

S. aureus 对 PMN 粘弹性和细胞骨架影响的研究

胡亚萍¹, 宋关斌², 刘建栋³, 吕火祥³, 许立³, 蔡绍哲²

(1. 上海交通大学, 上海 200030;

2. 重庆大学生物工程学院国家教委生物力学和组织工程开放重点实验室, 重庆 400044

3. 浙江省立医院, 浙江 杭州 310014;)

摘要: 利用微管吸吮技术和免疫组化染色, 研究了在不同浓度金黄色葡萄球菌及其代谢液作用下多形核中性粒细胞粘弹性的变化, 以及在金黄色葡萄球菌作用下 PMN 细胞骨架的改变。结果发现金黄色葡萄球菌代谢液对 PMN 粘弹性无显著影响, 而金黄色葡萄球菌悬液则对 PMN 的粘弹性有显著影响, 各参数值随金黄色葡萄球菌浓度的增加而显著递增, 至金黄色葡萄球菌浓度达 10 倍 PMN 浓度时趋于稳定; 微丝和微管的免疫组化染色发现其细胞骨架形态发生改变, 定量分析其光密度值有显著增加。这些结果表明: PMN 受金黄色葡萄球菌刺激后, 细胞骨架发生了重新组装和骨架蛋白的表达, 使 PMN 刚性和粘性均增加, 促进在局部微循环中滞留粘附, 发生炎性反应。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 多形核中性粒细胞; 粘弹性; 细胞骨架; 微管吸吮技术; 光密度; 大鼠

中图分类号: Q66 文献标识码: A 文章编号: 1000-6737(2001)03-0561-07

多形核中性粒细胞 (Polymorphonuclear Neutrophils, PMN) 是免疫系统中防御外来感染、参与炎性反应的第一道防线, 其活性表现以及功能的发挥与其在血液循环中的流变学行为有重大的关系; 其粘弹性研究一直是血液流变学和微循环领域中的一个经典问题, 以往多侧重于生理状态下或某单一生化因素改变的 PMN 粘弹性研究, 而对于 PMN 这种免疫细胞在其细胞功能激活状态下, 即免疫激活下的粘弹性改变的研究却很少见。因此, 对于 PMN 免疫激活状态下粘弹性的研究, 将可能有助于解释其在病理生理状态下的流变学行为, 阐明其在微循环中的免疫活动过程。而细胞骨架在细胞形态的支持、变形、运动及信息的传导等诸多方面起着重要的作用, 其表达和组装状态的改变将直接影响细胞的粘弹性改变及其流变行为。为此, 本研究选择金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) 这一常见致病菌, 体外制造感染模型, 以研究 PMN 在免疫激活状态下的粘弹性变化以及相应的细胞骨架状态改变, 以探讨可能的病理生理意义及其机制。

1 材料与方法

1.1 粘弹性实验材料制备

1.1.1 PMN 分离: 参考沈关心^[1]方法, 健康成年 Wistar 大鼠眼底取血 3ml, 肝素抗凝, 37℃ 静止 1h, 取血上层沿管壁轻轻加入到另一含等量淋巴细胞分离液 (比重 1.0778/cm³) 的试管, 20℃, 2000r/min 离心 10min; 取中间白膜层再次加入含等量淋巴细胞分离液试管中, 20℃,

收稿日期: 2001-02-06

作者简介: 胡亚萍, 1964年生, 主治医师, 大学, 电话: 0571-85132615-3307, E-mail: yapinghu64@yahoo.com.cn.

2500r/min 离心 20min 后弃上清;沉淀部分以 RPMI1640 清洗 2 次(20℃, 1500r/min, 5min), 然后以 RPMI1640 调节细胞浓度至 5×10^5 个/ml 备用。

1.1.2 大鼠自体血清制备:健康成年 Wistar 大鼠眼底取血, 37℃ 孵箱静置 1h, 1×10^4 r/min 离心 5min, 取上层淡黄色血清, 0.22 μ m 滤膜过滤, -20℃ 保存备用。

1.1.3 *S. aureus* 悬液制备:临床分离野毒株 *S. aureus* 接种于 5ml 肉汤培养基, 置 37℃ 摇床培养 12h, 然后 100℃ 加热 15min 灭活, 1.2×10^6 r/min 离心 5min 后弃上清, 比浊法^[2] 以 RPMI1640 细胞培养液调节 *S. aureus* 浓度至约 5×10^8 /ml, 置 4℃ 冰箱备用。

1.1.4 *S. aureus* 代谢液制备:取 37℃ 培养 12h *S. aureus* 悬液 1ml, 1.2×10^4 r/min 离心 5min 弃上清, 加入 RPMI1640 清洗 2 次 (1.2×10^4 rpm, 5min), 然后加入 RPMI1640 调整 *S. aureus* 浓度至 5×10^8 /ml, 37℃ 摇床培养 0.5h. 离心取上清, 0.22 μ m 滤膜过滤, -20℃ 保存备用。

1.2 粘弹性实验分组

实验共分 6 组(I ~ VI), 各组均含 0.5ml 制备好 PMN 细胞悬液和 0.2ml 自体血清, 其中实验组 I 为正常对照组, 另加 0.5ml 空白 RPMI1640, 实验组 II 另加 0.5ml 制备好的 *S. aureus* 代谢液, 实验组 III ~ VI 分别从 5×10^8 细菌浓度(即 1/10 PMN 浓度)以 10 倍递增加入 0.5ml *S. aureus* 悬液(分别为 1/10 \times PMN, 1 \times PMN, 10 \times PMN, 100 \times PMN 浓度)。

1.3 粘弹性测量实验方法

各组液体混匀后, 取约 0.6ml 加入自制小室中, 采用微管吸吮技术(Micropipette Aspiration Technique)对 PMN 进行粘弹性测定, 详细过程参照龙勉等^[3]的方法, 实验时间为 1h。

1.4 粘弹性实验数据处理

1.4.1 于图像处理系统(Vidas 21, Kontron Co.)对 PMN 变形全过程进行数据测量。

1.4.2 采用标准线性粘弹性固体模型(Kelvin Model)描述 PMN 的流变特性, 认为 PMN 是均质的粘弹性固体球, 在阶跃负压下发生小变形, 以非线性迭代方法进行实验数据拟合, 其本构方程如下:

$$\sigma + (\mu k_2) \partial \sigma / \partial t = k_1 \epsilon + \mu [1 + (k_1/k_2)] \partial \epsilon / \partial t$$

其中 K_1 和 K_2 为弹性系数, μ 为粘性系数, σ, ϵ 分别为应力和应变。

1.4.3 各组粘弹性参数均采用 Mean \pm SD 表示, 并对各参数进行两样本均数的 t 检验, $P < 0.05$ 为显著性差异。

1.5 PMN 细胞骨架免疫组化染色试剂制备:

1.5.1 冷甲醛丙酮固定剂: Na_2HPO_4 15ml, KH_2PO_4 120ml, 三蒸水 30ml, 丙酮 45ml, 40% 甲醛 25ml, 4℃ 保存备用。

1.5.2 微丝(肌动蛋白)小鼠单克隆抗体: Actin, Muscle specific Ab-3 (Lab Vision Corporation, USA), 0.5ml \times 200 μ g/ml, 使用浓度以 PBS 1:50 稀释成 4 μ g/ml。

1.5.3 微管蛋白小鼠单克隆抗体: Tubulin- β Ab-3 (Lab Vision Corporation, USA), 0.5ml \times 200 μ g/ml, 使用浓度以 PBS 1:50 稀释成 4 μ g/ml。

1.5.4 ABC 及其染、显色试剂盒: Ultravision Detection System, Anti-mouse, HRP/AEC (Lab Vision Corporation, USA). 二抗特性: 抗小鼠 IgG(H+L), 免疫山羊制备。

1.6 PMN 细胞骨架免疫组化染色实验分组

根据粘弹性实验结果,选取 I 和 V 组条件分别做微管和微丝的细胞骨架染色, I 组为正常对照, V 组为 10 倍细胞量 *S. aureus* 刺激组;染色结果进行光密度测量,并作对比研究。

1.7 PMN 免疫组化染色实验方法^[4]

取细胞悬液于 PDL 预处理的载玻片上均匀涂片,自然风干 1h, 冷甲醛固定液固定 5min, 0.1mol/L PBS 5min×3 次洗去固定剂, 0.3% H₂O₂-甲醇处理 15 min, 0.1mol/L PBS 5min×3 次洗去, Ultra V Block 5min 阻止非特异性背景染色, 0.1mol/L PBS 5min×4 次洗去, 0.5% Triton X100-PBS 处理 30min; 然后加一抗 (Tubulin-βAb-3 或 Actin, Muscle specific Ab-3) 37℃ 湿盒孵育 1hr, 0.1M PBS 5min×4 次洗去未结合一抗; 加生物素标记羊抗鼠(二抗)室温孵育 10min, 0.1mol/L PBS 5min×4 次洗去; 加链卵白素过氧化物酶室温孵育 10min, 0.1mol/L PBS 5min×4 次洗去; 将 1 滴 AEC 显色剂加入 1ml AEC 底物混匀, 然后马上加混合物于载玻片上孵育 10min; 最后以双蒸水冲洗中止反应; 并以明胶封片保存。

1.8 PMN 细胞骨架蛋白染色光密度测定及数据处理

1.8.1 对各组染色玻片以 Tiger920 图像分析仪进行骨架蛋白染色光密度测定 (第三军医大学组胚教研室)。

1.8.2 实验测量数据统计处理: 对实验所得微管和微丝染色平均光密度进行两样本均数的 *t* 检验, $P < 0.05$ 为显著性差异。

2 结 果

2.1 本实验研究利用微管吸吮技术测量了 PMN 在不同浓度的 *S. aureus* 及其代谢液的作用下其粘弹性的变化规律, 微管内半径在 1.0~1.8μm 之间, 实验数据经拟合得到各组粘弹性参数如表 1。各组 PMN 变形过程的特征值见表 2, 其中 $1/(k_1 + k_2)$ 正比于细胞初始变形程度, $1/k_1$ 正比于细胞最大变形程度, $(k_1 + k_2)/(k_1 \times k_2)$ 正比于细胞蠕变时间长短, $k_1/(k_1 + k_2)$ 为

Table 1 Viscoelastic coefficients of PMN

	I (n=25)	II (n=21)	III (n=18)	IV (n=20)	V (n=22)	VI (n=21)
$k_1(N/m^2)$	268.48 ± 28.23	281.79 ± 20.87	405.90 ± 24.29	653.51 ± 46.84	1013.53 ± 96.65	1057.38 ± 89.66
$k_2(N/m^2)$	577.94 ± 89.97	600.26 ± 101.18	823.11 ± 86.68	1087.38 ± 93.10	1670.10 ± 126.83	1726.58 ± 102.68
$\mu(N \cdot s/m^2)$	85.16 ± 14.80	84.54 ± 14.19	121.48 ± 8.73	164.32 ± 10.46	280.32 ± 19.03	297.64 ± 14.06

n: number of PMN measured; k_1 : I vs. II: $0.05 < P < 0.1$; V vs. VI: $0.1 < P < 0.2$; The values of *t* show significant difference ($P < 0.05$) between any other 2 experimental groups. k_2 : I vs. II: $P > 0.02$; V vs. VI: $0.1 < P < 0.2$; The values of *t* show significant difference ($P < 0.05$) between any other 2 experimental groups. μ : I vs. II: $P > 0.5$; The values of *t* show significant difference ($P < 0.05$) between any other 2 experimental groups.

Table 2 Characteristic values of deformation of PMN

		I (n=25)	II (n=21)	III (n=18)	IV (n=20)	V (n=22)	VI (n=21)
$1/(k_1 + k_2)$	$m^2/N \times 10^{-4}$	11.81	11.34	8.14	5.74	3.73	3.59
$1/k_1$	$m^2/N \times 10^{-4}$	37.25	35.49	24.64	15.30	9.87	9.46
$(k_1 + k_2)\mu/(k_1 \cdot k_2)$	$S \times 10^{-1}$	4.65	4.41	4.47	4.03	4.44	4.54
$k_1/(k_1 + k_2)$	%	31.72	31.95	33.03	37.54	37.77	37.98

初始变形占最大变形比例。

2.2 本实验利用 ABC 法对 PMN 在 *S. aureus* 作用下的细胞骨架 (微丝和微管) 进行了免疫

Table 3 AODs of PMN cytoskeleton immunohistochemistry

	Actin			Tubulin- β		
	AOD	$S \times 10^4 \mu m^2$	n	AOD	$S \times 10^4 \mu m^2$	n
I	2.6560 ± 0.1219	2.2370	6	2.5705 ± 0.1264	2.7233	6
V	2.8220 $\pm 0.0641^*$	1.1185	5	2.8821 $\pm 0.1514^*$	2.2370	5

AOD: mean optical density, S: area measured, n: number of cells measured, * : show significant difference.

组化染色, 并进行了染色光密度的定量研究。表 3 为染色细胞光密度测量及计算结果。

3 讨 论

自 Geert W. Schmid-Schonbein^[5]首次以 Kelvin 模型对白细胞进行单细胞的定量粘弹性研究以来, 研究人员已对白细胞及其它细胞的粘弹性及其变化机理作了一定研究, 并一直以此作为有核细胞粘弹性定量研究的理想模型, 这当然也由于白细胞粘弹性对其功能的密切相关性。另外, 微丝和微管的重要功能之一就是形成细胞的骨架形态和运动, 它对细胞的粘弹性具有直接的影响, Chien^[6,7]等曾以秋水仙素和细胞松弛素 B 分别阻断 PMN 细胞骨架的完整性, 来研究微丝和微管对 PMN 粘弹性参数的影响, 发现它们之间具有密切相关性。吴泽志^[8]等也有类似的相关报道。白细胞作为人体的免疫细胞, 起着抗感染的重要作用, 但对此典型病理模型下白细胞粘弹性改变及其细胞骨架相应变化的研究却鲜见报道。*S. aureus* 是引起人体感染的最主要病原菌之一, 能产生多种内外毒素和致炎因子。因此, 本文以 *S. aureus* 免疫激活 PMN 作为模型, 对其粘弹性及其细胞骨架的改变作了研究。

表 1 为各实验组的粘弹性参数值, 除实验组 II (*S. aureus* 代谢液) 与实验组 I (正常对照)

无显著性差异外,其余各组(*S. aureus*)均与组 I 有非常显著差异,并且 III、IV、V 各组间两两亦有显著性差异, V 和 VI 之间 k_1 和 k_2 无显著性差异, μ 值差异仍显著。从数值上看,随着 *S. aureus* 浓度从 1/10 细胞浓度以 10 倍递增,其三参数亦随之显著递增,至 10 倍细胞浓度时趋于平台状态,递增明显减缓。表 2 为各组细胞变形过程的特征值,更加直观地表征了其变形的动态过程,从其数值上看, $1/(k_1 + k_2)$ 和 $1/k_1$ 两值随各组 *S. aureus* 浓度的增加而迅速递减,至 10 倍细胞浓度时趋于平台状态。 $(k_1 + k_2) \mu / (k_1 \times k_2)$ 变化不明显, $k_1 / (k_1 + k_2)$ 则随 *S. aureus* 浓度的增加而上升。从上述结果可以看出,随着 *S. aureus* 浓度的增加, PMN 的刚性也显著递增,同时粘性也有显著的增加,表现为变形过程中 PMN 的初始变形程度和最大变形程度均大幅减少、初始变形占最大变形比例随浓度而有所升高、同时蠕变时间下降却不明显。而对 *S. aureus* 代谢液,则与正常对照组未见粘弹性的显著变化。

对于外界因素对 PMN 粘弹性的影响,徐兴祥^[9]和周向东^[10]等以内毒素活化大鼠 PMN 作了研究,结果发现 PMN 的 k_1 、 k_2 和 μ 值均上升,本实验结果与其相符,但其上升幅度远小于本实验结果。秦廷武^[11]等则对运动力竭前后大鼠 PMN 粘弹性作了研究,也得到类似结果。另外尚有关于 Ca^{2+} ^[12] 和 pH^[13] 对 PMN 粘弹性影响的报道,认为其粘弹性变化将对 PMN 的迁移、吞噬以及与内皮细胞的粘附等功能产生重要影响,引起局部血流动力学的改变,使局部血液粘度增加、血流减缓、血液层流状态改变,使 PMN 易于与血管内皮接触,粘性系数的增高又易于使 PMN 与血管内皮的粘附以及移行渗出,产生局部炎症反应;在毛细血管通道,变硬的 PMN 可直接滞留,引起局部阻塞(直径:PMN 8 μ m, 毛细血管 5 μ m),并有可能造成局部血管床的破坏损伤,如徐兴祥^[9]的研究结果表明,大量 PMN 在肺内的扣押是其介导肺微血管通透性增加、肺水肿、微血栓形成及肺泡上皮广泛损伤,从而导致急性肺损伤的关键所在;而 PMN 的变形性是影响其在肺内扣押最主要的初始因素。在本研究中,*S. aureus* 的存在能即刻引起 PMN 的粘弹性改变,表现为明显的快相反应,并在一定范围内有明显的量效依赖性,表明 PMN 能在 *S. aureus* 感染局部微循环中即刻滞留粘附,引起局部炎症反应,并能随感染严重程度而决定其滞留粘附 PMN 量的多少及炎症反应的程度。而 *S. aureus* 代谢液对 PMN 粘弹性无明显影响,是否其仅能产生趋化作用?或者其引起粘弹性改变成分具有极短寿命?值得进一步探讨。

PMN 在 *S. aureus* 免疫激活后,细胞边缘微丝染色较正常对照模糊,微丝较集中于细胞外围区域分布,并似有一定规则;而对照组则相对在全细胞不均匀地弥散分布。细胞边缘微管染色也如微丝一样较正常对照模糊,以细胞中央向外围区域发散分布,正常对照则表现为一种不均匀的分布状态。从染色强弱的定量研究看(表 3),在 *S. aureus* 免疫激活下,PMN 的微丝和微管染色测量光密度值均比对照组有显著增加。Chien^[6,7]等的研究发现,以秋水仙素破坏微管组装骨架的完整性能使 PMN 的 k_2 和 μ 值减小而 k_1 不变;以细胞松弛素 B 破坏微丝网络结构的完整性,使 PMN 的 k_1 、 k_2 和 μ 值均大幅度减小。因此,细胞骨架结构的装配状态直接决定着 PMN 粘弹性值,并且微丝网络的装配状态直接决定着 PMN 的 k_1 值。所以,微丝染色外围区域,即细胞膜下凝胶层微丝纤维网络层增厚的迹象。同时,*S. aureus* 免疫激活后的 PMN 染色分布的相对均匀和规则性,反映了其细胞骨架响应外界刺激下的一种相对有序的装配状态,而非以一种解离或储备状态存在;其染色平均光密度值的显著增加则表明免疫激活后的 PMN 骨架蛋白表达的增加,参与细胞骨架的组装;这些改变将直接导致粘弹性三参数值的增

高。可见,本免疫组化实验结果与粘弹性实验结果相符,能很好地解释其变化的机理。

综观本实验模型及相关资料,可以认为 PMN 在 *S. aureus* 免疫激活下的流变特征变化是一种复杂的生物物理和生物化学综合作用的结果,其可能的具体流变学行为: PMN 受局部感染 *S. aureus* 刺激,通过生化信号(如表面受体分子、pH、 Ca^{2+} 等改变),即刻动用解离态或储备微丝微管等骨架蛋白及其进一步表达,进行微管组装和微管指导下的微丝组装等行为,发生了细胞骨架的重排,形成有利于其功能态发挥的细胞骨架状态(如凝胶层增厚、微管网络更为规则、致密等),从而引起粘弹性各参数的迅速增加,导致细胞刚性和粘性的即刻提高,可在局部微循环滞留粘附、并移行渗出、引起炎症反应。另外,对于 PMN 移行渗出过程中的流变学行为, PMN 的快相反应和慢相反应与骨架蛋白的组装和表达之间的关系以及它们与粘弹性的关系等,尚有待于进一步研究。



Fig.1 Microfilaments immunohistochemical results of PMN of group I

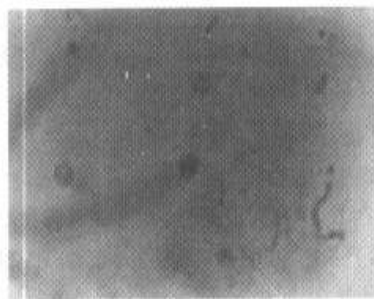


Fig.2 Microfilaments immunohistochemical results of PMN of group V



Fig.3 Microtubule immunohistochemical results of PMN of group I

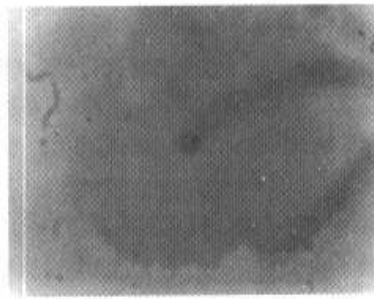


Fig.4 Microtubule immunohistochemical results of PMN of group V

参考文献:

- [1] 沈关心. 现代免疫学实验技术[M]. 武汉: 湖北科技出版社, 1998. 312-314.
- [2] 杨廷彬. 实用免疫学[M]. 长春: 长春出版社, 1994. 434-442.
- [3] 龙勉, 吴泽志, 王红兵, 等. 肝癌细胞粘弹性的实验研究[J]. 生物物理学报, 1996, 12(1): 169-173.
- [4] Roychowdhury S, et al. G protein binding and G protein activation by nucleotide transfer involve distinct domains on tubulin: regulation of signal transduction by cytoskeletal elements[J]. *Biochemistry*, 1993, 32(18): 4955-61.

- [5] Schmid-Schonbein GW, et al. passive mechanical properties of human leukocytes[J]. *Biophysics J*, 1981,36: 243 - 256.
- [6] Chien S, et al. Effect of colchicines on viscoelastic properties of neutrophils[J]. *Biophysics J*, 1986,46: 383 - 386.
- [7] Chien S, et al. Rheology of leukocytes[J]. *Ann NY Acad Sci*, 1987,516:333 - 347.
- [8] 吴泽志,张钢,龙勉,等. 秋水仙素和长春花碱对肝细胞粘弹性的影响[J]. *生物物理学报*,1998,14(1):167 - 171.
- [9] 徐兴祥,孙耕耘,钱桂生,等. 急性肺损伤大鼠白细胞变形性变化及山莨菪碱影响[J]. *中华结核和呼吸杂志*,1998, 21(10):598 - 600.
- [10] 周向东,杨肇亨. 活化中性粒细胞变形能力改变的单细胞定量研究[J]. *微循环技术杂志*,1996,1:10 - 11.
- [11] 秦廷武,杨瑞芳,蒋稼欢,等. 大鼠运动力竭后生理生化因素对 PMN 粘弹性影响的实验研究[J]. *中国血液流变学杂志*,1998,8(1):1 - 7.
- [12] Zaiss S. The influence of calcium on the deformability of human granulocytes[J]. *Biorheology*, 1990,27: 701 - 709.
- [13] Sun RJ, et al. The deformability of normal PMNs and the effect of pH on the deformability of PMNs[A]. *Proceedings of Beijing Satellite Symposium of the Eighth International Congress of Biorheology*[C]. Peking Univ Press, 1992.192 - 195.

INVESTIGATION ON THE INFLUENCE OF STAPHYLOCOCCUS. AUREUS ON THE VISCOELASTICITY AND CYTOSKELETON OF RAT PMN

HU Ya - ping¹, SONG Guan - bin², LIU Jian - dong³,

LU Huo - xiang³, XU Li³, CAI Shao - xi²

(1. Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China;

2. Chongqing university, bioengineering college, Chongqing 400044, China;

3. Zhejiang provincial hospital, Hangzhou 310014, China)

Abstract: Using micropipette aspiration technique and immunohistochemistry, the effects of staphylococcus. aureus and its metabolite on the rheological characteristics and cytoskeleton of PMN were studied. Results show that S. aureus metabolite has no significant effects on the viscoelastic coefficients, but S. aureus can affect the viscoelastic coefficients of PMN significantly and the value of k_1 , k_2 and μ are related to the concentrations of S. aureus directly. Meanwhile, the morphological studies show that the structure of microfilament and microtubule system changed, and the mean optical density of AODs also increases significantly. These results show that the PMN has reassembled and reconstructed its cytoskeleton and has much protein expression of actin and tubulin when activated immunologically. Thus, the deformability of PMN decreases and viscosity of PMN increases remarkably, which is favorable to the sequestration and adhesion of PMN in microcirculation.

Key Words: Staphylococcus. aureus; Polymorphonuclear neutrophils;

Viscoelasticity; Cytoskeleton; Micropipette aspiration technique;

Optical density; Rat