

炭疽芽孢在巨噬细胞 RAW264.7 内的萌发过程

李 霆, 王恒樑, 史兆兴, 冯尔玲, 刘润艳, 黄留玉

李霆, 王恒樑, 史兆兴, 冯尔玲, 刘润艳, 黄留玉, 军事医学科学院生物工程研究所 北京市 100071

李霆, 1977-04-18 生, 江苏省南京市人, 汉族. 军事医学科学院生物工程研究所 2002 级博士研究生, 从事病原微生物功能基因组研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 30470100

通讯作者: 王恒樑, 100071, 北京市丰台东大街 20 号, 军事医学科学院生物工程研究所. wanghl@nic.bmi.ac.cn

电话: 010-66948836 传真: 010-63833521

收稿日期: 2005-05-08 接受日期: 2005-05-25

Germination process of *Bacillus anthracis* endospores within macrophage RAW264.7

Ting Li, Heng-Liang Wang, Zhao-Xing Shi, Er-Ling Feng, Run-Yan Liu, Liu-Yu Huang

Ting Li, Heng-Liang Wang, Zhao-Xing Shi, Er-Ling Feng, Run-Yan Liu, Liu-Yu Huang, State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Bioengineering, Beijing 100071, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30470100

Correspondence to: Dr. Heng-Liang Wang, Beijing Institute of Bioengineering, State key laboratory of pathogen and biosecurity, 20 Dongda Street, Beijing 100071, China. wanghl@nic.bmi.ac.cn

Received: 2005-05-08 Accepted: 2005-05-25

Abstract

AIM: To confirm the germination process of *Bacillus anthracis* A16R endospores within murine macrophage RAW264.7

METHODS: Macrophage RAW264.7 cells were infected by *Bacillus anthracis* A16R (pXO2) spores at a multiplicity of infection (MOI) of 20:1. Then the cells were harvested at different time points (1, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 and 8 h after infection). The growth of infected cells was observed under light microscope by fuchsin basic methylene blue staining.

RESULTS: The endospores began to germinate and develop into vegetative bodies 2 to 2.5 hours after infection. The vegetative bodies entered the phase of binary fission 3.5 to 4 hours after infection. At 5 to 5.5 hours, the bacillus proliferated into exponential phase and the macrophages began to lyse 7 to 8 hours after infected.

CONCLUSION: For the first time, fuchsin basic methylene blue staining is used to study the germination process of *Bacillus anthracis* endospores within macrophage RAW264.7.

Key Words: *Bacillus anthracis*; Germination; Fuchsin basic methylene blue staining; Macrophage

Li T, Wang HL, Shi ZX, Feng EL, Liu RY, Huang LY. Germination process of *Bacillus anthracis* endospores within macrophage RAW264.7. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(13):1540-1543

摘要

目的: 确定炭疽杆菌 A16R 芽孢在巨噬细胞系 RAW264.7 内萌发的过程.

方法: 用炭疽杆菌 A16R 芽孢以 MOI 20:1 感染 RAW264.7, 分别于吞噬后 1、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8 h 取细胞爬片进行复红美蓝染色, 显微镜观察.

结果: 吞噬后 2-2.5 h, 细胞内的芽孢开始萌发并形成繁殖体;吞噬后 3.5-4 h, 繁殖体开始二分裂;吞噬后 5-5.5 h, 繁殖体进入指数增长阶段;吞噬后 7-8 h, 大量的繁殖体充斥于细胞内、外, 细胞开始崩解.

结论: 首次采用复红美蓝染色确定了 A16R 炭疽芽孢在巨噬细胞 RAW264.7 内的萌发过程.

关键词: 炭疽芽孢杆菌; 巨噬细胞; 萌发; 复红美蓝染色

李霆, 王恒樑, 史兆兴, 冯尔玲, 刘润艳, 黄留玉. 炭疽芽孢在巨噬细胞 RAW264.7 内的萌发过程. *世界华人消化杂志* 2005;13(13):1540-1543
<http://www.wjnet.com/1009-3079/13/1540.asp>

0 引言

炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*) 系统性感染是致命性的. 炭疽芽孢首先被感染部位的巨噬细胞吞噬并由其携带至附近的淋巴结, 随后芽孢在巨噬细胞内存活、萌发进而形成繁殖体, 后者很快从巨噬细胞内释放并扩散进入淋巴系统、血液循环系统, 在那里迅速地繁殖并释放大量毒素 (致死毒素 (LT) 和水肿毒素 (ET)) 从而引发菌血症、脓毒血症和休克, 最终导致宿主死亡^[1]. 巨噬细胞不仅是机体内最早和炭疽芽孢作用 (噬菌作用) 的细胞, 还能够诱导宿主产生针对病原菌侵袭的防御反应, 并在炭疽感染过程中介导细胞毒作用^[2-5]. 为了研究宿主细胞在芽孢萌发过程中不同时段的全局性反应, 准确界定炭疽芽孢在萌发过程中结构、功能改变的时间点 (段) 就成为了全面研究宿

主反应机制的必要前提. 我们采用复红美蓝染色简便而有效地确定了 A16R 芽孢在巨噬细胞内急性感染时萌发形成繁殖体的过程, 为今后从基因表达谱和比较蛋白质组等多种角度开展炭疽芽孢感染的宿主反应机制研究奠定了基础.

1 材料和方法

1.1 材料 亚甲基蓝、碱性品红、石碳酸等试剂均购自北京化学试剂公司; 小牛血清购自 Hyclone 公司; DMEM 培养基购自 Gibco 公司; 细胞培养板购自 Costar 公司; HF safe 900/C + 型生物安全柜为上海力新实业有限公司产品; 3K12 离心机为 Sigma 公司产品; E600 生物显微镜为 Nikon 公司产品; 成像系统为 Spot 公司产品. 小鼠腹腔巨噬细胞系 RAW264.7 购自协和医科大学基础医学细胞中心, 炭疽芽孢杆菌 A16R (pX02⁻) 为本室保存. 芽孢的制备、纯化和计数参照文献^[6]挑取芽孢杆菌 A16R 单菌落接种于 LB 液体培养基, 37℃, 200 r/min 培养 4 d 后, 经复红美蓝染色、镜检, 当芽孢数达 80% 以上开始收集. 4℃ 10 000 g 离心 10 min, 弃上清, 用灭菌纯水重悬沉淀后 65℃ 水浴 30 min 杀灭残余的繁殖体, 灭菌纯水重复离心洗涤 10 次, 去除繁殖体碎片. 取少量芽孢溶液进行平板稀释计数以确定活芽孢浓度, 并将芽孢浓度固定在 10¹¹/L 左右, 4℃ 保存. 以上操作均在生物安全柜内进行.

1.2 方法 细胞培养和芽孢吞噬试验参照文献^[7]稍作修改, 小鼠腹腔巨噬细胞系 RAW264.7 用含有 100 mL/L 小牛血清和 100 mg/L 的氨苄青霉素和链霉素的 DMEM 培养基于 37℃, 50 mL/L CO₂, 饱和湿度培养至 80% 融合. 胰酶 (2.5 g/L 胰蛋白酶, 0.2 g/L EDTA, pH7.2) 消化, 血球计数板计数. 在 6 孔细胞培养板中放置 20 mm × 20 mm 灭菌盖玻片, 共 3 块培养板. 按 5 × 10⁵ 细胞/孔的数量将细胞接种于已放置了盖玻片的培养孔中, 用无双抗的含 100 mL/L 小牛血清的 DMEM 培养基于 37℃, 50 mL/L CO₂, 饱和湿度培养 24 h. 次日, 吸出培养孔中的培养基, pH7.2 PBS 漂洗 3 次. 按照感染比 (MOI) 20:1 加入 A16R 芽孢的 DMEM 悬液, 100 μL/cm², 即 800 μL/孔, 置 37℃, 50 mL/L CO₂, 饱和湿度培养 30 min, 并开始计时. 弃去芽孢悬液, PBS 洗 3 遍, 加入含 2.5 g/L 庆大霉素的 DMEM 溶液, 作用 30 min. 弃去培养基, PBS 洗 3 遍后, 添加新鲜无血清 DMEM 继续培养. 分别于添加芽孢后 1、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8 h 取出一张细胞爬片, 进行复红美蓝染色. 将上述爬片用 PBS 漂洗 3 次, 纯水漂洗 1 次, 20 s. 吹干, 甲醇固定 10 min, 石碳酸复红 (100 mL 30 g/L 碱性品红的 950 mL/L 酒精溶液和 90 mL 50 g/L 石碳酸水溶液混匀, 滤纸过滤)

染色 40 min, 水洗, 950 mL/L 酒精脱色 30 s, 水洗, 碱性美蓝 (30 mL 10 g/L 亚甲基蓝的 950 mL/L 酒精溶液和 100 mL 0.1 g/L 的氢氧化钾水溶液混匀, 滤纸过滤) 染色 1-2 min, 水洗去除多余染料, 干燥. 封片方法如下: 950 mL/L 酒精 1 min, 2 次; 无水乙醇脱水 1 min, 2 次; 二甲苯透明 1 min, 2 次. 采用 Nikon E600 生物显微镜进行油镜观察, 图像采集应用 Spot CCD 系统完成. 以上试验重复 2 次.

2 结果

通过复红美蓝染色法, 有效地确定了炭疽杆菌 A16R 芽孢按照 MOI 20:1 的比例感染鼠腹腔巨噬细胞系 RAW264.7 后, 其在巨噬细胞内的萌发过程. 染色结果显示, RAW264.7 细胞吞噬 A16R 芽孢 1 h 后, 细胞内存在大量的红色芽孢 (红色箭头所示), 说明 A16R 芽孢被成功吞噬但尚未形成繁殖体. 吞噬后 2-2.5 h, 细胞内少量芽孢开始萌发, 并开始呈现出繁殖体才能染上的蓝色 (黑色箭头所示). 吞噬后 3 h, 细胞内萌发的芽孢数量逐渐增多, 萌发的芽孢开始膨胀. 吞噬后 3.5-4 h, 细胞内出现典型的繁殖体并开始二分裂. 吞噬后 4.5-5 h, 细胞内进入二分裂的繁殖体逐步增多, 并开始生长至胞外. 吞噬后 5.5 h, 繁殖体进入指数生长阶段. 吞噬后 6-6.5 h, 繁殖体在巨噬细胞内/外快速增殖, 呈典型的竹节状. 吞噬后 7-8 h, 大量的繁殖体充斥于细胞内/外, 胞内空泡增多, 逐渐崩解, 细胞脱落, 出现细胞毒效应 (图 1). 最后, 需要指出一个客观事实即所有被吞噬的芽孢其在细胞内萌发和生长的进程并不可能完全一致, 而我们所观察到的结果是该时段的最早发生的或者代表性的事件.

3 讨论

感染性疾病是病原微生物和宿主紧密相互作用的结果, 只有深入了解病原微生物与宿主相互作用的分子细节才可能鉴定出病原微生物的所有毒力基因、全面理解病原微生物的致病机制和宿主的防御机制. 巨噬细胞是炭疽芽孢萌发和毒力体现的关键宿主细胞, 因此开展巨噬细胞反应机制的研究对于理解炭疽感染机制和宿主免疫机制意义重大. 国外已有文献报道了多种菌株炭疽芽孢在巨噬细胞内存活、萌发的研究, 而国内在这方面却鲜有报道. 另外, 本试验所采用的 A16R (pX02⁻) 是我国特有的无荚膜水肿型活芽孢疫苗株, 其皮肤炭疽的保护率为 80-100%, 但对死亡率高的肺炭疽保护效果不佳, 其机制如何尚无报道, 因此开展对炭疽杆菌 A16R 和巨噬细胞相互作用的研究不仅有利于深入了解炭疽感染的分子机制, 还将为 A16R 疫苗的改良提供帮助.

炭疽芽孢感染巨噬细胞是一个动态的过程, 准确

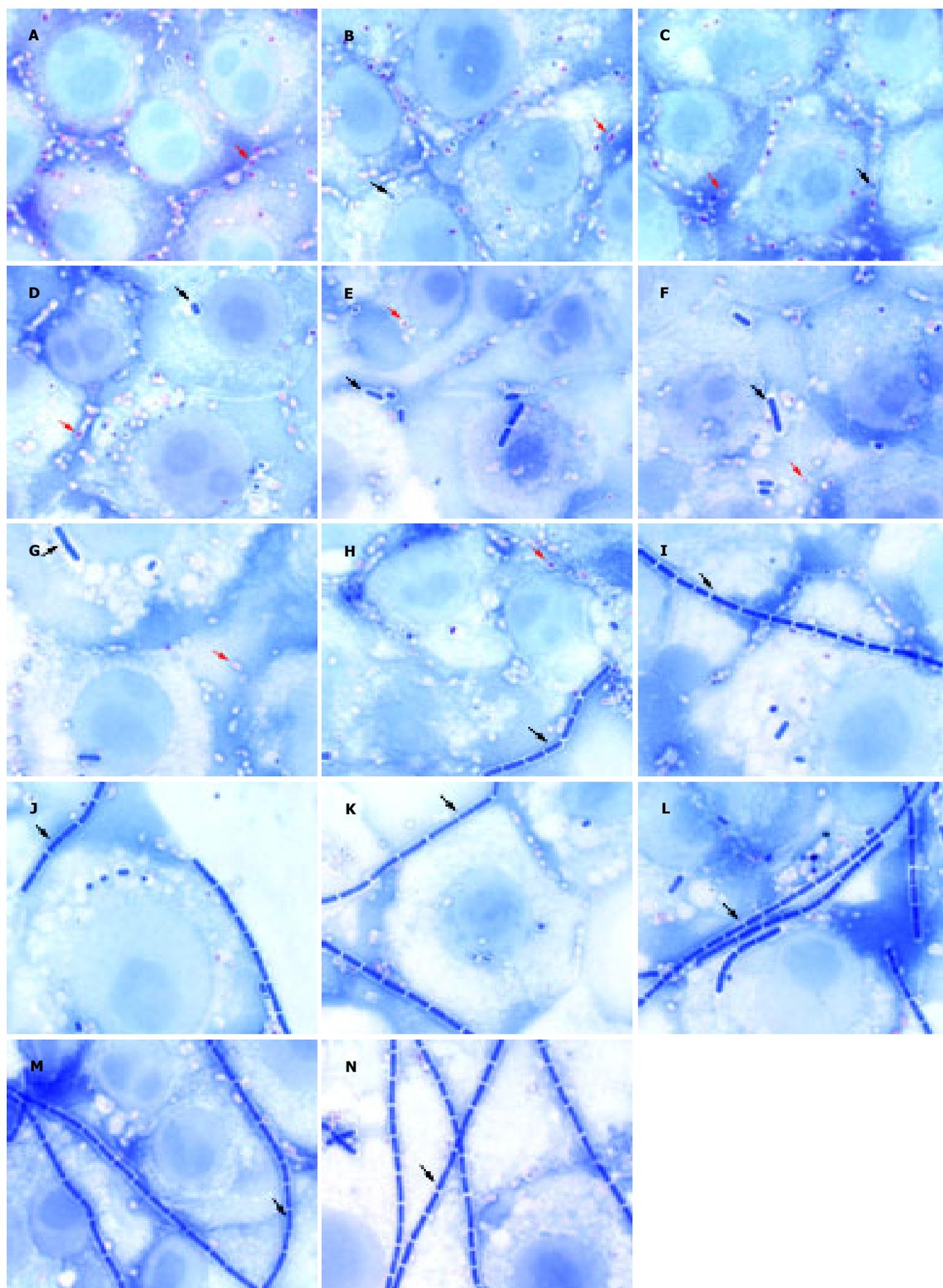


图1 RAW264.7 细胞感染炭疽芽孢A16R 芽孢后不同时间的复红美蓝染色结果. A: 1 h; B: 2 h; C: 2.5 h; D: 3 h; E: 3.5 h; F: 4 h; G: 4.5 h; H: 5 h; I: 5.5 h; J: 6 h; K: 6.5 h; L: 7 h; M: 7.5 h; N: 8 h.

界定炭疽芽孢在感染模型中结构、功能改变的时间点(段)是全面研究宿主反应机制的前提. 已有文献采用了免疫荧光-激光共聚焦显微镜^[5-6]、透射电镜^[7]以及常规革兰染色^[7-8]等方法检测了几株炭疽芽孢在巨噬细胞内的萌发情况, 但都存在着过程繁琐或者不能同时显示芽孢和繁殖体等缺陷. 因此, 我们考虑能否应用芽孢染色法来检测芽孢在巨噬细胞内萌发的过程. 常用的芽孢染色法包括孔雀石绿染色、Moller 染色以及复红美蓝染色等, 但前两种染色过程都需要加热, 不适用于细胞爬片的染色. 我们采用染色过程温和的复红美蓝染色法, 对吞噬后的芽孢和萌发的繁殖体进行了清楚地着色(芽孢呈红色和繁殖体呈蓝色), 从而简便、有效地确定了 A16R 芽孢在巨噬细胞 RAW264.7 内的萌发过程, 并为今后通过基因表达谱分析和比较蛋白质组等方法对宿主细胞在芽孢萌发不同时段的全局性反应进行研究奠定了基础.

4 参考文献

- 1 Fukao T. Immune system paralysis by anthrax lethal toxin: the roles of innate and adaptive immunity. *Lancet Infect Dis* 2004;4:166-170
- 2 Moayeri M, Leppla SH. The roles of anthrax toxin in pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 2004;7:19-24
- 3 Guidi-Rontani C. The alveolar macrophage: the Trojan horse of *Bacillus anthracis*. *Trends Microbiol* 2002;10:405-409
- 4 Hanna PC, Acosta D, Collier RJ. On the role of macrophages in anthrax. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10198-10201
- 5 Guidi-Rontani C, Weber-Levy M, Labruyere E, Mock M. Germination of *Bacillus anthracis* spores within alveolar macrophages. *Molecular Microbiol* 1999;31:9-17
- 6 Guidi-Rontani C, Levy M, Ohayon H, Mock M. Fate of germinated *Bacillus anthracis* spores in primary murine macrophages. *Molecular Microbiol* 2001;42:931-938
- 7 Dixon TC, Fadl AA, Koehler TM, Swanson JA, Hanna PC. Early *Bacillus anthracis*-macrophage intracellular survival and escape. *Cellular Microbiol* 2000;2:453-463
- 8 Bergman NH, Passalacqua KD, Gaspard R, Shetron-Rama LM, Quackenbush J, Hanna PC. Murine macrophage transcriptional responses to *bacillus anthracis* infection and intoxication. *Infection Immunity* 2005;73:1069-1080

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第六届全国胃肠动力学术研讨会征文通知

本刊讯 为提高国内胃肠动力障碍性疾病临床和基础研究水平, 吸取国外最新研究成果, 加强对外交流与合作, 中华医学会消化病学分会胃肠动力学组定于 2005-11 月上旬在武汉召开全国第六届胃肠动力学术会议, 届时将邀请国内外胃肠动力学专家就本学科的基础和临床研究进展作专题演讲, 并进行广泛的学术交流. 现将征文有关事项通知如下:

1 征文内容

(1) 胃肠动力障碍性疾病的基础和临床研究; (2) 胃肠功能性疾病的基础和临床研究; (3) 胃肠神经系统功能与胃肠动力学基础研究; (4) 胃肠动力学检测方法的临床应用.

2 征文要求

(1) 论文摘要不得超过 800 字, 电脑打印(附软盘), 格式为: 题目, 作者, 单位, 邮编, 目的, 方法, 结果和结论, 附联系电话及 E-mail 地址; (2) 已在全国公开发表的论文不予受理.

3 投稿地址

武汉市解放大道 1277 号协和医院消化科 刘劲松 收(邮编: 430022), 电话: 027-85726381; 2 武汉市丁字桥路 100 号湖北省医学会 林勇 胡丽萍收(邮编: 430064), 电话: 027-87893467.

4 截稿日期

2005-07-30

5 会议具体地点

另行通知. 会议信息, 论文投稿, 表格下载请登陆网站: <http://hubeiyiyuan.go.nease.net>.

中华医学会消化病学分会

消化病学分会胃肠动力学组