DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.06.014
第25卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 6
2003年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2003

文章编号:1000-5404(2003)06-0495-03

论著

铜绿假单胞菌体外粘附肠上皮细胞对其细胞膜生物特性的影响

陈 军,夏培元,常 山,肖光夏 (第三军医大学附属西南医院全军烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探索铜绿假单胞菌粘附肠上皮细胞后细胞膜生物特性的变化规律及可能的机制。方法 采用体外肠上皮细胞培养模型,研究绿脓杆菌粘附后对肠上皮细胞活力、细胞膜磷脂酶A_2、细胞内钙、细胞膜磷脂成分、膜流动性的影响。结果 细菌粘附后3 h肠上皮细胞活力明显下降,PLA_2活性增高,细胞内钙离子浓度增加,肠上皮细胞膜荧光偏振度、微粘度和分子排列有序性系数即出现增加,膜流动性降低,细胞膜磷脂含量降低,磷脂酰肌醇(PI)、磷脂酰胆碱(PC)含量逐渐降低。结论 绿脓杆菌粘附后肠上皮细胞胞内钙超载所导致的膜PLA_2活化以及肠上皮细胞膜磷脂降解是导致膜流动性降低的根本原因。

关键词:铜绿假单胞菌;粘附;肠上皮细胞膜;膜流动性
中图法分类号:R322.45;R329.2;R378.991 文献标识码:A

Study of the effects of *Pseudomonas aeruginosa* adhesive on membrane of intestinal epithelial cells *in vitro*

CHEN Jun, XIA Pei-yuan, CHANG Shan, XIAO Guang-xia (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the mechanism of intestinal epithelial cell membrane injury due to *Pseudomonas aeruginosa* adhesion. Methods The intestinal epithelial cells were cultured and adhered with *Pseudomonas aeruginosa*. The changes in the viability of the cells and the activity of membranous PLA_2, the calcium content of cell, contents of phospholipid and membrane fluidity were observed. Results At 3rd h after the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*, the viability of the intestinal epithelial cells decreased significantly, but the activity of membranous PLA_2, the calcium content of cell increased significantly; the contents of phospholipid (PL), phosphatidylinositol (PI) and phosphatidylcholine (PC) in cell membrane decreased gradually, but the membrane fluorescence polarization and microviscosity of intestinal epithelial cell membrane increased significantly. Conclusion The activation of PLA_2 and the degradation of phospholipid due to the overloading of calcium in intestinal epithelial cells after the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to intestinal epithelial cells might be the fundamental factors to result in the reduction of membrane fluidity.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; adhesion; intestinal epithelial cell membrane; membrane fluidity

严重烧(创)伤后肠道细菌移位并致感染这一现象已被公认。细菌移位的第一步是其粘附于肠粘膜上皮细胞,进而定植于肠粘膜表面,随后侵入肠系膜淋巴结,进而播及全身。目前关于细菌粘附于细胞表面后细胞膜的一系列变化知之甚少,为了更好的了解这方面的变化。本研究拟从体外铜绿假单胞菌(绿脓杆菌)粘附肠上皮细胞模型入手,探索粘附后细胞膜生物特性的变化规律及可能的机制。

基金项目:全军"九五"指令性课题资助项目(96L042)
作者简介:陈 军(1970-),男,广东省电白县人,博士,助理研究员,主要从事烧伤感染方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68753755
收稿日期:2001-07-25;修回日期:2002-04-15

1 材料和方法

1.1 菌株和细胞株

铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginasa ATCC 27853),由本室保存。鼠肠上皮细胞株IEC-6,引自于中国科学院上海细胞研究所。

1.2 培养方法

1.2.1 肠上皮细胞的培养 IEC-6细胞接种于25 ml的培养瓶中,加入含10%小牛血清和双抗(青、链霉素各100 U)的DMEM培养液中,于37℃,5%CO_2、95%湿度的二氧化碳孵箱中培养,1~2 d更换培养液,90%融合时用0.1%胰酶-EDTA消化传代。

1.2.2 细菌培养 铜绿假单胞菌ATCC 27853用普通培养基经需氧、37℃培养后,3 500 r/min离心30 min收集细菌;用无血

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

清无双抗的 DMEM 培养液悬浮细菌，调整菌浓度为 1×10^7/ml。

1.3 粘附实验及分组

正常对照组：肠上皮细胞在 24 孔细胞培养板中常规培养致单层，用无菌 PBS 洗 3 遍，改加 10%正常血清 DMEM 培养液；绿脓杆菌粘附组：常规培养致单层，用无菌 PBS 洗 3 遍，每孔加入 200μl 菌液，然后置 37℃ 5%CO_2 培养箱中孵育。以上两组均于粘附后 1、3、6 h 收集样本进行检测。

1.4 检测指标

1.4.1 细胞活力的测定　采用四唑盐(MTT)比色法[1]。

1.4.2 IEC 培养液中磷脂酶 A_2(PLA_2)活性的测定　采用生化法[2]。

1.4.3 IEC 胞浆游离 Ca^{2+} 浓度的测定　采用荧光法[3]。

1.4.4 IEC 膜脂流动性测定　采用荧光偏振法测定[4]。

1.4.5 IEC 膜磷脂分析　采用高效毛细管电泳法(HPCE)[5]。

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用华西医科大学 PEMS 医用统计软件包作 t 检验。

2 结果

2.1 绿脓杆菌粘附对 IEC 细胞活力的影响

绿脓杆菌粘附后，细胞活力在 1 h 即下降，至孵育 3 h 细胞活力显著下降，之后持续降低，见表 1。

表 1 绿脓杆菌粘附对 IEC 细胞活力的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 The effects of Pseudomonas aeruginosa adhesion on IEC cell viability ($\bar{x}\pm s$)

Time(h)	n	1 h	3 h	6 h
Control group	10	0.57±0.09	0.55±0.08	0.51±0.06
Adhesion group	10	0.46±0.05 *	0.36±0.07 **	0.19+0.05 **

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* Control group

2.2 绿脓杆菌粘附对细胞膜 PLA_2 的影响

结果显示粘附后 1 h PLA_2 的活性即开始升高，3~6 h 活性明显增加，见表 2。

表 2 绿脓杆菌粘附对 IEC 培养上清 PLA_2 活性的影响($\mu mol\cdot min^{-1}\cdot L^{-1}$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 The effects of Pseudomonas aeruginosa adhesion on PLA_2 activity of IEC cell supernatant($\mu mol\cdot min^{-1}\cdot L^{-1}$, $\bar{x}\pm s$)

Time(h)	n	1 h	3 h	6 h
Control group	10	0.07±0.02	0.08±0.02	0.09±0.03
Adhesion group	10	0.11±0.04 *	0.16±0.06 **	0.29±0.09 **

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* Control group

表 3 绿脓杆菌粘附对 IEC 胞浆游离钙浓度的影响(nmol/L, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3 The effects of Pseudomonas aeruginosa adhesion on IEC cytosolic free calcium(nmol/L, $\bar{x}\pm s$)

Time(h)	n	1 h	3 h	6 h
Control group	10	102.37±43.6	111.79±46.8	132.47±38.6
Adhesion group	10	145.32±43.2	223.56±48.6 **	321.77±55.8 **

**: $P<0.01$ *vs* Control group

2.3 绿脓杆菌粘附对 IEC 胞浆游离钙浓度的影响

粘附后胞浆 Ca^{2+} 浓度迅速升高，至 3 h 非常显著的高于对照组，此后持续增高，见表 3。

2.4 绿脓杆菌粘附对 IEC 细胞膜流动性的影响

作用 1 h IEC 细胞膜荧光偏振度即开始升高，膜流动性下降，膜脂微粘度和分子排列有序性系数增加，随时间延长变化加剧，6 h 达最高值，见表 4。

表 4 绿脓杆菌粘附对 IEC 细胞膜荧光偏振度、膜脂微粘度和分子排列有序性系数的影响($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 4 The effects of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion on IEC fluorescence polarization and membrane fluidity($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

	Control group	Post adhesion hour(h)		
		1	3	6
P	0.135±0.045	0.155±0.048	0.211±0.053 *	0.257±0.042 **
η	0.911±0.186	0.973±0.124	1.771±0.138 *	2.529±0.189 **
γ	0.098±0.013	0.117±0.014	0.144±0.019 *	0.185±0.024 **

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* Control group

2.5 绿脓杆菌粘附对 IEC 细胞膜磷脂成分的影响

粘附后 1 h 细胞膜磷脂含量即开始减少，其中磷脂酰肌醇 PI、磷脂酰胆碱 PC 受较大的影响，随着作用时间的延长，IEC 细胞膜中 PI、PC 的含量逐渐降低，而磷脂酰鞘磷脂 SM、磷脂酰乙醇胺 PE 及磷脂酰丝氨酸 PS 的变化无明显的规律性，见表 5。

表 5 绿脓杆菌粘附对 IEC 细胞膜磷脂成分的影响($n=5$, μg/ml, $\bar{x}\pm s$)

Tab 5 The effects of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion on IEC membrane phospholipid ($n=5$, μg/ml, $\bar{x}\pm s$)

Post adhesion hour (h)	SM	PC	PE	PI	PS
0	38.4±4.3	52.1±5.4	35.9±5.2	60.3±7.4	57.7±8.1
1	41.2±4.6	47.3±4.6	34.2±4.6	51.1±6.3	59.8+7.7
3	44.6±5.1	40.3±3.9 **	31.6±3.8	43.4±5.7 **	63.3±6.4
6	39.9±3.9	33.4±3.8 **	33.4±3.1	36.6±5.6 **	56.6±5.9

**: $P<0.01$ *vs* Control group

3 讨论

铜绿假单胞菌(绿脓杆菌)是一种条件致病菌，也是烧伤病人肠道菌群移位的主要细菌之一[6]，绿脓杆菌与肠上皮细胞的粘附是其移位的第一步，粘附后细胞膜出现的一系列病理生理变化对认识肠粘膜细胞的损害机制有重要的指导意义，因此本研究从体外粘附模型入手，首次探讨了绿脓杆菌粘附后肠上皮细胞膜生物物理特性的变化规律及意义。

本研究结果表明，绿脓杆菌粘附后 1 h 细胞活力即开始下降，至 3 h 活力明显下降，说明绿脓杆菌粘附后对 IEC 细胞造成了严重损害。同时，粘附后 1 h 细胞内 Ca^{2+} 增多，且持续增高，至 6 h 为正常对照的 2.43 倍，形成 Ca^{2+} 超载。肠上皮细胞细胞膜主要由膜蛋白

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

和膜脂构成, 膜脂的主要成分是磷脂: 鞘磷脂、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸等。研究显示粘附后细胞膜的磷脂组成发生改变, 肠上皮细胞膜中磷脂酰肌醇 PI、磷脂酰胆碱 PC 的含量随时间的延长含量逐渐降低。Ca^{2+} 在细胞内过度的积聚对细胞生长和功能的实现具有负面效应, 导致细胞膜的损伤, 细胞内 Ca^{2+} 超负荷导致细胞膜损伤的机制尚未完全阐明。目前认为, 胞浆内 Ca^{2+} 增高时可激活中性蛋白酶和磷脂酶, 加速膜磷脂的降解而引起膜的损伤, 损伤部位包括细胞的质膜、线粒体内质网和细胞骨架系统。一旦膜发生不可逆性损伤, 它对各种离子的屏障作用即丧失, 导致细胞内外离子分布的紊乱, 大量 Ca^{2+} 流入细胞内, 进入细胞内的 Ca^{2+} 一方面进一步激活磷脂酶; 另一方面, 大量的 Ca^{2+} 沉积于线粒体内, 使其能量代谢功能障碍乃至丧失, ATP 减少, 最终导致细胞功能的降低和死亡[7]。

PLA_2 属于 sn-2 酰基水解酶家族[8]。本研究结果表明作用后 IEC-6 磷脂酶 A_2(PLA_2)活性迅速升高, 6 h 达 0.29 $\mu mol \cdot min^{-1} \cdot L^{-1}$。因此 PLA_2 的活性异常增高, 可导致膜磷脂的大量降解。过多的 Ca^{2+} 是激活 PLA_2 最主要的因素[9], PLA_2 的激活是膜磷脂减少的主要原因[10]。活化的 PLA_2 水解膜磷脂, 使肠上皮胞外游离脂肪酸(FFA)和溶血磷脂大量堆积, FFA 可衍生为血小板活化因子等多种生物活性因子, 这些代谢产物一方面可直接损伤细胞膜和线粒体, 还可为合成炎症介质提供大量前体; 另一方面膜磷脂组成改变可使膜流动性降低, 加剧膜结合蛋白功能的损害, 形成恶性循环。其次膜磷脂代谢存在脱酰化-再酰化过程, 即在磷脂酶的作用下, 磷脂水解成 FFA 与溶血磷脂, 经过酰基辅酶 A 合成酶(CoAS)的作用, FFA 再酰化, 与溶血磷脂再合成磷脂, 此循环的任一环节异常都可导致膜磷脂代谢紊乱。

细胞膜的流动性是指生物膜系统具有类似于液体那样容易流动的一种物理性质[11]。本研究显示铜绿假单胞菌粘附后 3 h 后肠上皮细胞膜流动性明显降低, 而这意味着磷脂分子的活动度降低。有研究表明膜流动性与膜上内源性 PLA_2 呈负相关, 即膜的硬化可激活内源性 PLA_2[12], Stark[13] 也指出细胞膜磷脂成分的变化将改变膜的流动性。

综上, 我们认为铜绿假单胞菌粘附后肠上皮细胞胞内钙超载所导致的膜 PLA_2 活化以及肠上皮细胞膜磷脂降解是导致膜流动性降低的根本原因。这一系列变化相辅相存、互为因果从而导致了肠上皮细胞膜的结构和功能损害。

参考文献:

[1] Hida T, Ueda R, Takahashi T, *et al*. Chemosensitivity and radiosensitivity of small cell lung cancer cell lines studied by a newly developed 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) hybrid assay [J]. Cancer Res, 1989, 49(17): 4785—4790.

[2] Bhat M K, Mueller Harvey I, Sumner I G, *et al*. Simplified methods for the synthesis of 2-hexadecanoylthio-1-ethylphosphorylcholine and for the determination of phospholipase A_2 activity[J]. Biochim Biophys Acta, 1993, 1166(2—3): 244—250.

[3] Yada T, Oiki S, Ueda S, *et al*. Intestinal secretagogues increase cytosolic free Ca^{2+} concentration and K^+ conductance in a human intestinal epithelial cell line[J]. J Membr Biol, 1989, 112(2): 159—167.

[4] Gillies P, Robinson C, Chapple R. Effects of hypercholesterolemia on the microsomal membrane fluidity of intimal-medial versus medial layers of swine aorta: implications for the pathogenesis of vasospasm[J]. Exp Mol Pathol, 1987, 47(1): 90—97.

[5] Lisbeth I, soren M, hilmer S. Analysis of individual phospholipids by high-performance capillary electrophoresis[J]. JAOCS, 1994, 71(2): 183—188.

[6] Yu P, Martin C M. Increased gut permeability and bacterial translocation in Pseudomonas pneumonia-induced sepsis[J]. Crit Care Med, 2000, 28(7): 2573—2577.

[7] Uratani Y, Kobayashi M, Yokoyama Y, *et al*. Phospholipids stabilize the secondary structure of the sodium-coupled branched-chain amino acid carrier of Pseudomonas aeruginosa[J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1435(1—2): 71—83.

[8] Uozumi N, Kume K, Nagase T, *et al*. Role of cytosolic phospholipase A_2 in allergic response and parturition[J]. Nature, 1997, 390(6660): 618—622.

[9] Peters Golden M, Song K, Marshall T, *et al*. Translocation of cytosolic phospholipase A_2 to the nuclear envelope elicits topographically localized phospholipid hydrolysis[J]. Biochem J, 1996, 318(Pt 3): 797—803.

[10] Chien K R, Han A, Sen A, *et al*. Accumulation of unesterified arachidonic acid in ischemic canine myocardium. Relationship to a phosphatidylcholine deacylation-reacylation cycle and the depletion of membrane phospholipids[J]. Circ Res, 1984, 54(3): 313—322.

[11] 高　洪, 谭丽勤, 李卫真, 等. 内毒素对山羊肝线粒体膜磷脂代谢及膜流动性的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(1): 39—41.

[12] 汪青松, 郑彩梅, 李露斯. 大鼠缺血后脑磷脂酶 A_2、线粒体磷脂含量及线粒体膜流动性的改变[J]. 解放军医学杂志, 1998, 23(6): 445—446.

[13] Stark J M, Jackson S K. Sensitivity to endotoxin is induced by increased membrane fatty-acid unsaturation and oxidant stress[J]. J Med Microbiol, 1990, 32(4): 217—221.

（编辑　薛国文）

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