

伤寒沙门菌质粒诱导巨噬细胞凋亡

睦 阳 吴淑燕 宋国蓉 李嫒渊 吕 杰 黄 瑞*

(苏州大学基础医学与生物科学学院病原生物学系, 苏州 215123)

摘要 为探讨伤寒沙门菌质粒 pR_{ST98} 上毒力基因与小鼠巨噬细胞 $J_{774A.1}$ 凋亡的关系及可能机制, 将鼠伤寒沙门菌标准毒株 SR-11、低毒株 RIA 和 pR_{ST98} 经接合转移导入 RIA 的接合子 pR_{ST98}/RIA , 体外分别与小鼠巨噬细胞 $J_{774A.1}$ 共培养, Giemsa 染色法确定细菌对细胞的感染复数 (multiplicity, MOI)。于 0、1、3、6、12 和 24 h 用 Annexin V-FITC 试剂盒检测细菌感染后细胞凋亡情况; 用透射电镜观察细胞的变化; 用 JC-1 染色法、激光扫描细胞仪及激光共聚焦显微镜检测线粒体膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 的改变。结果显示, 细菌与 $J_{774A.1}$ 的最佳 MOI 为 100:1。从感染后 3 h 起, $J_{774A.1}$ 的凋亡率表现为 SR-11 组 > pR_{ST98}/RIA 组 > RIA 组 ($P < 0.05$); 电镜观察的结果显示 3 h 起各组细胞内可见染色质边聚等凋亡改变, 12 h 见凋亡小体, 以 SR-11 组最为明显, pR_{ST98}/RIA 组多于 RIA 组, 24 h 各组细胞多为坏死改变; 感染后 $J_{774A.1}$ 线粒体 $\Delta\Psi_m$ 下降的百分率表现为 SR-11 组、 pR_{ST98}/RIA 组和 RIA 组依次降低。以上结果表明携带质粒 pR_{ST98} 的宿主菌毒力增强, 感染后使巨噬细胞的凋亡率随时间延长而增加。

伤寒沙门菌 (*Salmonella typhi*) 引起的人类伤寒热在发展中国家仍然是一种严重的传染病, 每年全球大约有 2 100 万人受感染, 其中死亡人数超过 20 万^[1]。近年来, 虽然全球范围内伤寒的死亡率有所下降, 但其发病率仍呈上升趋势。我国伤寒、副伤寒的发病自 1990 年以后得到一定控制, 但部分省份的发病率依然居高不下, 时有暴发流行的报道。 pR_{ST98} 是本实验室在 20 世纪 80 年代中后期从我国 13 省市暴发的多重耐药伤寒临床株中分离到的一个分子量为 98.6 MDa (约 150 kb) 的大质粒, 可编码对 10 余种药物的抗性, 属不相容性 C 群 (IncC)^[2]。通过 Southern 印迹、PCR 和核酸测序等方法, 本实验室首次报道了 pR_{ST98} 上亦含有其他沙门菌毒力质粒上高度保守的序列——*spv* (*Salmonella plasmid virulence genes*)^[3]。由于伤寒沙门菌是一种严格只对人类致病的病原体, 没有合适的动物模型和有效的遗传学工具, 我们既往利用与其有非常近缘关系的鼠伤寒沙门菌 (*Salmonella typhimurium*) 作为研究对象来研究 pR_{ST98} , 结果证实该质粒是一种既介导细菌耐药性又能增强细菌毒力的具有双重功能的嵌合型质粒。由于沙门菌为胞内菌, 在宿主体内主要寄居在巨噬细胞 (macrophage, MΦ) 内, 并有研究发现伤寒沙门菌感染可导致巨噬细胞异常凋亡^[4]。我们前期的研究已发现 pR_{ST98} 与 MΦ $J_{774A.1}$ 的凋亡有相关性, 本文进一步探讨该质粒与细胞凋亡之

间的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及细胞株 鼠伤寒沙门菌标准毒株 SR-11 和低毒株 RIA 由美国弗吉尼亚大学微生物学系许晓生教授惠赠, pR_{ST98}/RIA 系将 pR_{ST98} 经接合转移导入 RIA 的接合子, 药敏试验质控菌大肠杆菌 ATCC25922 为本实验室保存。MΦ $J_{774A.1}$ 由浙江大学医学院严杰教授惠赠。

1.1.2 主要试剂和仪器 阿米卡星 (amikcine, AMK) 购自 Sigma 公司, Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒为上海生物晶美公司产品, 线粒体膜电位 JC-1 检测试剂盒购自碧云天生物公司, DAPI 检测试剂盒购自凯基生物公司。FC500 型流式细胞仪 (flow cytometer, FCM) 为美国 Beckman-Coulter 公司产品, iCys™ Research Imaging Cytometer 激光扫描细胞仪 (laser scanning cytometry, LSC) 为美国 CompuCyte Corporation 公司产品, UC6 超薄切片机和 TCS-SP2 激

收稿日期: 2009-01-09 接收日期: 2009-04-14

江苏省高校自然科学基金 (No.08KJB130009) 和苏州市社会发展基金会 (No.SS08025) 资助项目

* 通讯作者。Tel: 0512-65880132, E-mail: hruidm@163.com

光共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscopy, LSCM)为德国Leica Company公司产品, H600 透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)为日本日立公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 J_{774A.1} 常规培养至对数生长期, 胰酶消化后用不含抗生素的 RPMI 1640 离心洗涤 3 次。细胞培养板每孔加入 1 ml 浓度为 5×10^5 个/ml 的细胞, 5% CO₂、37 °C 平衡 12 h 待用。电镜检测标本的细胞直接以培养瓶培养, 浓度为 1×10^7 个/ml。

1.2.2 细菌培养和定量 细菌培养至对数生长期, A₆₀₀ 测定菌液浓度后稀释至 5×10^7 CFU/ml, 同时作平板菌落计数。

1.2.3 细菌与 J_{774A.1} 的 MOI 测定 细胞培养条件和浓度同前。分别将对数生长期菌液用无抗生素 RPMI 1640 培养液稀释后加入 24 孔板, 未加细菌的正常细胞作对照组, 细菌与细胞 MOI 分别为 10 : 1、50 : 1 和 100 : 1。于 0、1、2、3、4、5、6、7、8、12、16、20 和 24 h 共 13 个时间点分别取出小圆玻片, 甲醇固定后 Giemsa 染色, 油镜下观察并摄片。

1.2.4 J_{774A.1} 凋亡率的检测 根据预实验结果, 按照 MOI 为 100 : 1 将 3 株细菌加入过夜平衡的 J_{774A.1} 培养板, 每组设 3 个复孔, 5% CO₂、37 °C 共培养 3 h, 用 PBS 洗 3 次后加入含 100 μg/ml AMK 的 RPMI 1640 共作用 2 h 以去除胞外菌(此时定为 0 点), 吸除上清液后重悬于含 10 μg/ml AMK 的 RPMI 1640, 分别在 0、1、3、6、12 和 24 h 将 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒按说明书操作后用 FCM 检测, 同时设未加细菌的正常细胞对照组, 各时间段凋亡率的计算为 3 复孔均值减去对照组数值。

1.2.5 透射电镜制样 细胞培养和细菌感染方法同上, 分别在每个时间点弃培养液, 用 D-Hanks 洗涤细胞后胰酶消化, 2 000 r/min 离心 3 min, 弃上清液, 加入 2.5% 戊二醛固定 2 h, PBS 漂洗后 1% 锇酸固定 1 h, 丙酮梯度脱水, 环氧树脂包埋, 超薄切片机切片, 醋酸铀、柠檬酸铅染色后透射电镜下观察摄片。

1.2.6 J_{774A.1} 线粒体 $\Delta\Psi_m$ 的测定 细胞培养和细菌感染方法同上, 同时设未加细菌的正常细胞对照组, 在上述时间点按检测试剂盒说明书进行线粒体 JC-1、DAPI 双染。激光扫描细胞仪扫描参数为 20 \times , DAPI 的激发光波长 405 nm, 发射光检测通道为蓝色; JC-1 的激发光波长 488 nm, 用绿色和橙色双通道检

测, 每个样本扫描数不少于 3 000 个细胞。同时用激光共聚焦显微镜观察细胞并进行图像分析。

1.3 统计学处理

用 SPSS 15.0 进行统计学处理, 数据以率(%)表示, 组间差异比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 细菌与 J_{774A.1} 的 MOI 测定

3 株受试菌与 J_{774A.1} 共培养 3 h, MOI 为 100 : 1 时作用明显, Giemsa 染色所见视野内绝大部分细胞内有细菌侵入, 随时间延长细胞内外的细菌量增多, 12 h 时细胞出现明显破坏, 共作用 24 h 时视野中遍布细菌, 大部分细胞崩解, 而对照组无明显变化(图 1)。在本实验中, 当细菌与 J_{774A.1} 的 MOI 为 100 : 1 并共同培养 3 h 后作用明显, 因此本研究后续实验以此作为细菌与细胞相互作用的最佳观察点。

2.2 J_{774A.1} 凋亡率的检测

FCM 检测 Annexin V-FITC 染色结果表明, 3 h 起(SR-11、pR_{ST98}/RIA 和 RIA 组的凋亡率分别为 21.3%、8.6%、10.2%)各时间段 J_{774A.1} 的凋亡率均为 SR-11 组 > pR_{ST98}/RIA 组 > RIA 组, 且凋亡率随时间延长而增加(6 h 时分别为 45.6%、33.5%、25.8%), 三组间差别有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 透射电镜结果

对照组细胞呈圆形, 细胞膜表面微绒毛丰富, 细胞浆均匀, 空泡少, 细胞核异染色质呈斑点状分布。3 h 起各感染组细胞可见到染色质边聚、固缩等凋亡改变, 12 h 可见凋亡小体, 以 SR-11 组最明显, pR_{ST98}/RIA 组多于 RIA 组, 24 h 各组细胞多为坏死改变。说明携带质粒 pR_{ST98} 的宿主菌能增强诱导 M Φ 发生凋亡的能力(图 2)。

2.4 J_{774A.1} 线粒体 $\Delta\Psi_m$ 的测定

2.4.1 激光扫描细胞仪检测 感染 1 h 后 SR-11、pR_{ST98}/RIA 和 RIA 所引起的 J_{774A.1} 线粒体 $\Delta\Psi_m$ 下降的百分率均呈上升趋势, 各感染时间段 SR-11 引起的 J_{774A.1} 线粒体 $\Delta\Psi_m$ 下降的百分率都高于 pR_{ST98}/RIA 和 RIA, 而 pR_{ST98}/RIA 显著高于 RIA ($P < 0.05$) (图 3)。

感染 1 h 后 J_{774A.1} 细胞分布随感染时间延长向绿色荧光区域偏移, 提示线粒体 $\Delta\Psi_m$ 下降随作用时间的延长而加剧。SR-11 和 pR_{ST98}/RIA 感染组偏移的细胞比例较 RIA 高(图 4)。

2.4.2 激光共聚焦显微镜检测 未感染细菌正常对照组细胞线粒体的红色荧光和绿色荧光强度相当,

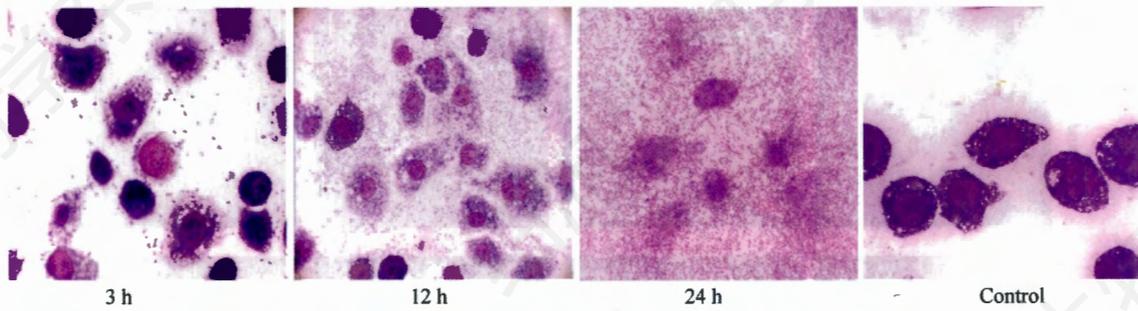


Fig.1 Giemsa staining of *J*_{774A.1} infected with pR_{ST98}/RIA at different times (MOI=100 : 1; 1 000×)

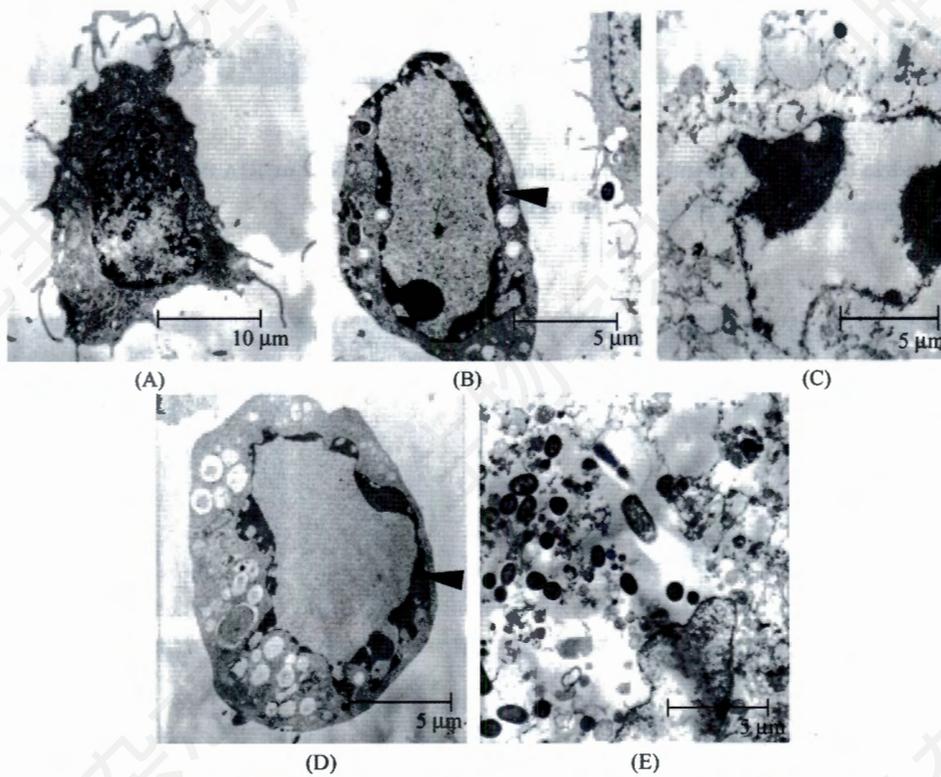


Fig. 2 *J*_{774A.1} infected with pR_{ST98}/RIA or RIA after 3 h and 24 h detected by TEM

A: *J*_{774A.1} without infection; B: *J*_{774A.1} infected with pR_{ST98}/RIA after 3 h; C: *J*_{774A.1} infected with pR_{ST98}/RIA after 24 h; D: *J*_{774A.1} infected with RIA after 3 h; E: *J*_{774A.1} infected with RIA after 24 h. Arrows indicate the chromatin margination.

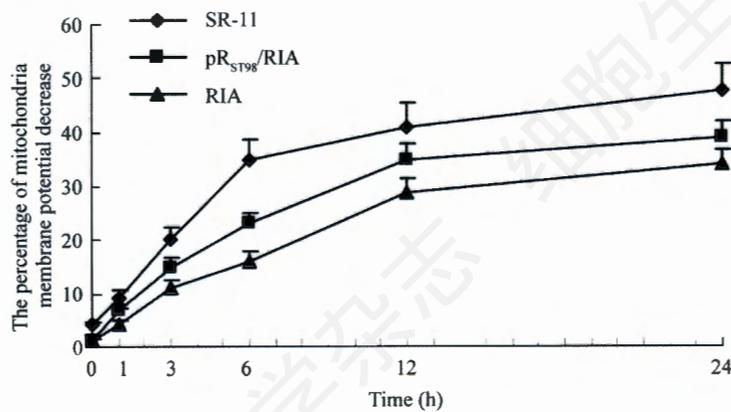


Fig. 3 The percentage of mitochondria membrane potential decrease of *J*_{774A.1}

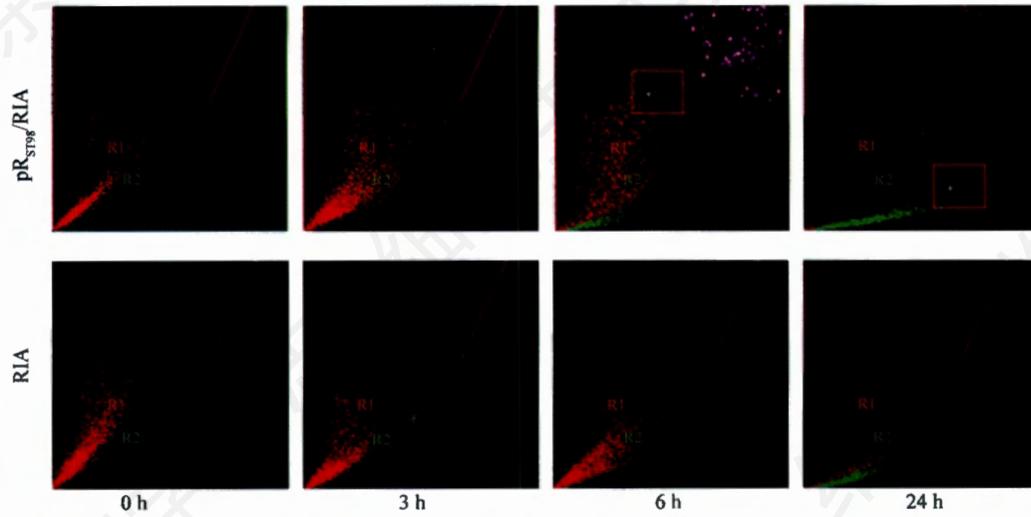


Fig. 4 The mitochondria membrane potential of *J774A.1* infected with pR_{ST98}/RIA or RIA detected by LSC at different time points and the corner panels are higher magnification of the boxed areas (200 \times)

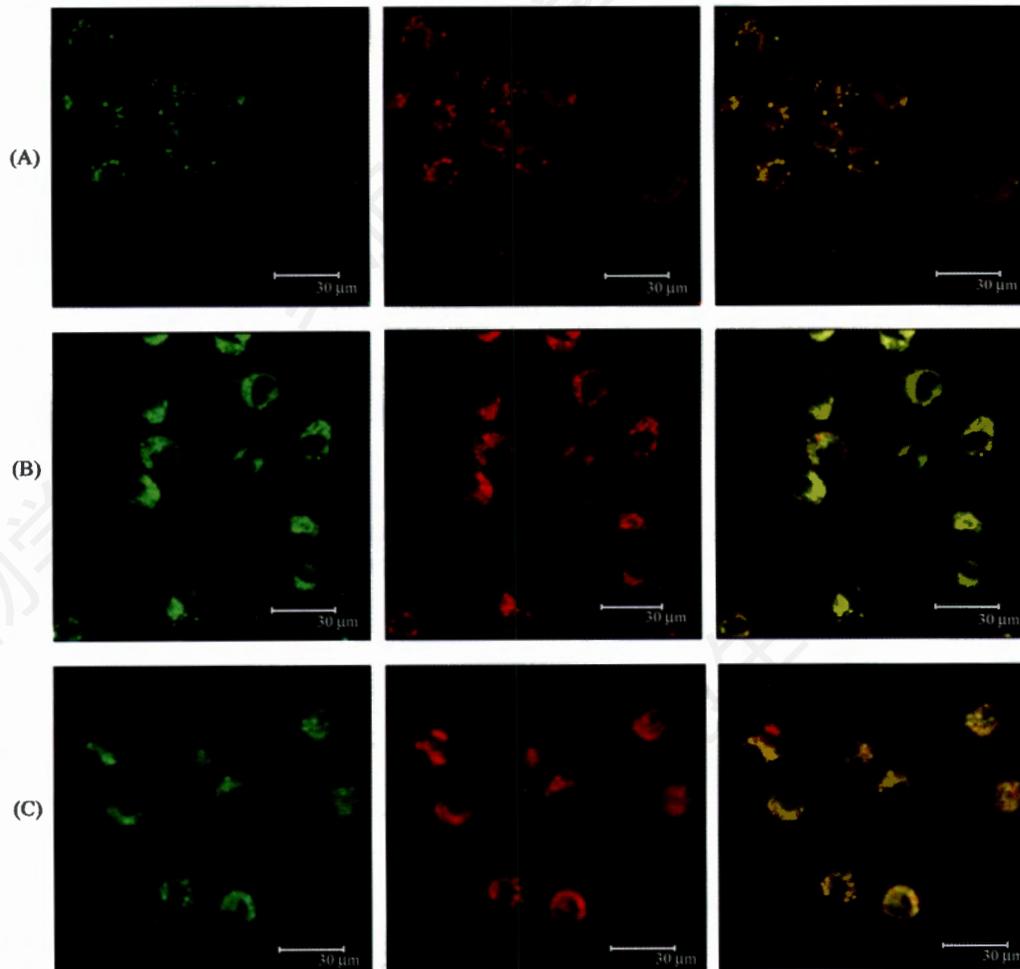


Fig. 5 *J774A.1* without infection and infected with pR_{ST98}/RIA or RIA after 1 h examined by LSCM
A: *J774A.1* without infection; B: *J774A.1* infected with pR_{ST98}/RIA; C: *J774A.1* infected with RIA.

叠加后呈黄色。而各感染组 1 h 后, 在激光发射强度不变的条件下, 红色荧光强度开始低于绿色荧光强度, 叠加后仍呈绿色, 说明实验组的红绿荧光强度比率明显低于对照组, 即经细菌感染的细胞线粒体 $\Delta\Psi_m$ 降低(图 5)。

3 讨论

沙门菌为胞内菌, 在宿主体内主要寄居在单核- $M\Phi$, 具有抵抗溶酶体酶、抑制吞噬体-溶酶体融合、干扰活性氧中介物等逃避 $M\Phi$ 杀伤的防御机制。 $M\Phi$ 是人体主要的吞噬细胞, 它在病原体的清除和破坏中起重要作用。既往研究发现 pR_{ST98} 尽管与宿主菌的粘附和侵袭力无关^[5], 但能够提高其宿主菌抗吞噬和在巨噬细胞内的存活能力^[6]。本研究用 Annexin V-FITC/PI 染色法和流式细胞术检测发现各时间段 pR_{ST98} /RIA, 引起细胞凋亡的水平高于 RIA 说明 pR_{ST98} 能增强其宿主菌诱导 $M\Phi$ 凋亡的能力。

电镜观察细胞超微结构被认为是检测凋亡的金标准。本研究发现 3 h 起各感染组细胞内均可见到染色质边聚、固缩等凋亡改变, 12 h 可见凋亡小体, 以 SR-11 组最为明显, pR_{ST98} /RIA 组多于 RIA 组, 24 h 各组细胞多为坏死改变。说明携带质粒 pR_{ST98} 的宿主菌能增强诱导 $M\Phi$ 发生凋亡的能力。

LSC 以多组参数分析细胞及形态, 是当前细胞生物学最先进的分析仪器, 被称作“定量影像细胞仪”。它既能像流式细胞仪一样对散射光和荧光进行多参数检测, 又能作为一台高通量显微镜, 对单细胞进行多色分析且没有损耗。线粒体通透性的改变是凋亡过程中的重要事件, 表现为 $\Delta\Psi_m$ 的下降, 是细胞凋亡级联反应过程中最早发生的事件之一^[7]。本研究用 LSC 和 LSCM 结合 JC-1 染色动态检测 $J_{774A.1}$ 线粒体 $\Delta\Psi_m$ 的改变, 结果表明从感染后 1 h 起, pR_{ST98} /RIA 感染组引起 $J_{774A.1}$ 线粒体 $\Delta\Psi_m$ 下降的百分率明显高于 RIA 感染组($P < 0.05$), 提示 pR_{ST98} 可提高细胞凋亡率从而影响感染的进程, 与前期实验结果一致^[8]。

鼠伤寒沙门菌是一种能够感染多种动物的革兰阴性兼性胞内菌, 侵入细胞后存在于独特的囊膜结构——含沙门菌囊泡(*Salmonella* containing vacuole, SCV)。沙门菌通过毒力岛 2 (SPI-2) 的 III 型分泌系统分泌效应分子干扰宿主细胞的杀菌机制, 修饰 SCV 使其适合沙门菌的生存, 目前已有近 20 个效应分子被鉴定, 它们在感染的不同阶段起作用^[9]。有报道沙门

菌 *phoPQ* 毒力基因调节系统能特异地监测 $M\Phi$ 的内环境, 控制多个基因的表达, 而促进该调节系统正向调节的 *spvB* 基因位于毒力质粒上, 质粒丢失后毒力明显下降^[10], 而我们在既往的研究中已证实 pR_{ST98} 上存在与沙门菌毒力质粒基因 *spv* 同源的序列^[11]。 pR_{ST98} 作为一个结构复杂的嵌合型大质粒, 含有很多尚未明确的序列, 这些序列各自的功能和彼此间的相互关系尚未明了, 携带 pR_{ST98} 的宿主菌对 $M\Phi$ 凋亡的影响与 *spvB* 直接相关还是由其他基因产物共同作用有待进一步研究。此外, 线粒体通透性改变并不是凋亡的唯一表象, 可能是自噬和凋亡所共有的通路, 两者密切相关^[11]。本实验中观察到了线粒体膜电位的改变, pR_{ST98} 上 *spv* 毒力基因可能还会通过增强细胞自噬途径来提高细菌的毒力, 我们下一步将对自噬与凋亡的关系进行深入的研究。

参考文献(References)

- [1] Siddiqui FJ, Rabbani F, Hasan R, et al. Typhoid fever in children: some epidemiological considerations from Karachi, Pakistan, *Int J Infect Dis*, 2006, 10(3): 215-222
- [2] 黄 瑞, 穆荣普. 伤寒沙门氏菌耐药性及其耐药质粒的监测, *中华传染病杂志*, 1994, 12(4): 202-206
- [3] Huang R, Wu S, Zhang X, et al. Molecular analysis and identification of virulence gene on pR_{ST98} from multi-drug resistant *Salmonella typhi*, *Cell Mol Immunol*, 2005, 2(2): 136-140
- [4] Chanana V, Ray P, Rishi DB, et al. Reactive nitrogen intermediates and monokines induce caspase-3 mediated macrophage apoptosis by anaerobically stressed *Salmonella typhi*, *Clin Exp Immunol*, 2007, 150(2): 368-374
- [5] 黄 瑞, 吴淑燕, 闻玉梅. 伤寒杆菌耐药质粒 pR_{ST98} 介导细菌毒力的研究, *中华微生物与免疫学杂志*, 2001, 21(3): 302-305
- [6] 黄 瑞, 吴淑燕. 用流式细胞术分析耐药质粒与伤寒沙门菌在巨噬细胞内生存的关系, *上海医学检验杂志*, 2001, 16(4): 211-213
- [7] Serafino A, Sinibaldi-Vallebona P, Lazzarino G, et al. Modifications of mitochondria in human tumor cells during anthracycline-induced apoptosis, *Anticancer Res*, 2000, 20(5B): 3383-3394
- [8] 宋国荣, 吴淑燕, 李嫔渊. 伤寒沙门菌质粒 pR_{ST98} 与巨噬细胞凋亡的关系, *苏州大学学报(医学版)*, 2008, 28(5): 692-695
- [9] García-del Portillo F, Núñez-Hernández C, Eisman B, et al. Growth control in the *Sal monella*-containing vacuole, *Curr Opin Microbiol*, 2008, 11(1): 46-52
- [10] García-Calderón CB, Casadesús J, Ramos-Morales F. Rcs and PhoPQ regulatory overlap in the control of *Salmonella enterica* virulence, *J Bacteriol*, 2007, 189(18): 6635-6644
- [11] Sy LK, Yan SC, Lok CN, et al. Timosaponin A-III induces autophagy preceding mitochondria-mediated apoptosis in HeLa cancer cells, *Cancer Res*, 2008, 68(24): 10229-10237

Macrophage Apoptosis Induced by *Salmonella typhi* R Plasmid

Yang Sui, Shu-Yan Wu, Guo-Rong Song, Yuan-Yuan Li, Jie Lv, Rui Huang*

(Department of Microbiology, Medical College of Soochow University, Suzhou 215123, China)

Abstract The relationship between a virulent gene on *Salmonella typhi* (*S. typhi*) R plasmid pR_{ST98} and macrophage apoptosis was explored. pR_{ST98} was transferred into an attenuated strain of *S. typhimurium* RIA to create a transconjugant pR_{ST98}/RIA. Standard *S. typhimurium* virulence strain SR-11 was used as a positive control, and *S. typhimurium* RIA as a negative one. Multiplicity of infections (MOI) were detected. The murine macrophage J_{774A.1} was infected by these three strains of *S. typhimurium* separately *in vitro*. J_{774A.1} apoptosis was detected by flow cytometer at 0, 1, 3, 6, 12 and 24 h respectively. The ultrastructure of J_{774A.1} was examined using transmission electron microscope. Mitochondria membrane potential was detected by JC-1 staining. It was demonstrated that the MOI was 100 : 1. SR-11 resulted in a higher apoptosis in J_{774A.1} than pR_{ST98}/RIA, and a conjugant pR_{ST98}/RIA was higher than RIA. Research data demonstrated that chromatin margination occurred 3 h post-infection. The apoptosis body was observed 12 h after infection, particularly in SR-11 infected cells. The majority of cells 24 h post infection were necrotic. These results indicate that the bacteria carrying plasmid pR_{ST98} has the potential to increase macrophage apoptosis.

Key words *Salmonella typhi*; plasmid; macrophage; apoptosis

Received: January 9, 2009 Accepted: April 14, 2009

This work was supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu High Education Institute (No.08KJB310009) and the Social Development Foundation of Suzhou (No.SS08025)

*Corresponding author. Tel: 86-512-6588132, E-mail: hruidm@163.com