

细菌脂多糖诱导人单核细胞株对细菌脂蛋白的耐受性及其与肌动蛋白骨架关系

刘建仓 周 荣 刘良明 刘 韧 肖 南*

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所第二研究室, 创伤、烧伤及复合伤国家重点实验室, 重庆 400042)

摘要 细菌脂多糖(LPS)可诱导宿主对 LPS 的耐受, 但对细菌脂蛋白(BLP)是否存在交叉耐受, 目前报道不一。采用人单核细胞株(THP-1), 建立小剂量 LPS 诱导 THP-1 对 LPS 耐受的细胞模型; 观察细胞肌动蛋白骨架、炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的浓度及 NF- κ B 的 DNA 结合活力的变化情况; 探讨 BLP 交叉耐受及细胞骨架在其中的作用。结果显示, THP-1 细胞经小剂量(10 ng/ml) LPS、大剂量(100 ng/ml) LPS 或 BLP 刺激后, 细胞形态严重变形, 肌动蛋白重组, 细胞周边肌动蛋白丝带消失, 出现明显的肌动蛋白收缩团块及伪足, 细胞核内 NF- κ B 的 DNA 结合活性显著升高, 培养上清液中炎症因子(TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6)的释放显著增加; 而小剂量 LPS 预刺激 12 h 后, 再用大剂量的 LPS 或 BLP 刺激 6 h, 上述指标明显改善; 采用细胞骨架肌动蛋白聚集破坏剂鬼笔环肽预处理后的 THP-1 细胞, 可取消由小剂量 LPS 诱导的自身耐受及对 BLP 的交叉耐受; 可见, 细菌 LPS、BLP(100 ng/ml)可诱导 THP-1 细胞肌动蛋白骨架的改变, 激活 NF- κ B 信号通路, 诱导炎症细胞因子 TNF- α 、IL-1、IL-6 过度释放, 激活宿主炎症细胞的炎症反应; 而小剂量 LPS 预刺激后可诱导出 THP-1 细胞对 LPS 的自身耐受和对 BLP 的交叉耐受; 细胞骨架肌动蛋白参与了小剂量 LPS 诱导 THP-1 细胞对 LPS 自身耐受和对 BLP 交叉耐受的形成。

关键词 人单核巨噬细胞; 细菌脂多糖; 细菌脂蛋白; 耐受性; 细胞骨架

内毒素耐受是指机体或细胞经低剂量细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激后, 对 LPS 的再次刺激呈低反应性或无反应状态, 其主要表现是, 宿主免疫炎症细胞经小剂量 LPS 处理后, 再给予较大剂量 LPS 时, 炎症细胞因子(如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等)产生明显减少。它与机体的免疫力、LPS 的内化、LPS 信号转导效率等综合因素有关^[1]。然而, 除 LPS 外, 细菌的其他结构成分如细菌脂蛋白(bacterial lipoprotein, BLP)也具有重要的作用^[2,3]。Medvedev 等^[4]报道, 在小鼠腹膜单核细胞, LPS 可诱导细胞对 BLP 产生较弱的耐受性, 但 Wang 等^[5]报道, 在预先接受非致死剂量 LPS 的小鼠不能耐受致死剂量的 BLP。对 LPS 耐受的宿主免疫炎症细胞与 BLP 之间是否有交叉耐受及其相关机制, 值得进一步研究阐明。

肌动蛋白(actin)细胞骨架参与了细胞的许多生物学功能, 包括运动、趋化、分裂增殖、吞饮和分泌等^[6]。正常的肌动蛋白骨架结构对于维持细胞的正常形态和功能起着至关重要的作用。肌动蛋白骨架的聚集和重组是炎症反应中宿主免疫炎症细胞

(如单核/巨噬细胞)募集及激活的重要环节, 但肌动蛋白骨架是否在 LPS 耐受或 BLP 交叉耐受中起重要作用, 目前尚无相关文献报道。本文采用人单核细胞株, 建立小剂量 LPS 诱导耐受的细胞模型, 观察其对 BLP 的交叉耐受性, 并初步探讨细胞骨架肌动蛋白在其中的作用。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

THP-1 细胞(人单核细胞株, 购自第三军医大学药理系); 胎牛血清和 1640 培养基(美国 Hyclone); LPS、BLP(美国 Alexis); Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents Kit、LightShift Chemiluminescent EMSA Kit、phalloidin、FITC-phalloidin(美国 Pierce); TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 ELISA 检测试剂盒(武汉博士德); 1500 型全波长酶标仪(芬兰); TCS Sp2 激光共聚焦荧光显微镜(德国 Leica)。

收稿日期: 2007-01-23 接受日期: 2007-05-18

国家自然科学基金资助项目 (No.30471791)

* 通讯作者。Tel: 023-68757736, E-mail: xiao_nan_99@yahoo.com

1.2 方法

1.2.1 小剂量 LPS 诱导 THP-1 细胞对 LPS 耐受细胞模型的建立 将 THP-1 细胞(2×10^6 个/孔)接种于 24 孔板培养 24 h 后更换培养基^[7]。实验分为 8 组($n=8$): 正常对照组(A), 不做任何处理培养 12 h; 10 ng/ml LPS 处理组(B), 即 10 ng/ml LPS 温育 THP-1 细胞 12 h; 100 ng/ml LPS 或 BLP 组(C、D), 即 100 ng/ml LPS 或 BLP 温育 THP-1 细胞 6 h; LPS 诱导耐受及 BLP 交叉耐受组(E、F), 即 10 ng/ml LPS 预温育 THP-1 细胞 12 h 后, 收集细胞并用无菌 PBS 液洗涤两次, 更换新鲜培养液温育 2 h, 随后细胞采用 100 ng/ml BLP 或 100 ng/ml LPS 继续温育 6 h; 鬼笔环肽(phalloidin)处理 LPS 诱导耐受及 BLP 交叉耐受组(G、H), 即 $0.3 \mu\text{mol/L}$ 鬼笔环肽预温育 THP-1 细胞 3 h 后, 收集细胞并用无菌 PBS 液洗涤两次, 更换新鲜培养液温育 2 h, 再进行 LPS 诱导耐受实验。收集各组细胞及培养上清液, -70°C 贮存备用。

1.2.2 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 活性的测定 培养上清液中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的浓度采用 ELISA 试剂盒按说明书进行检测。

1.2.3 细胞核蛋白的提取 采用核蛋白提取试剂盒提取细胞核蛋白。各组 THP-1 细胞先用预冷的 PBS 液洗涤两次, 加入 $200 \mu\text{l}$ 细胞裂解液重悬并高速震荡 15 s 后冰浴放置 10 min, 离心($16\ 000\ \text{g}$, 5 min, 4°C)弃上清液, 沉淀再加入 $100 \mu\text{l}$ 核裂解液重悬并高速震荡 15 s 后冰浴放置 40 min, 离心($16\ 000\ \text{g}$, 10 min, 4°C)收集上清液即为核蛋白。采用 Lowry 法测定蛋白质浓度。

1.2.4 凝胶滞留法(electrophoretic mobility shift assays, EMSA)检测 NF- κB 转录活性 NF- κB 的凝胶滞留分析按试剂盒操作说明进行。采用末端标记法将 NF- κB 的 DNA 结合位点(5'-AGTTGAGGGGACT-TTCCCAGGC-3' 3'-TCAACTCCCCTGAAAGGGTC-CG-5' 标记生物素; 取 $3 \mu\text{g}$ 核蛋白与生物素标记的 $20\ \text{fmol/L}$ 寡聚核苷酸室温温育 20 min 后, 5% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离($100\ \text{V}$, 3 h), 剥离凝胶并转膜($380\ \text{mA}$, 1 h)后, 在暗室将膜置于发光增强试剂中反应(2~3 min)后, 迅速用塑料膜包裹并与 X 射线胶片一同放入暗盒中, 曝光 2~5 min, 再将胶片显影、定影; 采用图象分析仪对胶片中的目标带进行扫描及灰度分析。

1.2.5 细胞肌动蛋白骨架的荧光染色 模型同 1.2.1 所述, 收集各组 THP-1 细胞, PBS 液洗涤 2 次, 将细

胞均匀地平铺于多聚赖氨酸处理的载玻片上, 经 3.7% 多聚甲醛室温固定 10 min 后, PBS 洗涤 2 次, 0.5% Triton X-100 室温温育 3 min, PBS 洗涤 2 次, 加入 $1 \mu\text{g/ml}$ FITC- 鬼笔环肽标记细胞内肌动蛋白骨架, 室温温育 40 min, PBS 洗涤 4 次, 30% 甘油封片, 用激光共聚焦观察细胞形态及肌动蛋白骨架状态。

1.2.6 统计学处理 所有数据均采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 Excel 统计软件的组间或自身对照 t 检验进行统计学分析。 $P < 0.05$ 表示组间有显著性差异, $P < 0.01$ 表示组间有非常显著性差异。

2 结果

2.1 小剂量 LPS 诱导对 BLP 的交叉耐受及肌动蛋白骨架在其中的作用

THP-1 细胞用小剂量 LPS(10 ng/ml)刺激 12 h 后, 培养上清液中 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 的释放与正常相比显著增高($P < 0.01$)。小剂量 LPS(10 ng/ml)预刺激 12 h 后再以大剂量 LPS 或 BLP(100 ng/ml)刺激 6 h, TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 释放与单独使用大剂量 LPS 或 BLP 刺激组相比显著降低($P < 0.01$), 说明采用小剂量 LPS(10 ng/ml)预刺激 12 h 后可诱导出 THP-1 细胞对 LPS 的耐受及对 BLP 的交叉耐受; 但预先用细胞骨架肌动蛋白聚集破坏剂鬼笔环肽($0.3 \mu\text{mol/L}$)处理后, 可破坏上述耐受性的诱导, 表现为 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 释放明显高于耐受组($P < 0.01$), 且鬼笔环肽预处理对 BLP 交叉耐受性的影响要远小于对 LPS 耐受的影响(图 1)。

2.2 小剂量 LPS 耐受及 BLP 交叉耐受后细胞核内 NF- κB 活力变化及肌动蛋白骨架在其中的作用

大剂量(100 ng/ml)LPS 或 BLP 刺激 THP-1 细胞均可使细胞核内 NF- κB 的 DNA 结合活性显著增强($P < 0.01$), 但小剂量 LPS(10 ng/ml)刺激时 NF- κB 的 DNA 结合活性无显著变化; 小剂量 LPS(10 ng/ml)预刺激 12 h 后再以大剂量(100 ng/ml)LPS 或 BLP 刺激 6 h, 细胞核内 NF- κB 的 DNA 结合活性较大剂量 LPS 或 BLP(100 ng/ml)刺激显著降低($P < 0.01$); $0.3 \mu\text{mol/L}$ 鬼笔环肽预处理后, 细胞核内 NF- κB 的 DNA 结合活性又显著升高($P < 0.01$)(图 2)。

2.3 诱导 LPS 耐受及交叉耐受后细胞形态及肌动蛋白骨架的变化

正常细胞肌动蛋白主要分布在细胞周边, 在细胞与细胞接触处呈束状相互连接, 形成周边肌动蛋白丝

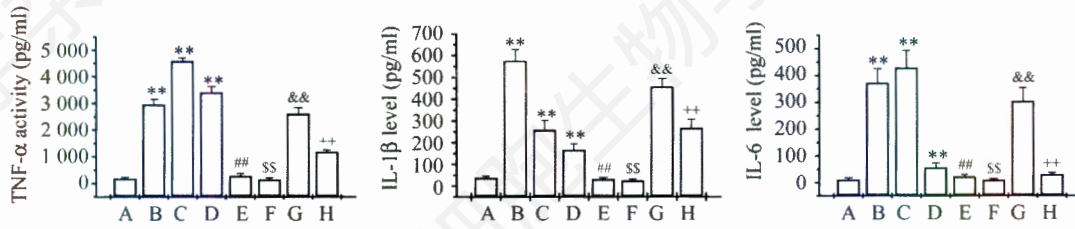


Fig.1 Changes of TNF-α, IL-1β and IL-6 releasing in LPS-toleranced and BLP-cross tolerated THP-1 cell

A: control group; B: 10 ng/ml LPS 12 h group; C: 100 ng/ml LPS 6 h group; D: 100 ng/ml BLP 6 h group; E: 10 ng/ml LPS 12 h +100 ng/ml LPS 6 h (LPS-toleranced) group; F: 10 ng/ml LPS 12 h+100 ng/ml BLP 6 h (BLP-cross tolerated) group; G: 0.3 μmol/L phalloidin 3 h +10 ng/ml LPS 12 h+100 ng/ml LPS 6 h group; H: 0.3 μmol/L phalloidin 3 h +10 ng/ml LPS 12 h + 100 ng/ml BLP 6 h group. ***P*<0.01, vs control group; ##*P*<0.01, vs 100 ng/ml LPS 6 h group; SS*P*<0.01, vs 100 ng/ml BLP 6 h group; &&*P*<0.01, vs LPS-toleranced group; ++*P*<0.01, vs BLP-cross tolerated group.

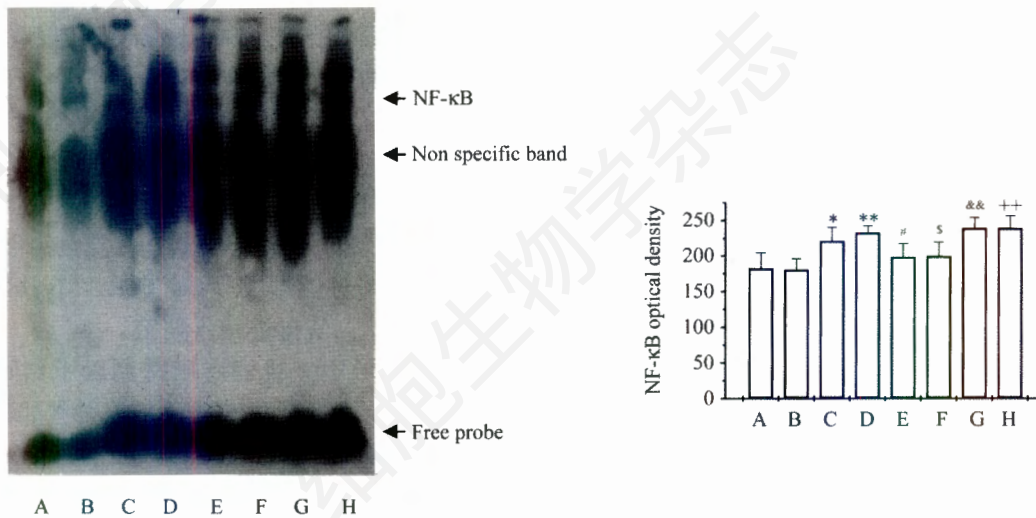


Fig.2 The measurement of NF-κB DNA binding activity in LPS-toleranced and BLP-cross tolerated THP-1 cell

A: control group; B: 10 ng/ml LPS 12 h group; C: 100 ng/ml LPS 6 h group; D: 100 ng/ml BLP 6 h group; E: 10 ng/ml LPS 12 h+100 ng/ml LPS 6 h (LPS-toleranced) group; F: 10 ng/ml LPS 12 h +100 ng/ml BLP 6 h (BLP-cross tolerated) group; G: 0.3 μmol/L phalloidin 3 h +10 ng/ml LPS 12 h+100 ng/ml LPS 6 h group; H: 0.3 μmol/L phalloidin 3 h+10 ng/ml LPS 12 h+100 ng/ml BLP 6 h group. **P*<0.05, ***P*<0.01, vs control group; #*P*<0.05, vs 100 ng/ml LPS 6 h group; ^s*P*<0.05, vs 100 ng/ml BLP 6 h group; &&*P*<0.01, vs LPS-toleranced group; ++*P*<0.01, vs BLP-cross tolerated group.

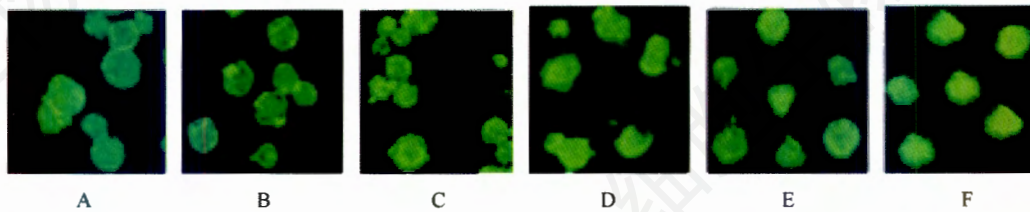


Fig. 3 Changes of the morphological shape and actin cytoskeleton in THP-1 stained with FITC-phalloidin

A: control group; B: 10 ng/ml LPS 12 h group; C: 100 ng/ml LPS 6 h group; D: 100 ng/ml BLP 6 h group; E: 10 ng/ml LPS 12 h+100 ng/ml LPS 6 h group; F: 10 ng/ml LPS 12 h+100 ng/ml BLP 6 h group.

带(图 3A); 小剂量 LPS(10 ng/ml)刺激 THP-1 细胞 12 h, 细胞肌动蛋白重组, 肌动蛋白收缩成小团状或短小的束状, 周边肌动蛋白丝带模糊, 细胞形态有改变,

出现微弱的伪足(图 3B); 大剂量 LPS 或 BLP(100 ng/ml)刺激 THP-1 细胞 6 h 后, 细胞内出现明显的肌动蛋白收缩团块, 细胞形态严重变形, 出现大量伪足(图

3C、图3D); 而小剂量 LPS(10 ng/ml)预刺激 12 h 后再以大剂量(100 ng/ml)LPS 或 BLP 刺激 6 h, 细胞形态较大剂量(100 ng/ml)LPS 或 BLP 刺激有明显的改善, 伪足明显减少, 但细胞内仍聚集着肌动蛋白团块(图 3E、图 3F)。

3 讨论

感染所致的脓毒症及脓毒性休克大部分是由革兰氏阴性菌(G⁻)所引起, LPS 是 G⁻ 胞壁的主要糖脂成分, BLP 则是 G⁻ 和 G⁺ 胞壁内最丰富的蛋白质。细菌感染及抗生素治疗时, LPS 及 BLP 可被释放并激活宿主免疫炎症细胞(如单核/巨噬细胞, 中性粒细胞等)产生炎症细胞因子, 如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 IL-12。尽管适量的炎症细胞因子合成释放是免疫炎症细胞具有抗菌活性的前提, 但过量炎症细胞因子的合成释放可导致急性呼吸窘迫综合征、多器官功能衰竭形成及机体死亡。抑制宿主炎症细胞的过度活化, 并不影响其吞噬及杀菌能力是防治脓毒症/脓毒性休克发生的重要手段, 但如何调控宿主炎症细胞的过度激活状态, 还是目前尚待解决的问题。

内毒素耐受是生物在长期进化过程中形成的一种保守的防护性调节机制。目前认为, 单核巨噬细胞系统是内毒素作用的主要靶细胞, 是产生内毒素耐受的主要效应细胞^[8-10]。关于细菌 LPS 与 BLP 是否存在着交叉耐受性, 目前还尚未阐明。本实验结果显示, 在人 THP-1 细胞, 小剂量 LPS (10 ng/ml)预刺激不仅可诱导对大剂量 LPS (100 ng/ml)耐受, 也可诱导对 BLP 的交叉耐受, 表现为细胞 NF- κ B 转录活性明显降低, 炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 释放显著减少, 与 Medvedev 等^[9]的报道一致。

免疫炎症细胞膜上的 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)家族是介导识别 LPS/BLP 信号的膜受体超家族蛋白, 其中 TLR4 是 LPS 的识别受体, 而 TLR2 是 BLP 的特异性识别受体。有报道指出, 肌动蛋白骨架的聚集和重组是炎症反应中宿主免疫炎症细胞(如单核/巨噬细胞)募集及激活的重要环节^[11]。肌动蛋白是细胞骨架的重要成分, 对细胞伪足形成、移行、浸润起着重要的作用。研究发现, 炎症刺激(如 LPS)通过 TLRs 可诱导肌动蛋白骨架的聚集, 提示细胞骨架肌动蛋白可能与 TLRs 信号通路有关^[12]; 在人中性粒细胞, LPS 可激活 TLR4-IRAK-NF- κ B 信号通路, 诱导宿主炎症细胞的过度激活及炎症细胞因子如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 过度释放, 而该过程依

赖于细胞骨架系统, 进一步揭示了肌动蛋白骨架与 TLRs 偶联的下游信号关系密切^[13]。本实验结果显示, 小剂量 LPS (10 ng/ml)及大剂量(100 ng/ml)LPS 或 BLP 刺激 THP-1 细胞后, 细胞骨架肌动蛋白重组, 收缩成团状或束状, 周边肌动蛋白丝带消失, 细胞形态改变, 出现大量伪足; 而小剂量 LPS (10 ng/ml)预刺激 12 h 后再以大剂量(100 ng/ml)LPS 或 BLP 刺激 6 h, 细胞形态有明显的改善, 伪足明显减少; 细胞骨架肌动蛋白聚集破坏剂鬼笔环肽可取消 LPS 耐受及 BLP 交叉耐受, 提示肌动蛋白骨架与 LPS 诱导耐受及对 BLP 交叉耐受有关。结果还显示, 鬼笔环肽预处理对 BLP 交叉耐受性的影响要远小于对 LPS 耐受的影响。由于 TLR2/TLR4 可与其下游接头分子 MyD88 结合并形成复合物, 且 Medvedev 等^[9]报道诱导 LPS 耐受后细胞 TLR2、TLR4 及其下游信号分子 MyD88 的表达均没有变化, 而与 TLR4-MyD88 复合物形成减少有关, 是否提示在 LPS 耐受细胞(THP-1)中, 细胞骨架肌动蛋白主要是通过干预胞内信号分子(如 MyD88)的转位及 TLR4-MyD88 复合物形成, 从而参与 LPS 耐受性的形成, 而对 TLR2-MyD88 复合物形成影响不大, 值得进一步研究。

综上所述, 我们可以得到以下结论:(1)细菌 LPS、BLP 均可刺激 THP-1 细胞骨架肌动蛋白的改变, 激活 NF- κ B 信号通路, 诱导宿主炎症细胞的过度激活和炎症细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 过度释放;(2)小剂量细菌 LPS 可诱导 THP-1 细胞对大剂量 LPS 的自身耐受, 并与细菌 BLP 之间存在着交叉耐受;(3)细胞肌动蛋白骨架参与了小剂量 LPS 诱导 THP-1 细胞对 LPS 自身耐受和对 BLP 交叉耐受的形, 其机制与 NF- κ B 信号通路的激活有关。

参考文献 (References)

- [1] 张德明等. 第三军医大学学报, 2003, 25: 380
- [2] Sparwasse T et al. *Nature*, 1997, 386: 336
- [3] Klinman DM et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 2879
- [4] Medvedev AE et al. *J Immunol*, 2002, 169: 5209
- [5] Wang JH et al. *J Immunol*, 2003, 170: 14
- [6] Brancolini C et al. *EMBO J*, 1995, 14: 5179
- [7] Medvedev AE et al. *J Immunol*, 2000, 164: 5564
- [8] 刘鸿翔等. *重庆医学*, 2006, 35: 850
- [9] 李崇辉等. *中华实验外科杂志*, 2004, 21: 1362
- [10] Hansen C et al. *Surg Forum*, 1999, 50: 219
- [11] Di Marzio P et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 331: 909
- [12] West MA et al. *Science*, 2004, 305: 1153
- [13] Heagy W et al. *Shock*, 2000, 14: 271

LPS-induced BLP Tolerance and the Role of Actin Cytoskeleton in THP-1 Cell Line

Jian-Cang Liu, Rong Zhou, Liang-Ming Liu, Ren Liu, Nan Xiao*

(State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 2, Research Institute of Surgery, Daping Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract Abstract It is remain uncertain whether bacterial lipopolysaccharide (LPS)-toleranced monocyte cross-toleranced with bacterial lipoprotein (BLP). The study was aimed to observe the LPS tolerance and BLP cross-tolerance induced by LPS (10 ng/ml) and the changes of actin, and to explore the role of actin cytoskeleton in LPS-tolerance and BLP cross-tolerance in THP-1. The human monocyte cell line (THP-1) were adopted to establish the LPS-toleranced and BLP cross-toleranced cellular models. Actin skeleton, supernatant concentration of cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-6) and NF- κ B DNA binding activity was tested. When THP-1 were insulted with LPS (100 ng/ml) or BLP (100 ng/ml), The cellular morphologic changes were significant with the formation of pseudopod and the actin reorganized to form the actin-band, NF- κ B DNA binding activity upregulated in nuclear, and the concentration of cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-6) in supernatant increased in THP-1. Pretreatment THP-1 with LPS (10 ng/ml), the morphology, cytokines and NF- κ B DNA binding activity were improved. Phalloidin, a specific actin cytoskeleton reorganization inhibitor, partly abolished the LPS tolerance and BLP cross-tolerance in THP-1 cell induced by 10 ng/ml LPS. The results suggested that LPS (100 ng/ml) and BLP (100 ng/ml) could trigger the reorganization of actin cytoskeleton, activate NF- κ B transcription, and increase the cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-6) releasing, which were closely associated with the activation of inflammation. LPS (10 ng/ml) pretreatment could induce LPS tolerance and BLP cross-tolerance in THP-1 which was at least partly associated with actin cytoskeleton.

Key words human monocytic-leukemia cells (THP-1); bacterial lipopolysaccharide (LPS); bacterial lipoprotein (BLP); tolerance; cytoskeleton

Received: January 23, 2007

Accepted: May 18, 2007

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30471791)

*Corresponding author. Tel: 86-23-68757736, E-mail: xiao_nan_99@yahoo.com