

沙眼衣原体 pORF5 蛋白通过上调 DJ-1 激活 Nrf2/NQO1 通路调控细胞氧化应激与凋亡

龚思露¹, 周辉^{*2}

1 湖南中医药大学第二附属医院 医学检验中心, 湖南 长沙 410005

2 湖南中医药大学第一附属医院 医学检验与病理中心, 湖南 长沙 410007

龚思露, 周辉. 沙眼衣原体 pORF5 蛋白通过上调 DJ-1 激活 Nrf2/NQO1 通路调控细胞氧化应激与凋亡[J]. 微生物学通报, 2025, 52(3): 1062-1072.

GONG Silu, ZHOU Hui. *Chlamydia trachomatis* plasmid-encoded protein pORF5 up-regulates DJ-1 expression to activate the Nrf2/NQO1 pathway in the regulation of oxidative stress and apoptosis[J]. Microbiology China, 2025, 52(3): 1062-1072.

摘要:【背景】pORF5 质粒蛋白是沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*, Ct)的重要毒力因子, 具有抑制细胞氧化应激和凋亡的作用。【目的】探讨 pORF5 是否通过上调 DJ-1 蛋白激活核因子红细胞 2 相关因子 2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)/醌氧化还原酶 1 [NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1, NQO1]信号通路调控脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的细胞氧化应激与凋亡。【方法】用不同浓度的 pORF5 质粒蛋白以不同时间刺激 HeLa 细胞, Western blotting 检测 DJ-1 蛋白表达情况; 采用活性氧(reactive oxygen species, ROS)试剂盒、流式细胞术检测 pORF5 对 LPS 诱导的细胞氧化应激和凋亡的影响; 利用小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)干扰 HeLa 细胞 DJ-1 蛋白表达, 用荧光显微镜观察细胞内 ROS 荧光强度, 用试剂盒检测超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量变化; 用 Nrf2 特异性抑制剂(ML385)预处理细胞 1 h, pORF5 单独或与 LPS 共刺激细胞后, 分析凋亡相关蛋白 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)、B 细胞淋巴瘤因子 2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)蛋白表达水平; 利用 Western blotting 分析干扰 DJ-1 蛋白表达对 Nrf2/NQO1 信号通路的影响。【结果】pORF5 可上调 DJ-1 蛋白表达, 并且最佳刺激浓度和时间分别为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 18 h; pORF5 质粒蛋白可显著减弱 LPS 诱导的 ROS 荧光强度及细胞凋亡率($P<0.001$); si-DJ-1 组中 ROS 荧光强度增强, MDA 含量增多($P<0.001$), SOD 活性下降($P<0.001$); ML385 能抑制 pORF5 诱导的 Nrf2、NQO1 蛋白表达($P<0.001$), 上调促凋亡蛋白 Bax 表达($P<0.05$), 下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达($P<0.01$); si-DJ-1 组中 Nrf2 及 NQO1 的表达明显降低($P<0.001$, $P<0.01$)。【结论】pORF5 质粒蛋白可通过上调 DJ-1 蛋白激活 Nrf2/NQO1 信

资助项目: 湖南省自然科学基金(2022JJ40324); 湖南省卫生健康委卫生科研课题(202011000475, W20243080)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hunan Province (2022JJ40324) and the Health Research Project of Hunan Provincial Health Commission (202011000475, W20243080).

*Corresponding author. E-mail: ZHUI5318@163.com

Received: 2024-06-12; Accepted: 2024-07-28; Published online: 2024-08-23

号通路抑制 LPS 诱导的细胞氧化应激与凋亡。

关键词: 沙眼衣原体; pORF5 质粒蛋白; 氧化应激; 凋亡; DJ-1

***Chlamydia trachomatis* plasmid-encoded protein pORF5 up-regulates DJ-1 expression to activate the Nrf2/NQO1 pathway in the regulation of oxidative stress and apoptosis**

GONG Silu¹, ZHOU Hui^{*2}

1 Medical Laboratory Center, The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410005, Hunan, China

2 Medical Laboratory and Pathology Center, The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan, China

Abstract: [Background] The plasmid-encoded protein pORF5 is a pivotal virulence factor of *Chlamydia trachomatis* (Ct), capable of inhibiting oxidative stress and apoptosis. **[Objective]** To investigate whether pORF5 up-regulates the expression of DJ-1 protein to activate the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) pathway in the regulation of lipopolysaccharide (LPS)-induced cellular oxidative stress and apoptosis. **[Methods]** HeLa cells were treated with different concentrations of pORF5 for different time periods. Western blotting was employed to determine the expression level of DJ-1. The reactive oxygen species (ROS) assay kit and flow cytometry were employed to examine the effects of pORF5 on LPS-induced oxidative stress and apoptosis. The expression of DJ-1 protein in HeLa cells was down-regulated by siRNA-DJ-1, and the cellular ROS fluorescence intensity was observed under a fluorescence microscope. Corresponding assay kits were used to measure the levels of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in each group. After pretreatment with the Nrf2 inhibitor ML385 for 1 h, HeLa cells were stimulated with pORF5 alone or combined with LPS, and the expression levels of the apoptosis-related proteins B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2-associated X protein (Bax) were determined. Western blotting was employed to evaluate the effect of down-regulating the expression of DJ-1 on the Nrf2/NQO1 pathway. **[Results]** pORF5 up-regulated the expression of DJ-1, and the up-regulatory effect was the strongest after treatment with 10 µg/mL pORF5 for 18 h. pORF5 reduced LPS-induced ROS fluorescence intensity and cell apoptosis rate ($P<0.001$). The si-DJ-1 group showed increased ROS fluorescence intensity and MDA content but decreased SOD activity ($P<0.001$). ML385 inhibited pORF5-induced expression of Nrf2 and NQO1 ($P<0.001$), up-regulated the expression of the pro-apoptotic protein Bax ($P<0.05$), down-regulated the expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 ($P<0.01$). The expression of Nrf2 and NQO1 was down-regulated in the si-DJ-1 group ($P<0.001$, $P<0.01$). **[Conclusion]** pORF5 can up-regulate the expression of DJ-1 protein to activate the Nrf2/NQO1 pathway, thereby inhibiting LPS-induced oxidative stress and apoptosis.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*; pORF5; oxidative stress; apoptosis; DJ-1

沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*, Ct)是性传播疾病最常见的病原菌, 具有广泛致病谱, 其感染可致多种疾病, 如: 失明、泌尿生殖道感染性疾病、性病淋巴肉芽肿、不孕症、异位妊娠等^[1]。临床上 Ct 感染病程隐匿, 常因不易被发觉而使患者延误治疗, 导致慢性或持续性感染, 造成不可逆性病理损伤。因此, 阐明 Ct 毒力因子及其致病机制, 寻找有应用价值的分子靶点, 是 Ct 感染性疾病预防与治疗的关键。

Ct 是一种具有独特发育周期的专性细胞内寄生菌^[2]。研究发现^[3], Ct 感染可诱导活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生, 但 Ct 能快速抑制 NADPH 氧化酶活性, 减少 ROS 生成, 抑制氧化应激诱导的细胞凋亡, 为其完成细胞内的发育周期创造条件, 但具体作用机制尚不清楚。

pORF5 是 Ct 质粒编码的唯一一种分泌性质粒蛋白, 在 Ct 致病过程中发挥重要作用^[4]。已有研究证明, pORF5 蛋白能诱导核因子红细胞 2 相关因子 2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)转位并上调醌氧化还原酶 1 [NAD(P)H: quinone oxidoreductase1, NQO1]发挥抗氧化作用, 促进 Ct 包涵体的生长^[5]。我们前期研究显示, pORF5 可通过上调宿主细胞 DJ-1 蛋白抑制细胞凋亡^[6]。DJ-1 又称帕金森相关蛋白 7 (Parkinson protein 7, PARK7), 是由 189 个氨基酸组成的同型二聚体, 在进化中高度保守, 其参与调节细胞自噬、凋亡、线粒体稳态等多种病理生理过程^[7]。另外, DJ-1 也具有强大的抗氧化功能, 能通过调节多条信号通路, 增强细胞抗氧化酶蛋白表达, 促进胞内 ROS 的清除, 抑制氧化应激诱导的细胞凋亡^[8]。然而, DJ-1 是否通过 Nrf2/NQO1 信号通路参与调控 pORF5 的抗氧化及凋亡作用尚不清楚。

为深入研究 pORF5 调控细胞氧化应激与凋亡的分子机制, 本研究通过小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)技术干扰 DJ-1 蛋白表达, 观察 DJ-1 蛋白表达与 pORF5 蛋白抗氧化作用的关系; 应用特异性抑制剂阻断 Nrf2/NQO1 通路, 通过 Western blotting 检测凋亡相关蛋白表达, 分析 Nrf2/NQO1 信号通路对 pORF5 抗凋亡作用的影响; 并观察干扰 DJ-1 蛋白表达后 Nrf2 及 NQO1 蛋白表达变化, 以探讨 DJ-1 与 Nrf2/NQO1 信号通路的上下游关系, 综合分析 pORF5 调控细胞氧化应激与凋亡的分子机制, 以期深入了解 pORF5 在 Ct 致病机制中的作用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 样品

HeLa-229 细胞, 中国科学院上海细胞研究所; pET-28a(+)/pORF5 重组质粒及 pORF5 重组蛋白, 武汉戴安生物技术有限公司。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

DMEM 培养基和胎牛血清, Gibco 公司; 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS), Sigma 公司; ML385 (Nrf2 抑制剂), Glpbio 公司; DJ-1 抗体、Nrf2 抗体、NQO1 抗体、B 细胞淋巴瘤因子 2 相关 X 蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)抗体、B 细胞淋巴瘤因子 2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)抗体和 GAPDH 抗体, Proteintech 公司; 放射免疫沉淀法(radio immunoprecipitation assay, RIPA)裂解液、ECL 化学发光试剂、BCA 蛋白浓度测定试剂盒及 ROS 检测试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司; Annexin V-FITC (AV)/碘化丙啶(propidium iodide, PI)凋亡检测试剂盒, BD 公司; 丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)含量检测试剂盒, 北京索莱宝生物科技有限公司;

siRNA-DJ-1 及对照, 湖南丰晖生物科技有限公司。流式细胞仪, Beckman Coulter 公司; 凝胶成像分析系统, Bio-Rad 公司; 倒置荧光显微镜, Nikon 公司。

1.3 细胞培养与处理

将 HeLa 细胞接种于含 10%胎牛血清、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素和 100 U/mL 青霉素 G 的 DMEM 培养基中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱中培养, 当细胞密度长至 80%–90%时, 用不同浓度 pORF5 蛋白(0、2.5、5.0、10.0、20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)刺激 HeLa 细胞 18 h 后, 再选择 pORF5 最佳刺激浓度刺激 HeLa 细胞不同时间(0、6、12、18 和 24 h)。部分实验根据需要需要使用 siRNA-DJ-1 (si-DJ-1)转染 HeLa 细胞 24 h 或用 Nrf2 特异性抑制剂 ML385 预处理 HeLa 细胞 1 h, 然后用 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)单独或与 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 pORF5 质粒蛋白共刺激细胞 18 h。

1.4 Western blotting 检测 HeLa 细胞中 DJ-1、Nrf2、NQO1、Bax、Bcl-2 蛋白表达

根据实验需要, 按 1.3 培养并收集不同处理组细胞样本。使用 RIPA 裂解液提取总蛋白, 采用 BCA 法测定蛋白浓度后进行 SDS-PAGE 分析, 将目的蛋白转至 PVDF 膜, 用 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h。加入 DJ-1、Nrf2、NQO1、Bax、Bcl-2 蛋白特异性一抗并低温孵育过夜后, 分别加入二抗室温孵育 2 h, 最后用 ECL 化学发光试剂盒显影、拍照, 采用 Image J 软件评估蛋白灰度值。

1.5 荧光显微镜观察细胞内 ROS 水平

按 1.3 处理细胞后, 按照 ROS 检测试剂盒说明书, 利用 2,7-二氯二氢荧光素二乙酸酯(2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA)探针对各组细胞 ROS 进行检测, 采用倒置荧光显微镜观察绿色荧光强弱, 并拍照记录。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡

收集处理后各组 HeLa 细胞, 用 500 μL binding buffer 重悬, 并加入 3 μL PI 染色液和 AV 避光孵育 30 min, 另设 AV 单染、PI 单染和对照组(53 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 3 min), 利用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.7 细胞内 SOD 和 MDA 含量的检测

根据不同实验目的处理细胞后收集各组细胞, 按照相关检测试剂盒说明书测定细胞中 SOD 和 MDA 含量。

1.8 统计学分析

所有数据采用 GraphPad Prism 10.0 软件中的单因素 ANOVA 进行分析, 数据用均数 \pm 标准差的方式表示。

2 结果与分析

2.1 pORF5 质粒蛋白能上调 DJ-1 蛋白表达

课题组前期经蛋白质组学技术及生物信息学分析发现质粒蛋白 pORF5 能改变宿主蛋白谱, 其中 DJ-1 蛋白在 pORF5-HeLa 稳转株中表达明显升高^[6]。本研究将纯化好的不同浓度 pORF5 质粒蛋白(0、2.5、5.0、10.0 和 20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)分别刺激 HeLa 细胞 18 h, Western blotting 检测 DJ-1 蛋白表达, 结果显示: 当 pORF5 浓度达 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, DJ-1 蛋白的表达水平升高最明显($P<0.05$) (图 1A 和 1B)。再用 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的 pORF5 以不同时间刺激 HeLa 细胞, DJ-1 的表达随时间增加而逐渐上调, 当刺激时间为 18 h 时, DJ-1 的表达量最高($P<0.01$) (图 1C 和 1D)。以上结果说明 pORF5 能上调 DJ-1 蛋白表达, 与前期结果一致, 并且最适 pORF5 刺激浓度和时间分别为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 18 h, 此刺激条件将用于后续实验。

2.2 pORF5 质粒蛋白对 LPS 诱导的细胞 ROS 水平与凋亡的影响

先前的研究已经证实 pORF5 蛋白具有抗氧化和抗凋亡作用^[5,9]。为进一步观察 pORF5 对 ROS 水平的影响,本研究用 LPS 单独或与 pORF5 共

处理细胞后,利用 DCFH-DA 荧光探针对各组细胞进行染色,观察 ROS 荧光强度发现,相较于 control 组,LPS 单独刺激组诱导细胞产生了大量 ROS 荧光;而 pORF5 和 LPS 共刺激组中 ROS 荧光强度较 LPS 组明显减弱(图 2)。

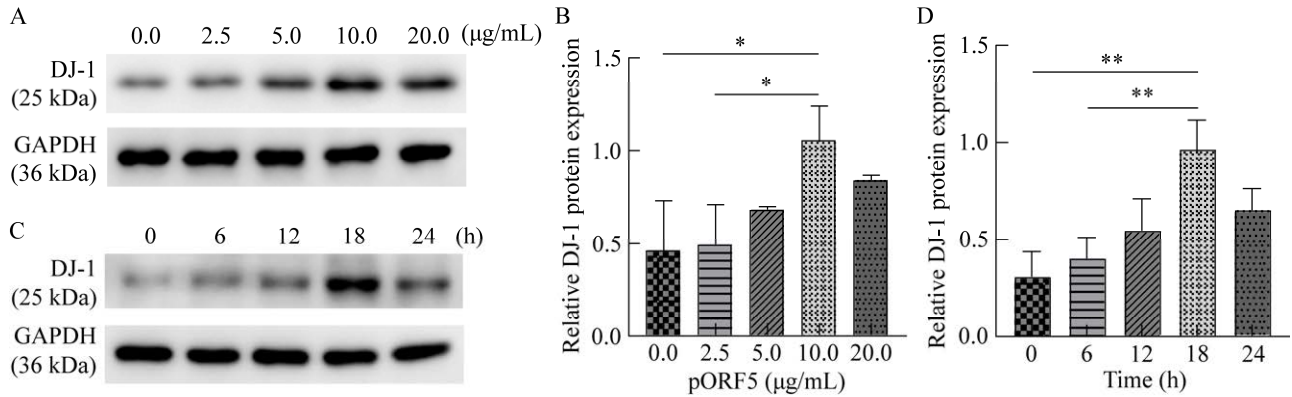


图 1 Western blotting 检测 pORF5 质粒蛋白对 HeLa 细胞 DJ-1 蛋白表达水平的影响 A: 不同浓度 pORF5 质粒蛋白对 DJ-1 蛋白表达的影响; B: 不同浓度刺激的 DJ-1 蛋白灰度值; C: pORF5 质粒蛋白不同刺激时间对 DJ-1 蛋白表达的影响; D: 不同时间刺激的 DJ-1 蛋白灰度值扫描。

Figure 1 Effect of pORF5 plasmid protein on DJ-1 expression by Western blotting. A: Effect of different concentrations of pORF5 plasmid protein on DJ-1 expression; B: Gray values of DJ-1 protein stimulated by different concentrations; C: Effect of pORF5 plasmid protein on DJ-1 expression at different times; D: Gray values of DJ-1 protein stimulated at different times. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

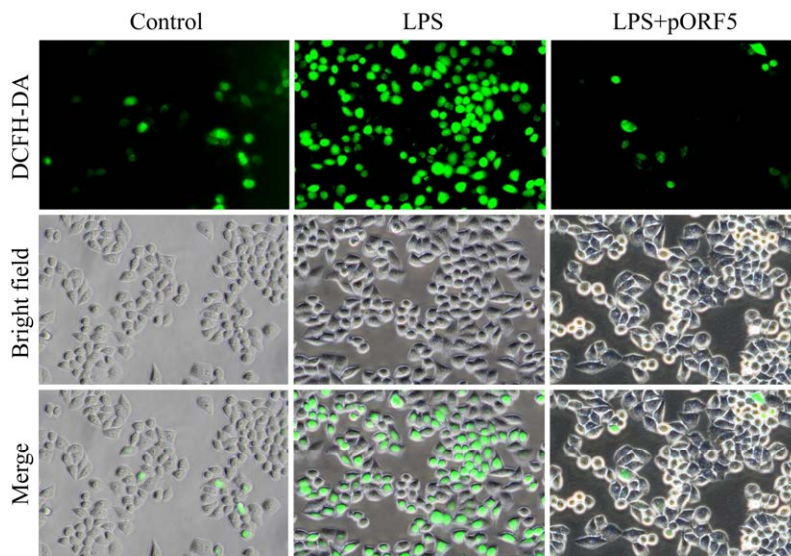


图 2 pORF5 质粒蛋白对 LPS 诱导的 HeLa 细胞 ROS 荧光强度的影响

Figure 2 Effect of pORF5 plasmid protein on ROS fluorescence intensity in LPS-induced HeLa cells.

通过流式检测凋亡率发现，pORF5+LPS 组凋亡率较 LPS 组明显下降($P<0.001$) (图 3)。提示 pORF5 能减弱 LPS 诱导的 ROS 生成，进而抑制氧化应激诱导的细胞凋亡。

2.3 pORF5 质粒蛋白通过上调 DJ-1 抑制 LPS 诱导的 HeLa 细胞氧化应激

课题组前期已经证明 pORF5 蛋白通过上调 DJ-1 抵抗宿主细胞凋亡^[6]，为进一步研究 DJ-1 蛋白与氧化应激的关系，首先利用 siRNA 技术干

扰 HeLa 细胞中 DJ-1 蛋白表达，Western blotting 检测 DJ-1 的干扰效果；并检测 pORF5 与 LPS 刺激后 si-DJ-1 组和对照组 HeLa 细胞中 ROS、MDA 及 SOD 含量，结果表明：相较于对照组，si-DJ-1 组中 DJ-1 蛋白表达明显减少，说明 DJ-1 蛋白受到有效干扰(图 4A)；si-DJ-1 组中 SOD 含量较对照组显著降低($P<0.001$)，而 MDA 含量上调($P<0.001$)，ROS 荧光强度也明显增强(图 4B-4D)。提示 pORF5 通过上调 DJ-1 发挥抗氧化作用。

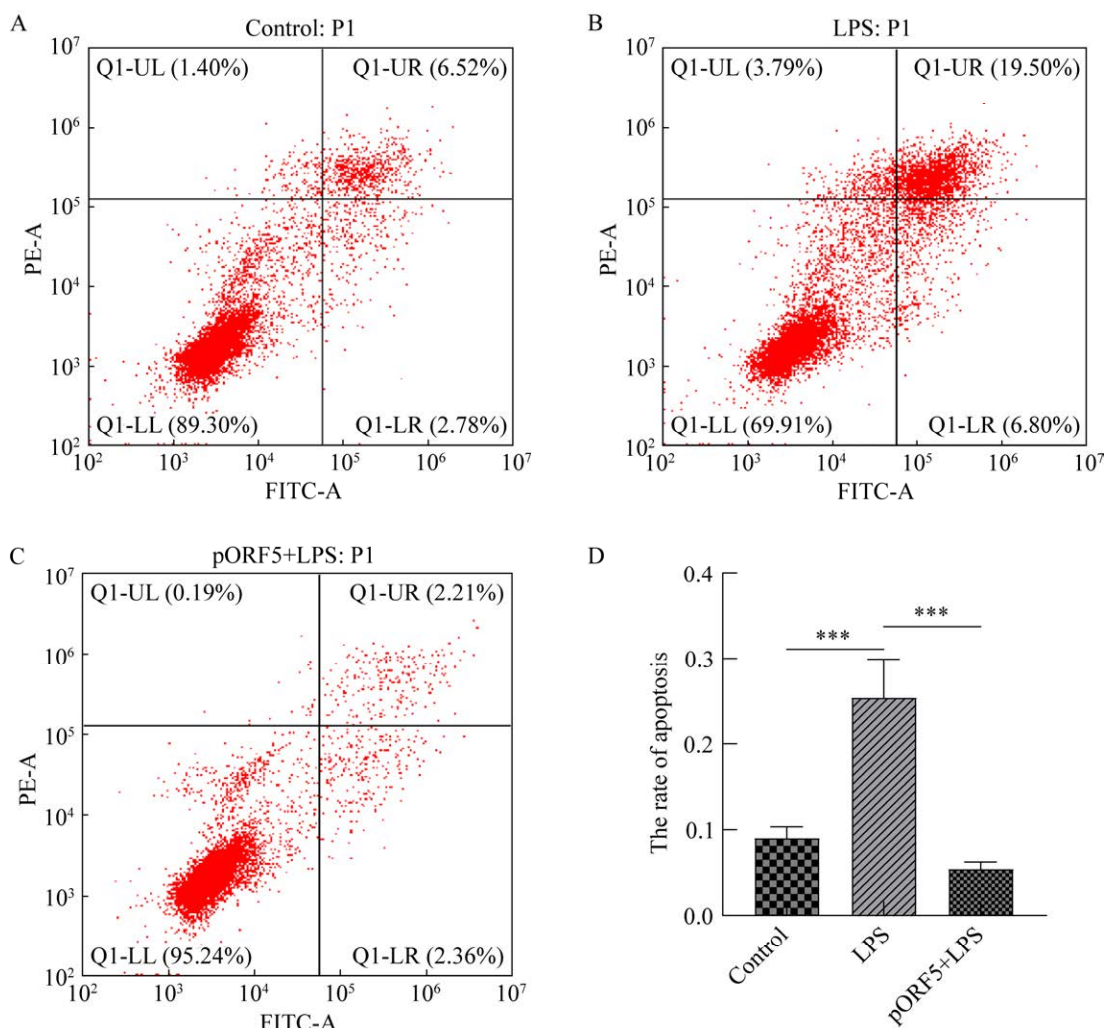


图 3 流式细胞术检测细胞凋亡率 A-C: 流式细胞散点图(A: Control; B: LPS; C: pORF5+LPS)。D: 细胞凋亡率柱状图。

Figure 3 The apoptosis rate was detected by flow cytometry. A-C: Flow cytometry scatter plots (A: Control; B: LPS; C: pORF5+LPS). D: Histogram of percentage of apoptotic cells. ***: $P<0.001$.

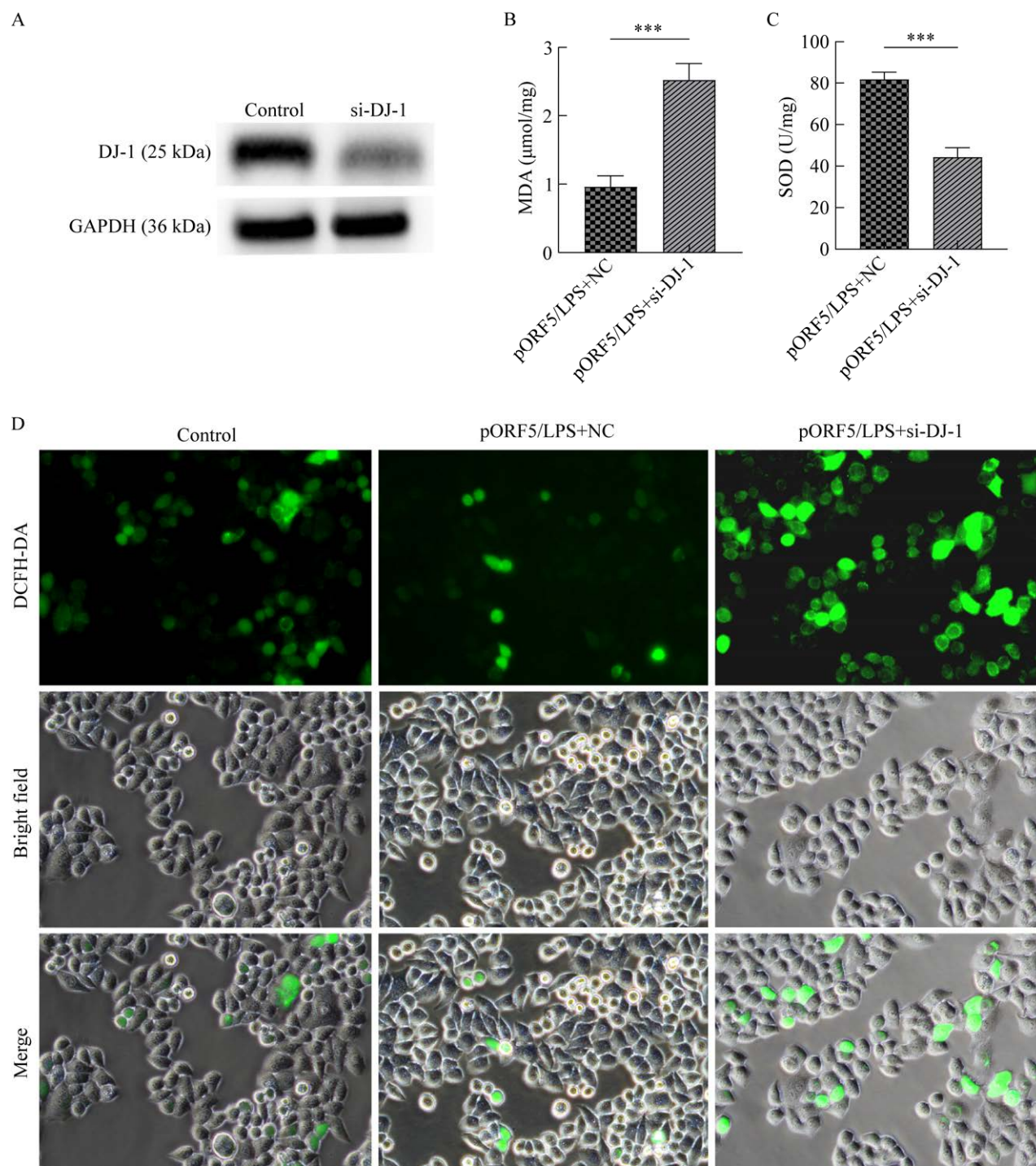


图4 pORF5通过上调DJ-1抑制LPS诱导的HeLa细胞氧化应激 A: Western blotting检测DJ-1干扰效果; B: MDA含量分析; C: SOD含量分析; D: ROS荧光强度。

Figure 4 pORF5 represses LPS-induced oxidative stress *via* DJ-1 upregulation in HeLa cells. A: The interference effect of DJ-1 was analyzed by Western blotting; B: Histogram for MDA contents assayed; C: Histogram for SOD contents assayed; D: ROS fluorescence intensity. ***: $P < 0.001$.

2.4 Nrf2/NQO1 信号通路参与 pORF5 的抗凋亡作用

有研究表明 pORF5 可激活 Nrf2/NQO1 信号通路发挥抗氧化效应^[5]，为进一步探讨 Nrf2/NQO1 通路是否参与 pORF5 质粒蛋白的抗凋亡作用，先用 Nrf2 特异性抑制剂 ML385 预处理 HeLa 细胞 1 h，再用 pORF5 质粒蛋白刺激细胞，Western blotting 结果显示，ML385 能抑制 pORF5 诱导的 Nrf2 及 NQO1 蛋白表达 ($P<0.001$) (图 5A–5C)，并促进促凋亡蛋白 Bax

表达 ($P<0.05$)，下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达 ($P<0.01$) (图 5D–5F)，提示 pORF5 可通过激活 Nrf2/NQO1 通路抑制细胞凋亡。

2.5 pORF5 质粒蛋白激活 Nrf2/NQO1 通路依赖于 DJ-1 蛋白表达上调

Nrf2/ARE 信号通路被证明是 DJ-1 蛋白增强抗氧化酶表达的重要下游通路。研究显示，DJ-1 可与细胞质中 Keap1-Nrf2 复合体结合，解离活化的 Nrf2 单体入核，再促使下游基因表达保护细胞免受氧化应激损伤^[10]。为研究 pORF5

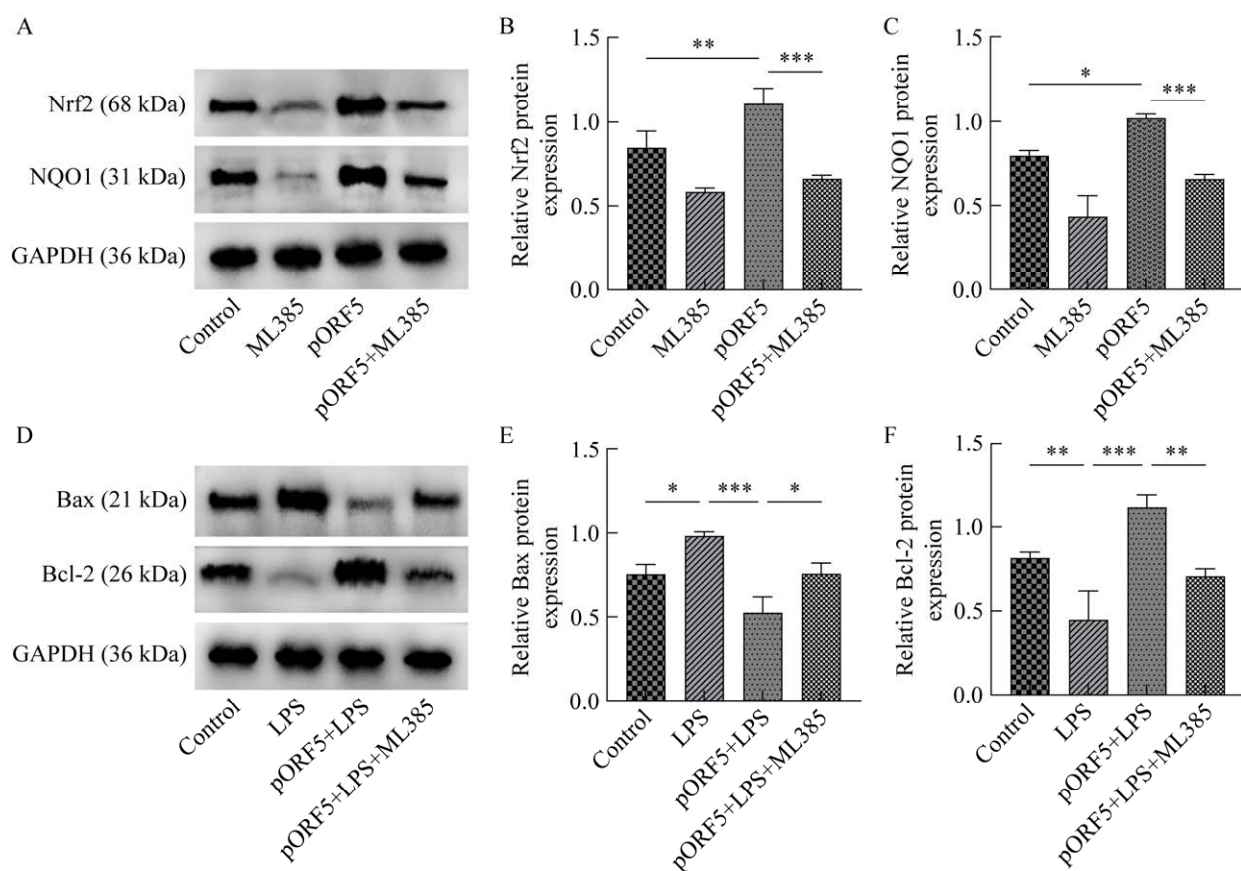


图 5 pORF5 质粒蛋白激活 Nrf2/NQO1 通路对 Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响 A: Western blotting 检测 Nrf2 和 NQO1 蛋白表达; B: Nrf2 蛋白灰度值扫描; C: NQO1 蛋白灰度值扫描; D: Western blotting 检测 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达; E: Bax 蛋白灰度值扫描; F: Bcl-2 蛋白灰度值扫描。

Figure 5 Effect of Nrf2/NQO1 pathway activated by pORF5 plasmid protein on Bax and Bcl-2 expression. A: The expression of Nrf2 and NQO1 was analyzed by Western blotting; B: Gray scanning of Nrf2 protein; C: Gray scanning of NQO1 protein; D: The expression of Bax and Bcl-2 was analyzed by Western blotting; E: Gray scanning of Bax protein; F: Gray scanning of Bcl-2 protein. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

激活 Nrf2/NQO1 信号通路是否由 DJ-1 所介导, 用 pORF5 质粒蛋白刺激 si-DJ-1 组及对照组细胞, Western blotting 结果发现, si-DJ-1 组中 Nrf2 及 NQO1 的表达明显降低($P<0.001$, $P<0.01$) (图 6), 说明 pORF5 需通过上调 DJ-1 激活 Nrf2/NQO1 信号通路。

3 讨论

Ct 作为具有独特发育周期的专性细胞内寄生菌, 为维持其在宿主细胞内的生长发育, 已进化出多种机制调控宿主细胞凋亡和氧化应激水平, 从而逃避免疫清除促进自身感染^[11]。pORF5 是由 Ct 质粒编码的重要毒力蛋白, 其在 Ct 与宿主细胞互作中发挥重要作用。大量研究证明, pORF5 能改变宿主蛋白谱, 并通过多条信号转导通路调控细胞凋亡和氧化应激等生物学功能^[12-13]。课题组前期研究证明, pORF5 蛋白可通过上调 DJ-1 活化细胞外信号调节激酶/丝裂原活化蛋白激酶(extracellular signal-regulated kinase/ mitogen activated protein kinase,

ERK/MAPK)信号通路而抑制细胞凋亡^[6]。DJ-1 是公认的一种多功能蛋白, 在氧化应激、凋亡、线粒体稳态与自噬等多种生命过程中发挥重要调控作用。其中最广为接受的功能是抗氧化应激作用^[14]。为深入探究 pORF5 调控细胞氧化应激与凋亡的作用机制, 本实验首先测定了不同浓度 pORF5 蛋白刺激 HeLa 细胞后 DJ-1 的表达水平, 结果显示 DJ-1 蛋白表达呈浓度和时间依赖性上调, 说明 pORF5 可上调 DJ-1 蛋白表达, 与前期结果一致, 并且最适刺激浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$, 时间为 18 h; 此外, pORF5+LPS 处理组中 ROS 荧光强度及凋亡水平均较 LPS 单独处理组明显降低, 提示 pORF5 具有抗凋亡和抗氧化作用。据报道, DJ-1 对氧化应激极为敏感, 可根据氧化应激程度直接灭活或通过调控线粒体功能减少细胞内的 ROS^[15-16]。为进一步分析 DJ-1 蛋白与 pORF5 抗氧化作用的关系, 干扰 DJ-1 蛋白表达后发现, 相较对照组, si-DJ-1 组中 ROS 荧光强度明显增强, 并且 MDA 含量升高, 而 SOD 含量降低。证实 DJ-1 是 pORF5 调控细胞氧化应

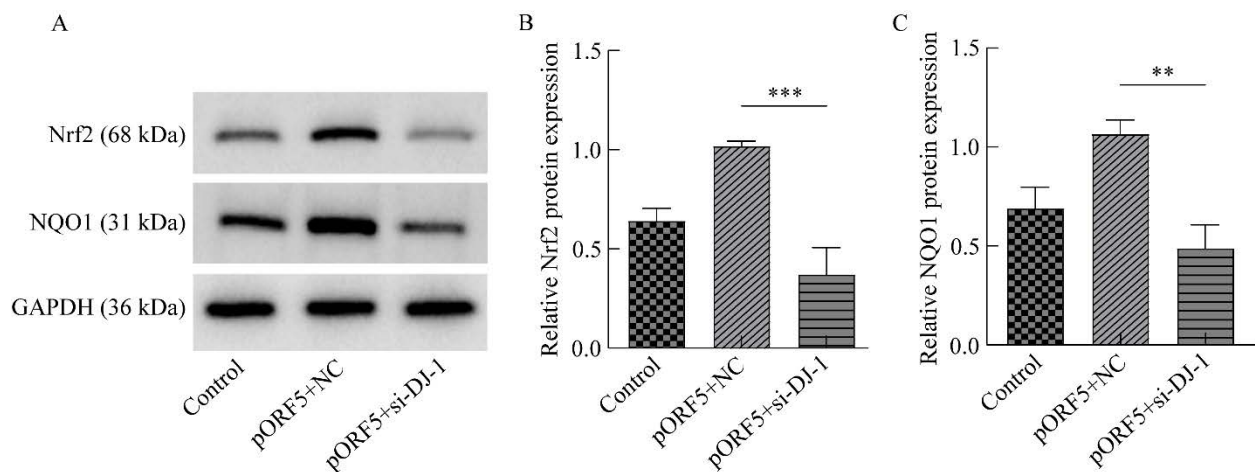


图 6 DJ-1 蛋白表达对 pORF5 激活 Nrf2/NQO1 通路的影响 A: Western blotting 检测 Nrf2 和 NQO1 蛋白表达; B: Nrf2 蛋白灰度值; C: NQO1 蛋白灰度值。

Figure 6 Effect of expression of DJ-1 on Nrf2/NQO1 pathway activated by pORF5 plasmid protein. A: The expression of Nrf2 and NQO1 was analyzed by Western blotting; B: Gray of Nrf2 protein; C: Gray of NQO1 protein. **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

激反应的关键分子。当细胞受到 LPS 诱导的氧化应激刺激时产生大量 ROS, pORF5 可通过上调 DJ-1 蛋白表达, 增强胞内抗氧化酶蛋白含量及对 ROS 和 MDA 的清除能力, 从而减少 ROS 造成的细胞损伤, 促进细胞存活。但 pORF5 上调 DJ-1 发挥抗氧化和抗凋亡作用的过程中参与调控细胞稳态的信号通路还需进一步研究。

Nrf2 是一种重要的核转录因子, 能激活下游的抗氧化保护因子, 减轻氧化应激损伤, 发挥抗炎、抗肿瘤、保护细胞等作用。当机体遭受氧化应激刺激时, Nrf2 发生核转位与抗氧化反应原件(antioxidant responsive element, ARE)结合, 激活抗氧化酶因子 NQO1 和血红素加氧酶 1 (heme oxygenase 1, HO-1)等^[17]。已有研究证明 pORF5 质粒蛋白能诱导 Nrf2 核转位并上调 NQO1 蛋白水平减轻氧化应激反应, 促进 Ct 生长^[5]。既往研究还表明, DJ-1 可促使 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 (Kelch-like epichlorohydrin associated protein 1, Keap1)/Nrf2 复合体解离及下游抗氧化酶蛋白 NQO1 的表达, 进而保护细胞免受氧化应激的损害, 维持细胞正常生理功能^[18]。因此, 为探讨 Nrf2/NQO1 信号通路在 pORF5 抗凋亡效应中的作用及与 DJ-1 蛋白的关系, 本研究先用特异性抑制剂 ML385 预处理 HeLa 细胞, 再用 pORF5 质粒蛋白单独或与 LPS 共刺激细胞, Western blotting 结果表明, ML385 能明显抑制 pORF5 诱导的 Nrf2 及 NQO1 表达水平, 并促进 Bax 表达, 下调 Bcl-2 的表达。而干扰 DJ-1 蛋白表达后, Nrf2 及 NQO1 蛋白表达也明显下调。以上结果提示, pORF5 可通过激活 DJ-1 介导的 Nrf2/NQO1 通路抑制细胞凋亡, 发挥抗氧化保护作用。研究发现, 大量 ROS 的堆积可导致线粒体功能障碍、膜通透性改变和膜电位下降, 释放凋亡相关因子^[19]。而 pORF5 被证实可抑制线粒体介导的细胞凋

亡^[9], 并且 DJ-1 蛋白与线粒体功能、结构高度相关, 在维持线粒体稳态中发挥重要作用^[20]。结合前期研究与本实验结果表明, 在氧化应激刺激下, pORF5 可能通过作用 DJ-1 蛋白介导的 Nrf2/NQO1 通路来调节 Bcl-2 家族控制的线粒体凋亡途径, 从而减少氧化应激细胞的凋亡。然而, pORF5 和 DJ-1 可作用多条信号通路维持细胞内稳态, 例如 pORF5 可通过激活磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt)信号通路抑制细胞凋亡; 而过表达 DJ-1 蛋白也可促使 PI3K/Akt 信号通路中 Akt 磷酸化, 保护神经细胞^[21-22]。因此, pORF5 与 DJ-1 之间的相互作用机制还需深度探究。

4 结论

本研究结果证实 pORF5 蛋白通过上调 DJ-1 激活 Nrf2/NQO1 信号通路抵抗宿主细胞氧化应激与凋亡, 为进一步阐明 pORF5 在 Ct 致病机制中的作用提供了实验依据。然而, 氧化应激与细胞凋亡之间的关系密切且复杂, pORF5 蛋白调控两者之间的动态平衡促进 Ct 感染的潜在机制还有待深入研究。

REFERENCES

- [1] BASTIDAS RJ, VALDIVIA RH. The emerging complexity of *Chlamydia trachomatis* interactions with host cells as revealed by molecular genetic approaches[J]. Current Opinion in Microbiology, 2023, 74: 102330.
- [2] 李雪燕, 贾天军. 沙眼衣原体包涵体膜蛋白 CT225 与宿主波形蛋白存在相互作用[J]. 微生物学通报, 2021, 48(2): 462-470.
LI XY, JIA TJ. *Chlamydia trachomatis* CT225 interacting with vimentin from HeLa cell[J]. Microbiology China, 2021, 48(2): 462-470 (in Chinese).
- [3] BONCOMPAIN G, SCHNEIDER B, DELEVOYE C, KELLERMANN O, DAUTRY-VARSAT A, SUBTIL A. Production of reactive oxygen species is turned on and rapidly shut down in epithelial cells infected with *Chlamydia trachomatis*[J]. Infection and Immunity, 2010, 78(1): 80-87.
- [4] CHEONG HC, CHEOK YY, CHAN YT, TANG TF,

- SULAIMAN S, LOOI CY, GUPTA R, ARULANANDAM B, CHANG LY, WONG WF. *Chlamydia trachomatis* plasmid-encoding Pgp3 protein induces secretion of distinct inflammatory signatures from HeLa cervical epithelial cells[J]. BMC Microbiology, 2023, 23(1): 58.
- [5] SHU MY, LEI WB, SU SM, WEN YT, LUO FZ, ZHAO LH, CHEN LL, LU CX, ZHOU Z, LI ZY. *Chlamydia trachomatis* Pgp3 protein regulates oxidative stress via activation of the Nrf2/NQO1 signal pathway[J]. Life Sciences, 2021, 277: 119502.
- [6] LUO FZ, SHU MY, GONG SL, WEN YT, HE B, SU SM, LI ZY. Antiapoptotic activity of *Chlamydia trachomatis* Pgp3 protein involves activation of the ERK1/2 pathway mediated by upregulation of DJ-1 protein[J]. Pathogens and Disease, 2019, 77(9): ftaa003.
- [7] SONG IK, KIM MS, FERRELL JE Jr, SHIN DH, LEE KJ. Stepwise oxidations play key roles in the structural and functional regulations of DJ-1[J]. The Biochemical Journal, 2021, 478(19): 3505-3525.
- [8] WANG WP, ZHAO H, CHEN BH. DJ-1 protects retinal pericytes against high glucose-induced oxidative stress through the Nrf2 signaling pathway[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 2477.
- [9] ZOU Y, LEI WB, SU SM, BU JC, ZHU SX, HUANG QL, LI ZY. *Chlamydia trachomatis* plasmid-encoded protein Pgp3 inhibits apoptosis via the PI3K-AKT-mediated MDM2-p53 axis[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2019, 452(1/2): 167-176.
- [10] CHAN JYH, CHAN SHH. Activation of endogenous antioxidants as a common therapeutic strategy against cancer, neurodegeneration and cardiovascular diseases: a lesson learnt from DJ-1[J]. Pharmacology & Therapeutics, 2015, 156: 69-74.
- [11] STELZNER K, VOLLMUTH N, RUDEL T. Intracellular lifestyle of *Chlamydia trachomatis* and host-pathogen interactions[J]. Nature Reviews Microbiology, 2023, 21(7): 448-462.
- [12] ZOU Y, DAI WT, LEI WB, SU SM, HUANG QL, ZHOU Z, CHEN CQ, LI ZY. Identification of proteins interacting with pORF5 in the pathogenesis of *C. trachomatis*[J]. American Journal of Translational Research, 2018, 10(6): 1633-1647.
- [13] WEN YT, CHEN HL, LUO FZ, ZHAO LH, SHU MY, SU SM, ZHAO YQ, HUANG QL, LI ZY. *Chlamydia trachomatis* plasmid protein pORF5 up-regulates zfas1 to promote host cell survival via MAPK/p38 pathway[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 593295.
- [14] RANINGA PV, Di TRAPANI G, TONISSEN KF. The multifaceted roles of DJ-1 as an antioxidant[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2017, 1037: 67-87.
- [15] ZHANG LL, WANG JC, WANG JJ, YANG B, HE QJ, WENG QJ. Role of DJ-1 in immune and inflammatory diseases[J]. Frontiers in Immunology, 2020, 11: 994.
- [16] ZHOU J, ZHANG L, WANG M, ZHOU L, FENG XP, YU LL, LAN J, GAO W, ZHANG CD, BU YQ, HUANG CH, ZHANG HY, LEI YL. CPX targeting DJ-1 triggers ROS-induced cell death and protective autophagy in colorectal cancer[J]. Theranostics, 2019, 9(19): 5577-5594.
- [17] WENG BW, ZHANG XY, CHU XY, GONG XH, CAI C. Nrf2-Keap1-ARE-NQO1 signaling attenuates hyperoxia-induced lung cell injury by inhibiting apoptosis[J]. Molecular Medicine Reports, 2021, 23(3): 221.
- [18] CLEMENTS CM, McNALLY RS, CONTI BJ, MAK TW, TING JPY. DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(41): 15091-15096.
- [19] ZOROV DB, JUHASZOVA M, SOLLOTT SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release[J]. Physiological Reviews, 2014, 94(3): 909-950.
- [20] WANG XL, PETRIE TG, LIU YC, LIU J, FUJIOKA H, ZHU XW. Parkinson's disease-associated DJ-1 mutations impair mitochondrial dynamics and cause mitochondrial dysfunction[J]. Journal of Neurochemistry, 2012, 121(5): 830-839.
- [21] SHU MY, BU JC, LEI WB, CHEN LL, ZHOU Z, LU CX, CHEN CQ, LI ZY. Pgp3 protein of *Chlamydia trachomatis* inhibits apoptosis via HO-1 upregulation mediated by PI3K/Akt activation[J]. Microbial Pathogenesis, 2023, 178: 106056.
- [22] JARAMILLO-GÓMEZ J, NIÑO A, ARBOLEDA H, ARBOLEDA G. Overexpression of DJ-1 protects against C2-ceramide-induced neuronal death through activation of the PI3K/AKT pathway and inhibition of autophagy[J]. Neuroscience Letters, 2015, 603: 71-76.