

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*

张可** 赵伟东** 李强 方文刚 朱莉 陈誉华***

(中国医科大学基础医学院发育生物学教研室, 卫生部细胞生物学重点实验室, 沈阳 110001)

摘要 大肠杆菌是导致新生儿细菌性脑膜炎最常见的革兰氏阴性致病菌。为探讨毒力岛基因 *ibeT* 在大肠杆菌 K1 株致病过程中的作用, 构建了 *ibeT* 基因缺失的大肠杆菌 K1 株, 细菌在细胞内存活试验结果显示, *ibeT* 基因缺失抑制了大肠杆菌 K1 株在人脑微血管内皮细胞中的生长。利用激光共聚焦扫描显微镜观察到, 在细菌侵袭进入人脑微血管内皮细胞后, 与野生型相比, *ibeT* 基因缺失突变株较多地滞留在溶酶体内; 透射电镜结果进一步显示, *ibeT* 基因缺失使大肠杆菌 K1 株逃逸 ECV(含有人脑微血管的囊泡)的能力发生了下降, 继而使其在细胞浆内的复制减少。利用体外模拟的弱酸性环境, 检测大肠杆菌菌体胞内的缓冲容量, 发现 *ibeT* 基因缺失突变株菌体胞内的缓冲能力较野生型低。这些结果提示, 在大肠杆菌 K1 株侵袭进入人脑微血管内皮细胞后, *ibeT* 基因有利于大肠杆菌降解 ECV 膜, 避免与溶酶体融合, 进而促使大肠杆菌逃逸进入细胞浆并进行复制。

关键词 *ibeT*, 大肠杆菌 K1 株, 人脑微血管内皮细胞, 溶酶体, 逃逸

学科分类号 R37

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00590

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, 但是病死率仍然得不到显著的改善^[1, 2]。大肠杆菌 (*E. coli*) 是导致新生儿脑膜炎最常见的革兰氏阴性致病菌^[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, BMECs) 组成的血脑屏障。大肠杆菌穿过 BMECs 涉及两个关键性环节, 一是 *E. coli* 黏附并侵袭进入 BMECs, 二是 *E. coli* 在 BMECs 中逃避宿主细胞的防御并进行繁殖, 最终穿过 BMECs 入脑。近年来, 学者们利用分离培养的 BMECs 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 BMECs 相关基因, 如 *fimH*, *ompA*, *ibeA*, *ibeB*, *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], 但是对于进入 BMECs 中的 *E. coli* 如何逃避宿主细胞的防御并进行繁殖的机制目前尚不清楚。

我们在研究过程中, 从致新生儿脑膜炎 *E. coli* K1 株 RS218 (O18 : K1 : H7) 中克隆鉴定了一个 20.3 kb 的 *E. coli* K1 毒力岛基因 GimA (genetic

island of meningitic *E. coli* containing *ibeA*)^[4]。GimA 仅存在于 *E. coli* 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, 全长 1 404 bp, 推断的编码蛋白约 50 ku。有研究显示, *ibeT* 基因缺失的 *E. coli* K1 突变株对人脑微血管内皮细胞 (human brain microvascular endothelial cells, HBMECs) 的黏附和侵袭能力下降^[5]。我们在最近的研究中发现了 *ibeT* 基因有利于 *E. coli* K1 在 HBMECs 中进行繁殖的新现象, 并对其涉及的机制进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

E. coli K1 株 RS218 (O18 : K1 : H7) 由新生儿

* 国家自然科学基金 (30570094, 30500277) 和辽宁省博士启动基金 (20051036) 资助项目。

** 共同第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 024-23256666-5019, E-mail: yhchen@mail.cmu.edu.cn

收稿日期: 2008-08-26, 接受日期: 2008-10-13

脑膜炎患者的脑脊液中分离^[6], E44 是 RS218 的抗利福平突变株; 核酸内切酶, T4 DNA 连接酶购自 Takara 公司; pGEMT-easy 载体为 Promega 公司产品; 质粒 DNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司; DNA 片段纯化及胶回收试剂盒为上海生工生物有限公司产品; HBMECs 由美国约翰霍普金斯大学医学院 Kwang Sik Kim 博士惠赠; BHI (brain heart infusion) 细菌培养基和 Nu 血清为美国 BD 公司产品; RPMI-1640 培养基为美国 Invitrogen 公司产品; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)为 Hyclone 公司产品; 兔抗人早期内体抗原 1(early endosomal antigen 1, EEA1)和溶酶体相关膜蛋白 1(lysosome associated membrane protein 1, Lamp1)抗体为美国 Abcam 公司产品; 兔抗人组织蛋白酶 D (Cathepsin D)抗体为美国 Santa Cruz Biotechnology 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 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 15%置于-70℃. 以 *E. coli* DH5 α 作为亚克隆和质粒扩增的宿主菌. 在 LB 培养基中分别加入浓度为 100 mg/L 氨苄青霉素和 50 mg/L 卡那霉素, 于 37℃、225 r/min 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 mg/L 利福平的 LB 培养基于 37℃、225 r/min 条件下培养. 在进行侵袭细胞的试验之前, 挑取 E44 株单菌落接种于含有 100 mg/L 利福平的 3.75% BHI 培养基中, 在 37℃、90 r/min 条件下培养过夜.

1.2.2 细胞培养. HBMECs 在 37℃、5% CO₂、100%湿度的条件下, 于含有 10%FBS、10%Nu 血清、2 mmol/L 谷氨酰胺和 1 mmol/L 丙酮酸钠的 RPMI-1640 培养液中进行培养. 每 2~3 天更换新鲜培养液, 待细胞在培养瓶底面生长至 90%左右时, 用含 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.

1.2.3 E44: Δ *ibeT* 基因缺失突变株的构建. 参照文献[7, 8]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' GTCAGATGAAAATACGGTAGAGTC-AGGT 3', p2, 5' AAGCTTAACTTTATTCCCTGTTAAAAGACT 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' AAGCTTGTATTCAAGAT-

AATAAATGCG 3', p4, 5' GAGCTCGGCTGACA-GAGTATAACGTAAT 3', 分别在 p3 和 p4 的 5' 端加入 *Hind* III 和 *Sac* I 的酶切位点. 利用这两对引物, 以 E44 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 分别获得 *ibeT* 基因上游和下游的 DNA 序列, 将这两个序列分别克隆到 pGEMT-easy 载体上, 再利用 p2 和 p3 上的酶切位点 *Hind* III 将两个片段拼接. 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.

1.2.4 细菌在细胞内存活试验. 按文献[9]报道的方法, 简述如下: 将 HBMECs 接种到 24 孔板中, 待细胞长成单层时将培养液更换为实验培养液(RPMI-1640, 5% FBS, 1 mmol/L 丙酮酸钠), 同时每孔加入 1×10^7 个过夜培养的大肠杆菌, 37℃、5% CO₂、100%湿度的条件下孵育 1.5 h 后, 弃去实验培养液, 用 RPMI-1640 洗 3 次, 加入含有 100 U/ml 庆大霉素的实验培养液杀死细胞外的细菌后, 分别在继续培养 0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h 后用无菌水裂解细胞, 将细胞裂解液涂布于在含有利福平的 LB 琼脂平板上, 过夜培养, 计数菌落个数.

1.2.5 细菌生长曲线测定. 参照文献[10]报道的方法, 在 LB 培养基中, 分别接种过夜培养的 E44 株或 E44: Δ *ibeT* 突变株, 在 37℃、225 r/min 条件下继续培养, 分别在接种后的第 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h 时收集部分菌液, 测定菌液在波长为 600 nm 时的吸光度值. 以时间为横坐标, 所测得的吸光度值为纵坐标, 绘制生长曲线.

1.2.6 免疫荧光实验. 将 HBMECs 接种到无菌处理的盖玻片上, 待细胞在盖玻片上生长至 50%左右时, 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 1×10^7 /ml, 分别在加入细菌孵育后 30 min、1 h 及 2 h 时, 弃去实验培养液, PBS 漂洗后, 4%多聚甲醛室温固定 15 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min. 0.25% Triton X-100 透化 10 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min. 5% BSA 室温封闭 1 h 后, 在孵育 30 min、1 h 及 2 h 的盖玻片上分别滴加抗 EEA1(1:500)、Lamp1(1:500)以及 Cathepsin D(1:400)抗体, 4℃过夜. PBS 漂洗盖片 3 次, 每次 5 min, 然后加入 TRITC

标记的二抗(1:200), 室温孵育 1 h. PBS 洗 3 次, 每次 5 min. 4, 6- 联脒 -2- 苯基吡啶(DAPI, 1:1000) 室温染色 3 min, 去离子水略洗一下盖片后, 90% 甘油封片, 以激光共聚焦扫描显微镜进行观察. 随机选取 10 个视野, 计算与溶酶体标志物发生共定位的细菌数量占细胞内细菌数量的百分率.

1.2.7 透射电镜观察. 将细胞以适当的密度接种到培养皿中, 待细胞铺满单层时, 更换为实验培养液, 然后加入过夜培养的 E44 株或 E44: $\Delta ibeT$ 突变株至 $1 \times 10^7/\text{ml}$, 分别在加入大肠杆菌后的第 1、第 2 和第 3 小时, 弃掉实验培养液并用细胞刮刀收集细胞. 按照文献[9]报道的方法, 将所收集的细胞用 2.5%戊二醛固定后, 再用 2%四氧化锇固定 1 h, 经丙酮脱水后, 用环氧树脂浸透并包埋, 利用超薄切片机将包埋块切成 70~80 nm 的超薄切片, 并将超薄切片用醋酸铀和柠檬酸铅染色, 用透射电镜进行观察. 在细菌侵袭细胞 2 h 后, 选取 30 个位于细胞浆内的细菌, 计算具有完整膜结构的含有大肠杆菌的囊泡(*E. coli* containing vacuole, ECV)占细胞浆内全部细菌数量的百分率.

1.2.8 细菌缓冲容量测定. 参照文献[11]的方法, 简述如下: 在对数生长期收集细菌, 将细菌重悬于去离子水中. 取 4 管细菌悬液, 将其用 0.05 mol/L HCl 缓慢地调到 pH 分别为 7.5, 7.0, 6.5, 6.0 和 5.5, 利用酚酞作为指示剂, 用 0.05 mol/L KOH 进行滴定, 计算出细菌胞外缓冲容量记作 B_o . 用同样方法, 但在用 KOH 进行滴定前以终浓度为 5%

Triton X-100 对细菌菌体进行透化, 得到细菌胞内和胞外总的缓冲容量记作 B_t . B_t 与 B_o 的差值即为细菌胞内缓冲容量, 记作 B_i .

2 结 果

2.1 *ibeT* 基因缺失抑制了 *E. coli* K1 在 HBMECs 中的生长

为了分析 *ibeT* 基因是否能够影响 *E. coli* K1 侵袭进入 HBMECs 后在宿主细胞内部的生长, 我们首先构建了 E44: $\Delta ibeT$ 突变株, 并利用该突变株进行了细胞内细菌存活试验. 在细菌侵袭 HBMECs 之后, 用庆大霉素杀死细胞外的大肠杆菌, 并将 HBMECs 继续培养一定时间后, 检测 HBMECs 中存活的细菌. 如图 1a 所示, 随着培养时间的延长, E44 株在 HBMECs 内繁殖速度较快, 培养 12 h 获得的菌落数明显高于培养 0 h 获得的菌落数, 获得的菌落数于培养 24 h 达到顶点, 是培养 0 h 所获得菌落数的 4.5 倍, 在培养 48 h 所获得的菌落数仍保持较高水平. 而 E44: $\Delta ibeT$ 突变株与 E44 株的生长情况差别明显, E44: $\Delta ibeT$ 突变株在侵袭进入 HBMECs 后的 48 h 内所获得的菌落数均无明显变化. 为了排除细菌本身的生长速度对该实验的影响, 我们还对 E44 株和 E44: $\Delta ibeT$ 突变株的生长曲线进行了测定(图 1b), 结果显示, 两者在体外的生长速度没有显著性差异. 这些结果表明, 在 *E. coli* K1 侵袭进入 HBMECs 后, *ibeT* 基因的缺失能够抑制 *E. coli* K1 在宿主细胞内部的生长繁殖.

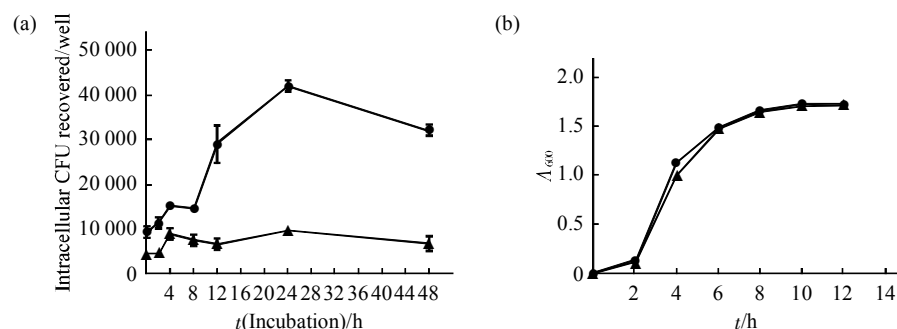


Fig. 1 Deletion of *ibeT* gene inhibited the intracellular growth of *E. coli* K1 in HBMECs

(a) HBMECs were infected with E44 strain or its isogenic *ibeT* mutant for 1.5 h, treated with gentamicin to kill extracellular bacteria, and the number of intracellular bacteria was determined at the indicated time points. (b) Growth curves of E44 strain and its isogenic *ibeT* mutant in LB medium. The error bars represent standard deviations of triplicate samples and the results shown are representative of three independent experiments.

●—●: E44; ▲—▲: $\Delta ibeT$.

2.2 *ibeT* 基因缺失导致 *E. coli* K1 逃逸 HBMECs 溶酶体的能力发生缺陷

有研究表明, *E. coli* K1 侵袭进入 HBMECs 内

部后, 首先形成含有大肠杆菌的囊泡, 即 ECV, ECV 会先后募集早期内体标志性蛋白和晚期内体标志性蛋白, 但是 ECV 最终没有全部与溶酶体发

生融合,从而使 *E. coli* K1 免于降解^[12]. 我们的结果显示, *ibeT* 基因缺失使得 *E. coli* K1 在 HBMECs 中的繁殖受到了抑制,这种现象是否与 ECV 逃逸溶酶体相关值得探讨. 因此,我们利用激光共聚焦扫描显微镜,以 EEA1、Lamp1 和 Cathepsin D 分别作为早期内体、晚期内体和溶酶体的标志物,观察了 HBMECs 内吞大肠杆菌的过程. 结果显示,向培养的 HBMECs 加入细菌共同孵育 30 min 后, E44 株和 E44: Δ *ibeT* 突变株的菌体大多与 HBMECs 表达的 EEA1 有共定位(如图 2a 箭头所示,呈黄色),在加入细菌孵育 1 h 后, E44 株和 E44: Δ *ibeT* 突变株也与 HBMECs 的 Lamp1 有较多的共定位

(图 2b). 需要指出的是,在加入细菌孵育 2 h 后,大部分 E44 株的菌体所在位置看不到溶酶体标志物——Cathepsin D 的荧光,而 E44: Δ *ibeT* 突变株菌体与 Cathepsin D 的荧光信号仍表现为明显的重叠现象(图 2c). 对免疫荧光共定位的结果进行分析发现, E44: Δ *ibeT* 突变株与 Cathepsin D 共定位的比率明显高于 E44 株,统计学分析有显著性差异(图 2d). 这些结果表明, *ibeT* 基因缺失不影响 *E. coli* K1 进入 HBMECs 后 ECV 与早期内体和晚期内体融合的过程,而是使大部分 ECV 与溶酶体发生了融合,即 *ibeT* 基因缺失后, *E. coli* K1 逃逸 HBMECs 溶酶体的能力发生了缺陷.

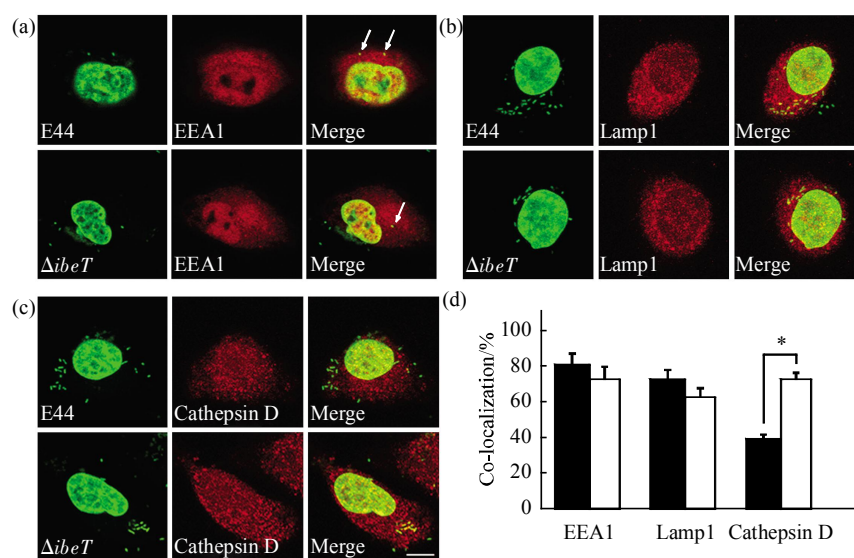


Fig. 2 Intracellular trafficking of the E44 strain and its isogenic *ibeT* mutant in HBMECs

HBMECs were infected by the E44 strain or its isogenic *ibeT* mutant for 30 min (a), 1 h (b) and 2 h (c), followed by wash of extracellular bacteria. Cells were fixed and EEA1 (a), Lamp1 (b) and Cathepsin D (c) were stained with respective primary antibodies followed by respective secondary antibodies conjugated with TRITC, bacteria were labeled with DAPI. EEA1, Lamp1 were acquired on E44 strain except Cathepsin D. However, EEA1, Lamp1 and Cathepsin D were acquired on isogenic *ibeT* mutant. Scale bar: 10 μ m. (d) Quantification of co-localization of cytoplasmic bacteria with EEA1, Lamp1 and Cathepsin D based on examination of 10 random visual fields. The error bars represent standard deviations of triplicate samples and the results shown are representative of three independent experiments. * $P < 0.05$. ■: E44; □: Δ *ibeT*.

2.3 *ibeT*基因有利于 *E. coli* K1 从 ECV 中逃逸入细胞浆

我们的上述结果显示,敲除了 *ibeT* 基因后的 E44: Δ *ibeT* 株逃逸溶酶体的能力发生了缺陷. 为了进一步观察 *ibeT* 基因在 *E. coli* K1 逃逸溶酶体过程中的作用,利用透射电镜观察了 E44 和 E44: Δ *ibeT* 突变株在侵袭 HBMECs 过程中的表现. 如图 3 所示,在 E44 株和 E44: Δ *ibeT* 突变株侵袭 HBMECs 后 30 min, HBMECs 质膜向外伸出伪足将细菌菌体包围,在侵袭 HBMECs 后 2 h,进入 HBMECs

细胞浆内的 E44 株菌体大多表现为游离于细胞浆,菌体完整,周围没有膜结构包绕,而进入 HBMECs 细胞浆的 E44: Δ *ibeT* 突变株菌体仍位于具有完整膜结构的 ECV 内. 半定量分析结果显示,在细菌侵袭 HBMECs 后 2 h, E44: Δ *ibeT* 在 HBMECs 内所形成的完整 ECV 数量约占胞浆内总的细菌数量的 70%,明显高于 E44 侵袭组. 这些结果表明, *ibeT* 基因有利于 *E. coli* K1 破坏 ECV 膜并从 ECV 逃逸入细胞浆.

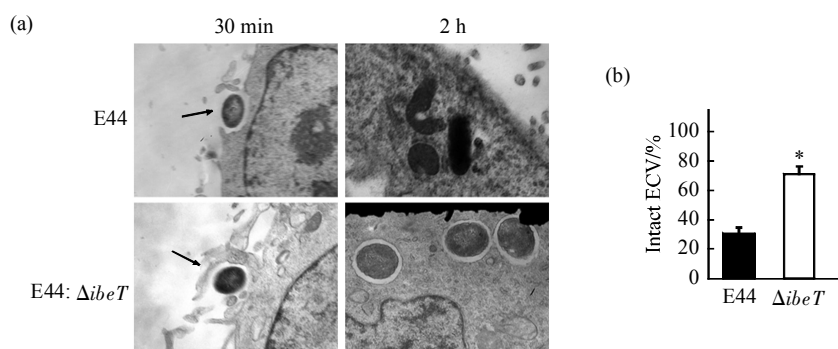


Fig. 3 The E44:Δ*ibeT* mutant failed to escape from the ECV into the cytoplasm of HBMECs

(a) Representative electron micrographs of ECV after HBMECs infected with E44:Δ*ibeT* mutant at indicated times, compared with E44 strain (10 000×). Arrows showed the uptake of *E. coli* by HBMECs 30 min postinfection. Free bacteria were observed in the cytoplasm 2 h after E44 infection, whereas intact ECV were showed 2 h after E44:Δ*ibeT* infection. (b) Quantification of intact ECV in cytoplasm of HBMECs from different sections 2 h after infection. The error bars represent standard deviations of triplicate samples and the results shown are representative of three independent experiments. **P* < 0.05.

2.4 敲除 *ibeT* 基因后的 E44:Δ*ibeT* 突变株菌体胞内的缓冲容量下降

大肠杆菌进入 HBMECs 后, 以 ECV 的形式存在于 HBMECs 细胞浆内, 而 ECV 大多数与溶酶体发生融合. 研究表明, ECV 的内部环境呈逐渐酸化的趋势(其内部 pH 值可以下降至 5.6 左右)^[13]. 而细菌胞内缓冲容量通常被作为细菌在外界 pH 变化时维持其内环境稳定的重要指标^[14, 15], 因此, 我们利用体外实验检测了偏酸性条件下 E44 株与 E44:Δ*ibeT* 突变株菌体胞内的缓冲容量. 结果显示, 在溶液 pH 值分别为 6.5 和 6.0 时, E44 株菌体胞内的缓冲容量较 E44:Δ*ibeT* 突变株为高, 统计学分析有显著性差异, 而在 pH 值分别为 7.5、7.0 和 5.5 时, 二者的胞内缓冲容量区别不大(图 4). 这使我

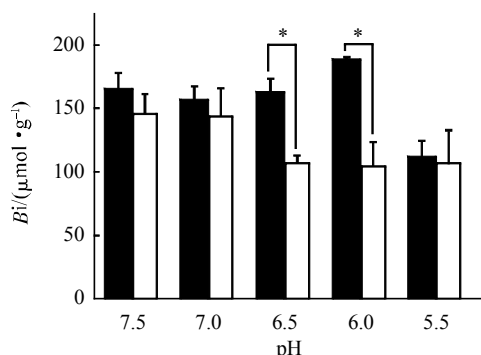


Fig. 4 Cytoplasmic buffering capacity of E44 strain and E44:Δ*ibeT* mutant at different pH values

Cytoplasmic buffering capacity (*Bi*) values for E44 strain and E44:Δ*ibeT* mutant over a range of external pH values. *Bi* values were calculated as described in the **Materials and methods**. The error bars represent standard deviations of triplicate samples and the results shown are representative of three independent experiments. **P* < 0.05. ■: E44; □: Δ*ibeT*.

们有理由推断, 在 *E. coli* K1 侵袭进入 HBMECs 后, *ibeT* 基因的表达可以使 ECV 内的大肠杆菌表现出较强的维持菌体内环境稳定的能力.

3 讨 论

近年来, 在对病原体与宿主细胞相互作用的研 究中, 病原体如何抵抗宿主细胞的防御机制进而在 宿主细胞的胞浆中存活, 逐渐受到研究人员的关 注^[16, 17]. 我们在研究中发现, 将致脑膜炎 *E. coli* K1 的毒力岛基因 *ibeT* 敲除后, 侵袭进入 HBMECs 的 *E. coli* K1 在 HBMECs 内的生长繁殖受到了抑制, 这提示 *ibeT* 基因的表达产物可能参与了 *E. coli* K1 抵抗 HBMECs 防御的过程.

已有研究显示, 微生物大多以吞噬体的形式进入吞噬细胞内部^[16, 17]. 吞噬体在进入吞噬细胞后, 胞浆内早期内体特异性蛋白 EEA1、Rab5 等即黏附于吞噬体的外表面并发挥作用, 形成早期内体. 接着, 早期内体外表面的 Rab5 逐渐减少, 随着表面募集的晚期内体相关蛋白 Rab7、Lamp1 以及 6-磷酸甘露糖受体逐渐增多, 早期内体开始向晚期内体成熟演变. 在依赖于三磷酸腺苷(ATP)的质子泵作用下, 氢离子进入晚期内体使晚期内体酸化, 形成吞噬性溶酶体, 最终使微生物被降解^[16, 17]. 对于一些非吞噬细胞(如上皮细胞, 内皮细胞等)而言, 微生物进入宿主细胞后, 在宿主细胞浆内的运输过程与吞噬体的成熟过程有一定相似性^[18]. 我们用激光共聚焦扫描显微镜观察到, 在 E44 株和 E44:Δ*ibeT* 突变株侵袭进入 HBMECs 后, 在 HBMECs 胞浆内形成的 ECV 会依次募集早期内体特异性蛋白

EEA1、晚期内体相关蛋白 Lamp1。接着,我们又以 Cathepsin D 作为溶酶体的标志物,观察了 E44 株和 E44: $\Delta ibeT$ 突变株在侵袭 HBMECs 过程中与 HBMECs 溶酶体的共定位。结果显示,大多数野生型 E44 株最终会逃逸 HBMECs 溶酶体,而将 *ibeT* 基因敲除后的 E44: $\Delta ibeT$ 突变株却大部分与溶酶体发生了融合。这说明, *ibeT* 基因的表达产物并不影响 ECV 募集早期内体相关蛋白和晚期内体相关蛋白的过程,而是参与了 *E. coli* K1 从 HBMECs 溶酶体逃逸的过程。

不同的病原菌通过不同的方式来逃逸宿主细胞内溶酶体的降解,以利于其在宿主细胞内的寄生及播散致病。如军团杆菌可以通过分泌一些信号分子使其避免与早期内体融合进入内吞途径,柯克斯体通过适应溶酶体内的偏酸性环境而在细胞内部存活,志贺杆菌则可以破坏其周围的囊泡结构逃逸入胞浆,继而避免被溶酶体降解^[18]。为了进一步观察 *E. coli* K1 从 HBMECs 溶酶体逃逸的过程,我们利用透射电镜观察了在 *E. coli* K1 侵袭 HBMECs 过程中 ECV 的变化。结果显示, *ibeT* 基因的缺失影响了 *E. coli* K1 裂解 ECV 膜结构的能力。这使我们合理推断,由于 *ibeT* 基因缺失后的 E44: $\Delta ibeT$ 突变株不能破坏 ECV 膜结构,从而使大多数进入 HBMECs 胞浆的大肠杆菌与溶酶体融合而被降解,造成游离于胞浆大肠杆菌的数量明显减少,最终导致 E44: $\Delta ibeT$ 突变株在 HBMECs 胞浆内的繁殖数量明显下降。

病原体侵袭进入宿主细胞浆后,病原体所处的小囊泡的内部环境常表现为逐渐酸化的过程^[18]。我们的研究显示,当外环境的 pH 值分别为 6.5 和 6.0 时, E44 的菌体胞内缓冲能力明显高于 E44: $\Delta ibeT$ 突变株。这提示, *ibeT* 基因参与了 *E. coli* K1 在外界环境发生酸化时的自我调节过程,即 *ibeT* 基因的表达可以使 *E. coli* K1 在外界 pH 发生酸化时恢复菌体内环境稳态并维持自身的活力。

从我们的结果可以看出, *ibeT* 基因的表达有利于进入 HBMECs 胞浆的 *E. coli* K1 降解 ECV 膜结构,使 ECV 避免了与溶酶体的融合,从而协助 *E. coli* K1 逃逸入 HBMECs 胞浆,促进 *E. coli* K1 在 HBMECs 胞浆内的生长繁殖。而 *ibeT* 基因如何通过维持 *E. coli* K1 的菌体胞内缓冲能力来参与 *E. coli* K1 降解 ECV 膜结构,这是我们下一步打算研究的内容。

参 考 文 献

- 1 黄邵良,陈述枚,何政贤. 小儿内科学. 北京: 人民卫生出版社, 2004. 193~194
Huang S L, Chen S M, He Z X. Pediatric Internal Medicine. Beijing: People Health Publishing House, 2004. 193~194
- 2 Xie Y, Kim K J, Kim K S. Current concepts on *Escherichia coli* K1 translocation of the blood-brain barrier. FEMS Immunol Med Microbiol, 2004, **42**(3): 271~279
- 3 Huang S H, Stins M F, Kim K S. Bacterial penetration across the blood-brain barrier during the development of neonatal meningitis. Microbes Infect, 2000, **2**(10): 1237~1244
- 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. 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. 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. Infect Immun, 1980, **29**(1): 200~206
- 7 Huang S H, Wan Z S, Chen Y H, et al. Further characterization of *Escherichia coli* brain microvascular endothelial cell invasion gene *ibeA* by deletion, complementation, and protein expression. J Infect Dis, 2001, **183**(7): 1071~1078
- 8 Huang S H, Chen Y H, Fu Q, et al. Identification and characterization of an *Escherichia coli* invasion gene locus, *ibeB*, required for penetration of brain microvascular endothelial cells. Infect Immun, 1999, **67**(5): 2103~2109
- 9 Santic M, Molmeret M, Barker J R, et al. A Francisella tularensis pathogenicity island protein essential for bacterial proliferation within the host cell cytosol. Cell Microbiol, 2007, **9**(10): 2391~2403
- 10 Liew C W, Illias R M, Mahadi N M, et al. Expression of the Na⁺/H⁺ antiporter gene (*g1-nhaC*) of alkaliphilic Bacillus sp. G1 in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett, 2007, **276**(1): 114~122
- 11 Krulwich T A, Agus R, Schneier M, et al. Buffering capacity of bacilli that grow at different pH ranges. J Bacteriol, 1985, **162**(2): 768~772
- 12 Kim K J, Elliott S J, Di Cello F, et al. The K1 capsule modulates trafficking of *E. coli*-containing vacuoles and enhances intracellular bacterial survival in human brain microvascular endothelial cells. Cell Microbiol, 2003, **5**(4): 245~252
- 13 Horwitz M A, Maxfield F R. Legionella pneumophila inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. J Cell Biol, 1984, **99**(6): 1936~1943
- 14 Wilks J C, Slonczewski J L. pH of the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*: rapid measurement by green fluorescent protein

- fluorimetry. J Bacteriol, 2007, **189**(15): 5601~5607
- 15 Baker-Austin C, Dopson M. Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. Trends Microbiol, 2007, **15**(4): 165~171
- 16 Santic M, Molmeret M, Klose K E, *et al.* Francisella tularensis travels a novel, twisted road within macrophages. Trends Microbiol, 2006, **14**(1): 37~44
- 17 Hackstadt T. Redirection of host vesicle trafficking pathways by intracellular parasites. Traffic, 2000, **1**(2): 93~99
- 18 Scott C C, Botelho R J, Grinstein S. Phagosome maturation: a few bugs in the system. J Membr Biol, 2003, **193**(3): 137~152

IbeT*, an *Escherichia coli* K1 Pathogenicity Island Gene, is Essential for Escape From The Lysosomes in Human Brain Microvascular Endothelial Cells

ZHANG Ke**, ZHAO Wei-Dong**, LI Qiang, FANG Wen-Gang, ZHU Li, CHEN Yu-Hua***

(Department of Developmental Biology, China Medical University, Key Laboratory of Cell Biology, Ministry of Public Health, Shenyang 110001, China)

Abstract *Escherichia coli* is the most common gram-negative organism causing neonatal meningitis. In order to characterize the role of the pathogenicity island gene *ibeT* of *Escherichia coli* K1 in the pathogenesis of neonatal meningitis, an *ibeT* gene isogenic in-frame deletion mutant strain was constructed. Intracellular survival assay in human brain microvascular endothelial cells (HBMECs) showed that the deletion of *ibeT* inhibited the growth of *Escherichia coli* K1 within HBMECs. Confocal microscopy analysis showed that much more *ibeT* mutant remained in lysosomes of HBMECs compared with wild type *Escherichia coli* K1 after bacterial invasion into HBMECs. Transmission electron micrographs further showed that *ibeT* mutant strain was failed to disrupt the *Escherichia coli* containing vacuole (ECV) and escape into the cytoplasm. Furthermore, cytoplasmic buffering capacities of *ibeT* mutant were lower than wild type *Escherichia coli* K1 at pH 6.5 and pH 6.0. These results suggested that the expression of *ibeT* in *Escherichia coli* K1 contributed to ECV membrane degradation and subsequent escape from lysosomes into the cytoplasm for replication after *Escherichia coli* K1 invasion into HBMECs.

Key words *ibeT*, *Escherichia coli* K1, HBMEC, lysosome, escape

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00590

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30570094, 30500277) and Doctoral Seeding Fund of Liaoning Province (20051036).

** Both authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-24-23256666-5019, E-mail: yhchen@mail.cmu.edu.cn

Received: August 26, 2008 Accepted: October 13, 2008