论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201504009

类鼻疽伯克霍尔德氏菌感染 THP-1 细胞模型的评价及其感染机制的初步探讨

黎元莉[1*],方 瑶[2*],陈 海[2],毛旭虎[2] (572000 海南 三亚,海南省三亚市人民医院检验科[1];400038 重庆,第三军医大学医学检验系临床微生物学及免疫学教研室[2])

[摘要] **目的** 建立类鼻疽伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia pseudomallei*, B. pseudomallei, BP for short)感染人急性单核白血病细胞 THP-1 的细胞模型,探讨聚乙二醇 3350(PEG 3350)对细菌侵入细胞及胞内生存的影响,对比类鼻疽伯克霍尔德氏菌与其减毒株(也称为泰国株,即 Burkholderia thailandensis, *B. thailandensis*,BT for short)的感染特性。**方法** 通过绘制细菌生长曲线,探讨类鼻疽伯克霍尔德氏菌及其减毒株的增殖规律;通过透射电镜观察细菌胞内感染状态和宿主细胞的超微病理变化;分析不同时相的细菌入胞率和胞内生存状态,探讨细菌与宿主细胞的相互作用;通过检测受感染细胞培养液的上清和患者血清中的细胞因子,评价宿主细胞的反应性和 PEG 对于细菌侵入细胞及胞内生存的影响,以及对比细胞受类鼻疽伯克霍尔德氏菌及其减毒株感染后的炎症反应性,从而评价该模型的稳定性。**结果** 确定了 *B. pseudomallei* 和 *B. thailandensis* 的生长规律和感染时相特征及超微病理损伤特点。炎症因子测定中,两种细菌感染细胞后分泌的 TNF-α 出现感染中期的高峰,受 BP 感染的细胞的 IL-6 分泌则呈双峰改变,受 BT 感染的细胞 IL-6 的分泌和 PEG 对细胞分泌炎症因子的影响更为复杂。同时,患者血清中细胞因子的检测则没有显示出一定的规律,与其临床转归关系也不明确。**结论** 成功构建类鼻疽伯克霍尔德氏菌感染 THP-1 细胞的模型,初步探讨了类鼻疽伯克霍尔德氏菌感染宿主细胞的机制。

[关键词] 类鼻疽伯克霍尔德氏菌;类鼻疽伯克霍尔德氏菌减毒株;人急性单核白血病细胞;聚乙二醇
[中图法分类号] R378.99;R392.11;R515.902 [文献标志码] A

Evaluation of a *Burkholderia pseudomallei* invaded THP-1 cell model and primary investigation on mechanism of its infection to host cells

Li Yuanli[*1], Fang Yao[2*], Chen Hai[2], Mao Xuhu[2] ([1]Department of Clinical Laboratory, Sanya People's Hospital, Sanya, Hainan Province, 570100; [2]Department of Clinical Microbiology and Immunology, Faculty of Laboratory Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To establish a cell model of human acute mononuclear leukemia cells THP-1 are infected by *Burkholderia pseudomallei* (BP) and then determine the effect of polyethylene glycol 3350 (PEG3350) on bacteria-affected cells and intracellular survival. To compare the infection characteristics of BP and its attenuated strain, *Burkholderia thailandensis* (BT) to lay the foundation of the infection mechanism of the bacterium. **Methods** The growth curves of BP and BT were drawn to probe their proliferation rule. Transmission electron microscopy was used to observe the ultra-structure pathological changes of the number of intracellular bacteria and the infected host cells for the reaction of the bacteria and host cells. Plate counting was tested for bacterial colonies at different hours after invasion to analyze the intracellular growth of bacteria. The cytokines in the supernatant of the infected cells and patients' serum samples were detected to evaluate the reactivity of host cells and the effect of PEG3350 on the bacteria-affected cells and intracellular survival. The inflammatory responses of infected cells to BP and BT strains were contrasted and analyzed. Thereby the stability of this model was evaluated. **Results** The growth curves, phase-infected characteristics, ultra-structure

[基金项目] 海南省重点科技计划项目资助(ZDXM2014143);三亚市病原微生物学重点实验室(L1216)
* 同等贡献者
[通信作者] 毛旭虎,E-mail: mxh95xy@tom.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151118.1451.013.html(2015-11-18)

pathological impairments of BP and BT strains were revealed in this study. During the detection of cytokines, TNF-α contents in the supernatant of the cells infected by 2 strains of bacteria reached the peak in the infected metaphase, the exudation of IL-6 contents in the supernatant infected by BP presented 2 peaks, while, the exudation of IL-6 contents of the cells infected by BT and the effect of cytokines by PEG3350 were more complex. In addition, no definite rule was found in the detection of cytokines in patients' serum. There was no obvious relationship of the cytokines with clinical outcomes. **Conclusion** The model of BP-infected THP-1 cells is constructed successfully in this study. The mechanism of BP infecting the host cells is obtained primarily, which founding a precondition for the interaction between this pathogenic bacteria and host cells in the further study.

[**Key words**] *Burkholderia pseudomallei*; *Burkholderia thailandensis*; THP-1 cells; polyethylene glycol

Supported by the Project of Key Science and Technology Plan of Hainan Province (ZDXM2014143) and the Project of Key Laboratory of Pathogenic Biology (L1216). Li Yuanli and Fang Yao are co-first authors who contributed equally to this article. Corresponding author: Mao Xuhu, E-mail: mxh95xy@tom.com, Liyuanli and Fangyao contributed equally.

类鼻疽(Melioidosis)是一种由类鼻疽伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia pseudomallei*, *B. pseudomallei*, BP)引起的一种热带疾病,发病率及病死率高,病程长,易复发[1-3]。类鼻疽伯克霍尔德氏菌是兼性胞内菌,它侵入人体后虽然可以引起人免疫细胞的一系列反应,但却能通过一系列的逃逸机制阻止内吞体与溶酶体的融合,逃避免疫细胞对它的清除作用,从而存活增殖并引起人体的一系列炎症性疾病。这一机制是如何产生的?细菌和宿主免疫细胞的相互作用的机制如何?目前还鲜有报道。要研究这一机制,建立类鼻疽伯克霍尔德氏菌感染细胞的模型是必要的前提。Burkholderia thailandensis (*B. thailandensis*,BT)是一种对人和动物都不致病的类鼻疽伯克霍尔德氏菌,由于它和BP无论菌落特征还是表型都很相似,所以生物学研究上常把BT作为BP研究的对照菌株。THP-1是人急性单核细胞,聚乙二醇(PEG)分子能改变细胞的生物膜结构,使两细胞发生疏散和重组,从而使细胞发生融合,进而对细菌胞内生存产生影响,因此本实验拟用PEG对细胞进行预处理以诱导细胞融合后再用细菌感染,观察PEG诱导细胞融合后是否提高细菌的入胞率及这种情况下细胞培养上清的细胞因子有何变化。故本研究拟以人急性单核白血病细胞THP-1为模型,以本室保存并已进行全基因组测序的菌株BPC006(GenBank:CP003781&CP003782)为病原菌代表,用购买的无毒株BT为对照菌株,评价细菌与细胞孵育时间对细菌侵入细胞数量的影响,另外还评价了用PEG与THP-1共同孵育5 min后对侵入细胞的细菌数量的影响。同时通过电镜从形态学上评价细菌侵入细胞的病理损伤变化,并检测人血清及感染后THP-1细胞分泌的各种细胞因子的变化,来评价感染模型的稳定性。

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株BPC006(GenBank:CP003781&CP003782)和人急性单核白血病细胞THP-1均由本室保存。类鼻疽伯克霍尔德氏菌无毒株菌株BT编号为E264购自ATCC;PEG型号为3640,相对分子质量3 350,购自美国Sigma公司;酵母提取物、胰蛋白胨购自美国Sigma公司,NaCl(国产分析纯)购自国药集团化学试剂有限公司,琼脂购自Promega公司;BILON-COS-211C恒温摇床购自购自上海比朗仪器有限公司;Thermo Forma 3111型细胞培养箱购自美国Forma公司;紫外分光光度计8453购自Agilent;1640细胞培养基和胎牛血清均购自Hyclone公司;人IL-1β、IL-6和TNF-α ELISA预包被试剂盒购自深圳达科为公司;透射电镜(Philips TECNAI 10)由第三军医大学分析中心提供。

1.2 方法

1.2.1 比较*B. pseudomallei*和*B. thailandensis*的生长规律 BP和BT通过三线法划线接种于固体LB培养基中,37 ℃培养,48 h后分别挑单个菌落转种于加有5 mL液体LB的摇瓶中置于温控摇床中,37 ℃,200 rpm扩大培养,4 h后分别取100 μL加入10 mL液体LB里,37 ℃,200 rpm扩大培养。分别收集4 h、6 h、8 h、10 h、12 h和14 h的菌液100 μL加入900 μL无菌生理盐水重悬,并用无菌生理盐水倍比稀释,分别取100 μL菌液涂板,培养48 h后计数并比较BP和BT的生长规律,定量细菌浓度,确定感染细胞的细菌浓度。

1.2.2 比较*B. pseudomallei*和*B. thailandensis*的胞内生存情况 取培养好的THP-1加入15 mL离心管,800 rpm离心10 min后轻柔弃上清,再用1640培养基重悬,以每孔细胞浓度为1×10^6个,2 mL/孔接种于6孔板中,每孔加入10 μL浓度为1×10^{10}/mL的菌液感染细胞。37 ℃、5% CO_2孵箱中共孵2 h,后取出以800 rpm离心10 min,轻柔弃去上清,37 ℃预热的无菌PBS洗两次,加入含250 μg/mL卡那霉素的1640培养基重悬以杀灭胞外细菌,后按2 mL/孔加入6孔板中

共孵2 h,共孵后取出轻轻吹打板壁以免细胞粘壁,加入EP管中800 rpm离心10 min,上清收集测细胞因子,底部沉淀加入1 mL 1% Triton裂解15 min后用无菌PBS倍比稀释涂板计数。收集感染4 h、8 h、12 h、20 h、24 h、44 h的细胞及相同时相的用无毒株BT感染的细胞,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%。

1.2.3 透射电镜观察细菌的入胞情况 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800 rpm离心10 min后,在4 ℃的条件下,用2.5%戊二醛固定样品,送至第三军医大学电镜室进行透射电镜检测。

1.2.4 聚乙二醇诱导细胞融合对细菌胞内生存的影响[4] THP-1加入15 mL离心管,800 rpm离心10 min后轻柔弃上清,再用1640培养基重悬后,按500 μL/L的量加入PEG诱导,置37 ℃共孵5 min,后800 rpm离心10 min,轻柔弃去上清,再加入1640培养基,以每孔2 mL,浓度为1×10^6/孔接种于6孔板中,细菌以MOI=100∶1的菌量感染细胞。37 ℃、5% CO_2孵箱中共孵2 h,后取出800 rpm离心10 min,轻柔地弃去上清,37 ℃预热的无菌PBS洗两次,加入含250 μg/mL卡那霉素的1640培养基重悬以杀灭胞外细菌,后按2 mL/孔加入6孔板中共孵2 h,后取出轻轻吹打板壁以免细胞粘壁,加入EP管中800 rpm离心10 min,收集上清测细胞因子,底部沉淀加入1% Triton 1 mL裂解15 min后用无菌PBS倍比稀释涂板计数。同时做无毒株E264的侵袭实验。分别收集感染4 h、8 h、12 h的细胞及相同时间无毒株BT感染的细胞。

1.2.5 TNF-α、IL-6和IL-1β的检测[4-5] 检测不同感染时相下细胞培养上清中TNF-α、IL-6和IL-1β的含量,评价感染后THP-1细胞的炎症反应,按试剂盒说明书进行。

1.2.6 患者血清中IL-1β、和TNF-α的检测 检测不同患者血清中IL-1β和TNF-α的含量,评价感染后人体的炎症反应,按试剂盒说明书进行。

1.3 统计学处理

感染模型稳定性验证 所有实验均做3次以上重复,数据统计采用*t*检验分析差异显著性,GraphPad Prism 5.0软件作图,以得到感染模型建立的最佳条件。

2 结果

2.1 *B. pseudomallei* 和 *B. thailandensis* 生长规律的比较

BP和BT在4~8 h内生长相对后期较缓慢,8 h以后生长增快,12~14 h细胞增长速度比8~12 h的速度还快。BT比BP生长得快些,但两者区别不大,见图1。

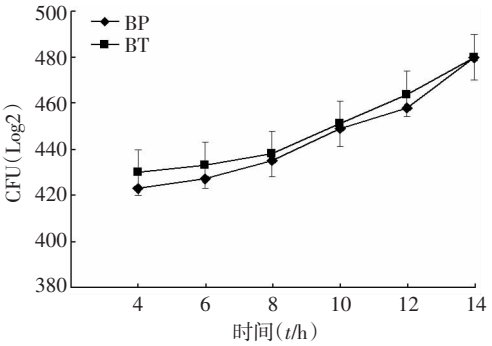


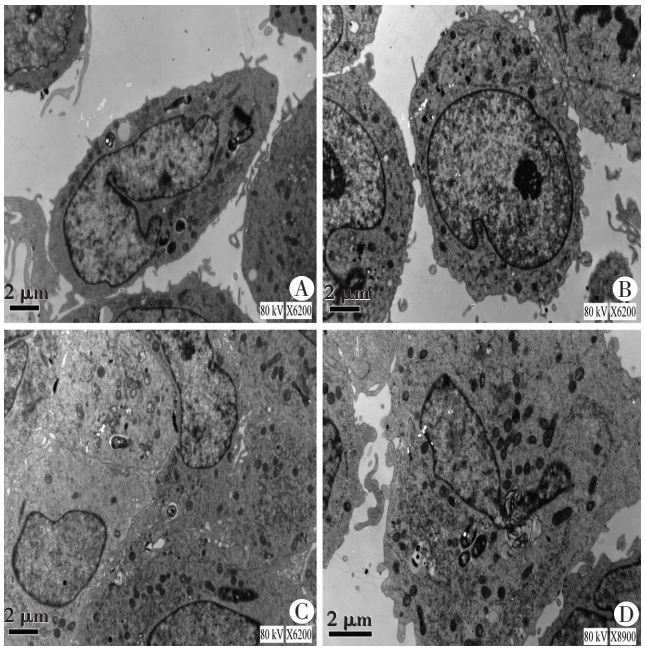
图1 BP和BT生长曲线

2.2 *B. pseudomallei* 和 *B. thailandensis* 的胞内生存情况的比较

短时间(0~4 h)内观察,虽然4 h内BP的数量[(20.13±0.79)CFU(log2)]多于BT[(19.33±1.43)CFU(log2)],但BT生长速度超过了BP,且两者数量相差的趋势愈来愈明显,8 h后BT数量[(25.65±0.57)CFU(log2)]明显多于BP[(22.72±2.29)CFU(log2)]。

2.3 透射电镜观察细菌的入胞情况

BP感染16 h后投射电镜下即可见细菌侵入细胞内如(图2A、C),而BT感染的细胞在44 h后才可见细菌侵入细胞的现象(图2D)。同时无细菌感染的阴性对照24 h细胞尚是完好且无细菌侵入现象(图2B)。



A:BP感染16 h,B:无细菌感染24 h,C:BP感染24 h,D:BT感染44 h

图2 不同细菌感染的不同感染时相细菌的胞内生存状态和THP-1细胞病理损伤表现

2.4　聚乙二醇诱导细胞融合对细菌胞内生存的影响

在 PEG3350 诱导下,8 h 内 BP 和 BT 在细胞的胞内拷贝数是下降的,8 ~ 12 h 两者均呈上升趋势,而 12 ~ 24 h 生长趋于停滞,如图 3。

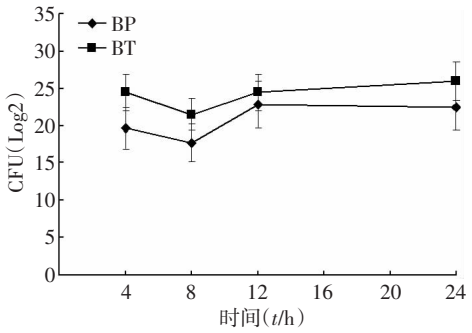


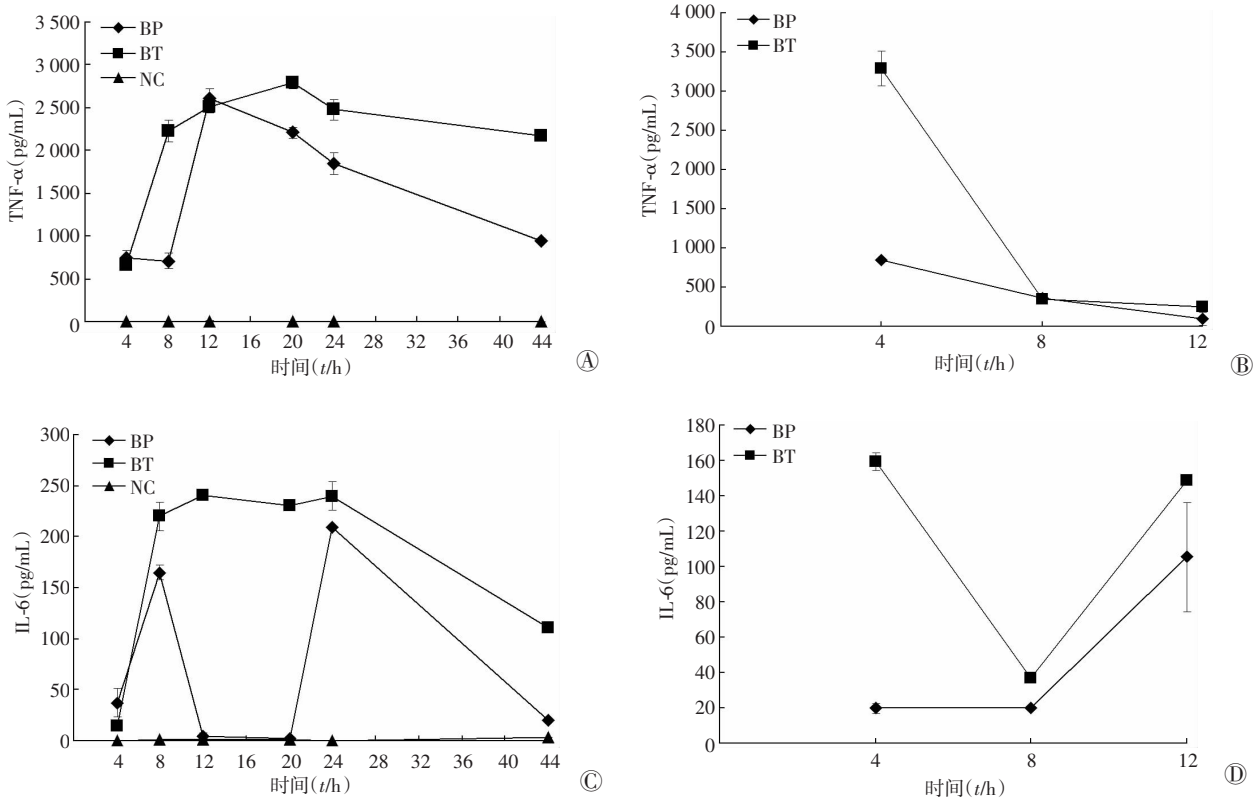
图 3　PEG 诱导细胞后细菌胞内生存的情况

2.5　TNF-α、IL-6 和 IL-1β 的检测

BP 与 BT 感染的细胞上清中的细胞因子水平都增高,而未感染的细胞上清则无任何变化。其中 BP 感染上清的炎症因子 TNF-α 的含量在 8 h 内无明显变化,12 h 达分泌峰值后持续下降,44 h 降至与 4 h 感染时差不多水平,而 BT 感染的上清则在感染后持续上升,并在 20 h 达峰值后渐次下降(图 4A)。在 PEG 预处理的情况下,两者都是先升高后再持续下降,但 BT 感染的上清的 TNF-α 在 4 h 时升高的更明显,8 h 后 BP 和 BT 感染上清的 TNF-α 开始降低且两者差别不大(图 4B)。而在炎症因子 IL-6 的检测中,除未感染的细胞上清无任何变化外,BP 和 BT 感染上清的 IL-6 含量差别更加明显,BP 感染上清的 IL-6 呈明显的双峰形,在 8h 达第一个峰值后开始下降,在 12 到 20 h 几乎达到最低值,20 h 后又开始持续升高并在 24 h 达峰值后再次下降,而 BT 感染上清的 IL-6 含量则在 4 h 升高后在 8 h 至 24 h 维持在峰值附近,24 h 后再下降(图 4C)。用 PEG3350 预处理后 BP 感染上清的 IL-6 含量在 8h 内无变化,8 h 后开始增高。而 BT 感染上清则在 4 h 先升高,8 h 后降至与 BP 感染上清差不多的最低水平后再增高,且 BT 感染上清的 IL-6 含量都比 BP 感染的高(图 4D)。而 IL-1β 的检测中,BP 和 BT 感染细上清的 IL-1β 含量都很高,4 h 就都超过了试剂的检测上限。

2.6　患者血清中 TNF-α 和 IL-1β 的检测

患者血清中在 TNF-α 和 IL-1β 检测中除了 1 例标本的检测值:TNF-α 为 9.48 pg/L;IL-1β 为 131.81 pg/L 外,其余检测值都低于试剂的检测下限,升高的那例患者病情危重,临床诊断为严重败血症,右上臂蜂窝织炎及糖尿病。肝功能严重受损,血液黄疸严重。



A:BP、BT 感染及未感染的细胞上清中 TNF-α 的检测;B:PEG 诱导后的 BP、BT 感染的细胞上清中 TNF-α 的检测;C:BP、BT 感染及未感染的细胞上清中 IL-6 的检测;D:PEG 诱导后的 BP、BT 感染的细胞上清中 IL-6 的检测

图 4　不同感染时相及不同细菌感染下细胞培养上清中细胞因子含量变化

3 讨论

类鼻疽伯克霍尔德氏菌分布广、致病性强[6-9]，临床表现又不典型，易被误诊。由于类鼻疽是一种兼性胞内菌，侵入人体后虽然引起人体免疫细胞的一系列反应，却又能逃逸机体免疫清除作用而继续生长繁殖，这一感染逃逸机制至今仍未阐明。本文旨在以类鼻疽感染人单核细胞的研究为切入点，从基本的细胞模型构建开始，为今后类鼻疽感染机制的研究工作奠定基础。

THP-1 来源于人急性单核细胞，具有悬浮生长、培养简单的特点，是模拟研究类鼻疽伯克霍尔德氏菌感染人体免疫细胞的理想模型。因此我们通过建立稳定的类鼻疽伯克霍尔德氏菌感染 THP-1 细胞模型对探讨类鼻疽伯克霍尔德氏菌感染与免疫系统作用机制具有重要意义。

通过实验我们摸索了 BP 和 BT 的生长规律，为后续实验细菌感染复数(MOI)的确定奠定了基础。透射电镜不仅能确定细菌胞内感染成功，而且能观察到细胞的病理损伤情况，实验中 BP 感染的细胞在 16 h 即可看到细菌，而 BT 感染的细胞要到 44 h 才能看到细菌，这提示 BP 对人体具有比 BT 更强的侵袭力。在细菌感染细胞后观察细菌在胞内生存情况，发现 BT 复制率比 BP 高，这可能是因为 BT 对人体不致病，所以细胞对 BT 的免疫排斥没有 BP 强。这一现象在 PEG3350 预处理细胞后细菌胞内生存情况中也存在，但 PEG3350 诱导时细菌的生存情况是先下降再升高之后处于一个平台期。这可能是因为细菌开始侵入细胞时，由于免疫杀伤作用使其数量减少，之后细菌逃避宿主细胞免疫清除并开始增殖，在一段时间后达到拷贝峰值，而后处于生长增殖的平台期。这一规律在 IL-6 的检测中也有体现，BP 感染的细胞上清的 IL-6 含量也是先升高后下降，这可能是细菌开始进入细胞时刺激细胞的免疫机制使其分泌的细胞因子升高，之后病原菌为逃避细胞的免疫防御而下调自身免疫原性，从而与宿主细胞和平共处，使细胞分泌的细胞因子下降。之后随着病原菌复制的增多，菌体的免疫原性或者分泌性抗原的增加使宿主的免疫反应性增强，分泌更多的细胞因子。随着感染时间延长，细胞免疫病理损伤越加严重，最终细胞崩解增加，使分泌的细胞因子再次下降。而 BT 感染细胞分泌的 IL-6 则只升高而无这一双峰变化也从另一方面加强这一推论的可能性。而 PEG3350 预处理的细胞可能是细胞膜的融合，结构性的改变促使其对细菌的初始入侵不够敏感，之后才调动免疫机制反应而使细胞因子升高。TNF-α 的检测中可能由于 BP 逃逸细胞免疫的能力比 BT 强，故其感染开始时相对 BT 刺激细胞分泌的细胞因子不明显，后期随着细菌增殖的增多，免疫原性增加，刺激了细胞免疫反应性，而感染后期随着细胞的崩解，细胞因子分泌再次降低。而 PEG3350 预处理的细胞融合后降低了其免疫反应性，分泌的细胞因子持续下降。患者血清中的细胞因子含量除了一例临床症状特别严重的患者升高外，其他患者都降低，是否可以认为细胞因子的检测不能作为临床上类鼻疽感染的一个辅助检测指标这有待进一步研究确认。

本研究构建的类鼻疽伯克霍尔德氏菌感染 THP-1 细胞模型能较好地反映出类鼻疽伯克霍尔德氏菌感染人单核细胞的病理变化，为进一步研究该菌与宿主细胞的相互作用，阐明其致病机制和免疫机制具有重要的指导意义。

参考文献：

[1] Fang Y, Chen H, Li YL, *et al*. Melioidosis in Hainan, China: a restrospective study[J]. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2015,109(10): 636-642.

[2] Currie B J, Dance D A, Cheng A C. The global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and melioidosis: an update[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2008, 102 Suppl 1: S1-S4.

[3] Wiersinga W J, Currie B J, Peacock S J. Melioidosis[J]. N Engl J Med, 2012, 367(11): 1035-1044.

[4] Sun G W, Lu J, Pervaiz S, *et al*. Caspase-1 dependent macrophage death induced by *Burkholderia pseudomallei*[J]. Cell Microbiol, 2005, 7(10): 1447-1458.

[5] Chen Y L, Chen Y S, Lin H H, *et al*. Immunostimulatory flagellin from *Burkholderia pseudomallei* effects on an increase in the intracellular calcium concentration and up-regulation of TNF-alpha by mononuclear cells[J]. Microbiol Immunol, 2007, 51(1): 81-86.

[6] Wuthiekanun V, Chierakul W, Rattanalertnavee J, *et al*. Serological evidence for increased human exposure to *Burkholderia pseudomallei* following the tsunami in southern Thailand[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(1): 239-240.

[7] Subran B, Ackermann F, Watin-Augouard L, *et al*. Melioidosis in a European traveler without comorbidities: a case report and literature review[J]. Int J Infect Dis, 2013, 17(9): e781-e783.

[8] Schultze D, Muller B, Bruderer T, *et al*. A traveller presenting with severe melioidosis complicated by a pericardial effusion: a case report[J]. BMC Infect Dis, 2012, 12: 242.

[9] 马广强，王倩，朱金华，等. 广西地区类鼻疽伯克霍尔德氏菌的分布调查[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(2): 142-144.

(收稿:2015-04-02;修回:2015-06-29)

(编辑 邓强庭)