

本文引用: 张可, 李强, 王佳贺, 等. 大肠杆菌 K1 株毒力岛基因 *ibeT* 参与调节脑微血管内皮细胞骨架重排[J]. 新乡医学院学报 2014, 31(2): 87-89.

【基础研究】

大肠杆菌 K1 株毒力岛基因 *ibeT* 参与调节脑微血管内皮细胞骨架重排

张可¹, 李强², 王佳贺³, 方文刚¹, 陈誉华¹

(1. 中国医科大学发育细胞生物学教研室 辽宁 沈阳 110001; 2. 中国医科大学附属盛京医院检验科 辽宁 沈阳 110004; 3. 中国医科大学附属盛京医院老年病科 辽宁 沈阳 110004)

摘要: 目的 探讨大肠杆菌 K1 株毒力岛基因 *ibeT* 与人脑微血管内皮细胞(HBMEC)骨架重排的关系。方法 从大肠杆菌 K1 E44 中剔除侵袭基因 *ibeT*, 利用 *ibeT* 基因缺失突变株侵袭 HBMEC 10 min 后, 再用罗丹明标记的毒伞素对细胞骨架进行染色, 荧光显微镜观察。结果 E44 与 E44: $\Delta ibeT$ 均能引起 HBMEC 的微丝发生重新分布。与 E44 相比, E44: $\Delta ibeT$ 侵袭 HBMEC 的微丝向细胞周边延伸的程度较 E44 侵袭后的 HBMEC 弱, 所形成的膜皱褶结构较少。E44 侵袭细胞皮质区的肌动蛋白纤维基本消失, E44: $\Delta ibeT$ 侵袭 HBMEC 细胞皮质区的肌动蛋白纤维仍然清晰可见。结论 侵袭基因 *ibeT* 参与大肠杆菌 K1 侵袭 HBMEC 骨架重排。

关键词: *ibeT*; 细胞骨架; 脑微血管内皮细胞; 大肠杆菌 K1

中图分类号: R37 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2014)02-0087-03

ibeT an *Escherichia coli* K1 pathogenicity island gene participated in regulation of cytoskeleton rearrangement in brain microvascular endothelial cells

ZHANG Ke¹, LI Qiang², WANG Jia-he³, FANG Wen-gang¹, CHEN Yu-hua¹

(1. Department of Developmental Cell Biology, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China; 3. Department of Geriatrics, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between the *ibeT* gene in *Escherichia coli* K1 and the cytoskeleton rearrangement of human brain microvascular endothelial cells (HBMEC). **Methods** The invasive gene *ibeT* was deleted from E44. After 10 min of *ibeT* gene deletion mutant (E44: $\Delta ibeT$) invasion of HBMEC, cells were incubated with TRITC-labeled phalloidin to stain the actin filaments and then analyzed by using immunofluorescence microscope. **Results** The microfilaments in HBMEC was redistributed which was caused by E44 or E44: $\Delta ibeT$. However, compared to E44, the extension to cell edge of microfilaments of HBMEC infected by E44: $\Delta ibeT$ was weak and the cell membrane ruffle was less. Stress fibers and cortical fibers disappeared in HBMEC which caused by E44 whereas the actin filaments of cortical fibers was still existed in infected by E44: $\Delta ibeT$. **Conclusion** The invasion gene *ibeT* contributes to cytoskeleton rearrangement of HBMEC.

Key words: *ibeT*; cytoskeleton; brain microvascular endothelial cells; *Escherichia coli* K1

新生儿细菌性脑膜炎是儿科严重感染性疾病之一,临床上尽管可以选用相应的抗生素治疗,但病死率仍得不到显著改善,且幸存者常伴有失听、失明、癫痫、智力和运动障碍等后遗症^[1-2]。因此,探讨该病的发病机制对新生儿细菌性脑膜炎的防治策略具有重要意义。大肠杆菌是导致新生儿脑膜炎最常见的革兰阴性致病菌^[2-3]。现已知引起大肠杆菌性脑

膜炎的首要条件是血行播散的大肠杆菌必须穿过主要由脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cells, BMEC)组成的血脑脊液屏障。近年来,学者们利用分离培养的 BMEC 作为研究模型,先后鉴定了致脑膜炎大肠杆菌中的一些侵袭 BMEC 相关基因,如 *fimH*、*ompA*、*ibeA*、*ibeB* 及 *CNF1* 等,并对与大肠杆菌侵袭相关的细胞内信号转导通路进行了探讨^[2-3],但细菌的这些侵袭基因如何参与侵袭进入宿主细胞的机制,目前尚不清楚。作者在研究过程中,从致新生儿脑膜炎大肠杆菌 K1 株 RS218(O18:K1:H7)中克隆鉴定了一个 20.3 kb 的大肠杆菌 K1 毒力岛基因 *GimA*^[4]。*GimA* 仅存在于大肠杆菌 K1,其他非脑膜炎大肠杆菌中均不含 *GimA* 序列。*ibeT* 基

DOI: 10.7683/xyxyxb.2014.02.002

收稿日期: 2013-11-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81101225, 81101224)

作者简介: 张可(1981-),女,辽宁沈阳人,博士,讲师,研究方向: 神经血管细胞生物学与神经退行性疾病。

通信作者: 陈誉华(1963-),男,辽宁沈阳人,博士研究生导师,教授,研究方向: 神经血管细胞生物学与神经退行性疾病。

因是 GimA 中的一个编码基因,全长 1 404 bp,推断的编码蛋白相对分子质量约为 5×10^4 。有研究显示 *ibeT* 基因缺失的大肠杆菌 K1 突变株对人 BMEC (human BMEC, HBMEC) 的侵袭能力下降^[5]。*ibeT* 在大肠杆菌 K1 中的表达,有利于大肠杆菌 K1 在 HBMEC 中繁殖。作者在近期的研究中发现 *ibeT* 参与大肠杆菌 K1 侵袭 HBMEC 时细胞骨架重排,并对其涉及的机制进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 细菌培养 大肠杆菌以 LB 培养基(每升中含胰蛋白胨 10 g, NaCl 10 g, 酵母提取物 5 g)培养,贮存时加入甘油至体积分数 15% 置于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。以大肠杆菌 DH5 α 作为亚克隆和质粒扩增的宿主菌。SM10 λ π 作为与 E44 接合的供体菌用于传递质粒 pCVD442。在 LB 培养基中分别加入浓度为 $100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氨苄西林和 $50\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的卡那霉素,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $225\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下培养带有质粒的 DH5 α 和 SM10 λ π 宿主菌。大肠杆菌 E44 株用含有 $100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 利福平的 LB 培养基于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $225\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下培养。在行细胞侵袭试验前,挑取 E44 单菌落接种于含有 $100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 利福平的体积分数 3.75% 的 BHI 培养基中于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $90\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下培养过夜。

1.2 细胞培养 HBMEC 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 、100% 湿度的条件下,于含有体积分数 10% 胎牛血清、体积分数 10% Nu 血清、 $2\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺和 $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丙酮酸钠的 RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 培养液中进行培养。每 2 ~ 3 d 更换新鲜培养液,待细胞在培养瓶底面生长至约 90% 时,用含体积分数 0.25% 胰蛋白酶的细胞消化液消化细胞后,加入培养液,吹打成单细胞悬液后,用培养液将其稀释 3 倍,分瓶继续培养。

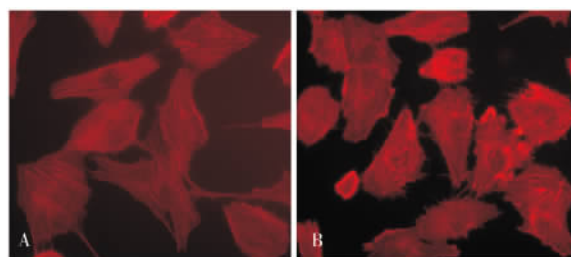
1.3 大肠杆菌 K1 *ibeT* 基因缺失突变株的构建 参照文献[6-7]报道的方法,依据 GimA (Genbank 登录号: AF289032) 序列,针对 *ibeT* 基因上游序列,设计引物 p1: 5'-GTCAGATGAAAATACGGTAGACT-CAGGT-3', p2: 5'-AAGCTTAACCTTTATTCCTGTTA-AAAGACT-3', 分别在 p1 和 p2 的 5' 端加入 *Sal* I 和 *Hind* III 的酶切位点; 针对 *ibeT* 基因下游序列,设计引物 p3: 5'-AAGCTTGTATTCAAGATAATAAAT-GCG-3', p4: 5'-GAGCTCGGCTGACAGAGTATAACG-TAAT-3', 分别在 p3 和 p4 的 5' 端加入 *Hind* III 和 *Sac* I 的酶切位点。利用这 2 对引物,以 E44 基因组 DNA 为模板进行聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增,分别获得 *ibeT* 基因上游和下游的 DNA 序列; 将这 2 个序列分别克隆到 pGEMT-

easy 载体上,再利用 p2 和 p3 上的酶切位点 *Hind* III 将 2 个片段拼接。利用 *Sal* I 和 *Sac* I 将拼接后的片段克隆到自杀性载体 pCVD442 上,并将重组质粒转化到 SM10 λ π 感受态细菌中。将带有重组质粒的 SM10 λ π 供体菌接合转导至受体菌 E44 中,通过菌体内同源交换,经 PCR 鉴定并测序验证,得到 *ibeT* 基因缺失的 E44: Δ *ibeT* 突变株。

1.4 荧光法观察微丝 将 HBMEC 接种到无菌处理的盖玻片上,待细胞在盖玻片上生长至约 50% 时,将培养液更换为实验培养液,然后加入过夜培养的 E44 株或 E44: Δ *ibeT* 突变株至 10^{10} L^{-1} ,在加入细菌孵育 10 min 时,弃去实验培养液,磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 漂洗后,体积分数 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min; 体积分数 0.25% Triton X-100 透化 10 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min; 体积分数 5% 牛血清白蛋白室温封闭 1 h 后,在盖玻片上滴加罗丹明标记的毒伞素室温避光染色 1 h, PBS 洗 3 次,每次 10 min。去离子水略洗一下盖玻片后,体积分数 90% 甘油封片,用荧光显微镜进行观察。

2 结果

利用荧光标记技术,通过罗丹明标记的毒伞素对细胞骨架的主要组分——肌动蛋白微丝观察发现, E44 与 E44: Δ *ibeT* 均能引起 HBMEC 的微丝发生重新分布。与 E44 相比, E44: Δ *ibeT* 侵袭 HBMEC 的微丝向细胞周边延伸的程度较 E44 侵袭后的 HBMEC 弱,所形成的膜皱褶结构较少。E44 侵袭的 HBMEC 横贯细胞的应力纤维数量减少,细胞皮质区的肌动蛋白纤维基本消失,而 E44: Δ *ibeT* 侵袭 HBMEC 细胞皮质区的肌动蛋白纤维仍然清晰可见 (图 1)。提示侵袭基因 *ibeT* 参与了大肠杆菌 K1 侵袭 HBMEC 骨架重排。



A: E44: Δ *ibeT*; B: E44。

图 1 *ibeT* 基因缺失对大肠杆菌 K1 侵袭 HBMEC 骨架重排的影响

Fig. 1 Effect of the deletion of *ibeT* gene on the cytoskeletal rearrangement induced by *Escherichia coli* K1 invading to HBMEC

3 讨论

近年来,致病菌侵袭进入宿主细胞的机制日益受到研究者的关注。细胞骨架是由蛋白质纤维构成的网状结构,参与细胞运动、细胞分裂和细胞分化等生命活动。肌动蛋白是细胞骨架中的重要成分,在一些信号刺激下,肌动蛋白丝可发生聚合或重排^[8]。细菌正是利用肌动蛋白细胞骨架的不同信号反应性,以不同方式进入细胞。细菌侵袭进入非吞噬细胞的机制主要有2种:一是拉链式机制。即细菌接触宿主细胞后,与宿主相应受体结合,激活宿主细胞信号传导系统,引发肌动蛋白细胞骨架重排。随后宿主膜包裹于菌体周围,细菌似陷入其中,此过程称为拉链式机制。采用此方式的典型致病菌为耶尔森菌和产单核细胞李氏菌^[8-10]。研究显示,大肠杆菌 K1 侵袭进入 HBMEC 也是通过该机制。二是触发式机制。细菌与宿主细胞接触后,迅速引发大规模的细胞骨架反应,细胞质膜下的肌动蛋白聚合物伸出片状或伪足样结构,将膜包裹的细胞外细菌卷入细胞内。此过程又称为微胞饮,形成胞内膜包涵体。与拉链式机制相比,触发式机制中宿主细胞形态发生明显改变。典型代表为志贺菌和沙门菌属^[8-9]。

细菌的许多毒力蛋白参与宿主细胞的骨架重排。目前已经鉴定了多个可直接被分泌到真核细胞内的细菌效应分子,例如, EspB 是肠致病性大肠杆菌的一种分泌蛋白,它可以通过细菌的Ⅲ型分泌系统进入 Hela 细胞质中,引起 Hela 细胞发生细胞骨架变化^[11]。在大肠杆菌 K1 侵袭 HBMEC 相关研究中,本实验室曾报道^[12]大肠杆菌 K1 的效应分子 IbeB 蛋白可以引起 Hela 细胞的细胞骨架重新组装(片状伪足出现),该发现不仅为研究细菌的侵袭机制累积了资料,而且可以利用致病菌基因组作为“分子探针”研究真核细胞的骨架调控机制。作者在近期的研究中发现, GimA 是定位在大肠杆菌 K1 中的毒力岛,且仅存在于大肠杆菌 K1,其他非脑膜炎大肠杆菌中均不含 GimA 序列。*ibeT* 基因是 GimA 中的一个编码基因,而且,还是一个具有侵袭功能的毒力基因^[5]。*ibeT* 基因的敲除,不仅可以使大肠杆菌 K1 对 HBMEC 的侵袭力下降,而且使大肠杆菌 K1 逃逸 HBMEC 溶酶体的能力发生了缺陷。为了探讨 *ibeT* 参与大肠杆菌 K1 侵袭 HBMEC 的机制,作者构建了 *ibeT* 基因缺失突变株,对突变株侵袭 HBMEC 后的细胞骨架进行了染色分析。结果显示,与野生型大肠杆菌 K1 相比, *ibeT* 基因缺失突变

株侵袭 HBMEC 的微丝向细胞周边延伸的程度较弱,所形成的膜皱褶结构较少,即 *ibeT* 基因的缺失削弱了大肠杆菌 K1 对 HBMEC 骨架的破坏程度。这些结果提示, *ibeT* 可能通过参与对 HBMEC 骨架进行调节,从而有助于大肠杆菌 K1 对 HBMEC 的侵袭。本研究一方面为大肠杆菌 K1 侵袭 HBMEC 的机制累积了资料,另一方面,增加了对细菌基因调节细胞骨架的认识,关于 *ibeT* 参与调节 HBMEC 所涉及的细胞内信号分子,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 刘浩书,邓媛媛,熊涛,等.新生儿细菌性脑膜炎 45 例[J].实用儿科临床杂志,2011,26(10):733-735.
- [2] 刘玉兰,赵志霞,黄孝宇.新生儿化脓性脑膜炎的早期诊断与预后[J].新乡医学院学报,2000,17(2):126-127.
- [3] Shanmuganathan M V, Krishnan S, Fu X *et al.* *Escherichia coli* K1 induces pterin production for enhanced expression of Fcγ receptor I to invade RAW 264.7 macrophages[J]. *Microbes Infect* 2013, [Epub ahead of print].
- [4] Huang S H, Chen Y H, Kong G *et al.* A novel genetic island of meningitic *Escherichia coli* K1 containing the *ibeA* invasion gene (GimA): functional annotation and carbon-source-regulated invasion of human brain microvascular endothelial cells[J]. *Funct Integr Genomics* 2001, 1(5):312-322.
- [5] Zou Y, He L, Chi F *et al.* Involvement of *Escherichia coli* K1 *ibeT* in bacterial adhesion that is associated with the entry into human brain microvascular endothelial cells[J]. *Med Microbiol Immunol*, 2008, 197(4):337-344.
- [6] Silver R P, Aaronson W, Sutton A *et al.* Comparative analysis of plasmids and some metabolic characteristics of *Escherichia coli* K1 from diseased and healthy individuals[J]. *Infect Immun*, 1980, 29(1):200-206.
- [7] 张可,赵伟东,李强,等.毒力岛基因 *ibeT* 有助于大肠杆菌抵抗人脑微血管内皮细胞溶酶体的降解[J].生物化学与生物物理进展,2009,36(4):417-423.
- [8] 张湘燕,郭晓奎,刘晶星.细菌利用宿主肌动蛋白细胞骨架进入非吞噬细胞的机制[J].细胞生物学杂志,2002,24(3):155-158.
- [9] 徐邦牢.细菌侵袭与宿主细胞骨架重排[J].国外医学:临床生物化学与检验学分册,2001,22(4):203-204.
- [10] 杨晓煜,焦云娟,冶亚平,等.食管黏膜上皮癌变过程中与细胞骨架蛋白 tensin 同源的磷酸酯酶基因的表达及意义[J].新乡医学院学报,2009,26(4):334-336.
- [11] Taylor K A, Luther P W, Donnenberg M S. Expression of the EspB protein of enteropathogenic *Escherichia coli* within Hela cells affects stress fibers and cellular morphology [J]. *Infect Immun*, 1999, 67(1):120-125.
- [12] 赵伟东,陈誉华.大肠杆菌血脑屏障侵袭基因 *ibeB* 的稳定转染能够促进 Hela 细胞片状伪足的形成[J].生物化学与生物物理进展,2005,32(2):116-121.

(本文编辑:徐刚珍 英文编辑:杨博)