

支原体巨噬细胞活化脂肽-2 经 PI3K/Nrf2 诱导单核细胞表达 HO-1 和 NQO1

游晓星,马小华,刘良专,曾焱华,朱翠明,何军,蒋传好,余敏君,吴移谋

(南华大学病原生物学研究所,湖南 衡阳 421001)

摘要: **目的** 观察支原体巨噬细胞活化脂肽-2(MALP-2)对 THP-1 单核细胞血红素氧合酶-1(HO-1)和 NAD(P)H:醌氧化还原酶-1(NQO1)表达的影响,以明确机体抵抗支原体感染所致炎性损伤的自我防御机制。**方法** 体外培养 THP-1 细胞并分为对照组和实验组。其中对照组加入等体积培养基,实验组根据不同的实验目的加入不同浓度的 MALP-2 作用 5~120 min 或 12 h,Western blot 检测 HO-1 和 NQO1 表达以及 Akt 磷酸化水平。同时,采用 PI3K 抑制剂 LY294002 处理细胞,以证实 PI3K 参与 HO-1 表达。提取细胞核蛋白,凝胶迁移率实验和免疫荧光观察 NF-E2 相关因子 2(Nrf2)的 DNA 结合活性和核转位情况,并采用特异性 siRNA 沉默 Nrf2 后,Western blot 观察其对 HO-1 和 NQO1 表达的影响。**结果** Western blot 结果显示,MALP-2 能诱导 THP-1 细胞表达 HO-1 和 NQO1 蛋白,且呈一定的剂量依赖性。此外,MALP-2 能激活 PI3K,且 PI3K 抑制剂能抑制 HO-1 和 NQO1 的表达;凝胶迁移率实验和激光共聚焦结果显示,MALP-2 能增强 Nrf2 的 DNA 结合活性及核转位,而 PI3K 抑制剂处理后,Nrf2 的 DNA 结合活性以及核转位水平进一步降低。RNA 干扰 Nrf2 后,HO-1 和 NQO1 表达显著降低。**结论** MALP-2 能诱导 THP-1 细胞表达 HO-1 和 NQO1,其机制可能受 PI3K/Nrf2 调控。

关键词: 支原体巨噬细胞活化脂肽-2; 血红素氧合酶-1; NAD(P)H:醌氧化还原酶-1; NF-E2 相关因子 2
中图分类号:R392.9 **文献标识码:**A

Macrophage-activating Lipopeptide-2 Induces the Expression of HO-1 and NQO1 via PI3K/Nrf2 Pathways in Monocytes

YOU Xiaoxing, MA Xiaohua, LIU liangzhuan, et al

(Institution of Pathogenic Biology, Medical College, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** This study aimed to determine the role of macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) on the expression of hemoxygenase-1 (HO-1) and NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1), and then investigate its regulatory mechanism to better understand the self-protecting mechanism upon mycoplasma infection. **Methods** THP-1 cells were cultured in vitro and divided into control group and experimental group. In the control group, equal volume of culture medium was added. For the experimental group, different concentrations of MALP-2 were added for 5~120 min or 12 h, and the expression of HO-1 and NQO1, phosphorylation of Akt were detected by Western blot. Also, PI3K inhibitor LY294002 was used to investigate the role of PI3K in HO-1 expression. Immunofluorescence and electrophoretic mobility shift assay were applied to examine the nuclear translocation and DNA-binding activity of NF-E2-related factor 2 (Nrf2). Silencing of Nrf2 was achieved by RNA interference and expression of HO-1 and NQO1 were detected by Western blot.

Results MALP-2 induced THP-1 cells production of HO-1 and NQO1 in a dose-dependent manner, as demonstrated by Western blot. In addition, MALP-2 could also activate PI3K, and LY294002 inhibited HO-1 and NQO1 expression. MALP-2

收稿日期:2013-11-06

基金项目:国家自然科学基金(31000091,81072418),湖南省科研条件创新专项(2013TT2013)。

作者简介:游晓星,博士生,实验师,研究方向:支原体致病机制与防治, E-mail:youxiaoxing2013@gmail.com. 通讯作者吴移谋,硕士,教授,博士生导师,研究方向:病原体致病机制与防治, E-mail:yimouwu@sina.com.

could also induce the translocation of Nrf2 to the nucleus, and increase its DNA-binding activity; but this activity could be inhibited by PI3K inhibitor. Silencing of Nrf2 expression significantly inhibited HO-1 and NQO1 expression. **Conclusion** MALP-2 can induce THP-1 cells expression of HO-1 and NQO1 through PI3K/Nrf2 pathways.

Key words: macrophage-activating lipopeptide-2; hemoxygenase-1; NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1; NF-E2-related factor 2

支原体是一类能引起人类呼吸道和泌尿生殖道感染的病原体^[1]。目前其致病机制尚未完全明了,但其诱导的异常免疫反应是导致机体免疫损伤的重要因素^[2]。由于支原体缺乏细胞壁,其细胞膜是支原体与宿主细胞相互作用的唯一结构,其膜脂蛋白是引起炎症反应的主要物质。支原体脂蛋白和其他细菌脂蛋白结构类似,由 N 端的二酰半胱氨酸以及 C 端的多肽组成,其中 N 端的二酰半胱氨酸结构是其免疫活性的基础^[2]。由于支原体脂蛋白在提取过程中易被内毒素污染,因此在研究其功能时,通常采用与脂蛋白结构相同的人工合成的巨噬细胞活性脂肽-2 (macrophage-activating lipopeptide-2, MALP-2) 作为替代物质^[3]。研究显示, MALP-2 通过与细胞表面的 TLR 结合后,能激活 MAPKs 以及核转录因子 NF- κ B 和 AP-1,从而诱导多种前炎症细胞因子和介质的表达^[4]。既然支原体感染所诱发的炎症反应是其主要的致病因素,对机体而言,必然存在某种负调控机制使炎症反应趋向于稳态,从而避免组织损伤。研究发现,在感染状态下,机体可合成多种保护性蛋白,包括谷氨酰半胱氨酸连接酶催化亚基, NAD(P)H: 醌氧化还原酶 1 (NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1, NQO1) 以及血红素氧合酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 等。但 MALP-2 是否也能诱导这些抗氧化相关蛋白的表达,目前仍不清楚。本研究旨在观察 MALP-2 对 HO-1 和 NQO1 表达的影响并探讨其调控机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人单核细胞系 THP-1 细胞购自 ATCC, MALP-2 购自 Alexis Biochemicals (ALX-162-027-C050)。鼠抗人 HO-1、NQO1、p-Akt 及 total Akt 抗体购自 Cell Signaling。LY294002 购自 Sigma-Adrich。鼠抗人 Nrf2 抗体购自 Santa Cruz。Nrf2 siRNA 序列由 Ribobio 公司合成。凝胶迁移率分析试剂盒购自 Viagene。蛋白酶、磷酸酶抑制剂 Cocktail 购自 Roche, 细胞蛋白提取试剂盒、蛋白浓度测定试剂盒购自

Thermo, FuGENE6 转染试剂购自 Roche。

1.2 细胞培养与处理

THP-1 细胞用含 10% FBS、2 mmol/L 谷氨酰氨、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养基中,于 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 的恒温细胞培养箱中培养。MALP-2 刺激前, THP-1 细胞于 1 000 rpm 离心 5 min, 无菌 PBS 洗涤后, 用含 1% FBS 的 RPMI-1640 培养液于 6 孔板中调整其密度为 5×10^5 /mL, 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 继续培养 24 h。根据不同的实验目的分为阴性对照组和实验组。其中对照组仅加入等体积培养基, 而实验组根据不同的研究目的加入不同浓度 MALP-2 刺激 5 ~ 120 min 或 12 h。

1.3 Western blot 检测 HO-1、NQO1 表达及 Akt 磷酸化

细胞刺激结束后, 用预冷的无菌 PBS 洗涤, 迅速置于冰上, 按照胞浆/胞核蛋白提取试剂盒提供的步骤获取胞浆蛋白或总蛋白, BCA 法测定其浓度。取 80 μ g 蛋白加入等体积的 2 $\times$ SDS 上样缓冲液煮沸 5 min 后用于 SDS-PAGE。随后转印至 PVDF 膜上。并利用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 封闭 1 h, 随后加入一抗抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。多次洗涤后, 加入 HRP 标记的二抗孵育膜 1 h。ECL 法发光、显影。

1.4 凝胶迁移率实验检测 Nrf2 DNA 结合活性

THP-1 细胞处理结束后, 按照试剂盒提供的方法获取核蛋白。根据 Viagene 公司提供的非放射性 EMSA 试剂盒的操作步骤建立结合反应体系和竞争反应体, 随后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。电转移后, 交联固定 DNA, 化学发光显影。

1.5 免疫荧光观察 Nrf2 核转位

用 PBS 洗涤细胞并重悬, 加入 0.1 ~ 0.5 mL 细胞悬液至载玻片上, 用甩片机在 1 200 rpm 下离心 10 min, 室温干燥 15 ~ 20 min。随后用 3.5% 多聚甲醛室温固定 15 min, 随后用 100% 甲醇通透 10 min。PBS 洗涤后, 1% 山羊血清 37 $^{\circ}$ C 封闭 30 min。加入 Nrf2 抗体 (1:100) 孵育 2 h。用 PBS 充分洗涤后, 加入羊抗鼠二抗 (1:1 000) 室温孵育 1 h。细胞核采用 1 μ g/mL DAPI 染色。随后采用共聚焦显微镜拍照 (Zeiss LSM710)。

1.6 瞬时转染 siRNA

约 5×10^4 细胞接种于 24 孔板中培养过夜。随后

按照 FuGENE6 提供的操作步骤,将 100 nmol/L Nrf2 siRNA(正义链 5'-UCC CGU UUG UAG AUG ACA A-3';反义链 5'-UUG UCA UCU ACA AAC GGG A-3')混合物孵育细胞。转染 24 h 后,用 PBS 漂洗细胞,并用 1% FBS 维持 24 h 后再用 MALP-2 刺激 12 h。

1.7 统计学分析

应用 GraphPad Prizm 软件进行统计学分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,并采用单因素方差分析数据, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

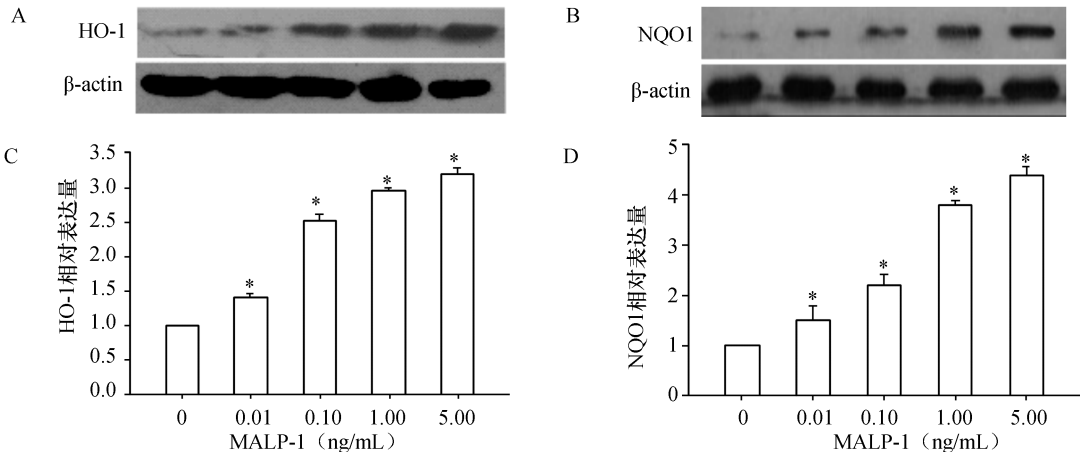


图1 MALP-2 诱导 THP-1 细胞表达 HO-1 和 NQO1 蛋白 A、B: Western blot; C、D: 灰度扫描(相对值). 与对照组(0 ng/mL)比较, *: $P < 0.05$

2.2 MALP-2 激活 PI3K 诱导 HO-1 和 NQO1 表达

5 ng/mL MALP-2 作用 THP-1 细胞 5 min 即可诱导 PI3K 下游产物 Akt 磷酸化(图 2)。而 THP-1 预先经不同浓度 PI3K 特异性抑制剂 LY294002 处理后,再用 MALP-2 刺激 12 h, HO-1 和 NQO1 表达随之降低(图 2)。

2.3 MALP-2 诱导 Nrf2 核转位

5 ng/mL MALP-2 作用 THP-1 细胞 60 min 后,激光共聚焦显示,核转录因子 Nrf2 核转位明显增多。而经 25 μ mol/L PI3K 特异性抑制剂 LY294002 处理后,可显著降低细胞核中 Nrf2 水平(图 3)。

2.4 MALP-2 增强 THP-1 细胞中 Nrf2 DNA 结合活性

5 ng/mL MALP-2 处理 30 min 尚不能检测出 Nrf2 DNA 结合活性的变化,60 min 后开始增强,120 min 后达到高峰。未标记 Nrf2 探针可使 DNA-蛋白结合形成的滞后条带消失,而 NF- κ B 探针对其无明显影响。同时, Nrf2 抗体结合后,能形成一条超滞后条带(super shift)。LY294002 处理后, DNA 结

2 结 果

2.1 MALP-2 诱导 THP-1 细胞表达 HO-1 和 NQO1

Western blot 结果显示,0.01 ng/mL MALP-2 作用 THP-1 细胞 12 h 后,可明显诱导 HO-1 和 NQO1 表达,且随 MALP-2 浓度增高,HO-1 和 NQO1 表达逐渐增多(图 1A、B)。其中 5 ng/mL MALP-2 处理后,HO-1 和 NQO1 表达分别增加了 3.2 和 4.4 倍,而此时尚未出现细胞毒性作用(MTT 结果未显示)。

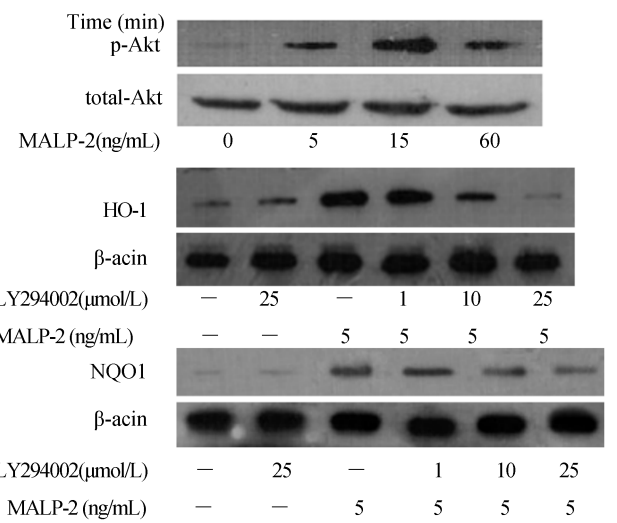


图2 MALP-2 经 PI3K 诱导 THP-1 表达 HO-1 和 NQO1

合活性降低(图 4)。

2.5 Nrf2 参与 HO-1 和 NQO1 的表达

采用 Nrf2 siRNA 干扰其表达后,Western blot 结果显示,HO-1 和 NQO1 的表达水平显著降低(图 5)。

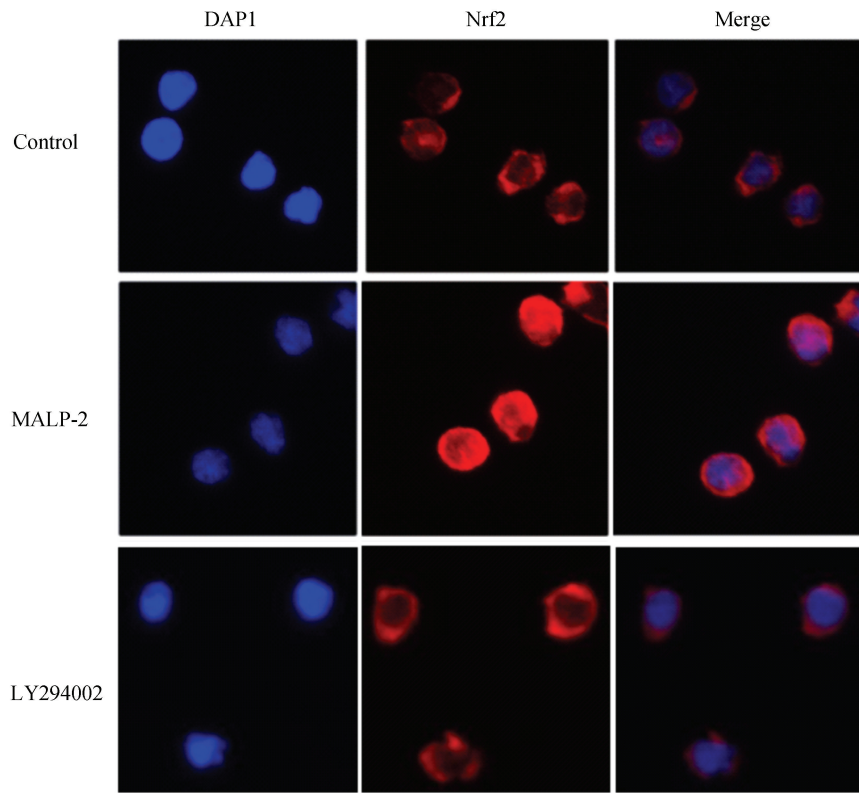


图 3 MALP-2 经 PI3K 诱导 Nrf2 核转位

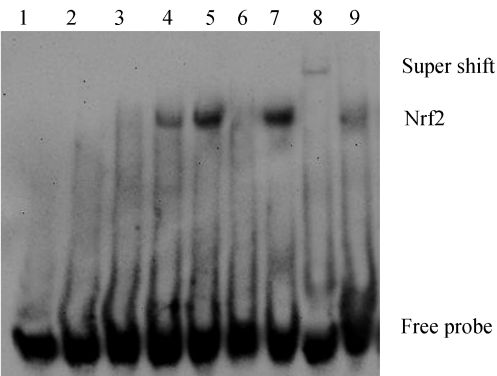


图 4 MALP-2 经 PI3K 增强 Nrf2 DNA 结合活性 1: 对照组;2~5: MALP-2 刺激 0、30、60 和 120 min;6: 未标记 Nrf2 探针;7: NF-κB 探针;8: Nrf2 抗体; 9: 25 μmol/L LY294002

3 讨 论

炎症是机体抵抗外源性感染的一种自我防御反应。对于机体而言,炎症反应必然受到受到严格的调控,从而使机体的炎症-抗炎反应趋于平衡而避免过度炎症反应的发生^[5-6]。目前已经证实,机体可表达过多抗氧化、抗炎功能的蛋白,从而负调控炎症反应^[7],其中以 HO-1 和 NQO1 研究最为透彻。研

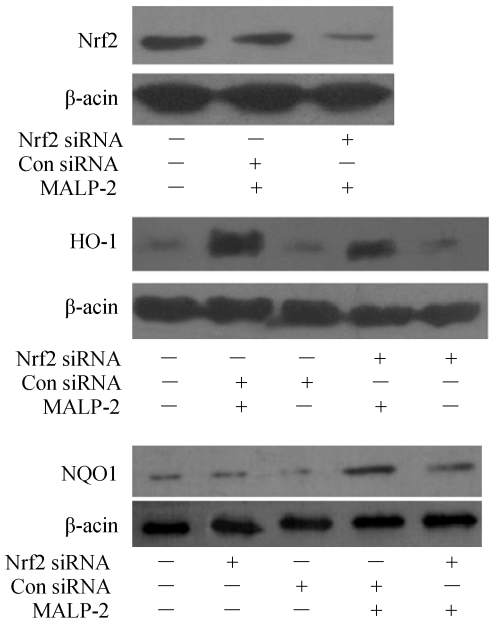


图 5 Nrf2 参与调控 MALP-2 诱导 HO-1 和 NQO1 表达

究显示,通过诱导 HO-1 高表达可显著降低细胞因子及炎症介质的含量,抑制粘蛋白表达以及细胞凋亡^[8],同时, LPS 也可上调 HO-1 和 NQO1 的表达,从而抑制 IL-1β 和 TNF-α 的过度分泌^[9]。此外,采用

药物诱导 HO-1 或 NQO1 表达后,可下调多种细胞因子以及炎症介质的表达^[10]。这表明 HO-1 和 NQO1 在维持机体的稳态方面发挥重要作用,这可能是机体一种获得性的自我保护机制。本研究证实,MALP-2 可通过 PI3K/Nrf2 通路诱导 THP-1 细胞表达 HO-1 和 NQO1,这表明支原体感染后,虽然能诱导单核、巨噬细胞产生炎症因子或介质清除病原体,但同时也能诱导 HO-1 和 NQO1 的表达,从而在一定程度上负调控炎症反应而避免炎症失控或组织损伤。PI3K 是参与细胞生长以及骨架重塑的重要激酶,其激活后可导致脂质底物磷酸化而形成第二信使,并激活下游蛋白激酶 B,即 Akt。因此检测 Akt 的磷酸化可间接反应 PI3K 的激活^[11]。有研究显示 TLR2 和相应配体结合后,可与 PI3K 形成复合体而参与信号转导^[12]。本研究证实 MALP-2 处理后能明显诱导 Akt 磷酸化,而 PI3K 抑制剂处理 THP-1 细胞后,HO-1 和 NQO1 表达明显降低,这表明 HO-1 和 NQO1 的表达受 PI3K 的调控。Nrf2 在正常情况下与抑制因子 Keap1 存在于细胞浆中,keap1 降解后,Nrf2 转位至细胞核内与 HO-1 或 NQO1 基因上游的启动子趋于结合而诱导其表达^[13-14]。本研究通过免疫荧光证实 MALP-2 能显著诱导 Nrf2 核转位,凝胶迁移率实验也进一步证实了其 DNA 结合活性显著增强,而上述过程能被 PI3K 抑制剂 LY294002 所抑制。同时,采用 siRNA 干扰 Nrf2 表达后,HO-1 和 NQO1 的表达也随之降低。这表明 Nrf2 和 PI3K 参与 HO-1 和 NQO1 的表达。

总之,本研究证实 MALP-2 可通过 PI3K/Nrf2 信号通路反馈性诱导 HO-1 和 NQO1 的表达,从而可能实现对炎症反应的负调控,这在维持机体的稳定具有重要意义。由于 MALP-2 是支原体膜蛋白的衍生脂肽,其主要的生物学特性是致炎作用。若能从结构上对 MALP-2 进行改造,降低其致炎活性而保留 HO-1 和 NQO1 的诱导活性,或许可以成为某些炎症性疾病治疗的重要辅助药物。

参考文献:

[1] Citti C, Blanchard A. Mycoplasmas and their host: emerging and re-emerging minimal pathogens[J]. Trends Microbiol, 2013, 21(4): 196-203.

[2] You X, Wu Y, Zeng Y, et al. Mycoplasma genitalium-derived lipid-associated membrane proteins induce activation of MAPKs, NF-kappaB and AP-1 in THP-1 cells[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2008, 52(2): 228-236.

[3] Galanos C, Gumenscheimer M, Muhlradt P, et al. MALP-2, a Mycoplasma lipopeptide with classical endotoxic properties: end of an era of LPS monopoly[J]? J Endotoxin Res, 2000, 6(6): 471-476.

[4] Kaufmann A, Muhlradt PF, Gemsa D, et al. Induction of cytokines and chemokines in human monocytes by Mycoplasma fermentans-derived lipoprotein MALP-2[J]. Infect Immun, 1999, 67(12): 6303-6308.

[5] Nathan C, Ding A. Nonresolving inflammation[J]. Cell, 2010, 140(6): 871-882.

[6] Murray PJ, Smale ST. Restraint of inflammatory signaling by interdependent strata of negative regulatory pathways[J]. Nat Immunol, 2012, 13(10): 916-924.

[7] Thimmulappa RK, Scollick C, Traore K, et al. Nrf2-dependent protection from LPS induced inflammatory response and mortality by CDDO-Imidazolide[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 351(4): 883-889.

[8] Raval CM, Lee PJ. Heme oxygenase-1 in lung disease[J]. Curr Drug Targets, 2010, 11(12): 1532-1540.

[9] Rushworth SA, MacEwan DJ, O'Connell MA. Lipopolysaccharide-induced expression of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 and heme oxygenase-1 protects against excessive inflammatory responses in human monocytes[J]. J Immunol, 2008, 181(10): 6730-6737.

[10] Kim HA, Yeo Y, Kim WU, et al. Phase 2 enzyme inducer sulforaphane blocks matrix metalloproteinase production in articular chondrocytes[J]. Rheumatology (Oxford), 2009, 48(8): 932-938.

[11] Mo L, Yang C, Gu M, et al. PI3K/Akt signaling pathway-induced heme oxygenase-1 upregulation mediates the adaptive cytoprotection of hydrogen peroxide preconditioning against oxidative injury in PC12 cells[J]. Int J Mol Med, 2012, 30(2): 314-320.

[12] Liljeroos M, Vuolteenaho R, Morath S, et al. Bruton's tyrosine kinase together with PI 3-kinase are part of Toll-like receptor 2 multiprotein complex and mediate LTA induced Toll-like receptor 2 responses in macrophages[J]. Cell Signal, 2007, 19(3): 625-633.

[13] Bryan HK, Olayanju A, Goldring CE, et al. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation[J]. Biochem Pharmacol, 2013, 85(6): 705-717.

[14] 马小华, 游晓星, 吴移谋. HO-1 在免疫调节中的作用及其相关信号转导通路研究进展[J]. 中南医学科学杂志, 2011, 39(6): 705-709.

(此文编辑:朱雯霞)