



## 肺炎链球菌触发肺 II 型上皮细胞微丝肌动蛋白重排的钙信号转导机制

肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, S. pn)是一种常见的革兰氏阳性致病菌,所致临床发病率和死亡率均较高[1]。目前,由于多糖荚膜疫苗免疫原性较弱及耐药现象的出现,使预防及治疗具有一定的局限性。有文献资料报道,肠致病性大肠埃希氏菌及沙门氏菌等革兰氏阴性致病菌粘附宿主细胞可使胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 增加,由此触发微丝肌动蛋白(F-actin)细胞骨架重排,进而侵袭宿主细胞[2][3]。 $Ca^{2+}$ 除具有信号转导功能外,还具有直接参与由细胞内肌动蛋白引起的兴奋-收缩耦联效应这一重要的生理功能。基于此,本研究旨在探讨S. pn是否通过钙信号转导触发F-actin细胞骨架重排,进而侵袭肺 II 型上皮细胞(A549)。这将为最终阐明S. pn的致病机制提供科学的理论依据,为开发新一代治疗S. pn感染性疾病的药物提供新思路。

### 1 材料和方法

#### 1.1 实验菌株

S. pn为标准菌株SIII型,购自中国科学院菌种保藏中心。对该菌的生物学特征鉴定结果如下:(1)光镜检查示革兰氏染色阳性,在C+Y半合成培养基中成双和链状生长,钝端相对,尖端相背;(2)血平板示半透明、光滑、扁平小菌落,周围可见草绿色溶血环,48 h后菌落中央出现脐窝状凹陷;(3)生化反应示胆汁溶菌试验(+)、菊糖分解试验(+)

#### 1.2 实验细胞株

肺 II 型上皮细胞(A549)购自中科院上海细胞所细胞库。

#### 1.3 主要试剂及配制

1.3.1 C+Y半合成S. pn培养基 含Yeast抽提物[4],抽滤灭菌分装,4 °C保存,用于培养S. pn。培养条件:37 °C恒温水浴静置培养。

1.3.2 RPMI-1640细胞培养基 用于培养A549细胞。每升培养液中含RPMI 1640粉剂10.4 g(购自GIBCO)、HEPES 4.8 g(购自中科院上海生化所东风生化技术公司)、 $NaHCO_3$  2.0 g、经灭活的胎牛血清(FCS)100 ml、青霉素及链霉素各100 U/ml,调节pH 7.4,抽滤灭菌,分装,-20 °C保存。

1.3.3 FCS 购自杭州四季青生物工程材料研究所,特级,无支原体。初用前56 °C、30 min灭活补体。-20 °C分装冻存。

1.3.4 胰酶 购自Serva。溶于pH 7.4的PBS溶液,浓度为0.25%,抽滤灭菌,4 °C保存。

1.3.5 Fura-2/AM 购自Sigma。用DMSO溶解分装后-20 °C避光保存,浓度为1 mg/ml。使用时终浓度为5  $\mu$ mol/L。

1.3.6 测钙离子用D-Hanks液  $NaCl$  8.0 g,  $KH_2PO_4$  0.6 g,  $KCl$  0.4 g,  $NaHCO_3$  0.42 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.197 g,  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  0.1185 g,  $Glucose$  5.0 g,用去离子水800 ml溶解,调pH 7.6,最后定容至1 000 ml,抽滤灭菌,4 °C分装保存。

1.3.7 负载液 含10%FCS、0.5%BSA的RPMI-1640培养基,调pH至7.6,抽滤灭菌,4 °C分装保存。

1.3.8 洗涤液 含0.2%BSA的D-Hanks液, 调pH 7.6, 临时配制。

1.3.9 细胞内钙离子测定液 含0.2%BSA、0.1mmol/L EGTA的D-Hanks液, 调pH 7.6, 抽滤灭菌, 4℃分装保存。

1.3.10 FITC-phalloidin 购自Sigma。用含1%DMSO的PBS溶液(pH 7.4)配制, 浓度为5 μg/ml, 分装, -20℃避光保存。

1.3.11 信号转导抑制剂dantrolene 购自Sigma。用DMSO溶解, 分装, -20℃避光保存。原始浓度为10 000 μmol/L。

1.3.12 多聚甲醛溶液 称取多聚甲醛0.4 g, 置于烧杯中, 加入80 ml 0.01 mol/L PBS溶液, 加热至60℃左右, 持续搅拌, 使其完全溶解, 加入少许1 mol/L NaOH溶液至清亮, 用0.01 mol/L PBS定容至100 ml, pH 7.4。室温放置。

1.3.13 胰蛋白胨-植琼脂血平板的制备 称取胰蛋白胨15.0 g, 植物蛋白胨5.0 g,  $K_2HPO_4$  2.5 g, NaCl 5.0 g, Glucose 2.5 g, 琼脂粉15.0 g, 加入双蒸水800 ml溶解, 调节pH(7.3±0.2), 分装, 121℃灭菌15 min, 4℃保存。将上述TSA培养基(呈固态)加热溶化, 当冷至50℃左右时, 加入5%的去纤维绵羊血, 摇匀, 倒血平板, 4℃保存。

1.3.14 细胞松弛素D 购自Sigma。用DMSO溶解, 原液浓度为1 mg/ml, -20℃分装保存。

1.3.15 I型胶原酶 购自Sigma。用含10%FCS的RPMI-1640培养液配制, 浓度为0.25%, 抽滤灭菌。4℃保存。

#### 1.4 方法

1.4.1 S.pn培养 将S.pn接种于C+Y培养基中, 37℃水浴静置培养至对数生长中后期( $D_{620}=0.4$ , 约 $10^8$ 菌落形成单位/ml)。用于整个实验时, 先离心(2 500 r/min、10 min), 再用预冷的PBS洗3次, 不含双抗RPMI-1640悬浮至 $10^8$ 菌落形成单位/ml。

1.4.2 A549培养 将A549细胞接种于含适量RPMI-1640培养液的培养瓶或培养板孔中, 用于整个实验。

1.4.3 S.pn作用于A549细胞后F-actin的FITC-phalloidin荧光染色 将A549细胞接种于带小块盖玻片的24孔培养板孔中, 待其呈单层生长后, 吸出孔内培养液, 用PBS轻轻冲洗3次; 加入用不含双抗的RPMI-1640培养液悬浮的对数生长中后期S.pn菌液, 轻轻混匀, 37℃、5%CO<sub>2</sub>孵箱中温育2 h; 夹出小盖玻片, 用PBS轻轻冲洗5次, 4%多聚甲醛室温固定15 min; 用PBS轻轻冲洗5次, 沥干水份(勿干燥), 每张盖玻片上加10 μl FITC-phalloidin荧光染料, 室温潮湿暗盒中静置40 min; 用PBS轻轻冲洗5次, 沥干; 用无荧光软布擦净其背面, 置于洁净无荧光载玻片上, 荧光显微镜下观察F-actin重排情况。同时设不受S.pn感染的A549细胞作为对照。

1.4.4 信号传导抑制剂dantrolene预处理A549细胞后F-actin的FITC-phalloidin荧光染色 同1.4.3。只是在加入S.pn前, 分别加入预先用RPMI-1640稀释混匀并使其成梯度浓度的抑制剂, 预处理A549细胞30 min, 再加入S.pn混匀, 继续作用2 h。荧光镜下观察F-actin的重排情况。

1.4.5 F-actin的重排计分标准[5] 荧光镜下显示典型F-actin聚集结构者计1分, 非典型者计0.5分, 没有发生聚集者计0分, 每张盖玻片计数200个细胞。F-actin重排百分率(%)=总计分/200×100%。

1.4.6 S.pn侵袭A549细胞实验 将A549细胞接种于24孔培养板孔中, 待其呈单层生长(约 $5 \times 10^5$ /ml)后, 用PBS轻轻冲洗3次; 加入用不含双抗的RPMI-1640培养液悬浮的对数生长中后期S.pn菌液, 轻轻混匀; 用水平式离心机1 000 r/min离心10 min, 以促进其粘附A549; 37℃、5%CO<sub>2</sub>孵箱中温育2 h后, 用无菌PBS轻轻洗3次; 加入含1%FCS、10 U/ml青霉素、200 U/ml庆大霉素的RPMI-1640培养液; 37℃、5%CO<sub>2</sub>孵箱孵育1 h, 以充分杀死胞外S.pn; 用无菌PBS洗3次, 加入100 μl 0.25%胰酶使贴壁细胞悬浮, 再加入400 μl 0.025% TritonX-100裂解细胞3 min, 10倍稀释后吸取100 μl涂布琼脂血平板[6]; 37℃、5% CO<sub>2</sub>孵箱培养过夜, 计数平板上的菌落数。S.pn侵袭入A549的个数=平板上计数的菌落数/每培养孔的细胞数。

1.4.7 细胞松弛素D对S.pn侵袭入A549细胞的作用 同1.4.6方法。在加入S.pn前, 用不同浓度的细胞松弛素D处理A549细胞2 h, 然后再加入S.pn继续温育2 h, 同样计数侵入A549的S.pn数。

1.4.8 A549细胞内[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>测定 用0.25%胰酶消化贴壁单层A549, D-Hanks液洗3次; 用2 ml负载液

悬浮细胞，加入10  $\mu\text{l}$  Fura-2/AM溶液(终浓度为5  $\mu\text{mol/L}$ )，混匀，37  $^{\circ}\text{C}$ 水浴避光振荡40 min。将负载后细胞用含0.2% BSA的D-Hanks液洗3次，用细胞内钙测定液悬浮细胞。锥虫蓝染色检查细胞活力 $>90\%$ [7]，并调整细胞数至 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 。测定前将仪器比色器恒定在37  $^{\circ}\text{C}$ ，分别扫描标准品及负载后细胞悬液的激发波长和发射波长以判断负载是否成功，选择负载后细胞悬液的激发波长和发射波长为测定波长。胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 由下式计算： $[\text{Ca}^{2+}]_i (\text{nmol/L}) = K_d \times (F - F_{\min}) / (F_{\max} - F)$ ，式中 $K_d$ 为Fura-2/ $\text{Ca}^{2+}$ 的解离常数，在37  $^{\circ}\text{C}$ 时为224 nmol/L，F为在不同条件下测定的荧光强度值； $F_{\max}$ 为加入终浓度为0.1% TrtonX-100后的最大荧光强度值， $F_{\min}$ 为在 $F_{\max}$ 基础上再加入终浓度为5 mmol/L EGTA时的最小荧光强度值[8]。

1.4.9 S. pn作用A549后的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 测定 将A549接种于24孔培养板孔。单层贴壁(约 $5 \times 10^5/\text{孔}$ )后吸出孔内液体，各孔加入无双抗RPMI-1640培养液悬浮的 S. pn菌液(约 $10^8$ 菌落形成单位/ml)，37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 分别温育30、60、90 min，收集12孔细胞于一塑料试管中。收集细胞方法：在温育后用无菌PBS(pH 7.4)洗涤细胞6次；用含0.25%胶原酶的RPMI-1640温育消化细胞10 min；再用含5%FCS的PBS洗2次，负载并测定计算A549细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的方法同1.4.8。

#### 1.4.10 统计学处理

使用SAS软件进行相关系数的计算，组间比较采用方差分析。

## 2 结果

### 2.1 完整的S. pn触发A549细胞F-actin细胞骨架重排

S. pn作用A549细胞后，F-actin经FITC-phalloidin染色呈圆形深黄色聚集(图1)；对照细胞无上述变化，呈现均匀黄色荧光外观(图2)。

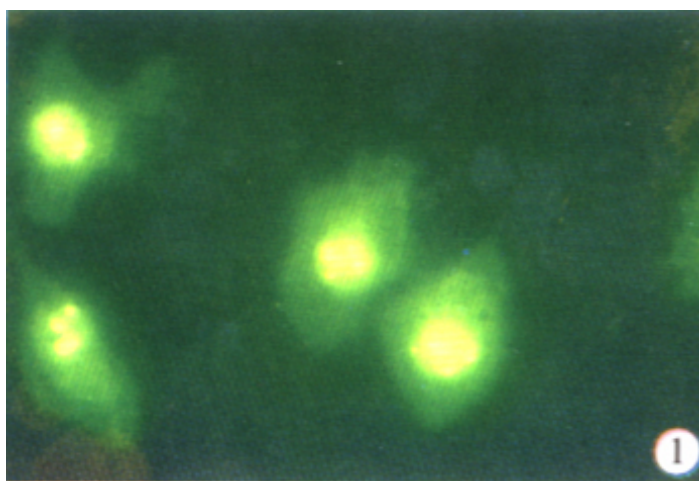


图1 完整的S. pn作用A549细胞2 h后F-actin在荧光显微镜下呈黄色并圆形聚集(原放大倍数： $\times 400$ )

Fig.1 Round aggregation of yellow F-actin in A549 cells observed under fluoroscopy after intact S. pn adhesion of A549 for 2 h(Original magnification: $\times 400$ )

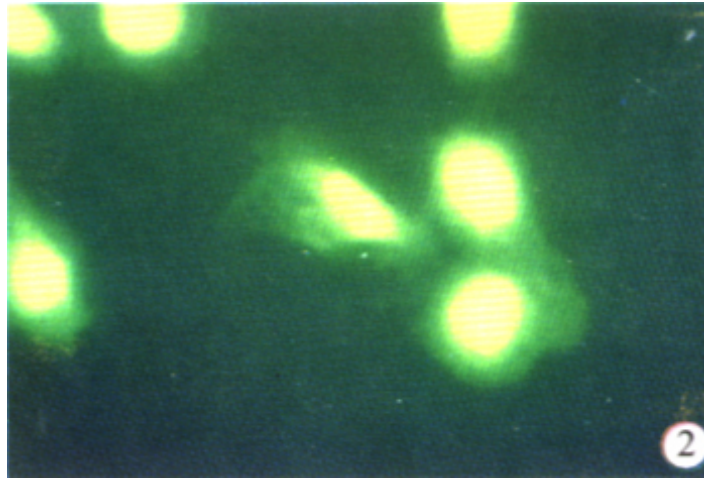


图2 对照A549细胞内F-actin在荧光显微镜下呈黄色并均匀分布(原放大倍数: ×400)  
 Fig.2 Even distribution of yellow F-actin in control A549 cells observed under  
 fluoroscopy(Original magnification:×400)

## 2.2 F-actin重排与S. pn侵袭A549细胞的关系

分别用0、0.10、0.25和0.50  $\mu\text{g/ml}$ 细胞松弛素D预处理A549, S. pn侵袭数分别为(152 $\pm$ 31)、(19 $\pm$ 10)、0和0 CFU/孔, 不同浓度细胞松弛素D预处理A549细胞后的侵袭数与对照组(细胞松弛素D浓度为0  $\mu\text{g/ml}$ )比较有显著差异( $P<0.001$ )。细胞松弛素D可明显减低S. pn对A549的侵袭, 而且其浓度增加至0.25  $\mu\text{g/ml}$ 时, 未得到可测的侵袭数, 提示F-actin细胞骨架重排可导致S. pn侵袭A549细胞。

## 2.3 S. pn触发A549细胞F-actin细胞骨架重排钙信号转导机制

2.3.1  $\text{Ca}^{2+}$ 抑制剂dantrolene对F-actin重排的抑制作用 分别用0、10、25、50和100  $\mu\text{mol/L}$  dantrolene预处理A549, F-actin的重排百分率(%)分别为100、75.77 $\pm$ 4.76、60.21 $\pm$ 6.05、41.57 $\pm$ 4.13和15.21 $\pm$ 3.74, 不同浓度 $\text{Ca}^{2+}$ 抑制剂dantrolene预处理A549细胞后的F-actin的重排百分率与对照组(dantrolene浓度为0  $\mu\text{mol/L}$ )比较有显著差异( $P<0.001$ )。F-actin细胞骨架重排与信号转导抑制剂dantrolene间存在剂量依赖关系。图3显示用 $\text{Ca}^{2+}$ 抑制剂dantrolene 预处理A549细胞后, 在荧光显微镜下F-actin细胞骨架重排被部分抑制; 图4显示DMSO对重排无影响。

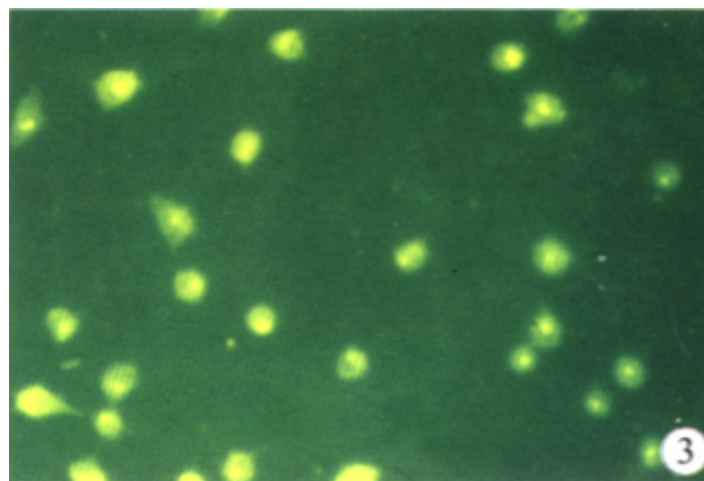


图3 Dantrolene预处理后F-actin聚集被部分抑制(原放大倍数: ×200)  
 Fig.3 F-actin aggregation partly inhibited by 25  $\mu\text{mol/L}$  dantrolene(Original  
 magnification:×200)



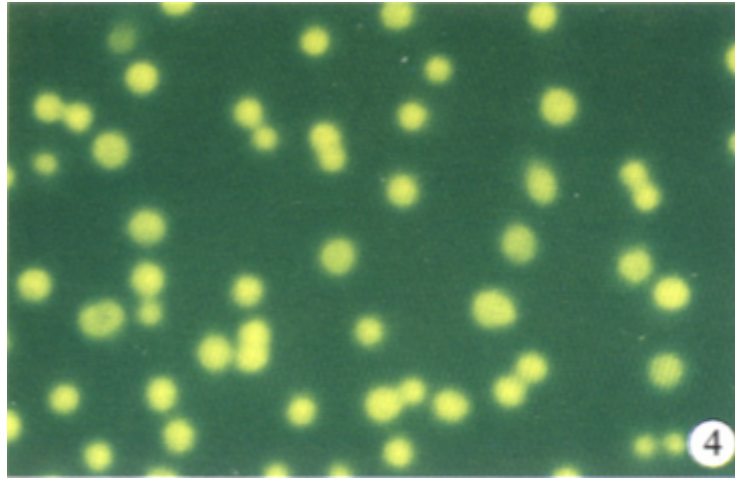


图4 DMSO作用A549细胞后F-actin不发生聚集(原放大倍数:  $\times 200$ )

Fig. 4 F-actin without aggregation after DMSO treatment of A549 cells(Original magnification:  $\times 200$ )

2.3.2 Fura-2/AM标准液和负载后A549细胞悬液扫描 Fura-2/AM标准液和负载后A549细胞悬液的激发波长分别为375和350 nm, 发射波长为485和485 nm。

2.3.3 对照549细胞 $[Ca^{2+}]_i$  细胞外 $[Ca^{2+}]_i$ 为1.3 mmol/L时, 对照A549细胞的胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 为 $(194.1 \pm 17.4)$  nmol/L( $n=4$ ); 测定液中不含 $Ca^{2+}$ 并加入0.1 mmol/L EGTA时, A549细胞的胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 为 $(166.6 \pm 20.8)$  nmol/L( $n=4$ ), 二者比较无显著意义。

2.3.4 S. pn作用于A549细胞后胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 测定 S. pn粘附A549细胞30、60、90 min后的胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 高于对照 $[(187.4 \pm 17.3)$  nmol/L],  $P < 0.001$ 并达到饱和, 分别为 $(487.5 \pm 38.1)$ 、 $(548.2 \pm 35.6)$ 和 $(557.2 \pm 47.5)$  nmol/L。

### 3 讨论

病原菌侵袭宿主细胞是传染过程建立的重要环节之一, 病原菌通常借助宿主细胞F-actin细胞骨架的高度可塑性及其运动功能而侵袭细胞[9]。研究S. pn是否通过F-actin细胞骨架侵袭宿主细胞及其信号转导机制, 对于阐明其致病机制有重要意义。

#### 3.1 S. pn触发A549细胞F-actin细胞骨架重排及F-actin细胞骨架重排在S. pn侵袭A549细胞中的作用

本研究证实完整的S. pn可触发A549细胞F-actin细胞骨架重排, 这与文献所报道的关于革兰氏阴性病原菌作用于宿主细胞后的结果有类似之处, 也是到目前为止, 首次描述S. pn触发A549细胞F-actin细胞骨架重排的形态学特征。为进一步研究F-actin细胞骨架重排在S. pn侵袭A549细胞中的作用, 我们用不同浓度的细胞松弛素D预处理A549细胞, 观察侵袭数的变化, 发现随抑制剂浓度增大, 侵袭数明显降低, 并在浓度为0.25  $\mu$ g/ml时, 未得到可测的侵袭数, 提示F-actin细胞骨架重排在S. pn侵袭A549细胞中起着非常重要的作用, 它可直接影响S. pn侵袭A549细胞。

#### 3.2 S. pn触发A549细胞F-actin细胞骨架重排的钙信号转导机制

目前为止, 文献中尚无关于S. pn可触发A549细胞F-actin细胞骨架重排机制的报道。我们通过研究发现S. pn可通过钙信号转导途径触发A549细胞F-actin细胞骨架重排, F-actin细胞骨架重排百分率与该抑制剂间存在剂量依赖关系, 二者变化呈高度负相关, 相关系数为 $r = -0.86$ 。S. pn作用于A549细胞可引起胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化, S. pn粘附A549细胞30、60、90 min后胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 均比对照组约高3倍, 由此提示S. pn粘附A549细胞可使胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 增加, F-actin细胞骨架发生重排是由S. pn粘附A549细胞后触发钙信号转导途径引起的。其最可能的机制为: S. pn粘附A549细胞, 使胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 增加, 而 $Ca^{2+}$ 可影响多种F-actin结合蛋白活性[10]

[11]。S. pn很可能通过钙信号转导使多种F-actin结合蛋白活性发生变化，活性变化大小与F-actin细胞骨架重排百分率成比例，但有关S. pn通过Ca<sup>2+</sup>信号转导途径引起与F-actin细胞骨架重排相关的A549细胞是何种蛋白的变化，以及其与A549细胞内Ca<sup>2+</sup>振荡的调节或相关关系还有待进一步研究。

#### 参考文献：

[1]Gillespie SH. Aspects of pneumococcal infection including bacterial virulence, host response and vaccination[J]. J Med Microbiol, 1989, 28(9): 237-48.

[2]Dytoc M, Fedorko L, Sherman PM. Signal transduction in human epithelial cells infected with attaching and effacing Escherichia coli in vitro[J]. Gastroenterology, 1999, 106(21): 1150-61.

[3]Philpott DJ, Ismaili A, Dytoc MT. Increased adherence of Escherichia coli RDEC-1 to human tissue culture cells results in the activation of host signaling pathways[J]. J Infect Dis, 1995, 172(13): 136-43.

[4]Lacks SA. Study of genetic material determining an enzyme activity in pneumococcus [J]. Biochem Biophys Acta, 1960, 39(7): 508-17.

[5]Peiffer I, Servin AL, Bernet-Camard MF. Piracy of decay-accelerating factor (CD55) by the diffusely adhering strain Escherichia coli C1845 promotes cytoskeletal F-actin rearrangements in cultured human intestinal INT407 cells[J]. Infect Immun, 1998, 66(9): 4036-42.

[6]Paton JC. Molecular analysis of the pathogenicity of streptococcus pneumoniae: the role of pneumococcal proteins[J]. Annu Rev Microbiol, 1993, 47(22): 89-115.

[7]刘振伟. 用Fura-2测定缺氧时海马细胞内游离钙离子浓度的变化[J]. 细胞生物学杂志 (J Cytobiol), 1994, 16(3): 141-3.

[8]Dana JP, Ismaili A, Dytoc MT, et al. Increased adherence of Escherichia coli RDEC-1 to human tissue culture cells results in the activation of host signaling pathways[J]. J Infect Dis, 1998, 172(1): 136-43.

[9]Mitchell TJ. Cellular microbiology: an integrated approach to understanding pathogenesis of infection[J]. J Cell Sci, 2000, 113(pt19): 3355-6.

[10]杨建一. 医学细胞生物学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 127-48.

[11]Finlay BB, Cossart P. Exploitation of mammalian host cell function by bacterial pathogens[J]. Science, 1997, 276(5313): 718-25.

#### 参考文献：

[1]Gillespie SH. Aspects of pneumococcal infection including bacterial virulence, host response and vaccination[J]. J Med Microbiol, 1989, 28(9): 237-48.

[2]Dytoc M, Fedorko L, Sherman PM. Signal transduction in human epithelial cells infected with attaching and effacing Escherichia coli in vitro[J]. Gastroenterology, 1999, 106(21): 1150-61.

[3]Philpott DJ, Ismaili A, Dytoc MT. Increased adherence of Escherichia coli RDEC-1 to human tissue culture cells results in the activation of host signaling pathways[J]. J Infect Dis, 1995, 172(13): 136-43.

[4]Lacks SA. Study of genetic material determining an enzyme activity in pneumococcus [J]. Biochem Biophys Acta, 1960, 39(7): 508-17.

[5]Peiffer I, Servin AL, Bernet-Camard MF. Piracy of decay-accelerating factor (CD55) by the diffusely adhering strain Escherichia coli C1845 promotes cytoskeletal F-

actin rearrangements in cultured human intestinal INT407 cells[J]. Infect Immun, 1998, 66(9): 4036-42.

[6]Paton JC. Molecular analysis of the pathogenicity of streptococcus pneumoniae: the role of pneumococcal proteins[J]. Annu Rev Microbiol, 1993, 47(22): 89-115.

[7]刘振伟. 用Fura-2测定缺氧时海马细胞内游离钙离子浓度的变化[J]. 细胞生物学杂志 (J Cytobiol), 1994, 16(3): 141-3.

[8]Dana JP, Ismaili A, Dytoc MT, et al. Increased adherence of Escherichia coli RDEC-1 to human tissue culture cells results in the activation of host signaling pathways[J]. J Infect Dis, 1998, 172(1): 136-43.

[9]Mitchell TJ. Cellular microbiology: an integrated approach to understanding pathogenesis of infection[J]. J Cell Sci, 2000, 113(pt19): 3355-6.

[10]杨建一. 医学细胞生物学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 127-48.

[11]Finlay BB, Cossart P. Exploitation of mammalian host cell function by bacterial pathogens[J]. Science, 1997, 276(5313): 718-25.

---

[回结果列表](#)