

一氧化氮参与附睾上皮细胞感染后的宿主防御*

赵云涛^{1,2}, 郭景慧¹, 陈璇³, 伍忠奎¹, 周文良¹

(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275; 2. 广东海洋大学现代生化中心, 广东 湛江 524088;
3. 中山大学附属第二医院; 广东 广州 510120)

摘要: 以金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 感染附睾上皮细胞的体外感染模型, 分别采用 RT-PCR 和 western blot 等方法研究一氧化氮 (NO) 在附睾上皮细胞宿主防御中的作用。结果表明附睾上皮感染后上调 iNOS RNA 和蛋白水平的表达, 并产生大量的 NO, 采用 iNOS 的抑制剂 L-NMMA 和 AGE 预处理后, NO 水平显著降低, 与空白处理组相比, 抑制剂处理组的 *S. aureus* 数量显著增加, 这表明 NO 参与了附睾上皮细胞的宿主防御过程, 在附睾上皮细胞的宿主防御中具有重要的作用。

关键词: 附睾上皮细胞; 一氧化氮; 宿主防御

中图分类号: Q492.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2009) 03-0084-05

Nitric Oxide Is Involved in Host Defense of Epididymal Epithelial Cells

ZHAO Yuntao^{1,2}, GUO Jinghui¹, CHEN Xuan³, WU Zhongkui¹, ZHOU Wenliang¹

(1. School of Life Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;
2. Modern Biochemistry Center, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;
3. Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

abstract: To investigate the role of nitric oxide (NO) in the host defense of epididymal epithelial cells, an *in vitro* infection model, RT-PCR and western blot were carried out. We found that NO could be secreted significantly by the primary cultured rat epididymal epithelia infected with *Staphylococcus aureus*. Epididymal epithelial induced nitric oxide synthase (iNOS) expression was up-regulated significantly after *S. aureus* infection at mRNA and protein levels compared with control. With Aminoguanidine (AGE) or NG-Monomethyl-L-arginine (L-NMMA) pretreatment, NO production was reduced and the number of *S. aureus* was enhanced accordingly. With these results we concluded that NO play a crucial role in host defense of epididymal epithelial cells.

Key words: epididymal epithelial cells; nitric oxide; host defense

附睾是精子成熟发育和储存的场所, 目前认为其具有负责运送精子、浓缩精液、使精子成熟及保护精子等多种作用^[1]。附睾发生病原感染和炎症后严重危害男性生殖健康。已知大肠杆菌、葡萄球菌、链球菌、病毒以及衣原体、淋病、梅毒等性传播疾病都会导致附睾炎^[2-4]。附睾上皮细胞在附睾炎的发病过程中具有重要调节作用。

附睾上皮扮演了同其他上皮相似的角色, 附睾

上皮细胞分泌大量的抗菌物质, 如防御素、溶菌酶、Mucin 等协同杀死入侵病原生物以保护附睾免受感染^[5]。大量研究表明 NO 是炎症过程中的一种重要分子, 其能杀死入侵的病源生物, 从而维护机体的稳态, 在上皮细胞宿主防御中具有重要的作用^[6-8]。NO 在生物体内主要由一氧化氮合酶 (NOS) 催化合成, NOS 广泛分布于机体各处, 其有 3 种亚型: 神经元型 (nNOS)、内皮型 (eNOS)

* 收稿日期: 2008-08-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30570229, 30770817)

作者简介: 赵云涛 (1975 年生), 男, 助理研究员; 通讯作者: 周文良; E-mail: lsszw1@yahoo.com.cn

和诱导型(iNOS)。nNOS和eNOS为组成性表达,其催化L-精氨酸产生NO参与细胞信号的转导和功能调节;iNOS一般表达很弱,病理状态如炎症状态下多种细胞因子激活核因子NF- κ B,上调iNOS表达引起NO合成增加^[9-10],高浓度的NO能杀死入侵的病原生物以维持机体的稳态。

目前NO在附睾上皮细胞宿主防御中的作用还不清楚,为此,本研究以体外*S. aureus*感染原代培养的大鼠附睾上皮细胞为模型,并分别采用药理学手段、RT-PCR和western blot技术研究NO在附睾上皮细胞宿主防御中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级雄性SD大鼠(体质量120~150 g)购自广东省实验动物中心。

1.2 药品

Trizol和Ex Taq DNA聚合酶购自TaKaRa公司,M-MLV逆转录酶、Oligo(dT)18、dNTP及RNA酶抑制剂购自promega公司。双氢睾酮、丙酮酸钠、胶原蛋白酶、购于Sigma公司。EMEM培养基干粉、 $w=0.25\%$ 的胰蛋白酶、HBSS、FBS、双抗购自GIBCO公司。抗iNOS抗体、抗GAPDH抗体购自美国SANTA CRUZ公司;HRP标记的抗兔二抗和抗山羊二抗购自北京中杉生物科技公司。化学发光试剂盒购自美国PIERCE公司。牛血清白蛋白、Tween 20、SDS、Triton X100、过硫酸铵、Tris等购自Amresco公司。

1.3 附睾上皮细胞的原代培养

参考Wong的方法^[11],具体步骤如下:雄性SD大鼠采用CO₂处死,迅速于无菌条件下取大鼠附睾尾部,HBSS液洗涤3次;用剪刀充分剪碎附睾尾部组织至糜状,转移入 $w=0.25\%$ 的胰蛋白酶中,于32℃震荡消化30 min;1 000 r/min离心,去除胰蛋白酶,组织块转移到1 mg/mL的胶原蛋白酶中,于32℃震荡消化60 min;1 000 r/min离心,去除胶原蛋白酶,用EMEM完全培养基洗涤细胞,离心,去上清;加入4 mL EMEM完全培养基,打散细胞,转移入25 mL培养瓶中,于32℃, $\varphi=5.0\%$ CO₂的培养箱中培养4~6 h;4~6 h后,平滑肌细胞、成纤维细胞等其他非上皮细胞贴壁,而上皮细胞尚未贴壁,吸出未贴壁的细胞,此细胞即为附睾上皮细胞,分别种于6孔板、12孔板,加入EMEM完全培养基,于32℃, $\varphi=5.0\%$ CO₂的培养箱中培养,每2 d更换新的EMEM完全培养

基。4~5 d长成单层致密细胞后用于实验。

1.4 金黄色葡萄球菌的培养

S. aureus (ATCC 6538)为广州医学院李孜博士惠赠,挑取单菌落接种于LB肉汤中,于37℃恒温培养箱中震荡培养,待到对数增长期时,取含菌培养基,10 000 r/min离心5 min,弃上清,加入PBS打散洗涤细菌,10 000 r/min离心5 min,弃上清,加入PBS,吹打,根据A₆₀₀的值进行稀释、涂板和计数。A₆₀₀=0.80时对应的细菌浓度为 0.33×10^9 CFU/mL。

1.5 附睾上皮细胞感染*S. aureus*模型的建立

待12孔板中附睾上皮细胞长成单层上皮后,更换培养基为含 $w=1\%$ FBS的EMEM培养基,12 h后,吸弃含 $w=1\%$ FBS的EMEM培养基,分别加入含或不含*S. aureus* (1×10^7 CFU/mL)的EMEM完全培养基1 mL。置于32℃ CO₂培养箱中,分别于不同处理时间吸出培养液,10 000 r/min,4℃离心10 min。取上清用于NO的测定。附睾上皮细胞经冰冷的PBS洗涤,提取RNA用于RT-PCR分析或者加入蛋白提取液抽提蛋白用于western blot分析。

为研究*S. aureus*感染附睾上皮细胞后NO的作用,在*S. aureus*感染附睾上皮细胞之前60 min,附睾上皮细胞分别经抑制剂预处理60 min,然后加入含金黄色葡萄球菌(1×10^7 CFU/mL)的EMEM完全培养基1 mL。放于32℃ CO₂培养箱中,于不同处理时间吸出培养液,用于细菌计数和NO浓度的分析。

1.6 NO的分析

采用Griess法^[12],取细胞培养上清液100 μ L和等量的Griess试剂混匀,室温反应20~25 min,于550 nm处读取吸光度值,测得的A值与标准亚硝酸钠曲线进行比较得出NO浓度。

1.7 RNA的提取和RT-PCR

待附睾上皮细胞长成单层后,取出6孔板,细胞用无钙镁的PBS洗涤2次,Trizol法提取总RNA,反转录。取反转录产物1 μ g,分别以iNOS和GAPDH的上、下游引物进行扩增。引物序列如下:iNOS上游引物5' CTACCTACCTGGGGAACACCT GGG3',下游引物5' GGAGGAGCTGATG-GAGTAGTAGCGG3',扩增产物为442 bp。GAPDH:上游引物5' ACCACAGTCCATGCCATCAC3',下游引物5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3',扩增产物为452 bp。反应条件为:94℃预变性3 min,94℃45 s,63℃45 s,72℃45 s,35个循环,最

后 72 ℃ 延长 10 min。取 PCR 产物在 $w = 1.5\%$ 琼脂糖凝胶中电泳, EB 染色, 在 Bio-rad 凝胶图象分析系统中分析扫描。定量采用 NIH ImageJ (Version 1.24) 软件进行分析 (软件下载自 [Http://rsb.info.nih.gov/nih-image](http://rsb.info.nih.gov/nih-image))。

1.8 Western blot 检测 iNOS 表达量变化

在感染不同时间收集细胞, PBS 洗涤两次, 加入裂解缓冲液 (20 mmol/L Tris HCl, 215 mmol/L EDTA、 $\varphi = 10\%$ 甘油, $w = 0.1\%$ SDS, $w = 1\%$ Triton X-100, $w = 1\%$ 去氧胆酸钠, 10 mmol/L 焦磷酸钠, 50 mmol/L 氟化钠, 1 mmol/L 正钒酸钠, 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟), 冰浴静置 1 h, 然后 4 ℃、14 000 r/min 离心 25 min, 上清液即为所提取的蛋白溶液。每个样品取 25 μg 总蛋白, 在灌制的 $w = 10\%$ SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳后电转移至 PVDF 膜, 90 V 低温条件下电转移 2 h, $w = 5\%$ 脱脂奶粉于 37 ℃ 封闭 2 h, 加入用 $w = 5\%$ 脱脂奶粉稀释的兔抗 iNOS 克隆抗体 (1:600 稀释)、兔抗 GAPDH 抗体 (1:1 000 稀释), 4 ℃ 过夜。TTBS 洗涤 5 次后用抗兔二抗 (1:2 000 稀释) 常温下孵育 2 h, TTBS 洗膜 5 次后将 ECL (增强化学发光) 试剂盒中的 A 液和 B 液等量混合, 滴加于膜上, 反应 1 min 后, 在暗室中压片, 显影, 定影。底片经扫描仪扫描后分析结果。定量采用 NIH ImageJ (Version 1.24) 软件进行分析。

1.9 统计学分析

结果采用平均值 $\pm$ 标准差, 组间比较采用单因素方差进行分析, $P < 0.05$ 表示为差异显著。

2 结果

2.1 附睾上皮细胞感染 *S. aureus* 后合成大量 NO

已知 NO 是宿主天然防御中的重要分子, 我们

对附睾上皮感染 *S. aureus* 后是否产生 NO 进行了测定, 结果表明附睾上皮感染 *S. aureus* 3 h 时, NO 的生成量很少, 和空白对照组相比差异不显著, 5 h 后, 附睾上皮产生大量的 NO, 差异均极显著 ($P < 0.01$), 并随时间延长分泌量明显增加, 至 12 h 时, NO 分泌量达 1 292 $\mu\text{mol/L}$ (图 1)。

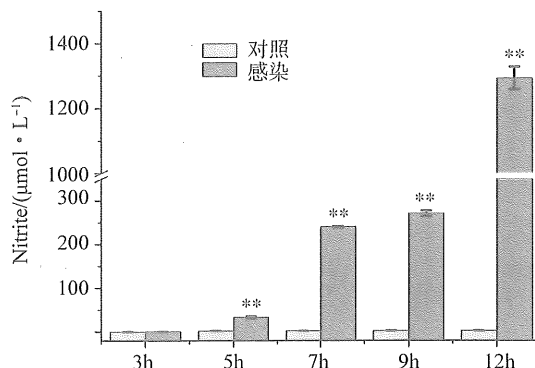


图 1 感染 *S. aureus* 后不同时间内附睾上皮细胞分泌的 NO 的量 ($n = 4, \bar{x} \pm \text{SD}$)

Fig. 1 NO production of Epididymal epithelium response to *S. aureus* infection at different times

** 表示和空白对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$)

2.2 附睾上皮细胞感染 *S. aureus* 后上调 iNOS 的表达

本研究分别通过 RT-PCR 和 western blot 对诱导型的 NO 合酶的表达式进行研究。结果表明在 mRNA 水平上 (图 2), 附睾上皮在静息状态下 iNOS 有弱表达, 感染 2 h 后, 表达量明显增加, 感染后 8 h 内, iNOS 在 mRNA 水平上均有明显升高。在蛋白水平上 (图 3), 附睾上皮在静息状态下有弱表达, 感染 4 h 后, 表达量明显增加, 至 12 h 时, 表达量达到最大。

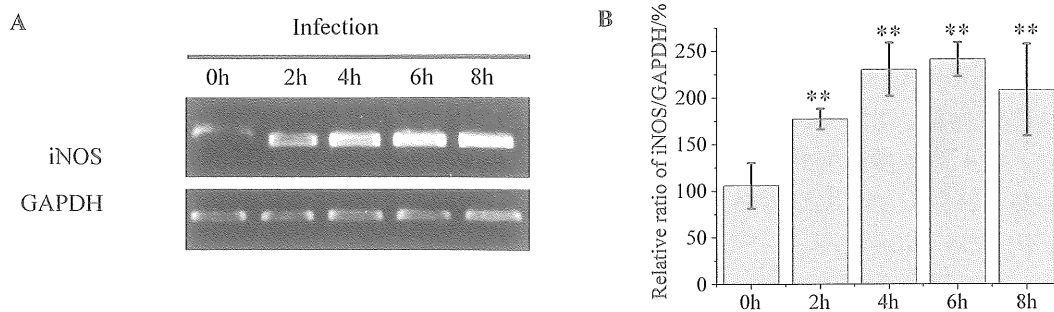


图 2 *S. aureus* 感染对附睾上皮细胞 iNOS mRNA 转录水平的影响

Fig. 2 The levels of iNOS mRNA of epididymal epithelium infected with *S. aureus* at different time points

附睾上皮细胞 iNOS 转录水平的表达量随着感染时间的延长明显增加; ** 表示和 0 h 组相比差异极显著 ($P < 0.01$)

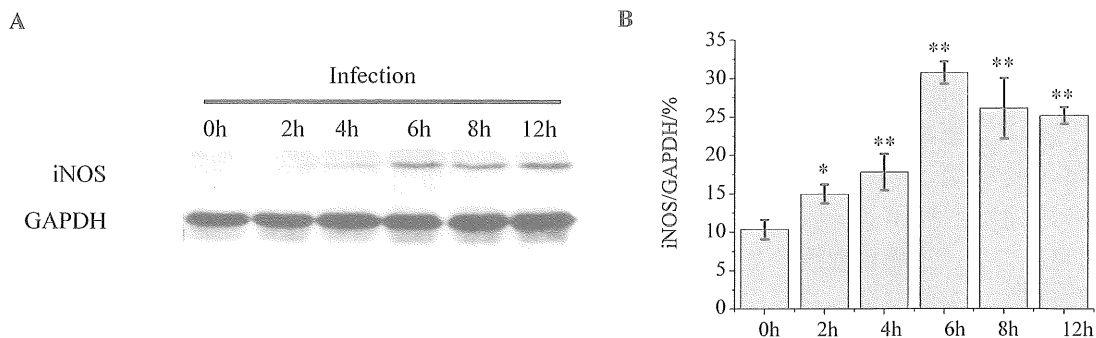


图3 *S. aureus* 感染对附睾上皮细胞 iNOS 蛋白表达水平的影响

Fig. 3 The proteins levels of iNOS of epididymal epithelium infected with *S. aureus* at different time points
附睾上皮细胞 iNOS 蛋白水平的表达量在感染 4 h 后明显增加; * 表示和 0 h 组相比差异显著 ($P < 0.05$); ** 表示和 0 h 组相比差异极显著 ($P < 0.01$)

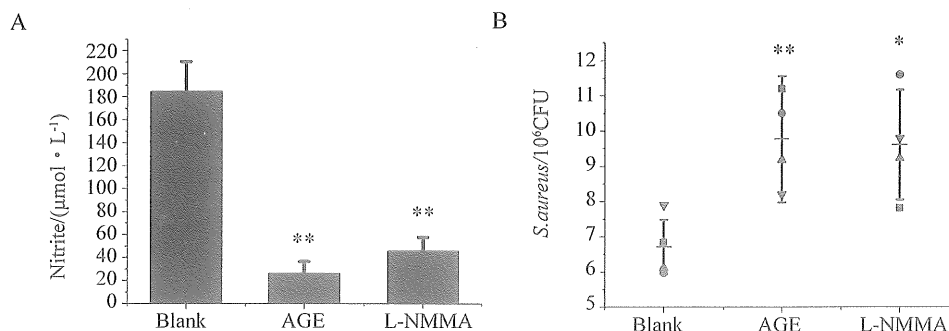


图4 NO 参与附睾上皮细胞对 *S. aureus* 感染的宿主防御

Fig. 4 NO was involved in host defense of epididymal epithelial cells

A: 附睾上皮细胞经 iNOS 抑制剂 AGE 和 L-NMMA 预处理, *S. aureus* 感染后附睾上皮细胞 NO 分泌量明显减少; B: 细菌数量明显增加; * 表示和空白组相比差异显著 ($P < 0.05$); ** 表示和空白组相比差异极显著 ($P < 0.01$)

2.3 NO 参与附睾对 *S. aureus* 的杀伤作用

为研究 NO 在附睾宿主防御中的作用,我们采用 iNOS 抑制剂 AGE 和 L-NMMA 预处理上皮细胞后, *S. aureus* 引发的附睾 NO 分泌量明显减少,差异显著。而培养的细胞上清液中金黄色葡萄球菌的数量和空白组相比数量增加,差异显著。这说明 NO 具有抑制 *S. aureus* 生长的活性,其参与了附睾上皮细胞的宿主防御过程。

3 讨论

上皮细胞是机体防御病原微生物感染的第一道防线,已有的研究表明胃肠道、呼吸道、泌尿道等上皮均表达有多种 TLRs,可识别病原生物的入侵并分泌细胞因子和化学因子等物质对微生物入侵起反应^[13-15]。

附睾上皮作为附睾防御病原生物入侵的第一道防线,必定具有感受病原生物的侵袭及作出相应抗感染反应的能力。已有的文献报道附睾上皮细胞合

成并分泌大量的抗菌物质,这些抗菌物质能协同杀死入侵的病原生物。附睾上皮细胞感染后,也能上调抗菌物质的表达,如 Bin1b 在感染后表达上调,以促进上皮细胞的宿主防御能力。

NO 是一种重要的信号分子,参与多种生理功能的调节,其也在上皮细胞天然免疫和宿主防御过程中具有重要的作用。已报道肠道、呼吸道等上皮细胞在病原感染后能上调 iNOS 的表达并合成大量的 NO 杀死入侵生物,从而增强宿主防御功能^[16-18]。在天然免疫和宿主防御过程中高浓度的 NO 主要由 iNOS 合成。在正常生理条件下,各组织细胞的 iNOS 活性几乎不表达,炎症或某些病理状态下, iNOS 表达会上调并引起 NO 合成的显著增加。

目前 NO 是否参与附睾上皮细胞免疫防御还不清楚。本研究发现附睾上皮细胞感染 *S. aureus* 后 5 h 即能分泌大量的 NO,感染后 12 h NO 分泌量达 1 292 μmol/L,呈现随时间延长分泌量上升的趋

势。RT-PCR 和 western blot 实验都表明附睾上皮细胞在静息状态下有微弱的 iNOS 基因的表达, 这表明低水平的 iNOS 在附睾生殖生理过程中可能具有重要的生理意义。感染后 3 h 附睾上皮细胞开始上调 iNOS 基因的转录, 4 h 时蛋白表达明显上调。采用 iNOS 的抑制剂抑制 *S. aureus* 引发的附睾 NO 分泌量明显减少后, 细胞培养液中金黄色葡萄球菌的数量明显增加, 差异显著。这说明 NO 具有抑制 *S. aureus* 生长的活性, 其参与了附睾上皮细胞的宿主防御过程, 另外附睾感染后 iNOS 表达的上调可能是附睾感染后炎症反应的重要机制之一。

已知少量的 NO 广泛参与和调节机体的生理生化过程, 而高浓度的 NO 不但可以杀死病原生物, 也可能对宿主产生损伤, 其在宿主防御中具有重要的作用。Moeller 等^[19]报道呼吸道上皮表达低水平的 iNOS, 患有 CF 的病人的 iNOS 表达下调, NO 产生的减少可能会导致宿主防御功能的缺失。上调 iNOS 的表达并生成大量的 NO 对宿主防御具有重要的意义。附睾上皮细胞感染 *S. aureus* 后上调 iNOS 的表达并生成大量的 NO 在附睾宿主防御中可能具有重要的生理和病理意义。

参考文献:

- [1] ROBAIRE B, HERMO L. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, function, and their regulation[M]// KNOBIL E, NEILL J, et al. The physiology of reproduction. New York: Raven Press, 1988: 999 - 1080.
- [2] DEJUCQ N, JéGOU B. Viruses in the mammalian male genital tract and their effects on the reproductive system [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2001, 65(2): 208 - 231.
- [3] LUZZI G A, O'BRIEN T S. Acute epididymitis [J]. BJU Int, 2001, 87(8): 747 - 755.
- [4] KANG T W, LEE K H, PIAO C Z, et al. Three cases of xanthogranulomatous epididymitis caused by *E. coli* [J]. J Infect, 2007, 54(2): 69 - 73.
- [5] PALLADINO M A, JOHNSON T A, GUPTA R, et al. Members of the toll-like receptor family of innate immunity pattern-recognition receptors are abundant in the male rat reproductive tract [J]. Biol Reprod, 2007, 76(6): 958 - 964.
- [6] BOVE P F, VAN DER VLIET A. Nitric oxide and reactive nitrogen species in airway epithelial signaling and inflammation [J]. Free Radic Biol Med, 2006, 41(4): 515 - 527.
- [7] COLEMAN J W. Nitric oxide in immunity and inflammation [J]. Int Immunopharmacol, 2001, 1(8): 1397 - 1406.
- [8] TRIPATHI P, TRIPATHI P, KASHYAP L, et al. The role of nitric oxide in inflammatory reactions [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2007, 51(3): 443 - 452.
- [9] BOGDAN C. Nitric oxide and the regulation of gene expression [J]. Trends Cell Biol, 2001, 11(2): 66 - 75.
- [10] NUSSLER A K, BILLIAR T R. Inflammation, immunoregulation and inducible nitric oxide synthase [J]. J Leukoc Biol, 1993, 54(2): 171 - 178.
- [11] WONG P Y D. Mechanism of adrenergic stimulation of anion secretion in cultured rat epididymal epithelium [J]. Am J Physiol, 1988, 254(1 Pt 2): F121 - 133.
- [12] DING A H, NATHAN C F, STUEHR D J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production [J]. J Immunol, 1988, 141(7): 2407 - 2412.
- [13] MEDZHITOV R. Toll-like receptors and innate immunity [J]. Nat Rev Immunol, 2001, 1(2): 135 - 145.
- [14] HIEMSTRA P S, BALS R. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens [J]. Eur Respir J, 2004, 23(2): 327 - 333.
- [15] KAGNOFF M F. Microbial-epithelial cell crosstalk during inflammation [J]. Ann NY Acad Sci, 2006, 1072: 313 - 320.
- [16] MANNICK J B. Immunoregulatory and antimicrobial effects of nitrogen oxides [J]. Proc Am Thorac Soc, 2006, 3(2): 161 - 165.
- [17] DARLING K E, EVANS T J. Effects of nitric oxide on *Pseudomonas aeruginosa* infection of epithelial cells from a human respiratory cell line derived from a patient with cystic fibrosis [J]. Infect Immun, 2003, 71(5): 2341 - 2349.
- [18] MALLADI V, PUTHENEDAM M, WILLIAMS P H, et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* outer membrane proteins induce iNOS by activation of NF-kappaB and MAP kinases [J]. Inflammation, 2004, 28(6): 345 - 353.
- [19] MOELLER A, HORAK F J R, LANE C, et al. Inducible NO synthase expression is low in airway epithelium from young children with cystic fibrosis [J]. Thorax, 2006, 61(6): 514 - 520.