

· 论 著 ·

不可分型流感嗜血杆菌对气管黏膜上皮细胞的作用

钱建美, 修清玉^{*}, 王桂芳, 颜泽敏(第二军医大学长征医院呼吸内科, 上海 200003)

[摘要] 目的: 探讨不可分型流感嗜血杆菌(NTHi)与气液界面无血清培养原代兔气管黏膜上皮细胞的相互作用。方法: 利用低温酶消化法分离兔气管黏膜上皮细胞, 无血清培养液及胶原覆盖膜形成的气液界面培养, 使上皮细胞分化成假复层黏膜纤毛上皮细胞, 然后加入NTHi感染上皮细胞, 通过扫描电镜(SEM)和透射电镜(TEM)观察其形态结构变化。结果: NTHi感染24 h后, SEM示气管黏膜上皮细胞表面结构破坏, 90%细胞凋亡或死亡, 纤毛倒伏、断裂, 细菌与非纤毛上皮细胞连接; TEM示细菌黏附在细胞表面, 细胞表面有较多微绒毛, 伴微绒毛延伸或伪足包绕细菌, 将其吞噬胞内。结论: NTHi黏附在上皮细胞表面, 上皮细胞通过伪足形成和微绒毛延伸包绕细菌, 将细菌吞噬在胞内; NTHi对上皮细胞有毒性作用, 致细胞变性坏死或凋亡。

[关键词] 不可分型流感嗜血杆菌; 气管黏膜上皮细胞; 细胞凋亡

[中图分类号] R 378.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)07-0769-04

Primary rabbit tracheal epithelial cells infected by nontypeable *Haemophilus influenzae*

QIAN Jian-Mei, XU Qing-Yu^{*}, WANG Gui-Fang, YAN Ze-Min (Department of Respiratory Diseases, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To explore the effect of nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) strain ATCC49247 on primary rabbit tracheal epithelial (TE) cells. **Methods:** TE cells were isolated with low temperature protease digestion and cultured on collagen gel-coated membranes at an air-liquid interface in serum-free medium. Under these conditions, TE cells were proliferated and differentiated into a pseudostratified mucociliary epithelium, which were infected by NTHi. Morphologic changes of the cells were examined by scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) after 24 h. **Results:** SEM showed that bacteria adhered to non-ciliated cells; death or apoptosis occurred in 90% of TE cells and cilia were broken. TEM showed NTHi adhered to the cell surface on which there were many microvilli. Lamellipodia and microvilli surrounded bacteria within vacuoles of airway cells. **Conclusion:** NTHi can attach to non-ciliated cells, the latter devours the bacteria by lamellipodia and microvilli. NTHi is toxic to TE cells, resulting in the death or apoptosis of TE cells.

[KEY WORDS] nontypeable *Haemophilus influenzae*; tracheal epithelial cells; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(7): 769-772]

^[1] 不可分型流感嗜血杆菌(NTHi)是一种无荚膜的革兰阴性球杆菌, 常聚集在呼吸道, 感染气道表面, 造成黏膜纤毛清除机制受阻或丧失。它是慢性阻塞性肺疾病(COPD)急性加重期患者痰中最常见的分离条件致病菌, 在儿童化脓性中耳炎中分离率达30%左右^[1]。20世纪90年代以来, 国外学者利用人支气管上皮细胞原代培养^[2]及多种支气管细胞株模型^[3,4], 对NTHi的致病机制作了有意义的探索, 但国内尚无有关报道。我们利用气液界面无血清培养原代兔气管黏膜上皮细胞模型, 对NTHi的致病作用进行了研究。

1 材料和方法

1.1 试剂和药品 蛋白酶XV型、内皮细胞生长支持物(EGS)、表皮生长因子(EGF)、胰岛素(INS)、转铁蛋白(TF)、甲状腺素(T₃)、氢化可的松(HC)均为Sigma产品, DMEM/F12、胎牛血清(FCS)为Gibco

产品, 牛真皮I型胶原(CSC)为Roche产品, 余为国产分析纯。ATCC49247 NTHi为本院标准菌株。

1.2 培养器皿 套皿(3412型)为Costar产品, 套皿用I型胶原以0.15 ml/cm²铺膜, 室温放置数小时备用。

1.3 培养液配制 在DMEM/F12中加入10 μg/ml NS、0.1 μg/ml HC、10 μg/ml TF、20 ng/ml T₃、25 ng/ml EGF、7.5 μg/ml ECGS、1 mmol/L 谷氨酰胺、100 U/ml 青霉素、50 μg/ml 链霉素, 为无血清培养液(CM)。

1.4 气管黏膜上皮细胞分离和培养 气管黏膜上皮细胞分离和培养参照Wu^[5]及Tournier^[6]等方法。新西兰大白兔, 体质量2~3 kg, 上海实验用养兔场

[基金项目] 渤林格殷格翰COPD资助项目(9803)。

[作者简介] 钱建美(1971-), 女(汉族), 主治医师。现在解放军第101医院呼吸科, 江苏无锡214000。

^{*}Corresponding author.

提供, 空气栓塞致死, 在无菌条件下取出气管, 用 PBS 冲洗数次, 气管喉端用 4 mm 塑料插管并结扎固定, 注入 0.1% 蛋白酶 XIV 少许, 结扎支气管端, 继续注入蛋白酶至充盈, 插管封口, 将整段气管浸没在冷的 DMEM 培养液中, 4℃ 消化 18 h。随后用含 10% FCS 的 DMEM 冲出消化液, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 同上洗涤 1 次。用少量 CM⁺ (CM⁺ 10% FCS) 悬浮细胞, 血细胞计数板计数, 锥虫蓝拒染法检测细胞活力, 按 $5.0 \times 10^5/\text{cm}^2$ 活细胞数加入套皿杯中, 5% CO₂ 37℃ 培养, 24 h 后换为无血清培养液, 上层培养液 0.5 ml, 下层培养液 2.0 ml, 隔日换液 1 次, 直至约第 7 天细胞融合长满后, 移去上层培养液, 仅加底层培养 CM⁻ (CM 中去除 EGF 和 ECGS)。气液界面形成, 并去除一些生长因子, 利于上皮细胞分化为功能纤毛上皮细胞。

1.5 细菌感染 将 ATCC49247 NTHi 接种于改良的哥伦比亚巧克力琼脂培养基, 5% CO₂ 37℃ 培养约 18~24 h。挑取平板中数个菌落于 PBS 中混悬, 制成约 1×10^9 cfu/ml 菌液, 用 PBS 稀释 10 倍, 混匀, 取 1 ml 用无抗生素 CM⁻ 稀释 10 倍, 取 200 μl 加入套皿杯中, 底层培养液用无抗生素 CM⁻ 代替。在 5% CO₂ 37℃ 培养 24 h 后, 移去上、下层培养液, PBS 冲洗 2 次, 2% 戊二醛固定, 置于 4℃ 待作电镜检查。

1.6 透射电镜 取膜 1% 锇酸后固定, 乙醇逐级脱水, 环氧丙烷置换, EPON 618 浸透包埋, 制成超薄切片, 常规枸橼酸铅染色液染色, HITACHI FH500 透射电镜观察。

1.7 扫描电镜 取膜 1% 锇酸后固定, 乙醇逐级脱

水, HITACHI HCP-2 临界点干燥, BAL-TEC 离子射导电, 飞利浦公司 XL30 ESEM 环境扫描电镜观察。

2 结果

2.1 原代兔气管黏膜上皮细胞培养分析 用酶低温消化获得气管黏膜上皮细胞, 锥虫蓝染色法显示细胞成活率 90% 以上, 每条气管细胞得率约 1.0×10^7 , 倒置相差显微镜下观察可见细胞呈圆形、多角形并可见活动的纤毛。套皿接种细胞 24 h 后, 贴壁率为 60%。套皿气液界面培养 2 周后, 切下套皿膜 H-E 染色, 镜下可见细胞呈现复层生长 (图 1)。

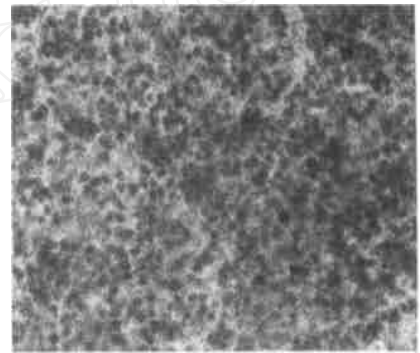


图 1 气液界面培养的气管黏膜上皮细胞 H-E 染色

Fig 1 H-E staining of tracheal epithelial cells cultured at a air-liquid interface (×200)

正常气管黏膜上皮细胞气-液界面方式培养 2 周后, 扫描电镜观察, 气管黏膜上皮细胞结构完整, 纤毛排列整齐光滑, 细胞间紧密连接, 未见到凋亡或死亡细胞, 可分辨出两种细胞类型, 一种为纤毛细胞, 约占 10%; 另一种为非纤毛上皮细胞, 表面覆盖着微绒毛 (图 2A、2B)。

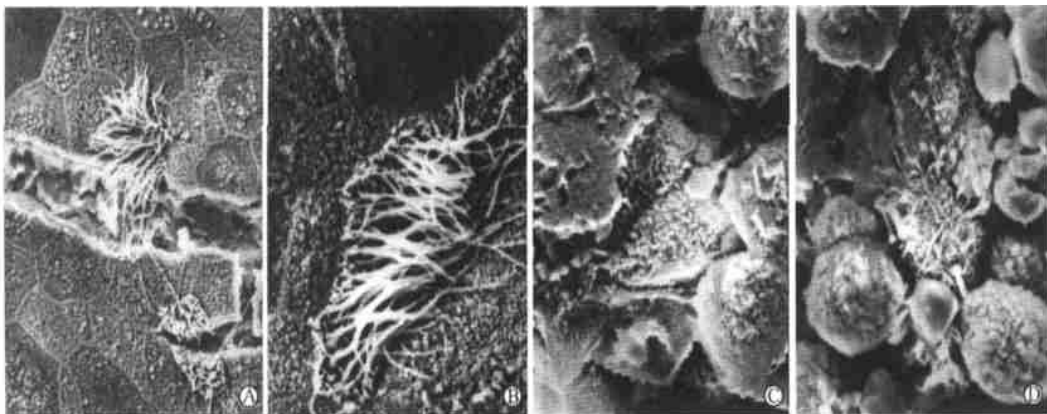


图 2 气液界面培养的细菌未感染 (A、B) 和感染 (C、D) 气管黏膜上皮细胞扫描电镜观察

Fig 2 SEM studies of uninfected (A, B) and infected (C, D) tracheal epithelial cells on a air-fluid interface

A: Ciliated and non-ciliated cells were seen (×2 000); B: The ciliary surface was smooth and neat (×4 000);

C: NTHi adhered to non-ciliated cells 24 h after infection (×4 000);

D: Death and apoptosis occurred in 90% of TE cells and ciliary was broken 24 h after infection (×4 000)

2.2 NTHi感染气管黏膜上皮细胞24 h后电镜观察 SEM示气管黏膜上皮细胞表面结构破坏,多数上皮细胞连接松散,90%细胞凋亡或死亡,纤毛倒伏、断裂或紊乱,细菌与非纤毛上皮细胞连接,并可见成团的细菌黏附在细胞表面(图2C、2D)。

TEM示多数上皮细胞凋亡或死亡,细胞表面有较多微绒毛,NTHi黏附在细胞表面;细胞微绒毛延伸,有时伪足包绕细菌,将其吞噬胞内,部分细菌通过细胞层进入聚碳酸酯膜内,在细胞间可见到细菌(图3)。



图3 气液界面培养的细菌感染24 h
气管黏膜上皮细胞透射电镜观察

Fig 3 TEM studies of infected tracheal epithelial cells cultured for 24 h on air-fluid interface (×5 000)

Bacteria adhered to the cell surface, lamellipodia and microvilli surrounded the bacteria within vacuoles of airway cells

3 讨论

NTHi是重要的条件致病菌,常引起急性上、下呼吸道感染。部分COPD患者下呼吸道持续存在NTHi,引起COPD反复加重,发作次数较无细菌感染增多^[7],导致肺部疾患较高的发病率和死亡率。目前其损害气管黏膜上皮细胞的机制尚未完全清楚,因难以取得患者组织标本,故自然感染过程未被详细研究。为了研究NTHi对气管黏膜上皮细胞的致病作用,我们应用气液界面无血清原代培养兔气管黏膜上皮细胞,模拟体内真实情况加以研究。本组研究表明NTHi感染对气管黏膜上皮细胞有毒性作用,使上皮细胞紧密连接破坏,细胞变性、坏死,纤毛断裂、紊乱、失去运动能力,最终从表面脱落,NTHi通过上皮细胞间裂隙进入聚碳酸酯膜内。NTHi选择性黏附在非纤毛细胞表面,伴随微绒毛延伸,有时形成伪足包绕NTHi,将其吞噬入上皮细胞内。

Ketterer等^[2]利用原代人支气管黏膜上皮细胞培养,通过SEM、TEM、CLSM等证实了NTHi黏附在非纤毛气管黏膜上皮细胞表面,引起细胞骨架重排,伪足和微绒毛包绕细菌,并吞噬于胞内,细菌感染半小时后引起纤毛细胞的纤毛结构变硬并聚集成团,与我们研究结果相似。本组将细菌作用细胞

24 h后还发现大多数细胞已死亡或凋亡,表明该菌对细胞有毒性作用。在体内经支气管镜活检肺组织行原位杂交,发现15例AECB患者中,13例胞内存在Hi,仅1例支气管刷洗液中培养Hi为阳性^[8]。

这些研究表明NTHi不是传统认为的胞外菌,它可以进入胞内。目前的研究结果认为其胞内侵袭至少存在3种机制:(1)Ketterer等^[2]应用CLSM发现通过细胞大吞噬吞饮作用;(2)NTHi进入单核细胞和A549胞内涉及 β 葡聚糖受体^[9];(3)通过NTHi脂寡糖末端磷酸胆碱(Chop)与PAF受体结合介导侵袭机制^[10]。

NTHi表面能表达多种特异黏附素,细菌通过这些黏附素特异地黏附于呼吸道黏膜非纤毛上皮细胞表面,使得上皮细胞结构重排,将细菌吞噬于胞内。在体内,它在上皮细胞或单核细胞内可能会长期持续存在,避免抗生素及免疫机制作用^[11],有的持续黏附于细胞表面,一旦机体抵抗力下降,NTHi开始繁殖,引起肺部反复感染,使得呼吸道及肺组织进行性损害。是否可通过应用胞内菌抗菌药物^[12]进行治疗,消除由于NTHi导致COPD反复发作,最终延长COPD患者的缓解期,改善肺功能,这些均有待进一步观察。

[参考文献]

- [1] Teele DW, Klein JO, Rosner B. Epidemiology of otitis media during the first seven years of life in children in greater Boston: a prospective, cohort study[J]. *J Infect Dis*, 1989, 160(1): 83-94
- [2] Ketterer MR, Shao JQ, Hornick DB, et al. Infection of primary human bronchial epithelial cells by *Haemophilus influenzae*: macropinocytosis as a mechanism of airway epithelial cell entry[J]. *Infect Immun*, 1999, 67(8): 4161-4170
- [3] Clemans DL, Bauer RJ, Hanson JA, et al. Induction of proinflammatory cytokines from human respiratory epithelial cells after stimulation by nontypeable *Haemophilus influenzae*[J]. *Infect Immun*, 2000, 68(8): 4430-4440
- [4] Frick AG, Joseph TD, Pang LY, et al. *Haemophilus influenzae* stimulates ICAM-1 expression on respiratory epithelial cells[J]. *J Immunol*, 2000, 164: 4185-4196
- [5] Wu R, Smith D. Continuous multiplication of rabbit tracheal epithelial cells in a defined, hormone-supplemented medium[J]. *In Vitro*, 1982, 18(9): 800-812
- [6] Tournier F, Laoukili J, Giuliani I, et al. Ciliated differentiation of rabbit tracheal epithelial cells *in vitro*[J]. *Eur J Cell Biol*, 1998, 77(3): 205-213
- [7] Patel IS, Seemungal TAR, Wilks M, et al. Relationship between bacterial colonization and the frequency, character, and severity of COPD exacerbations[J]. *Thorax*, 2002, 57(9): 759-764
- [8] Bandi V, Apicella MA, Mason E, et al. Nontypeable *Haemophilus influenzae* in the lower respiratory tract of pa-

- tients with chronic bronchitis[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 164(11): 2114-2119
- [9] Ahren L, William DL, Rice PJ, et al The importance of a β glucan receptor in the nonopsonic entry of nontypeable *Haemophilus influenzae* into human monocytic and epithelial cells[J]. *J Infect Dis*, 2001, 184(2): 150-158
- [10] Swords WE, Ketterer MR, Shao J, et al Binding of the nontypeable *Haemophilus influenzae* lipooligosaccharide to the PA F receptor initiates host cell signaling[J]. *Cell Microbiol*, 2001, 3(8): 525-536
- [11] van Schilfgaarde M, Eijk P, Regelink A, et al *Haemophilus influenzae* localized in epithelial cell layers is shielded from antibiotics and antibody-mediated bactericidal activity[J]. *Microb Pathol*, 1999, 26(5): 249-262
- [12] Ahren L, Karlsson E, Forsgren A, et al Comparison of the antibacterial activities of ampicillin, ciprofloxacin, clarithromycin, telithromycin and quinupristin/dalfopristin against intracellular nontypeable *Haemophilus influenzae* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2002, 50(6): 903-906
- [收稿日期] 2003-10-11 [修回日期] 2004-04-20
[本文编辑] 孙 岩

· 个案报告 ·

泪腺良性多形性腺瘤一例报告

Pleomorphic adenoma of lacrimal gland: a case report

胡华生, 程金伟, 魏锐利(第二军医大学长征医院眼科, 上海 200003)

[关键词] 泪腺; 多形性腺瘤; 诊断; 外科手术

[中图分类号] R 739.7

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X (2004) 07-0772-01

1 临床资料 患者, 女, 35 岁, 因“左眼眶上缘肿块伴视力下降、流泪、眼胀 2 个月”入院。查体: 全身情况未见明显异常。眼部检查: 右眼视力 1.0, 左眼视力 0.3。右眼前节及眼底未见异常。左眼眶上缘外 2/3 范围局部隆起, 皮肤无红肿, 可触及长条形肿块, 大小约 7 mm × 23 mm, 表面凹凸不平, 质中, 活动度差, 紧贴眶缘, 不随眼球运动改变位置。左眼位略向前下方偏斜, 眼球向上运动明显受限, 眼球突出度 12.0 mm > $\overline{\quad}$ 9.5 mm < 13.5 mm。左眼前节及眼底未见异常。

态不规则, 略呈椭圆形, 大小约 10 mm × 16 mm, 边界清楚, 回声区有“瘤芽”突出, “瘤芽”内回声更低, 后有声衰减, 椭圆形回声压迫眼球使球壁向下隆起(图 1A、1B)。CT 平扫示左眼泪腺窝内有类圆形软组织团块影, 密度均匀, CT 值为 49 HU, 边界清楚, 边缘不规则呈小锯齿状, 泪腺窝有压迫性骨凹陷, 周围眶骨边缘光滑, 眼球受压向前下方移位(图 1C、1D)。MRI 平扫示左眼球外上方泪腺窝区一团块状异常信号影, T₂WI 略低信号, T₂WI 高信号(图 1E、1F)。

B 超示左眼眶外上方约泪腺窝处有一低回声实质性肿块, 形

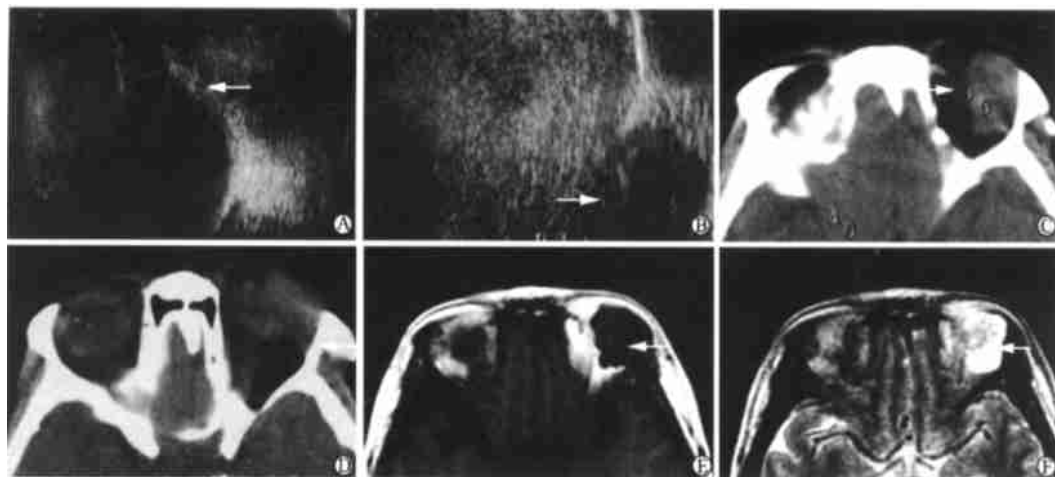


图 1 泪腺多形性腺瘤的影像学表现

A: 箭头示肿瘤压迫眼球; B: 箭头示肿瘤“瘤芽”突出; C: 箭头示肿瘤密度均匀, 边界清楚, 边缘呈小锯齿状;

D: 箭头示泪腺窝压迫性骨凹陷; E: 箭头示 T₂WI 像; F: T₂WI 像

[1] 患者在全麻下行左眼外侧开眶肿瘤摘除术。手术过程: 眶外上缘“S”形皮肤切口, 暴露并剥离骨膜, 锯开骨瓣, 充分暴露肿瘤。肿瘤位于眶颧上方, 紧贴眶骨壁, 质中, 类圆形, 有完整包膜。直视下剪开肿瘤包膜周围的黏连组织, 完整取出

(下转第 784 页)

[作者简介] 胡华生(1979-), 男(汉族), 第二军医大学海军医学系 1998 级学员