

人血清对生殖支原体 LAMPs 诱导 THP-1 细胞表达 TNF- α 的影响

何 军^{1,2}, 游晓星², 伍绍坚¹, 田 巍¹, 吴移谋²

(1. 南华大学附属南华医院检验科, 湖南 衡阳 42100; 2. 南华大学病原生物学研究所)

摘 要: **目的** 探讨人血清对生殖支原体(Mg)脂质相关膜蛋白(LAMPs)诱导 TNF- α 表达的影响。 **方法** 提取对数期 Mg 的 LAMPs, 分别加入脂蛋白脂肪酶, 蛋白酶 K 及人血清预处理后, 刺激 THP-1 细胞, ELISA 法测定其 TNF- α 水平。 **结果** Mg LAMPs 为一混合蛋白, 其活性成分为脂质成分, 能激活 THP-1 细胞表达大量 TNF- α , 且与 LAMPs 浓度呈明显的剂量依赖性。人血清能上调 LAMPs 诱导的 TNF- α 水平, 且与 LAMPs 浓度呈明显的剂量依赖性。 **结论** 人血清上调 Mg LAMPs 诱导 THP-1 细胞表达 TNF- α 。

关键词: 生殖支原体; 脂质相关膜蛋白; 肿瘤坏死因子; 人血清

中图分类号: R375

文献标识码: A

Effect of Human Serum on Lipid-associated Membrane Proteins of Mycoplasma Genitalium Induced TNF- α Production in THP-1 Cells

HE Jun, YOU Xiaoxing, WU Shaojian, et al

(Department of Clinical Laboratory, Affiliated Nanhua Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of human serum on TNF- α expression activated by lipid-associated membrane proteins (LAMPs) of Mycoplasma genitalium (Mg). **Methods** LAMPs were extracted and pretreated with lipoprotein lipase or protease K or serum human. THP-1 cells were stimulated and the expression of TNF- α was detected by ELISA. **Results** LAMPs are mixed proteins and the active ingredients are lipid moiety. The secretion of TNF- α was mediated in LAMPs induced THP-1 cells and was significantly increased by LAMPs in a dose-dependent manner. TNF- α levels were significantly up-regulated in LAMPs activated THP-1 cells by Human serum and was significantly increased by LAMPs in a dose-dependent manner. **Conclusions** The human serum raised TNF- α levels by Mg LAMPs induced THP-1 cells.

Key words: mycoplasma genitalium; lipid-associated membrane protein; tumor necrosis factor; human serum

支原体是一类缺乏细胞壁、呈高度多形性、能通过滤菌器、可在无细胞的培养中繁殖的最小原核细胞型微生物。生殖支原体(Mycoplasma genitalium, Mg)是从非淋菌性尿道炎患者尿道分泌物中分离出的一

种支原体,可引起急慢性尿道炎、阴道炎、子宫内膜炎、盆腔炎、输卵管性不孕等多种疾病,并且作为 AIDS 相关支原体与 HIV 患者的死亡密切相关^[1-3]。由于支原体缺乏细胞壁,其膜表面存在的大量脂质相关膜蛋白(lipid-associated membrane proteins, LAMPs)是其黏附、定植、入侵宿主细胞以及引起宿主炎症反应的物质基础^[4]。单核细胞是人类天然免疫的首要防线,也是分化为巨噬细胞、树突状细胞的共同前体细胞。本研究通过提取 Mg LAMPs 刺激 THP-1 细胞,初步探讨 LAMPs 的活性成分及人血清对其诱导 TNF- α 水平变化的影响。

收稿日期:2014-01-07

基金项目:国家自然科学基金课题(31100137),湖南省自然科学基金课题(14JJ7044),湖南省卫生计生科研计划课题(B2011-058)。

作者简介:何军,博士生,主管技师,研究方向:支原体致病性和致病机制研究, E-mail: junhe2008@hotmail.com. 通讯作者吴移谋,教授,博士生导师,研究方向:支原体致病机制与防治, E-mail: yimouwu@sina.com.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Mg-37 标准株由南华大学病原生物学研究所保存,人单核细胞系 THP-1 细胞购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。青霉素、多粘菌素 B、LPS 购自 Solarbio;无支原体牛血清和超级新生胎牛血清购自四季青生物工程公司;RPMI-1640 培养基购自 Hyclone;PPLO 购自 BD 公司;脂蛋白脂肪酶和蛋白酶 K 购自 Sigma-Aldrich;人肿瘤坏死因子 α ELISA 试剂盒购自 eBioscience;1% 人血清来自正常体检者并经其同意使用。

1.2 Mg 培养及 LAMPs 的提取

将 Mg 菌液按 1:40 比例接种于 PPLO 改良培养基中于 95% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温下培养 3~4 天,培养基颜色由玫瑰红色变为清亮的橙色时,表示 Mg 生长已进入对数期。Mg LAMPs 的提取按照参考文献进行^[5],BCA 法测定蛋白浓度后置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 备用。Mg LAMPs 在刺激前用 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 多粘菌素 B 处理 2 h,去除可能存在的内毒素污染。

1.3 THP-1 细胞培养及 LAMPs 刺激

THP-1 细胞在含 10% 胎牛血清的 1640 培养基中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养。接种前换无血清培养基,在 24 孔培养板中每孔接种 1×10^5 THP-1 细胞,分别加入不同浓度的 LAMPs, LPS (100 ng/mL),PBS 至孔中混匀孵育 8 h。

1.4 TNF- α 水平的测定及 LAMPs 的预处理

THP-1 细胞被刺激后,经两次反复冻融后离心取上清,采用 ELISA 法根据具体操作说明书进行测定。LAMPs 分别与 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 脂蛋白脂肪酶、蛋白酶 K,人血清在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下混匀孵育 2 h 后再用于细胞刺激。

1.5 统计学分析

计量资料采用均数 $\pm$ 标准差表示,每组实验重复三次,组间比较采用 t 检验,运用 SPSS 13.0 软件进行分析, $P < 0.05$ 表示其差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 Mg LAMPs 的提取及初步鉴定

Mg LAMPs 提取后经 15% SDS-PAGE 电泳,结果证实 Mg LAMPs 为一混合蛋白,大部分蛋白位于 19~48 KDa 之间(图 1)。

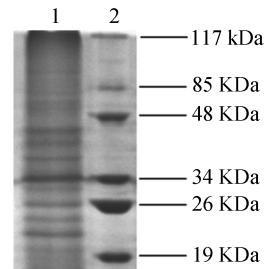


图 1 Mg LAMPs 的 SDS-PAGE 蛋白质电泳图 1: Mg LAMPs;2: 蛋白 Marker

2.2 LAMPs 诱导 THP-1 细胞分泌 TNF- α

以 0.1~4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Mg LAMPs 分别诱导 THP-1 细胞 8 h,ELISA 结果显示,TNF- α 水平明显增加,并且随 LAMPs 的浓度增加而增加。4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LAMPs 刺激后 TNF- α 水平增高了 7 倍(图 2)。

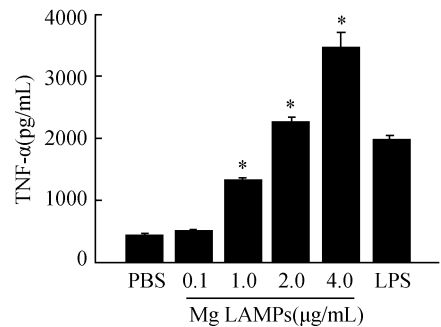


图 2 Mg LAMPs 诱导 THP-1 细胞分泌 TNF- α 与前一组相比,* : $P < 0.05$

2.3 Mg LAMPs 中脂质成分诱导 THP-1 细胞分泌 TNF- α

Mg LAMPs 分别被 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 脂蛋白脂肪酶和蛋白酶 K 孵育 2 h 后刺激 THP-1 细胞,ELISA 结果显示,被脂蛋白脂肪酶 (Lipoprotein lipase) 处理的 LAMPs 诱导 TNF- α 水平明显降低,而被蛋白酶 K (Proteinase K) 处理的 LAMPs 诱导 TNF- α 水平变化不明显(图 3)。

2.4 人血清上调 LAMPs 诱导的 TNF- α 水平

在与 1% 人血清 (1% Serum) 孵育 2 h 后,Mg LAMPs 刺激 THP-1 细胞 8 h,ELISA 结果显示 TNF- α 水平明显上升,明显高于同浓度未加人血清组 (NOSerum),并且随 LAMPs 浓度增加而增加 ($P < 0.05$)(图 4)。

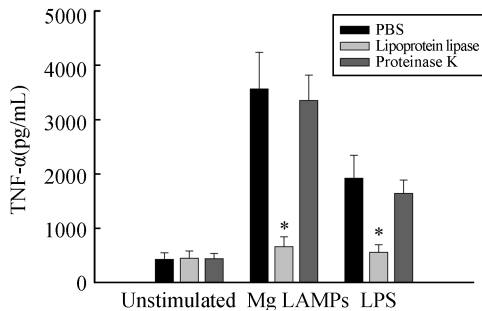


图3 LAMPs中脂质成分诱导THP-1细胞分泌TNF-α与PBS组相比, *: $P < 0.05$ 。Unstimulated:未刺激组;LPS:脂多糖

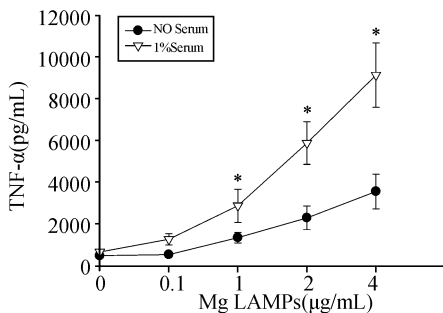


图4 人血清上调LAMPs诱导的TNF-α水平与1%人血清前一组比较, *: $P < 0.05$

3 讨论

支原体细胞膜是与宿主细胞相互作用的主要成分,而膜上丰富的类似于LPS的LAMPs是影响机体炎症反应的主要蛋白。目前已证实LAMPs能诱导多种细胞分泌一系列炎症因子和诱导细胞凋亡、坏死^[6]。由于生物活性的发挥可能要通过LAMPs中各种蛋白相互作用,因此对LAMPs的整体研究相对单个脂蛋白来说更有意义。我们前期研究发现Mg LAMPs能激活NF-κB,并且与TLR2有关^[7]。NF-κB信号通路活化的重要作用是通过诱导激活下游的免疫及炎症相关因子的转录表达。本研究发现Mg LAMPs为混合蛋白,大部分蛋白位于19~48 kDa之间,具有明显的生物活性,能激活THP-1细胞表达大量TNF-α,并且其水平与LAMPs浓度呈明显的剂量依赖性。支原体感染多倾向于慢性或隐性感染,由于产生的TNF-α具有组织损伤和免疫保护双重作用,最后走向取决于机体免疫系统之间的相互作用。

人血清中含有多种生物活性蛋白,其中包括介导LPS生物活性的脂多糖结合蛋白(lipopolysaccharide-binding protein, LBP), CD14等。LBP由肝细胞合成和分泌,在血清中的正常浓度为5~10 mg/L,

急性反应期可升高到200 mg/L,与LPS中的类脂体A具有高度亲和性^[8]。在血清中的CD14主要为可溶性CD14(soluble CD14, sCD14),主要由单核细胞产生,其正常浓度为2~5 mg/ml,占血中全部CD14含量的99%^[9]。TNF-α作为致机体产生炎症反应的重要因子。sCD14能直接与LPS结合,介导LPS所致的TNF-α的产生。LBP本身并不能诱导TNF-α的产生,但LBP却能明显增强LPS对TNF-α的诱导作用,增加TNF-α mRNA转录的速度和程度,使TNF-α水平明显上升^[10]。我们推测人血清可能对类似于LPS的LAMPs有一定的作用,结果发现,人血清能明显上调LAMPs诱导的TNF-α的产生。研究发现,脂质能够与许多微生物中脂蛋白N-末端半胱氨酸的Src同源序列结合,而支原体的生物学活性也刚好位于N-末端脂肽部分^[11]。通过脂蛋白脂肪酶和蛋白酶K预处理后发现,LAMPs中诱导活性成分为脂质部分,并非蛋白部分。研究证实LAMPs的生物活性不仅与其脂质成分,脂肽的、脂肪酸链的饱和程度、数量及酰化程度有关^[12-13],而且最近研究发现,LBP能结合三酰化和二酰化脂肽,CD14能结合二酰化脂肽介导免疫反应^[14-15]。本文作者推测人血清的上调作用可能是上清中LBP和sCD14的共同作用。因此,通过诱导TNF-α表达而对机体组织产生保护或损伤作用,这可能是Mg感染所引起的炎症反应的基础,同时也为Mg的致病机制研究及防治提供新的思路。

参考文献:

- [1] Plecko V, Zele SL, Tripkovic V, et al. Mycoplasma genitalium: clinical significance and diagnosis[J]. Acta Dermatovenereol Croat, 2013, 21(4): 236-240.
- [2] McGowan CL, Rohde RE, Redwine G. Epidemiological and clinical rationale for screening and diagnosis of Mycoplasma genitalium infections[J]. Clin Lab Sci, 2014, 27(1): 47-52.
- [3] Vandepitte J, Bukkenya J, Hughes P, et al. Clinical characteristics associated with Mycoplasma genitalium infection among women at high risk of HIV and other STI in Uganda[J]. Sex Transm Dis, 2012, 39(6): 487-491.
- [4] Bai F, Ni B, Liu M, et al. Mycoplasma hyopneumoniae-derived lipid-associated membrane proteins induce apoptosis in porcine alveolar macrophage via increasing nitric oxide production, oxidative stress, and caspase-3 activation[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2013, 155(3): 155-161.

(下转第245页)

(上接第 228 页)

- [5] Shimizu T, Kida Y, Kuwano K. Triacylated lipoproteins derived from *Mycoplasma pneumoniae* activate nuclear factor- κ B through toll-like receptors 1 and 2[J]. *Immunol*, 2007, 121(4):473-483.
- [6] Adamu JY, Wawegama NK, Browning GF, et al. Membrane proteins of *Mycoplasma bovis* and their role in pathogenesis[J]. *Res Vet Sci*, 2013, 95(2):321-325.
- [7] 何军, 游晓星, 曾焱华, 等. 生殖支原体 LAMPs 经 TLR2 激活 NF- κ B[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2010, 30(12):1137-1140.
- [8] Nam BH, Ahn KJ, Kim YO, et al. Molecular cloning and characterization of LPS-binding protein/bactericidal permeability-increasing protein (LBP/BPI) from olive flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2010, 133(2-4):256-263.
- [9] Romero-Sanchez M, Gonzalez-Serna A, Pacheco YM, et al. Different biological significance of sCD14 and LPS in HIV-infection: importance of the immunovirology stage and association with HIV-disease progression markers[J]. *J Infect*, 2012, 65(5):431-438.
- [10] Ranao DR, Kelley SL, Tapping RI. Human lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and CD14 independently deliver triacylated lipoproteins to Toll-like receptor 1 (TLR1) and TLR2 and enhance formation of the ternary signaling complex[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(14):9729-9741.
- [11] Shibata K, Hasebe A, Into T, et al. The N-terminal lipopeptide of a 44-kDa membrane-bound lipoprotein of *Mycoplasma salivarium* is responsible for the expression of intercellular adhesion molecule-1 on the cell surface of normal human gingival fibroblasts[J]. *J Immunol*, 2000, 165(11):6538-6544.
- [12] Choi SY, Lim JW, Shimizu T, et al. Reactive oxygen species mediate Jak2/Stat3 activation and IL-8 expression in pulmonary epithelial cells stimulated with lipid-associated membrane proteins from *Mycoplasma pneumoniae*[J]. *Inflamm Res*, 2012, 61(5):493-501.
- [13] Liu YC, Lin IH, Chung WJ, et al. Proteomics characterization of cytoplasmic and lipid-associated membrane proteins of human pathogen *Mycoplasma fermentans* M64[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4):e35304.
- [14] Schröder NW, Heine H, Alexander C, et al. Lipopolysaccharide binding protein binds to triacylated and diacylated lipopeptides and mediates innate immune responses[J]. *J Immunol*, 2004, 173(4):2683-2691.
- [15] Nakata T, Yasuda M, Fujita M, et al. CD14 directly binds to triacylated lipopeptides and facilitates recognition of the lipopeptides by the receptor complex of Toll-like receptors 2 and 1 without binding to the complex[J]. *Cell Microbiol*, 2006, 8(12):1899-1909.

(此文编辑:秦旭平)