

· 基础研究 ·

原核表达肺炎链球菌毒力蛋白 PspA 对人类嗜中性粒细胞释放 CXCL8 的影响

徐 蕾¹, 陈 丹², 甘 萍³, 曹 炬⁴

(1. 重庆医科大学病原生物学教研室 400016; 2. 重庆建设医院药剂科 400050; 3. 重庆三峡中心医院儿童分院儿内科 404000; 4. 重庆医科大学附属第一医院检验科 400016)

摘要:目的 探讨原核表达肺炎链球菌表面蛋白 A(PspA)对人类嗜中性粒细胞释放 CXCL8 的影响。方法 将重组质粒 pET-32a(+)/PspA 转化到大肠埃希菌 BL21(DE3)中,经异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷诱导重组菌表达 TRx-His-PspA 融合蛋白并纯化;通过肠激酶切掉融合蛋白的 TRx-His 部分,获得 PspA 蛋白。用 PspA 蛋白免疫小鼠,获得抗 PspA 抗体。再将 PspA 蛋白加入到人类嗜中性粒细胞的培养基中共孵育,检测 CXCL8 释放水平的差异;最后,用抗 PspA 抗体检测其对 PspA 蛋白促人类嗜中性粒细胞释放 CXCL8 的影响。**结果** 中性粒细胞细胞内合成和释放到培养基上清液的 CXCL8 显著增加($P < 0.05$);而加入了抗 PspA 抗体后,PspA 蛋白刺激人中性粒细胞释放 CXCL8 的能力明显减弱。**结论** PspA 可以上调人类嗜中性粒细胞趋化因子 CXCL8 的合成和释放,揭示了中性粒细胞和肺炎链球菌致病因素之间的关系。

关键词:链球菌,肺炎;膜蛋白质类;中性粒细胞;CXCL8

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.14.020

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)14-1397-03

Influence of pneumococcal surface protein A on human neutrophils releasing CXCL8

Xu Lei¹, Chen Dan², Gan Ping³, Cao Ju⁴

(1. Department of Pathobiology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Department of Pharmacy, Chongqing Jianshe Hospital, Chongqing 400050, China; 3. Department of Internal Medicine, Children's Branch Hospital, Chongqing Sanxia Central Hospital, Chongqing 404000, China; 4. Department of Laboratory, First Affiliate Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the influence of prokaryotic express pneumococcal surface protein A(PspA) on CXCL8 releasing from human neutrophils. **Methods** The recombinant plasmid pET-32a(+)/PspA was transformed into E. coli BL21(DE3). The fusion protein TRx-His-PspA was expressed and digested by enterokinase after purification, in order to get protein PspA. Then mice were immunized with protein PspA to get the anti-PspA antibodies. Protein PspA single or mixed with anti-PspA antibodies was added in the medium of human neutrophils for coincubation. Later the CXCL8 producing and releasing from neutrophils were detected. **Results** The fusion protein TRx-His-PspA was expressed and purified successfully. The protein PspA was obtained after digested by enterokinase. The anti-PspA antibodies with high titer were gotten from the immunized mice. After the protein PspA adding in the medium of human neutrophils, the neutrophils were detected to produce and release more CXCL8 by real-time quantitative polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay ($P < 0.05$). On the other side, the anti-PspA antibodies could reduce the ability of protein PspA to stimulate the CXCL8 producing and releasing. **Conclusion** The protein PspA could induce human neutrophil synthesizing and releasing chemokine CXCL8, which reveals the relationship between neutrophils and Streptococcus pneumoniae.

Key words: streptococcus pneumoniae; membrane proteins; neutrophils; CXCL8

据世界卫生组织统计,每年死于肺炎链球菌侵入性疾病的人数有 1.6 亿^[1]。肺炎链球菌表面蛋白 A(pneumococcal surface protein A, PspA)是肺炎链球菌的主要毒力蛋白之一,该菌在侵入性疾病的发病机制中发挥重要作用。另一方面,中性粒细胞从血液中迁移到炎症病灶是固有免疫反应抗侵入性肺炎链球菌疾病的初始阶段^[4]。然而,中性粒细胞和肺炎链球菌的相互作用还不完全清楚。本研究通过揭示肺炎链球菌毒力蛋白 PspA 和人嗜中性粒细胞释放炎症因子 CXCL8 的密切关系,从而了解肺炎链球菌与机体免疫细胞、免疫体系的相互关系,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 菌株及质粒 大肠埃希菌 BL21(DE3)为本实验室保存; pET-32a(+)/PspA 为本实验室构建。

1.2 动物及主要试剂 BALB/c 小鼠由重庆医科大学动物中心提供,均为雌性,8~10 周龄,18~20 g。异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷、丙烯酰胺为 Sigma 产品,质粒抽提试剂盒为 Omega 公

司产品,组氨酸单克隆抗体及辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 为 Novagen 公司产品,SYBR 绿色荧光定量 PCR 购自罗氏公司, RPMI-1640 培养基、胎牛血清、HEPES 购自 Gibco 公司。

1.3 融合蛋白 TRx-His-PspA 的诱导表达、鉴定及纯化 将重组质粒 pET-32a(+)/PspA 转化至大肠埃希菌 BL21 中,挑取阳性克隆,接种于含氨苄西林的普通琼脂培养液中,于 37 ℃ 振荡至对数增长后期时,加入异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(终浓度为 1.5 mmol/L)诱导 4 h,取样进行 12% 十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulfonate polyacrylate gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析。表达产物经 SDS-PAGE 后电转移至聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,加入组氨酸单克隆抗体孵育过夜;PBS 液洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的二抗 IgG,室温作用 1 h 后二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色,观察结果。超声波破菌后,细菌滤液采用亲和层析法纯化融合蛋白,将所得的融合蛋白溶液经透析除盐复性。

1.4 去除标签蛋白, 获得 PspA 蛋白 肠激酶切除融合蛋白 TRx-His-PspA 溶液, 取少量溶液经 12% SDS-PAGE 分析确认被切除部分分别是 TRx-His 和 PspA 后, 将剩余溶液加入到 Ni-Agarose His 柱, 滤去 TRx-His 蛋白, 获得 PspA 蛋白, 置于 -80°C 备用。

1.5 抗 PspA 抗体的制备 腹腔免疫小鼠。基础免疫: PspA 10 g/只加完全弗氏佐剂; 加强免疫: PspA 10 g/只+不完全弗氏佐剂(每隔 2 周加强 1 次, 连续 2 次); 对照组只注射佐剂; 第 3 次免疫 1 周后, 眼眶取血行酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测免疫效果, 用 PspA 蛋白包被酶标板, 加小鼠血清, 再加入二抗, 显色后读取 450 nm 波长下各孔的吸光度, 以高于阴性对照组 2.1 倍为阳性。

1.6 外周血中性粒细胞的分离 采集正常志愿者新鲜外周血, 全血用没有二价阳离子的 Hanks 平衡盐缓冲液(Hanks balanced salt mixture, HBSS) 稀释后形成连续的梯度分层; 在室温下以 $500\times g$ 的速度离心 30 min 后弃上清液, 再将细胞置于 1.5% 右旋糖酐溶液中, $200\times g$ 离心 10 min, 吸取上清液。连续两次 $0.5\times \text{PBS}$ 的低渗裂解 30 s 以去除红细胞; 再用同等体积的 $1.75\times \text{PBS}$ 恢复等张, 中性粒细胞计数。最后, 中性粒细胞的形态分析评估其纯度大于 98%, 台盼蓝染色显示其活细胞所占比例大于 96%。分离获得的中性粒细胞用 RPMI-1640 培养基培养, 辅以 10% 和 20 mmol/L 羧乙基哌嗪乙硫磺酸缓冲液。

1.7 PspA 蛋白对中性粒细胞活力影响的噻唑蓝法分析 中性粒细胞(1×10^5 细胞/孔) 分别接种到 96 孔板, 用 10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL 浓度的 PspA 蛋白分别处理中性粒细胞 12 h 和 24 h, 每孔加入 $10\ \mu\text{L}$ 噻唑蓝溶液, 继续培养 4 h, 小心吸去孔内培养液, 每孔加入 $200\ \mu\text{L}$ 二甲亚砜, 低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。在 550 nm 处的吸光度测定吸光度, 以量化有活性的中性粒细胞。

1.8 CXCL8 浓度的测定 中性粒细胞接种于 10 cm 培养皿中(5×10^6 细胞/个), 用 10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL 浓度的 PspA 蛋白刺激中性粒细胞 8 h 后提取总 RNA, 取 $1\ \mu\text{g}$ 的总 RNA, 利用随机引物将其逆转录成 cDNA。采用实时定量 PCR 扩增 CXCL8(上游引物: 5'-GAC CAC ACT GCG CCA ACA CA-3'; 下游引物: reverse, 5'-ACC TCT TCA AAA ACT TCT CCC GAC-3' 和 β -actin(上游引物: 5'-AGC GGG AAA TCG TGC GTG-3'; 下游引物: 5'-CAG GGT ACA TGG TGG TGC C-3')。同时, 用 10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL 浓度的 PspA 蛋白分别刺激中性粒细胞 12 h 和 24 h, 然后收集细胞培养上清液, 采用 ELISA 测定 CXCL8 在无细胞上清液中的浓度。

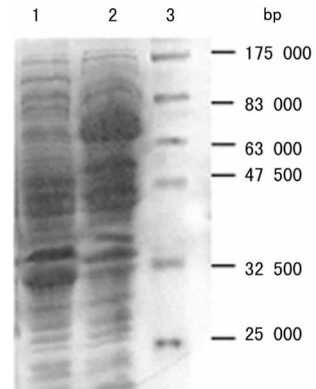
1.9 实时定量 PCR 扩增 CXCL8 中性粒细胞分两组接种于 6 孔板中(5×10^5 细胞/个), 一组加入 PspA 蛋白(100 ng/mL) 和抗 PspA 抗体(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 孵育 30 min 的混合物; 另一组只加 PspA 蛋白(200 ng/mL) 不加抗体, 处理 24 h 后, 采用实时定量 PCR 扩增 CXCL8。

1.10 统计学处理 应用 SPSS16.0 软件进行统计学数据分析, 组间比较采用 *t* 检验, 组间比较采用单因素方差检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

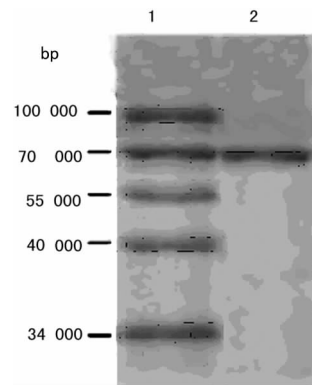
BL21/pET-32a(+)-PspA 的诱导表达产物可见相对分子质量约 70 000 的蛋白条带, 为 PspA(相对分子质量 50 000) 与 Trx-His(相对分子质量 20 000) 的融合蛋白条带(图 1); 重组蛋白与组氨酸单克隆抗体反应, 在 70 000 左右处出现特异的

反应条带, 确证获得了带有 6 个组氨酸接头的融合蛋白(图 2)。透析除去尿素, 使融合蛋白复性(图 3)。



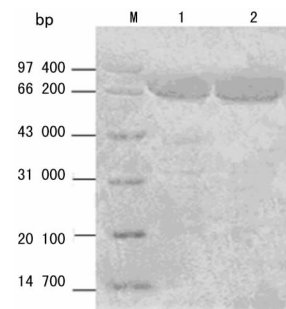
1: BL21/pET-32a(+)-PspA 的诱导表达产物; 2: BL21/pET-32a(+)-PspA 的诱导表达产物; 3: Marker。

图 1 融合蛋白的电泳图



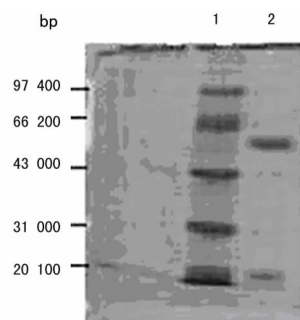
1: Marker; 2: 诱导表达的融合蛋白。

图 2 融合蛋白的 Western-blot 图



1: Marker; 2: 纯化的融合蛋白。

图 3 纯化的融合蛋白的电泳图



1: Marker; 2: 酶切后的融合蛋白。

图 4 融合蛋白酶切后的电泳图

切除融合蛋白 TRx-His 标签, 获得 PspA 蛋白(图 4)。高

浓度的 PspA 蛋白引起宿主细胞的细胞毒作用是非常有限(图 5)。PspA 蛋白刺激中性粒细胞后, CXCL8 的释放均呈剂量依赖性增强(图 6, $P < 0.05$), 其中 CXCL8 水平在 24 h 高于 12 h, CXCL8 的释放在 100~200 ng/mL 浓度时进入了一个平台期(图 7)。当 PspA 蛋白被抗体中和后, CXCL8 的释放明显下降(图 8, $P < 0.05$)。

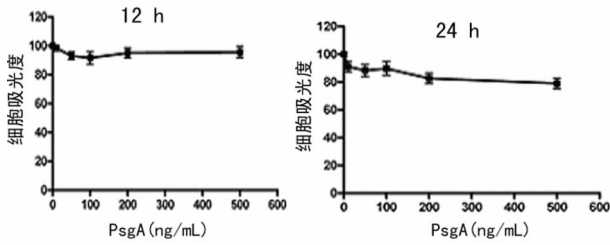


图 5 PspA 蛋白对中性粒细胞活力影响的线形图

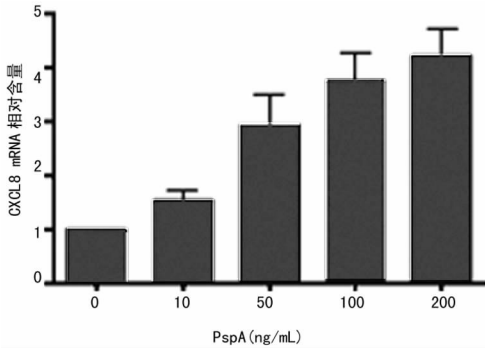


图 6 中性粒细胞受 PspA 蛋白刺激后产生 CXCL8 的柱状图

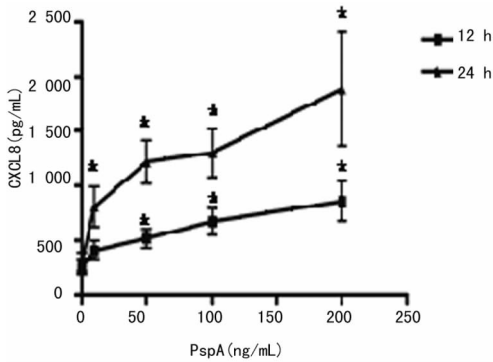


图 7 PspA 蛋白刺激中性粒细胞释放 CXCL8 的线形图

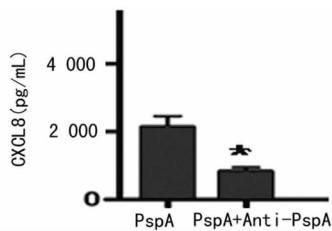


图 8 PspA 蛋白及其抗体影响 CXCL8 产生的柱状图

3 讨论

肺炎链球菌的毒性蛋白, 包括 PspA 已被证明在侵入性肺炎链球菌感染的发病机制中发挥关键作用^[2-4]。PspA 是肺炎链球菌的细胞表面蛋白, 在目前分离出的所有肺炎链球菌菌株中都存在^[5]。PspA 的疫苗可以预防高危婴儿感染肺炎链球菌^[6]。PspA 是乳铁蛋白结合蛋白, 它可以抑制由肺炎链球菌

引起的补体活化^[7]。同时, PspA 可以保护肺炎链球菌避免受乳铁蛋白的杀伤作用^[8]。此外, PspA 在流感病毒感染后的继发性肺炎链球菌感染中也起作用^[9]。

嗜中性粒细胞是固有免疫系统中主要的效应细胞, 同时也参与适应性免疫反应^[10]。嗜中性粒细胞是循环体系和组织中最丰富的白细胞, 成为清除侵入性肺炎链球菌的主要成分。肺炎链球菌与中性粒细胞的相互作用激活了嗜中性粒细胞, 使其吞噬肺炎链球菌并且合成了多种炎症介质, 从而诱发炎症反应。这些炎症调节因子包括颗粒酶(如髓过氧化物酶、 β -葡萄糖醛酸酶、弹性蛋白酶、明胶酶等)和细胞因子, 特别是 IL-9、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 和转化生长因子 α (transforming growth factor α , TGF- α)^[11-12], 这可能是嗜中性粒细胞防御侵入性肺炎链球菌感染的机制。由于嗜中性粒细胞是早期免疫应答的重要组成, 所以肺炎链球菌如何调节中性粒细胞免疫功能对于解决侵入性肺炎链球菌的感染是非常重要的。嗜中性粒细胞通过一定的趋化因子, 尤其是 CXCL8^[13], 被招募到炎症部位。CXCL8 是 CXC 趋化因子家族的成员之一, 它可以刺激嗜中性粒细胞的吞噬功能, 并上调该细胞表面黏附分子的表达, 以及增强嗜中性粒细胞对内皮细胞的黏附。事实证明, 侵入性肺炎链球菌疾病中炎症部位的 CXCL8 浓度明显增加^[15]。

本研究证明了 PspA 可以刺激中性粒细胞的 CXCL8 生产。由于 CXCL8 是一个强有力的中性粒细胞趋化因子, 肺炎链球菌毒性蛋白增加 CXCL8 的释放, 招募更多的中性粒细胞在感染组织杀死肺炎链球菌。另一方面, 过量生产 CXCL8 可以招募更多的中性粒细胞以及其他免疫细胞如淋巴细胞和嗜碱性粒细胞在炎症部位, 放大炎症反应。事实上, 肺炎链球菌引起的体液免疫反应就是细胞炎症因子和抗炎因子在体内的差异调节^[16]。所以, 本实验探讨了在炎症反应中肺炎链球菌的这种毒力蛋白和 CXCL8 的功能联系, 为弄清一系列炎症反应中免疫细胞和肺炎链球菌致病因素之间的关系, 制定新的战略来控制肺炎链球菌侵入性疾病做铺垫。

参考文献:

- [1] Cripps AW, Leach, AJ, Lehmann D, et al. Pneumococcal vaccination in developing countries[J]. Lancet, 2006, 368 (9536): 644.
- [2] Bogaert D, De Groot R, Hermans PW. Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease[J]. Lancet Infect Dis, 2004, 4(3): 144-154.
- [3] Koedel U, Scheld WM, Pfister HW. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis[J]. Lancet Infect Dis, 2002, 2(12): 721-736.
- [4] Farnworth SL, Henderson NC, Mackinnon AC, et al. Galectin-3 reduces the severity of pneumococcal pneumonia by augmenting neutrophil function[J]. Am J Pathol, 2008, 172(2): 395-405.
- [5] Bergmann S, Hammerschmidt S. Versatility of pneumococcal surface proteins[J]. Microbiology, 2006, 152(2): 295-303.
- [6] Francis JP, Richmond PC, Pomat WS, et al. Maternal antibodies to pneumolysin but not to pneumococcal surface protein A delay early pneumococcal carriage in high-risk papua new guinean infants[J]. Clin Vaccine Immunol, 2009, 16(11): 1633-1638.
- [7] Hammerschmidt S, Bethe G, Remane PH. (下转第 1401 页)

阻滞^[12],心脏和神经兴奋性降低,可抑制交感神经而使副交感神经作用相对增强,麻醉观察时认为麻醉药物没有达到应有的剂量而增加药量。(3)受体阻滞神经细胞膜上药物转运体的改变,致使细胞内液中药物量不足,药物不能有效通过细胞内机制发挥作用^[13]。(4)戊巴比妥被多药耐药相关蛋白逆浓度泵出细胞,减少细胞内药物浓度,导致细胞内药物浓度降低,不能有效发挥麻醉作用。(5)从能量代谢来看,戊巴比妥麻醉动物后,Hb对O₂的亲合力降低,动物机体组织氧需要量超过了氧供应量,容易使机体出现缺氧状态,乳酸亦有不同程度的增加。细胞质及细胞器pH值的改变,使药物到达作用部位的靶位点时浓度减少^[14-16]。基于以上几种原因,使细胞内外药物浓度降低,尤其是蛋白结构的改变以及体内对麻醉药物逐步耐受,使重复戊巴比妥药物量逐渐增加。

综上所述,戊巴比妥多次麻醉实验动物后,使动物对麻醉药产生一定的耐药性,因此,在动物实验过程中,除了采取有效、合理、方便的麻醉方法和药物外,还应适量增加麻醉药物量,以充分保障实验的顺利进行。

参考文献:

- [1] 汪静,丁隼,姜莹,等.两种麻醉剂对KM小鼠麻醉效果的比较[J].实验动物与比较医学,2009,29(2):132-134.
- [2] 何平,高翔,宋锦璘,等.低强度脉冲超声波对Beagle犬II度根分叉病变的辅助效应[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(7):1219-1223.
- [3] 白海红,林纓,李桦,等.比格犬血浆中盐酸羟考酮和罗通定GC-MS测定法及其在药代动力学研究中的应用[J].分析化学,2009,37(A2):310.
- [4] 潘东升,范玉明,李波.影响犬和非人灵长类动物临床病理学检测指标的因素[J].中国药事,2011,25(4):392-395.
- [5] 黄振兴,李宏霞.比格犬和食蟹猴的麻醉抢救[J].浙江畜牧兽医,2011,36(4):33-34.

- [6] 马利杰,张英泽,郑占乐.山羊单纯与复合全身麻醉效果的比较[J].中国比较医学杂志,2009,19(5):76-78.
- [7] 靳洪涛,李万芳,李慧,等.Beagle犬静脉注射S(+)-盐酸氯胺酮和盐酸氯胺酮急性毒性及毒代动力学比较研究[J].中国现代药物应用,2009,3(10):18-20.
- [8] 张阔,田枫,康爱君,等.实验用比格犬戊巴比妥钠麻醉并发症的观察及处理[J].实验动物科学,2007,24(2):32-34.
- [9] 车爱萍,王洁,夏振娜,等.药物安全药理学研究新进展[J].中国新药杂志,2010,19(15):1309-1313.
- [10] 阳海鹰,王青秀,刘雁,等.双压力导管植入比格犬体内植入手术的实施及在安全药理学研究中的应用[J].军事医学,2011,35(6):464-468.
- [11] 周昆,屈彩芹.动物实验常用麻醉剂的比较与选择[J].实验动物科学,2008,25(2):41-47.
- [12] 王德军,林琳,陈民利,等.不同麻醉方法对大鼠血气电解质及能量代谢的影响[J].中国比较医学杂志,2009,19(8):51-54.
- [13] 潘东升,范玉明,李波.影响犬和非人灵长类动物临床病理学检测指标的因素[J].中国药事,2011,25(4):392-395.
- [14] 袁进,吴清洪,陈丽,等.西藏小型猪、小猎犬与人血液流变学指标的比较研究[J].南方医科大学学报,2009,29(7):1428-1430.
- [15] Choi SY, Hwang JS, Kim IH, et al. Basic data on the hematology, serum biochemistry, urology, and organ weights of Beagle dogs[J]. Lab Anim Res, 2011, 27(4): 283-291.
- [16] 肖衍宇,陈志鹏,刘雯,等.磷酸川芎嗪缓释制剂在比格犬体内的药动学和生物等效性研究[J].中国药理学杂志,2011,22(17):1344-1348.

(收稿日期:2012-01-12 修回日期:2012-03-06)

(上接第 1399 页)

- et al. Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae* [J]. Infect Immun, 1999, 67(4): 1683-1687.
- [8] Shaper M, Hollingshead SK, Benjamin WH, et al. PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin[J]. Infect Immun, 2004, 72(9): 5031-5040.
 - [9] King QO, Lei B, Harmsen AG. Pneumococcal surface protein A contributes to secondary *Streptococcus pneumoniae* infection after influenza virus infection[J]. J Infect Dis, 2009(4): 537-545.
 - [10] Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens; apoptosis as infection-promoting factor[J]. Immunobiology, 2008, 213(3/4): 183-191.
 - [11] Navarini AA, Lang KS, Verschoor A, et al. Innate immune-induced depletion of bone marrow neutrophils aggravates systemic bacterial infections [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(17): 7107-7112.

- [12] Foley SC, Hamid Q. Images in allergy and immunology: neutrophils in asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2007, 119(5): 1282-1286.
- [13] Dogan S, Zhang X, Pridmore AC, et al. Pneumolysin-induced CXCL8 production by nasopharyngeal epithelial cells is dependent on calcium flux and MAPK activation via Toll-like receptor 4[J]. Microbes Infect, 2011, 13(1): 65-75.
- [14] Herbold W, Maus R, Hahn I, et al. Importance of CXC chemokine receptor 2 in alveolar neutrophil and exudate macrophage recruitment in response to pneumococcal lung infection[J]. Infect Immun, 2010, 78(6): 2620-2630.
- [15] Koedel U, Scheld WM, Pfister HW. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis[J]. Lancet Infect Dis, 2002, 2(12): 721-736.
- [16] Khan AQ, Shen Y, Wu ZQ, et al. Endogenous pro- and anti-inflammatory cytokines differentially regulate an in vivo humoral response to streptococcus pneumoniae[J]. Infect Immun, 2002, 70(2): 749-761.

(收稿日期:2011-12-25 修回日期:2012-02-05)