

大肠杆菌 K₈₈ 体外黏附 Caco-2 细胞 及其对细胞膜的影响

郭彤*, 许梓荣

(浙江大学动物分子营养学教育部重点实验室, 浙江大学饲料科学研究所, 杭州 310029)

摘要: 采用体外 Caco-2 细胞培养模型, 研究大肠杆菌 K₈₈ 黏附 Caco-2 肠上皮细胞后对其存活率及增殖活力、细胞膜磷脂酶 A₂、细胞内 Ca²⁺ 浓度及膜流动性的影响。结果表明, 细菌黏附 3h 后细胞活力明显下降, PLA₂ 活性升高, 细胞内 Ca²⁺ 浓度增加, 细胞膜流动性降低, 从而导致肠上皮细胞膜结构和功能的损害。

关键词: 大肠杆菌 K₈₈; 黏附; Caco-2 细胞; 细胞膜

中图分类号: Q241 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)02

Caco-2 细胞是体外培养的肠上皮单层细胞株, 细胞来源于人的结肠腺癌细胞。Caco-2 细胞株由 Borchardt 和 Workers 在 1989 年构建的^[1]。由于 Caco-2 细胞株在特定培养条件下可自发进行上皮样分化并形成紧密连接, 其结构功能、形态学、标志酶的功能表达及渗透特性等都与小肠上皮细胞类似^[2]。而小肠黏膜上皮细胞是肠道的主要功能细胞, 参与肠道食物的消化、吸收、免疫屏障和应激反应等。1994 年, Gruz 等^[3]首先应用 Caco-2 细胞单层肠上皮系统模拟肠黏膜作了体外上皮细胞-细菌相互作用关系的研究。此后, Caco-2 单层肠上皮细胞成为国内外学者研究细胞-细菌相互作用关系的最佳模型。

大肠杆菌 K₈₈ 是肠道内存在的一种致病菌, 也是肠道细菌移位的主要菌群之一, 它可引起人及动物发生腹泻, 严重时死亡。它与肠上皮细胞的黏附是其移位的第一步, 进而定植于肠黏膜表面, 随后侵入肠系膜淋巴结, 从而遍及全身^[4,5]。细菌会对黏附后的细胞产生一系列的病理生理变化, 但目前关于细菌黏附于细胞表面后细胞膜的变化知之甚少。

本研究旨在从体外大肠杆菌 K₈₈ 黏附 Caco-2 细胞着手, 探讨黏附后 Caco-2 细胞膜的变化规律及可能的作用机制, 为致病菌侵染肠上皮细胞导致的细菌移位以及认识细菌对肠上皮细胞致病机制建立了科学的理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株和细胞株

致病菌大肠杆菌 K₈₈ (*Escherichia coli* K₈₈, ATCC K₈₈), 购自中国药品生物制品检定所。Caco-2 细胞株购自中国科学院生物化学与细胞生物研究所。

1.2 仪器和试剂

主要仪器: CH-2 型 Olympus 光学显微镜 (日本); REVCO-3500 型 CO₂ 培养箱 (美国); MK3 型自动酶标仪 (荷兰); RF-540 型荧光分光光度计 (日本, 岛津); LKB1217 型液闪仪 (瑞典)。

主要试剂: DMEM 培养液、胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶、Hank's 缓冲液均购自 GIBCO 公司; 青、链霉素、二甲基亚砷 (DMSO)、MTT、荧光探针 DPH、Fura2-AM 均购自 Sigma 公司; 培养瓶、培养板购自 Corning 公司; MH 肉汤购自 Difco 公司; [³H]-花生四烯酸购自中国科学院原子能研究所。

1.3 培养方法

1.3.1 Caco-2 细胞培养 首先将 Caco-2 细胞生长在 25ml 的培养瓶中, 加入含 10% 灭活的胎牛血清和 100U/ml 青霉素、100μg/ml 链霉素、含 L-谷氨酰胺的 DMEM 培养液, 37℃, 5%CO₂ 培养箱中培养, 直到 Caco-2 细胞贴壁生长为单层细胞。用 0.25% 胰蛋白酶消化传代并计数。然后用 DMEM 培养液调整细胞数为 5 × 10⁴ 细胞/ml, 接种到 24 孔细胞培养板中, 每孔 2ml, 置 37℃, 5% 的 CO₂ 培养箱中培

养,待Caco-2细胞在培养板底部形成完整的类似上皮样的膜状结构时用于试验。期间每隔一天更换一次培养液。使用前细胞用Hank's缓冲液洗3次,再向每孔加入1ml DMEM。

1.3.2 细菌的培养 将大肠杆菌K₈₈培养在MH肉汤培养液中,37℃振荡过夜培养。培养完毕后,3000r/min离心15min,收集细菌,用无血清无双抗的DMEM培养液悬浮细菌,调整菌液浓度为 1×10^7 CFU/ml,备用。

1.4 黏附试验及分组

黏附试验分为对照组和大肠杆菌K₈₈黏附组。对照组:Caco-2细胞在24孔细胞培养板中常规培养至单层,用无菌Hank's平衡盐溶液(HBSS)洗3次,再加入含10%胎牛血清的DMEM培养液。大肠杆菌K₈₈黏附组:细胞培养至单层,用无菌HBSS洗3次,每孔加200 μ l菌液,然后置于37℃,5%的CO₂培养箱中培养。以上两组均于黏附后1、3、6h收集样本进行检测。

1.5 检测指标

1.5.1 细胞存活率的测定 采用台盼蓝排除检测法^[6]测定细胞存活率。方法:将细胞培养于24孔细胞培养板中,细胞贴壁生长成单层细胞时,对照组、试验组分别在1、3、6h收集样本进行检测。单层细胞经0.25%胰蛋白酶消化,吹打成细胞悬液,取20 μ l细胞悬液和等量的2%台盼蓝液混合,滴入细胞计数板。在显微镜下计数200个细胞,镜下见未着色的是活细胞,呈蓝色的是死细胞,计算存活率。

1.5.2 细胞增殖活力的测定 采用四唑盐(MTT)比色法^[7]定量测定Caco-2细胞增殖的活力。方法:将细胞培养于96孔细胞培养板,每孔各加180 μ l培养液,在规定时间内1、3、6h取出,然后加20 μ l 0.5%MTT液,继续培养4h。吸去培养液,每孔加入等量(200 μ l)DMSO溶液,在微型振荡器上振荡5min,在自动酶标仪上测定光吸收值(OD),波长为570nm。

1.5.3 Caco-2细胞胞浆游离Ca²⁺浓度的测定 采用荧光法,方法参见文献^[8]。用fura-2AM作为荧光探针,于Ex=340nm,Em=490nm,狭缝5nm,RF-540型荧光分光光度计测定。

1.5.4 Caco-2细胞液中磷脂酶A₂(PLA₂)活性的测定 采用放射化学法,方法参见文献^[9]。用LKB1217型液闪仪测定。

1.5.5 Caco-2细胞膜流动性的测定 采用荧光偏振法测定,方法参见文献^[10]。将待测细胞用胰蛋白酶消化成单细胞悬液,1000r/min离心10min收集细胞,PBS液(pH 7.0)洗涤1次,加入1.5ml(2×10^{-6} mol/L)DPH溶液,25℃标记1h,再用PBS液(pH 7.0)洗涤1次,最后悬浮于3ml PBS液中。用RF-540型荧光分光光度计于Ex=362nm,Em=432nm,狭缝10nm,测温25℃,测量并计算细胞膜荧光偏振度P和膜脂微黏度 η 。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SAS(6.12版)软件进行方差分析和显著性检验。差异显著用 $P < 0.05$,差异极显著用 $P < 0.01$ 表示。

2 结果与讨论

2.1 大肠杆菌K₈₈黏附对Caco-2细胞存活率的影响

结果表明,大肠杆菌K₈₈黏附Caco-2细胞后,随黏附时间的延长,细胞存活率逐渐降低,从1h的94.2%降低到6h的81.4%,与对照组相比,1h差异显著($P < 0.05$),而培养3h后差异极显著($P < 0.01$)。见表1。表明大肠杆菌K₈₈黏附Caco-2细胞后降低了活细胞的数量,说明大肠杆菌K₈₈对细胞具有毒害作用,也证实了大肠杆菌K₈₈具有致病作用。

2.2 大肠杆菌K₈₈黏附对Caco-2细胞增殖活力的影响

由表2可见,大肠杆菌K₈₈黏附Caco-2细胞后,细胞增殖活力在1h就开始下降,与对照组相比,差异显著($P < 0.05$)。而培养3h后细胞增殖活力显著下降,与对照组相比,差异极显著($P < 0.01$)。之后细胞增殖活力持续降低。这说明大肠杆菌K₈₈黏附Caco-2细胞后对其造成严重损害。

表1 大肠杆菌K₈₈黏附Caco-2细胞对其存活率的影响(%)

组别	n	时间(h)		
		1	3	6
对照组	10	98.1 \pm 0.4	98.7 \pm 0.3	99.2 \pm 0.6
试验组	10	94.2 \pm 2.3*	89.6 \pm 2.1**	81.4 \pm 1.5**

注:与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

表2 大肠杆菌K₈₈黏附Caco-2细胞对其增殖活力的影响(吸光度A)

组别	n	时间(h)		
		1	3	6
对照组	10	0.72 \pm 0.08	0.73 \pm 0.07	0.75 \pm 0.05
试验组	10	0.64 \pm 0.08*	0.48 \pm 0.06**	0.12 \pm 0.06**

注:与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

表3 大肠杆菌 K₈₈ 黏附对 Caco-2 细胞胞浆游离 Ca²⁺ 浓度的影响(nmol/L)

组别	n	时间(h)		
		1	3	6
对照组	10	102.4±41.2	115.4±38.2	132.6±45.2
试验组	10	265.3±37.2**	336.4±42.8**	403.3±48.6**

注: 表示与对照组相比, **P<0.01。

2.3 大肠杆菌 K₈₈ 黏附对 Caco-2 细胞胞浆游离 Ca²⁺ 浓度的影响

大肠杆菌 K₈₈ 黏附 Caco-2 细胞后胞浆 Ca²⁺ 浓度迅速升高, 并随时间的延长, Ca²⁺ 浓度持续升高。结果见表 3。至 6h 约为对照组的 3 倍, 造成 Ca²⁺ 浓度超载。Ca²⁺ 在细胞内的过度积累对细胞的生长和功能的实现具有负面效应, 可导致细胞膜的损伤。但损伤机制还未完全阐明。目前认为可能的机制是: 胞浆 Ca²⁺ 浓度的升高可激活中性蛋白酶和磷脂酶, 加速膜磷脂的降解而引起膜的损伤。膜一旦发生不可逆损伤, 对各种离子的屏障作用即消失, 导致细胞内外离子分布的紊乱, Ca²⁺ 大量流入细胞内, 一方面激活磷脂酶; 另一方面沉积于线粒体内, 使其能量代谢功能障碍乃至丧失, 最终导致细胞功能的降低和死亡^[11]。

2.4 大肠杆菌 K₈₈ 黏附对 Caco-2 细胞膜 PLA₂ 活性的影响

PLA₂ 是哺乳动物体内广泛分布的一类水解酶, 可水解甘油磷脂 Sn-2 位酯键产生游离脂肪酸和溶血磷脂。PLA₂ 被认为在生物膜的稳态过程中起重要作用^[12]。本文所测 PLA₂ 活性值来自膜上, 结果见表 4。

可以看出, 大肠杆菌 K₈₈ 黏附 Caco-2 细胞 1h 后, PLA₂ 活性开始升高, 3~6h 活性明显增加, 6h 达 0.41 μmol · min⁻¹ · L⁻¹, 几乎为相应对照的 4 倍。也有相关报道表明^[13], 用低剂量的大肠杆菌悬液静脉注射给自愿受试者, PLA₂ 的活性在 3h 开始升高, 24h 达高值。尽管 PLA₂ 激活的确切机制还不清楚, 但大量试验表明内毒素改变了细胞的内环境。大量试验表明, PLA₂ 的活性异常升高, 可导致细胞内的 [Ca²⁺] 增加, 过多的 Ca²⁺ 是激活 PLA₂ 最主要的因素^[14]。而且 PLA₂ 激活后作用于底物磷脂(它是细胞膜、细胞器膜的主要组成成分), 这是膜磷脂减少的主要原因。活化的 PLA₂ 水解膜磷脂, 使肠上皮胞外游离脂肪酸和溶血磷脂大量堆积, 这些代谢产物可直接损伤细胞膜, 使细胞膜上脂肪酸链缩短, 导致膜流动性下降, 而细胞的生存依赖于膜结

表4 大肠杆菌 K₈₈ 黏附对 Caco-2 细胞培养上清 PLA₂ 活性的影响(μmol · min⁻¹ · L⁻¹)

组别	n	时间(h)		
		1	3	6
对照组	10	0.09±0.02	0.10±0.02	0.11±0.03
试验组	10	0.16±0.03*	0.27±0.04**	0.41±0.04**

注: 表示与对照组相比, *P<0.05, **P<0.01。

构的完整。因此, 膜损伤势必造成细胞损伤和功能破坏。

2.5 大肠杆菌 K₈₈ 黏附对 Caco-2 细胞膜流动性的影响

研究表明, 对照组(n=10)的细胞膜荧光偏振度 P 为 0.126 ± 0.042, 而大肠杆菌 K₈₈ 黏附 Caco-2 细胞(n=10)后的 1、3 和 6h, 细胞膜荧光偏振度 P 分别为 0.132 ± 0.035, 0.145 ± 0.045 和 0.174 ± 0.032; 相应的膜脂微黏度 η 分别为 0.805 ± 0.127, 0.921 ± 0.134, 1.217 ± 0.124。可见, 大肠杆菌 K₈₈ 黏附 Caco-2 细胞后, 细胞膜荧光偏振度 P 升高, 膜脂微黏度增加, 膜刚性增加, 导致膜流动性降低, 随时间延长变化加剧。

细胞膜(既包括膜脂, 又包括膜蛋白)具有类似于液体易流动的特性。流动性是细胞膜结构的主要特征, 对细胞膜表现其正常功能具有十分重要的生理意义。如能量转换、物质转运、细胞分裂、细胞融合等都与膜的流动性密切相关^[15]。膜流动性的下降无疑会给细胞正常的生理活动(如膜通透性、膜上酶活性、受体功能及能量传递等)带来诸多影响, 损害细胞的形态和功能^[16]。研究表明, 大肠杆菌 K₈₈ 黏附 Caco-2 细胞 3h 后膜的流动性明显降低, 从而使细胞死亡。另外, 我们还用大肠杆菌 ATCC 25922 菌株作了类似的研究, 结果相似。

3 结论

总之, 本试验研究结果表明: 大肠杆菌 K₈₈ 直接黏附 Caco-2 细胞后, 使细胞存活率下降, 细胞增殖活力降低, 胞内钙超载, [Ca²⁺] 升高, PLA₂ 水平升高, 膜流动性降低, 而这些变化最终导致 Caco-2 细胞膜的结构和功能损害。

参 考 文 献

- [1] HIDLGO I J, RAUB T J, BORCHARDT R T. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability [J]. *Gastroenterology*, 1989, 96: 736 - 749.

- [2] PINTO M, ROBINE-LEON S, APPAY M D, *et al.* Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture [J]. *Biol Cell*, 1983, **47**: 323 — 330.
- [3] GRUZ N, QI L, DEITCH E A, *et al.* The Caco-2 cell monolayer systems as an *in vitro* model for studying bacterial-enterocyte interactions and bacterial translocation [J]. *Burn Care Rehabil*, 1994, **15**: 207 — 209.
- [4] BEACHEY E H, EISENSTEIN B, OFEK I. *Adherence and infectious Diseases: Current Concepts*. Kalamazoo: The Upjohn Company, 1982: 36 — 39.
- [5] BOEDEKER E C. *Attachment of Organisms to the Gut mucosa* [M]. Boca Raton, FL, Vols.I and II. CRC Press, 1984: 126 — 128.
- [6] 杨景山. *医学细胞化学与细胞生物学技术*. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1990: 118 — 121.
- [7] HIDA T, UEDA R. Chemosensitivity and radiosensitivity of small cell lung cancer cell line studied by a newly developed 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) hybrid assay [J]. *Cancer Res*, 1989, **49**(17): 4785 — 4790.
- [8] YADA T, OIKI S, UEDA S, *et al.* Intestinal secretagogues increase cytosolic free Ca²⁺ concentration and K⁺ conductance in a human intestinal epithelial cell line [J]. *J Membr Biol*, 1989, **112**(2): 159 — 167.
- [9] ABE T, SAKAMOTO K, KAMOHARA H, *et al.* Group II phospholipase A₂ is increased in peritoneal and leural effusion in patients with various types of cancer [J]. *Int Cancer*, 1997, **74**: 245 — 250.
- [10] STUBBS C D, KINOSITA K Jr, MUNKONGE F, *et al.* The dynamics of lipid motion in saroplasmic reticulum membranes determined by steady-state and time, resolved fluorescence measurements on 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene and related molecules[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1984, **775** (3): 374-380
- [11] URATANI Y, KOBAYASHI M, YOKOYAMA Y, *et al.* Phospholipids stabilize the secondary structure of the sodium-coupled branched-chain amino acid carrier of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1435**: 71 — 83.
- [12] DEBEER F C, DEBEER M C, VAN DER D R, *et al.* Secretory non-pancreatic phospholipase A₂ influence on lipoprotein metabolism [J]. *J Lipid Res*, 1997, **38**: 2232 — 2239.
- [13] UHL W, BUCHLER M, NEVALAINEN T J, *et al.* Serum phospholipase in patients with multiple injuries [J]. *J Trauma*, 1990, **30**(11): 1285 — 1286.
- [14] FRANCESCONI M, CASONATO A, PONTARA E, *et al.* Type IIB factor induces phospholipase A₂ activation and cytosolic Ca²⁺ increase in platelets. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **214**: 102 — 109.
- [15] 沈同, 王镜岩主编. *生物化学*(第二版). 高等教育出版社, 1999: 479 — 485.
- [16] ISMAILI A, MEDDINGS J B, RATNAM S, *et al.* Modulation of host cell membrane fluidity: a novel mechanism for preventing bacterial adhesion [J]. *Am J Physiol*, 1999, **277**(1): G201 — 208.

Effects of *Escherichia coli* K₈₈ Adhesion on Membrane Characteristics of Caco-2 Cells *in vitro*

GUO Tong*, XU Zi Rong

(Key Lab for Molecular Animal Nutrition of Ministry of Education, Feed Science Institute of Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: Caco-2 intestinal epithelial cells were used in this experiment and adhered with *Escherichia coli* K₈₈. The change in the viability of the cells and the activity of membranous PLA₂, the calcium concentration of cells and membrane fluidity were studied. Results showed: at 3h after the adhesion of *Escherichia coli* K₈₈, the viability of the Caco-2 cells decreased significantly; the activity of membranous PLA₂ and the calcium concentration of cells increased significantly; cell membrane fluidity decreased. Therefore, structure and function of Caco-2 cell membrane suffered impairment.

Key words: *Escherichia coli* K₈₈; adhesion; Caco-2 cell; cell membrane

*Corresponding author, E-mail: tongguo@zju.edu.cn