

荚膜在新生隐球菌致人脐静脉内皮细胞损伤中的作用

曹艳云¹, 徐顺明¹, 汪晓军², 温海^{2*}

(1. 上海市浦东新区人民医院皮肤科, 上海 201200; 2. 第二军医大学长征医院皮肤科, 上海 200003)

[摘要] **目的:** 探讨无荚膜和有荚膜(野生株)两种新生隐球菌菌株对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)抑制率的差异, 明确荚膜在其中发挥的作用。**方法:** 通过透射电子显微镜(TEM)观察新生隐球菌侵入和损伤 HUVEC 的过程以及作用后细胞的形态学变化; 分别在不同时相点用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)检测细胞抑制率的变化。**结果:** 通过 TEM 观察到两种菌株均造成细胞不同程度的损伤; 细胞的内质网疏松, 线粒体肿大, 细胞核膜损伤及其细胞的基本结构紊乱。CCK-8 试剂盒的检测结果表明, 共孵 30 min 时, 两菌株对 HUVEC 的抑制率比较无统计学意义; 共孵 1、2、3、4 h 时, 无荚膜株对内皮细胞的抑制率均高于野生株($P < 0.05$), 在 1 h 无荚膜株的抑制率可高达 79%; 5 h 时, 两菌株对 HUVEC 的抑制率无统计学差异。**结论:** 无荚膜株较野生株造成 HUVEC 更大程度的损伤, 说明荚膜在隐球菌损伤 HUVEC 过程中发挥着重要作用。

[关键词] 新生隐球菌; 人脐静脉内皮细胞; 荚膜

[中图分类号] R 379.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)02-0148-03

Role of *Cryptococcus neoformans* capsule in *Cryptococcus neoformans*-induced damage of human umbilical vein endothelial cells

CAO Yan-yun¹, XU Shun-ming¹, WANG Xiao-jun², WEN Hai^{2*} (1. Department of Dermatology, People's Hospital of Pudong New Area, Shanghai 201200, China; 2. Department of Dermatology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the different inhibitory effects of capsule-depleted and wild type *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*) on human umbilical vein endothelial cell (HUVEC), so as to clarify the role of *C. neoformans* capsule. **Methods:** The infection process of HUVEC by *C. neoformans* and the cellular morphologic changes of HUVEC were observed by transmission electron microscope (TEM). The cell inhibition rates were detected with CCK-8 kit at different phases. **Results:** TEM observation revealed different degrees of cell damages after co-cultured with the above 2 strains of *C. neoformans*, with the loose endoplasmic reticulum, swollen mitochondria, nuclei damage, and disarranged cell structure. The result of CCK-8 showed that there was no significant difference in the inhibition rates of HUVEC between the 2 groups 30 min after co-culture ($P > 0.05$). 1 h, 2 h, 3 h, and 4 h after co-culture, the inhibition rate in capsule-depleted group was higher than that of the wild strain group ($P < 0.05$), with the inhibition rate being 79% at 1 hour. Five hours after co-culture, the inhibition rates were similar in capsule-depleted group and wild strain group ($P > 0.05$). **Conclusion:** Capsule-depleted *C. neoformans* causes more significant endothelial cell injury than wild strain *C. neoformans* does, indicating that the capsule play an important role in *C. neoformans*-induced damage of endothelial cells.

[KEY WORDS] *Cryptococcus neoformans*; human umbilical vein endothelial cells; capsule

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(2): 148-150]

新生隐球菌是一种重要的病原真菌, 最常感染中枢神经系统引起致命的脑膜炎。目前已明确, 隐球菌与血管内皮细胞的相互作用是其侵犯其他深部组织的前提, 能够在血管内皮细胞内繁殖并造成其损伤是隐球菌致病的重要因素。因此, 研究不同的新生隐球菌菌株对血管内皮细胞损伤的差异, 对于明确其致病机制有重要意义。本研究通过透射电子显微镜(TEM)和细胞计数试剂盒-8(CCK-8)两种方法来比较无荚膜株和有荚膜株(野生株)对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)的损伤, 明确荚膜在隐球菌损伤 HUVEC

中的作用。

1 材料和方法

1.1 细胞系和菌株 HUVEC (购自 Cascade Biologics); 新生隐球菌标准野生株 B3501 和荚膜缺陷株 Cap60 (均由中国医学真菌保藏管理中心隐球菌专业实验室提供), 其中 B3501 为新生隐球菌血清 D

[基金项目] 国家自然科学基金(30471566). Supported by National Natural Science Foundation of China(30471566).

[作者简介] 曹艳云, 硕士, 住院医师。

* Corresponding author. E-mail: wenhai98@sohu.com

型新生变种, 具有荚膜、产黑素等经典的毒性因子。

1.2 实验试剂 Medium 200, 胰蛋白酶液(购自 Cascade Biologics); Sabouraud 培养基(SDA); YEPD 培养液; 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.0); CCK-8 试剂盒(Dojindo, Japan); 电镜固定液(4%多聚甲醛)。

1.3 细胞悬液的制备 将处于对数生长期的 HUVEC 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 制备细胞悬液, 接种于 6 孔细胞培养板, 使每孔细胞为 5×10^6 , 在 37°C 、5% CO_2 饱和湿度的培养箱中孵育过夜。

1.4 真菌悬液的制备 分别挑取一接种环在 SDA 平板上活化(30°C 培养 24 h)的 B3501 和 Cap60, 各接种于 5 ml 的 YEPD 培养液中, 120 r/min ($r=5 \text{ cm}$) 离心, 30°C 培养过夜, 吸取 1 ml 上述 YEPD 菌悬液接种入 10 ml YEPD 培养液中, 120 r/min ($r=5 \text{ cm}$) 离心, 30°C 培养 18 h, 5000 r/min ($r=5 \text{ cm}$) $\times 5 \text{ min}$ 离心, 收集菌体, 用 PBS 洗 3 次, 再用 PBS 调整菌悬液密度至 $1 \times 10^8/\text{ml}$ 。

1.5 真菌和 HUVEC 共孵育 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 1 ml 新鲜培养基, 再分别加入上述制备的两种新生隐球菌悬液 $100 \mu\text{l}$ (使细

胞与新生隐球菌的比例为 1:10)。在 37°C 、5% CO_2 饱和湿度的培养箱中共孵育。

1.6 HUVEC 损伤的检测 共孵育 6 h 后, 按 TEM(H-800, 日本) 常规包埋、超薄切片后上样观察。分别于 30 min、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h 加入 $10 \mu\text{l}$ 密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 不同新生隐球菌菌悬液到 96 孔板内, 每组设 3 个平行孔, 以不加任何菌的 HUVEC 作为空白对照。同时每个孔内加入 $10 \mu\text{l}$ 的 CCK-8 试剂, 在培养箱内培养 4 h。在 450 nm 波长处测定光密度(D), 参比波长为 650 nm。根据所测 D 值计算相对应的抑制率: 抑制率 = (对照组 D 值 - 加菌组 D 值) / (对照组 D 值 - 本底 D 值) $\times 100\%$ 。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 10.00 软件, 采用多组样本间比较的 SNK 检验, 进行统计学分析。

2 结果

2.1 TEM 的结果 通过 TEM, 可清楚地观察到两种菌株与 HUVEC 相互作用的过程中, 两种菌株均有出芽现象(图 1A); 细胞内质网疏松, 线粒体肿大, 空泡形成, 细胞核膜损伤, 细胞核固缩、碎裂, 最终导致细胞破坏、死亡(图 1B、1C)。其中, Cap60 对 HUVEC 的损伤远远高于 B3501(具体比例未统计)。

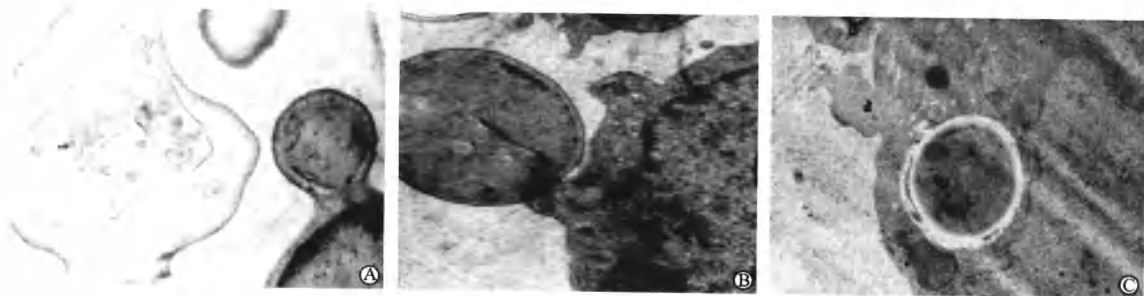


图 1 新生隐球菌对 HUVEC 的抑制作用(TEM)

Fig 1 TEM observation of HUVEC after co-cultured with *C. neoformans*

A; B3501 budded in cytolymph of HUVEC, cell nucleus membrane was depressed and cell structure was destroyed ($\times 15000$); B; Cell membrane was damaged and "pinchers" protuberances appeared for adhesion B3501 after B3501 interacted with HUVEC ($\times 12000$); C; Cell membrane was destroyed, cell nucleus became irregular, mitochondrion was swollen, and endoplasmic reticulum became loose after Cap60 invaded HUVEC ($\times 7000$)

2.2 CCK-8 结果 HUVEC 与不同新生隐球菌菌株共孵 30 min 时, 两菌株对 HUVEC 的抑制率比较无统计学意义; 共孵时间分别为 1、2、3、4 h 时, 无荚膜株对内皮细胞的抑制率均高于野生株 ($P < 0.05$), 在 1 h 无荚膜株的抑制率可高达 79%; 5 h 时, 两菌株对 HUVEC 的抑制率无统计学差异(图 2)。

3 讨论

本实验通过透射电镜清楚地观察到, 两种菌株

与内皮细胞相互作用的过程中, 均可见出芽现象, 说明隐球菌的活力良好。HUVEC 与新生隐球菌共孵后, 细胞的内质网、线粒体肿大, 空泡形成, 细胞核膜损伤, 细胞核固缩或碎裂及其细胞的结构紊乱, 说明细胞受到不同程度的损伤。Chen 等^[1]发现, 人脑微血管内皮细胞(HBMEC)接触新生隐球菌后, HBMEC 的细胞核、线粒体和内质网发生形态学的变化。但是 Chang 等^[2]关于 HBMEC 与新生隐球菌相互作用的研究表明, 无论是有荚膜株还是无荚膜

株黏附和通过 HUVEC 均不影响 HUVEC 的形态和完整性。这些差别可能归因于接种菌株的培养时间和菌体直径大小差别,或者是试剂的差异,比如使用不同批号的血清以及 HUVEC 的生长状态。

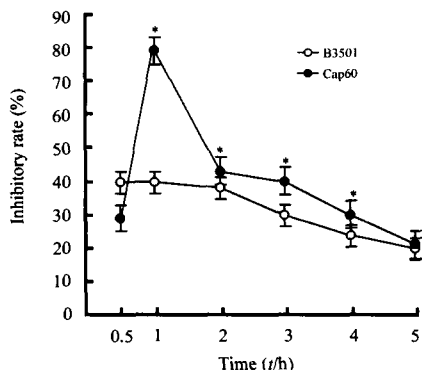


图2 不同菌株与 HUVEC 共孵的抑制率变化曲线

Fig 2 Inhibition rates of HUVEC by different strains of *C. neoformans*

* $P < 0.05$ vs B3501 strain

本研究采用 CCK-8 试剂盒来检测两种菌株对 HUVEC 的损伤差异。为了实验的严谨性和准确性,我们设计隐球菌悬液空白对照组(即在 96 孔板中按照试剂盒的要求只加入隐球菌悬液和 CCK-8 试剂),检测到其 D 值均为 0,说明 CCK-8 试剂对新生隐球菌不发生作用,不干扰本实验的结果。该方法方便简捷,干扰因素少,效果满意。通过检测两种菌株与 HUVEC 相互作用后的 D 值,计算出相对应的抑制率,判断出不同菌株对 HUVEC 的损伤的程度及特点差异。

当共孵时间为 30 min 时,两种菌株对 HUVEC 的抑制率分别为 40% 和 29%,两者比较无统计学意义。这可能是由于共孵时间较短,两者还未充分接触及发挥作用。共孵时间为 1、2、3、4 h 时, Cap60 对 HUVEC 的抑制率明显高于 B3501 ($P < 0.05$)。但是在 5 h 两者的抑制率未见明显差异,可能是由于新生隐球菌对宿主细胞损伤到一定程度,进入“饱和”状态,具体机制目前不清楚。Ibrahim 等^[3]研究表明无荚膜株较有荚膜株更易被 HUVEC 黏附和吞噬,引起更多的 HUVEC 破坏。同时有研究表明荚膜的出现亦抑制了其他微生物病原体与内皮细胞的相互作用,例如,Ⅲ型荚膜多糖增加了 B 族链球菌被 HUVEC 吞噬的能力^[4]。这与本实验结果一致。

新生隐球菌的内陷或者说被吞噬需要内皮细胞发生损伤^[5]。所有有关降低病原体被吞噬的条件都

能减少内皮细胞的损伤。这些条件包括 GXM(荚膜的主要组成成分)的存在,热灭活的患者血清以及内皮细胞和细胞松弛素 D 的接触。Ibrahim 等^[3]发现同时把葡萄糖醛酰木糖基甘露聚糖(GXM)和无荚膜株加到 HUVEC 上,将会抑制无荚膜株对内皮细胞的黏附和破坏。这表明荚膜的出现削弱了内皮细胞对隐球菌的吞噬作用。另外一个原因是细胞内摄/吞噬作用需要的血清因子可能是经典补体途径中的成分之一。但无荚膜株能激活经典和旁路补体途径,有荚膜株只能激活旁路补体途径;故无荚膜株对细胞的损伤能力高于有荚膜株。

尽管有荚膜株在已存在的感染中更易逃避宿主免疫机制,但无荚膜株更易诱发隐球菌感染。有趣的是,Goldman 等^[6]发现隐球菌在肺泡扩散中可能短时间内隐藏它的荚膜。多年来,在新生隐球菌和宿主细胞的研究热点均集中在免疫细胞方面,而在与血管内皮细胞之间相互作用的研究才刚刚受到重视。目前还没有发现隐球菌侵入并穿过血管内皮细胞的相关因子,不同菌体损伤血管内皮细胞能力差异的基础研究还未见报道。本研究通过 TEM 和 CCK-8 试剂盒检测内皮细胞的抑制率,为进一步的蛋白质组学研究奠定了良好的基础。

[参考文献]

- [1] Chen S H, Stins M F, Huang S H, et al. *Cryptococcus neoformans* induces alterations in cytoskeleton of human brain microvascular endothelial cells[J]. J Med Microbiol, 2003, 52 (Pt 11): 961-970.
- [2] Chang Y C, Stins M F, McCaffery M J, et al. Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier[J]. Infect Immun, 2004, 72: 4985-4995.
- [3] Ibrahim A S, Filler S G, Alcoulomre M S, et al. Adherence to and damage of endothelial cells by *Cryptococcus in vitro*; role of the capsule[J]. Infect Immun, 1995, 63: 4368-4374.
- [4] Gibson R L, Lee M K, Soderland C, et al. Group B streptococci invade endothelial cells; type III capsular polysaccharide attenuates invasion[J]. Infect Immun, 1993, 61: 478-485.
- [5] Archibald L K, McDonald L C, Rheapumikankit S, et al. Fever and human immunodeficiency virus infection as sentinels for emerging mycobacterial and fungal bloodstream infections in hospitalized patients ≥ 15 years old, Bangkok[J]. J Infect Dis, 1999, 180: 87-92.
- [6] Goldman D, Lee S C, Casadevall A. Pathogenesis of pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection in the rat[J]. Infect Immun, 1994, 62: 4755-4761.

[收稿日期] 2006-10-30

[修回日期] 2007-01-22

[本文编辑] 孙岩