论著

文章编号:1000-5404(2013)19-2010-04

类鼻疽伯克霍尔德氏菌感染A549细胞模型的建立

毛 婵[1,3,4*],李 倩[1*],方 瑶[1],潘 静[2],顾 江[1],唐 彬[1],李 娜[1],张卫军[1] (400038 重庆,第三军医大学:医学检验系临床微生物学与免疫学教研室[1],医学检验系临床血液学教研室[2],西南医院药剂科[3];400030 重庆,重庆医药高等专科学校[4])

[摘要] **目的** 建立类鼻疽伯克霍尔德氏菌感染人肺癌上皮细胞A549的细胞模型。**方法** 优化类鼻疽伯克霍尔德杆菌感染A549细胞的感染条件(如MOI、感染时间),通过活细胞工作站动态观察、Giemsa染色、激光共聚焦、透射电镜确证胞内感染和宿主细胞的形态变化,通过炎症因子IL-8和TNF-α的检测,分析病原菌入胞率和宿主反应性,评价该模型中病原菌侵入A549导致多核巨细胞(multinuclear giant cell,MNGC)形成的特点和病理损伤规律。**结果** 透射电镜结果显示类鼻疽伯克霍尔德氏菌侵入到胞内的时间最早是4 h。通过Giemsa染色形态观察,类鼻疽伯克霍尔德氏菌感染后最早8 h可观察到典型MNGC的形成。随着感染时间的延长,MNGC形成率和炎症因子IL-8逐渐升高,而TNF-α在此模型中变化不明显。**结论** 成功构建类鼻疽伯克霍尔德氏菌感染A549细胞模型。

[关键词] 类鼻疽伯克霍尔德氏菌;人肺癌上皮细胞;细胞模型
[中图法分类号] R-332; R378.99; R734.2 [文献标志码] A

Establishment of a *Burkholderia pseudomallei* invaded A549 cell model

Mao Chan[1,3,4], Li Qian[1], Fang Yao[1], Pan Jing[2], Gu Jiang[1], Tang Bin[1], Li Na[1], Zhang Weijun[1] ([1]Department of Clinical Microbiology and Immunity, College of Pharmacy, [2]Department of Clinical Hematology, Faculty of Laboratory Medicine, [3]Department of Pharmacy, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [4]Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing, 400030, China)

[**Abstract**] Objective To establish an infection model of A549 cells by *Burkholderia pseudomallei in vitro* to study its pathogenesis. Methods The purpose of this study was to optimize the methods in infection of A549 cells by *Burkholderia pseudomallei*, such as multiplicity of infection (MOI) and incubation time. The number of intracellular bacteria and the formation of multinuclear giant cells (MNGCs) were visualized by Giemsa staining, live-cell digital video gallery, immunofluorescence assay and transmission electron microscopy. Furthermore, the expression of inflammatory cytokines, interleukin (IL)-8 and tumor necrosis factor (TNF)-α were detected. Results Monolayers of A549 cells were co-incubated with *Burkholderia pseudomallei* (MOI = 100∶1) and centrifugated for 5 min at 170 × *g*. At 1 hour of post-infection, the extracellular bacteria were killed by the addition of 250 μg/mL kanamycin. Intracellular bacteria of A549 cells after infection with *Burkholderia pseudomallei* were observed as early as 4 h post-infection. MNGCs were observed in the 8 after infection, and *Burkholderia pseudomallei* induced release of IL-8 from A549 cells in a dose- and time-dependent fashion, whereas TNF-α was not detected. Conclusion A burkholderia pseudomallei invaded A549 cell model is successfully established.

[**Key words**] *Burkholderia pseudomallei*; A549 cells; cell model

Supported by the Major Project of "Twelfth Five-year Plan" of Medical Research of PLA (AWS11J011-04) and the Major Military Pre-research Foundation of Third Military Medical University (2012XJY03). Mao Chan and Li Qian are the first authors who contributed equally to this work. Corresponding author: Li Qian, Tel: 86-23-68752315, E-mail: liqianjane@163.com

类鼻疽(Melioidosis)是由类鼻疽伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia pseudomallei*,简称类鼻疽杆菌)所引起的一种新发传染病[1]。该疾病主要集中在东南亚和澳大利亚北部等地区,而我国的海南、广州、香港以及台湾也是重要的流行区[2]。类鼻疽杆菌主要经呼吸道、消化道、血液或者直接接触的途径感染,几乎可以侵入机体的任何器官。其中超过50%的类鼻疽患者以肺炎的临床表现出现,严重者可伴发败血症,再者吸入性感染作为最易传播的感染方式,使类鼻疽肺部感染机

[基金项目] 全军医学科研"十二五"重大项目(AWS11J011-04);第三军医大学重大军事预研基金(2012XJY03)
* 同等贡献者
[通信作者] 李 倩,电话:(023)68752315,E-mail:liqianjane@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130726.1057.006.html(2013-07-26)

制的研究显得尤为重要[3-4]。目前国内关于类鼻疽杆菌的基础研究鲜有报道,至今尚未建立类鼻疽杆菌感染人肺上皮细胞的研究模型。本研究以人肺癌上皮细胞A549为模型,以本室分离、保种及全基因组测序的类鼻疽杆菌BPC006(GenBank:CP003781& CP003782)为病原菌代表,分别评价细菌数量、细菌与细胞孵育时间对细菌侵入细胞数量的影响,通过形态学和病理生化指标评价感染后A549细胞病理损伤的特点,以此评价感染模型的稳定性,旨在为进一步研究其致病机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、细胞株、试剂及仪器

类鼻疽伯克霍尔德氏菌菌株BPC006(GenBank:CP003781&CP003782)和人肺癌上皮细胞A549均由本室保存;DMEM细胞培养基和胎牛血清均购自HyClone公司;人IL-8和TNF-α ELISA预包被试剂盒购自达科为公司;兔抗类鼻疽伯克霍尔德氏菌多克隆抗体由本室方瑶硕士制备;山羊抗兔FITC购自碧云天公司。透射电镜(Philips TECNAI 10)、活细胞工作站(OLYMPUS IX81-ZDC)、激光共聚焦显微镜(Leica TCS SP5)均由本校仪器分析测试中心提供。

1.2 方法

1.2.1 细菌侵袭实验(细菌入胞率的分析) A549用10% FBS-DMEM培养基重悬,以5×10^5个/孔接种于12孔板中,37 ℃、5% CO_2孵箱中培养过夜。感染当天更换新鲜培养基,细菌以不同感染复数(multiplicity of infection,MOI)比例感染细胞,170×*g*离心5 min。共孵1 h后,用37 ℃预热的无菌PBS洗2次,加入含250 μg/mL卡那霉素的10% FBS-DMEM,杀灭胞外细菌。收集感染4 h后的细胞,用0.2% Triton X-100裂解后倍比稀释涂板计数。计算方法为:摄取率=(细胞裂解出的细菌数/感染初始细菌数)×100%。

1.2.2 Giemsa染色[多核巨细胞(multinuclear giant cell,MNGC)形成率的分析] 细菌以MOI=100:1感染接种于盖玻片上的A549单层细胞,取感染后不同时相的细胞爬片,用无菌PBS洗涤3次,无水甲醇固定10 min,自然干燥后Giemsa染色。为了评价MNGC的形成规律,每张细胞爬片观察30个视野。将细胞核>2的定义为1个MNGC。MNGC形成率的计算方法为:MNGC=(多核巨细胞中的核数/总的核数)×100%。

1.2.3 空斑形成实验 细菌以MOI=100:1或1 000:1感染A549细胞24 h后,用无菌PBS洗涤3次,Giemsa染色后观察。

1.2.4 动态观察细胞融合状态 通过活细胞工作站动态实时观察,可以快速确定细菌感染后A549细胞形态学变化的规律,为后续实验摸索条件。

1.2.5 免疫荧光分析 将细胞爬片用2.5%多聚甲醛固定30 min,0.1% Triton X-100透膜5 min,1:200稀释的兔抗类鼻疽杆菌多克隆抗体孵育1 h,1:500稀释的山羊抗兔FITC二抗避光孵育1 h,1:1 000稀释的DAPI避光孵育10 min。最后用抗荧光淬灭剂封片后,4 ℃湿盒内避光保存,待激光共聚焦显微镜观察。

1.2.6 透射电镜观察细菌的入胞情况 从形态学上观察病原菌入侵宿主细胞内的情况。将收集的细胞以1 000 r/min离心10 min后,在4 ℃的条件下,用2.5%戊二醛固定样品,送至本校电镜室。

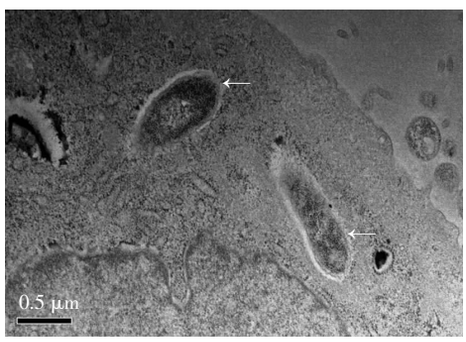
1.2.7 IL-8和TNF-α的检测 检测不同感染时相下细胞培养上清中IL-8和TNF-α的含量,评价感染后A549细胞的炎症反应,按试剂盒说明书进行。

1.2.8 统计学处理 所有实验重复3次以上,数据采用SPSS 13.0统计软件进行*t*检验,Adobe Illustrator CS3和GraphPad Prism 5软件作图,从而得到此感染模型的最佳条件。

2 结果

2.1 细菌入胞率的分析结果

类鼻疽杆菌BPC006以不同的MOI感染A549细胞,观察感染4 h后的细菌入胞率,结果显示,细菌在MOI为100:1和1 000:1时,细菌的入胞率较高[分别为(4.48±1.13)%、(4.56±0.50)%],两者无明显的差异($P>0.05$),而在MOI为1:1和10:1时入胞率较低[分别为(0.43±0.31)%、(0.91±0.44)%]。图1显示了类鼻疽杆菌感染A549细胞(MOI=100:1)4 h后的入胞情况。

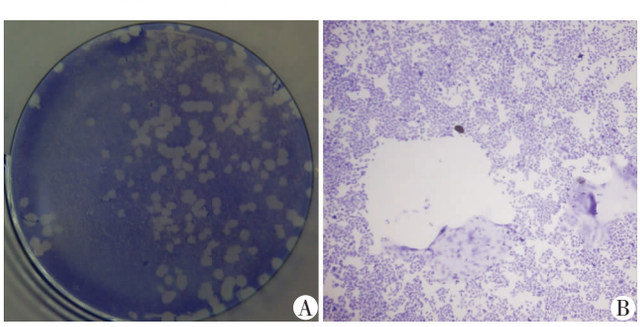


↑:类鼻疽杆菌

图1 类鼻疽杆菌感染A549细胞4 h后的入胞情况 (TEM)

2.2 空斑形成实验

为了评价入胞后的细菌在胞间的传播能力,观察以MOI为100:1和1 000:1分别感染细胞24 h后空斑形成情况。与未感染组相比,类鼻疽杆菌可以导致明显的空斑(直径约1 mm)。显微镜下将空斑放大观察,可见融合后的细胞大片坏死、脱落。MOI为1 000:1时,空斑数量较多,细胞脱落明显,导致细胞量损失较多,不利于后续对感染后细胞作进一步的功能分析。因此,在此细胞模型中我们采用了MOI为100:1的比例。见图2。



A:MOI=100:1的空斑形成;B:A图空斑的局部放大(Giemsa ×40)

图2 类鼻疽杆菌感染A549细胞后空斑形成情况

2.3 活细胞工作站动态观察细胞融合状态

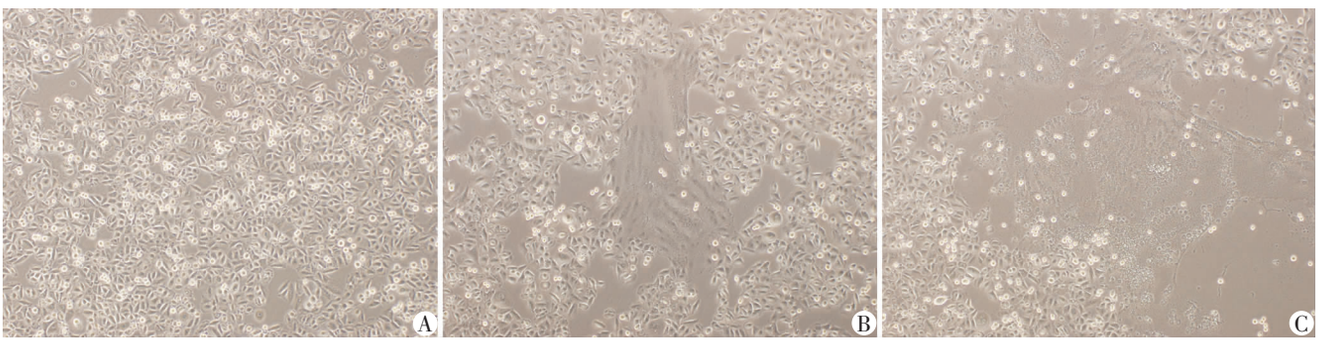
实时动态观察细胞融合的形成规律(图3),在感染后16 h可观察到典型的MNGC,虽然在早期感染(<8 h)也可见MNGC,但是融合的细胞数量较少,MNGC中的细胞核多在10个以下,而16 h以后所形成的MNGC,其核数可达到10^3个。

2.4 MNGC形成率的分析结果

由图4可见,类鼻疽杆菌所导致的MNGC在感染后16 h增加明显,并且形态改变明显,与活细胞动态观察结果一致。另外,值得注意的是,在MNGC内存在大量的类鼻疽杆菌,而该菌在非融合细胞或较小的MNGC内数量较少,这在激光共聚焦结果中得到证实(图5)。

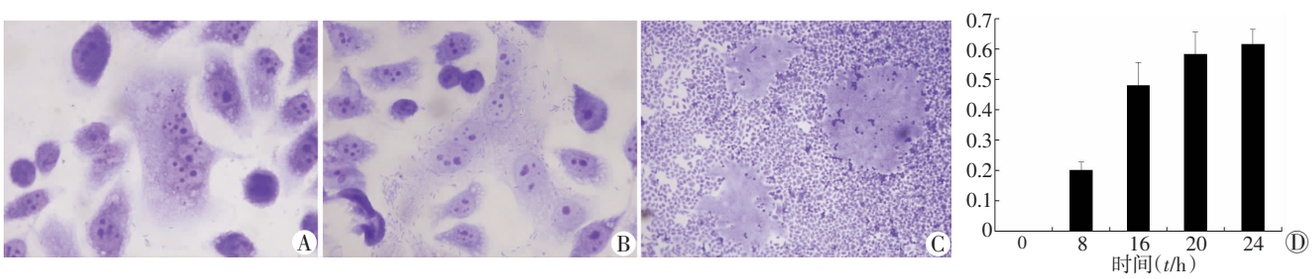
2.5 炎症因子IL-8和TNF-α的检测结果

与阴性对照组相比,在MOI为100∶1和1 000∶1的条件下,炎症因子IL-8随着感染时间的延长逐渐分泌增加,即在感染初期上升较慢,而在感染中后期(8~24 h)快速上升。而炎症因子TNF-α在此细胞模型中改变不明显。见表1。



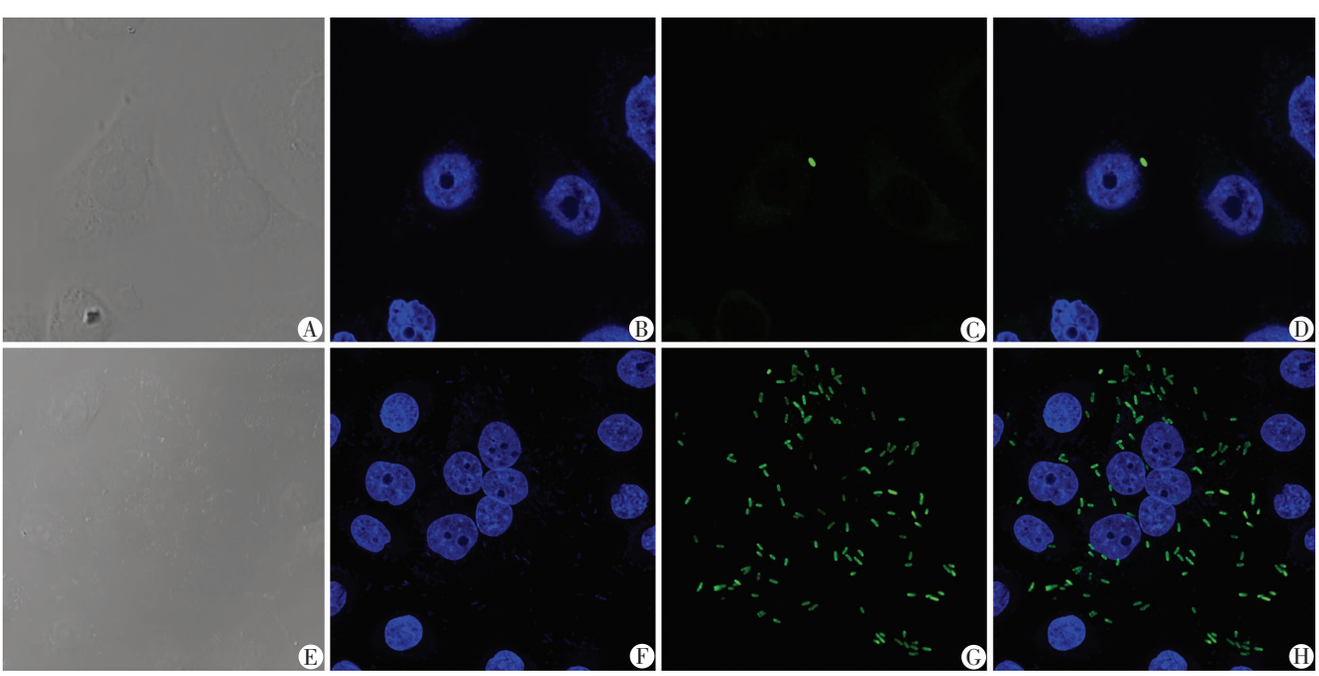
A:感染后8 h;B:感染后16 h;C:感染后24 h

图3 动态观察不同感染时相下细胞融合情况 (倒置显微镜 ×200)



A:感染后8 h(Giemsa ×1 000);B:感染后16 h(Giemsa ×1 000);C:感染后24 h(Giemsa ×40);D:MNGC形成率的定量分析结果

图4 不同感染时相下MNGC的形成率



A、E:白光图;B、F:DAPI通道;C、G:单染类鼻疽杆菌通道;D:B、C整合图;H:F、G整合图;A~D:感染后2 h;E~H:感染后16 h

图5 激光共聚焦显微镜观察感染A549细胞2、16 h类鼻疽杆菌在细胞内的存活情况

表1 不同感染时相和感染条件下培养上清中细胞因子IL-8和TNF-α的检测结果(pg/mL,$\bar{x} \pm s$)

感染条件	IL-8			TNF-α		
	8 h	12 h	24 h	8 h	12 h	24 h
阴性对照	15.19±4.08	27.65±8.16	57.61±6.13	6.04±1.28	7.65±3.05	11.94±3.18
MOI=100∶1	106.00±11.37[a]	139.24±16.78[a]	768.94±42.20[a]	7.12±2.02	9.38±1.81	14.06±1.88
MOI=1 000∶1	280.81±30.94[a]	348.39±12.04[a]	907.85±24.90[a]	13.23±2.42	10.05±2.66	13.76±2.97

a: $P<0.05$,与阴性对照比较

3 讨论

类鼻疽被认为是一种正在扩散的人兽共患病。我国海南、广西、福建及南海周边国家是类鼻疽感染的重灾区,由于类鼻疽杆菌主要存在于水或土壤中,雨季或强风季节会大大增加水源污染或吸入性感染的概率。加上类鼻疽的临床表现不典型、病原菌耐药性强,一般常规抗生素治疗不能杀灭病原菌,是经典的生物战剂。类鼻疽急性感染者多以肺炎出现,致死率高,然而类鼻疽的感染机制至今仍未阐明。本研究以类鼻疽肺部感染的研究为切入点,从基本的细胞模型构建开始,旨在为今后类鼻疽感染机制的研究工作奠定基础。

A549细胞具有贴壁生长、培养简单、生长快速等优点,是研究类鼻疽杆菌肺部感染的理想选择。因此通过建立稳定的类鼻疽杆菌感染A549细胞模型探讨类鼻疽杆菌肺部感染机制具有重要意义。

通过实验摸索,我们发现以较大的MOI比例感染A549细胞时细菌侵入宿主细胞的概率较大,一方面原因,可能是A549细胞不是吞噬细胞,对细菌的摄入率不如巨噬细胞J774A.1[5]和RAW264.7[6]明显;另一方面,细菌数量本身较少时,在共孵育的1 h内与宿主细胞的相互作用概率较低。目前细菌侵入细胞的方式还不清楚。在实验中,我们发现以MOI=1 000∶1感染细胞12 h后,细胞状态不佳,死亡细胞较多,同时空斑形成实验也显示细胞大片死亡、脱落,考虑后续长时间感染的情况需求,最终选取MOI=100∶1为最佳比例。

多核巨细胞作为类鼻疽杆菌诱导宿主细胞融合后形成的典型形态学特征,与类鼻疽杆菌的致病性密切相关[7-8],常常被用于细胞模型建立中的评价指标[9]。通过活细胞工作站实时动态观察,我们初步了解到随着感染时间的延长,类鼻疽杆菌使细胞融合逐渐增多,在感染后24 h尤其明显,可形成成百上千个核的MNGC,肉眼可见。从我们的模型中可以看到,感染初期细菌在胞内增殖并不明显,这一时间段很可能是细菌逃避免疫的过程。进一步Giemsa染色后观察,感染初期MNGC形成率不高、形态较小,提示细菌在胞内增殖、胞间传播并不明显,这一时间段很可能是细菌主动逃避宿主细胞免疫清除的过程,而"自噬"在其中的作用已见报道[10]。我们发现MNGC的形成随着感染时间的延长逐渐增加,在感染16 h后细胞呈片状融合、形态典型。从IL-8的检测中也能看到这一规律,而TNF-α在此细胞模型中变化不明显,原因可能是TNF-α主要是由免疫细胞所分泌,而A549细胞自身分泌较低,不能作为其病理损伤的生化评价指标。值得注意的是,在融合的细胞中存在大量的类鼻疽杆菌,尤其以周边较为明显。通过激光共聚焦显示,我们确认细菌在非融合或者较小的MNGC内较少,而在大片融合的MNGC中大量存在,这一现象是否与类鼻疽杆菌逃逸宿主的免疫清除以及强耐药性相关,有待进一步证明。

本研究表明,我们构建的类鼻疽杆菌感染A549细胞模型能较好地反映该细菌感染人肺上皮细胞的病理变化,为进一步研究类鼻疽杆菌与宿主细胞的相互作用提供了可靠的平台。

参考文献:

[1] Wiersinga W J, Currie B J, Peacock S J. Melioidosis[J]. N Engl J Med, 2012, 367(11): 1035-1044.
[2] Stewart T, Engelthaler D M, Blaney D D, *et al*. Epidemiology and investigation of melioidosis, Southern Arizona[J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(7): 1286-1288.
[3] Currie B J. Melioidosis: an important cause of pneumonia in residents of and travellers returned from endemic regions[J]. Eur Respir J, 2003, 22(3): 542-550.
[4] Galyov E E, Brett P J, DeShazer D. Molecular insights into *Burkholderia pseudomallei* and Burkholderia mallei pathogenesis[J]. Annu Rev Microbiol, 2010, 64: 495-517.
[5] 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.
[6] Burtnick M N, Brett P J, Harding S V, *et al*. The cluster 1 type VI secretion system is a major virulence determinant in *Burkholderia pseudomallei*[J]. Infect Immun, 2011, 79(4): 1512-1525.
[7] Suparak S, Kespichayawattana W, Haque A, *et al*. Multinucleated giant cell formation and apoptosis in infected host cells is mediated by *Burkholderia pseudomallei* type Ⅲ secretion protein BipB[J]. J Bacteriol, 2005, 187(18): 6556-6560.
[8] Wong K T, Puthucheary S D, Vadivelu J. The histopathology of human melioidosis[J]. Histopathology, 1995, 26(1): 51-55.
[9] Suparak S, Muangsombut V, Riyapa D, *et al*. *Burkholderia pseudomallei*-induced cell fusion in U937 macrophages can be inhibited by monoclonal antibodies against host cell surface molecules[J]. Microbes Infect, 2011, 13(12/13): 1006-1011.
[10] Cullinane M, Gong L, Li X, *et al*. Stimulation of autophagy suppresses the intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei* in mammalian cell lines[J]. Autophagy, 2008, 4(6): 744-753.

(收稿:2013-04-22;修回:2013-06-08)
(编辑 邓强庭)