

# A族链球菌诱导巨噬细胞坏死而非凋亡

马翠卿 胡光磊 杨建岭 胡洁 张玲 冯惠东 杨丽娟 魏林\*

(河北医科大学免疫教研室, 石家庄 050017)

**摘要** 为了研究A族链球菌(GAS)作用巨噬细胞系RAW264.7后, RAW264.7细胞增殖变化的情况, 以进一步研究GAS的致病机制。将RAW264.7接种于96孔板, 采用低菌量、中菌量和高菌量分别作用于该细胞, 培养三天后行MTT检测; 用TUNEL及ANNEXIN V-FITC法检测高菌量GAS作用后巨噬细胞是否发生凋亡; 透射电子显微镜观察低、中、高菌量GAS作用RAW264.7后细胞超微结构的变化。结果显示低、中菌量GAS对RAW264.7细胞增殖有促进作用; 高菌量GAS对细胞增殖有抑制作用, 且高菌量GAS作用RAW264.7后诱导大部分细胞发生了坏死而非凋亡。结果表明高菌量GAS引起RAW264.7细胞发生坏死而非凋亡。

**关键词** A族链球菌(GAS); 巨噬细胞; 细胞坏死; 细胞凋亡

A族链球菌(GAS)是引起人类感染的主要致病菌之一, 其致病机制复杂, 除了能产生大量的毒性蛋白以外, 其本身还具有逃避免疫攻击的能力<sup>[1-3]</sup>, 致使临床上链球菌感染存在着反复性及难以治愈等问题。一些研究已经描述了化脓性链球菌通过各种途径干扰中性粒细胞的抗微生物活性, 包括释放分子干扰中性粒细胞的募集<sup>[6]</sup>, 诱导中性粒细胞死亡等<sup>[7]</sup>。但是, GAS是否能逃避巨噬细胞强大的抗微生物作用, 是否能诱导巨噬细胞凋亡呢? 这些都鲜有报道。因此, 本实验将GAS作用于BALB/c小鼠来源的巨噬细胞株RAW264.7, 观察GAS作用RAW264.7后对该细胞增殖的影响及其超微结构的变化; 并在了解到高菌量GAS作用于RAW264.7后导致该细胞增殖活性降低的前提下, 应用ANNEXIN V-FITC及TUNEL细胞凋亡检测试剂盒检测该细胞的凋亡情况, 为进一步研究GAS的致病机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

鼠巨噬细胞系RAW264.7细胞系购于军事医学科学院, A族链球菌本室保存。LPS(Sigma公司), ANNEXIN V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(BD公司), 一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(碧云天生物技术研究所)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 MTT法检测GAS作用后对RAW264.7增殖的影响** RAW264.7细胞以 $2 \times 10^4$ 个/孔接种于96孔板, 培养过夜。将生长至对数生长期的GAS分五

个作用时段(20 min, 40 min, 60 min, 90 min, 120 min)作用RAW264.7, 每个时间段均以细菌与细胞之比(MOI)为低菌量(5:1), 中菌量(20:1), 高菌量(50:1, 100:1), 同时设PBS阴性及LPS阳性(作用终浓度为 $0.5 \mu\text{g/ml}$ )对照, 均设三复孔, 作用完毕弃菌, 无菌PBS洗涤两次后, 每孔加 $100 \mu\text{l}$ 含抗生素10%小牛血清的DMEM,  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  孵箱内培养三天后, 每孔加 $20 \mu\text{l}$  MTT继续培养4 h, 弃上清、加 $100 \mu\text{l}$ /孔DMSO, 测 $\text{OD}_{490}$ 检测细胞增殖情况。

**1.2.2 一步法TUNEL检测细胞凋亡** 将RAW264.7以 $2 \times 10^3$ /孔接种于96孔板, 按1.2.1方法以MOI为50:1, 100:1分别作用细胞90 min, 作用完毕继续培养三天后, 按一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒检测。于荧光显微镜下观察(使用蓝光激发), 凋亡细胞发出绿色荧光。

**1.2.3 ANNEXIN V-FITC法检测细胞凋亡** 按1.2.2方法作用RAW264.7细胞, 作用完毕继续培养三天, 按ANNEXIN V-FITC细胞凋亡检测试剂盒检测。于荧光显微镜下观察(使用蓝光激发), 处于凋亡早期的细胞发出绿色荧光, 凋亡晚期发出绿红两种荧光, 坏死细胞发出红绿两种荧光或红色荧光。

**1.2.4 透射电子显微镜观察GAS作用前后RAW264.7超微结构** 将RAW264.7以 $5 \times 10^5$ 个/孔接种于6

收稿日期: 2010-06-28 接受日期: 2010-09-27

国家自然科学基金(No.30872399, No.30901350), 河北省自然科学基金(No.C2009001091)和河北省卫生厅科学基金(No.08054)资助项目

\* 通讯作者。Tel: 0311-86261191, E-mail: weilin21@sina.com

孔板培养过夜。按 1.2.1 方法以低菌量、中菌量和高菌量分别作用 RAW264.7 细胞 90 min, 设阴性对照, 作用完毕继续培养三天后, 用 0.25% 胰酶(含 0.03% EDTA)消化、收集细胞, 1 500 r/min×10 min 离心, 细胞沉淀用 2.5% 戊二醛固定后送河北医科大学电镜室进行切片观察。

**1.2.5 统计方法** 刺激组和对照组两样本均数比较用 SPSS13.0 统计软件行两样本均数 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

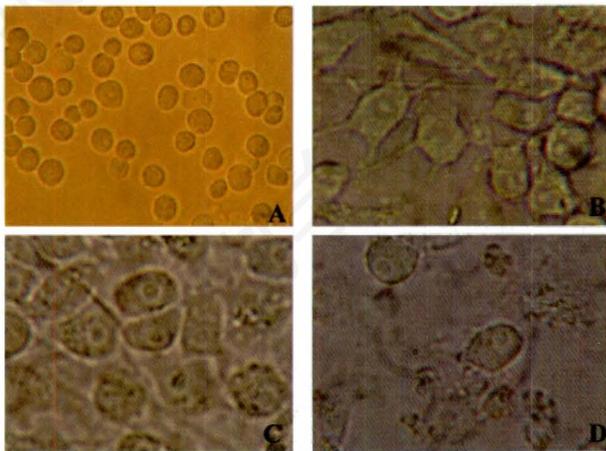
## 2 结果

### 2.1 倒置显微镜观察

正常未刺激的 RAW264.7 为圆形贴壁细胞(图 1A); 低、中菌量作用细胞后, 细胞体积变大, 形状不规则, 突起增加, 提示细胞功能活跃(图 1B 和图 1C); 高菌量作用后, 细胞形态不规则, 胞膜模糊, 大量细胞死亡(图 1D)。

### 2.2 MTT 结果

低、中菌量作用细胞时, 刺激组 OD<sub>490</sub> 值高于阴性对照组, 经统计学处理有统计学意义, 提示 GAS 对 RAW264.7 增殖有促进作用(低菌量时这种促进作用最显著, 中菌量 20:1 时, 促进作用维持在较高水平), 这种作用具有时间(图 2)、剂量依赖性(图 3)。高菌量作用细胞时, 刺激组细胞 OD<sub>490</sub> 值低于阴性对照组, 经统计学处理有统计学意义, 提示高浓度 GAS 对巨噬细胞增殖具有抑制作用, 并且随菌量的加大抑制作用更明显(图 4)。

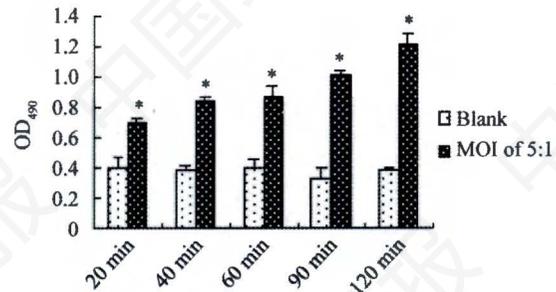


**Fig.1** The observation of RAW264.7 cells infected with GAS by optical microscope(400×)

A: PBS; B: MOI=5:1; C: MOI=20:1; D: MOI=100:1.

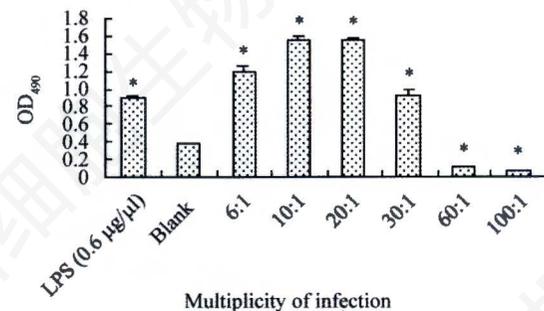
### 2.3 细胞凋亡的检测

高菌量作用巨噬细胞后, 经 TUNEL 检测, 几乎检测不到细胞凋亡(图 5)。经 ANNEXIN V-FITC 检测, 当 GAS 以 MOI=50:1 作用细胞时, 尽管有少量细胞发生凋亡, 但大部分细胞发生了坏死(图 6B); 当 GAS 以 MOI=100:1 作用细胞时, 几乎检测不到细胞凋亡, 细胞全部坏死(图 6C)。



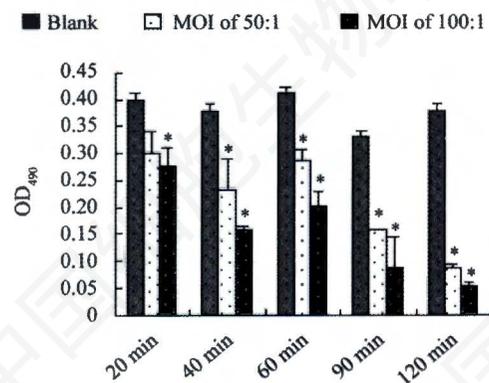
**Fig.2** The proliferation of RAW264.7 infected with GAS (MOI=5:1)

\* $P < 0.05$  vs blank.



**Fig.3** The proliferation of RAW264.7 infected with GAS for 120 min

\* $P < 0.05$  vs blank.

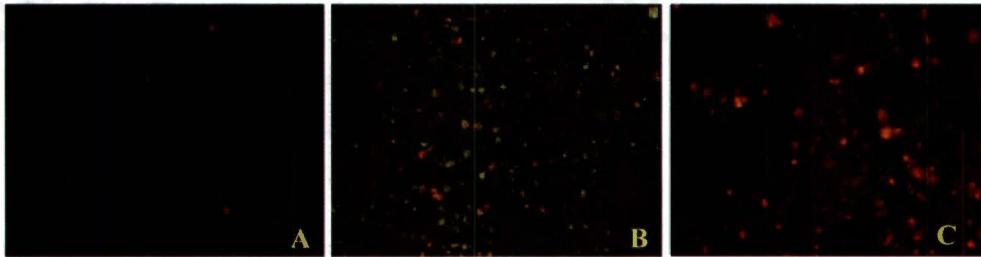


**Fig.4** The proliferation of RAW264.7 infected with high-dose GAS

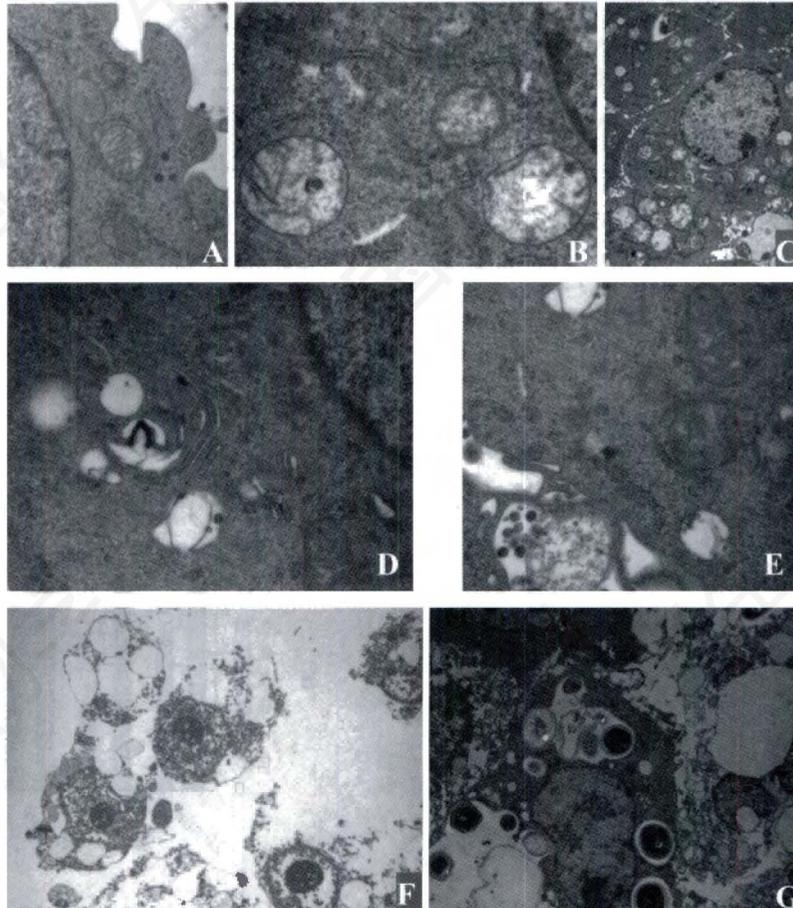
\* $P < 0.05$  vs blank.



**Fig.5** The detection of apoptosis of RAW264.7 cells infected with GAS by TUNEL(200×)  
A: PBS; B: MOI=100:1.



**Fig.6** The detection of apoptosis of RAW264.7 cells infected with GAS by ANNEXIN V-FITC(200×)  
A: PBS; B: MOI=50:1; C: MOI=100:1.



**Fig.7** The observation of ultrastructure of RAW264.7 cells infected with GAS by transmission electron microscopy  
A: PBS; B,C: MOI=5:1; D,E: MOI=20:1; F,G: MOI=100:1.

## 2.4 透射电子显微镜观察

MOI=5:1、20:1 时, RAW264.7 细胞出现空泡化, 细胞器较对照组增多, 线粒体水肿, 核膜融合消失, 粗面内质网扩张、脱颗粒, 胞内溶酶体髓样化(图 7B~7E), 细胞功能活跃。MOI=100:1 时, 胞内残余大量细菌菌体, 细胞微绒毛消失, 胞膜消失, 胞质高度水肿空泡化, 细胞器减少且形态异常, 裸核, 核周见少量胞质, 细胞死亡(图 7F 和图 7G)。

## 3 讨论

巨噬细胞是免疫系统中极其重要的吞噬细胞, 病原微生物感染机体后, 体内的巨噬细胞能有效地吞噬外来抗原(如病原微生物、不溶性颗粒)并通过分泌多种酶类(如溶酶体酶和溶菌酶)、细胞因子(如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6)、活性氧、NO 等物质, 直接杀灭、消化、降解病原体, 并将抗原肽呈递给 CD4<sup>+</sup>T 细胞识别以启动特异性免疫应答<sup>[8]</sup>, 最终清除外来病原体, 但在一些炎症疾病中观察到了巨噬细胞的死亡。研究发现许多因素都能造成巨噬细胞凋亡, 如一些胁迫(stress)作用、病原体的入侵<sup>[9-11]</sup>以及病原体的组成成分<sup>[12,13]</sup>和细胞因子<sup>[14,15]</sup>的刺激等。巨噬细胞的凋亡、坏死或减少可能是微生物抑制宿主免疫反应和在感染部位持续存在的一个重要策略。

A 族链球菌(GAS)是一种常见的人类致病菌, 其引起的感染可以导致无临床症状的携带状态、普通感染如咽炎或严重的蔓延性疾病如坏死性筋膜炎, 爆发性的毒性休克<sup>[16]</sup>。GAS 之所以能在人群中持续存在并引起严重的疾病, 一方面其能逃避宿主的免疫监视功能<sup>[17,18]</sup>, 另一方面与其存在的大量毒力因子有关。

已知抗化脓性链球菌的天然免疫也和抗其他多种病原体一样主要依靠定居巨噬细胞和招募来的嗜中性粒细胞的作用, 但发现其可以在多种宿主细胞内存活(尽管不能增殖), 像巨噬细胞、中性粒细胞、上皮细胞、成纤维细胞等<sup>[19-22]</sup>, 这些细胞成为反复发作的 GAS 疾病的储存库。近年来, GAS 引起宿主反复感染与其逃避宿主免疫监视的关系越来越受到重视。据报道, G- 菌表面的 LPS(脂多糖)+IFN- $\gamma$  可以诱导巨噬细胞的凋亡<sup>[23]</sup>, 那么化脓性链球菌能否诱导巨噬细胞凋亡呢? 我们在研究 GAS 与 RAW264.7 巨噬细胞的相互作用中发现, 高菌量(MOI=50:1, 100:1)的 GAS 作用 RAW264.7 巨噬细胞后, 凋亡检测和电镜结果均显示 GAS 诱导绝大多数巨噬细胞坏死而非凋亡。Limbago 等<sup>[24]</sup>报道链球菌溶血素 O(SLO)缺陷

的 GAS 变异株皮下注射至小鼠体内后, 比其野生株具有显著的减毒效应, 同样, 溶血素 S(SLS)缺陷的 GAS 变异株在皮肤坏死的小鼠模型中, 其引起的坏死损伤比其野生菌症状减轻很多<sup>[25]</sup>, 提示 GAS 可能主要由 SLO 和 SLS 引起对宿主的细胞毒效应; 其他实验也显示 SLO 和 SLS 均有助于化脓性链球菌早期阶段的皮肤感染及诱导坏死<sup>[26]</sup>, 这可能也是化脓性链球菌引起巨噬细胞坏死的原因, 该机制赋予链球菌一种生存优势, 使其逃避天然免疫, 以便促进其进一步侵袭到其他部位。

本实验中, 低中菌量 GAS 作用 RAW264.7 后, 引起巨噬细胞吞噬消化等功能增强, 这可能是由于低菌量 GAS 不足以引起细胞毒效应, 反而使巨噬细胞吞噬少量 GAS 后被活化, 从而表现为功能活跃; 但高菌量 GAS 的细胞毒却引起巨噬细胞死亡, 只是这种死亡是通过使细胞坏死而非凋亡。

本研究将有助于认识 GAS 与宿主细胞之间的相互作用, 有助于揭示 GAS 在细胞内存活和逃避巨噬细胞攻击的机制, 为探索 GAS 的致病机制奠定基础。

## 参考文献(References)

- 1 Cue D, Dombek PE, Lam H. Streptococcus pyogenes serotype M1 encodes multiple pathways for entry into human epithelial cells. *Infect Immun* 1998; 66: 4593-601.
- 2 Lapenta D. Group A streptococci efficiently invade human respiratory epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12115-9.
- 3 Kuo CF, Lin YS, Chuang WJ, Wu JJ, Tsao N. Degradation of complement 3 by streptococcal pyrogenic exotoxin B inhibits complement activation and neutrophil opsonophagocytosis. *Infect Immun* 2008; 76(3):1163-9.
- 4 Terao Y, Mori Y, Yamaguchi M, Shimizu Y, Ooe K, Hamada S, et al. Group A streptococcal cysteine protease degrades C3 (C3b) and contributes to evasion of innate immunity. *J Biol Chem* 2008; 283(10): 6253-60.
- 5 Pichichero ME. Group A b-hemolytic streptococcal infections. *Pediatr Rev* 1998; 19(9): 291-302.
- 6 Hidalgo-Grass C, Dan-Goor M, Maly A, Yoni E, Laura AK, Victor N, et al. Effect of a bacterial pheromone peptide on host chemokine degradation in group A streptococcal necrotising soft-tissue infections. *Lancet* 2004; 363: 696-703.
- 7 Miyoshi-Akiyama T, Takamatsu D, Koyanagi M, Zhao J, Imanishi K, Uchiyama T. Cytocidal effect of Streptococcus pyogenes on mouse neutrophils *in vivo* and the critical role of streptolysin S. *J Infect Dis* 2005; 192: 107-16.
- 8 Stvrtnova V, Jakubovsky J, Hulin I. Inflammation and fever: pathophysiology principles of diseases. Bratislava: Academic Electronic Press, 1995.
- 9 Chen Y, Smith MR, Thirumalai K, Zychlinsky A. A bacterial invasin induces macrophage apoptosis by binding directly to

- ICE. *EMBO J* 1996; 15(15): 3853-60.
- 10 Orth K, Xu Z, Mudgett MB, Bao ZQ, Palmer LE, Bliska JB, *et al.* Disruption of signaling by *Yersinia* effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. *Science* 2000; 290(5496): 1594-7.
  - 11 Hilbi H, Moss JE, Hersh D, Chen Y, Arondel J, Banerjee S, *et al.* Shigella-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB. *J Biol Chem* 1998; 273(49): 32895-900.
  - 12 Han KJ, Su X, Xu LG, Bin LH, Zhang J, Shu HB. Mechanisms of the TRIF induced interferon-stimulated response element and NF- $\kappa$ B activation and apoptosis pathways. *J Biol Chem* 2004; 279 (15): 15652-61.
  - 13 Hsu LC, Mo PJ, Zhang KZ, Luo JL, Maeda S, Kaufman RJ, *et al.* The protein kinase PKR is required for macrophage apoptosis after activation of Toll like receptor4. *Nature* 2004; 428(6980): 341-5.
  - 14 Kim SO, Ono K, Tobias PS, Han J. Orphan nuclear receptor Nur77 is involved in caspase-independent macrophage cell death. *J Exp Med* 2003; 197(11): 1441-52.
  - 15 Vadiveloo PK, Vairo G, Hertzog P, Hamilton JA. Role of type I interferons during macrophage activation by lipopolysaccharide. *Cytokine* 2000; 12(11): 1639-46.
  - 16 Cunningham MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 470-511.
  - 17 Bisno AL, Brito MO, Collins CM. Molecular basis of group A streptococcal virulence. *Lancet* 2003; 3: 191-200.
  - 18 Chhatwal GS, McMillan DJ. Uncovering the mysteries of invasive streptococcal diseases. *Trends Mol Med* 2005; 11: 152-5.
  - 19 Staali L, Mörgelin M, Björck L, Tapper H. Streptococcus pyogenes expressing M and M-like surface proteins are phagocytosed but survive inside human neutrophils. *Cell Microbiol* 2003; 5: 253-65.
  - 20 Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, Yamamoto A, Yamaguchi H, Kamimoto T. Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. *Science* 2004; 306: 1037-40.
  - 21 Håkansson A, Bentley CC, Shakhnovic EA, Wessels MR. Cytolysin-dependent evasion of lysosomal killing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005; 102: 5192-7.
  - 22 Thulin P, Johansson L, Low DE, Gan BS, Kotb M, McGeer A, *et al.* Viable group A streptococci in macrophages during acute soft tissue infection. *PLoS Med* 2006; 3(3): e53.
  - 23 Kim SO, Ono K, Han J. Apoptosis by pan-caspase inhibitors in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281(5): L1095-105.
  - 24 Limbago B, Weinrick B, Scott JR. Role of streptolysin O in a mouse model of invasive group A streptococcal disease. *Infect Immun* 2000; 68: 6384-90.
  - 25 Betschel SD, Borgia SM, Barg NL, Low DE, De Azavedo JC. Reduced virulence of group A streptococcal Tn916 mutants that do not produce streptolysin S. *Infect Immun* 1998; 66: 1671-9.
  - 26 Fontaine MC, Lee JJ, Kehoe MA. Combined contributions of streptolysin O and streptolysin S to virulence of serotype M5 Streptococcus pyogenes strain Manfredo. *Infect Immun* 2003; 71: 3857-65.

## Necrosis, Not Apoptosis of RAW264.7 Macrophages Following Infection with GAS

Cui-Qing Ma, Guang-Lei Hu, Jian-Ling Yang, Jie Hu, Ling Zhang, Hui-Dong Feng, Li-Juan Yang, Lin Wei\*  
(Department of Immunology, Basic Medical College, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

**Abstract** To study the proliferation of macrophage RAW264.7 infected with group A streptococcus (GAS), exploring the pathogenic mechanism of GAS, RAW264.7 cells were seeded into 96 plates, and then infected with GAS at an MOI (multiply of infection) ranging from 5:1 to 100:1 (bacteria number per macrophage) for 20 min, 40 min, 60 min, 90 min and 120 min, subsequently the bacteria were abandoned and the infected RAW264.7 cells were incubated for 3d, and then added MTT to measure OD<sub>490</sub>. Following high-dose GAS stimulation, apoptosis was detected by TUNEL and ANNEXIN V-FITC. The ultrastructure of RAW264.7 cells, infected with GAS, was observed by transmission electron microscopy. We found that the activation and proliferation of RAW264.7 cells were enhanced following infections with low-dose GAS, while the proliferation of cells was declined when cells were infected with high-dose GAS, moreover, the cells were found to be necrosis but not apoptosis. Our results suggest that macrophages RAW264.7 are induced to be necrosis but not apoptosis with high-dose GAS stimulation.

**Key words** group A streptococcus(GAS); macrophage; necrosis; apoptosis

Received: June 27, 2010 Accepted: September 27, 2010

The work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30872399, No.30901350), the Natural Science Foundation of Hebei Province (No.C2009001091) and the Scientific Research Foundation of Health Bureau of Hebei Province (No.08054)

\*Corresponding authors. Tel: 86-311-86261191, E-mail: weilin21@sina.com