

细胞培养中黑点状污染物的种类及防治方法

谭百宏¹,王艳玲¹,郑敬彤²,于军¹,刘利²,李艳超³

摘要 目的 探讨细胞培养中黑点状污染物的种类及防治措施。方法 倒置显微镜观察黑点状污染物的生长状态;革兰染色、金胺 O 染色以及电子显微镜术分析黑点状物质的形态学特征;16S rDNA 基因测序鉴定细菌种类;药敏实验筛选污染物敏感的抗生素;采用 RAW264.7 细胞培养上清液对冻存的 SH-SY5Y 细胞进行复苏。结果 倒置显微镜实时观察显示黑点状物质呈静止和运动两种生长状态;革兰染色呈阴性,金胺 O 染色呈阳性;电子显微镜负染技术揭示该污染物是一种短杆状细菌,游动期带有极性鞭毛;16S rDNA 基因测序表明该污染物是一种名为 *phenylobacterium zucineum* *HLK1* 的苯基杆菌。药敏实验筛选出头孢曲松、羧苄西林和亚胺培南等抗生素对该细菌具有抑制作用,但是细胞培养实验表明上述抗生素无法清除 SH-SY5Y 细胞内的细菌。被污染细胞不能长期冷冻保存,但是采用 RAW264.7 细胞培养上清液进行复苏可显著提高细胞的存活效率。结论 培养体系内的黑点状污染物是一种能够侵入细胞内部、生存能力极强的寡营养细菌,常规抗生素处理很难将它们从培养体系内清除。RAW264.7 细胞培养上清液可能含有某种对抗 *p. z. HLK1* 的活性物质,采用 RAW264.7 细胞培养上清进行细胞复苏可以显著提高细胞的存活效率。

关键词 SH-SY5Y 细胞;细胞培养;单核-巨噬细胞系统;细菌污染

中图分类号 R 372

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)01-0126-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.01.021

2022-09-22 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81871014)

作者单位:吉林大学白求恩医学部¹基础医学实验教学中心、²病原生物学系、³组织学与胚胎学系,长春 130021

作者简介:谭百宏,女,高级工程师,责任作者,E-mail: tanbaihong@jlu.edu.cn;

李艳超,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: liyan-chao@jlu.edu.cn

近些年国内一些实验室出现一种特殊的细胞污染形式,该污染物在倒置显微镜下呈黑点状,看似细胞碎屑,却具有一定游动能力。这些黑点状物质通常对宿主细胞没有明显影响,只有在细胞复苏、换液不及时、或传代密度过低等情况下才会迅速增多并导致细胞死亡,因而有人形象地称之为“黑胶虫”。“黑胶虫”问题并不局限于国内,国外网站内也经常看到关于它们本质和危害的讨论^[1]。上述现象已经持续多年,但是很少有人对此做深入研究^[1-2]。探讨污染物的种类和防治措施不仅耗费时间和精力,而且还常与实验初衷严重偏离。然而如果不弄清污染的原因,细胞培养将会不断重复“培养-污染-丢弃-再培养”的恶性循环,造成实验浪费的同时还会培养出超级耐药细菌。为此,笔者对该实验室中出现的黑点状污染物进行详细分析,希望能对各位同行的相关实验有所帮助或借鉴。

1 材料与方 法

1.1 实验材料与试剂 本实验使用的细胞系包括人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞系(ATCC 公司)和小鼠巨噬细胞来源的 RAW264.7 细胞系(组织与胚胎学系传代保存细胞株);DMEM 高糖培养基购自 Gibco 公司(Invitrogen, 美国); γ 射线照射胎牛血清购自 Biological Industries(以色列);青链霉素和革兰染色试剂购自北京鼎国生物技术公司;金胺 O 购自上海 Aladdin 公司;血平板和药敏片购自杭州微生物试剂公司。本实验所使用的仪器包括 37 °C 细胞培养箱(SANY, 日本)、Olympus BX51 倒置显微镜(日本)以及 JEM 1200EXII 透射电子显微镜(JEOL, 日本)。

expression level of KLF7 in esophageal cancer cells (Eca109 and EC9706) was significantly higher than that in normal esophageal epithelial cells (Het-1A, $P < 0.05$). In addition, the expression of KLF7 was higher in the cytoplasm and nucleus of Het-1A cells, while only in the nucleus of esophageal cancer cells (Eca109 and EC9706). Additionally, the overexpression of KLF7 in Eca109 cells changed the cell cycle, promoted cell proliferation and migration, and up-regulated the expression levels of CCND1 and P53 ($P < 0.05$). **Conclusion** Overexpression of KLF7 might promote the proliferation and migration of esophageal cancer cells.

Key words esophageal cancer; Kruppel-like factor 7; proliferation; migration; P53; CCND1

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养和倒置显微镜实时观察 培养细胞用含有 15% 胎牛血清和 1% 双抗(青霉素、链霉素各 100 U/ml)的 DMEM 高糖培养基在 5% CO₂ 和 37 °C 的条件下连续培养,利用 Olympus BX51 倒置显微镜每隔 24 h 观察或实时录像。

1.2.2 革兰和金胺 O 染色 收集细胞培养上清液,用接种环在防脱载玻片上涂成直径约 1 cm 的薄层。部分涂片滴加结晶紫染色 1 min,水洗后覆盖碘液 1 min,95% 乙醇脱色后用番红复染 2 min,水洗后用普通光学显微镜观察照相。部分涂片用 0.01% 金胺 O 染色液处理 10 min,0.5% 酒精脱色 1 min,再用 0.5% 高锰酸钾处理 3 min,水洗后采用 Olympus BX51 倒置显微镜进行荧光观察和照相。

1.2.3 电子显微镜观察 收集培养上清液,滴加到带有支持膜的铜网上,室温下用 2% 磷钨酸负染 2 min,蒸馏水清洗干燥后在 JEOL-JEM 1200EXII 电子显微镜下对染色标本进行观察与照相。

1.2.4 黑点状污染物的鉴定 处于游动期的黑点状污染物会脱离瓶壁进入培养上清液,宿主细胞此时尚未受到明显影响。吸取 50 μl 静止状态的培养上清液放入盛有 5 ml DMEM 的培养瓶内,在 5% CO₂ 和 37 °C 的条件下培养 24 h,按此方法多次传代,即可获得纯度较高的黑点状污染物。传代培养 3 次后,吸取 20 μl 培养上清提取细菌 DNA 作为模板,利用细菌 16S rDNA 引物 7F(5'-CAGAGTTT-GATCCTGGCT-3') 和 1540R(5'-AGGAGGTGATC-CAGCCGCA-3') 序列对分离样品进行 PCR 扩增,94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 20 s,56 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 25 s,共 35 个循环。在 1% 琼脂糖凝胶上采用 UNIQ-10 DNA 检索试剂盒分离 PCR 产物,利用 ABI 3730 DNA 分析仪进行测序。

1.2.5 平板药敏和连续细胞培养实验 在无菌条件下将含有黑点状物质的培养上清液均匀涂在血平板上,0.5 h 后用镊子把准备好的药敏片贴于血平板上,记录药敏片名称(表 1)与放置顺序,置于 37 °C 恒温箱中培养 24 h 后,观察和记录抑菌环大小。将被黑点状物质污染的 SH-SY5Y 细胞接种于 24 孔板内(1.0 × 10⁶/孔),分别添加不同浓度的敏感抗生素连续培养 4 周。

1.2.6 细胞冻存复苏实验 生长状态良好的 SH-SY5Y 细胞按照常规方法(90% 胎牛血清 + 10% 二甲基亚砷)冷冻存放于 -80 °C。收集生长状态良好的 RAW264.7 细胞培养上清液,2 500 r/min 离心

表 1 药敏实验中所用到的抗生素和剂量

抗生素名称	含量 (μg/片)	抗生素名称	含量 (μg/片)
青霉素 G	10U	先锋哌酮/舒巴坦	75/75
苯唑西林	1	头孢克肟	5
氨苄西林	10	卡那霉素	30
羧苄西林	100	链霉素	10
阿洛西林	75	妥布霉素	10
美洛西林	75	新霉素	30
红霉素	15	氯霉素	30
哌拉西林	100	奈替米星	30
氨苄西林/舒巴坦	10/10	四环素	30
替卡西林/克拉维酸	75/10	克拉霉素	15
头孢氨苄	30	阿奇霉素	15
头孢唑林	30	阿米卡星	30
头孢拉定	30	庆大霉素	10
头孢呋辛	30	麦迪霉素	30
头孢克洛	30	吡哌酸	30
头孢他啶	30	诺氟沙星	10
头孢曲松	30	依诺沙星	10
头孢哌酮	75	氧氟沙星	5
头孢噻肟	30	环丙沙星	5
头孢唑肟	30	洛美沙星	10
拉氧头孢	30	亚胺培南	10

5 min 除去细胞碎屑放于 4 °C 冰箱内备用。30 d 后,分别采用 RAW264.7 细胞培养上清液(实验组, n = 6)和常规复苏培养基(对照组, n = 6;含 15% 灭活胎牛血清和 1% 双抗的高糖 DMEM)对冻存细胞进行复苏。

1.3 统计学处理 细胞复苏次日换液前后分别放于 Olympus BX51 倒置显微镜下观察拍照。使用 Image J 软件(NIH, 美国)对贴壁细胞进行计数,各组单位面积内细胞数采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 18.0(Chicago, IL, USA)软件进行数据分析,用 Graphpad prism 8 软件作图。组间差异利用 Student *t* 检验进行比较, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黑点状污染物的形态学观察 为防止人为污染,本实验所用试剂均经严格消毒或无菌处理,所用血清均经 γ 射线照射,所涉及的无菌操作均由具有多年经验的人员完成。尽管如此,实验室保存的所有细胞在培养过程中均出现黑点状污染物。此外,从某公司新购入的细胞内也发现类似的黑点状物质。

图 1A 显示的是一瓶刚从某公司购买的 SH-SY5Y 细胞株,细胞生长状态良好,但是细胞内部以及培养瓶壁上均可看到一些黑点状结构(箭头,图

1A)。如果细胞生长状态变差或换液不及时,这些黑点状物质就会迅速增多(图1B~C),它们经常会形成串珠样结构悬挂在相邻细胞之间(如图1B箭头所示)。实时录像显示部分黑点在原位做不规则振动或者仅游动很短的距离,还有一些黑点能够在培养基中远距离游走(如图1E~F中箭头所示)。革兰染色结果显示这些游动的“黑点”是一种革兰阴性细菌(图1D)。

通常情况下,黑点状物质的增多与细胞崩解同时发生(图1C和1J),随着培养体系内营养耗竭,大部分黑点状物质变为静止状态。如果将这样的培养瓶密封起来放置在室温环境或培养箱内,黑点的增

殖速度会逐渐减缓,它们之间有时会出现一种细针状或同心圆状的规律性结构(图1K~M)。

2.2 金胺O染色 游动状态的“黑点”呈金胺O阳性染色(图2A、B),静止期“黑点”的金胺O染色变弱,但是“黑点”间同心圆结构的染色却明显增强(图2C、D)。

2.3 电子显微镜观察 电子显微镜观察显示游动状态的“黑点”是一种短杆状细菌,长轴为 $(1.5 \pm 0.6) \mu\text{m}$ ($n = 100$),短轴为 $(0.6 \pm 0.1) \mu\text{m}$ ($n = 100$),细菌的一侧经常可以看到极性鞭毛(图3A~C)。静止期的“黑点”通常没有鞭毛(图3D~I),部分细菌外周出现较厚的包膜状结构(图3F)。这些

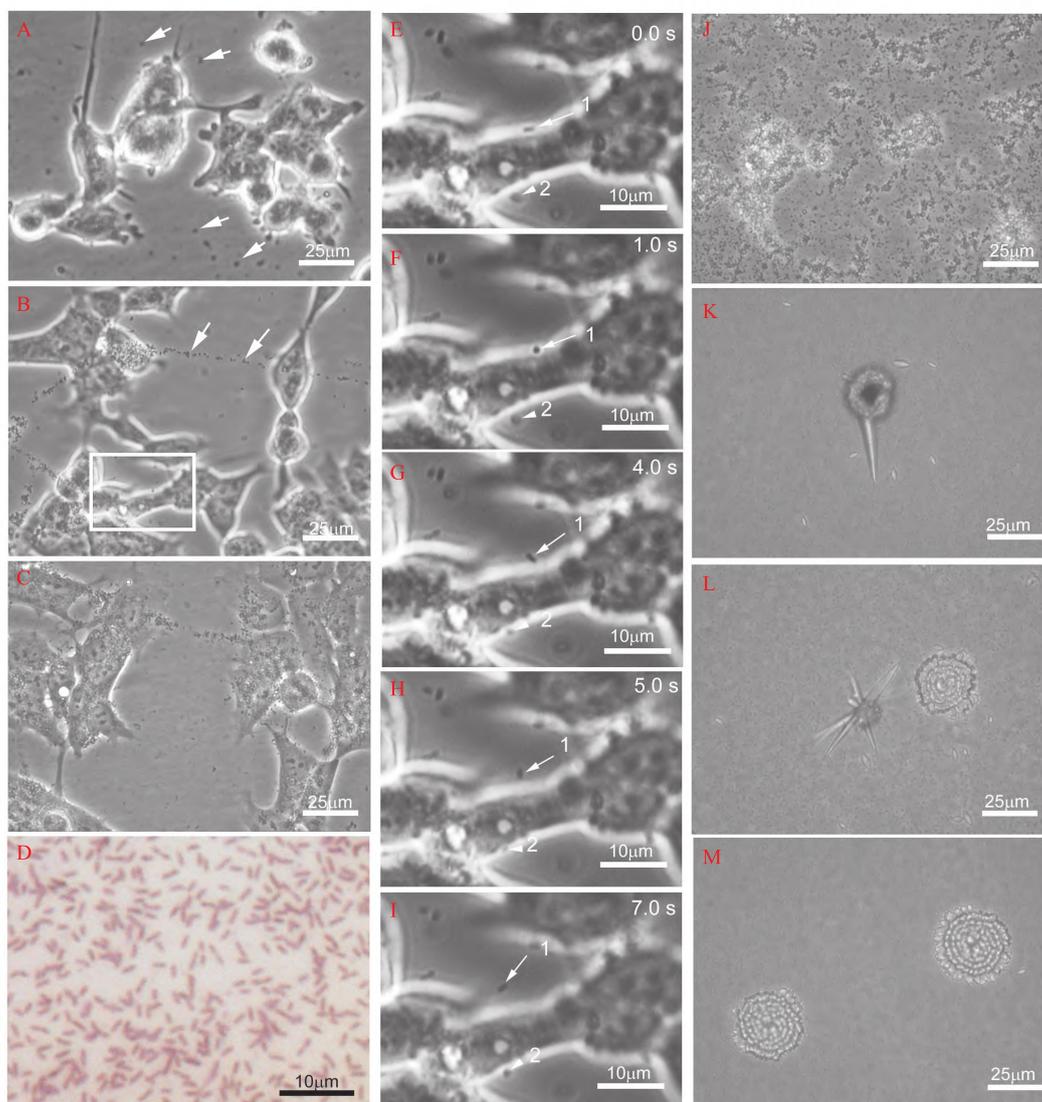


图1 培养体系内黑点状污染物的不同生长状态

A~C:培养细胞不同生长状态下黑点状物质的形态 $\times 420$;D:黑点状物质呈革兰阴性染色 $\times 1400$;E~I:图B中方框部分在不同时间的变化,数字1和2标记出两个游动的黑点状结构 $\times 1270$;J:细胞死亡后培养瓶内充满黑点状物质 $\times 1270$;K~M:在缺氧和营养匮乏的情况下黑点状结构之间出现细针状或同心圆状结构 $\times 420$

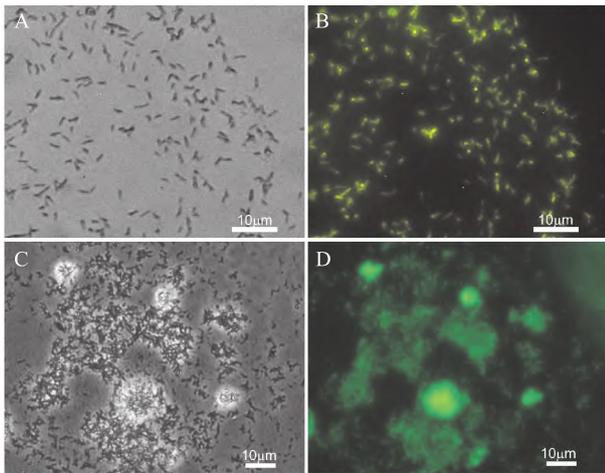


图2 黑点状污染物金胺O染色结果

A: 游动期黑点状物质的光镜照片 ×1 600; B: 图A内细菌的金胺O染色结果 ×1 600; C: 静止期黑点状物质的光镜照片 ×1 070; D: 图C内细菌的金胺O染色结果 ×1 070

细菌经常会首尾相连形成长短不等的串珠状结构(图3B、D、E、I)。

2.4 细菌种属鉴定 以游动状态黑点状物质的基因组为模板,利用细菌16S rDNA常规引物对分离其进行PCR扩增,在琼脂糖凝胶电泳显示出清晰的单一条带(图4A)。该片段长度为800 bp(图4B),GenBank/EMBL/DBJ数据库比对显示这些黑点状物质属于一种名为 *phenylobacterium zucineum* *HLK1*(*p. z. HLK1*, CP000747)的苯基杆菌。

2.5 敏感抗生素除菌实验 平板药敏实验从42种抗生素中筛选出头孢曲松、羧苄西林和亚胺培南三种抗生素可能对黑点状细菌有抑制作用,但是连续细胞培养实验表明上述抗生素均无法将细菌从培养

体系内清除。一旦停药,培养基内的黑点就会迅速增多,致使培养细胞短期内大量死亡。

2.6 SH-SY5Y细胞冻存复苏实验 被黑点状细菌污染的细胞无法长期冷冻保存,即使它们冻存前状态良好,复苏后仍会出现大量细胞死亡。如图5所示,冻存30 d的SH-SY5Y细胞复苏1 d后出现严重破损,细胞之间可见大量黑点状物质(图5A);换液后破碎细胞和黑点状物质大部分消失,但是瓶壁上依然可以看到少量残存的细胞和黑点状物质(图5B)。与SH-SY5Y细胞相比,具有吞噬能力的

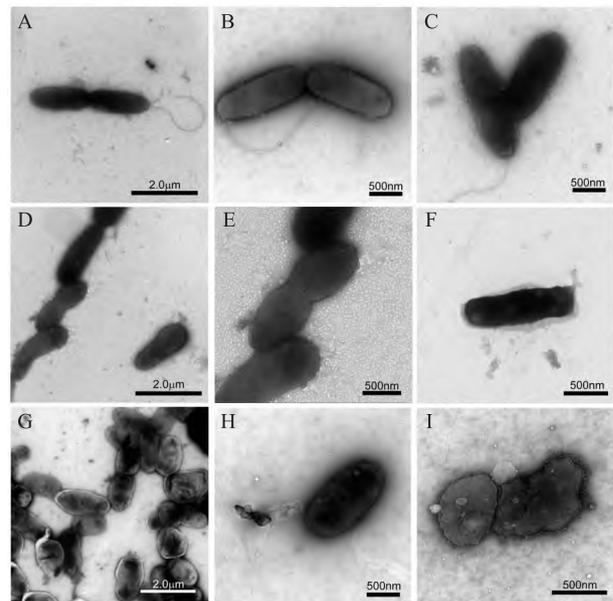


图3 黑点状污染物的电镜照片

A~C: 游动期的黑点状结构; D~I: 静止期的黑点状结构(其中E为图D的局部放大); A、D: ×10 900; B、C、E、H: ×22 000; F: ×29 500; G: ×9 000; I: ×36 400

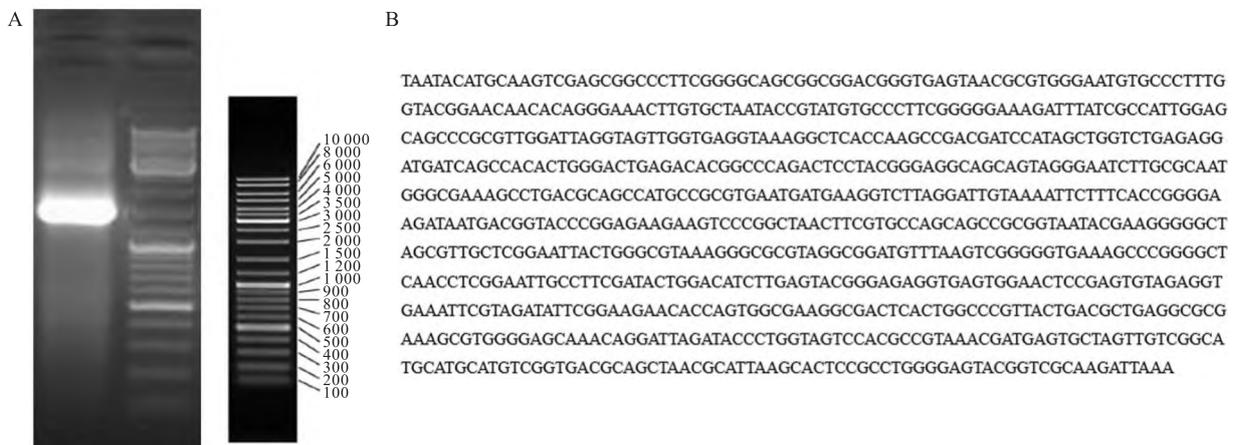


图4 16S rDNA 基因鉴定结果

A: PCR 结果; B: 16S rDNA 测序结果

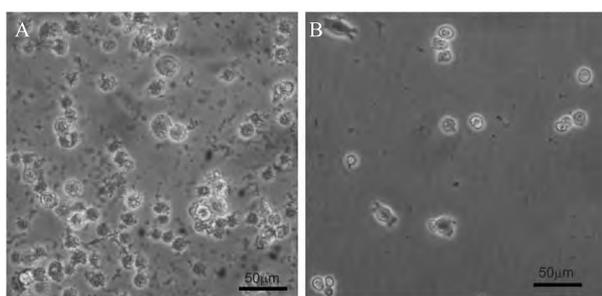


图5 常规方法复苏被污染细胞换液前(A)后(B)的对比 ×590

RAW264.7 细胞系似乎具有某种自清洁能力(图6A、B),用这些细胞的培养上清液复苏 SH-SY5Y 细胞可以显著提高复苏细胞的存活效率($P < 0.001$),同时细胞之间黑点状物质也明显减少(图6C~G)。

3 讨论

根据网上论坛和少数已经发表的学术论文^[1-2],笔者归纳出“黑胶虫”具有两个公认的特征:①在形态上呈黑点或短杆状,具有静止和运动两种生存状态,这可能是“黑胶虫”名称的由来;②“黑胶虫”能与宿主细胞在相当长一段时间内“和睦”相处,并不影响细胞的增殖和生长状态,这一特征明显不同于其他大多数细菌污染。2010年美国密歇根州立大学 Gray et al^[1]对该校某实验室内出现的黑

点状污染物进行分析,发现它们可能属于一种无色杆菌(*Achromobacter*)。2020年中国广东省某重点实验室周怡婷等^[2]对该实验室内出现的一种类似“黑胶虫”的污染物进行分析,将其鉴定为一种缺陷短波单胞菌(*Brevundimonas*)。这两篇论文声称敏感抗生素可以有效地清除^[1]或抑制^[2]细胞污染,但是对污染物的形态、生长方式、及其与培养细胞的关系缺乏详尽描述。

类似“黑胶虫”的不明微生物同样也出现在笔者所在的实验室内,它们在倒置显微镜下呈黑点状,革兰染色呈阴性,金胺O染色呈阳性。在电子显微镜下,这些细菌的大小仅为 $0.9 \sim 2.1 \times 0.5 \sim 0.7 \mu\text{m}$,游动期带有运动鞭毛,当培养体系中营养缺乏时几乎所有细菌都失去鞭毛而以非运动形式存在。上述实验结果非常符合“黑胶虫”的第一个特征。基因测序结果表明这些黑点状微生物是一种名为 *p. z. HLK1* 的苯基杆菌(*Phenylobacterium*)。在系统发育学上,*Phenylobacterium* 与 *Caulobacter crescentus* 最为接近,它们在营养充足时产生极性鞭毛能够游动,营养匮乏时则失去鞭毛,并形成较厚的菌膜进入静止状态^[3-5]。*Phenylobacterium* 菌属目前只有五个成员,无一例外都是寡营养细菌,能够在各种营养匮乏的环境中生存^[3,6-7],*p. z. HLK1* 则是该菌属中唯一具有真核细胞侵染能力的成员^[8]。浙江大学医

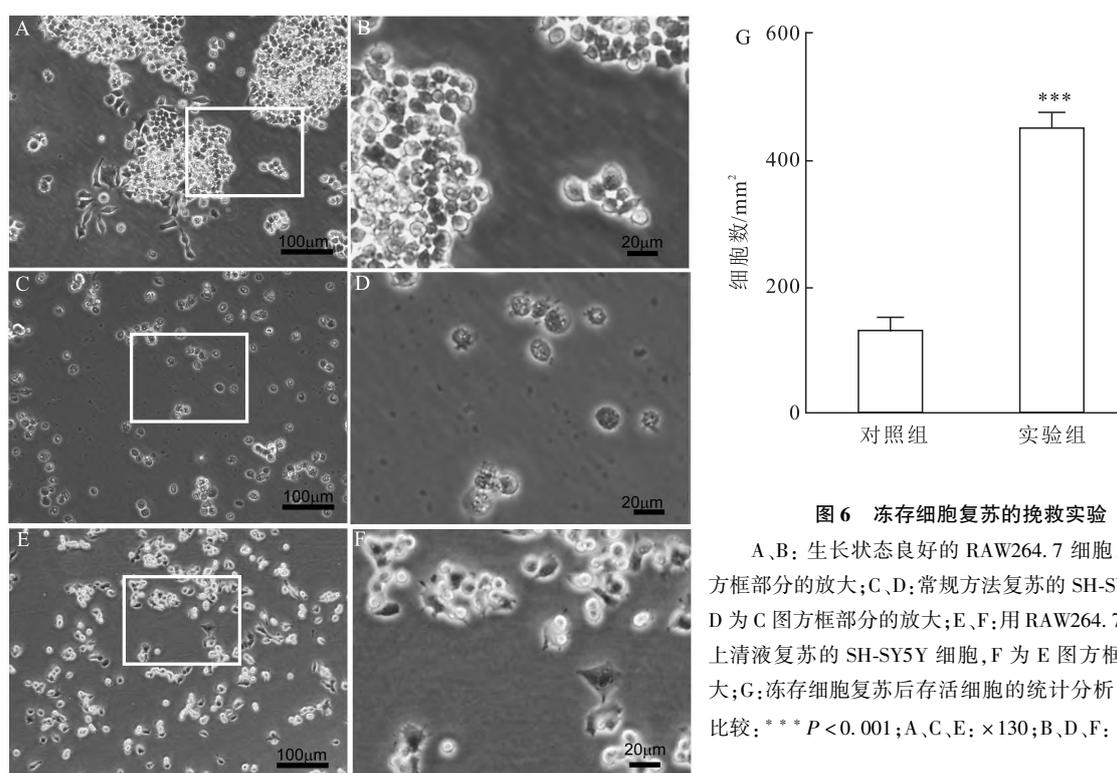


图6 冻存细胞复苏的挽救实验

A、B: 生长状态良好的 RAW264.7 细胞,B 为 A 图方框部分的放大;C、D: 常规方法复苏的 SH-SY5Y 细胞,D 为 C 图方框部分的放大;E、F: 用 RAW264.7 细胞培养上清液复苏的 SH-SY5Y 细胞,F 为 E 图方框部分的放大;G: 冻存细胞复苏后存活细胞的统计分析;与对照组比较:*** $P < 0.001$;A、C、E: $\times 130$;B、D、F: $\times 400$

学院 Zhang et al^[9] 报道该校某研究所培养的 K562 肿瘤细胞系出现 *p. z. HLK1* 胞内感染, 但是受污染的细胞虽已传代多年却一直没有发生明显的形态学或生理学改变。这一发现表明 *p. z. HLK1* 在宿主细胞内具有长期稳定生长的能力, 因此非常符合“黑胶虫”的第二个特征。

本实验测试了 40 余种抗生素对黑点状污染物的防治效果, 结果显示常规抗生素处理无法将细菌从培养体系内清除。电子显微镜观察显示 *p. z. HLK1* 不仅能够形成很厚的包膜, 而且还能躲到宿主细胞内部^[9], 这可能是抗生素无法清除此类细菌的主要原因之一。

细胞冷冻复苏后生命力非常脆弱, *p. z. HLK1* 经常会利用这个机会在培养体系内迅速增殖, 这可能是导致细胞复苏失败的一个容易被忽略的因素。笔者尝试用 RAW264.7 细胞培养上清液对被污染的 SH-SY5Y 细胞进行复苏, 发现这种方法虽然无法清除“黑胶虫”, 但是却能显著地提高复苏细胞的存活效率。事实上, 培养状态良好的 SH-SY5Y 细胞的培养上清液对同种细胞复苏的效果也要优于常规复苏方法。这种方法很像原代神经元培养时的“半量换液法”^[10-11]。生长状态良好的细胞可以比作“年轻”的人或动物, 研究^[12]发现老年小鼠来源的骨髓间充质干细胞的更新和分化能力存在缺陷, 但是如果把它们接种在来自年轻小鼠的细胞外基质上, 这些衰老的细胞就可以“返老还童”, 重新获得类似年轻小鼠的活力。

宿主细胞与 *p. z. HLK1* “共生”现象表明宿主细胞本身可能具有一定抵抗“黑胶虫”的能力^[9-10]。RAW264.7 细胞来源于单核-吞噬细胞系统, 不仅具有一定吞噬功能, 而且还能分泌多种细胞因子。郝宏兴等^[13]发现巨噬细胞培养上清液对处于红外期的约氏疟原虫具有明显的抑制或杀灭作用。本研究显示 RAW264.7 细胞培养上清液可能含有某种对抗 *p. z. HLK1* 的活性物质, 进一步探讨宿主细胞对抗 *p. z. HLK1* 的机制可能为防治黑点状污染物提供新的线索。

参考文献

- [1] Gray J S, Birmingham J M, Fenton J I. Got black swimming dots in your cell culture? Identification of *Achromobacter* as a novel cell culture contaminant[J]. *Biologicals*, 2010, 38(2): 273-7.
- [2] 周怡婷, 高增鸿, 杨嘉文, 等. 细胞培养中“黑胶虫”污染的检测及防治[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2020, 47(1): 61-70.
- [3] Hirsch P. Microbial life at extremely low nutrient levels[J]. *Adv Space Res*, 1986, 6(12): 287-98.
- [4] Brun Y V, Marczynski G, Shapiro L. The expression of asymmetry during *Caulobacter* cell differentiation[J]. *Annu Rev Biochem*, 1994, 63: 419-50.
- [5] Bodenmiller D, Toh E, Brun Y V. Development of surface adhesion in *Caulobacter crescentus*[J]. *J Bacteriol*, 2004, 186(5): 1438-47.
- [6] Aslam Z, Im W T, Ten L N, et al. *Phenylobacterium koreense* sp. nov., isolated from South Korea[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, 55(Pt 5): 2001-5.
- [7] Tiago I, Mendes V, Pires C, et al. *Phenylobacterium falsum* sp. Nov., an Alphaproteobacterium isolated from a nonsaline alkaline groundwater, and emended description of the genus *Phenylobacterium*[J]. *Syst Appl Microbiol*, 2005, 28(4): 295-302.
- [8] Luo Y, Xu X, Ding Z, et al. Complete genome of *Phenylobacterium zucineum*-a novel facultative intracellular bacterium isolated from human erythroleukemia cell line K562[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 386.
- [9] Zhang K, Han W, Zhang R, et al. *Phenylobacterium zucineum* sp. nov., a facultative intracellular bacterium isolated from a human erythroleukemia cell line K562[J]. *Syst Appl Microbiol*, 2007, 30(3): 207-12.
- [10] 熊天庆, 王登莉, 谭百宏, 等. 人类及小鼠某些细胞系培养中苯基杆菌的污染(英文)[J]. *微生物学报*, 2015, 55(2): 176-86.
- [11] 强婷婷, 张丽, 胡宪文. MPTP 在七氟烷诱导大鼠海马神经元损伤中的作用及其机制[J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(6): 932-8.
- [12] Sun Y, Li W, Lu Z, et al. Rescuing replication and osteogenesis of aged mesenchymal stem cells by exposure to a young extracellular matrix[J]. *FASEB J*, 2011, 25(5): 1474-85.
- [13] 郝宏兴, 黄复生, 况明书, 等. IL-1、IL-6 和活化枯否细胞培养上清液对约氏疟原虫红外期发育的影响[J]. *第三军医大学学报*, 1999(2): 33-5.

Types and control methods of black dot-like contaminants in cell cultures

Tan Baihong¹, Wang Yanling¹, Zheng Jingtong², Yu Jun¹, Liu Li², Li Yanchao³

(¹Laboratory Teaching Center of Basic Medicine, ²Dept of Pathogenic Biology,

³Dept of Histology and Embryology, Norman Bethune Health Science Center of Jilin University, Changchun 130021)

Abstract Objective To explore the type and control measure of black dot-like contaminants in cell cultures.

NLRP3 炎症小体介导的巨噬细胞极化在 ITP 中的作用

宋传龙, 海力其古丽·努日丁, 焦红杰, 王学梅, 严 媚

摘要 目的 探讨在免疫性血小板减少症(ITP)中 NLRP3 炎症小体的活化水平及抑制 NLRP3 介导的炎症小体活化对 M1 型巨噬细胞极化与免疫功能的影响。方法 RT-qPCR 法检测 ITP 患者(ITP 组)和健康对照组(Control 组)外周血单个核细胞(PBMC)与 CD14⁺ 单核细胞中 NLRP3 mRNA 的表达;ELISA 法检测两组血清中 IL-1 β 与 IL-18 的含量;Pearson 相关系数分析 NLRP3、IL-1 β 与 IL-18 表达水平与血小板计数的相关性;将 ITP 患者来源的 M0 型巨噬细胞(MDMs)分为 4 组:IgG 对照组(IgG 组),MCC950 处理组(MCC950 组),LPS、IFN- γ 与 IgG 处理组(LPS + IFN- γ + IgG 组)和 LPS、IFN- γ 与 MCC950 处理组(LPS + IFN- γ + MCC950 组);RT-qPCR 与 Western blot 检测 4 组 MDMs 中 M1 型巨噬细胞标志物 CD86、iNOS、MCP-1 mRNA 与蛋白水平;Western blot 检测各组 MDMs 中 NLRP3 炎症小体相关蛋白 NLRP3、ASC、cleaved caspase-1 与 IL- β 的表达;流式细胞术检测各组 MDMs 对血小板的吞噬能力,CFSE 法检测各组 MDMs 对 CD4⁺T 与 CD8⁺T 的增殖影响。结果 与 Control 组相比,

ITP 组 NLRP3 mRNA 水平和 IL-1 β 与 IL-18 含量均升高($P < 0.05$);ITP 患者中血小板计数与 NLRP3、IL-1 β 和 IL-18 呈负相关关系($P < 0.05$)。与 IgG 组相比,LPS + IFN- γ + IgG 组与 LPS + IFN- γ + MCC950 组细胞中 CD86、iNOS、MCP-1 的 mRNA 与蛋白表达水平增加($P < 0.05$),NLRP3、ASC、cleaved caspase-1、IL- β 蛋白表达与血小板吞噬能力和对 CD4⁺T 与 CD8⁺T 细胞的增殖促进能力升高($P < 0.05$),而与 LPS + IFN- γ + IgG 组相比,LPS + IFN- γ + MCC950 组细胞中上述检测指标均降低($P < 0.05$)。结论 在 ITP 中 NLRP3 炎症小体活化水平升高,且与 MDMs 的过度 M1 型极化相关,而抑制 NLRP3 介导的炎症小体活化可改善巨噬细胞的 M1 型极化与免疫功能。

关键词 免疫性血小板减少症;NLRP3 炎症小体;M1 型巨噬细胞

中图分类号 R 725.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)01-0132-08
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.01.022

2022-09-10 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82160031)

作者单位:新疆医科大学第一附属医院儿内一科,乌鲁木齐 830054

作者简介:宋传龙,男,住院医师,博士研究生;

严 媚,女,主任医师,教授,博士,责任作者,E-mail:
yan10mei25@163.com

免疫性血小板减少症(imune thrombocytopenia, ITP)是一种儿童常见的自身免疫性疾病^[1]。巨噬细胞既是效应细胞,吞噬血小板,又是抗原递呈细胞,可刺激 B 细胞产生针对血小板的自身抗体^[2]。而在 ITP 中,研究^[3]证实,巨噬细胞具有向促

Methods The growth state of bacteria was investigated under an inverted microscope; Their morphological characteristics were analyzed by Gram and auramine O staining as well as electron microscopy; 16S rDNA gene sequencing was used to analyze bacterial species; Drug sensitivity test was used to screen antibiotics against the bacteria; Cryopreserved SH-SY5Y cells were resuscitated by cell culture supernatant of RAW264 cells. **Results** Inverted microscopic real-time observations showed that black dot-like substances had two growth states: static and moving. They were negative for Gram staining while positive for auramine O staining. Electron microscopy revealed that they were short rod-shaped bacteria with a polar flagellum during moving phase. 16S rDNA gene sequencing showed that these bacteria were *phenylobacterium zucineum HLK1*. Ceftriaxone, carboxycillin and imipenem were screened by drug sensitivity test to have inhibitory effects on the bacteria, but cell culture experiments showed that they could not remove the bacteria from SH-SY5Y cells. Contaminated cells could not be cryopreserved for a long time, but resuscitation with RAW264.7 cell culture supernatant significantly improved the survival rate of cells. **Conclusion** The black dot-like contaminants in cell cultures are a special type of oligotrophic bacterium with strong viability that can invade the cells and cannot be cleared with antibiotic treatment. RAW264.7 cell culture supernatant seems contain some substances against bacteria, and resuscitating frozen cells with RAW264.7 cell culture supernatant may significantly improve the survival rate of cells.

Key words SH-SY5Y cells; cell culture; monocyte-macrophage system; bacterial contamination