 t 检验,  $P < 0.01$ , 差别有显著性。RT-PCR 法检测其 mRNA 的表达也有相同结果: TNF- $\alpha$  mRNA 在肠球菌溶血菌株感染细胞中的相对表达量比非溶血菌株感染的细胞高, 经 t 检验,  $P < 0.05$ , 差别有统计学意义。【结论】肠球菌溶血菌株比非溶血菌株更能促进小鼠巨噬细胞 RAW264.7 产生 TNF- $\alpha$  炎症因子。

**关键词:** 肠球菌属; 溶血素; 肿瘤坏死因子 TNF- $\alpha$ ; 逆转录-聚合酶链反应 RT-PCR

**中图分类号:** R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 12-1649-05

肠球菌是院内感染的重要病原, 所致疾病包括泌尿道感染、心内膜炎、败血症、前列腺炎、胆囊炎、腹膜炎、关节炎、眼内炎、食物中毒等多种疾病, 其中心内膜炎、败血症等已对生命造成严重威胁<sup>[1, 2]</sup>。同时, 肠球菌的多耐药、高耐药、以及万古霉素耐药菌迅速增加, 被喻为“超级细菌”, 给治疗带来极大困难, 人们开始关注肠球菌毒力因子及其致病机制, 以制定防治肠球菌感染的新策略。

目前, 国内对肠球菌的研究多集中在微生物生态学意义及耐药性上, 相关毒力因子研究的报道较少。国外已通过临床资料及动物模型研究表明肠球菌溶血素是重要的毒力因子, 但对其作用机制的研究很少, 主要是其细胞毒作用。近年研究表明: 有些细菌的溶血素如百日咳杆菌、肺炎链球菌、李斯特菌等可促进中性粒细胞、A549 等细胞产生炎症介质<sup>[3-5]</sup>, 肠球菌溶血素是否有类似促进炎症因子产生的作

用, 未见报道。本文通过比较肠球菌溶血、非溶血菌株感染巨噬细胞后, 培养液中 TNF- $\alpha$  炎症因子的含量以及 TNF- $\alpha$  mRNA 表达的差异, 为进一步探讨肠球菌溶血素经典的细胞毒作用外的其他致病机制奠定基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和细胞:** 肠球菌溶血菌株分离自福建医科大学附属协和医院、附属第一医院临床标本, 肠球菌非溶血菌株中 10 株为临床标本, 1 株分离自健康人群。小鼠单核细胞-巨噬细胞株 RAW264.7, 购自中科院上海细胞生物研究所。

**1.1.2 引物:** 由日本 TaKaRa 生物有限公司合成。PCR 溶血素 *cyIA* 基因(扩增片段 480 bp): 上游: 5'-ACAC-GATTGCTCCAAGAGTGA-3', 下游: 5'-GAAAGTCA

基金项目: 福建省自然科学基金(C0510008); 福建省科技计划项目(2005D090)

作者简介: 强华(1966-), 女, 福建闽侯人, 副教授、博士, 研究方向条件致病菌。Tel: +86-591-83569309; E-mail: qianghua66@sina.com

收稿日期: 2008-06-07; 修回日期: 2008-10-10

GCAGCTTTGCCTA-3 ; RT-PCR 内参 GAPDH (扩增片段 530 bp): 上游: 5'-AGGCCGGTGCTGAGTA-TGTC-3 ,下游: 5'-TGCCTGCTTACCACCTTCT-3 ; RT-PCR TNF- $\alpha$  (扩增片段 443 bp): 上游: 5'-TGGA-AGACTCCTCCCAGGTA-3 , 下游: 5'-GTCTACTGA ACTTCGGGGTGA-3 。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** TNF- $\alpha$  ELISA 检测试剂盒 (深圳晶美有限公司); Titan One Tube RT-PCR Kit (Roche 公司); 用于总 RNA 提取 Total RNA Isolation Kit (Invitrogen 公司); Ex Taq 酶、Rnase H 和 DNase I (Roche 公司); RPMI1640 细胞培养液、胰蛋白酶 (Gibco 公司); 小牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司); LPS (Sigma 公司); 多粘菌素 B polymyxin-B (AMRESCO 公司); 氨苄青霉素 ampicillin (华北制药集团); PCR 仪 2720 型 (ABI 公司); 紫外分光光度计 2100pro 型 (BIOCHROM 公司); 凝胶成像分析仪 Gel Doc 1000、稳压电泳仪 300 型 (BIO-RAD 公司); 二氧化碳细胞培养箱 BB15 (Heraeus 贺利氏公司)。

## 1.2 肠球菌溶血株、非溶血株的判定

肠球菌属鉴定、溶血素表型检测、溶血素基因型检测、药敏实验参照文献[6]。肠球菌溶血素 *cylA* 基因检测的 PCR 反应体系组分( $\mu$ L): ExTaq 预混液 12.5, 上游引物 F 1.0, 下游引物 R 1.0, 菌液上清 1.0, 高压灭菌水 9.5, 总计 25.0。PCR 反应程序: 94 3 min, 94 30 s, 6 30 s, 72 60 s; 30 个循环, 72 7 min。选取对氨苄青霉素敏感, 在 5% 兔血平板出现透明溶血环, 且溶血素 *cylA* 基因 PCR 阳性的菌株 (即溶血素表型及基因型都阳性者) 作为肠球菌溶血株组 ( $hly^+$ ), 对氨苄青霉素敏感, 在 5% 兔血平板不出现透明溶血环, 且 *cylA* PCR 阴性的菌株 (即溶血素表型及基因型都阴性者) 作为肠球菌非溶血株组 ( $hly^-$ )。

## 1.3 细菌悬液制备

$hly^+$  肠球菌、 $hly^-$  肠球菌分别培养 24 h, 用 RPMI1640 细胞培养液调整菌密度为  $1 \times 10^8$  个/mL。

## 1.4 RAW264.7 细胞培养

RAW264.7 细胞培养在含 10% 小牛血清的 RPMI1640 细胞培养液中, 置于 37 含 5%  $CO_2$  的培养箱内培养, 按贴壁细胞传代培养法, 每两天用 0.25% 胰酶消化传代一次。用 0.25% 的胰酶消化对数生长期的 RAW264.7 细胞, 用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 细胞培养液调节细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL。

## 1.5 细菌感染 RAW264.7 细胞

经胰酶消化制成  $1 \times 10^6$  个/mL 细胞悬液, 每孔 1 mL, 接种于 12 孔细胞培养板, 贴壁生长后, 吸弃培养液, 分别加入 1 mL 用 10% 小牛血清 RPMI1640 培养液配制的  $3 \times 10^7$  个/mL  $hly^+$  肠球菌、 $hly^-$  肠球菌悬液。每株细菌重复 3 孔, 另取 3 孔加细胞培养液作空白对照。感染 1 h, 吸弃培养液, 用 RPMI1640 培养液反复洗 5 遍, 加入含氨苄青霉素 200  $\mu$ g/mL、10% 小牛血清 RPMI1640 培养液继续培养。分别于感染后 3、6、9、24 h 收集细胞培养液, -20 冰箱保存, 待测。收集感染后 6 h 的细胞提取 RNA。

## 1.6 内毒素污染的检测

50 ng/mL LPS、 $hly^+$ 、 $hly^-$  肠球菌感染 RAW264.7 细胞时分别加入多粘菌素 B (5  $\mu$ g/mL), 另一平行组加培养液。比较感染 6 h 后加多粘菌素 B 组与不加多粘菌素 B 组的感染细胞培养上清液中 TNF- $\alpha$  的含量, 观察多粘菌素 B 的存在是否能抑制肠球菌感染的 RAW264.7 细胞培养液中 TNF- $\alpha$  的含量。

## 1.7 细胞培养液中 TNF- $\alpha$ 测定

按试剂盒操作说明进行。

## 1.8 RT-PCR 检测 TNF- $\alpha$ 表达

按 Trizol 说明书, 一步法提取 RAW 264.7 细胞总 RNA; 测定 RNA 浓度及纯度; 用 RT-PCR kit 将 RNA 逆转录成 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 PCR。反应体系 25.0  $\mu$ L: 反应条件: 94 3 min, 94 30 s, 9 40 s, 72 60 s; 30 个循环; 72 7 min。PCR 产物琼脂糖凝胶电泳, 对电泳条带光密度进行扫描, 获各条带光密度, 计算 TNF- $\alpha$  基因的相对表达水平。计算公式如下: TNF- $\alpha$  基因的相对表达水平 = TNF- $\alpha$  基因 RT-PCR 产物电泳条带的光密度 / GAPDH 内参 RT-PCR 产物电泳条带的光密度。

## 1.9 统计学处理

数据用 SPSS11.0 统计软件包处理。细胞培养液 TNF- $\alpha$  含量、RT-PCR mRNA 相对灰度值以  $\bar{x} \pm S$  表示。 $hly^+$ 、 $hly^-$  组细胞培养液中 TNF- $\alpha$  含量比较以及  $hly^+$ 、 $hly^-$  组 RT-PCR mRNA 相对灰度值比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  确定为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肠球菌溶血株的基因型检测

PCR 扩增肠球菌溶血素基因较为保守的 *cylA* 片段, 扩增范围 544~1024 bp, 凝胶电泳 480 bp 处, 溶血菌株可见 DNA 条带 (图 1)。

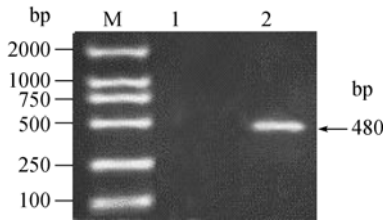


图 1 肠球菌溶血素 *cyIA* 基因的检测

Fig. 1 PCR amplification of *cyIA* gene to detect the occurrence of enterococci hemolysin. M. DL-2000 marker; 1. non-hemolytic strain; 2. hemolytic strain.

2.2 多粘菌素 B 对肠球菌感染的 RAW264.7 细胞产生 TNF- $\alpha$  的影响

多粘菌素 B 消除 LPS 影响的能力是可信的, 5  $\mu\text{g/mL}$  多粘菌素 B 能抑制 99% 的由 50  $\text{ng/mL}$  LPS 刺激产生的 TNF- $\alpha$  含量, 经 *t* 检验,  $P < 0.01$ , 差别有显著性。无肠球菌感染的细胞培养液中检测不到 TNF- $\alpha$  含量 (低于 20  $\text{ng/mL}$ ), 而且 5  $\mu\text{g/mL}$  多粘菌素 B 对 *hly*<sup>+</sup> 肠球菌、*hly*<sup>-</sup> 肠球菌感染 6h 后培养上清

表 1 多粘菌素 B 对肠球菌及 LPS 感染的 RAW264.7 细胞产生 TNF- $\alpha$  含量的影响

Enterococci	Culture medium ( $\bar{x} \pm S$ )(pg/mL)	Polymyxin-B(5 $\mu\text{g/mL}$ ) ( $\bar{x} \pm S$ )(pg/mL)
<i>Hly</i> <sup>+</sup> strains(n=5)	8012 $\pm$ 524	8211 $\pm$ 548 <sup>b</sup>
<i>Hly</i> <sup>-</sup> strains(n=5)	2877 $\pm$ 212	3085 $\pm$ 257 <sup>b</sup>
LPS control(n=5)	11140 $\pm$ 635	105 $\pm$ 37 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.01$ , b:  $P > 0.05$  compared with medium control untreated with PmB.

表 2 *hly*<sup>+</sup>、*hly*<sup>-</sup> 肠球菌感染的 RAW264.7 细胞培养液中 TNF- $\alpha$  的含量

Group	3 h(pg/mL)( $\bar{x} \pm S$ )	6 h(pg/mL)( $\bar{x} \pm S$ )	9 h(pg/mL)( $\bar{x} \pm S$ )	24 h(pg/mL)( $\bar{x} \pm S$ )
<i>hly</i> <sup>+</sup> strains(n=11)	4169 $\pm$ 378 <sup>a</sup>	8132 $\pm$ 524 <sup>a</sup>	5457 $\pm$ 309 <sup>a</sup>	4822 $\pm$ 295 <sup>a</sup>
<i>hly</i> <sup>-</sup> strains(n=11)	1085 $\pm$ 256	2975 $\pm$ 265	1383 $\pm$ 297	1236 $\pm$ 285
medium control(n=5)	<20	<20	<20	<20

a:  $P < 0.01$  compared with *hly*<sup>-</sup> enterococci group

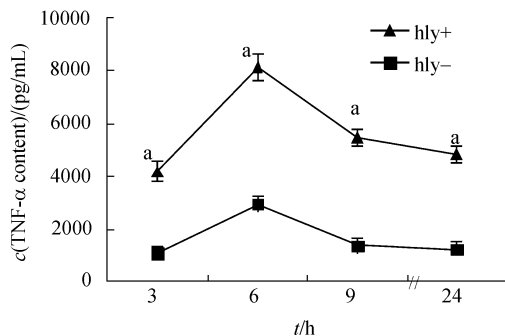


图 3 *hly*<sup>+</sup> 肠球菌、*hly*<sup>-</sup> 肠球菌感染的 RAW264.7 细胞培养液中的 TNF- $\alpha$  的含量

Fig. 3 Contents of TNF- $\alpha$  in the culture supernatants of RAW264.7 cells infected with *hly*<sup>+</sup> or *hly*<sup>-</sup> enterococci. *hly*<sup>+</sup> enterococci(n=11) *hly*<sup>-</sup> enterococci(n=11) medium control(n=5). a:  $P < 0.01$ , compared with *hly*<sup>-</sup> enterococci group.

液中的 TNF- $\alpha$  含量没有影响, 经 *t* 检验,  $P > 0.05$ , 说明环境中 LPS 的污染对实验结果的影响可忽略, 肠球菌本身具有刺激 RAW264.7 细胞产生 TNF- $\alpha$  炎症因子的作用 (表 1、图 2)。

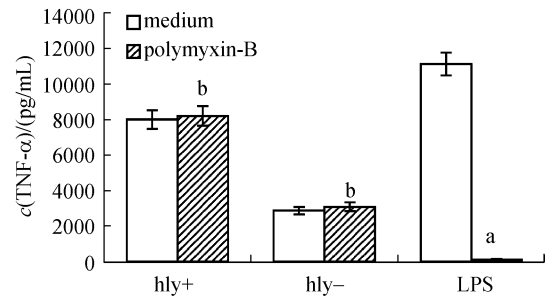


图 2 多粘菌素 B 对肠球菌及 LPS 感染的 RAW264.7 细胞产生 TNF- $\alpha$  含量的影响

Fig. 2 Effect of polymyxin-B on the release of TNF- $\alpha$  from RAW264.7 infected with enterococci or LPS. *hly*<sup>+</sup> enterococci(n=5), *hly*<sup>-</sup> enterococci(n=5), LPS control(n=5), a:  $P < 0.01$ , b:  $P > 0.05$  compared with medium control untreated with PmB.

2.3 *hly*<sup>+</sup> 肠球菌、*hly*<sup>-</sup> 肠球菌感染 RAW264.7 细胞产生 TNF- $\alpha$  含量的比较

如表 2、图 3 所示, 未加细菌的空白对照组检测不到 TNF- $\alpha$ 。细菌感染 3h 后细胞培养上清液中 TNF- $\alpha$  含量开始增加, 6 h 达到高峰, 随后降低。各观测点细胞培养上清液中的 TNF- $\alpha$  的含量, 肠球菌溶血株组均比肠球菌非溶血株组高, 经 *t* 检验,  $P < 0.01$ , 差别有显著性。

2.4 *hly*<sup>+</sup> 肠球菌、*hly*<sup>-</sup> 肠球菌感染 RAW264.7 细胞表达 TNF- $\alpha$  mRNA 的比较

提取的感染细胞 RNA, 每份样品的 *OD*<sub>260</sub> 与 *OD*<sub>280</sub> 值均在 1.8~2.0 之间, 可见 28 S, 18 S 带完整, 说明细胞总 RNA 的纯度和完整性良好。

如图 4 所示: RT-PCR 可扩增出 443 bp、530 bp 处两条 DNA 条带, 分别代表 TNF- $\alpha$  和 GAPDH 内参。 *Hly*<sup>+</sup> 肠球菌感染细胞表达的 TNF- $\alpha$  条带比 *hly*<sup>-</sup> 肠球菌感染的条带亮, 未感染细胞 443 bp 处未出现相应条带。

如表 3 所示: TNF- $\alpha$  在 *hly*<sup>+</sup> 肠球菌感染 RAW264.7 细胞中的相对表达量比 *hly*<sup>-</sup> 肠球菌感染细胞的表达量高, 经 *t* 检验,  $P < 0.05$ , 差别有显著性。

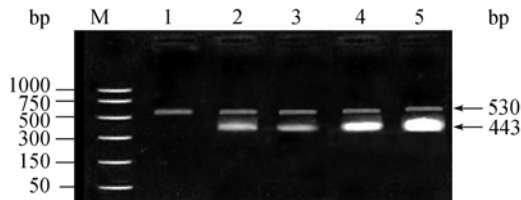


图 4  $hly^+$ 、 $hly^-$ 肠球菌感染的 RAW264.7 细胞中 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达

Fig. 4 Expression of TNF- $\alpha$  mRNA by RAW264.7 cells infected with  $hly^+$  or  $hly^-$  enterococci. M. DL-1000 bp mark; 1. uninfected cell controls 2-3.  $hly^-$  enterococci A1, S6 4-5.  $hly^+$  enterococci S18, S89.

表 3  $hly^+$ 、 $hly^-$ 肠球菌感染的 RAW264.7 细胞 TNF- $\alpha$ 表达产物的相对灰度

Table 3 The relative gray of TNF- $\alpha$  expressed by RAW264.7 cells infected with  $hly^+$  or  $hly^-$  enterococci

Group		Relative gray(TNF- $\alpha$ / GAPDH) $\bar{x} \pm S$
Uninfected control	n=5	0
$hly^+$ enterococci	n=11	2.6 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
$hly^-$ enterococci	n=11	0.8 $\pm$ 0.06

a:  $P < 0.01$  compared with control group and  $P < 0.05$  compared with  $hly^-$  enterococci

### 3 讨论

在肠球菌的毒力因子中,溶血素是研究较早的毒力因子,更由于溶血素表型最容易被检测,因此成为临床上判断毒力菌株的重要标志。临床标本中肠球菌溶血株的检出率大大高于健康人群粪便标本<sup>[7]</sup>; Dupont 等报道:在鼠腹膜炎模型中,溶血素提高细菌致死能力,并且远高于其他已知的肠球菌毒力因子<sup>[8]</sup>。肠球菌溶血素的毒力作用还在心内膜炎动物模型、兔眼内炎模型中得到了证明<sup>[9~10]</sup>。众多临床资料分析及动物实验已表明溶血素是肠球菌的重要毒力因子之一,但其相关致病机制的研究还主要是溶血素的细胞毒作用。笔者认为,仅有细胞毒机制无法解释临床疾病的发病过程,它可能还具有其他致病机制。本文通过比较肠球菌溶血、非溶血菌株感染巨噬细胞后,培养液中 TNF- $\alpha$ 炎症因子的含量以及 TNF- $\alpha$  mRNA 表达,发现肠球菌溶血株刺激产生 TNF- $\alpha$ 的能力比肠球菌非溶血株强,提示:肠球菌溶血素除了经典的细胞毒作用外,可能还有其他的致病机制如具有促进产生炎症因子等,值得我们进一步探讨。

在感染中,炎症因子加剧组织细胞的损伤,从而导致临床败血症、感染性休克时的多器官衰竭及死亡。因此,炎症因子水平常与疾病的严重性及死亡率

密切相关。Montravers 等在大鼠腹腔感染模型研究中表明,肠球菌可增强炎症反应,加剧腹腔炎症的持续和播散<sup>[11]</sup>。Huycke 等报道“肠球菌溶血株引起的菌血症病人早期死亡率是非溶血株所致菌血症病人的 5 倍”<sup>[12, 13]</sup>。我们认为这有可能是因为:肠球菌溶血株产生的炎症因子更强,从而导致更剧烈的组织损伤。

脂多糖是很强的炎症因子刺激物,而在操作环境中可能存在内毒素污染,为明确细胞培养液中的 TNF- $\alpha$  是否由内毒素污染引起,我们设计了利用多粘菌素 B 消除 LPS 影响的实验。结果表明:环境中 LPS 的污染对实验结果的影响可忽略,肠球菌本身具有刺激 RAW264.7 细胞产生 TNF- $\alpha$  炎症因子的作用,而溶血株的 TNF- $\alpha$  含量更高,推测:肠球菌溶血素或其他与溶血素相关联的其他因素在刺激炎症因子产生中具有协同作用。

炎症因子在感染中发挥着重要作用,因此,能刺激炎症因子产生的物质也被认为是毒力因子。目前致炎物质研究较多的是革兰染色阴性菌细胞壁上的组分 LPS。近年来,人们发现阳性菌中脂磷壁酸 LTA、肽聚糖、信息素以及一些微生物毒素也与炎症相关<sup>[14, 15]</sup>。如果肠球菌的溶血素也与炎症因子产生有关,将扩充致炎物质的种类。

虽然,溶血素是表型最容易被检测的毒力因子,但是溶血素表型的检测还受到红细胞来源、红细胞新鲜度以及培养时间等因素的影响,仅有表型检测仍可出现假阳性、假阴性菌株。为了能准确判定肠球菌的溶血、非溶血菌株,本文还测定了其基因型,并选取表型及基因型相符的菌株进行实验,提高了溶血株判断的准确率。

目前,国外虽已用动物模型开展了肠球菌溶血素的毒力因子研究,但肠球菌溶血素具体致病机制的相关报道,国内外文献报道极少。本文突破肠球菌溶血株作用机制的传统观念,通过临床天然菌株,探讨肠球菌溶血株细胞毒作用以外的其他可能致病机制,使人们对肠球菌溶血株的生物学功能有了新的认识和理解,为进一步了解肠球菌的致病机制、指导临床诊断、防治耐药肠球菌的感染奠定基础。

### 参 考 文 献

- [1] Haghight M, Dehghani SM, Alborzi A, et al. Organisms causing spontaneous bacterial peritonitis in children with liver disease and ascites in Southern Iran. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(36): 5890-5892.
- [2] Bar KJ, Wisplinghoff H, Wenzel RP, et al. Systemic inflamma-

- tory response syndrome in adult patients with nosocomial bloodstream infections due to *enterococci*. *BMC Infect Dis*, 2006, 6(1): 145–147.
- [3] Bassinet L, Fitting C, Housset B, *et al*. Bordetella pertussis adenylate cyclase-hemolysin induces interleukin-6 secretion by human tracheal epithelial cells. *Infect Immun*, 2004, 72(9): 5530–5533.
- [4] Rijnveld AW, van den Dobbelsteen GP, Florquin S, *et al*. Roles of interleukin-6 and macrophage inflammatory protein-2 in pneumolysin-induced lung inflammation in mice. *J Infect Dis*, 2002, 185: 123–126.
- [5] Tsuchiya K, Kawamura I, Takahashi A, *et al*. Listeriolysin O-induced membrane permeation mediates persistent interleukin-6 production in Caco-2 cells during *Listeria monocytogenes* infection *in vitro*. *Infect Immun*, 2005, 73(7): 3869–3877.
- [6] 强华, 谢曼凌. 溶血性、非溶血性肠球菌的毒力差异. 福建医科大学学报(*Journal of Fujian Medical University*), 2007, 41(1): 43–45.
- [7] Dupre I, Zanetti S, Schito AM, *et al*. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia. *Med Microbiol*, 2003, 52(3): 491–498.
- [8] Dupont H, Montravers P, Mohler J, *et al*. Disparate findings on the role of virulence factors of *Enterococcus faecalis* in mouse and rat models of peritonitis. *Infect Immun*, 1998, 66(6): 2570–2575.
- [9] Chow JW, LA Thal, MB Perri, *et al*. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993, 37(11): 2474–2477.
- [10] Jett BD, Jensen HG, Rordquist RE. Contribution of the pAD1-encoded cytolysin to the severity of experimental enterococcus faecalis endophthalmitis. *Infect Immun*, 1992, 60(6): 2445–2448.
- [11] Montravers P, Mohler J, Saint L, *et al*. Carbon. Evidence of the proinflammatory role of *Enterococcus faecalis* in polymicrobial peritonitis in rats. *Infect Immun*, 1997, 65(1): 144–149.
- [12] Huycke MM, Spiegel CA, Gilmore MS. Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1991, 35(8): 1626–1634.
- [13] Furtado GH, Mendes RE, Pignatari AC, *et al*. Risk factors for vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* bacteremia in hospitalized patients: an analysis of two case-control studies. *Am J Infect Control*, 2006, 34(7): 447–451.
- [14] Thorpe CM, Smith WE, Hurley BP, *et al*. Shiga toxins induce, superinduce, and stabilize a variety of C-X-C chemokine mRNAs in intestinal epithelial cells, resulting in increased chemokine expression. *Infect Immun*, 2001, 69(10): 6140–6147.
- [15] Yamamoto S, Tin-Tin-Win-Shwe, Ahmed S, *et al*. Effect of ultrafine carbon black particles on lipoteichoic acid-induced early pulmonary inflammation in BALB/c mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006, 213(3): 256–266.

## Influence of hemolytic and non-hemolytic enterococci on TNF- $\alpha$ expression in murine macrophage cells

Hua Qiang\*, Xiaohui Zheng, Jianyin Lin

(Department of Medical Microbiology and Parasitology, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China)

**Abstract:** [Objective] To study the influence of hemolytic and non-hemolytic enterococci on TNF- $\alpha$  expression in Murine macrophage cells. [Methods] The possibility of endotoxin contamination in the cell culture was excluded by polymyxin-B inhibition. RAW264.7 were infected with hemolytic or non-hemolytic enterococci at bacteria: cell ratio of 30:1 for 1h, followed by washing and re-incubation for 24h in complete medium containing 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ampicillin. TNF- $\alpha$  concentrations in culture supernatants at different time intervals after infection for 3 h, 6 h, 9 h and 24 h were measured by ELISA. TNF- $\alpha$  mRNA expression by macrophages infected with hemolytic or non-hemolytic enterococci respectively for 6h was compared by RT-PCR. [Results] TNF- $\alpha$  was not detected in culture supernatants from uninfected RAW264.7 cells. The concentrations (pg/mL) of TNF- $\alpha$  present in culture supernatants from RAW264.7 cells stimulated by hemolytic enterococci were significantly higher than that stimulated by non-hemolytic enterococci at all time intervals tested,  $p < 0.01$ , Student t-test. TNF- $\alpha$  mRNA expression measured by RT-PCR brought about similar results: more TNF- $\alpha$  mRNA was expressed in RAW 264.7 cells stimulated with hemolytic enterococci as compared with non-hemolytic enterococci stimulation ( $p < 0.05$ , Student t-test). [Conclusion] hemolytic enterococci promoted the generation of inflammatory factor TNF- $\alpha$ .

**Keywords:** *Enterococcus*; hemolysin; TNF- $\alpha$ ; RT-PCR

Supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (C0510008) and the Science and Technology Development Plan of Fujian Province (2005D090)

\*Corresponding author. Tel: +86-591-83569309; E-mail: qianghua66@sina.com

Received: 7 June 2008/ Revised: 10 October 2008