

LPS与巨噬细胞中 *htra2* 的表达及相关性研究

韩文正¹, 武虎¹, 李晓艳¹, 李红艳¹, 姚韵靓², 郭科妮¹, 周秀梅¹

(1. 浙江理工大学生命科学学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018; 2. 浙江大学医学院免疫研究所, 杭州 310058)

摘 要: 通过 LPS(lipopolysaccharide)分别刺激树突状细胞和巨噬细胞,发现巨噬细胞中 HtrA 丝氨酸蛋白酶 2 (HtrA serine peptidase 2, *htra2*)基因的表达随着刺激时间的延长呈现下调的变化趋势,提示巨噬细胞中的 *htra2* 受到 LPS 的调控。为了进一步证实 LPS 刺激的特异性,实验建立 VSV(vesicular stomatitis virus)病毒感染巨噬细胞模型,采用荧光定量 PCR,免疫荧光方法分别从 *htra2* 的蛋白水平和定位上研究 *htra2* 的变化与 LPS 刺激巨噬细胞产生效应的相关性;构建了 *htra2* 基因过表达的质粒 pKH3-*htra2*-HA,采用 ELISA, Western Blot 及荧光定量 PCR 等方法,检测过表达 *htra2* 对巨噬细胞产生和分泌炎症因子 IL-6(Interleukin-6)及 IL-1b(Interleukin-1b)的影响。实验结果表明:*htra2* 仅在 LPS 刺激巨噬细胞的体系中受到调控,且过表达的 *htra2* 会上调巨噬细胞 IL-1b 和 IL-6 的表达水平。

关键词: 巨噬细胞; LPS; VSV; 免疫荧光; IL-6

中图分类号: R392 **文献标志码:** A

0 引言

近年来,人们对固有免疫的研究不断深入,主要集中于树突状细胞、巨噬细胞、NK 细胞在病毒、细菌等病原微生物感染机体后产生的免疫调控过程^[1]。固有免疫识别病原相关分子模式通过细胞表面的模式识别受体,目前已报道十多种类型的模式识别受体^[2]。其中 TLR4 是目前研究得比较深入的模式识别受体家族成员之一,主要通过细菌的细胞壁组成成分激活细胞内多种免疫应答效应,控制外来微生物的感染。

脂多糖 LPS(lipopolysaccharide)是革兰氏阴性细菌的细胞壁成分,能够引发多种免疫细胞发生形态、功能以及细胞内基因表达的变化,并导致宿主细胞因子失控的表达,引起严重感染、器官损伤以及休克等多种疾病的产生^[3]。研究表明,LPS 能够被细胞表面的 TLR4 识别,并将信号传递至胞内,激发下游的多条信号,如 MAPK(mitogen activated pro-

tein kinase), NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell)等信号途径,引发细胞内一系列固有免疫分子的表达,如细胞因子(cytokine)和趋化因子(chemokine),包括 IL-1 (Interleukin-1), IL-6 (Interleukin-6), IL-12 (Interleukin-12), TNF- α (Tumor necrosis factor- α)以及趋化因子 IL-8 (Interleukin-8)等等。TLR 家族不仅能够启动天然免疫应答,还是连接天然免疫和获得性免疫应答的枢纽^[4]。

水疱性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)属于单链 RNA 病毒。研究表明,VSV 能够被细胞的 TLR7-9 识别,介导机体抗病毒的效应^[5]。

HTRA2,也称作 Omi。HTRA2/Omi 是一种定位于线粒体的丝氨酸蛋白酶,定位于线粒体的 Omi 是其全长的前体形式,N 端的 TM(transmembrane domain)结构域,丝氨酸蛋白酶结构域,C 端的结合结构域。Omi 的成熟建立在 N 端的 TM 结构域的丢失^[6]。Omi 的高级结构是通过结晶学分析

收稿日期: 2012-10-08

基金项目: 国家自然科学基金(81272687);科研启动基金(1204807-Y)

作者简介: 韩文正(1986—),男,安徽萧县人,硕士研究生,主要从事肿瘤的靶向基因治疗研究。

通信作者: 周秀梅,电子邮箱: zhouxiumei824@163.com

证实,以三聚体的形式发挥功能^[7]。目前的功能研究已证实,HTRA2/Omi参与细胞凋亡的事件,主要包括以下两个方面:a) HTRA2/Omi可以与XI-AP(X染色体连锁凋亡抑制蛋白)之间的相互作用,直接利用其自身具有的蛋白酶活性引起细胞凋亡^[8];b) HTRA2/Omi可以与Hax-1相互作用,引发细胞自噬性凋亡^[9]。

目前还没有关于HTRA2/Omi在免疫系统中的研究报道。探索HTRA2/Omi参与免疫效应的调控以及与免疫炎症因子IL-6、IL-1b之间的关系,可以进一步了解HTRA2/Omi蛋白的功能,同时也为临床免疫诊断及研究提供更多有价值的信息。

1 材料与方法

1.1 材料

Reverse Transcriptase M-MLV、SYBR Premix Ex Taq II以及相关限制性内切酶购自Takara公司。HTRA2抗体购自R&D公司, β -actin抗体购自碧云天公司。线粒体marker COX IV一抗购自Abcam公司。jetPEI转染试剂购自Polyplus Transfection公司。LPS购自Sigma公司,硫羟乙酸盐肉汤购自BD公司。免疫荧光二抗、Mouse IL-6 ELISA Ready-Set-Go Kit购自eBioscience。蛋白定量试剂盒Pierce BCA Protein Assay Kit购自Thermo。所有细胞都在5% CO₂,37℃培养条件下培养,培养液为10% FBS(Foetal Bovine Serum)的DMEM(Dulhecco's Modified Eagle's Medium)。

1.2 方法

1.2.1 原代巨噬细胞、巨噬细胞系培养

1.2.1.1 小鼠腹腔巨噬细胞M ϕ (macrophage)的培养

实验前3天,向每只小鼠腹腔内注入硫羟乙酸盐肉汤1 mL。动物处死后收集腹腔液分离巨噬细胞并计数,以 2.5×10^6 个/mL的细胞密度接种于24孔培养板。培养12 h后,弃培养液,用DMEM培养基冲洗1~2次,再加入新鲜的培养液,置于5% CO₂,37℃条件培养。

1.2.1.2 小鼠巨噬细胞系RAW264.7的培养

RAW264.7从液氮中取出,置于37℃水浴中迅速解冻,复苏后,用新鲜培养基重悬,以 2.5×10^6 个/mL的细胞密度接种于24孔培养板置于5% CO₂,37℃条件培养。

1.2.2 免疫荧光法

4%多聚甲醛室温固定20 min。PBS洗3次,

300~500 μ L 0.2% Triton X-100透膜15 min。PBS洗3次,5 min/次。5% BSA封闭0.5~1 h。加入一抗4℃孵育过夜。PBS洗3次,5 min/次。滴加荧光二抗,室温避光30 min。避光清洗,5 min/次,3次。避光DAPI复染,封片。

1.2.3 荧光定量PCR

1 μ g/mL LPS分别刺激细胞不同的时间点。收集刺激后的细胞,按照Takara公司的Trizol使用说明书、Reverse Transcriptase M-MLV、SYBR Premix Ex Taq II(Perfect Real Time)说明书提取RNA,反转录成cDNA,进行荧光定量PCR分析*htra2*、*il-6*、*il-1b*基因mRNA表达情况。相关引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2.4 VSV病毒的扩增

HEK293细胞接种于直径10 cm Dish待细胞生长至80%,加入VSV病毒,3~4 d细胞全部病变后收集细胞。CsCl密度梯度离心纯化病毒之后,接种HEK293细胞于96孔培养板。待细胞生长至60%~70%,感染经梯度稀释的纯化病毒,本实验病毒稀释范围为 $10^7 \sim 10^{12}$ 倍。5% CO₂,37℃培养5 d开始观察记录空斑,至第10 d止,采用TCID₅₀(tissue culture infective dose)法计算病毒滴度^[10]。

1.2.5 ELISA分析HTRA2过表达后*il-6*及*il-1b*变化

将细胞铺于12孔培养板。待细胞生长至80%,移去旧的培养基,每孔加入1 mL的新鲜DMEM培养基及转染试剂,将去内毒素的过表达质粒转入细胞,培养24 h。弃掉旧培养液,加入含LPS的新鲜培养液,刺激不同的时间点。收集细胞培养液,按照Mouse IL-6 ELISA Ready-Set-Go Kit说明书分析其中IL-6的蛋白含量。

1.2.6 Western Blot检测蛋白水平的变化

将细胞铺于12孔培养板。待细胞生长至80%,移去旧的培养基,分别用1 μ g/mL的LPS刺激不同的时间点,收集细胞。加入蛋白裂解液冰上裂解30 min。通过BCA法进行蛋白定量,以每管50 μ g蛋白样品分装于1.5 mL的EP管中,加入5 \times SDS蛋白上样缓冲液,煮沸10 min,-80℃保存备用。配制10%的SDS-PAGE凝胶电泳板,每孔加入50 μ g蛋白样品进行电泳,硝酸纤维素膜(PVDF)转移、封闭后,再分别用抗 β -actin、HTRA2的抗体作为一抗,用相应的荧光二抗进行杂交,最后用红外线成像系统(Odyssey)检测PVDF膜上二抗的荧光信号^[11]。

1.2.7 统计学处理

统计学软件采用 Excel 2007, 所有定量实验均重复 3 次, 各组数据以“均值±标准差”表示。组间比较用 *t* 检测, $P < 0.05$ 代表差异显著, $P < 0.01$ 代表差异极显著。

2 结果

2.1 LPS 刺激 M ϕ 及 RAW264.7 细胞不同时间点 *htra2* mRNA 特异性表达情况

通过荧光定量 PCR, 以 LPS 刺激对照组 0 h 时目的基因 mRNA 相对 β actin 的比值为 1, 其他时间段样品均与 0 h 样品相比。结果表明在巨噬细胞系

RAW264.7 (见图 1a) 及腹腔巨噬细胞 (见图 1b) 中, *htra2* 的 mRNA 变化趋势基本一致, 随着刺激时间的延长 *htra2* 的 mRNA 表达被下调。为了进一步研究是 LPS 的刺激影响了 *htra2* mRNA 在巨噬细胞中表达差异的特异性, 以 VSV 刺激代替 LPS。结果表明目的基因 mRNA 在巨噬细胞系 RAW264.7 (见图 1c) 及腹腔巨噬细胞 (见图 1d) 表达水平并没有显著差异。此外, 为了验证 LPS 刺激, *htra2* mRNA 在巨噬细胞中表达差异的特异性, 以培养的骨髓来源的树突状细胞代替巨噬细胞。结果表明 LPS 刺激不同时间点发现目的基因 mRNA 表达水平并没有显著差异 (见图 1e)。

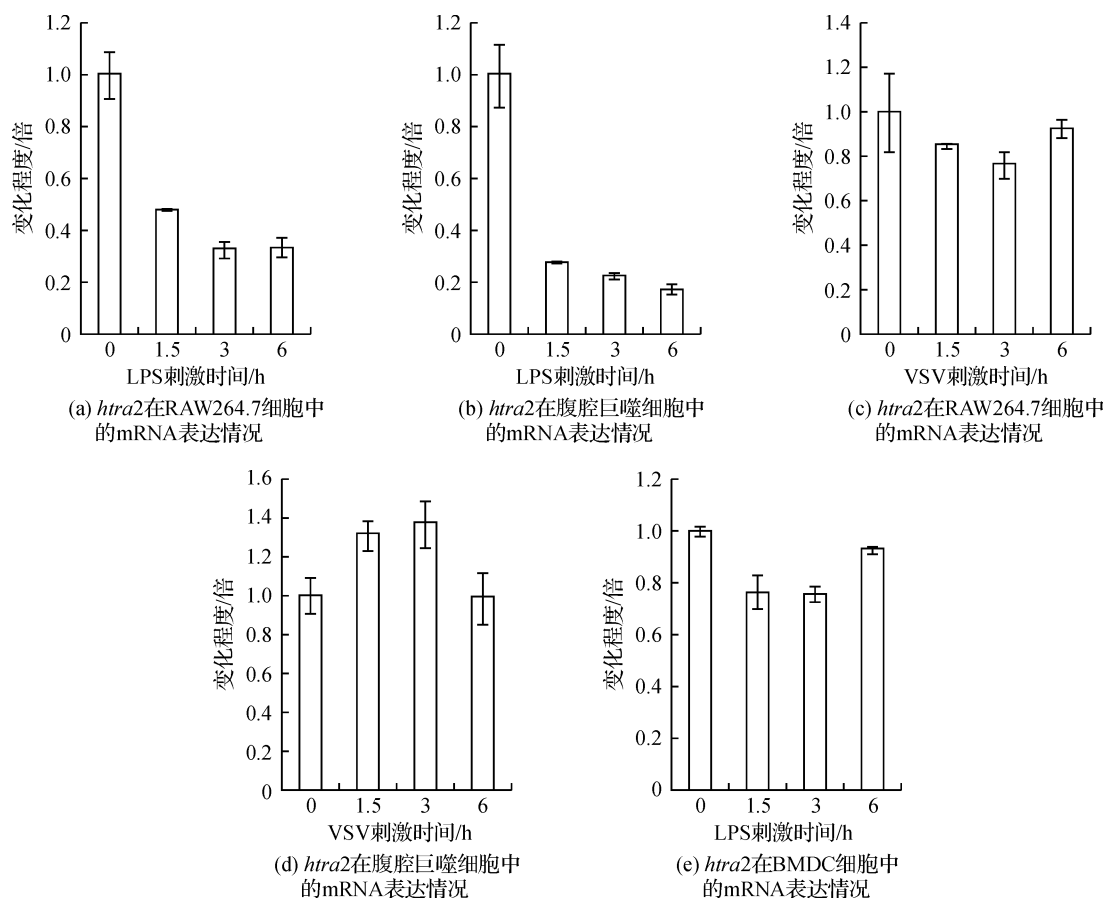
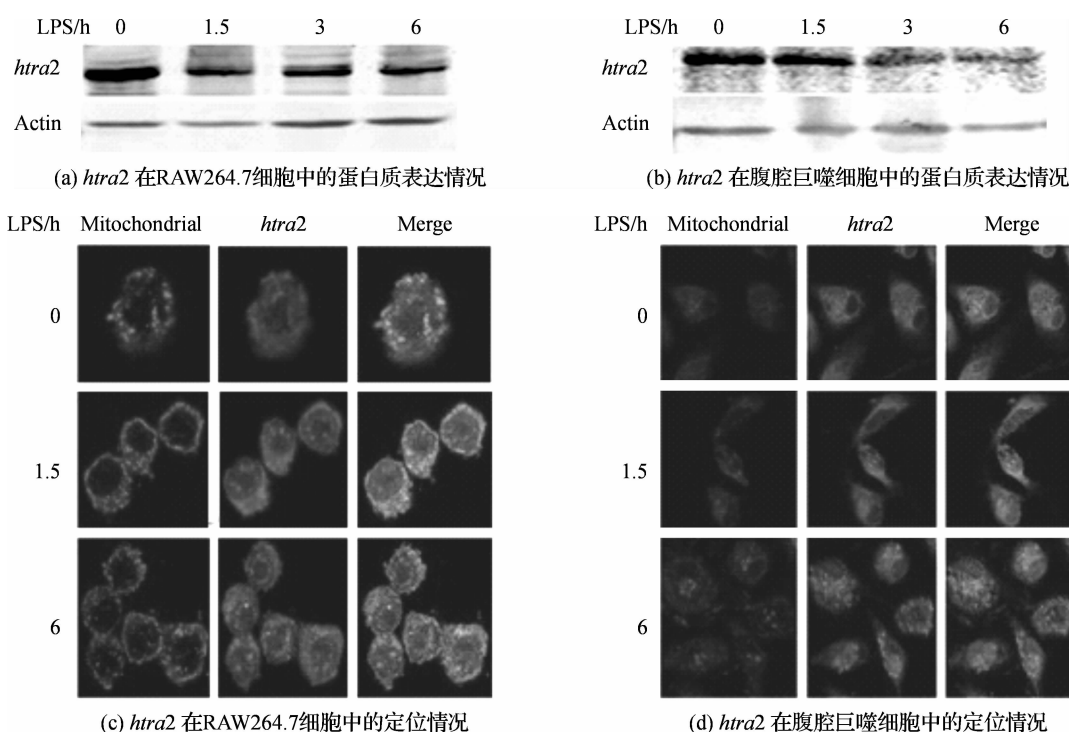


图1 *htra2* mRNA 在巨噬细胞中特异性表达的情况

2.2 LPS 刺激 M ϕ 及 RAW264.7 细胞不同时间点 *htra2* 蛋白水平和定位变化的情况

由于 *htra2* mRNA 在 LPS 刺激巨噬细胞时下调, 用同样的处理方法进一步研究 *htra2* 蛋白质水平的变化。结果表明, 内源 *htra2* 蛋白质随着刺激时间的延长在巨噬细胞系 RAW264.7 (见图 2a) 及腹腔巨噬细胞 (见图 2b) 中呈下调趋势, 与 mRNA 的下调一致。有研究表明 *htra2* 定位在线粒体

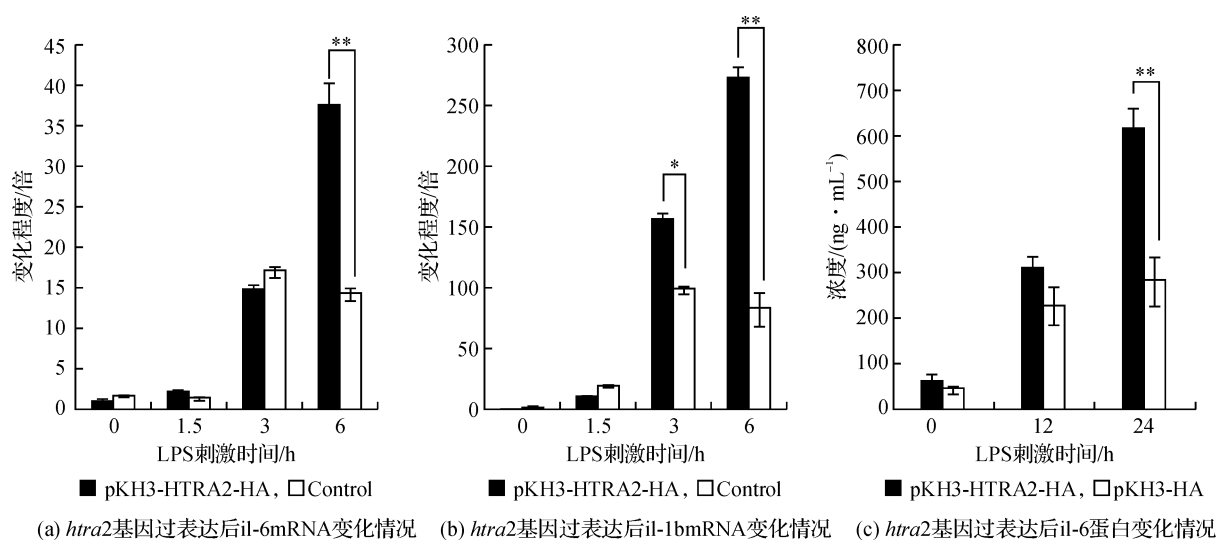
中^[12], 用同样的处理方法, 通过抗体标记线粒体 marker COX IV (红色荧光) 和内源 *htra2* (绿色荧光) 来检测 *htra2* 定位变化。结果表明, 在验证之前报道的 *htra2* 定位在线粒体之后, 发现在巨噬细胞系 RAW264.7 (见图 2c) 及腹腔巨噬细胞 (见图 2d) 中随着刺激的时间延长有部分内源 *htra2* 从线粒体中离开, 并形成点状聚集。

图2 *htra2* 在巨噬细胞中蛋白质水平和定位变化情况

2.3 *htra2* 基因过表达后 IL-6 及 IL-1b 的变化

通过荧光定量 PCR, 结果表明在 *htra2* 基因过表达的情况下, *il-6* (见图 3a)、*il-1b* (见图 3b) 的 mRNA 表达水平在 LPS 刺激 RAW264.7 细胞的不

同时间较对照组均有升高。通过 ELISA 分析 LPS 刺激 RAW264.7 细胞不同时间的细胞上清, 发现在 *htra2* 基因过表达的情况下, 细胞上清中 IL-6 的蛋白含量较对照组均有明显的增加 (见图 3c)。

图3 *htra2* 过表达后 IL-6 及 IL-1b 的变化情况

“*”代表 $P < 0.01$, “*”代表 $P < 0.05$

3 讨论

细菌脂多糖 LPS^[13] 是革兰氏阴性菌细胞壁的成分, 能够被 TLR4 所识别。LPS 刺激巨噬细胞或树突状细胞是模拟机体抗细菌感染免疫。LPS 能够与 LBP (LPS binding protein) 及受体蛋白 CD14

分子形成复合物, 当 TLR4 与该复合物结合时, 能激活下游的多条信号途径, 如 MAPK、NF- κ B 途径等, 进而将信号传递至核内^[14]。MAPK 家族是一组重要的丝/苏氨酸蛋白激酶, 通过调节下游底物的磷酸化水平来激活细胞内的多种转录因子。部分被激活的转录因子能够作用于多种免疫炎症因子如

il-6、*il-1b* 等基因启动子序列上的重要位点,调节免疫应答^[15]。

疱疹性口炎病毒 VSV 是一种由感染能力的病毒颗粒,能够被巨噬细胞摄取,并被 TLR7-9 所识别。VSV 刺激巨噬细胞是模拟机体抗病毒感染免疫。VSV 的 RNA 链能够与巨噬细胞胞内 TLR7-9 形成复合物,启动下游信号途径,主要产生 IFN 来对抗病毒的感染免疫,从而调节免疫应答^[16]。

实验结果表明,在 LPS 存在条件下刺激巨噬细胞时,会引起 *htra2* 基因特异的表达差异。而 LPS 刺激专职抗原递呈的树突状细胞^[17] 时及巨噬细胞抗病毒^[18] 免疫时,*htra2* 基因的表达没有变化。随着 LPS 刺激时间的延长,*htra2* 蛋白质下调和 *htra2* mRNA 变化趋势基本一致,但已证实蛋白质水平的变化不仅受到 mRNA 转录^[19] 水平的影响还受到转录翻译后修饰^[20] 的影响,故在原代巨噬细胞和细胞系中 *htra2* 蛋白质水平的变化并不完全一致。伴随 LPS 刺激 *htra2* 由线粒体中释放出来,提示这一释放使其重新定位并参与 LPS 引发事件中去。此外,过表达的 *htra2* 能够通过一系列信号途径,促进免疫炎症因子 IL-6、IL-1b 的表达。*htra2* 可能参与某一种或多种家族成员之间的作用来实现对转录因子的调控,进而影响免疫炎症因子^[21] 的表达。*htra2* 基因在免疫系统中的潜在作用及其具体作用机制还有待继续探索研究。如 *htra2* 在 LPS 刺激时,增强了 IL-6、IL-1b 表达和分泌。这些结果将为免疫炎症因子表达调控的研究提供一定的参考意义。

参考文献:

- [1] Janeway Jr C A, Medzhitov R. Innate immune recognition[J]. Annual Review of Immunology, 2002, 20(1): 197-216.
- [2] Papadimitraki E D, Bertsias G K, Boumpas D T. Toll like receptors and autoimmunity: a critical appraisal[J]. Journal of Autoimmunity, 2007, 29(4): 310-318.
- [3] Aderem A, Ulevitch R J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response [J]. Nature, 2000, 406 : 782-787.
- [4] Akira S, Tokeda K, Kaisho T, et al. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity[J]. Nature Immunology, 2001, 2(8): 675-80.
- [5] Georgel P, Jiang Z, Kunz S, et al. Vesicular stomatitis virus glycoprotein G activates a specific antiviral Toll-like receptor 4-dependent pathway[J]. Virology, 2007, 362(2): 304-313.
- [6] Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, et al. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death[J]. Molecular Cell, 2001, 8(3): 613-621.
- [7] Li Wenyu, Srinivasula S M, Chai Jijie, et al. Structural insights into the pro-apoptotic function of mitochondrial serine protease HtrA2/Omi[J]. Nature Structural Biology, 2002, 9(6): 436-441.
- [8] Martins L M, Iaccarino I, Tenev T, et al. The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(1): 439-444.
- [9] Li B, Hu Q, Wang H, et al. Omi/HtrA2 is a positive regulator of autophagy that facilitates the degradation of mutant proteins involved in neurodegenerative diseases [J]. Cell Death and Differentiation, 2010, 17: 1773-1784.
- [10] Lin H T, Tsai H Y, Liu C P, et al. Comparability of bovine virus titers obtained by TCID50/mL and FAID50/mL [J]. Journal of Virological Methods, 2010, 165(1): 121-124.
- [11] Ornberg R L, Harper T F, Liu H, et al. Western blot analysis with quantum dot fluorescence technology: a sensitive and quantitative method for multiplexed proteomics[J]. Nature Methods, 2005, 2(1): 79-81.
- [12] Hegde R, Srinivasula S M, Zhang Z J, et al. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(1): 432-438.
- [13] Wright S D, Ramos R A, Tobias P S, et al. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide(LPS) and LPS binding protein[J]. Science, 1990, 249(4975): 1431-1433.
- [14] Wang D, Lou J, Ou Y, et al. Ras-related protein Rab10 facilitates TLR4 signaling by promoting replenishment of TLR4 onto the plasma membrane[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(31): 13806-13811.
- [15] Ndlovu N, Van Lint C, Van Wesemael K, et al. Hyperactivated NF- κ B and AP-1 transcription factors, promote highly accessible chromatin and constitutive transcription across the interleukin-6 gene promoter in metastatic breast cancer cells[J]. Molecular and Cellular Biology, 2009, 29(20): 5488-5504.
- [16] Narayan O, Sheffer D, Clements J E, et al. Restricted replication of lentiviruses. Visna viruses induce a unique interferon during interaction between lymphocytes and infected macrophages[J]. J Exp Med, 1985,

- 162(6): 1594-1969.
- [17] Steinman R M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity[J]. Annual Review of Immunology, 1991, 9: 271-296.
- [18] Kedzierska K, Mak J, Mijch A, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments phagocytosis of mycobacterium avium complex by human immunodeficiency virus type 1-infected monocytes/macrophages in vitro and in vivo[J]. J Infect Dis, 2000, 181(1): 390-394.
- [19] Le P T, Lazorick S, Whichard L P, et al. Regulation of cytokine production in the human thymus: epidermal growth factor and transforming growth factor alpha regulate mRNA levels of interleukin 1 alpha(IL-1 alpha), IL-1 beta, and IL-6 in human thymic epithelial cells at a post-transcriptional level[J]. JEM, 1991, 174(5): 1147-1157.
- [20] Dai Z, Hooker B S, Quesenberry R D, et al. Optimization of acidothermus cellulolyticus endoglucanase(E1) production in transgenic tobacco plants by transcriptional, post-transcription and post-translational modification[J]. Transgenic Research, 2005, 14(5), 627-643.
- [21] Matsusaka T, Fujikawa K, Nishio Y, et al. Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(21): 10193-10197.

Study of Expression and Relevance of *htra2* in Macrophage and LPS

HAN Wen-zheng¹, WU Hu¹, LI Xiao-yan¹, LI Hong-yan¹, YAO Yun-liang², GUO Ke-ni¹, ZHOU Xiu-mei¹

(1. Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, School of Life Sciences,

Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

2. Institute of Immunology, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: This study stimulates dendritic cell and macrophage with LPS(lipopolysaccharide) and finds that the expression of HtrA serine peptidase 2(*htra2*) gene presents a variation trend of down-regulation with the extension of stimulation time, indicating that *htra2* in macrophage is regulated and controlled by LPS. To further demonstrate the specificity of LPS stimulation, the experiment establishes VSV(Vesicular Stomatitis Virus) virus infected macrophage model and studies the correlation between *htra2* variation and effect of LPS stimulation on macrophage respectively from the protein level and positioning of *htra2* with fluorescent quantitation PCR and immunofluorescence methods; establishes plasmid pKH3-*htra2*-HA of *htra2* gene overexpression and detects the influence of overexpressed *htra2* on macrophage's production and secretion of inflammatory factors IL-6(Interleukin-6) and IL-1b(Interleukin-1b) with ELISA, Western Blot and fluorescent quantitation PCR. The experimental result shows that *htra2* is only regulated and controlled in the system of LPS stimulating macrophage and overexpressed *htra2* will cause up-regulation of expression level of macrophage IL-1b and IL-6.

Key words: macrophage; LPS; VSV; immunofluorescence; IL-6

(责任编辑: 许惠儿)