

大肠杆菌侵袭基因缺失突变株与人脑微血管内皮细胞的相互作用

陈冬松* 方文刚 陈誉华** 宋今丹

(中国医科大学发育生物学教研室, 卫生部细胞生物学重点实验室, 沈阳 110001)

摘要 *ibeA*、*ibeB*、*ibeC*是与大肠杆菌侵袭人脑微血管内皮细胞(HBMEC)密切相关的基因,但迄今各基因的功能并不清楚。应用侵袭分析和免疫荧光技术分析了各基因的缺失突变型及野生型大肠杆菌对HBMEC的侵袭、细胞骨架与细胞间紧密连接的影响。结果显示:野生型菌大肠杆菌侵袭率为3.46%,而*ibeA*、*ibeB*、*ibeC*缺失突变株分别为0.54%、0.82%和0.73%;*ibeA*缺失突变型与野生型大肠杆菌作用相似,可引起HBMEC的细胞骨架蛋白分布改变,在细胞膜处呈明显的聚集,而*ibeB*和*ibeC*缺失突变株并未引起细胞骨架的明显改变;野生型和*ibeA*缺失突变型大肠杆菌可引起紧密连接结构的明显改变,而*ibeB*和*ibeC*缺失突变株对紧密连接结构的影响不明显。这些观察到的结果提示:*ibeB*和*ibeC*基因产物可能在调节细胞骨架和影响细胞紧密连接中起重要作用,而*ibeA*基因产物在其中的作用较小。

关键词 *ibeA*; *ibeB*; *ibeC*; 细胞骨架; 紧密连接

新生儿细菌性脑膜炎在发展中国家属常见疾病。大肠杆菌(*E. coli*)是此类疾病的主要病原菌之一。现已证明,*E. coli*经血源传播,通过血脑屏障侵入中枢神经系统,但其侵袭机制目前尚不清楚。迄今已于*E. coli* K1株中鉴定了多个与其侵袭人脑微血管内皮细胞(human brain microvascular endothelial cell, HBMEC)相关的基因:*ibeA*, *ibeB*, *yijP* (*ibeC*), *aslA*, *ompA*, *ypdP*^[1-6],但这些基因在*E. coli*侵袭HBMEC过程中的具体功能、以及它们之间的区别和联系目前尚不清楚。本实验比较了*E. coli* *ibeA*、*ibeB*和*ibeC*基因缺失突变株分别与HBMEC相互作用后,HBMEC细胞骨架和细胞间紧密连接结构的变化,观察到*ibe*族基因在*E. coli*侵袭HBMEC过程中的功能差异。

1 材料与方

1.1 材料

E. coli K1株RS218(O18:K1:H7)由新生儿脑膜炎患者的脑脊液中分离,E44是RS218的抗利福平突变株^[7];E44:Δ*ibeA*,来源于E44的*ibeA*基因缺失突变株^[2];E44:Δ*ibeC*,来源于E44的*ibeC*基因缺失突变株^[1]。HBMEC由美国约翰霍普金斯大学医学院 Kwang Sik Kim 博士惠赠。以上细菌株和细

胞系均由本研究室保存。BHI(brain heart infusion)细菌培养基和Nu-Serum为美国BD公司产品;RPMI 1640培养基为美国Invitrogen公司产品;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)为Hyclone公司产品;罗丹明标记的毒伞素为美国Sigma公司产品;ZO-1抗体为Zymed公司产品;抗ZO-1抗体购自北京中山生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 从E44菌株中剔除*ibeB*基因 如图1所示,pKS7-6N为我们以前自pKS7-7B中构建的重组质粒,其插入片段缺乏*ibeB*基因N末端0.87 kb的*SmaI*-*NsiI*之间的氨基酸编码序列^[3],以*Bam*HI和*Eco*RI双酶切pKS7-6N,补平酶切粘末端为平端,电泳、回收6.1 kb的插入片段,并将其重组到自杀性质粒pCVD442的*SmaI*位点,命名为pCVD7D。通过电转移方法将pCVD7D导入SM10λpir细菌。SM10λpir(pCVD7D)供体菌与受体菌E44的接合在含有氨苄青霉素和利福平的LB平板上进行,挑取长出的单菌

收稿日期:2004-10-25 接受日期:2004-12-23

国家自然科学基金资助项目(No.30170053, No.30170470, No.30370702)

* 辽宁大学生命科学系, 沈阳 110036

** 通讯作者。Tel: 024-23260246, Fax: 024-23260246, E-mail: yhchen@mail.cmu.edu.cn

落在 LB 液体培养基中培养至对数生长期, 取其稀释液涂于不含 NaCl、但含 5% 蔗糖的 LB 平板上, 再取蔗糖抗性菌落确定其氨基青霉素抗性确已丢失, 由此获得的突变体进一步用 PCR 确证染色体上 *ibeB* 基因的剔除。

1.2.2 细菌培养 将 E44、E44 : $\Delta i b e A$ 、E44 : $\Delta i b e B$ 、E44 : $\Delta i b e C$ 分别接种在 BHI 液体培养基中, 置 37 °C, 90 r/min 培养 10~14 h, 以供细菌侵袭和同 HBMEC 相互作用分析。

1.2.3 HBMEC 培养 HBMEC 从临床手术的脑组织中分离制备^[8], 在 37 °C、5% CO₂ 条件下, 于含有 10% FBS、10% Nu-Serum、2 mmol/L 谷氨酰胺、1 mmol/L 丙酮酸钠和一定量的非必需氨基酸、维生素、青链霉素的 RPMI1640 培养液中培养 HBMEC。

1.2.4 细菌侵袭 HBMEC 分析 按以前报道的方法^[9]进行。在 24 孔板上培养 HBMEC, 至形成细胞单层时, 更换为实验培养液(与生长培养液的差别是不含 Nu-Serum, 且 FBS 为 5%), 同时每孔加入过夜培养的细菌约 1×10^7 个(每种细菌至少做 3 孔), 37 °C 培养 1.5 h 后, 更换含 100 u/ml 庆大霉素的实验培养液, 继续培养 1 h 时以杀死细胞外细菌, 继之, 弃去培养液, 用 $1 \times$ PBS 洗 3 次, 以无菌水裂解经细菌侵袭的细胞, 在含有利福平的 BHI 平板上培养裂解液中的细菌并计数, 根据加入的细菌总数计算出各株细菌的侵袭率。

1.2.5 HBMEC 细胞骨架观察 在盖玻片上培养 HBMEC, 至 30%~50% 细胞融合时, 更换为实验培养液, 同时分别加入适量的过夜培养的 E44、E44 : $\Delta i b e A$ 、E44 : $\Delta i b e B$ 、E44 : $\Delta i b e C$ 细菌株, 继续培养 30 min 后, 弃去培养液, $1 \times$ PBS 洗 3 次, 应用罗丹明标记的毒伞素对 F-肌动蛋白进行化学荧光染色, 荧光显微镜下观察 HBMEC 的细胞骨架变化。

1.2.6 HBMEC 细胞间的紧密连接结构观察 在盖玻片上培养 HBMEC, 至长成单层时, 更换为实验培养液, 同时分别加入适量的过夜培养的 E44、E44 : $\Delta i b e A$ 、E44 : $\Delta i b e B$ 、E44 : $\Delta i b e C$ 细菌株, 继续培养 30 min 后, 弃去培养液, $1 \times$ PBS 洗 3 次, 常规细胞免疫荧光方法(一抗为紧密连接结构蛋白 ZO-1 抗体)染色, 在荧光显微镜下观察 HBMEC 细胞间紧密连接的变化。

2 结果

2.1 E44 菌株中 *ibeB* 基因的剔除分析

ibeB 基因的 ORF 为 1383 bp, 实验中从其编码的第一个氨基酸开始, 按读码框共剔除掉编码 290 个氨基酸的 DNA 序列, 即 0.87 kb。PCR 扩增结果证明, E44 和 E44 *ibeB* 基因缺失突变株的扩增产物大小分别为约 1.5 kb、0.6 kb(图 1), 这与实验设计结果一致, PCR 产物的序列分析结果进一步证明了剔除基因读码框的正确性(资料未显示)。细菌侵

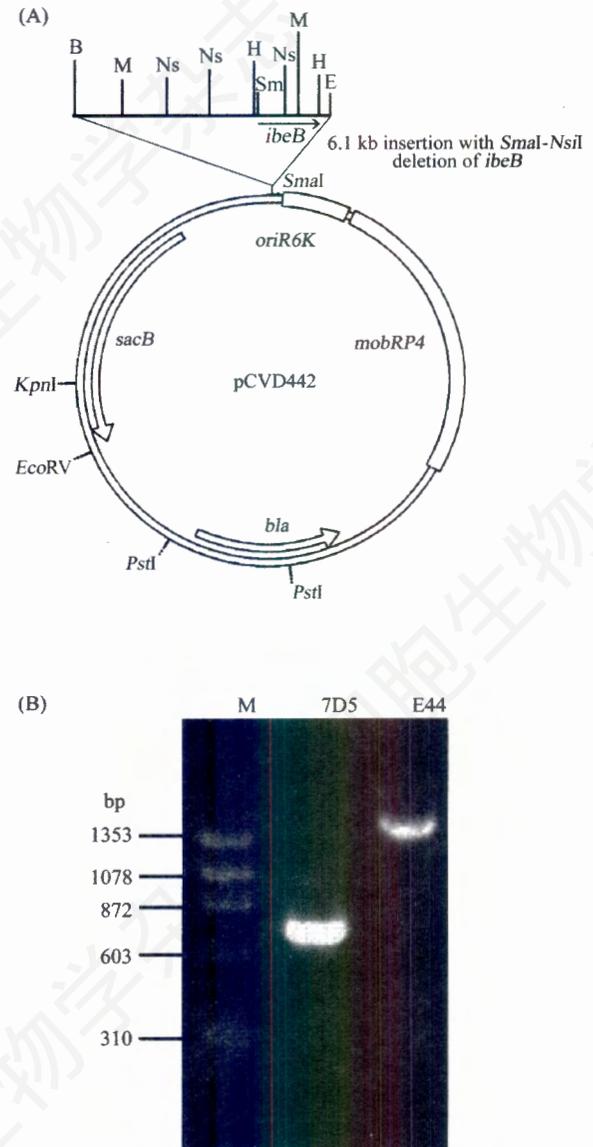


图 1 E44 菌株中 *ibeB* 基因的剔除分析

A: 图上部为从 *E. coli* K1 RS218 株中克隆的部分 DNA 片段(6.97 kb)酶切位点^[3], 其 6.1 kb 片段(缺少 *ibeB* 中 *SmaI*-*NsiI* 间的 0.87 kb)被插入到自杀性质粒载体 pCVD442, 插入位点为 *SmaI*。其中 B: *Bam*HI; H: *Hind*III; E: *Eco*RI; Ns: *Nsi*I; Sm: *Sma*I; M: *Mlu*I; *bla*: 编码氨基青霉素抗性的基因(*amp*^R); *sacB*: 蔗糖敏感基因; *mobRP4*: 高效接合转移基因; *OriR6K*: *pir* 复制依赖区。
B: E44 *ibeB* 基因缺失突变株的 PCR 鉴定的琼脂糖凝胶电泳。

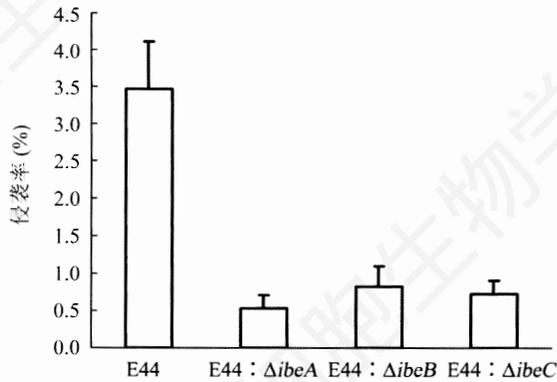


图2 野生型(E44)及突变型(E44:ibeA, E44:ibeB, E44:ibeC) *E. coli* 对 HBMEC 的侵袭率
每次实验平行样本数: $n \geq 3$ 。

侵袭 HBMEC 的实验结果显示, E44 *ibeB* 基因缺失突变株的侵袭力明显低于 E44(图 2)。我们将 E44 *ibeB* 基因缺失突变株命名为 E44:Δ*ibeB*。

2.2 *E. coli* *ibe* 基因缺失突变株对 HBMEC 的侵袭率比较

如图 2 所示, E44:Δ*ibeA*, E44:Δ*ibeB*, E44:Δ*ibeC* 这 3 个 *E. coli* 基因缺失突变株对 HBMEC 的侵袭率显著低于野生型 E44($P < 0.01$, $n \geq 3$)。野生型 E44 的侵袭率(均值)为 3.46%, 而 *ibeA*、*ibeB*、*ibeC* 缺失突变株分别为 0.54%、0.82% 和 0.73%。

2.3 *E. coli* *ibe* 基因缺失突变株对 HBMEC 细胞骨架的影响

E. coli 侵袭 HBMEC 的主要特征之一是引起 HBMEC 细胞骨架的改变^[10], 本实验结果显示, 不同的 *E. coli* *ibe* 基因缺失突变株对 HBMEC 细胞骨架的影响有显著的异同: 在 E44:Δ*ibeA*, 其与 HBMEC 相互作用后, 可引起细胞骨架(F-肌动蛋白)的明显改变, 表现为细胞骨架向细胞边缘聚集, 并呈现出片状伪足和伴随的细胞膜皱褶形成, 这些变化与野生型 E44 所引起的细胞骨架改变相似; 而 E44:Δ*ibeB*、E44:Δ*ibeC* 与 HBMEC 相互作用后并未引起细胞骨架的明显改变, 作用后的 HBMEC 中, 其 F-肌动蛋白仍然呈纤维丝状分布于细胞质中, 类似正常 HBMEC 中的细胞骨架(图 3)。这说明, 在 *E. coli* 侵袭 HBMEC 过程中, *ibe* 各侵袭基因所扮演的角色是不同的: *E. coli* *ibe* 基因编码产物 IbeB 蛋白和 IbeC 蛋白可调控 HBMEC 的细胞骨架改变, 而 IbeA 蛋白则不能。

2.4 *E. coli* *ibe* 基因缺失突变株对 HBMEC 细胞间紧密连接结构的影响

ZO-1 是细胞间紧密连接结构的主要蛋白质之一, 可以通过观察细胞间 ZO-1 蛋白的分布情况来判定细胞间的紧密连接结构的完整与否^[11]。ZO-1 抗体的免疫荧光染色结果显示, 不同 *E. coli* 侵袭基因缺失突变株与 HBMEC 作用后, HBMEC 细胞间的紧密连接结构有明显的不同: 在 E44, 细胞周边荧光即 ZO-1 蛋白呈不连续分布, 提示 E44 与 HBMEC 作用后, 紧密连接结构被破坏; E44:Δ*ibeA* 与 HBMEC 作用后所引起的细胞间紧密连接结构的改变即 ZO-1 蛋白的分布情况与野生型 E44 类似; 但在 E44:Δ*ibeB* 和 E44:Δ*ibeC* 细菌突变株, 其与 HBMEC 相互作用后, 细胞周边的 ZO-1 蛋白荧光呈现连续分布, 与正常 HBMEC 相比, 几乎未见有改变(图 4)。这说明 *E. coli* *ibe* 基因编码产物 IbeB 蛋白和 IbeC 蛋白可使 HBMEC 间的紧密连接开放, 而 IbeA 蛋白则不能。

3 讨论

在活细胞(细菌)水平上的基因剔除是研究基因功能的有效手段。本研究中应用的 *E. coli* 基因缺失突变株 E44:Δ*ibeA* 和 E44:Δ*ibeC* 为本课题组成员在以往的工作过程中完成^[1,2]。在本实验 *E. coli* *ibeB* 基因缺失突变株构建过程中, 依据基因的读码框对 *ibeB* 进行了剔除, 避免了 *E. coli* 细菌染色体上 *ibeB* 上、下游其他基因的失活或激活, 以便可有效进行 *ibeB* 基因的功能分析。研究结果显示, *E. coli* *ibeB* 基因缺失突变株, 即 E44:Δ*ibeB* 对 HBMEC 的侵袭力显著低于野生型 E44, 并与 E44:Δ*ibeA* 和 E44:Δ*ibeC* 相似, 这为进一步分析 *ibeB* 基因的功能打下了基础。

病原菌侵袭非吞噬性宿主真核细胞是需要细胞骨架参与的吞噬过程^[12,13], *E. coli* K1 侵袭 HBMEC 也不例外^[14,15]。迄今已发现某些细菌的致病因子, 如沙门氏菌的 SipA^[16]、肠道大肠杆菌的 EsP 蛋白^[17,18] 都是重要的细胞骨架调节蛋白, 它们的缺失将导致细菌侵袭能力的下降。在 *E. coli* K1 侵袭 HBMEC 过程中, 有文章报道 *OmpA* 可能参与细胞骨架调控过程^[6,17], 但 *ibeA*、*ibeB*、*ibeC* 等基因在其中的作用尚未见文献报道。本实验结果显示: *ibeA* 基因缺失突变株在与 HBMEC 相互作用后, 其所引起的细胞骨架蛋白发生重新分布并在细胞膜处呈现明显的聚集斑(片状伪足)现象与野生型 E44 株触发的细胞骨架改变类似, 而 *ibeB* 和 *ibeC* 基因缺失突变株在与

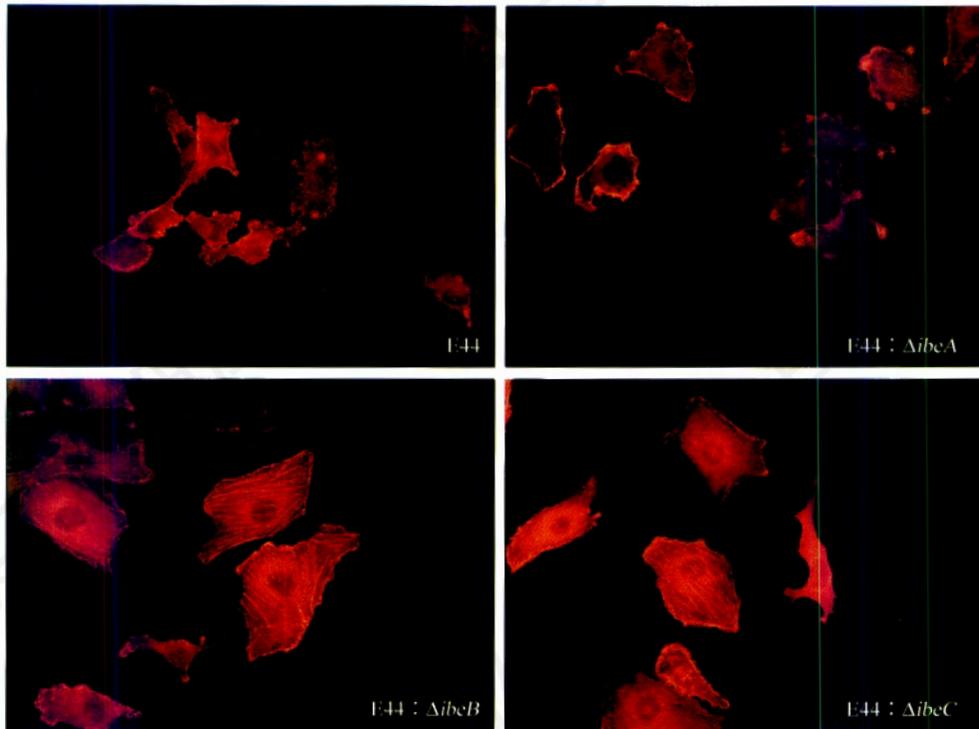


图3 不同 *E.coli* 侵袭基因缺失突变株与 HBMEC 作用 30 min 后, HBMEC 细胞骨架的变化

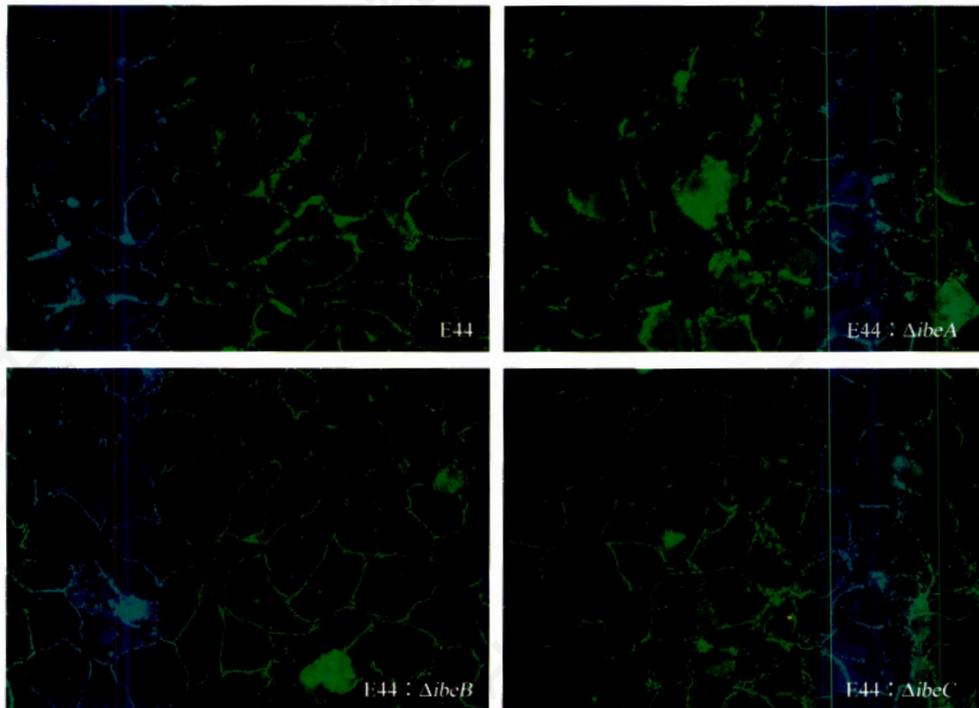


图4 不同 *E.coli* 侵袭基因缺失突变株与 HBMEC 作用 30 min 后, HBMEC 细胞间紧密连接结构的变化

HBMEC 相互作用后并未引起细胞骨架的明显改变。这些结果提示: 在 *E.coli* K1 侵袭 HBMEC 过程中, *ibeA*、*ibeB*、*ibeC* 基因产物所起的作用是不同的, *IbeA* 蛋白可能并不参与 HBMEC 细胞骨架的调节,

但 *IbeB* 蛋白和 *IbeC* 蛋白则与 HBMEC 细胞骨架的调节密切相关。其详细机制有待于进一步研究。

HBMEC 细胞间的紧密连接是影响血脑屏障通透性的重要因素, 有研究者认为 *E.coli* K1 进入中枢神

经系统的机制并不限于其对HBMEC侵袭的穿胞作用(transcytosis),它也有可能通过直接打开血脑屏障的HBMEC细胞间紧密连接途径而进入脑内^[15]。已有文献报道在*E.coli* K1侵袭HBMEC过程中,紧密连接的通透性增加^[19]。本实验结果提示,*E.coli* K1 *ibe* 基因编码产物像其引起HBMEC细胞骨架的改变一样,也对HBMEC细胞间的紧密连接的通透性有重要影响:IbeB蛋白和IbeC蛋白可打开血脑屏障的HBMEC细胞间紧密连接,而IbeA蛋白则不能,这进一步提示在*E.coli* K1通过打开血脑屏障的HBMEC细胞间紧密连接途径而进入脑内过程中,*E.coli* K1的IbeB蛋白和IbeC蛋白致病因子可能起重要作用。

通过以上研究,可以得出结论:IbeA蛋白并不参与HBMEC细胞骨架调节;IbeB蛋白和IbeC蛋白则与HBMEC细胞骨架调节和紧密连接开放密切相关。

参考文献 (References)

- [1] Wang Y *et al. Infect Immun*, 1999, **67**: 4751
- [2] Huang SH *et al. Infect Immun*, 1995, **63**: 4470
- [3] Huang SH *et al. Infect Immun*, 1999, **67**: 2103
- [4] Prasadarao NV *et al. Infect Immun*, 1996, **64**: 154
- [5] Hoffman JA *et al. Infect Immun*, 2000, **68**: 5062
- [6] Wang Y *et al. Pediatr Res*, 2002, **51**: 559
- [7] Weiser J N *et al. Infect Immun*, 1991, **59**: 2252
- [8] Stins M F *et al. J Neuroimmunol*, 1997, **76**: 81
- [9] Badger J L *et al. Infect Immun*, 1998, **66**:5692
- [10] Reddy M A *et al. J Biol Chem*, 2000, **275**:36769
- [11] Furuse M *et al. J Cell Biol*, 1994, **127**:1617
- [12] Gatfield J *et al. Adv Immunol*, 2003,**81**:45
- [13] Khan NA *et al. Microb Pathog*, 2003,**35**:35
- [14] Sukumaran SK *et al. J Biol Chem*. 2002, **277**:50716
- [15] Chen YH *et al. Cell Microbiol*, 2002,**4**:503
- [16] McGhie E J *et al. Mol Cell*, 2004, **13**:497
- [17] Nougayrede JP *et al. Mol Microbiol*, 1999, **31**: 19
- [18] Warawa J *et al. Infect Immun*, 1999, **67**: 5538
- [19] Sukumaran SK *et al. J Infect Dis*, 2003, **188**: 1295

Interaction of *E. coli* Invasion Gene Deletion Mutants with Human Brain Microvascular Endothelial Cell

Dong-Song Chen*, Wen-Gang Fang, Yu-Hua Chen**, Jin-Dan Song

(Department of Developmental Biology, Key Laboratory of Cell Biology, Ministry of Public Health of China, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract *IbeA*, *ibeB* and *ibeC* are important genes associated with *E.coli* K1 invasion to human brain microvascular endothelial cell (HBMEC), but the role of each gene in invasion process is not clear. The main purpose of this study is to make a preliminary conclusion of the function of each gene. We had HBMEC interacted with the invasion gene (*ibeA*, *ibeB* and *ibeC*) deletion mutants of *E.coli*, meanwhile the HBMEC interacted with wild type *E. coli* is as positive control. The invasion rate of each mutant, HBMEC cytoskeleton and tight junction changes were studied. In the invasion test, each mutant of *E.coli* showed remarkable low invasion rate to HBMEC in contrast to that of wild *E.coli*. HBMEC interacted with *ibeA* deletion mutant showed distinct change in cytoskeleton just same as the positive control, while, HBMEC interacted with *ibeB*, *ibeC* deletion mutants respectively showed relatively small in cytoskeletal change in contrast to negative control HBMEC. In tight junction test, HBMEC interacted with *ibeA* deletion mutant showed the same result as positive control HBMEC in which tight junction is heavily disturbed, HBMEC interacted with *ibeB*, *ibeC* deletion mutants respectively showed relatively small tight junction disturbance in contrast to negative control HBMEC. Taken together, we can propose that the IbeA not play any role in cytoskeleton and tight junction regulation; IbeB and IbeC, on the contrary, play an important role in both processes.

Key words *ibeA*; *ibeB*; *ibeC*; cytoskeleton; tight junction

Received: October 25, 2004 Accepted: December 23, 2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30170053, No.30170470, No.30370702)

*Present address: Department of Life Science, Liaoning University, Shenyang 110036, China

**Corresponding author. Tel: 86-24-23260246, Fax: 86-24-23260246, E-mail: yhchen@mail.cmu.edu.cn