

· 论 著 ·

MALP-2 对多形核中性细胞凋亡及其 Bax 蛋白表达的影响*

高 燕¹, 叶迎春², 袁 青¹, 周云刚¹, 黄 黎¹, 刘佳佳^{1△}

(泸州医学院: 1. 免疫学教研室; 2. 病原生物与免疫学实验室, 四川泸州 646000)

摘 要:目的 研究 Toll 样受体(TLR)激动剂巨噬细胞活化脂肽(MALP-2)影响多形核中性细胞(PMN)凋亡及凋亡相关的 Bax 蛋白的表达水平。方法 分离培养正常受试者的外周血 PMN, 分别加入实验组、阳性对照组和阴性对照组。用流式细胞术检测不同组 PMN 的凋亡发生率, 通过 Western blotting 技术检测各组 PMN Bax 蛋白的表达水平。结果 MALP-2 降低 PMN 自发性凋亡的发生率, 与阳性对照组和阴性对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 接受 MALP-2 刺激的 PMN 表达 Bax 蛋白低于阳性对照组与阴性对照组($P < 0.05$)。结论 在 TLR 激动剂诱发的 PMN 生存效应中, MALP-2 可能通过降低 PMN 胞内 Bax 蛋白的表达水平来延长 PMN 的生命期限。

关键词:中性核细胞; 细胞凋亡; Toll 样受体; Bcl-2 相关 X 蛋白质

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.14.001

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)14-1353-02

Effects of MALP-2 on apoptosis and intracellular Bax expression of neutrophils*

Gao Yan¹, Ye Yingchun², Yuan Qing¹, Zhou Yungang¹, Huang Li¹, Liu Jiajia^{1△}

(1. Department of Immunology; 2. Department of Pathogenic Biology and Immunology Laboratory, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To explore the effects of MALP-2 as TLR agonist on the apoptosis and intracellular Bax protein expression of polymorphonuclear neutrophils(PMN). **Methods** Heparinized peripheral blood was obtained from healthy volunteers. PMN were cultured according to experimental needs; the experimental group(MALP-2), positive control group(flagellin) and negative control group. Apoptosis of PMN was detected by flow cytometric analysis. The expression of Bax protein of PMN was examined by Western blotting analysis. **Results** Flow cytometry indicated that MALP-2 delayed PMN apoptosis. Western blotting showed that the expression of Bax protein in PMN was down-regulated by MALP-2. **Conclusion** MALP-2 might delay spontaneous apoptosis of PMN by reducing the expression of Bax protein in PMN.

Key words: neutrophils; apoptosis; toll-like receptors; Bcl-2-associated X protein

多形核中性细胞(polymorphonuclear neutrophil, PMN, 简称中性核细胞)来源于骨髓, 属终末分化细胞, 正常生命期限约为 24~48 h, 这就意味着 PMN 一旦分化成熟即启动其自发性凋亡^[1]。现在已知有多种基因参与 PMN 自发性凋亡的调控, 其中 Bcl-2 家族成员在细胞凋亡的基因调控过程中起着至关重要的作用^[2]。Bax 是 Bcl-2 家族中促凋亡的重要成员之一。Toll 样受体(toll-like receptor, TLR)是一类识别病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)的模式识别受体, 目前 TLRs 家族成员中人类有 11 种, 鼠类 13 种^[3]。TLR 作为病原体的关键效应器, 表达于 PMN 的表面或内部, 在机体感染病原体后或与其相应的 TLR 激动剂结合后, 均可导致 PMN 的活化, 从而影响 PMN 自发性凋亡的发生速率, 调控机体炎症反应的发生与发展进程。巨噬细胞活化脂肽(macrophage activating lipopeptide-2, MALP-2)是 TLR2/TLR6 的配体, 对 PMN 功能具有直接效应, 是作用于 PMN 的重要微生物结构识别体^[4]。本研究运用 TLR 激动剂——MALP-2(TLR2/6 的配体)刺激人 PMN, 观察它们对 PMN 凋亡和 Bax 蛋白表达水平的影响, 探索 TLR 激动剂调节 PMN 凋亡过程中与相关的 Bax 蛋白表达水平关系。

1 材料与方法

1.1 材料 RPMI-1640 培养液和胎牛血清购自 Gibco 公司,

MALP-2 细菌鞭毛蛋白(flagellin)购自 Alexis 公司, 兔抗人 Bax 多抗(一抗)购自 Thermo, 羊抗兔 IgG-HRP(二抗)购自 Santa Cruz 公司, 内参 3 磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)兔多抗购自 KPL 公司, 流式凋亡检测试剂盒购自 Beckman 公司。

1.2 方法

1.2.1 PMN 的分离 抽取健康志愿者外周静脉血, 经 Ficoll 密度梯度离心法分离后取 PMN 层, 通过台盼蓝拒染实验及 Wright-Giemsa 染色法确保细胞活力和纯度均达 96% 以上方可使用。

1.2.2 细胞的培养 调整细胞浓度为 2×10^6 个/mL, 分别将加入 MALP-2 10 ng/mL 作为实验组, 加入 flagellin 100 ng/mL 作为阳性对照组, 未经处理的 PMN 作为阴性对照组, 各组均设 3 个复孔。置 37℃、湿度 90%、5%CO₂ 的孵箱中培养, 按实验需要收获不同时间段细胞加以分析。

1.2.3 细胞凋亡率的检测 分别收获上述各组培养 8 h PMN, 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤; 4℃, 3%甲醛冰上固定 30 min; PBS 洗涤弃上清液, 转入流式收集管中; 加 FITC-Annexin V 5 μL 和 PI 2.5 μL, 混匀后避光冰浴 10 min; 加 Binding buffer 500 μL/管; 流式细胞仪测细胞凋亡率, CellQuest 软件分析。

1.2.4 Western blotting 分析 分别收获上述各组培养 8 h 的 PMN,并提取其总蛋白。15 μ L 总蛋白上样于 12% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离,电转移至二氟化树脂(polyvinylidene fluoride,PVDF)膜,5% BSA 封闭液室温封闭 1 h。一抗(1:1 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,二抗(1:1 000)育膜 60 min;1:5 000 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的 GAPDH 多克隆抗体(内参膜)育膜 1 h。加入化学发光底物反应液 5 min;于荧光化学发光图像分析仪中进行曝光,采用 Quantity-one 分析系统检测蛋白条带的平均密度值。

1.3 统计学处理 应用 SPSS16.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 one-way ANOVA,检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 新鲜分离 PMN 活性纯度鉴定 直接倒置光学显微镜下观察,细胞透明,有立体感和折光感,活性好(图 1);Wright-Giemsa 染色后可见细胞绝大多数为 3~4 叶核的 PMN,纯度高(图 2)。

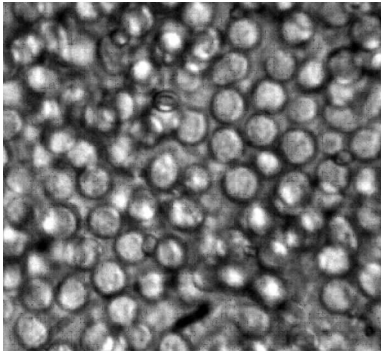


图 1 PMN(光镜 $\times 400$)

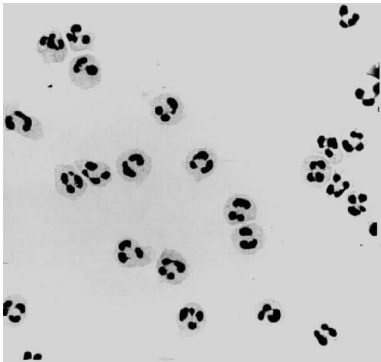
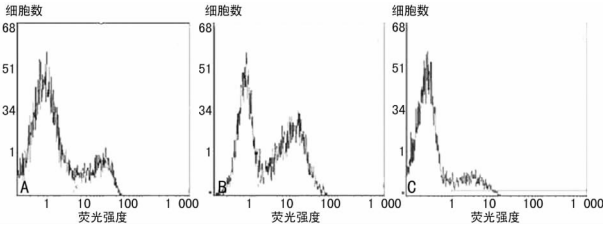


图 2 PMN(Wright-Giemsa 染色 $\times 1\ 000$)



A: 阴性对照组;B: 阳性对照组;C: 实验组。

图 3 流式细胞仪检测 PMN 凋亡率

2.2 流式细胞术检测 PMN 凋亡率 阴性对照组 PMN 自发性凋亡的发生率为 22.61 ± 3.31 (图 3A);阳性对照组 PMN 凋

亡的发生率为 53.78 ± 7.00 (图 3B);实验组 MALP-2 凋亡的发生率为 17.23 ± 3.39 (图 3C)。3 组凋亡率统计分析见表 1。

2.3 Western blotting 检测 PMN Bax 蛋白的表达 Western blotting 检测 PMN Bax 蛋白的表达见图 4。

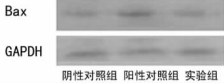


图 4 PMN Bax 蛋白的表达(Western blotting)

3 讨 论

PMN 除了自发性凋亡外,还存在多种外界因素(如激素、脂多糖、TNF- α)的作用下,发生凋亡的加速或延迟^[5]。Fukata 等^[6]研究发现,PMN 的激活、活化和趋化整个过程可受 TLRs 的调控。TLR 信号可激活固有免疫、刺激抗原特异性免疫反应,并引发炎症反应;促进细胞膜表面表达相关免疫分子;促进免疫细胞的成熟和功能性;抗病毒感染;诱导氧化亚氮依赖性杀菌活性;介导全身免疫病理损伤及其家族间的协同作用影响免疫应答等。在人体内发现的 TLR 家族 11 个成员中,TLR1、TLR2、TLR4、TLR5 和 TLR6 表达在细胞表面,专门识别细菌产物^[7]。flagellin 是 TLR5 的惟一配体,可特异识别结合 TLR,介导全身炎症反应、氧化应激和器官损害^[8-9]。而在所有 TLRs 中,TLR2 识别的配体可能最多,包括肽聚糖、脂蛋白、支原体、HSP 等,但在识别过程中需与 TLR1 或 TLR6 形成二聚体发挥作用。MALP-2 是 TLR2/TLR6 的配体,在接触 MALP-2 后,PMN 获得激活细胞状态,分泌 IL-8 和 MIP-1 β ,吞噬能力增强,细胞表面 CD62L 表达下调。但 MALP-2 对休眠 PMN 的凋亡效应施加的只是一个短期影响,长期持久的效应发生在 MALP-2 跨膜转移后。用 MALP-2 处理后的 PMN 移动增强,也是由于动力效应而不是趋化作用。本研究应用流式细胞术检测了 PMN 凋亡率情况,结果显示实验组细胞凋亡率为 17.23 ± 3.39 ,与阴性对照组和阳性对照组比较细胞凋亡率明显下降,并且 3 组之间差异均具有统计学意义($P<0.05$),说明 MALP-2 能明显延迟 PMN 凋亡的发生,延长 PMN 的生命期限。

Bax 蛋白是 1993 年 Oltvai 等^[10]从表达 Bcl-2 的人 B 细胞系 RL1 中鉴定分离出一种新型的蛋白质分子,它是 Bcl-2 家族中第一个被确认有细胞凋亡促进作用的成员。Bax 蛋白可在线粒体膜上形成新的通道、改变原有的通道或者改变线粒体膜的脂质成分或分布,影响线粒体膜的通透性及线粒体膜对其他影响因子的反应性,进而引发细胞凋亡^[11]。在 PMN 抗/促凋亡基因的平衡调节中,Bax 和 Bcl-2 两种基因相互制约,形成细胞凋亡的正负调控。然而,Bcl-2 蛋白质家族促凋亡和抗凋亡成员调控细胞凋亡作用的具体机制到目前还不清楚,它可能是一个非常复杂的相互作用的体系。随着对 Bcl-2 家族研究的深入,更多的与细胞凋亡相关的基因将会被发现,人们可以进一步地认识细胞编程死亡的本质及其调控机制。因此,对 Bax 及 Bcl-2 家族成员的深入了解有着非常重要的意义。本研究将 MALP-2 作用于 PMN 后,从蛋白水平运用 Western blotting 技术检测 PMN Bax 蛋白的表达是否影响。Western blotting 检测结果显示,实验组和阴性对照组比较,MALP-2 对 PMN Bax 蛋白的表达水平有下调作用,而且实验组和阳性对照组比较,Bax 蛋白的表达差异有统计学意义($P<0.05$),说明不同的 TLR 激动剂对 Bax 蛋白的表达可能表现出抑制作用或促进作用,这可能与 TLR 激动剂类型有关。因此,本研究的实验结果提示,在 TLR 激动剂诱发的 PMN 生(下转第 1357 页)

胞凋亡或修复与再生的具体作用机制,将为脑创伤提供新的治疗靶点和手段。

参考文献:

- [1] Cullen BR. Transcription and processing of human microRNA precursors[J]. *Mol Cell*,2004,16(6):861-865.
- [2] Doench JG,Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression[J]. *Genes Dev*,2004,18(5):504-511.
- [3] Alvarez-Garcia I,Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease [J]. *Development*,2005,132(21):4653-4662.
- [4] Taganov KD,Boldin MP,Chang KJ,et al. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146,an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses[J]. *Proc Nat Acad Sci*,2006,103(33):12481-12486.
- [5] 洪军,崔建忠,高俊玲,等. 海马区 c-fos 基因表达在大鼠脑创伤后认知功能障碍中的作用[J]. *中华创伤杂志*,2009,26(11):988-991.
- [6] Lu LF,Boldin MP,Chaudhry A,et al. Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses[J]. *Cell*,2010,142(6):914-929.
- [7] Bhaumik D,Scott GK,Schokrpur S,et al. Expression of microRNA-146 suppresses NF- κ B activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells[J]. *Oncogene*,2008,27(42):5643-5647.
- [8] Nakasa T,Miyaki S,Okubo A,et al. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue[J]. *Arthritis Rheum*,2008,58(5):1284-1292.
- [9] Lukiw WJ,Zhao Y,Cui JG. An NF- κ B-sensitive micro RNA-146a-mediated inflammatory circuit in Alzheimer disease and in

stressed human brain cells[J]. *J Biol Chem*,2008,283(46):31315-31322.

- [10] Aronica E,Fluiter K,Lyer A,et al. Expression pattern of miR-146a,an inflammation-associated microRNA,in experimental and human temporal lobe epilepsy[J]. *Eur J Neuro Sci*,2010,1(6):1100-1107.
- [11] Lin SL,Chiang A,Chang DY,et al. Loss of mir-146a function in hormone-refractory prostate cancer[J]. *RNA*,2008,14(3):417-424.
- [12] Kadhim HJ,Duchateau J,Sébire G. Cytokines and brain injury:invited review[J]. *J Intensive Care Med*,2008,23(4):236-249.
- [13] Culmsee C,Siewe J,Junker V,et al. Reciprocal inhibition of p53 and nuclear factor- κ B transcriptional activities determines cell survival or death in neurons[J]. *J Neuro Sci*,2003,23(24):8586-8595.
- [14] Neubert M,Ridder DA,Bargiotas P,et al. Acute inhibition of TAK1 protects against neuronal death in cerebral ischemia[J]. *Cell Death Differ*,2011,18(9):1521-1530.
- [15] Kim HG,Hwang YP,Han EH,et al. Metallothionein-iii provides neuronal protection through activation of nuclear factor- κ B via the TrkA/phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling pathway[J]. *Toxicol Sci*,2009,112(2):435-449.
- [16] Imielski Y,Schwamborn JC,Lüningschrör P,et al. Re-growing the adult brain:NF- κ B controls functional circuit formation and tissue homeostasis in the dentate gyrus [J]. *PLoS One*,2012,7(2):30838.

(收稿日期:2012-01-20 修回日期:2012-03-05)

(上接第 1354 页)

存效应中,MALP-2 可能通过下调 PMN 内 Bax 蛋白的表达来延长 PMN 的生命期限,从而影响和改变机体炎症反应的强度和发生、发展进程。

参考文献:

- [1] Maianski NA,Mainaski AN,Kuijpers TW,et al. Apoptosis of neutrophils[J]. *Acta Haematol*,2004,111(1):56-66.
- [2] Tsukaharas S,Yamamoto S,Shew TT,et al. Inhalation of low-level formaldehyde increases the Bcl-2/Bax expression ratio in the hippocampus of immunologically sensitized mice [J]. *Neuroimmunomodulation*,2006,13(2):63-68.
- [3] Kong Y,Le Y. Toll-like receptors in inflammation of the central nervous system[J]. *Int Immunopharmacol*,2011,11(10):1407-1414.
- [4] Wilde I,Lotz S,Engelmann D,et al. Direct stimulatory effects of the TLR2/6 ligand bacterial lipopeptide MALP-2 on neutrophil granulocytes[J]. *Med Microbiol Immunol*,2007,196(2):61-71.
- [5] O'Neill LA. Innate immunity:squelching anti-viral signaling with NLRX1[J]. *Curr Biol*,2008,18(7):R302-304.
- [6] Fukata M,Michelsen KS,Eri R,et al. Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute

colitis[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*,2005,288(5):1055-1065.

- [7] O'Mahony DS,Pham U,lyer R,et al. Differential constitutive and cytokine-modulated expression of human Toll-like receptors in primary neutrophils,monocytes,and macrophages[J]. *Int J Med Sci*,2008,5(1):1-8.
- [8] Liaudet L,Szabo C,Evgenov OV,et al. Flagellin from gram-negative bacteria is a potent mediator of acute pulmonary inflammation in sepsis[J]. *Shock*,2003,19(2):131-137.
- [9] Liaudet L,Murthy KG,Mabley JG,et al. Comparison of inflammation,organ damage,and oxidant stress induced by salmonella enterica serovar muenchen flagellin and serovar enteritidis lipopolysaccharide [J]. *Infect Immun*,2002,70(1):192-198.
- [10] Oltvai ZN,Milliman CL,Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog,Bax,that accelerates pro-gammed cell death[J]. *Cell*,1993,74(4):609-619.
- [11] 吴敏,倪鏖,吴丽群. 重度子痫前期患者外周血 PMN 凋亡及其机制的研究[J]. *现代妇产科进展*,2008,3(17):185-186.

(收稿日期:2011-12-26 修回日期:2012-02-06)