

梅毒螺旋体膜脂蛋白 Tp0821 促炎活性研究

吴志周,文美贞,柯建良,祝新,谭雪玲

(江门市皮肤医院检验科,广东 江门 529000)

摘要: **目的** 探讨梅毒螺旋体(Tp)膜脂蛋白 Tp0821 潜在的促炎活性及可能参与的信号转导通路。 **方法** 表达重组蛋白 Tp0821(rTp0821),去除其中内毒素。rTp0821 刺激 THP-1 细胞,ELISA 检测促炎细胞因子 IL-6、IL-8 和 IL-1 β 的表达水平;ERK1/2、JNK、p38 和 NF- κ B 特异性抑制剂分别预处理 THP-1 细胞 30 min,再以 rTp0821 刺激 THP-1 细胞,ELISA 分别检测 IL-6、IL-8 和 IL-1 β 的表达水平。 **结果** rTp0821 刺激 THP-1 细胞表达 IL-6、IL-8 和 IL-1 β 在一定范围内与刺激时间以及蛋白浓度呈正相关,1.0 μ g/mL 刺激 24 h 时各细胞因子表达水平最高;rTp0821 刺激经 ERK1/2、JNK、p38 和 NF- κ B 特异性抑制剂预处理后的 THP-1 细胞,IL-6 表达水平分别下降 63.4% ($P < 0.001$)、4.3% ($P > 0.05$)、53.4% ($P < 0.001$) 和 73.1% ($P < 0.0001$),IL-8 分别下降 49.2% ($P < 0.001$)、6.0% ($P > 0.05$)、41.1% ($P < 0.001$) 和 71.0% ($P < 0.001$),IL-1 β 分别下降 36.8% ($P < 0.01$)、3.9% ($P > 0.05$)、30.3% ($P < 0.001$) 和 59.7% ($P < 0.001$)。 **结论** rTp0821 可通过 ERK1/2、p38 和 NF- κ B 通路诱导 THP-1 细胞表达促炎细胞因子 IL-6、IL-8 和 IL-1 β ,Tp0821 可能是 Tp 重要的致病因子。

关键词: 梅毒螺旋体; 膜脂蛋白; Tp0821; 促炎细胞因子; 信号转导通路

中图分类号:R377.1 文献标识码:A

Proinflammatory Effect of *Treponema Pallidum* Membrane Lipoprotein Tp0821

WU Zhizhou, WEN Meizhen, KE Jianliang, et al

(Department of Clinical Laboratory, Jiangmen Dermatology Hospital, Jiangmen, Guangdong 529000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the proinflammatory effect of *Treponema pallidum* membrane lipoprotein Tp0821 and related signal transduction pathways and provide experimental basis for the clarification of pathogenesis mechanisms of *T. pallidum*. **Methods** The recombinant protein Tp0821 (rTp0821) was expressed and the endotoxin in rTp0821 was removed. ELISA was used to detect the expression of proinflammatory cytokines IL-6, IL-8, and IL-1 β of human THP-1 cells stimulated with rTp0821. Furthermore, rTp0821 was used to stimulate human THP-1 cells pretreated with the ERK1/2 inhibitor PD98059, p38 inhibitor SB203580, and NF- κ B inhibitor BAY11-7082, respectively, and then ELISA was performed for detection of the expression level of proinflammatory cytokines. **Results** rTp0821 possesses the ability to induce THP-1 cells to secrete IL-6, IL-8, and IL-1 β in dose- and time-dependent manners. The expression level of proinflammatory cytokines peaked when THP-1 cells were stimulated with 1.0 μ g/mL of rTp0821 for 24 hours. Moreover, when pretreated with PD98059, SP600125, SB203580, and BAY11-7082, respectively, THP-1 cells decreases expression of IL-6 by 63.4% ($P < 0.001$), 4.3% ($P > 0.05$), 53.4% ($P < 0.001$), and 73.1% ($P < 0.0001$), IL-8 by 49.2% ($P < 0.001$), 6.0% ($P > 0.05$), 41.1% ($P < 0.001$), and 71.0% ($P < 0.001$), IL-1 β by 36.8% ($P < 0.01$), 3.9% ($P > 0.05$), 30.3% ($P < 0.001$), and 59.7% ($P < 0.001$), respectively. **Conclusion** These data indicate that the rTp0821 may activate the THP-1 cells to produce the proinflammatory cytokines via ERK1/2, P38, and NF- κ B signal transduction pathways and membrane lipoprotein Tp0821 might be an important pathogenic factor.

Key words: *Treponema pallidum*; membrane lipoprotein; Tp0821; proinflammatory cytokines; signal transduction pathways

梅毒是由梅毒螺旋体(*Treponema pallidum*, Tp)引起的一种性传播疾病。近年来梅毒发病率居高不下,全球每年大约新发 1 200 万梅毒病例,已经成为全球严重的公共卫生问题^[1]。Tp 不能在体外培养的特性严重限制了其致病分子和致病机制研究^[2]。目前的研究表明,Tp 膜脂蛋白引起的炎症可能是介导 Tp 感染后机体病理损伤的主要原因^[3]。

同其他膜脂蛋白一样^[4],Tp0821 膜脂蛋白具有良好的免疫原性和抗原性^[5],但其是否还具有促炎活性以及是否参与介导机体的炎症反应尚不明确。本研究旨在探讨 Tp0821 潜在的促炎活性以及可能参与活化的信号转导通路,为阐明 Tp 致病机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

Tp Nichols 标准株以及人单核细胞(THP-1 细胞)均由南华大学病原生物学研究所馈赠。BamHI 和 XhoI 限制性内切酶购自美国 NEB 公司,Ni-NTA 亲和层析纯化试剂盒、Detoxi-Gel TM 内毒素去除胶、T4 连接酶、胎牛血清以及 Anti-His 单克隆抗体购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,HRP-羊抗小鼠 IgG 购自美国 Millipore 公司,ECL 蛋白印迹法检测试剂盒、IL-6 和 IL-8 ELISA 试剂盒为英国 Abcam 公司产品。从南华大学附属第一医院和广东省江门市皮肤医院收集 60 份梅毒患者血清和 40 份正常血清。梅毒患者血清由临床诊断确诊(RPR 和 TPPA 血清学试验阳性、特异的临床症状以及不洁性接触史)。

1.2 方法

1.2.1 重组 Tp0821(rTp0821)的表达、纯化与鉴定

从 GenBank 中获取 *tp0821* 基因序列,设计引物(上海英潍捷基公司合成)。上游引物为 5'-CGCGGATC-CATGAAAGGAAAAACGGTGAG-3',下划线为 BamHI 酶切位点;下游引物为 5'-CCGCTCGAGCTACAAAG-CAGGCGCCACC-3',下划线为 XhoI 酶切位点。以 Tp Nichols 株 DNA 为模板,PCR 扩增 *tp0821* 基因,构建 pET28a(+)/Tp0821 重组质粒。经测序鉴定后转化至 *E.coli* BL21 中,0.1 mmol/L IPTG 于 30 °C 诱导表达 4 h,Ni-NTA 亲和层析法纯化 Tp0821。BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测 rTp0821 浓度,Detoxi-GelTM 内毒素去除胶去除其中的内毒素,鲎试剂盒检测其中内毒素含量。以 Anti-His 单抗为一抗,以羊抗鼠为二抗,

Western blot 鉴定 rTp0821。

1.2.2 rTp0821 促炎作用测定

THP-1 细胞于 37 °C、5%CO₂ 恒温培养箱以含 10% FBS、100 U/mL 青霉素 G、100 μg/mL 链霉素、2 mmol/L 谷氨酰胺的 RPMI1640 培养基培养。在细胞布满整个视野时离心,弃去培养基后以无菌 PBS 漂洗,分装,然后加新鲜培养基继续于 37 °C、5%CO₂ 恒温培养箱中培养。为测定不同浓度对促炎细胞因子表达水平的影响,分别以含 0.5、1.0、3.0 和 5.0 μg/mL 的 rTp0821 预处理 THP-1 细胞。为检测 rTp0821 在不同时间对促炎细胞因子表达水平的影响,用 1.0 μg/mL rTp0821 刺激 THP-1 细胞 6、12、24 和 48 h。各实验组设置阳性对照(100 ng/mL LPS)、阴性对照(PBS)和空白对照(仅加入培养基),每组设 3 个平行孔。PBS 冲洗上述 THP-1 细胞 3 次后以 0.1% Triton X-100 处理 30 min,离心收集上清,按照 ELISA 试剂盒说明书测定其中 IL-6、IL-8 和 IL-1β 浓度。

1.2.3 rTp0821 促炎作用的相关信号通路测定

为探讨 MAPK 与 NF-κB 是否参与 Tp0821 诱导 THP-1 细胞表达促炎细胞因子,分别以 ERK1/2 特异性抑制剂 PD98059、JNK 特异性抑制剂 SP600125、p38 特异性抑制剂 SB203580 和 NF-κB 的特异抑制剂 BAY11-7082 预处理 THP-1 细胞 30 min,rTp0821 刺激 THP-1 细胞 24 h 后,ELISA 检测其分泌 IL-6、IL-8 和 IL-1β 浓度。

1.2.4 统计学方法

所有实验均重复 3 次。采用 SPSS 15.0 统计软件进行分析,实验数据以均数±标准差表示,均数之间比较采用 *t* 检验,*P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 rTp0821 的表达、纯化与鉴定

tp0821 基因 PCR 扩增产物电泳显示在 800 bp 左右大小处存在一条特异性条带(图 1),与预期片段的大小(807 bp)相符。测序结果与 GenBank 公布结果完全一致。pET-28a/Tp0821 在 *E.coli* BL21 表达 34 kD 大小的蛋白,与预期蛋白分子量一致(图 2)。Western blot 鉴定结果显示其与 His 单抗和梅毒血清反应(图 3),表明该蛋白为 Tp0821。

2.2 rTp0821 刺激 THP-1 细胞表达 IL-6、IL-8 和 IL-1β

rTp0821 诱导 THP-1 细胞分泌促炎细胞因子 IL-6、IL-8 和 IL-1β 在一定范围内与刺激时间和蛋白

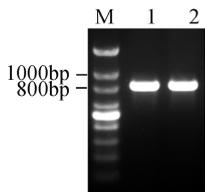


图 1 pET-28a/Tp0821 菌液 PCR 鉴定 M:DNA marker; 1, 2: pET-28a/Tp0821 重组质粒的扩增产物

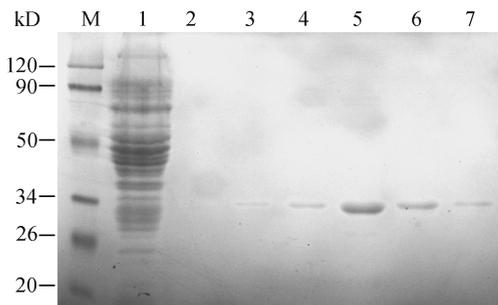


图 2 rTp0821 的纯化 M: Protein marker; 1: 流出液; 2~7: 不同咪唑浓度洗脱液洗脱的 rTp0821

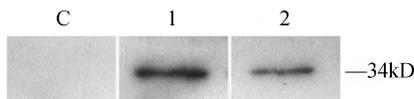


图 3 rTp0821 Western blot 鉴定 C: 对照正常人血清; 1: Anti-His 单抗; 2: 梅毒患者血清

浓度呈正相关: 低于 1 $\mu\text{g/mL}$ 时, IL-6、IL-8 和 IL-1 β 的水平随刺激蛋白浓度增加而增加, 1 $\mu\text{g/mL}$ 时达到峰值, 分别为 $166.0 \pm 16.9 \text{ pg/mL}$ 、 $145.3 \pm 10.7 \text{ pg/mL}$ 和 $118.2 \pm 16.3 \text{ pg/mL}$ (图 4A), 随后随浓度增加而表达下降; 1 $\mu\text{g/mL}$ rTp0821 刺激 THP-1 细胞时, IL-6、IL-8 和 IL-1 β 表达水平在 24 h 内随刺激时间增加而增加, 24 h 时均达到峰值, 分别为 $177.8 \pm 8.8 \text{ pg/mL}$ 、 $147.4 \pm 7.6 \text{ pg/mL}$ 和 $118.3 \pm 7.0 \text{ pg/mL}$ (图 4B), 随后随刺激时间延长而表达下降。

2.3 PD98059、SP600125、SB203580 和 BAY11-7082 抑制 rTp0821 诱导 THP-1 细胞表达 IL-6、IL-8 和 IL-1 β rTp0821 刺激经 PD98059、SP600125、SB203580 以及 BAY11-7082 预处理后的 THP-1 细胞, IL-6 表达水平分别下降 63.4% ($P < 0.001$)、4.3% ($P > 0.05$)、53.4% ($P < 0.001$) 和 73.1% ($P < 0.0001$), IL-8 分别下降 49.2% ($P < 0.001$)、6.0% ($P > 0.05$)、41.1% ($P < 0.001$) 和 71.0% ($P < 0.001$), IL-1 β 分别下降 36.8% ($P < 0.01$)、3.9% ($P > 0.05$)、30.3% ($P < 0.001$) 和

59.7%

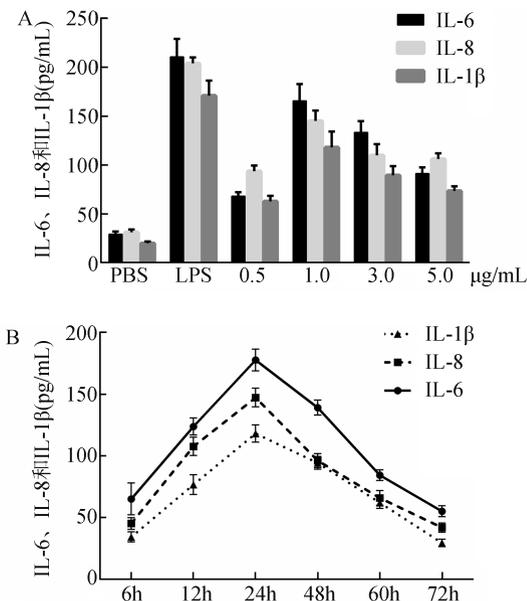


图 4 不同浓度 rTp0821 (A) 和不同刺激时间(B)对 THP-1 细胞表达促炎细胞因子的影响 PBS 为阴性对照, LPS 为阳性对照

($P < 0.001$) (图 5)。以上表明 PD98059、SB203580 和 BAY11-7082 能显著抑制 rTp0821 刺激 THP-1 细胞表达促炎细胞因子 IL-6、IL-8 和 IL-1 β , JNK 特异性抑制剂 SP600125 则无明显影响。

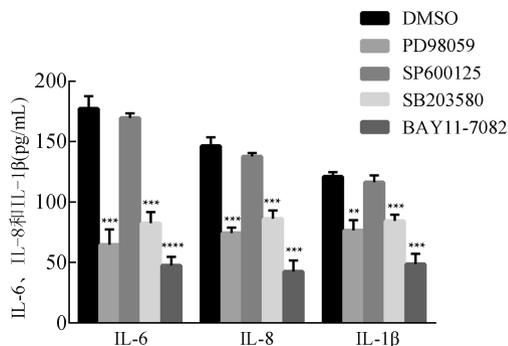


图 5 MAPK 和 NF- κ B 特异抑制剂对 rTp0821 诱导 THP-1 细胞表达促炎细胞因子的影响 与对照组比较, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$

3 讨 论

前期研究表明, Tp 膜脂蛋白 Tp0663^[6] 和 Tp0751^[3] 均可诱导 THP-1 细胞表达促炎细胞因子, 与 Tp 致炎有关。Tp0821 也是一种膜脂蛋白, 但是否具有促炎活性尚不明确。本研究选择 THP-1 细

胞作为模式细胞主要是由于 THP-1 细胞比小鼠巨噬细胞对刺激物更敏感,也更接近人体细胞的生理状态,而且其作为巨噬细胞的前体,在抵抗感染的过程中起着不可替代的作用。IL-6、IL-8 和 IL-1 β 是启动炎症反应的关键细胞因子,参与介导机体的免疫调控。本研究结果表明 Tp0821 诱导 THP-1 细胞表达促炎细胞因子水平在一定范围内与蛋白浓度和刺激时间呈正相关。当 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tp0821 刺激 THP-1 细胞 24 h 时,促炎细胞因子表达水平达到峰值。这可能是由于过高浓度 Tp0821 和过长刺激时间会干扰 THP-1 细胞正常生物学功能,进而影响促炎细胞因子的表达。

MAPK 由 ERK1/2、JNK 和 p38 等构成,是多种病原体活化单核/巨噬细胞的胞内信号转导中枢^[7-8]。本研究发现,ERK1/2 特异性抑制剂 PD98059 和 p38 异性抑制剂 SB203580 能抑制 rTp0821 诱导 THP-1 细胞表达促炎细胞因子,但 JNK 抑制剂 SP600125 预处理 THP-1 细胞后对促炎细胞因子表达却没有明显影响。这表明,ERK1/2 和 p38 可能参与 Tp0821 介导 THP-1 细胞表达促炎细胞因子。

NF- κ B 是一种早期转录因子,参与调控多种促炎细胞因子的基因转录^[9]。静息状态时,NF- κ B 通过与 I κ B 结合成无活性的异二聚体而存在于胞浆^[10-11]。当受到外来刺激时,I κ B 磷酸化后降解,游离的 NF- κ B 随后转位至胞核与特异序列结合,进而发挥调控作用^[12]。本研究发现,NF- κ B 特异性抑制剂 BAY 11-7082 预处理 THP-1 细胞 30 min 后,促炎细胞因子表达水平明显受到抑制,表明 NF- κ B 可能参与 rTp0821 介导 THP-1 细胞所致炎症反应。

综上,本研究初步表明 ERK1/2、p38 和 NF- κ B 参与 rTp0821 介导 THP-1 细胞表达促炎细胞因子,Tp0821 可能为 Tp 潜在致病因子。

参考文献:

[1] Gerbase AC, Rowley JT, Heymann DH, et al. Global preva-

lence and incidence estimates of selected curable STDs [J]. Sex Transm Infect, 1998, 74(Suppl 1): S12-16.

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

[3] 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.

[4] Van Voorhis WC, Barrett LK, Lukehart SA, et al. Serodiagnosis of syphilis: antibodies to recombinant Tp0453, Tp92, and Gpd proteins are sensitive and specific indicators of infection by *Treponema pallidum* [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(8): 3668-3674.

[5] Xie Y, Xu M, Wang C, et al. Diagnostic value of recombinant Tp0821 protein in serodiagnosis for syphilis [J]. Lett Appl Microbiol, 2016, 62(4): 336-343.

[6] 刘小军, 张跃军, 吴谋谋, 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.

[7] Yang Y, Kim SC, Yu T, et al. Functional roles of p38 mitogen-activated protein kinase in macrophage-mediated inflammatory responses [J]. Mediators Inflamm, 2014, 2014: 352371.

[8] Gaestel M. MAPK-activated protein kinases (MKs): novel insights and challenges [J]. Front Cell Dev Biol, 2015, 3: 88.

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

[10] Kaltschmidt B, Widera D, Kaltschmidt C. Signaling via NF-kappaB in the nervous system [J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1745(3): 287-299.

[11] Mitchell S, Vargas J, AUID- Oho, et al. Signaling via the NFkappaB system [J]. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2016, 8(3): 227-241.

[12] Christian F, Smith EL, Carmody RJ. The Regulation of NF-kappaB Subunits by Phosphorylation [J]. Cells, 2016, 5(1).

(本文编辑: 蒋湘莲)