

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.46.028 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]
唐新杰, 盛玲玲, 张群, 谢峰. 链球菌溶血素O提高细胞的通透性[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(46): 8689-8692.

链球菌溶血素O提高细胞的通透性*★

唐新杰, 盛玲玲, 张群, 谢峰

文章亮点: ①目前普遍使用的可以使受体细胞发生可逆性通透的方法主要有电穿孔和链球菌溶血素O的使用。②实验的目的在于观察不同质量浓度的链球菌溶血素O对细胞通透性及状态的影响,寻找最适合的链球菌溶血素O浓度。③实验结果发现,不同质量浓度的链球菌溶血素O对细胞形态均无明显影响。随着链球菌溶血素O质量浓度的提高,细胞的通透率仅轻微上升。质量浓度为230 μg/L的链球菌溶血素O对细胞的损伤是最小的,而300 μg/L和400 μg/L组的细胞增殖能力明显降低。说明适当的链球菌溶血素O浓度对细胞的影响非常小,并不是链球菌溶血素O的质量浓度越大越好。230 μg/L的链球菌溶血素O溶液可以使大量细胞产生通透,且保持细胞的形态及活性。

关键词: 链球菌溶血素O; 通透性; 成纤维细胞; 细胞形态; 增殖能力; 钙离子; 蛋白质; 渗透屏障; 渗透率; 细胞培养

摘要

背景: 实验发现链球菌溶血素O引起的细胞通透在一定程度上是可逆的,链球菌溶血素O产生的孔道在Ca²⁺存在的情况下可以自然封闭。

目的: 观察链球菌溶血素O是否可以使猪成纤维细胞的通透性发生改变,及不同质量浓度的链球菌溶血素O对细胞状态的影响。

方法: 分别使用质量浓度为0, 230, 300, 400 μg/L的链球菌溶血素O溶液处理猪成纤维细胞,孵育50 min后,加入PI染液,观察细胞的通透率。加入含Ca²⁺的培养液封闭细胞后,分别观察细胞的形态变化及增殖能力的变化。

结果与结论: 随着链球菌溶血素O溶液质量浓度的增加,细胞的通透率只轻度提高。链球菌溶血素O处理细胞后,细胞的形态没有发生明显的改变。质量浓度为230 μg/L的链球菌溶血素O溶液对细胞的增殖能力无明显影响,而300 μg/L和400 μg/L的链球菌溶血素O溶液明显地降低了细胞的增殖能力。提示质量浓度为230 μg/L的链球菌溶血素O溶液可以提高细胞的通透性,并保持细胞正常的形态及增殖能力。

上海交通大学医学院附属第九人民医院,上海市200011

唐新杰★,女,1976年生,河南省洛阳市人,汉族,2012年上海交通大学医学院毕业,硕士,主要从事细胞抽提物重编程方面的研究。
Tangxinjie0916@163.com

通讯作者:谢峰,博士,主治医师,上海交通大学医学院附属第九人民医院,上海市200011
xiepeng@163.com

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2012)46-08689-04

收稿日期:2012-08-17
修回日期:2012-10-15
(20110817002W·W)

Effects of streptolysin O on increasing cell permeability

Tang Xin-jie, Sheng Ling-ling, Zhang Qun, Xie Feng

Abstract

BACKGROUND: Streptolysin O (SLO)-induced cell permeability is reversible to a certain extent, and the pores can be closed in the medium containing Ca²⁺.

OBJECTIVE: To observe whether SLO could improve the permeability of pig fibroblasts and to observe the states of cells treated with SLO of different concentrations.

METHODS: Pig fibroblasts were permeated with SLO solution of different concentrations (0, 230, 300 and 400 μg/L respectively). After incubation of 50 minutes, the cells were stained with PI to observe cell permeability. When adding the medium containing Ca²⁺, the cells were plated. Morphology and multiplication capacity of these cells were detected.

RESULTS AND CONCLUSION: Along with increase of SLO solution concentration, the cell permeability improved slightly. When cells were treated with SLO, the cell morphology was not changed. 230 μg/L SLO had no influence on the capacity of cell proliferation, and however, 300 μg/L and 400 μg/L SLO reduced the proliferation capacity significantly appearing statistically difference when compared with 0 μg/L group. These findings indicate that 230 μg/L SLO could increase cell permeability with keeping the normal shape and proliferation ability of cells.

Tang XJ, Sheng LL, Zhang Q, Xie F. Effects of streptolysin O on increasing cell permeability. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(46): 8689-8692.

Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Medical College of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200011, China

Tang Xin-jie★, Master, Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Medical College of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200011, China
tangxinjie0916@163.com

Corresponding author: Xie Feng, Doctor, Attending physician, Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Medical College of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200011, China
xiefenghe@163.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30900308*

Received: 2012-08-17
Accepted: 2012-10-15

0 引言

由于细胞膜的生物屏障, 大分子的蛋白质和核酸等不能自由进入细胞发挥生物学效应。链球菌溶血素O是A群链球菌产生的一种外毒素, 能够使细胞膜产生大的孔道, 使大量有毒物质进入细胞质, 从而对细胞产生毒性作用^[1]。Giles等^[2-3]实验发现链球菌溶血素O引起的细胞通透在一定程度上是可逆的, 此作用的发挥可能与反义寡核苷酸可以进入细胞调节细胞修复有关。这些研究为链球菌溶血素O应用于生命科学奠定了理论基础。实验旨在观察链球菌溶血素O是否可以使猪成纤维细胞的通透性发生改变, 及不同质量浓度的链球菌溶血素O对细胞状态的影响。

1 材料和方法

设计: 单一样本观察。

时间及地点: 实验于2009年10月至2011年6月在上海市组织工程重点实验室完成。

材料:

实验动物: 3 d龄健康乳猪1只, 由上海斯莱克实验动物有限公司提供。

试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
DMEM 培养基	GIBCO 公司, 美国
CO ₂ 恒温培养箱	Thermo Scientific 公司, 美国
链球菌溶血素 O 及 ATP 生成系统	Sigma 公司, 美国
流式细胞分析仪	Beckman 公司, 德国
倒置相差显微镜	Nikon 公司, 日本

实验方法:

猪成纤维细胞的培养: 取3 d龄家猪背部皮肤剃毛、体积分数75%乙醇消毒处理后, 局部麻醉切取约3 cm×3 cm大小的全层皮肤, 放入含250 U/mL青霉素和250 mg/L链霉素的无菌磷酸盐缓冲溶液中浸泡10 min。无菌条件下将皮肤组织剪成3 mm×1.5 cm大小的块状, 加入适量质量浓度为0.25%的Dispase II溶液, 置于4 °C冰箱中过夜。次日, 分离皮肤组织的表皮

和真皮。剪碎真皮组织, 移至50 mL的离心管中, 加入适量质量浓度为2 g/L的II型胶原酶, 置于37 °C摇床中消化1 h。消化结束后, 过滤离心收集细胞, 按3×10⁶的密度接种于100 cm²的培养皿中。2 d后首次换液。待细胞长满至培养皿的85%–90%时, 采用2.5 g/L胰蛋白酶消化的方法将细胞传代(1:3)。本实验使用二三代的成纤维细胞。

链球菌溶血素O渗透处理成纤维细胞: 收集成纤维细胞后, 用PBS洗涤2次。计数后平均分为4份, 置于15 mL离心管中。离心弃上清, 各管中分别加入质量浓度为0, 230, 300, 400 μg/L的链球菌溶血素O溶液, 使细胞浓度为1×10⁹ L⁻¹。混匀后置于37 °C水浴箱中孵育50 min, 每15 min混匀1次。孵育结束后离心(1 500 r/min, 37 °C, 5 min), 弃上清。

细胞渗透率的测定: 细胞处理结束后加入质量浓度为20 mg/L的PI染液500 μL, 孵育5 min后用PBS漂洗2次。流式细胞仪检测PI阳性细胞的比例。

链球菌溶血素O渗透后细胞的形态学变化: 细胞处理结束后, 每管加入含2 mmol/LCaCl₂的培养液, 使每管的细胞浓度为1.5×10⁷ L⁻¹。将4个标本的细胞分别接种于24孔板中, 每孔1 mL, 每个样本含3个副孔。2 h后更换培养液为不含Ca²⁺的培养液。倒置相差显微镜下观察接种后第1, 2, 3天时细胞形态学变化。

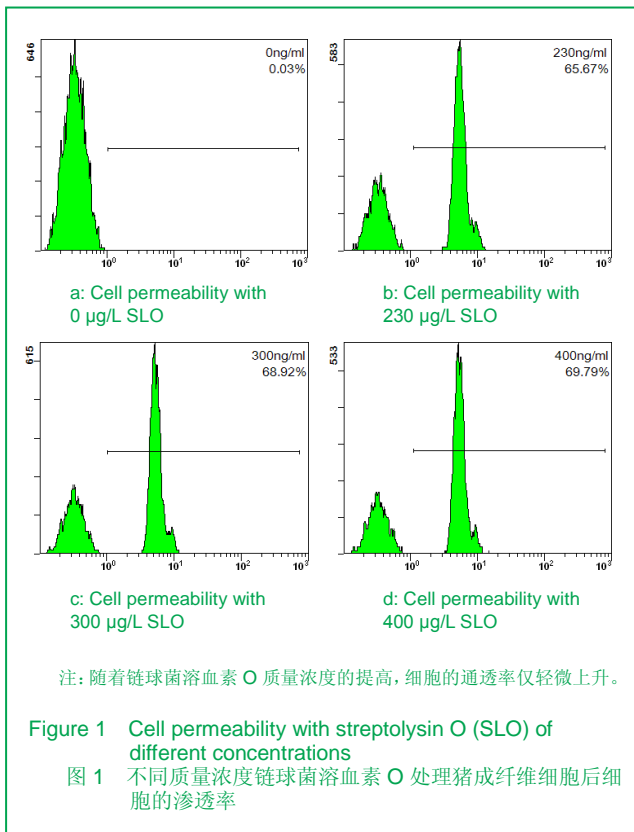
链球菌溶血素O渗透后细胞增殖能力的改变: 细胞处理结束后, 每管加入含2 mmol/LCaCl₂的培养液, 使每管的细胞浓度为16.67×10⁶ L⁻¹。分别接种于96孔板中, 每个孔300 μL的细胞混悬液, 每个样本含3个副孔。2 h后更换为不含Ca²⁺的培养液。次日, 96孔板中的样本每孔分别加入10 μL的CCK-8, 37 °C培养箱中避光孵育3 h, 将上清吸至新的96孔板中, 酶标仪检测每孔的A值。实验检测第1, 2, 3天时细胞的增殖情况。

主要观察指标: 链球菌溶血素O渗透后细胞通透性的改变、形态学变化及增殖情况。

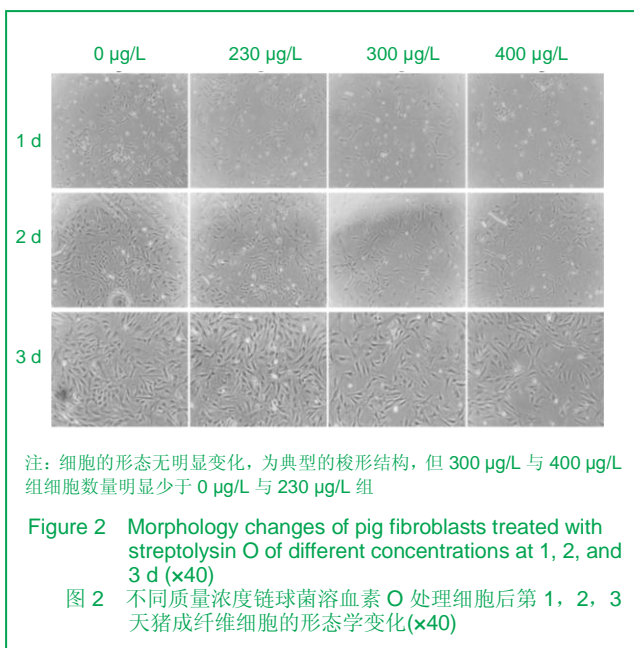
2 结果

2.1 链球菌溶血素O渗透后细胞通透性的改变
不同质量浓度的链球菌溶血素O渗透成纤维细

胞后进行PI染色, 流式细胞仪检测通透率分别为(0.03±0.001)%、(65.62±0.05)%、(68.90%±0.03)%、(69.79±0.03)%, 见图1。

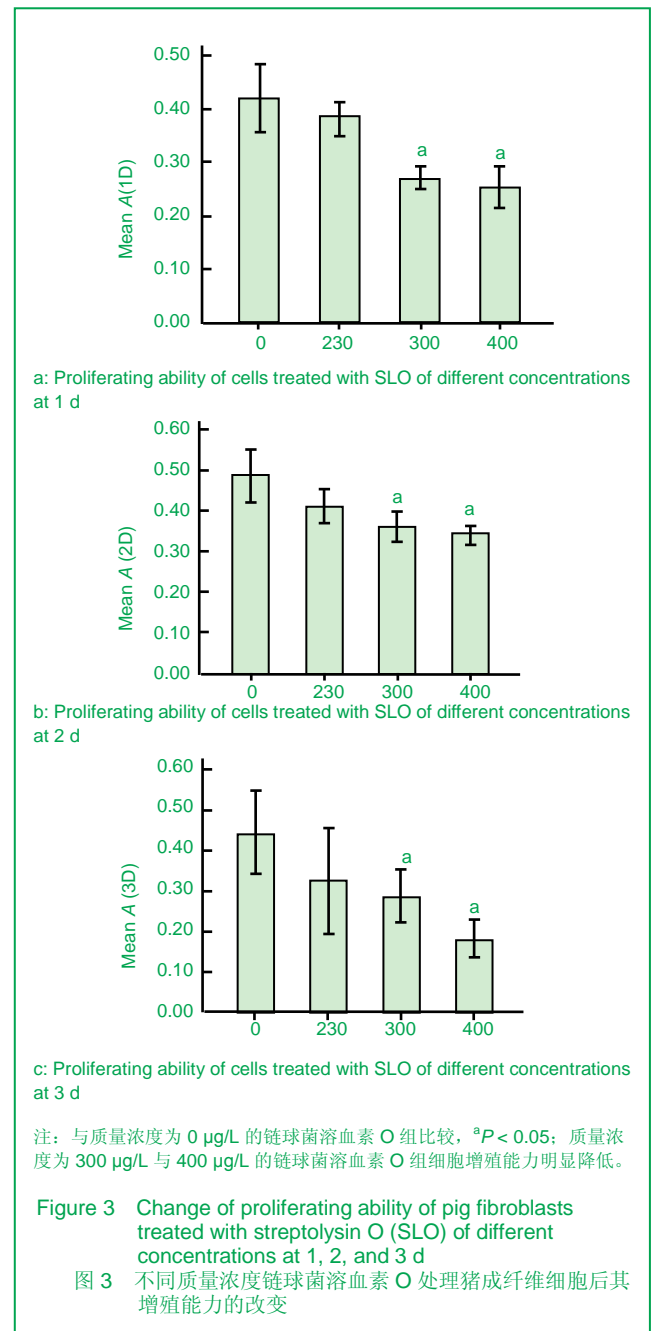


2.2 链球菌溶血素 O 渗透细胞后细胞的形态学变化见图2。



链球菌溶血素 O 处理成纤维细胞后, 分别观察 1, 2, 3 d 时细胞的形态, 发现细胞的形态无明显变化, 呈现为典型的梭形结构。但是, 300 µg/L 与 400 µg/L 组的细胞数量明显少于 0 µg/L 与 230 µg/L 组, 见图2。

2.3 链球菌溶血素 O 渗透细胞后细胞增殖情况 CCK-8 检测链球菌溶血素 O 渗透处理后的细胞增殖, 结果表明, 质量浓度为 230 µg/L 的链球菌溶血素 O 溶液对细胞的损伤最小, 其增殖能力与质量浓度为 0 µg/L 的链球菌溶血素 O 组之间比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$); 而质量浓度为 300 µg/L 与 400 µg/L 的链球菌溶血素 O 组细胞的增殖能力明显降低, 与质量浓度为 0 µg/L 的链球菌溶血素 O 组之间比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 见图3。



3 讨论

近年来的研究发现目的细胞抽提物进入受体细胞后可以发挥重编程作用, 使受体细胞转变为目的细胞,

这一策略为人造器官提供了新的种子细胞来源,为病损组织器官替代修复治疗提供了新思路。在此类实验中,细胞抽提物是通过机械法将细胞破碎后高速离心获取,所以抽提物几乎包括了细胞内所有的可溶性蛋白质,使得蛋白质的分子量大小悬殊^[4]。因此,如何使这些蛋白质进入受体细胞发挥作用是抽提物发挥重编程作用的关键。

为了克服细胞壁、细胞膜存在而形成的渗透屏障,多种方法被应用于改变细胞的通透性,如超声、冻融、有机溶剂(甲苯、二甲亚砷等)、电穿孔等^[4]。目前普遍使用的可以使受体细胞发生可逆性通透的方法主要有电穿孔和链球菌溶血素O的使用^[3]。理论上来说,电穿孔法可用于各种细胞,但需要昂贵的电转仪,而且过高的场强和过长的电脉冲时间会不可逆的损伤细胞膜而裂解细胞^[5]。相比较之下,链球菌溶血素O的使用较简便,只需将链球菌溶血素O溶液加入细胞中,给予一定的作用时间,即可达到通透效果。链球菌溶血素O对黏附和非黏附的细胞均具有成孔毒性,链球菌溶血素O结合至细胞膜后,毒素单体弥散至细胞膜的双层结构中,单体发生寡聚体化聚合为同型聚合体,从而形成一孔道结构^[6-7],使得相对分子质量<100 000的物质进入细胞质^[3]。目前已发表的关于抽提物的重编程作用的文章中,链球菌溶血素O的浓度不一,变化于230-400 $\mu\text{g/L}$,学者们认为大量链球菌溶血素O是致死的^[8]。

实验结果发现,不同质量浓度的链球菌溶血素O对细胞的形态均无明显影响,细胞仍呈现典型的梭形结构。随着链球菌溶血素O质量浓度的提高,细胞的通透率仅轻微上升。但是,高浓度的链球菌溶血素O对细胞的损伤是非常明显的,主要体现在细胞的数量和增殖能力方面。从结果中可以看出,细胞的贴壁能力随着链球菌溶血素O质量浓度的提高而明显降低;230 $\mu\text{g/L}$ 的链球菌溶血素O对细胞的损伤是最小的,与0 $\mu\text{g/L}$ 组之间比较差异无显著性意义,而300 $\mu\text{g/L}$ 和400 $\mu\text{g/L}$ 组的细胞增殖能力明显降低,与对照组之间比较差异有显著性。此结果说明,适当的链球菌溶血素O质量浓度对细胞的影响是非常小的,并不是链球菌溶血素O的质量浓度越大越好。根据先前的文献报道,本实验中链球菌溶血素O孵育的时间为50 min。同Naruse等^[9]的发现,细胞在200 $\mu\text{g/L}$ 的链球菌溶血素O溶液中孵育50 min后,卵细胞的细胞核转移的成功率远远高于孵育30, 70 min后的转移率。目前实验已经证明成纤维细胞在230 $\mu\text{g/L}$ 的链球菌溶血素O溶液中孵育50 min后,允许T细胞抽提物^[10]、胰岛细胞抽提物^[11]、胚胎干细胞抽提物等进入细胞^[12],从而进一步产生重编程效应。

4 参考文献

- [1] Hall EH, Gurel V, Dahlberg AE, et al. Inhibition of human breast cancer Matrigel invasion by Streptolysin O activation of the EGF receptor ErbB1. *Cell Signal*. 2011;23(12):1972-1977.
- [2] Giles RV, Spiller DG, Grzybowski, et al. Selecting optimal oligonucleotide composition for maximal antisense effect following streptolysin O-mediated delivery into human leukaemia cells. *Nucleic Acids Res*. 1998;26(7):1567-1575.
- [3] Walev I, Bhakdi SC, Hofmann F, et al. Delivery of proteins into living cells by reversible membrane permeabilization with streptolysin-O. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001;98(6):3185-3190.
- [4] Luo J. *Weishengwu Xuebao*. 2001;41(3):386-389.
罗杰. 细胞通透性的改变及应用[J]. *微生物学报*, 2001,41(3): 86-389.
- [5] Gu RH, Li SG, Song WJ, et al. *Shiyan Dongwu yu Bijiao Yixue*. 2010;3(4):241-250.
谷瑞环,李善刚,宋伟杰,等. 电穿孔介导外源基因转染兔成体成纤维细胞的初步研究[J]. *实验动物与比较医学*, 2010,3(4): 41-250.
- [6] Palmer M, Vulicevic I, Saweljew P, et al. Streptolysin O: a proposed model of allosteric interaction between a pore-forming protein and its target lipid bilayer. *Biochemistry*. 1998;37(8):2378-2383.
- [7] Palmer M, Harris R, Freytag C, et al. Assembly mechanism of the oligomeric streptolysin O pore: the early membrane lesion is lined by a free edge of the lipid membrane and is extended gradually during oligomerization. *EMBO J*. 1998;17(6):1598-1605.
- [8] Bhakdi S, Weller U, Walev I, et al. A guide to the use of pore-forming toxins for controlled permeabilization of cell membranes. *Med Microbiol Immunol*. 1993;182(4):167-75.
- [9] Kenji Naruse, Yanshi Quan, Baek-Chul Kim, et al. Streptolysin-O treatment of fetal fibroblasts improves cell fusion and in vitro development of porcine nuclear transfer embryos. *Journal of Reproduction and Development*. 2009; 5(3):236-239.
- [10] Anne-Mari Hakelien, Helga B. Landsverk, Jame M. Robl, et al. Reprogramming fibroblasts to express T-cell functions using cell extracts. *Nature Biotechnology*. 2002;20(5):445-446.
- [11] Anne-Mari Hakelien, Kristine G. Gaustad, Philippe Collas. Transient alteration of cell fate using a nuclear and cytoplasmic extract of an insulinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;316(3):834-841.
- [12] Thierry Bru, Catriona Clarke, Michael J. McGrew, et al. Rapid induction of pluripotency genes after exposure of human somatic cells to mouse ES cell extracts. *Exp Cell Res*. 2008; 14(14):2634-2642.

来自本文课题的更多信息——

基金资助: 国家自然科学基金资助项目 (30900308)。

作者声明: 文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。