

Toll 样受体抗体抑制脂多糖激活巨噬细胞的吞噬活性*

王梁华 冯煜 钟山 朱玉平 娄永华 焦炳华**

(第二军医大学基础医学部卫生毒理学教研室, 上海 200433)

摘要 应用脂多糖 (LPS) 激活巨噬细胞后其吞噬能力大大增强, 以此为模型发现 TLR2 的多抗能部分抑制 LPS 激活巨噬细胞吞噬金葡萄球菌的能力, 也能部分阻断对 U937 细胞的吞噬活性. TRAIL 或 TNF α 多克隆抗体同样能起到类似作用. 实验还发现低浓度血清培养亦在一定程度上抑制 LPS 激活巨噬细胞的吞噬作用. 结果证实 TLR2 能介导 LPS 的功能, 而某些血清因子参与了介导 LPS 的信号转导过程, 提示 LPS 激活巨噬细胞吞噬能力的提高与诱导表达 TRAIL 等细胞因子有关.

关键词 脂多糖, TLR2, 抗体, 巨噬细胞, TRAIL, TNF α

学科分类号 R392

免疫系统的识别是由识别病原相关分子受体介导的, 这些受体所激活的信号与各种免疫应答所要表达的基因有关. 这些受体根据功能可分为三类: 信号受体、内吞受体及分泌蛋白. 内吞受体与分泌蛋白的作用已较明确, 如抗体、补体参与的病原体或病原分子的内吞. 但病原识别的直接信号受体直到最近随着发现 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs), 在果蝇和哺乳动物的宿主防御中的重要作用后才逐渐被确立, 因为 TLRs 所激活的细胞内信号正是控制着各种效应基因表达的转录因子 NF- κ B^[1,2].

TLRs 介导着绝大部分哺乳动物、昆虫及植物的宿主防御. TLR2 是最先报道介导脂多糖 (LPS) 信号的分子^[3], 后来发现 TLR4 也能识别各种病原分子^[4], TLR4 基因突变小鼠的实验结果也证实了这一点^[5]; 最近发现 TLR2 能特异识别某些病原分子^[6]. 但 TLR2 与 TLR4 信号转导的中间一些过程及其他的 TLRs 分子所结合的配体与信号转导过程还不是很清楚^[1,2]. 本文应用 LPS 激活的巨噬细胞对细菌与肿瘤细胞的吞噬能力作为指标, 观察了 TLR2 等抗体对其抑制作用.

1 材料与方法

1.1 外周血单个核淋巴细胞 (PBMC) 分离、培养

新鲜抽取的健康志愿者抗凝外周全血, 置于 250 $^{\circ}$ C 干烤 4 h 以上的试管中, 经淋巴细胞分离液

梯度离心 (4 $^{\circ}$ C, 400 \times g, 30 min) 取界面细胞, 用无钙镁 PBS (pH 7.2) 悬浮细胞, 离心 (650 \times g, 10 min) 洗细胞两次, 1640 培养基 (含 10% 人 AB 型血清) 悬浮细胞, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 孵箱培养 2 h 后, 吸弃培养上清, 用预热的培养基轻轻洗细胞去除非贴壁细胞, 即获得贴壁的单核细胞. 体外培养 7 d, 每两天换新鲜 RPMI 1640 (含 10% 人 AB 型血清), 7 d 后即单核细胞来源的人巨噬细胞.

1.2 LPS, 细菌及计数

酚水法抽提、三乙胺电透析转化的 *Salmonella minnesota Re595* LPS^[7], 1 g/L - 20 $^{\circ}$ C 冻存备用. 蛋白质、核酸含量 < 0.01%.

将金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, SA) (本室保存) 37 $^{\circ}$ C 扩大培养 18 h. 用有限稀释法测定细菌浓度, 即 4000 r/min 离心 10 min, 悬于适量 PBS (pH 7.2), 取 0.1 ml 作有限稀释, 铺涂于 LB 板, 18 h 后计数.

1.3 抗 TLR2 抗血清的制备与初步纯化

人 TLR2 细胞外区域的重组表达质粒 pBlue-Script-TLR2 由 HGS 倪建博士赠送. 酶切鉴定后, 转化大肠杆菌 K802, IPTG 诱导表达 4 h. 离心收集细菌, 超声破碎, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 分析表达. 确认后, 作制备性电泳, 小心

* 国家自然科学基金资助项目 (39970041).

** 通讯联系人.

Tel: 021-65493936, E-mail: jiaobh@uninet.com.cn

收稿日期: 2000-06-12, 接受日期: 2000-08-23

切下重组表达条带 (反复多次后, 合计重组蛋白约含 0.5 mg), 磨碎后与完全福氏佐剂充分混合, 得乳化液 2 ml, 多点皮内注射于小鼠, 每周免疫一次. 三星期后用初步纯化的 TLR2 尾静脉冲击, 心脏采血, 得到全血约 5 ml. 离心 10 000 r/min, 30 min, 得到血清 3 ml, 即为抗血清.

以硫酸铵法制备抗 TLR2 的多克隆抗体, 分装冻存备用. 酶联免疫 (ELISA) 检测免疫血清或多克隆抗体抗 TLR2 活性, 确定免疫效价. 抗原为重组表达 TLR2 的粗提物 (1 g/L), 二抗为 HRP 标记的兔抗鼠酶标二抗 (华美公司), 以 PBS 作为抗血清或抗体的阴性对照. 结果判定: 样品 $A_{492} \geq$ 阴性对照 A_{492} 二倍以上者, 判定为阳性, 根据阳性反应的抗体溶液稀释最大倍数的倒数计算出效价.

1.4 TLR2 多抗阻断巨噬细胞的吞噬作用

不经任何刺激的巨噬细胞为正常组; 经 100 μ g/L LPS 刺激的为 LPS 组; 加入 1:1 000 TLR2 多抗和 100 μ g/L LPS 37 $^{\circ}$ C 共同孵育 3 h 刺激的为 TLR2Ab 组. 在加入 SA 后孵育 15、60、120 min 后室温离心 800 r/min, 15 min, 取上清, 同 1.2 计数. 吞噬率计算: $(1 - CFU_{\text{实验组}} / CFU_{\text{LPS组}}) \times 100\%$. 巨噬细胞对肿瘤细胞株 U937 的吞噬实验分组同上, 取共孵育 18 h 一个时间点. 结晶紫法测上清与对照 A_{595} 值可估算活细胞数. 吞噬率 = $(1 - A_{595}(\text{实验组}) / A_{595}(\text{LPS 组})) \times 100\%$. 每组实验重复 5 次.

1.5 分析 TRAIL 与 TNF α 多抗的作用

TRAIL 羊抗人多抗 (Santa Cruz) 1:1 000 稀释; TNF α 兔抗人多抗本室制备^[8], 1:5 000 稀释, 进行阻断实验. 实验分组如 1.4.

1.6 数据统计处理

以 *t* 检验比较相应组间平均吞噬率 (%) 差异的显著性, $P < 0.05$ 为显著, $P < 0.01$ 为非常显著.

2 结 果

2.1 抗 TLR2 多克隆抗体效价的确定

重组表达的 TLR2 经制备性 SDS-PAGE, 割胶得到 TLR2 抗原, 免疫小鼠后得到 TLR2 多克隆抗体. ELISA 分析其效价为 1×10^4 : 5×10^4 . 图 1 显示了 SDS-PAGE 分析重组表达 TLR2 结果. 用 ELISA 检测抗体效价的结果见图 2.

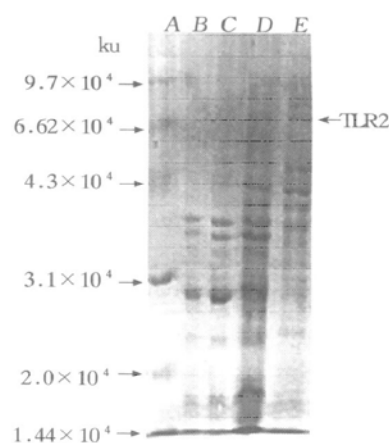


Fig. 1 Analyzed expression of TLR2 by SDS PAGE

A: protein marker; B, C: recombinant TRAIL; D: before induced by IPTG; E: induced by IPTG.

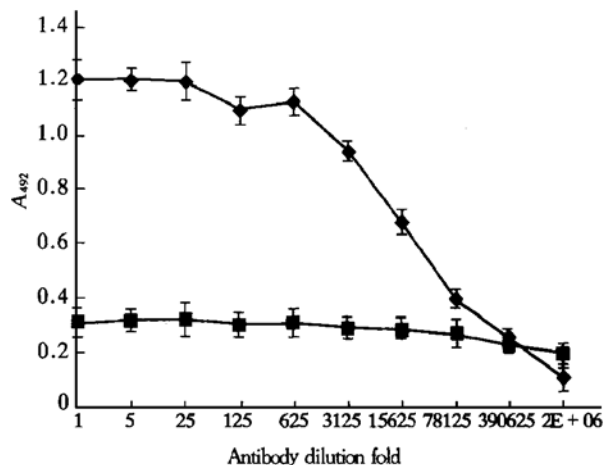


Fig. 2 Analyzed titer of polyclone antibodies to TLR2 by ELISA

■ — ■: PBS; ◆ — ◆: anti-TLR2 Ab.

2.2 多抗对巨噬细胞吞噬 SA 的影响

体外培养 7 d 的 PBMC 以 2×10^6 /孔接种于 16 孔板, 4 h 后加入 2×10^8 /ml 的 SA, 分别共孵育 15、60、120 min, 轻微震荡, 吸出上清作有限稀释培养, 计算菌落数. 得到的吞噬率结果见图 3. 结果表明, LPS 组巨噬细胞对金黄色葡萄球菌在 120 min 时吞噬率达到 $87.25\% \pm 4.4\%$; 用 TRAIL 多抗和 TNF α 多抗后, 巨噬细胞对金黄色葡萄球菌在 120 min 时的吞噬率分别下降为 $56.12\% \pm 5.76\%$ 和 $53.51\% \pm 5.3\%$, 两组与 LPS 组皆有非常显著差异 ($P < 0.01$). 与正常组亦有非常显著差异 ($P < 0.01$), 说明 TRAIL 抗体或 TNF α 抗体能部分阻断 LPS 激活的巨噬细胞对 SA 吞噬作用,

提示 LPS 在激活巨噬细胞的机理中还有其他效应分子参与增强其对 SA 的吞噬能力. 用 TLR2 的多抗 (1:1 000 稀释) 也能部分阻断巨噬细胞的吞噬作用, 吞噬率为 $43.25\% \pm 5.28\%$, 与 LPS 刺激组有非常显著差异 ($P < 0.01$), 与未刺激组亦有显著差异 ($P < 0.05$, 图 3). 提示除 TLR2 途径外 LPS 可能还有其他激活巨噬细胞的途径, 从而增强其吞噬能力.

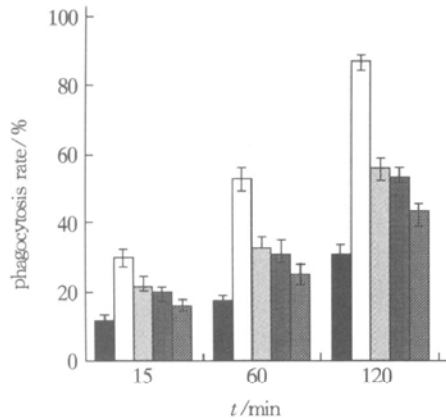


Fig.3 Inhibited phagocytosis to SA of LPS-activated macrophages by antibodies of TLR2, TRAIL and TNF α

■ : normal; □ : LPS; ▨ : LPS+TLR2Ab; ▩ : LPS+TNF α ;
 ■ : LPS+TLR2Ab.

2.3 多抗对巨噬细胞吞噬 U937 的影响

体外培养 7 d 的 PBMC 以 2×10^6 /孔种于 16 孔板, 4 h 后, 加入 2×10^6 /ml 的 U937 细胞, 共孵育 18 h 后, 轻微震荡, 吸出上清至 96 孔板上以结晶紫法染色, 595 nm 下读 A 值. 得到的巨噬细胞吞噬率结果如图 4. 结果表明, LPS 组巨噬细胞对 U937 的吞噬率达到 $37.9\% \pm 1.8\%$; 应用 TRAIL 多抗和 TNF α 多抗后, 巨噬细胞对 U937 的吞噬率分别下降为 $22.5\% \pm 2.9\%$ 和 $28.6\% \pm 3.1\%$, 两

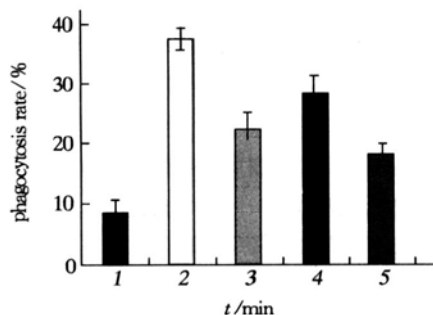


Fig.4 TLR2, Inhibited phagocytosis to U937 cells of LPS-activated macrophages by antibodies of TLR2, TRAIL and TNF α

1: normal; 2: LPS; 3: TRAILAb; 4: TNF α ; 5: TLR2Ab.

者与 LPS 组皆有非常显著差异 ($P < 0.01$), 与正常组巨噬细胞 ($8.4\% \pm 2.1\%$) 相比也有非常显著差异 ($P < 0.01$), 说明 TRAIL 抗体或 TNF 抗体能部分阻断由 LPS 激活的巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬作用. TLR2 抗体 (1:1 000 稀释) 也能部分阻断巨噬细胞的吞噬作用, 吞噬率为 $18.5\% \pm 3.2\%$, 与 LPS 组有非常显著差异 ($P < 0.01$), 与正常组亦有差异 ($P < 0.01$, 图 4).

2.4 血清影响多抗阻断巨噬细胞吞噬 SA

已知血清中存在的某些因子参与 LPS 激活细胞的作用, 我们通过降低细胞培养时的血清浓度以观察血清因子浓度对 TLR2 与 LPS 作用的影响.

结果发现低浓度血清 (1%) 培养的巨噬细胞不管是 LPS 组还是各抗体组, 对 SA 的吞噬作用均明显减弱, 与上述 10% 血清培养的巨噬细胞吞噬金葡萄球菌作用有显著差异; 用 TLR2 多克隆抗体阻断后吞噬能力进一步降低, 与 LPS 组有非常显著差异 (图 3 和图 5). 证实血清中某些因子参与 LPS 与细胞结合从而激活效应细胞. 实验进一步发现, 尽管低浓度时各实验组巨噬细胞对 SA 的吞噬作用普遍下降, 但高、低血清浓度的 TRAIL 和 TNF α 抗体组对巨噬细胞吞噬的抑制率无显著差异 ($P > 0.05$), 即只要有血清存在 (1% 或 10%), 在同样浓度的 LPS 刺激下抗体所阻断的吞噬率基本相同. TNF α 是 LPS 作用细胞后的效应分子, 而 TRAIL 也是 LPS 激活细胞后的诱导物之一^[9]. 提示 LPS 激活细胞产生效应所需的效应分子浓度不必很高, 或低浓度的 LPS 与细胞结合即可启动细胞效应, 而并不需要高浓度血清因子的参与.

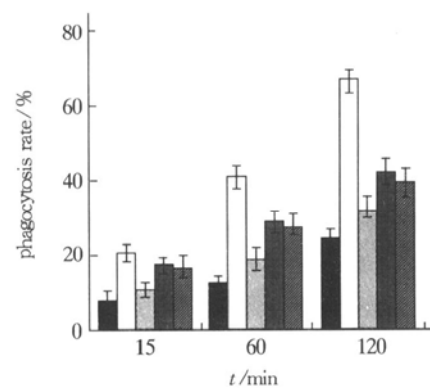


Fig.5 Inhibited phagocytosis to SA of LPS-activated macrophages by antibodies in low serum concentration (1%)

■ : normal; □ : LPS; ▨ : LPS+TLR2Ab; ▩ : LPS+TRAILAb;
 ■ : LPS+TNF α .

综合上述实验, 我们推测 LPS 与 TLR2 结合时需血清因子参与. 因为不同血清浓度、同样效价的 TLR2 多克隆抗体阻断 LPS 的吞噬作用有明显差异; 而 LPS 一旦激活细胞诱导产生效应分子后, 血清浓度的高低对吞噬作用影响并不大.

3 讨 论

3.1 TLR2 多克隆抗体的制备

用 SDS-PAGE 分离和割胶的方法制备高纯度抗原快速、效率高. 胶割下后, 所需抗原存在于聚丙烯酰胺内, 后者又是极好的佐剂, 可增加抗原的免疫原性, 加上用含卡介苗 (BCG) 的完全福氏佐剂超声匀浆混合后免疫小鼠, 可获得高滴度的抗体. 本实验应用此法制备的多克隆抗体效价达 1.5×10^4 (ELISA), 充分说明了用割胶法制备抗原, 免疫动物制备抗体是可行和高效的.

3.2 巨噬细胞吞噬能力的增强

本实验结果表明, LPS 激活细胞后, 诱导产生的死亡因子 TRAIL 与 TNF α 可以增强细胞本身的吞噬能力. 现在知道, TRAIL 和 TNF α 本身并无杀菌作用, 而是通过进一步激活自身或旁细胞, 释放效应因子如穿孔素和超氧离子等从而起到抗菌作用. 有人证实, 细菌的外膜成分或 LPS 可诱导 NK 细胞与 T 细胞表达 Fas, 这些细胞对各种肿瘤细胞的吞噬能力明显增强, 比未激活的细胞约高 5~10 倍^[10]. 我们的实验证明, 外周巨噬细胞对细菌的吞噬也与 TRAIL 和 TNF α 的诱导表达有关, 应用 TRAIL 和 TNF α 多克隆抗体阻断后, 巨噬细胞的吞噬能力明显减弱.

实验中我们只选择了一种具有代表性的 SA. 这是因为如应用革兰阴性菌, 则细菌本身的某些成分 (如外膜或外膜中的 LPS) 可能影响实验而不利于结果的分析.

本实验还观察了巨噬细胞对肿瘤细胞 U937 的作用. 结果发现 LPS 能增强巨噬细胞对其的吞噬. 应用 TRAIL 或 TNF α 的多抗能部分阻断这种作用. 提示 LPS 激活巨噬细胞后, 亦可能是由诱导产生的死亡因子介导增强激活巨噬细胞吞噬能力的作用. 另一方面, 巨噬细胞受到刺激后所释放的死亡因子亦可发挥其他的生物学作用, 如 TNF α 与 TRAIL 皆可杀伤 U937 细胞. 我们先前的试验已证实 LPS 刺激 U937 细胞也能诱导表达死亡因子 TRAIL, 18h 时可观察到部分细胞溶溃、死亡, 但总细胞数并不减少. 分析可能是 LPS 同时也激活细胞分裂增

殖^[10]. U937 细胞已被证实表达 TLR2, 所以在观察巨噬细胞对 U937 细胞作用时, 应考虑 LPS 对 U937 细胞的综合作用.

3.3 LPS 的信号转导与 TLR2 有关

LPS 诱导各种效应因子表达的机理目前仍不清楚, 可能的途径是 LPS 在血清中内毒素结合蛋白 (LPS binding protein, LBP) 的作用下解聚形成单体并形成复合物, 结合于细胞膜上 CD14 分子, 进一步转呈 LPS 至真正受体而引起信号转导^[11]. 最新的研究发现 TLR2、4 参与 LPS 的信号转导, 而 TLR 是一类非常古老的分子, 它们所介导的作用与一切后生动物防御外界物质的感染或侵入有关^[1,2]. 本实验结果显示 TLR2 介导了 LPS 对细胞的作用, 应用 TLR2 抗体可部分阻断 LPS 激活的巨噬细胞对 SA 和 U937 的吞噬效应. 而 TLR2 抗体和 TRAIL 抗体或 TNF α 抗体可能作用于 LPS 刺激细胞的整个信号途径的不同环节. 图 6 的结果显示, 当 TLR2 抗体与 TRAIL 抗体或 TNF 抗体联合

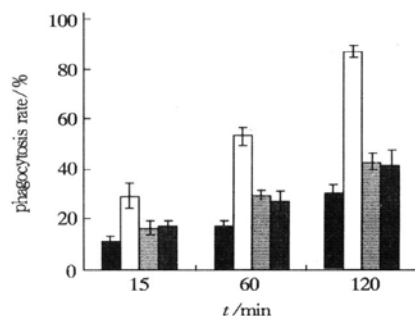


Fig.6 Inhibited phagocytosis to SA of LPS-activated macrophages by combined with the different antibodies

■ : normal; □ : LPS(100 μg/L); ▨ : TLR2Ab + TRAILAb; ▩ : TLR2 + TNFAb.

作用于 LPS 激活的巨噬细胞时, 与单用 TLR2 抗体阻断的效应无显著差异 (图 3), 同时也不能完全阻断巨噬细胞的作用, 即不管是联合还是单独应用抗体, LPS 激活的巨噬细胞吞噬 SA 的作用均较未激活的巨噬细胞高得多 ($P < 0.05$), 这就充分证实了上述抗体可能作用于不同的环节; 并提示 LPS 作用于细胞可能有其他的途径存在.

血清因子在 LPS 信号转导中起着重要的作用. 已有的资料表明, LBP 和可溶性 CD14 对 LPS 结合于效应细胞上是必需的. 我们的实验也证实了这一点. 无血清培养的细胞需较高浓度的 LPS 才能激活细胞; 由此有人提出在细胞膜上可能存在不同亲和

力的 LPS 受体;但也有资料证实高浓度的 LPS 可以直接与细胞膜融合,从而发挥作用.本实验选择浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的 LPS 激活细胞就是想充分观察 LPS 激活细胞的作用,因小鼠或人体液中 LPS 达到如此高的浓度,足以致小鼠或人于死地;而体外无血清细胞培养实验表明不管是低亲和力受体还是与膜融合都需高浓度的 LPS^[11].实验结果如预计的那样,血清浓度的高低对 LPS 激活后的巨噬细胞吞噬能力有明显的影响.

当然,LPS 作用机制相当复杂.以 TLRs 家族为突破口,研究清楚 LPS 的作用途径和效应可以为基础研究与临床提供许多有益的资料,对防治内毒素休克等有重要意义.

参 考 文 献

- 1 王梁华,司与红,焦炳华. Toll 样受体及其信号转导. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28 (3): 304~ 308
Wang L H, Si Y H, Jiao B H. Prog Biochem Biophys, 2001, 28 (3): 304~ 308
- 2 Bowie A, O'Neill L A. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. J Leukoc Biol, 2000, 67 (4): 508~ 514
- 3 Yang R B, Mark M R, Gray A, et al. Toll-like receptor 2 mediates lipopolysaccharide induced cellular signalling. Nature, 1998, 395 (6699): 284~ 288
- 4 Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. Immunity, 1999, 11 (4): 443~ 451
- 5 Poltorak A H, Xialong H, Sminova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. Science, 1998, 282 (5396): 2085~ 2088
- 6 Flo T H, Halaas O, Lien E, et al. Human toll-like receptor 2 mediates monocyte activation by *Listeria monocytogenes*, but not by group B streptococci or lipopolysaccharide. J Immunol, 2000, 164 (4): 2064~ 2069
- 7 Galanos C, Jiao B, Freudenberg M A. Fractionation of smooth-form lipopolysaccharide, chemical and biological characterization of the fractions. J Chromatogra, 1988, 440 (2): 397~ 404
- 8 周丙荣,焦炳华. 人基因重组肿瘤坏死因子单克隆抗体的研制. 第二军医大学学报, 1990, 3 (2): 216~ 219
Zhou B R, Jiao B H. Acad J Sec Med Univ, 1990, 3 (2): 216~ 219
- 9 王梁华,朱玉平,潘卫,等. 肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体的克隆与表达. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15 (4): 667~ 670
Wang L H, Zhu Y P, Pan W, et al. Chin J Biochem Mol Biol, 1999, 15 (4): 667~ 670
- 10 Halaas O, Vik R, Espevik T. Induction of Fas ligand in murine bone marrow NK cells by bacterial polysaccharides. J Immunol, 1998, 160 (11): 4330~ 4336
- 11 焦炳华,王梁华,周丙荣,等. 细菌内毒素的结构与功能. 见:曾庆贵,等编. 中华内科理论与实践. 成都:四川科学技术出版社, 1998, 5: 567~ 573
Jiao B H, Wang L H, Zhou B R, et al. The structure and function of endotoxin. In: Zeng Q G eds. Theory and Practice of Chin Internal Med. Chengdu: Si Chuan Science and Technology Press, 1998, V. 567~ 573

The Inhibition on Phagocytosis of Lipopolysaccharide-stimulated Macrophages by Polyclone Antibody of TLR2*

WANG Liang-Hua, FENG Yu, ZHONG Shan, ZHU Yu-Ping, LOU Yong-Hua, JIAO Bing-Hua**

(Department of Health Toxicology, College of Basic Medicine, Second Military of Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract The phagocytosis to *Staphylococcus aureus* (SA) and cultivated U937 cells by macrophages derived from PBMC was enhanced significantly under lipopolysaccharide (LPS) stimulation. The present experiment showed that the application polyclone antibodies to TLR2 suppressed partly the phagocytosis of macrophages in this model. The LPS-enhanced phagocytosis could be further blocked partly by polyclone antibodies to TRAIL or TNF α . Cells cultivated in a lower serum concentration (1%) was also shown to be a decreased phagocytosis. The results confirmed that TLR2 was a LPS receptor which mediated its signal transduction, while some serum factors participated in the binding of LPS to its membrane receptors. It further suggested that LPS induced effectors such as TRAIL and TNF α might be the key mediators involved in the mechanisms of LPS-enhanced phagocytosis.

Key words lipopolysaccharide (LPS), TLR2, antibody, macrophage, TRAIL, TNF α

* This work was supported by a grant from National Natural Sciences Foundation of China (39970041).

** Corresponding author. Tel: 86-21-65493936, E-mail: jiaobh@uninet.com.cn

Received: June 12, 2000 Accepted: August 23, 2000