

双歧杆菌的脂磷壁酸对巨噬细胞 MAPK 的影响^{*}

李迎雪, 宋 洋, 姚 君, 张 茹(广东省深圳市人民医院消化内科 518020)

【摘要】 目的 探讨双歧杆菌的脂磷壁酸(LTA)对巨噬细胞丝裂源活化蛋白激酶(MAPK)活性的影响。**方法** 选取 6~8 周龄巴比赛(BALB/c)小鼠 90 只,按随机数字表达法分为九组,每组 10 只,A 组腹腔注射磷酸缓冲盐溶液(PBS);B 组腹腔注射 LTA;C 组腹腔注射 LTA+细胞外调节蛋白激酶(ERK)抑制剂;D 组腹腔注射 LTA+c-Jun 氨基末端激酶(JNK)抑制剂;E 组腹腔注射 LTA+p38 抑制剂;F 组腹腔注射 LTA+ERK 及 JNK 抑制剂组;G 组腹腔注射 LTA+ERK 及 P38 抑制剂组;H 组腹腔注射 LTA+JNK 及 P38 抑制剂;I 组腹腔注射 LTA+3 种抑制剂。九组小鼠注射 5 d,每天注射 1 次,饲养 7 d 后,处死全部小鼠,采用免疫印迹法检测九组小鼠腹腔巨噬细胞 MAPK 家族中 ERK1/2、p38MAPK 和 JNK 蛋白的磷酸化水平。**结果** (1)B 组小鼠腹腔巨噬细胞 ERK1/2 蛋白磷酸化水平较 A 组明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);两组小鼠腹腔巨噬细胞 p38MAPK 和 JNK 平均荧光强度差异无统计学意义($P>0.05$);(2)向小鼠腹腔注射抑制剂的其他七个组别,其相应的蛋白表达水平几乎为零,且对其他蛋白表达无影响。**结论** LTA 可能是通过活化巨噬细胞 MAPK 家族中 ERK1/2 来激活巨噬细胞表达、合成和分泌细胞因子,抑制剂能够有效阻断蛋白表达通路,对其他蛋白表达无影响。

【关键词】 双歧杆菌; 脂磷壁酸; 巨噬细胞; 丝裂源活化蛋白激酶
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.13.002 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)13-1821-03

Effects of bifidobacterium lipoteichoic acid on macrophages MAPK^{*} LI Ying-xue, SONG Yang, YAO Jun, ZHANG Ru(Department of Gastroenterology, Shenzhen Municipal People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518020, China)

【Abstract】 Objective To study the influence of bifidobacterium lipoteichoic acid (LTA) on macrophage mitogen activated protein kinase (MAPK) activity of macrophages. **Methods** 90 BALB/c mice with 6—8 weeks old were selected and randomly divided into 9 groups according to the random number table, 10 mice per group. The group A was injected by phosphate buffer solution(PBS); the group B was intraperitoneally injected by LTA; the group C was intraperitoneally injected by LTA + ERK inhibition agent; the group D was intraperitoneally injected by LTA + JNK inhibitor; the group E was intraperitoneally injected by LTA + p38 inhibitors; the group F was intraperitoneally injected by LTA + ERK and JNK inhibitor; the group G was intraperitoneally injected by LTA + ERK and P38 inhibitor; the group H was intraperitoneally injected by LTA + JNK and P38 inhibitors; the group I was intraperitoneally injected by LTA + three kinds of inhibitors. 9 groups were injected for 5 d, once a day. After 7 d feeding, the mice all were sacrificed. The phosphorylation levels of ERK1/2, p38MAPK and JNK protein in the peritoneal macrophages MAPK family were detected by using immunoblotting (Western blot). **Results** (1) The ERK1/2 protein phosphorylation levels of abdominal cavity macrophage in the group B was significantly increased compared with the group A, the difference was statistically significant ($P<0.05$); the abdominal cavity macrophage p38MAPK and JNK average fluorescence intensity had no statistical difference between these two groups ($P>0.05$); (2) In the other 7 groups, the corresponding protein expression levels were almost zero, moreover had no effect on the expression of other proteins. **Conclusion** LTA is probably to activate the macrophages to express, synthesize and secrete cytokines by activating ERK1/2 in macrophages MAPK family, inhibitor can effectively block the protein expression pathway without affecting the expression of other proteins.

【Key words】 bifidobacterium; lipoteichoic acid; macrophages; mitogen activated protein kinase

双歧杆菌是黏附于人类肠道最主要的细菌,是有益菌群之一,通过维持机体肠道内菌群平衡来维护宿主的健康^[1]。随着医疗技术和微生物生态学的发展,学者们越来越重视对双歧杆菌的研究。脂磷壁酸(LTA)是双歧杆菌细胞壁的重要大分子,也是双歧杆菌发挥其抗菌、抗衰老、抗肿瘤及调节机体免疫功效的重要结构成分之一^[2]。LTA 是以 1,3 磷酸二脂键连接的而成的线性磷酸甘油多聚体,是一种无不良反应的调节

剂^[3]。巨噬细胞 MAPK 是由脯氨酸介导的丝氨酸、酪氨酸双重磷酸化作用的蛋白激酶,ERK1/2 和 p38MAPK 是 MAPK 信号传导通路中信号蛋白分子,MAPK 对巨噬细胞具有活化、刺激作用,能够有效地促进巨噬细胞的吞噬能力。研究表明,LTA 能够通过活化 NF- κ B、AP-1 和 MAPK 家族中 ERK1/2、p38MAPK 来激活巨噬细胞信息通道,促使巨噬细胞表达和分泌细胞因子,加强巨噬细胞吞噬能力,增强细胞毒作用,抑制体

^{*} 基金项目:广东省深圳市科技计划项目(201202125)。
作者简介:李迎雪,女,硕士研究生,主治医师,研究方向为胃肠病学。

内多种肿瘤的生长^[4-5]。为了解 LTA 激活巨噬细胞信息通道,分泌细胞因子的机制,笔者做了相关研究,通过观察小鼠腹腔巨噬细胞 MAPK 家族中 ERK1/2、p38MAPK 和 JNK 的含量,来研究双歧杆菌的 LTA 对巨噬细胞 MAPK 的影响机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料来源 6~8 周龄 BALB/c 小鼠 90 只,体质量 20~23 g,其中雌鼠 45 只,雄鼠 45 只(小鼠购于河南省动物实验中心)。

1.2 LTA 提取 在 LB 培养基中接种双歧杆菌,于 37 ℃ 的无氧环境中培养,48 h 后裂解,离心并收集上清液。上清液置入 50 ℃ 的水浴锅中恒温,待上清液分层后收集上层溶液,用醋酸铵缓冲液洗脱溶液。

1.3 给药方法 小鼠第 1 天,空腹注射 10% 硫乙醇酸盐肉汤 2 mL,第 2 天起,给予不同试剂。A 组注射磷酸缓冲盐溶液(PBS)0.2 mL,B 组腹腔注射 LTA;C 组腹腔注射 LTA+细胞外调节蛋白激酶(ERK)抑制剂;D 组腹腔注射 LTA+ c-Jun 氨基末端激酶(JNK)抑制剂;E 组腹腔注射 LTA+p38 抑制剂;F 组腹腔注射 LTA+ERK 及 JNK 抑制剂组;G 组腹腔注射 LTA+ERK 及 P38 抑制剂组;H 组腹腔注射 LTA+JNK 及 P38 抑制剂;I 组腹腔注射 LTA+3 种抑制剂。1 次/天,连用 5 d(LTA 剂量均为 10 μg,3 种抑制剂剂量均为 0.2 mL,均购于美国 Selleck 公司)。

1.4 巨噬细胞收集及培养 7 d 后,处死小鼠,Hank's 液灌洗腹腔,收集灌洗液。将细胞数调至 10⁶/mL,取 100 μL 细胞悬液置于培养板中,37 ℃ 下 5% CO₂ 孵箱中培养 2 h,加入 100 μL 的 10% 小牛血清的 RPMI1640 营养液和终极浓度为 10 ng/mL 脂多糖(LPS),培养 24 h 后,置于-30 ℃ 环境中保存。

1.5 免疫印迹法检测九组小鼠 p-ERK1/2、p-p38 和 p-JNK 的蛋白表达 离心收集细胞,PBS 洗涤 3 次,加入裂解液,于 4 ℃ 水中冰浴 30 min,1 200 r/min 离心 10 min,吸取上清液。BCA 法进行蛋白定量,后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)凝胶电泳分离,并将蛋白质转移到 PVDF 膜上,成像后分析结果。

1.6 统计学处理 采用统计学软件 SPSS17.0 进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 A、B 两组小鼠腹腔内巨噬细胞 MAPK 家族中 ERK1/2、p38 和 JNK 的蛋白表达水平比较 经 LTA 刺激后的 B 组小鼠腹腔巨噬细胞 ERK1/2 蛋白表达水平较 A 组明显升高,差异有统计学意义(*P*<0.05);两组小鼠腹腔巨噬细胞 p38MAPK 和 JNK 蛋白表达水平差异无统计学意义(*P*>0.05),见表 1。

表 1 两组小鼠巨噬细胞 ERK1/2、p38 和 JNK 蛋白表达水平比较情况($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	ERK1/2	JNK	P38
B 组	10	1.38±0.28*	0.72±0.15	0.64±0.12
A 组	10	1.17±0.21	0.75±0.13	0.68±0.16

注:与 A 组比较,* *P*<0.05。

2.2 B、C、D、E 四组小鼠腹腔内巨噬细胞 MAPK 家族中 ERK1/2、p38 和 JNK 的蛋白表达水平比较 与 B 组比较,加

入 ERK 抑制剂的 C 组小鼠,ERK1/2 蛋白磷酸化水平几乎为零;加入 JNK 抑制剂的 D 组小鼠,JNK 蛋白磷酸化水平几乎为零;加入 p38 抑制剂的 E 组小鼠,p38 蛋白磷酸化水平几乎为零。见表 2。

表 2 B、C、D、E 组小鼠 ERK1/2、p38 和 JNK 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	ERK1/2	JNK	P38
B 组	10	1.38±0.28	0.72±0.15	0.64±0.12
C 组	10	0.09±0.05	0.69±0.13	0.61±0.16
D 组	10	1.32±0.28	0.07±0.02	0.63±0.11
E 组	10	1.32±0.28	0.76±0.13	0.04±0.01

2.3 F、G、H、I 四组小鼠 ERK1/2、p38 和 JNK 蛋白磷酸化水平表达比较 F 组加入 ERK 和 JNK 抑制剂,其 ERK1/2 和 JNK 蛋白几乎为零表达;G 组和 H 组如同 F 组,加入抑制剂所对应的蛋白磷酸化表达几乎为零;I 组加入 3 种抑制剂,则 ERK1/2、JNK 和 p38 蛋白几乎为零表达。见表 3。

表 3 F、G、H、I 组小鼠 ERK1/2、p38 和 JNK 蛋白表达水平比较情况($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	ERK1/2	JNK	P38
F 组	10	0.07±0.03	0.06±0.03	0.64±0.12
G 组	10	0.09±0.05	0.62±0.13	0.05±0.02
H 组	10	1.32±0.28	0.05±0.02	0.06±0.03
I 组	10	0.06±0.02	0.05±0.03	0.04±0.02

3 讨 论

双歧杆菌是动物和人类肠道中重要的生理性有益菌群,维护肠道菌群平衡及机体健康^[6-8]。LTA 是革兰阳性菌细胞壁内的重要大分子结构,其亲水端参与细菌黏附定值作用,疏水端能够与细胞膜紧密相连,LTA 参与体内免疫调节,抑制肿瘤生长,激活局势细胞吞噬能力,是无不良反应的生物调节剂^[9]。目前研究证实,双歧杆菌的 LTA 通过激活巨噬细胞多种信息通道,活化巨噬细胞,增强巨噬细胞吞噬能力,降低消化道疾病发生,也为预防和治疗胃肠道疾病提供重要依据,但对 LTA 促使巨噬细胞表达的机制目前尚未清楚^[10]。

ERK 通路、p38MAPK 通路、JNK/SAPK 通路及 BMK 通路这 4 条通路可以介导多种细胞信号,演变为细胞信号转导的汇聚通路^[11-12]。MAPK 能够启动细胞内信号传递系统,介导 p38MAPK 激活,活化哺乳动物转录因子家族(NF-κB)和铁氧还蛋白转录类似因子 1(AP-1),促使巨噬细胞的表达、合成和分泌白细胞介素 1(IL-1)、白细胞介素 6(IL-6)及肿瘤坏死因子-α^[13]。相关研究表明,诸多因子如集落刺激因子-1、前列腺素 E2 以及酵母多糖能够活化巨噬细胞,其主要途径是提高 ERK1/2、p38MAPK 和 AP-1 的活性^[14-15]。本研究结果显示,经双歧杆菌的 LTA 刺激后的小鼠腹腔巨噬细胞 MAPK 中 ERK1/2 蛋白磷酸化水平明显要高于注射 PBS 组,而 A 组和 B 组小鼠腹腔巨噬细胞 MAPK 家族中 p38MAPK 和 JNK 水平无明显差异,加入抑制剂的其他七组,其相应的蛋白磷酸化表达均几乎为零,这表明双歧杆菌的 LTA 通过活化 MAPK 家族中 ERK1/2 激活小鼠巨噬细胞表达、合成和分泌细胞因子,以增强巨噬细胞的吞噬能力;抑制剂能够有效阻断 ERK1/2、

JNK 和 p38 通路,且抑制剂不能影响其他蛋白水平表达。但 LTA 对巨噬细胞 MAPK 家族中 JNK 和 p38MAPK 水平影响不大。

综上所述,双歧杆菌的 LTA 能够通过活化巨噬细胞 MAPK 家族中 ERK1/2 水平,促进巨噬细胞表达、合成和分泌 IL-1、IL-6 及肿瘤坏死因子- α ,增强其杀伤活性和细胞毒作用,为临床预防和治疗消化道疾病提供重要参考依据。

参考文献

[1] 杨林,王立生,崔忠林,等.双歧杆菌对腹腔巨噬细胞 ERK1/2 蛋白激酶通道的影响[J].中国微生态学杂志,2005,17(2):85-86.

[2] 王玉林,王立生,朱惠明,等.双歧杆菌 DNA 对巨噬细胞 MAPK 的影响[J].中国微生态学杂志,2005,17(4):256-257.

[3] 李多云,刘晓军,程航,等.双歧杆菌肠道内调控表达肠道病毒 71 型 VP1 蛋白的实验研究[J].中国病原生物学杂志,2014,9(5):422-426.

[4] 李雪,王义乾,罗海华,等. NF- κ B 信号通路对 BLP 耐受巨噬细胞 iNOS 表达的影响[J].中国临床解剖学杂志,2014,3(3):300-305.

[5] 黄国珍,陈伟布,李丽梅,等.双歧杆菌的脂磷壁酸激活巨噬细胞产生 TNF- α 的信号通路[J].中国当代医药,2013,20(21):102-103.

[6] 杨丽,刘志强,Chen X,等.婴儿双歧杆菌对花生过敏小鼠模型肠道 Th2 反应的调节[J].中国微生态学杂志,2012,24(8):677-681.

[7] 钟世顺,李淑梅,张振书.双歧杆菌分泌型黏附素对肠上

皮细胞形态学的影响[J].世界华人消化杂志,2011,15(8):836-840.

[8] 崔树娜,URSULA B.金雀异黄素对脂多糖诱导的巨噬细胞 MAPK 和 TLR 信号转导通路的影响[J].细胞与分子免疫学杂志,2014,30(3):233-236.

[9] 李迎雪,王立生,苟安营,等.双歧杆菌的完整肽聚糖对小鼠腹腔巨噬细胞缝隙链接的影响[J].中国微生态学杂志,2008,20(3):195-196.

[10] 李玉涛,侯任穷,张宇,等.纳米氧化铁双歧杆菌 LTA 对实验性胃癌抑制效果的影响[J].中国微生态学杂志,2008,20(4):329-331.

[11] 李芙蓉,王跃,刘明方,等.双歧杆菌脂磷壁酸对 B16 荷瘤小鼠 NK 细胞受体 NKG2D 及其配体的影响[J].中国微生态学杂志,2009,21(1):16-19.

[12] 丁培杰.双歧杆菌脂磷壁酸对小鼠腹腔巨噬细胞体外吞噬和 NO 释放的影响[J].华中科技大学学报:医学版,2009,38(6):812-814.

[13] 谢宁,郭斌,王跃,等.双歧杆菌脂磷壁酸与 5-氟尿嘧啶体内联用对肿瘤细胞凋亡的影响[J].中国微生态学杂志,2009,21(12):1090-1094.

[14] 李迎雪,杨林,王立生,等.双歧杆菌的完整肽聚糖对巨噬细胞 AP-1 的影响[J].中国微生态学杂志,2007,19(2):129-131.

[15] 冯聚玲,杨林,姚君,等.双歧杆菌的完整肽聚糖对大鼠腹腔巨噬细胞 TNF- α 表达的影响[J].中国微生态学杂志,2010,22(7):577-579.

(收稿日期:2015-01-20 修回日期:2015-03-10)

(上接第 1820 页)

高。目前,我国结肠造口患者适应水平处于中低下水平,因此,了解和提高患者术后的适应性是护理工作的重点之一。本研究中,患者的适应水平总分处于中等水平,除接受维度外,持续担忧和积极生活态度维度得分均不理想。应采取有效措施改善患者心理状态,帮助患者树立信心,重新适应造口带来的新生活,从而有效提高患者生活质量。

参考文献

[1] 胡爱玲,张美芬,张俊娥,等.结肠造口患者适应状况及相关因素的研究[J].中华护理杂志,2010,45(2):109-111.

[2] 吴在德,吴肇汉.外科学[M].北京:人民卫生出版社,2006:515.

[3] Andrews H,Roy C. The Roy adaptation model:the definitive statement[M]. Norwalk: Appleton& Lange,1991:22-59.

[4] Simmons KL,Smith JA,Maekawa A. Development and psychometric evaluation of the Ostomy Adjustment Inventory-23[J].J Wound Ostomy Continence Nurs,2009,36(1):69-76.

[5] 皋文君,袁长蓉.造口患者适应量表的信效度测评[J].中华护理杂志,2011,8(8):811-813.

[6] Krouse R,Grant M,Ferrell B,et al. Quality of Life outcomes in 599 cancer and non-cancer patients with colostomies[J].J Surg Res,2007,138(1):79-87.

[7] 朱珍玲.永久性结肠造口患者自我护理能力与生活质量的的相关性研究[J].护理学报,2011,18(8):17-20.

[8] 陈如男,姚静静,刘砚燕,等.肠造口患者生活质量影响因素的研究进展[J].解放军护理杂志,2012,29(15):34-37.

[9] Lam WW,Fielding R. The evolving experience of illness for Chinese women with breast cancer:a qualitative study [J]. Psycho-Oncology,2003,12(2):127-140.

[10] Parlani G,De RP,Norgiolini L,et al. Timing of complications during carotid artery stenting. How can they be predicted[J]. Acta Chir Belg,2006,106(4):367-371.

[11] 吕娟,宁宁,廖灯彬,等.肠造口患者生活质量及其影响因素的研究进展[J].华西医学,2011,26(10):1593-1596.

[12] 陈如男,沈园园,郁晓路,等.肠造口术后不同时间患者生活质量与社会支持的相关性[J].解放军护理杂志,2013,30(6):10-13.

[13] 刘砚燕,袁长蓉.肠造口患者术后适应水平影响因素的研究进展[J].中华护理杂志,2012,47(4):379-382.

(收稿日期:2015-01-25 修回日期:2015-03-10)