

后菌落中央出现脐窝状凹陷。生化反应示胆汁溶菌试验、葡萄糖分解试验。

1.2 实验细胞株

肺域型上皮细胞 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、抽滤灭菌分装。用于培养 S.pn。培养条件：37℃ 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、GIBCO 的 HEPES 4.8 g、NaHCO₃ 2.0 g、经灭活的胎牛血清 100 ml、青霉素及链霉素各 100 U/ml。调节 pH 7.4。抽滤灭菌分装。保存。

1.3.3 FCS 购自杭州四季青生物工程材料研究所。支原体检测前用 56℃ 30 min 灭活补体。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。保存。

1.3.5 Fura-2/AM 购自 Sigma。用 DMSO 溶解分装。后 -20℃ 避光保存。浓度为 1 mg/ml。使用时终浓度为 5 μmol/L。

1.3.6 测钙离子用 D-Hanks 液 NaCl 8.0 g、H₂PO₄ 0.6 g、Cl 0.4 g、NaHCO₃ 0.42 g、MgSO₄·7H₂O 0.197 g、Na₂HPO₄·2H₂O 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。分装保存。

1.3.7 负载液 含 10% FCS、5% BSA 的 RPMI-1640 培养基。调 pH 至 7.6。抽滤灭菌。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、1 mmol/L EGTA 的 D-Hanks 液。调 pH 7.6。抽滤灭菌。分装保存。

1.3.10 FITC-phalloidin 购自 Sigma。用含 1% DMSO 的 PBS 溶液。调 pH 7.4。浓度为 5 μg/ml。分装。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 份避光保存。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、Na₂HPO₄ 2.5 g、CaCl₂ 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。依 21 份分装。15 min 灭菌。保存。上述 TSA 培养基。加热溶化。冷至 50℃ 左右时。加入 5% 的去纤维绵羊血。混匀。倒血平板。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 份分装。保存。

1.3.15 玉型胶原酶 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。7℃ 水浴静置培养。至对数生长中后期。约 10⁸ 菌落形成单位/ml。用于整个实验时。离心 500 r/min。30 min。再用预冷的 PBS 洗 3 次。不含双抗 RPMI-1640 悬浮至 10⁸ 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。取出孔内培养液。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。7% CO₂ 孵箱中温育 2 h。取出小盖玻片。用 PBS 轻轻冲洗 5 次。多聚甲醛室温固定 15 min。用 PBS 轻轻冲洗 5 次。沥干水份。干燥。每张盖玻片上加 10 μg 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 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 × 10⁵/ml。

后袁用 PBS 轻轻冲洗 3 次曰加入用不含双抗的 RPMI-1640 培养液悬浮的对数生长中后期 S.pn 菌液袁轻轻混匀曰用水平式离心机 1 000 r/min 离心 10 min袁以促进其粘附 A549曰7 益尧% CO₂ 孵箱中温育 2 h 后袁用无菌 PBS 轻轻洗 3 次曰加入含 1%FCS尧0 U/ml 青霉素尧00 U/ml 庆大霉素的 RPMI-1640 培养液曰7 益尧% CO₂ 孵箱孵育 1 h袁以充分杀死胞外 S.pn曰用无菌 PBS 洗 3 次曰加入 100 滋 0.25%胰酶使贴壁细胞悬浮袁再加入 400 滋 0.025% TritonX-100 裂解细胞 3 min袁0 倍稀释后吸取 100 滋涂布琼脂血平板曰7 益尧% CO₂ 孵箱培养过夜袁计数平板上的菌落数遥S.pn 侵袭入 A549 的个数 = 平板上计数的菌落数 / 每培养孔的细胞数遥

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 方法遥在加入 S.pn 前袁用不同浓度的细胞松弛素 D 处理 A549 细胞 2 h袁然后再加入 S.pn 继续温育 2 h袁同样计数侵入 A549 的 S.pn 数遥

1.4.8 A549 细胞内[Ca²⁺]_i 测定 用 0.25%胰酶消化贴壁单层 A549袁D-Hanks 液洗 3 次曰用 2 ml 负载液悬浮细胞袁加入 10 滋 Fura-2/AM 溶液渊浓度为 5 滋mol/L袁混匀袁7 益水浴避光振荡 40 min遥将负载后细胞用含 0.2% BSA 的 D-Hanks 液洗 3 次袁用细胞内钙测定液悬浮细胞遥维虫蓝染色检查细胞活力 >90%遥调整细胞数至 2伊0⁶/ml遥测定前将仪器比色器恒定在 37 益袁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袁选择负载后细胞

悬液的激发波长和发射波长为测定波长遥胞内[Ca²⁺]_i 由下式计算渊Ca²⁺]_i(nmol/L)=K_d伊(F-F_{min})/(F_{max}-F)袁式中 K_d 为 Fura-2/Ca²⁺ 的解离常数袁在 37 益时为 224 nmol/L袁F 为在不同条件下测定的荧光强度值袁F_{max} 为加入终浓度为 0.1% TrtonX-100 后的最大荧光强度值袁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遥

1.4.9 S.pn 作用 A549 后的[Ca²⁺]_i 测定 将 A549 接种于 24 孔培养板孔遥单层贴壁渊5伊0⁵/孔袁后吸出孔内液体袁各孔加入无双抗 RPMI-1640 培养液悬浮的 S.pn 菌液 渊10⁸ 菌落形成单位 /ml袁7 益尧% CO₂ 分别温育 30尧0尧0 min袁收集 12 孔细胞于一塑料试管中遥收集细胞方法渊在温育后用无菌 PBS渊H 7.4冤洗涤细胞 6 次曰用含 0.25%胶原酶的 RPMI-1640 温育消化细胞 10 min曰再用含 5%FCS 的 PBS 洗 2 次袁负载并测定计算 A549 细胞内[Ca²⁺]_i 的方法同 1.4.8遥

1.4.10 统计学处理 使用 SAS 软件进行相关系数的计算袁组间比较采用方差分析遥

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 细胞后袁F-actin 经 FITC-phalloidin 染色呈圆形深黄色聚集 渊图 1冤曰对照细胞无上述变化袁呈现均匀黄色荧光外观 渊图 2冤遥

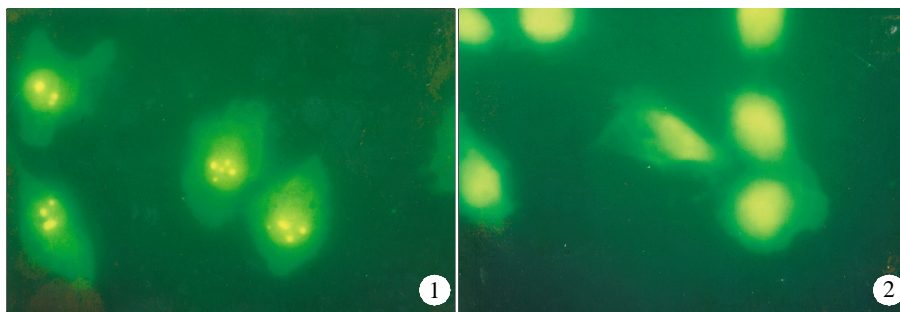


图 1 完整的 S.pn 作用 A549 细胞 2 h 后 F-actin 在荧光显微镜下呈黄色并圆形聚集 渊放大倍数渊伊00冤
Fig.1 Round aggregation of yellow F-actin in A549 cells observed under fluoroscopy after intact S.pn adhesion of A549 for 2 h 渊original magnification:伊00冤

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 渊放大倍数渊伊00冤
Fig.2 Even distribution of yellow F-actin in control A549 cells observed under fluoroscopy 渊original magnification:伊00冤

2.2 F-actin 重排与 S.pn 侵袭 A549 细胞的关系

分别用 0尧.10尧.25 和 0.50 滋/ml 细胞松弛素 D 预处理 A549袁S.pn 侵袭数分别为 渊52 依 1 冤尧渊9 依 10 冤尧0 和 0 CFU/孔袁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渊细胞松弛素 D 浓度为 0 滋/ml冤比较有显著差异 渊<0.001冤遥细胞松弛素

D 可明显减低 S.pn 对 A549 的侵袭袁而且其浓度增加至 0.25 滋/ml 时袁未得到可测的侵袭数袁提示 F-actin 细胞骨架重排可导致 S.pn 侵袭 A549 细胞遥

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 Ca²⁺ 抑制剂 dantrolene 对 F-actin 重排的抑制作

用 分别用 0 尧 0.5 尧 0 和 100 兹mol/L dantrolene 预
处理 A549 表-actin 的重排百分率 渊分别为 100 尧
75.77 依.76 尧 0.21 依.05 尧 1.57 依.13 和 15.21 依.74 尧
不同
浓度 Ca²⁺ 抑制剂 dantrolene 预处理 A549 细胞后的
F-actin 的重排百分率与对照组 渊antrolene 浓度为

0 兹mol/L 渊比较有显著差异 渊<0.001 渊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 遥图 3 显示用 Ca²⁺ 抑制剂 dantrolene 预处理
A549 细胞后 袁在荧光显微镜下 F-actin 细胞骨架重排
被部分抑制 渊图 4 显示 DMSO 对重排无影响 遥

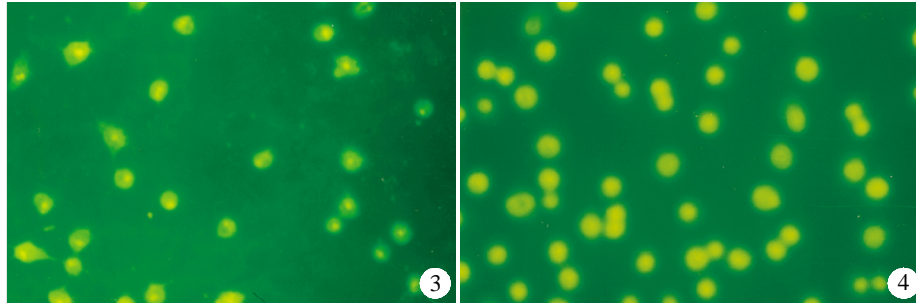


图 3 Dantrolene 预处理后 F-actin 聚集被部分抑制 渊原放大倍数 渊 200 渊

Fig.3 F-actin aggregation partly inhibited by 25 兹mol/L dantrolene 渊original magnification: 渊 200 渊

图 4 DMSO 作用 A549 细胞后 F-actin 不发生聚集 渊原放大倍数 渊 200 渊

Fig.4 F-actin without aggregation after DMSO treatment of A549 cells 渊original magnification: 渊 200 渊

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 350nm 袁发射波长为 485 和 485nm 遥
2.3.3 对照 549 细胞 [Ca²⁺]_i 细胞外 [Ca²⁺]_e 为 1.3 mmol/L
时 袁对照 A549 细胞的胞内 [Ca²⁺]_i 为 渊94.1 依.74 渊mol/L
渊=4 渊测定液 中不含 Ca²⁺ 并加入 0.1 mmol/L EGTA
时 袁 A549 细胞的胞内 [Ca²⁺]_i 为 渊66.6 依.08 渊nmol/L
渊=4 渊二者比较无显著意义 遥

2.3.4 S.pn 作用于 A549 细胞后胞内 [Ca²⁺]_i 测定 S.pn
粘附 A549 细胞 30 尧 0 尧 0 min 后的胞内 [Ca²⁺]_i 高于
对照 渊渊87.4 依.73 nmol/L 渊袁 <0.001 渊并达到饱和 袁分别
为 渊87.5 依.81 渊渊渊48.2 依.56 渊渊渊57.2 依.75 渊渊mol/L 遥

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 袁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 渊渊研究 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 袁对于阐明其致病机制有重要意义 遥

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 袁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 袁
也是到目前为止 袁首次描述 S.pn 触发 A549 细胞
F-actin 细胞骨架重排的形态学特征 遥为进一步研究
F-actin 细胞骨架重排在 S.pn 侵袭 A549 细胞中的作
用 袁我们用不同浓度的细胞松弛素 D 预处理 A549 细

胞 袁观察侵袭数的变化 袁发现随抑制剂浓度增大 袁袭
数明显降低 袁并在浓度为 0.25 兹/ml 时 袁未得到可测
的侵袭数 袁提示 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 袁它可直接影响 S.pn
侵袭 A549 细胞 遥

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 袁文献中尚无关于 S.pn 可触发 A549 细
胞 F-actin 细胞骨架重排机制的报道 遥我们通过研究
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 袁-actin 细胞骨架重排百分率
与该抑制剂间存在剂量依赖关系 袁二者变化呈高度负
相关 渊相关系数为 r=-0.86 渊S.pn 作用于 A549 细胞可
引起胞内 [Ca²⁺]_i 的变化 袁.pn 粘附 A549 细胞 30 尧 0 尧
90 min 后胞内 [Ca²⁺]_i 均比对照组约高 3 倍 袁由此提示
S.pn 粘附 A549 细胞可使胞内 [Ca²⁺]_i 增加 袁-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 遥其最可能的机制为 渊.pn 粘附
A549 细胞 袁使胞内 [Ca²⁺]_i 增加 袁而 Ca²⁺ 可影响多种
F-actin 结合蛋白活性 渊渊渊.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 袁活性变化
大小与 F-actin 细胞骨架重排百分率成比例 袁但有关
S.pn 通过 Ca²⁺ 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 袁以及其与
A549 细胞内 Ca²⁺ 振荡的调节或相关关系还有待进
一步研究 遥

原始序列的大量信息¹⁰⁻¹²。本研究采用 IUAC 正则表达式的方法表示调控元件模块在较大程度上放宽对保守片段之间距离的情况下搜索结果中假阳性的出现仍然较少。提示该方法的特异性可能较高。

对于上述两种方法获得的序列再进行转录因子位置权重矩阵的评估。从结果上看许多序列含有 RFX 及 NFY 转录因子结合位点。说明在进行过程中反应元件有相当的保守性。

为在更大规模上实现上述步骤并能不断地加入新的方法。我们基于大型计算机的 UNIX 操作系统和界面友好的 Window 操作系统。以面向对象的程序设计方法重新编写或写或利用各种算法。并建立了相应的数据库系统。以期为进一步的工作打下坚实基础。由于物种多样性及基因组本身的复杂性。处于非编码区的调控元件模块变异程度相当大。因此调控元件模块预测方法尚很不成熟。只有结合大规模的数据分析及深入的真核基因调控实验才有可能完全了解调控信息的编码方式。

参考文献

Davidson EH, Rast JP, Oliveri P, et al. A genomic regulatory network for development. *Science*, 2002, 295(5560): 1669-78.
 Berman BP, Nibu Y, Pfeiffer BD, et al. Exploiting transcription factor binding site clustering to identify cis-regulatory modules involved in pattern formation in the Drosophila genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(2): 757-62.
 Ghosh D. Object-oriented transcription factors database (ooTFD).

Nucleic Acids Res, 2000, 28(1): 308-10.
 Smith TF, Waterman MS. Identification of common molecular sub-sequences. *J Mol Biol*, 1981, 147: 195-7.
 Wingender E, Dietze P, Karas H, et al. TRANSFAC: a database on transcription factors and their DNA binding sites. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24(1): 238-41.
 Quandt K, Frech K, Karas H, et al. MatInd and MatInspector: fast and sensitive tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(23): 4878-84.
 van-den Elsen PJ, Peijnenburg A, van Eggermond MC, et al. Shared regulatory elements in the promoters of MHC class I and class II genes. *Immunol Today*, 1998, 19(7): 308-12.
 van Helden J, Rios AF, Collado-Vides J. Discovering regulatory elements in non-coding sequences by analysis of spaced dyads. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(8): 1808-18.
 Semba S, Yokozaki H, Yamamoto S, et al. Microsatellite instability in precancerous lesions and adenocarcinomas of the stomach. *Cancer*, 1996, 77(8 Suppl): 1620-7.
 Loots GG, Locksley RM, Blankespoor CM, et al. Identification of a coordinate regulator of interleukins 4, 13, and 5 by cross-species sequence comparisons. *Science*, 2000, 288(5463): 136-140.
 Gottgens B, Barton LM, Gilbert JG, et al. Analysis of vertebrate SCL loci identifies conserved enhancers. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(2): 181-6.
 Rebeiz M, Reeves NL, Posakony JW. SCORE: a computational approach to the identification of cis-regulatory modules and target genes in whole-genome sequence data. Site clustering over random expectation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(15): 9888-93.
 Pennacchio LA, Rubin EM. Genomic strategies to identify mammalian regulatory sequences. *Nat Rev Genet*, 2001, 2(2): 100-9.



渊 接 171 页 冤

参考文献

Gillespie SH. Aspects of pneumococcal infection including bacterial virulence, host response and vaccination. *J Med Microbiol*, 1989, 28(9): 237-48.
 Dytoc M, Fedorko L, Sherman PM. Signal transduction in human epithelial cells infected with attaching and effacing Escherichia coli in vitro. *Gastroenterology*, 1999, 106(21): 1150-61.
 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 Infect Dis*, 1995, 172(13): 136-43.
 Lacks SA. Study of genetic material determining an enzyme activity in pneumococcus. *Biochem Biophys Acta*, 1960, 39(7): 508-17.
 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. *Infect Immun*, 1998, 66(9): 4036-42.
 Paton JC. Molecular analysis of the pathogenicity of streptococcus pneumoniae: the role of pneumococcal proteins. *Annu Rev Microbiol*, 1993, 47(22): 89-115.
 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. *细胞生物学杂志 (J Cytobiol)*, 1994, 16(3): 141-3.
 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 Infect Dis*, 1998, 172(1): 136-43.
 Mitchell TJ. Cellular microbiology: an integrated approach to understanding pathogenesis of infection. *J Cell Sci*, 2000, 113(pt19): 3355-6.
 杨建一. 医学细胞生物学. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 127-48.
 Finlay BB, Cossart P. Exploitation of mammalian host cell function by bacterial pathogens. *Science*, 1997, 276(5313): 718-25.