

论著·基础研究

小鼠巨噬细胞对钩端螺旋体 56606v 和 56606a 的吞噬及炎症应答的比较研究

范霞¹, 夏碧丽², 吕霖¹, 徐梦莎³, 李佳茵¹, 何平¹

1. 上海交通大学基础医学院免疫学与微生物学系, 上海 200025; 2. 复旦大学附属公共卫生临床中心, 上海 201508; 3. 浙江省台州恩泽医疗集团恩泽医院药剂科, 台州 318050

[摘要] **目的**·比较问号钩端螺旋体 56606v 株和 56606a 株对小鼠巨噬细胞的感染情况, 探究致病性钩端螺旋体的致病机制。**方法**·用问号钩端螺旋体强毒株 56606v 株和减毒株 56606a 株分别感染 C57BL/6 小鼠腹腔巨噬细胞后, 对样本进行免疫荧光染色, 观察巨噬细胞对钩端螺旋体的吞噬及清除能力, 并通过 realtime-PCR 检测感染后巨噬细胞的细胞因子的表达。**结果**·免疫荧光染色和 realtime-PCR 结果均发现在感染 72 h 后, 56606v 株仍能在巨噬细胞中存活, 而 56606a 株不能在巨噬细胞中存活; 巨噬细胞对 56606v 株的吞噬率高于对 56606a 株的吞噬率, 而感染 56606v 株后细胞因子的表达低于感染 56606a 株后的水平。**结论**·问号钩端螺旋体强毒株 56606v 株能在巨噬细胞中存活, 并引起较低的炎症反应, 可借此逃避免疫细胞的杀伤从而引发疾病; 而减毒株 56606a 株被巨噬细胞吞噬后则被清除, 且引发较强的炎症反应, 易被机体免疫细胞清除, 从而不引起疾病。

[关键词] 钩端螺旋体; 巨噬细胞; 吞噬; 炎症反应; 免疫逃逸

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.01.004 **[中图分类号]** 310.41 **[文献标志码]** A

Comparison of the phagocytosis and inflammatory response of murine macrophages infected by *Leptospira* strains 56606v and 56606a

FAN Xia¹, XIA Bi-li², LÜ Lin¹, XU Meng-sha³, LI Jia-yin¹, HE Ping¹

1. Department of Immunology and Microbiology, Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medical Sciences, Shanghai 200025, China; 2. Shanghai Public Health Clinical Center, Fudan University, Shanghai 201508, China; 3. Taizhou Enze Medical Center, Zhejiang Province, Taizhou 318050, China

[Abstract] **Objective**·To compare the response and consequence of mouse macrophages infected by *Leptospira interrogans* 56606v and 56606a, and explore the mechanisms of pathogenic *Leptospira* to cause disease. **Methods**·Peritoneal macrophages of C57BL/6 mice were infected by pathogenic *Leptospira* 56606v and non-pathogenic *Leptospira* 56606a respectively. Immunofluorescence staining was performed to observe phagocytosis and clearance of *Leptospira* after infection, and realtime-PCR was used to determine cytokine production of macrophages. **Results**·After 72-hour infection, strain 56606v exhibited a lower phagocytic rate but survived after incubation with peritoneal macrophages compared with strain 56606a, which showed a higher phagocytic rate but was cleared at that time point. Additionally, cytokine production of macrophages incubated with 56606v was lower than that with 56606a. **Conclusion**·*Leptospira interrogans* strain 56606v can survive in macrophages, which may contribute to evasion from phagocytic clearance and lead to disease, while strain 56606a can be cleared, which implicates a lower pathogenicity.

[Key words] *Leptospira interrogans*; macrophage; phagocytosis; inflammatory response; immune surveillance

钩端螺旋体, 简称钩体, 可分为致病型钩体和腐生型钩体。致病型钩体, 如问号钩端螺旋体, 为钩端螺旋体病 (简称钩体病) 的病原体, 而生活在天然地表水和土壤中的腐生型钩体则不会导致疾病^[1-2]。钩体病是全球人畜共患病, 致病型钩体导致人体患病的主要原因之一是它们能逃避先天防御机制, 在组织中生存和生长^[3-4]。固有免疫是抵抗钩体入侵的第一道防线^[5]。巨噬细胞是重要的固有免疫细胞, 具有吞噬、免疫炎症、抗原提呈等作用。

问号钩端螺旋体秋季群秋季型 56606v 株 (简称问号钩体 56606v 株) 为强毒株, 小鼠感染后产生黄疸等明显的钩体病表现^[6]; 问号钩体 56606a 为 56606v 株的减毒株, 由 56606v 株在体外长期传代产生, 对敏感动物不致病。目前, 这 2 种钩体感染为何会引起不同的反应尚不清楚。本文旨在研究强毒株钩体 56606v 株和减毒株钩体 56606a 株感染小鼠巨噬细胞产生的免疫反应的差异, 从而探究固有免疫对控制钩体感染的作用机制。

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (81471908) (National Natural Science Foundation of China, 81471908)。

[作者简介] 范霞 (1993—), 女, 硕士生; 电子信箱: fanx_fx@163.com。

[通信作者] 何平, 电子信箱: hpatsh@sjtu.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株 问号钩体 56606v 为强毒株, 是我国流行的钩体代表菌株之一。最初从一名钩体病患者血液中分离获得, 由上海生物制品所保种并提供, 通过本实验室定期感染金黄地鼠来保持毒力并传代保存。问号钩体 56606a 株, 为钩体 56606v 株在体外长期传代的减毒株, 对敏感动物金黄地鼠不致病。

1.1.2 实验细胞 小鼠腹腔巨噬细胞, 取自 SPF 级 C57BL/6 小鼠。小鼠 6 ~ 8 周, 雌性, 购自上海斯莱克实验动物有限公司。动物生产许可证号为 SCXK (沪) 2013-0016, 动物使用许可证号为 SYXK (沪) 2013-0058。

1.1.3 主要试剂及仪器 主要试剂有 RMPI 1640 培养基 (Gibco), 胎牛血清 (Gibco), 青 / 链霉素双抗 (Gibco), 庆大霉素 (生工), EMJH 培养基 (BD), 巯基乙酸钠 (BD), PBS (生工), Alexa 647 标记的羊抗兔 IgG (Abcam), TRITC 标记的羊抗兔 IgG (Proteintech), DAPI (碧云天), CCK-8 (日本东仁)。主要仪器有细胞培养箱 (Thermo), 荧光定量 PCR 仪 (ABI 7500 Fast), Nanodrop (Thermo), 激光扫描共聚焦显微镜 (Leica TCS SP8) 等。

1.2 方法

1.2.1 钩体培养 取钩体 56606v 株和 56606a 株接种于 EMJH 培养基中, 28 ℃ 培养至对数生长期。

1.2.2 小鼠巨噬细胞提取 野生型成年 C57BL/6 雌性小鼠腹腔注射 1 mL 5% 巯基乙酸钠溶液, 5 d 后提取小鼠腹腔巨噬细胞。无菌操作取出小鼠股骨中的骨髓细胞, 置于含 30% L929 上清的骨髓细胞培养液中培养, 3 d 时换液, 5 ~ 7 d 后获得骨髓巨噬细胞 (bone marrow-derived macrophage, BMDM)。

1.2.3 吞噬实验 取无菌 24 孔板圆形细胞爬片于 24 孔板中, 铺上小鼠腹腔巨噬细胞, 每孔 2×10^5 个细胞, 过夜培养, 使细胞贴在圆形爬片上生长。将处于对数生长期的钩体, 以感染复数 (multiplicity of infection, MOI) = 100:1 感染细胞, $300 \times g$ 离心 10 min 使其同步化, 37 ℃ 吞噬 1、24、48、72 h。并在感染 1 h 后, 用 100 $\mu\text{g/mL}$ 庆大霉素处理细胞 2 h, 将细胞外及培养基中未吞钩体杀死。

1.2.4 免疫荧光染色 4% 多聚甲醛固定细胞进行免疫染色, 封闭后用兔抗钩体 56606v 兔血清作为一抗, Alexa 647 标记的羊抗兔 IgG 为二抗, 对未被细胞吞噬的钩体进行荧光染色; 然后用 0.25% Triton X-100 破膜, 以免抗钩体 56606v 兔血清作为一抗, TRITC 标记的羊抗兔 IgG 为

二抗, 对胞内的钩体进行荧光染色, 最后用 DAPI 染细胞核, 在激光共聚焦荧光显微镜下观察。未被吞噬的钩体标记为黄色, 吞噬细胞内钩体标记为红色, 细胞核标记为蓝色, 用白光显示细胞轮廓。

1.2.5 Realtime-PCR 腹腔巨噬细胞 5×10^5 个接种于 12 孔板中, 过夜培养。处于对数生长期的钩体以 MOI=100:1 感染细胞, 37 ℃ 吞噬 1、24、48、72 h。并在感染 1 h 后, 用 100 $\mu\text{g/mL}$ 庆大霉素处理细胞 2 h, 将细胞外及培养基中未吞钩体杀死。用 TRIzol 裂解细胞, 按照说明书进行 RNA 抽提, 反转录成 cDNA, realtime-PCR 检测 16SrRNA 的表达。巨噬细胞感染钩体 6 h, 提取 RNA, 反转录成 cDNA, realtime-PCR 检测细胞因子的表达水平。引物序列见表 1。

表 1 Realtime-PCR 引物
Tab 1 Primers used for realtime-PCR

基因	引物序列 (5'→3')
GAPDH	正向 TGTGAACGGATTGGCCGTA
	反向 ACTGTGCCGTTGAATTGCC
16SrRNA	正向 AGCACGTGTGTTGCCCTAGACATA
	反向 GTTGCCATCATTTCAGTTGGGCACT
IL-6	正向 TAGTCCTTCTACCCCAATTTC
	反向 TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
IL-1 β	正向 GAAATGCCACCTTTTGACAGTG
	反向 TGGATGCTCTCATCAGGACAT

1.2.6 CCK-8 检测细胞活性 接种 100 μL 腹腔巨噬细胞到 96 孔板中, 每孔 5×10^4 个细胞, 过夜培养。对数生长期钩体以 MOI=100:1 感染细胞 1、24、48、72 h, 在各个时间点进行 CCK-8 检测。其中感染 1 h 后用 100 $\mu\text{g/mL}$ 庆大霉素杀菌 2 h, 杀去胞外未吞钩体。每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 37 ℃ 放置 2 h; 测定 450 nm 吸光度。细胞存活率的计算公式为: 细胞存活率 = [(实验孔 - 空白对照孔) / (对照孔 - 空白对照孔)] $\times 100\%$ 。

1.2.7 ELISA 腹腔巨噬细胞 1×10^5 个接种于 96 孔板中, 过夜培养。处于对数生长期的钩体以 MOI=100:1 感染细胞, 24 h 后取上清, 用 ELISA 试剂盒检测上清中的 TNF- α 。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 6 软件对数据进行统计分析及制图, 数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 t 检验做统计学差异分析, $P < 0.05$ 表

示差异有统计学意义。结果代表 3 次的重复实验结果。

2 结果

2.1 问号钩体 56606a 株和 56606v 株感染对小鼠腹腔巨噬细胞活性的影响

问号钩体 56606a 株和 56606v 株感染小鼠腹腔巨噬细胞

胞不同时间, CCK-8 检测各个时间点的细胞活性。结果显示 56606a 株感染 1、24、48、72 h 时, 细胞活性良好, 存活率均在 80% 以上 (图 1A); 56606v 株感染 1 ~ 72 h, 细胞活性亦良好, 存活率均在 100% 左右 (图 1B)。该结果说明感染后, 问号钩体 56606v 株及 56606a 株均不会影响小鼠腹腔巨噬细胞的活性。

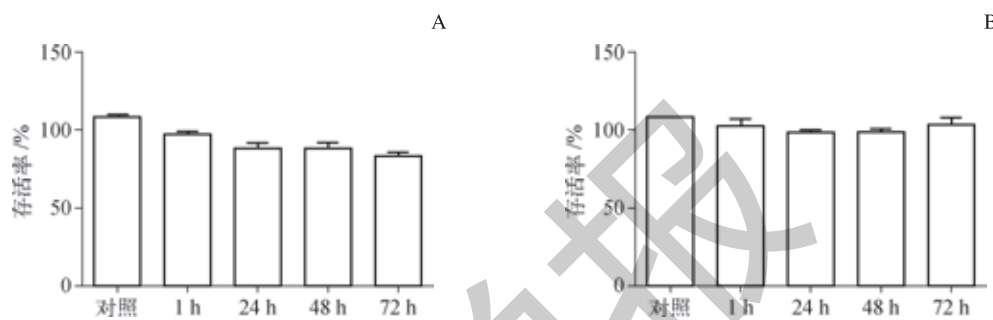


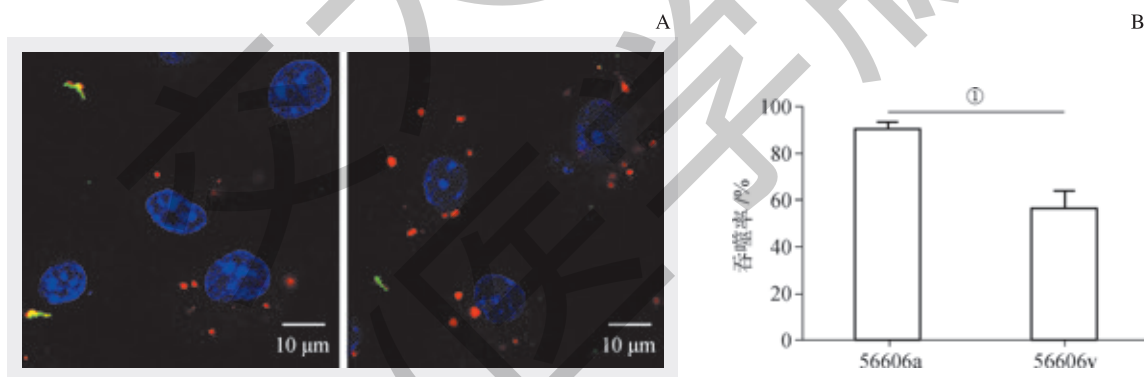
图 1 问号钩体 56606a 株 (A) 和 56606v 株 (B) 感染腹腔巨噬细胞不同时间的细胞活性

Fig 1 Cell viability of mouse peritoneal macrophages infected with *Leptospira interrogans* strain 56606a (A) and 56606v (B) in different time points

2.2 巨噬细胞对问号钩体 56606a 株和 56606v 株的吞噬情况

问号钩体 56606a 株和 56606v 株感染小鼠 BMDM 1 h 后荧光显微镜观察巨噬细胞对钩体的吞噬情况。随机选取

100 个细胞, 对吞噬率进行统计分析, 结果表明 56606a 株和 56606v 株的吞噬率分别为 89.8% 和 56.5%, 即 BMDM 对 56606v 株的吞噬率低于对 56606a 株的吞噬率 (图 2)。



注: A. BMDM 对问号钩体 56606a 株 (左) 和 56606v 株 (右) 吞噬的荧光图; B. 吞噬率统计分析。① $P=0.002$ 。

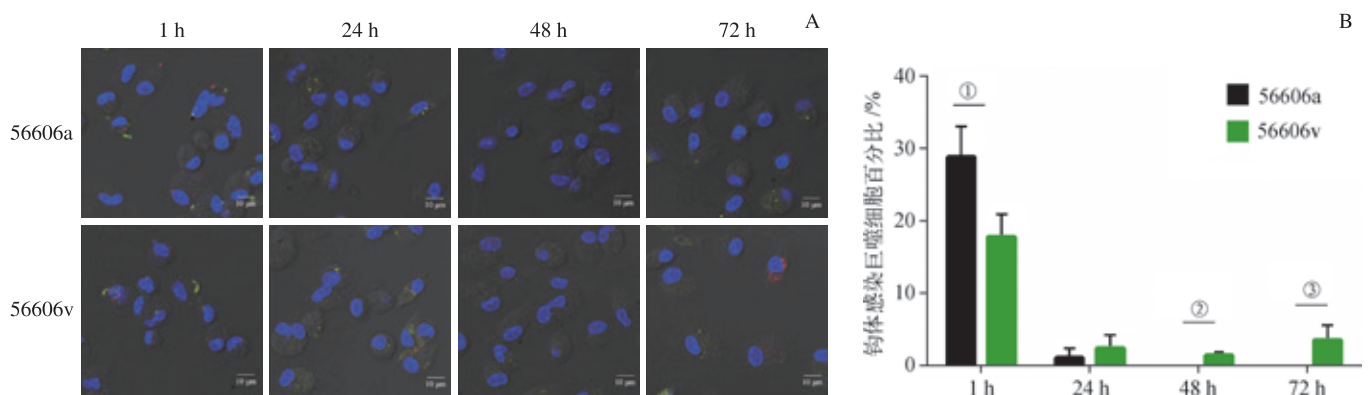
图 2 BMDM 对问号钩体 56606a 株和 56606v 株的吞噬情况

Fig 2 Phagocytosis of BMDM infected by *Leptospira interrogans* strain 56606a and 56606v

2.3 问号钩体 56606a 株和 56606v 株在巨噬细胞中的存活情况

问号钩体 56606a 株和 56606v 株分别感染小鼠腹腔巨噬细胞 1、24、48、72 h, 激光共聚焦荧光显微镜观察并统计细胞内有钩体的细胞数。红色荧光代表被吞噬的钩体, 黄色荧光代表未被吞噬并黏附在细胞表面的钩体。结果如图 3 所示, 在感染 1 h 时, 大量钩体 56606a 株和 56606v 株被巨噬细胞吞噬; 24 h 后, 细胞内钩体大量减少; 感染后 48 h 和 72 h, 荧光显微镜观察不到 56606a 株存在,

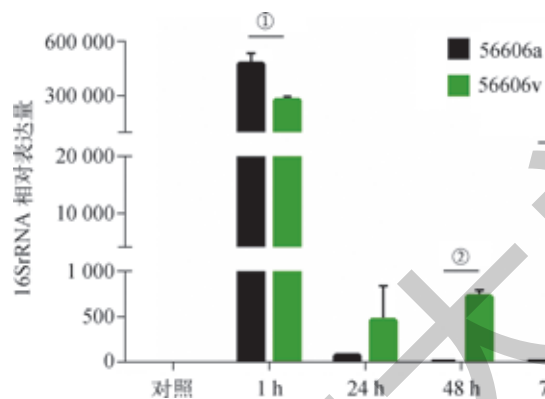
而 56606v 株仍被观察到部分存在于巨噬细胞中; 48 h 时 1.46% 的细胞能检测到钩体 56606v 株, 72 h 时更有 3.56% 的细胞能检测到钩体 56606v 株的存在, 说明钩体 56606v 株可以在小鼠腹腔巨噬细胞中存活。Realtime-PCR 结果亦表明 56606a 株不能在巨噬细胞中存活, 会被巨噬细胞清除, 而 56606v 株在 24 h 大量被巨噬细胞清除后, 仍有部分能在巨噬细胞中存活且增殖 (图 4)。说明 56606a 株能在短时间内被巨噬细胞清除, 而 56606v 株不能完全被巨噬细胞清除, 能部分存活在巨噬细胞中。



注: A. 钩体感染巨噬细胞后对钩体进行免疫荧光染色的结果图; B. 统计分析。① $P=0.041$, ② $P=0.002$, ③ $P=0.012$ 。

图 3 免疫荧光染色检测钩体 56606a 株和 56606v 株感染小鼠腹腔巨噬细胞不同时间后的存活情况

Fig 3 Survival of *Leptospira interrogans* strain 56606a and 56606v infected mouse peritoneal macrophages in different time points by immunofluorescence staining



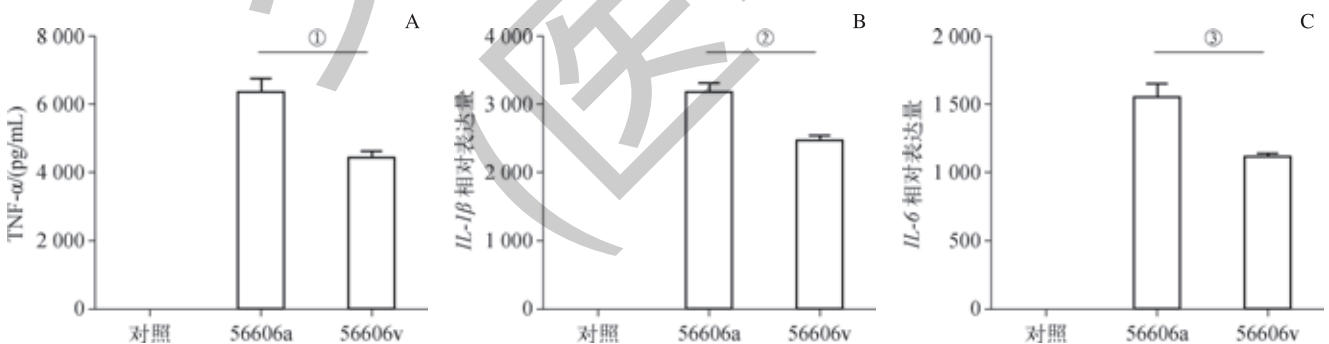
注: ① $P=0.045$, ② $P=0.004$, ③ $P=0.007$ 。

图 4 Realtime-PCR 检测钩体 56606a 株和 56606v 株感染小鼠腹腔巨噬细胞不同时间后的存活情况

Fig 4 Survival of *Leptospira interrogans* strain 56606a and 56606v infected mouse peritoneal macrophages in different time points by realtime-PCR

2.4 问号钩体 56606a 株和 56606v 株感染腹腔巨噬细胞引起的炎症反应

问号钩体 56606a 株和 56606v 株感染小鼠腹腔巨噬细胞 6 h, realtime-PCR 检测炎症因子的表达情况; 感染 24 h, ELISA 检测炎症因子 TNF- α 的表达。ELISA 检测结果显示 56606a 株和 56606v 株刺激后产生的 TNF- α 浓度分别为 6 307 pg/mL 和 4 418 pg/mL, 56606a 株能引起巨噬细胞更严重的细胞因子表达 (图 5A)。此外, realtime-PCR 对 *IL-6*、*IL-1 β* 的检测结果显示 56606a 株刺激引起的细胞因子表达高于 56606v 株的刺激 (图 5B、C)。这些结果都说明与 56606v 株相比, 问号钩体 56606a 株感染后诱导的细胞因子表达水平更高, 引起的炎症反应更严重。



注: A. TNF- α ; B. *IL-1 β* ; C. *IL-6*。① $P=0.030$, ② $P=0.022$, ③ $P=0.034$ 。

图 5 钩体 56606a 株和 56606v 株感染腹腔巨噬细胞后细胞因子的表达

Fig 5 Cytokines expressed by peritoneal macrophages infected with *Leptospira interrogans* strain 56606a and 56606v

3 讨论

固有免疫是对抗外来病原菌感染的重要方式。巨噬细胞通过识别、吞噬并清除病原体发挥固有免疫的作用, 抵抗病原菌的感染。致病型钩体可通过受损皮肤和黏膜侵

入机体, 扩散进入肝脏和肾脏, 从而引发疾病^[7-10]。然而, 在感染的初级阶段, 致病型钩体逃逸固有免疫这第一道防线的方式仍然不清楚。本文研究了致病型钩体 56606v 株和其减毒株 56606a 株与小鼠巨噬细胞的相互作用。结果表明, 强毒株钩体 56606v 株具有抗巨噬细胞吞噬作用,

小鼠巨噬细胞对 56606v 株的吞噬能力明显弱于对 56606a 株的吞噬能力。其次,我们还发现钩体 56606v 株能在巨噬细胞中存活并增殖,而 56606a 株被巨噬细胞吞噬后消亡。

已有研究^[11-12]发现,钩体赖株(strain Lai)感染人或小鼠巨噬细胞可引起巨噬细胞凋亡,且引起凋亡的能力与钩体的毒力有关。在本研究中所用强毒株 56606v 株可感染地鼠或小鼠产生严重黄疸等钩体病典型症状^[6],但钩体 56606a 株和 56606v 株并不引起巨噬细胞死亡。其原因可能是不同钩体菌株对巨噬细胞的作用不同。

钩体 56606v 株为强毒株,感染地鼠或小鼠可引起严重的黄疸等钩体病表现。钩体 56606a 株为 56606v 株在体外长期传代的减毒株,对敏感动物金地鼠等不具有致病性。将 56606a 株和 56606v 株分别感染小鼠腹腔巨噬细胞 1、24、48 和 72 h,发现 56606a 株很快被巨噬细胞杀死,而 56606v 株能在巨噬细胞中存活。已有研究^[13-14]表明致病型钩体能在某些宿主细胞如 Kupffer 细胞、神经小胶质细胞中存活。有研究^[11]已证实问号钩体可在人类单核细胞中存活和复制,且随孵育时间增加,钩体在 THP-1 细胞中的数量增多,但这种现象在小鼠巨噬细胞 J774 中并不存在。但是,也有研究^[15]表明致病型问号钩体能在小鼠

骨髓来源的巨噬细胞中存活并复制,而非致病型钩体不能在小鼠 BMDM 中存活。钩体 56606a 株不具有致病性且不能在小鼠巨噬细胞中存活,而 56606v 株是强毒株,具有致病性并能在小鼠腹腔巨噬细胞中存活。上述结果表明钩体毒力与其引起细胞坏死或凋亡的能力不一定相关,而是与钩体抗吞噬能力及其在巨噬细胞内存活能力相关。非致病型钩体可被机体免疫系统清除从而不引发疾病,而强毒株则可逃避固有免疫系统的杀伤,扩散到靶器官,引发疾病,出现黄疸等钩体病的典型症状。

钩体刺激巨噬细胞会引起炎症反应^[16]。巨噬细胞感染强毒株钩体 56606v 株后,细胞因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的表达水平明显低于感染减毒株钩体 56606a 株后的表达水平。钩体 56606v 株感染后产生较低的炎症反应有利于躲避机体免疫细胞对其清除;而减毒株 56606a 株感染后引起较强的炎症反应有利于宿主对其清除。

综上所述,本研究结果表明强毒株钩体 56606v 株能在小鼠巨噬细胞中存活而减毒株钩体 56606a 株被巨噬细胞免疫清除,提示致病型钩体的毒力可能与免疫逃逸机制相关。目前关于钩体毒力因子研究较多的为钩体脂多糖(LPS)和外膜蛋白^[1]。钩体毒力因子与钩体免疫逃逸间的相互作用,尚需进一步的研究。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] Adler B, de la Pena Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis[J]. Vet Microbiol, 2010, 140(3/4): 287-296.
- [2] Adler B. Pathogenesis of leptospirosis: cellular and molecular aspects[J]. Vet Microbiol, 2014, 172(3/4): 353-358.
- [3] Barocchi MA, Ko AI, Reis MG, et al. Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen[J]. Infect Immun, 2002, 70(12): 6926-6932.
- [4] Li L, Ojcius DM, Yan J. Comparison of invasion of fibroblasts and macrophages by high- and low-virulence *Leptospira* strains: colonization of the host-cell nucleus and induction of necrosis by the virulent strain[J]. Arch Microbiol, 2007, 188(6): 591-598.
- [5] Fraga TR, Barbosa AS, Isaac L. Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system[J]. Scand J Immunol, 2011, 73(5): 408-419.
- [6] Xia B, Sun L, Fan X, et al. A new model of self-resolving leptospirosis in mice infected with a strain of *Leptospira interrogans* serovar Autumnalis harboring LPS signaling only through TLR4[J]. Emerg Microbes Infect, 2017, 6(5): e36.
- [7] Viriyakosol S, Matthias MA, Swancutt MA, et al. Toll-like receptor 4 protects against lethal *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae infection and contributes to *in vivo* control of leptospiral burden[J]. Infect Immun, 2006, 74(2): 887-895.
- [8] Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen[J]. Nat Rev Microbiol, 2009, 7(10): 736-747.
- [9] Monahan AM, Callanan JJ, Nally JE. Review paper: host-pathogen interactions in the kidney during chronic leptospirosis[J]. Vet Pathol, 2009, 46(5): 792-799.
- [10] Chassin C, Picardeau M, Goujon JM, et al. TLR4- and TLR2-mediated B cell responses control the clearance of the bacterial pathogen, *Leptospira interrogans*[J]. J Immunol, 2009, 183(4): 2669-2677.
- [11] Li S, Ojcius DM, Liao S, et al. Replication or death: distinct fates of pathogenic *Leptospira* strain Lai within macrophages of human or mouse origin[J]. Innate Immun, 2010, 16(2): 80-92.
- [12] Jin D, Ojcius DM, Sun D, et al. *Leptospira interrogans* induces apoptosis in macrophages via caspase-8- and caspase-3-dependent pathways[J]. Infect Immun, 2009, 77(2): 799-809.
- [13] Cinco M, Domenis R, Perticarari S, et al. Interaction of leptospires with murine microglial cells[J]. New Microbiol, 2006, 29(3): 193-199.
- [14] Marangoni A, Aldini R, Sambri V, et al. Uptake and killing of *Leptospira interrogans* and *Borrelia burgdorferi*, spirochetes pathogenic to humans, by reticuloendothelial cells in perfused rat liver[J]. Infect Immun, 2000, 68(9): 5408-5411.
- [15] Toma C, Okura N, Takayama C, et al. Characteristic features of intracellular pathogenic *Leptospira* in infected murine macrophages[J]. Cell Microbiol, 2011, 13(11): 1783-1792.
- [16] Matsui M, Rouleau V, Bruyere-Ostells L, et al. Gene expression profiles of immune mediators and histopathological findings in animal models of leptospirosis: comparison between susceptible hamsters and resistant mice[J]. Infect Immun, 2011, 79(11): 4480-4492.

[收稿日期] 2018-10-15

[本文编辑] 邵碧云