

# 生殖支原体脂质相关膜蛋白通过 c-Src/ROS/Nrf2 途径诱导胎盘滋养层细胞表达血红素氧合酶

何璐<sup>1,2</sup>, 游晓星<sup>2</sup>, 李国华<sup>3</sup>, 曾焱华<sup>2</sup>, 李冉辉<sup>2</sup>, 朱翠明<sup>2</sup>, 余敏君<sup>2</sup>, 陈忠东<sup>1\*</sup>, 吴移谋<sup>2</sup>

(1. 南华大学附属第一医院妇产科, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学医学院病原生物学研究所, 特殊病原体防控湖南省重点实验室; 3. 南华大学心血管疾病研究所)

**摘要:** **目的** 探讨生殖支原体脂质相关膜蛋白(LAMPs)诱导胎盘滋养层细胞表达血红素氧合酶-1(HO-1)的分子机制。**方法** 用0.5~5 μg/mL生殖支原体LAMPs处理体外培养的胎盘滋养层细胞4~12 h,采用实时定量PCR和Western blot法分别检测HO-1 mRNA和蛋白的表达以及核因子相关因子-2(Nrf2)的核转位;比色法观察HO-1的酶活性;2',7'-二氯二氢荧光黄二乙酸酯(H<sub>2</sub>DCFDA)检测活性氧产生。分别采用酪氨酸激酶c-Src抑制剂PP1、活性氧抑制剂N-乙酰半胱氨酸(NAC)和Nrf2 siRNA干预,观察HO-1的表达情况。**结果** 生殖支原体LAMPs能诱导滋养层细胞HO-1 mRNA和蛋白的表达,上调其酶活性。同时,LAMPs也能诱导其产生活性氧,并促使Nrf2核转位。PP1和NAC预处理后,可明显降低HO-1的表达水平以及细胞核内Nrf2含量。采用Nrf2 siRNA转染后,HO-1的表达显著减少。**结论** 生殖支原体LAMPs通过c-Src/ROS/Nrf2途径诱导滋养层细胞表达HO-1。

**关键词:** 生殖支原体; 脂质相关膜蛋白; 血红素氧合酶-1; 滋养层细胞

中图分类号:R518.9,R392-33,R711.32 文献标识码:A

## Mycoplasma Genitalium-derived Lipid-associated Membrane Proteins Induces Placental Trophoblast Cells Expression of HO-1 via ROS/Nrf2

HE Lu, YOU Xiaoxing, LI Guohua, et al

(Departments of Gynecology & Obstetrics, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the mechanism of the expression of heme oxygenase-1 (HO-1) in response to Mycoplasma genitalium-derived lipid-associated membrane proteins (LAMPs) in placental trophoblast cells. **Methods** Placental trophoblast cells were cultured in vitro and stimulated by 0.5~5 μg/mL of LAMPs for 4~12h, expression of HO-1 mRNA and protein, and nuclear translocation of nuclear factor erythroid-2 related factor 2 (Nrf2) were detected by real-time PCR and Western blot, respectively. The enzyme activity of HO-1 was detected by colorimetric method. The intracellular formation of reactive oxygen species (ROS) was detected by using the fluorescent probe H<sub>2</sub>DCFDA. Tyrosine kinase c-Src inhibitor PP1, N-acetyl-cysteine (NAC) and Nrf2 siRNA were used to analyse the function of ROS and Nrf2 in mediating of HO-1 expression. **Results** M. genitalium LAMPs enhanced the expression of HO-1 at mRNA and protein levels as well as the enzyme activity of HO-1 in placental trophoblast cells in a concentration-dependent manner. In the meantime, LAMPs also induced placental trophoblast cells accumulation of ROS and nuclear translocation of Nrf2. PP1 and NAC treatment could inhibit LAMPs-induced HO-1 expression and Nrf2 nuclear translocation, and transfection of Nrf2 siRNA significantly abrogate HO-1 expression. **Conclusion** M. genitalium LAMPs induced placental trophoblast cells expression of HO-1 through c-Src/ROS/Nrf2 pathways.

**Key words:** mycoplasma genitalium; lipid-associated membrane proteins; heme oxygenase-1; placental trophoblast cells

生殖支原体(*Mycoplasma genitalium*)是 Tully 等人从男性非淋球菌尿道炎患者体内分离出来的一种病原体。它作为一种病原微生物的观点已被人们接受。生殖支原体黏附至生殖道黏膜后,主要通过其细胞膜中的脂质相关膜蛋白(lipid-associated membrane proteins, LAMPs)发挥致炎作用,从而引起女性多种泌尿生殖系统疾病如盆腔炎、宫颈炎、不育(孕)症,并参与胎膜早破、产褥感染和新生儿肺炎等不良妊娠的发生<sup>[1]</sup>。胎盘滋养层细胞是母体和胎儿进行物质交换的场所,同时也是母体固有免疫系统的重要组成部分<sup>[2]</sup>。研究显示,支原体感染后,可诱导胎盘滋养层细胞表达多种细胞因子和炎症相关介质<sup>[3]</sup>。虽然支原体本身难以通过胎盘屏障,但是其感染导致细胞因子过度分泌,这对滋养层细胞具有毒性作用,也是引起不良妊娠发生的重要因素<sup>[4]</sup>。因此对于母体而言,如何负调控这些细胞因子的过度分泌,是维持胎儿发育的关键。人工合成的支原体巨噬细胞活化脂肽-2 可诱导人单核细胞表达血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1, HO-1),从而抑制炎症因子的过度分泌<sup>[5]</sup>。但对于生殖支原体感染后,胎盘滋养层细胞能否表达 HO-1 目前仍不清楚。本文旨在观察生殖支原体 LAMPs 能否诱导滋养层细胞表达 HO-1,并探讨其分子机制。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 生殖支原体 G37 标准株购自 ATCC(ATCC<sup>®</sup> 33530D<sup>TM</sup>)。小鼠抗人 HO-1 抗体、小鼠抗人核因子相关因子-2(nuclear factor-E2-related factor 2, Nrf2)抗体以及小鼠抗人 TATA 结合蛋白(TATA-binding protein, TBP)抗体购自 Santa Cruz;抗磷酸化 c-Src(Tyr416)和抗总 c-Src 单克隆抗体购自 Cell Signaling;酪氨酸激酶 c-Src 抑制剂 PP1, N-乙酰-半胱氨酸(N-acetyl-cysteine, NAC)以及 2', 7'-二氯二氢荧光黄二乙酸钠(2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, H<sub>2</sub>DCFDA)购自 Sigma。HO-1 活性检测试剂盒购自上海 GENMED 公司;细胞蛋白提取试剂盒、蛋白浓度测定试剂盒购自 Thermo 公司;Lipofectamine 2000 转染试剂及新霉素(Normocin)购自 Invitrogen 公司;蛋白酶抑制剂购自 Roche。用于分离滋养层细胞的胎盘绒毛组织来自 2012 年 10 月~2013 年 10 月南华大学附属第一医院妇产科所收治的患者(孕 18~31 周)。开展研究前均与患者签署

知情同意书,研究内容和方法经过南华大学医学伦理委员会的批准。

### 1.2 方 法

**1.2.1 生殖支原体培养与 LAMPs 提取** 生殖支原体标准株用 SP4 培养基于 950 mL/L CO<sub>2</sub>、37 °C 条件下培养。当菌液由玫瑰红变为橙色时,离心获取菌体,根据参考文献提供的方法提取 LAMPs<sup>[6]</sup>。用 5 mL Tris 缓冲液(pH 8.0 的 50 mmol/L Tris、0.15 mol/L NaCl、1 mmol/L EDTA)重悬浮支原体沉淀,并加入终浓度为 20 mL/L 的 Triton X-114,4 °C 静置 1 h,随后 37 °C 孵育 30 min 以促进相分离。弃上层水相,加入等体积 Tris 缓冲液后重复上述相分离 1 次。第 2 次相分离结束后,弃水相,用 Tris 缓冲液恢复至初始体积,加入 2.5 倍体积无水乙醇-20 °C 以沉淀 LAMPs。超声处理后测定其浓度备用。

**1.2.2 滋养层细胞的分离与培养** 按照参考文献提供的方法分离鉴定滋养层细胞<sup>[7]</sup>。细胞用含 100 mL/L 胎牛血清以及 50 mg/mL 新霉素(Normocin)的 M199 培养基,于 37 °C、50 mL/L CO<sub>2</sub> 的恒温细胞培养箱中培养。实验前将 2 × 10<sup>5</sup> 个细胞接种于培养板中培养 48 h,随后用 0.5~5 μg/mL LAMPs 作用细胞 4~12 h(视不同的实验目的而定)<sup>[6]</sup>。

**1.2.3 实时定量 PCR 检测 HO-1 mRNA 的表达** 细胞处理完毕后,用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA,并取 3 μg 的 RNA 进行逆转录,将获得的 cDNA 进行实时定量 PCR。本文所用引物如下。HO-1 上游引物为 5'-ATGGCCTCCCTGTACCACATC-3', HO-1 下游引物为 5'-TGTTGCGCTCAATCTCCTCCT-3'; β-actin 上游引物为 5'-CATCCTGCGTCTGGACCTGG-3', β-actin 下游引物为:5'-TAATGTCACG-CACGATTTCC-3',在 LightCycler96 定量 PCR 仪(Roche)上按以下程序扩增:50 °C 2 min, 95 °C 10 min, 95 °C 15 s, 58 °C 1 min 共 40 个循环。PCR 结束后计算各处理组中 HO-1 蛋白的相对表达量,计算公式:2-ΔΔCt, ΔΔCt = 实验组(CtHO-1-Ctβ-actin)-对照组(CtHO-1-Ctβ-actin)。

**1.2.4 HO-1 酶活性检测** 处理后的细胞加入 1.5 mL 的试剂 A 漂洗细胞,随后加入 100 μL 裂解液 B 充分混匀,超声裂解细胞后于 4 °C, 10 000 r/min 离心 15 min,获取 20 μL 上清置于另一新的 EP 管中,分别加入 340 μL 缓冲液 C、20 μL 反应液 D、20 μL 底物,混匀,37 °C 温育 60 min。最后加入 400 μL 终止液终止反应。1 000 rpm 离心

5 min。取 100  $\mu\text{L}$  绿色相,测量其在 464 nm 和 530 nm 波长的吸光度,并根据待测样品的蛋白浓度计算出 HO-1 的活性,单位以每小时单位蛋白(mg)中胆红素浓度(nmol/L)表示。

**1.2.5 Western blot 法检测 HO-1 表达及 Nrf2 核转位** 滋养层细胞经 LAMPs 处理后,用预冷 PBS 漂洗 2 次,随后加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液充分裂解细胞,4  $^{\circ}\text{C}$  12 000 r/min 离心 10 min。细胞浆和细胞核蛋白提取试剂盒严格根据厂家说明书进行。将获取的蛋白经 10% ~ 12% 的 SDS-PAGE、转膜,放入 5% 脱脂奶粉中封闭 1 h;洗涤后,加入小鼠抗人 HO-1 或 Nrf2 抗体(1:1 000),4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜;多次洗涤后,加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗小鼠二抗孵育 1 h。ECL 法发光、显影。

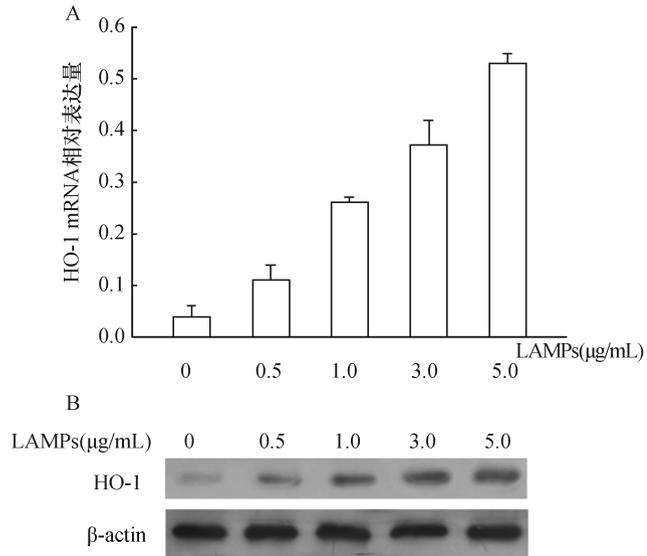
**1.2.6 活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测** 以  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  为荧光探针检测细胞内 ROS 水平。其原理是不发荧光的  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  进入细胞后能被过氧化物、氢过氧化物等氧化分解为二氯荧光黄而产生荧光。孵育结束后,向各管中加入终浓度 5  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  染液,37  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 30 min。PBS 洗细胞 3 次,重悬细胞, SynergyHT 荧光分光光度计(Bio-Tec)检测细胞悬液荧光强度(激发波长 485 nm,发射波长 530 nm)。

**1.2.7 Nrf2 的 siRNA 瞬时转染** 将滋养层细胞接种于 1.5 mL 无血清的培养基的 6 孔板中,放入培养箱中备用。按 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 说明书配制 A、B 液并充分混合,静置 20 min 后加入 6 孔板中,按试剂盒说明书要求,使 siRNA 终浓度达 100 nmol/L,转染 4 h 后换上完全培养基继续培养。

**1.3 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。

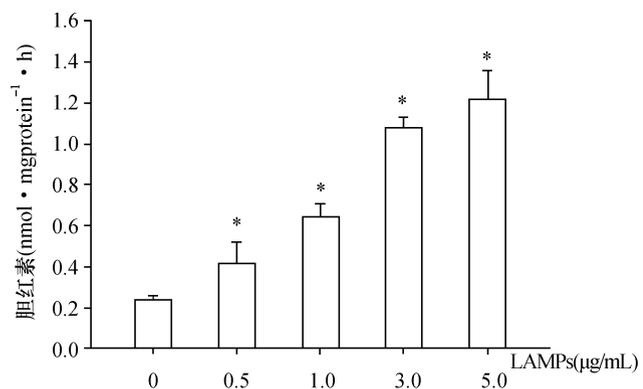
## 2 结 果

**2.1 生殖支原体 LAMPs 诱导滋养层细胞表达 HO-1 mRNA 和蛋白** 在正常情况下,滋养层细胞中 HO-1 mRNA 表达水平很低。用 0.5  $\mu\text{g/mL}$  LAMPs 处理滋养层细胞 12 h 后,可明显诱导 HO-1 mRNA 表达,随着 LAMPs 浓度的增加,HO-1 mRNA 表达水平也逐渐升高(图 1A)。Western blot 检测结果显示 HO-1 蛋白表达水平与 mRNA 的变化一致(图 1B)。



**图 1 生殖支原体 LAMPs 对滋养层细胞 HO-1 表达的影响** A:生殖支原体 LAMPs 诱导滋养层细胞表达 HO-1 mRNA。与对照组(0  $\mu\text{g/mL}$ )相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; B:生殖支原体 LAMPs 诱导滋养层细胞表达 HO-1 蛋白

**2.2 生殖支原体 LAMPs 上调滋养层细胞 HO-1 酶活性** 在正常情况下,滋养层细胞中 HO-1 酶活性水平很低。采用 0.5  $\mu\text{g/mL}$  LAMPs 处理滋养层细胞 12 h 后,HO-1 酶活性明显增加,随着 LAMPs 浓度的增高,HO-1 酶活性也随着之增强(图 2),作用趋势与 HO-1 的表达趋势相似。



**图 2 生殖支原体 LAMPs 对滋养层细胞 HO-1 酶活性的影响** 与对照组(0  $\mu\text{g/mL}$ )相比, \* $P < 0.05$

**2.3 酪氨酸激酶 c-Src 参与调控滋养层细胞 HO-1 的表达** 采用 5  $\mu\text{g/mL}$  的 LAMPs 处理滋养层细胞 3 min 后,即可诱导酪氨酸激酶 c-Src 的磷酸化,随着 LAMPs 处理时间的延长,c-Src 的磷酸化水平增加,处理 10 min 后 c-Src 的磷酸化水平反而降低

(图 3A)。而使用 10 ~ 30  $\mu\text{mol/L}$  酪氨酸激酶 c-Src 抑制剂 PP1 预处理滋养层细胞 1 h 后,HO-1 表达水平明显降低(图 3B),PP1 可以明显抑制 HO-1 的表达。

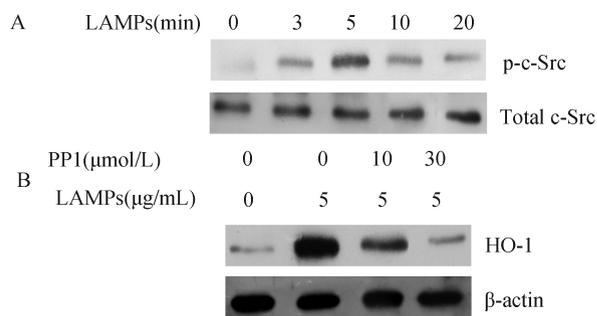


图 3 酪氨酸激酶 c-Src 在生殖支原体 LAMPs 诱导滋养层细胞 HO-1 表达中的作用 A:生殖支原体 LAMPs 诱导滋养层细胞 c-Src 的磷酸化;B: PP1 拮抗生殖支原体 LAMPs 诱导滋养层细胞 HO-1 的表达

### 2.4 生殖支原体 LAMPs 诱导滋养层细胞表达 HO-1 与 ROS 的产生有关

在正常情况下,滋养层细胞内有少量的 ROS 存在。生殖支原体 LAMPs 能明显促使滋养层细胞生成 ROS,随着 LAMPs 的浓度增加,ROS 的生成增多,而采用 30  $\mu\text{mol/L}$  PP1 预处理滋养层细胞 1 h 后,ROS 的生成显著降低(图 4A)。生殖支原体 LAMPs 能显著诱导滋养层细胞表达 HO-1,而采用不同浓度的 ROS 抑制剂 NAC 预处理滋养层细胞 4 h 后,HO-1 表达降低,NAC 能拮抗 LAMPs 对滋养层细胞 HO-1 表达的诱导作用(图 4B)。

### 2.5 生殖支原体 LAMPs 诱导滋养层细胞 Nrf2 核转位

在正常情况下,Nrf2 可分布在细胞质和细胞核,但主要存在细胞质中。当用 5  $\mu\text{g/mL}$  LAMPs 处理滋养层细胞 1 ~ 2 h 后,细胞核中 Nrf2 含量逐渐增多,且胞质中 Nrf2 含量随之降低,而核蛋白内参 TBP 的含量保持恒定。而预先用 ROS 抑制剂 NAC 孵育后,LAMPs 诱导滋养层细胞 Nrf2 核转位的作用被明显抑制(图 5)。

### 2.6 Nrf2 参与调控滋养层细胞 HO-1 的表达

在正常情况下,滋养层细胞中 HO-1 表达水平很低。5  $\mu\text{g/mL}$  LAMPs 能明显诱导滋养层细胞 HO-1 的表达。而采用特异性 siRNA 干扰 Nrf2 表达后(图 6A),再用 5  $\mu\text{g/mL}$  LAMPs 处理滋养层细胞 12 h,Western blot 检测结果显示,HO-1 的表达量明显降低(图 6B)。

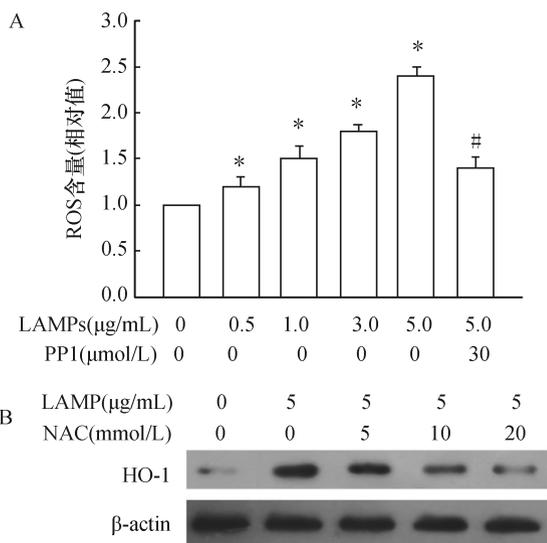


图 4 ROS 在生殖支原体 LAMPs 诱导滋养层细胞表达 HO-1 中的作用 A:生殖支原体 LAMPs 诱导滋养层细胞产生 ROS.与对照组(0 $\mu\text{g/mL}$  LAMPs)相比,\* $P < 0.05$ ,# $P < 0.05$ ;B: NAC 拮抗生殖支原体 LAMPs 诱导滋养层细胞表达 HO-1

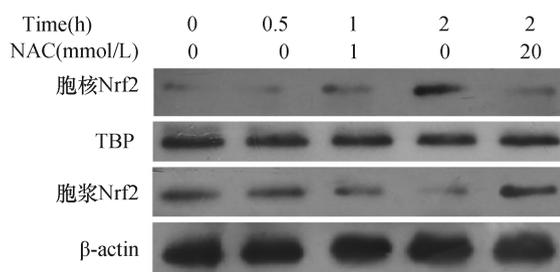


图 5 生殖支原体 LAMPs 对滋养层细胞 Nrf2 核转位的影响

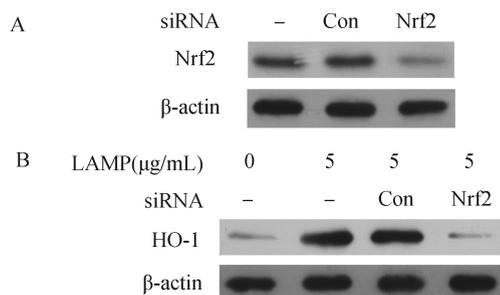


图 6 沉默 Nrf2 表达对滋养层细胞 HO-1 表达的影响 A: Nrf2 siRNA 干扰效果;B:siRNA 干扰沉默 Nrf2 表达后下调滋养层细胞 HO-1 的表达

## 3 讨 论

LAMPs 是生殖支原体重要的致炎物质,可诱导胎盘组织分泌多种炎症相关介质从而参与局部炎症反应<sup>[9]</sup>。因此对于母体而言,支原体感染后必然存在

某种负性调控机制以抑制过度的炎症反应,从而维持胎儿的正常发育<sup>[9]</sup>。HO-1 是催化血红素降解为胆红素、一氧化碳和 Fe<sup>2+</sup> 的限速酶。HO-1 除了其固有的降解血红素活性外,对炎症反应也具有一定的调控作用<sup>[10]</sup>。本文 LAMPs 可显著诱导滋养层细胞 HO-1 mRNA 和蛋白的表达,并上调其酶活性,而酪氨酸激酶 c-Src 抑制剂 PP1 明显抑制 HO-1 的表达。HO-1 的表达增加被认为是宿主细胞免受免疫病理损伤或应激损伤的一种适应性保护机制。由于血红素是重要的促炎物质,HO-1 促进血红素的降解无疑是其调控细胞因子分泌的重要机制。此外,HO-1 催化血红素降解产物胆红素、一氧化碳和 Fe<sup>2+</sup> 对炎症介质的表达也具有一定程度的抑制作用。

本文同时也显示 LAMPs 可显著诱导 ROS 产生。ROS 虽然有利于清除病原体,但其过度生成对宿主细胞 DNA 和蛋白具有毒性作用。在哺乳动物体内,ROS 可反馈性激活 Nrf2 核转录因子,从而诱导 HO-1 等多种抗氧化相关蛋白的表达<sup>[11]</sup>。生理条件下 Nrf2 定位于细胞质中,在各种外源性刺激作用后,如感染,可引起细胞内 ROS 增多,随后诱导 Nrf2 转位至细胞核,与靶基因启动子结合从而启动其表达,参与调控细胞的抗氧化应激损伤以及炎症反应<sup>[12]</sup>。LAMPs 处理滋养层细胞 60 min 后,可显著增加细胞核内 Nrf2 含量,并持续至 2 h 以上。这表明 LAMPs 可激活滋养层细胞内 Nrf2。为了研究 Nrf2 的激活是否受 ROS 调控,本实验采用 ROS 清除剂 NAC 处理滋养层细胞后,结果发现 LAMPs 诱导 Nrf2 核转位的作用受到明显抑制。同时,NAC 也可抑制 HO-1 的表达,沉默 Nrf2 基因后,HO-1 表达几乎消失。以上结果表明 LAMPs 可能通过 ROS/Nrf2 途径诱导滋养层细胞表达 HO-1。但 ROS 激活 Nrf2 的机制目前仍不完全清楚,可能机制是当细胞内 ROS 浓度增高时,可促使 Nrf2 的抑制蛋白 Keap1 与其解离,从而使其转移至细胞核,随后 Nrf2 结合至靶基因的抗氧化反应元件,启动下游保护性基因的转录。

总之,本研究证实生殖支原体 LAMPs 通过 c-Src/ROS/Nrf2 途径上调滋养层细胞 HO-1 的表达。HO-1 可能通过多种途径调控炎症介质及细胞因子的产生,最终反馈性调控炎症反应的强度,这可能是机体一种获得性的自我保护机制。

#### 参考文献:

[1] Mobley VL, Hobbs MM, Lau K, et al. Mycoplasma genitali-

um infection in women attending a sexually transmitted infection clinic: diagnostic specimen type, coinfections, and predictors [J]. *Sex Transm Dis*, 2012, 39(9): 706-709.

[2] 王专家, 张宇飞, 刘淑英. 绵羊多核绒毛膜滋养层细胞的分离培养与鉴定 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2014, 30(1): 82-86.

[3] Mitsunari M, Yoshida S, Shoji T, et al. Macrophage-activating lipopeptide-2 induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E (2) via toll-like receptor 2 in human placental trophoblast cells [J]. *J Reprod Immunol*, 2006, 72(1-2): 46-59.

[4] Griesinger G, Saleh L, Bauer S, et al. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines of human placental trophoblasts in response to pathogenic bacteria [J]. *J Soc Gynecol Investig*, 2001, 8(6): 334-340.

[5] 马小华, 游晓星, 曾焱华, 等. 支原体巨噬细胞活化脂肽 2 经 MAPKs 和 Nrf2 途径诱导人单核细胞血红素合成酶-1 产生 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2014, 34(4): 289-293.

[6] He J, You X, Zeng Y, et al. Mycoplasma genitalium-derived lipid-associated membrane proteins activate NF-kappaB through toll-like receptors 1, 2, and 6 and CD14 in a MyD88-dependent pathway [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2009, 16(12): 1750-1757.

[7] Kahlo K, Fill MS, Ignatov T, et al. HO-1 as modulator of the innate immune response in pregnancy [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2013, 70(1): 24-30.

[8] Jalali BM, Kitevska A, Wasielek M, et al. Effects of seminal plasma and the presence of a conceptus on regulation of lymphocyte-cytokine network in porcine endometrium [J]. *Mol Reprod Dev*, 2014, 81(3): 270-281.

[9] Sun Q, Chen X, Yu J, et al. Immune modulatory function of abundant immune-related microRNAs in microvesicles from bovine colostrum [J]. *Protein Cell*, 2013, 4(3): 197-210.

[10] Byun SJ, Son Y, Pae HO. Cytoprotective effect of beta-lapachone by inducing heme oxygenase-1 expression and AMP-activated protein kinase activation in human endothelial cells [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2014, 18(7): 949-958.

[11] Cuadrado A, Martin-Moldes Z, Ye J, et al. Transcription factors NRF2 and NF-kappaB are coordinated effectors of the Rho family, GTP-binding protein RAC1 during inflammation [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(22): 15244-15258.

[12] Lee IC, Kim SH, Baek HS, et al. The involvement of Nrf2 in the protective effects of diallyl disulfide on carbon tetrachloride-induced hepatic oxidative damage and inflammatory response in rats [J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 63: 174-185.

(此文编辑: 蒋湘莲)