文章编号:1000-5404(2007)20-1933-03

论著

肠出血性大肠埃希菌O157:H7黏附HeLa细胞模型的建立

余 抒[1*],顾 江[1*],曾 浩[1],杨 琴[1],刘艳青[1],张卫军[1],罗 萍[1],王庆旭[2],毛旭虎[1] ([1]第三军医大学医学检验系临床微生物及免疫学教研室,重庆 400038,[2]成都军区总医院检验科,成都 610000)

提 要:目的 建立肠出血性大肠埃希菌O157:H7体外黏附HeLa细胞模型,为进一步研究其致病机制奠定基础。**方法** 以细菌黏附HeLa细胞数量为指标,分别评价细菌数量、细菌与细胞孵育时间对细菌黏附数量的影响,得到最佳条件,最后肌动蛋白荧光染色(FAS)试验鉴定模型。**结果** 加入细菌为1×10^5 CFU,细菌与细胞孵育4 h时,黏附细胞的数量最佳,FAS检测发现该条件下细菌能够引起细胞特异性黏附、擦拭(attaching & effacing, A/E)损伤,模型建立成功。**结论** 成功建立O157:H7体外黏附HeLa细胞模型,为进一步研究其致病机制提供了条件。

关键词:肠出血性大肠埃希菌O157:H7;细胞模型;HeLa细胞

中图法分类号:R-33;R378.21;R446.5 **文献标识码**:A

Establishment of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 attached HeLa cell model

YU Shu[1], GU Jiang[1], ZENG Hao[1], YANG Qin[1], LIU Yan-qing[1], ZHANG Wei-jun[1], LUO Ping[1], WANG Qing-xu[2], MAO Xu-hu[1] ([1]Department of Clinical Microbiology and Immunology, College of Medical Laboratory Science, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Laboratory Medicine, The General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu 610000, China)

Abstract: Objective To establish Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 attached HeLa cell model for further study on its pathogenic mechanism. Methods HeLa cells and *Escherichia coli* O157:H7 were incubated together in different condition (amount of bacteria, incubation time). In regard to the amount of bacteria attached, we decided the best condition for O157:H7 to infect HeLa cells and identified the characterized A/E (attaching and effacing) lesion by FAS (fluorescence actin staining). Results The best condition is that 1×10^5 CFU O157:H7 and HeLa cells were incubated together for 4 h, under which the specific A/E lesion can be observed. Conclusion EHEC O157:H7 attached HeLa cell model has been successfully established.

Key words: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7; cell model; HeLa cell

肠出血性大肠埃希菌(enterohemorrhagic *Escherichia coli*,EHEC)O157:H7是一种重要的传染病病原菌。自1982年被确认为致病菌以来,世界各地包括中国都有不同规模的暴发流行。EHEC O157:H7感染可致腹泻、出血性结肠炎(hemorrhagic colitis,HC),还可引发溶血性尿毒综合征(hemolytic uremic syndrome,HUS)及血栓性血小板减少紫癜(thrombotic thrombocytopenia purpura,TTP)等严重并发症,严重者可导致死亡[1,2]。肠出血性大肠埃希菌进入肠道后,黏附肠上皮细胞,并引起以细胞微绒毛脱落、肌动蛋白聚集、细胞骨架蛋白重排为特征,形态学表现为感染细胞"叶枕"形成的特征性病理变化-黏附、擦拭A/E(attaching & effacing)损伤[3]。肌动蛋白荧光染色(FAS, fluorescence actin staining)是对A/E损伤进行鉴定的常规方法[4]。

本研究以常用HeLa细胞为模型,分别评价细菌数量、细菌与细胞孵育时间对细菌黏附数量的影响,最

基金项目:国家自然科学基金(30670107),国家高技术发展研究计划"863"项目(2006AA02Z405)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30670107) and the National "863" High-Tech Development Plan of China (2006AA02Z405)

作者简介:余 抒(1981-),女,重庆市人,硕士研究生,主要从事病原菌与宿主间相互作用和单克隆抗体的研究。电话:(023)68752315
*:同等贡献者
通讯作者:毛旭虎,电话:(023)68752315,E-mail: mxh95xy@tmmu.com.cn

收稿日期:2007-01-25;修回日期:2007-05-09

后通过 FAS 检测 HeLa 细胞 A/E 损伤的形成，成功构建 O157: H7黏附 HeLa 细胞模型，为进一步研究其黏附损伤机制奠定了基础。

本研究以常用 HeLa 细胞为模型，分别评价细菌数量、细菌与细胞孵育时间对细菌黏附数量的影响，最后通过 FAS 检测 HeLa 细胞 A/E 损伤的形成，成功构建 O157: H7黏附 HeLa 细胞模型，为进一步研究其黏附损伤机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、细胞株、试剂

HeLa 细胞，O157: H7 EDL933 菌株，DMEM 培养基，RPMI 1640 培养液等。

1.2 O157 与 HeLa 细胞的黏附

加 DMEM 培养基中生长的细菌（吸光度值为 0.2～0.8）一定量于贴壁生长的 HeLa 细胞中，DH5α 为阴性对照，共同孵育特定时间后，灭菌 PBS 洗掉未黏附细菌。一份甲醇固定后姬姆萨染色，倒置显微镜观察细菌黏附情况。另一份经 0.25% 胰酶消化液完全消化后，离心后计数重悬液中细菌数目。

1.3 黏附细胞肌动蛋白荧光染色

贴壁生长 HeLa 细胞与 O157: H7、DH5α（阴性对照），37 ℃，孵育一定时间后，PBS 清洗未黏附细菌，4% 的多聚甲醛（pH 7.2～7.6）室温固定，0.2% Triton X-100/PBS 通透处理，1% BSA/PBS 室温封闭后加兔抗 EspA（大肠杆菌分泌蛋白 A，用于菌体染色）多克隆血清（1∶2 000），4 ℃过夜；加羊抗兔 IgG-FITC（1∶200），37 ℃孵育 1 h；加鼠抗 β-actin 抗体（1∶100），37 ℃孵育 1 h；加羊抗小鼠 IgG-TRITC（1∶200）37 ℃孵育1 h；PBS 洗涤后自然干燥，40% 甘油封片，染色结果用共聚焦荧光显微镜观察。

1.4 统计学方法

通过 t 检验分析试验组 O157 和对照组 DH5α 与细胞黏附时的细菌黏附量，确定试验组与细胞黏附的能力，进而，通过黏附细菌数量与孵育时间关系的分析，得出试验组黏附的最佳时段，从而优化 O157 与 HeLa 细胞黏附模型。

2 结果

2.1 不同加入细菌量对细胞模型建立的影响

加入不同细菌数量的 O157 和 DH5α 的菌株情况下测得黏附细胞细菌数量如表 1 所示。每 O157 试验组与 DH5α 对照组统计分析，二者差异非常显著（$P<0.01$）。

表 1 加入不同数量细菌后细胞黏附细菌的数量（$\times 10^6$）

组别	加入细菌数量（$\times 10^5$CFU）					
	0.1	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4
O157	3.22 ±0.57[a]	5.79 ±0.43[a]	7.65 ±0.37[a]	9.04 ±0.69[a]	9.15 ±0.75[a]	9.28 ±0.85[a]
DH5α	0.33 ±0.27	0.82 ±0.48	1.2 ±0.57	1.63 ±0.49	1.76 ±0.55	1.81 ±0.45

a：$P<0.01$，和 DH5α 组比较

2.2 黏附细菌数量与孵育时间的关系

选定加入菌量为 1×10^5CFU 后，改变细菌与细胞孵育时间，得到的黏附细菌数量与孵育时间的关系。如表 2 所示，每 O157 试验组与 DH5α 对照组统计分析，两者差异非常显著（$P<0.01$）。并且，孵育时间在 4 h 后与 4 h 比较无显著差异（$P>0.05$）。

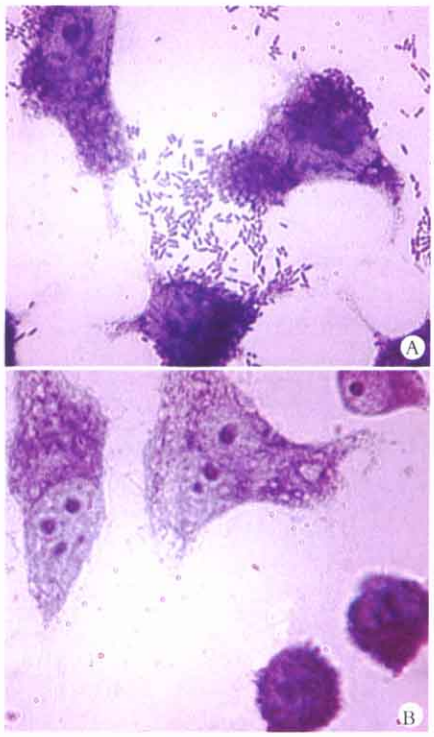
表 2 不同孵育时间对黏附细菌数量的影响（$\times 10^6$）

组别	孵育时间（h）					
	2	4	5	6	7	8
O157	7.65 ±0.47[a]	9.04 ±0.57[a]	9.15 ±0.77[a]	9.28 ±0.85[a]	10.33 ±0.96[a]	11.40 ±0.85[a]
DH5α	1.20 ±0.61	1.63 ±0.74	1.76 ±0.75	1.81 ±0.88	2.11 ±0.73	2.23 ±0.96

a：$P<0.01$，和 DH5α 组比较

2.3 细菌与细胞紧密黏附

贴壁生长细胞与细菌黏附后，经姬姆萨染色后观察如图 1 所示。大量细菌紧密黏附于 HeLa 细胞表面，而 DH5α 阴性对照则无明显的细菌黏附。

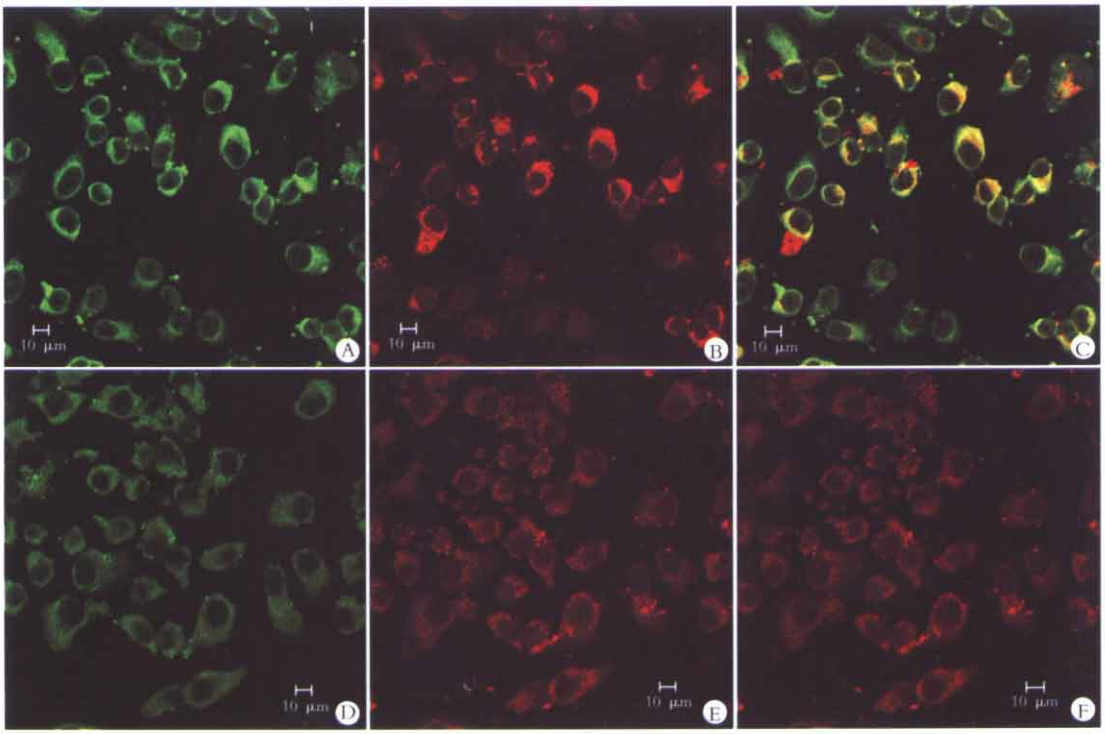


A：O157 与 HeLa 细胞紧密黏附；B：DH5α 与 HeLa 细胞黏附的阴性对照

图 1 倒置显微镜观察细菌与 HeLa 细胞紧密黏附情况
（姬姆萨染色 ×100）

2.4 HeLa 细胞肌动蛋白荧光染色（FAS）结果

如图 2 所示，O157 细菌被染成绿色（图 2A），肌动蛋白被染成红色（图 2B），融合后黄光处为肌动蛋白聚集部位（图 2C）。阴性对照却未见红色荧光和融合后的黄光出现（图 2D、E、F）。



A：O157 与 HeLa 细胞黏附；B：单染 HeLa 细胞肌动蛋白；C：A、B 整合图；D：未加 O157 的阴性对照；E：肌动蛋白未聚集的阴性对照；F：D、E 整合图

图 2　HeLa 细胞 FAS 试验结果

3　讨论

肠出血性大肠埃希菌 O157: H7是近年来新发现的人畜共患病病原菌，它在肠道上皮细胞定植后，引起特异性黏附和擦拭（A/E）损伤，破坏肠道组织，诱发肠组织炎症，引起腹泻、出血性肠炎等疾病，同时它还产生致贺毒素，引起 HUS 甚至死亡等严重的并发症。

EHEC O157: H7引起宿主肠上皮细胞形成以肠上皮细胞微绒毛破坏、肌动蛋白聚集、细菌黏附为特征，形态学表现为感染细胞“底座”形成的特征性变化 - A/E（attaching & effacing）损伤。引起 A/E 损伤的致病分子主要位于细菌致病岛 LEE（locus of effacing）上[5]。LEE 编码细菌Ⅲ型分泌系统和相关分泌蛋白如 Tir（translocated intimin receptor）、*Map*、*Esp*F、*EspG*、*Esp*H 和 *Sep*Z 等[6]。这些效应分子及其他非 LEE 编码的致病分子如 TCCP（Tir couple cytoskeleton protein）通过Ⅲ型分泌系统转导进入宿主细胞，通过与宿主细胞内信号分子相互作用，最终引起 A/E 损伤的形成[7]。

HeLa 细胞来源于黑人妇女的宫颈癌细胞，具有贴壁生长，培养简单，生长快速等优点，是研究大肠埃希菌黏附定植的理想选择。因此通过构建 HeLa 细胞黏附模型探讨 O157 感染黏附定植机制，无疑具有重要意义。

通过试验显示，在加入细菌量为 1×10^5 CFU，孵育时间为 4 h 时，细菌紧密黏附细胞数量最合适，且与阴性对照差异非常显著（$P < 0.01$），姬姆萨染色观察到 O157 细菌与 HeLa 细胞的黏附，而未见有 DH5α 与细胞的黏附也证实了这一点，最后 FAS 试验观察到细菌黏附部位肌动蛋白的聚集，有 A/E 损伤的形成。这些结果说明 O157 能够黏附 HeLa 细胞，并引起 HeLa 细胞类似肠上皮样细胞改变，能够模拟天然 O157 感染细胞过程，成功建立了 EHEC O157: H7细胞黏附模型。此模型将应用于下一步 O157 引起宿主细胞特异 A/E 损伤的机制研究。

参考文献：

[1] 李洪卫，景怀琦，逄　波，等. 徐州市 2000 年肠出血性大肠埃希菌 O157: H7感染性腹泻的调查[J]. 中华流行病学杂志，2002，23（2）：119 - 122.

[2] Bell B P, Goldoft M, Griffin P M, *et al*. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157: H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience[J]. JAMA, 1994 272(17): 1349 - 1353.

[3] Frankel G, Phillips A D, Rosenshine I, *et al*. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements[J]. Mol Microbiol, 1998, 30(5): 911 - 921.

[4] Knutton S, Baldwin T, Williams P H, *et al*. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*[J]. Infect Immun, 1989, 57(4): 1290 - 1298.

[5] McDaniel T K, Jarvis K G, Donnenberg M S, *et al*. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995 92(5): 1664 - 1668.

[6] Caron E, Crepin V F, Simpson N, *et al*. Subversion of actin dynamics by EPEC and EHEC[J]. Curr Opin Microbiol, 2006, 9(1): 40 - 45.

[7] Garmendia J, Carlier M F, Egile C, *et al*. Characterization of TccP-mediated N-WASP activation during enterohaemorrhagic *Escherichia coli infection*[J]. Cell Microbiol, 2006, 8(9): 1444 - 1455.

（编辑　薛国文）