

rVvhA作用于THP-1细胞NF- κ B信号通路的研究

屠艳焯 刘艳飞 陈建林 楼永良*

(温州医学院检验医学院, 温州 325035)

摘要 研究重组创伤弧菌溶细胞素(rVvhA)对人单核细胞系(THP-1)NF- κ B信号通路的影响。应用CCK-8法检测rVvhA对THP-1细胞增殖的抑制作用;倒置显微镜和激光共聚焦显微镜观察rVvhA作用后细胞的形态学变化和细胞内NF- κ B p65的核转移情况;应用流式细胞仪和Western blot检测rVvhA作用后细胞浆内和细胞核内NF- κ B p65的表达情况;ELISA检测rVvhA作用于细胞后TNF- α 、IL-6表达含量的变化。试验结果显示:rVvhA能够呈时间-剂量依赖性地抑制THP-1细胞的生长,且镜下可见明显的细胞形态学变化。激光共聚焦显示0.4 HU/mL rVvhA作用6 h后,THP-1细胞内NF- κ B p65的核转移现象最明显;流式细胞仪结果显示0.6 HU/mL rVvhA作用2 h后,细胞内总的NF- κ B p65表达量达到高峰;Western blot检测显示0.6 HU/mL rVvhA作用4 h时细胞核内NF- κ B p65蛋白含量最高;ELISA显示TNF- α 的表达在rVvhA作用的适当范围内呈时间-剂量依赖性变化;IL-6在0.6 HU/mL rVvhA作用时表达量最高,随后随着浓度的增加反而下降;NF- κ B抑制剂能使IL-6表达量下调。实验证明rVvhA作用于THP-1细胞后能激活NF- κ B信号通路,上调TNF- α 、IL-6的表达,而NF- κ B抑制剂能够下调IL-6的表达。

关键词 创伤弧菌;溶细胞素;THP-1细胞;NF- κ B p65;TNF- α ;IL-6

创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)为嗜盐性海生革兰氏阴性杆菌,隶属于弧菌属第五群细菌,广泛存在于海水及海产品中,可通过生食海产品或经过肢体破损创口接触海水感染人体,感染后可迅速发展为脓毒症,临床研究发现脓毒症患者病变下肢肌肉坏死,呈严重蜂窝织炎改变,同时多伴有呼吸功能障碍,最终出现急性肾功能衰竭、严重代谢性酸中毒、弥漫性血管内凝血等,直至发展为多器官功能障碍综合征。脓毒症及其引发的多器官功能障碍综合征是创伤弧菌脓毒症患者死亡的主要原因,死亡率高达70%^[1]。创伤弧菌的毒力因素包括脂多糖、荚膜多糖、金属蛋白酶、溶细胞素等。其中,创伤弧菌溶细胞素是创伤弧菌唯一分泌至细胞外、具有创伤弧菌种属特异性的外毒素,它的活性和毒性都非常强,是引起机体组织细胞损伤的主要毒力因子。

目前认为脓毒症的发生在于细胞内NF- κ B(nuclear factor- κ B)信号通路的过度活化,尤其是TNF- α (tumor necrosis factor- α)、IL-1(interleukin-1)等原发性促炎症因子的增加,进一步作用于巨噬细胞等产生大量的继发性炎症因子^[2],这些炎症因子反过来又可以进一步激活NF- κ B,从而形成正反馈的级联放大效应,产生过度的炎症反应,引起机体组织和细胞的损

害。NF- κ B是目前研究得较为清楚的转录因子,通常以同源或异源二聚体形式(主要是p50/p65非活性形式)存在于细胞中。当细胞受到细菌、细胞因子等刺激后可使NF- κ B活化,解离出来的NF- κ B p65蛋白可发生核转移,进入细胞内使调控基因转录活性增强,启动多种细胞因子的转录和翻译过程,从而释放大量的炎症因子导致细胞和组织损伤^[3]。

IL-6(interleukin-6)被确定为B细胞因子,由激活的巨噬细胞、淋巴细胞及上皮细胞分泌,在过度炎症反应时大量分泌,诱发微循环的一系列炎症改变,血浆IL-6水平常作为细胞因子级联反应激活的一个标志,它反应出宿主炎症反应与疾病严重程度的相关度,临床上学者认为IL-6可作为反映脓毒症预后的一个指标^[4]。

本实验以分化成巨噬细胞的人单核细胞系(THP-1)为靶细胞^[5],检测重组创伤弧菌溶细胞素(recombinant *Vibrio vulnificus* hemolysin, rVvhA)对其NF- κ B信号通路的影响,为临床感染创伤弧菌后引起促炎和抗炎机制失调而导致的脓毒症提供了基础研究的

收稿日期: 2011-09-01 接受日期: 2011-10-27

浙江省自然科学基金(No. Y2090468)资助项目

*通讯作者。Tel: 0577-86689779, E-mail: ly110282004@yahoo.com.cn

实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和细胞株 质粒pET28a(+)-*vvhA*^[6]由本实验室构建及保存, THP-1细胞株由浙江大学医学院病原生物学教研室惠赠。

1.1.2 主要试剂及耗材 Ni²⁺-NTA His Band亲和层析柱购自上海申能博彩生物科技有限公司, 还原型谷胱甘肽(GSH)、氧化型谷胱甘肽(GSSH)、二硫苏糖醇(DTT)、盐酸胍及精氨酸均为加拿大BBI公司产品, RPIM1640培养基、细胞培养板和培养瓶均购自美国Corning公司, 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司, 细胞核蛋白/细胞浆蛋白抽提试剂盒购自生工生物(上海)有限公司, 青链霉素、胰蛋白酶细胞消化液、BAY11-7082、PDTC(NF- κ B抑制剂/抗氧化剂)、CCK-8试剂盒、NF- κ B激活-核转运试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒(增强型)、超敏ECL化学发光试剂盒、PVDF膜、Western一抗、二抗稀释液和封闭液均购自上海碧云天生物技术研究, NF- κ B p65抗体购自美国Cayman公司, 辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG(H+L)、山羊抗小鼠Alexa Fluor 488 nm购自杭州联科生物技术有限公司, 人肿瘤坏死因子(TNF- α)和人白介素-6(IL-6) ELISA试剂盒购自厦门慧嘉公司。

1.2 方法

1.2.1 rVvhA的表达、纯化、复性及溶血活性测定按照参考文献[6]进行。前期工作成功构建了重组质粒pET-28a(+)-*vvhA*。0.5 mmol/L IPTG诱导*E. coli* BL21(DE3)(含pET-28a(+)-*vvhA*质粒)菌株表达, SDS-PAGE分析表达产物。通过Ni²⁺-NTA亲和层析法纯化表达产物。复性液结合分步透析法复性后, 利用绵羊红细胞测定其溶血活性。rVvhA冷冻干燥成粉末于-70 °C保存。1溶血单位(HU)为使红细胞悬液中的血红蛋白释放一半所需要的rVvhA量。

1.2.2 THP-1细胞的培养、传代及诱导分化

THP-1细胞培养于含10%胎牛血清的RPIM1640培养液中, 置37 °C、5% CO₂、饱和湿度的CO₂培养箱中培养。当细胞生长满瓶时, 每2~3天更换新鲜培养液并传代。THP-1细胞的诱导分化: 50 ng/mL PMA诱导36 h, 使细胞分化为贴壁的巨噬细胞后, 改为无血清的1640培养基培养12 h。

1.2.3 细胞生长抑制试验 采用CCK-8法。收集对数生长期的THP-1细胞, 接种于96孔板(1×10⁶/孔)。50 ng/mL PMA诱导36 h后, 改为无血清的1640培养基, 培养12 h后加入rVvhA, 使其终浓度分别为0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 HU/mL。设培养液组为阴性组, 每组设三个复孔, 置CO₂培养箱中分别培养2, 4, 6, 8, 10 h。按CCK-8检测试剂盒操作说明进行。用酶标仪测定450 nm处各组细胞的吸光度(D)值, 以(D_{作用组}-D_{空白组})/(D_{正常组}-D_{空白组})×100%表示细胞的相对活力。

1.2.4 rVvhA作用于THP-1细胞的形态学观察

THP-1细胞按1×10⁶/孔接种于6孔板中, 50 ng/mL PMA诱导36 h后, 改为无血清的1640培养基培养12 h, 同时进行实验分组: 对照组(未加PMA诱导)、正常组(50 ng/mL PMA诱导36 h)、0.5 HU/mL rVvhA组和2.0 HU/mL rVvhA组。分别作用4 h后, 于倒置显微镜400倍下观察细胞形态。

1.2.5 rVvhA作用于THP-1后NF- κ B p65的激光共聚焦显微镜观察 THP-1细胞按1×10⁶/孔接种于激光共聚焦专用的玻璃底培养皿中, 50 ng/mL PMA诱导36 h后, 改为无血清的1640培养基培养12 h, 分别设置: 正常组、0.2 HU/mL rVvhA作用2 h组、0.4 HU/mL rVvhA作用6 h组和1.0 HU/mL rVvhA作用6 h组。收集不同处理组细胞, 按NF- κ B激活-核转运试剂盒操作说明进行。染色完毕1 h内用激光共聚焦显微镜观察分化后THP-1细胞NF- κ B p65的核转移情况。

1.2.6 rVvhA作用于THP-1后NF- κ B p65的流式细胞仪检测 采用流式细胞仪定量检测rVvhA作用诱导后THP-1细胞NF- κ B p65的表达情况, THP-1细胞按1×10⁶/孔接种于6孔板, 50 ng/mL PMA诱导36 h后, 改为无血清的1640培养基培养12 h, 分别设置: 对照组、正常组、0.2 HU/mL rVvhA作用1 h组、0.6 HU/mL rVvhA作用1, 2, 3 h组和1.0 HU/mL rVvhA作用3 h组。收集不同处理组细胞, 按流式细胞术常规操作法操作, 染色完毕1 h内检测THP-1细胞NF- κ B p65的表达情况。

1.2.7 rVvhA作用于THP-1后NF- κ B p65的Western blot分析 根据细胞核蛋白/细胞浆蛋白提取试剂盒说明, 提取核蛋白。用BCA法测定蛋白质浓度, 将提取的细胞核蛋白液与上样变性液以4:1混合离心后, 100 °C变性5 min。取25 μ g蛋白上样于10%的SDS-PAGE胶中。将胶中的目的蛋白转印到PVDF膜上。室温下, 用封闭液于摇床上振荡封闭2 h。转印膜与

1:250稀释的鼠抗人NF- κ B p65于4 °C孵育过夜, 用TBST洗涤3次, 15 min/次。洗涤后, 将膜与辣根过氧化物酶标记的二抗在室温下于摇床上振荡孵育2 h。用TBS洗涤3次, 15 min/次。洗涤后用ECL化学发光试剂作用1 min, 直接用BIO-RAD Molecular Imager显影定影。

1.2.8 rVvhA作用于THP-1后TNF- α 、IL-6的检测

THP-1细胞按 1×10^6 /孔接种于96孔板, 50 ng/mL PMA诱导36 h后, 改为无血清的1640培养基培养12 h, 分别设置: 正常组、不同浓度(0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 HU/mL) rVvhA分别作用THP-1细胞4 h组、0.5 HU/mL rVvhA分别作用不同时间(0.5, 1, 2, 3, 4 h)组、0.5 HU/mL rVvhA作用2 h组和NF- κ B抑制组(加入100 μ mol/L BAY11-7082和100 μ mol/L PDTC, 预处理细胞2 h后去除抑制剂, 再加入0.5 HU/mL rVvhA作用2 h), 收集细胞上清液, 4 °C、120 000 r/min离心15 min, 按酶联免疫试剂盒操作说明操作, 酶标仪450 nm处测定吸光度值。

1.3 统计学处理

以上实验至少重复3次, 采用SPSS16.0软件进行统计学分析。所有变量均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析(ANOVA), 各实验组与阴性对照组间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 rVvhA的表达、纯化及复性效果

表达的rVvhA分子量约为54 kDa, 以包涵体形式存在(图1, 条带3)。经反复洗涤、Ni²⁺-NTA亲和层析法纯化得到rVvhA(图1, 条带4、5)。利用复性液结合分步透析法进行复性后, 测定其溶血活性1 HU为 0.2×10^{-6} g。

2.2 细胞生长抑制试验

CCK-8结果显示, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 HU/mL rVvhA与分化后的THP-1细胞分别作用2, 4, 6, 8, 10 h后, THP-1细胞的存活率从0.5 HU/mL rVvhA作用2 h时的88.26%降到4.0 HU/mL作用10 h时的1.37%, 呈时间-剂量依赖性(图2)。

2.3 rVvhA作用于THP-1细胞后的形态学观察

50 ng/mL PMA诱导36 h后, 倒置显微镜下观察发现细胞形态发生了从圆形(图3A)到梭形(图3B)的变化, 类似巨噬细胞, 且贴壁较牢; 0.5 HU/mL rVvhA作用分化THP-1细胞4 h后, 细胞发生圆缩、细胞数

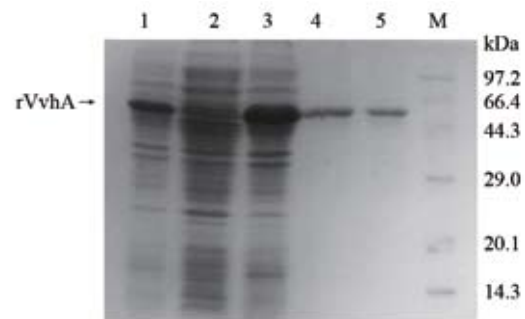
变少(图3C); 相同的时间里, 2.0 HU/mL rVvhA作用组细胞已脱落, 镜下可见细胞碎片(图3D)。

2.4 rVvhA作用于THP-1细胞后NF- κ B p65的激光共聚焦显微镜观察

NF- κ B p65 Cy3标记后激光共聚焦显微镜观察: 正常分化后的THP-1细胞胞质呈弱阳性, 胞核呈阴性(图4A)。0.2 HU/mL rVvhA作用于THP-1细胞2 h后, 镜下观察发现细胞质阳性增强、细胞核呈弱阳性, 细胞数未见明显减少(图4B); 0.4 HU/mL rVvhA作用6 h后, 镜下细胞质呈阳性, 细胞核呈强阳性, 细胞脱落并逐渐减少(图4C); 1.0 HU/mL rVvhA作用6 h后, 镜下细胞质和细胞核着色变浅或基本不着色(图4D)。

2.5 rVvhA作用于THP-1细胞后NF- κ B p65的流式细胞仪检测结果

NF- κ B p65 Alexa Fluor488 nm标记法检测显示: 0.2,



1: 穿透液; 2, 3: 0.5 mmol/L IPTG诱导BL21(DE3) pET-28a(+)-rVvhA后的上清和沉淀; 4, 5: Gu NTA-60、100洗脱rVvhA蛋白; M: 蛋白质低分子量标准。

1: penetration sample; 2,3: supernatant and sediment of BL21(DE3) pET28a(+)-rVvhA induced with 0.5 mmol/L IPTG; 4,5: elution rVvhA by Ni²⁺-NTA affinity chromatography; M: low molecular protein marker.

图1 SDS-PAGE分析亲和层析纯化的rVvhA

Fig.1 The purification of rVvhA analysis by SDS-PAGE

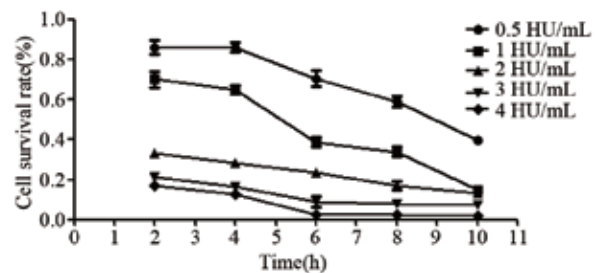


图2 rVvhA作用50 ng/mL PMA诱导后THP-1细胞的细胞存活率

Fig.2 Effect of rVvhA on cell survival rate of 50 ng/mL PMA induced THP-1 cells

0.6 HU/mL rVvhA作用1 h组和1.0 HU/mL rVvhA作用3 h组的NF-κB p65百分率分别为(36.45±3.46)%、(37±2.35)%和(23.45±1.76)%，都高于正常组(21.8±2.03)%，且前两组与正常组相比差异具有明显统计学意义($P<0.01$) (图5和表1)。

其中，0.6 HU/mL rVvhA分别作用1, 2, 3 h后NF-κB p65的百分率分别为(37±2.35)%、(44.5±3.35)%和(34.63±1.87)%，都高于正常组(21.8±2.03)%，且与正常组相比具有统计学意义($P<0.01$) (图5和表1)。

2.6 rVvhA作用于THP-1细胞后NF-κB p65的Western blot结果

Western blot检测NF-κB p65的表达结果提示：0.6 HU/mL rVvhA作用4 h组、0.6 HU/mL rVvhA作用6 h组和1.0 HU/mL rVvhA作用8 h组NF-κB p65

的百分率分别为(29.29±0.05)%、(27.78±0.02)%和(10.25±0.01)%，与正常组(16.06±0.02)%相比都具有统计学意义($P<0.05$)，且1.0 HU/mL rVvhA作用8 h组与正常组相比NF-κB p65的表达下降(图6和表2)。0.2 HU/mL rVvhA作用2 h组[(20.38±0.05)%]与正常组[(16.06±0.02)%]相比差异无统计学意义($P>0.05$) (图6和表2)。

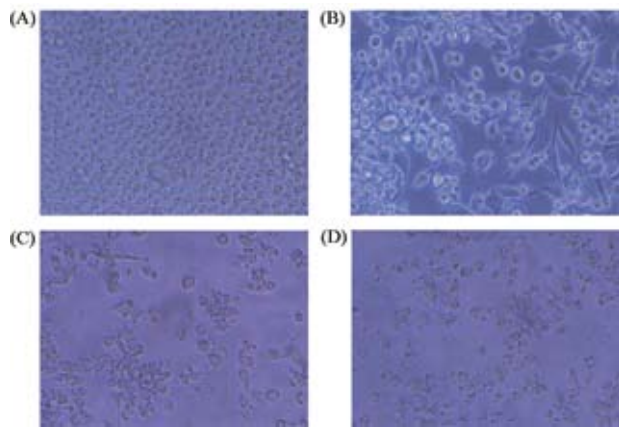


图3 倒置显微镜下观察rVvhA作用于THP-1细胞后细胞形态学的变化(400×)

Fig.3 Morphology changes of THP-1 cells observed by inverted microscope after treated by rVvhA(400×)

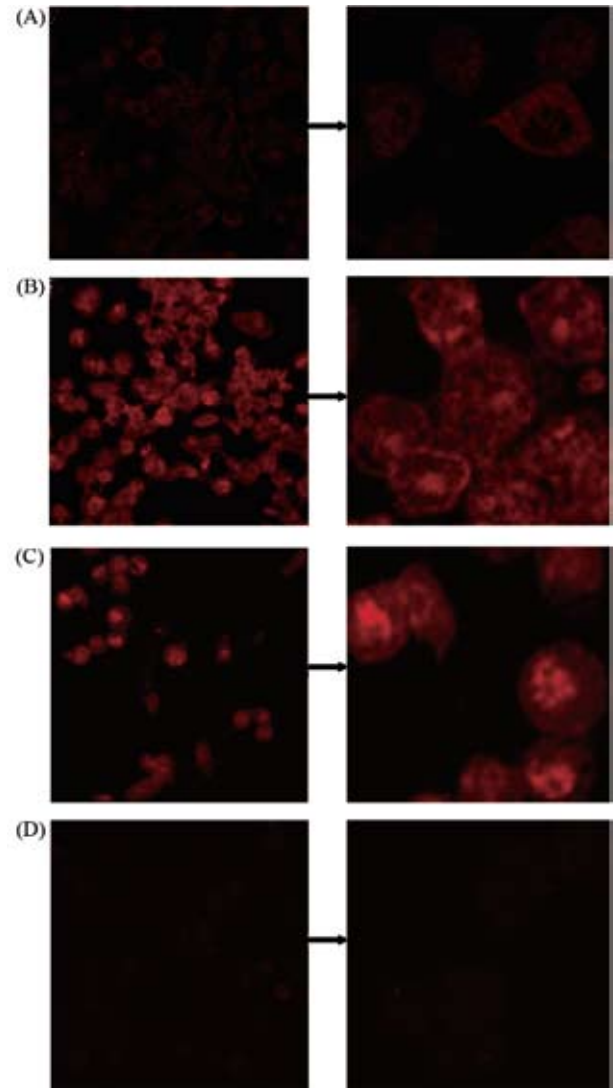
表1 流式细胞仪检测细胞内总NF-κB p65的表达情况

Table 1 Analysis of the expression of total NF-κB p65 by flow cytometry($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别 Groups	NF-κB p65的表达量(%) Expression of NF-κB p65(%)
Uninduced group	1.16±0.17
Induced group	21.8±2.03
0.2 HU/mL rVvhA treated for 1 h	36.5±3.46*
0.6 HU/mL rVvhA treated for 1 h	37.0±2.35*
0.6 HU/mL rVvhA treated for 2 h	44.5±3.35*
0.6 HU/mL rVvhA treated for 3 h	34.63±1.87*
1.0 HU/mL rVvhA treated for 3 h	23.45±1.76

与未诱导组相比, * $P<0.01$ 。

* $P<0.01$ vs the uninduced group.

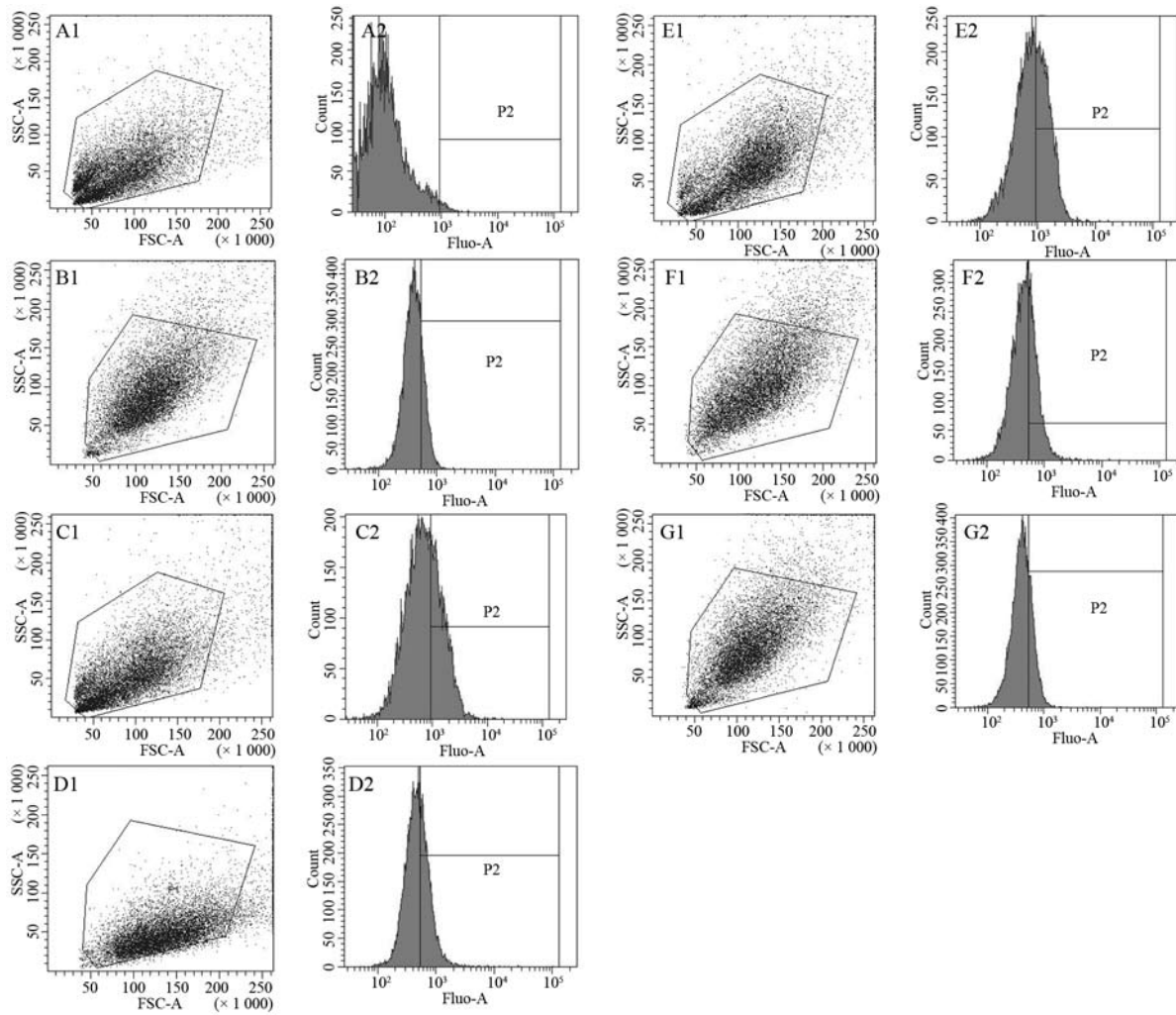


A: 50 ng/mL PMA诱导分化后的THP-1细胞; B: 0.2 HU/mL rVvhA作用2 h的THP-1细胞; C: 0.4 HU/mL rVvhA作用6 h的THP-1细胞; D: 1.0 HU/mL rVvhA作用6 h的THP-1细胞。

A: THP-1 cells induced by 50 ng/mL PMA; B: THP-1 cells treated by 0.2 HU/mL rVvhA for 2 h; C: THP-1 cells treated by 0.4 HU/mL rVvhA for 6 h; D: THP-1 cells treated by 1.0 HU/mL rVvhA for 6 h.

图4 激光共聚焦显微镜下NF-κB p65核转移情况(600×)

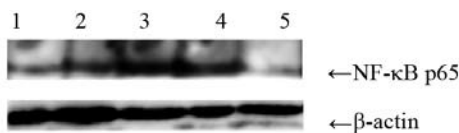
Fig.4 NF-κB p65 nuclear transfer observation by laser scanning confocal microscope(600×)



A1,A2: 未诱导的THP-1细胞; B1,B2: 诱导后的THP-1细胞; C1,C2: 0.2 HU/mL rVvhA作用1 h; D1,D2: 0.6 HU/mL rVvhA作用1 h; E1,E2: 0.6 HU/mL rVvhA作用2 h; F1,F2: 0.6 HU/mL rVvhA作用3 h; G1,G2: 1.0 HU/mL rVvhA作用3 h。
 A1,A2: uninduced THP-1 cells; B1,B2: induced THP-1 cells; C1,C2: THP-1 cells treated by 0.2 HU/mL rVvhA for 1 h; D1,D2: THP-1 cells treated by 0.6 HU/mL rVvhA for 1 h; E1,E2: THP-1 cells treated by 0.6 HU/mL rVvhA for 2 h; F1,F2: THP-1 cells treated by 0.6 HU/mL rVvhA for 3 h; G1,G2: THP-1 cells treated by 1.0 HU/mL rVvhA for 3 h.

图5 流式细胞仪检测细胞内总NF-κB p65的表达情况

Fig.5 Analysis of the expression of total NF-κB p65 by flow cytometry



1: PMA诱导后的THP-1细胞; 2: 0.2 HU/mL rVvhA作用2 h组; 3: 0.6 HU/mL rVvhA作用4 h组; 4: 0.6 HU/mL rVvhA作用6 h组; 5: 1.0 HU/mL rVvhA作用8 h组。

1: PMA induced THP-1 cells; 2: THP-1 cells treated by 0.2 HU/mL rVvhA for 2 h; 3: THP-1 cells treated by 0.6 HU/mL rVvhA for 4 h; 4: THP-1 cells treated by 0.6 HU/mL rVvhA for 6 h; 5: THP-1 cells treated by 1.0 HU/mL rVvhA for 8 h.

图6 Western blot检测细胞核内NF-κB p65的表达情况

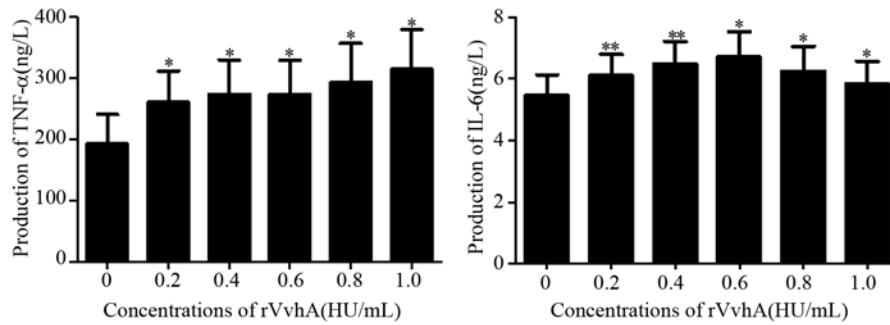
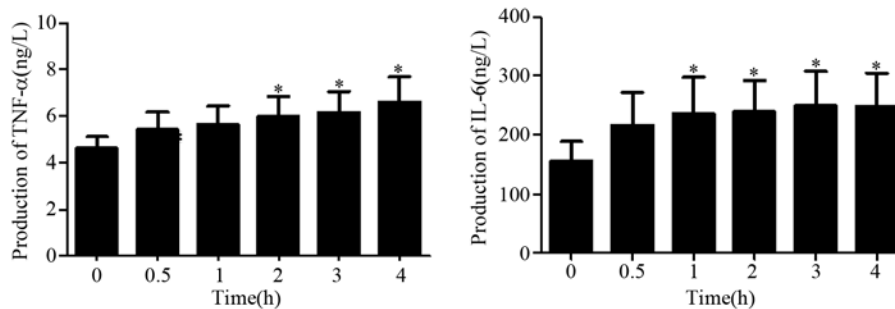
Fig.6 Western blot performed for NF-κB p65 protein levels detection in the nuclear extract

表2 Western blot检测细胞核内NF-κB p65表达量
 Table 2 Analysis of the expression of nuclear NF-κB p65 by Western blot($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别 Groups	NF-κB p65的表达量(%) Expression of NF-κB p65(%)
Induced group	16.06±0.02
0.2 HU/mL rVvhA treated for 2 h	20.38±0.05
0.6 HU/mL rVvhA treated for 4 h	29.29±0.05*
0.6 HU/mL rVvhA treated for 6 h	27.78±0.02*
1.0 HU/mL rVvhA treated for 8 h	10.25±0.01*

*P<0.05, 与诱导组相比。

*P<0.05 vs the induced group.

图7 不同浓度rVvhA作用于THP-1细胞4 h后TNF- α 、IL-6的表达量Fig.7 The production of TNF- α , IL-6 in THP-1 cells treated by different concentrations of rVvhA for 4 h

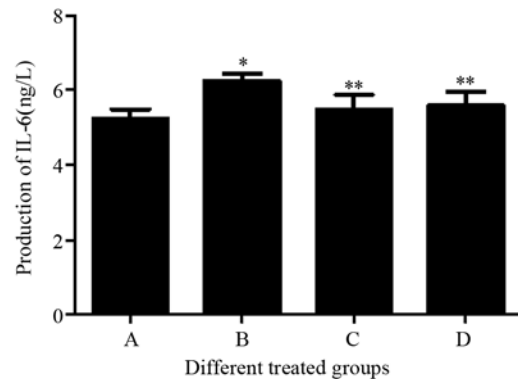
* $P < 0.05$, 与0.5 HU/mL rVvhA 0 h作用组相比。

* $P < 0.05$ vs 0.5 HU/mL rVvhA treated group.

图8 0.5 HU/mL rVvhA作用于THP-1细胞不同时间后TNF- α 、IL-6的表达量Fig.8 The production of TNF- α , IL-6 in THP-1 cells treated by rVvhA in different time

2.7 rVvhA作用于THP-1细胞后TNF- α 、IL-6的表达情况

ELISA结果显示: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 HU/mL rVvhA作用4 h后TNF- α 的表达量随rVvhA作用浓度的增加而增加, 且有统计学意义($P < 0.05$)。而IL-6表达量在0.6 HU/mL rVvhA作用时达到高峰, 其后的0.8, 1.0 HU/mL rVvhA作用组与0.6 HU/mL rVvhA作用组相比IL-6的表达量略有下降, 其中0.2, 0.4 HU/mL rVvhA作用组与正常组相比有显著统计学差异($P < 0.01$) (图7); 0.5 HU/mL rVvhA分别作用0.5, 1, 2, 3, 4 h时TNF- α 、IL-6的表达量均随时间的增加而增加, 且有统计学意义($P < 0.05$) (图8)。100 μ mol/L BAY11-7082和100 μ mol/L PDTIC预处理细胞2 h后与未加抑制剂的0.5 HU/mL rVvhA 2 h组相比, IL-6的表达量有所下降, 且具有统计学意义($P < 0.05$) (图9), 而NF- κ B抑制剂对TNF- α 的表达量无影响。



A: 诱导组; B: 0.5 HU/mL rVvhA作用2 h; C: 0.5 HU/mL rVvhA作用2 h+100 μ mol/L BAY11-7082抑制剂; D: 0.5 HU/mL rVvhA作用2 h+100 μ mol/L PDTIC抑制剂。* $P < 0.01$, 与诱导组相比; ** $P < 0.05$, 与0.5 HU/mL rVvhA作用2 h组相比。

A: induced group; B: 0.5 HU/mL rVvhA treated for 2 h; C: 0.5 HU/mL rVvhA treated for 2 h+100 μ mol/L BAY11-7082 inhibitor; D: 0.5 HU/mL rVvhA treated for 2 h+100 μ mol/L PDTIC inhibitor. * $P < 0.01$ vs induced group; ** $P < 0.05$ vs 0.5 HU/mL rVvhA treated for 2 h group.

图9 NF- κ B抑制剂对0.5 HU/mL rVvhA作用2 h后的THP-1细胞IL-6表达量的影响Fig.9 Effect of NF- κ B inhibitors on IL-6 expression after 0.5 HU/mL rVvhA treated for 2 h in THP-1 cells

3 讨论

NF- κ B最早于1986年在鼠成熟B细胞和粒细胞瘤中被发现,并被命名为细胞核kappa轻链基因表达的调节子,后经研究发现其存在于几乎所有的细胞中。目前所知的NF- κ B/Rel家族成员包括RelA(p65)、RelB、c-Rel、v-Rel、p50、p52等,通常所指的NF- κ B为p50和p65的异源二聚体。在细胞正常状态下,p50/p65二聚体在血浆中与I- κ B α 、I- κ B β 和I- κ B γ 等NF- κ B抑制家族蛋白结合^[7],隐藏p65与靶DNA结合的关键氨基酸残基,抑制NF- κ B与靶DNA调节区的特异性结合。炎症反应发生时,细胞外细胞因子等激活I- κ B激酶(I- κ K)使之与NF- κ B p50/p65异源二聚体相连的I- κ B α 磷酸化^[8],磷酸化的I- κ B α 与泛素结合后被蛋白酶降解,I- κ B α 被降解后,p50/p65复合物进入核内,与靶基因的 κ B位点结合。p50和p65具有不同的结构和功能,p65的C端序列中含有转录激活结构域,其中富集丝氨酸、酸性氨基酸和疏水性氨基酸,能直接作用于转录元件而激活靶基因的转录^[16];而p50的C端则无此结构和功能。活化的转录因子NF- κ B通过与相应的炎症介质靶基因启动子区的 κ B位点结合而导致大量的炎症介质基因的过度表达。

炎症因子作为机体防御系统的重要组成部分,在调节宿主免疫炎症反应过程中具有重要作用,但是炎症因子在体内过度表达会引起组织损伤和器官功能障碍。IL-6是一种具有多种功能的细胞因子^[9],炎症反应中,IL-6对其它炎症细胞,如中性粒细胞、单核巨噬细胞等有趋化作用。大量研究发现IL-6水平升高是最早的感染指标,比常规的C-反应蛋白要提早许多,外周血IL-6水平检测,在临床上可作为脓毒症诊断和治疗的相关指标。而肿瘤坏死因子TNF- α 就是一个重要的前炎症因子,它与受体结合后可以启动细胞内的多种信号通路,包括丝裂原活化蛋白酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号途径等^[10],从而引起其它因子表达和细胞凋亡等多种生物学效应的发生。且NF- κ B活性的增高在这一过程中有着重要的作用,TNF- α 表达既受NF- κ B的调控,又能促进NF- κ B的活化。

前期工作已证实以基因重组方式克隆、表达、纯化和复性的rVvhA的溶血活性1HU为 0.2×10^{-6} g^[11]。本实验证实:在0.4 HU/mL rVvhA作用6 h的THP-1细胞内NF- κ B p65的核转移现象最明显;0.6 HU/mL rVvhA作用2 h时细胞内总的NF- κ B p65表达量达到

高峰。Western blot结果提示:0.6 HU/mL rVvhA作用4 h时细胞核内NF- κ B p65蛋白含量最高,但是超过一定的浓度和时间范围,细胞存活率较低时,rVvhA作用于分化后的THP-1细胞的NF- κ B p65的表达量反而下降。表明在适当的浓度范围内,细胞存活率较高时,rVvhA可激活NF- κ B信号通路并呈时间-剂量依赖性,且可诱导分化成巨噬细胞的THP-1细胞上调TNF- α 、IL-6的表达量。用NF- κ B抑制剂预处理细胞2 h后,相同作用条件下IL-6的表达量明显下降,而TNF- α 的表达量无明显变化。

rVvhA作用分化后的THP-1细胞如何激活NF- κ B信号通路机制尚不明确,推测与其诱导细胞上调TNF- α 的表达有关。有研究表明^[12],TNF可与肿瘤坏死因子受体2(tumor necrosis factor receptor 2, TNFR2)结合后介导NF- κ B信号通路的激活,引发“炎症级联反应”,导致IL-1、IL-6、IL-8等大量释放,使炎症反应不断放大,p38 MAPK可能参与了TNF- α 诱导下NF- κ B的活化过程。

参考文献 (References)

- 1 卢中秋,程俊彦,陈志康. 创伤弧菌感染的流行病学及临床特点. 中国急救医学 2003; 5(23): 318-20.
- 2 Ross JA, Auger MJ, Burke B, Lewis CE. The biology of the macrophage. Oxford Medical Publications 2002; 2: 1-72.
- 3 Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. Nat Rev Immunol 2002; 2: 725-34.
- 4 Inagaki T, Hoshino M, Hayakawa T, Ohara H, Yamada T, Yamada H, et al. Interleukin 6 is a useful marker for early prediction of the severity of acute pancreatitis. Pancreas 1997; 14(1): 1-8.
- 5 Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MK, Dockrell DH. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. PLoS One 2010; 5(1): e8668.
- 6 李桂军,桂静,肖美英,楼永良. 创伤弧菌溶细胞素vvhA基因在大肠杆菌中的表达及其对应激因子的调控. 中华微生物学和免疫学杂志 2008; 28(1): 24-8.
- 7 Whiteside ST, Epinat JC, Rice NR, Israél A. I κ B, a novel member of the I κ B family, controls RelA and c-Rel NF- κ B activity. EMBO J 1997; 16(6): 1413-26.
- 8 Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation. Cell 1997; 91(2): 243-52.
- 9 Ondrey FG, Dong G, Sunwoo J, Chen Z, Wolf JS, Crowl-Bancroft CV, et al. Constitutive activation of transcription factors NF-(kappa)B, AP-1, and NF-IL 6 in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines that express pro-inflammatory

- and pro-angiogenic cytokines. *Mol Carcinog* 1999; 26(2): 119-29.
- 10 Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV, Wallach D. MAPK-related kinase involved in NF- κ B induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 1997; 385(6616): 540-4.
- 11 桂 静, 肖美英, 楼永良, 胡 蝶, 严 杰, 朱晔晶. 创伤弧菌溶细胞素融合蛋白重组、表达与细胞毒活性鉴定. *细胞生物学杂志* 2008; 30(1): 89-94.
- 12 Song HY, Regnier CH, Kirschning CJ, Goeddel DV, Rothe M. Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades: Bifurcation of nuclear factor- κ B and c-jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathway TNF receptor-associated factor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(18): 9792-6 .
- 13 Kang MK, Jhee EC, Koo BS, Yang JY, Park BH, Kim JS, *et al.* Induction of nitric oxide synthase expression by *Vibrio vulnificus* cytolytic toxin. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290(3): 1090-5.
- 14 Espat NJ, Auffenberg T, Abouhamze A, Baumhofer J, Moldawer LL, Howard RJ. A role for tumor necrosis factor- α in the increased mortality associated with *Vibrio vulnificus* infection in the presence of hepatic dysfunction. *Ann Surg* 1996; 223(4): 428-33.
- 15 Duran A, Diaz MT, Moscat J. Essential role of RelA Ser311 phosphorylation by ζ PK in NF- κ B transcriptional activation. *EMBO J* 2003; 22(15): 3910-8.
- 16 Bonizzi G, Karin M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004; 25(6): 280-8.
- 17 Karin M, Lin A. NF- κ B at the crossroads of life and death. *Immunol* 2002; 3(3): 221-7.
- 18 Rothe M, Sarma V, Dixit VM, Goeddel DV. TRAF2-mediated activation of NF- κ B by TNF receptor2 and CD40. *Science* 1995; 269(5229): 1424-7 .
- 19 Atwood WJ, Tornatore CS, Traub R, Conant K, Drew PD, Major EO. Stimulation of HIV type 1 gene expression and induction of NF- κ B (p50/p65)-binding activity in tumor necrosis factor α -treated human fetal glial cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10(10): 1207-11.
- 20 Espinosa L, Santos S, Inglés-Esteve J, Muñoz-Canoves P, Bigas A. p65-NF κ B synergizes with Notch to activate transcription by triggering cytoplasmic translocation of the nuclear receptor corepressor N-CoR. *Cell* 2002; 115(Pt6): 1295-303.
- 21 Takada Y, Singh S, Aggarwal BB. Identification of a p65 peptide that selectively inhibits NF- κ B activation induced by various inflammatory stimuli and its role in down-regulation of NF- κ B-mediated gene expression and up-regulation of apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279(15): 96-104.

Study on NF- κ B Activation Pathway in rVvhA-effected THP-1 Cells

Tu Yanye, Liu Yanfei, Chen Jianlin, Lou Yongliang*

(School of Medical Lab Science, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

Abstract This study designed to investigate how recombinant *Vibrio vulnificus* hemolysin (rVvhA) activates NF- κ B signaling pathway in the PMA-stimulated THP-1 cell line. The cytotoxic effect of rVvhA on the growth of THP-1 cells was identified by CCK-8. Cell morphology was observed by inverted microscope. NF- κ B p65 nuclear transfer was observed by laser scanning confocal microscope. NF- κ B p65 expression in rVvhA effected THP-1 cells was detected by flow cytometry. NF- κ B p65 expression in rVvhA effected THP-1 cell nucleus was determined by Western blot analysis. TNF- α and IL-6 expression in rVvhA effected THP-1 cells was quantified by ELISA. The viability of THP-1 cells exposed to rVvhA was inhibited in time-dose dependent manner and the cell morphology changed obviously observed by inverted microscope. The levels of NF- κ B p65 transferred into nucleus reached its peak after treated by 0.4 HU/mL rVvhA for 6 h. Total content of NF- κ B p65 in cells peaked at 2 h treated by 0.6 HU/mL rVvhA. NF- κ B p65 in cell nucleus was the most after 0.6 HU/mL rVvhA treated for 4 h. rVvhA effected THP-1 cells can raise the expressions of TNF- α and IL-6. NF- κ B inhibitors can restrain the expression of IL-6. rVvhA had cytotoxic effect on THP-1 cells. It can activate NF- κ B signaling pathway in THP-1 cells and increase the expressions of TNF- α and IL-6, meanwhile, NF- κ B inhibitors can decrease the expression level of IL-6.

Key words *Vibrio vulnificus*; cytolytic toxin; THP-1; NF- κ B p65; TNF- α ; IL-6

Received: September 1, 2011 Accepted: October 27, 2011

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.Y2090468)

*Corresponding author. Tel: 86-577-86689779, E-mail: lyl10282004@yahoo.com.cn