维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)02－0166－03

galE 基因敲除后空肠弯曲菌变异株毒力的改变

束晓梅，蔡方成

(重庆医科大学儿科学院儿科研究所,重庆 400014)

【摘 要】目的:研究 galE 基因敲除后空肠弯曲菌变异株的毒力改变。方法:使用 Hep－2 细胞进行空肠弯曲菌野生株(CJHB9313)和 galE 变异株的黏附和侵袭实验,并比较两者血清敏感性和运动力的变化。结果:发现亲代株 CJHB93 及 galE 变异株对 Hep－2 细胞黏附力分别为 8.3% 及 1.2%,变异株的黏附力仅为亲代株的 14.5%,有显著差异($P<0.01$);CJHB9313 及变异株对 Hep－2 细胞侵袭力分别为 5.6% 及 0.3%,变异株侵袭力仅为亲代株的 5.4%,差异也具显著性($P<0.01$);还发现亲代株及变异株对血清的敏感性也发生变化,与 10% 血清孵育 30min 及 60min 后,前者存活 77.6% 及 67.0%,后者存活 33.6% 及 8.4%,均存在显著差异($P<0.05$);但变异株的运动力与亲代株无明显差异。结论:galE 变异株的毒力明显减低,可能成为减毒 CJ 活菌苗的候选株。

【关键词】空肠弯曲菌;变异株;毒力;侵袭;黏附

【中国图书分类法分类号】R37 【文献标识码】A 【收稿日期】2004－09－02

Variation of virulence in galE knock－out mutant of Campylobacter jejuni

SHU Xiaomei, et al

(*Institute of Pediatrics, College of Pediatrics, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the change in virulence of Campylobacter jejuni (CJ) mutant after galE gene knock－out. *Methods*: Using Hep－2 cells, adherence and invasion assays were performed in the galE mutant and the parent strain, meanwhile, serum sensitivity assay and motility test were made in them. *Results*: The galE mutant showed a reduction in its ability to adhere to and invade Hep－2 cells. The ability of the galE mutant and parent strain to adhere to Hep－2 cells were 1.2 % and 8.3% respectively, and adherence ability of the former only was 14.5% of that of the latter. The difference was significant ($P<0.01$). The ability of the galE mutant and parent strain to invade Hep－2 cells were 0.3% and 5.6% respectively, and invasion ability of the former only was 5.4% of that of the latter. The difference was also significant ($P<0.01$). Furthermore, the sensitivity of both to sera were compared by incubated parental strain and galE mutant in 10% normal serum pools at 37℃. Bacterial counts were determined at 30 and 60 min after incubation. After 30mm, 60 min of incubation, the survival of parental strain and galE mutant were 77.6%, 67.0% and 33.6%, 8.4% respectively. The survival of the galE mutant was significantly reduced compared to that of the parental strain ($P<0.05$). The mobility test showed no difference between mutants and parental strains. *Conclusion*: These results indicate that the galE mutants with a significant reduction in virulence may have a future role as a live attenuated vaccine candidate.

【Key words】Campylobacter jejuni; Mutant; Virulence; Invasion; Adhesion

空肠弯曲菌(Campylobacter jejuni,CJ)是导致胃肠道感染最常见的细菌之一,更重要的是某些血清型 CJ 与神经系统自身免疫性疾病——格林巴利综合征(Guillain－Barre syndrome, GBS)关系密切[1]。脂寡糖(Lipo－oligosaccharide, LOS)是革兰氏阴性菌主要的毒力因子,LOS 可能与 CJ 肠道毒力密切相关,并是 CJ 诱导外周神经损伤的关键抗原成分[2,3]。Benjamin 等[2]在标准株 CJ 81116 证明,galE 基因编码 UDP－葡萄糖－4－表位酶,是 LOS 外核糖基合成重要的酶分子,敲除 galE 基因后,变异株 LOS 外核糖基缺失,推断此变异株肠道毒力减弱并不再诱导外周神经损伤,可能成为 CJ 减毒活菌苗的候选株。

已经证明源于 CJ HB9313 的 galE 变异株 LOS 外核神经节苷脂模拟结构缺失,不再能诱导外周神经免疫损伤发生[4]。本实验检测其肠道毒力改变,

作者介绍:束晓梅(1964－),女,博士,教授,
主要研究方向:儿童神经疾病。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170990)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

探索 galE 变异株作为减毒活菌苗的可能性。

1 材料与方法

1.1 菌株及培养基

CJ HB9313(HS:19 型)亲代株及 galE 基因敲除变异株(galE mutant,galE 变异株)由澳大利亚皇家墨尔本研究所 Benjamin N Fry 博士馈赠,培养于心脑浸液肉汤(Brain - Heart lnfusion broth,BHIB,Difco 公司)或 Skirrow 固体培养基中,变异株培养基加终浓度 30μg/ml 卡那霉素。

1.2 细胞株

人喉上皮细胞癌细胞株(Hep - 2)购自武汉大学中国典型培养物保藏中心,常规传代培养于含 10% 小牛血清的 RPMll640 培养液中。

1.3 血清库(serum pools)

来自 10 个健康成年人(男女各半)混合血清,0.45μm 滤膜过滤除菌,分装保存 - 70℃ 备用。

1.4 培养基 RPMI1640、Hank 液,小牛血清、胰蛋白酶购自美国 HyClone 公司。

1.5 黏附实验

实验分 4 组(每组 5 个复孔):①亲代株实验组、②亲代株对照组、③变异株实验组、④变异株对照组。除对照组外,将 Hep - 2 细胞(浓度 1×10^5/ml)每孔 1ml 接种培养板,18h 长成单层(每孔约 3×10^5 个细胞);Hank 液洗涤,各组每孔分别加入 0.9ml RPMl 1640 培养液和 0.1ml 亲代株或 galE 变异株悬液(2×10^7 CFU/ml);继续培养 3h;吸去菌液,PBS 漂洗;各孔加入 1ml 含 0.01% TritonX - 100 的 PBS 裂解单层细胞;吸出各孔悬液,混匀,经 1:100 稀释后各取 100μl 涂布于 Skirrow 培养基,48h 计数菌落,黏附力用百分数表示(即黏附细菌数所占接种细菌数的百分数)。

1.6 侵袭实验

分组、单层细胞培养、加入菌悬液共培养等均同上进行;吸去菌液,PBS 洗涤,每孔加入 1ml 含 100μg/ml 庆大霉素的培养液,杀死细胞外的 CJ(此处理不影响细胞内细菌存活);继续孵育 2h,吸去菌液,PBS 漂洗,加入 1ml 裂解液,裂解单层细胞;吸出各孔悬液,1:100 稀释,各取 100μl 涂布于 Skirrow 培养基,48h 培养计数菌落数,侵袭力也用百分数表示(即庆大霉素处理后存活细菌占接种细菌数的百分数)。

1.7 血清敏感性实验

制备浓度 10^6CFU/ml 的亲代株、变异株悬液及 10% 终浓度血清库备用。微量滴定板每孔加 100μl 此血清,再分别加入 100μl 上述待测菌悬液,37℃ 孵育 30min 或 60min(每个标本平行做 5 份);另设血清阴性对照组,上述血清经 56℃ 加热 30min 灭活补体后使用。分别在血清作用 0min、30min、60min 时,吸取各孔标本经 PBS 稀释 1000 倍,分别取 100 μl 涂布于 Skirrow 培养基,48h 培养记数菌落。血清敏感性用孵育后存活细菌的百分数表示。

1.8 细菌动力试验

接种针分别沾取亲代株及变异株单菌落,接种于半固体动力培养基(含 0.35% 琼脂的 BHIB),穿刺约培养基深度的 1/3,于 37℃、培养 24h 观察结果。

1.9 统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件包对资料进行 Student t 检验,$P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 亲代株及变异株对 Hep - 2 细胞黏附力

如表 1 显示:galE 变异株对 Hep - 2 细胞黏附力为 1.2%,亲代株为 8.3%,二者存在非常显著性差异($t=3.94$,$P<0.01$);若将亲代株黏附率视为 100%,变异株仅为亲代株的 14.5%,比亲代株降低了 7 倍。

2.2 亲代株及变异株对 Hep - 2 细胞侵袭力

如表 1 所示:galE 变异株对 Hep - 2 细胞侵袭力为 0.3%,亲代株对 Hep - 2 细胞侵袭力为 5.6%,二者差异非常显著($t=7.75$,$P<0.01$);若视亲代株的侵袭率为 100%,变异株仅为亲代株的 5.4%,比亲代株降低了 22 倍。

2.3 血清敏感性

亲代株及变异株对混合血清杀菌作用的敏感性见图 1,与 10% 混合血清孵育 30min 后,galE 变异株存活率为 33.6%,比亲代株的存活率(77.6%)明显降低,两者存在非常显著性差异($t=7.47$,$P<0.001$)。孵育 60min 时,galE 变异株存活率仅为 8.4%,而亲代株为 67.0%($t=15.25$,$P<0.001$),说明 galE 变异株对血清杀菌的抵抗力明显降低。然而,补体灭活后的血清无论对 galE 变异株或亲代株,均丧失其灭菌作用。

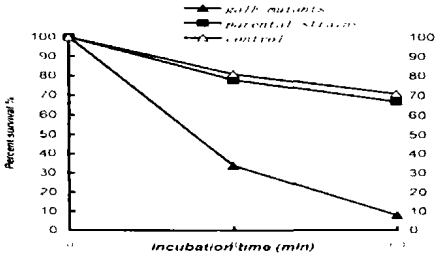


图 1 亲代株及 galE 变异株的血清敏感性

2.4 细菌动力

24h 观察结果,见变异株与野生株一样均沿穿刺线向外呈毛刺状生长,表示变异株无明显运动能力的变化。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 亲代株及 galE 变异株对 Hep－2 细胞的黏附力及侵袭力

实验分组($n=5$)	黏附细菌数(CFU/孔)	黏附力(%)	黏附率(%)	侵袭细菌数(CFU/孔)	侵袭力(%)	侵袭率(%)
变异株实验组	24000±20000*	1.20	14.50	6000±6000*	0.30	5.40
变异株对照组	1000±140	0.05	0	160±100	0.01	0
亲代株实验组	166000±72000	8.30	100.00**	112000±30000	5.60	100.00**
亲代株对照组	1400±80	0.07	0	80±60	0.00	0

*：与亲代株相比，$P<0.01$　　**：便于比较，将亲代株黏附率及侵袭力视为 100%

3 讨 论

肠道细菌的动力、黏附力及侵袭力皆是其主要的毒力特征。CJ 肠炎有明显肠壁侵袭症状，该菌的动力及黏附力是其定植肠黏膜、引起肠道炎症的重要特征。CJ 的黏附力和侵袭力可能由多种因素及机制决定，LOS 在 CJ 对上皮细胞黏附及侵袭中可能起重要作用[2]，Beniamin 等[2]研究发现，CJ 81116 的 galE 变异株对人类肠 INT407 细胞的侵袭力和黏附力均有明显下降。

本实验采用国际公认的检测细菌黏附及侵袭力的模式细胞 Hep－2 细胞进行，有关细菌计数方法，国内多用显微镜下直接计数[5]，此法简单且耗时少。我们曾用不同染色方法直接计数黏附细菌数，但发现结果受主观因素影响较大。本研究采用平板倾注法计数细菌，反映的是黏附及侵袭的活菌数。结果显示 galE 变异株对 Hep－2 细胞的黏附力仅为亲代株的 14.5%，侵袭力仅为 5.4%，与亲代株相比分别降低了 7 倍和 22 倍，证明 LOS 结构改变可导致其黏附力及侵袭力降低。

血清敏感性也是评价细菌毒力的指标之一，具有抵抗血清杀伤作用菌株的毒力常高于血清敏感性细菌。一些细菌 LOS 结构可抵御血清中补体杀伤作用，已知 CJ 属血清敏感性细菌(不能抵抗全血清的杀菌作用)，是通过激活补体引发补体介导的免疫杀菌机制，故灭活补体的血清不再有杀 CJ 的作用。虽然 CJ 对全血清敏感，但可抵抗 10%低浓度血清杀伤[6]。本文比较亲代株及变异株对 10%低浓度血清敏感性的变化显示，galE 变异株抗 10%血清杀伤能力较亲代株明显下降，血清敏感性增高；而亲代株可抵抗低浓度血清的杀伤。说明变异株丧失 LOS 外核神经节苷脂模拟结构后，血清敏感性增加，毒力可能随之降低。

细菌动力也是重要的毒力标志。一般认为，CJ 的动力主要由鞭毛介导，涉及鞭毛生物合成的基因发生突变时，变异株多丧失动力。鞭毛虽然是 CJ 动力必须的，但可能不是唯一的因素，如志贺氏菌还需要脂多糖的存在以维持其动力和毒力[7]。本实验显示 LOS 糖基缺失并未影响 CJ 的动力。

综上结果，galE 变异株生物学特征发生改变，包括对上皮细胞的黏附力、侵袭力下降，对血清免疫杀菌的敏感性增加等，表明变异株肠道毒力减弱，可能成为减毒活菌苗的有力候选株。

(作者现在遵义医学院附院儿科工作。)

参 考 文 献

[1] Parkhill J, Wren BW, Mungall K, et al. The genome sequence of the food－borne pathogen Campylobacter jejuni reveals hypervariable sequences[J]. Nature, 2000; 10: 403(6770): 665－668.

[2] Fry BN, Feng S, Chen YY, et al. The galE gene of Campylobacter jejuni Is Involved in Lipopolysaccharide Synthesis and Virulence[J]. Infect Immun, 2000; 68(5): 2594－2601.

[3] Guerry P, Szymanski CM, Prendergast MM. Phase variation of Campylobacter jejuni 81－176 lipooligosaccharide affects ganglioside mimicry and invasiveness in vitro[J]. Infect Immun, 2002; 70(2): 787－793.

[4] 束晓梅，蔡方成. galE 变异株脂寡糖结构及抗原性鉴定[J]. 中国免疫学杂志，2004; 20(5): 300－302.

[5] 蒋 虹，胡 宏，尹一兵，等. 双歧杆菌及其表面分子粘附肠上皮细胞的研究[J]. 重庆医科大学学报，1999; 24(2): 126－129.

[6] Blaser J, Smith F, Kohler F. Susceptibility of Campylobacter isolates to thebactericidal activity of human serum[J]. J Infect Dis, 1985; 151(2): 227－235.

[7] Van Den Bosch L, Morona R. The actin－based motility defect of a Shigella flexneri rmlD rough LPS mutant is not due to loss of IcsA polarity[J]. Microb Pathog, 2003; 35(1): 11－18.