论著

文章编号:1000-5404(2011)13-1338-04

肺炎链球菌溶血素诱导 THP-1 细胞凋亡涉及 MAPK1/3 信号途径

姜 慧,贺 潇,袁 军,王 虹,李忱炜,董 杰,崔 瑾,董姗姗,周爱娥,张雪梅,胥文春,尹一兵,何於娟
(400016 重庆,重庆医科大学检验系临床检验诊断学教育部重点实验室)

【摘要】 **目的** 探讨肺炎链球菌溶血素(pneumolysin,Ply)对人急性单核细胞白血病单核细胞株 THP-1 细胞的增殖抑制和诱导凋亡作用及机制。**方法** MTT 法检测 Ply 对 THP-1 细胞的增殖抑制。瑞氏染色观察 Ply 对人 THP-1 细胞形态的影响。AnnexinV-FITC/PI 双标法检测细胞凋亡。琼脂糖凝胶电泳观察凋亡细胞 DNA 片段化现象。免疫组化和 Western blot 检测 MAPK1/3 蛋白表达的变化。**结果** 将人 THP-1 细胞分别与 0.05、0.1、0.5、1、2.5、5 μg/ml Ply 共同孵育后,在 24、48、72、96 h 用 MTT 法检测细胞增殖抑制率,发现 Ply 对人 THP-1 细胞具有明显的增殖抑制作用,并且呈剂量和时间依赖性,IC_{50}(24 h)为 1.31 μg/ml;0.05 μg/ml 和 0.1 μg/ml Ply 分别处理 THP-1 细胞 12 h 后,通过瑞氏染色法观察人 THP-1 细胞可见凋亡小体及核碎裂象等典型的凋亡形态学改变;用 0.05 μg/ml Ply 和 0.1 μg/ml Ply 作用 THP-1 细胞 12 h 后细胞早期凋亡率分别为 11.83% 和 48.45%($P<0.05$);提取凋亡 THP-1 细胞 DNA,进行琼脂糖凝胶电泳可见典型的"梯状"条带;Ply 作用于人 THP-1 细胞后,胞内 MAPK1/3 蛋白表达降低($P<0.05$)。**结论** Ply 可诱导人 THP-1 细胞凋亡,此作用涉及 MAPK1/3 信号通路的参与。

【关键词】 肺炎链球菌溶血素;THP-1 细胞;凋亡;MAPK1/3 通路
【中图法分类号】 R378.18;R733.71;R329.28 【文献标志码】 A

Pneumolysin induces apoptosis in human THP-1 cells through MAPK1/3 signal pathway

Jiang Hui, He Xiao, Yuan Jun, Wang Hong, Li Chenwei, Dong Jie, Cui Jin, Dong Shanshan, Zhou Ai'e, Zhang Xuemei, Xu Wenchun, Yin Yibing, He Yujuan (Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics of Ministry of Education, Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【**Abstract**】 **Objective** To determine the effect of pneumolysin (Ply) on proliferation and apoptosis in human acute monocytic leukemia THP-1 cells. **Methods** After exposure to Ply at 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5, or 5 μg/ml for 24, 48 or 72 h, the proliferation in THP-1 cells was measured by MTT assay. Morphological changes in the treated and untreated THP-1 cells were observed by Wright's staining. The apoptotic rate of THP-1 cells was examined by AnnexinV-FITC/PI-stain. DNA fragmentation was examined by sepharose electrophoresis. The expression of MAPK1/3 was investigated by immunocytochemical staining and Western blot analysis. **Results** Ply resulted in apparent inhibition on proliferation of THP-1 cells in a time- and dose-dependent manner, with an IC_{50} (24 h) of 1.31 μg/ml. Typical morphological features of apoptosis, such as nuclear fragmentation and apoptosis bodies, were observed in THP-1 cells after Ply treatment at 0.05 and 0.1 μg/ml for 12 h by Wright's staining. After Ply treatment at 0.05 and 0.1 μg/ml for 12 h, the apoptotic rate of THP-1 cells was 11.83% and 48.45%, respectively ($P<0.05$). A typical ladder pattern was identified in DNA electrophoresis. The expression of MAPK1/3 was reduced ($P<0.05$) after THP-1 cells were treated with Ply. **Conclusion** Ply induces apoptosis in human THP-1 cells though MAPK1/3 signal pathway.

【**Key words**】 pneumolysin; THP-1 cells; apoptosis; MAPK1/3 signal pathway

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30872363). Corresponding author: He Yujuan, Tel: 86-23-68485859, E-mail: yjhemail@126.com

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(30872363)
【通信作者】 何於娟,电话:(023)68485859,E-mail:yjhemail@126.com

肺炎链球菌(*streptococcus pneumoniae*,*S. pn*)是人体最常见的呼吸道细菌,常导致社区获得性肺炎、脑膜炎、中耳炎等疾病。肺炎链球菌溶血素(pneumolysin,Ply)是肺炎链球菌的强毒力因子,是氨基酸序列高度保守的 52×10^3 的可溶性蛋白。Ply 是胆固醇依赖的溶细胞素家族成员,在靶细胞膜上通过寡聚体化而形成一种大的环形穿膜孔,所形成的寡聚物与毒素的溶细胞活性以及过度的细胞调节活动有关[1]。在肺炎链球菌与宿主细胞的相互作用中,肺炎链球菌所释放的 Ply 可直接杀伤靶细胞或导致靶细胞凋亡。

固有免疫是生物在长期进化中逐渐形成的,是机体抵御病原体入侵的第一道防线。树突状细胞、单核-巨噬细胞、中性粒细胞等是主要的固有免疫细胞。目前大多数研究主要针对 Ply 诱导树突状细胞[2]、耳蜗毛细胞[3]及神经元细胞[4]凋亡及死亡,而 Ply 对人单核细胞增殖和凋亡的研究尚未见报道。本研究通过研究 Ply 对人急性单核细胞白血病单核细胞株 THP-1 细胞体外生长的影响,探讨 Ply 诱导单核细胞凋亡的机制,为进一步研究 Ply 触发宿主瞬时和早期固有免疫应答机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人急性单核细胞白血病单核细胞株 THP-1 细胞(中国科学院上海细胞生物学研究所);Ply[5]和 rPly[6](Ply 的第 146 位氨基酸发生突变,无溶血活性)均由本实验室表达;改良型 RPMI1640 培养基(美国 HyClone 公司);胎牛血清(美国 HyClone 公司);噻唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司);AnnexinV-FITC/PI 试剂盒(美国 Biovision 公司);DNA ladder 试剂盒(南京凯基生物生物科技发展有限公司);即用型免疫组化 SABC 试剂盒、盐酸二氨基联苯胺(DAB)显色试剂、兔抗人 MAPK1/3 (即 Erk1/2) IgG 多克隆抗体、β-actin 肌动蛋白、辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG、辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG、ECL Western blot 化学发光检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人急性单核细胞白血病 THP-1 单核细胞常规培养于含 10% 胎牛血清的改良型 RPMI1640 培养液(含 100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素)中,置于 37℃,相对湿度 95%,5% CO_2 培养箱中培养,每 2 ~ 3 天传代 1 次,取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 MTT 检测 将对数生长期的 THP-1 细胞配制成密度为 1×10^4/ml 细胞悬液,每孔 200 μl 接种于 96 孔板,再分别加入不同浓度的 Ply 蛋白和 rPly 蛋白(0.05、0.1、0.5、1、2.5、5 μg/ml),另设加入等量培养液的空白对照组,每组设 5 个平行孔。分别培养 24、48、72、96 h 后每孔加入 MTT 溶液(5 mg/ml) 20 μl,37 ℃继续培养 4 h 后离心,吸弃孔内培养上清液。每孔加入 150 μl DMSO,振荡使结晶溶解,用酶标仪测定不同作用时间下细胞的光密度值[$D(492)$],实验重复 3 次,按中效方程计算 IC_{50},并计算细胞增殖抑制率(RI),$RI = [1 - D(492)_{药物组} / D(492)_{对照组}] \times 100\%$。

1.2.3 瑞氏染色观察细胞形态变化 将 0.05 μg/ml Ply、0.1 μg/ml Ply、0.1 μg/ml rPly 处理的 THP-1 细胞常规培养12 h 后,离心收集 THP-1 细胞,PBS 洗涤,离心涂片机甩片,瑞氏染色,光学显微镜下观察细胞形态学变化。

1.2.4 AnnexinV-FITC/PI 双标法检测细胞凋亡 将 0.05 μg/ml Ply、0.05 mg/ml rPly、0.1 μg/ml Ply、0.1 μg/ml rPly 处理的 THP-1 细胞常规培养 12 h 后,离心收集细胞,按试剂盒说明书进行操作,应用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.5 DNA 片段化分析 将 0.1 μg/ml Ply 和 0.1 μg/ml rPly 处理的 THP-1 细胞常规培养 12 h 后,离心收集 2×10^6 细胞,用 DNA 提取试剂盒提取 DNA,1% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙啶染色,凝胶成像仪观察。

1.2.6 免疫组织化学检测 将用 0.05 μg/ml Ply、0.1 μg/ml Ply、0.1 μg/ml rPly 处理的 THP-1 细胞常规培养 12 h 后,离心收集,PBS 冲洗,配制成 1×10^6/ml 细胞悬液,离心涂片,4% 多聚甲醛固定,3% H_2O_2 溶液中室温下浸泡 15 min;滴加相应一抗(1∶100 稀释),4℃过夜,按照 SABC 免疫组化试剂盒说明书进行操作,DAB 显色,苏木精复染,脱水、透明、封固,显微镜下观察,以细胞质和(或)细胞膜呈棕黄色颗粒为阳性。计算机图像分析系统选取 10 个高倍视野(×400),计算每视野下阳性细胞的光密度值及平均光密度值,并计算比值,比值 = 处理组平均光密度值/对照组平均光密度值。比值反映蛋白表达水平的高低。

1.2.7 Western blot 检测 将 0.05 μg/ml Ply 和 0.1 μg/ml Ply 处理的 THP-1 细胞常规培养 12 h 后,离心收集 1×10^6 细胞,PBS 冲洗 3 次,在细胞沉淀中加入 250 μl 细胞裂解液和蛋白酶抑制剂 10 mg/ml,冰上裂解 30 min,期间振荡 2 次,4 ℃下 12 000 r/min 离心 10 min,收集蛋白上清液,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,5% 脱脂奶粉 25 ℃封闭 2 h,加入兔抗人 MAPK1/3 多克隆抗体(1∶200)、β-actin 单克隆抗体(1∶2 000)孵育过夜,TBST 冲洗 3 次,每次 10 min,随后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(1∶5 000)、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG(1∶5 000)25 ℃孵育 2 h,TBST 冲洗 3 次,每次 10 min,化学发光剂显色,曝光,对 MAPK1/3 蛋白表达情况进行检测。β-actin 作为内参照。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行重复测量方差分析。

2 结果

2.1 Ply 对 THP-1 细胞增殖的影响

0.05、0.1、0.5、1、2.5、5 μg/ml Ply 分别作用于 THP-1 细胞后,随着作用时间的延长,对 THP-1 细胞的生长抑制作用逐渐增强,具有明显的量效和时效关系($P < 0.05$,表 1);而不同浓度 rPly 对 THP-1 细胞的生长均无抑制作用。

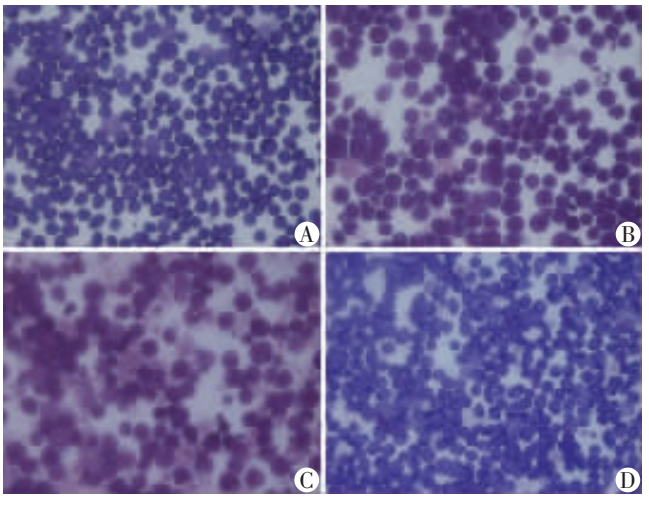
表 1　不同时间不同浓度 Ply 对 THP-1 细胞增殖抑制作用
[$n=3$, ($\bar{x}\pm s$)%]

Ply 浓度	24 h	48 h	72 h	96 h
0.05 μg/ml	5.77 ± 1.91^{ae}	9.54 ± 3.23^{a}	14.92 ± 4.40^{ae}	16.17 ± 3.81^{af}
0.1 μg/ml	6.94 ± 1.13^{e}	21.68 ± 0.31	27.43 ± 5.28^{e}	25.96 ± 1.00^{f}
0.5 μg/ml	38.13 ± 4.47^{ae}	52.90 ± 1.76^{a}	67.56 ± 2.84^{ae}	71.65 ± 0.39^{af}
1 μg/ml	55.93 ± 3.87^{be}	63.29 ± 3.49^{b}	75.32 ± 1.66^{be}	85.76 ± 0.47^{bf}
2.5 μg/ml	63.15 ± 2.80^{ce}	70.81 ± 4.51^{c}	81.13 ± 2.52^{ce}	90.43 ± 1.01^{cf}
5 μg/ml	65.62 ± 4.55^{de}	78.98 ± 1.27^{d}	87.38 ± 4.45^{de}	91.51 ± 0.33^{df}

a：$P<0.05$，与 0.01 μg/ml 比较；b：$P<0.05$，与 0.5 μg/ml 比较；c：$P<0.05$，与 1 μg/ml 比较；d：$P<0.05$，与 2.5 μg/ml 比较；e：$P<0.05$，与 48 h 比较；f：$P<0.05$，与 72 h 比较

2.2　Ply 对 THP-1 细胞形态学影响

0.05、0.1 μg/ml Ply 分别作用于 THP-1 细胞 12 h 后，空白对照组 THP-1 细胞呈圆形，染色质疏松，核仁清晰。随着 Ply 作用浓度的增大，THP-1 细胞形态发生明显变化：光镜观察见 0.05 μg/ml Ply 处理的 THP-1 细胞大小不一，胞膜表面微绒毛消失，胞质浓缩，细胞核体积减小，核染色质聚集或边集，可见明显的凋亡小体；0.1 μg/ml Ply 处理的 THP-1 细胞不仅可见凋亡小体，还可见细胞出现膜碎裂、核固缩、核碎裂、核溶解等细胞坏死的表现。0.1 μg/ml rPly 处理的对照组 THP-1 细胞形态学上无明显变化（图 1）。

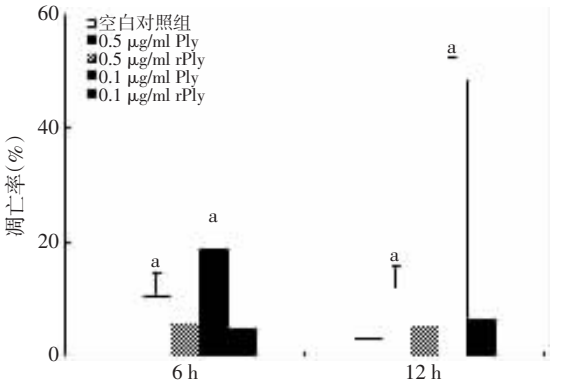


A：空白对照组；B：0.05 μg/ml Ply 处理组；C：0.1 μg/ml Ply 处理组；D：0.1 μg/ml rPly 处理组

图 1　不同浓度 Ply 对 THP-1 细胞形态的影响　（瑞氏染色 ×400）

2.3　Ply 对 THP-1 细胞凋亡的影响

0.05 μg/ml Ply 和 0.1 μg/ml Ply 作用 6 h 的 THP-1 细胞早期凋亡率分别为 10.52%、18.64%，作用 12 h 早期凋亡率分别为 11.83%、48.45%，与对照组相比差异有统计学意义（$P<0.05$），而 0.1 μg/ml rPly 处理组与空白对照组无明显差异（图 2）。

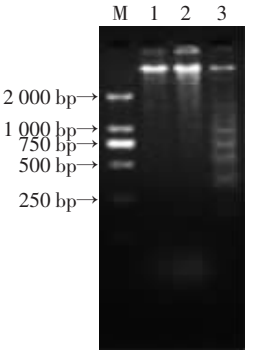


a：$P<0.05$，与空白对照组比较

图 2　不同浓度 Ply 作用不同时间对 THP-1 细胞凋亡的影响（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

2.4　DNA 片段化分析

0.1 μg/ml Ply 作用 THP-1 细胞 12 h 后，提取细胞 DNA，进行琼脂糖凝胶电泳，可见比较典型的“梯状”条带，而 0.1 μg/ml rPly 处理组与空白对照组均未见“梯状”条带，表明 Ply 处理后 THP-1 细胞发生凋亡（图 3）。

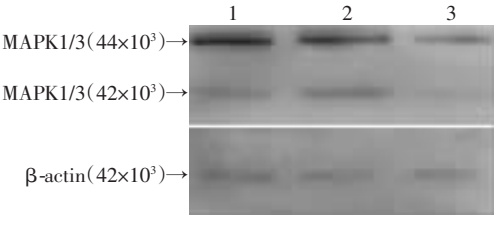


M：标准；1：对照组；2：0.1 μg/ml rPly 处理组；3：0.1 μg/ml Ply 处理组

图 3　THP-1 细胞 DNA 片段化分析

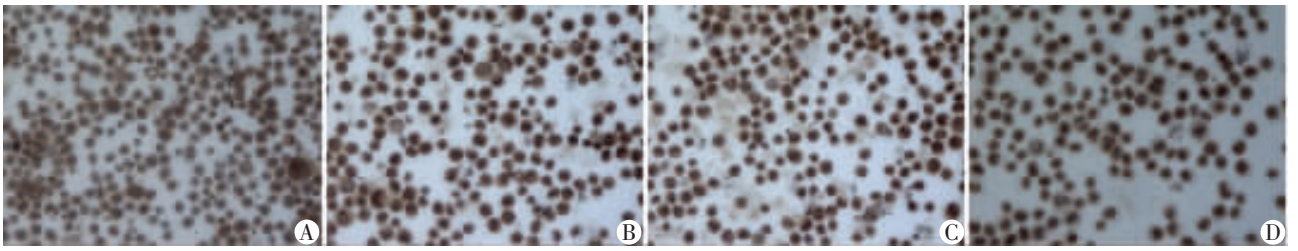
2.5　Ply 对 THP-1 细胞 MAPK1/3 蛋白表达的影响

免疫组化结果显示 MAPK1/3 蛋白（即 Erk1/2 蛋白）主要定位于细胞质，与对照组相（0.73 ± 0.04）比较，经 0.05 μg/ml Ply（0.3 ± 0.02）、0.1 μg/ml Ply（0.28 ± 0.04）、0.1（0.35 ± 0.02）μg/ml rPly 作用 12 h 后 THP-1 细胞质中 MAPK1/3 表达均减弱（图 4）；Western blot 检测结果显示，与正常对照组比较，随 Ply 浓度的提高，MAPK1/3 表达水平逐渐减少（$P<0.05$，图 5）。



1：空白对照组；2：0.05 μg/ml Ply 处理组；3：0.1 μg/ml Ply 处理组

图 5　Western blot 检测 THP-1 细胞 MAPK1/3 蛋白表达



A:空白对照组;B:0.05 μg/ml Ply 处理组;C:0.1 μg/ml Ply 处理组;D:0.1 μg/ml rPly 处理组

图 4 免疫组化染色观察 Ply 对 THP-1 细胞 MAPK1/3 蛋白表达的影响 (SABC ×400)

3 讨论

肺炎链球菌是常见的呼吸道细菌,常导致社区获得性肺炎。许多研究已经表明 Ply 的细胞毒性作用有利于肺炎链球菌的毒力表现,对肺炎链球菌的致病性具有决定性作用。近几年研究发现 Ply 具有诱导宿主细胞凋亡的作用[2-4],但对人单核细胞的作用尚不清楚[1]。

本实验以人急性单核细胞白血病单核细胞株 THP-1 细胞为研究对象,用 Ply 进行体外实验,MTT 结果显示 Ply 对 THP-1 细胞具有增殖抑制作用。形态观察、AnnexinV-FITC/PI 双标法、DNA 片段化分析分析均显示 Ply 对 THP-1 细胞具有明显的诱导凋亡作用。

在 Ply 诱导的中耳炎模型中,Ca^{2+} 通过 Ply 形成的微孔进入细胞内,钙内流引起细胞死亡[3];Ply 诱导的脑膜炎模型中,是通过线粒体损伤引起神经元细胞死亡[4];而在肺炎模型中,Ply 可以诱导依赖 Caspase 和非依赖 Caspase 这 2 种形式的凋亡[7]。另外,也有研究报道肺炎链球菌可以诱导人内皮细胞发生 p38MAPK 和 JNK 介导的依赖 Caspase 的凋亡[8]。但是,对于 Ply 诱导人单核细胞凋亡的机制尚少见报道。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases,MAPK)信号途径存在于所有生物体内的大多数细胞内,是真核生物细胞重要的信号转导通路,可将细胞表面信号刺激转导致细胞及其核内,与细胞增殖、存活、分化、凋亡等生理过程密切相关[9-10]。到目前为止,在哺育动物细胞中已至少发现有 3 条 MAPK 通路[9-10]:细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated protein kinase,ERK)通路、c-jun 氨基末端激酶(c-jun N-terminal kinase,JNK)通路和 p38MAPK 通路[11-13]。既然 MAPK 信号通路是一个广谱的信号途径,那么在 Ply 诱导的 THP-1 细胞的凋亡过程中,MAPK 有没有参与呢?

本实验采用免疫组化和 Western blot 检测发现,在 Ply 诱导 THP-1 细胞凋亡时 MAPK1/3 蛋白,即 Erk1/2 蛋白表达降低,表明 MAPK1/3 信号通路参与了 Ply 诱导 THP-1 细胞的凋亡。那么 Ply 诱导的 MAPK1/3 信号通路介导的 THP-1 细胞的凋亡到底是通过何种机制发挥作用?Ply 触发宿主瞬时和早期固有免疫应答的具体机制是什么?这些问题我们将在后续研究中进一步分析。

参考文献:

[1] Kadioglu A, Weiser J N, Paton J C, *et al*. The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease [J]. Nat Rev Microbiol, 2008, 6(4): 288-301.

[2] Colino J, Snapper C M. Two distinct mechanisms for induction of dendritic cell apoptosis in response to intact Streptococcus pneumoniae [J]. J Immunol, 2003, 171(5): 2354-2365.

[3] Beurg M, Hafidi A, Skinner L, *et al*. The mechanism of pneumolysin-induced cochlear hair cell death in the rat [J]. J Physiol, 2005, 568(Pt 1): 211-227.

[4] Braun J S, Hoffmann O, Schickhaus M, *et al*. Pneumolysin causes neuronal cell death through mitochondrial damage [J]. Infect Immun, 2007, 75(9): 4245-4254.

[5] 贺潇, 袁军, 王虹, 等. 肺炎链球菌溶血素的体外表达及活性鉴定 [J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(3): 237-240.

[6] Kirkham L A, Kerr A R, Douce G R, *et al*. Construction and immunological characterization of a novel nontoxic protective pneumolysin mutant for use in future pneumococcal vaccines [J]. Infect Immun, 2006, 74(1): 586-593.

[7] Garcia-Suarez Mdel M, Florez N, Astudillo A, *et al*. The role of pneumolysin in mediating lung damage in a lethal pneumococcal pneumonia murine model [J]. Respir Res, 2007, 8: 3.

[8] NGuessan P D, Schmeck B, Ayim A, *et al*. Streptococcus pneumoniae R6x induced p38 MAPK and JNK-mediated caspase-dependent apoptosis in human endothelial cells [J]. Thromb Haemost, 2005, 94(2): 295-303.

[9] Boutros T, Chevet E, Metrakos P. Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer [J]. Pharmacol Rev, 2008, 60(3): 261-310.

[10] 蔡文琴, 钱桂生. 几条重要的信号转导通道研究的概况及临床意义 [J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(2): 91-93.

[11] Mebratu Y, Tesfaigzi Y. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? [J]. Cell Cycle, 2009, 8(8): 1168-1175.

[12] Weston C R, Davis R J. The JNK signal transduction pathway [J]. Curr Opin Cell Biol, 2007, 19(2): 142-149.

[13] Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases [J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1773(8): 1358-1375.

(收稿 2010-12-03 修回 2011-01-11)
(编辑 张 维)