DOI:10.15972/j.cnki.43-1509/r.2016.03.006 ·基础医学·

梅毒螺旋体纤连蛋白结合蛋白 Tp0136 前炎症活性的研究

肖勇健[1,2],刘卓然[1],赵飞骏[2],余 坚[2],曾铁兵[2]
(1.南华大学附属第二医院检验科,湖南 衡阳 421001;2.南华大学病原生物学研究所)

摘 要:目的 初步研究梅毒螺旋体纤连蛋白结合蛋白 Tp0136 潜在的前炎症活性。 **方法** 构建重组质粒 pET-28a/Tp0136 并诱导其表达目的蛋白;将不同浓度(1、2、5、10 μg/mL)的 rTp0136 分别刺激 THP-1 源性巨噬细胞,ELISA 法分别检测其产生前炎症细胞因子 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的水平;并同时用二硫代氨基甲酸吡咯烷(PDTC)预先处理巨噬细胞,检测相应细胞因子分泌量。 **结果** 成功构建了 pET-28a/Tp0136 重组质粒,并诱导表达和纯化出 rTp0136;重组蛋白能诱导巨噬细胞产生 IL-1β、IL-6 和 TNF-α,并且呈浓度和时间依赖性;重组蛋白刺激经 PDTC 预处理后的巨噬细胞,其 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的分泌水平分别降至 32%、35%和 27%。 **结论** rTp0136 可诱导巨噬细胞产生前炎症细胞因子,该过程可能受 NF-κB 调控。

关键词: 梅毒螺旋体; 纤连蛋白结合蛋白; Tp0136; 前炎症细胞因子; 核因子 kappa B
中图分类号:R759.1 **文献标识码:**A

Proinflammatory Activity of Recombinant Fibronectin-Binding Proteins Tp0136 of Treponema Pallidum

XIAO Yongjian, LIU Zhuoran, ZHAO Feijun, et al
(*Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan* 421001, *China*)

Abstract: Objective To explore potential proinflammatory activity of the Treponema pallidum fibronectin-binding protein (FnBP) Tp0136. **Methods** The recombinant pET-28a/Tp0136 was constructed and induced to express the targeting protein in *E.coli* BL21. In vitro various concentrations of protein was used to stimulate human macrophages derived from THP-1 cell line at different time. ELISA was performed to detect the level of proinflammatory cytokines IL-1β, IL-6 and TNF-α; Recombinant protein was used to stimulate the macrophages pre-treated with PDTC, and ELISA was performed to detect the releasing IL-1β, IL-6 and TNF-α respectively. **Results** The recombinant plasmid was constructed and the corresponding recombinant protein was obtained successfully; rTp0136 could induce production of IL-1β, IL-6 and TNF-α in dose- and time-dependent manners significantly. Secretion of IL-1β, IL-6 and TNF-α decreased to 32%, 35% and 27% respectively when macrophages was pre-treated with PDTC. **Conclusion** The data suggested that the FnBP Tp0136 could activate the THP-derived human macrophages to release the proinflammatory cytokines, which might be regulated via NF-κB.

Key words: Treponema pallidum; fibronectin-binding protein (FnBP); Tp0136; proinflammatory cytokines; NF-κB

梅毒(Syphilis)是由梅毒螺旋体(Treponema pallidum, Tp)感染引起的一种性传播疾病(STD),其病程较长,临床症状复杂多变,并且其与 AIDS 的发生发展密切相关[1]。上世纪 90 年代以来,全球每年大约有 1 200 万梅毒新发病例,已严重危害公众的身心健康[2],成为我国乃至全世界共同面对的社会问题和公共卫生问题[3-4],而对于 Tp 致病机制的阐明将为梅毒的防治提供有力的理论基础。

纤连蛋白结合蛋白(fibronectin-binding proteins, FnBP)作为病原体上的膜蛋白,在粘附宿主、定植等

收稿日期:2015-11-17;**修回日期:**2016-04-20
基金项目:湖南省医药卫生科研计划项目(No:B2012-055);湖南省科技厅一般项目(No:2014TT2025);湖南省医药卫生科研计划项目(No:B2013-035).

的过程中具有非常重要的作用,是造成宿主感染的一种非常重要的毒力因子[5-6]。Tp0136 为近年来新发现的一种 Tp 主要的 FnBP[7],其主要介导 Tp 与宿主细胞的结合,也可介导 Tp 结合细胞间质中的 Fn,是机体较早接触的 Tp 膜蛋白之一,在感染早期可引起宿主产生较强的体液免疫应答,此外,Tp0136 是否具有与其他膜脂蛋白[8-10]类似前炎症效应,目前尚不明确。本文将探讨 Tp0136 潜在的炎症活性以及激活是否受 NF-κB 调控,为阐明 Tp0136 在 Tp 感染所致损伤中的作用提供理论基础和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 菌株和质粒 Tp Nichols 标准株、表达菌 *E. coli* BL21(DE3)、pET-28a 质粒、人单核细胞(THP-1)均为南华大学病原生物学研究所保存。

1.1.2 试剂和试剂盒 Pfu PCR MasterMix 试剂盒(北京天根公司)、辣根过氧化酶(HRP)标记羊抗人 IgG(大连宝生物公司);DNA 分子量标准、蛋白分子量标准(北京天根公司);限制性内切酶 *Bam*H Ⅰ、*Eco*R Ⅰ、T4 连接酶(NEB 公司);Ni-NTA 亲和层析柱、PCR 产物回收试剂盒(Qiagen 公司);BCA 微量蛋白测定试剂盒(Pierce 公司)、ECL 蛋白印迹法检测试剂盒(Pierce 公司),Detoxi-GelTM 内毒素去除胶(Thermo Scientific 公司),显色基质鲎试剂盒(厦门鲎试剂公司),IL-1β、IL-6 和 TNF-α 试剂盒(R&D 生物制剂有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 Tp 0136 基因的扩增 在线(www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)获取 Tp 0136 的全基因序列(基因编号:CP004010),应用 Signal P 4.1 软件作信号肽序列分析(www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/),去除信号肽序列,设计引物(由上海生工合成),上游引物 F:5′-CGGGATCCCGCGATTTCACTGGCATCTTTG-3′,下划线为 *Bam*HⅠ酶切位点,下游引物 R:5′-GGAATTC-CTACTCGCGGTTCCAGGAGCA-3′,下划线为 *Eco*RⅠ酶切位点;PCR 扩增体系:2×Pfu PCR MasterMix 12.5 μL、10 μmol/L 引物各 1 μL、Tp DNA 模板 2 μL、加 ddH_2O 补至 25 μL。扩增条件:94 ℃5 min;94 ℃ 30 s、66 ℃ 30 s、72 ℃ 1 min 30 s,共 35 个循环;72 ℃延伸10 min。琼脂糖凝胶电泳后,在凝胶成像仪(Bio-rad 公司)中观察目的条带。回收、纯化 PCR 产物,备用。

1.2.2 重组体 pET-28a/Tp 0136 的构建与鉴定 将纯化后的 PCR 产物和 pET-28a 质粒分别用限制性内切酶 *Bam*H Ⅰ 和 *Eco*R Ⅰ 双酶切,再用 T4 连接酶将按比例混合的酶切产物进行连接、转化至处于感受态的克隆菌 *E.coli* JM 109 中,培养 48 h 后筛选阳性克隆,作酶切鉴定和 PCR 鉴定,初步鉴定的阳性质粒送上海生工公司进行测序。再将经测序鉴定正确的 pET-28a/Tp 0136 转化至表达菌 *E. coli* BL21(DE3)中构建重组表达体。

1.2.3 Tp 0136 重组蛋白的表达、纯化及鉴定 IPTG 诱导重组体 pET-28a/Tp 0136 表达目的蛋白,同时设未诱导组及阴性对照组,SDS-PAGE 分析表达结果。大规模诱导重组菌,收集菌体,加入溶菌酶作用,超声裂解菌体后离心收集沉淀制备包涵体,包涵体充分溶解后用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化,具体操作步骤按试剂盒中说明书。纯化产物采用尿素梯度透析复性后,作 SDS-PAGE 分析及 Western blot 鉴定;按 BCA 法测定重组蛋白的浓度;重组蛋白经 Detoxi-GelTM 内毒素去除胶过柱,然后用显色基质鲎试剂盒测定其内毒素含量。

1.2.4 THP-1 细胞培养及刺激试验 于 RPMI-1640 培养基(含 10% 胎牛血清)中加入人单核细胞系 THP-1 细胞,置 37 ℃,5% CO_2 恒温细胞培养箱中培养,每 3 天传代 1 次。于传代后第 1 天收集细胞,按 1×10^6/mL 细胞数接种于细胞培养板中,每孔加至 2 mL RPMI-1640 培养基,为刺激 THP-1 细胞转化为巨噬细胞,再加入终浓度为 100 nmol/L 的佛波酯(PMA),继续培养 2 天后,实验组分别加入终浓度为 1、2、5、10 μg/mL 重组蛋白的无血清培养液,继续培养。另外,为评价 Tp 0136 重组蛋白刺激巨噬细胞产生 CKs 的时间依赖性,于培养液中加入终浓度为 5 μg/mL 的重组蛋白分别培养 6、12、24、48、60、72 h。各实验组均设 LPS (100 ng/mL)为阳性对照、PBS 为阴性对照。各组均设 3 个平行试验。为了评价 CKs 的分泌是否受 NF-κB 通路的调控,另用 25 μmol/L PDTC 预处理巨噬细胞 30 min,再以 5 μg/mL的重组蛋白刺激巨噬细胞,继续培养 24 h。

1.2.5 ELISA 检测 CKs 将已贴壁的巨噬细胞用 PBS 吹打、冲洗 3 次,再用 0.1% Triton X-100 处理 30 min,反复冻融细胞 2 次,离心,收集上清液,按 ELISA 试剂盒说明书测定上清液中 IL-1β、IL-6 和

TNF-α 的含量。

1.3 **统计学方法** 所有实验均重复 3 次,实验数据用均数±标准差表示,运用 SPSS13.0 软件,均数之间比较采用 t 检验和 One way ANOVA 方差分析,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 **重组体 pET-28a/Tp 0136 的鉴定** 以重组质粒为模板,PCR 扩增出约 1 400 bp 的 DNA 片段,与预期结果相符;重组质粒经 *Bam*H Ⅰ 和 *Eco*R Ⅰ 双酶切后,得到与 PCR 产物一致的条带(图 1);测序结果经 BLAST 后证实与 GenBank 中公布的 Tp 0136 序列完全一致。

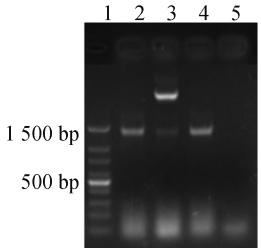

图 1 pET-28a/Tp 0136 重组质粒双酶切鉴定及菌液 PCR 鉴定 1:DNA marker;2:以 Tp Nichols 株 DNA 为模板的扩增产物;3:pET-28a/Tp 0136 双酶切;4:重组质粒的扩增产物;5:PCR 阴性对照

2.2 **Tp 0136 重组蛋白的表达、纯化及鉴定** 含 pET-28a/Tp0136 的 *E.coli* BL21 经 IPTG 诱导后,表达出一分子量约 50 kDa 大小条带的目的蛋白,与预期结果相符(见图 2A);存在于包涵体的融合蛋白采用 Ni-NTA 亲和层析纯化柱以及 pH 梯度洗脱法纯化,见图 2B;纯化后目的蛋白用尿素梯度透析复性后,分别以 6×His-Tag 单抗和梅毒患者血清为一抗作 WB 鉴定,结果显示在相应位置出现单一特异性条带,见图 3;BCA 法测定蛋白浓度为270 μg/mL;重组蛋白经内毒素去除胶去除所含内毒素后,用鲎试剂检测其内毒素含量<0.04 EU/mL,符合后续试验要求。

2.3 **Tp 0136 重组蛋白刺激 THP-1 源性巨噬细胞产生 CKs** rTp 0136 呈现以剂量依赖方式和时间依赖方式刺激巨噬细胞产生 CKs(图 4)。用重组蛋白刺激巨噬细胞后,能明显诱导后者产生 IL-1β、IL-6 和 TNF-α,其产量并且随着蛋白浓度的增加而增加,至 5 μg/mL 达到峰值,峰值分别为 195.51±14.73 pg/mL、170.19±4.38 pg/mL、1732.90±44.52 pg/mL,随后呈下降趋势,实验组 CKs 的分泌量均明显高于同浓度的对照组,经 t 检验和 One way ANOVA 方差分析,得 IL-1β 组($F=216.179$,$P=0.00$)、IL-6 组($F=283.275$,$P=0.00$)和 TNF-α 组($F=1880.739$,$P=0.00$),其差异有统计学意义。当用 5 μg/mL rTp0136 刺激巨噬细胞,在 24 h 内随刺激时间增加,诱导巨噬细胞产生 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的水平也增加,其中 TNF-α 的水平于 24 h 时达到高峰,为 1662±87.9 pg/mL,IL-1β、IL-6 的水平于48 h时达到高峰,为 332.5±16.4 pg/mL、145.7±11.4 pg/mL(图 4B)。

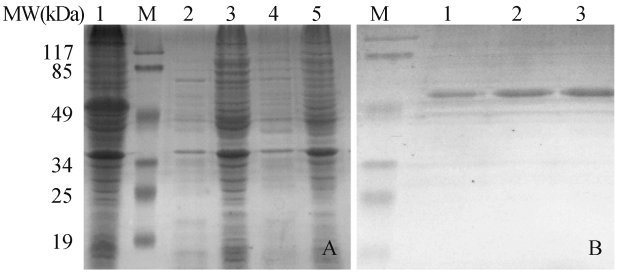

图 2 rTp 0136 电泳图 A:rTp 0136 的表达,M:蛋白分子量;1:经 IPTG 诱导的 pET-28a/Tp 0136 沉淀;2:诱导的 pET-28a/Tp 0136 上清;3:未诱导的 pET-28a/Tp 0136 沉淀;4:未诱导的 pET-28a/Tp 0136 上清;5:诱导的阴性克隆;B:rTp 0136 的纯化,M:蛋白分子量;1-3:纯化后的 rTp 0136

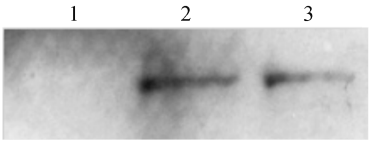

图 3 Tp 0136 重组蛋白的 WB 鉴定 1:阴性对照;2:梅毒患者血清;3:6 × His-Tag 单抗

2.4 **NF-κB 与 CKs 产生的关系** 巨噬细胞经 PDTC 预处理后,rTp0136 刺激其 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的产量分别降至对照组(经 DMSO 处理)32%、35%和 27%,见图 5。rTp0136 刺激巨噬细胞产生 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 可能受 NF-κB 通路的调控。

3 讨 论

Tp 目前尚未证明有明显的致病物质,如荚膜、内毒素和外毒素等致病因子。资料表明[5-6],病原菌外膜上的 FnBP 能与 ECM 的纤连蛋白(Fn)结合,在细菌粘附宿主细胞等的过程中具有非常重要的作用,是引起宿主感染重要的毒力因子。同样 Tp 外膜蛋白中的 FnBP 在 Tp 入侵宿主的初始阶段,如粘附、定植等致病环节中也发挥着重要作用[7]。此

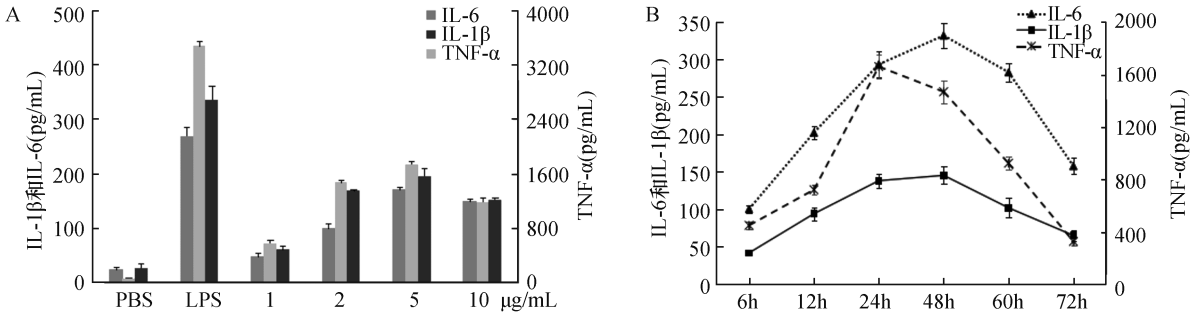

图 4 梅毒螺旋体纤连蛋白 rTp0136 以剂量和时间依赖方式诱导 THP-1 源性巨噬细胞产生 IL-1β、IL-6 和 TNF-α A:分别用不同浓度重组蛋白刺激巨噬细胞后,IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的产生量,其中 LPS 为阳性对照,PBS 为阴性对照(均为三次平行试验);B:5 μg/mL rTp0136 刺激巨噬细胞后,在不同时间点 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的产生量(均为三次平行试验)

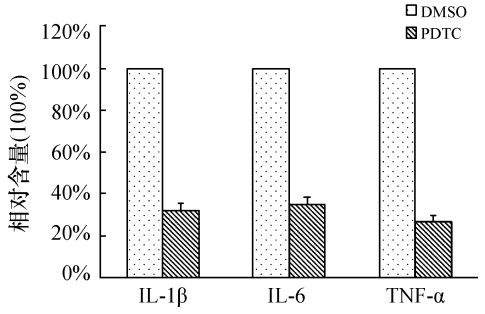

图 5 NF-κB 抑制剂 PDTC 对巨噬细胞分泌 CKs 的影响

外,Tp 感染宿主后,细胞免疫在致病过程中起着重要作用[8],一方面能清除螺旋体,另一方面又导致局部组织病理损伤,这主要是由于 Tp 在感染部位繁殖后,某些菌体成分可激活局部或/和邻近的单核/巨噬细胞,诱导合成和释放一系列炎性介质,引起炎症反应,形成梅毒下疳。

目前已有研究[8-10]表明,Tp 的膜蛋白 TpN47、TpN17、Tp0751 和 Tp0663 均可诱导单核/巨噬细胞释放前炎症细胞因子。Tp 0136 作为一种膜脂蛋白,属于 FnBP 家族,在感染早期,即可产生较强的体液免疫应答[11],另外,Tp 0136 主要依靠其氨基末端结合宿主细胞的 Fn[12],从而使螺旋体粘附于宿主细胞,为病原体在局部定植提供保证,但其是否具有促前炎症活性作用还不明确。本研究采用人单核细胞(THP-1)源性的巨噬细胞为研究对象,在体外环境模拟人体对 Tp 感染后的免疫应答。IL-1β、IL-6 和 TNF-α 是重要的促炎因子,能介导机体的炎症反应和免疫调节等。本研究显示,Tp 0136 蛋白能诱导人巨噬细胞分泌 IL-1β、IL-6 和 TNF-α,分泌量与蛋白浓度和诱导时间呈一定的依赖关系。随着刺激浓度增大,分泌量亦增加,在蛋白刺激浓度为5 μg/mL,IL-1β、IL-6 和 TNF-α 分泌量达到高峰;在刺激时间上,TNF-α 出现峰值时间在 24 h,而 IL-1β、IL-6 峰值时间在 48 h。当高于此浓度和此刺激时间后,CKs 的产生量明显减少,可能是由于浓度过高和刺激时间过长会干扰巨噬细胞正常的生物学功能,从而导致 CKs 分泌的减少[9]。

NF-κB 作为一个早期转录因子,是各种炎症反应的共同通路,参与免疫反应的早期和炎症反应各阶段的许多分子(其中包括 IL-1β、IL-6 和 TNF-α)都受到其调控,在多种生理及病理情况下有重要作用[13]。本文利用 NF-κB 特异抑制剂 PDTC 预处理巨噬细胞后,发现其能明显抑制 rTp0136 诱导的 NF-κB 活化,使 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 分泌减至 20%~30%左右,表明 rTp0136 诱生 THP-1 源性巨噬细胞产 CKs 可能经 NF-κB 通路调控。

由于 Tp 至今尚不能体外人工培养[8],很大程度上制约了对其深入研究。本研究利用分子克隆技术,成功表达去信号肽的 rTp0136,初步证实 Tp0136 蛋白作为一种膜脂蛋白,具有与 TpN47、TpN17、Tp0751 和 Tp0663 等类似的前炎症活性,在体外能够诱导人巨噬细胞产生 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 等前炎症因子,该过程可能受 NF-κB 通路的调节。诚然,本研究尚有不足之处,比如 Tp0136 蛋白是否还可刺激巨噬细胞产生其他的细胞因子,该过程是否还受到其他信号通路的调节,比如 TLR-MAPK 通路等,这些均有待进一步证实。

参考文献:

[1] Sellati TJ, Wilkinson DA, Sheffield JS, et al. Virulent Treponema pallidum, lipoprotein, and synthetic lipopeptides induce CCR5 on human monocytes and enhance their susceptibility to infection by human immunodeficiency virus type 1[J]. J Infect Dis, 2000, 181(1): 283-293.

(下转第 295 页)

标志物进行评估。结果显示相比正常前列腺组织，ACAT1 显著高表达于前列腺癌组织中。这一研究与 ACAT1 在乳腺癌组织中的表达水平明显高于其正常组织的结果一致[5-6]。临床因素分析显示，ACAT1 的表达水平与 Gleason score 分级和肿瘤病理分期有关，而与前列腺癌患者年龄、外周血 PSA 水平无关。相比中/高分化肿瘤，ACAT1 在低分化(GS≥7)前列腺癌中表达升高。同样，与器官局限性 pT2 肿瘤比，ACAT1 在晚期 pT3 肿瘤中表达明显升高，而这些通常与不良预后是联系在一起的[7]。但是，ACAT1 在前列腺癌中的具体作用及作用机制有待于进一步研究。在后续的研究中，本文作者将进一步验证 ACAT1 的功能，揭示 ACAT1 在前列腺癌中的作用及其作用机制。

参考文献：

[1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2015, 65(1): 5-29.

[2] Saraon P, Jarvi K, Diamandis EP. Molecular alterations during progression of prostate cancer to androgen independence[J]. Clin Chem, 2011, 57(10): 1366-1375.

[3] 梁寒. 第 7 版 UICC-AJCC 胃癌 TNM 分期及日本胃癌新分期胃癌治疗指南的临床应用前景[J]. 中国肿瘤临床, 2012, 39(20): 1466-1471.

[4] Saraon P, Cretu D, Musrap N, et al. Quantitative proteomics reveals that enzymes of the ketogenic pathway are associated with prostate cancer progression[J]. Mol Cell Proteomics, 2013, 12(6): 1589-1601.

[5] Martinez-Outschoorn UE, Lin Z, Whitaker-Menezes D, et al. Ketone bodies and two-compartment tumor metabolism: stromal ketone production fuels mitochondrial biogenesis in epithelial cancer cells[J]. Cell Cycle, 2012, 11(21): 3956-3963.

[6] Martinez-Outschoorn UE, Lin Z, Whitaker-Menezes D, et al. Ketone body utilization drives tumor growth and metastasis[J]. Cell Cycle, 2012, 11(21): 3964-3971.

[7] Brimo F, Montironi R, Egevad L, et al. Contemporary grading for prostate cancer: implications for patient care[J]. Eur Urol, 2013, 63(5): 892-901.

(本文编辑：蒋湘莲)

(上接第 266 页)

[2] Gerbase AC, Rowley JT, Heymann DH, et al. Global prevalence and incidence estimates of selected curable STDs[J]. Sex Transm Infect, 1998, 74(Suppl 1): S12-16.

[3] Tucker JD, Cohen MS. China's syphilis epidemic: epidemiology, proximate determinants of spread, and control responses[J]. Curr Opin Infect Dis, 2011, 24(1): 50-55.

[4] Stephenson J. Syphilis outbreak sparks concerns[J]. JAMA, 2003, 289(8): 974.

[5] Peacock SJ, Foster TJ, Cameron BJ, et al. Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of Staphylococcus aureus to resting human endothelial cells[J]. Microbiology, 1999, 145 (Pt 12): 3477-3486.

[6] Rivera J, Vannakambadi G, Hook M, et al. Fibrinogen-binding proteins of Gram-positive bacteria[J]. Thromb Haemost, 2007, 98(3): 503-511.

[7] Brinkman MB, McGill MA, Pettersson J, et al. A novel Treponema pallidum antigen, TP0136, is an outer membrane protein that binds human fibronectin[J]. Infect Immun, 2008, 76(5): 1848-1857.

[8] Lafond RE, Lukehart SA. Biological basis for syphilis[J]. Clin Microbiol Rev, 2006, 19(1): 29-49.

[9] Liu S, Wang S, Wu Y, et al. Production of proinflammatory cytokines in the human THP-1 monocyte cell line following induction by Tp0751, a recombinant protein of Treponema pallidum[J]. Sci China Life Sci, 2010, 53(2): 229-233.

[10] 刘小军，张跃军，吴移谋，等. 梅毒螺旋体重组蛋白 Tp0663 前炎症活性的研究[J]. 中国现代医学杂志, 2013, (28): 15-19.

[11] Brinkman MB, McKevitt M, McLoughlin M, et al. Reactivity of antibodies from syphilis patients to a protein array representing the Treponema pallidum proteome[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(3): 888-891.

[12] Ke W, Molini BJ, Lukehart SA, et al. Treponema pallidum subsp. pallidum TP0136 protein is heterogeneous among isolates and binds cellular and plasma fibronectin via its NH2-terminal end[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2015, 9(3): e0003662.

[13] May MJ, Ghosh S. Signal transduction through NF-kappa B[J]. Immunol Today, 1998, 19(2): 80-88.

(本文编辑：蒋湘莲)