

◇ 基础医学研究 ◇

金黄色葡萄球菌刺激巨噬细胞对 JNK 活化和 Th1/Th2 型细胞因子分泌的影响

肖文艳 方 磊 吴惠梅 丁佩山 刘荣玉

摘要 目的 探讨金黄色葡萄球菌(简称金葡菌)刺激小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 对 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)信号通路活化及其对 Th1/Th2 型细胞因子表达的影响。方法 体外培养小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 细胞,以金葡菌的感染复数(MOI)值为 10(金葡菌:细胞=10:1)刺激 RAW264.7 细胞,设置时间点为 0.5、1.0、1.5、2.0 h。Western blot 检测金葡菌刺激后 RAW264.7 细胞 JNK 磷酸化水平,ELISA 法检测各时间点 RAW264.7 细胞上清液中白介素-5(IL-5)和干扰素- γ (IFN- γ)的表达水平。结果 金葡菌刺激 RAW264.7 细胞后 JNK 磷酸化水平显著升高,在 0.5 h 最明显($P<0.01$);细胞上清液中 IFN- γ 水平在金葡菌刺激后 0.5、1.0 h 显著升高($P<0.01$),而在 1.5、2.0 h 逐渐恢复到正常水平($P>0.05$);IL-5 水平在金葡菌刺激后 1.0 h 开始升高($P<0.05$),并在 1.5、2.0 h 显著升高($P<0.01$);另外 IL-5/IFN- γ 在 1.0、1.5、2.0 h 时差异均有统计学意义($P<0.01$)。结论 金葡菌刺激小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞能够活化 JNK 通路,并影响 Th1/Th2 型细胞因子的表达。

关键词 巨噬细胞; JNK; IL-5; IFN- γ

中图分类号 R 562.2+5; Q 241; Q 74

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)04-0423-04

慢性阻塞性肺疾病、支气管哮喘等多种肺部疾病的共同病理生理特征,是多种炎性细胞及细胞因子相互作用所致的气道病变,在其病理生理过程中,巨噬细胞起着极其重要的作用。巨噬细胞在细菌毒素、烟雾等有害物质的刺激下,向肺组织迁移并释放多种细胞因子如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)、白介素(interleukin, IL)-6、IL-5、IL-4 等,这些细胞因

子又可以趋化 T 淋巴细胞、嗜酸性粒细胞等迁移进而导致气道持续炎症和严重损伤。研究^[1]显示金黄色葡萄球菌(简称金葡菌)细胞壁成分肽聚糖可以通过巨噬细胞表面 Toll 样受体 2(Toll-like receptor 2, TLR2)介导活化丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族的 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun amino-terminal kinase, JNK)信号通路,特别是活化 JNK 信号通路能够促进巨噬细胞吞噬金葡菌等病原体的过程^[2],并且活化的 JNK 信号通路能够激活下游核转录因子系统释放多种细胞因子。因此,该研究拟通过金葡菌刺激小鼠巨噬细胞来观察 JNK 信号通路的活化及其对 IL-5、IFN- γ 炎性细胞因子分泌的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料 小鼠单核-巨噬细胞系 RAW264.7 购于中国科学院上海细胞库;金葡菌 NCTC8325 由中国科学技术大学生命科学学院教授馈赠;DMEM 培养基、胎牛血清、青霉素、链霉素均购于美国 Invitrogen 公司;胰蛋白酶、酵母提取物购于英国 Oxoid 公司;氯霉素购于上海现代哈森药业有限公司;细胞裂解液由 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4)、0.1% SDS、1% Triton X-100、0.25% 脱氧胆酸钠,150 mmol/L 氯化钠和 1 mmol/L EDTA 配制而成,蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂购于瑞士 Roche 公司;磷酸化 JNK (p-JNK)、JNK 多克隆抗体购于美国 CST 公司;GAPDH 单克隆抗体购于上海康成生物公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗购于美国 Promega 公司;蛋白电泳转移系统购于美国 Bio-Rad 公司;PVDF 膜购于美国 Millipore 公司;ECL 化学发光检测试剂盒购于美国 Thermo 公司;荧光化学发光成像系统购于上海欧翔科学仪器有限公司;奥林巴斯倒置显微镜 IX70 购于日本 Olympus 公司;IL-5、IFN- γ ELISA 试剂盒购于武汉华美生物工程有限公司(IL-5 货号:CSB-E04637m; IFN- γ 货号:CSB-E04578m),IFN- γ 试剂盒与 IL-5 试剂盒检测范围分

2014-02-17 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:81270083、81170030);安徽省重点实验室计划项目(编号:1206c0805028);安徽省科技攻关项目(编号:12010402135)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院干部呼吸科,安徽省老年病研究所,合肥 230022

作者简介: 肖文艳 男 硕士研究生;

刘荣玉 女 教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: rongyuliu@gmail.com

别为 15.60 ~ 1 000.00 pg/ml 和 31.25 ~ 2 000.00 pg/ml。

1.2 细胞培养 RAW264.7 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,同时添加 100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素,5% CO₂、37 °C 培养箱中培养,每 2~3 d 换液 1 次,每 4~5 d 根据细胞生长状态传代 1 次,保持细胞处于对数生长期生长。

1.3 细菌培养 金葡菌在 0.1% 氯霉素的 LB 培养基(胰蛋白胨 10 g/L; 酵母提取物 5 g/L; NaCl 10 g/L) 中培养 16 h 后,取对数生长期细菌测定其光密度值(optical density, OD) (OD₆₅₀ = 0.2, 约合 2 × 10⁸ / ml),用甘油将细菌冻存, -80 °C 保存。

1.4 金葡菌刺激细胞 将对数生长期的 RAW264.7 细胞按 1 × 10⁵ / ml 的密度分别接种 12 孔板,培养过夜。PBS 清洗金葡菌 3 次,用不含抗生素的 DMEM 培养基重悬并稀释,将浓度调整至细胞:金葡菌 = 1:10,将金葡菌加入细胞中分别刺激 0、0.5、1.0、1.5、2.0 h。

1.5 Western blot 检测细胞 JNK 蛋白磷酸化水平 各组细胞处理如 1.4 所示,收集上述各组细胞用 PBS 漂洗后,加入预冷的细胞裂解液 100 μl,冰上裂解 15 min,收集裂解产物,12 000 r/min 4 °C 离心 15 min,将上清液移至新的 EP 管中,取少量用 BCA 法测定蛋白质含量,然后加入等体积 2 × loading buffer 混匀,沸水中煮 10 min,冷却后 -20 °C 保存。取 25 μg 蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 将蛋白分离,再通过转膜将蛋白转移到 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭后,加相应一抗 p-JNK 和 JNK(1:2 000) 4 °C 过夜后置于室温 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 15 min,加二抗(1:2 000) 室温放置 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 15 min, ECL 化学发光试剂孵育蛋白膜上后放入荧光化学发光成像系统中进行检测, Image J 软件分析蛋白条带灰度值。GAPDH 作为内参, p-JNK 与 JNK 灰度值的比值代表各组样品 p-JNK 的相对表达量,同时也反映了 JNK 的磷酸化水平。

1.6 ELISA 测定 IL-5 和 IFN-γ 的分泌量 收集金葡菌刺激细胞后的培养基, 1 500 r/min 4 °C 离心 15 min,留取上清液, -80 °C 保存待测。用相应 ELISA 检测试剂盒,按说明书操作规范分别检测细胞上清中 IL-5 和 IFN-γ 的含量。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组样本均数比较采用单

因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较时采用 Bonferroni 检验。

2 结果

2.1 金葡菌刺激 RAW264.7 细胞 绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP) 标记的金葡菌刺激巨噬细胞后,显微镜观察实验组 RAW264.7 细胞与对照组 RAW264.7 细胞形态上的差异。金葡菌在感染巨噬细胞后,巨噬细胞开始皱缩变形,并逐渐形成吞噬囊泡进而内吞金葡菌。见图 1。

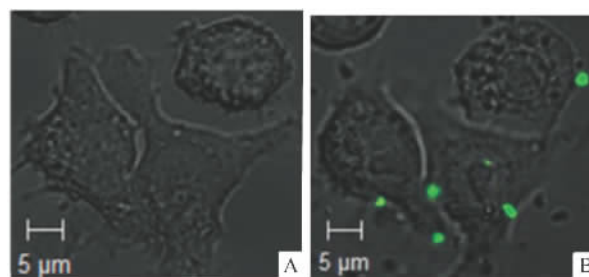


图 1 金葡菌刺激 RAW264.7 细胞 ×20
A: 对照组; B: 实验组

2.2 金葡菌刺激 RAW264.7 细胞后对 p-JNK 蛋白表达量的影响 金葡菌刺激 RAW264.7 细胞后, Western blot 检测刺激不同时间段 RAW264.7 细胞中 p-JNK 蛋白的表达量。各时间段,金葡菌刺激后 RAW264.7 细胞的 p-JNK 蛋白表达量均明显高于未刺激的 RAW264.7 细胞 ($P < 0.01$),且 0.5 h 组相比其余各组, p-JNK 蛋白表达升高的水平最明显 ($P < 0.01$),见图 2。

2.3 金葡菌刺激 RAW264.7 细胞后对 IL-5/IFN-γ 分泌量的影响 金葡菌刺激 RAW264.7 细胞后, ELISA 检测刺激不同时间段 RAW264.7 细胞上清液中 IL-5 和 IFN-γ 的分泌量,金葡菌刺激巨噬细胞后, 1.0 h 实验组与对照组 IL-5 分泌量差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 1.5 h 和 2.0 h 实验组相比于对照组, IL-5 分泌量差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 0.5 h 和 1.0 h 实验组与对照组 IFN-γ 分泌量差异有统计学意义 ($P < 0.01$),并且 0.5 h 实验组分泌量最大 ($F = 269.064$); 对 IL-5、IFN-γ 的分泌量进行相对比较时发现,随着刺激时间的延长, IL-5 与 IFN-γ 分泌量的比值 (IL-5/IFN-γ) 逐渐增大,且 1.0、1.5 和 2.0 h 实验组与 0.5 h 实验组差异均有统计学意义 ($P < 0.01$),见表 1。

表 1 处理不同时间的巨噬细胞分泌 IL-5、IFN- γ 的表达 ($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

项目	0 h	0.5 h	1.0 h	1.5 h	2.0 h
IL-5 (pg/ml)	20.98 $\pm$ 2.33	25.41 $\pm$ 1.92	30.29 $\pm$ 3.03*	38.16 $\pm$ 3.48**	50.28 $\pm$ 3.69**
IFN- γ (pg/ml)	14.53 $\pm$ 2.23	34.04 $\pm$ 4.46**	25.23 $\pm$ 2.60**	20.03 $\pm$ 2.34	16.75 $\pm$ 1.94
IL-5/IFN- γ	1.45 $\pm$ 0.06	0.75 $\pm$ 0.47	1.20 $\pm$ 0.14##	1.90 $\pm$ 0.10##	3.01 $\pm$ 0.16##

与对照组(0 h)比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 0.5 h 比较: ## $P < 0.01$

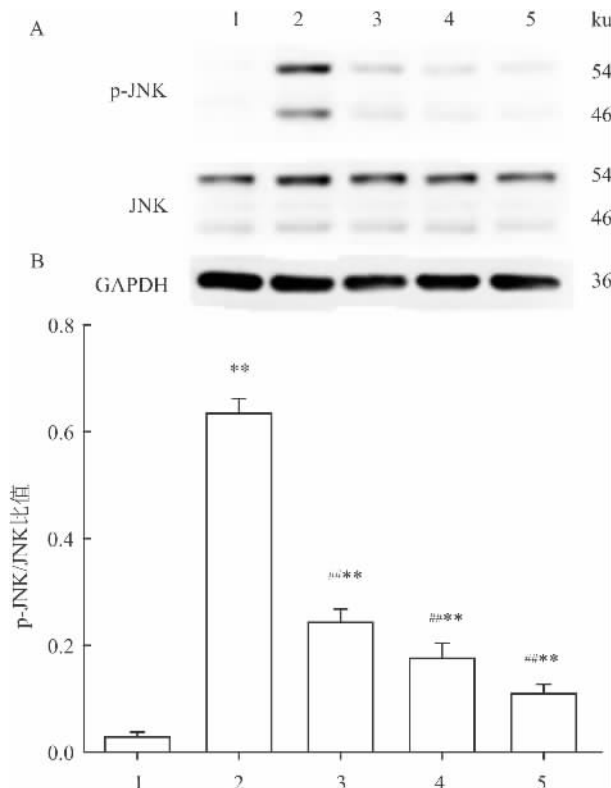


图 2 Western blot 法检测金葡菌刺激 RAW264.7 细胞后对 p-JNK 蛋白表达量的影响

1: 0 h; 2: 0.5 h; 3: 1.0 h; 4: 1.5 h; 5: 2.0 h; 与对照组(0 h)比较: ** $P < 0.01$; 与 0.5 h 组比较: ## $P < 0.01$

3 讨论

气道防御屏障中的巨噬细胞介导的天然免疫反应在慢性炎症中起着至关重要的作用,主要通过吞噬病原体和协调炎症反应来调控天然免疫应答从而参与炎症的慢性化。分布于巨噬细胞表面的 Toll 样受体(TLRs)家族通过识别金葡菌细胞壁的组分如肽聚糖、脂磷壁酸等后介导下游信号分子 JNK 的活^[3], JNK 信号通路被激活后,胞质中的 JNK 分子移位到细胞核,可以进一步促进核内的转录因子 c-Jun 氨基末端 63 及 73 位的丝氨酸残基磷酸化,激活后的核转录因子系统可以释放多种细胞因子参与调控细胞的迁移、增殖与分化^[4]。另外 JNK 信号通路

还可以通过上调吞噬相关基因(如清道夫受体 CD36、SR-A)促进巨噬细胞吞噬金葡菌的过程^[5]。

本实验结果显示金葡菌刺激小鼠巨噬细胞后, JNK 磷酸化水平在 30 min 达到高峰,与此同时,分泌的 IFN- γ 水平也达高峰,这与 Oltmanns et al^[6] 研究相一致。随着金葡菌刺激时间的延长, JNK 磷酸化水平开始降低并伴有 IFN- γ 分泌的减少,而在整个刺激过程中 IL-5 的分泌量表现为逐渐增加的趋势。另外,该研究通过 IL-5 与 IFN- γ 分泌程度的相对比较来看,金葡菌感染的早期炎症细胞因子主要以 IFN- γ 为主,而后期 IL-5 的分泌则逐渐占据主导地位,而 Masuda et al^[7] 研究发现肥大细胞通过其表面 TLR4 识别 G⁻ 菌细胞壁成分脂多糖后活化 JNK 信号通路并介导 Th2 型细胞因子(IL-5、IL-10、IL-13)分泌显著升高,并且 IL-5 和 IL-13 能够下调巨噬细胞分泌 IL-12、IFN- γ ,进而加重气道炎症,而本研究显示巨噬细胞在吞噬金葡菌后同样能够活化 JNK 信号通路并介导 IL-5 分泌显著升高。

巨噬细胞吞噬金葡菌后完成抗原提呈作用,辅助性 T 淋巴细胞(T helper cells, TH)在抗原提呈细胞作用下开始活化,同时产生 IL-2,活化的 TH 细胞在不同细胞因子环境下向 Th1 或 Th2 转化(IL-4、IL-5 促进 Th2 的分化, IL-12、IFN- γ 促进 Th1 的分化)。本研究显示在巨噬细胞吞噬金葡菌的后期以 IL-5 的分泌为主,据此推测在 IL-5 微环境下, TH 细胞倾向于向 Th2 的分化。另外 IL-5 可以招募并诱导嗜酸性粒细胞(eosinophil, Eos)分化, JNK 信号通路可能涉及到 Eos 的招募^[8]。

Kim et al^[9] 发现金葡菌的定植与气道慢性炎症密切相关,金葡菌分泌的超抗原肠毒素具有强大的抗原刺激能力,在极低浓度下即可激活大量的 T 淋巴细胞,并且金葡菌细胞壁成分-肽聚糖和磷壁酸亦为单核/巨噬细胞和淋巴细胞强有力的刺激原,可诱导 TNF- α 、IFN- γ 、IL-5 等炎症介质的大量合成与释放^[10]。且近年研究^[11]显示金葡菌与哮喘密切相关,其分泌出具有超抗原活性的肠毒素不仅能够调节 B、T 淋巴细胞功能,还能够激活其他炎性细胞

(如巨噬细胞、嗜酸性粒细胞等)。

综上所述,本研究显示金葡菌刺激巨噬细胞后活化 JNK 信号通路并对炎性细胞因子 IL-5、IFN- γ 有调控作用,提示 JNK 信号通路可能参与气道慢性疾病的发生。

参考文献

- [1] Bhatt K H, Sodhi A, Chakraborty R. Peptidoglycan induced expression of Peroxisome proliferator-activated receptor γ in mouse peritoneal macrophages: Role of ERK and JNK MAP kinases[J]. Cytokine 2012 60(3): 778–86.
- [2] Wang H, Wu Y, Ojcius D M, et al. Leptospiral hemolysins induce proinflammatory cytokines through toll-like receptor 2-and 4-mediated JNK and NF- κ B signaling pathways[J]. PLoS One 2012 7(8): e42266.
- [3] Watanabe I, Ichiki M, Shiratsuchi A, et al. TLR2-mediated survival of *Staphylococcus aureus* in macrophages: a novel bacterial strategy against host innate immunity[J]. J Immunol 2007 178(8): 4917–25.
- [4] Wuyts W A, Vanaudenaerde B M, Dupont L J, et al. Involvement of p38 MAPK, JNK, p42/p44 ERK and NF- κ B in IL-4 beta-induced chemokine release in human airway smooth muscle cells[J]. Respir Med 2003 97(7): 811–7.
- [5] Doyle S E, O'Connell R M, Miranda G A, et al. Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38[J]. J Exp Med 2004 199(1): 81–90.
- [6] Oltmanns U, Issa R, Sukkar M B, et al. Role of c-Jun N-terminal kinase in the induced release of GM-CSF, RANTES and IL-8 from human airway smooth muscle cells[J]. Br J Pharmacol 2003 139(6): 1228–34.
- [7] Masuda A, Yoshikai Y, Aiba K, et al. Th2 Cytokine production from mast cells is directly induced by lipopolysaccharide and distinctly regulated by c-Jun N-Terminal kinase and p38 pathways[J]. J Immunol 2002 169(7): 3801–10.
- [8] Kampen G T, Stafford S, Adachi T, et al. Eotaxin induces degranulation and chemotaxis of eosinophils through the activation of ERK2 and p38 mitogen-activated protein kinases[J]. Blood 2000 95(6): 1911–7.
- [9] Kim E S, Kim E C, Lee S M, et al. Bacterial yield from quantitative cultures of bronchoalveolar lavage fluid in patients with pneumonia on antimicrobial therapy[J]. Korean J Intern Med 2012 27(2): 156–62.
- [10] 姚咏明, 盛志勇. 重视金黄色葡萄球菌脓毒症的研究[J]. 中华烧伤杂志 2000 16(2): 75–7.
- [11] Bachert C, Zhang N, Patou J, et al. Role of staphylococcal superantigens in upper airway disease[J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2008 8(1): 34–8.

Effects of *Staphylococcus aureus* on the activation of JNK and secretion of Th1/Th2 cytokines in murine macrophage

Xiao Wenyan, Fang Lei, Wu Huimei, et al

(Dept of Pulmonary, Anhui Geriatrics Institute, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the effects on c-Jun amino-terminal kinase (JNK) expression and Th1/Th2 cytokines secretion from mouse macrophage cell line RAW264.7 stimulated by *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).

Methods RAW264.7 cells were cultured *in vitro*, then were stimulated by *S. aureus* at a multiplicity of infection (MOI) of 10 (*S. aureus*: cells = 10:1) for 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 h respectively. The protein expression of p-JNK was analyzed by Western blot, the levels of interleukin-5 (IL-5) and interferon- γ (IFN- γ) in the supernatants of each group were analyzed by ELISA. **Results** After stimulating by *S. aureus*, the level of JNK phosphorylation was significantly increased and was maximized at 0.5 h ($P < 0.01$); the level of IFN- γ was significantly increased at 0.5, 1.0 h ($P < 0.01$), but back to normal level at 1.5 and 2.0 h ($P > 0.05$); IL-5 began to increase at 1.0 h and 1.5 h ($P < 0.05$), and was significantly higher at 2.0 h ($P < 0.01$); additionally, the ratio of IL-5/IFN- γ was significantly increased at 1.0, 1.5 and 2.0 h ($P < 0.01$). **Conclusion** *S. aureus* stimulation activates JNK signaling and regulates the balance of Th1/Th2 cytokines in murine macrophages.

Key words macrophage; c-Jun amino-terminal kinase; interleukin-5; interferon- γ