

新生隐球菌对角质形成细胞活力的作用研究

朱元杰 顾菊林 陈江汉 赵瑾 仇芸 温海
(第二军医大学长征医院皮肤科, 上海 200003)

【摘要】 目的 研究新生隐球菌体外对角质形成细胞活力的影响。**方法** 将新生隐球菌父代标准株与子代荚膜缺陷株于体外分别与角质形成细胞分别共培养,同时设立热灭活的菌体、空白对照,再分别设立菌体与细胞直接接触与不接触共培养相互对照,分别作用 0.5 h、1 h 和 2 h 后,采用流式细胞仪检测隐球菌角质形成细胞的凋亡率。**结果** 随着时间延长,与空白对照组及热灭活组比较,实验组角质形成细胞的凋亡率逐渐增加。无荚膜株与父代有荚膜株比较,无荚膜株对细胞活力的影响在作用后 1 h、2 h 明显低于有荚膜株。2 种菌株不直接接触培养使细胞的凋亡率明显下降;不直接接触的有荚膜株与热灭活的菌体之间比较差异不显著。**结论** 虽然有荚膜株与无荚膜株隐球菌均可以使角质形成细胞活性明显降低,但荚膜可以显著增强菌体对细胞活力的影响;角质形成细胞活力的降低主要是通过菌体接触培养后产生的,诱导细胞凋亡需要菌体与细胞的直接接触。

【关键词】 隐球菌;角质形成细胞;活力

【中图分类号】 R 379.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-3827(2011)01-0031-04

Effect of *Cryptococcus neoformans* on the viability of keratinocytes

ZHU Yuan-jie, GU Ju-lin, CHEN Jiang-han, ZHAO Jin, QIU Yun, WEN Hai

(Department of Dermatology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of *Cryptococcus neoformans* on the viability of keratinocytes. **Methods** Strains of *Cryptococcus neoformans* B3501 and its acapsule mutant cap64 were cocultured with keratinocytes and the viability of the keratinocytes was measured by flow cytometry after 0.5 h, 1 h and 2 h. Results were compared with those of negative control, heat-killed fungi, and the fungi indirectly contacted with keratinocytes. **Results** Viability of keratinocytes decreased significantly cocultured with *Cryptococcus neoformans* by time prolonging, while more significantly after 1 h and 2 h coculture with B3501. There was no difference in the viability of keratinocytes between coculture with killed B3501 and indirect coculture with B3501. **Conclusions** Capsule of *Cryptococcus neoformans* plays an important role in viability of keratinocytes. Indirect contact with *Cryptococcus neoformans* is necessary for viability decreasing.

【Key Words】 *Cryptococcus neoformans*; keratinocytes; viability

[Chin J Mycol, 2011, 6(1): 31-34]

新生隐球菌是一种重要的病原真菌,对免疫功能受损或正常的宿主均可致病。皮肤隐球菌感染占隐球菌感染的10%~15%,近年来日益受到重

视^[1]。原发性皮肤隐球菌感染作为一种独立的疾病,已得到绝大多数真菌病和皮肤病研究者的公认^[2-4]。

角质形成细胞是皮肤的主要构成细胞,其镶嵌状紧密排列对微生物的侵袭具有防御作用,还可通过分泌各种细胞因子发挥一定的免疫作用。角质形成细胞活力的降低,必将破坏其紧密连接结构,

基金项目:国家自然科学基金(30600540),上海市青年科技启明星计划(08QA14006)。

作者简介:朱元杰,男(汉族),博士,副主任医师,副教授。E-mail: mycology@126.com

通讯作者:温海, E-mail: wenhai98@sohu.com

减低其对微生物侵袭的防御作用。我们在前期对隐球菌黏附与侵袭角质形成细胞进行研究的基础上^[5,6],进一步对新生隐球菌对角质形成细胞的活力影响进行研究,并探讨隐球菌主要独立因子——荚膜对菌体活力的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

菌株 新生隐球菌标准野生株 B3501 和荚膜缺陷株 cap64 均来自中国医学真菌保藏管理中心隐球菌专业实验室。其中 B3501 为新生隐球菌血清 D 型,具有目前已知所有毒力因子, cap64 为 B3501 子代荚膜缺陷株。

细胞 人角质形成细胞株 Hacat 引自美国国立卫生研究所,由第二军医大学附属长海医院皮肤科顾军教授惠赠。

培养基 新生隐球菌培养于 YPD 液体和固体培养基(1% 酵母浸膏,2% 蛋白胨和 2% 葡萄糖及 0.05% 的氯霉素,固体加 2% 琼脂)。Hacat 细胞培养于加入 10% 小牛血清,100 U/mL 青霉素、100 g/mL 链霉素的 DMEM 高糖培养基。

主要试剂和仪器 DMEM 高糖培养基,小牛血清,0.025% 胰酶-EDTA (Gibco)。碘化丙啶(PI, Sigma 公司)。流式细胞仪为美国库而特公司产品。

1.2 方法

角质形成细胞培养 Hacat 细胞 0.025% 胰酶-EDTA 溶液 37℃ 消化后,将细胞悬液吸入离心管中,以 1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,加入新鲜培养基,滴管轻轻吹打细胞制成细胞悬液。用血细胞计数板调整细胞浓度至 1×10^5 /mL,等量接种于 6 孔细胞培养板中,培养于 37℃,5% CO₂ 恒温培养箱中。

新生隐球菌对角质形成细胞的损伤作用 待 6 孔细胞培养板中细胞生长至 90% 以上融合后,吸去培养基,PBS 清洗去除脱落细胞,加入 2 mL 新鲜培养基,再加入 20 μL 浓度为 1×10^6 CFU/mL 菌悬液继续培养。

角质形成细胞损伤的检测 分别于加入菌悬液 0.5 h、1 h、2 h 后,吸去培养基,PBS 轻轻清洗去除隐球菌,加入 0.025% 胰酶-EDTA 溶液 37℃ 消化后收集细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,PBS 洗涤,离心去 PBS,吹打混匀,加入冰预冷的 70%

的乙醇固定,4℃,2 h。离心弃去固定液。加入 1 mL PI 染液(100 g/mL)染色,4℃ 避光 30 min。上样流式细胞仪分析,用氩离子激发荧光,激光光波波长为 488 nm,发射光波波长大于 630 nm。流式细胞仪的结果为死亡细胞加凋亡细胞的总数表示损伤程度。每个样本重复 3 次,取 3 次平均值。

对照与计算取值 设立加入不含菌悬液的培养基为空白对照,设立热灭活的 B3501 死菌为菌体对照。同时,设立对照比较隐球菌不直接接触角质形成细胞是否对其造成损伤。方法为在 6 孔细胞培养板中细胞生长至 90% 以上融合后,吸去培养基,PBS 清洗去除脱落细胞,加入新生隐球菌菌悬液前置入 1 μm 孔径 cell transwell inserts,菌悬液加于 inserts 与细胞不直接接触的另一面中。由于新生隐球菌的直径大小在 2 ~ 10 μm^[7],一般在 1 μm 以上,因此,1 μm 的孔径对于隐球菌是无法穿过的,而 1 μm 的孔径的存在可以允许隐球菌与角质形成细胞混合培养液中的所有分子穿过,因此可以作为一个对照。有无荚膜的新生隐球菌均分别进行对照研究。

统计分析 采用 SPSS 11.0 统计分析软件对凋亡率进行 χ^2 检验, *P* 值取 0.05。

2 结 果

2.1 新生隐球菌对角质形成细胞的损伤

流式细胞仪检测结果显示(见图 1),随着时间延长,与空白对照组及热灭活组比较,角质形成细胞的凋亡率逐渐增加,统计学检验提示结果差异具有显著性(*P* < 0.05)。而无荚膜株与父代有荚膜株比较,无荚膜株对细胞的损伤能力在作用后 1 h、2 h 明显低于有荚膜株(*P* < 0.05)。热灭活的菌体组在三个时相点均比空白对照组降低细胞活力更加显著(*P* < 0.05)。

2.2 不同培养方式对角质形成细胞活力的影响

比较隐球菌直接接触角质形成细胞与分开培养的对照组发现(见图 2),2 种菌株不直接接触细胞后,诱导细胞的凋亡率明显下降,每种菌株自身均差异具有显著性(*P* < 0.05)。而不直接接触的 B3501 组与热灭活的 B3501 组之间比较,差异不显著(*P* > 0.05)。

3 讨 论

随着皮肤作为隐球菌系统感染的入口得到了

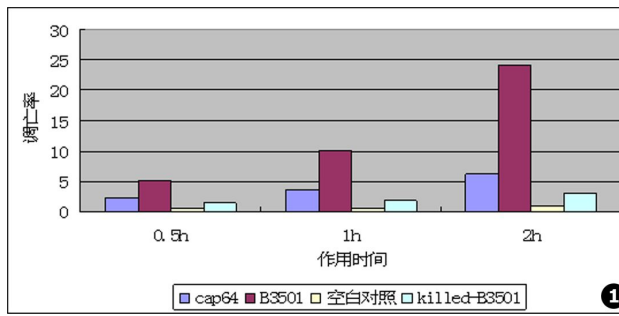


图 1 新生隐球菌对角质形成细胞活力的作用

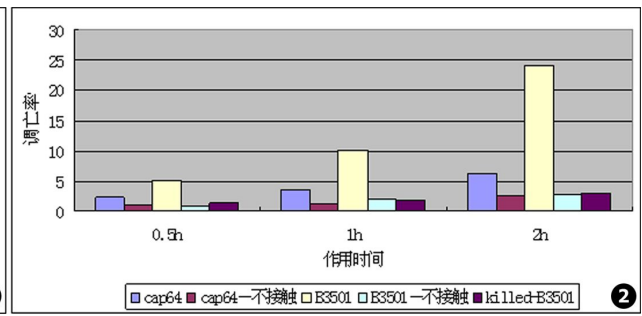


图 2 不同培养方式对角质形成细胞活力的影响

Fig. 1 Effect of *Cryptococcus neoformans* on viability of keratinocytes under different culture conditions

Fig. 2 Effect of *Cryptococcus neoformans* on viability of keratinocytes under different culture conditions

确认^[8],原发性皮肤隐球菌感染的研究正在受到越来越多的重视,隐球菌与角质形成细胞的相互作用机制是皮肤隐球菌感染发病机制研究的关键^[7]。我们前期的研究发现,新生隐球菌与角质形成细胞在体外相互作用后,新生隐球菌可以黏附并侵袭角质形成细胞,无荚膜株的隐球菌对细胞的黏附与侵袭率高于有荚膜株^[5,6]。在此基础上,我们进一步研究隐球菌及其荚膜对角质形成细胞活力的影响。

结果显示,新生隐球菌在体外可以显著降低角质形成细胞的活力,随着时间的延长,细胞活力下降更加明显。同时,隐球菌与角质形成细胞非直接接触共培养时,虽然仍然可以造成细胞活力的下降,但与直接接触培养时比较,角质形成细胞的活力下降明显减少。这一方面提示隐球菌培养生长中的分泌物可能对细胞活力产生影响,尤其是一些分泌性蛋白酶类物质;另一方面,隐球菌需要与角质形成细胞直接接触才能进一步影响细胞的活力,提示菌体表面物质需要与细胞接触后诱发细胞活力降低,这种活力的降低可能是通过某种菌体配体与细胞表面受体结合后诱导的。隐球菌菌体与角质形成细胞的直接接触对其降低细胞的活性具有非常关键的作用。

荚膜是隐球菌最为重要的独立因子,但其在隐球菌致病中的作用正在重新认识。我们前期的研究发现,荚膜缺陷株隐球菌对角质形成细胞的黏附与侵袭率均明显高于有荚膜株,这一结果与国外学者在隐球菌和血管内皮细胞相互作用研究中得到的结果相类似^[9],提示无荚膜株的致病力或侵袭力可能高于有荚膜株。但在本研究中我们发现,隐球菌有荚膜株对角质形成细胞活力的影响明显大于

无荚膜株;结合直接接触培养对细胞活力的降低更加显著,这些结果提示荚膜可以促进细胞凋亡,对细胞活力造成更为明显的损伤。因此我们认为,虽然荚膜在隐球菌黏附和侵袭细胞中发挥了一定的阻碍作用,其在致病中的作用仍然非常重要,其在致病中的确切作用有待进一步明确。

皮肤隐球菌感染的报道日渐增多,但其发病机制的研究目前才刚刚开始。作为皮肤最重要组成细胞的角质形成细胞与隐球菌间的相互作用是研究的关键。在细胞学研究基础上,进一步探索二者作用的分子机制,明确隐球菌皮肤感染的相关毒力因子。

参考文献

[1] Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans* [M]. American Society for Microbiology, Washington, 1998.

[2] Christianson JC, Engber W, Andes D. Primary cutaneous cryptococcosis in immunocompetent and immunocompromised hosts [J]. Med Mycol, 2003, 41(3):177-188.

[3] Neuville S, Dromer F, Morin O, et al. Primary cutaneous cryptococcosis: a distinct clinical entity [J]. Clin Infect Dis, 2003, 36(3):337-347.

[4] Revenga F, Paricio JF, Merino FJ. Primary cutaneous cryptococcosis in an immunocompetent host: case report and review of the literature [J]. Dermatology, 2002, 204(2):145-149.

[5] 朱元杰, 温海, 顾菊林, 等. 荚膜在新生隐球菌对人角质形成细胞黏附与通过细胞层中的作用 [J]. 中华皮肤科杂志, 2007, 40(8): 496-497.

[6] 朱元杰, 温海, 顾菊林, 等. 隐球菌与体外培养角质形成细胞的相互作用 [J]. 临床皮肤科杂志, 2006, 35(8): 503-505.

[7] 朱元杰, 温海. 原发性皮肤隐球菌病 [J]. 中国真菌学杂志, 2007, 2(1):43-45.

[8] Tilak R, Prakash P, Nigam C, et al. Cryptococcal meningitis

- with an antecedent cutaneous Cryptococcal lesion[J]. Dermatol Online J, 2009, 15(9):12. 4368-4374.
- [9] Ibrahim AS, Filler SG, Alcouloumre MS, et al. Adherence to and damage of endothelial cells by *Cryptococcus neoformans* in vitro: role of the capsule[J]. Infect Immun, 1995, 63(11): [收稿日期] 2010-12-01 [本文编辑] 王 飞

· 消息 ·

《中国真菌病学杂志》 上海新先锋药业有限公司
注射用两性霉素 B 脂质体 (锋克松) 临床应用有奖征文

真菌感染一直是困扰临床医师及患者的问题,两性霉素 B 作为一种广谱抗真菌制剂,被誉为治疗深部真菌感染的“金标准”。但由于两性霉素 B 的毒副作用,因而限制了其临床的使用。而脂质体独特的靶向作用,极大的减少了其毒副作用。已经广泛应用于深部真菌感染治疗,获得较好疗效。锋克松作为注射用两性霉素 B 脂质体的独家国产制剂自上市以来,其确切的疗效,副作用小,为临床医师和患者都带来了更好的选择。为了交流临床治疗和用药经验,《中国真菌学杂志》与上海新先锋药业有限公司共同举办此次征文活动。

一 征文内容范围:注射用两性霉素 B 脂质体 (锋克松) 治疗真菌感染的病例报告,临床研究报告及综述。

- 1 病例报告:建议有简短病史,诊疗前后真菌学检验结果等相关内容。
- 2 临床研究报告:注射用两性霉素 B 脂质体 (锋克松) 治疗各类真菌感染的临床研究。治疗最好有对照组,可包括多中心临床研究。突出注射用两性霉素 B 脂质体 (锋克松) 和其他抗真菌药物的优势。
- 3 综述:注射用两性霉素 B 脂质体 (锋克松) 治疗各类真菌感染的综述,包括荟萃分析。

二 征文时间:2011 年 2 月 1 日~2011 年 12 月 31 日。

三 投稿事项 地址:上海市延安西路 1146 号 200052 收件人:市场部 刘清毅 E-mail:time88180@hotmail.com 投稿时请注明“锋克松征文”字样,最好同时发送电子版。

四 文章评选及奖项设置

- 1 《中国真菌学杂志》将组织专家对稿件进行分阶段评审,符合杂志发表要求的稿件将于 2011 年 3 月后在《中国真菌学杂志》发表。
- 2 活动将评出优秀稿件 15 篇,其中病例报告 5 篇,临床研究 5 篇,综述 5 篇。从中评选出一等奖 1 名 (奖金 3 000 元/人),二等奖 2 名 (奖金 1 500 元/人),三等奖 3 名 (奖金 800 元/人),优秀奖 9 名,并汇编成册。
- 3 获奖者可参加国内学术交流一次。
- 4 所有参与者将获得杂志社和上海新先锋药业有限公司提供的纪念奖。

欢迎大家踊跃投稿,有问题可联系上海新先锋药业有限公司市场部 (021-62522141 刘清毅) 或杂志编辑部。