

网络出版时间: 2020-9-4 10:38 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20200903.1446.001.html>

◇基础医学研究◇

胞内氯离子通道蛋白在单增李斯特菌感染的炎性小体活化中的作用

张连军 陈晨 黄俊松 姬强 耿慧武 李新颖 刘晓颖

摘要 目的 探究胞内氯离子通道蛋白(CLICs)在单增李斯特菌(*L. monocytogenes*)感染的巨噬细胞炎性小体活化中的作用。方法 原代培养小鼠来源的骨髓巨噬细胞,加入CLICs抑制剂IAA94用以抑制CLICs活性,感染*L. monocytogenes*,并分别通过ELISA、Western blot方法检测细胞培养上清液、细胞裂解液中白细胞介素-1 β (IL-1 β)的含量,研究CLICs对感染细胞炎性小体的活化作用。结果 ELISA实验显示IAA94处理的巨噬细胞在*L. monocytogenes*感染后释放的IL-1和乳酸脱氢酶(LDH)浓度下降;Western blot结果显示IAA94对*L. monocytogenes*感染引起的NOD样受体蛋白3(NLRP3)表达无影响。结论 CLICs促进*L. monocytogenes*感染的炎性小体的活化,但可能不通过NLRP3炎性小体通路,具体机制有待进一步研究。

关键词 氯离子通道蛋白;炎性小体;单增李斯特菌

中图分类号 R 392.12

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)10-1483-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.10.001

胞内氯离子通道蛋白(the chloride intracellular channels, CLICs)家族包括CLIC1-6等^[1]。CLICs在调节胞内酸碱度、细胞体积、肿瘤发生发展中有重要作用^[2]。炎性小体的活化通过激活天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-1(caspase-1)促进细胞因子前体白细胞介素1 β (pro-interleukin-1 β , pro-IL-1 β)和前体白细胞介素18(pro-interleukin-18, pro-IL-18)的切割并分泌白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素18(interleukin-18, IL-18)^[3]。其中NOD样受体蛋白3(Nod-like receptor family, pyrin domain containing 3, NLRP3)炎性小体被多种类型的

病原体及其他信号所激活,在机体免疫反应和疾病发生过程中扮演重要角色。

单增李斯特菌(*L. monocytogenes*)能够激活巨噬细胞内的NLRP3、黑素瘤缺乏因子2炎性小体等^[4-5]。该研究通过*L. monocytogenes*为胞内菌感染模型,观察CLICs在*L. monocytogenes*感染活化的炎性小体中的作用,进而为自身性免疫疾病的防治提供新的作用靶点和治疗措施。

1 材料与方法

1.1 细胞与菌株 从安徽医科大学实验动物中心订购C57BL/6J小鼠,取其骨髓巨噬细胞进行原代培养。菌株来自安徽省疾病预防控制中心,菌株编号CMCC54004。

1.2 主要试剂与仪器 茚基氧乙酸抑制剂(indanoyloxyacetic acid inhibitor, IAA94)(上海MedChemExpress公司);PageRuler™ Prestained Protein Ladder、Gibco培养液(美国Thermo Fisher Scientific公司);胎牛血清(加拿大Wisent公司);RIPA细胞裂解液(上海碧云天生物技术有限公司);小鼠IL-1 β 多抗(美国R&D systems公司);小鼠caspase-1单抗、小鼠NLRP3(Cryo-2)单抗(美国Adipogen公司)、生物素标记的小鼠IL-1 β 多克隆抗体(美国eBioscience公司);IL-1 β 蛋白标准品(上海Novoprotein公司);辣根过氧化物酶标记的Streptavidin二抗(美国Proteintech公司);辣根过氧化物酶标记的二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);TMB显色液、一抗稀释液(北京碧云天生物技术有限公司);庆大霉素、改良型BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海生工生物工程公司);CO₂恒温培养箱(美国nuiversall-maging公司);酶标仪(美国Molecular Devices公司);化学发光凝胶成像系统FluorChem FC3(美国ProteinSimple公司);光吸收酶标仪(美国Molecular Devices公司)。

1.3 方法

1.3.1 小鼠骨髓来源巨噬细胞培养 取C57BL/6J

2020-06-15 接收

基金项目: 安徽高校自然科学基金项目(编号: KJ2019A0235); 国家自然科学基金(编号: 81772908); 安徽医科大学校科研基金项目(编号: 2018xkj012)

作者单位: 安徽医科大学生命科学院生物学系, 合肥 230032

作者简介: 张连军, 男, 硕士研究生;

李新颖, 女, 讲师, 责任作者, E-mail: amyli87@126.com;

刘晓颖, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: liuxi-aoying@ahmu.edu.cn

小鼠来源的骨髓巨噬细胞 (bone marrow derived macrophages, BMDMs) 接种于含巨噬细胞完全培养液的培养皿中, 37 °C、5% CO₂ 恒温培养 7~9 d。在炎性小体实验中, 收集培养成熟的 BMDMs, 接种到 12 孔板中, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续培养 24 h, 加入终浓度为 100 ng/ml 的 LPS, 在 12 孔板中活化 3 h; 接着用 PBS 洗涤 2 次, 更换新鲜培养液, 然后加入终浓度为 100 μmol/L 的 IAA94 继续在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 0.5 h; PBS 洗涤 2 次, 更换新鲜培养液, 使用 *L. monocytogenes* 感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 5 感染 BMDMs 并在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中共培养 30 min; 用 PBS 洗涤 2 次, 加入终浓度为 10 μg/ml 庆大霉素孵育 BMDMs, 杀灭细胞外细菌, 继续在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 6 h 后收集细胞培养上清液, ELISA、Western blot 检测 IL-1、乳酸脱氢酶 (lactic dehydrogenase, LDH) 的浓度。

1.3.2 *L. monocytogenes* 培养 将挑取的 *L. monocytogenes* 单克隆菌落于脑心浸出液肉汤 (brain heart infusion broth, BHI) 培养液中, 并且在 37 °C 摇床中振荡, 过夜培养; 接着将细菌混悬液进行 1:50 稀释并在 37 °C 中继续培养 2.5~3 h 直至 OD₆₀₀ 达到 0.10, 此时细菌数达到约 2 × 10⁸/ml。将菌液从摇床中取出, 室温 4 000 r/min 离心 5 min, 并利用 PBS 清洗 2 次, 混悬后用于感染细胞。

1.3.3 ELISA 检测 IL-1 的表达 接种 1 × 10⁶ BMDMs 于 12 孔细胞培养板, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后加入终浓度为 100 ng/ml LPS 刺激 3 h; 并且加入 IAA94 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 30 min, 抑制 CLICs; 然后利用 *L. monocytogenes* MOI 5 感染 30 min; 最后加入终浓度为 10 μg/ml 庆大霉素杀死细胞外 *L. monocytogenes*, 收集细胞培养上清液, 置于 -80 °C 保存。96 孔 ELISA 板用小鼠 IL-1β 单克隆抗体 (1:500) 4 °C 过夜孵育。含 0.05% Tween-20 的 PBS 即 PBST 洗涤 3 次, 每次 2 min。用含 1% BSA 的 PBS 室温封闭 2 h, PBST 洗涤 3 次, 每次 2 min。加入待检测样品和制作标准曲线的 IL-1β 蛋白标准品 (倍数稀释), 然后 4 °C 过夜孵育, PBST 洗涤 3 次, 每次 2 min。加入生物素标记的小鼠 IL-1β 多克隆抗体 (1:500) 室温孵育 2 h, PBST 洗涤 3 次, 每次 2 min。并加入辣根过氧化物酶标记的 Streptavidin 二抗 (1:5 000) 室温避光孵育 30 min, PBST 洗涤 3 次, 每次 2 min。加入 TMB 底物显色, 然后加入 H₂SO₄ 终止反应, 酶标仪 450 nm 处测量

各孔的吸光度值。

1.3.4 LDH 的测定 接种 1 × 10⁶ BMDMs 于 12 孔细胞培养板, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后加入终浓度为 100 ng/ml LPS 刺激 3 h; 并且加入 IAA94 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 30 min, 抑制 CLICs; 然后利用 *L. monocytogenes* MOI = 5 感染 30 min; 最后加入终浓度为 10 μg/ml 庆大霉素杀死细胞外 *L. monocytogenes*, 收集细胞培养液上清液。将收集的细胞培养液上清液加入 96 孔板, 接着加入 LDH 检测工作液, 混匀, 室温避光孵育 30 min, 酶标仪 490 nm 处测量各孔吸光度值。

1.3.5 Western blot 待细胞培养 6 h 之后, 取出 12 孔板置于冰上; 预冷的 PBS 洗 2 次; 弃尽 PBS, 加入 RIPA 细胞裂解液, 冰上孵育 20 min; 4 °C、14 000 r/min 离心 20 min; 应用 BCA 法测定蛋白浓度; 取部分样品, 加 5 × SDS 上样缓冲液, 100 °C 煮沸 5 min, 取等量 (20 μg) 的蛋白质样品进行 SDS-PAGE 电泳。252 mA 恒流转膜 90 min, 含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 90 min; 分别一抗 4 °C 孵育过夜; TBST 洗 3 次; 辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:5 000) 室温孵育 90 min; TBST 洗 3 次; ECL 发光液显影。

1.4 统计学处理 采用 Graphpad Prism 8 软件进行统计分析, 所有计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, *t* 检验用于两组间均数的比较。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IAA94 对 *L. monocytogenes* 感染巨噬细胞炎性小体活化引起的 IL-1β 分泌的影响 为探究 CLICs 在 *L. monocytogenes* 感染引起的炎性小体的活化的作用, 在感染前使用 IAA94 抑制 CLICs 活性, 检测 *L. monocytogenes* 感染后 IL-1β 的释放情况。如图 1 所示, 在没有 *L. monocytogenes* 感染的情况下, 仅有少量 IL-1β 分泌至培养液上清液中; 在 LPS 预处理条件下, 巨噬细胞在 *L. monocytogenes* 感染后分泌大量 IL-1β, 与此相比, 经过 IAA94 处理后, 巨噬细胞在 *L. monocytogenes* 感染后 IL-1β 的分泌量呈下降趋势 (P = 0.028, n = 5), 说明 IAA94 对 *L. monocytogenes* 感染巨噬细胞活化炎性小体引起的 IL-1β 分泌有抑制作用。

2.2 IAA94 对 *L. monocytogenes* 感染巨噬细胞引起的细胞毒性的影响 炎性小体的活化伴随着细胞焦亡 (pyroptosis), 为了进一步确认 CLICs 调节的 *L. monocytogenes* 感染引起的炎性小体活化伴随的细胞

焦亡,通过检测细胞培养上清液中的 LDH 水平分析细胞毒性。如图 2 所示,在无 *L. monocytogenes* 感染处理组,细胞培养上清液中的 LDH 水平低;当 LPS 预处理时,IAA94 的加入使 *L. monocytogenes* 感染引起的细胞毒性降低,提示 IAA94 能够降低 *L. monocytogenes* 感染引起的细胞毒性($P=0.008$)。

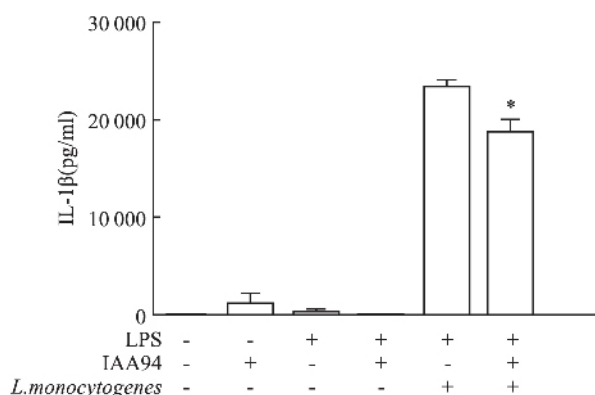


图1 IAA94 处理后对 *L. monocytogenes* 感染巨噬细胞引起炎症小体活化导致 IL-1 β 分泌的变化
与未经 IAA94 处理组比较: * $P < 0.05$

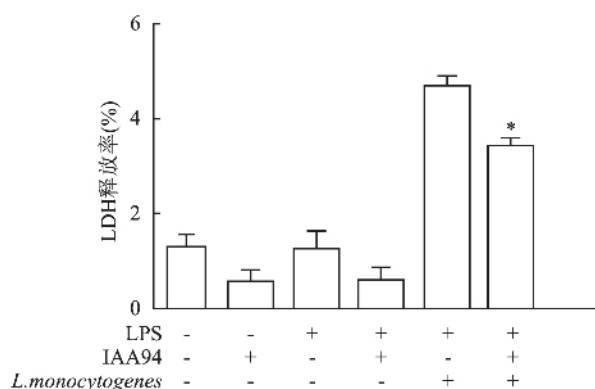


图2 IAA94 处理导致 *L. monocytogenes* 感染巨噬细胞引起的细胞毒性的改变
与未经 IAA94 处理组比较: * $P < 0.05$

2.3 IAA94 在 *L. monocytogenes* 感染的炎症小体的活化中对 NLRP3 炎症小体组分蛋白表达的影响

为了确定 CLICs 参与 *L. monocytogenes* 感染活化的炎症小体的分子机制,将细胞培养上清液、细胞裂解液进行 Western blot 实验,检测上清液中 caspase-1、IL-1 β 以及细胞中 NLRP3、caspase-1、pro-IL-1 β 的表达情况。图 3 显示,细胞培养上清液中,IAA94 处理后 *L. monocytogenes* 感染引起的 IL-1 β 释放量较对照组减少,caspase-1 的表达量也减少($n=3$)。细胞裂解液中 NLRP3 的表达量在 IAA94 处理组与对照组相比没有变化,提示 CLICs 参与的 *L. monocytogenes*

感染的炎症小体的活化可能不通过 NLRP3 炎症小体。

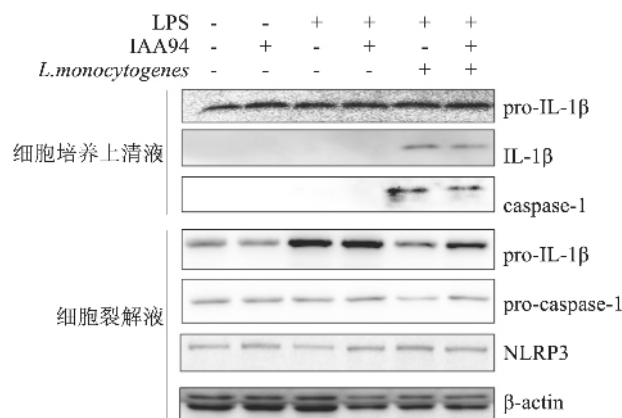


图3 炎症小体相关蛋白在细胞培养上清液、细胞裂解液中的表达

3 讨论

本研究探讨了 CLICs 促进 *L. monocytogenes* 感染引起的非 NLRP3 依赖的炎症小体的活化。*L. monocytogenes* 是一种革兰阳性食源性致病菌^[6],其被巨噬细胞吞噬形成吞噬小泡,其与溶酶体融合形成吞噬溶酶体,通过产生溶菌素 O (listeriolysin O)、磷脂酶 PlcA、PlcB 裂解吞噬溶酶体,从其中逃逸到细胞质中并迅速繁殖,感染相邻细胞^[7-8]。*L. monocytogenes* 感染巨噬细胞后,通过炎症小体的活化分泌 IL-1,激活一系列固有免疫反应进而清除感染。CLICs 在 *L. monocytogenes* 感染引起的炎症小体活化中的作用,提示其在抗胞内寄生菌感染中扮演重要角色。

CLICs 在细胞内分布广泛,家族成员的蛋白质序列有高度的同源性,C-端含有约 220 个氨基酸残基的同源结构域。CLICs 有可溶型和膜结合型两种类型,在静息细胞内主要以可溶形式的形式存在^[1]。CLICs 主要作为质子-氯离子交换通道调节细胞内 pH 水平,在肿瘤发生发展中有重要作用^[9]。*L. monocytogenes* 通过吞噬作用感染细胞,在细胞中形成吞噬小体,*L. monocytogenes* 表面的溶胞素 (listeriolysin) 裂解吞噬小体并使细菌逃离酸性环境避免被杀死,逃离到细胞质中的细菌导致炎症小体的活化,包括 NLRP3、AIM2、NLRC4 等,促进 IL-1 的释放进而调节促感染免疫反应^[10]。在 *L. monocytogenes* 感染下,该菌从吞噬小体逃逸到细胞质中,NLRP3 炎症小体首先被活化,而 AIM2、NLRC4 炎症小体则在感染后期由 *L. monocytogenes* 释放的 DNA、鞭毛蛋白所激活^[10]。NLRP3 炎症小体的活化进一步使

caspase-1 活化并切割 pro-IL-1 进而释放 IL-1。研究^[11]表明 CLICs 在 NLRP3 炎性小体激活中有重要作用,可能是通过感应细胞内钾离子流的升高或线粒体 ROS 的升高调控细胞内氯离子流,进而调节 NLRP3 炎性小体的组装,从而促进 IL-1 的释放。本研究结果显示 CLICs 在 *L. monocytogenes* 感染引起的 IL-1 的释放中是必需的,提示 CLICs 在抗感染免疫中扮演重要角色。在利用 LPS 诱导细胞产生 pro-IL-1 的过程中,CLICs 抑制剂 IAA94 并未对 pro-IL-1 的表达产生影响,表明 CLICs 对 NF- κ B 通路相关的 pro-IL-1 的表达无影响。在 *L. monocytogenes* 感染过程中,CLICs 是否通过促进 *L. monocytogenes* 逃离吞噬小体,促进 IL-1 的释放值得进一步研究。关于 *L. monocytogenes* 感染中 CLICs 是否通过 NLRP3 以外的其他通路活化炎性小体,需要进一步验证。

小鼠基因组中表达 CLIC1、CLIC3、CLIC4、CLIC5、CLIC6 等 CLICs 家族成员,其中 CLIC1、CLIC4、CLIC5 通过促进细胞内氯离子流动促进 NLRP3 炎性小体的活化,但在 AIM2、NLRC4 炎性小体的活化中无作用。本研究使用 IAA94 抑制 CLICs 的活性,而 CLICs 各个家族成员在 *L. monocytogenes* 感染的炎性小体活化的作用,以及各个成员之间的冗余效应需要进一步探究。

参考文献

[1] Edwards J C, Kahl C R. Chloride channels of intracellular mem-

branes[J]. *FEBS Lett* 2010, 584(10): 2102–11.

- [2] Littler D R, Harrop S J, Goodchild S C, et al. The enigma of the CLIC proteins: Ion channels, redox proteins, enzymes, scaffolding proteins? [J]. *FEBS Lett* 2010, 584(10): 2093–101.
- [3] Peretti M, Angelini M, Savalli N, et al. Chloride channels in cancer: Focus on chloride intracellular channel 1 and 4 (CLIC1 AND CLIC4) proteins in tumor development and as novel therapeutic targets[J]. *Biochim Biophys Acta* 2015, 1848(10 Pt B): 2523–31.
- [4] Bryant C, Fitzgerald K A. Molecular mechanisms involved in inflammasome activation[J]. *Trends Cell Biol* 2009, 19(9): 455–64.
- [5] Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes[J]. *Cell* 2010, 140(6): 821–32.
- [6] Dussurget O, Pizarro-Cerda J, Cossart P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2004, 58: 587–610.
- [7] Cossart P, Helenius A. Endocytosis of viruses and bacteria [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014, 6(8): a016972.
- [8] Pamer E G. Immune responses to *Listeria monocytogenes* [J]. *Nat Rev Immunol* 2004, 4(10): 812–23.
- [9] Bierne H, Milohanic E, Kortebe M. To be cytosolic or vacuolar: the double life of *Listeria monocytogenes* [J]. *Front Cell Infect Microbiol* 2018, 8: 136.
- [10] Eitel J, Suttrop N, Opitz B. Innate immune recognition and inflammasome activation in *Listeria monocytogenes* infection [J]. *Front Microbiol* 2010, 1: 149.
- [11] Scheel O, Zdebik A A, Lourdel S, et al. Voltage-dependent electrogenic chloride/proton exchange by endosomal CLIC proteins [J]. *Nature*, 2005, 436(7049): 424–7.

The role of chloride intracellular channels in inflammasome activation during *L. monocytogenes* infection

Zhang Lianjun, Chen Chen, Huang Junsong, et al

(Dept of Biology, College of Life Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the role of chloride intracellular channels (CLICs) in inflammasome activation during *L. monocytogenes* infection. **Methods** The primary cultured murine bone marrow macrophages were treated with CLIC inhibitor IAA94 and infected with *L. monocytogenes*, the levels of interleukin-1 beta (IL-1 β) in cell culture supernatants and cell lysates were detected using ELISA and Western blot, respectively. **Results** The release of IL-1 β and lactate dehydrogenase (LDH) decreased in the group of indanyloxyacetic acid 94 (IAA94) treatment with *L. monocytogenes* infection. Western blot showed that the level of IL-1 β in the cell lysates with IAA94 treatment and *L. monocytogenes* infection decreased but not in Nod-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3) dependent manner. **Conclusion** Chloride channel proteins is essential in inflammasome activation during *L. monocytogenes* infection, but it may not be in NLRP3-independent way, and the mechanism is still to be further elucidated.

Key words CLICs; inflammasome; *L. monocytogenes*