

赖型钩端螺旋体 OmpA 外膜蛋白 Loa22 对血管内皮细胞的毒性及对通透性的影响

王一舟, 余德立, 夏志杨, 鲍 朗[△]

四川大学华西基础医学与法医学院 感染免疫实验室(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨赖型钩端螺旋体 Loa22 蛋白对血管内皮的毒性作用和功能影响。**方法** 用赖型钩端螺旋体 Loa22 成熟肽原核重组质粒进行诱导表达带有 GST 标签的 Loa22 融合蛋白,经亲和层析柱进行纯化并获取目标蛋白,用 SDS-PAGE 和 Western blot 对目标蛋白进行检测和证实。用获得的 GST-Loa22 融合蛋白刺激处理培养的人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)来说明钩端螺旋体外膜蛋白 Loa22 对血管内皮细胞的毒性作用以及对其通透性的影响。**结果** 成功表达 Loa22 成熟肽原核重组质粒,通过鉴定并纯化得到 Loa22 融合蛋白,该蛋白随着浓度的升高能使培养的血管内皮细胞 CCK-8 吸光度值降低,细胞凋亡率增加,HUVEC 单层通过率升高。**结论** Loa22 融合蛋白对血管内皮细胞有明显的毒性作用,还使得 HUVEC 通透性增加。

【关键词】 赖型钩端螺旋体 Loa22 人脐静脉血管内皮细胞 细胞毒性 凋亡

The Cytotoxic Effect and the Effect of Permeability with OmpA Like Protein Loa22 from *Leptospira interrogans* Serovar Lai on HUVEC WANG Yi-zhou, YU De-li, XIA Zhi-yang, BAO Lang[△]. Laboratory of Infection and Immunity, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China
[△] Corresponding author, E-mail: baolang@scu.edu.cn

【Abstract】 Objective To study the toxic effect and the change of permeability on human umbilical vein endothelia (HUVE) of the Loa22 protein from virulent serovar Lai, *Leptospira interrogans* by expressing its protein. **Methods** In this study, the pGEX-Loa22 peptide prokaryotic recombinant plasmid of *Leptospira interrogans* serovar Lai preserved in our laboratory was used to express Loa22 fusion protein with GST lable. Then the target fusion protein was obtained by using affinity chromatography with the GST-Trap FF Column. The purified Loa22 fusion protein was detected by SDS-PAGE and confirmed by Western blot assay using the mouse anti-GST tag monoclonal anti-body. pGEX-Loa22 protein was administered to culture with human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) to elucidate the cytotoxic role and the change of permeability of leptospiral outer membrane proteins. **Results** The recombinant plasmid with Loa22 mature peptide was expressed successfully and the protein was purified. Significant higher level of apoptosis ratio, lower CCK-8 abortion, and increasing permeability on HUVEC were observed after treated the HUVEC with the expressed fusion protein. **Conclusion** The purified Loa22 fusion protein have obvious toxic effects on vascular endothelial cells, and also it can increase permeability of HUVEC.

【Key words】 *Leptospira interrogans* Loa22 HUVEC Cytotoxic Apoptosis

钩端螺旋体病在全球广泛流行,严重影响农牧业发展和人群健康^[1]。钩端螺旋体病的致病因子目前尚未完全确定,一般认为外膜蛋白、脂多糖、溶血素等具有重要的致病作用,但其致病机制却不完全清楚^[2]。外膜蛋白在钩体附着、入侵组织、免疫致病过程中起着重要的作用,其中 Loa22 蛋白是钩体感染宿主所必须的毒力蛋白^[3],该蛋白的 C 端含有 OmpA 结构,只存在于致病性钩体中。钩端螺旋体病的临床表现多种多样,其中弥漫性出血是突出的表现,因此探讨 Loa22 蛋白对血管损伤及其机制甚

为重要^[4]。本研究对赖型钩端螺旋体 Loa22 成熟肽原核重组质粒进行诱导表达,并将成功表达获得的目的蛋白作用于人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC),研究该蛋白对 HUVEC 的毒性作用以及引起的细胞通透性增加,进而为钩体引起血管损伤的出血机制提供新的探索路径和依据。

1 材料和方法

1.1 赖型钩端螺旋体 Loa22 成熟肽原核重组质粒、细胞株及其培养条件

赖型钩端螺旋体 Loa22 成熟肽原核重组质粒由本实验室保存^[5],人脐静脉血管内皮细胞株

[△] 通讯作者, E-mail: baolang@scu.edu.cn

(HUVECs)由四川大学华西医院移植免疫实验室提供,CCK-8 试剂盒(博士德公司),凋亡检测试剂盒(凯基生物),HRP-人白蛋白(Solarbio 公司),millicell hanging cell culture(pore size 0.4 μm , diameter 6.5 mm)(Millipore 公司)。HUVEC 用含有 10% 小牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 DMEM(均购自哈里生物)培养基在 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 的恒温培养箱中进行培养。

1.2 实验分组

将传 3 代后培养稳定的 HUVEC 调整其细胞数分别接种于实验所需的 96 孔板、6 孔板以及 Hanging Millicell 的顶层小室中,并将其放入 37 $^\circ\text{C}$ 培养,待细胞贴壁后再进行实验。96 孔板中每孔接种 100 μL ,设 PBS 和 0、10、20、40、100 $\mu\text{g/mL}$ 5 个浓度的融合蛋白对每孔细胞进行刺激,PBS 和每孔浓度设 5 个复孔,以不加蛋白刺激的孔即 0 浓度孔作为空白对照组,以加入 PBS 的孔作为阴性对照组。6 孔板中每孔接种 1.5 mL,设 PBS 和 0、10、20、40、100 $\mu\text{g/mL}$ 5 个浓度的融合蛋白对每孔细胞进行刺激,PBS 和每孔浓度设 5 个复孔,以不加蛋白刺激的孔即 0 浓度孔作为空白对照组,以加入 PBS 的孔作为阴性对照组。每个 Millicell 顶层小室中接种 1 mL,设 PBS 和 0、10、20、40、100 $\mu\text{g/mL}$ 5 个浓度的融合蛋白对每孔细胞进行刺激,PBS 和每孔浓度设 5 个复孔,以不加蛋白刺激的孔即 0 浓度孔作为空白对照组,以加入 PBS 的孔作为阴性对照组。同一次实验中所接种的 HUVEC 均来自同一次传代 3 代后培养稳定的细胞。

1.3 pGEX-Loa22 重组质粒的诱导表达及纯化

挑取含重组质粒 pGEX-Loa22 单个菌落的大肠杆菌 BL21,接种于 2 mL LB 液体培养基中(含氨苄青霉素 100 $\mu\text{g/mL}$),置 7 $^\circ\text{C}$ 摇床振荡培养 12~14 h,次日取 50 μL 菌液转种于 5 mL LB 液体培养基(含氨苄青霉素 100 $\mu\text{g/mL}$)中,放入 37 $^\circ\text{C}$ 摇床中振荡培养 3 h 后,向 pGEX-Loa22 重组质粒菌液中加入异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG,终浓度为 0.1 mmol/L),37 $^\circ\text{C}$ 诱导培养 5 h 后收集菌液,用 PBS 洗涤再用 200 μL PBS 重悬,最后加入 10 mg/mL 溶菌酶 1 μL ,室温中放置 5 min,而后冰冻于 -70 $^\circ\text{C}$ 20 min,取出置于 37 $^\circ\text{C}$ 水浴 10 min,反复冻融 20 次左右,待悬液变为透明后,4 $^\circ\text{C}$ 12 000 r/min 离心 5 min,小心吸取上清,存于 4 $^\circ\text{C}$ 备用。取裂解液上清 20 μL 加入 2 $\times$ SDS 凝胶加样缓冲液 20 μL 中混匀,煮沸 5 min 准备上样。配

制分离胶和浓缩胶,将上述制备的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳检测和用带有鼠抗 GST-tag 的抗体进行 Western blot 鉴定。GST 标签蛋白的表达纯化及鉴定过程和上述类似。将得到的融合蛋白用带有 GST 标签的亲和层析蛋白柱对融合蛋白进行纯化^[6]。被纯化出来的 Loa22 融合蛋白通过了 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 检测^[7]。

1.4 Loa22 对 HUVEC 活细胞数的影响

CCK-8 试剂盒广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的快速高灵敏的检测。收集 HUVEC 细胞,将细胞数调整至 $1 \times 10^5/\text{mL}$,接种于 96 孔板中,每孔 100 μL ,放入孵箱中培养,细胞贴壁后给予不同蛋白刺激处理细胞,继续孵箱培养 8 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,孵箱继续培养 2 h。在 450 nm 波长处测定吸光度(A)值。

1.5 Loa22 对 HUVEC 细胞凋亡的影响

将 HUVEC 细胞接种至 6 孔板中(10^6 细胞/孔),孵箱培养细胞贴壁后,给予不同浓度蛋白刺激处理 HUVEC 细胞 24 h 后收集细胞。按照试剂盒说明书步骤收集各孔细胞,用冰 PBS 洗涤 2 次,再用 500 μL Binding Buffer 悬浮细胞,加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后,加入 5 μL Propidium Iodide 混匀,室温避光反应 10 min。经流式细胞仪检测细胞群体中的凋亡细胞数,计算细胞凋亡率。流式细胞分析重复做 3 次。

1.6 Loa22 对 HUVEC 细胞通透性的影响

HRP-白蛋白的分析检测是为了研究细胞通透性的变化。由于 HRP-白蛋白存在分散于细胞间的狭小空间里,并且它能穿过细胞的紧密连接部分,因此,在研究培养的 HUVEC 通透性时,HRP-白蛋白是一个特别合适的指标。Millicell 双层式单层细胞模型系统分为上下两室,中间有一层聚酯膜(膜孔径 0.4 μm ,直径 6.5 mm),将 HUVEC 以 2×10^5 细胞/ cm^2 接种在顶层小室微孔膜上,待细胞长至融合后,改用无酚红无血清 DMEM 继续培养 8 h,根据实验设计将各种浓度的 Loa22 融合蛋白和 GST 标签蛋白刺激 HUVEC,未被处理刺激的 HUVEC 单位作为空白对照组。培养 24 h 后,在各浓度实验组中加入 100 μL (1 g/L) HRP-白蛋白到双层小室的顶室,37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 1 h,随后从每个双层小室的顶室和底室分别取样品 100 μL 于 96 孔板中,并向每孔中加入 100 μL TMB 避光 10 min 后加入 2 mol/L H_2SO_4 终止反应。酶标仪在波长 450 nm 测定 A 值。用 HRP-白蛋白通透系数来代

表 HUVEC 单层的通透性,通透系数由底室和顶室样品中 HRP-白蛋白含量的比值得出。

1.7 统计学方法

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。如果方差齐,就采用单因素方差分析和 *t* 检验;如果方差不齐,就采用 *t'* 检验进行各组样本之间的两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *Loa22* 对 HUVEC 活细胞数的影响

HUVEC 细胞经过 *Loa22* 蛋白刺激处理后, *Loa22* 各剂量组 CCK-8 吸光度值均有不同程度降低。 *Loa22* 蛋白在各刺激浓度条件与空白对照组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。 *Loa22* 蛋白可抑制 HUVEC 增殖,而标签蛋白 GST 没有抑制 HUVEC 的增殖。见图 1。

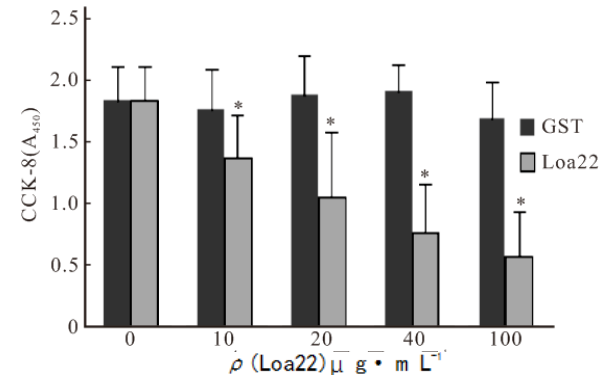


图 1 GST-*Loa22* 融合蛋白和 GST 标签蛋白对 HUVEC 细胞增殖的影响

Fig 1 The proliferation effect of *Loa22* fusion protein and GST-tagged protein on HUVEC

* $P < 0.05$, vs. untreated (blank control)

2.2 *Loa22* 对 HUVEC 细胞凋亡的影响

HUVEC 细胞经过 *Loa22* 蛋白刺激处理后细胞凋亡明显,在 *Loa22* 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时实验组与空白对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。在图 2 中显示随着蛋白刺激浓度的增加,细胞凋亡率显著增加,在同样情况下标签蛋白不能改变细胞凋亡率。

2.3 *Loa22* 融合蛋白增加 HRP 白蛋白通过 HUVEC 单层细胞的通透性

见图 3。与空白对照组相比, *Loa22* 融合蛋白显著提高 HRP-白蛋白穿透 HUVEC 单层的通过率。在同一个浓度下,当 *Loa22* 蛋白浓度 $\geq 20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时通过率显著增加,与空白对照组相比,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),但是标签蛋白并没有改变 HUVEC 单层的通透率。因此, *Loa22* 蛋白可以

增加 HUVEC 的通透性。

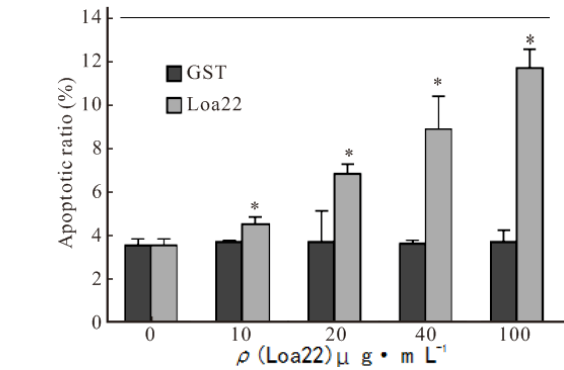


图 2 GST-*Loa22* 融合蛋白和 GST 标签蛋白引起 HUVEC 凋亡的结果

Fig 2 The induced apoptotic ratio of *Loa22* fusion protein and GST-tagged protein treated HUVEC

* $P < 0.05$, vs. untreated (blank control)

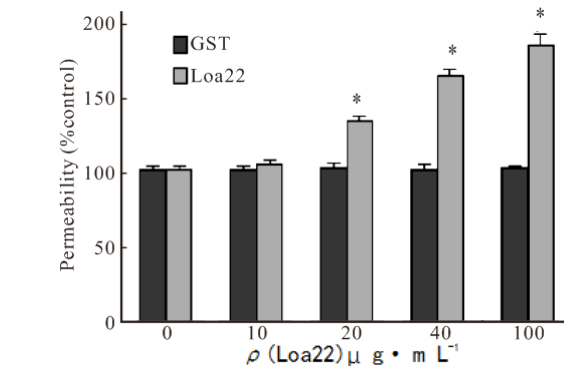


图 3 GST-*Loa22* 融合蛋白和 GST 标签蛋白对 HUVEC 单层通透性的影响

Fig 3 The permeability effect of *Loa22* fusion protein and GST-tagged protein on HUVEC

* $P < 0.05$, vs. untreated (blank control)

3 讨论

钩端螺旋体病是由致病因子引起的细胞损伤和血管损伤的病理过程,而外膜蛋白是钩体最重要的致病因子之一。外膜蛋白 *Loa22* 引起的血管损伤会直接破坏血管内皮细胞的完整性,造成血管内皮细胞通透性的增加而引起出血。通常细胞增殖、细胞凋亡以及细胞上清中乳酸脱氢酶、一氧化氮的释放等都是细胞损伤的参考指标。本研究组前期成功高浓度地表达了赖型钩端螺旋体 *Loa22* 成熟肽融合蛋白^[5],本次实验发现将该 *Loa22* 融合蛋白作用于 HUVEC 后,随着蛋白浓度的增加, CCK-8 吸光度降低, CCK-8 试剂中含有 WST-8,它可以在电子载体的作用下被细胞线粒体中的一些脱氢酶还原生成橙黄色的 Formazan。细胞增殖越多越快,颜色越深,细胞毒性越大,颜色越浅。因此,可以说明

Loa22 蛋白对 HUVEC 细胞具有直接的损伤作用,抑制了 HUVEC 细胞的增殖。同时 Loa22 的这种细胞毒性作用也可能是引起 HUVEC 通透性增加的原因之一。

本研究发现,Loa22 融合蛋白在一定条件下可以引起细胞凋亡,凋亡率也随着蛋白浓度的升高而升高,凋亡率差异有统计学意义。虽然细胞凋亡在正常血管生长和再生过程中是一个必不可少的组成部分,但是过度凋亡和异常监管都可能导致动脉粥样化形成且破坏内皮细胞的单层完整性,因此我们可以推测,Loa22 对 HUVEC 有明显的毒性作用,Loa22 可能启动了 HUVEC 的凋亡过程,并且它所引起和所促进的细胞凋亡过程也可能是内皮细胞完整性被破坏而使得通透性增加的原因之一。

本实验结果还显示 Loa22 蛋白可以使 HRP-人白蛋白 HUVEC 单层通过率升高,由于血管损伤主要表现为紧密连接的变化和通透性的变化^[8],Loa22 可能引起内皮细胞某些紧密连接开放,造成红细胞渗出,这可能与钩端螺旋体出血机制有关^[9]。进一步研究 Loa22 蛋白血管内皮细胞损伤的分子病理变化对钩端螺旋体病发病机制的阐明有着特殊的意义。

参 考 文 献

- 1 Levett PN. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev,2001;14(2):296-326.
- 2 Adler B, Lo M, Seemann T, *et al.* Pathogenesis of leptospirosis: the influence of genomics. Vet Microbiol,2011;153(1-2):73-81.
- 3 Ristow P, Bourhy P, McBride FW, *et al.* The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. PLoS Pathog,2007;3(7):e97.
- 4 鲍 朗,戴保民.钩端螺旋体病肺弥漫性出血实验模型肺微血管结构和机能变化的探讨.四川医学院学报,1985;16(4):285-288.
- 5 朱海龙,鲍 朗,张会东.构建 Loa22 基因去信号肽片段原核重组表达载体.中国组织工程研究与临床康复,2007;11(37):7358-7360.
- 6 张 英,鲍 朗,朱海龙等.赖型钩端螺旋体 Loa22 重组质粒的蛋白表达和对巨噬细胞的毒性作用.四川大学学报(医学版),2008;39(3):351-354.
- 7 朱海龙,鲍 朗,张会东等.赖型钩端螺旋体 ompA 膜蛋白 Loa22 基因的克隆分析及蛋白表达.中国人兽共患病学报,2006;22(4):294-297.
- 8 Baldwin AL, Thurston G. Mechanics of endothelial cell architecture and vascular permeability. Crit Rev Biomed Eng,2001;29(2):247-278.
- 9 Luks AM, Lakshminarayanan S, Hirschmann JV, *et al.* Leptospirosis presenting as diffuse alveolar hemorrhage: case report and literature review. Chest,2003;123(2):639-643.

(2014-09-13 收稿,2014-12-11 修回)

编辑 汤 洁

本 刊 征 稿 启 事

《四川大学学报(医学版)》(原《华西医科大学学报》)是中文核心期刊,曾荣获全国优秀科技期刊一等奖、首届国家期刊奖提名奖、第二、三届全国期刊奖百种重点期刊、四川省十佳科技期刊称号和第一、二、三、四、五届中国高校精品科技期刊奖,2014 中国国际影响力优秀学术期刊。本刊被美国《医学索引》(INDEX MEDICUS, IM/MEDLINE),《生物学文摘》(BIOLOGICAL ABSTRACTS,BA),《化学文摘》(CHEMICAL ABSTRACTS,CA),荷兰《医学文摘》(EXCERPTA MEDICA, EM),中国科技论文与引文数据库(CSTPCD),中国生物医学文献光盘数据库(CBMdisc),中文生物医学期刊文献数据库(CMCC),中国学术期刊网全文数据库(CNKI),中国学术期刊(光盘版),万方数据-数字化期刊群等数据库收录。

为了更好地开展国内外学术交流,促进医药卫生事业的发展,凡符合编辑部稿件要求(见每卷末期稿约),均可向本刊投稿。凡属于国家自然科学基金及其他部省级以上科研基金资助的来稿,编辑部将适当地给予优先。用英文撰写的稿件投稿时应附上中文稿。英文稿一经采用,刊出时间可提前。

本刊在线投稿网址: <http://scdx.cnjournals.com>

地址:四川省成都市人民南路三段 17 号四川大学学报(医学版)编辑部

邮政编码:610041

电话/传真:(028)85501320

E-mail: scuxbyxb@scu.edu.cn

四川大学学报(医学版)编辑部