· 论著 ·

细菌脂蛋白耐受中核转录因子核转位机制研究

高丽杰 李崇辉 汪江淮 黄志强

【摘要】 **目的** 探讨细菌脂蛋白(BLP)耐受所致核转录因子-κB(NF-κB)活化受抑制的分子机制。**方法** 以不同浓度 BLP(10、100、1 000 ng/ml)预处理人急性单核细胞白血病细胞(THP-1)诱导 BLP 耐受,再以不同浓度BLP(0、10、100、1 000 ng/ml)刺激经 BLP 预处理(耐受组)或未经 BLP 预处理(对照组)的 THP-1 细胞,采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测培养上清中肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的释放,确定最适的 BLP 预处理和刺激浓度。然后按此条件处理细胞不同时间(0、0.5、1、2、6 h)并提取蛋白,用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测 NF-κB 亚单位 p50 和 p65 的表达、核转位及磷酸化情况。**结果** 对照组中 10、100、1 000 ng/ml BLP 可剂量依赖性刺激 THP-1 活化并产生 TNF-α(pg/ml:184.86±32.51、3 215.88±167.09、6 042.96±245.37),耐受组中 100 ng/ml BLP 预处理几乎完全抑制不同剂量 BLP 诱导的 TNF-α 释放。故最适 BLP 预处理浓度为 100 ng/ml,刺激浓度为 1 000 ng/ml。Western blotting 检测表明,在 BLP 耐受的细胞质中 p50 蛋白表达明显高于对照组(0 h:542.9±15.6 比 272.8±13.2, 0.5 h:558.0±16.9 比 236.4±11.8, 1 h:524.7±17.5 比 211.6±9.8, 2 h:584.9±15.6 比 222.4±12.3, 均 $P<0.01$),而两组间 p65 蛋白无明显差异。BLP 刺激还可诱导对照组细胞中 p50 和 p65 发生核转位,即细胞核中 p50 和 p65 蛋白增加(1 h p50:344.2±13.6 比 79.0±5.2, p65:78.4±4.5 比 0, 均 $P<0.05$),而耐受组细胞核中 p50 和 p65 均无明显变化。另外,BLP 刺激还可诱导对照组细胞中 p65 的 536 位丝氨酸发生快速磷酸化(0.5 h:0.67±0.08 比 0.04±0.01, 1 h:0.71±0.11 比 0.04±0.01, 均 $P<0.05$),但是在 BLP 刺激的耐受组细胞中磷酸化 p65 蛋白水平无明显变化。**结论** BLP 耐受的 THP-1 细胞中抑制性 NF-κB 亚单位 p50 表达上调,而具有转活化能力的亚单位 p65 的核转位及磷酸化均受到抑制,可能是 BLP 耐受中 TNF-α 等 NF-κB 依赖的基因表达减少的分子机制之一。

【关键词】 细菌脂蛋白; 耐受; 核转录因子-κB; p65; p50

Study on the nuclear translocation mechanism in the inhibition of nuclear factor-κB activation in bacterial lipoprotein-tolerant THP-1 cells

GAO Li-jie, LI Chong-hui, WANG Jiang-huai, HUANG Zhi-qiang. * Hepatobiliary Surgery Institute, PLA General Hospital, Beijing 100853, China*
Corresponding author: LI Chong-hui, Email: Lichonghui720@yahoo.com.cn

【**Abstract**】 **Objective** To approach the nuclear factor-κB (NF-κB) nuclear translocation mechanism in bacterial lipoprotein (BLP) tolerance. **Methods** Human monocytic THP-1 cells were first pretreated with 10, 100, 1 000 ng/ml BLP for 20 hours to induce BLP tolerance. Then THP-1 cells without BLP pretreatment (control group) or with BLP pretreatment (tolerance group) were stimulated with 0, 10, 100, 1 000 ng/ml BLP again for 6 hours. The tumor necrosis factor-α (TNF-α) content in culture medium was measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in order to determine the most suitable BLP pretreatment and stimulation concentration. Western blotting was used to detect the protein level, nuclear translocation and phosphorylation of NF-κB p50 and p65 in the cells of control and tolerance groups treated with respective conditions for 0, 0.5, 1, 2 and 6 hours. **Results** In control group BLP stimulation (10, 100, 1 000 ng/ml) could induce THP-1 activation and TNF-α production (pg/ml: 184.86 ± 32.51, 3 215.88±167.09, 6 042.96±245.37) in a dose-dependent manner. In tolerance group, 100 ng/ml BLP pretreatment resulted in almost complete inhibition of TNF-α production as induced by 10 - 1 000 ng/ml BLP stimulation. Therefore, 100 ng/ml BLP pretreatment and 1 000 ng/ml stimulation were selected for following cell treatment. Western blotting analysis showed that there was an increase of p50 protein level in BLP-tolerant cells comparing with control group (0 hour: 542.9±15.6 vs. 272.8±13.2, 0.5 hour: 558.0±16.9 vs. 236.4±11.8, 1 hour: 524.7±17.5 vs. 211.6±9.8, 2 hours: 584.9±15.6 vs. 222.4±12.3, all $P<0.01$), whereas the p65 protein level was similar between the two groups. BLP stimulation also induced the nuclear translocation of p50 and p65 in control group (1-hour p50: 344.2±13.6 vs. 79.0±5.2, p65: 78.4±4.5 vs. 0, both $P<0.05$), but not in tolerance group. In addition, the phosphorylation of p65 at serine 536 was induced after BLP stimulation in control THP-1 cells (0.5 hour: 0.67±0.08 vs. 0.04±0.01, 1 hour: 0.71±0.11 vs. 0.04±0.01, both $P<0.05$), but this change was not detected in BLP-tolerant cells. **Conclusion** It was found that in BLP-tolerant cells, the expression of inhibitory subunit p50 was increased and the nuclear translocation and phosphorylation of p65 with trans-activation ability was inhibited. These changes are likely responsible for the reduced gene expression of NF-κB dependent genes in BLP-tolerant cells.

【**Key words**】 Bacterial lipoprotein; Tolerance; Nuclear factor-κB; p65; p50

细菌脂蛋白(BLP)是革兰阳性和革兰阴性细菌外膜中最丰富的蛋白,其特征是在蛋白的 N-端含有独特的脂酰基-氨基酸结构。同细菌内毒素脂多糖(LPS)一样,BLP 可由生长或裂解的细菌释放,并在启动先天抗感染免疫中发挥重要作用[1-2]。BLP 不但可活化宿主炎症免疫细胞,诱导炎症细胞因子释放,导致休克甚至死亡,而且可诱导自我耐受以及与 LPS 的交叉耐受[3]。BLP 耐受还可使小鼠抵抗活细菌或盲肠结扎穿孔造成的脓毒症而免于死亡[4-5]。因此,阐明 BLP 耐受的分子机制对于理解机体的抗感染免疫调节以及针对脓毒性休克的防治措施研究具有重要意义[6]。具有转活化能力的 p65 和不具有转活化能力的抑制性亚单位 p50 是核转录因子-κB(NF-κB)的两种最常见形式。BLP 耐受的重要特征是耐受细胞中的 NF-κB 活化受到抑制,从而使肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素(IL-1、IL-6)等 NF-κB依赖基因表达明显减少[7-8]。本研究中从 p50 和 p65 的表达调节及核转位来分析 BLP 耐受的分子机制。

1　材料与方法

1.1　材料与细胞:BLP(合成的细菌脂多肽 Pam3-Cys-Ser-Lys4-OH)购自德国罗氏分子生化公司。抗 p50、p65 和磷酸化 p65(p-p65)兔多克隆抗体购自美国细胞信号技术公司。人急性单核细胞白血病细胞(THP-1)培养于含 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养基中。

1.2　诱导 BLP 耐受:以不含或含有不同浓度 BLP(10、100、1 000 ng/ml)的培养基预处理 THP-1 细胞,每个剂量平行 3 组,20 h 后用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次,加入新鲜培养基培养 2 h,然后以 10、100、1 000 ng/ml BLP 刺激经过 BLP 预处理的细胞(耐受组)6 h,收集培养液用于 TNF-α 测定,以确定最佳的 BLP 预处理和刺激剂量;收集细胞用于蛋白提取。以未经 BLP 预处理的细胞为对照。

1.3　蛋白提取及测定:BLP 刺激不同时间后,离心收集细胞。以低渗缓冲液〔10 mmol/L 羟乙基哌嗪乙硫磺酸(Hepes),pH 值 7.9,1.5 mmol/L $MgCl_2$,10 mmol/L KCl,1 mmol/L 二硫苏糖醇,1×混合蛋白酶抑制剂〕处理细胞,离心取沉淀,重悬于含 0.6% NP-40 的低渗缓冲液中处理 10 min,离心取上清即为细胞质蛋白。将沉淀重悬于细胞核蛋白提取液(20 mmol/L Hepes,pH 值 7.9,1.5 mmol/L $MgCl_2$,0.42 mol/L NaCl,0.2 mmol/L 乙二胺四乙酸,25%甘油,1 mmol/L 二硫苏糖醇,1×混合蛋白酶抑制剂)中冰浴 10 min,离心取沉淀为细胞核蛋白,蛋白定量后每个样品取 50 μg,采用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)进行检测,蛋白条带以凝胶图像分析软件进行半定量分析。

1.4　TNF-α 测定:采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测细胞培养上清中的 TNF-α 浓度,严格按试剂盒(美国 R&D 公司产品)说明书步骤操作。

1.5　统计学处理:实验数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　BLP 耐受的 THP-1 细胞中 TNF-α 含量变化(表 1):BLP 可活化 THP-1 细胞并剂量依赖性诱导 TNF-α 产生(对照组)。当细胞以不同剂量 BLP 预处理后,再以同样或更高剂量 BLP 刺激,TNF-α 的产生明显减少(BLP 耐受组)。100 ng/ml BLP 预处理几乎完全抑制不同剂量 BLP 诱导的 TNF-α 释放。因此在以下实验中均以 100 ng/ml BLP 预处理 THP-1 细胞,然后以 1 000 ng/ml BLP 进行刺激,并与未经 BLP 预处理的对照组细胞进行比较。

表 1　BLP 耐受的 THP-1 细胞中 TNF-α 含量的变化($\bar{x}\pm s$)

组别	BLP 浓度	样本数	不同 BLP 浓度刺激时 TNF-α 水平(pg/ml)			
			BLP 0 ng/ml 刺激时	BLP 10 ng/ml 刺激时	BLP 100 ng/ml 刺激时	BLP 1 000 ng/ml 刺激时
对照组	培养基预处理	3	2.73±0.28	184.86±32.51	3 215.88±167.09	6 042.96±245.37
BLP 耐受组	10 ng/ml 预处理	3	10.76±3.42	39.47± 3.42[a]	451.67± 28.84[a]	3 320.97±233.31[a]
	100 ng/ml 预处理	3	21.92±0.90	18.28± 3.49[a]	29.66± 0.59[a]	86.27± 10.84[a]
	1 000 ng/ml 预处理	3	30.34±4.13[a]	28.09± 0.64[a]	27.77± 0.32[a]	28.85± 1.40[a]

注:BLP:细菌脂蛋白,THP-1:人急性单核细胞白血病细胞,TNF-α:肿瘤坏死因子-α;与对照组比较,[a]$P<0.01$

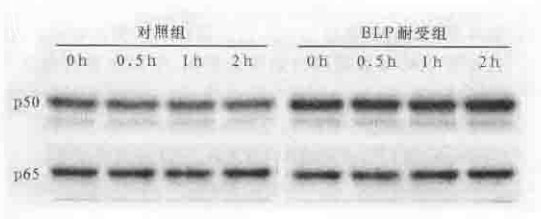
DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.05.004
基金项目:国家自然科学基金资助项目(30100174);爱尔兰科学工程技术委员会资助项目(SC/2003/27)
作者单位:100853 北京,解放军总医院全军肝胆外科研究所(高丽杰、李崇辉、黄志强);爱尔兰科克大学外科学系(汪江淮)
通信作者:李崇辉,Email:Lichonghui720@yahoo.com.cn

表 2　BLP 耐受的 THP-1 细胞质和细胞核中 p50、p65 蛋白表达及细胞中 p-p65 水平的变化($\bar{x}\pm s$)

组别	刺激时间	样本数	细胞质 p50	细胞质 p65	细胞核 p50	细胞核 p65	细胞 p-p65
对照组	0 h	3	272.8±13.2	374.8±17.4	79.0± 5.2	0	0.04±0.01
	0.5 h	3	236.4±11.8	389.3±14.5	192.9± 9.8	54.2±3.6	0.67±0.08[c]
	1 h	3	211.6± 9.8	408.0±32.5	344.2±13.6[c]	78.4±4.5[c]	0.71±0.11[c]
	2 h	3	222.4±12.3	477.6±16.8	256.6±13.6	15.0±3.2	0.25±0.09
	6 h	3			251.4±11.5	19.4±6.3	
BLP 耐受组	0 h	3	542.9±15.6[a]	386.1±14.5	171.8± 9.8	5.4±2.9[b]	0.10±0.01
	0.5 h	3	558.0±16.9[a]	332.5±35.2	120.6± 6.5	5.0±1.2[b]	0.15±0.03[b]
	1 h	3	524.7±17.5[a]	484.3±14.6	239.3± 3.6	6.4±0.6[b]	0.12±0.02[b]
	2 h	3	584.9±15.6[a]	495.1±15.8	250.6± 6.9	8.1±2.1	0.18±0.02
	6 h	3			205.1±10.2	13.2±3.9	

注：BLP：细菌脂蛋白，THP-1：人急性单核细胞白血病细胞，p-p65：磷酸化 p65；与对照组同时间点比较，[a]$P<0.01$，[b]$P<0.05$；与本组刺激 0 h 比较，[c]$P<0.05$；空白代表无此项

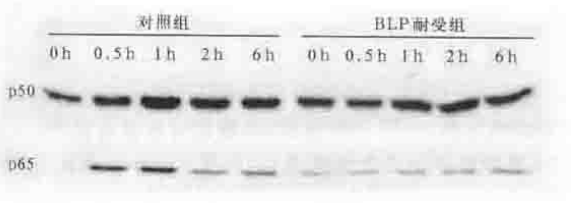
2.2　BLP 耐受的 THP-1 细胞质中 p50、p65 蛋白表达(图 1；表 2)：与对照组相比，BLP 耐受组刺激 0、0.5、1、2 h 细胞质中 p50 蛋白表达水平明显增加(均 $P<0.01$)，而 p65 则变化不大。提示 BLP 预处理使 p50 蛋白水平发生了上调。



BLP：细菌脂蛋白，THP-1：人急性单核细胞白血病细胞

图 1　蛋白质免疫印迹法检测对照组和 BLP 耐受组 BLP 刺激不同时间点 THP-1 细胞质中 p50 和 p65 蛋白表达

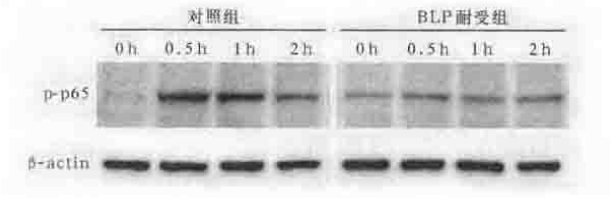
2.3　BLP 耐受的 THP-1 细胞核中 p50、p65 蛋白表达(图 2；表 2)：对照组未处理的细胞核中 0 h 检测不到 p65 蛋白表达，但存在基础表达水平的 p50 蛋白；而 BLP 刺激细胞 0.5～6 h 可使核内 p50 和 p65 蛋白表达均显著增加，提示发生了 p50、p65 亚单位的核转位。然而在 BLP 耐受的细胞中，BLP 刺激细胞 0.5～6 h，细胞核内的 p50 蛋白表达虽然有所增加但存在延迟，且 p65 蛋白表达无明显变化。提示在 BLP 耐受的细胞中 BLP 诱导的 NF-κB 核转位特别是 p65 受到抑制。



BLP：细菌脂蛋白，THP-1：人急性单核细胞白血病细胞

图 2　蛋白质免疫印迹法检测对照组和 BLP 耐受组 BLP 刺激不同时间点 THP-1 细胞核中 p50 和 p65 蛋白表达

2.4　BLP 耐受的 THP-1 细胞中 p65 磷酸化水平(图 3；表 2)：对照组细胞中 BLP 刺激可诱导 p65 快速磷酸化，0.5 h 时 p-p65 蛋白水平即显著升高($P<0.05$)；在 BLP 耐受的 THP-1 细胞中，BLP 刺激并未明显诱导 p65 进一步磷酸化。提示 BLP 耐受的 THP-1 细胞中 p65 磷酸化受到明显抑制。



BLP：细菌脂蛋白，THP-1：人急性单核细胞白血病细胞，p-p65：磷酸化 p65，β-actin：β-肌动蛋白

图 3　蛋白质免疫印迹法检测对照组和 BLP 耐受组 BLP 刺激不同时间点 THP-1 细胞中 p65 磷酸化的变化

3　讨　论

内毒素耐受现象被认为是宿主感染细菌后的一种适应性反应，是机体通过细胞内重新程序化下调炎症反应，而避免产生过量炎症介质导致自我毒性的一种机制[1]。临床发现许多脓毒症患者外周血单核细胞对 LPS 刺激呈低反应性，表现为内毒素耐受状态。BLP 也存在类似于内毒素的耐受现象，但对其分子机制的研究远不如内毒素那样清楚[7]。BLP 耐受的重要特征是 NF-κB 依赖的炎症细胞因子如 TNF-α、IL-1、IL-6 等表达显著减少。正常单核细胞受到 BLP 刺激后，NF-κB 转位到核内，与靶基因上的 κB 位点结合启动基因转录与表达。在 BLP 耐受的细胞中可能由于 NF-κB 不能正常进行核转位或与靶基因结合，因而不能正常启动炎症基因转录。

细胞中有丰富的 NF-κB 家族亚单位 p50/p65 异源二聚体。p50/p50 同源二聚体虽然可与 DNA 结

合，但不能启动转录。在静止细胞中，p50/p65 与其抑制蛋白(IκBα)结合，BLP 刺激可使 IκBα 磷酸化并被降解，释放 p50 和 p65，二者再通过核定位信号转位到细胞核内，与靶基因上的 κB 位点结合启动靶基因转录。有关内毒素耐受机制的研究认为，内毒素耐受的细胞核中 p50/p50 增加，阻止了 p50/p65 与 DNA 的结合，因而使炎症基因的表达降低[9]。本实验证明，BLP 耐受的 THP-1 细胞质中 p50 蛋白水平显著增加，而 p65 变化不明显；对照组 BLP 刺激可诱导 THP-1 细胞核内 p50 和 p65 蛋白水平均增加，即发生了核转位。但 BLP 耐受组 BLP 刺激只诱导 THP-1 细胞中 p50 发生核转位，而 p65 无明显变化。表明在 BLP 耐受的细胞中，无转活化能力的 p50 不但表达上调，且可以发生核转位，而具有转活化能力的 p65 的核转位则受到抑制，可能是 BLP 耐受中 NF-κB 活化受到抑制的分子机制之一。

虽然 NF-κB 核转位是启动 NF-κB 依赖的基因转录重要步骤之一，但也有研究表明，p65 转活化区的 536 位丝氨酸残基磷酸化对 NF-κB 转录活性也是必须的，目前认为其磷酸化是由抑制因子-κB 激酶 β(IKKβ)完成[10]。已证明 TNF、LPS、T 淋巴细胞共刺激分子和淋巴毒素等均可诱导 p65 的 536 位丝氨酸磷酸化[11-12]，但是 BLP 诱导的 p65 磷酸化还未见文献报道。本研究发现，对照组 BLP 刺激 THP-1 细胞可诱导 p65 快速磷酸化，以刺激 0.5 h 和 1 h 最强；但在 BLP 耐受的细胞中，BLP 刺激却不能诱导 p65 磷酸化。在 BLP 耐受的细胞中蛋白磷酸化受抑似乎是一个普遍问题。在我们以前的研究中还发现，p38 和 IκBα 磷酸化也受到抑制[4,7]，其原因需要进一步研究。但是在 BLP 耐受的细胞中 p65 不能发生核转位可能与 p65 的磷酸化受到抑制有关。

综上，本研究表明，在 BLP 耐受的 THP-1 细胞中，NF-κB 的表达水平、核转位及磷酸化均参与了 NF-κB 依赖的基因转录的调控。这些新的分子机制可能为将来在许多炎症免疫甚至肿瘤疾病中干预 NF-κB 靶基因的表达提供新的靶点。

参考文献

[1] Zhang H, Niesel DW, Peterson JW, et al. Lipoprotein release by bacteria: potential factor in bacterial pathogenesis. Infect Immun, 1998, 66: 5196-5201.

[2] Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, et al. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. Science, 1999, 285: 736-739.

[3] Sato S, Nomura F, Kawai T, et al. Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways. J Immunol, 2000, 165: 7096-7101.

[4] Wang JH, Doyle M, Manning BJ, et al. Cutting edge: bacterial lipoprotein induces endotoxin-independent tolerance to septic shock. J Immunol, 2003, 170: 14-18.

[5] O'Brien GC, Wang JH, Redmond HP. Bacterial lipoprotein induces resistance to Gram-negative sepsis in TLR4-deficient mice via enhanced bacterial clearance. J Immunol, 2005, 174: 1020-1026.

[6] 阴赋宏. 关注转化医学　加强危重病的临床与基础研究. 中国危重病急救医学, 2010, 22: 326-327.

[7] Buckley JM, Wang JH, Redmond HP. Cellular reprogramming by Gram-positive bacterial components: a review. J Leukoc Biol, 2006, 80: 731-741.

[8] 李崇辉, 王金晶, 高丽杰, 等. 白细胞介素-1 受体相关激酶 1 蛋白过表达对细菌脂蛋白耐受的影响. 中国危重病急救医学, 2010, 22: 8-11.

[9] Ziegler - Heitbrock L. The p50-homodimer mechanism in tolerance to LPS. J Endotoxin Res, 2001, 7: 219-222.

[10] Buss H, Dörrie A, Schmitz ML, et al. Constitutive and interleukin-1-inducible phosphorylation of p65 NF-kappa B at serine 536 is mediated by multiple protein kinases including I kappa B kinase (IKK)-alpha, IKKbeta, IKKepsilon, TRAF family member-associated (TANK)-binding kinase 1 (TBK1), and an unknown kinase and couples p65 to TATA-binding protein-associated factor II31-mediated interleukin-8 transcription. J Biol Chem, 2004, 279: 55633-55643.

[11] Mattioli I, Sebald A, Bucher C, et al. Transient and selective NF-kappa B p65 serine 536 phosphorylation induced by T cell costimulation is mediated by I kappa B kinase beta and controls the kinetics of p65 nuclear import. J Immunol, 2004, 172: 6336-6344.

[12] Yang F, Tang E, Guan K, et al. IKK beta plays an essential role in the phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 induced by lipopolysaccharide. J Immunol, 2003, 170: 5630-5635.

(收稿日期：2011-03-05)　(本文编辑：李银平)

· 科研新闻速递 ·

早期检测严重创伤患者肾脏多普勒阻力指数可预测失血性休克的发生

近期，意大利学者进行了临床试验，研究创伤后肾脏多普勒阻力指数(RI)是否会较早发生改变，及其变化是否可作为失血性休克患者隐性低灌注的征兆。试验中选择了严重创伤后血流动力学稳定的 52 例成年患者，检测其肾脏多普勒 RI、血红蛋白、标准剩余碱、乳酸、收缩压、心率及下腔静脉直径，并记录患者预后(是否进展为失血性休克)。应用 Logistic 回归分析来评估失血性休克进展的危险因素。结果显示：52 例患者中有 29 例发生了失血性休克；失血性休克患者的肾脏多普勒 RI、损伤严重度评分及标准剩余碱均高于非失血性休克患者；Logistic 回归分析显示，肾脏多普勒 RI>0.7 是多发伤患者进展为失血性休克惟一的独立危险因素。研究人员得出结论：对于早期血流动力学稳定的严重创伤患者，如无创性肾脏多普勒检测 RI>0.7，则表明可能进展为失血性休克。

刘先奇，编译自《Radiology》，2011-04-07(电子版)；胡森，审校