DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.13.004
第26卷第13期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 13
2004年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2004

文章编号:1000-5404(2004)13-1137-04

论著

肠道螺旋体对肠上皮细胞的吸附及其特性的研究

程小星[1],G. E. Duhamel[2] ([1]第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室,重庆 400038;[2]University of Nebraska, Lincoln, Nebraska 68583, USA)

提 要:目的 研究肠道螺旋体对肠上皮细胞吸附的特性。方法 利用人工培养的肠上皮细胞系H407细胞建立研究肠道螺旋体与肠上皮细胞相互作用的方法,并用该方法研究肠道螺旋体对肠上皮细胞吸附的特性。结果 4种不同来源的肠道螺旋体分离株均能吸附到人肠上皮细胞系H407细胞的表面,其中以人的分离株SP16的吸附率为最高,而非致病性的*Brachyspira innocens* B256株则没有明显的吸附。人分离株SP16与H407细胞共同孵育1 h后的吸附率为63.77%,2 h则达到89.11%。H407细胞经固定后肠道螺旋体仍能有效地吸附到细胞上,显示受体是稳定表达在肠上皮细胞的表面。结论 利用人工培养的肠上皮细胞系H407细胞建立了研究肠道螺旋体与肠上皮细胞相互作用的体外模型。

关键词:肠道螺旋体;肠上皮细胞;吸附
中图法分类号:Q939.2;R322.45 文献标识码:A

Attachment of *Brachyspira pilosicoli* to intestinal epithelial cells

CHENG Xiao-xing[1], G. E. Duhamel[2] ([1]Department of Microbiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; [2]University of Nebraska, Lincoln, Nebraska 68583, USA)

Abstract: Objective To characterize the attachment of *B. pilosicoli* to intestinal epithelial cells. Methods Cultured human intestinal epithelial cell line H407 was employed for the establishment of an *in vitro* attachment assay for the study of the mechanism of attachment of *B. pilosicoli* to intestinal epithelial cells. Results Four strains of *B. pilosicoli* isolated from human and animals could attach to H407 intestinal epithelial cells, and the human isolate SP16 had the highest attachment rate. The attachment rate of SP16 reached 63.77% at 1 h and 89.11% at 2 h after coincubation of SP16 with H407 cells. When H407 cells were fixed, human isolate SP16 could still attach to the cells efficiently, suggesting stable expression of receptor on the cell surface. Conclusion An *in vitro* attachment assay using human intestinal epithelial cell line H407 has been established and can be used to study of interactions of *B. pilosicoli* with human intestinal epithelial cells *in vitro*.

Key words: Brachyspira pilosicoli; intestinal epithelium; absorption

肠道螺旋体(*Brachyspira pilosicoli*, *B. pilosicoli*)是一新发现的引起肠道螺旋体病(intestinal spirochetosis, IS)的病原菌[1,2]。它既可以感染人,也可以感染动物(如猪、狗、鸡等)。该螺旋体在世界许多地方都有发现,包括北美洲、南美洲、欧洲和亚洲的国家。在美国、澳大利亚以及西欧的一些国家,肠道螺旋体在人群中的感染率比较低,平均在1.5%,但在HIV阳性病人其感染率超过30%[3]。在发展中国家如巴布亚新几内亚和阿曼,人群的感染率高达30%[4,5]。在我国尚少见到肠道螺旋体的研究报道。

肠道螺旋体病的主要特征是大量的长螺旋形的病原菌以一端吸附在大肠和结肠肠细胞的表面,另一端游离在肠腔中,形成密集的单层螺旋体覆盖层。有螺旋体吸附的肠粘膜可出现微绒毛的损害,严重时螺旋体可侵入上皮细胞[6]。

利用猪等动物模型的感染实验已经证明人的肠道螺旋体可以导致肠道螺旋体病[7,8],但肠道螺旋体对人的致病性还存在争议,可能与慢性腹泻和肠出血有关[3,6]。美国和法国的研究显示,对于重危病人和免疫缺陷的病人,肠道螺旋体可以引起菌血症,导致严重的后果[9,10]。

微生物吸附到上皮细胞是其在宿主建立感染的关键步骤之一。为了研究肠道螺旋体与肠细胞的相互作用,特别是吸附的分子机制,本研究建立了利用人工培养的肠上皮细胞研究肠道螺旋体吸附的方法,并用该

作者简介:程小星(1963-),男,湖北省天门市人,博士,教授,主要从事微生物学和免疫学方面的研究。电话:(023)68752241

收稿日期:2003-05-01;修回日期:2003-09-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

方法研究了肠道螺旋体吸附的特性。

1 材料与方法

1.1 菌株

肠道螺旋体标准株 P43/6/78(ATCC #49776)和 *Brachyspira innocens* B256 株(ATCC #29796)由 ATCC 获得。肠道螺旋体人分离株 SP16、犬分离株 16242-94 和猪分离株 Wahoo 为保存菌株。以上螺旋体均在厌氧条件下在 trypticase soy broth 培养液中培养。

1.2 细胞培养

人肠上皮细胞系 H407 细胞(ATCC #CCL6)用含有 10% 胎牛血清的 MEM (GIBCO)培养液在 37 ℃含 5% CO_2 的孵箱中培养。对用于吸附实验的细胞,先用含有 0.1% 胰酶和 0.02% EDTA 的 PBS 处理,用 PBS 洗 1 次,将细胞悬浮于含有 10% 胎牛血清的 MEM 培养液中,调整细胞浓度为 1×10^5 细胞/ml,以每孔 1 ml 加到带有无菌培养孔的 4 孔培养玻片上,于 37 ℃ CO_2 孵箱中过夜培养。

1.3 肠道螺旋体吸附实验

新培养的肠道螺旋体用 MEM 培养液洗 1 次,用含有 10% 胎牛血清的 MEM 培养液稀释到最终浓度为 1×10^7 螺旋体/ml,再以每孔 1 ml 加入到长有 H407 细胞的培养玻片上,通常在 37 ℃ CO_2 孵箱中培养 1~2 h。在培养时间到达后,用 PBS 洗 4 次以去除没有吸附的螺旋体,再用含 2% 多聚甲醛和 2.5% 戊二醛的固定液固定 10 min,在空气中晾干。细胞培养玻片首先与 1∶1 000 稀释的螺旋体特异的 7G2 单克隆抗体[11] 反应 30 min。用 PBS 洗涤 3 次后分别与生物素标记的抗小鼠抗体以及碱性磷酸酶标记的亲和素反应。用 PBS 洗涤 3 次后加 Vector Red 底物反应,并用苏木精复染使背景为浅蓝色。对照单加稀释液。

1.4 螺旋体的处理

将新培养的肠道螺旋体在无菌条件下分为 4 份,第 1 份作为对照,其余 3 份分别以 0.3% 的甲醛溶液处理 1 h、在 56 ℃加热处理 1 h 和在冰上冻 1 h。甲醛溶液处理的螺旋体用 PBS 洗 3 次以去除甲醛。4 份肠道螺旋体标本均以含有 10% 胎牛血清的 MEM 培养液稀释为 1×10^7 螺旋体/ml,分别加在含有 H407 细胞的不同培养孔中,在 37 ℃ CO_2 孵箱中培养 2 h,然后用组化的方法特异地显示吸附在 H407 细胞上的肠道螺旋体。

1.5 H407 细胞的处理

在细胞培养玻片上生长的 H407 细胞分别用含有 0.25% 戊二醛的 PBS 溶液和 1% 甲醛溶液在室温中处理 10 min。用 PBS 洗 4 次,分别加入 1×10^7 螺旋体,在 37 ℃ CO_2 孵箱中培养 2 h,用免疫组化的方法特异地显示吸附的肠道螺旋体。对照用没有处理的 H407 细胞。

1.6 用粘蛋白(猪肠来源,以及牛颌下腺来源)、唾液酸和肝素对肠道螺旋体的处理

为了检测含糖化合物对肠道螺旋体吸附的影响,新稀释的 1×10^7 的肠道螺旋体分别与 500 μg 猪肠来源的粘蛋白、500 μg 牛颌下腺来源的粘蛋白、500 μg 唾液酸或 50 单位肝素共同在 37 ℃孵 30 min,然后分别加入到含有 H407 细胞的细胞培养玻片的培养孔中,在 37 ℃ CO_2 孵箱中培养 2 h,然后用免疫组化的方法特异地显示肠道螺旋体。

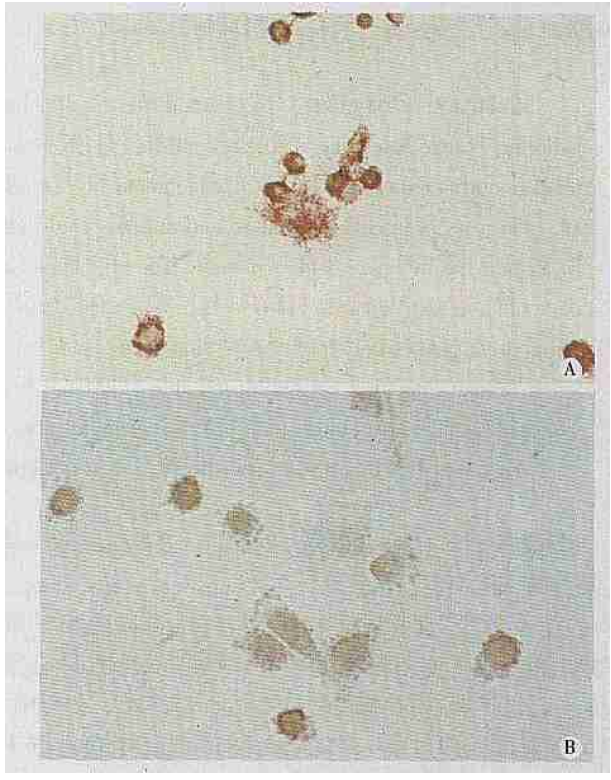
1.7 肠道螺旋体细胞吸附的计算方法

对每 1 个实验计数大约 200 个细胞。单一细胞如果有 5 个以上的螺旋体吸附则被定为阳性。结果以下列方式表示:(阳性细胞数/总细胞数)× 100%。

2 结果

2.1 肠道螺旋体对人肠上皮细胞系 H407 细胞的吸附

起初用吉姆萨染色难以准确地分辨吸附的螺旋体。改用免疫组化特异染色后,螺旋体被染成红色,易于分辨与记数(图 1)。本研究所用的 4 株不同来源的肠道螺旋体,包括肠道螺旋体标准参考株 P43/6/78、人分离株 SP16、犬分离株 16242-94 和猪分离株 Wahoo 均可以吸附到 H407 细胞上,而非致病的 *B. innocens* B256 株则没有明显的吸附,证实该方法是特异的。人分离株 SP16 是所用的肠道螺旋体中对 H407 细胞吸附率最高的,孵育 1 h 的吸附率为 63.77%,2 h 则达到 89.11%(图 2)。所以在以后的实验中均选用 SP16 株。



A: *B. pilosicoli* human isolate SP16 spirochetes attaching to cultured human H407 intestinal epithelial cells were stained red (IHC× 40); B: Control immunocytochemistry staining of *B. pilosicoli* (IHC× 40)

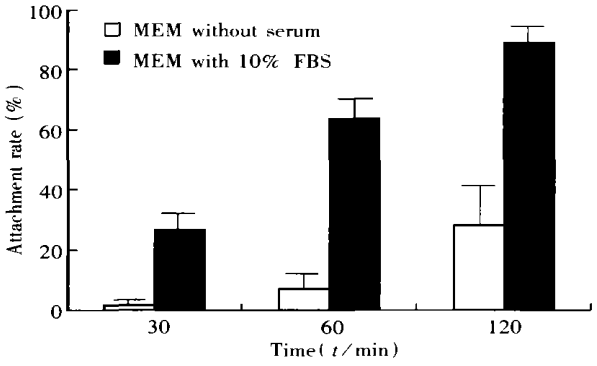
图 1 肠道螺旋体免疫组化染色

Fig 1 Immunocytochemical staining of *B. pilosicoli*

比较没有血清的 MEM 与含有 10% 胎牛血清的 MEM 作为稀释液对肠道螺旋体吸附的影响发现,用含 10% 胎牛血清的 MEM 作为稀释液明显提高肠道螺旋体对 H407 细胞的吸附(图 2)。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

所用肠道螺旋体数量与 H407 细胞数量之比对肠道螺旋体的吸附率有显著的影响。在螺旋体与细胞之比为 100∶1 时, 2 h 的吸附率为 84.98%, 而在 10∶1 时则仅为 22.15%。



Open and shaded bars represented the attachment rate of spirochetes in MEM medium without serum and that of spirochetes in MEM medium containing 10% fetal bovine serum, respectively

图 2　孵育时间和胎牛血清对肠道螺旋体吸附到 **H407** 细胞的影响 ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

Fig 2　Effects of fetal bovine serum and length of incubation on attachment of *B. pilosicoli* strain SP16 to H407 cells ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

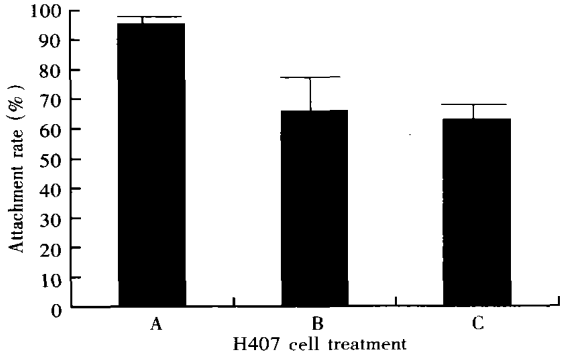
2.2　影响肠道螺旋体吸附的因素

0.3%的甲醛溶液和 56 ℃处理 1 h 均可以杀死肠道螺旋体, 但不影响螺旋体的数量。这些死亡的肠道螺旋体在 2 h 的孵育期内完全不能吸附到 H407 细胞上。

在冰上冷冻的肠道螺旋体若吸附实验在 4 ℃孵育则螺旋体不能吸附到 H407 细胞上, 若在 37 ℃孵育则对吸附没有明显的影响。

2.3　细胞处理对肠道螺旋体吸附的影响

在加入肠道螺旋体之前用含 0.25% 戊二醛的 PBS 溶液和 1%甲醛溶液分别固定 H407 细胞对螺旋体的吸附虽然有些影响, 但肠道螺旋体仍能有效地吸附到 H407 细胞上(图 3)。



A: Control; B: 1% formalin; C: 0.25% glutaraldehyde

图 3　细胞处理对肠道螺旋体 **SP16** 株吸附的影响

Fig 3　Effects of H407 cell treatment on spirochete attachment

2.4　含糖化合物对肠道螺旋体吸附的影响

同对照相比, 500 μg 猪肠来源的粘蛋白、500 μg 牛颌下腺来源的粘蛋白、500 μg 唾液酸和 50 U 肝素对肠道螺旋体的细胞吸附没有明显的影响。

3　讨论

以往多用猪和鸡等动物模型来研究肠道螺旋体与肠上皮细胞的相互作用[7,8], 虽然可以忠实地反映体内感染的状况, 但由于动物实验费用昂贵和工作量大等特点, 难以进行大规模的筛选实验。本研究利用体外培养的人肠上皮细胞系 H407 细胞和免疫组化特异染色建立了研究肠道螺旋体与肠上皮细胞相互作用的新方法。该方法的建立对研究肠道螺旋体吸附的分子机制, 如筛选配体和受体等, 有重要的意义。吉姆萨染色将细胞和螺旋体染成相似的颜色, 在显微镜下难以区分。用免疫组化的方法则具有明显的优势, 首先是 7G2 单克隆抗体特异地同螺旋体反应[11], 避免了非特异性反应; 其次是螺旋体与细胞分别染成红色和浅蓝色, 易于记数分析。

人肠道螺旋体分离株 SP16 对 H407 细胞的吸附同肠道螺旋体的数量和孵育时间密切相关, 说明吸附是特异的。死亡的 SP16 分离株不能吸附到 H407 细胞上, 其可能的解释是肠道螺旋体的吸附需要它的化学趋化的能力。活的肠道螺旋体能在鞭毛的驱动下游向细胞, 导致与细胞上受体的结合。

H407 细胞经含 0.25% 戊二醛的 PBS 溶液和 1% 甲醛溶液固定后仍能被肠道螺旋体有效地吸附, 提示受体并不需要诱导, 而是稳定地表达在肠上皮细胞的表面。而且螺旋体的吸附不需要细胞的主动参与。

肠道螺旋体病的主要特征是大量的长螺旋形的病原菌以一端吸附在大肠和结肠肠细胞的表面, 形成密集的单层螺旋体覆盖层。根据目前的研究, 肠道螺旋体对肠粘膜的吸附, 以及由吸附的肠道螺旋体造成的肠细胞微绒毛的损害和对肠上皮细胞的侵入等是其致病的重要因素[6]。了解肠道螺旋体对肠上皮细胞吸附的分子机制将有助于设计有效的阻止肠道螺旋体感染的途径。由于粘蛋白、唾液酸和肝素已经在其它病原菌中证明是它们受体的成分[12~15], 因此本研究选择了这些化合物, 它们不能阻断肠道螺旋体的吸附说明该螺旋体的细胞受体可能不是这些成分。

参考文献:

[1] Trott D J, Stanton T B, Jensen N S, *et al*. *Serpulina pilosicoli* sp. nov, the agent of porcine intestinal spirochetosis[J]. Int J Syst Bacteriol, 1996

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

46(1): 206—215.
[2] Ochiai S, Adachi Y, Mori K. Unification of the genera Serpulina and Brachyspira, and proposals of *Brachyspira hyodysenteriae* Comb. Nov., *Brachyspira innocens* Comb. Nov. and *Brachyspira pilosicoli* Comb. Nov. [J]. Microbiol Immunol, 1997, 41(6): 445—452.
[3] Mikosza A S, Hampson D J. Human intestinal spirochetosis: *Brachyspira aalborgi* and/or *Brachyspira pilosicoli*[J]? Anim Health Res Rev, 2001, 2(1): 101—110.
[4] Barrett S P. Intestinal spirochaetes in a Gulf Arab population[J]. Epidemiol Infec, 1990, 104(2): 261—266.
[5] Trott D J, Combs B G, Mikosza A S J, *et al*. The prevalence of *Serpulina pilosicoli* in humans and domestic animals in the Eastern Highlands of Papua New Guinea[J]. Epidemiol Infect, 1997, 119(3): 369—379.
[6] Duhamel G E. Comparative pathology and pathogenesis of naturally acquired and experimentally induced colonic spirochetosis[J]. Anim Health Res Rev, 2001, 2(1): 3—17.
[7] Jamshidi A, Hampson D J. Experimental infection of layer hens with a human isolate of *Brachyspira pilosicoli*[J]. J Med Microbiol, 2003, 52(4): 361—364.
[8] Trott D J, Huxtable C R, Hampson D J. Experimental infection of newly weaned pigs with human and porcine strains of *Serpulina pilosicoli*[J]. Infect Immun, 1996, 64(11): 4648—4654.
[9] Kanavaki S, Mantadakis E, Thomakos N, *et al*. *Brachyspira* (*Serpulina*) *pilosicoli* spirochetemia in an immunocompromised patient[J]. Infection, 2002, 30(3): 175—177.
[10] Trott D J, Jensen N S, Saint Girons I, *et al*. Identification and characterization of *Serpulina pilosicoli* isolates recovered from the blood of critically ill patients[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(2): 482—485.
[11] Fisher L N, Mathiesen M R, Duhamel G E, Restriction fragment length polymorphism of the periplasmic flagellar flaA1 gene of Serpulina species [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 1997, 4(6): 681—686.
[12] Vimal D B, Khullar M, Gupta S, *et al*. Intestinal mucins: the binding sites for *Salmonella typhimurium*[J]. Mol Cell Biochem, 2000, 204(1—2): 107—117.
[13] Giannasca K T, Giannasca P J, Neutra M R, Adherence of *Salmonella typhimurium* to Caco-2 cells: identification of a glycoconjugate receptor [J]. Infect Immun, 1996, 64(1): 135—145.
[14] Simon P M, Goode P L, Mobasseri A, *et al*. Inhibition of *Helicobacter pylori* binding to gastrointestinal epithelial cells by sialic acid-containing oligosaccharides[J]. Infect Immun, 1997, 65(2): 750—757.
[15] Yabushita H, Noguchi Y, Habuchi H, *et al*. Effects of chemically modified heparin on *Chlamydia trachomatis* serovar L2 infection of eukaryotic cells in culture[J]. Glycobiology, 2002, 12(5): 345—351.

(编辑 王 红)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2004)13-1140-01

经皮穿刺 ^{125}I 粒子植入治疗肺部转移性神经鞘瘤 1 例

Brachytherapy of lung metastasis of neurilemmoma with percutaneous implantation of ^{125}I seeds: a case report

胡建林, 熊 玮, 杨和平, 黄 英, 李学军 (第三军医大学西南医院呼吸内科, 重庆 400038)

患者, 女性, 20 岁。发现右肺进行增大结节病灶 7 个月, 无咳嗽、咯血、胸痛及其他症状。入院前 31 个月曾行 T_{11-12} 胸椎神经鞘瘤切除术。入院前 16 个月局部神经鞘瘤复发再次手术治疗, 术后化疗 2 个周期, 局部病灶未再复发。查体: 全身浅表淋巴结无肿大, 双肺无异常体征, T_{11-12} 胸椎处未扪及包块。入院前 7 个月胸片示右下肺背段单个结节病灶, 直径约 0.5 cm, 边缘清楚。入院时 X 线胸片示: 右下肺结节病灶增大至直径 2 cm, 边缘仍光滑。经皮肺穿刺活检病理诊断为神经鞘瘤。

在 X 线透视定位下, 将 3 根 1.2 mm× 160 mm 的 BARD 穿刺活检针经皮穿刺到肺部结节病灶内, 通过穿刺针将 12 颗 ^{125}I 粒子置入到病灶内, 每颗粒子放射活度为 33.3 MBq, 置入粒子总放射活度为 399.6 MBq。术后 38 d 复查胸片示病灶缩小至直径 0.5 cm, 术后 3 个月病灶完全消失, 术后 7 个月复查胸片仍未见复发。患者术后一直无任何不适。术后 1 个月血常规检查正常。

讨论

神经鞘瘤是自周围神经许旺细胞发生的良性肿瘤, 临床上较少见。手术切除肿瘤是最主要的治疗手段, 少数患者手术后局部肿瘤可复发, 极少发生转移。本例患者发生肺内转移实属罕见。对于不宜手术及术后复发者可进行放射治疗, 体外 γ 刀治疗仅可使少数神经鞘瘤完全消失, 大多数病灶可缩小[1,2]。放射性 ^{125}I 粒子瘤体内植入是一种近距离放疗方式, 由于放射源直接在瘤体内起作用, 与肿瘤细胞距离近, 并且为持续性作用, 故很小剂量的放射源也能发挥很强的杀伤肿瘤细胞的作用, 对于许多实体瘤均有良好的局部控制作用[3,4]。本例肺内

(下转 1144 页)

作者简介: 胡建林(1963—), 男, 江西省景德镇市人, 博士, 副主任医师, 副教授, 主要从事肺癌基础和临床研究及呼吸系统介入技术方面的研究, 已发表论文 26 篇。电话: (023) 68754121, E-mail: jianlinhu63@yahoo.com.cn

收稿日期: 2004-05-25; 修回日期: 2004-06-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net