

## 穿透支原体 LAMPs 诱导 NF- $\kappa$ B 激活介导小鼠巨噬细胞凋亡

曾焱华, 吴移谋\*, 余敏君, 刘劫, 游晓星, 唐双阳

(南华大学医学院病原生物学研究所 衡阳 421001)

**摘要:** 研究穿透支原体(Mpe)脂质相关膜蛋白(LAMPs)能否诱导小鼠巨噬细胞凋亡, 并阐明其可能的分子机制, 以了解 Mpe 潜在的致病性。用 Annexin-V-FITC 凋亡检测试剂盒和 DNA Ladder 方法检测 Mpe LAMPs 诱导体外培养的小鼠巨噬细胞系 Raw264.7 细胞的凋亡。以间接免疫荧光和 Western blotting 方法检测经 Mpe LAMPs 处理的小鼠巨噬细胞 NF- $\kappa$ B 的激活和 NF- $\kappa$ B 抑制剂吡咯啉烷二甲基硫脲(PDTC)对细胞凋亡的影响。结果表明: Mpe LAMPs 能诱导小鼠巨噬细胞发生早期或晚期凋亡; Mpe LAMPs 能诱导激活小鼠巨噬细胞的 NF- $\kappa$ B, 使其从细胞浆中转位到细胞核内; PDTC 能显著地抑制经处理的小鼠巨噬细胞的 NF- $\kappa$ B 的激活, 且能抑制 Mpe LAMPs 诱导的巨噬细胞发生凋亡。因此, Mpe LAMPs 诱导小鼠巨噬细胞凋亡可能与 NF- $\kappa$ B 的激活有关, 因而 Mpe 可能是一个重要的致病因素。

**关键词:** 穿透支原体; 膜蛋白; 核因子 $\kappa$ B; 凋亡

中图分类号: R392 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2008)03-0355-07

支原体是最小的能自我复制的原核细胞型微生物, 能引起急性呼吸道感染、泌尿生殖道炎症、关节炎和自身免疫性紊乱等疾病<sup>[1]</sup>。研究表明一些支原体能影响机体的免疫系统, 如激活巨噬细胞、T细胞、NK细胞以及促进B细胞和T细胞增殖, 这些效果可能与支原体膜结合的脂蛋白有关<sup>[2]</sup>。脂质相关膜蛋白(Lipid-associated membrane proteins, LAMPs)(包括膜本体蛋白和外周膜蛋白)是暴露在穿透支原体(*M. penetrans*, Mpe)、生殖支原体和肺炎支原体等支原体表面与周围环境各种成分不断相互作用因而影响机体免疫系统的一类主要蛋白<sup>[3]</sup>, 因此认为LAMPs与支原体的致病性有关。

穿透支原体是近年来新发现的致病性支原体, 研究表明Mpe在艾滋病的发展过程中起着辅助因子或促进因子的作用, 因而称之为艾滋病相关支原体<sup>[4]</sup>; 此外, Mpe还与非艾滋病相关的尿道炎和呼吸系统疾病有关。Mpe能依靠其特殊的顶端结构黏附和入侵宿主的RBC、CD4<sup>+</sup> T细胞和巨噬细胞等<sup>[5]</sup>, 但关于Mpe对宿主的致病

性及其可能的致病机制仍不十分清楚。我们以前的研究证实Mpe LAMPs能诱导小鼠巨噬细胞表达诱导性一氧化氮合酶而产生一氧化氮(一种重要的炎症介质)<sup>[6]</sup>。

为进一步了解 Mpe 潜在的致病性, 我们研究是否其 LAMPs 能诱导小鼠巨噬细胞发生凋亡, 另外, 我们也通过研究 NF- $\kappa$ B 抑制剂吡咯啉烷二甲基硫脲(pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC)对小鼠巨噬细胞发生凋亡的影响来阐明其可能的分子机制。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂和仪器:** Mpe 标准株 GTU-54-6A1 为本研究所保存; BCA 微量蛋白测定试剂盒购自 Pierce 公司; Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒购自 Oncogene 公司; 硝酸纤维素膜和 ECL 发光试剂为英国 Amersham 公司产品; PDTC、多黏菌素 B、蛋白酶 K 和胰酶均购自 Sigma 公司; 兔抗 NF- $\kappa$ B 抗体和辣根

基金项目: 湖南省自然科学基金(06JJ50044); 湖南省卫生厅课题(B2005-089)

\*通讯作者。Tel: +86-734-8281555; Fax: +86-734-8282907; E-mail: yimouwu@sina.com

作者简介: 曾焱华(1974-), 男, 湖南新化人, 讲师, 硕士, 研究方向为支原体的致病性和致病机制。E-mail: zengyihua21cn@126.com

收稿日期: 2007-07-30; 修回日期: 2007-11-05

过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体均购自美国 Santa Cruz 公司; 异硫氰酸荧光素标记的羊抗兔 IgG 购自北京中山生物公司; 荧光显微镜为日本 Nikon 公司产品; 凝胶电泳成像分析仪为珠海黑马公司产品。

**1.1.2 细胞和培养:** 小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 购自中科院上海生物化学与细胞生物学研究所; RPMI 1640 培养基为 Invitrogen Life Technologies 公司产品。用含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养基在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 环境中培养小鼠巨噬细胞。处理细胞前将其以 10<sup>6</sup>/mL 浓度转移至 24 孔细胞培养板 (Costar, USA)。为检测 Mpe 是否能诱导巨噬细胞凋亡, 细胞用含 2 μg/mL LAMPs 的无血清培养基培养 12 或 24 h。为评价 PDTc 对细胞凋亡或 NF-κB 激活的影响, 用 25 μmol/L PDTc 预处理细胞 30 min 后再用含 2 μg/mL LAMPs 无血清培养基培养 12 h 或 1 h。

## 1.2 Mpe 脂质相关膜蛋白提取

Mpe LAMPs 的提取和水相的收集按参考文献<sup>[7]</sup>进行: 用 500 mL SP-4 培养基培养 Mpe 标准株 GTU-54-6A1 至对数生长期, 离心收集支原体沉渣, 经 Triton X-114 (TX-114) 裂解后, 支原体的蛋白被分为 TX-114 相和水相两部分, 用无水乙醇沉淀存在于 TX-114 相中的 LAMPs, 收集水相部分作为对照实验。蛋白浓度用 BCA 微量蛋白测定试剂盒测定。以上的蛋白提取物在使用前经 100 μg/mL 多黏菌素 B 预孵育 2 h 以消除在蛋白提取过程中可能污染的内毒素<sup>[7]</sup>, 经鲎实验检测, 所有蛋白提取物中内毒素含量低于 10 pg/mL。

## 1.3 MTT 法检测 LAMPs 对巨噬细胞增殖的作用

取对数期生长状态良好的 Raw264.7 细胞, 以 4000 个/孔接种于 96 孔板上, 培养 24 h 后弃去原培养液, 各实验组分别加入含 0.25、0.5、1.0、2.0 μg/mL Mpe LAMPs 的培养基 200 μL, 对照组仅加等量的培养液, 各浓度设 4 个复孔。分别培养 24 h、48 h 和 72 h 后, 加入新鲜配制的 MTT (5 g/L) 溶液 20 μL, 37℃ 孵育 4 h 后吸去上清液, 每孔加 150 μL 二甲基亚砜 (DMSO), 在震荡器上振荡 10 min, 用酶标仪测 570 nm 处的吸光度 (A) 值。细胞增殖抑制率按  $(1 - \text{实验组 A 值} / \text{对照组 A 值}) \times 100\%$  计算。实验共重复 3 次, 取 3 次结果的平均 A 值, 所有数据均以均数 ± 标准误表示, 用 SPSS10.0 统计软件对资料进行独立样本 t 检验后再进行单向方差分析,  $P < 0.05$  表示有显著差异。

## 1.4 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡

细胞呈单层生长铺满培养瓶 80% 左右后经 2 μg/mL LAMPs 及水相对照分别处理 12 h、24 h, 然后用 PBS 洗涤细胞 2 次, 加入胰蛋白酶消化细胞并用预冷的结合缓冲液调整细胞浓度到 1 × 10<sup>6</sup>/mL。按 Annexin

V-FITC 凋亡检测试剂盒的操作说明书进行, 将 0.5 mL 经刺激后的细胞液转入 EP 管中加入 10 μL Media Binding Reagent, 加入 1.25 μL Annexin V-FITC, 于室温 (18 ~ 24℃) 避光静置 15 min。经 1 000g 离心 5 min 后, 去上清, 加入 0.5 mL 预冷的 1 × 结合缓冲液, 加入 10 μL 碘化丙啶 (Propidium iodide, PI) 以将发生早期凋亡的细胞和死细胞区分开来, 取少许细胞滴在玻片上并盖上盖玻片, 立即用荧光显微镜观察并照相。

## 1.5 DNA Ladder 检测

用水相和 LAMPs 处理 RAW264.7 细胞 0、12、24 和 36 h 后, 将漂浮细胞和贴壁细胞 (胰酶消化) 一起收集于无菌 Ep 管中, 2 000 r/min 离心 5 min 并用预冷的 PBS 洗涤细胞 1 次, 小心弃去上清; 加入 20 μL 溶解缓冲液 [20 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Tris, pH 8.0, 0.8% (W/V) SDS], 用移液管尖混匀细胞沉淀; 加 10 μL RNA 酶 A (500 U/mL), 轻轻混匀, 37℃ 孵育 90 min; 加 10 μL 蛋白酶 K (20 mg/mL), 轻轻混匀, 50℃ 孵育过夜; 20 μL DNA 样品中加入 4 μL 10 × DNA 加样缓冲液, 以低电压 (35 V, 4 h) 在 2% (W/V) 琼脂糖凝胶中电泳, 紫外灯下观察结果并用凝胶成像系统照相。

## 1.6 Western blot 检测 NF-κB 的转位

为说明 NF-κB 激活后是否从胞浆转位到胞核内, 按参考文献<sup>[8]</sup>所述方法提取细胞的核蛋白, 用 BCA 微量蛋白测定试剂盒测定所提取的核蛋白的浓度。10 μg 蛋白经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后电转移至硝酸纤维素膜上, 然后经 5% 脱脂牛奶 4℃ 封闭过夜后与兔抗 NF-κB 抗体室温孵育 2 h, 经 TBST 洗膜后与辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 孵育 1 h。经洗膜后用 ECL 发光试剂显色。

## 1.7 NF-κB 的免疫定位

为对 NF-κB 进行定位, 细胞经 2 或 100 μL 水相处理 1 h 后用冰冻甲醇固定, 与兔抗 NF-κB 抗体孵育 2 h 后, 再经异硫氰酸荧光素标记的羊抗兔 IgG 孵育 1 h, 经洗膜后在荧光显微镜下观察并照相。

# 2 结果

## 2.1 LAMPs 抑制 RAW264.7 细胞的增殖

不同浓度 LAMPs 作用 RAW264.7 细胞 24 ~ 72 h 后, MTT 比色法测得的各组 A<sub>570</sub> 值见表 1。经统计分析, 0.25 μg/mL LAMPs 处理组和对照组之间无明显差异 ( $P > 0.05$ ), 0.5、1.0 和 2.0 μg/mL LAMPs 处理组能有效抑制巨噬细胞的增殖 ( $P < 0.01$ ), 并且随着浓度的增加及作用时间的延长, 细胞增殖的抑制率增加 (图 1), 说明 Mpe LAMPs 对小鼠巨噬细胞增殖的抑制作用呈浓度和时间依赖性。

表 1 不同浓度和不同时间的 Mpe LAMPs 对巨噬细胞增殖的影响

Table 1 The effect of Mpe LAMPs on macrophages proliferation

t/h	c(LAMPs)/( $\mu$ g/mL)				
	0	0.25	0.5	1.0	2.0
24	0.48 $\pm$ 0.06	0.45 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.36 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.32 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.28 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
48	1.43 $\pm$ 0.12	1.35 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	1.06 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	0.88 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.80 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>
72	2.36 $\pm$ 0.32	2.18 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	1.56 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	1.28 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.92 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>

Compare with control, "a" means  $P > 0.05$ , and "b" means  $P < 0.01$ .

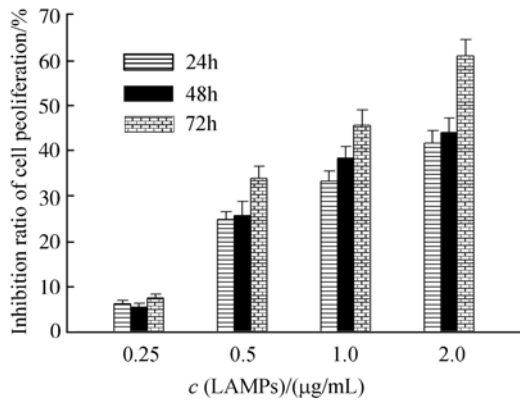


图 1 不同浓度和不同时间的 Mpe2 LAMPs 对巨噬细胞增殖的抑制率

Fig.1 Histogram of the inhibitory rate of various LAMPs on proliferation of Raw264.7 cells. MTT assay was used to examine the inhibitory effect of Mpe LAMPs on cell growth in Raw264.7 cells. 0.5, 1.0 and 2.0  $\mu$ g/mL LAMPs significantly inhibited cell growth after stimulation 24,48 or 72 h, whereas, 0.25 $\mu$ g/mL LAMPs was shown to have little inhibitory effect on growth of Raw264.7 cells.

## 2.2 Mpe LAMPs 诱导 RAW264.7 细胞发生凋亡

经 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒检测发现：正常细胞和经 100  $\mu$ L 水相处理 12 h 及 24 h 后的细胞均没见到有荧光着色，而经 2  $\mu$ g/mL LAMPs 处理 12 h 后的细胞见到有较强的绿色荧光着色，这说明 2  $\mu$ g/mL Mpe LAMPs 刺激细胞 12 h 后即可诱导细胞发生凋亡，当 2  $\mu$ g/mL LAMPs 处理细胞 24 h 后则出现明显的晚期凋亡现象，胞膜有着绿色荧光但胞核被碘化丙啶染成红色(图 2)。DNA Ladder 检测的结果也证实 Mpe LAMPs 能诱导 RAW264.7 细胞发生凋亡，如图 3 所示，当 2  $\mu$ g/mL Mpe LAMPs 处理小鼠巨噬细胞 24h 和 36h 后即出现典型的 180~200 bp 左右的凋亡梯状带，而对照组仅显示基因组，活细胞 DNA 呈一高分子量条带位于胶顶部。

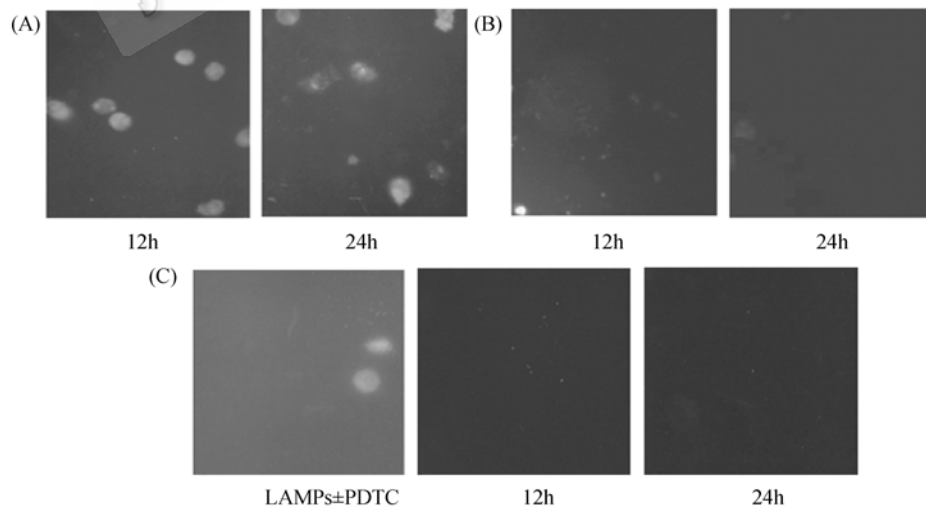


图 2 Annexin-V-FITC 凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡(400 $\times$ )

Fig.2 Apoptosis was detected by Annexin V-FITC apoptosis detection kit (400 $\times$ ). Mouse macrophages were stained with annexin-V and PI and subjected to fluorescence microscope analysis. The cells that reacted with annexin-V, but not with PI, are early-stage apoptotic cells, whereas cells that reacted with both annexin-V and PI are late-stage apoptotic cells. (A): Cells were treated 12 h or 24 h with 2  $\mu$ g/mL LAMPs; (B): Cells were treated 12 h or 24 h with 100  $\mu$ L aqueous; (C): Cells were stimulated for 12 h or 24 h with medium or 12 h with 25  $\mu$ M of PDTC-preincubation and then 2  $\mu$ g/mL of LAMPs. Original Magnification  $\times$ 400.

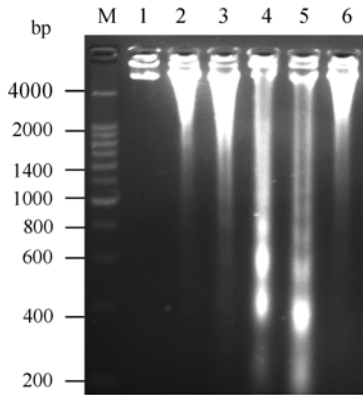


图3 Mpe LAMPs 诱导小鼠巨噬细胞基因组 DNA 发生片段化

Fig.3 *M. penetrans* LAMPs induced the fragmentation of mouse macrophages genomic DNA. Genomic DNA was prepared from aqueous phase-or *M. penetrans* LAMPs-or PDTC-preincubated and then LAMPs-stimulated mouse macrophages and analyzed by agarose gel electrophoresis as described in "Materials and Methods". M. 200 bp DNA Marker; 1. Medium for 24 h; 2. Aqueous phase for 24 h; 3. 2 µg/mL LAMPs for 12h; 4. 2 µg/mL LAMPs for 24 h; 5. 2 µg/mL LAMPs for 36 h; 6. 25 µmol/L of PDTC-preincubation for 30 min and then 2 µg/mL of LAMPs-stimulation for 24h.

### 2.3 Mpe LAMPs 诱导 NF-κB 的激活

我们使用间接免疫荧光和 Western blot 方法检测了 Mpe LAMPs 对巨噬细胞信号转导途径的影响。结果显示(图 4), 正常细胞和经水相处理 1h 的细胞, 其细胞浆呈强绿色荧光着色, 说明 NF-κB P65 都存在于细胞浆中; 而当用 2µg/mL LAMPs 处理细胞 1h 后, 细胞浆中的绿色荧光着色强度显著减弱, 并可在细胞核中见到强绿色荧光着色, 这说明在细胞浆和细胞核内均检测到了 NF-κB P65。用 Western blot 方法我们也从经 LAMPs 处理的细胞的核提取物中检测到了 NF-κB, 而从正常细胞和经水相处理的细胞的核提取物中未检测到 NF-κB 或仅检测到少量 NF-κB(图 5)。这些结果表明 Mpe LAMPs 能诱导激活小鼠巨噬细胞的 NF-κB, 使其从细胞浆中转位到细胞核内。

### 2.4 PDTC 抑制 NF-κB 的激活

如图 4 所示, 当用 25 µmol/L PDTC 预处理细胞 30 min, 然后用 2 µg/mL LAMPs 刺激细胞 1h 时, NF-κB P65 主要位于胞浆中。Western blot 结果也证实: 与仅用 Mpe LAMPs 处理的细胞相比, 在 PDTC 预处理后再用 LAMPs 刺激的细胞的核提取物中, 仅检测到少量 NF-κB(图 5)。以上这些结果说明 PDTC 能抑制小鼠巨噬细胞 NF-κB 的激活。

### 2.5 PDTC 抑制 Mpe LAMPs 诱导的细胞凋亡

如图 2 所示, 与仅用 Mpe LAMPs 处理的细胞相比, 在用 PDTC 预处理后再用 LAMPs 刺激细胞时, 仅检测到个别的凋亡细胞。DNA Ladder 分析的结果也证实, 在 PDTC 预处理后再用 LAMPs 刺激的细胞的 DNA 提取物中, 未见到凋亡梯状带(图 3)。以上这些结果表明 NF-κB 的特异性抑制剂 PDTC 能抑制 Mpe LAMPs 诱导的巨噬细胞发生凋亡。

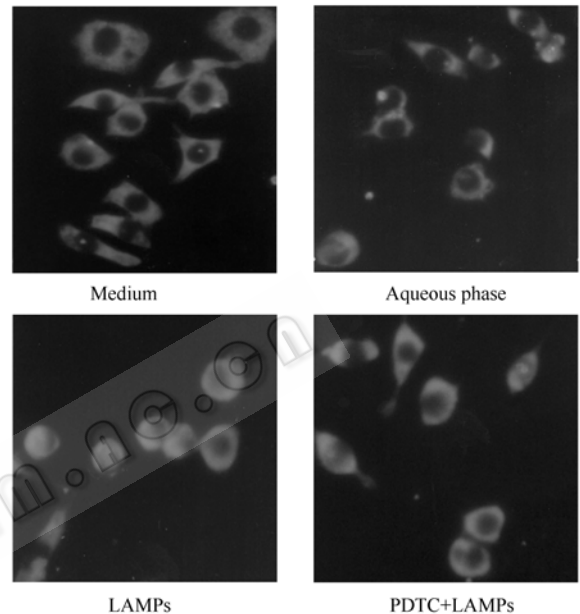


图4 Mpe LAMPs 诱导小鼠巨噬细胞 NF-κB 发生转位

Fig.4 *M. penetrans* LAMPs induced the translocation of NF-κB in mouse macrophages. NF-κB translocation were visualized in macrophages after 1 h of incubation with 2 µg/mL LAMPs, compared with 100 µL of aqueous stimulated or medium-treated cells or PDTC-preincubated for 30 min and then LAMPs-stimulated cells. Intracellular NF-κB p65 were visualized by fluorescence microscope using rabbit anti-NF-κB p65(C-20) antibody followed by FITC-labeled goat anti-rabbit immunoglobulin G. Original Magnification×400.

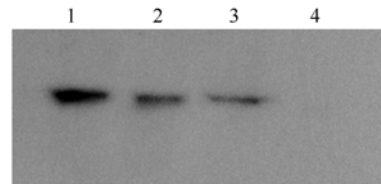


图5 Western blot 检测细胞核提取物中的 NF-κB

Fig.5 Detection of NF-κB from nuclear extract by Western blot. Nuclear proteins were prepared from medium-or aqueous-or LAMPs-stimulated macrophages or PDTC-preincubated and then LAMPs-stimulated cells, and then separated on SDS polyacrylamide gels and electroblotted on nitrocellulose filter, incubated with polyclonal rabbit anti-NF-κB P65(C-20) antibody followed by horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G. Immunoreactive bands were visualized by using ECL chemiluminescence kit. Lane 1: 2 µg/mL LAMPs for 1 h; Lane 2: 25 µmol/L of PDTC-preincubation for 30 min and then 2 µg/mL of LAMPs-stimulation for 1 h; Lane 3: 100 µL aqueous phase for 1 h. Lane 4: Medium for 1h.

### 3 讨论

已有许多研究表明一些细菌、真菌、病毒及其代谢产物大多能诱导宿主细胞,特别是免疫系统中某些细胞(如巨噬细胞)凋亡,如沙门菌属分泌的一种 SipB 蛋白能诱导巨噬细胞凋亡<sup>[9]</sup>;人类免疫缺陷病毒能上调感染的巨噬细胞 FasL 的表达而介导巨噬细胞和未感染的 T 细胞凋亡<sup>[10]</sup>,这些病原微生物诱导免疫细胞凋亡使其抵抗机体免疫系统的免疫防御及免疫监视,因而与对宿主的致病性有关。

支原体是最小的能自我复制的不含细胞壁的微生物,因不含细胞壁故不含脂多糖。有趣的是支原体有一种暴露在其表面能与周围环境各种成分不断相互作用因而影响机体免疫系统的脂质相关膜蛋白。支原体感染宿主细胞的结局依赖于支原体和细胞两方面的特性,在支原体和宿主细胞之间的相互作用中,研究人员比较关注的是由支原体引起宿主细胞发生的程序性细胞死亡——凋亡。已有一些研究报道了一些支原体或支原体的某些成分和凋亡的关系,但其结果不尽相同。Hall 等报道源自发酵支原体的 (*Mycoplasma fermentans*) 的重组蛋白 P48 诱导白血病细胞分化和凋亡<sup>[11]</sup>。Into 等的研究也证明发酵支原体和唾液支原体的膜脂蛋白能诱导 Toll 样受体 2 介导淋巴细胞和单核细胞凋亡<sup>[12]</sup>。而另一些报道则认为支原体感染能抑制细胞凋亡<sup>[13]</sup>,Glenn 等也报道发酵支原体感染不会诱导 U937 细胞凋亡,反而经过降低 Capase-8 的活性而抑制 TNF- $\alpha$  诱导的细胞凋亡<sup>[14]</sup>。这些矛盾的结果可能是由于不同的支原体或其蛋白对不同的细胞系有不同的效果。

Mpe 是最先从感染人类免疫缺陷病毒的病人的尿液中分离出来的一种支原体,它在免疫缺陷病人体内更容易从黏膜附着处入侵,从而使发生持续感染的可能性大大增加。为了解 Mpe 潜在的致病性,本研究通过 MTT 比色法检测 LAMPs 对细胞增殖的影响,表明 Mpe LAMPs 在一定浓度范围(0.5~2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )能显著抑制小鼠巨噬细胞系 Raw264.7 细胞的增殖,且其增殖抑制作用呈浓度和时间依赖性。而低浓度的 LAMPs(0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),即使作用时间延长,其增殖抑制作用仍然很弱。Annexin V-FITC/PI 双染色法检测的结果表明 Mpe LAMPs 处理小鼠巨噬细胞 12 h 后,即可使细胞发生早期凋亡,当处理 24 h 时则出现了部分晚期凋亡细胞。DNA Ladder 检测的结果也证实 Mpe LAMPs 处理小鼠巨噬细胞后,其基因组显示明

显的凋亡梯状带。

巨噬细胞在调节微生物和宿主之间的相互作用及介导先天性特异免疫反应方面发挥重要作用,介导和调控自身及其它细胞的凋亡是巨噬细胞实现其免疫调节和效应细胞功能的主要方式之一,巨噬细胞的凋亡可能导致正常时由巨噬细胞所产生的 TNF- $\alpha$  和白细胞介素等细胞因子的减少,因而改变 T 细胞的免疫反应导致机体免疫力下降或消失引起疾病发生。许多物质参与了对细胞凋亡的调控。研究表明支原体的膜成分,主要是脂蛋白能经调节信号转导途径而诱导细胞发生凋亡,如 Into 等报道支原体脂蛋白和脂肽能经 Toll 样受体 2(Toll-like receptor 2, TLR2)和 6 诱导发生凋亡的细胞死亡,而 TLR2 和 TLR6 能导致核转录因子  $\kappa$ B(nuclear transcription factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)和 NF- $\kappa$ B 控制的相关基因的激活<sup>[15]</sup>。NF- $\kappa$ B 是近年发现的与免疫细胞激活、炎症反应、细胞增殖、凋亡和分化有关的一种核转录因子,主要是由 p50 和 p65 两个亚单位组成的二聚体。未被激活时与抑制蛋白 I- $\kappa$ B 结合位于胞质,在某些刺激因素作用下 I- $\kappa$ B 降解而与 NF- $\kappa$ B 解离即被激活进入胞核,与特定基因启动子上的相应位点结合,从而调节基因的转录<sup>[16]</sup>。Biffi 等也报道一些凋亡相关基因 5'端的转录调控区有 NF- $\kappa$ B 的特异性结合位点<sup>[17]</sup>。NF- $\kappa$ B 可通过调节这些基因的转录与表达参与对细胞凋亡的调控:Antwerp 于 1996 年首次发现 NF- $\kappa$ B 能够抑制由 TNF- $\alpha$  诱导的细胞凋亡<sup>[18]</sup>,进一步的研究发现 NF- $\kappa$ B 主要通过诱导或上调抗凋亡基因而抑制凋亡<sup>[19]</sup>,但 NF- $\kappa$ B 对细胞凋亡存在着双向调节关系,它既可以促进凋亡的发生<sup>[20]</sup>,也可抑制凋亡<sup>[21]</sup>。它们到底是抑制还是诱导凋亡取决于细胞的类型及刺激因素和刺激时间的不同,这可能与以下因素有关:病原微生物在感染和复制过程当中诱导对自身的生存构成威胁的某些免疫细胞(如巨噬细胞)凋亡;另一方面又采取各种策略编码各种蛋白质来抑制其赖以生存的宿主细胞凋亡,使之最大限度的复制、传播和持续存在。

既然 NF- $\kappa$ B 可调节一些基因的转录与表达参与对细胞凋亡的调控,因此在本研究中,我们还研究了 Mpe LAMPs 诱导的小鼠巨噬细胞发生凋亡是否与 NF- $\kappa$ B 的激活有关。正如免疫荧光所见到的,当用 Mpe LAMPs 处理巨噬细胞后,正常存在于胞浆中的 NF- $\kappa$ B 被激活后转位到了细胞核内。而且从细胞核的提取物中,我们也用 Western blot 检测到了 NF- $\kappa$ B 且发现 NF- $\kappa$ B 的特异性抑制剂 PDTC 能显著抑制

NF- $\kappa$ B 的转位。另外, 磷脂酰丝氨酸外翻分析及 DNA 片段化检测的结果说明 PDTC 能显著地抑制经 LAMPs 处理的小鼠巨噬细胞发生凋亡。以上的结果说明 Mpe LAMPs 是一种潜在的 NF- $\kappa$ B 的诱导剂, 且 Mpe LAMPs 诱导小鼠巨噬细胞发生凋亡可能与 NF- $\kappa$ B 的激活有关。由于诱导巨噬细胞凋亡是病原微生物抵抗机体免疫系统的免疫防御的重要机制; 另外, NF- $\kappa$ B 能调节与免疫功能有关的各种基因的表达, 因此本研究有利于了解 Mpe 入侵宿主后与宿主的免疫反应, 且能在分子水平上阐明 Mpe 潜在的致病性和其致病机制。

### 参 考 文 献

- [1] Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62 (4): 1094–1156.
- [2] Shibata K, Hasebe A, Into T, *et al.* The N-terminal lipopeptide of a 44-kDa membrane-bound lipoprotein of *Mycoplasma salivarium* is responsible for the expression of intercellular adhesion molecule-1 on the cell surface of normal human gingival fibroblasts. *J Immunol*, 2000, 165 (11): 6538–6544.
- [3] Baseman JB, Reddy SP, Dallo SF. Interplay between mycoplasma surface proteins, airway cells, and the protean manifestations of mycoplasma-mediated human infections. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996, 154 (4 Pt 2): S137–144.
- [4] Lo SC, Hayes MM, Wang RY, *et al.* Newly discovered mycoplasma isolated from patients infected with HIV. *Lancet*, 1991, 338: 1415–1418.
- [5] Lo SC, Hayes MM, Kotani H, *et al.* Adhesion onto and invasion into mammalian cells by *Mycoplasma penetrans*: a newly isolated mycoplasma from patients with AIDS. *Mod Pathol*, 1993, 6 (3): 276–280.
- [6] Zeng YH, Wu YM, Zhang WB, *et al.* Activation of nuclear factor kappaB and induction of inducible nitric oxide synthase by lipid-associated membrane proteins isolated from *Mycoplasma penetrans*. *Chin Med J*, 2004, 117 (7): 997–1001.
- [7] Rawadi G, Roman-Roman S. Mycoplasma membrane lipoproteins induced proinflammatory cytokines by a mechanism distinct from that of lipopolysaccharide. *Infect Immun*, 1996, 64 (2): 637–643.
- [8] Schreiber E, Matthias P, Muller MM, *et al.* Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17 (15): 6419.
- [9] Hilbi H, Moss JE, Hersh D, *et al.* Shigella-induced apoptosis is dependent on caspase-1, which binds to IpaB. *J Biol Chem*, 1998, 273 (49): 32895–900.
- [10] Sanduzzi A, Fraziano M, Mariani F. Monocytes/macrophages in HIV infection and tuberculosis. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2001, 15 (3): 294–298.
- [11] Hall RE, Agarwal S, Kestler DP. Induction of leukemia cell differentiation and apoptosis by recombinant P48, a modulin derived from *Mycoplasma fermentans*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 269 (1): 284–289.
- [12] Into T, Nodasaka Y, Hasebe A, *et al.* Mycoplasmal lipoproteins induce toll-like receptor 2- and caspases-mediated cell death in lymphocytes and monocytes. *Microbiol Immunol*, 2002, 46 (4): 265–76.
- [13] Feng SH, Tsai S, Rodriguez J, *et al.* Mycoplasmal infections prevent apoptosis and induce malignant transformation of interleukin-3-dependent 32D hematopoietic cells. *Mol Cell Biol*, 1999, 19 (12): 7995–8002.
- [14] Gerlic M, Horowitz J, Farkash S, *et al.* The inhibitory effect of *Mycoplasma fermentans* on tumour necrosis factor (TNF)-alpha-induced apoptosis resides in the membrane lipoproteins. *Cell Microbiol*, 2007, 9 (1): 142–153.
- [15] Into T, Kiura K, Yasuda M, *et al.* Stimulation of human Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR6 with membrane lipoproteins of *Mycoplasma fermentans* induces apoptotic cell death after NF-kappa B activation. *Cell Microbiol*, 2004, 6 (2): 187–199.
- [16] 邓仲良, 吴移谋, 曾焱华, 等. 解脲脲原体脂质相关膜蛋白通过激活核因子 $\kappa$ B 调控诱导性一氧化氮合酶在小鼠巨噬细胞中的表达. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2006, 46 (5): 807–811.
- [17] Biffi WL, Moore EE, Moore FA, *et al.* Interleukin-6 delays neutrophil apoptosis. *Arch Surg*, 1996, 131 (1): 24–29.
- [18] Van-Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, *et al.* Suppression of TNF-alpha induced apoptosis by NF-kappa B. *Science*, 1996, 274 (5288): 787–789.
- [19] Lee HH, Dadgostar H, Cheng Q, *et al.* NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96 (16): 9136–9141.
- [20] Lin KI, Lee SH, Narayanan R, *et al.* Thiol agents and Bcl-2 identify an alphavirus-induced apoptotic pathway that requires activation of the transcription factor NF-kappa B. *J Cell Biol*, 1995, 131 (5): 149–1161.
- [21] Wang CY, Guttridge DC, Mayo MW, *et al.* NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*, 1999, 19 (9): 5923–5929.

## **Mycoplasma penetrans lipid-associated membrane proteins induce nuclear factor $\kappa$ B activation-mediated apoptosis in mouse macrophage**

Yanhua Zeng, Yimou Wu<sup>\*</sup>, Minjun Yu, Jie Liu, Xiaoxing You, Shuangyang Tang

(Institute of Pathogenic Biology, Medical College, University of South China, Hengyang 421001, China)

**Abstract:** To investigate the potential pathogenicity of *Mycoplasma penetrans* (*M. penetrans*) and the possible molecular mechanisms, we investigated whether *M. penetrans* lipid-associated membrane proteins (LAMPs) could induce mouse macrophages Raw264.7 apoptosis by activating nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Apoptosis was detected in *M. penetrans* LAMPs-stimulated mouse macrophages by Annexin-V-FITC staining and DNA fragmentation analysis. We also analyzed the activation of NF- $\kappa$ B and the effects of pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), an inhibitor of NF- $\kappa$ B, on *M. penetrans* LAMPs-induced mouse macrophages apoptosis by indirect immunofluorescence and Western blotting. Our results suggested that *M. penetrans* LAMPs could induce mouse macrophages significant early- and late-stage apoptosis. Agarose gel electrophoresis of the DNA of LAMPs-challenged cells revealed that a ladder-like pattern of migration of DNA indicative of apoptosis. *M. penetrans* LAMPs could activate NF- $\kappa$ B in mouse macrophages. PDTC could partially inhibit the activation of NF- $\kappa$ B and thus inhibit *M. penetrans* LAMPs-induced mouse macrophages apoptosis. This study demonstrates that *M. penetrans* LAMPs may be an important etiological factor due to its ability to induce mouse macrophages apoptosis, which was probably mediated through the activation of NF- $\kappa$ B.

**Keywords:** *Mycoplasma penetrans*; membrane proteins; nuclear factor kappa B; apoptosis

Supported by the Natural Science Foundation of Hunan Province (06JJ50044) and the Health Department Foundation of Hunan Province (B2005-089)

<sup>\*</sup>Correspondence author. Tel: +86-734-8281555; Fax: +86-734-8282907; E-mail: yimouwu@sina.com

Received: 30 July 2007/Revised: 5 November 2007

### 答 作 者 问

问：我想问一下作者及单位署名顺序的修改问题。投稿后经过专家审查通过后即将发表，如果想调整作者并且修改作者及单位署名顺序是否可以？是否需要提供什么证明或者相关的材料？

答：(1) 如变单位署名顺序，需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信，证明内容：原署名顺序—现署名顺序—盖章。(2) 如变更作者署名顺序，需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容：原作者姓名及顺序—修改之后的作者姓名及顺序。(3) 将此证明信邮寄回编辑部，新的变更即可生效。

问：我想尽早得到审稿结果，或者提前发表，有没有好的办法能使审稿老师快点。比如我们增加审稿费等方法？

答：在发给作者的“收稿通知”中，编辑部已经告知了我刊处理稿件的程序和大致时间进度。在作者向我刊投稿之前，应详细了解我刊的规定。审稿人评审一篇文章，并给出谨慎的评审意见是需要一定时间的。所以，作者在投稿之前应该留出足够多的时间给编辑部，以便于编辑部进行评审，我们的承诺是在 2 个月之内给予答复，6~10 个月之内刊出。如要求提前发表，请在投稿的同时提出书面报告，说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性，经过我刊编委会讨论并通过后，可予提前刊出，无需另加费用。