

引文格式:惠靖雯,倪焰,栾洁,高大庆.肺炎克雷伯菌的毒力特性及其对视网膜色素上皮细胞炎症相关因子表达的影响[J].眼科新进展,2018,38(9):829-831. doi:10.13389/j.cnki.rao.2018.0196

【实验研究】

肺炎克雷伯菌的毒力特性及其对视网膜色素上皮细胞炎症相关因子表达的影响[△]

惠靖雯 倪焰 栾洁 高大庆

作者简介:惠靖雯,女,1992年3月出生,天津人,硕士。联系电话:18502229230;E-mail:drhuijw@163.com;ORCID:0000-0001-8346-4270

About HUI Jing-Wen: Female, born in March, 1992. Master degree, physician. Tel: 18502229230; E-mail: drhuijw@163.com; ORCID: 0000-0001-8346-4270

收稿日期:2017-08-23
修回日期:2018-02-26
本文编辑:董建军

[△]基金项目:江苏省普通高校专业学位研究生实践创新计划项目(编号:1124000058)

作者单位:210009 江苏省南京市,东南大学附属中大医院眼科(惠靖雯,现工作于天津市眼科医院);210009 江苏省南京市,东南大学附属中大医院眼科(倪焰,栾洁);210009 江苏省南京市,东南大学医学院(高大庆)

通讯作者:栾洁,E-mail:luanqiu10@163.com;ORCID:0000-0003-0520-980X

Received date: Aug 23, 2017
Accepted date: Feb 26, 2018

Foundation item: Foundation for Practice Innovation Project of University Professional Degree Postgraduate Students from Jiangsu Province (No: 1124000058)

From the Department of Ophthalmology, the Affiliated Zhongda Hospital, Medical College of Southeast University (HUI Jing-Wen, now work in Tianjin Eye Hospital), Nanjing 210009, Jiangsu Province, China; Department of Ophthalmology, the Affiliated Zhongda Hospital, Medical College of Southeast University (NI Yan, LUAN Jie), Nanjing 210009, Jiangsu Province, China; Medical College of Southeast University (GAO Da-Qing), Nanjing 210009, Jiangsu Province, China

Responsible author: LUAN Jie, E-mail: luanqiu10@163.com; ORCID: 0000-0003-0520-980X

【关键词】肺炎克雷伯菌;高毒力;视网膜色素上皮细胞;炎症因子

【中图分类号】R774.1

Virulent characteristic of *klebsiella pneumonia* and its effects of KP on the expression of inflammatory cytokines of retinal pigment epithelial cells

HUI Jing-Wen, NI Yan, LUAN Jie, GAO Da-Qing

[Abstract] Objective To compare the virulent characteristic of hypervirulent *klebsiella pneumonia* (hvKP) with classic *klebsiella pneumonia* (cKP) and to investigate the effect of KP on the expression of inflammatory cytokines of RPE cells. **Methods** Totally 8 strains of hvKP and 8 strains of cKP were collected and divided into hvKP group and cKP group. The virulence characteristics of KP were evaluated and compared by string test, PCR amplification of regulator of mucoid phenotype gene A (rmpA) gene test, antiserum trial and survival within macrophages experiment. Then the secretion level of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) and interleukin-6 (IL-6) of PER cells infected by KP strains of these two groups were detected separately by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The hypermucoid phenotype, the level of rmpA gene expression, the ability of antiserum killing, and the survival rate within macrophages in the hvKP group were statistically significant higher than those in the cKP group. After RPE cells were infected with KP, the levels of MCP-1 and IL-6 in the supernatant were (1177.38 ± 227.17) ng · L⁻¹ and (118.63 ± 40.39) ng · L⁻¹ in the hvKP group, seperatively, and (669.50 ± 62.01) ng · L⁻¹ and (53.75 ± 14.04) ng · L⁻¹ in the cKP group respectively. The levels of MCP-1 and IL-6 secreted by RPE cells in the hvKP group were 1.76 and 2.20 times accordingly higher than those in the cKP group, and both approached statistically significant difference (both *P* < 0.05). **Conclusion** hvKP has the characteristics of hypermucoid phenotype, stronger antiserum ability and high survival rate within macrophages phagocytosis when compared with the cKP, and can induce more serious inflammatory reaction as RPE cells are infected with KP.

[Key words] *klebsiella pneumonia*; hypervirulence; retinal pigment epithelium cells; inflammatory cytokines

【摘要】 目的 比较高毒力肺炎克雷伯菌与经典肺炎克雷伯菌的毒力特性,探讨不同毒力的肺炎克雷伯菌对视网膜色素上皮细胞炎症相关因子表达的影响。**方法** 收集8株高毒力肺炎克雷伯菌及8株经典肺炎克雷伯菌,分为高毒力肺炎克雷伯菌组和经典肺炎克雷伯菌组,通过黏液丝实验、PCR扩增rmpA基因检测、细菌抗血清杀伤实验及细菌抗吞噬实验比较两组肺炎克雷伯菌的毒力特性;两组细菌分别感染视网膜色素上皮细胞,通过ELISA检测视网膜色素上皮细胞内单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)及白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)表达水平。**结果** 高毒力肺炎克雷伯菌组细菌的高黏液表型、rmpA基因表达水平、抗血清杀伤能力及抗巨噬细胞吞噬能力均显著高于经典肺炎克雷伯菌组;两组细菌分别感染视网膜色素上皮细胞后,高毒力肺炎克雷伯菌组MCP-1和IL-6含量分别为(1177.38 ± 227.17) ng · L⁻¹、(118.63 ± 40.39) ng · L⁻¹,经典肺炎克雷伯菌组分别为(669.50 ± 62.01) ng · L⁻¹、(53.75 ± 14.04) ng · L⁻¹;视网膜色素上皮细胞MCP-1和IL-6表达水平高毒力肺炎克雷伯菌组分别是经典肺炎克雷伯菌组的1.76倍和2.20倍,差异均有统计学意义(均为*P* < 0.05)。**结论** 相对于经典肺炎克雷伯菌,高毒力肺炎克雷伯菌具有高黏液表型、抗血清杀伤能力及抗巨噬细胞吞噬能力强的特性,且感染视网膜色素上皮细胞后,可引起更严重的炎症反应。

眼内炎是一种凶险的感染性致盲性眼后段疾病,常常造成严重的视力损害。内源性眼内炎是一种在眼外感染后经过血源性播散引起的凶险的感染性致盲性眼病,起病急骤,一旦病原菌侵入眼内,迅速破坏眼内组织,症状严重,虽然总体发病率低,但常造成严重的视力损害。细菌或真菌通过血液循环播散进入眼内,引起脉络膜、视网膜、玻璃体等眼内组织炎症,以细菌性眼内炎居多,其中肺炎克雷伯菌是其主要的致病原之一。然而,内源性眼内炎的致病菌谱近年来不断发生变化,有报道^[1]高毒力肺炎克雷伯菌(hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*, hvKP)^[2]相对经典肺炎克雷伯菌(classic *Klebsiella pneumoniae*, cKP)而言,致病力强且破坏性大,患者视力恢复较差,预后不良。本研究将 hvKP 与 cKP 的毒力特性进行比较,探讨不同毒力的肺炎克雷伯菌对视网膜色素上皮细胞内单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)及白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和细胞 本研究应用的 8 株 cKP 和 8 株 hvKP 均来源于江苏大学附属江滨医院住院及门诊患者标本,由其检验科分离鉴定并赠送。人视网膜色素上皮细胞 ARPE-19 及鼠源巨噬细胞 RAW264.7 购自美国 ATCC 公司。

1.1.2 试剂 混合型人血清(江苏恩莫阿赛生物公司),LB(Luria Broth)培养基、RPMI-1640 培养液(江苏南京生兴生物技术有限公司),人 MCP-1 和人 IL-6 ELISA 试剂盒(上海优宁维生物科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细菌毒力特性的比较 将江苏大学附属江滨医院检验科分离鉴定并赠送的 8 株 hvKP 和 8 株 cKP,分为 hvKP 组和 cKP 组,进行下述实验。

1.2.1.1 黏液丝实验 按照参考文献^[1]的方法将 16 株肺炎克雷伯菌分别接种于体积分数 5% 的羊血琼脂平板培养基,于 37 ℃ 孵育过夜,用细菌接种环轻柔向上挑起菌落,如不能挑起黏液丝或黏液丝长度小于 5 mm,判为黏液丝实验阴性;如挑起的黏液丝长度大于或等于 5 mm,判为黏液丝实验阳性。

1.2.1.2 rmpA 基因检测 从 Genebank 中查找序列,使用 Primer5.0 软件设计 rmpA 基因的一对 PCR 引物,上游引物为 5'-TTCGCAGAAGTATTCGGTTGG-3',下游引物为 5'-CTAAATACCTGGCATGAGAC-3',产物长度为 939 bp。用细菌基因组 DNA 作为模板。PCR 反应体系 25 μL,一对正反引物各 1.2 μL,模板 1 μL,反应液 12.5 μL,蒸馏水补足至 25 μL。反应条件:预变性 95 ℃,4 min;95 ℃30 s,55 ℃30 s,72 ℃45 s,30 个循环;延伸 72 ℃10 min。PCR 结束后制备 0.1 g·L⁻¹ 的琼脂糖凝胶,染色后取 6 μL PCR 产物与

溴酚蓝加样缓冲液混合,加样于琼脂糖凝胶点样孔内,电压 90 V,电泳时间 20 min。停止电泳后,将凝胶置于凝胶成像仪中观察并记录结果。

1.2.1.3 细菌抗血清杀伤实验 按照参考文献^[3]的方法将培养至对数生长后期的两组细菌分别用 PBS 缓冲液悬浮,调节细菌的浓度至 10 × 10⁶ CFU·L⁻¹,并与血清按 1:1 的比例混合,37 ℃ 振荡培养 2 h 后,将混合培养液进行梯度稀释,通过平板计数法检测细菌的存活数量,并计算存活率,存活率 = 存活细菌数量/初始细菌数量 × 100%。

1.2.1.4 细菌抗吞噬实验 按照参考文献^[4]的方法将培养至对数生长后期的两组细菌分别用 PBS 缓冲液悬浮,调节细菌的浓度稀释至 10 × 10⁶ CFU·L⁻¹,并按感染复数(multiplicity of infection, MOI) 100:1 比例混合细菌与鼠源巨噬细胞 Raw264.7,于 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 孵箱共孵育 1 h, PBS 清洗 3 次,每孔加入 500 μL 体积分数 0.5% Tween-20 裂解贴壁细胞,稀释后涂平板,检测细菌的存活数量,并计算巨噬细胞内细菌的被吞噬率,胞内细菌被吞噬率 = 细胞内存活的细菌数量/初始细菌数量 × 100%。

1.2.2 ELISA 检测视网膜色素上皮细胞炎症相关因子 MCP-1 及 IL-6 的表达水平 将两组肺炎克雷伯菌分别感染视网膜色素上皮细胞,按照参考文献^[5]的方法,体外培养 ARPE-19 细胞至第三代,MOI 以 100:1 比例将对数生长后期的细菌与 ARPE-19 细胞加入 24 孔培养板,于 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 条件下共孵育 10 h,离心收集上清液,参照 ELISA 试剂盒说明书,检测上清液中炎症细胞因子 MCP-1、IL-6 的含量。

1.3 统计学方法 每次实验重复 3 次,实验数据以 SPSS 20.0 进行统计学处理,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用成组设计 *t* 检验进行统计分析,α = 0.05。

2 结果

2.1 细菌毒力特性的比较

2.1.1 黏液丝实验 8 株 hvKP 黏液丝实验为阳性;8 株 cKP 黏液丝实验为阴性。

2.1.2 PCR 检测 rmpA 基因 分别以各个细菌的染色质 DNA 为模板,进行 PCR 检测,结果显示, hvKP 组的菌株均有 rmpA 基因(543 bp)的表达(图 1),而 cKP 组的菌株无 rmpA 基因的表达。

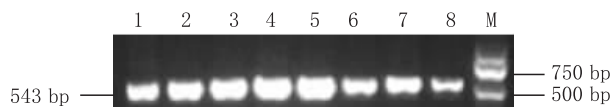


图 1 8 株黏液丝实验阳性肺炎克雷伯菌的 rmpA 基因表达。M: Marker

2.1.3 细菌抗血清杀伤实验 细菌抵抗血清杀伤效应的检测结果显示: hvKP 组细菌的存活率

(18.2%)明显高于cKP组细菌的存活率(5.3%),且差异有统计学意义($P < 0.05$),提示hvKP组的细菌抵抗血清杀伤效应的能力高于cKP组。

2.1.4 细菌抗吞噬实验 两组细菌抵抗巨噬细胞吞噬作用的结果显示:巨噬细胞胞内hvKP组的细菌被吞噬率(1.1%)明显低于cKP组(7.5%),差异有统计学意义($P < 0.05$),提示hvKP组的细菌抵抗巨噬细胞吞噬作用的能力高于cKP组。

2.2 ELISA 检测结果 两组肺炎克雷伯菌分别感染视网膜色素上皮细胞,共孵育10 h。hvKP组细菌侵袭视网膜色素上皮细胞后,MCP-1和IL-6含量分别为(1177.38 ± 227.17) ng · L⁻¹、(118.63 ± 40.39) ng · L⁻¹,cKP组分别为(669.50 ± 62.01) ng · L⁻¹、(53.75 ± 14.04) ng · L⁻¹;视网膜色素上皮细胞MCP-1和IL-6表达水平hvKP组分别是cKP组的1.76倍和2.20倍,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。

3 讨论

肺炎克雷伯菌为革兰阴性菌,是最常见的眼内炎病原菌之一,在临床各种样本中均有较高的检出率。1986年,我国台湾学者首次报道了一种可引起多部位脓肿的肺炎克雷伯菌,命名为hvKP。hvKP并不像cKP倾向于感染有基础疾病、免疫受损的住院患者,而是通常感染免疫功能正常的中青年,且患者多为社区获得性感染。在致病特点上,与hvKP联系最密切的临床感染是肝脓肿^[6]。肝脓肿易出现转移性感染,最为严重的是眼内炎和中枢系统感染^[7],给患者带来的痛苦远远超过肝脓肿本身。3%~10%的肺炎克雷伯菌感染性肝脓肿会发生转移性感染,其中2/3为内源性眼内炎,1/3为脑膜炎。近年来,肺炎克雷伯菌引起的内源性眼内炎的报道有所增多,且这种眼内炎进展快,对视力损害大,预后差,即使采取积极的抗菌治疗也难以摆脱失明的风险^[8],而患者在出现眼痛症状前很少进行眼科检查,因此对肺炎克雷伯菌毒力的判定及其对眼部可能产生影响的判断尤为重要。

荚膜多糖是hvKP的重要抗原物质^[9],使其具有高黏性,而高黏性特征与细菌的毒力密切相关。通常以黏液丝实验作为鉴定hvKP毒力的有效指标,然而并非所有的hvKP均表现出高黏性表型^[10],因此,尚需结合细菌的基因型特征、抗血清杀伤能力和抗巨噬细胞吞噬能力来综合鉴定细菌的毒力。本实验中,我们通过黏液丝实验初步验证hvKP的表型,再分别通过PCR扩增rmpA基因检测、细菌抗血清杀伤实验、细菌抗巨噬细胞吞噬实验进一步确定肺炎克雷伯菌的毒力强弱。

rmpA是与细菌毒力相关的基因,可辅助荚膜合成,是调控形成高黏性菌落的胞外多糖合成的重要

基因。本实验中,rmpA基因在hvKP组的菌株中有表达,而在cKP组的菌株中不表达,证实了hvKP是与高黏性相关的重要基因。

人全血清中含有抗体和补体成分,与细菌接触后可发生免疫反应,抗体与细菌的抗原表位结合,并与补体系统共同作用,募集、杀伤细菌;利用抗血清实验可以检测并判定细菌的抗杀伤能力。我们的实验结果提示hvKP菌株抗杀伤能力明显强于cKP菌株。

巨噬细胞对于细菌有较强的吞噬杀伤作用,细菌的抗吞噬能力越强,说明细菌的毒力越强。本实验中,hvKP组的菌株抵抗巨噬细胞杀伤的能力明显高于cKP组的菌株,提示hvKP具有较强的抗吞噬能力。

视网膜色素上皮细胞是抵抗血源性感染的重要屏障,也被描述为眼部免疫的重要细胞,能分泌促炎因子和抗炎因子,并作为抗原提呈细胞。坏死性凋亡的发生与组织缺血缺氧及炎症刺激密切相关,若MCP-1浓度明显增高,提示眼内有坏死性凋亡发生。IL-6能诱导B细胞分化和产生抗体,并诱导T细胞活化增殖、分化,参与机体的免疫应答,是炎症反应的促发剂,是眼部在感染时诱发免疫反应的重要促炎因子。本实验的结果提示,视网膜色素上皮细胞在受hvKP与cKP侵袭后,均能引起MCP-1和IL-6的表达,但hvKP组的表达量更多,提示hvKP的致炎性较cKP更强。

参考文献

- [1] SHON A S,BAJWA R P S,RUSSO T A. Hypervirulent(hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed[J]. *Virulence*,2013,4(2):107-118.
- [2] POMAKOVA D K,HSIAO C B,BEAMAN J M,OLSON R,MACDONALD U,KEYNAN Y. Clinical and phenotypic differences between classic and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: an emerging and under-recognized pathogenic variant[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*,2012,31(6):981-989.
- [3] RUSSO T A. Penicillin-binding protein 7/8 contributes to the survival of *Acinetobacter baumannii* in vitro and in vivo[J]. *J Infect Dis*,2009,199(4):513-521.
- [4] NAZARETH H,GENAGON S A,RUSSO T A. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* survives within neutrophils[J]. *Infect Immun*,2007,75(6):2776-2785.
- [5] POLLREISZ A,RAFFERTY B,KOZAROV E,LALLA E. *Klebsiella pneumoniae* induces an inflammatory response in human retinal-pigmented epithelial cells[J]. *Biochem Bioph Res Commun*,2012,418(1):33-37.
- [6] SIU L K,YEH K M,LIN J C,FUNG C P,CHANG F Y. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: a new invasive syndrome[J]. *Lancet Infect Dis*,2012,12(11):881-887.
- [7] ABDULHAMID A,BAILEY S J. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess and endophthalmitis[J]. *BIVIJ Case Rep*,2013,3(1):1-3.
- [8] GAI C L,FENG X M,CHEN X L. Clinical observation of endogenous endophthalmitis caused by liver abscess[J]. *Int J Ophthalmol*,2011,11(6):951-953.
- [9] LIN Y C,LU M C,TANG H L,LIU H C,CHEN C H,LIU K S. Assessment of hypermucoviscosity as a virulence factor for experimental *Klebsiella pneumoniae* infections; comparative virulence analysis with hypermucoviscosity-negative strain[J]. *BMC Microbiol*,2011,11(1):50.
- [10] BRISSE S,FEVRE C,PASSET V,ISSENHUTHJEANJEAN S,TOURNEBIZE R,DIANCOURT L. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization[J]. *PLoS One*,2009,4(3):e4982.