

## 淋病奈瑟菌感染小鼠脾脏单个核细胞对NLRP3、IL-1 $\beta$ 表达的影响

魏娜<sup>1</sup>, 张方<sup>2</sup>, 李街青<sup>2</sup>, 陈佳玲<sup>2</sup>, 史建强<sup>2\*</sup>, 陈嵘祎<sup>1\*</sup> (1. 南方医科大学皮肤病医院, 广东广州 510091; 2. 广东医科大学附属第一医院, 广东湛江 524001)

**摘要:** **目的** 研究淋病奈瑟菌(Ng)感染小鼠脾脏单个核细胞对NLRP3、IL-1 $\beta$ 表达的影响。**方法** 通过测定不同稀释度Ng菌液OD<sub>450</sub>值, 结合平板菌落计数法, 建立淋病奈瑟菌OD<sub>450</sub>值(x) - 活菌数(y)回归方程。不同浓度Ng悬液感染小鼠脾脏单个核细胞, 采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)、Western blot检测NLRP3、IL-1 $\beta$ 水平。**结果** 成功建立了淋病奈瑟菌OD<sub>450</sub>值(x) - 活菌数(y)回归方程:  $y = 287.65x - 30.583$ 。qRT-PCR、Western blot结果显示, 以OD<sub>450</sub>值=0.2 Ng悬液感染单个核细胞1 h, NLRP3、IL-1 $\beta$ 表达量最高。**结论** 利用OD值计数Ng简便、快捷; NLRP3、IL-1 $\beta$ 在Ng感染中起关键作用。

**关键词:** 淋病奈瑟菌; 小鼠; 脾脏; NLRP3; IL-1 $\beta$

中图分类号: R 575

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2023) 02-0132-05

### Effect of *Neisseria gonorrhoeae* infection on NLRP3 and IL-1 $\beta$ expression in spleen mononuclear cells of mice

WEI Na<sup>1</sup>, ZHANG Fang<sup>2</sup>, LI Jie-qing<sup>2</sup>, CHEN Jia-ling<sup>2</sup>, SHI Jian-qiang<sup>2\*</sup>, CHEN Rong-yi<sup>1\*</sup> (1. Dermatology Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510091, China; 2. Department of Dermatology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the influence of *Neisseria gonorrhoeae* (Ng) infection on NLRP3 and IL-1 $\beta$  expression in spleen mononuclear cells of mice. **Methods** The OD<sub>450</sub> value (x)-viable count (y) regression equation of Ng was established by OD value measurement of different Ng dilutions and plate colony counting. The spleen mononuclear cells of mice were infected with different Ng concentrations, and their expression NLRP3 and IL-1 $\beta$  was detected by qRT-PCR and Western blot. **Results** The OD<sub>450</sub> value (x)-viable count (y) regression equation of Ng was established:  $y = 287.65x - 30.583$ . qRT-PCR and Western blot showed that NLRP3 and IL-1 $\beta$  expression reached the top in mononuclear cells infected with OD<sub>450</sub> value=0.2 Ng suspension for 1 h. **Conclusion** OD<sub>450</sub> value is simple and rapid for Ng counting. NLRP3 and IL-1 $\beta$  play a key role in Ng infection.

**Key words:** *Neisseria gonorrhoeae*; mice; spleen; NLRP3; IL-1 $\beta$

淋病是由淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*, Ng)感染引起的性传播疾病<sup>[1]</sup>, 该菌感染常引起模式识别受体(Pattern recognition receptors, PRRs)激活。PRRs包括Toll样受体(toll-like receptors, TLRs)、C型凝集素受体(C-type lectin receptors, CLR)、RIG-I样受体(RIG-I-like receptors, RLRs)、NOD样受体(NOD-like receptors, NLRs)、AIM2样受体(Aim2-

like receptors, ALRs), 可识别入侵微生物表达的病原相关分子模式(Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)及组织损伤释放的内源性危险相关分子模式(Damage-associated molecular patterns, DAMPs)。其中TLRs、NLRs在细菌感染中研究较多, 而NLRP3是属于NOD样受体的一种, 细菌感染可激活宿主免疫细胞NLRP3来上调IL-1 $\beta$ 以抵抗感染。体外细胞实验研

收稿日期: 2022-12-20

基金项目: 广东省科技创新战略专项基金(2021A1515011218), 广州市科技计划项目(202002030106), 国家自然科学基金(81872532)

作者简介: 魏娜(1996-), 女, 在读硕士研究生, E-mail: veranawei@163.com

张方(1993-), 女, 硕士研究生, E-mail: 544498414@qq.com, 为共同第一作者

通信作者: 陈嵘祎(1977-), 男, 博士, 主任医师, E-mail: Rongyichen@163.com

史建强(1961-), 男, 本科, 主任医师, E-mail: jianqiangshi@126.com

究Ng的感染条件与宿主引起免疫应答对该病致病机制研究非常关键,然而Ng体外感染单核细胞实验最佳活菌含量罕见报道,本文通过研究Ng定量方法以及不同含量Ng感染单个核细胞对IL-1 $\beta$ 、NLRP3表达的影响,为后续体外Ng感染免疫实验研究提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 致病菌和C57/BL6J小鼠 淋病奈瑟菌菌株,购于上海宜醇化工有限公司,菌种编号19424; C57/BL6J小鼠,购于广东省医学动物中心。

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、CO<sub>2</sub>培养箱(美国Thermo SCIENTIFIC),高速低温台式离心机(美国Thermo),ViniTM7 Dx Real-Time PCR仪(美国Life),倒置显微镜(日本OLYMPUS),分光光度计(德国Eppendorf),电泳槽(美国Thermo),转膜槽(美国Bio-Rad),Azure C500多功能分子成像分析仪(美国Thermo),小鼠单个核细胞分离液(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司),淋病奈瑟菌选择培养基(江门凯林公司),澳洲源胎牛血清(美国Gibco),RPMI 1640完全培养基、PBS缓冲液(美国Gibco),Trizol(美国Ambion),qRT-PCR试剂盒、SYBR® Premix Ex Taq™ II试剂盒(日本TaKaRa),RIPA裂解液(10 $\times$ )、蛋白酶/磷酸酶抑制剂cocktail(100 $\times$ )、兔抗GAPDH抗体、兔抗IL-1 $\beta$ 抗体、抗兔IgG、HRP-linked抗体(美国Cell Signaling Technology),兔抗NLRP3抗体(英国Abcam),红细胞裂解液(1 $\times$ )、NuPAGE TM10% Bis-Tris Gel胶、MES-SDS Running Buffer(20 $\times$ )(美国Invitrogen),immobilon Western HRP底物(美国Millipore)、Bradford蛋白浓度测定试剂盒(去垢剂兼容型)(中国碧云天有限公司),TBS干粉(中国博士德生物有限公司),70  $\mu$ m孔径尼龙细胞筛(美国Corning),脂多糖LPS(美国Sigma)。

### 1.2 方法

1.2.1 菌液OD值测定 将Ng接种于Ng选择培养基,置于37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h,用接种环挑取单个菌落于含10%胎牛血清的1640培养液中制成细菌悬液。以未加菌的培养液为空白对照液调零,波长450 nm测量OD值,选取OD值在0.6~1.0之间的菌液进行1:1.0、1:1.2、1:1.4、1:1.6、1:1.8、1:2.0梯度稀释,并测量其OD<sub>450</sub>值。

1.2.2 菌落平板计数 将按1:1.0、1:1.2、1:1.4、

1:1.6、1:1.8、1:2.0梯度稀释的各组菌液进行10、10<sup>2</sup>……10<sup>n</sup>倍比稀释,吸取1 mL稀释后的菌液均匀涂布于固体培养基上,置于37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h。选取培养基上菌落数为30~300个对应的稀释倍数为最佳稀释倍数,准确计数培养基上菌落数,再乘以稀释倍数10<sup>n</sup>,为1 mL菌液中的活菌数(CEU/mL),即菌液中Ng活菌的含量。

1.2.3 回归方程计算 以菌落数为y值,菌液OD<sub>450</sub>值为x值,计算相关回归方程。

1.2.4 小鼠脾脏单个核细胞获取 于超净工作台中无菌操作取出C57/BL6J小鼠脾脏,以PBS漂洗2次后,以磨砂玻片轻轻研磨,用细胞筛过滤获得悬浊液4 mL。将此悬浊液移至已盛有单个核细胞分离液的离心管中,悬浊液与单个核细胞分离液体积之比为1:4,以500 $\times$ g离心30 min,分4层,取上数第2层,即单个核细胞层。加入适量PBS液漂洗1次,加入红细胞裂解液2 mL,吹打混匀2 min,再加入PBS漂洗1次即可获得高纯度的单个核细胞。

1.2.5 RT-qPCR检测单个核细胞中IL-1 $\beta$ 、NLRP3 mRNA表达水平 将OD<sub>450</sub>值为0.2、0.6、1.0、1.4的Ng悬液与单个核细胞置于含10%胎牛血清的1640培养基中共培养1、2、6、12 h,此为实验组;设置不加入Ng的空白对照组计OD<sub>450</sub>值为0。培养结束后,采用梯度离心去除Ng,收集单个核细胞。运用Trizol法提取细胞总RNA,采用随机引物法反转录为cDNA,以SYBR Green核酸染料为荧光探针,用Real-time PCR检测细胞IL-1 $\beta$ 、NLRP3的mRNA表达。选取上调IL-1 $\beta$ 、NLRP3 mRNA表达量最高的OD<sub>450</sub>值的Ng悬液与单个核细胞置于含10%胎牛血清的1640培养基中共培养,并设立脂多糖LPS单阳性对照组,在培养0、1、2、6、12、24 h后分别收集单个核细胞,并采用梯度离心去除Ng。同样运用Trizol法提取细胞总RNA,采用随机引物法反转录为cDNA,以SYBR Green核酸染料为荧光探针,用Real-time PCR检测细胞IL-1 $\beta$ 、NLRP3 mRNA表达量。每个样品均设置3个复管,重复试验3次。分别测定对照组和试验组目的基因与内参基因的Ct值,实验结果取其均值,采用2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup>法对各组基因mRNA表达水平进行相对定量分析。

引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计,序列如下:IL-1 $\beta$ -F: 5' CTGCTGGTGTGTGACGTTCC3' \IL-1 $\beta$ -R: 5' ATATGGGTCCGACAGCACGA3'; NLRP3-F: 5' TGCACACAGTGGTGTTCAG3' \NLRP3-R: 5' TCACCTCTCGGCAGTGGATA3'; GAP

DH-F: 5' TGCACCACCAACTGCTTAG3' \GAPDH-R: 5' GGATGCAGGGATGATGTTTC3'.

1.2.6 蛋白免疫印迹检测 IL-1 $\beta$ 、NLRP3 表达 选取上调 IL-1 $\beta$ 、NLRP3 mRNA 表达水平最高的 OD<sub>450</sub> 值的 Ng 悬液与单个核细胞置于含 10% 胎牛血清的 1640 培养基中共培养,并设立脂多糖 LPS 单阳性对照组,在培养 0、1、2、6、12、24 h 后分别收集单个核细胞,并采用梯度离心去除 Ng。收集细胞悬液,通过裂解、离心留取上清作为样品,使用 Bradford 蛋白测定法检测总蛋白浓度。等量蛋白质上样、电泳、转膜,5% BSA 的 TBST 封闭液室温缓慢摇动 60 min。TBST 液快速洗涤 5 min,重复 3 次。加入一抗(工作液浓度为 1:1 000)室温摇床孵育 2 h,4 °C 过夜,洗膜,孵育二抗,洗膜,显影。结果分析:以 GAPDH 为内参,比较目的蛋白表达水平。

1.2.7 统计学处理 以 SPSS13.0 软件进行统计学处理,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,使用单因素方差分析及  $q$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 建立 NgOD<sub>450</sub> 值(x) - 活菌数(y) 回归方程

经过计数培养基上菌落数目,选择最佳稀释倍数为 106,计数此稀释倍数下不同 OD 值菌液接种于固体培养基上的菌落数,计算 OD 值与活菌数的回归方程(表 1)。

### 2.2 不同含量 Ng 悬液感染单个核细胞对 IL-1 $\beta$ 、NLRP3 mRNA 表达水平的影响

实时荧光定量 PCR 相对定量分析显示,将菌液

表 1 Ng 菌落平板计数

稀释度	1:1.0	1:1.2	1:1.4	1:1.6	1:1.8	1:2.0
OD 值	0.592	0.536	0.499	0.468	0.440	0.373
活菌数( $\times 10^6$ )	144	123	109	99	98	80
回归方程: $y=287.65x-30.583$ ; $r^2=0.9699$						

OD<sub>450</sub> 值为 0 的空白对照组 IL-1 $\beta$ 、NLRP3 mRNA 表达量设为 1,实验组 IL-1 $\beta$ 、NLRP3 mRNA 相对表达量随 Ng 含量升高出现先升高后下降的趋势,菌液 OD 值为 0.2 的实验组 IL-1 $\beta$  mRNA 相对表达量最高( $P < 0.01$ ),见表 2。OD 值为 0.2 的实验组 NLRP3 mRNA 相对表达量也最高( $P < 0.01$ ),见表 3。

### 2.3 Ng 感染单个核细胞不同时间点的 IL-1 $\beta$ 、NLRP3 表达

实时荧光定量 PCR 相对定量分析显示,将培养时间为 0 h 的 IL-1 $\beta$ 、NLRP3 mRNA 表达量设为 1,余时间点的 IL-1 $\beta$ 、NLRP3 mRNA 表达量随着培养时间延长出现先升高后下降的趋势,在培养 1 h 后,IL-1 $\beta$ 、NLRP3 mRNA 相对表达量最高( $P < 0.01$ ),见表 4; Western Blot 结果显示相同的变化趋势(图 1)。单阳性对照组的实时荧光定量 PCR 结果提示 IL-1 $\beta$ 、NLRP3 mRNA 表达量随着培养时间延长出现先升高后下降的趋势,在培养 1 h 后,IL-1 $\beta$ 、NLRP3 mRNA 相对表达量最高( $P < 0.01$ ),见表 5; Western Blot 结果显示 LPS 可上调 IL-1 $\beta$  分泌,随着时间推移没有出现降低趋势,NLRP3 随着时间推移出表达量有所降低(图 2),推测与蛋白翻译滞后于 mRNA 转录且 NLRP3 是 IL-1 $\beta$  上游蛋白有关。

表 2 不同含量 Ng 感染单个核细胞中 IL-1 $\beta$  的 mRNA 水平

( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=9$ )

组别	感染时间			
	1 h	2 h	6 h	12 h
A 组 (OD=0.0)	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
B 组 (OD=0.2)	13.47 $\pm$ 2.86 <sup>a</sup>	5.05 $\pm$ 2.86 <sup>a</sup>	4.42 $\pm$ 1.05 <sup>a</sup>	5.56 $\pm$ 2.02 <sup>a</sup>
C 组 (OD=0.6)	10.70 $\pm$ 2.86 <sup>a</sup>	1.76 $\pm$ 0.69 <sup>b</sup>	4.12 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup>	2.70 $\pm$ 0.90 <sup>ab</sup>
D 组 (OD=1.0)	12.31 $\pm$ 2.86 <sup>a</sup>	1.44 $\pm$ 0.24 <sup>b</sup>	3.43 $\pm$ 0.47 <sup>ab</sup>	1.57 $\pm$ 0.92 <sup>b</sup>
E 组 (OD=1.4)	8.32 $\pm$ 2.86 <sup>ab</sup>	1.52 $\pm$ 0.31 <sup>b</sup>	2.73 $\pm$ 0.27 <sup>ab</sup>	1.45 $\pm$ 0.95 <sup>b</sup>

在相同时间点:与 A 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与 B 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$

表 3 不同含量 Ng 感染单个核细胞中 NLRP3 的 mRNA 水平

( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=9$ )

组别	感染时间			
	1 h	2 h	6 h	12 h
A 组 (OD=0.0)	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
B 组 (OD=0.2)	6.97 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	5.26 $\pm$ 2.47 <sup>a</sup>	1.10 $\pm$ 0.60	0.70 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
C 组 (OD=0.6)	6.48 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	2.20 $\pm$ 0.85 <sup>b</sup>	0.66 $\pm$ 0.19	0.64 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>
D 组 (OD=1.0)	6.78 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	2.18 $\pm$ 0.48 <sup>b</sup>	0.89 $\pm$ 0.74	0.65 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>
E 组 (OD=1.4)	4.49 $\pm$ 0.19 <sup>ab</sup>	2.44 $\pm$ 0.49 <sup>b</sup>	0.65 $\pm$ 0.57	0.61 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>

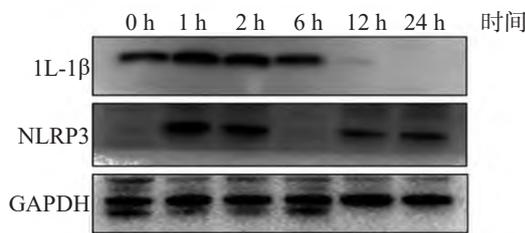
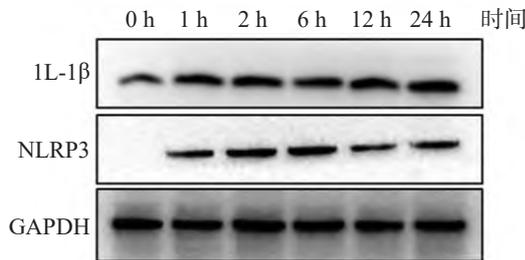
在相同时间点:与 A 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与 B 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$

表4 Ng感染单个核细胞不同时间后IL-1 $\beta$ 、NLRP3的mRNA水平 $(\bar{x} \pm s, n=9)$ 

组别	感染时间					
	0 h	1 h	2 h	6 h	12 h	24 h
IL-1 $\beta$	1.00 $\pm$ 0.00	4.26 $\pm$ 2.19 <sup>a</sup>	3.86 $\pm$ 2.20 <sup>a</sup>	1.73 $\pm$ 1.26 <sup>b</sup>	1.09 $\pm$ 0.80 <sup>b</sup>	0.30 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>
NLRP3	1.00 $\pm$ 0.00	4.23 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	2.94 $\pm$ 0.55 <sup>ab</sup>	1.09 $\pm$ 0.92 <sup>b</sup>	0.90 $\pm$ 1.05 <sup>b</sup>	0.48 $\pm$ 0.56 <sup>b</sup>

在同组中:与0 h比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与1 h比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ 表5 LPS单阳性对照组中IL-1 $\beta$ 、NLRP3的mRNA水平 $(\bar{x} \pm s, n=9)$ 

组别	感染时间					
	0 h	1 h	2 h	6 h	12 h	24 h
IL-1 $\beta$	1.00 $\pm$ 0.00	15.29 $\pm$ 2.64 <sup>a</sup>	15.79 $\pm$ 1.77 <sup>a</sup>	7.47 $\pm$ 2.01 <sup>a</sup>	3.37 $\pm$ 0.88 <sup>ab</sup>	1.42 $\pm$ 0.31 <sup>b</sup>
NLRP3	1.00 $\pm$ 0.00	6.17 $\pm$ 1.98 <sup>a</sup>	5.24 $\pm$ 2.00 <sup>a</sup>	3.63 $\pm$ 1.05 <sup>bc</sup>	2.11 $\pm$ 0.74 <sup>c</sup>	3.09 $\pm$ 0.60 <sup>bc</sup>

在同组中:与0 h比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与1 h比较,<sup>c</sup> $P<0.01$ 图1 Ng感染单个核细胞不同时间后单个核细胞中IL-1 $\beta$ 、NLRP3水平图2 LPS单阳性对照组中IL-1 $\beta$ 、NLRP3水平

### 3 讨论

淋病由Ng感染所致,是第二常见的细菌性传播疾病<sup>[2]</sup>。既往认为大多数淋球菌性泌尿生殖道感染的男性患者大多数是有症状的,而女性患者大多数为无症状感染<sup>[3-4]</sup>。然而有研究表明,Ng的无症状感染在男、女性中均常见<sup>[5-6]</sup>。女性无症状淋病患者易延误就医,常继发输卵管炎、盆腔炎、不育甚至播散性淋病,并增加HIV感染及传播的概率<sup>[7]</sup>。迄今,无症状淋病的病因尚未完全阐明,且目前淋病的治疗主要依赖注射用头孢曲松,缺乏推荐使用的高质量抗菌药物,Ng逐渐形成抗生素耐药,使得淋病的治疗具有挑战性和高度可变性<sup>[8]</sup>。由于受Ng现有组织培养和动物模型系统的限制,Ng赖以增殖复制的微环境的许多生态位未知<sup>[9]</sup>。因此,开展体外细胞实验研究针对Ng与宿主相

关免疫应答机制具有一定的意义,然而尚无文献为体外Ng感染细胞实验提供细菌含量和感染时间的参考依据。单个核细胞的分离技术便捷,使其成为众多免疫感染实验初步研究对象,本实验以小鼠脾脏单个核细胞为实验对象,研究Ng对IL-1 $\beta$ 、NLRP3基因表达的影响,以期为后续感染实验中选择Ng悬液含量和时间提供参考。

比浊计数是根据菌悬液的透光量间接地测定细菌的数量,细菌悬浮液的含量在一定范围内与透光度成反比,与光密度成正比。因此,可用分光光度计测定菌液,用光密度(OD值)表示样品菌液含量。有研究者对采用紫外—可见分光光度法测定对细菌含量进行动态监测,在一定范围内吸光度与细菌含量呈良好的线性关系<sup>[10-12]</sup>。但是比浊法只能测定相对细菌含量,不能得到确切活菌数值。本次试验中,采用比浊法结合菌落平板计数法,测定一系列已知OD值的菌悬液中活细菌数,作出光密度—活菌数标准曲线,进一步弥补比浊法计数的缺点,得到简便快速细菌计数的方法,制备一系列不同含量的Ng菌液。

Ng有粘附宿主黏膜的特性,感染人类泌尿生殖道,主要引起局部黏膜固有免疫反应,并且可以反复感染,而不产生免疫记忆<sup>[9]</sup>。Ng还能释放肽聚糖片段、外膜囊泡(membrane vesicles, OMVs)和脂寡糖(lipo-oligosaccharide, LOS),从而激活TLRs、NLRs,诱导产生多种细胞因子如IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 等<sup>[13]</sup>。IL-1 $\beta$ 是一种高效的促炎细胞因子,对宿主防御感染和损伤至关重要。无症状的淋病患者宫颈分泌的IL-1 $\beta$ 比有症状的患者要少得多<sup>[14]</sup>。NLRs是一种细胞内固有免疫受体,可识别和触发细菌感染的炎症<sup>[15]</sup>,而炎症是一种限制微生物感染的保护过程。NLRP3炎症小体是细胞溶质多蛋白复合物,由传感蛋白NLRP3、接头蛋白—凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-

associated speck-like protein containing a CARD, ASC) 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1 (Caspase-1) 组成, 充当着固有免疫系统传感器<sup>[16]</sup>。NLRP3 可以被多种激活物激活包括 ATP、活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS)、尼日利亚菌素 (nigericin)<sup>[17]</sup>。Ng 可激活 NLRP3 炎症小体, 被触发后, 炎症小体通过激活 Casp-1 切割 IL-1 $\beta$  前体、IL-18 前体, 产生成熟 IL-1 $\beta$ 、IL-18, 并诱导细胞焦亡 (pyroptosis)<sup>[18]</sup>。有研究表明, 黄体酮可抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路并下调 ROS, 抑制 Ng 诱导的 NLRP3 的激活和 IL-1 $\beta$  的形成<sup>[19]</sup>。本实验通过检测被不同含量 Ng 感染的单个核细胞中 IL-1 $\beta$ 、NLRP3 表达, 发现在菌液 OD<sub>450</sub> 值为 0.2, 即活菌数为 2.69 $\times$ 10<sup>7</sup> CFU/mL 时, 单个核细胞 IL-1 $\beta$ 、NLRP3 mRNA 表达水平最高, 可以推测在此含量下, 单个核细胞对 Ng 引起免疫应答效应较大, 可以将此细菌含量进行后续体外针对 Ng 免疫应答实验。将 Ng (OD<sub>450</sub> 值=0.2) 与单个核细胞进行连续时间培养, 发现在 1 h 后, 单个核细胞 IL-1 $\beta$ 、NLRP3 基因相对表达量最高, 推测在 Ng 感染 1 h 后单个核细胞的免疫效应较大。本研究为日后 Ng 感染单核细胞实验提供了可靠的活菌定量方法, 为 Ng 感染单个核细胞实验提供了细菌含量和感染时间的参考依据, 我们研究还发现 LPS 刺激单个核细胞表达 IL-1 $\beta$ 、NLRP3 比较稳定, 24 h 两者仍表达较高, 但活菌实验 12 h 后 IL-1 $\beta$ 、NLRP3 表达下降, 考虑是活菌实验时单核细胞杀灭 Ng 后炎症因子表达下降所致。笔者认为活菌实验能更好模拟感染过程, 更有利于观察单核细胞抗 Ng 感染动态过程, 研究者应考虑不同需求选择不同的实验方法。

#### 参考文献:

- [1] VINCENT L R, JERSE A E. Biological feasibility and importance of a gonorrhea vaccine for global public health[J]. *Vaccine*, 2019, 37(50): 7419-7426.
- [2] Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guideline[S]. *MMWR*, 2021, 70(4): 65-70.
- [3] BOZICEVIC I, FENTON K A, MARTIN I M, et al. Epidemiological correlates of asymptomatic gonorrhea[J]. *Sex Transm Dis*, 2006, 33(5): 289-295.
- [4] 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.
- [5] XIONG M, LAN L, FENG T, et al. Analysis of the sex ratio of reported gonorrhoea incidence in Shenzhen, China[J]. *BMJ Open*, 2016, 6(3): e009629.
- [6] DETELS R, GREEN A M, KLAUSNER J D, et al. The incidence and correlates of symptomatic and asymptomatic *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections in selected populations in five countries[J]. *Sex Transm Dis*, 2011, 38(6): 503.
- [7] KABAPY A F, SHATAT H Z, ABD EL-WAHAB E W. Attributes of HIV infection over decades (1982–2018): A systematic review and meta-analysis[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2020, 67(6): 2372-2388.
- [8] UNEMO M, SEIFERT H S, HOOK E W, et al. Gonorrhoea[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5(1): 1-23.
- [9] QUILLIN S J, SEIFERT H S. *Neisseria gonorrhoeae* host adaptation and pathogenesis[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2018, 16(4): 226-240.
- [10] 肖敏, 杨峰, 王旭荣, 等. 分光光度法测定金黄色葡萄球菌菌液浓度方法的建立[J]. *动物医学进展*, 2014, 35(11): 40-43.
- [11] 董自艳, 戴翠, 马仕洪, 等. 紫外—可见分光光度法快速确定细菌菌液的浓度[J]. *中国药品标准*, 2014, 15(20): 120-121.
- [12] 王青, 徐彦召, 杨磊, 等. 一种广谱, 低毒的抗菌肽类似物 HJH-3 的生物学活性和膜活性的测定[J]. *中国预防兽医学报*, 2019, 41(8): 800-806.
- [13] YANG Y, LIU S, LIU J, et al. Inhibition of TLR2/TLR4 alleviates the *Neisseria gonorrhoeae* infection damage in human endometrial epithelial cells via Nrf2 and NF- $\kappa$ B signaling[J]. *J Reprod Immunol*, 2020, 142: 103192.
- [14] WU Z, XU L, TU Y, et al. The relationship between the symptoms of female gonococcal infections and serum progesterone level and the genotypes of *Neisseria gonorrhoeae* multi-antigen sequence type (NG-MAST) in Wuhan, China[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2011, 30(1): 113-116.
- [15] LIAO K C, SANDALL C F, CARLSON D A, et al. Application of immobilized ATP to the study of NLRP inflammasomes[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2019, 670: 104-115.
- [16] VERMA V, DHANDA R S, MØLLER N F, et al. Inflammasomes and their role in innate immunity of sexually transmitted infections[J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 540.
- [17] STUTZ A, KOLBE C C, STAHL R, et al. NLRP3 inflammasome assembly is regulated by phosphorylation of the pyrin domain[J]. *J Exp Med*, 2017, 214(6): 1725-1736.
- [18] LI L H, LIN J S, CHIU H W, et al. Mechanistic insight into the activation of the NLRP3 inflammasome by *Neisseria gonorrhoeae* in macrophages[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1815.
- [19] ZHANG S, ZHANG Y, GAN L, et al. Progesterone suppresses *Neisseria gonorrhoeae* induced inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome pathway in THP-1 cells and murine models[J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 570093.