

# 牛杀菌/通透性增加蛋白对脂多糖介导的炎性细胞因子表达的影响

姚楠<sup>1,2,4\*</sup>, 白杰<sup>1,3\*</sup>, 张雪梅<sup>1</sup>, 张宁<sup>1</sup>, 吴卫东<sup>2</sup>, 李文蓉<sup>1</sup>

- 1 农业部草食家畜遗传育种与繁殖重点实验室 新疆维吾尔自治区动物生物技术重点开放实验室 新疆维吾尔自治区畜牧科学院生物技术研究中心, 新疆 乌鲁木齐 830000
- 2 新疆维吾尔自治区人民医院临床医学研究中心, 新疆 乌鲁木齐 830000
- 3 河南省农业科学院畜牧兽医研究所, 河南 郑州 450002
- 4 新疆维吾尔自治区克拉玛依市人民医院, 新疆 克拉玛依 834000

姚楠, 白杰, 张雪梅, 等. 牛杀菌/通透性增加蛋白对脂多糖介导的炎性细胞因子表达的影响. 生物工程学报, 2015, 31(2): 195-205.

Yao N, Bai J, Zhang XM, et al. Effects on the expression of lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokines mediated by bovine bactericidal/permeability-increasing protein. Chin J Biotech, 2015, 31(2): 195-205.

**摘要:** 杀菌/通透性增加蛋白 (Bactericidal/permeability-increasing protein, BPI) 能结合并特异地中和来自革兰氏阴性菌外膜的脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS)。为了研究牛源 BPI 蛋白及其 N 端结构域在 LPS 介导的免疫应答中的作用, 本文将 BPI 全长 1 449 bp 编码区序列 (BPI) 和其 N 端 714 bp 的编码区序列 (BPI714) 分别导入 mHEK293 细胞, 分析了稳定表达的 BPI 或 BPI714 对 LPS 介导的炎性细胞因子表达的影响。首先将构建的 pLEX-BPI/pLEX-BPI714 载体分别转染 mHEK293 细胞, 获得稳定表达牛源 BPI 或 BPI714 的 mHEK293 细胞; 然后用 LPS 刺激上述细胞, 分别收集刺激前、刺激后 1 h、3 h、6 h、12 h、24 h、36 h 和 48 h 的细胞, 并同时收集未表达 BPI 或 BPI714 的 mHEK293 细胞在各时间点的样品作为对照; 采用定量 RT-PCR 检测上述细胞中炎性细胞因子 *IL-8*、*IL-1 $\beta$* 、*TNF- $\alpha$* 、*NF- $\kappa$ B-1*、*NF- $\kappa$ B-2* 的相对表达水平, 比较 LPS 刺激前后表达 BPI/BPI714 和对照细胞中上述基因转录水平的变化规律。研究表明, LPS 刺激后, 对照细胞中 *IL-8*、*IL-1 $\beta$* 、*TNF- $\alpha$* 、*NF- $\kappa$ B-2* 表达水平在不同时间点均显著提高 ( $P < 0.05$ ), 并呈现规律性变化; 而稳定表达 BPI/BPI714 的细胞在同样刺激条件下, *IL-8*、*IL-1 $\beta$* 、*TNF- $\alpha$* 、*NF- $\kappa$ B-2* 基因的转录水平均未发生显著变化 ( $P > 0.05$ )。根据我们的实验结果, 在 mHEK293 细胞模型中 BPI 或 BPI714 均能显著降低 LPS 介导的炎性细胞因子表达, 抑制 LPS 介导的免疫应答。这不仅为进一步研究 BPI 抑菌机制和利用其抑菌功能提供了可靠的实验依据, 也为分析抗菌蛋白的抗菌

Received: April 4, 2014; Accepted: October 20, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30860183).

Corresponding author: Wenrong Li. Tel: +86-991-4832343; Fax: +86-991-4833671; E-mail: xjlwr@126.com

\*These authors contributed equally to this study.

国家自然科学基金 (No. 30860183) 资助。

网络出版时间: 2014-11-18

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.140207.html>

效果提供了一种可靠的实验方法。

**关键词:** 杀菌/通透性增加蛋白, 脂多糖, 免疫应答, 炎症细胞因子

## Effects on the expression of lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokines mediated by bovine bactericidal/permeability-increasing protein

Nan Yao<sup>1,2,4\*</sup>, Jie Bai<sup>1,3\*</sup>, Xuemei Zhang<sup>1</sup>, Ning Zhang<sup>1</sup>, Weidong Wu<sup>2</sup>, and Wenrong Li<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Genetics, Breeding and Reproduction of Grass Feeding Livestock, Ministry of Agriculture, the Key Laboratory of Animal Biotechnological of Xinjiang, Biotechnological Center, Xinjiang Academy of Animal Science, Urumqi 830000, Xinjiang, China

<sup>2</sup> Clinical Research Center, Xinjiang People's Hospital, Urumqi 830000, Xinjiang, China

<sup>3</sup> Institute of Animal Science of Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, Henan, China

<sup>4</sup> Karamay City People's Hospital, Karamay 834000, Xinjiang, China

**Abstract:** Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) can bind to and specifically neutralize lipopolysaccharide (LPS) from the outer membrane of Gram-negative bacteria. In order to evaluate potent LPS-neutralizing activity of bovine BPI, the full-length coding sequence (1 449bp) or 714 bp N-terminal coding sequence (*BPI714*) of bovine BPI was transfected into mHEK293 cells and the expression of LPS-induced inflammatory cytokines was studied. First, we constructed the lentiviral expression vectors and generated mHEK293 cells stably expressing recombinant bovine BPI or BPI714. Then, we detected the expression of *IL-8*, *IL-1 $\beta$* , *TNF- $\alpha$* , *NF- $\kappa$ B-1* and *NF- $\kappa$ B-2* genes by real-time PCR at 0, 1, 3, 6, 12, 24, 36 and 48 h post of LPS induction in cells with or without recombinant bovine BPI or BPI714 ectopic expression, respectively. In response to LPS, the robust abundance of inflammatory cytokines including *IL-8*, *IL-1 $\beta$* , *TNF- $\alpha$*  and *NF- $\kappa$ B-2* was observed in wild type mHEK293 cells at eachtime point. On the contrary, mRNA abundance of *IL-8*, *TNF- $\alpha$*  and *NF- $\kappa$ B-2* in transfected mHEK293 cells showed no significant changes at each indicated time point. Our results demonstrated that recombinant bovine full length BPI or BPI714 down-regulated the expression of inflammatory cytokines and revealed that either of bovine BPI or BPI714 was able to inhibit the immune respond stimulated by LPS. This study provides evidence for further investigating the mechanisms and application of BPI/LPS-neutralizing activity and also documents a reliable approach for analysis of the efficacy of antibacterial proteins.

**Keywords:** bactericidal/permeability-increasing protein, lipopolysaccharide, immune respond, inflammatory cytokines

在人和动物生活的环境中存在着大量的革兰氏阴性菌, 脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 是革兰氏阴性菌菌膜的组成部分。在革兰氏阴性菌侵入动物机体后, LPS 被机体的天然免疫系统 TLR 识别, 当机体检测到 LPS 的入侵信号后, 在转录因子家族 (Nuclear factor- $\kappa$ -gene binding, *NF- $\kappa$ B*) 的调控下, 白介素 8 (Interleukin-

8, *IL-8*)、白介素 1 $\beta$  (Interleukin-1 $\beta$ , *IL-1 $\beta$* ) 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$ , *TNF- $\alpha$* ) 等促炎症因子的表达水平都急剧增加, 产生清除病原菌的免疫反应<sup>[1-2]</sup>。杀菌/通透性增加蛋白 (Bactericidal/permeability-increasing protein, *BPI*) 是机体在免疫反应中释放的免疫分子, 它与 LPS 有很高的亲和能力, 可以特异地中和 LPS,

对革兰氏阴性菌有强烈的细胞毒性效应<sup>[3-4]</sup>。

*BPI* 基因最初是在人中性粒细胞中发现<sup>[5]</sup>, 嗜酸性粒细胞也有低水平的表达<sup>[6]</sup>。随着研究的深入, 在人胃肠道上皮细胞<sup>[7]</sup>、皮肤成纤维细胞<sup>[8]</sup>、泪腺管上皮细胞<sup>[9]</sup>、生殖道上皮细胞<sup>[10]</sup>中都检测到 *BPI* 的转录和表达。牛源 *BPI* 蛋白研究相对较少, 目前主要集中在基因多态性对基因功能的影响及 *BPI* 体外表达后抑菌功能的研究, 对牛 *BPI* 抑菌机制的研究还未见报道。

本实验将牛源的 *BPI* 基因转入到 mHEK293 (该细胞系由白杰等<sup>[11]</sup>参考 Sauter 等<sup>[12]</sup>的方法, 将牛源的 *CD14-MD2-TLR4* 基因转染到 HEK293 细胞后, 该细胞系具有了免疫应答能力, 是研究牛天然免疫反应的细胞模型) 细胞中进行表达, 期望了解 LPS 介导的炎症反应发生时, *BPI* 基因稳定表达对炎性细胞因子转录表达的影响。此外, 研究显示人源 *BPI* 与 LPS 结合的核心区域位于 *BPI* 蛋白 N 端。因此, 本研究克隆获得了牛源 *BPI* 基因 CDS 全长及 *BPI* N 端的编码序列, 开展了二者对 LPS 介导的炎症反应影响的研究。本研究有助于了解牛源 *BPI* 的抗菌机理, 为进一步利用其抗菌活性, 降低奶牛乳腺炎的发病率, 提高牛奶食用的安全性提供理论和实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 载体、菌种及细胞

DH5 $\alpha$  感受态细胞购自北京天根公司; pMD20-T 载体购自 TaKaRa 公司; pLEX-MCS 慢病毒表达载体及其包装质粒 pMD2G、pSPAX 购自 Openbiosystem 公司; 用于生产重组慢病毒的 293T 包装细胞购自 ATCC 公司。包含牛源

*CD14-MD2-TLR4* 基因的 mHEK293 细胞系由新疆畜牧科学院动物生物技术中心提供。

#### 1.1.2 酶及主要试剂

限制性内切酶 *Bam*H I、*Mlu* I 购自 Fermentas 公司; T4 DNA 连接酶、PrimeSTAR<sup>®</sup> HS DNA Polymerase 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; Trizol 试剂和 Lipofectamine<sup>™</sup> 2000 试剂购自 Invitrogen 公司; DMEM 培养基和胎牛血清购自 GIBCO 公司; HA 抗体购自北京天根公司; 荧光二抗购自 LI-COR 公司; QuantiTect SYBR Green I 试剂购自 QIAGEN 公司。其他试剂为国产分析纯。

### 1.2 牛 *BPI/BPI714* 基因表达载体的构建

根据 *BPI* 基因的 mRNA 序列 (NM\_173895.2), 设计用于扩增牛 *BPI* 基因 N 端序列 (大小为 714 bp) 的一对 PCR 引物, 上、下游引物分别引入 *Bam*H I 和 *Mlu* I 酶切位点, 下划线部分为 HA 标签序列。同时设计另一对引物用以扩增 *BPI* 全长 CDS 序列 (大小为 1 449 bp), 引物也分别引入 *Bam*H I 和 *Mlu* I 酶切位点, 下划线部分为 HA 标签序列 (序列详见表 1)。用荷兰牛血样 2.5 mL 提取总 RNA, 取 1  $\mu$ g RNA 反转录成 cDNA。目的片段的 PCR 扩增体系为: cDNA 2  $\mu$ L, 10 $\times$ 缓冲液 2  $\mu$ L, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.5  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTPs 2  $\mu$ L, 前述上下游引物各 10 pmol/L, 1.25 U PrimeSTAR<sup>®</sup> HS DNA 聚合酶, 超纯水补足到 20  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 65  $^{\circ}$ C (降低 2  $^{\circ}$ C/2 循环) 退火 40 s 以及 72  $^{\circ}$ C 延伸 100 s, 共 16 个循环; 然后 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 51  $^{\circ}$ C 退火 40 s 以及 72  $^{\circ}$ C 延伸 100 s 共 19 个循环; 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 琼脂糖凝胶电泳检测。目的片段和

pLEX-MCS 载体分别用 *Bam*H I 和 *Mlu* I 双酶切, 回收酶切产物进行克隆, 经酶切和测序鉴定正确的重组质粒分别命名为 pLEX-BPI 和 pLEX-BPI714。

### 1.3 稳定表达牛 BPI 和 BPI N 端的 mHEK293 细胞的获得

#### 1.3.1 BPI、BPI714 重组慢病毒的制备

采用磷酸钙方法分别将 pLEX-BPI/pLEX-BPI714 质粒、包装质粒和包膜质粒共转染到 293T 细胞中, 分别获得携带 *BPI* 和 *BPI714* 基因的重组病毒。步骤如下: 293T 细胞于 10 cm 培养皿培养, 细胞汇合度达到 70%–80% 时进行转染。转染试剂包括 pLEX-BPI/pLEX-BPI714 质粒 20  $\mu$ g, 包装质粒 pSPAX 15  $\mu$ g, pMD2G 6  $\mu$ g, 去离子水补足 500  $\mu$ L, 加入  $2 \times$  HBS (0.273 mol/L NaCl, 10  $\mu$ mol/L KCl, 1.4  $\mu$ mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 42  $\mu$ mol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸及 10  $\mu$ mol/L 葡萄糖, pH 7.05) 500  $\mu$ L, 2.5 mol/L  $\text{CaCl}_2$  溶液 50  $\mu$ L。室温孵育 20 min 后, 将混合液均匀滴加至生长 293T 细胞培养基中。12–14 h 后更换新鲜培养基, 48 h 后收获含病毒颗粒的细胞培养液, 分装保存于  $-70^\circ\text{C}$  备用。

#### 1.3.2 稳定表达 BPI/BPI714 mHEK293 细胞的构建及鉴定

将 pLEX-BPI/pLEX-BPI714 重组慢病毒感染 mHEK293 细胞。步骤如下, 在 6 孔板每孔各铺  $3 \times 10^5$  个 mHEK293 细胞。当细胞汇合度达到 70% 时, 将 pLEX-BPI/pLEX-BPI714 重组慢病毒 0.5 mL 和 DMEM 培养液 0.5 mL 混合, 同时加入聚凝胺 (Polybrene) 10  $\mu$ g, 16 h 换液后继续培养 48 h, 在培养基中添加 600 ng/mL 的嘌呤霉素进行筛选, 获得表达牛源 *BPI/BPI714* 基因的细

胞系 mHEK293-BPI 和 mHEK293-BPI714。

BPI/BPI714 基因在 mHEK293 中的表达鉴定。分别收集 mHEK293-BPI 和 mHEK293-BPI714 细胞, 裂解后取 40  $\mu$ g 总蛋白按文献[13]进行 Western blotting 分析, 其中一抗为 1:5 000 小鼠抗 HA 抗体。

#### 1.4 稳定表达 BPI 基因对 LPS 介导的炎性细胞因子表达的影响

6 孔板中分别培养  $3 \times 10^5$  个/孔稳定表达 BPI/BPI714 和未表达 BPI/BPI714 的 mHEK293 细胞, 当细胞汇合度达到 70% 时, 添加 LPS (终浓度 100 ng/mL), 分别收集实验组和对照组 0、1、3、6、12、24、36 和 48 h 共 8 个时间点的细胞。为保证实验结果准确, 每个时间点均设平行样品。通过定量 RT-PCR 检测上述细胞中相关炎性细胞因子相对表达量的变化。

#### 1.5 实时定量 RT-PCR 检测细胞炎性细胞因子的转录水平

##### 1.5.1 标准曲线的制备

使用标准曲线相对定量法对基因 mRNA 水平进行定量 RT-PCR 分析。首先分别制备目的基因的标准品。针对人 *IL-8*、*IL-1 $\beta$* 、*TNF- $\alpha$* 、*NF- $\kappa$ B-1*、*NF- $\kappa$ B-2* 和 *GAPDH* 基因, 设计相应的跨内含子引物 (表 1)。将 PCR 获得的目的片段克隆至 pMD-20-T 载体, 使用 *Eco*R I 内切酶获得线性化质粒。经 DNA 纯化试剂盒 (QIAGEN) 纯化线性化质粒 DNA, 梯度稀释至 1 ng/ $\mu$ L、100 pg/ $\mu$ L、10 pg/ $\mu$ L、1 pg/ $\mu$ L、100 fg/ $\mu$ L、10 fg/ $\mu$ L、1 fg/ $\mu$ L 共 7 个浓度作为标准品。使用 QuantiTect SYBR Green I 试剂进行定量 RT-PCR, 生成标准曲线。

表 1 基因克隆及定量 RT-PCR 检测的引物序列

Table 1 Amplification primers for real-time RT-PCR and gene cloning

Primer name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Size (bp)
BPI	CTGGGATCCGAAGACATGGCCAG AGGCCCTGAC	<u>CTTACGCGTTCAAGCGTAGTCTGGGA</u> <u>CGTCGTATGGGTAGCTGTAGTGGACA</u> TCTGCACCG	1 449
BPI714	CTGGGATCCGAAGACATGGCCAG AGGCCCTGAC	<u>CTTACGCGTTCAAGCGTAGTCTGGGA</u> <u>CGTCATATGGGTAGGTGCCACCAGT</u> GAGTAATCG	714
IL-8	ACTGGGTGCAGAGGGTTGTG	AACCAGGAATCTTGTATTGCATC	187
IL-1 $\beta$	CGAATCTCCGACCACCACTACAG	TCCCATGTGTGCGAAGAAGATAGG	156
TNF- $\alpha$	CCTCTTCTCCTTCTGATCGTGG	ACATGGGCTACAGGCTTGTCACT	174
NF- $\kappa$ B-1	ATGAAAGACGAGGAGTACGAGC	CTTTTCTTCATGGATGATGGC	153
NF- $\kappa$ B-2	ACATGGAGAGTTGCTACAACCC	GCCTTCACAGCCATATCGAAAT	179
GAPDH	CACGGCATCGTCACCAACTG	CAGGGGTGTTGAAGGTCTCGAAC	183

The underlined sequences are the HA peptide tag sequences.

### 1.5.2 样本的制备及实时定量 PCR 检测

用 Trizol 提取实验组和对照组的不同时间点细胞样品总 RNA, 取 1  $\mu$ g 总 RNA 反转录成 cDNA, 取 2  $\mu$ L cDNA 进行定量 RT-PCR, 选择 GAPDH 作为内参基因。反应程序均为: 95  $^{\circ}$ C 15 min, 55 个循环: 95  $^{\circ}$ C 30 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s。溶解曲线: 99  $^{\circ}$ C 10 s, 40  $^{\circ}$ C 15 s, 99  $^{\circ}$ C 0.1  $^{\circ}$ C/s, 降温至 40  $^{\circ}$ C 30 s。反应体系: 2 $\times$ Master mix 10  $\mu$ L; 上下游引物 (10 pmol/L) 1  $\mu$ L; cDNA 2  $\mu$ L; 无 RNA 酶超纯水 7  $\mu$ L。每个样本重复 3 次。

### 1.5.3 统计分析

使用 SPSS13.0 软件进行数据的方差分析。当结果显示表达差异显著时 ( $P < 0.05$ ), 在图上用不同字母 a、b、c 表示; 当结果显示表达差异不显著时 ( $P > 0.05$ ), 在图上用相同字母表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 BPI/BPI714 慢病毒表达载体的构建

以荷斯坦牛血样总 RNA 的反转录产物 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 分别获得 1 449 bp

和 714 bp 的 BPI CDS 全长和 N 端目的片段。随即分别将目的片段克隆到 pLEX-MCS 表达载体, 经双酶切鉴定后, 对重组质粒测序。测序结果显示, 获得的目的片段序列正确, 且基因序列准确插入载体的预定位置。

### 2.2 获得稳定表达 BPI 的 mHEK293 细胞系

将携带牛源 BPI/BPI714 的重组病毒感染 mHEK293 细胞, 获得稳定表达 BPI/BPI714 的 mHEK293 细胞, Western blotting 检测 BPI/BPI714 在细胞中的表达情况。结果显示, 在 55 kDa 和 25 kDa 标准分子量附近有特异的目的蛋白, 说明 BPI/BPI714 在 mHEK293 细胞中表达 (图 1)。

### 2.3 稳定表达的 BPI/BPI714 对 LPS 诱导的炎性细胞因子表达的影响

为了研究重组 BPI/BPI714 蛋白对 LPS 介导的炎性细胞因子的影响, 以稳定表达 BPI/BPI714 mHEK293 细胞为细胞模型, 用 LPS 分别刺激 BPI/BPI714 mHEK293 的实验组细胞和不表达 BPI/BPI714 的 mHEK293 对照组细胞,

分析不同细胞经 LPS 诱导后炎症因子表达的变化。分别收集 LPS 刺激前、刺激后不同时间点的实验组和对照组细胞，制备细胞总 RNA 进行反转录，获得相应 cDNA。通过实时定量 RT-PCR 检测实验组和对照组各个时间点细胞的炎症因子 *IL-8*、*IL-1 $\beta$*  和 *TNF- $\alpha$*  以及转录因子 *NF- $\kappa$ B-1* 和 *NF- $\kappa$ B-2* 共 5 个基因转录水平的相对表达量。

### 2.3.1 稳定表达的 BPI/BPI714 对 LPS 诱导的 *IL-1 $\beta$* 基因表达水平的影响

对于没有表达 BPI 或 BPI714mHEK293 细胞，LPS 刺激 6 h 后，*IL-1 $\beta$*  基因的相对转录水平升高 ( $P < 0.05$ )，随后下降至与对照差异不显著，之后的时间点其表达量虽有小幅波动，但均与刺激前差异不显著。相比，无论表达 BPI 或 BPI714，LPS 刺激 1 h 后表达 BPI/BPI714 的细胞中 *IL-1 $\beta$*  基因的相对转录水平均显著升高 ( $P > 0.05$ )，随后下降，之后各时间点 *IL-1 $\beta$*  基因表达量和刺激前相比，差异均不显著 ( $P > 0.05$ ) (图 2)。

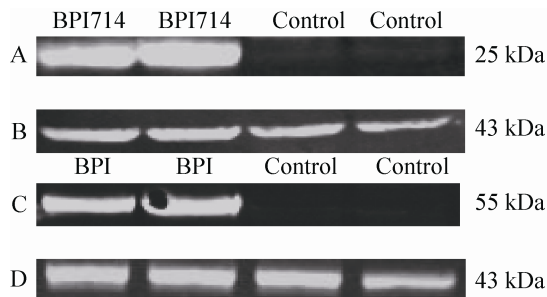


图 1 Western blotting 检测重组蛋白 BPI /BPI714 的表达

Fig. 1 Western blotting analysis of recombinant BPI /BPI714 expression. (A) Western blotting analysis of BPI N-terminal domain. (B) Western blotting analysis of  $\beta$ -actin, the samples were the same as A. (C) Western blotting analysis of full-length BPI. (D) Western blotting analysis of  $\beta$ -actin, the samples were the same as C.

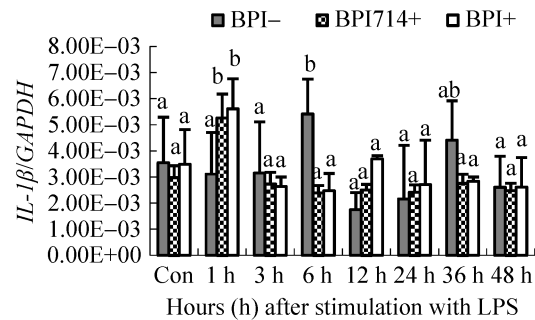


图 2 LPS 刺激前后稳定表达 BPI/BPI714 和未表达 BPI/BPI714 的 mHEK293 细胞中 *IL-1 $\beta$*  基因的相对表达水平

Fig. 2 *IL-1 $\beta$*  gene responses to LPS (100 ng/mL) stimulation in mHEK293 cells transfected with BPI/BPI714 and non-transfected mHEK293 cells. Con: control.

### 2.3.2 稳定表达的 BPI/BPI714 对 LPS 诱导的 *TNF- $\alpha$* 基因表达水平的影响

LPS 刺激 1 h 后，没有表达 BPI 或 BPI714 的 mHEK293 细胞中 *TNF- $\alpha$*  基因的相对转录水平迅速升高 ( $P < 0.05$ )，随后的时间点逐渐下降，并在 36 h 后降到与对照差异不显著。而表达 BPI 和 BPI714 的细胞在 LPS 刺激后，*TNF- $\alpha$*  基因的相对转录水平相比 LPS 刺激前没有显著变化 ( $P > 0.05$ ) (图 3)。

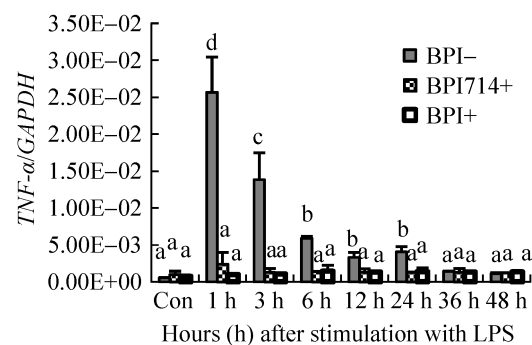


图 3 LPS 刺激前后稳定表达 BPI/BPI714 和未表达 BPI/BPI714 的 mHEK293 细胞中 *TNF- $\alpha$*  基因的相对表达水平

Fig. 3 *TNF- $\alpha$*  responses to LPS (100 ng/mL) stimulation in mHEK293 cells transfected with BPI/BPI714 and non-transfected mHEK293 cells.

### 2.3.3 稳定表达的 BPI/BPI714 对 LPS 诱导的 *IL-8* 基因表达水平的影响

LPS 刺激 1 h 后, 没有表达 BPI 或 BPI714 的 mHEK293 细胞中 *IL-8* 基因的相对转录水平即显著升高 ( $P < 0.05$ ), 到 3 h 达到最高点, 而后逐渐下降, 刺激 36 和 48 h 后 *IL-8* 基因转录表达与刺激前相比无显著变化 ( $P > 0.05$ )。与表达 BPI 或 BPI714 的细胞相比, *IL-8* 基因的相对转录水平在 LPS 刺激前后没有显著变化 ( $P > 0.05$ ) (图 4)。

### 2.3.4 稳定表达的 BPI/BPI714 对 LPS 诱导的 *NF- $\kappa$ B-2* 基因表达水平的影响

没有表达 BPI 或 BPI714 的 mHEK293 细胞在 LPS 刺激后 1 h、3 h 和 6 h, *NF- $\kappa$ B-2* 基因的相对转录水平迅速、持续升高, 维持较高的转录表达水平, 与刺激前相比, 差异显著 ( $P < 0.05$ )。LPS 刺激 12 h 时, *NF- $\kappa$ B-2* 基因表达水平下降至刺激前水平 ( $P > 0.05$ ), 刺激 24 h 时其表达水平再次升高, 较 LPS 刺激前的表达水平差异显著, 随后在 36 h 和 48 h 又恢复到刺激前的表达水平 ( $P > 0.05$ )。与此同时, 表达 BPI 和 BPI714 的 mHEK293 细胞, 其 *NF- $\kappa$ B-2* 基因相对转录水平 LPS 刺激前和刺激后没有显著变化 ( $P > 0.05$ ) (图 5)。

### 2.3.5 稳定表达的 BPI/BPI714 对 LPS 诱导的 *NF- $\kappa$ B-1* 基因表达水平的影响

在没有表达 BPI 或 BPI714 的 mHEK293 细胞中, LPS 刺激后 *NF- $\kappa$ B-1* 基因的转录表达升高, 在刺激后 3 h 的表达量与刺激前相比差异显著, 然后逐渐下降, 并在刺激 12 h 后表达水平降低至刺激前的表达水平。在表达 BPI 和 BPI714 的细胞中, *NF- $\kappa$ B-1* 的相对转录水平在 LPS 刺激 1 h 时升高, 与刺激前显著差异; 随后

下降, 刺激 3 h、6 h 后 *NF- $\kappa$ B-1* 基因转录水平降至刺激前的表达水平; 之后 *NF- $\kappa$ B-1* 表达量持续下降, 显著低于刺激前的表达水平 (图 6)。

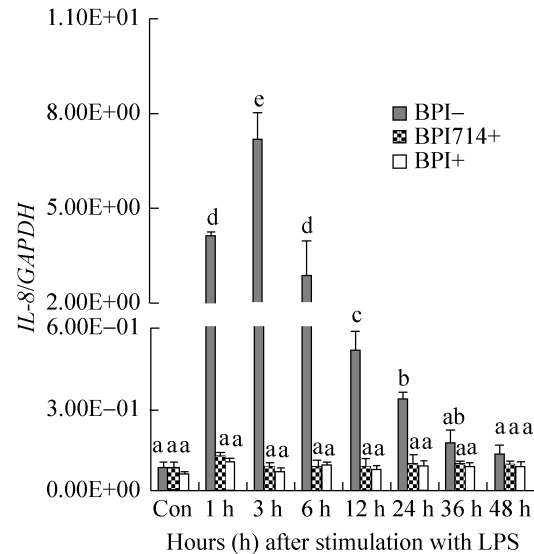


图 4 LPS 刺激前后稳定表达 BPI/BPI714 和未表达 BPI/BPI714 的 mHEK293 细胞中 *IL-8* 基因的相对表达水平

Fig. 4 *IL-8* gene responses to LPS (100 ng/mL) stimulation in mHEK293 cells transfected with BPI/BPI714 and non-transfected mHEK293 cells.

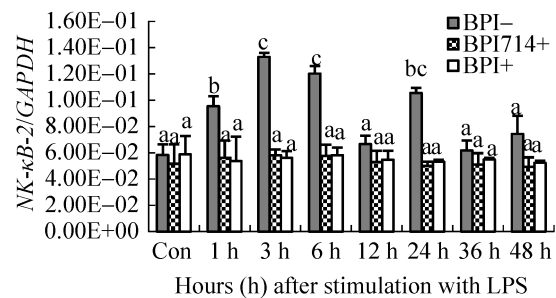


图 5 LPS 刺激前后稳定表达 BPI/BPI714 和未表达 BPI/BPI714 的 mHEK293 细胞中 *NF- $\kappa$ B-2* 基因的相对表达水平

Fig. 5 *NF- $\kappa$ B-2* gene responses to LPS (100 ng/mL) stimulation in mHEK293 cells transfected with BPI/BPI714 and non-transfected mHEK293 cells.

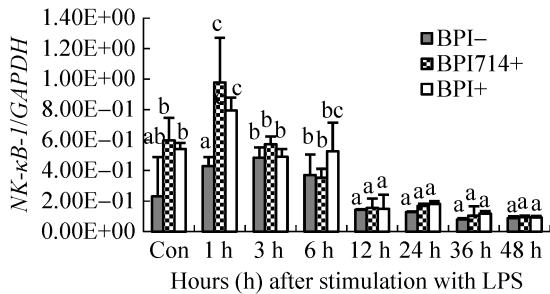


图6 LPS刺激前后稳定表达BPI/BPI714和未表达BPI/BPI714的mHEK293细胞中*NF-κB-1*基因的相对表达水平

Fig. 6 *NF-κB-1* gene responses to LPS (100 ng/mL) stimulation in mHEK293 cells transfected with BPI/BPI714 and non-transfected mHEK293 cells.

### 3 讨论

LPS是革兰氏阴性菌菌膜的组成部分,可以导致急性炎症反应,清除LPS或对LPS的脱毒是机体免疫反应的最重要目标。激活免疫反应首先需要把单个LPS分子转移到宿主细胞的表面识别受体TLR4,这个过程需要LBP和革兰氏阴性菌菌膜上的LPS结合,由LBP把内毒素单体转移给可溶的CD14(或细胞膜上的CD14)形成复合物,该复合物的结合底物是MD2或MD2-TLR4,然后由MD2将内毒素和TLR4结合起来,通过激活NF-κB途径,使巨噬细胞释放促炎性细胞因子,如*TNF-α*、*IL-1β*和*IL-6*等,诱导巨噬细胞介导的免疫应答,从而清除细菌<sup>[14]</sup>。

*IL-8*可由多种细胞产生,包括单核细胞、巨噬细胞、内皮细胞、成纤维细胞和表皮细胞等。*IL-1α*、*IL-1β*和LPS是刺激*IL-8*分泌的主要诱导剂。*IL-8*主要生物学功能是趋化和激活中性粒细胞,使其产生处理细胞毒素的吞噬小泡<sup>[4]</sup>。吞噬小泡中包括大量的抗菌肽、活性氧以及骨髓分化的蛋白,能够消灭病原菌,清除LPS

或对LPS进行脱毒化处理,其中BPI是抗菌肽处理LPS的主要成分之一。

自1978年Weiss等提取天然BPI分子后,人们已经对兔、鼠、猪、牛和鸡等多种生物的BPI基因进行研究,大部分研究主要集中在BPI基因多态性对其功能的影响<sup>[15-17]</sup>,以及不同组织的BPI表达分布以及其对革兰氏阴性菌的杀菌能力方面。徐俊杰等<sup>[18]</sup>从细菌培养和平板计数上,都证实BPI有极强的抑菌效果。在全血实验中,5 nmol/L浓度的nBPI55或rBPI23就可使对血清和吞噬作用具有抵抗力的有荚膜粗糙型大肠杆菌发生损伤<sup>[1]</sup>。Eckert等<sup>[19]</sup>通过表达TLR4信号通路的HEK293细胞研究小鼠BPI的功能,发现鼠源BPI能特异的抑制*IL-8*和*NF-κB*基因的表达。Wittmann等<sup>[20]</sup>在稳定表达*NF-κB*基因的RAW细胞系(*RAW-κB*)中研究BPI对LPS诱导的炎性反应的影响,发现鼠源BPI可以抑制*NF-κB*、*IL-8*和*TNF*基因的表达。综上所述,LPS刺激后,炎性细胞因子*TNF-α*、*IL-1β*、*IL-8*和转录因子*NF-κB*表达水平均显著增加。因此,我们认为通过分析这些基因的表达水平变化能够判断BPI对LPS介导的免疫应答的影响作用。为此本实验选择了上述炎性细胞因子/转录因子,利用具有TLR4信号通路的mHEK293细胞系,将牛源BPI/BPIN端基因分别转染到上述mHEK293细胞中,在相同LPS刺激条件下,通过比较稳定表达BPI/BPI714实验组细胞和没有表达BPI/BPI714对照组细胞中这些因子的相对转录水平变化情况,评价牛源BPI对LPS介导的免疫应答的影响。

不同剂量的LPS刺激不同物种的免疫细胞、炎性细胞因子的转录水平变化并不完全相同。Strandberg等<sup>[21]</sup>采用50 μg/mL的LPS刺激牛乳



腺上皮细胞, 炎性细胞因子的转录水平均迅速提高, 其中 *IL-8* 和 *TNF- $\alpha$*  的转录水平在 2 h 后最高, 而 *IL-1 $\beta$*  在刺激 8 h 后达到最高转录水平。而 Hadley 等<sup>[22]</sup>采用 1 ng/mL 的 LPS 刺激人的血液, 发现 *TNF- $\alpha$*  在 6 h 后表达水平达到最高, *IL-1 $\beta$*  在 12 h 达到最高水平, *IL-8* 则在 24 h 时达到最高水平。Guillermo 等<sup>[23]</sup>对人的单核细胞系 THP-1 用 LPS (100 ng/mL) 进行刺激, 发现 *TNF- $\alpha$*  表达量迅速升高, 并在 4 h 后达到最高水平, 随后缓慢下降。Lee 等<sup>[24]</sup>用大肠杆菌刺激奶牛个体, 采集牛奶中的细胞, 检测炎性细胞因子转录水平的变化, 发现 *TNF- $\alpha$*  转录水平没有显著升高, 而 *IL-8* 在 16 h 后转录水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), 而后逐渐下降。总体上, 在 LPS 刺激的各种实验模型中, 尽管炎性细胞因子表达在变化强度和时间内存在差异, 但是炎性细胞因子表达水平都会显著高于其刺激前的转录水平。本研究结果也显示, 没有 BPI/BPI714 表达时, LPS 刺激 mHEK293 细胞后, *IL-8*、*IL-1 $\beta$*  和 *TNF- $\alpha$*  以及转录因子 *NF- $\kappa$ B-2* 的转录水平均显著提高, 说明 LPS 可以诱导 mHEK293 产生炎性细胞因子应答。然而, 当稳定表达 BPI/BPI714 mHEK293 细胞受到相同 LPS 刺激细胞后, 其 *IL-8*、*TNF- $\alpha$*  和 *NF- $\kappa$ B-2* 的转录水平均接近刺激前的转录水平, 都未发生显著变化, 说明 BPI 能强烈抑制以上基因的转录表达。这一结果与 Eckert 等<sup>[19]</sup>和 Wittmann 等<sup>[20]</sup>的研究结果相似, 说明不同物种的 BPI 抗菌机理是相似的。然而, 本实验检测到表达 BPI/BPI714 的细胞在 LPS 刺激后 6 h, 其中 *IL-1 $\beta$*  的表达与对照组细胞相比也显著降低, 但该基因在 LPS 刺激后 1 h 的转录表达水平却比刺激前显著升高了, 提示在 LPS 诱导的炎性细胞因子应答中

*IL-1 $\beta$*  基因的转录调节与 *IL-8* 和 *TNF- $\alpha$*  可能不完全相同。此外, 不表达 BPI/BPI714 的细胞经 LPS 刺激后 *NF- $\kappa$ B-1* 基因转录水平并没有显著提高, 而稳定表达 BPI/BPI714 的细胞在 LPS 刺激后 1 h, *NF- $\kappa$ B-1* 基因转录水平却显著升高, 说明 *NF- $\kappa$ B-1* 基因在 LPS 刺激的炎性反应中不起主要作用。

本研究分别构建了牛 BPI 和 BPI N 端编码序列的表达载体并导入 mHEK293 细胞中使其成功表达, 收集 LPS 刺激前后不同时间点细胞样品, 利用实时定量 RT-PCR 方法检测 *IL-8*、*IL-1 $\beta$* 、*TNF- $\alpha$* 、*NF- $\kappa$ B-1* 和 *NF- $\kappa$ B-2* 基因的表达变化规律。结果表明, LPS 刺激后, 没有表达 BPI/BPI714 的细胞中 *IL-8*、*IL-1 $\beta$* 、*TNF- $\alpha$* 、*NF- $\kappa$ B-2* 表达水平在不同时间点均显著提高 ( $P < 0.05$ ), 并呈现规律性变化; 而稳定表达 BPI/BPI714 细胞在同样刺激条件下, *IL-8*、*IL-1 $\beta$* 、*TNF- $\alpha$* 、*NF- $\kappa$ B-2* 基因在 LPS 刺激前后的转录水平均没有显著变化 ( $P > 0.05$ )。说明在 mHEK293 细胞模型中, 稳定表达 BPI/BPI714 的细胞能强烈抑制 LPS 介导的炎性细胞因子的表达。该实验结果证明了 BPI/BPI714 均能抑制 LPS 介导的免疫应答, 这为将来研究抗菌蛋白的抗菌效果提供了一种可靠的方法, 也为进一步研究其抑菌机制、开发利用其抑菌功能提供了可靠的实验依据。

## REFERENCES

- [1] Chen XD, Wang SB, Jiang Q, et al. The effect of endotoxins on the levels of cytokines, soluble adhesion molecule, and sFas/sFasL in patients with severe burn. *Chin J Emerg Med*, 2004, 13(7): 470-473 (in Chinese).  
陈晓东, 王顺宾, 江琼, 等. 内毒素对严重烧伤

- 后细胞因子、可溶性粘附分子及 sFas/sFasL 的影响. 中华急诊医学杂志, 2004, 13(7): 470–473.
- [2] Lin JP, Bai J, Zhang XM, et al. Association the mutation of 2021 locus of Toll-like receptor 4 gene (TLR4) exon 11 polymorphisms with somatic cell score in Xinjiang brown cattle. *J Agr Biotech*, 2010, 18(6): 1115–1122 (in Chinese).  
林嘉鹏, 白杰, 张雪梅, 等. 新疆褐牛 Toll 样受体基因 (TLR4) 外显子 III2021 位点突变与奶牛体细胞评分的相关性研究. *农业生物技术学报*, 2010, 18(6): 1115–1122.
- [3] Tobias PS, Soldau K, Iovine NM, et al. Lipopolysaccharide (LPS)-binding proteins BPI and LBP form different types of complexes with LPS. *J Biol Chem*, 1997, 272(30): 18682–18685.
- [4] Chen J. Research progress of endotoxin inhibitor. *World Notes on Antibiotics*, 2005, 26(3): 137–141 (in Chinese).  
陈军. 内毒素抑制剂的研究进展. *国外医药抗生素分册*, 2005, 26(3): 137–141.
- [5] Weiss J, Elsbach P, Olsson I, et al. Purification and characterization of a potent bactericidal and membrane active protein from the granules of human polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem*, 1978, 253(8): 2664–2672.
- [6] Calafat J, Janssen H, Tool A, et al. The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is present in specific granules of human eosinophils. *Blood*, 1998, (91): 4770–4775.
- [7] Canny G, Levy O, Furuta GT, et al. Lipid mediator-induced expression of bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in human mucosal epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(6): 3902–3907.
- [8] Reichel PH, Seemann C, Csernok E, et al. Bactericidal/permeability-increasing protein is expressed by human dermal fibroblasts and upregulated by interleukin 4. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2003, 10(3): 473–475.
- [9] Peuravuori H, Aho VV, Aho HJ, et al. Bactericidal/permeability-increasing protein in lacrimal gland and in tears of healthy subjects. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2006, 244(2): 143–148.
- [10] Canny GO, Trifonova RT, Kindelberger DW, et al. Expression and function of bactericidal/permeability increasing protein in human genital tract epithelial cells. *J Infect Dis*, 2006, 194(4): 498–502.
- [11] Bai J. Study of Toll-like receptor 2 & 4 gene structure and function and its correlation with mastitis in bovine [D]. Urumqi: Xinjiang University, 2012 (in Chinese).  
白杰. Toll 样受体 2 和 4 基因结构和功能及其与奶牛乳房炎的相关性研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆大学, 2012.
- [12] Sauter KS, Brcic M, Franchini M, et al. Stable transduction of bovine TLR4 and bovine MD-2 into LPS-nonresponsive cells and soluble CD14 promote the ability to respond to LPS. *Vet Immunol Immunopathol*, 2007, 118(1): 92–104.
- [13] Liu CX, Wang LQ, Li W, et al. Highly efficient generation of transgenic sheep by lentivirus accompanying the alteration of methylation status. *PLoS ONE*, 2013, 8(1): e54614.
- [14] Hendrik Schultz, Jerrold P. The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in infection and inflammatory disease. *Clin Chim Acta*, 2007, 384(1/2): 12–23.
- [15] Yang QF, Chen BL, Zhang QS, et al. Glu216Lys polymorphism of bactericidal/permeability-increasing protein gene has no association with inflammatory bowel disease in Chinese Han population. *Chin J Pathophysiol*, 2013, 29(4): 718–723 (in Chinese).  
杨庆帆, 陈白莉, 张青森, 等. 杀菌/通透性增加蛋白基因 Glu216Lys 多态性与中国汉族人群炎症性肠病无关. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(4): 718–723.
- [16] Ma Y, Jin XB, Li XB, et al. Optimization of condition for expression of BPI23-haFGF fusion protein in *Pichia pastoris*. *Biotechnology*, 2013, 23(2): 25–29 (in Chinese).  
马艳, 金小宝, 李小波, 等. BPI23-haFGF 融合蛋白在毕赤酵母中表达条件的优化. *生物技术*, 2013, 23(2): 25–29.
- [17] Wu ZC, Wang J, Zhu SP, et al. The partial cSNPs

- detection of pig BPI gene and its influence on protein structure and function. *Acta Vet Zootech Sin*, 2013, 44(7): 1000–1007 (in Chinese).
- 吴正常, 王靖, 朱世平, 等. 猪 BPI 基因部分 cSNPs 检测及其对蛋白结构功能的影响. *畜牧兽医学报*, 2013, 44(7): 1000–1007.
- [18] Xu JJ, Xu J, Wang HT. Gene cloning and expression of human bactericidal/permeability-increasing protein. *Acta Microbiol Sin*, 2001, 41(6): 669–672 (in Chinese).
- 徐俊杰, 徐静, 王海涛. 杀菌/通透性增加蛋白基因的克隆及在 CHO 细胞中的表达. *微生物学报*, 2001, 41(6): 669–672.
- [19] Eckert M, Wittmann I, Röllinghoff M, et al. Endotoxin-induced expression of murine bactericidal permeability/increasing protein is mediated exclusively by Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$ -dependent pathways. *J Immunol*, 2006, 176(1): 522–528.
- [20] Wittmann I, Schönefeld M, Aichele D, et al. Murine bactericidal/permeability-increasing protein inhibits the endotoxic activity of lipopolysaccharide and gram-negative bacteria. *J Immunol*, 2008, 180(11): 7546–7552.
- [21] Strandberg Y, Gray C, Vuocolo T, et al. Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells. *Cytokine*, 2005, 31(1): 72–86.
- [22] Hadley JS, Wang JE, Foster SJ, et al. Peptidoglycan of *Staphylococcus aureus* upregulates monocyte expression of CD14, Toll-like receptor 2 (TLR2), and TLR4 in human blood: possible implications for priming of lipopolysaccharide signaling. *Infect Immun*, 2005, 73(11): 7613–7619.
- [23] Giambartolomei GH, Zwerdling A, Cassataro J, et al. Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*. *J Immunol*, 2004, 173(7): 4635–4642.
- [24] Lee JW, Bannerman DD, Paape MJ, et al. Characterization of cytokine expression in milk somatic cells during intramammary infections with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* by real-time PCR. *Vet Res*, 2006, 37(2): 219–229.

(本文责编 陈宏宇)