

· 基础研究 ·

抗金黄色葡萄球菌富丝氨酸重复蛋白 SraP_{L-Lectin} 抗体在小鼠巨噬细胞抗感染中的功能研究

许秀华^{1,2}, 郑峰², 岳岩³, 汪春晖², 周婷婷^{2*}, 胡龙华^{1*}¹南昌大学第二附属医院检验科, 江西医学检验重点实验室, 江西 南昌 330036; ²东部战区疾病预防控制中心, 江苏 南京 210002; ³解放军总医院眼科, 北京 100853

[摘要] 目的: 阐述单克隆抗体 anti-SraP_{L-Lectin} 在小鼠巨噬细胞吞噬杀伤金黄色葡萄球菌过程中的功能。方法: PCR 扩增 sraP 相应基因片段, 并克隆至 pET28a 表达载体, 用 0.1 mmol/L 异丙基硫代半乳糖苷 (isopropyl β-D-thiogalactoside, IPTG) 诱导表达, 镍柱纯化重组蛋白, 经 Western blot 分析 anti-SraP_{L-Lectin} 的特异性, 采用 qPCR 检测巨噬细胞炎症因子诱导表达水平, CCK8 检测金黄色葡萄球菌的增殖抑制率, 涂板计数巨噬细胞上清和裂解液中金黄色葡萄球菌的菌落数。结果: anti-SraP_{L-Lectin} 不仅能与不同截短类型的 SraP 重组蛋白结合, 而且能与金黄色葡萄球菌细胞壁蛋白发生特异性结合; anti-SraP_{L-Lectin} 能下调小鼠巨噬细胞促炎因子 [肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白介素 (interleukin, IL)-1β、IL-12p40] 的表达并上调抑炎因子 (IL-10) 的表达。庆大霉素和 anti-SraP_{L-Lectin} 共同作用下, 未见金黄色葡萄球菌出现明显的增殖。anti-SraP_{L-Lectin} 能降低巨噬细胞上清中金黄色葡萄球菌的载量。结论: 单克隆抗体 anti-SraP_{L-Lectin} 与金黄色葡萄球菌形成免疫复合物能减轻巨噬细胞的炎症反应, 促进巨噬细胞对金黄色葡萄球菌的清除。

[关键词] 金黄色葡萄球菌; 富丝氨酸重复蛋白; 单克隆抗体; 巨噬细胞; 免疫复合物**[中图分类号]** R378.1**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2019)04-472-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20190402

Function study of the anti-infection effects for an anti-SraP_{L-Lectin} antibody in mouse macrophages infected by *Staphylococcus aureus*

Xu Xiuhua^{1,2}, Zheng Feng², Yue Yan³, Wang Chunhui², Zhou Tingting^{2*}, Hu Longhua^{1*}¹Department of Clinical Laboratory Medicine, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Key Laboratory of Medicine in Jiangxi Province, Nanchang 330006; ²Disease Control and Prevention of Eastern Theater Command, Nanjing 210002; ³Department of Ophthalmology, The General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

[Abstract] **Objective:** To determine the functions of an anti-SraP_{L-Lectin} monoclonal antibody in the process of phagocytosis and killing *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) in the mouse macrophages. **Methods:** Different gene sequence of sraP was amplified by PCR and specific amplification products were inserted into pET28a plasmid. The rpET28a-SraP_{L-Lectin} plasmid was transferred into *E.coli*. BL21 and induced by 0.1 mmol/L IPTG at 25 °C. The recombinant protein was purified by nickel column and the specificity of this antibody was detected by Western blot. The expression level of inflammatory factors in macrophages was detected by qPCR. CCK8 assay was carried out to assess the inhibition rate of *S.aureus* proliferation. The number of *S.aureus* colonies in the supernatant and lysate of macrophages was counted on the coated plate. **Results:** Anti-SraP_{L-Lectin} monoclonal antibody could specifically bind to recombinant SraP truncated proteins and cell wall protein of *S.aureus*. The co-incubation of monoclonal antibody with *S.aureus* could induce the down-regulation of pro-inflammatory cytokine (TNF-α, IL-1β, IL-12p40) and up-regulation of anti-inflammatory cytokine (IL-10) in macrophages. The proliferation of *S.aureus* USA300 LAC was obviously inhibited in the co-effect of gentamicin and antibody. Anti-SraP_{L-Lectin} reduced the amount of *S.aureus* in macrophage supernatant. **Conclusion:** The immune complex of anti-SraP_{L-Lectin} antibody and *S.aureus* can alleviate the immune response of macrophages and promote the clearance of macrophages to *S.aureus*.

[Key words] *Staphylococcus aureus*; serine-rich repeat protein; monoclonal antibody; macrophages; immune complex

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(04):472-477]

[基金项目] 国家科技重大专项(2017ZX10303401); 国家自然科学基金(81460327); 江苏省博士后基金(1701155C); 全军应用基础研究项目(BWS14J046); 江苏省青年医学人才项目(QNRC2016846)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: ahzt128@126.com; longhua@163.com

金黄色葡萄球菌既可引起医院感染,也可造成社区感染,是医院感染防控中的重点监控菌株。金黄色葡萄球菌可引起皮肤软组织、呼吸系统、泌尿系统及血流等感染^[1-3],毒力因子在其致病过程中起着重要作用,其中富丝氨酸重复蛋白SraP是细胞壁锚定蛋白,也是金黄色葡萄球菌的毒力因子。SraP配体结合区的L-Lectin模序为其活性位点,能够识别并结合宿主细胞表面的唾液酸化受体^[4]。我们前期采用细胞融合技术筛选出能稳定表达的杂交瘤细胞株并制备了单克隆抗体 anti-SraP_{L-Lectin},该抗体能阻断金黄色葡萄球菌黏附和侵入 A549 细胞^[5]。巨噬细胞能快速识别病原菌并发挥免疫调节和吞噬杀伤功能。本研究进行了巨噬细胞炎症因子诱导实验和吞噬实验,从而了解 anti-SraP_{L-Lectin}在巨噬细胞吞噬杀伤金黄色葡萄球菌过程中的作用,初步明确其在抗感染过程中的功能,为研发有效防控金黄色葡萄球菌感染的疫苗提供理论依据和有效靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

金黄色葡萄球菌 USA300 LAC 由第四军医大学罗晓星教授惠赠;大肠杆菌 DH5 α 、BL21 由本实验室保存,分别用于克隆实验和蛋白表达研究;除非特殊说明, DH5 α 、BL21 以肉汤 LB (Oxoid 公司,英国)作为培养基,培养条件为 37 $^{\circ}$ C, 200 r/min,金黄色葡萄球菌以胰酪大豆胨液体 TSB (Oxoid 公司,英国)作为液体培养基,以胰酪大豆胨琼脂 TSA (Oxoid 公司,

英国)作为固体培养基,培养条件为 37 $^{\circ}$ C, 200 r/min;溶葡萄球菌酶、ExtaqDNA 聚合酶、脱氧核糖核酸酶 DNase I、反转录试剂盒 RTmix、荧光定量试剂盒 TB、质粒提取试剂盒 (Sigma 公司,美国),溶菌酶 (Biosharp 公司,韩国),细菌基因组提取试剂盒 (北京天根公司),胶回收提取试剂盒 (Promega 公司,美国),庆大霉素、卡那霉素 (Biofroxx 公司,德国),蛋白酶抑制剂 (Roche 公司,瑞士),HRP 标记羊抗鼠单克隆抗体 (Abcam 公司,英国),RPMI1640 培养基 (Gibco 公司,美国),胎牛血清 (上海四季青公司),RNA 提取试剂盒 (上海飞捷公司),化学发光显色液 ECL (Thermo 公司,美国),细胞增殖与毒性检测试剂盒 CCK8 (DOJINDO 公司,日本);C57BL/6 小鼠购于上海史莱克公司。

1.2 方法

1.2.1 金黄色葡萄球菌 SraP 截短蛋白的制备

针对金黄色葡萄球菌 SraP 的 4 个截短类型 (SraP₉₀₋₇₅₁、SraP₂₄₅₋₇₅₁、SraP₂₄₅₋₅₇₂、SraP₂₄₅₋₄₉₂) 的相应核酸序列,以 USA300 LAC 基因组为模板分别设计引物 (表 1),PCR 扩增后,分别克隆至 pET28a,经 DH5 α 扩增、抽提质粒并测序正确后,转化入表达菌 BL21, 37 $^{\circ}$ C, 200 r/min 摇床培养至 *D* (600 nm) 为 0.8,加入 0.1 mmol/L 异丙基硫代半乳糖苷 (isopropyl β -D-thiogalactoside, IPTG) 25 $^{\circ}$ C 诱导过夜 (表达过程中培养基均含有卡那霉素),4 000 r/min 离心 20 min 收集菌体,PBS 洗 1 遍,PBS 重悬超声处理后,4 $^{\circ}$ C 12 000 g 离心 10 min 收集上清,0.22 μ m 滤膜过滤后,利用镍柱亲和层析纯化重组 His 标签蛋白。

表 1 PCR 引物

Table 1 Primers for PCR

引物名称	引物序列(5'→3')
SraP245-492aa-F	CTTAGCTATGTCAACAGAGTCTGCTGTACACAAG
SraP245-492aa-R	GGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGT
SraP245-572aa-R	CACAAGCTT TTACATCAGTAAAAATAATATG
SraP245-751aa-R	CACAAGCTTTTAAATTTCTTGTACTTCATATTTA
SraP90-751aa-F	CACAAGCTTTTAAATGTTTGTGGTGTACC
β -actin-F	AGTGTGACGTTGACATCCGT
β -actin-R	GCAGCTCAGTAACAGTCCGC
IL-1 β -F	GCTCTTACTGACTGGCATGAG
IL-1 β -R	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
IL-12p40-F	TGGTTTGCCATCGTTTTGCTG
IL-12p40-R	ACAGGTGAGGTTCACTGTTTCT
TNF- α -F	CTGAACTTCGGGGTGATCGG
TNF- α -R	GGCTTGCTCACTCGAATTTTGAGA
IL-10-F	GCTCTTACTGACTGGCATGAG
IL-10-R	CGCAGCTCTAGGAGCATGTG

1.2.2 金黄色葡萄球菌细胞壁蛋白的提取

配制提取缓冲液: Buffer A 900 mL (50 mmol/L Tris-HCl, 30% raffinose, 145 mmol/L NaCl pH7.5), 蛋白酶抑制剂(每片 1 mL ddH₂O 溶解); Buffer B (900 mL Buffer A 中加入蛋白酶抑制剂 20 μ L, 终浓度 100 μ g/mL 的溶葡萄球菌酶, 终浓度 80 μ g/mL DNase I 及 10 \times DNase I Buffer)。

过夜培养金黄色葡萄球菌 1:100 转接 6 mL TSB 培养至对数生长期后期, 4 000 r/min 离心 20 min 收集菌体, PBS 洗 2 遍, 取 1 mL Buffer B 充分重悬, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后, 4 $^{\circ}$ C 12 000 g 离心 10 min, 收集上清^[6]。

1.2.3 Western blot 检测

取上述 SraP 截短蛋白或细胞壁蛋白提取物煮样, 电泳, 转膜及封闭后, 实验组室温孵育 anti-SraP_{L-Lectin} 2 h, 洗膜后, 室温孵育 HRP 标记羊抗鼠单克隆抗体 IgG 1 h, PBST 洗膜 3 遍, 每遍 15 min。阴性对照封闭后室温孵育 HRP 标记羊抗鼠单克隆抗体 IgG 1 h, 洗膜后曝光。

1.2.4 qPCR 检测巨噬细胞炎症因子表达水平

培养过夜的金黄色葡萄球菌 1:100 转接 TSB, 培养 3~4 h, 用 TSB 调整 $D(600\text{ nm})$ 为 2.0 (2.6 \times 10⁹ CFU/mL), 取 100 μ L 离心并用 PBS 清洗 1 次, 1 mL 的 RPMI1640 培养基重悬用于后续实验。

小鼠腹腔巨噬细胞的诱导与提取方法见参考文献^[7]。含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基充分重悬巨噬细胞, 3 \times 10⁵ 个/孔铺于 24 孔细胞培养板, 次日换液后分为实验组、细菌对照组、抗体对照组和空白对照组, 每组 3 个复孔; 实验组每孔加入终浓度为 100 μ g/mL 的单克隆抗体 anti-SraP_{L-Lectin} 和 75 \times 10⁵ CFU (约 30 μ L) 的金黄色葡萄球菌 (MOI=25); 细菌对照组每孔加入 75 \times 10⁵ CFU 的金黄色葡萄球菌; 抗体对照组每孔加入终浓度为 100 μ g/mL 的 anti-SraP_{L-Lectin}; 空白对照组加入等体积的 RPMI1640 培养基。摇匀, 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱孵育 1 h 后, 500 r/min 离心 5 min, 孵育 1 h, 加入庆大霉素 100 μ g/mL, 摇匀, 继续孵育 4 h 后, 按 RNA 提取试剂盒说明提取巨噬细胞 RNA, 反转录为 cDNA, 反转录程序: 37 $^{\circ}$ C 20 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s。cDNA 模板稀释后进行炎症因子 qPCR 检测, 引物见表 1, qPCR 程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 1 个循环; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环。以 β -actin 作为 qPCR 检测的内参, 使用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 的方法进行目的基因表达的统计与分析。

1.2.5 CCK8 增殖抑制实验

96 孔细胞培养板加入含 10% FBS 的 RPMI1640

培养基 100 μ L/孔, 设置 0 μ g/mL、100 μ g/mL 2 个抗体浓度梯度, 阴性对照组 (不加庆大霉素) 及空白对照组 (仅加 RPMI1640 培养基作为检测本底), 每组 3 个复孔。向 0 μ g/mL、100 μ g/mL 浓度抗体组及阴性对照组加入细菌悬液 3 μ L 摇匀, RPMI1640 培养基为空白对照, 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱孵育 1 h 后, 分别向 0 μ g/mL、100 μ g/mL 抗体组加入 100 μ g/mL 庆大霉素, 摇匀, 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱孵育 3 h, 向各组加入 CCK8 试剂 10 μ L/孔, 分别于 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h 后酶标仪检测 450 nm 吸光度。增殖抑制率=(对照组吸光度-实验组吸光度)/(对照组吸光度-空白对照组吸光度) \times 100%。

1.2.6 小鼠巨噬细胞吞噬实验

含 10% FBS RPMI1640 培养基充分重悬小鼠巨噬细胞, 3 \times 10⁴ 个/孔铺于 96 孔细胞培养板, 次日换液后, 实验组加入终浓度为 100 μ g/mL 的 anti-SraP_{L-Lectin}, 对照组加入相应体积的 RPMI1640 基础培养基 (每组 3 个复孔)。各孔分别加入细菌悬液 3 μ L (MOI=25), 摇匀, 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱孵育 1 h 后, 500 r/min 离心 5 min, 孵育 1 h, 加入 100 μ g/mL 庆大霉素, 摇匀, 继续孵育 3 h, RPMI1640 培养基洗 2 遍, 加入 10 μ g/mL 庆大霉素, 19 h 后吸尽上清, 无菌 PBS 洗 1 遍, 加入 0.02% Triton X-100 裂解细胞, 将细胞裂解液和细胞上清用无菌 PBS 稀释后分别涂板计数。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 6.0 统计软件进行统计分析。计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用 t 检验。多组间比较采用方差分析, 两两比较采用 LSD 法, 细菌增殖抑制率的比较采用重复测定的方差分析。P \leq 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 anti-SraP_{L-Lectin} 能特异结合不同截短类型的 SraP 重组蛋白及金黄色葡萄球菌细胞壁蛋白

Western blot 结果显示, anti-SraP_{L-Lectin} 检测的抗原蛋白分子量大小分别约为 35、40、55、80 kDa, 与本实验所表达含 L-Lectin 模序的不同截短类型的 SraP 蛋白理论分子量相符 (图 1A), 表明 anti-SraP_{L-Lectin} 能够特异性识别 L-Lectin 模序。为了解 anti-SraP_{L-Lectin} 与金黄色葡萄球菌细胞壁蛋白中 SraP 的结合能力, 本实验提取金黄色葡萄球菌 USA300 LAC 菌株的细胞壁蛋白进行 Western blot, 结果显示, 实验组在约 55、60、80 kDa 处呈现明显条带, 而阴性对照组仅在 40~50 kDa 处呈现少量非特异性结合 (图 1B), 由此

说明 anti-SraP_{L-Lectin} 具有与金黄色葡萄球菌细胞壁蛋白组分结合的能力。

2.2 anti-SraP_{L-Lectin} 能减轻金黄色葡萄球菌刺激小鼠巨噬细胞介导的炎症反应

结果表明(图2),所有组别与空白对照组比较,炎症因子表达量都有所增高($P < 0.001$),可能系金黄色葡萄球菌毒力因子刺激巨噬细胞和(或)抗体作用于巨噬细胞表面 IgG Fc 段受体(FcγR)相关。另外,与单独加入金黄色葡萄球菌的细菌对照组相比,提前加入抗体再加金黄色葡萄球菌的实验组巨噬细胞促炎因子的表达量更低(TNF-α: $P < 0.05$; IL-1β: $P < 0.05$; IL-12p40: $P < 0.01$),而抑炎因子的表达更高(IL-10: $P < 0.01$);与抗体对照组相比,实验组诱导巨噬细胞促炎因子的表达量均更低(TNF-α: $P < 0.001$; IL-12p40: $P < 0.001$),而诱导抑炎因子的

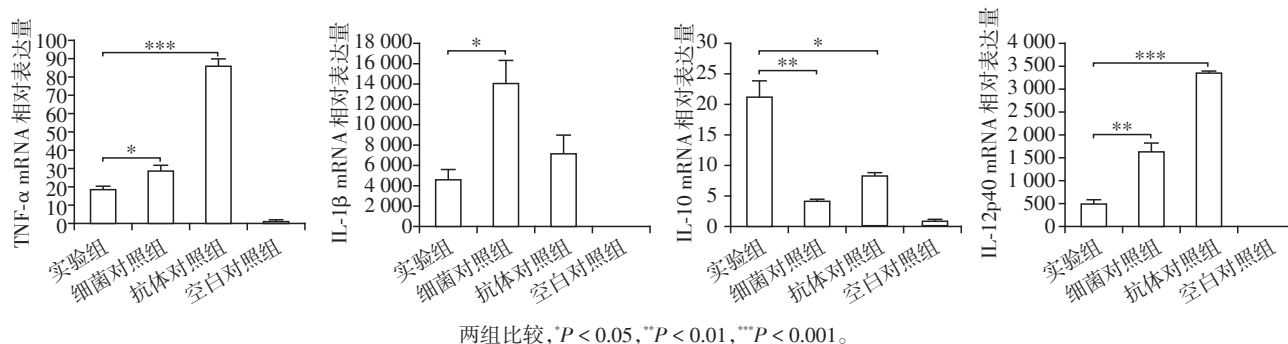


Figure 2 Cytokine expression in mouse macrophages induced by *S. aureus*

表达则更高(IL-10: $P < 0.05$)。表明 anti-SraP_{L-Lectin} 作用于金黄色葡萄球菌能减轻其诱导鼠巨噬细胞产生的炎症反应。

2.3 CCK8 检测金黄色葡萄球菌增殖

CCK8 结果显示(图3),当抗体浓度为 0 μg/mL 时(即仅有庆大霉素作用于金黄色葡萄球菌),与未加庆大霉素组相比,初始时间点金黄色葡萄球菌的增殖抑制率达 85%以上,且随着时间的延长而增加;当抗体浓度为 100 μg/mL 时,与未加庆大霉素组相比,初始时间点金黄色葡萄球菌的增殖抑制率已超过 95%,但各时间梯度增加不明显,两浓度抗体组间的抑制率差异具有统计学意义($P < 0.001$),但两组吸光度皆低于 CCK8 实验最佳计数值下限(1.0)。

2.4 anti-SraP_{L-Lectin} 能减少小鼠巨噬细胞上清中金黄色葡萄球菌数量

将金黄色葡萄球菌与小鼠巨噬细胞共同孵育 24 h 后的细胞上清和细胞裂解液分别进行涂板计

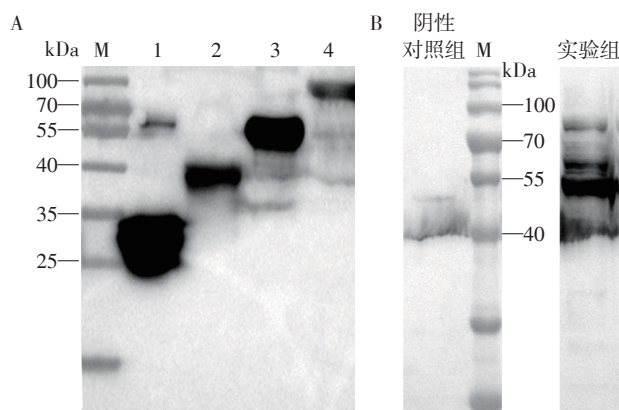


Figure 1 Identification of specificity of anti-SraP_{L-Lectin} antibody

Figure 1 Identification of specificity of anti-SraP_{L-Lectin} antibody

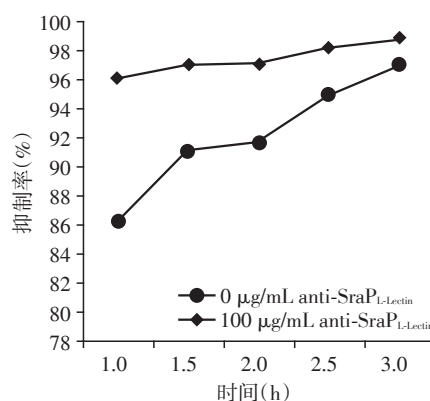


Figure 3 Proliferation inhibition of *S. aureus*

数,结果显示,加入 anti-SraP_{L-Lectin} 的巨噬细胞上清中的金黄色葡萄球菌数量远低于对照组($P < 0.01$),而细胞裂解液中的细菌数量虽高于对照组,但差异无统计学意义($P > 0.05$,图4)。

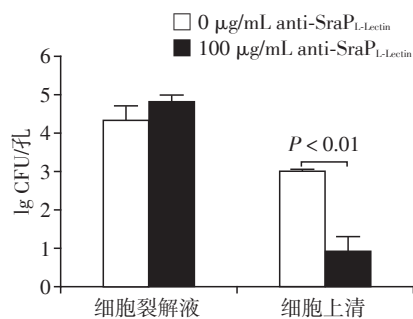


图4 小鼠巨噬细胞内外细菌计数

Figure 4 Bacteria count in supernatant and lysates of macrophages

3 讨论

金黄色葡萄球菌富丝氨酸重复蛋白SraP主要通过其配体结合区的L-Lectin模序识别并结合宿主细胞表面的唾液酸化受体,继而黏附并侵入宿主细胞。本实验中的单克隆抗体特异性检测结果表明,anti-SraP_{L-Lectin}能够特异性结合包含L-Lectin模块的各类截短SraP重组蛋白。在金黄色葡萄球菌细胞壁蛋白提取物中发现多个蛋白条带能与anti-SraP_{L-Lectin}结合,表明该单克隆抗体能够识别并结合金黄色葡萄球菌,而出现多个条带可能系SraP蛋白各模块间由不同的化学键连接,稳定性不尽相同,高温变性过程中,部分蛋白在不同的模块间发生断裂^[8-9],致使Western blot试验结果呈现多个蛋白条带,此现象从图1A重组蛋白SraP₉₀₋₇₅₁在约55、40 kDa处也出现条带可以印证;另一种可能的解释是金黄色葡萄球菌的细胞壁上存在含有L-Lectin模序的其他蛋白,从而与anti-SraP_{L-Lectin}结合,尚需研究证实。

在小鼠巨噬细胞炎症因子诱导实验中,发现提前加入anti-SraP_{L-Lectin}后,金黄色葡萄球菌刺激巨噬细胞产生的3种促炎因子(TNF-α、IL-1β、IL-12p40)低于对照组(单独细菌或抗体刺激),而抑炎因子IL-10则明显高于对照组。由于IL-10的释放依赖于免疫球蛋白FcγR及Toll样受体2(TLR2)的激活^[10-11],因此,我们对巨噬细胞TLR2受体的转录组进行了检测,实验结果表明,与单独加入金黄色葡萄球菌相比,加入抗体与金黄色葡萄球菌的巨噬细胞TLR2表达水平升高(资料未展示),但差异无统计学意义。因此,在本研究中TLR2可能并非巨噬细胞IL-10释放的主要依赖性受体,但实验组巨噬细胞促炎因子TNF-α、IL-1β、IL-12p40较低水平的表达可能与IL-10的抑炎效应相关^[12-13]。先前的研究表明被病原菌激活的巨噬细胞会产生大量的炎症因子,从

而加快对病原菌的清除速率^[14],然而,过强的炎症反应不仅不利于病原菌的清除,反而易造成机体损伤,因此,适度的炎症反应对于机体清除病原菌显得尤为重要^[15]。实验组与对照组巨噬细胞炎症因子表达存在差异,可能是由于金黄色葡萄球菌与anti-SraP_{L-Lectin}形成抗原抗体复合物,激活或共激活了巨噬细胞表面的IgG FcR和(或)模式识别受体,改变了巨噬细胞炎症反应通路^[16],最终减轻了金黄色葡萄球菌诱导的巨噬细胞炎症反应;也可能是抗体作用于金黄色葡萄球菌,使其增殖率和致病力下降,导致巨噬细胞的炎症反应减弱。

本研究采用CCK8实验探讨anti-SraP_{L-Lectin}对金黄色葡萄球菌增殖速率的影响。结果显示100 μg/mL anti-SraP_{L-Lectin}对金黄色葡萄球菌的增殖抑制率达95%以上,庆大霉素单独作用于金黄色葡萄球菌能使其增殖抑制率达85%以上,表明庆大霉素单独作用能显著抑制金黄色葡萄球菌的增殖,且anti-SraP_{L-Lectin}与庆大霉素对金黄色葡萄球菌的增殖抑制具有协同作用。本研究进行的吞噬实验结果显示,anti-SraP_{L-Lectin}处理的细胞上清细菌计数远低于对照组,可能的原因是:①anti-SraP_{L-Lectin}与金黄色葡萄球菌结合后,阻碍了其黏附于巨噬细胞表面,从而使其在更换细胞培养液过程中被清除;②抗体结合金黄色葡萄球菌后抑制了其增殖,从而使上清中细菌数量减少;③anti-SraP_{L-Lectin}与金黄色葡萄球菌形成抗原抗体复合物,促进了巨噬细胞的调理吞噬作用^[17],从而减少上清中金黄色葡萄球菌的数量。这可能也是巨噬细胞内金黄色葡萄球菌计数略高于对照组的原因,但此差异并不明显,可能与抗体作用于金黄色葡萄球菌从而抑制其在巨噬细胞内增殖与免疫逃逸,使其对巨噬细胞杀伤作用的抵抗力减弱相关。另一方面,金黄色葡萄球菌亦能被巨噬细胞吞噬但不被杀灭^[18],如细胞壁肽聚糖被乙酰化修饰的金黄色葡萄球菌能产生溶菌酶抵抗^[19]。因此,本实验未加入抗体组可能造成巨噬细胞对金黄色葡萄球菌的不完全吞噬,使其可在胞内增殖,吞噬细胞死亡后又释放到上清,且在10 μg/mL庆大霉素下能够以较快的速率增殖,最终培养上清中金黄色葡萄球菌数量增多,而胞内增殖不明显。因此,延长巨噬细胞吞噬时间再进行细菌计数或对巨噬细胞的存活数量与状态进行量化比较,将有助于进一步明确anti-SraP_{L-Lectin}在巨噬细胞吞噬杀伤金黄色葡萄球菌过程中的作用。

在金黄色葡萄球菌临床耐药日益严峻的当下,

寻找新的抗感染治疗方案已成为当务之急。金黄色葡萄球菌富丝氨酸重复蛋白SraP是其定植与感染宿主的重要毒力因子,anti-SraP_{L-Lectin}能特异结合金黄色葡萄球菌富丝氨酸重复蛋白SraP并有效降低巨噬细胞上清中金黄色葡萄球菌载量,表明该抗体可作为抗金黄色葡萄球菌感染的治疗策略,为研发有效防控其感染的疫苗提供理论依据和有效靶点。

[参考文献]

- [1] Asgeirsson H, Thalme A, Weiland O. *Staphylococcus aureus* bacteraemia and endocarditis - epidemiology and outcome: a review[J]. *Infect Dis*, 2018, 50(3): 175-192
- [2] Ambroggio L, Florin TA, Shah SS, et al. Emerging biomarkers of illness severity: Urinary metabolites associated with sepsis and necrotizing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia[J]. *Pharmacotherapy*, 2017, 37(9): 1033-1042
- [3] Walker JN, Flores-Mireles AL, Pinkner CL, et al. Catheterization alters bladder ecology to potentiate *Staphylococcus aureus* infection of the urinary tract[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(41): E8721-E8730
- [4] Yang YH, Jiang YL, Zhang J, et al. Structural insights into SraP-mediated *Staphylococcus aureus* adhesion to host cells[J]. *Plos Pathog*, 2014, 10(6): e1004169
- [5] 岳岩,郑峰,曹清心,等.金黄色葡萄球菌富丝氨酸重复蛋白SraP_(L-Lectin)特异性抗体的制备及其功能分析[J].南京医科大学学报(自然科学版),2018,38(11): 1494-1498
- [6] Siboo IR, Chambers HF, Sullam PM. Role of SraP, a serine-rich surface protein of *Staphylococcus aureus*, in binding to human platelets[J]. *Infect Immun*, 2005, 73(4): 2273-2280
- [7] Cai B, Wang M, Zhu X, et al. The Fab fragment of a humanized anti-Toll like receptor 4(TLR4) monoclonal antibody reduces the lipopolysaccharide response via TLR4 in mouse macrophage[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(10): 25502-25515
- [8] Liu H, May K. Disulfide bond structures of IgG molecules: Structural variations, chemical modifications and possible impacts to stability and biological function[J]. *Mabs-Austin*, 2012, 4(1): 17-23
- [9] Trivedi MV, Laurence JS, Siahaan TJ. The role of thiols and disulfides on protein stability[J]. *Curr Protein Pept Sc*, 2009, 10(6): 614
- [10] Danne C, Ryzhakov G, Martínez-López M, et al. A large polysaccharide produced by helicobacter hepaticus induces an anti-inflammatory gene signature in macrophages[J]. *Cell Host Microbe*, 2017, 22(6): 733-745
- [11] Gallo P, Gonçalves R, Mosser DM. The influence of IgG density and macrophage Fc(gamma)receptor cross-linking on phagocytosis and IL-10 production[J]. *Immunol Lett*, 2010, 133(2): 70-77
- [12] Raza A, Crothers JW, McGill MM, et al. Anti-inflammatory roles of p38α MAPK in macrophages are context dependent and require IL-10[J]. *J Leukocyte Biol*, 2017, 102(5): 1219-1227
- [13] Da Silva MD, Bobinski F, Sato KL, et al. IL-10 Cytokine released from M2 macrophages is crucial for analgesic and anti-inflammatory effects of acupuncture in a model of inflammatory muscle pain[J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 51(1): 19-31
- [14] Cole AL, Muthukrishnan G, Chong C, et al. Host innate inflammatory factors and staphylococcal protein A influence the duration of human *Staphylococcus aureus* nasal carriage[J]. *Mucosal Immunol*, 2016, 9(6): 1537-1548
- [15] Jiang X, Wang Y, Qin Y, et al. Micheliolide provides protection of mice against *Staphylococcus aureus* and MRSA infection by down-regulating inflammatory response[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1410-1453
- [16] Kinder M, Greenplate AR, Strohl WR, et al. An Fc engineering approach that modulates antibody-dependent cytokine release without altering cell-killing functions[J]. *MAbs*, 2015, 7(3): 494-504
- [17] Kasturirangan S, Rainey GJ, Xu L, et al. Targeted Fcγ receptor(FcγR)-mediated clearance by a biparatopic bispecific antibody[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(10): 4361-4370
- [18] Flannagan R S, Kuiack R C, McGavin M J, et al. *Staphylococcus aureus* uses the GraXRS regulatory system to sense and adapt to the acidified phagolysosome in macrophages[J]. *Mbio*, 2018, 9(4): e01143-e01151
- [19] Kaplan A, Ma J, Kyme P, et al. Failure to induce IFN-β production during *Staphylococcus aureus* infection contributes to pathogenicity[J]. *J Immunol*, 2012, 189(9): 4537-4545

[收稿日期] 2019-01-29