

# 生殖支原体脂质相关膜蛋白激活核因子 $\kappa$ B 诱导人单核细胞 表达前炎症细胞因子及凋亡

邱 宏, 吴移谋\*, 游晓星, 余敏君, 曾焱华

( 南华大学医学院病原生物研究所 衡阳 421001 )

**摘 要:** 为了解生殖支原体(*Mg*)潜在的致病性及其脂质相关膜蛋白(LAMPs)诱导人单核细胞(THP-1)凋亡及表达前炎症细胞因子(CKs)的分子机制,用*Mg*提取的LAMPs刺激THP-1细胞,以ELISA法和RT-PCR方法分析CKs产生和其mRNA的表达。不同试验组的细胞经AnnexinV联合PI染色后通过流式细胞仪检测细胞凋亡。采用EMSA方法检测LAMPs处理的THP-1细胞中核转录因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)的激活,并分析NF- $\kappa$ B抑制剂二硫代氨基甲酸吡咯烷(pyrrolidine dithiocarbamate,PDTC)对LAMPs处理的THP-1细胞产生CKs的量和其mRNA表达及细胞凋亡的影响。LAMPs能以时间和剂量依赖方式刺激THP-1细胞产生TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6,且能激活NF- $\kappa$ B诱导THP-1细胞表达CKs的mRNA及发生凋亡,PDTC能显著抑制CKs的mRNA表达水平和细胞凋亡。由于LAMPs能激活NF- $\kappa$ B诱导THP-1细胞表达CKs及产生细胞凋亡,因而可能是一个重要的致病因素。

**关键词:** 生殖支原体 膜蛋白 核因子  $\kappa$ B 细胞因子 凋亡

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2007)05-0899-06

生殖支原体(*Mycoplasma genitalium*, *Mg*)是目前已发现的最小原核细胞型微生物,首先由Tully等于1981年从13名男性非淋球菌尿道炎(NGU)标本中分离到2株,因其来源于泌尿生殖道,故命名为*Mg*。越来越多的资料表明*Mg*与NGU、围产期感染症、婴幼儿肺炎等疾病有关<sup>[1]</sup>。此外,*Mg*还有黏附玻璃、塑料器皿和滑行运动的能力,能依赖其特殊的顶端结构黏附宿主细胞,但关于*Mg*对宿主的致病性及其可能的致病机制仍还不十分清楚。脂质相关膜蛋白(Lipid-associated membrane proteins, LAMPs)暴露在*Mg*表面,与周围环境成分不断相互作用,因而影响机体免疫系统<sup>[2]</sup>。

本实验旨在研究*Mg* LAMPs是否能激活人单核细胞(THP-1)产生前炎症性细胞因子(Cytokines, CKs)和表达其相应的mRNA及发生细胞凋亡。同时也通过研究LAMPs是否诱导NF- $\kappa$ B的激活以及吡咯烷二甲基硫脲(pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC)一种NF- $\kappa$ B抑制剂<sup>[3]</sup>对NF- $\kappa$ B的激活、CKs的产生及细胞凋亡的影响,以了解*Mg*入侵宿主后与宿主的免疫反应,在分子水平上阐明其致病性及其可能的致病机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞培养和刺激

THP-1细胞用含10%新生牛血清、2mmol/L谷氨酰胺和10mmol/L HEPES的RPMI1640培养基在37℃、5%CO<sub>2</sub>环境中培养。当使用细胞时将其转移至24孔细胞培养板(10<sup>6</sup>/mL),分别用含有0.5~5 $\mu$ g/mL LAMPs的无血清培养基培养24h。为检测LAMPs在不同时间对细胞产生CKs的影响,分别用LAMPs处理细胞0h、6h、12h、24h、36h和48h;为评价NF- $\kappa$ B的抑制剂吡咯烷二甲基硫脲(pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC)对CKs产生的影响,细胞用含3 $\mu$ g/mL LAMPs和25 $\mu$ mol/L PDTC的无血清培养基培养24h。同时用100ng/mL的LPS做阳性对照,以100 $\mu$ L水相处理细胞做为阴性对照组。

### 1.2 试剂和仪器

*Mg*标准株G-37:由东南大学赵季文教授惠赠提供;THP-1细胞株:购自中国典型培养物保藏中心。BCA蛋白浓度测定试剂盒购于碧云天公司;细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 测定试剂盒及Annexin V-

基金项目:国家自然科学基金(30570093);湖南省自然科学基金(06JJ5044)

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

作者简介: 邱宏(1979-),女,湖南省怀化市人,硕士研究生,主要从事生殖支原体致病机制的研究。E-mail: qihuh\_1979@163.com

收稿日期: 2007-01-17; 接受日期: 2007-03-13; 修回日期: 2007-07-09

FITC 凋亡检测试剂盒购于晶美生物工程有限公司; RT-PCR 试剂盒 RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 购自于大连宝生物公司; 非放射性 NF- $\kappa$ B-EMSA 试剂盒购自 VIAGENE 公司。青霉素、链霉素购自华美公司; 硫酸多黏菌素 B 购自 Invitrogen Life Technologies 公司; Trizol 试剂: 购自美国 Invitrogen Life Technologies 公司; LPS、EGTA、PDTC: 均购自美国 sigma 公司; DEPC 购自美国 Fluka 公司; 无支原体新生牛血清 购自杭州四季青公司; 24 孔和 6 孔细胞培养板 购自美国 Costar 公司。所有的引物都由上海生物工程公司合成。

### 1.3 Mg LAMPs 的提取

用 SP-4 培养基培养 Mg 标准株 G-37 至对数生长期, 离心收集支原体沉渣, LAMPs 的提取和水相的收集按参考文献 4 进行。将 500mL 支原体培养物经 10000r/min 离心 10min, 收集支原体沉渣, 将其重悬于 5mL TBSE 溶液 [50mmol/L Tris (pH8.0), 0.15mol/L NaCl, 1mmol/L EDTA] 中, 加入 TX-114 至终浓度为 2% 以裂解支原体, 于 4 $^{\circ}$ C 静置 1h, 将支原体裂解物于 37 $^{\circ}$ C 温育 10min, 使其发生相分离, 以 10000r/min 离心 20min, 取发生相分离后的上层水相分装, 储存于 -80 $^{\circ}$ C 以用作阴性对照。在下层 TX-114 相中加入等体积的 4 $^{\circ}$ C TBSE, 混匀后 4 $^{\circ}$ C 静置 10min。以上的相分离过程重复 2 次。将发生相分离后的 TX-114 相用 4 $^{\circ}$ C TBSE 重悬至初始体积, 加入 2.5 倍体积的无水乙醇, -20 $^{\circ}$ C 过夜以沉淀膜蛋白成分, 经离心后用 PBS 重悬沉渣并经超声处理即为所要提取的 LAMPs。蛋白浓度用 BCA 微量蛋白测定试剂盒测定。所提取的 LAMPs 在使用前经 100 $\mu$ g/mL 多黏菌素 B 预孵育 2h, 以消除在蛋白提取过程中可能被污染的内毒素<sup>[4]</sup>。

### 1.4 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和 IL-6 浓度的测定

细胞经 LAMPs 处理后, 将细胞反复冻融 2 次, 将冻融液于 4 $^{\circ}$ C、5000r/min 离心 5min 后取上清液储存于 -70 $^{\circ}$ C, 以供测定 CKs (代表细胞内和释放到上清中的总的 CKs) 用, 其测定方法按照晶美公司的人 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 ELISA 检测试剂盒的说明书进行。

### 1.5 RT-PCR 检测 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和 IL-6 mRNA 的表达

用 Trizol 试剂从处理的细胞中提取总 RNA。使用 AMV 逆转录酶 (TaKaRa) 和随机引物 (Random 9 mers) 聚合合成第一链 cDNA。人 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和

IL-6 和  $\beta$ -actin (用做内对照) 的引物由上海生工合成, 序列分别如下: TNF- $\alpha$ : 上游: 5'-CAGAGGGAAGAGTCCCCAG-3', 下游: 5'-CCTTGGTCTGGTAGGAGACG-3'; IL-1 $\beta$ : 上游: 5'-TATTACAGTGGCAATGAGG-3', 下游: 5'-ATGAAGGGAAAGAAGGTG-3'; IL-6: 上游: 5'-TGACCAACCACAAATGC-3', 下游: 5'-CGAGCTCTGAAACAAAGGAT-3';  $\beta$ -actin (用做内对照) 的引物, 其序列如下:  $\beta$ -actin: 上游: 5'-CTGGGACGACATGGAGAAAA-3', 下游: 5'-AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC-3, PCR 产物长度分别为 324bp、252bp、430bp 和 564bp。100 $\mu$ L PCR 反应体系中含有 20 $\mu$ L cDNA, 具体反应条件如下: 94 $^{\circ}$ C 30s, 66 $^{\circ}$ C (TNF- $\alpha$ ) 63 $^{\circ}$ C (IL-6) 或 58 $^{\circ}$ C (IL-1 $\beta$  和  $\beta$ -actin) 45s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 35 个循环。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳用溴化乙锭染色并经凝胶成像系统成像。

### 1.6 细胞凋亡检测

为检测细胞凋亡, 按以下方法处理细胞: 细胞呈单层生长铺满培养瓶, 80% 左右后经 1~4 $\mu$ g/mL 的 LAMPs 和 3 $\mu$ g/mL LAMPs + 25 $\mu$ mol/L PDTC 处理细胞 12h, 同时用 0.1 $\mu$ g/mL 的 LPS 做阳性对照, 然后用 PBS 洗涤细胞 2 次, 用预冷的结合缓冲液调整细胞浓度到 1 $\times$ 10<sup>6</sup>/mL。将 0.5mL 细胞液转入 EP 管中加入 10 $\mu$ L 结合缓冲液, 然后加入 1.25 $\mu$ L Annexin V-FITC, 于室温 (18 $^{\circ}$ C ~ 24 $^{\circ}$ C) 避光静置 15min。经 1000 r/min 离心 5min 后去上清, 加入 0.5mL 预冷的结合缓冲液, 加入 10 $\mu$ L 碘化丙啶 (PI) 以将早期凋亡细胞与晚期凋亡及死亡细胞分开来, 立即用流式细胞仪检测。

### 1.7 凝胶阻滞实验 EMSA 检测 NF- $\kappa$ B 的活化

用 3 $\mu$ g/mL 的 LAMPs 在不同的时间处理后收集细胞, 用 1mL TBS 重悬细胞沉渣, 弃去上清液, 按参考文献 5 所述方法提取细胞核蛋白。细胞核蛋白的浓度用 BCA 微量蛋白测定试剂盒测定。采用生物素 3' 末端标记法将 NF- $\kappa$ B 探针 5'-AGTTGAGGGGACTTCCCAGGC-3'; 3'-TCAACTCCCCTGAAAGGGTCCG-5' 进行标记。将细胞核提取物 (10 $\mu$ g) 与生物素标记的探针在 20 $\mu$ L 的缓冲液 (10mol/L Tris-HCl, PH 8.5, 0.5mmol/L EDTA, 5mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1mol/L KCl, 0.05% NP-40, 2.5% Glycerol, 1 $\mu$ g/ $\mu$ L Poly (dI-dC) and 0.2 $\mu$ g/ $\mu$ L BSA) 中充分结合, 进行 6% 非变性 SDS-PAGE 电泳后, 转移至带正电荷的尼龙膜上, 120mJ 紫外交联 5min, 增强探针与膜的结合。阴性对照与阳性按上述方法与生物素标记的 NF- $\kappa$ B 探针

反应,竞争性抑制、非竞争性抑制的核提取物中加入标记的 NF- $\kappa$ B 探针,另分别加入未标记的 NF- $\kappa$ B 探针或非标记的非竞争性寡核苷酸探针。生物素标记的 DNA 探针与 HRP 标记的亲合素之间相结合,通过化学发光 X 光片曝光,显影,定影。

### 1.8 统计学处理

试验重复 3 次,所有数据均以均数  $\pm$  标准误表示,使用 SPSS13.0 统计软件对资料进行独立样本 *t* 检验后再进行单方向方差分析,  $p < 0.05$  表示有显著差异。

## 2 结果

### 2.1 Mg LAMPs 诱导 THP-1 细胞产生 IL-6、IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$

Mg LAMPs 诱导 THP-1 细胞能以时间依赖方式产生 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6。从图 1 可知,当 3 $\mu$ g/mL LAMPs 分别刺激细胞 6h 后即可从培养基中检测到 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6,而刺激 12h 产生的量则达到高峰。另外, Mg LAMPs 也能以剂量依赖方式诱导 THP-1 细胞产生 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6,从剂量反应图(图 2)可知,诱导 THP-1 细胞产生 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-

6 的 LAMPs 的最适浓度为 3 $\mu$ g/mL,产生 CKs 浓度各为(1885.29  $\pm$  58.62)pg/mL、(256.20  $\pm$  2.03)pg/mL、(35.29  $\pm$  0.49)pg/mL,与 100ng/mL LPS 诱导细胞产生 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的量(分别为 1288.96  $\pm$  34.34pg/mL、469.36  $\pm$  2.11pg/mL、33.01  $\pm$  0.81pg/mL)较接近( $p$  值均  $> 0.05$ )。我们也发现当 LAMPs 从 3 $\mu$ g/mL 增加到 5 $\mu$ g/mL 时,CKs 产生的量反而减少。

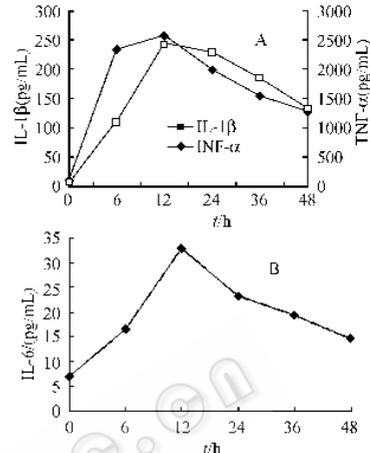


图 1 LAMPs 处理 THP-1 细胞后不同时间对产生 TNF- $\alpha$  和 IL-6 (A) 及 IL-1 $\beta$  (B) 量的影响

Fig. 1 The effect of different times on A, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ; B, IL-6 production in THP-1 cells treated with LAMPs

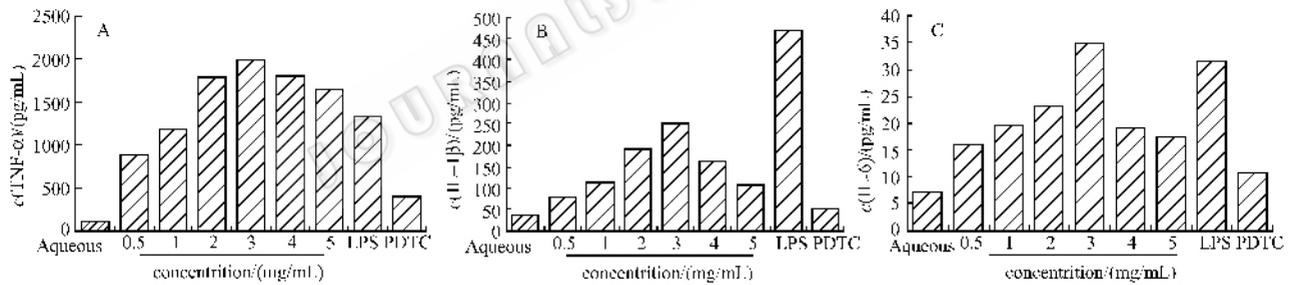


图 2 不同浓度的 LAMPs 对 TNF- $\alpha$  (A) IL-1 $\beta$  (B) 及 IL-6 (C) 生成量的影响

Fig. 2 The effect of different concentrations of LAMPs on A, TNF- $\alpha$ ; B, IL-1 $\beta$ ; C, IL-6 production

### 2.2 Mg LAMPs 诱导 THP-1 细胞表达 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和 IL-6 的 mRNA

由于 CKs 的产生主要经转录水平调节,用 RT-PCR 检测了 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的 mRNA 的表达水平,从图 3 可知,细胞经 3 $\mu$ g/mL LAMPs 处理 20h 后,其 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的 mRNA 的表达量较经 100 $\mu$ L 水相处理 20h 后高得多,且 PDTc (25 $\mu$ mol/L) 能显著抑制其 mRNA 的表达。

### 2.3 PDTc 下调 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和 IL-6 的产生且下调其 mRNA 的表达

从图 2 可知,用 LAMPs (3 $\mu$ g/mL) 和 PDTc (25 $\mu$ mol/L) 同时处理细胞后,其上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的量较仅用 LAMPs (3 $\mu$ g/mL) 处理时少得

多 ( $p < 0.05$ ) 这说明 PDTc 能显著地抑制经 LAMPs 处理的 THP-1 细胞产生 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6。另外,从图 3 也可知, PDTc 能显著抑制经 3 $\mu$ g/mL LAMPs 处理的细胞中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的 mRNA 表达。

### 2.4 Mg LAMPs 可诱导 THP-1 细胞发生凋亡

经凋亡检测试剂盒检测发现:正常细胞 FITC 及 PI 均低染,在流式细胞分析图上为 R1 区细胞簇(图 4)。早期凋亡细胞 FITC 高染 PI 低染,图上显示为 R2 区细胞簇。晚期凋亡细胞或坏死细胞 FITC 及 PI 均高染,图上显示为 R3 区细胞簇(因晚期凋亡细胞与坏死细胞不能完全区分,把坏死细胞计为晚期凋亡细胞)。Mg LAMPs 处理 THP-1 细胞 12h 后能诱导其发生凋亡,细胞凋亡率最高为 14.23%,而当用

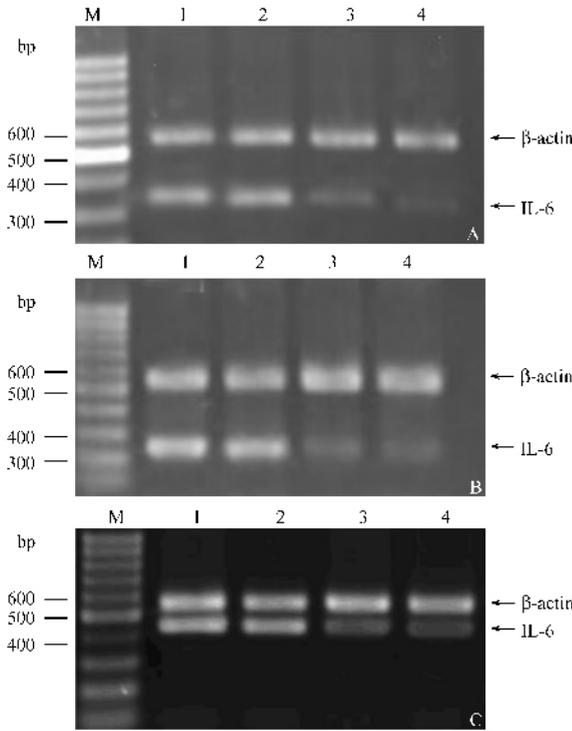


图3 不同处理组对 TNF- $\alpha$  (A) IL-1 $\beta$  (B) 及 IL-6 (C) mRNA 表达的影响

Fig.3 The effect of different groups on A, TNF- $\alpha$ ; B, IL-1 $\beta$ ; C, IL-6 mRNA expression. M: 100 bp DNA marker; 1: 0.1 $\mu$ g/mL LPS; 2: 3 $\mu$ g/mL of LAMPs; 3: 3 $\mu$ g/mL of LAMPs in combination with 25 $\mu$ mol/L PDTC; 4: 100 $\mu$ L aqueous phase.

LPS 处理细胞后其凋亡率为 16.53%。且 NF- $\kappa$ B 的特异性抑制剂 PDTC 能使凋亡细胞数目减少, 细胞凋亡率为 2.79% 明显减少 LAMPs 诱导细胞发生凋亡。

### 2.5 Mg LAMPs 可诱导 NF- $\kappa$ B 的活化

从图 5 可知, 阴性对照、非竞争性抑制组检测到了活化的 NF- $\kappa$ B 滞留条带, 阳性对照、竞争性抑制组未见活化的 NF- $\kappa$ B 滞留条带。而 NF- $\kappa$ B 在 LAMPs 组 1h 时有较弱的活性, 在 2h、4h 时组都见有较强的活性, 且在 2h 组的活性最强。

Agucous LPS		LAMPs						
Stimulation time	-	+	0h	1h	2h	4h	2h	2h
Competition	-	-	-	-	-	-	-	NF- $\kappa$ B API

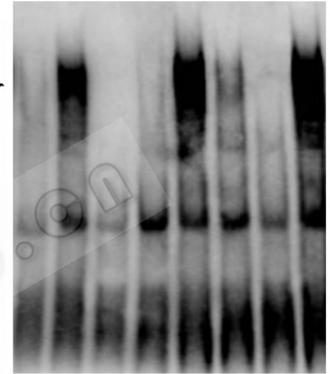


图5 EMSA 检测不同处理组 NF- $\kappa$ B 的活性

Fig.5 The activity of NF- $\kappa$ B in different groups was examined by EMSA.

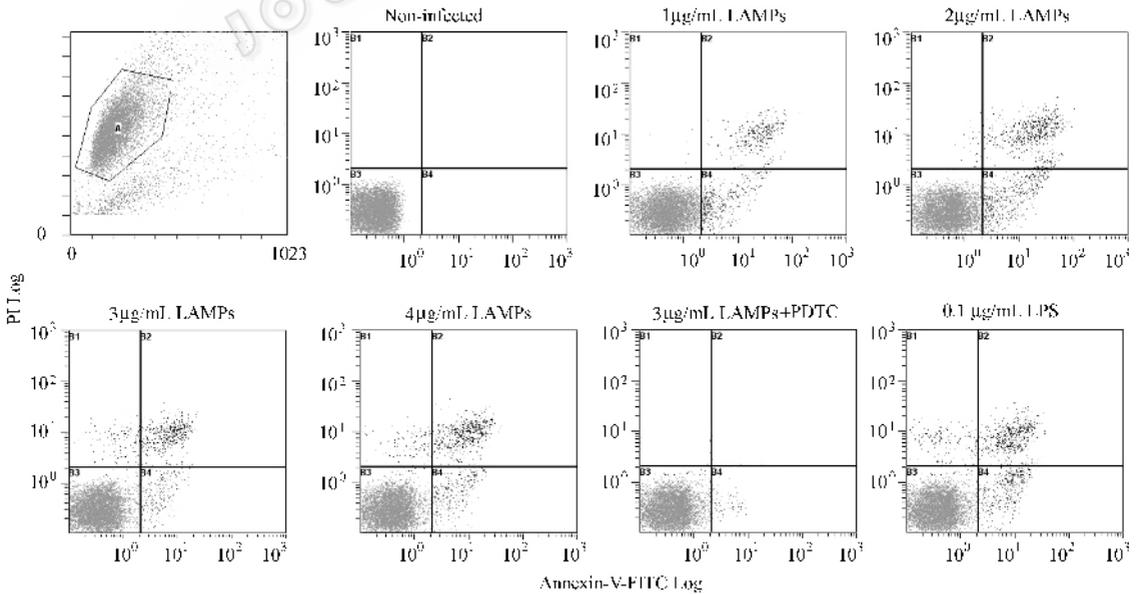


图4 不同处理组用 Annexin-V-FITC 结合 PI 染色法检测凋亡

Fig.4 Cell apoptosis of different groups was detected by Annexin-V-propidium iodide staining. THP-1 cells were stimulation with 1 to 4 $\mu$ g/mL of LAMPs, 3 $\mu$ g/mL of LAMPs in combination with 25 $\mu$ mol/L PDTC, or 0.1 $\mu$ g/mL LPS for 12 hours, stained with Annexin-V-FITC-PI and analyzed by FACS.

### 3 讨论

已有研究表明许多微生物的细胞壁产物如脂多糖、肽聚糖、脂胞壁酸和脂蛋白等能激活巨噬细胞合成和分泌一系列与感染性疾病相关的炎症蛋白<sup>[6]</sup>。支原体无细胞壁故不含脂多糖等成分,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 LAMPs。且已有研究表明一些支原体成分能激活巨噬细胞,如源自发酵支原体的高分子量物质(MDHM)和经热灭活的解脲支原体抗原能刺激小鼠巨噬细胞表达 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-8 等炎症细胞因子<sup>[7,8]</sup>,由精氨酸支原体提取的 5 种脂蛋白组成的膜成分及由穿透支原体提取的 LAMPs 能刺激人单核细胞释放 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-6<sup>[9,10]</sup>。

TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 都是前炎症细胞因子,是启动急性炎症反应的关键细胞因子。为了阐明 Mg 潜在的致病性,本研究证明 Mg LAMPs 能刺激人单核细胞系 THP-1 表达 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6,且能以时间和剂量依赖方式诱导细胞产生。然而当 LAMPs 从 0.5 $\mu$ g/mL 增加到 3 $\mu$ g/mL 时,CKs 的量反而减少了,这可能是由于 Mg LAMPs 对 THP-1 细胞有毒性作用减少了 CKs 的产生。为验证 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 基因是否表达,本研究利用 RT-PCR,成功扩出分子量分别为 430bp、252bp 及 324bp 的目的带,显示有 mRNA 的表达。同时也发现 NF- $\kappa$ B 的特异性抑制剂 PDTC 能显著地抑制经 LAMPs 处理的 THP-1 细胞产生 CKs,且能减少 CKs mRNA 的表达。

研究表明在细胞因子基因 5' 端的转录调控区含有 NF- $\kappa$ B 的结合位点<sup>[11]</sup>,在未经诱导的细胞内,细胞因子表达水平很低,甚至不表达,而 NF- $\kappa$ B 是正常表达在许多细胞的胞浆内调控机体免疫炎症反应、化学趋化因子和生长因子等的一种快速转录调控因子<sup>[12]</sup>。许多内源性和外源性的刺激因素能诱导 NF- $\kappa$ B 的激活,使 NF- $\kappa$ B 与其抑制蛋白解离而进入细胞核内与特定基因启动子结合,从而调节靶基因的表达。因为只有当位于基因上游的启动子被激活后才能诱导基因表达,故本实验检测了经 Mg LAMPs 刺激 THP-1 细胞后 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的产生及其 mRNA 的表达是否与 NF- $\kappa$ B 的激活有关。正如 EMSA 所见到的,它是应用广泛的检测 NF- $\kappa$ B 与其靶基因 DNA 结合状态的实验方法,当用 Mg LAMPs 处理 THP-1 细胞后,从细胞核的提取物中检测到 NF- $\kappa$ B 被激活,阳性对照及非竞争性抑制组可

见 NF- $\kappa$ B 与其靶基因 DNA 结合的滞留条带,而阴性对照和竞争性抑制组滞留条带消失,说明本实验方法检测到的滞留条带特异性地代表了 NF- $\kappa$ B 的活性。

细胞凋亡是在基因调控下发生的细胞主动死亡过程,包括生物、化学及病理等方面的因素导致细胞凋亡。许多物质参与巨噬细胞凋亡的调控,如 NF- $\kappa$ B、PKC、NO、PTK<sup>[13]</sup>等。在多数凋亡相关基因的启动子或增强子上都有 NF- $\kappa$ B 的特异性结合序列,NF- $\kappa$ B 可通过调节这些基因的转录与表达参与细胞凋亡的调控。本研究采用 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒检测了 Mg LAMPs 处理后的细胞,发现 12h 后即发生了凋亡,细胞凋亡率为 14.23%。且发现 NF- $\kappa$ B 特异性抑制剂 PDTC 能抑制经 LAMPs 处理的 THP-1 细胞发生凋亡,凋亡细胞减少到 2.79%,这说明 Mg LAMPs 诱导 THP-1 细胞发生凋亡可能与 NF- $\kappa$ B 的激活有关。

结果表明 Mg LAMPs 是一种潜在的 NF- $\kappa$ B 的诱导剂,能通过激活 NF- $\kappa$ B 而诱导 THP-1 细胞表达 CKs,且能诱导 THP-1 细胞发生凋亡,这说明 Mg LAMPs 可能是一个重要的致病因素。由于 CKs 在感染性疾病的致病性中具有重要作用,因此可通过抑制 CKs 的产生或用 NF- $\kappa$ B 抑制剂 PDTC 抑制 NF- $\kappa$ B 活性来治疗由 Mg 引起的炎症性紊乱。另外,由于 NF- $\kappa$ B 能调节与免疫功能有关的各种基因的表达,因此本研究的发现有利于了解 Mg 入侵宿主后与宿主的免疫反应。因此也有利于更好的了解 Mg 的免疫调节活性,且能在分子水平上更进一步的阐明 Mg 潜在的致病性。

### 参 考 文 献

- [1] Horner PJ, Gilroy CB, Thomas BJ, et al. Association of *Mycoplasma genitalium* with acute non-gonococcal urethritis. *Lancet*, 1993, **342** (8871) : 582 - 585.
- [2] Baseman JB, Reddy SP, Dallo SF, et al. Interplay between mycoplasma surface proteins, airway cells, and the protean manifestations of mycoplasma-mediated human infections. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996, **154** : s137 - s144.
- [3] 范延红,赵连友,郑强,等.核因子  $\kappa$ B 在精氨酸血管升压素诱导小鼠心肌成纤维细胞一氧化氮合成中的作用. *生理学报* 2003, **55** : 417 - 421.
- [4] Garcia J, Lemercier B, Roman-Roman S, et al. A *Mycoplasma fermentans*-derived synthetic lipopeptide induces AP-1 and NF-kappaB activity and cytokine secretion in macrophages via the activation of mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem*, 1998, **273**

- [ 5 ] 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 .
- [ 6 ] Henderson B , Poole S , Wilson M . Bacterial modulins : a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis . *Microbiol Rev* ,1996 **60** :316 – 341 .
- [ 7 ] Into T , Kiura K , Yasuda M , *et al.* . Stimulation of human Toll-like receptor ( TLR ) 2 and TLR 6 with membrane lipoproteins of *Mycoplasma fermentans* induces a apoptotic cell death after NF-kappa B activation . *Cell Microbiol* , 2004 **6** ( 2 ) :187 – 199 .
- [ 8 ] Garcia J , Lemercier B , Roman-Roman S , *et al.* . A *Mycoplasma fermentans*-derived synthetic lipopeptide induces AP-1 and NF-kappa B activity and cytokine secretion in macrophages via the activation of mitogen-activated protein kinase pathways . *J Biol Chem* ,1998 **273** ( 51 ) :34391 – 34398 .
- [ 9 ] Into T , Nodasaka Y , Hasebe A , *et al.* . Mycoplasmal lipoproteins induce toll-like receptor 2 and caspase-mediated cell death in lymphocytes and monocytes . *Microbiol Immunol* ,2002 **46** ( 4 ) :265 – 276 .
- [ 10 ] 吴移谋 , 曾焱华 , 詹利生 , 等 . 穿透支原体脂质相关膜蛋白诱导人单核细胞产生炎症性细胞因子 . 中华传染病杂志 , 2006 , ( 4 ) 251 – 253 .
- [ 11 ] Cooke CL , Davidge ST . Peroxynitrite increases iNOS through NF-kappaB and decreases prostacyclin synthase in endothelial cells . *Am J Physiol Cell Physiol* 2002 **282** :C395 – 402 .
- [ 12 ] Lee JJ , Burckart GJ . Nuclear factor kappa B : important transcription factor and therapeutic target . *J Clin Pharmacol* ,1998 , **38** :981 – 993 .
- [ 13 ] 黎 庶 , 汪正清 . LPS 诱导巨噬细胞凋亡的研究 . 中华微生物学和免疫学杂志 , 2003 **23** ( 7 ) :540 – 543 .

## ***Mycoplasma genitalium* lipid-associated membrane proteins induce human monocytic cell express proinflammatory cytokines and apoptosis by activating nuclear factor $\kappa$ B**

QIU Hong , WU Yi-mou\* , YOU Xiao-xing , YU Ming-jun , ZENG Yan-hua

( Department of Microbiology , Medical College , Nanhua University , Hengyang 421001 , China )

**Abstract** : Designed to investigate the potential pathogenicity of *Mycoplasma genitalium* ( *M. genitalium* ) and its molecular mechanisms responsible for the induction of proinflammatory cytokines gene expression in human monocytic cells ( THP-1 ) stimulated by lipid-associated membrane proteins ( LAMPs ) prepared from *M. genitalium* . THP-1 cells were stimulated with LAMPs to analyze the production of proinflammatory cytokines and the expression of mRNA was detected by RT-PCR . Cell apoptosis was detected in THP-1 cells by Annexin V-propidium iodide staining . The activity of transcriptional factors , NF- $\kappa$ B , was examined in THP-1 cells treated with LAMPs by EMSA . The effects of pyrrolidine dithiocarbamate ( PDTC ) , an inhibitor of NF- $\kappa$ B , on the production of proinflammatory cytokines , the expression of mRNA and apoptosis were also examined in THP-1 cells treated with LAMPs . *M. genitalium* LAMPs stimulate THP-1 cells to produce TNF- $\alpha$  , IL-1 $\beta$  and IL-6 in dose- and time-dependent manner . The mRNA levels and cell apoptosis are also downregulated in response to LAMPs stimulation and inhibited by PDTC treatment . *M. genitalium* LAMPs are found to trigger NF- $\kappa$ B activation , a possible mechanism for the induction of mRNA expression and the cell apoptosis . This study demonstrated that *M. genitalium* may be an important etiological factor of certain disease due to the ability of LAMPs to stimulate the expression of mRNA and apoptosis , which is probably mediated through the activation of NF- $\kappa$ B .

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