

本文引用: 仝剑非, 李丽, 李乃静, 等. 丝裂原活化蛋白激酶信号转导通路在金黄色葡萄球菌 α -毒素所致人外周血单核细胞凋亡中的作用[J]. 新乡医学院学报, 2014, 31 (4): 241-243.

【基础研究】

丝裂原活化蛋白激酶信号转导通路在金黄色葡萄球菌 α -毒素所致人外周血单核细胞凋亡中的作用

仝剑非¹, 李 丽², 李乃静², 白 雪², 王佳贺²

(1. 中国医科大学附属盛京医院神经内科, 辽宁 沈阳 110004; 2. 中国医科大学附属盛京医院老年病科, 辽宁 沈阳 110004)

摘要: 目的 研究丝裂原活化蛋白激酶信号转导通路在金黄色葡萄球菌 α -毒素所致人外周血单核细胞凋亡中的作用。方法 以 Annexin V 异硫氰酸荧光素/碘化丙啶双染流式细胞仪检测人外周血单核细胞的凋亡率, 以 Western blot 法检测 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、细胞外信号调节激酶 (ERK) 及 c-Jun N 末端激酶 (JNK) 等蛋白的表达。结果 随着 α -毒素作用时间的延长, 磷酸化-p38 MAPK 和 JNK1/2 等蛋白的表达逐渐增高, 而磷酸化-ERK1/2 蛋白的表达不变。用 SB203580 和 SP600125 阻断 p38 MAPK 和 JNK1/2 后, 单核细胞凋亡率明显降低, 分别为 $(17.7 \pm 1.8)\%$ 和 $(15.3 \pm 1.6)\%$, 与感染 60 min 时 $(35.7 \pm 3.6)\%$ 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 MAPK 信号通路的成员 p38 MAPK 和 JNK1/2 在金黄色葡萄球菌的致病过程中起重要作用。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 丝裂原活化蛋白激酶; α -毒素

中图分类号: R378.1⁺¹ **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239 (2014) 04-0241-03

Role of mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway in apoptosis of human monocytic cells induced by α -toxin from *Staphylococcus aureus*

NAO Jian-fei¹, LI Li², LI Nai-jing², BAI Xue², WANG Jia-he²

(1. Department of Neurology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China; 2. Department of Geriatrics, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China)

Abstract: **Objective** To investigate the role of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signal transduction pathway in the apoptosis of human monocytic cells induced by α -toxin from *Staphylococcus aureus*. **Methods** The apoptosis rates of the human monocytic cells were detected by Annexin V fluorescein isothiocyanate/propidium iodide double staining flow cytometry. Western blot were performed to detect the expressions of p38 mitogen activated protein kinase (MAPK), extra cellular signal regulated kinase 1/2 (ERK1/2), and c-Jun N-terminal kinase (JNK1/2). **Results** With the prolonged duration of action of α -toxin, the expression of phosphorylated-p38 MAPK and JNK1/2 gradually increased, while the expression of phosphorylated-ERK1/2 protein was unchanged. After interruption of p38 MAPK and JNK1/2 by SB203580 and SP600125, the apoptosis rate was $(17.7 \pm 1.8)\%$ and $(15.3 \pm 1.6)\%$ respectively; compared with the apoptosis rate $(35.7 \pm 3.6)\%$ at 60 min after infection, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The p38 MAPK and JNK1/2 play an important role in the process of pathogenesis of *Staphylococcus aureus*.

Key words: *Staphylococcus aureus*; mitogen activated protein kinase; α -toxin

金黄色葡萄球菌隶属于葡萄球菌属 (*Staphylococcus*), 是人类的一种重要致病菌, 是革兰阳性菌的代表, 可引起许多严重感染^[1]。 α -毒素亦称 α -溶血素, 是由金黄色葡萄球菌分泌的一种外毒素, 是其主要毒力因子之一^[2]。近年来研究发现, 金黄色葡萄

球菌的 α -毒素可以通过不同途径诱导不同的免疫细胞发生凋亡^[3]。但迄今较少见 α -毒素诱导人外周血单核细胞凋亡与丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 信号转导通路之间关系的报道。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 细胞培养试剂购自美国 Invitrogen 公司, 二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量试剂盒购自美国 Pierce 公司, 金黄色葡萄球菌 α -毒素及其他试剂均购自美国 Sigma 公司。离

DOI: 10.7683/xyxyxb.2014.04.001

收稿日期: 2013-09-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81101224); 盛京医院自由研究者计划项目 (编号: 201206)

作者简介: 仝剑非 (1970-), 男, 辽宁沈阳人, 博士, 副教授, 副主任医师, 主要从事细菌诱导细胞凋亡机制的研究。

通信作者: 王佳贺 (1973-), 女, 辽宁沈阳人, 博士, 教授, 主任医师, 主要从事细菌诱导细胞凋亡机制的研究。

心机购自德国 Eppendorf 公司; Annexin V 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC)/碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 流式细胞仪购自美国 Beckman 公司。外周静脉血采集自中国医科大学附属盛京医院体检的健康人群, 实验获取供者知情同意。

1.2 人外周血单核细胞分离与培养 取健康捐献者外周静脉血 25 mL, 肝素抗凝, 细胞悬液加在与血液等量的淋巴细胞分离液上, $500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min。收集血浆层和淋巴细胞分离液交界面的单个核细胞, 充分洗涤, 以含体积分数 10% 胎牛血清 (fetal calf serum, FCS) 的 RPMI 1640 培养液重悬细胞, 油镜下观察细胞形态, 锥虫蓝染色实验示细胞存活率为 98% 后将所得外周血单核细胞均匀接种于 24 孔培养板, 每孔细胞数约为 5×10^6 。在需要加入抑制剂后检测细胞凋亡的实验中, 在人外周血单核细胞中加入不同浓度的 p38 MAPK 抑制剂 (SB203580)、细胞外信号调节激酶 1/2 (extra cellular signal regulated kinase 1/2, ERK1/2) 抑制剂 (PD98059) 和 c-Jun N 末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK1/2) 抑制剂 (SP600125), 60 min 后加入 α -毒素作用 30 min。

1.3 Annexin V FITC/PI 双染流式细胞仪检测人外周血单核细胞凋亡 加入不同浓度的 SB203580、PD98059 和 SP600125, 人外周血单核细胞的凋亡率用流式细胞仪检测。 10^6 个细胞加入含有 Annexin V 的 60 μL 结合缓冲液 4 $^\circ\text{C}$ 避光 15 min。为了区别早期凋亡和晚期凋亡或坏死细胞, 细胞在检测前同时染 Annexin V 和 PI。细胞结合 Annexin V-FITC 和 PI 后其结果采用 CellQuest 软件用流式细胞仪进行分析 (FACS Calibur, BD Biosciences)。每个样品至少计数 10 000 个细胞。为了证实 MAPK 信号转导通路在 α -毒素诱导的人外周血单核细胞凋亡过程中的作用, 采用不同浓度的 SB203580、PD98059 和 SP600125 预处理人外周血单核细胞, 然后用 α -毒素诱导人外周血单核细胞凋亡, 60 min 后收集细胞, 用 Annexin V FITC/PI 双染后流式细胞仪分析人外周血单核细胞的凋亡情况。

1.4 Western blot 检测 p38 MAPK、ERK1/2、JNK1/2 等蛋白表达 人外周血单核细胞经处理 0、30、60、90 min 后, 用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 洗涤 3 次, 沉淀物在冰上用裂解液重悬 20 min。等量蛋白用体积分数 12% 的十二烷基磺酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳。通过电转仪将蛋白转移至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜, 转膜时间为 2 h。质量分数 2% 脱脂奶粉室温封闭 1 h; 质量分数 2% 脱脂奶粉稀释磷酸化-p38 MAPK、ERK1/2、JNK1/2,

以及 p38 MAPK、ERK1/2、JNK1/2 等一抗, 4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜; Tris 缓冲盐溶液 (Tris-buffered saline and tween 20, TBST) 洗膜 2 次, $0.5 \times$ 封闭液洗膜 2 次, 每次 15 min; 质量分数 1% 脱脂奶粉稀释二抗 (1 : 6 000), 室温孵育 1 h; TBST 洗膜 4 次, 每次 15 min, TBS 洗 2 次, 每次 15 min。按 PIERCE 化学发光试剂盒说明, 用发光试剂浸润 PVDF 膜, X 线片在感光屏内曝光成像, 结果在凝胶成像仪上照相。同一实验重复 3 次。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 10.0 软件对数据进行统计学处理, 细胞凋亡率以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间均数比较采用单因素方差分析, 两两比较采用最小显著差法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 金黄色葡萄球菌 α -毒素对 p38 MAPK、ERK1/2 和 JNK1/2 等蛋白表达的影响 结果显示, 随着 α -毒素作用时间的延长, 磷酸化-p38 MAPK 和 JNK1/2 等蛋白的表达逐渐增加, 而磷酸化-ERK1/2 蛋白的表达不变 (图 1)。

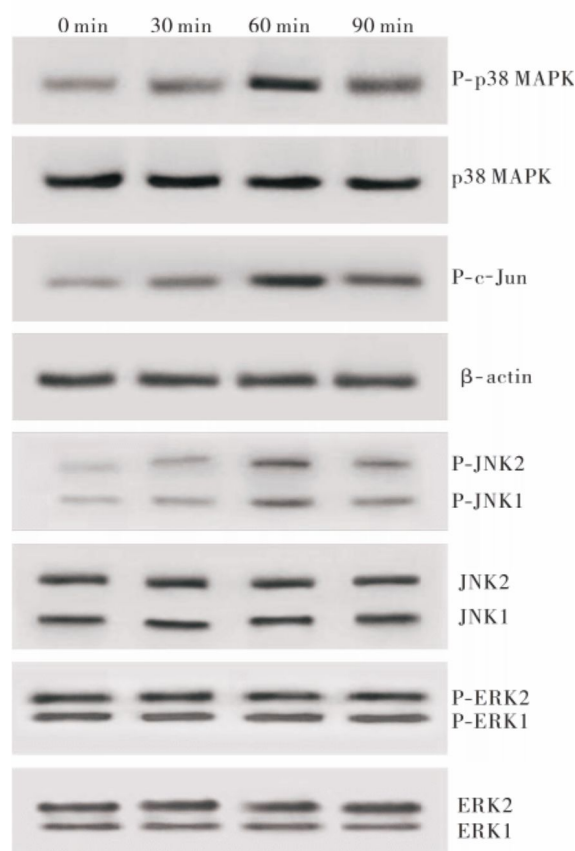


图 1 α -毒素对 p38 MAPK、ERK1/2 和 JNK1/2 等蛋白表达的影响

Fig. 1 Expressions of p38 MAPK, ERK1/2 and JNK1/2 proteins in α -toxin-induced human monocytic cells

2.2 MAPK 信号转导通路在 α -毒素诱导的人外周血单核细胞凋亡过程中的作用 α -毒素作用 0 min 时,人外周血单核细胞的凋亡率为 $(3.2 \pm 0.2)\%$; 作用 30 min 时,人外周血单核细胞的凋亡率为 $(17.8 \pm 1.7)\%$ 。用 SB203580 和 SP600125 阻断 p38 MAPK 和 JNK1/2 60 min 后,细胞凋亡率降低,分别为 $(17.7 \pm 1.8)\%$ 和 $(15.3 \pm 1.6)\%$,与 α -毒素感染 60 min 时细胞凋亡率 $(35.7 \pm 3.6)\%$ 比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。而用 PD98059 阻断 ERK1/2 信号转导通路后,人外周血单核细胞凋亡率为 $(38.9 \pm 4.1)\%$,与 α -毒素感染 60 min 时凋亡率比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

凋亡是基因控制的细胞自主性死亡过程,MAPK 途径在介导细胞凋亡过程中起重要作用^[4]。MAPK 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族,含有 3 个主要的成员即 ERK1/2、p38 MAPK 和 JNK^[5]。ERK1/2 通路被认为是经典的 MAPK 信号传导途径,其中 ERK1/2 通路是实现将细胞内信号传递给细胞核的关键信号分子^[6-7],一般认为 ERK1/2 主要调控细胞生长和细胞增殖^[8]。同时,JNK1/2 和 p38 MAPK 主要在细胞程序性死亡过程中起作用^[8]。

研究发现,金黄色葡萄球菌产生的 α -毒素能够通过 caspase-9 和 caspase-3 激活的线粒体途径诱导 Jurkat 细胞凋亡^[9]。作者所在研究团队在先前的研究中发现,促凋亡基因 Bax 表达的增加与 JNK 的磷酸化关系密切;MAPK 家族在 wood46 诱导 U937 细胞凋亡过程中起重要作用^[10-11]。本研究发现, α -毒素不仅能诱导人外周血单核细胞发生凋亡,还能激活细胞内 p38 MAPK 和 JNK1/2;用 SB203580 和 SP600125 阻断 p38 MAPK 和 JNK1/2 后,细胞凋亡率明显降低,与 α -毒素感染 60 min 时的细胞凋亡率比较,差异有统计学意义;而用 PD98059 阻断 ERK1/2 信号转导通路后,人外周血单核细胞凋亡率无明显改变。

综上所述,本研究结果表明,金黄色葡萄球菌 α -毒素能够诱导人外周血单核细胞凋亡,其机制可能与 MAPK 信号转导通路有关。而在此凋亡过程

中,是否有其他信号转导通路的参与,以及这些信号转导通路与 MAPK 通路之间的相互作用有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Chiao D J, Wey J J, Tsui P Y, et al. Comparison of LFA with PCR and RPLA in detecting SEB from isolated clinical strains of *Staphylococcus aureus* and its application in food samples [J]. *Food Chem*, 2013, 141 (3): 1789-1795.
- [2] Reddy P K, Shekar A, Kingston J J, et al. Evaluation of IgY capture ELISA for sensitive detection of Alpha hemolysin of *Staphylococcus aureus* without staphylococcal protein A interference [J]. *J Immunol Methods*, 2013, 391 (1/2): 31-38.
- [3] Zhang Y, Wang J F, Dong J, et al. Inhibition of alpha-toxin production by subinhibitory concentrations of naringenin controls *Staphylococcus aureus* pneumonia [J]. *Fitoterapia*, 2013, 86: 92-99.
- [4] 聂亚莉,王红娟,张懿玮,等.二烯丙基二硫化物诱导人肺癌细胞凋亡机制[J].新乡医学院学报,2007,26(1):6-9.
- [5] 李桂芬,唐源远.丝裂原活化蛋白激酶 p38 在急性胰腺炎患者外周血单个核细胞中的变化和意义[J].新乡医学院学报,2012,29(3):198-200,203.
- [6] 张大伟,卢晓燕,王晓文,等.辛伐他汀对大鼠损伤后狭窄颈总动脉中碱性成纤维细胞生长因子 mRNA 与细胞外信号调节激酶 1/2 mRNA 表达的影响[J].新乡医学院学报,2012,29(6):413-416.
- [7] Ko B, Cooke L L, Hoover R S. Parathyroid hormone (PTH) regulates the sodium chloride cotransporter via Ras guanylylreleasing protein 1 (Ras-GRP1) and extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway [J]. *Transl Res*, 2011, 158 (5): 282-289.
- [8] 廖永晖,汤雨,千年松,等.氧化应激与细胞凋亡[J].新乡医学院学报,2011,28(1):110-113.
- [9] Bantel H, Sinha B, Domschke W, et al. α -Toxin is a mediator of *Staphylococcus aureus*-induced cell death and activates caspases via the intrinsic death pathway independently of death receptor signaling [J]. *J Cell Biol*, 2001, 155 (4): 637-648.
- [10] Wang J H, Yu B, Niu H Y, et al. c-Jun N-terminal kinase-mediated signaling is essential for *Staphylococcus aureus*-induced U937 apoptosis [J]. *Chin Med Sci J*, 2009, 24 (1): 26-29.
- [11] Wang J H, Niu H Y, Zhang M, et al. Apoptosis induced by *Staphylococcus aureus* in human monocytic U937 cells involves Akt and MAPK phosphorylation [J]. *Afr J Biotechnol*, 2011, 10 (21): 4318-4327.

(本文编辑:徐刚珍 英文编辑:孟月)