

肺炎嗜衣原体包涵体膜蛋白 Cpn0147 诱导 单核细胞分泌 TNF- α 和 IL-8

吴 华,卿文衡,刘 军,张黎黎

(衡阳市中心医院检验科,湖南 衡阳 421001)

摘 要: **目的** 探讨肺炎嗜衣原体(Cpn)包涵体膜蛋白 Cpn0147 诱导人单核细胞分泌炎症因子的分子机制。**方法** 用去除内毒素活性的不同浓度 Cpn0147 重组蛋白(1.0、10.0、30.0 和 50.0 $\mu\text{g/mL}$)刺激 THP-1 细胞 0~48 h,ELISA 检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白介素-8(IL-8)的分泌水平;实时定量 PCR 检测 TNF- α 和 IL-8 mRNA 的表达;用 Toll 样受体 2(TLR2)和 TLR4 中和抗体处理 THP-1 细胞,或采用 TLR2 和 TLR4 siRNA 沉默其表达,ELISA 检测 THP-1 处理前后 TNF- α 和 IL-8 分泌的变化。**结果** Cpn0147 可诱导 THP-1 细胞表达 TNF- α 和 IL-8 的 mRNA 和蛋白;同时,不同时间点 Cpn0147 对 TNF- α 和 IL-8 的诱导水平有所不同,Cpn0147 作用 2~6 h 后即可诱导 TNF- α 和 IL-8 分泌,12 h 时达到峰值,随后逐渐下降。采用 TLR2 和 TLR4 中和抗体封闭 THP-1 细胞后,TNF- α 和 IL-8 分泌水平明显减少,采用 TLR2 和 TLR4 siRNA 干扰其表达后,TNF- α 和 IL-8 的分泌也得到了类似的结果。**结论** Cpn0147 可能通过 TLR2 和 TLR4 介导 TNF- α 和 IL-8 分泌。

关键词: 肺炎嗜衣原体; Toll 样受体 2; Toll 样受体 4; 肿瘤坏死因子- α ; 白介素-8

中图分类号: R392.12 **文献标识码:** A

Chlamydomonas pneumonia -Derived Inclusion Membrane Protein Cpn0147 Induces Monocytes Secretion of TNF- α and IL-8

WU Hua, QING Wenheng, LIU Jun, et al

(The clinical laboratory, Center Hospital of Hengyang City, Hengyang, Hunan, 421001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the molecular mechanism of the inclusion membrane protein Cpn0147 on the secretion of cytokines in monocytes. **Methods** Cultured THP-1 cells were stimulated with different concentration of endotoxin-free recombinant inclusion protein (1.0, 10.0, 30.0 and 50.0 $\mu\text{g/mL}$) for 0~48 h. Secretion of TNF- α and IL-8 were detected by ELISA, expression of the mRNA was measured by real-time PCR. In addition, cells were preincubated with Toll-like receptor 2 (TLR2) or TLR4 neutralizing antibody, or transfected with siRNA for TLR2 and TLR4, secretion of TNF- α and IL-8 were detected by ELISA. **Results** Cpn0147 could induce THP-1 cells the secretion of TNF- α and IL-8, and the expression of mRNA. The production of TNF- α and IL-8 varies with time intervals, the ELISA results indicated secretion of cytokines appeared after 2~6 h of stimulation, peaked at 12 h and then decreased. Pre-incubation of TLR2 or TLR4 neutralizing antibody significantly abrogate Cpn0147-induced cytokines production, similar results was also obtained by RNA interference of TLR2 and TLR4. **Conclusion** Cpn0147 can induce TNF- α and IL-8 secretion via TLR2 and TLR4.

Key words: Chlamydomonas pneumonia; Toll-like receptor 2; TLR4; TNF- α ; IL-8

肺炎嗜衣原体(Chlamydomonas pneumonia, Cpn)是一种严格细胞内寄生、具有独特发育周期的原核

细胞型微生物。作为一种常见的呼吸系统感染因子,Cpn 除可引起呼吸道的急、慢性感染、支气管炎和哮喘等呼吸系统疾病外,还和动脉硬化等多种慢性疾病相关^[1]。Cpn 的致病机制目前尚未完全明了,但其感染所致的炎症反应是多种疾病的发病基础。研究表明,衣原体包涵体膜蛋白在致病过程中

发挥重要作用。它不但可激活单核/巨噬细胞、内皮细胞而发挥促炎作用,同时也可通过 TLR2 和 TLR4 诱导 T 细胞增值,并能促进衣原体对宿主细胞的黏附、侵袭,或参与其免疫逃避等过程^[2,3]。因此,研究包涵体膜蛋白的功能,对了解其在衣原体致病中的作用具有重要意义。Cpn0147 是本课题组鉴定出的一种包涵体膜蛋白。前期研究表明,Cpn0147 基因高度保守,并具有良好的免疫原性^[4],但其对宿主细胞是否具有促炎活性目前尚未完全明了,本研究旨在观察体外重组蛋白能否诱导单核细胞分泌细胞因子,并初步探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂 pGEX-6p-2 载体原核表达重组菌由南华大学病原生物学研究所保存;人单核细胞 THP-1 购自 ATCC。HRP 标记的兔抗小鼠 IgG、Amicon? Ultra-15 蛋白超滤管购自 Millipore;抗 TLR2 和 TLR4 中和抗体购自 Novus Biologicals;Ni-NTA Spin Kit 购自 Qiagen 公司;TNF- α 和 IL-8 ELISA 检测试剂盒购自欣博盛生物科技有限公司。RPMI-1640 培养基、胎牛血清购自 Invitrogen;TLR2 和 TLR4 siRNA 购自 Santa Cruz。siRNA 转染试剂盒购自 Qiagen。

1.2 无内毒素的 Cpn0147 的制备与细胞培养

按照本课题组前期方法对 Cpn0147 进行大规模诱导表达^[4]。利用去内毒素纯化柱过柱后,采用蛋白超滤管对其进行浓缩、测定浓度后低温储存备用。THP-1 细胞用含 10% 胎牛血清,100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素,4.5 mg/mL L-谷氨酰胺的 RPMI-1640 培养基中,于 37 °C,5% CO₂ 条件下培养。2~3 天换液一次,待细胞生长至密度为 80% 时,根据不同的实验目的,细胞加入不同浓度的 1.0、10.0、30.0 和 50.0 μ g/mL 作用 0~48 h。

1.4 细胞因子检测 细胞经 Cpn0147 处理结束后,离心弃上清,采用连续冻融 2 次以充分裂解细胞。1 000 rpm 离心 10 min 后,获取上清测定 TNF- α 和 IL-8 含量。操作方法按照试剂盒提供的双抗体夹心法进行。通过测定 450 nm 处的吸光度值,并根据标准曲线计算分泌至细胞外的 TNF- α 和 IL-8 含量。

1.5 实时定量 PCR 检测 TNF- α 和 IL-6 mRNA 表达 根据试剂盒操作步骤提取细胞总 RNA,并取 3 μ g 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:TNF- α 上游引物为

5'-GCCCAGGCAGTCAGATCATC,下游引物为 5'-CG-GTTCAGCCACTGGAGCT-3';IL-8 上游引物为 5'-AT-GACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT-3';下游引物为 5'-TCTCAGCCCTCTTCAAAAACCTCTC-3';GAPDH 上游引物为 5'-ACCAGCCTCAAGATCATCAGCA-3',下游引物为:5'-TGCTAAGCAGTTGGTGGTGC-3',在定量 PCR 仪(ABI 7500)上按以下程序扩增:95 °C 2 min,随后按照以下程序扩增 40 个循环:95 °C 15 s,60 °C 1 min。PCR 结束后计算各处理组中 HO-1 的相对表达量,计算公式:2- $\Delta\Delta$ Ct, $\Delta\Delta$ Ct = 实验组 (CtTNF- α /IL-8-CtGAPDH)-对照组 (Ct TNF- α /IL-8-CtGAPDH)。

1.6 细胞转染 siRNA 转染前,THP-1 细胞更换为无血清培养基同步 18h,随后将其接种于 6 孔板中(密度约为 5×10^5 /mL)。siRNA 转染按照 Qiagen 公司的试剂盒操作步骤进行,将 100 nmol/L TLR2 或 TLR4 siRNA 或对照 siRNA 与转染试剂混合后孵育 18 h。随后更换为完全培养基用于下一步研究。

1.7 Western blot 采用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液 (25 mmol/L Tris-HCl pH7.4, 150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 1% SDS) 裂解细胞,并用 Bradford 法于 595 nm 波长处测定蛋白浓度。取等量蛋白经 8%~10% SDS-PAGE 后,转印至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉封闭后,分别加入一抗和 HRP 标记二抗孵育,ECL 显影。

1.8 统计学分析 所有实验数据重复 3 次,应用 SPSS 17.0 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 Cpn0147 诱导 THP-1 细胞 TNF- α 和 IL-8 mRNA 的表达 THP-1 细胞基础状态下 TNF- α 和 IL-8 表达量很低。当分别给予 1.0、10.0、30.0 和 50.0 μ g/mL Cpn0147 刺激细胞 8 h 后,实时定量 PCR 结果显示 TNF- α 和 IL-8 mRNA 表达量随着 Cpn0147 浓度的递增而增加(图 1)。

2.2 Cpn0147 诱导 THP-1 细胞分泌 TNF- α 和 IL-8 ELISA 结果显示,未经刺激的 THP-1 细胞 TNF- α 和 IL-8 分泌水平很低。经不同浓度重组 Cpn0147 刺激后 12 h 后,细胞上清中 TNF- α 和 IL-8 分泌水平显著增高,其中 50 μ g/mL Cpn0147 作用后, TNF- α 和

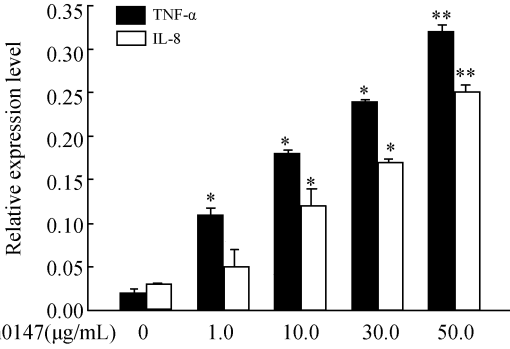


图1 不同浓度 Cpn0147 诱导 THP-1 细胞表达 TNF-α 和 IL-8 mRNA 与对照组(0 μg/mL)相比, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

IL-8 含量分别达 (486.34 ± 33.62) pg/mL 和 (125.47 ± 16.08) pg/mL(图2)。

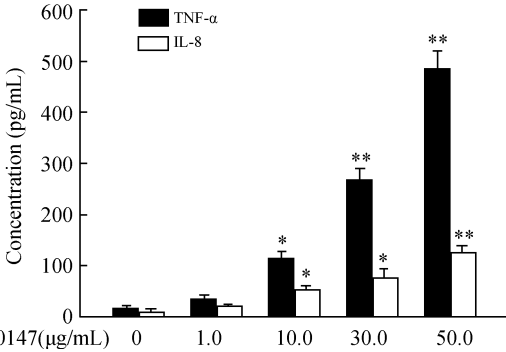


图2 不同浓度 Cpn0147 诱导 THP-1 细胞分泌 TNF-α 和 IL-8 与对照组(0 μg/mL)相比, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

2.3 Cpn0147 诱导 TNF-α 和 IL-8 依赖持续的转录和翻译 不同浓度的 RNA 合成抑制剂放线菌素(ActD)和翻译水平的抑制剂放线菌酮(CHX)预处理 THP-1 细胞后,ELISA 结果显示,TNF-α 和 IL-8 分泌显著降低(图3)。

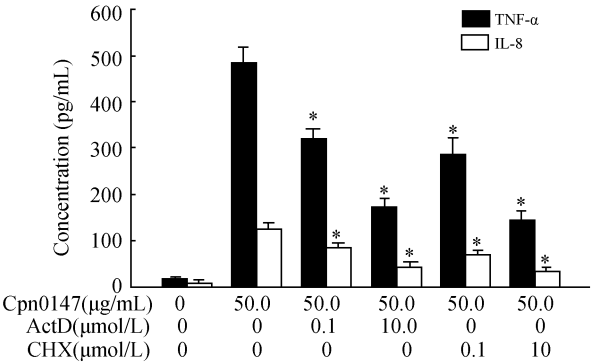


图3 放线菌素和放线菌酮对 Cpn0147 诱导 THP-1 细胞分泌 TNF-α 和 IL-8 的影响 与 Cpn0147(50 μg/mL)相比, *: $P < 0.05$

2.4 Cpn0147 不同时间诱导 TNF-α 和 IL-8 分泌 不同时间点 Cpn0147 对 TNF-α 和 IL-8 的诱导水平有所不同,Cpn0147 作用 2 ~ 6 h 后即可诱导 TNF-α 和 IL-8 分泌,12 h 时达到峰值,随后逐渐下降(图4)。

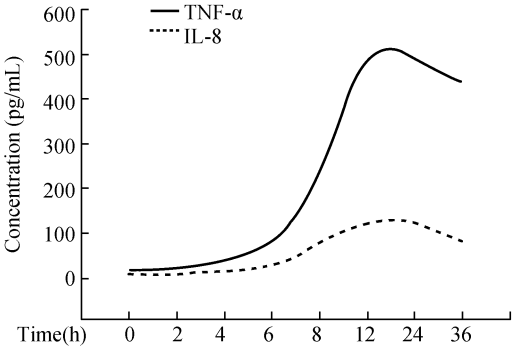


图4 Cpn0147 不同时间诱导 TNF-α 和 IL-8 分泌

2.5 TLR2 和 TLR4 中和抗体抑制 TNF-α 和 IL-8 分泌 THP-1 细胞与 5 μg/mL TLR2 或 TLR4 抗体预孵育 1 h,随后加入 50 μg/mL Cpn0147 刺激 12 h,结果显示 TLR2 和 TLR4 中和抗体处理后,TNF-α 和 IL-8 分泌水平明显降低(图5)。

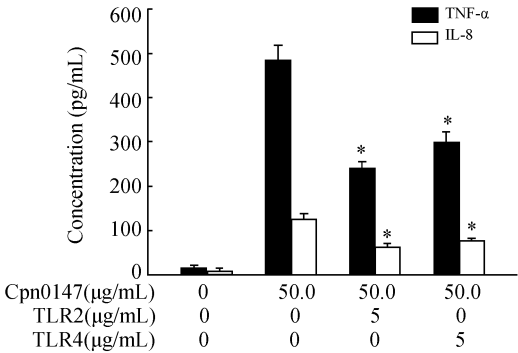


图5 TLR2 和 TLR4 中和抗体对 Cpn0147 诱导 THP-1 细胞分泌 TNF-α 和 IL-8 的影响 与 Cpn0147(50 μg/mL)相比, *: $P < 0.05$

2.6 沉默 TLR2 和 TLR4 表达下调 TNF-α 和 IL-8 分泌 采用 siRNA 转染 THP-1 细胞,分别使其沉默 TLR2 和 TLR4 表达(图6A)。随后加入 50 μg/mL Cpn0147 刺激 12 h,结果显示 RNA 干扰 TLR2 和 TLR4 表达后,TNF-α 和 IL-8 分泌水平明显降低(图6)。

3 讨 论

相对其他致病性较强的病原微生物(如沙眼衣

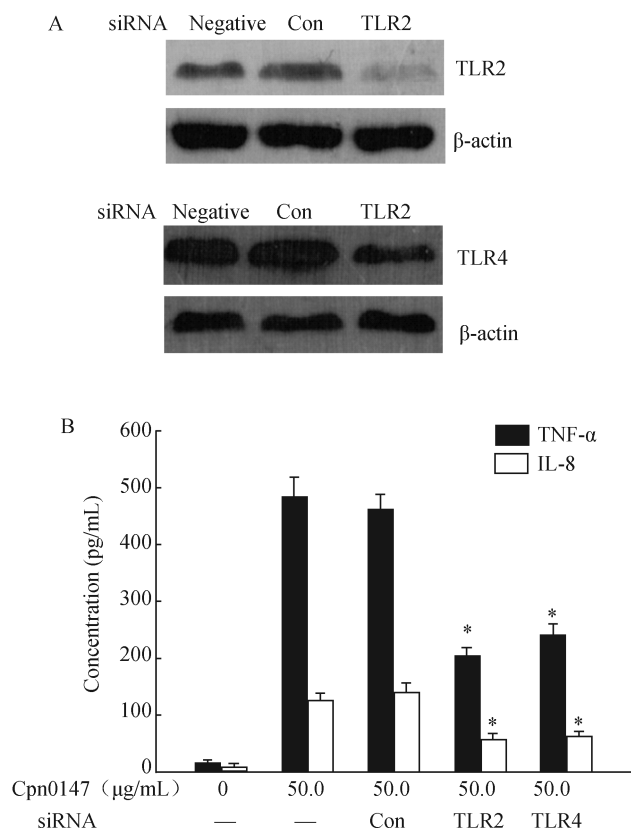


图6 TLR2和TLR4 siRNA对Cpn0147诱导THP-1细胞分泌TNF- α 和IL-8的影响 与对照siRNA(Con)相比, *: $P < 0.05$

原体)而言,Cpn毒力相对较低,其感染人体后并不直接导致严重的病理损伤。但如果Cpn慢性持续性感染后,可诱导宿主细胞产生多种促炎细胞因子以及炎症相关介质的产生,从而造成持续的炎症反应^[5]。Cpn0147为本课题组近期鉴定出来的一种包涵体膜蛋白,它定位于包涵体上,并且具有非常强的抗原性和免疫原性^[4]。包涵体膜是宿主细胞进行物质和信号转导发生的重要场所,其膜蛋白参与了衣原体的生长与致病过程^[3]。由于炎症是机体感染Cpn后所产生的一种免疫反应,它在发挥保护性防御反应的同时,也参与了Cpn所致的病理损伤^[6,7]。为检测Cpn0147是否作为一种炎症诱导物,本研究采用去除内毒素的纯化重组蛋白Cpn0147以不同剂量、不同作用时间体外刺激单核细胞系THP-1,采用ELISA和实时定量PCR对TNF- α 和IL-8蛋白以及mRNA的表达进行了观察。结果显示,Cpn0147与阴性对照组相比,可显著诱导TNF- α 和IL-8的产生,并呈现一定的剂量依赖关系,在1~50 μ g/mL范围内,随着Cpn0147蛋白浓度的增高,TNF- α 和IL-8分泌水平也逐渐升高。并且在50 μ g/mL Cpn0147作用8~12 h后,培养上清中TNF- α 和IL-8水

平达到最峰值,然后逐渐下降。而采用RNA合成抑制剂放线菌素和翻译水平的抑制剂放线菌酮处理后,TNF- α 和IL-8的分泌明显降低,这表明Cpn0147诱导其分泌依赖持续的转录和翻译。TNF- α 是具有多种生物学效应的促炎细胞因子之一,在炎症反应过程中出现最早,能通过与靶细胞膜上的受体结合后,可实现其抗感染与免疫调节功能,同时还可以进一步促进IL-1 β 和IL-6的合成以增强组织细胞敏感性。此外,也有研究证实高胆固醇高血脂症男性患者颈动脉斑块内可以检测到高浓度的Cpn和TNF- α ,这也提示Cpn感染以及TNF- α 与心脑血管疾病有关^[8]。IL-8是CXC家族重要的趋化因子,它可诱导中性粒细胞粘附并渗出至炎症部位,最终促进中性粒细胞产生呼吸爆发,释放各种蛋白水解酶和产生大量的氧自由基,参与局部炎症部位^[9]。

衣原体感染后,机体免疫系统主要通过Toll样受体(Toll-like receptor,TLR)对其进行识别。有研究显示,衣原体热休克蛋白60可能通过TLR4/MAPKs途径诱导血管平滑肌细胞增生^[10],在识别Cpn过程中,TLR2可能发挥更重要的作用^[11]。为了进一步观察Cpn0147诱导TNF- α 和IL-8分泌是否与TLR有关,本研究首先采用TLR2和TLR4中和抗体预处理细胞,结果显示通过抗体封闭TLR2和TLR4后,TNF- α 和IL-8分泌显著降低。随后采用siRNA沉默TLR2和TLR4后,也得到了类似的结果。目前有关Cpn重组蛋白与TLR的关系,还存在争议,其原因主要在于重组Cpn0147制备过程中虽然有被内毒素污染的可能^[6],但本研究在纯化Cpn0147过程中,采用了去内毒素纯化柱进行纯化,并采用鲎试剂对纯化产物进行了检测,其水平在60 pg/mL以下。这表明Cpn0147被内毒素污染的可能性很小。

总之,Cpn所致炎症反应是一种复杂的生理和病理过程,一方面它是机体清除衣原体感染所必须,另一方面,过度的炎症反应也是导致病理损伤的重要因素。在该过程中,各种细胞因子网络的平衡直接决定了炎症反应的最终结局。如何在两者之间寻求平衡是今后研究工作所面临的复杂问题。

参考文献:
[1] Fajardo KA, Zorich SC, Voss JD, et al. Pneumonia Outbreak Caused by Chlamydia pneumoniae among US Air Force Academy Cadets, Colorado, USA[J]. Emerg Infect Dis, 2015, 21(6):1049-1051. (下转第684页)

(上接第 617 页)

- [2] Mueller KE, Wolf KC. pneumoniae disrupts eNOS trafficking and impairs NO production in human aortic endothelial cells[J]. Cell Microbiol, 2015, 17(1): 119-130.
- [3] Ishida K, Matsuo J, Yamamoto Y, et al. Chlamydia pneumoniae effector chlamydial outer protein N sequesters fructose bisphosphate aldolase A, providing a benefit to bacterial growth[J]. BMC Microbiol, 2014, 14: 330.
- [4] 代国知, 马忠夏, 周安文, 等. 肺炎嗜衣原体 cpn0147 重组蛋白的免疫学活性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(14): 1671-1672.
- [5] Jha HC, Srivastava P, Vardhan H, et al. Chlamydia pneumoniae heat shock protein 60 is associated with apoptotic signaling pathway in human atheromatous plaques of coronary artery disease patients[J]. J Cardiol, 2011, 58(3): 216-225.
- [6] Gao B, Tsan MF. Recombinant human heat shock protein 60 does not induce the release of tumor necrosis factor alpha from murine macrophages[J]. J Biol Chem, 2003, 278(25): 22523-22529.
- [7] Marangoni A, Bergamini C, Fato R, et al. Infection of hu-

man monocytes by Chlamydia pneumoniae and Chlamydia trachomatis: an in vitro comparative study[J]. BMC Res Notes, 2014, 7: 230.

- [8] Kaperonis EA, Liapis CD, Kakisis JD, et al. The association of carotid plaque inflammation and Chlamydia pneumoniae infection with cerebrovascular symptomatology[J]. J Vasc Surg, 2006, 44(6): 1198-1204.
- [9] Rizzo A, Misso G, Bevilacqua N, et al. Zoledronic acid affects the cytotoxic effects of Chlamydia pneumoniae and the modulation of cytokine production in human osteosarcoma cells[J]. Int Immunopharmacol, 2014, 22(1): 66-72.
- [10] Sasu S, LaVerda D, Qureshi N, et al. Chlamydia pneumoniae and chlamydial heat shock protein 60 stimulate proliferation of human vascular smooth muscle cells via toll-like receptor 4 and p44/p42 mitogen-activated protein kinase activation[J]. Circ Res, 2001, 89(3): 244-250.
- [11] Prebeck S, Kirschning C, Durr S, et al. Predominant role of toll-like receptor 2 versus 4 in Chlamydia pneumoniae-induced activation of dendritic cells[J]. J Immunol, 2001, 167(6): 3316-3323.

(此文编辑: 秦旭平)