

沙門氏菌與人類巨噬細胞交互作用之體外試驗分析

唐偉誠、劉淑瑛、邱政洵

E-mail: 9509829@mail.dyu.edu.tw

摘要

沙門氏菌 (Salmonella) 是一種革蘭氏陰性桿菌，目前沙門氏菌超過2500種血清型。其中傷寒沙門氏菌 (Salmonella enterica serotype Typhi; S. Typhi) 和副傷寒沙門氏菌 (S. Paratyphi) 會引起人類傷寒病及副傷寒病。其它非傷寒沙門氏菌，如鼠傷寒沙門氏菌 (S. Typhimurium)，腸炎沙門氏菌 (S. Enteritidis)，豬霍亂沙門氏菌 (S. Choleraesuis) 則會引起腸炎或敗血症。本研究使用人類巨噬細胞 (THP-1) 去吞噬不同血清型沙門氏菌，在不同時間點評估沙門氏菌在細胞內的生存情形。各種不同血清型沙門氏菌在巨噬細胞內之存活率有所不同，其中豬霍亂沙門氏菌隨著感染時間增加到24小時後，其在巨噬細胞內菌數持續增加，而鼠傷寒沙門氏菌、傷寒沙門氏菌及腸炎沙門氏菌其巨噬細胞內菌數都呈現逐漸下降。以Annexin V – FITC/PI 雙染法，經螢光標定後，再以流式細胞儀分析豬霍亂沙門氏菌 (SC-B67) 感染人類巨噬細胞後細胞的死亡途徑，在感染12及14小時後，偵測有磷脂絲氨酸 (phosphatidylserine) 外露之細胞達16%及18%，相較於未經過細胞活化劑 (PMA) 活化成具吞噬能力的單核球細胞感染豬霍亂沙門氏菌SC-B67，有明顯較高比率的細胞凋亡情形。之後再以穿透式電子顯微鏡 (Transmission electron microscope)，觀察巨噬細胞吞噬豬霍亂沙門氏菌SC-B67後的細胞型態上的變化，在24小時觀察到細胞凋亡特徵，包括核濃縮 (nuclear condensation) 及細胞質空洞化 (cytoplasmic vacuolization) 現象。我們也使用生物晶片 (Oligo GEArray Human Apoptosis Microarray) 分析 SC-B67 如何啟動THP-1之凋亡基因，發現在感染後12小時，細胞凋亡基因，包括caspase-3、caspase-8、caspase-9、Bax及Bad有明顯的表現，同時也觀察到抑制細胞凋亡基因的啟動，如Bcl-2及Bcl-XL，本研究結果顯示豬霍亂沙門氏菌會誘導巨噬細胞走向凋亡，而凋亡主要是經由活化內在途徑所導致。

關鍵詞：沙門氏菌、豬霍亂沙門氏菌、巨噬細胞、流式細胞儀、穿透式電子顯微鏡、生物晶片、細胞凋亡

目錄

目錄	頁次
封面	內頁
簽名頁	授權書
iii	中文摘要
iv	英文摘要
vi	誌謝
viii	目錄
x	圖目錄
xii	表目錄
xv	第一章 緒論
1.1.1	沙門氏菌 (Salmonella) 簡介
1.1.2	豬霍亂沙門氏菌
3	1.1.3 細胞凋亡 (apoptosis)
4	1.3.1 細胞凋亡的型態學特徵
4	1.3.2 凋亡細胞的生化變化及分子機轉
5	1.3.3 細胞凋亡路徑 (apoptotic pathways)
7	1.3.4 細胞凋亡與細胞壞死 (necrosis) 的區別
9	1.3.5 凋亡細胞分析方式
9	1.4 流式細胞儀散色光譜圖簡介
10	1.5 電子顯微鏡
11	1.5.1 穿透式電子顯微鏡
12	1.6 生物晶片簡介
13	1.7 研究動機及目的
15	第二章 實驗材料與方法
16	2.1 沙門氏菌在人類巨噬細胞 (THP-1) 內存活能力之分析
16	2.1.1 菌株及培養基
16	2.1.2 細胞株及培養基
16	2.1.3 細胞的凍存、復甦
17	2.1.4 試劑
18	2.1.5 meropenem 抑菌濃度測定步驟
18	2.1.6 吞噬實驗 (phagocytosis) 步驟
19	2.2 以流式細胞儀判定細胞凋亡情形
20	2.3 穿透式電子顯微鏡實驗
21	2.4 生物晶片 (oligo GEArray) 實驗
23	第三章 結果與討論
28	3.1 meropenem 抑菌濃度測定
28	3.2 吞噬實驗
28	3.3 流式細胞儀判定細胞凋亡
30	3.4 穿透式電子顯微鏡觀察細胞型態上的變化
35	3.5 生物晶片數據分析
38	第四章 結論
42	參考文獻
75	附錄
83	圖目錄
頁次	圖一、細胞凋亡的三種路徑
44	圖二、各種不同血清型沙門氏菌感染人類巨噬細胞 (THP-1) 後，沙門氏菌在巨噬細胞內存活率分析
45	圖三、利用Annexin V-FITC/PI螢光標定後，再以流式細胞儀分析巨噬細胞未感染豬霍亂沙門氏菌 (negative control) 細胞膜上磷脂絲氨酸外露程度
46	圖四、利用Annexin V-FITC/PI螢光標定後，再以流式細胞儀分析利用camptothecin刺激單核球細胞 (positive control) 細胞膜上磷脂絲氨酸外露程度
47	圖五、利用Annexin V-FITC/PI螢光標定後，再以流式細胞儀分析人類巨噬細胞 (THP-1) 感染SC-B67後細胞膜上磷脂絲氨酸外露程度
49	圖六、利用Annexin V-FITC/PI螢光標定後，再以流式細胞儀分析單核球細胞未感染豬霍亂沙門氏菌 (negative control) 細胞膜上磷脂絲氨酸外露程度
50	圖七、利用Annexin V-FITC/PI螢光標定後，再以流式細胞儀分析單核球細胞 (THP-1) 感染SC-B67後細胞膜上磷脂絲氨酸外露程度
52	圖八、利用Annexin V-FITC/PI螢光標定後，再以流式細胞儀分析人類巨噬細胞 (THP-1) 感染SC-B67後細胞膜上磷脂絲氨酸外露程度
53	圖九、穿透式電子顯微鏡下觀察細胞型態的變化
54	圖十、巨噬細胞 (THP-1) 未感染豬霍亂沙門氏菌 (SC-B67) 在穿透式電子顯微鏡下的型態
55	圖十一、(A) 豬霍亂沙門氏菌 (SC-B67) 感染人類巨噬細胞 (THP-1)，此時間點為吞噬後，但是未加抗生素去除細胞外之細菌之前
56	圖十一、(B) 及 (C) 豬霍亂沙門氏菌 (SC-B67) 感染人類巨噬細胞 (THP-1)，此時間點為吞噬後，但是未加抗生素去除細胞外之細菌之前
57	圖十二、豬霍亂沙門氏菌 (SC-B67) 感染人類巨噬細胞 (THP-1) 4小時後在穿透式電子顯微鏡下的型態
58	圖十三、豬霍亂沙門氏菌 (SC-B67) 感染人類巨噬細胞 (THP-1) 8小時後在穿透式電子顯微鏡下的型態
59	圖十四、(A) 豬霍亂沙門氏菌 (SC-B67) 感染人類巨噬細胞 (THP-1) 24小時後在穿透式電子顯微鏡下的型態
60	圖十四、(B) 豬霍亂沙門氏菌 (SC-B67) 感染人類巨噬細胞 (THP-1) 24小時後在穿透式電子顯微鏡下的型態
61	圖十四、(C) 豬霍亂沙門氏菌

(SC-B67) 感染人類巨噬細胞 (THP-1) 24小時後在穿透式電子顯微鏡下的型態 62 圖十四、(D) 豬霍亂沙門氏菌 (SC-B67) 感染人類巨噬細胞 (THP-1) 24小時後在穿透式電子顯微鏡下的型態 63 圖十四、(E) 豬霍亂沙門氏菌 (SC-B67) 感染人類巨噬細胞 (THP-1) 24小時後在穿透式電子顯微鏡下的型態 64 圖十五、群聚分析 (cluster gram) 結果 65 圖十六、巨噬細胞感染SC-B67與未感染的巨噬細胞的基因表現相比較 (Group1比較) 66 圖十七、巨噬細胞感染SC-B67與巨噬細胞相比較 (Group1比較), 粒線體蛋白的細胞凋亡調控機制 67 圖十八、單核球細胞加comptotheicin刺激與單核球細胞相比較 (Group2比較), 單核球細胞感染SC-B67與單核球細胞相比較 (Group3比較), Caspases cascade 調控機制 68 圖十九、單核球細胞加comptotheicin刺激與單核球細胞相比較 (Group2比較), 單核球細胞感染SC-B67與單核球細胞相比較 (Group3比較), 粒線體蛋白的細胞凋亡調控機 69 表目錄 頁次 表一、本研究所使用的沙門氏菌各種血清型及對照組大腸桿菌 70 表二、meropenem抑菌濃度測定 71 表三、基因名及其功能。此群基因在細胞感染豬霍亂沙門氏菌或加入藥物 (camptotheicin) 刺激細胞, 與未感染的單核球及巨噬細胞相比較有較高的表現 72 表四、基因名及其功能。此群基因在單核球細胞及巨噬細胞或細胞感染豬霍亂沙門氏菌, 與加入藥物 (camptotheicin) 刺激的細胞相比較有較高的表現 73

參考文獻

1. Antonsson, B. and J. C. Martinou. 2000. The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell Res.* 256:50-57.
2. Arends, M. J., R. G. Morris, and A. H. Wyllie. 1990. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* 136:593-608.
3. Borner, C., R. Olivier, I. Martinou, C. Mattmann, J. Tschopp, and J. C. Martinou. 1994. Dissection of functional domains in Bcl-2 alpha by site-directed mutagenesis. *Biochem. Cell Biol.* 72:463-469.
4. Buchmeier, N. A. and F. Heffron. 1991. Inhibition of macrophage phagosome-lysosome fusion by *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 59:2232-2238.
5. Buchmeier, N. A., S. J. Libby, Y. Xu, P. C. Loewen, J. Switala, D. G. Guiney, and F. C. Fang. 1995. DNA repair is more important than catalase for *Salmonella* virulence in mice. *J. Clin. Invest* 95:1047-1053.
6. Chaubal, L. H. and P. S. Holt. 1999. Characterization of swimming motility and identification of flagellar proteins in *Salmonella pullorum* isolates. *Am. J. Vet. Res.* 60:1322-1327.
7. Chittenden, T., C. Flemington, A. B. Houghton, R. G. Ebb, G. J. Gallo, B. Elangovan, G. Chinnadurai, and R. J. Lutz. 1995. A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J.* 14:5589-5596.
8. Chiu, C. H., T. Y. Lin, and J. T. Ou. 1999. Predictors for extraintestinal infection of non-typhoidal *Salmonella* in patients without AIDS. *Int. J. Clin. Pract.* 53:161-164.
9. Chiu, C.H., T.L. Wu, L.H. Su, C. Chu, J.H. Chia, A.J. Kuo, M.S. Chien, T.Y. Lin. 2002. The emergence in Taiwan of fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis. *New Engl. J. Med.* 346: 413-9.
10. Cohen, J. I., J. A. Bartlett, and G. R. Corey. 1987. Extra-intestinal manifestations of *Salmonella* infections. *Medicine (Baltimore)* 66:349-388.
11. Ekins, S., E. Kirillov, E. A. Rakhmatulin, and T. Nikolskaya. 2005. A novel method for visualizing nuclear hormone receptor networks relevant to drug metabolism. *Drug Metab Dispos.* 33:474-481.
12. Finlay, B. B., B. Gumbiner, and S. Falkow. 1988. Penetration of *Salmonella* through a polarized Madin-Darby canine kidney epithelial cell monolayer. *J. Cell Biol.* 107:221-230.
13. Forsberg, M., R. Blomgran, M. Lerm, E. Sarndahl, S. M. Sebt, A. Hamilton, O. Stendahl, and L. Zheng. 2003. Differential effects of invasion by and phagocytosis of *Salmonella typhimurium* on apoptosis in human macrophages: potential role of Rho-GTPases and Akt. *J. Leukoc. Biol.* 74:620-629.
14. Green, D. R. and J. C. Reed. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281:1309-1312.
15. Gray, J. T., P. J. Fedorka-Cray, T. J. Stabel, and T. T. Kramer. 1996. Natural transmission of *Salmonella choleraesuis* in swine. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:141-146.
16. Gray, J. T. and P. J. Fedorka-Cray. 2001. Long-term survival and infectivity of *Salmonella choleraesuis*. *Berl Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 114:370-374.
17. Guiney, D. G. 2005. The role of host cell death in *Salmonella* infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 289:131-150.
18. Haimovich, B. and M. M. Venkatesan. 2006. *Shigella* and *Salmonella*: death as a means of survival. *Microbes. Infect.* 8:568-577.
19. Hengartner, M. O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770-776.
20. Herr, I. and K. M. Debatin. 2001. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 98:2603-2614.
21. Holden, D. W. 2002. Trafficking of the *Salmonella* vacuole in macrophages. *Traffic.* 3:161-169.
22. Kerr, J. F., A. H. Wyllie, and A. R. Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26:239-257.
23. Knodler, L. A. and B. B. Finlay. 2001. *Salmonella* and apoptosis: to live or let die? *Microbes Infect.* 3:1321-1326.
24. Larrick, J. W., D. G. Fischer, S. J. Anderson, and H. S. Koren. 1980. Characterization of a human macrophage-like cell line stimulated in vitro: a model of macrophage functions. *J. Immunol.* 125:6-12.
25. Lundberg, A. S. and R. A. Weinberg. 1999. Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur. J. Cancer* 35:1886-1894.
26. Luo, X., I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter, and X. Wang. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94:481-490.
27. Matsuda, H., F. R. Strebler, T. Kaneko, L. C. Stephens, L. L. Danhauser, G. N. Jenkins, N. Toyota, and J. M. Bull. 1996. Apoptosis and necrosis occurring during different stages of primary and metastatic tumor growth of a rat mammary adenocarcinoma. *Anticancer Res.* 16:1117-1121.
28. Mattson, M. P., Q. Guo, K. Furukawa, and W. A. Pedersen. 1998. Presenilins, the endoplasmic reticulum, and neuronal apoptosis in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 70:1-14.
29. Mead, P. S., L. Slutsker, V. Dietz, L. F. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, P. M. Griffin, and R. V. Tauxe. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5:607-625.
30. Monack, D. M., D. Hersh, N. Ghori, D. Bouley, A. Zychlinsky, and S. Falkow. 2000. *Salmonella* exploits caspase-1 to colonize Peyer's patches in a murine typhoid model. *J. Exp. Med.* 192:249-258.
31. Nakagawa, T., H. Zhu, N. Morishima, E. Li, J. Xu, B. A. Yankner, and J. Yuan. 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403:98-103.
32. Nicholson, D. W. and N. A. Thornberry. 1997. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.* 22:299-306.

33. Niedergang, F., J. C. Sirard, C. T. Blanc, and J. P. Kraehenbuhl. 2000. Entry and survival of *Salmonella typhimurium* in dendritic cells and presentation of recombinant antigens do not require macrophage-specific virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:14650-14655. 34. Popoff, M. Y., J. Bockemuhl, and L. L. Gheesling. 2003. Supplement 2001 (no. 45) to the Kauffmann-White scheme. *Res. Microbiol.* 154:173-174. 35. Reed, J. C. 1998. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17:3225-3236. 36. Ryan, K. M. and G. D. Birnie. 1996. Myc oncogenes: the enigmatic family. *Biochem. J.* 314 (Pt 3):713-721. 37. Saraste, A. and K. Pulkki. 2000. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc. Res.* 45:528-537. 38. Schwan, W. R., X. Z. Huang, L. Hu, and D. J. Kopecko. 2000. Differential bacterial survival, replication, and apoptosis-inducing ability of *Salmonella* serovars within human and murine macrophages. *Infect. Immun.* 68:1005-1013. 39. Shiratsuchi, A., S. Osada, S. Kanazawa, and Y. Nakanishi. 1998. Essential role of phosphatidylserine externalization in apoptosing cell phagocytosis by macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246:549-555. 40. Sizemore, D. R., E. A. Elsinghorst, L. C. Eck, A. A. Branstrom, D. L. Hoover, R. L. Warren, and F. A. Rubin. 1997. Interaction of *Salmonella typhi* strains with cultured human monocyte-derived macrophages. *Infect. Immun.* 65:309-312. 41. Stennicke, H. R. and G. S. Salvesen. 1998. Properties of the caspases. *Biochim. Biophys. Acta* 1387:17-31. 42. Su, L.H., C.H. Chiu, C. Chu, J.T. Ou. 2004. Antimicrobial resistance in nontyphoid *Salmonella* serotypes: a global challenge. *Clin. Infect. Dis.* 39:546-51. 43. Tauxe, R. V. 1997. Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. *Emerg. Infect. Dis.* 3:425-434. 44. Tibbetts, M. D., L. Zheng, and M. J. Lenardo. 2003. The death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis. *Nat. Immunol.* 4:404-409. 45. Tollefson, L., S. F. Altekuse, and M. E. Potter. 1997. Therapeutic antibiotics in animal feeds and antibiotic resistance. *Rev. Sci. Tech.* 16:709-715. 46. Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken, and C. Reutelingsperger. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* 184:39-51. 47. Villa, P., S. H. Kaufmann, and W. C. Earnshaw. 1997. Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem. Sci.* 22:388-393. 48. Yershov, G., V. Barsky, A. Belgovskiy, E. Kirillov, E. Kreindlin, I. Ivanov, S. Parinov, D. Guschin, A. Drobishev, S. Dubiley, and A. Mirzabekov. 1996. DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:4913-4918. 49. Yoshikawa, T. T., P. Herbert, and P. A. Oill. 1980. Salmonellosis. *West J. Med.* 133:408-417. 50. Zimmermann, K. C., C. Bonzon, and D. R. Green. 2001. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol. Ther.* 92:57-70. 51. Zou, H., Y. Li, X. Liu, and X. Wang. 1999. An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* 274:11549-11556.