

DOI:10.3969/cjz.j.issn.1002-2694.2013.03.015

类鼻疽伯克霍尔德氏菌感染 RAW264.7 细胞模型的建立

方 瑶¹,潘 静²,李 倩¹,顾 江¹,唐 彬¹,张卫军¹,毛旭虎¹

摘要:目的 建立类鼻疽伯克霍尔德氏菌感染小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的细胞模型,为进一步研究其致病机制奠定基础。**方法** 摸索类鼻疽伯克霍尔德氏菌培养条件、构建模型的感染条件(e.g. 感染复数, 感染时间),通过吉姆萨染色、透射电镜、活细胞工作站动态观察等确证胞内感染和宿主细胞的形态变化,分析病原菌侵袭率、胞内复制率和宿主反应性来评价该模型中病原菌侵入 RAW264.7 特点和病理损伤类型。**结果** 确定了类鼻疽伯克霍尔德氏菌的一般培养条件,感染复数 MOI = 100 感染宿主细胞,170 g 离心 5 min 后 37℃ 共孵 1 h 以利于细菌侵入胞内,含 250 μg/ml 卡那霉素的 DMEM-10 培养以杀死胞外病原菌。形态观察,类鼻疽伯克霍尔德氏菌感染后最早 8 h 可观察到异物多核巨细胞(MNGC),RAW264.7 细胞伸出伪足,相互融合。感染初期(<3 h)TNF-α 升高较快,9 h 后则下降至低值,直至感染后期(15~24 h)再次升高。**结论** 成功构建类鼻疽伯克霍尔德氏菌胞内感染模型,拟为进一步研究其致病机制提供了条件。

关键词:类鼻疽伯克霍尔德氏菌;小鼠巨噬细胞(RAW264.7);细胞模型

中图分类号:R378.99

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2013)03-0282-05

Establishment of a *Burkholderia pseudomallei* invaded RAW264.7 cell model

FANG Yao¹, PAN jin², LI Qian¹, GU Jiang¹, TANG Bin¹, ZHANG Wei-jun¹, MAO Xu-hu¹

(1. Department of Clinical Microbiology and Immunity, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;

2. Department of Clinical Hematology, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

ABSTRACT: To establish a RAW264.7 cell infection model by *Burkholderia pseudomallei* for further study on its pathogenesis, RAW264.7 cells and *B. pseudomallei* were incubated together in different conditions (multiplicity of infection, incubation time). In regard to the amount of bacteria invaded and the formation of multinucleate giant cells (MNGC), we designed the best condition for *B. pseudomallei* to infect RAW264.7 cells and obtained the characteristics of its infection. The best condition was that m. o. i=100, five minutes of 170 g for centrifugation, and one hour of incubation before adding 250 μg/mL of final concentration of kanamycin to kill the extracellular bacteria. Multinucleated giant cells could be formed in 8 h and be observed by microscope and Transmission Electron Microscope (TEM). While the cytokine TNF-α, an important inflammatory mediator, did not increase significantly as expected. In this way, a *B. pseudomallei* invaded RAW264.7 cell model was successfully established as a solid foundation for our further study on pathogenesis.

KEY WORDS: *Burkholderia pseudomallei* (*B. pseudomallei*); RAW264.7 cell; cell model

Corresponding author: Mao Xu-hu, Email: mxh95xy@tom.com

类鼻疽伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia pseudomallei*)又称类鼻疽杆菌,属于假单胞菌属,2006 年被美国 CDC 列为 B 类生物恐怖剂。它能感染机体几乎任何器官,导致的疾病称类鼻疽,是一种典型的热带疾病,有很高的误诊和死亡率,是一种正在扩散

通讯作者:毛旭虎,Email:mxh95xy@tom.com

作者单位:1. 第三军医大学医学检验系临床微生物教研室,重庆 400038;

2. 第三军医大学医学检验系临床血液教研室,重庆 400038

的人兽共患病^[1-2]。急性感染主要表现为急性败血症、多器官功能障碍(MODS),慢性感染主要累及肺、肝脾、脑等脏器及皮肤软组织,导致脓肿、炎症等。我国海南、广东及南海周边国家是类鼻疽流行的重灾区^[3],而国内类鼻疽伯克霍尔德氏菌的研究还处在起步阶段,尚未见该菌感染细胞的报道。本研究以小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞为宿主细胞,以本室已完成的全基因组测序的类鼻疽伯克霍尔德氏菌 BPC006 (GenBank: CP003781&CP003782) 为

病原菌代表,分别评价细菌数量、感染复数等对细菌侵入细胞数量的影响,通过形态学、病理生化指标和巨噬细胞多核巨细胞(multinucleate giant cells, MNGC)的形成规律以及细胞病理特点来评价感染模型的稳定性,最终成功建立了类鼻疽伯克霍尔德氏菌胞内感染模型。

虽然国外已成功建立了该菌标准株 K96243 的研究模型,但是未在文献中报道构建模型的细节,亦未评价模型的稳定性,也没有以中国类鼻疽伯克霍尔德氏菌分离株为对象的研究模型。同时,该模型选择的巨噬细胞是机体内重要的天然免疫细胞,模型的构建将为我们后续类鼻疽伯克霍尔德氏菌的免疫机制研究提供可靠的平台。本研究即是对此的补充,拟为我国的类鼻疽伯克霍尔德氏菌的致病机制研究提供有价值的参考。

1 材料与方法

1.1 菌株、细胞株、试剂及仪器 小鼠巨噬细胞 RAW264.7(ATCC:TIB-71),DMEM 培养基(GBICO 公司),胎牛血清(GBICO 公司),类鼻疽伯克霍尔德氏菌菌株 BPC006 (GenBank: CP003781&CP003782,本室分离、鉴定、测序及保存),Luria-Bertani 培养基(胰蛋白胨和酵母提取物为英国 OXOID 产品,NaCl 购于上海生工),小鼠 TNF- α ELISA 试剂盒(达科为 DKW12-2720-048),其它试剂为国产分析纯。 CO_2 培养箱(SERIES II Thermo),恒温摇床(BILON-COS-211C),菌落计数仪(HXK-V1),透射电镜(Philips TECNAI 10),活细胞工作站(OLYMPUS IX81-ZDC)等。

1.2 病原菌侵袭试验(细菌的摄取率和复制率分析) RAW264.7 用 DMEM-10 重悬,转入 12 孔板中,使得 5×10^6 细胞/孔,37℃孵箱中培养过夜,感染当天换成新鲜培养基,不同感染复数(细菌/细胞),37℃,170 g 离心 5 min,孵育 1 h,37℃预温的 Hanks 洗两次,含 250 μ g/ml 卡那霉素中培养,取分别感染 3,6,12,18 h 的细胞,用 0.2% Triton X-100 裂解后倍比稀释涂板计数。

1.3 透射电镜(TEM)观察受感染细胞形态 TEM 观察宿主细胞内病原菌,评价细胞病理变化及病原菌在宿主细胞内的生存状态。

1.4 活细胞工作站动态观察细胞融合状态 通过活细胞工作站的动态观察,可以快速确定形态学变化的规律,为后续试验摸索条件。

1.5 吉姆萨染色(观察 MNGC 的形成) 细胞在盖玻片上培养过夜后,感染类鼻疽杆菌,取不同时相感染后细胞,PBS 洗净,1% 多聚甲醛固定 15 min,

50% 和 90% 乙醇洗 5 min。干燥盖玻片后吉姆萨染色。为了评价 MNGC 的形成,每块盖玻片上至少有 1 000 个细胞核。MNGC 形成比例的计算方法为:MNGC% = 多核巨细胞中的核数/总的核数。

1.6 ELISA 法检测 TNF- α 利用 mouse TNF- α 预包被 ELISA kit 检测不同感染时相下细胞培养上清中 TNF- α 的含量,评价巨噬细胞作为一种免疫细胞对类鼻疽伯克霍尔德氏菌的免疫反应性。

1.7 感染模型稳定性验证 所有试验均做 3 次以上重复,数据统计采用 t 检验分析差异显著性,Microsoft Excel 软件作图,以得到感染模型建立的最佳条件。

2 结 果

2.1 宿主细胞对细菌的摄取率分析 不同感染复数,37℃,170 g 离心 5 min,孵育 1 h,收集感染 3 h 的细胞,用 0.2% Triton X-100 裂解后倍比稀释涂板计数,计算:摄取率% = (细胞裂解出的细菌数/感染初始细菌数) $\times 100\%$ 。

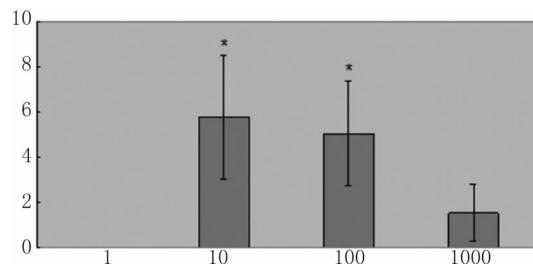


图 1 不同感染复数宿主细胞对病原菌的摄取率

Fig. 1 Bacterial uptake rate of host cell under different multiplicity of infection (MOI)
Horizontal axis: Different multiplicity of infection;
Longitudinal axis: Bacterial uptake rate;
 $* P < 0.05$.

以感染复数 MOI=10 或 100 时,细菌侵入宿主细胞的效率较高,但是 MOI=100 感染条件下侵袭率更稳定。而且在细菌感染细胞操作中,当感染复数 MOI=10 时,六孔细胞板每个孔中加入的菌液量在 1 μ l,操作误差较大,而 MOI=100 时人为的误差稍小些,所以在细胞模型的构建中我们采取了 MOI=100。

2.2 细菌的复制率分析 感染复数 MOI=100,37℃,170 g 离心 5 min,孵育 1 h,收集不同感染时相 1,2,4,8 h,用 0.2% Triton X-100 裂解后倍比稀释涂板计数,计算复制速率(入胞细菌倍增速率)。

细菌在 LB,37℃ 培养条件下生长的倍增时间约 1 h,但是从感染 1 h 到 8 h 过程中胞内细菌数量没有显著增加,本实验中没有计算确切的倍增时间。

2.3 活细胞工作站动态观察细胞融合状态 动态观察即可见明显的MNGC的形成,虽然巨噬细胞在其它外源性刺激下也能产生多核变,这也是一系列慢性疾病中肉芽肿等病变形成的基础,但是远不

及本细胞模型中形成MNGC的速度(8 h)和巨核细胞的核数(可达到 10^3 个核)。

2.4 透射电镜(TEM)观察受感染细胞形态

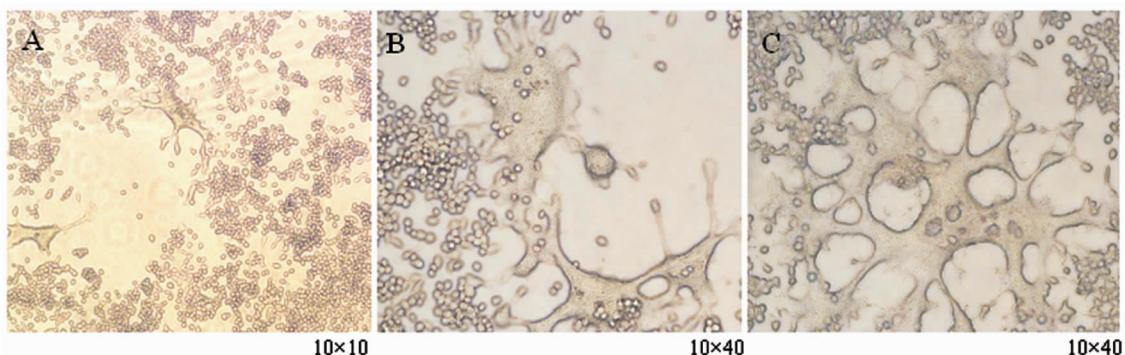


图2 不同感染时相下(A:8 h, B:12 h, C: 24 h)RAW264.7 细胞融合

Fig. 2 Fusion of RAW264.7 cells infected with *B. pseudomallei* in different phases

A: 8 h pro-infection; B: 12 h pro-infection; C: 24 h pro-infection

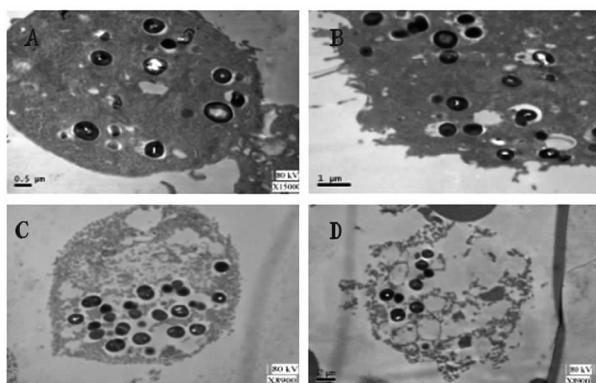


图3 不同感染时相(A: 4h, B: 8h, C: 21h, D: 24h)细菌的胞内生存状态和RAW264.7 细胞病理损伤表现

Fig. 3 Intracellular *B. pseudomallei* and host cell status in different phases under transmission electron microscope (TEM)

A: 4 h pro-infection; B: 8 h pro-infection; C: 21 h pro-infection; D: 24 h pro-infection

2.5 吉姆萨染色(观察MNGC的形成)

2.6 ELISA法检测炎症因子TNF- α 炎症因子TNF- α 呈现“双峰”变化,即在感染初期快速上升,而在感染中期(9~15 h)下降至较低值,在感染后期由于细胞发生强烈的免疫反应而升高,最终宿主细胞死亡而减少炎症因子的分泌。

3 讨论

我国海南、广东及南海周边国家是类鼻疽感染的重灾区,近十年来类鼻疽病例不断增加。由于病患主要来自医疗资源较缺乏的地区和低收入阶层,加上流行区并不广泛等原因,该病的防治工作一直

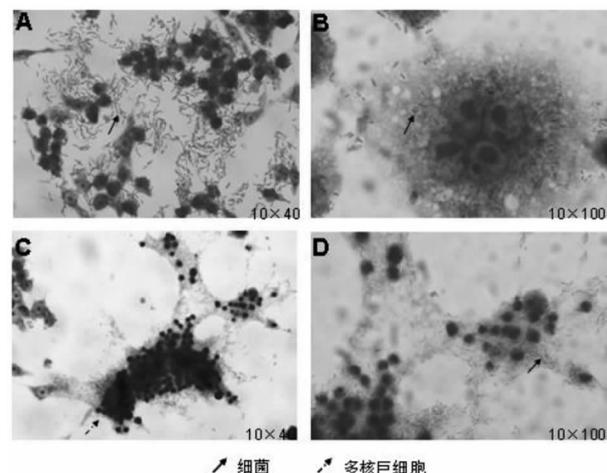


图4 类鼻疽伯克霍尔德氏菌感染导致RAW264.7 胞间融合形成多核巨细胞(MNGC)

Fig. 4 Multinucleated giant cells (MNGC) formation of RAW264.7 infected with *B. pseudomallei* by Giemsa staining

A: 4 h pro-infection; B: 8 h pro-infection; C: 21 h pro-infection; D: A zoom of C; Solid arrow: *B. pseudomallei* bacteria; Dashed arrow: Multinucleated giant cell

没有得以重视。从临床诊疗上看,类鼻疽有很高的致死率和复发率,而其感染机制却一直不清楚。本文作者旨在从最基本的平台建设做起,为后续的类鼻疽感染机制研究工作提供借鉴,节约宝贵的科研时间。

以前报道的类鼻疽伯克霍尔德氏菌的细胞模型所用的宿主细胞主要有小鼠巨噬细胞RAW264.7,人单核巨细胞U937,HeLa细胞等^[6-7],我们采用小

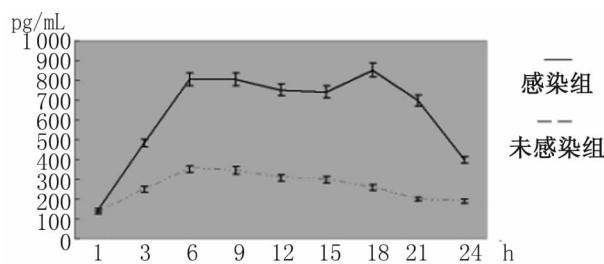


图 5 不同感染时相下培养上清中细胞因子 TNF- α 含量 ELISA 检测

Fig. 5 Determination of TNF- α change in culture supernatant by ELISA

Solid line: TNF- α change in infectious culture supernatant; Dashed line: TNF- α change in non-infectious culture supernatant; Horizontal axis: different time after infection; Longitudinal axis: TNF- α concentration, pg/mL

鼠巨噬细胞主要是因为该细胞系稳定、易培养的特点,也为今后建立小鼠动物模型提供实践基础。这些研究中确认模型构建成功的方法也不外乎电镜、观察 MNGC 的形成、侵袭率的分析等^[9],但都没有交代细胞模型建立的细节和评价模型稳定性的指标,对于我们的研究没有具体指导意义。有文献报道类鼻疽伯克霍尔德氏菌能在数分钟内进入细胞内^[5],但是如此短的侵入时间可能对已黏附于宿主细胞上的细菌才可能完成入侵,我们采用了孵育 1 h(文献中可查到的最短时间)的共孵条件。没有用更长的时间是为了尽量排除由于巨噬细胞运动、伸出伪足而吞噬类鼻疽伯克霍尔德氏菌的非主动入侵的情况。本文也是以电镜观察到宿主细胞内存在类鼻疽病原体为胞内感染模型成功建立的金标准,但是在建立模型的过程中发现了一些不同之处。比如,我们的细胞模型中细菌侵入率并没有像 W. Kespichayawattana^[9]所阐述的那样高(40%),这可能是由于他们采用孵育 2 h 的原因,这样细菌通过运动黏附上细胞的数量会更多,但是巨噬细胞的蠕动此时也会更活跃,那么细菌入胞是由于主动感染还是被动吞噬就不容易分辨了;MNGC 的形成主要集中在感染后期,其形成并没有与感染时间呈明显的线性规律。但是 MNGC 现象非常明显,能够在感染 24 h 内即形成成百上千个核的多核巨细胞,具有明显的形态学特征,甚至可以肉眼观察,对于确认感染有诊断意义;电镜不仅能确认病原菌是否侵入胞内,同时也能反映不同感染时相下宿主细胞的超微结构的改变和胞内病原菌的生存状态,从我们的模型中可以看到,感染初期细菌在胞内增值并不明显,这一时间段很可能是细菌逃避免疫的过程,正如 Sylvia Chieng 研究数据表明^[7],在类鼻疽伯克霍

尔德氏菌进入细胞的早期,病原菌会下调与复制、能量代谢和毒力等相关的基因从而降低自身免疫原性,达到与宿主细胞的和平共处。而在感染后期,病原菌逃逸到宿主细胞胞浆相对免疫压力较低的环境中,病原菌即开始上调这些基因,大量复制、引发免疫病理反应,致使宿主细胞发生免疫病理损伤而崩解,释放出的细菌可能参与到下一步的感染过程中去。从炎症因子 TNF- α 的检测中也能看到这一规律,即在感染初期由于触发宿主细胞的免疫机制, TNF- α 的分泌增加,而在感染 12 h 后病原菌似乎开始与宿主细胞和平相处了,宿主细胞的反应性也相应降低,感染后期由于细菌的免疫原性随着病原菌的大量复制而增加致使宿主细胞发生急剧的免疫反应,导致细胞的免疫病理损伤。通过以上形态学观察结果和生化指标表明我们成功构建了类鼻疽伯克霍尔德氏菌的胞内感染模型,这为进一步的该菌的感染机制研究提供了可靠的平台。

参考文献:

- [1] Currie BJ, Dance DA, Cheng AC. The global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and melioidosis: an update [J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2008, 102(01): S1-S4. DOI: 10.1016/S0035-9203(08)70002-6
- [2] Li L, Han OE, Zhao ZL, et al. Serologic investigation of melioidosis in human in Hainan Island and the report for the first local patient[J]. Chin J Zoonoses, 1990, 6(5): 38-39. (in Chinese)
- [3] Ma G, Zheng D, Cai Q, et al. Prevalence of *Burkholderia pseudomallei* in Guangxi, China[J]. Epidemiol Infect, 2007, 138(01): 37-39. DOI: 10.1017/S0950268809990264
- [4] Shams AM, Rose LJ, Hodges L, et al. Survival of *Burkholderia pseudomallei* on environmental surfaces[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73 (24): 8001-8004. DOI: 10.1128/AEM.00936-07
- [5] Lazar Adler NR, Govan B, Cullinane M, et al. The molecular and cellular basis of pathogenesis in melioidosis: how does *Burkholderia pseudomallei* cause disease[J]. FEMS Microbiol Rev, 2009, 33(06): 1079-1099. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2009.00189.x
- [6] Chuaygud T, Tungpradabkul S, Sirisinha S, et al. A role of *Burkholderia pseudomallei* flagella as a virulent factor [J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2008, 102 (Supplement 1): 140-144. DOI: 10.1016/S0035-9203(08)70031-2
- [7] Chieng S, Carreto L, Nathan S. *Burkholderia pseudomallei* transcriptional adaptation in macrophages[J]. BMC Genomics, 2012, 13: 328. DOI: 10.1186/1471-2164-13-328
- [8] Kespichayawattana W, Rattanachetkul S, Wanun T, et al. *Burkholderia pseudomallei* induces cell fusion and actin-associated membrane protrusion: a possible mechanism for cell-to-cell spreading[J]. Infect Immun, 2000, 68 (9): 5377-5384. DOI: 10.1128/IAI.68.9.5377-5384.2000

收稿日期:2012-09-18;修回日期:2012-12-29