

[文章编号] 1000-2200(2005)02-0098-03

·基础医学·

金葡菌及其 L 型诱导脐静脉内皮细胞凋亡及相关基因的研究

管俊昌, 刘 勇, 徐 飞, 夏佩莹

[摘要] 目的: 探讨金黄色葡萄球菌(金葡菌)及其 L 型诱导细胞凋亡的作用及可能的分子机制。方法: 用流式细胞术检测金葡菌及其 L 型感染人脐静脉内皮细胞(HUVECs) 后 2 h、4 h、6 h、8 h 和 10 h 的细胞凋亡率, 并同时用免疫组化方法检测各时间点 bcl-2 及 Fas 基因的表达情况。结果: 金葡菌及其 L 型均能诱导 HUVECs 发生凋亡, 与对照组比较差异有显著性($P < 0.05 \sim P < 0.01$)。金葡菌 L 型诱导细胞的凋亡率均低于金葡菌($P < 0.01$); bcl-2 及 Fas 基因表达率在感染后 6 h 与对照组比较差异均有显著性($P < 0.01$), 在诱导的时间内 bcl-2 基因表达率逐渐降低, 而 Fas 基因表达率逐渐增加($P < 0.01$)。结论: 金葡菌及其 L 型均能诱导 HUVEC 发生凋亡, 其机制可能与下调 bcl-2 蛋白及上调 Fas 蛋白有关。

[关键词] 金黄色葡萄球菌; 细菌 L 型; 内皮细胞; 凋亡; 基因

[中国图书资料分类法分类号] R 378.11 [文献标识码] A

Study on apoptosis and expression of its related genes of umbilical vein endothelial cells induced by *S. aureus* and its L-forms

GUAN Jun-chang, LIU Yong, XU Fei, XIA Pei-ying

(Department of Microbiology and Parasitology, Bengbu Medical College, Bengbu 233003, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the possible mechanism of apoptosis of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) induced by *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and its L-forms. **Methods** *S. aureus* and its L-forms were used to infect HUVECs by incubation for different intervals of 2 hours, 4 hours, 6 hours, 8 hours and 10 hours. Apoptotic rates in the treated cells were measured by flow cytometry, and expression of bcl-2 and Fas gene were detected by using immunohistochemical staining. **Results** Both *S. aureus* and its L-forms induced apoptosis in HUVECs. The apoptotic rates of treated HUVECs at different time were significantly higher than that of the control ($P < 0.05 \sim P < 0.01$). Moreover the apoptotic rates induced by L-forms were obviously lower than that by *S. aureus* ($P < 0.01$). At the 6 hours after infection, Bcl-2 expression in HUVECs treated with *S. aureus* and its L-forms was significantly lower, but that of Fas significantly higher than that in the control group. **Conclusions** Both *S. aureus* and its L-forms can induce apoptosis of HUVECs which may be resulted from bcl-2 down-regulation and Fas up-regulation.

[Key words] *Staphylococcus aureus*; bacterial L-forms; endothelial cell; apoptosis; gene

金黄色葡萄球菌(金葡菌)是临床上常见的主要致病菌之一。通常认为金葡菌感染导致炎症, 炎症促进坏死, 但随着研究的深入, 人们发现金葡菌感染还可以诱发宿主细胞凋亡^[1~4], 当金葡菌变异成 L 型后, 全部或部分失去细胞壁, 其是否能诱导细胞凋亡, 目前国内外尚未见报道。抑凋亡基因 bcl-2 和促凋亡基因 Fas 是现今研究较多、较重要的两个细胞凋亡相关基因, 本文通过金葡菌及其 L 型感染体外培养的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs), 用流式细胞术检测凋亡细胞、免疫组化法检测 bcl-2 及 Fas 的表达情况, 以探讨金葡菌及其 L 型诱导细胞凋亡的作用及可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 菌种 金葡菌标准菌株: CMCC 26075 株(产肠毒素 B 菌株)购于中国药品生物制品鉴定所。CMCC 26075 株 L 型: 按文献方法^[5]诱导与稳定。用无菌生理盐水、高渗盐水分别将细菌型及 L 型的培养物制成 10^8 CFU/ml 的悬液。

1.2 主要试剂 RPMI 1640 营养液及胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司。小牛血清购自杭州四季青公司。胰蛋白酶、碘化丙锭(PI)、Triton X-100 购自华美生物工程公司。鼠抗人 bcl-2 单抗及兔抗人 Fas 多抗、即用型 S-P 免疫组化试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司。

1.3 主要仪器 二氧化碳孵箱(日本 SANYO 公司); 流式细胞仪 FACS Calibur(美国 BD 公司); 离心机(Sigama 公司)。

1.4 细胞及培养 人脐静脉内皮细胞系(ECV-304)购自中科院上海细胞生物学研究所, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 在 37°C 5% CO_2 条

[收稿日期] 2004-08-16

[基金项目] 安徽省自然科学基金资助项目(No. 01043706); 安徽省教育厅自然科学研究计划项目(No. 2001kj172, No. 2002kj206)

[作者单位] 蚌埠医学院病原生物学教研室, 安徽蚌埠 233003

[作者简介] 管俊昌(1973-), 男, 安徽霍邱县人, 硕士, 讲师。

[通讯作者] 夏佩莹, 教授。

件下常规培养, 收获指数生长期的 HUVECs, 取约 10^4 /ml 的细胞接种于无菌的六孔板中, 常规培养 24 h 后进行实验。制作细胞爬片时, 可在加入细胞悬液前, 将 1 cm^2 大的无菌玻片放入六孔板中。

1.5 实验方法 弃去陈旧的培养液, 加入 1.8 ml 不含小牛血清的营养液, 同时加入 0.2 ml 诱导因素进行实验。按诱导因素不同实验分组: A 组, 10^8 CFU/ml 金葡菌诱导组; B 组, 10^8 CFU/ml 金葡菌 L 型诱导组; C 组, 生理盐水对照组。各组于诱导因素加入后 2 h、4 h、6 h、8 h、10 h 分别收集一次细胞, 70% 冷乙醇固定, 流式细胞术检测。细胞爬片制备: 于各时间点取出各组的细胞爬片, 放入 PBS 溶液中清洗 2 次, 以 4% 的多聚甲醛固定 20 min, 再以 PBS 冲洗, 用中性树脂胶将细胞爬片贴于载玻片上, 进行免疫组化检测。

1.6 流式细胞仪分析 细胞离心弃去固定液, 行 PI 染色后上机测试, 激发波长 488 nm, Cellquest 软件获取数据, Modifit LT 3.0 分析凋亡率。

1.7 bcl-2 及 Fas 蛋白的免疫组化检测 按常规方法并加以修改。细胞爬片用 PBS (pH 7.4) 洗 5 min \times 3 次 \rightarrow 加入内源性过氧化物酶阻断液, 室温下孵育 10 min \rightarrow PBS (pH 7.4) 洗 5 min \times 3 次 \rightarrow 加入 0.2% 的 Triton X-100 的柠檬酸钠溶液, 室温下孵育 5 min \rightarrow PBS (pH 7.4) 洗 5 min \times 3 次后加入兔血清, 以下步骤同常规方法。同时做省略一抗 (PBS 代替)、省略二抗等空白对照。阳性结果为胞膜或胞浆呈棕黄色, 随机记录 5 个视野的阳性细胞数占总细胞数的

比值。

1.8 统计学方法 采用方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 流式细胞术检测结果 凋亡率分析发现金葡菌及其 L 型诱导内皮细胞凋亡率明显高于对照组 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$), 在共培养 8 h 后为金葡菌及其 L 型诱导内皮细胞凋亡的高峰; 而金葡菌组诱导内皮细胞凋亡率与 L 型组比较差异有显著性 ($P < 0.01$) (见表 1)。

表 1 各组不同时间诱导的细胞凋亡率 (%) 比较 ($n_i = 4; \bar{x} \pm s$)

分组	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h
金葡菌组	$1.95 \pm 0.06^{* \# \#}$	$2.06 \pm 0.08^{* \# \#}$	$7.10 \pm 0.54^{* \# \#}$	$24.43 \pm 3.56^{* \# \#}$	$6.95 \pm 0.60^{* \# \#}$
L 型组	$1.42 \pm 0.23^*$	$1.54 \pm 0.18^*$	$3.52 \pm 0.07^{* *}$	$14.15 \pm 2.68^{* *}$	$11.03 \pm 0.98^{* *}$
对照组	1.07 ± 0.18	1.23 ± 0.20	1.39 ± 0.04	1.56 ± 0.10	1.71 ± 0.17
<i>F</i>	26.50	26.79	335.17	79.25	194.12
<i>P</i>	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
<i>MS</i> 组内	0.030	0.026	0.099	6.622	0.450

q 检验: 与对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 L 型组比较 # $P < 0.01$

2.2 bcl-2 及 Fas 蛋白的免疫组化染色结果 金葡菌及 L 型组 HUVEC 的 bcl-2 及 Fas 蛋白表达率于 6 h 后与对照组比较差异均有显著性 ($P < 0.01$); 随诱导时间的延长 bcl-2 蛋白表达率逐渐降低, 于 6 h 后表达率显著低于 2 h ($P < 0.01$), 而 Fas 蛋白表达率则随诱导时间的延长逐渐增加, 于 6 h 后显著高于 2 h ($P < 0.01$), 明显增强 (见表 2、3)。

表 2 各组因素不同时间对 HUVEC 的 bcl-2 蛋白表达率 (%) 的影响 ($n_i = 5; \bar{x} \pm s$)

分组	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>MS</i> 组内
金葡菌组	24.20 ± 0.67	23.48 ± 1.06	$17.40 \pm 1.78^{* \# \#}$	$15.20 \pm 1.55^{* \# \#}$	$14.92 \pm 1.45^{* \# \#}$	54.58	< 0.01	1.849
L 型组	24.00 ± 0.94	22.62 ± 1.19	$16.96 \pm 1.59^{* \# \#}$	$14.70 \pm 1.91^{* \# \#}$	$14.14 \pm 1.65^{* \# \#}$	46.35	< 0.01	2.240
对照组	24.18 ± 1.02	24.14 ± 0.85	23.62 ± 0.94	23.22 ± 0.96	22.60 ± 1.29	2.10	> 0.05	1.046
<i>F</i>	0.08	2.67	31.62	49.18	50.53	—	—	—
<i>P</i>	> 0.05	> 0.05	< 0.01	< 0.01	< 0.01	—	—	—
<i>MS</i> 组内	0.791	1.087	2.193	2.324	2.163	—	—	—

q 检验: 与对照组比较 * $P < 0.01$; 与各组 2 h 比较 # $P < 0.01$

表 3 各组因素不同时间对 HUVEC 的 Fas 蛋白表达率 (%) 的影响 ($n_i = 5; \bar{x} \pm s$)

分组	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>MS</i> 组内
金葡菌组	18.98 ± 0.80	20.80 ± 1.62	$31.40 \pm 2.26^{* \# \#}$	$33.64 \pm 2.47^{* \# \#}$	$33.96 \pm 2.41^{* \# \#}$	65.27	< 0.01	4.068
L 型组	19.02 ± 1.00	20.94 ± 1.56	$32.78 \pm 1.63^{* \# \#}$	$35.08 \pm 2.25^{* \# \#}$	$36.42 \pm 1.61^{* \# \#}$	123.12	< 0.01	2.749
对照组	19.02 ± 1.12	19.26 ± 1.18	19.96 ± 1.14	20.20 ± 1.59	19.60 ± 1.00	0.79	> 0.05	1.495
<i>F</i>	0.00	2.02	81.95	73.79	131.69	—	—	—
<i>P</i>	> 0.05	> 0.05	< 0.01	< 0.01	< 0.01	—	—	—
<i>MS</i> 组内	0.965	2.150	3.021	4.564	3.133	—	—	—

q 检验: 与对照组比较 * $P < 0.01$; 与各组 2 h 比较 # $P < 0.01$

3 讨论

金葡菌是一种引起人及动物感染和中毒性疾病的主要病原菌。研究发现金葡菌侵袭细胞与感染的持久和迁延有一定的关系,而且感染了金葡菌的细胞可通过细胞凋亡发生细胞毒性作用^[1,2,6]。国外已有大量实验证实,金葡菌虽然并非典型的胞内病原菌,但可黏附并进入多种细胞,并在细胞内存活一段时间,诱导细胞凋亡^[1~4],导致组织损伤。当金葡菌变异成 L 型后,失去或部分失去细胞壁,其是否能够诱导细胞凋亡,目前国内外尚未见报道。本实验通过金葡菌及其 L 型感染体外培养的 HUVECs,流式细胞术检测发现 G₀/G₁ 峰左侧出现了一个亚二倍体细胞群的峰型,即为凋亡峰。证明金葡菌及其 L 型均可诱导 HUVECs 发生凋亡。

目前国内外学者认为细菌 L 型变异后,仍有一定的致病性,但致病性较弱。本实验结果发现金葡菌及其 L 型虽然均能诱导内皮细胞凋亡,但金葡菌诱导细胞的凋亡率明显高于 L 型,说明金葡菌 L 型虽然能够诱导内皮细胞凋亡,但诱导能力较原菌弱,这可能与金葡菌变异为 L 型后致病物质减少有关^[7]。

细胞凋亡的发生是受基因调控的。在众多调控细胞凋亡的因子中,Fas 及 bcl-2 是最具代表性的一对基因蛋白,两者处于动态平衡,相互制约,保持机体的稳定^[8]。Fas 蛋白属于肿瘤坏死因子/神经生长因子受体家族的成员,研究发现 Fas 在体内外与 FasL 结合后均能导致表达 Fas 的细胞发生凋亡^[9]; bcl-2 是 bcl-2 家族的重要成员,其过度表达可特异性地抑制细胞凋亡^[10]。本实验中免疫组化结果显示,HUVEC 在金葡菌及其 L 型感染 6 h 后 bcl-2 蛋白明显下调,Fas 蛋白明显上调,与对照组比较差异有显著性($P < 0.01$)。Fas 蛋白表达上调和 bcl-2 蛋白表达下调均促进凋亡的发生,因此本实验结果提示金葡菌及其 L 型诱导的 HUVEC 凋亡过程可能与其上调促凋亡基因的表达和下调抑凋亡基因的表

达有关,至于这两种基因蛋白诱导 HUVEC 凋亡的确切机制尚待进一步研究。另外本实验流式细胞术检测结果示金葡菌及其 L 型诱导 HUVEC 的凋亡率于第 8 h 明显高于对照组,迟于 Fas 蛋白的上调表达,提示凋亡蛋白介导凋亡的发生需要一定的时间。有研究表明,Fas 蛋白介导凋亡过程需 3.5 h^[11],与本实验结果相符。

[参 考 文 献]

- [1] Menzies BE, Kourteva I. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis [J]. *Infect Immun*, 1998, 66(12): 5 994~5 998.
- [2] Bayles KW, Wesson CA, Liou LE, et al. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells [J]. *Infect Immun*, 1998, 66(1): 336~342.
- [3] Kahl BC, Goulian M, ran Wamel W, et al. *Staphylococcus aureus* RN6390 replicates and induces apoptosis in a pulmonary epithelial cell line [J]. *Infect Immun*, 2000, 68(9): 5 385~5 392.
- [4] Ahmed S, Meghji S, Williams RJ, et al. *Staphylococcus aureus* fibronectin binding proteins are essential for internalization by osteoblasts but do not account for differences in intracellular levels of bacteria [J]. *Infect Immun*, 2001, 69(5): 2 872~2 877.
- [5] 林特夫. 细菌 L 型的诱导 [A]. 见: 黄谷良, 林特夫, 郭秉兰主编. 细菌 L 型与疾病 [M]. 北京: 学苑出版社, 1991: 49~65.
- [6] Baran J, Guzik K, Hryniewicz W, et al. Apoptosis of monocytes and prolonged survival of granulocytes as a result of phagocytosis of bacteria [J]. *Infect Immun*, 1996, 64(10): 4 242~4 248.
- [7] 管俊昌, 夏佩莹. 产 B 型肠毒素金黄色葡萄球菌及其 L 型某些致病物质的比较 [J]. 蚌埠医学院学报, 2003, 28(2): 106~107.
- [8] Itoh N, Tsujimoto Y, Nagat S. Effect of bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death [J]. *J Immunol*, 1993, 151(2): 621~627.
- [9] Nagata S, Golstein P. The Fas death factor [J]. *Science*, 1995, 267(5 203): 1 449~1 456.
- [10] Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis [J]. *Nat Med*, 1997, 3(8): 614~620.
- [11] Roughton SA, Lareu RR, Bittles AH, et al. Fas and Fas ligand messenger ribonucleic acid and protein expression in the rat corpus luteum during apoptosis-mediated luteolysis [J]. *Biol Reprod*, 1999, 60(4): 797~804.

欢 迎 订 阅

蚌 埠 医 学 院 学 报

邮发代号 26-37

国外代号 BM 6535

全年定价 48.00 元