

雌二醇对Hela细胞淋球菌感染模型*il-6*、*il-8*、*nlrp3*表达的影响

阳慧芝, 周 飞, 刘盛波, 刘 双, 谭卉卉, 张 方, 陈嵘祎* (广东医科大学附属第一医院皮肤科, 广东湛江 524001)

摘 要: 目的 了解17 β -雌二醇(E2)对人HeLa细胞淋球菌(Ng)感染模型中细胞因子*il-6*、*il-8*、*nlrp3* mRNA表达的影响。方法 体外培养人HeLa细胞, 分为如下4组: 对照组、雌二醇组(E2组)、淋球菌感染组(Ng组)、淋球菌+雌二醇组(Ng+E2组); 对照组予DMEM培养基, E2组予17 β -雌二醇+DMEM培养, Ng组予淋球菌悬液+DMEM培养, Ng+E2组予17 β -雌二醇+淋球菌悬液+DMEM培养, 培养6、18 h后应用荧光定量PCR(qRT-PCR)检测各组细胞*il-6*、*il-8*、*nlrp3* mRNA表达量。结果 淋球菌刺激HeLa细胞6、18 h后, Ng组的*il-6*、*il-8*、*nlrp3* mRNA水平较对照组明显增加($P<0.01$), Ng+E2组*il-6*、*il-8* mRNA高于对照组但较Ng组下调($P<0.01$ 或 0.05), 而*nlrp3* mRNA表达明显低于Ng组及对照组($P<0.01$ 或 0.05); E2组刺激6 h的*il-8*和刺激18 h的*nlrp3*与对照组差异无统计学意义($P>0.05$); 其余指标差异均有统计学意义($P<0.01$ 或 0.05)。结论 E2可下调淋球菌感染诱导的人HeLa中*il-6*、*il-8*、*nlrp3* mRNA等促炎因子的表达, 起到抑制黏膜免疫, 促进淋球菌感染的作用。

关键词: 淋球菌; 雌二醇; HeLa细胞; 炎症细胞因子

中图分类号: R 759.2

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2018)01-0040-04

Effect of estradiol on the expression of *il-6*, *il-8* and *nlrp3* in Hela cell gonococcal infection model

YANG Hui-zhi, ZHOU Fei, LIU Sheng-bo, LIU Shuang, TANG Hui-hui, ZHANG Fang, CHEN Rong-yi*
(Department of Dermatology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, China)

Abstract: Objective To investigate the regulatory effect of E2 on the expression of inflammatory cytokine (*il-6*, *il-8*, *nlrp3*) mRNA in human Hela cells pretreated with Neisseria gonorrhoeae (Ng). Methods HeLa cells were cultured in vitro, which were randomly divided into four groups: Control Group, 17 β -Estradiol Group (E2 Group), Neisseria Gonorrhoeae Group (Ng Group), Neisseria Gonorrhoeae +17 β -Estradiol Group (E2+Ng Group). The Control Group was cultured in DMEM; The E2 Group was cultured in DMEM plus 17 β -estradiol; The Ng Group was cultured in DMEM plus gonococcal suspension; The E2+Ng Group was cultured in the same condition as the Ng Group plus 17 β -Estradiol. Total RNA was isolated after 6 and 18 hours, and the expression of *il-6*, *il-8*, *nlrp3* mRNA in each group was determined by qPCR. Results The expression level of *il-6*, *il-8* and *nlrp3* mRNA in Ng Group was significantly increased compared with the Control Group after Neisseria gonorrhoeae stimulated Hela cells for 6 h and 18 h ($P<0.01$). The expression of *il-6* and *il-8* mRNA in Ng+E2 Group was higher than that of the Control Group but down-regulated compared with the Ng Group ($P<0.01$ or 0.05), and the expression of *nlrp3* mRNA of the Ng Group was significantly lower than that of the Ng Group and Control Group ($P<0.01$ or 0.05); There was no statistical difference in the expression of *il-8* after 6 h stimulation and the expression of *nlrp3* after 18 h stimulation between the E2 Group and the Control Group ($P>0.05$); and there have been statistical differences for all the other indicators ($P<0.01$ or 0.05). Conclusion E2 can down-regulate the expression of the *il-6*, *il-8*, *nlrp3* and other inflammatory factors in human Hela induced by gonococcus and thus achieve the effect of inhibiting mucosal immunity and promoting gonococcal infection.

Key words: Neisseria gonorrhoeae; estrogen; Hela cells; inflammatory cytokines

基金项目: 广东省科技计划项目(No.2016A020215223), 广东医科大学留学归国科研启动项目(No. 2XB14005)

收稿日期: 2018-01-05; 修订日期: 2018-01-19

作者简介: 阳慧芝(1991-), 女, 学士, 硕士研究生。

通信作者: 陈嵘祎, 男, 博士, 主任医师, 硕士生导师, E-mail: Rongyichen@163.com。

淋球菌(*Neisseria gonorrhoeae*, Ng)引起男性淋病的尿道炎症状明显,常能被及时诊断和治疗。而女性Ng感染临床症状不典型,多在出现并发症如盆腔炎时才能被发现^[1]。文献显示妇女淋病发病率高达118.8/10万,更严峻的是50%以上女性淋病患者临床症状缺如成无症状淋病(Asymptomatic gonorrhea, AG)^[2]。AG患者常延误就医,不但继发输卵管瘢痕,引起不孕或异位妊娠、且增加HIV感染的机率,甚至导致播散性淋病^[3]。因此,美国疾控中心性传播疾病诊断和治疗指南推荐每年对有性生活的女性进行淋病筛查。目前认为AG与女性激素有关,但其病因尚未阐明,成性传播疾病防控的巨大隐患^[4-6],我们既往研究发现雌激素可抑制Th17细胞分化下调黏膜免疫促进念珠菌感染^[7],Th17细胞在抗淋球菌感染中很关键,敲除IL-17受体小鼠可导致中性粒细胞趋化减少,淋球菌感染延长。再者,雌二醇(E2)是小鼠淋球菌阴道炎诱导及维持必要条件且与播散性淋病相关^[5]。因此,我们推测雌激素参与了AG的发病,但雌激素通过何种机制调控淋球菌感染的免疫应答,最终导致AG,至今尚未阐明。本研究构建人HeLa细胞淋球菌感染模型研究雌二醇对相关炎症因子表达的影响,旨在探讨雌激素调控黏膜免疫在AG致病中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 人宫颈癌细胞株海拉细胞购于上海中乔新舟生物有限公司(货号ZQ0068),淋球菌菌株,购于上海宜醇化工有限公司,菌种编号19424。

1.1.2 主要仪器与试剂 SW-CJ-2FD型超净工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司),酶标仪、CO₂培养箱(美国Thermo SCIENTIFIC公司),高速低温台式离心机(美国Thermo公司)、Vintex™7 Dx Real-Time PCR仪(Life)、倒置显微镜(CKX41, OLYMPUS)、定量光度计(德国Eppendorf公司);17β-雌二醇粉剂(60393b, sigma有限公司)、淋球菌培养基(15098, 江门凯林公司)、澳洲源胎牛血清(10099-141, Gibco公司)、DMEM(C11885500BT, Gibco公司)、PBS, pH 7.2(20012-043, Gibco公司)、Trizol、qRT-PCR试剂盒(日本TaKaRa)、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)(RR820A, Takara公司)。

1.2 方法

1.2.1 淋球菌悬液制备 将淋球菌株干粉接种到含

0.1%葡萄糖和1%蛋白胨的液体沙氏培养基上,置于37℃ CO₂恒温箱培养36 h后,再接种到固体淋球菌培养基上,置于37℃恒温箱中培养24 h后,挑取白色菌落接种到装有无菌PBS液的1.5 mL EP管中,漩涡震荡后制成淋球菌菌悬液。最后用分光光度计调整菌悬液浓度OD₅₇₀值约0.15,血细胞计数板计数约至1×10⁸ CFU/mL。

1.2.2 Hela细胞的培养 将Hela细胞从冻存管中取出后,于37℃复苏细胞后加入含10%胎牛血清的DMEM培养基,置于37℃ CO₂恒温箱中培养,隔2~3 d换液一次,待细胞铺满后备用。

1.2.3 淋球菌感染模型构建 将以上所得的Hela细胞随机分成4组:对照组、雌激素组(E2组)、淋球菌组(Ng组)、淋球菌+雌激素组(Ng+E2组)。对照组:只加含FBS10%的DMEM培养基;E2组:17β-雌二醇(1×10⁻⁹ mol/L)+含FBS10%的DMEM培养基;Ng组:1×10⁸ CFU/mL的淋球菌悬液+含FBS10%的DMEM培养基;Ng组+E2感染组:加17β-雌二醇(1×10⁻⁹ mol/L)+1×10⁸ CFU/mL淋球菌悬液+含FBS10%的DMEM培养基,置于37℃ CO₂恒温箱培养,作用6或18 h后提取细胞样品总RNA。

1.2.4 实时定量PCR检测炎症因子mRNA的表达 用Trizol试剂提取4组细胞的总RNA,紫外分光光度法测定提取的RNA的浓度及纯度,按qRT-PCR试剂盒进行逆转录和扩增,引物由上海生工生物有限公司合成,引物序列见表1。

表1 引物序列

引物名称	引物序列	产物长度
<i>il-6</i>	上游 GAGGAGACTTGCCTGGTGAA	105 bp
	下游 AGCTCTGGCTTGTTCCTCAC	
<i>il-8</i>	上游 CTGCGCCAAACACAGAAATTA	118 bp
	下游 TGAATTCTCAGCCCTCTTCAA	
<i>nlrp3</i>	上游 TTCCAGGGAGTCGTTTGAAG	121 bp
	下游 TGGTTTACCAGGCCAAAGAG	
<i>gapdh</i>	上游 TAAAAGCAGCCCTGGTGACC	88 bp
	下游 CCACATCGCTCAGACACCAT	

1.3 统计学处理

统计量的计算采用Office Excel 2007。所有数据均来自于3次独立实验,实验结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用单因素方差分析及 q 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

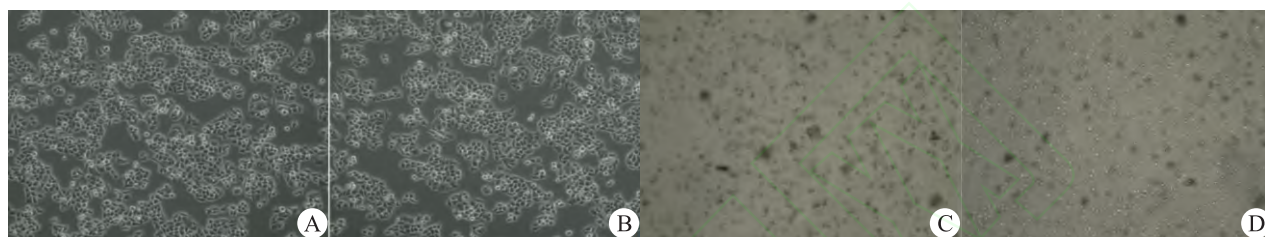
2 结果

2.1 细胞生长形态

HeLa光镜下细胞胞体大,为近似三角形的上皮细胞,细胞核呈规则的卵圆形。光镜下Ng组、Ng+E2组与对照组相比,HeLa细胞数量减少,分布稀疏,形态欠规则,以Ng组尤为明显。E2组与对照组相比,细胞数量、形态无明显变化。详见图1。

2.2 E2对Hela细胞淋球菌感染模型中*il-6*、*il-8*、*nlrp3* mRNA表达的影响

用 1×10^{-9} mol/L E2和 1×10^8 CFU/mL淋球菌处理Hela细胞,6 h后,E2组的*il-8* mRNA表达与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),Ng、Ng+E2组均高于对照组($P < 0.01$),Ng+E2组低于Ng组($P < 0.01$),而*il-6*、*nlrp3* mRNA表达的变化程度不如*il-8* mRNA明显。18 h后,Ng组*il-6*、*il-8*、*nlrp3* mRNA表达均高于对照组($P < 0.01$),以*il-8*最明显;Ng+E2组低于Ng组($P < 0.01$),详见表2。上述结果提示E2可拮抗淋球菌诱导的*il-6*、*il-8*、*nlrp3* mRNA水平的上调。



A: 对照组; B: E2组; C: Ng组; D: Ng+E2组

图1 细胞生长形态(20×)

表2 *il-6*、*il-8*、*nlrp3*在Hela细胞淋球菌感染模型中的表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	6 h			18 h		
	<i>il-6</i>	<i>il-8</i>	<i>nlrp3</i>	<i>il-6</i>	<i>il-8</i>	<i>nlrp3</i>
对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
E2组	0.82 ± 0.01^a	0.97 ± 0.05	0.78 ± 0.02^b	1.15 ± 0.00^a	1.19 ± 0.03^a	1.04 ± 0.06
Ng组	1.85 ± 0.05^{ac}	50.23 ± 0.92^{ac}	1.58 ± 0.22^{ac}	1.76 ± 0.04^{ac}	6.05 ± 0.08^{ac}	1.60 ± 0.04^{ac}
Ng+E2组	1.10 ± 0.01^{acc}	33.92 ± 0.18^{acc}	0.70 ± 0.02^{bce}	1.08 ± 0.04^{ade}	2.85 ± 0.06^{acc}	0.62 ± 0.01^{be}

与对照组比较: ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$; 与E2组比较: ^c $P < 0.01$, ^d $P < 0.05$; 与Ng组比较: ^e $P < 0.01$

3 讨论

淋球菌是一种兼性厌氧的革兰阴性双球菌,具有亲宿主黏膜的特性,常侵犯泌尿生殖器官的移行上皮及宫颈柱状上皮。淋球菌侵入组织后,靠菌毛粘附于上皮细胞上,待细胞将其吞噬后,其可在胞内繁殖。当黏膜上皮发生细胞溶解后,淋球菌被释放到黏膜下层,通过脂寡糖与补体相互作用形成局部炎症反应。此时,白细胞尤其是中性粒细胞在炎症介质的趋化作用下聚集,形成大量脓性分泌物。许多关于淋病的研究发现黏膜及其上皮细胞中存在前炎症因子及一些化学趋化因子(Chemokines)的表达。在淋病患者的尿道中发现,局部炎症在白细胞高峰期,其炎症因子(IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-17和TNF- α)的分泌也最多^[8]。一个子宫内细胞淋球菌感染模型也证实了淋球菌的菌毛(pilus)和Opa蛋白在促进细胞因子(IL-6、IL-8和TNF- α)的分泌中起重要作用^[9-10]。有学者发现ME180、Hela和HaCat上皮细

胞的淋球菌感染模型中,菌毛(pilus)和Opa蛋白上调IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-17、GM-CSF、Mcp-1和TNF- α 的表达,从而加重淋病的炎症反应^[8]。由此可看出炎症细胞因子、趋化因子在淋球菌的炎症发病机制中起着重要作用。淋球菌感染在不同的发病部位症状也不同,在大多数男性生殖道感染中,上皮细胞与淋球菌相互作用促进炎症因子的分泌和大量中性粒细胞的聚集,伴尿道疼痛。在女性生殖道的淋球菌感染中50%~80%患者病灶中性粒细胞聚集少,无明显疼痛症状,称为AG。AG患者常延误就医,多在出现并发症如盆腔炎时才能被发现,此时不但易继发输卵管瘢痕,引起不孕或异位妊娠,且易增加HIV感染的机率,甚至导致播散性淋病,其分子机制尚未明确^[3]。

既往我们研究提示孕激素与AG发病有关,近年也有学者提出该激素可能通过上调IL-10及Treg细胞抑制Th17细胞从而导致女性AG的发生^[5-6]。然而女

性激素不但有孕激素且包含雌激素,而雌激素是女性激素的主体。再有文献报道E2是小鼠Ng阴道炎症诱导及维持必要条件且与播散性淋病相关^[4],我们最新研究发现E2可募集REX/HDACs(雌激素受体辅助抑制因子/组蛋白去乙酰化酶)抑制ROR γ t表达(维A酸相关孤儿受体)来遏制Th17细胞分化导致阴道念珠菌感染^[7]。而Th17细胞在抗Ng感染中很关键,敲除IL-17受体小鼠可导致中性粒细胞趋化减少,Ng感染迁延^[6]。也有研究表明女性淋球菌下生殖道感染发展为上行感染的易感性可随月经周期而变化^[2,4],因此,我们推测雌激素及孕激素均具有抑制黏膜免疫并协同促进AG发病的作用,孕激素在AG的作用的研究已较明确^[6],但雌激素通过何种机制调控淋球菌感染的免疫应答而最终导致AG,至今尚未阐明。IL-6和IL-8是由单核-巨噬细胞、淋巴细胞、内皮细胞等分泌的一种多效应细胞因子。在宿主遭遇组织损伤、细菌及病毒感染后能诱导血清中IL-6、IL-8的高表达,属于趋化因子,并增加机体的炎症防御作用。NLRP3炎症小体主要由NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(Apoptosis associated speck-like protein containing a CARD domain, ASC)以及Pro-caspase-1组成,该炎症小体能够识别多种类型的病原体及危险分子。革兰阴性细菌可诱导NLRP3炎症小体非经典激活通路:TLR4/MyD88和TLR4/TRIF识别细胞外脂多糖,激活IFN通路,诱导Casp-11表达,后者再激活NLRP3炎症小体^[11]。在本研究中,我们通过Hela细胞淋球菌感染模型发现雌激素可拮抗淋球菌诱导的*il-6*、*il-8*、*nlrp3* mRNA水平的上调。上述证据提示E2抑制促炎因子、趋化因子表达并减少中性粒细胞浸润可能是AG致病机制之一。然而,AG的发病机制复杂,雌激素如何调控MiRNA、IL-33、IL-36、IL-37等因子及黏膜NKp46+NK细胞抑制黏膜免疫,促进淋球菌无症状感染仍需深入研究。

参考文献:

- [1] 樊尚荣,周小芳. 2015年美国疾病预防控制中心性传播疾病的诊断和治疗指南(续)——淋病的诊断和治疗指南[J]. 中国全科医学, 2015, 18(26): 3129-3131.
- [2] Chen H, Wu Z, Li J, et al. Effect of progesterone on gonococci-induced apoptosis and respiratory burst of human polymorphonuclear leukocytes in vitro[J]. Int J Dermatol, 2009, 48(9): 1011-1016.
- [3] Skerlev M, ČulavKoščak I. Gonorrhea: new challenges[J]. Clin Dermatol, 2014, 32(2): 275-281.
- [4] Jerse A E, Wu H, Packiam M, et al. Estradiol-treated female mice as surrogate hosts for neisseria gonorrhoeae genital tract infections[J]. Front Microbiol, 2011, 2:107.
- [5] Chen R Y, Tu Y, Lin J, et al. The nongenomic effects of progesterone in repressing iNOS activation through P38 MAPK pathways in gonococci-infected polymorphonuclear leukocytes and the clinical significance[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2010, 30(1): 119-125.
- [6] 许莉,陈娜,曾志良,等. 女性无症状淋病患者胸腺基质淋巴细胞生成素的表达及与IL-17、IL-10关系[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2017, 31(5): 523-525.
- [7] Chen R Y, Fan Y M, Zhang Q Y, et al. Estradiol inhibits Th17 cell differentiation through inhibition of ROR γ t transcription by recruiting ER α /REX complex to the EREs of ROR γ t Promoter[J]. J Immunol, 2015, 194(8): 4019-4028.
- [8] Edwards J L, Apicella M A. The Molecular mechanisms used by Neisseria gonorrhoeae to initiate infection differ between men and women[J]. Clin Microbiol Rev, 2004, 17(4): 965-981.
- [9] Ramsey K H, Schneider H, Cross A S, et al. Inflammatory cytokines produced in response to experimental human gonorrhea[J]. J Infect Dis, 1995, 172(1): 186-191.
- [10] Christodoulides M, Everson J S, Liu B L, et al. Interaction of primary human endometrial cells with Neisseria gonorrhoeae expressing green fluorescent protein[J]. Mol Microbiol, 2000, 35(1): 32-43.
- [11] Ming M S, Thirumala-Devi K. Regulation of inflammasome activation[J]. Immunol Rev, 2015, 265(1): 6-21.