

doi: 10.3969/j.issn.1008-0589.2013.01.05

金黄色葡萄球菌毒力因子 PSM- α 的 4 个基因串联融合表达及其对人中性粒细胞的生物学作用

刘丽慧¹, 温峻¹, 袁鹏², 史祺云², 金琨琪², 程威², 于录², 冯海华^{1*}

(1. 吉林大学 畜牧兽医学院, 吉林 长春 130062;

2. 吉林大学人兽共患病研究所 人兽共患病研究教育部重点实验室, 吉林 长春 130062)

摘要: 酚可溶性调控蛋白(PSM)是一种新发现的金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)细胞外分泌蛋白,为研究其对中性粒细胞的生物学作用,本研究通过设计 linker 将其中编码 PSM- α 蛋白的 PSM- α 1、PSM- α 2、PSM- α 3、PSM- α 4 基因串联,并克隆于 pGEX-4T-1 中。重组菌经 IPTG 诱导,重组蛋白以可溶形式高效表达。通过 Glutathione Sepharose 4B 亲和层析柱纯化并用凝血酶切除其 GST 标签,得到的蛋白作用于正常人的中性粒细胞,通过 ELISA 检测细胞因子 IL-1 β 及 IL-8 的含量。结果显示,纯化后蛋白刺激中性粒细胞后,IL-8 含量显著升高。结果证明,串联表达后的 PSM- α 蛋白可以刺激中性粒细胞释放炎症因子,诱导炎症的发生,产生致病作用。

关键词: 可溶性蛋白; 人中性粒细胞; 炎症

中图分类号: S852.61

文献标识码: A

文章编号: 1008-0589(2013)12-0019-04

Tandem expression of *Staphylococcus aureus* virulence factor PSM- α gene and its effect on human neutrophils

LIU Li-hui¹, WEN Jun¹, YUAN Peng², SHI Qi-yun², JIN Kun-qi², CHENG Wei²,
YU Lu², FENG Hai-hua^{1*}

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China;

2. Key Laboratory of Zoonosis, Ministry of Education, Institute of Zoonosis, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract: Phenol-soluble modulins (PSM) is a newly identified secreted virulence factor of *Staphylococcus aureus*. To study the effect of the subunits of PSM- α , the genes of PSM- α 1, PSM- α 2, PSM- α 3 and PSM- α 4 were cloned and the recombinant plasmid pGEX-PSM- α was constructed for expression in *E.coli*. The highly expressed soluble protein were purified and digested with thrombin to remove the GST-tag. Compared with negative control, the expression of human neutrophils IL-8 was increased significantly after co-culture with the purified PSM- α detected by ELISA kit. The current study demonstrated that PSM- α was able to cause disease by stimulating human neutrophils to release inflammatory factor.

Key words: soluble protein; human neutrophils; inflammation

金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)是人类常见的病原菌,感染后可以引起肺炎、心内膜炎、骨髓炎甚至败血症^[1]。由于抗生素滥用,*S.aureus*对多种抗生素

产生了耐药性^[2]。特别是近年来出现的社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(CA-MRSA)^[3-4],因其直接或间接的与健康医疗设施相关,已成为最重要的公

*Corresponding author

收稿日期: 2012-09-16

基金项目: 国家自然科学基金(31172364); 病毒基因工程国家重点实验室开放课题(2011KF05)

作者简介: 刘丽慧(1987-),女,吉林长春人,硕士研究生,主要从事兽医药理学研究。

* 通信作者: E-mail: yulu225@126.com; fhh70@163.com

共卫生问题之一^[5]。

酚可溶性调控蛋白(Phenol-soluble modulin, PSM)是最新发现的一种细胞外分泌蛋白,它在不需受体介导的条件下即具有细胞裂解能力,是逃避中性粒细胞的重要毒力因子;PSM还具有趋化功能,并能够诱导中性粒细胞释放细胞因子,引发炎症反应^[6,7]。PSM由核基因编码并且基因成簇存在,可分为 α -肽(-20~25个氨基酸)和 β -肽(-45个氨基酸),具有两亲性 α -螺旋结构。其中, α -肽包括PSM- α 1、PSM- α 2、PSM- α 3和PSM- α 4 4种亚型, β -肽由 β 1和 β 2组成。David等研究表明,当敲除PSM- α 后,*S.aureus*的致病力明显降低,而敲除PSM- β 后未见致病力的明显变化^[8],表明PSM- α 是*S.aureus*致病的主要毒力因子。本实验串联融合表达PSM- α 蛋白,采用纯化的蛋白刺激健康人的中性粒细胞,通过ELISA检测IL-1 β 及IL-8的含量,鉴定其对中性粒细胞的影响,为制备抗体及为*S.aureus*感染的有效控制和临床治疗奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要实验材料 大肠杆菌 BL21 (DE3)及表达载体 pGEX-4T-1 均为本实验室保存;限制性内切酶 *Sal*、*Bam*H 及 T4 连接酶均购自 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒及 DNA 片段纯化回收试剂盒购自 Axygen;还原型谷胱甘肽(GSH)购自上海鼎国生物技术有限公司;人中性粒细胞分离液 Polymorphprep 购自 AXIS-SHIELD PoC AS;纯化柱及 Glutathione Sepharose 4B 购自 GE 公司;凝血酶购自生工生物工程(上海)有限公司;CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学研究所;小鼠抗谷胱甘肽-S-转移酶(GST)抗体购自长春宝泰克生物科技公司;过氧化物酶标记的羊抗小鼠抗体、Hepes 缓冲液均购自武汉博士德生物工程有限公司;ELISA 试剂盒购自 e-Bioscience。

1.2 表达重组质粒 pGEX-PSM- α 的构建 根据 GenBank 中登录的 PSM- 基因序列(BK006301.1),通过 linker 将 PSM- α 1、PSM- α 2、PSM- α 3、PSM- α 4 4 个基因(图 1)串联于 pUC-50T 载体中(上海生工生物工程技术有限公司合成),*Sal* 及 *Bam*H 双酶切目的片段,经 DNA 纯化回收试剂盒回收目的片段,连接表达载体 pGEX-4T-1,转化感受态 BL21 (DE3)。培养后,提取重组质粒双酶切鉴定并测序鉴定。



图 1 PSM- α 串联基因

Fig.1 The four tandem genes encoding PSM- α

1.3 PSM- α 蛋白表达条件优化及鉴定 将重组菌 37℃ 培养至 OD_{600nm} 值为 0.4~0.6,分别加入 0.2 mM~1 mM IPTG,诱导温度分别为 16℃~37℃,转数分别为 180 r/min~220 r/min,诱导时间分别为 2 h~12 h,经 SDS-PAGE 分析确定最佳诱导条件。以优化条件大量诱导表达蛋白,收集菌体并超声裂解,离心后将收集沉淀及上清分别进行 SDS-PAGE 及 western blot 鉴定。

1.4 PSM- α 蛋白纯化、酶切及 SDS-PAGE 鉴定 按照 Glutathione Sepharose 4B Affinity 操作说明书纯化表达蛋白、凝血酶酶切(切除 GST 标签),获得的蛋白分别进行 SDS-PAGE 鉴定。

1.5 人中性粒细胞的分离 按照 Polymorphprep 说明书分离健康人外周静脉血(EDTA-K2 抗凝处理)中性粒细胞,重悬于 RPMI-1640 培养基中。

1.6 细胞毒性检测 将分离的中性粒细胞按 1×10^4 cells/孔培养于 96 孔板中,实验组中加入纯化后酶切处理的重组蛋白,使其终浓度分别为 10 μ g/mL、1 μ g/mL、100 ng/mL、10 ng/mL,同时设置空白孔及阴性对照孔,分别培养 2 h、4 h、6 h,根据 CCK-8 操作说明书测定不同浓度蛋白对细胞存活率的影响,计算公式为:细胞存活率(%)=(实验组 A 均值 - 空白孔 A 值)/(对照孔 A 值 - 空白孔 A 均值) $\times 100\%$ 。

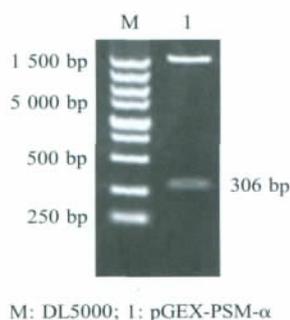
1.7 ELISA 检测 将分离的中性粒细胞按 1.5×10^5 cells/孔培养于 96 孔板中,实验组加入纯化后酶切处理蛋白,使其终浓度为 10 μ g/mL,置于 37℃ 5% CO₂ 培养 6 h^[9],收集上清,通过 ELISA 检测 IL-1 β 及 IL-8 的含量(e-Bioscience)。

1.8 统计学分析 采用 SPSS 13.0 对实验所得数据进行统计学分析。

2 结果

2.1 pGEX-PSM- α 表达重组质粒的构建及鉴定 通过人工合成由 linker 连接编码 PSM- α 4 个基因(PSM- α 1、PSM- α 2、PSM- α 3、PSM- α 4)的串联融合基因,并克隆于 pGEX-4T-1 载体中,构建表达重组

质粒 pGEX-PSM- α , 经 *Sal* 及 *Bam*H 双酶切后, 得到 306 bp 目的片段(图 2), 测序结果与预期相符。

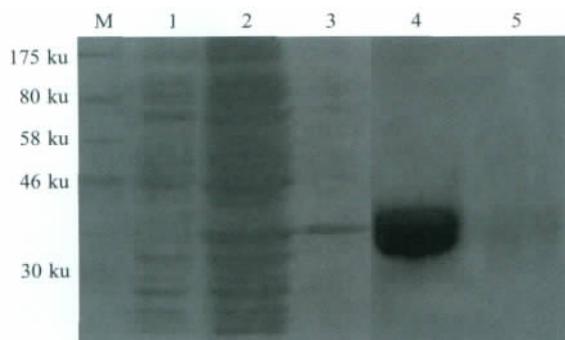


M: DL5000; 1: pGEX-PSM- α

图 2 重组质粒双酶切鉴定结果

Fig.2 Identification of the recombinant plasmid by *Sal* I and *Bam*H I digestions

2.2 PSM- α 蛋白 SDS-PAGE 及 western blot 鉴定 用不同诱导条件诱导表达蛋白, 超声裂解离心后收集沉淀及上清, 经 western blot 试验表明其具有免疫原性(图 3)。以优化条件 1 mM IPTG, 16 °C 220 r/min 诱导 12 h, 大量表达分子量为 36 ku 的可溶性蛋白。



M: 蛋白 Marker; 1: 诱导 0 h 上清; 2: 诱导 12 h 上清; 3: 诱导 12 h 沉淀; 4: IPTG 诱导 pGEX-PSM- α /BL21; 5: IPTG 诱导空菌 pGEX-4T-1/BL21

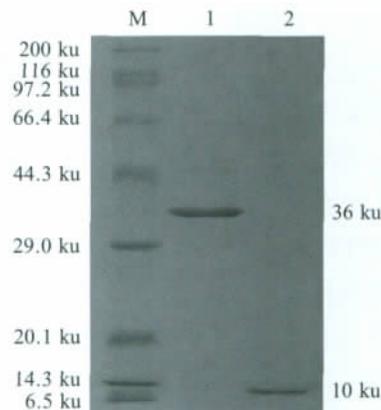
SDS-PAGE: M: Protein Marker; 1: The supernatant of pGEX-4T-1/BL21 induced for 0 h; 2: The supernatant of pGEX-PSM- α /BL21 induced for 12 h; 3: The precipitation of pGEX-PSM- α /BL21 induced for 12 h; Western blot: 4: pGEX-PSM- α /BL21 induced; 5: pGEX-4T-1/BL21 was induced

图 3 PSM- α 蛋白 SDS-PAGE 及 western blot 结果
Fig.3 Analysis of PSM- α protein through SDS-PAGE and western blot

2.3 PSM- α 蛋白纯化及酶切结果 诱导表达后蛋白经 Glutathione Sepharose 4B 亲和层析柱纯化得到 36 ku 的蛋白, 纯化后蛋白经凝血酶切除 GST 标签后得到 10 ku 重组蛋白(图 4)。

2.4 细胞毒性检测结果 用纯化后酶切处理的 PSM- α 蛋白作用于分离的中性粒细胞, 通过 CCK-8

试剂盒检测不同蛋白浓度、不同作用时间对细胞存活率的影响(图 5), 结果表明当蛋白浓度为 10 μ g/mL、作用 6 h 后, 对细胞的毒性为 10 % (将该浓度作为该蛋白对细胞的基本无毒浓度)。



M: 蛋白 Marker; 1: 纯化后蛋白; 2: 酶切后蛋白
M: Protein Marker; 1: Purified protein; 2: Digestion protein

图 4 PSM- α 蛋白纯化及酶切结果

Fig.4 Purification and digestion of the protein PSM- α

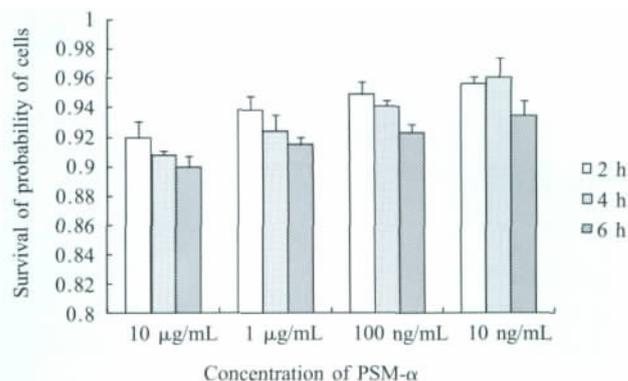


图 5 纯化后蛋白对人中性粒细胞的细胞毒性检测结果
Fig.5 Toxicity test of purified protein to human neutrophils

2.5 ELISA 检测结果 采用 ELISA 方法检测 IL-1 β 及 IL-8, 结果表明 PSM- α 蛋白刺激中性粒细胞后, 空白组 IL-8 仅为 74 pg/mL, 实验组 IL-8 含量平均为 918 pg/mL, 差异极显著 ($p < 0.01$); 对照组 IL-1 β (16 pg/mL) 与实验组 (45 pg/mL) 相比差异不显著。

3 讨论

PSM- α 是 CA-MRSA 的毒力因子之一, 已有报道表皮葡萄球菌能够引起巨噬细胞系中一些细胞发生炎症反应^[10]。有研究表明, CA-MRSA 野生株与 PSM- α 敲除株相比, 其毒力及致病性明显降低^[11]。本实验从 *S.aureus* 致病的主要毒力因子入手, 串联

融合表达了 PSM- α 。纯化后的蛋白可以通过免疫动物获得特异性抗体，为预防 *S.aureus* 感染提供依据。此外，研究 PSM- α 对中性粒细胞的作用，可以从根本上对 *S.aureus* 的感染进行控制及治疗。

中性粒细胞是最先渗入组织中的白血球，它们通过趋化因子的梯度渐变而随血流到达感染部位，是清除细菌最重要的吞噬细胞^[11]，也是天然免疫不可或缺的一部分。在炎症及败血型休克中，TNF- α 、IL-1 β 以及 IL-6 是主要炎症因子，而 TNF- α 、IL-8 是中性粒细胞强烈的化学引诱物^[12]。有研究表明，PSM- α 的致病机理是破坏白细胞，因此，在 *S.aureus* 逃避宿主天然免疫中 PSM- α 起到关键作用^[6]。本研究通过 PSM- α 蛋白刺激人的中性粒细胞后，检测两种细胞因子的含量显示，IL-8 表达量升高，提示 PSM- α 是通过趋化中性粒细胞从血循环到感染或组织损伤部位而引发机体的炎症反应。

本研究结果表明，PSM- α 能够刺激中性粒细胞释放炎症趋化因子，致使机体发生炎症，该实验为更好的控制 *S.aureus* 的感染和提高临床治疗效果提供一定的依据。

参考文献：

- [1] Lowy F D. *Staphylococcus aureus* infections [J]. N Engl Med, 1998, 339: 520-532.
- [2] Koziel J, Maciag-Gudowska A, Mikolajczyk T, et al. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by macrophages exerts cytoprotective effects manifested by the upregulation of antiapoptotic factors [J]. PLoS One, 2009, 4: e5210.
- [3] Adcock P, Pastor P, Medley F, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in two childcare centers [J]. Infect Dis, 1998, 178: 577-580.
- [4] Baggett H, Hennessy T, Leman R, et al. An outbreak of community-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections in southwestern Alaska [J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2003, 24: 397-402.
- [5] File T. Impact of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the hospital setting [J]. Cleve Clin J Med, 2007, 74(Suppl 4): S6-11.
- [6] Wang Rong, Braughton K R, Kretschmer D, et al. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA [J]. Nat Med, 2007, 13: 1510-1514.
- [7] Otto M. Looking toward basic science for potential drug discovery targets against community-associated MRSA [J]. Med Res Rev, 2009, 30: 5.
- [8] David M Z, Daum R S. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic [J]. Clin Microbiol Rev, 2010, 23: 616-687.
- [9] Mehlin C, Headley C M, Klebanoff S J. An inflammatory polypeptide complex from *Staphylococcus epidermidis*: isolation and characterization [J]. J Exp Med, 1999, 189: 907-918.
- [10] Mehlin C, Headley C M, Klebanoff S J. An inflammatory polypeptide complex from *Staphylococcus epidermidis*: isolation and characterization [J]. Exp Med, 1999, 189: 907-918.
- [11] Voyich J M, Braughton K R, Sturdevant D E, et al. Insights into mechanisms used by *Staphylococcus aureus* to avoid destruction by human neutrophils [J]. Immunol, 2005, 175: 3907-3919.
- [12] Mantovani A, Sica A, Sozzani S, et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization [J]. Trends Immunol, 2004, 25: 677-686.

(本文编辑：彭永刚)