

伤寒杆菌 IVB 型菌毛对 THP-1 细胞 PKC 和 ERK 及 NF- κ B 活化的影响

汪付兵¹ 涂建成¹

[摘要] 目的:初步探讨伤寒杆菌 IVB 型菌毛对 THP-1 细胞 PKC、ERK、NF- κ B 活化的影响。方法:将 THP-1 细胞分别与有 IVB 型菌毛的 A21-6 菌、缺失 IVB 型菌毛的 pilS 菌共同孵育,底物磷酸激酶测定法检测 PKC 活性变化,免疫印迹法检测 ERK 磷酸化水平,荧光素酶报道基因分析法检测 NF- κ B 激活表达。结果:THP-1 细胞经有 IVB 型菌毛的 A21-6 菌刺激后,PKC 活性变化、ERK 磷酸化水平和 NF- κ B 激活表达均显著高于相应的处理组;PKC、ERK、NF- κ B 活化水平分别于刺激 10、30、60 min 后即明显升高;并分别于 30、60、120 min 左右达到峰值。结论:伤寒杆菌 IVB 型菌毛显著增强了 THP-1 细胞 PKC、ERK、NF- κ B 活化水平,IVB 型菌毛在伤寒杆菌诱导单核/巨噬细胞 PKC、ERK、NF- κ B 活化过程中是一种重要的强刺激因素。

[关键词] 伤寒杆菌 IVB 型菌毛;THP-1 细胞;PKC;ERK;NF- κ B

[中图分类号] R392.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1004-2806(2012)04-0206-05

Effects of the Type IVB pili of *Salmonella enterica* serovar Typhi on the activity of PKC, ERK and NF- κ B in THP-1 cells

WANG Fubin TU Jiancheng

(Department of Medical Laboratory, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan, 430071, China)

Corresponding author: TU Jiancheng, E-mail: jian_1999@yahoo.com

Abstract Objective: To investigate the effects of the Type IVB pili of *Salmonella enterica* serovar Typhi on the activity of PKC, ERK and NF- κ B in THP-1 cells. **Method:** THP-1 cells were incubated with the *Salmonella* Typhi strain A21-6 or *Salmonella* Typhi strain pilS⁻, the activity of PKC, ERK and NF- κ B were measured with substrate phosphorylation kinase assay, Western blotting and luciferase reporter gene assay, separately. **Result:** The Type IVB pili of *Salmonella enterica* serovar Typhi strain A21-6 was significantly effected on the activity of PKC, ERK and NF- κ B; the activity of PKC, ERK and NF- κ B were increased 10min, 30min, 60min after being stimulated with the *Salmonella* Typhi A21-6, and reached the peak value at 30min, 60min and 120min, respectively. **Conclusion:** The type IVB pili of *Salmonella* Typhi may play an important role in the activity of PKC, ERK and NF- κ B induced by *Salmonella* Typhi, which could significantly increase the activity of PKC, ERK and NF- κ B in THP-1 cells.

Key words type IVB pili of *Salmonella enterica* serovar Typhi; THP-1 cell; PKC; ERK; NF- κ B

在近 2 300 种相关的沙门氏菌中,伤寒杆菌是最重要的致病菌,它是惟一只对人致病并导致伤寒热症的细菌^[1-2]。大多数沙门氏菌只引起肠炎,但伤寒杆菌可侵入人体血管导致高热及更严重的肠热症和败血症。它能侵入肠道细胞,并能生存于巨噬细胞和树突状细胞及 T 细胞内。

自 1992 年以来,伤寒杆菌出现愈来愈多的多种抗生素抗性成为重要和严重的问题。缺乏完善的疫苗,以及多种药物抗性均是人们对伤寒杆菌的致病机制以及其与宿主细胞相互作用、识别的机制认识及了解还不够^[3],伤寒杆菌的致病机制还待深入研究^[4-5]。病原性细菌毒力岛编码的 IVB 型菌毛在微生物的分子病原学领域中的地位近年越来

越受到人们的重视,其是细菌重要的毒力因素,与细菌的致病性密切相关,在细菌致病过程中起重要作用^[6]。这一点有多种相关文献报道,如霍乱弧菌 IV 型菌毛能作为一种重要致病因素介导吸附人体细胞^[6];绿脓杆菌的菌毛也能刺激上皮细胞产生转录因子 NF- κ B 和细胞因子 IL-8^[7],然而伤寒杆菌的 IVB 型纤毛对人体细胞(肠道上皮细胞和单核巨噬细胞)感染后的细胞信号转导途径上某些激酶和核转录因子的活性变化研究还未见报道。我们应用人类单核白血病细胞系-THP-1 细胞,对伤寒杆菌 IVB 型菌毛诱导 THP-1 细胞 PKC、ERK、NF- κ B 活化进行了研究,为阐明伤寒杆菌 IVB 型菌毛致病的信号转导机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

PepTag PKC 活性检测试剂盒购自美国 Pro-

¹ 武汉大学中南医院检验科(武汉,430071)

通信作者:涂建成, E-mail: jian_1999@yahoo.com

mega 公司;PMA 购自 Sigma 公司;兔抗磷酸化 ERK 多克隆抗体购自 R&D 公司;山羊抗兔 IgG-AP 及 BCIP/NBT 购自华美生物工程公司;质粒 pNF- κ B 购自 Stratagene 公司,该质粒包含一个基本的启动子元件,含 TATA box 和 5 个重复的 NF- κ B 识别和结合的序列(TGGGGACTTTC-CGC),启动子下游为萤光素酶报告基因;Luciferase assay Kit 购自 Promega 公司;DEAE-dextran 购自 Pharmacia 公司;RPMI-1640FBS 及其他培养试剂均购自 Gibco 公司。

1.2 细菌培养

表达 IVB 型菌毛 Typhi A21-6 菌株、缺失 IVB 型菌毛 Typhi pilS⁻菌株,均由武汉大学免疫系保存。将 A21-6 菌和 pilS⁻菌接种于含卡那霉素的 LB 液体培养液中,30℃ 静止培养 16 h,使其在 600 nm 处吸光度 A 值为 0.4~0.6,在随后的感染实验中,取适量细菌培养物,用 PBS 洗 3 次,重悬于 RPMI-1640 液中,适当稀释至所需菌液浓度。

1.3 细胞培养

THP-1 细胞培养用含 10% FBS 的 RPMI-1640 完全培养液(含 L-谷氨酰胺 2 mmol/L, Hepes 10 mmol/L 青霉素和链霉素各 100 μ /L),于 37℃ 5%CO₂ 孵箱中培养。在细菌感染细胞实验前,培养液中的血清浓度降至 5%,12 h 后,调整细胞浓度 10⁶ 个/L,接种于 6 孔培养板,加入 30 nmol/L PMA,作用 12 h,以备后续的各项感染实验使用。感染实验中为排除血清的影响,均采用无血清 RPMI-1640 培养液。

1.4 细菌感染细胞实验

将 THP-1 细胞按 10⁶ 个/ml 接种于 6 孔培养板中,然后加入不同浓度 A21-6 菌和 pilS⁻菌,使细胞与 2 种细菌的感染比例为 1:1、1:10、1:30,于 37℃ 5% CO₂ 条件下共同孵育,裂解感染后的 THP-1 细胞提取蛋白分别检测 PKC 和 ERK 活性。

1.5 细胞总蛋白提取

收获感染后的细胞用冰镇 PBS 洗 2 次,加入细胞裂解液(20 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 150 mmol/L NaCl,0.1% NP-40,1 mmol/L EDTA,1 mmol/L EGTA,0.2 mmol/L PMSF,0.5 mg/ml Leupeptin,1 mmol/L DTT),冰上裂解 30 min,反复冻融 2 次,14 000 r/min,离心 10 min,取上清保存于一80℃ 备检测用。用考马斯亮兰法测定蛋白浓度。

1.6 PKC 活性分析

每样本取 10 μ l 裂解液进行 PKC 活性测定,具体方法参照 Promega PKC 活性检测试剂盒。PKC 样本经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离后,凝胶照相,凝胶中磷酸化的蛋白条带用刮胡刀切下,95℃ 加热溶解,570 nm 处测定 A 值,计算 PKC 活性。

1.7 免疫印迹法检测 ERK 磷酸化水平

等量蛋白样品上样,以 5% 浓缩胶,10% 分离胶行 SDS-PAGE,电泳结束后将胶上蛋白转至大小相同的 PVDF 膜上,封闭漂洗后,加入适当浓度稀释的抗磷酸化 ERK 抗体,4℃ 孵育过夜,加入适当浓度稀释的碱性磷酸酶标记的二抗,孵育漂洗后,BCIP/NBT 底物避光显色 15 min。

1.8 NF- κ B 活化检测

1.8.1 细胞瞬时转染 用 DEAE-dextran 的方法进行 NF- κ B luciferase 报告基因质粒 DNA 转染,实验操作按《分子克隆》说明及相关参考文献[8]进行。

1.8.2 细菌感染转染细胞实验 将转染后的 THP-1 细胞按 10⁶ 个/L 接种于 6 孔培养板中,24 h 后,加入 30 nmol/L PMA,作用 12 h,然后加入不同浓度 A21-6 菌和 pilS⁻菌,使细胞与 2 种细菌的感染比例为 1:1、1:10、1:30,于 37℃ 5% CO₂ 条件下共同孵育。

1.8.3 虫萤光素酶活性分析 收获感染后的转染细胞,加入 1 $\times$ lysis buffer 100 μ l,室温下裂解 20 min,14 000 r/min 离心 10 min,取 20 μ l 上清液,加入 50 μ l 反应底物,10 s 后用 TD-20/20 luminometer 测其活性,然后以未经任何处理(无 PMA 和细菌)的转染细胞 Luc 活性值为基数(100%),计算其他值的倍数。

1.9 统计学分析

数据以表示 $\bar{x} \pm s$,用 SPSS 统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 IVB 型菌毛对 THP-1 细胞 PKC 活化时相的影响

A21-6 菌感染细胞后(细胞/细菌 1:10),其 PKC 活性在 10 min 后即明显升高,30 min 左右达峰值,其后逐渐回落,2 h 后降至 IVB 型菌毛刺激前水平。详见图 1。

2.2 IVB 型菌毛对 THP-1 细胞 PKC 活性的诱导作用

3 种不同浓度的 IVB 型菌毛 A21-6 菌感染细胞 30 min 后,诱导 PKC 活性作用均明显高于相应浓度的缺失 IVB 型菌毛 pilS⁻菌($P < 0.05$),细菌浓度用量高的 2 种细菌 PKC 活性反而下降,不同浓度 2 种细菌诱导 PKC 活性均显著高于无细菌感染的对照组。详见图 2。

2.3 IVB 型菌毛对 THP-1 细胞 ERK 磷酸化水平时相的影响

A21-6 菌感染细胞后(细胞/细菌 1:10),其 ERK 磷酸化水平在 30 min 后即明显升高,60 min 左右达峰值,其后逐渐回落,3 h 后基本降至 IVB 型菌毛刺激前水平。详见图 3。

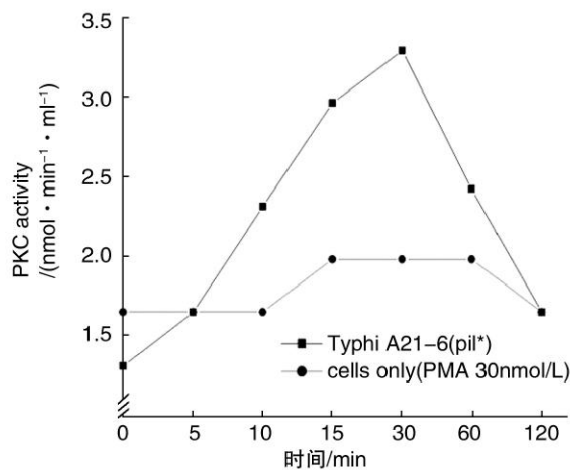


图 1 PKC 活性变化的时相关系变化曲线图

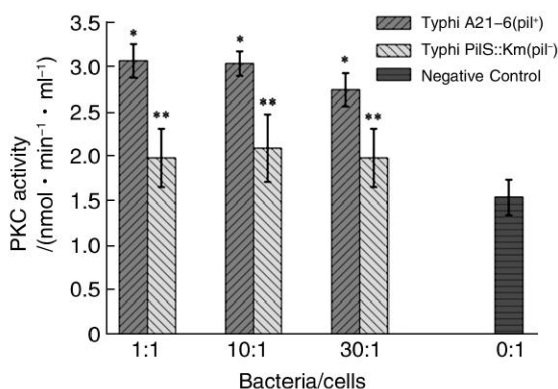


图 2 3 种不同浓度 IVB 型菌毛 A21-6 菌和缺失 IVB 型菌毛 pliS 菌对 THP-1 细胞 PKC 活性的诱导作用

2.4 IVB 型菌毛对 THP-1 细胞 ERK 磷酸化水平的诱导作用

3 种不同浓度的 IVB 型菌毛 A21-6 菌感染转染细胞 60 min 后,诱导 ERK 磷酸化水平作用均明显高于相应浓度的缺失 IVB 型菌毛 pliS 菌,细菌浓度用量高的 2 种细菌 ERK 磷酸化水平反而下降,不同浓度 2 种细菌诱导 ERK 磷酸化水平均显著高于无细菌感染的对照组。详见图 4。

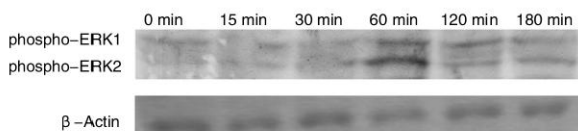
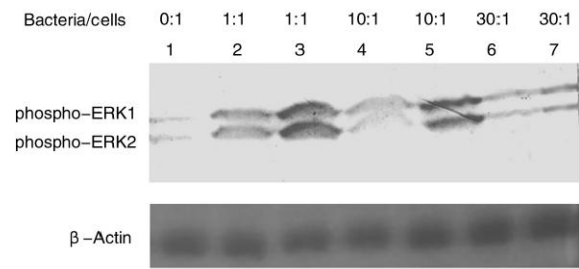


图 3 IVB 型菌毛对 THP-1 细胞 ERK 活化时相的影响

2.5 IVB 型菌毛对 THP-1 细胞 NF-κB 活化时相的影响

A21-6 菌感染转染细胞后(细胞/细菌 1:10),其 NF-κB 活性在 60 min 后即明显升高,120 min 左右达峰值,其后逐渐回落,4 h 后降至 IVB 型菌毛刺激 1 h 左右水平。详见图 5。



3,5,7 泳道为 A21-6 菌,2,4,6 泳道为 pliS 菌。

图 4 3 种不同浓度 IVB 型菌毛 A21-6 菌和缺失 IVB 型菌毛 pliS 菌对 THP-1 细胞 ERK 活化的诱导作用

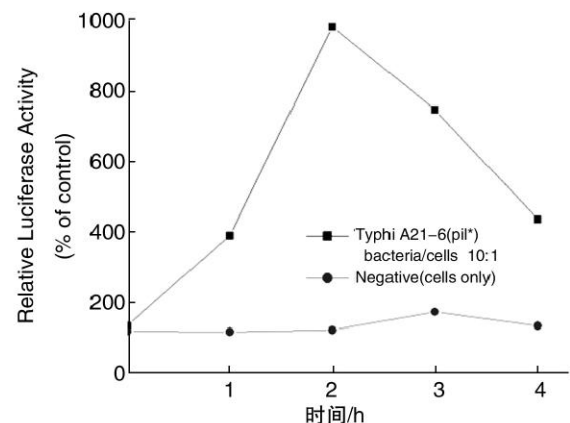


图 5 NF-κB 活化的时相关系变化曲线图

2.6 IVB 型菌毛对 THP-1 细胞 NF-κB 活化的诱导作用

2 种不同浓度(细胞/细菌 1:1、1:10)的 IVB 型菌毛 A21-6 菌感染转染细胞 2 h 后,诱导 NF-κB 活化作用均明显高于相应浓度的缺失 IVB 型菌毛 pliS 菌($P < 0.05$);细菌浓度用量高的 2 种细菌 NF-κB 活化反而下降,高浓度 A21-6 菌诱导 NF-κB 活化作用略低于 pliS 菌;不同浓度 2 种细菌诱导 NF-κB 活化均显著高于无细菌感染的对照组。详见图 6。

3 讨论

单核/巨噬细胞是机体防御中起重要作用的免疫效应细胞,除了能够吞噬和清除侵入机体的病原微生物外,还能够分泌和释放多种细胞因子,募集和趋化多种炎症细胞,并促其进入炎症组织,在炎症反应中发挥重要作用^[4]。当其受到外来刺激时,细胞膜接受刺激信号,通过多种途径将其传导到细胞核,启动相应基因的转录和细胞因子的表达,磷酸化作为一种重要的信号蛋白活性调节方式,在这一过程中发挥重要作用,蛋白激酶则是该过程中重要的调节蛋白。

蛋白激酶 C(PKC)是一类非常重要的信号转导分子,它与生命过程中的许多生物学事件密切相

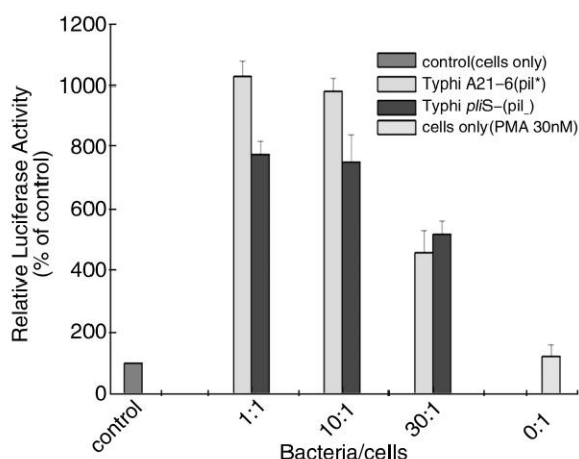


图6 3种不同浓度 IVB 型菌毛 A21-6 菌和缺失 IVB 型菌毛 *pilS* 菌对转染 NF- κ B-Luc 质粒后的 THP-1 细胞 NF- κ B 活性的诱导作用

关。PKC 作为信号传递系统中关键的酶,通过催化多种靶蛋白发生磷酸化反应,完成细胞对外源性信号的应答^[9]。伤寒杆菌 IVB 型菌毛作为细胞外一种刺激因素,是否能产生对 PKC 活性的影响,为证实这一问题,我们做了文中 PKC 活性测定的相关的实验。实验结果表明:伤寒杆菌 IVB 型菌毛在细菌与单核/巨噬细胞感染诱导 PKC 活性过程中是一种重要的刺激因素,显著增强了 PKC 的活化。

丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)是细胞内重要的信号转导系统,而细胞外信号激酶(ERK)则是该系统主要的和经典的通路,能被多种细胞外信号(炎症因子、病原微生物刺激、生长因子等)激活,通过磷酸化反应逐级传递至细胞核,并激活多种核转录因子,参与细胞的多种生理活动和病理过程^[10]。本文中,我们用免疫印迹法检测了 ERK 磷酸化水平,实验结果表明:伤寒杆菌 IVB 型菌毛作为细胞外一种刺激因素,显著增强了 ERK 磷酸化水平,它在细菌与单核/巨噬细胞感染诱导 ERK 磷酸化过程中是一种重要的刺激因素。

NF- κ B 是一种多功能、多向性核转录子。作为一种组成型核转录子,NF- κ B 在组织细胞中保持较低水平的持续活性,在免疫细胞的生长发育和其正常免疫功能发挥中都具重要作用。作为一种诱导型核转录子,创伤、微生物感染等刺激可以使 NF- κ B 活性异常升高,导致大量促炎细胞因子的过度释放,引起严重的免疫病理损伤^[11]。伤寒杆菌 IVB 型菌毛能否引起 NF- κ B 过度活化。本文中荧光素酶报道基因分析法检测 NF- κ B 激活表达的实验结果表明:伤寒杆菌 IVB 型菌毛显著的诱导细胞 NF- κ B 过度活化,它在细菌与单核/巨噬细胞感染诱导 NF- κ B 活化过程中是一种强的刺激因素。

伤寒杆菌 IVB 型菌毛与肠道上皮细胞表面的 CFTR(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)结合后,便进入了肠道细胞,引起肠热症和高热^[5,12]。在这里我们可以推测:IVB 型菌毛可能与单核/巨噬细胞表面 CFTR 或类似 CFTR 的结构域结合,诱导 PKC 活化,激活的 PKC 通过依赖或非依赖 ras 机制激活 MAPK^[13],由此形成 PKC-MAPK 级联反应,活化的 ERK_{1/2} 磷酸化 I κ B,I κ B 发生磷酸化而降解,与 NF- κ B 解离,NF- κ B 随即进入核内,激活相应基因表达而发挥作用^[10,14]。由伤寒杆菌 IVB 型菌毛诱导三者活化时间先后(PKC、ERK、NF- κ B 峰值分别 30 min、60 min、120 min)及信号传递途径三者位置的上下游关系,我们可初步推论:伤寒杆菌 IVB 型菌毛可能通过激活 PKC→ERK→NF- κ B 途径,引起机体病理损伤。该推测是否成立,尚需进一步研究确证。

本试验过程中发现:诱导单核/巨噬细胞 PKC、ERK、NF- κ B 的活化与细菌的浓度用量有一定的相关性,细菌浓度的用量过大(细胞/细菌 1:30)时,诱导细胞 PKC、ERK、NF- κ B 的活化作用反而下降,这可能是单核/巨噬细胞本身受到了损伤,大部分感染细胞裂解,功能正常的细胞数量减少,因而蛋白质合成下降,具体机制还待阐明。

综上所述,我们可知:①伤寒杆菌 IVB 型菌毛是一种重要刺激因素,增强了细菌诱导单核/巨噬细胞 PKC、ERK、NF- κ B 的活化;②伤寒杆菌 IVB 型菌毛可能通过激活 PKC→ERK→NF- κ B 途径引起机体致病。

参考文献

- [1] JONES B D, FALKOW S. Salmonella: host immune responses and bacterial virulence determinants[J]. Annu Rev Immunol, 1996, 14: 533-561.
- [2] ENGELS E A, LAU J. Vaccines for preventing typhoid fever[J]. Cochrane Database Syst, 2000, 2: CD001161-1161.
- [3] WYANT T L, TANNER M K, SZTEIN M B. Salmonella typhi flagella are potent inducers of proinflammatory cytokine secretion by human monocytes[J]. Infect Immun, 1999, 67: 3619-3624.
- [4] PIER G B, GROUT M, ZAIDI T, et al. Salmonella typhi uses CFTR to enter intestinal epithelial cells[J]. Nature, 1998, 393: 79-82.
- [5] KARAOLIS D K R, SOMARA S, MANEVAL JR D R, et al. A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus, and a phage receptor in cholera bacteria[J]. Nature(london), 1999, 399: 375-379.
- [6] DIMANGO E, RATNER A J, BRYAN R, et al. Activation of NF-kappaB by adherent Pseudomonas aeruginosa in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells[J]. Clin Invest, 1998, 101: 2598-2605.

抗核抗体和抗心磷脂抗体与特发性血小板减少性紫癜的关系探讨

赵硕¹ 吴俊琪¹ 王利民¹ 徐瑞龙¹

【摘要】 目的:探讨抗核抗体(ANA)和抗心磷脂抗体(ACA)与特发性血小板减少性紫癜(ITP)的关系。**方法:**对 50 例 ITP 患者及 25 例健康体检者血清进行 ACA 和 ANA 检测。**结果:**ITP 患者 ACA 和 ANA 阳性率明显高于对照组,在 50 例 ITP 患者中,ACA 阳性者 15 例,阳性率为 30%,ANA 阳性者 17 例,阳性率为 34%。**结论:**ACA 能与血小板内膜上的磷脂结合,导致血小板消耗性减少。我们应对 ANA 阳性的 ITP 患者进行随访,以观察此类患者将来是否发生 SLE、RA 等自身免疫性疾病。

【关键词】 特发性血小板减少性紫癜;抗核抗体;抗心磷脂抗体

【中图分类号】 R554 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1004-2806(2012)04-0210-02

Study of correlation between antinuclear antibody and anticardiolipin antibody with idiopathic thrombocytopenic purpura

ZHAO Shuo WU Junqi WANG Limin XU Ruilong

(Jinhua Central Hospital Laboratory, Jinhua, 321007, China)

Corresponding author: ZHAO Shuo, E-mail: dxmxs@sohu.com

Abstract Objective: To approach the correlation between antinuclear antibody(ANA) and anticardiolipin antibody(ACA) with idiopathic thrombocytopenic purpura(ITP). **Method:** The levels of serum ACA and ANA of 50 patients with ITP and 25 healthy cases were detected. **Result:** The positive rates of ACA and ANA with ITP were higher than those in the healthy cases. The positive rates of ACA and ANA were 30% and 34% respectively in 50 cases of ITP patients. **Conclusion:** ACA could combine with phospholipid of platelet membrane, resulting in platelet reduction. We should observe the patients whose ANA are positive, which could be useful in the prognosis of auto-immunity disease, such as SLE, RA.

Key words idiopathic thrombocytopenic purpura; antinuclear antibody; anticardiolipin antibody

特发性血小板减少性紫癜(ITP)是常见的以出血和血小板减少为主要特征的一组免疫综合征。抗心磷脂抗体(ACA)是一种结合在磷脂抗原中的自身免疫性抗体,临床上与血栓形成、血小板减少等关系密切。抗核抗体(ANA)是以细胞核为靶抗

原的自身抗体。为了解 ITP 的发病机制,探讨 ITP 与 ACA 和 ANA 之间的联系,笔者检测了 50 例 ITP 患者及 25 例健康体检者血清中的 ANA 和 ACA 水平,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象

ITP 组 50 例,为我院血液科及儿科患者,其中男 21 例,女 29 例;年龄 5~60 岁。均按张之南主

¹金华市市中心医院检验科(浙江金华,321000)
通信作者:赵硕, E-mail: dxmxs@sohu.com

- [7] KARL D MACK, RAN WEI, AHMED ELBAGARRI, et al. A novel method for DEAE-dextran mediated transfection of adherent primary cultured human macrophages[J]. Immunological Methods, 1998, 211: 79-86.
- [8] CASON B A, GORDON H J, AVERY I V, et al. Stimulation of c-jun kinase and mitogen-activated protein kinase by ischemia and reperfusion in the perfused rat heart[J]. Card Surg, 1995, 10: 441-444.
- [9] VITIELLO M, ISANTO M D, GALDIERO M, et al. Interleukin-8 production by THP-1 cells stimulated by Salmonella enterica Serovar Typhimurium porins is mediated by AP-1, NF- κ B and MAPK pathways[J]. Cytokine, 2004, 27: 15-24.
- [10] L I Q, VERMA I M. NF-KB-dependent signaling

pathways[J]. Exp Hemetol, 2002, 30: 285-296.

- [11] TUSI ISM, YIP CMC, HACKETT J, et al. The Type IVB pili of Salmonella enterica serovar typhi bind to the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator[J]. Infect Immun, 2003, 71: 6049-6049.
- [12] RICHARD M. Requirement of Ras-GTP-Raf complexes for activation of Raf-1 by protein kinase C[J]. Science, 1998, 280: 109-112.
- [13] OGATA N, YAMAMOTO H, KUGIYAMA K, et al. Involvement of protein kinase C in superoxide anion-induced activation of nuclear factor-kappa B in human endothelial cells[J]. Cardiovasc Res, 2000, 45: 513-521.

(收稿日期: 2011-08-01)