

布鲁氏菌磷酸葡萄糖变位酶对胚胎滋养层细胞的致炎作用

王震, 张辉*, 张艳, 郭飞, 张豫, 陈瑞花, 孟茹, 李志强, 张倩, 陈创夫*

石河子大学动物科技学院, 石河子 832000

摘要: 【目的】本文研究布鲁氏菌磷酸葡萄糖变位酶 (*pgm*) 基因缺失株和 PGM 蛋白对胚胎滋养层细胞 (HPT-8) 的损伤作用及其引起炎症反应时细胞因子的变化, 探讨布鲁氏菌 *pgm* 基因的生物功能。【方法】本文分别用布鲁氏菌 *pgm* 基因缺失株和纯化的 PGM 蛋白感染胚胎滋养层细胞, 通过细胞形态学的观察和酶联免疫反应检测其对细胞的损伤作用以及细胞因子的变化。【结果】本实验获得了纯化的 PGM 蛋白, 成功构建了 *pgm* 基因缺失株, 采用该基因缺失株免疫小鼠后, 采集血液分离血清, 虎红平板实验和试管凝集实验结果显示为阴性; *pgm* 缺失株和 PGM 蛋白感染 HPT-8 细胞均能诱发贴壁细胞脱落; 而且 *pgm* 基因缺失株侵袭 HPT-8 细胞的能力较 M5-90 明显降低。 *pgm* 基因缺失株侵袭 HPT-8 细胞诱导产生的细胞因子 IL-6、TNF- α 和 LDH 均高于 M5-90 对照组, 差异极显著 ($P < 0.01$), 而细胞因子 IL-10 的分泌变化不明显, PGM 蛋白感染 HPT-8 细胞时, 其细胞因子 LDH 表达水平高于 PBS 对照组, 差异极显著 ($P < 0.01$), 而 IL-6、IL-10 和 TNF- α 的表达水平明显低于 PBS 对照组, 差异显著 ($P < 0.05$)。【结论】本研究表明, PGM 蛋白和 *pgm* 缺失株可致胚胎滋养层细胞损伤, 且引发滋养层细胞细胞因子的表达变化, 为进一步研究布鲁氏菌感染宿主细胞的分子机制奠定了基础。

关键词: 布鲁氏菌, 磷酸葡萄糖变位酶, HPT-8

中图分类号: R37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 08-1040-09

布鲁氏菌病是由布鲁氏菌 (*Brucella*) 引起的一种广泛流行、人畜共患的慢性传染病, 是《中华人民共和国传染病防治法》规定的乙类传染病^[1]。人感染后常表现为持续性感染, 造成生殖系统的损害; 动物感染后, 公畜易引起睾丸炎, 母畜易造成流产^[2]。布鲁氏菌病在世界范围内广泛流行, 严重危害着畜牧业发展和人类健康。因此, 对该病的研究一直倍受国内外诸多学者高度关注^[3]。布鲁氏菌病的病原为布鲁氏菌, 是一种革兰氏阴性兼性胞内寄生菌^[4], 主要定居在胚胎滋养层细胞和巨噬细胞这两

类宿主细胞中。布鲁氏菌在这些细胞中表现出很强的生存和繁殖能力, 其在宿主细胞内寄生并能够逃避宿主的胞外防御机制, 也能抑制细胞的免疫机制, 从而使细菌长期寄生在宿主细胞内, 引起慢性感染, 但其分子致病机制至今仍不是非常清楚。

布鲁氏菌不分泌外毒素, 脂多糖 (LPS) 在维持布鲁氏菌外膜结构完整和稳定方面起着重要作用^[5], 是公认的布鲁氏菌主要毒力因子。磷酸葡萄糖变位酶是布鲁氏菌装配形成 LPS 的必需酶。完整的脂多糖作为布鲁氏菌的优势抗原, 能够刺激机

基金项目: 国家“973 项目” (2010CB30203); 国家自然科学基金 (31001046/30960288); 高层次人才科研启动资金 (RCZX200914)

* 通信作者。Tel: +86-993-2058002, Fax: +86-993-2058031, E-mail: ccf-xb@163.com (陈创夫); allanzhh@yahoo.com (张辉)

作者简介: 王震 (1987-), 男, 山东潍坊人, 硕士研究生, 主要从事布鲁氏菌致病机理的研究。

收稿日期: 2012-02-20; 修回日期: 2012-05-04

体产生很强的血清学反应, *pgm* 基因的缺失可影响细胞壁及其附件的合成, 比如 β 环状葡聚糖的合成^[6]。目前 *pgm* 基因在布鲁氏菌感染过程中发挥的具体作用尚不完全清楚。因此, 在本研究中我们选择 *pgm* 基因作为目的基因, 构建其原核表达载体并纯化重组蛋白, 同时构建布鲁氏菌 *pgm* 缺失株, 分别用 PGM 蛋白和 *pgm* 缺失株感染人胚胎滋养层细胞, 通过酶联免疫反应检测炎症细胞因子水平的变化, 分析 *pgm* 基因对胚胎滋养层细胞的影响, 为揭示 *pgm* 基因在布鲁氏菌持续感染过程中的功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、菌株和质粒: 羊种布鲁氏菌 M5-90 疫苗株和枯草杆菌均为本实验室保存, 大肠杆菌 *E. coli* DH5a 和大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞均购自天根生化 (北京) 科技有限公司; pET-28a

(+) 质粒、pMD18-T simple 载体, PGEM-7Zf⁺ 自杀质粒、pEGFP-N1 质粒均由本实验室保存; 人胚胎滋养层细胞 HPT-8 由第四军医大学军事预防医学系流行病学教研室提供。

1.1.2 主要试剂: Taq DNA 聚合酶、dNTP、Ni-NTA 纯化试剂盒和 BCA 蛋白质定量试剂盒均购自天根生化科技有限公司; DNA Marker、限制性内切酶、pMD18-T Simple 连接试剂盒均购自 TaKaRa 公司; 小量质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自上海捷瑞生物公司; 琼脂糖、蛋白 Marker SM0431 购自上海生工生物工程技术有限公司; 氨苄青霉素、卡那霉素购自德国 Sigma 公司; 咪唑购自 Biosharp 公司; DMEM 和胎牛血清购自美国 Gibco 公司; 人 LDH 检测试剂盒购自美国 R&D 公司; 人 IL-6、IL-10 和 TNF- α 检测试剂盒以及布鲁氏菌培养基均购自美国 BD 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 引物: 本实验研究所用引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primers and sequence

Primers	Sequences (5'→3')	Restriction site	Size/bp
<i>pgm</i> -N-F	<i>TCTAGA</i> ACCATCCGCAATCTTGAG	<i>Xba</i> I	1016
<i>pgm</i> -N-R	GGTACCGGCATGTTGTTCCCGTTCCG	<i>Kpn</i> I	
<i>pgm</i> -C-F	AAGCTTGTTCACCTGTCGGGTTCCCTTA	<i>Hind</i> III	1041
<i>pgm</i> -C-R	GAGCTCGAAATGGCAGGCGTAACA	<i>Sac</i> I	
<i>pgm</i> -F-1	ATGACCGCAAACACCGACAAGG		1632
<i>pgm</i> -R-1	TGGATGAGGAAACGCCGATGAT	<i>EcoR</i> I	
<i>pgm</i> -F-2	GAATTC CCCGATTGAAACGAACGGGAAC	<i>Sal</i> I	1400
<i>pgm</i> -R-2	GTCGACGGGAATAGGGGAATAAGGGAGT	<i>Sac</i>	
Sac B-F	GAGCTCGGGCTGGAAGAAGCAGACCGCTA		720
Sac B-R	GAGCTCGCTTATTGTTAACTGTTAATGTCC <i>Sac</i> I	<i>Kpn</i> I	
gfp-F	GGTACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	<i>Hind</i> III	
gfp-R	AAGCTTTTACTTGTACAGCTCGTCCATG		

Italic and underline represent the sequence recognition of restriction enzyme.

1.2 布鲁氏菌 *pgm* 基因的原核表达和纯化

1.2.1 pET-28a (+) *pgm* 的构建及鉴定: 以热灭活布鲁氏菌疫苗株 M5-90 为模板, 以 *pgm*-F-2 和 *pgm*-R-2 为引物扩增 *pgm* 基因, 大小为 1632bp。将 PCR 扩增获得的基因片段连接于 pMD18-T simple 载体, 转化 *E. coli* DH5a 感受态细胞。37°C, 摇菌培养过夜后提取质粒, 用 PCR 和 *EcoR* I/*Sal* I 双酶切方法鉴定 pMD18-T-*pgm* 重组质粒, 对鉴定正确的阳性质粒送华大基因测序。将测序正确的阳性菌

pMD18-T-*pgm* 重组质粒和 pET-28a (+) 表达载体用 *EcoR* I/*Sal* I 双酶切, 回收的 DNA 片段与经 *EcoR* I/*Sal* I 酶切过的 pET-28a (+) 载体片段连接后转入 *E. coli* DH5a 感受态细胞。挑取单菌落进行培养, 提取质粒, 用 PCR 方法和 *EcoR* I 及 *Sal* I 双酶切鉴定。鉴定正确的质粒再次送华大基因测序。

1.2.2 表达质粒转入 BL21 表达菌: 鉴定正确的质粒转化 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞。挑取单菌落进行培养, 提取质粒, 用 PCR 方法和 *EcoR* I 及 *Sal*

I 双酶切鉴定。

1.2.3 *pgm* 蛋白的表达与鉴定:将鉴定正确的阳性菌落接种于含 Kan^r 的液体 LB 中,37℃ 培养过夜,转接到新鲜的 LB 中,至 $OD_{600} = 0.6$ 时加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L 继续培养,分别在 0、2、4、6 h 收集菌液 1.0 mL,10625 × g 离心 2 min 收集菌体。12% SDS-PAGE 进行电泳,同时用宿主菌 BL21 和携带空质粒 pET-28a(+) 的 BL21 作空白对照,电泳后对凝胶进行染色、脱色、观察结果。

1.2.4 *pgm* 重组蛋白的纯化和 Western blot 检测:将含有 pET-28a(+) -*pgm* 的大肠杆菌 BL21 (DE3) 接种于含 Kan^r 的 200 mL 液体 LB 中,至 $OD_{600} = 0.6$ 时加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L 继续培养,6 h 后离心收集菌体。将收集的菌体重悬于 5 mL Lysis Buffer 中,超声破碎和冻溶处理 3-5 次;超声破碎,直至菌体透亮。4℃ 10625 × g 离心 20 min。离心后收集上清,按 4:1 的比例加入 Ni-NTA 琼脂糖珠,低温摇床结合 60 min 后,用 Wash Buffer 漂洗 Ni-NTA 琼脂糖珠 3-5 次;最后用 Elution Buffer 对 Ni-NTA 琼脂糖珠进行洗脱 3-5 次,收集洗脱液,进行 SDS-PAGE 电泳检测,使用半干式电转印仪,将 SDS-PAGE 凝胶上的蛋白样品转印到 NC 膜上,用 western blot 膜封闭液进行封闭,37℃ 作用 1 h;TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入 1:500 稀释的布鲁氏菌阳性血清,37℃ 作用 1 h;TBST 洗涤 3 次,加入 1:5000 稀释的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗羊 IgG,作用 1 h,TBST 洗涤 3 次,加入 DAB 底物显色液进行显色反应,用水终止反应。纯化的 PGM 蛋白经 BCA 蛋白定量试剂盒测定浓度后,-80℃ 保存。

1.3 布鲁氏菌 M5-90 Δ *pgm* 基因缺失株的构建

1.3.1 同源重组质粒 pGEM-7zf⁺- Δ *pgm*-Sac B 的构建:以布鲁氏菌 M5-90 疫苗株的基因组为模板,以 *pgm*-N-F、*pgm*-N-R 为引物扩增 *pgm* 基因上游同源臂(N 端);以 *pgm*-C-F、*pgm*-C-R 为引物扩增 *pgm* 基因下游同源臂序列(C 端);以 pEGFP-N1 质粒为模板,以 *gfp*-F、*gfp*-R 为引物扩增 *gfp* 基因,将 PCR 扩增获得的基因片段分别连接于 pMD18-T 载体中,得到的重组质粒分别用 *Xba* I/*Kpn* I、*Kpn* I/*Hind* III、*Hind* III/*Sac* I、*Sac* I 限制性内切酶进行酶切,将酶切后得到的上游同源臂、*gfp* 基因和下游同源臂连至自杀载体 pGEM-7zf⁺,经过鉴定正确的重组质粒命名为 pGEM-7zf⁺- Δ *pgm*。以枯草芽孢杆菌基因组为模

板,以 Sac B-F、Sac B-R 为引物扩增 Sac B 基因。将 PCR 扩增获得的基因片段连接 T 载体。用 Sac I 单酶切重组质粒 pGEM-7zf⁺- Δ *pgm* 和 pGM-T-sacB,将得到的 Sac B 基因与线性化的重组质粒 pGEM-7zf⁺- Δ *pgm* 连接,构建成同源重组质粒 pGEM-7zf⁺- Δ *pgm*-Sac B。

1.3.2 电转化布鲁氏菌 M5-90 感受态细胞:制备布鲁氏菌 M5-90 感受态细胞,取 20-30 μ L 重组质粒 pGEM-7zf⁺- Δ *pgm*-Sac B 加入 100 μ L 布鲁氏菌电转化感受态细胞中混匀,冰上放置 15 min 后,加入电击杯中,以 E = 1.5 KV/cm 电击,然后立即加入预热的 80 μ L 布鲁氏菌液体培养基。放入摇床以 37℃、180 r/min 振荡培养 24 h。菌液离心后涂布于含有筛选标记 (Amp^r) 的布鲁氏菌固体培养基上培养。

1.3.3 同源重组子的筛选和遗传稳定性检测:挑取电转后培养 3-4 d 的单菌落,以 *pgm*-F-1 和 *pgm*-R-1 为引物,用 PCR 方法鉴定同源重组单交换菌。将鉴定的同源重组单交换菌培养 24 h 后,离心后涂布在含 5% 蔗糖的布鲁氏菌固体培养基上,37℃ 培养后挑取单菌落,用 PCR 方法鉴定同源重组双交换菌。将鉴定正确的重组菌 M5-90 Δ *pgm* 在不含 5% 蔗糖的 TSA 培养基上连续传 15 代,用上述 PCR 方法分别检测重组菌的遗传稳定性^[7]。

1.4 血清学实验

1.4.1 虎红平板凝集试验 (RBPT):将 6-8 周龄 BABL/c 雄性小鼠随机分成 3 组: M5-90 组、 Δ *pgm* 组和空白组,每组 10 只。从布鲁氏菌固体培养基上分别挑取布鲁氏菌 M5-90 和 Δ *pgm* 的单菌落于液体培养基中培养至对数生长期,收集菌液,将菌液稀释成 1.5×10^7 CFU/mL, M5-90 组和 Δ *pgm* 组每只小鼠腹腔注射布鲁氏菌 0.2 mL (3.0×10^6 CFU/只),空白组每只注射 PBS 0.2 mL。于小鼠免疫后的第 10、20、30 d 进行尾静脉采血,分离血清。将抗原和分离的血清室温放置 30 min 以上,分别吸取 30 μ L 的血清和虎红平板凝集抗原,均匀混合涂于玻璃板上,以绵羊布鲁氏菌阳性血清作为对照,1-2 min 内观察试验结果。

1.4.2 标准试管凝集试验 (SAT):将 1.6.1 中分离的血清按照标准布鲁氏菌试管凝集试验 (国标号: GB15988-1995) 操作规范进行。全部试管充分震荡后,置于 37℃ 温箱中,22-24 小时后观察结果。

1.5 细胞的培养

将液氮中保存的 HPT-8 细胞取出后迅速投入 37℃ 水浴使其快速融化, 吸取细胞悬液加入 4 倍体积的 DMEM 培养液充分混匀, 73 × g 离心 5min, 去除培养液, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 37℃、5% CO₂ 条件下常规培养, 次日更换培养液继续培养。当细胞生长至瓶底 70% - 80% 时, 用 2.5% 胰酶消化后传代培养。稳定传代 3 次之后进行试验。

1.6 细胞侵袭实验

将 HPT-8 细胞接种至 6 孔板中, 细胞生长至对数期时, 弃去细胞培养液, PBS 漂洗 3 次后, 更换不加双抗的细胞培养液继续培养, 细胞计数板计数后, 即可进行侵袭实验。侵袭实验前, 布鲁氏菌通过 CFU 计数确定其浓度。布鲁氏菌 M5-90 株和 *pgm* 基因缺失株 37℃, 180 r/min 培养 24 h 后, 166 × g 离心弃培养基, 用不含双抗的细胞培养液重悬菌体。按细菌: 细胞为 200:1 进行侵袭, *pgm* 基因缺失株实验组和 M5-90 对照组分别进行 3 组平行实验。3 h 后观察细胞形态学的变化并收集各组细胞上清。之后, PBS 漂洗 3 遍, 洗去培养液中未黏附的细菌, 然后在含有 50 μg/mL 庆大霉素的培养基中孵育 45 min 来杀死胞外菌, PBS 漂洗 3 遍, 用 0.1% 的 TritonX-100 裂解细胞, 释放出胞内菌, 将裂解液倍比稀释以后涂布布鲁氏菌无抗平板, 计算 CFU。

1.7 PGM 蛋白感染细胞实验

将 HPT-8 细胞接种至 6 孔板中, 细胞生长至对数期时, 更换不加双抗的细胞培养液继续培养, 同时加入 PGM 蛋白至终浓度为 60 μg/mL。实验组重复 3 孔, 并设 PBS 对照组。24 h 后观察细胞形态学变化并收集 6 孔板中细胞上清液。

1.8 细胞因子水平的检测

酶联免疫吸附法对 1.6 和 1.7 中收集的细胞上清液进行检测, 按照 IL-6、IL-10、LDH、TNF-α 试剂盒说明书规程进行操作, 酶标仪测定 OD_{450nm} 值, 检测 IL-6、IL-10、LDH、TNF-α 细胞因子水平。

1.9 数据的处理与分析

布鲁氏菌 PGM 蛋白及布鲁氏菌 *pgm* 基因缺失株感染 HPT-8 实验中重复 3 孔的细胞因子检测结果, 用 SPSS 软件分别对 M5-90 和 *pgm* 缺失株以及 PGM 蛋白和 PBS 对照组进行单因素水平方差分析。在 Excell 中以组别为横坐标, 细胞因子分泌量为纵

坐标绘制每组 3 重复实验平均值的直方图。

2 结果

2.1 羊种布鲁氏菌 *pgm* 基因的原核表达

2.1.1 pET-28a(+)-*pgm* 重组表达质粒的构建及鉴定: 将转化后的菌液提取质粒 pET-28a(+)-*pgm*, 用 PCR 方法可扩增到约 1630bp 的目的条带; 限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切分别得到一条约 1630bp 的目的条带以及一条约 5300bp 的 pET-28a(+)-载体片段。

2.1.2 PGM 蛋白的表达和鉴定: 将重组质粒 pET-28a(+)-*pgm* 转化到大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中, 未经 IPTG 诱导的重组质粒菌液未检测到蛋白, 经 IPTG (终浓度 1 mmol/L) 诱导 2 h、4 h、6 h 后在 59.8 kDa 处分别出现一特异性条带, 大小与预期的蛋白分子量基本一致, 结果见图 1。

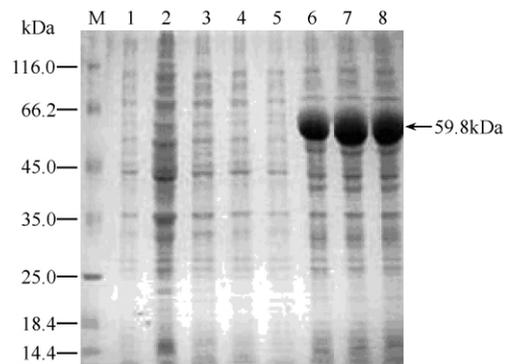


图 1 重组蛋白 PGM 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of expressed *pgm* fusion protei. M: Protein Marker. 1: *E. coli* BL21 (DE3) without induction. 2: *E. coli* BL21 (DE3) induced 4h. 3: pET-28a(+) without induction. 4: pET-28a(+) induced 4h. 5-8: pET-28a(+)-*pgm* induced 0h, 2h, 4h, 6h, respectively

2.1.3 PGM 重组蛋白的纯化和 Western blot 检测: 用 Ni-NTA 亲和纯化试剂盒对重组融合蛋白 PGM 蛋白进行纯化后, 将收集的洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳检测, 在约 59.8 kDa 处可见纯化的 PGM 蛋白条带 (图 2); 经 western blot 鉴定表明, 表达的重组蛋白 PGM 具有良好免疫原性。

2.2 布鲁氏菌 M5-90Δ*pgm* 基因缺失株鉴定

2.2.1 同源重组质粒 pGEM-7zf⁺-Δ*pgm*-Sac B 的鉴定: 用 *Xba* I/*Kpn* I 双酶切构建的同源重组质粒 pGEM-7zf⁺-Δ*pgm*-gfp-Sac B, 可以得到大小约为

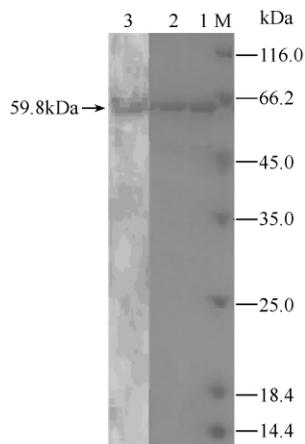


图2 重组蛋白 PGM 的纯化及 western blot 鉴定

Fig.2 Purification of PGM fusion protein and identification by western blot. M: Protein Marker. 1-2: Purification of PGM fusion protein. 3: Identification by Western blot.

1000 bp 的 DNA 条带,与上臂的理论值相符;用 *Kpn* I/*Hind* III 双酶切自杀载体 pGEM-7zf⁺- Δ *pgm*-gfp-Sac B,可以得到大小为 720bp 的 DNA 条带,与 *gfp* 基因的理论值相符;用 *Hind* III/*Sac* I 双酶切自杀载体 pGEM-7zf⁺- Δ *pgm*-gfp-Sac B,可以得到大小约为 1041bp 和 1400bp 的 DNA 条带,与下臂和 *Sac* B 基因的大小相符,结果如图 3,说明自杀载体 pGEM-7zf⁺- Δ *pgm*-gfp-Sac B 构建成功。

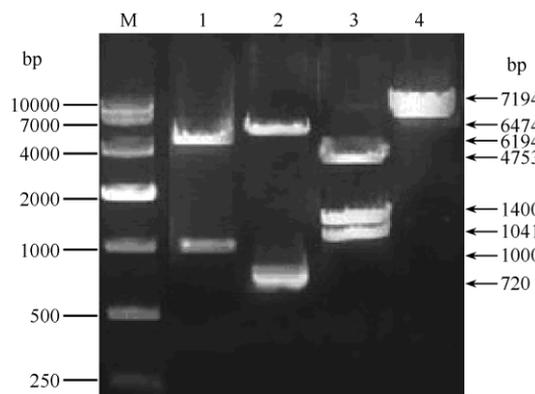


图3 pGEM- Δ *pgm* 质粒酶切鉴定

Fig. 3 Identification of pGEM- Δ *pgm* by restriction endonuclease digestion. M: Marker. 1: Products of pGEM- Δ *pgm* with *Xba* I/*Kpn* I digestion. 2: Products of pGEM- Δ *pgm* with *Kpn* I/*Hind* III digestion. 3: Products of pGEM- Δ *pgm* with *Hind* III/*Sac* I digestion. 4: Plasmid control.

2.2.2 重组菌 M5-90 Δ *pgm* 的遗传稳定性检测:将重组菌 Δ *pgm* 在不含抗性的布鲁氏菌固体培养基上连续传代至 15 代,用检测引物 (*pgm*-F-1 和 *pgm*-R-

1) 进行 PCR 检测,结果 Δ *pgm* 只能扩增出大小为 1310bp 的基因片段,而 M5-90 阳性对照组扩增产物长度为 2422bp (见图 4),证明了 M5-90 的 *pgm* 基因已被成功敲除并稳定遗传。

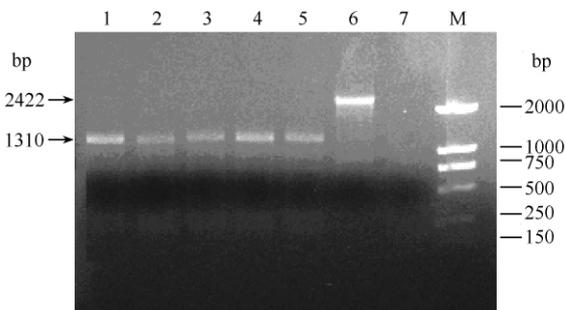


图4 M5-90 Δ *pgm* 遗传稳定性鉴定

Fig.4 The Fig of the heredity *Brucella* M5-90 Δ *pgm*. M: Maker. 1-5: The tested bacteria. 6: Negative control. 7: Positive control.

2.3 血清学实验结果

用 M5-90 和 Δ *pgm* 分别免疫小鼠后,于 10 d、20 d、30 d 分别断尾采血分离血清,获得的血清分别进行虎红平板凝集试验和试管凝集试验。由表 2 可知,接种 M5-90 的小鼠血清虎红平板凝集试验和试管凝集试验结果都为阳性,而接种 Δ *pgm* 的小鼠血清虎红平板凝集试验和试管凝集试验结果都为阴性。

2.4 细胞形态学观察

pgm 缺失株侵袭细胞结果显示:将 HPT-8 细胞传代至六孔板中,当细胞生长至对数期时,用 *pgm* 基因缺失株和 M5-90 亲本株侵袭 HPT-8 细胞(细菌:细胞 = 200:1),3 小时后通过共聚焦显微镜观察发现两实验组均有 10% 左右的 HPT-8 细胞脱落,胞质部分溶解,如图 6。PGM 蛋白转染细胞试验结果显示:当六孔板中的 HPT-8 细胞生长至对数期时,在细胞培养液中加入终浓度为 60 μ g/mL 的 PGM 蛋白,24 h 后通过共聚焦显微镜观察,发现实验组中约有 15% 的细胞发生脱落,胞质部分溶解。而 PBS 对照组中细胞数目和形态基本不变,如图 6。

2.5 细胞黏附侵袭实验

将布鲁氏菌 *pgm* 缺失株和 M5-90 株分别以 200:1 的 Mol 侵袭 HPT-8 细胞 3 h 后,裂解细胞进行 CFU 计数。结果显示:3 h 后 *pgm* 缺失株 CFU 计数为 6 个/细胞,M5-90 株 CFU 计数为 14 个/细胞。

表 2 SAT 与 RBPT 试验结果
Table 2 The results of SAT and RBPT

Groups	Time	SAT				RBPT
		1: 12.5	1: 25	1: 50	1: 100	
M5-90	10 d	+++	++	-	-	++
	20 d	++++	+++	-	-	++
	30 d	++++	+++	-	-	++
Δ pgm	10 d	-	-	-	-	-
	20 d	-	-	-	-	-
	30 d	-	-	-	-	-

“++++”, Very strong agglutination. “+++”, Strong agglutination. “++”, Moderate agglutination. “+”, Weak agglutination. “-”, No agglutination

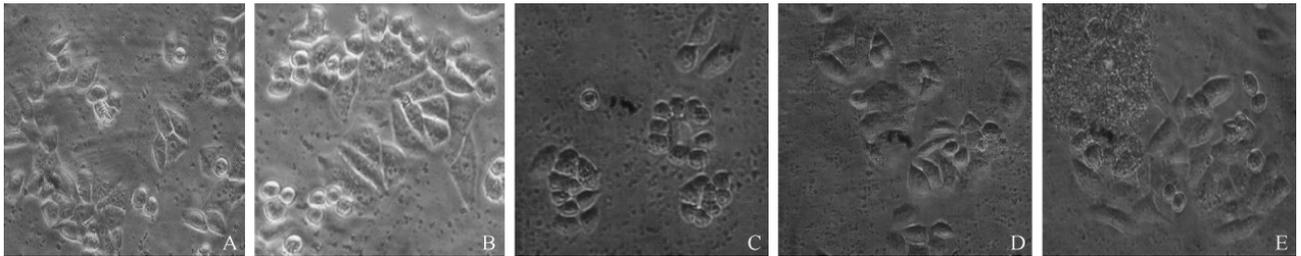


图 5 HPT-8 感染前后形态学变化

Fig. 5 Morphological changes of HPT-8 cell (200 ×). A: Uninfected cell (200 ×). B: PBS control (200 ×). C: M5-90 control. D: cells Infected by Δ pgm (200 ×). E: cells Infected by PGM Protein (200 ×).

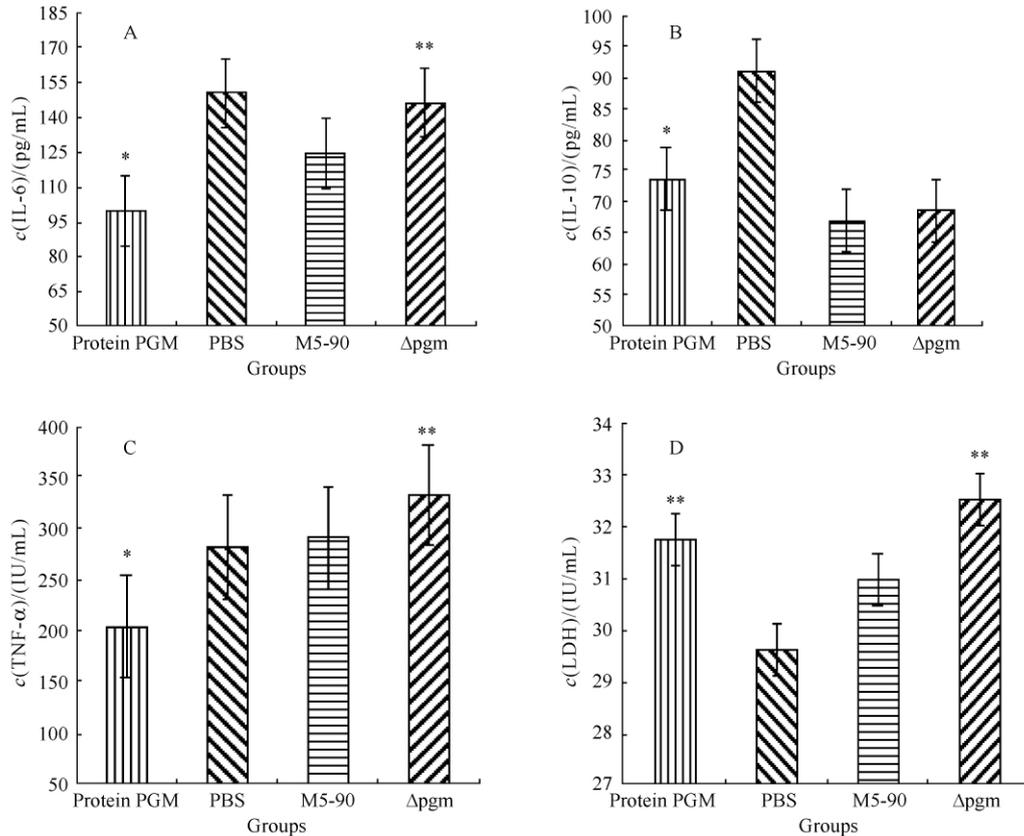


图 6 细胞因子的分泌量

Fig. 6 Concentrations of Cytokine. A: Detection result of IL-6. B: Detection result of IL-10. C: Detection result of TNF- α . E: Detection result of LDH.

2.6 细胞因子检测

按照 IL-6、IL-10、LDH、TNF- α 试剂盒说明书进行操作,用酶标仪测定 OD_{450} 值,计算 IL-6、IL-10、LDH、TNF- α 细胞因子水平结果,如图 6 所示,*pgm* 缺失株侵袭 HPT-8 诱导产生的细胞因子 IL-6、TNF- α 和 LDH 均高于 M5-90 对照组,差异极显著 ($P < 0.01$),而细胞因子 IL-10 的水平变化不明显。PGM 蛋白转染 HPT-8 细胞时,其细胞因子 LDH 表达水平高于 PBS 对照组,差异极显著 ($P < 0.01$),而 IL-6、IL-10 和 TNF- α 的表达水平低于 PBS 对照组,差异显著 ($P < 0.05$)。

3 讨论

布鲁氏菌是兼性胞内寄生菌,布鲁氏菌不仅能进入吞噬细胞内,也能够进入非吞噬性细胞中,如胚胎滋养层细胞。布鲁氏菌与滋养层细胞之间存在着独特的细菌与宿主关系,布鲁氏菌侵入孕畜的子宫后,在胚胎滋养层细胞内大量繁殖,引起胎盘炎和流产。当机体遭遇病原微生物的入侵,可产生相应的炎症和免疫反应,这是由于在长期的生物进化过程中发展出一系列识别病原体(包括病原体产物)的受体以及传递这些受体信号的信号分子。LPS 可通过与细胞膜表面的这些受体结合,激活 TLR4 (Toll-like receptor 4)、丝裂原蛋白激酶(mitogen activation protein kinase, MAPK)和 NF- κ B (nuclear factor- κ B) 信号通路,介导单核巨噬细胞、内皮细胞、胚胎滋养层细胞等细胞的激活,诱导多种细胞因子如 IL-1 β 、IL-6、IL-10、TNF- α 等的合成和释放^[8]。这些炎症因子的释放有助于宿主细胞对病原微生物的局限和清除,促进受损细胞的修复,但是如果炎症反应过度则会损害细胞的正常功能^[9]。因此,探索布鲁氏菌在感染胚胎滋养层细胞过程中的功能将有助于揭示布鲁氏菌引发宿主流产的分子机制。

布鲁氏菌及其蛋白对细胞的损伤作用诱发细胞的炎症反应,引起细胞因子的变化。在本研究中,通过检测胞内酶乳酸脱氢酶(LDH)^[10]的表达水平来衡量布鲁氏菌及其蛋白对细胞的损伤能力,结果显示细胞培养液中 LDH 的活性升高,证实布鲁氏菌及 PGM 蛋白对胚胎滋养层细胞均具有损伤作用,布鲁氏菌 *pgm* 基因缺失后,这种损伤能力较 M5-90 亲本株并未下降,该结果与李鹏等人^[11]应用 *pgm* 基因

突变株侵袭 Hela 细胞的研究存在差异,血清学实验证明 *pgm* 突变株的 LPS 明显缺失,这可能是由于布鲁氏菌对胚胎滋养层细胞的损伤作用不仅仅来自于 LPS,具体机制还有待于进一步验证。TNF- α 参与天然免疫和获得性免疫反应,是特异性免疫应答和炎症反应重要连接纽带,布鲁氏菌能激发滋养层细胞 TNF- α 的分泌,从而诱导细胞表面分子的表达,激活细胞分泌其他细胞因子杀灭病原体;同时,LPS 能抑制抗原的递呈过程,抑制机体的免疫反应,从而引发布鲁氏菌的慢性感染^[12]。在本研究中发现 *pgm* 缺失突变株诱导产生的 TNF- α 明显高于亲本株,说明固有性免疫反应在该缺失株侵袭滋养层细胞引发的急性感染中发挥着重要作用,同时 *pgm* 缺失后影响了 LPS 的合成,促进了宿主细胞的免疫应答反应。IL-6 在布鲁氏菌慢性感染中也发挥着重要作用,其可以抑制 MHC-II 类分子的表达和抗原的递呈^[12]。*pgm* 缺失株诱导细胞产生的 IL-6 高于 M5-90 亲本株,这可能是由于 *pgm* 的缺失影响了 LPS 的微区,使这种抑制作用部分恢复,同时 IL-6 被认为是炎症反应的标志,其可以激活 NK-(B 而诱导细胞间黏附分子的极化表达,是抗感染免疫反应的一个重要组成部分^[13],IL-6 在布鲁氏菌感染滋养层细胞时究竟是以抗炎作用为主还是以促炎作用为主,亦有待深入研究。IL-10 则是 Th2 细胞产生的抗炎因子,是公认的免疫抑制因子,抑制 TH1 细胞应答反应^[14],本研究中布鲁氏菌及其蛋白诱导滋养层细胞产生的 IL-10 低于 PBS 对照组,从侧面说明宿主被布鲁氏菌感染后主要以 Th1 型反应为主,这在之前国内外的研究中均有相似的报道^[15-17]。

综上所述,磷酸葡萄糖变位酶(*pgm*)基因作为布鲁氏菌毒力因子 LPS 的主要合成基因,布鲁氏菌 *pgm* 基因的缺失将影响布鲁氏菌的外膜结构,本研究通过对布鲁氏菌 *pgm* 基因缺失株和 PGM 蛋白感染的滋养层细胞进行形态学观察和细胞因子的检测,初步证实了布鲁氏菌 *pgm* 基因缺失株和 PGM 蛋白对滋养层细胞具有毒性作用,而且在细胞水平上探索其在抗感染免疫过程中的作用,这为进一步研究布鲁氏菌的慢性感染机制和揭示其引发宿主流产的分子机制奠定了基础。

参考文献

[1] 毛景东,王景龙,杨艳玲. 布鲁氏菌病的研究进展.

- 中国畜牧兽医 (*China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*), 2011, 38 (1): 222-227.
- [2] Related Articles, Links Greenfield R A, Drevets DA, Machado LJ, Voskuhl GW, Cornea P, Btonze MS. Bacterial pathogens as biological weapons and agents of bioterrorism. *American Journal of the Medical Sciences*, 2002, 323: 299-315.
- [3] 尚德秋, 李玉兰. 布氏菌分子生物学研究现状. 中国地方病防治杂志 (*Chinese Journal of Control of Endemic Disease*), 2005, 20 (5): 272-276.
- [4] Jinkyung Ko, Gary A. Splitter. Molecular Host-Pathogen Interaction in Brucellosis: Current Understanding and Future Approaches to Vaccine Development for Mice and Humans. *Clinical Microbiology Reviews*, 2003, 16 (1): 68-75.
- [5] Patrícia Gomes Cardoso, Gilson Costa Macedo, Vasco Azevedo, Sergio Costa Oliveira. Brucella spp. noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microb Cell Fact*, 2006, 5: 13.
- [6] Juan Esteban Ugalde, Diego José Comerci, M. Susana Leguizamón, Rodolfo Augusto Ugalde. Evaluation of Brucella abortus phosphoglucomutase (pgm) mutant as a new live rough-phenotype vaccine. *Infect Immun*, 2003, 71 (11): 6264-6269.
- [7] 李臻, 张红星, 唐利燕, 陈创夫, 王远志. 布鲁氏菌 M5-90 疫苗株 virB2 基因缺失株的构建及鉴定. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2010, 50 (12): 1677-1680.
- [8] Bin Xing, Adam D. Bachstetter, Linda J. Van Eldik. Microglial p38alpha MAPK is critical for LPS-induced neuron degeneration through a mechanism involving TNFalpha. *Molecular Neurodegeneration*, 2011, 6 (1): 84.
- [9] 潘灵辉. 细胞因子平衡在炎症反应中作用的研究进展. 医学综述 (*Medical Recapitulate*), 2005, 11 (9): 775-777.
- [10] 张沾, 陈创夫, 张辉, 张艳, 张娜, 李臻, 陈瑞花, 张豫. 布鲁氏菌 IV 型分泌系统效应子 VceC 功能的初步研究. 中国预防兽医学报 (*Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*), 2011, 33 (9): 685-688.
- [11] 李鹏, 潘玉焕, 罗德炎, 王希良. 布鲁杆菌 M16 株 pgm 基因突变活菌菌株毒力初步评价. 中国地方病防治杂志 (*Chinese Journal of Control of Endemic Disease*), 2011, 26 (2): 84-87.
- [12] Paula Barrionuevo, Juliana Cassataro, M. Victoria Delpino, Astrid Zwerdling, Karina A. Pasquevich, Clara Garc? a Samartino, Jorge C. Wallach, Carlos A. Fossati, Guillermo H. Giambartolomei. Brucella abortus Inhibits Major Histocompatibility Complex Class II Expression and Antigen Processing through Interleukin-6 Secretion via Toll-Like Receptor 2. *Infection And Immunity*, 2008, 76 (1): 250-262.
- [13] S De La Barrera, M Aleman, R Musella, P Schierloh, V Pasquinelli, V Garcia, E Abbate, M Del C Sasiain. IL-10 down-regulate costimulatory molecule on mycobacterium tuberculosis-pulsed macrophages and impair the lytic activity of CD4 and CD8 CTL in tuberculosis patients. *Clin Exp Immunol*, 2004, 138 (1): 128-138.
- [14] Dancella M. Fernades, Cynthia L. Baldwin. Interleukin-10 Downregulates Protective Immunity to Brucella abortus. *Infection And Immunity*, 1995, 63 (3): 1130-1133.
- [15] Mosmann T R, Sad S. The expanding universe of T2 cell subset: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*, 1996, 17: 138-146.
- [16] Kazak E, Oliveira SC, Goral G, Akalin H, Yilmaz E, Heper Y, Oral HB. Brucella abortus L7/L12 recombinant protein induces strong Th1 response in acute brucellosis patients. *Iranian Journal of Immunology*. 2010, 7 (3): 132-141.
- [17] Polci A, Leone A, Di Provido A. Study of the gene expression of Th1 and Th2 cytokines in the immune response of cows vaccinated with Brucella abortus RB51. *Veterionaria Italiana*. 2006, 42 (2): 147-155.

Effects of *Brucella* phosphoglucomutase on inducing infection of trophoblastic cells

Zhen Wang, Hui Zhang^{*}, Yan Zhang, Fei Guo, Yu Zhang, Ruihua Chen, Ru Meng, Zhiqiang Li, Qian Zhang, Chuangfu Chen^{*}

College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832000, China

Abstract: [Objective] We studied the biological function of *Brucella* phosphoglucomutase (*pgm*) gene, and detected the changes of human trophoblast cell invaded by the *Brucella* *pgm* mutant and PGM protein. [Methods] Human trophoblast cells were infected by the *pgm* mutant and PGM protein. The changes of cytokines were detected by enzyme-linked immunosorbent assay, and morphology of cells was identified. [Results] PGM protein was purified, and *pgm* mutant was constructed. The sera of mice immunized by *pgm* mutant were negative by agglutination test and Standard Tube Agglutination Test for Brucellosis. The cellular morphology of human trophoblast cells infected *pgm* mutant or PGM protein changed. The adhesion and infection of the *pgm* mutant reduced more than *Brucella* vaccine strain M5-90, and human trophoblast cells partially cracked off. The activity of IL-6, TNF- α or lactic dehydrogenase increased in human trophoblast cells infected by the *pgm* mutant more than *Brucella* vaccine strain M5-90 ($P < 0.01$), but not for IL-10. Lactic dehydrogenase in human trophoblast cells infected by the PGM Protein increased more than sodium phosphate buffer ($P < 0.01$), whereas IL-6 and TNF- α decreased in human trophoblast cells less than sodium phosphate buffer ($P < 0.05$). [Conclusion] The results suggest that the *pgm* mutant of *Brucella* and PGM protein had the cytotoxic effect for human trophoblast cells with cellular morphology and changes of cytokines.

Keywords: *Brucella*, Phosphoglucomutase, Human trophoblast cells

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Basic Research Program of China (973 Project) (2010CB30203), by the National Natural Science Foundation of China (31001046/30960288) and by the Scientific Research Fund for High-level Talents (RCZX200914)

^{*} Corresponding authors. Tel: +86-993-2058002, Fax: +86-993-2058031, E-mail: ccf-xb@163.com (Chuangfu Chen); allanzhh@yahoo.com (Hui Zhang)

Received: 20 February 2012 / Revised: 4 May 2012