

网络出版时间: 2016-10-12 13:23:00 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20161012.1323.003.html>

EIF2AK2 和 NLRP3 相互作用影响细胞分泌 IL-1 β 的研究

鞠小丽¹, 王 强²

摘要 目的 研究真核细胞翻译起始因子 2AK2(EIF2AK2) 蛋白对 Nod 样受体蛋白 3(NLRP3) 炎症体激活及细胞分泌 IL-1 β 的影响。方法 在 HEK-293 细胞中, 通过转染凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、NLRP3、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-1(Caspase-1) 和促白细胞介素-1 β (pro-IL-1 β) 基因构建 NLRP3 炎症体, 并检测 EIF2AK2 蛋白过表达或敲低对细胞分泌炎症性细胞因子 IL-1 β 的影响; 通过免疫共沉淀研究 EIF2AK2 蛋白和 NLRP3 蛋白相互作用。最后在人单核 THP-1 细胞中通过 siRNA 干扰验证 EIF2AK2 对 IL-1 β 分泌水平的影响。结果 在 HEK-293 细胞中, 过表达 EIF2AK2 蛋白能激活 NLRP3 炎症体后诱导细胞分泌 IL-1 β , 并且 IL-1 β 分泌水平随 EIF2AK2 表达水平提高而增加。免疫共沉淀结果显示 EIF2AK2 蛋白能和 NLRP3 蛋白发生相互作用。THP-1 细胞中 siRNA 干扰抑制 EIF2AK2 表达后发现细胞分泌 IL-1 β 减少。结论 EIF2AK2 蛋白能调控 NLRP3 炎症体的激活从而影响细胞分泌促炎症因子 IL-1 β 。

关键词 NLRP3 炎症体; EIF2AK2; IL-1 β 分泌; 蛋白相互作用

中图分类号 R 392.11

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)11-1565-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.11.003

先天免疫系统通过各种模式识别相关分子

2016-06-12 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81502621、81502088), 江苏省自然科学基金(编号: BK20140539), 江苏大学高层次人才启动基金项目((编号: 14JDG065、15JDG021), 中国博士后科学基金(编号: 2015M571677)

作者单位: 江苏大学¹ 医学院病理教研室、² 生命科学研究院, 镇江 212013

作者简介: 鞠小丽, 女, 讲师;

王 强, 男, 助理研究员, 硕士生导师, 责任作者, wan-qiang@ujs.edu.cn

(pathogen-associated molecular patterns, PAMP) 识别各种病原体后抵抗病原体入侵^[1]。炎症体是一种由模式识别相关分子组成的大分子复合物。Nod 样受体蛋白 3(Nod-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症体由 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC) 和天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-1(cysteine-containing aspartate-specific proteases-1, caspase-1) 组成的分子量约为 700 ku 的大分子复合物^[2-3]。目前研究^[4]显示多种 PAMP 如三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)、单钠尿酸盐晶体(monosodium urate, MSU)、胆固醇结晶、 β 淀粉样蛋白等内源性危险信号都能引起 NLRP3 炎症体的激活。NLRP3 炎症体异常激活参与多种代谢异常疾病如 II 型糖尿病、阿尔茨海默病和动脉粥样硬化等^[5]。NLRP3 炎症体激活 3 种模型: 线粒体 DNA 假说、活性氧假说和溶酶体破裂假说^[4]。已报道 SGT1 和 Hsp90^[6]、TXNIP、TRIM30^[7] 和 GPSM3 等蛋白能和 NLRP3 相互作用从而调节 NLRP3 炎症体激活。真核细胞翻译起始因子 2AK2(eukaryotic translation initiation factors 2AK2, EIF2AK2) 最初发现是一个病原识别分子, 该蛋白 N 末端能和双链 RNA 结合诱导 C 末端催化区域活化^[8]。该研究通过在 HEK-293 细胞中重构 NLRP3 炎症体研究 EIF2AK2 在 NLRP3 炎症体激活中的重要作用。

1 材料与方法

1.1 材料 人胚肾细胞 HEK-293 和人单核细胞 THP-1 购自美国菌种保藏中心(ATCC); DMEM 和 RPMI1640 培养基、胎牛血清购自美国 Hyclone 公

neuroprotective effects on neurodegeneration. The chaperone Hsp60 and GCN-2 expression associated with UPR^{mt} by RNA interference were inhibited to observe the role of Sir2 overexpression in suppressing neurodegeneration in PD transgenic Drosophila and verify the correlation with UPR^{mt}. **Results** Sir2 overexpression significantly inhibited neurodegeneration in PD transgenic Drosophila and improved the athletic ability. The effect of Sir2 was weakened by inhibiting UPR^{mt}. **Conclusion** Sir2 overexpression has neuroprotective effects on PD transgenic Drosophila which is associated with UPR^{mt}.

Key words PD; Sir2; transgenic Drosophila; UPR^{mt}

司; 人 IL-1 β ELISA 试剂盒购自美国 BD 公司; MSU 和 ATP 购自美国 Sigma 公司; HA 和 Flag 抗体购自美国 CST 公司; 二抗购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 NLRP3 炎症体在 HEK-293 细胞中构建 通过基因特异性引物分别从人的 cDNA 中扩增 ASC、NLRP3、Caspase-1 和促白细胞介素-1 β (pro-interleukin-1 β , pro-IL-1 β) 基因并克隆到 pMD18-T 载体上。随后分别用 BamH I 和 Xho I 进行酶切后连接到用相同酶切的真核表达载体 pcDNA3, 分别得到 pcDNA3-ASC、pcDNA3-NLRP3、pcDNA3-Caspase-1 和 pcDNA3-pro-IL-1 β 重组体。按 1×10^5 个细胞/孔将细胞接种于 24 孔培养板中, 每孔加入 500 μ l 培养基培养过夜。第 2 天分别将 10 ng pcDNA3-ASC、20 ng pcDNA3-NLRP3、5 ng pcDNA3-Caspase-1 和 100 ng pcDNA3-pro-IL-1 β 重组体通过 X-tremeGENE HP 共转染 HEK-293 细胞。转染后 24 h 分别收集的上清液, 通过 ELISA 法检测 HEK-293 细胞分泌 IL-1 β 水平。在研究 EIF2AK2 对 IL-1 β 分泌影响实验中, 除了按上面将 pcDNA3-ASC、pcDNA3-NLRP3、pcDNA3-Caspase-1 和 pcDNA3-pro-IL-1 β 共转染 HEK-293 细胞外, 还将 25 ~ 200 ng 的 pcDNA3-HA-EIF2AK2 的共转染 HEK-293 细胞, 转染后 24 h 分别收集细胞上清液并检测 HEK-293 细胞分泌 IL-1 β 水平。

1.3 免疫沉淀反应 将克隆到 pMD18-T 载体的 EIF2AK2 和 NLRP3 基因分别通过 BamH I 和 Xho I 位点克隆到 pEAK-HA 和 pCMV-Tag 2, 随后克隆到 pcDNA3 上形成含 HA 标签的 pcDNA3-HA-EIF2AK2 重组体和 Flag 标签的 cDNA3-Flag-NLRP3 重组体。按 1×10^6 个细胞/孔将细胞接种于 6 孔培养板中, 每孔加入 2 ml 培养基培养过夜。将 pcDNA3-HA-EIF2AK2 和 pcDNA3-Flag-NLRP3 重组体共转染细胞。转染 48 h 后收集细胞, 用预冷的 PBS 液冲洗细胞 2 遍后, 用 1 ml 含 1% NP-40 的细胞裂解液在冰上裂解细胞 30 min。收集细胞上清液后加入 1 μ g 小鼠抗 Flag 单克隆抗体 4 $^{\circ}$ C 旋转混合 2 h, 加入 20 μ l 蛋白 A 继续混合过夜, 离心后去上清液, 用细胞裂解液洗涤沉淀 3 遍, 加入 20 μ l 的 SDS-PAGE 上样缓冲液, 煮沸 5 min, 进行 SDS-PAGE 电泳。

1.4 Western blot 法检测 细胞经 RIPA 裂解液裂解后收集上清液获得细胞总蛋白, 并通过 BCA 方法进行蛋白定量。将 20 μ l 蛋白样品上样后进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后用半干电转仪转膜, 5% 脱

脂奶粉封闭 1 h, 然后加入 1 : 2 000 稀释的兔抗 HA 多克隆抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 用 0.5% TBST 洗膜 3 次, 加入 1 : 10 000 稀释的羊抗兔二抗, 室温孵育 1 h, 用 0.5% TBST 洗膜 3 次, 按照操作说明, 加入化学发光液, 进行凝胶成像显影。

1.5 siRNA 干扰 EIF2AK2 及对 IL-1 β 的分泌 根据人的 EIF2AK2 基因序列, 按照 siRNA 的设计原则分别设计两对 siRNA (正义引物: 5'-CAGGTTTCTTCATGGAGGAAGCTTAA-3'; 反义引物: 5'-GGACCTCCACATGATAGGAGGTTTA-3'), 并交由美国 Invitrogen 公司合成。按 1×10^6 个细胞/孔将细胞接种于 24 孔培养板中, 每孔加入 500 μ l 培养基。将 20 mol/L 的 siRNA 用 Invitrogen 细胞电转仪 Neon Transfection System (MPK5000) 进行转染。转染 48 h 后, 收集细胞并提取 RNA 进行半定量 PCR 检测 EIF2AK2 表达水平。同时将 5×10^4 个细胞/孔将细胞接种于 96 孔培养板中, 分别用 0.5 mg/ml MSU 和 5 mol/L 的 ATP 刺激 6 h 和 3 h 后, 收集细胞上清液, 通过 ELISA 法检测细胞分泌 IL-1 β 水平。

2 结果

2.1 HEK-293 细胞中过表达 EIF2AK2 诱导细胞分泌 IL-1 β Western blot 结果显示 EIF2AK2 能在 HEK-293 细胞中过表达 (图 1A)。将 10 ng ASC、20 ng NLRP3、5 ng Caspase-1 和 100 ng pro-IL-1 β 共转染 HEK-293 细胞 24 h 后, ELISA 结果显示炎症体复合物能诱导 IL-1 β 分泌 (图 1B)。为了研究 EIF2AK2 是否影响 NLRP3 炎症体激活和 IL-1 β 的分泌, 将 EIF2AK2、ASC、NLRP3、Caspase-1 和 pro-IL-1 β 共转染 HEK-293 细胞, 结果显示 EIF2AK2 能显著诱导细胞分泌 IL-1 β (图 1B)。

2.2 EIF2AK2 促进 IL-1 β 分泌具有浓度依赖性 将 0 ~ 100 ng 的 EIF2AK2 和 NLRP3 炎症体复合物共转染 HEK-293 细胞 24 h 后, Western blot 结果显示 EIF2AK2 表达水平随着转染 pcDNA3-HA-EIF2AK2 重组体的量增加而增加 (图 2A)。ELISA 检测显示 25 ~ 100 ng 的 EIF2AK2 能促进细胞分泌 IL-1 β , 并且细胞分泌 IL-1 β 水平随着 EIF2AK2 浓度的增加而增加 (图 2B)。

2.3 EIF2AK2 和 NLRP3 蛋白相互作用 将 Flag 标签的 NLRP3 蛋白和 HA 标签的 EIF2AK2 蛋白共转染 HEK-293 细胞, 通过免疫共沉淀显示 EIF2AK2 蛋白能和 NLRP3 蛋白发生相互作用 (图 3)。而对照 IgG 并未检测到条带, 说明 EIF2AK2 和 NLRP3 发

生特异的相互作用。

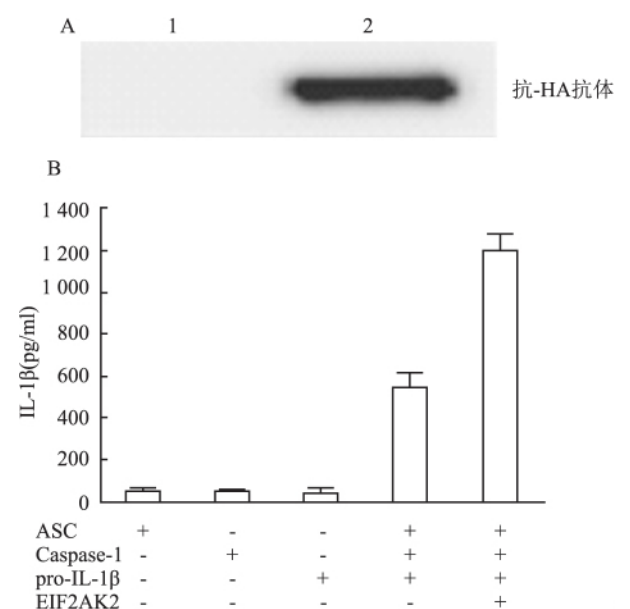


图1 HEK-293 细胞过表达 EIF2AK2 对 IL-1β 分泌影响

A: Western blot 法检测 EIF2AK2 表达水平; B: ELISA 法检测 IL-1β 分泌水平; 1: 空载体; 2: pcDNA3-HA-EIF2AK2

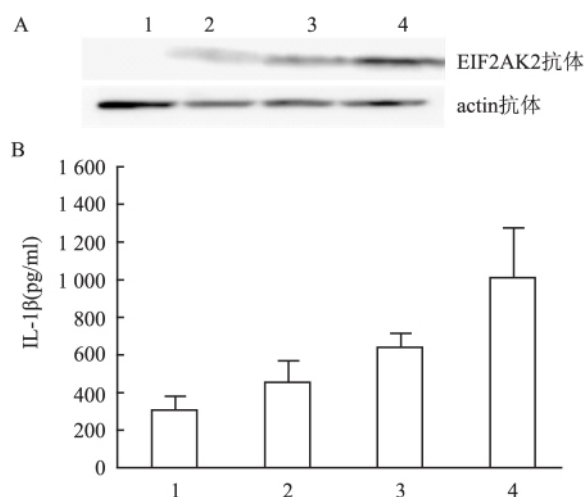


图2 HEK-293 细胞中 EIF2AK2 蛋白表达水平对 IL-1β 分泌的影响

A: Western blot 法检测 EIF2AK2 表达水平; B: ELISA 法检测 IL-1β 分泌水平; 1 ~ 4: 细胞分别转染 0、25、50、100 ng pcDNA3-HA-EIF2AK2 载体

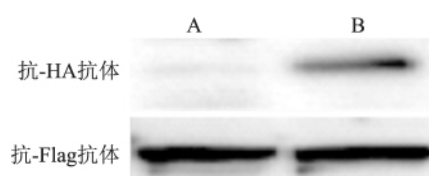


图3 HEK-293 细胞中 EIF2AK2 和 NLRP3 免疫共沉淀结果

A: IgG; B: Flag-NLRP3

2.4 siRNA 干扰 EIF2AK2 表达后抑制 IL-1β 的分泌 在人单核 THP-1 细胞中分别转染 EIF2AK2(#1 和 #2) 和对照 siRNA 转染 48 h 后 RT-PCR 结果显示 EIF2AK2 基因表达水平被显著抑制(图 4A) 。将这些细胞分别用 0.5 mg/ml MSU 和 5 mol/L 的 ATP 刺激 6 h 和 3 h 后, EIF2AK2 干扰的 THP-1 细胞比对照细胞分泌的 IL-1β 明显减少(图 4) 。

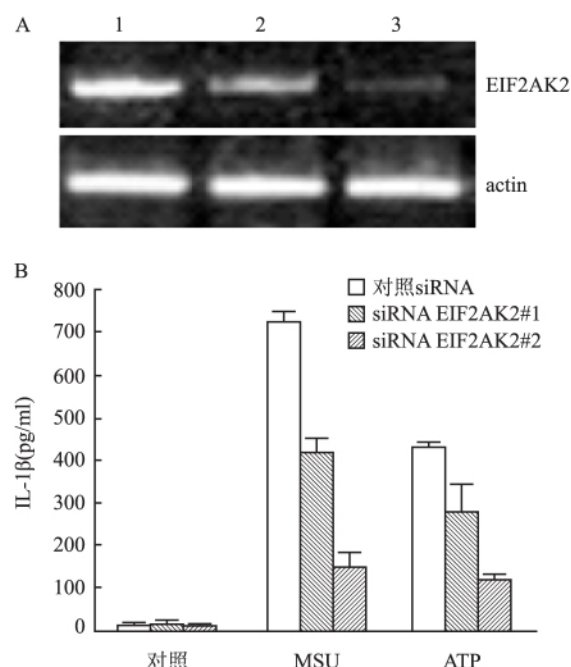


图4 THP-1 细胞中 siRNA 干扰 EIF2AK2 后 RT-PCR 检测基因表达水平(A) 及 ELISA 法检测 IL-1β 分泌水平(B)

1: 对照 siRNA; 2: siRNA EIF2AK2#1; 3: siRNA EIF2AK2#2

3 讨论

NLRP3 炎症体激活是一个复杂的过程, 涉及到一系列事件。不同的微生物和代谢产物激活 NLRP3 炎症体的机制也不同^[4]。如尿酸钠晶体和二氧化硅通过钙离子外流激活 NLRP3 炎症体^[9-10], 胰岛淀粉样多肽则通过活性氧激活 NLRP3 炎症体^[11], 而 β 淀粉样蛋白则通过溶酶体破裂激活炎症体^[12]。目前还没有发现 NLRP3 能直接识别这些配体而激活炎症体。推测可能通过不同上游信号激活 NLRP3 炎症体, 因此研究调节 NLRP3 炎症体激活的蛋白具有重要意义。目前已发现两类调节 NLRP3 炎症体的蛋白。一类包括热蛋白、POP 和病毒热蛋白(vPYDs) 等具有 PYD 结构域的蛋白; 另一类为包括 Iceberg、COP1、INCA 和 Caspase-12 等含有 CARD 结构域的蛋白。本研究显示的负调节蛋白虽然不

含有这两个结构域,但已有的研究^[13]显示 EIF2AK2 是一个病原识别受体,该蛋白的 N 末端能和双链 RNA 病毒相结合后激活 C 末端催化区域。同时亦显示该蛋白 N 末端还能识别许多非病毒类刺激,如脂肪酸、细胞外 ATP 和二氧化硅晶体等^[13]。本研究显示在 THP-1 细胞中,抑制 EIF2AK2 表达后能促进 ATP 诱导的 THP-1 细胞中 IL-1 β 分泌,推测 ATP 可能通过激活 EIF2AK2 从而影响炎症激活,最终影响细胞分泌 IL-1 β 。具体的机制将在以后的研究中进一步验证。

NLRP3 炎症体由 NLRP3 蛋白、接头蛋白 ASC 和效应蛋白 Caspase-1 组成复合体。本研究显示 EIF2AK2 蛋白能和炎症体的 NLRP3 蛋白相互作用,然而并不清楚该蛋白是否和炎症体中其它蛋白如 ASC 等相互作用,今后的研究方向将会进一步研究该蛋白调节炎症体激活的具体机制。NLRP3 炎症体和一系列的代谢疾病有关,虽然对 NLRP3 炎症体激活有了较多的认识,但针对 NLRP3 炎症体仍有许多问题需要研究解决,其中重要的问题之一就是炎症体如何被精确的调控,本研究显示 EIF2AK2 蛋白能调节 NLRP3 炎症体将为炎症体相关的疾病预防提供新的思路。

参考文献

- [1] Girardin S E, Philpott D J. Mini-review: the role of peptidoglycan recognition in innate immunity [J]. Eur J Immuno, 2004, 34 (7): 1777-82.
- [2] Lamkanfi M, Dixit V M. Mechanisms and functions of inflammasomes [J]. Cell, 2014, 57(5): 1013-22.
- [3] Davis B K, Wen H, Ting J P. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases [J]. Annu Rev Immuno, 2011, 29: 707-35.
- [4] Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production [J]. Nat Rev Immuno, 2010, 10(3): 210-5.
- [5] De Nardo D, Latz E. NLRP3 inflammasomes link inflammation and metabolic disease [J]. Trends Immuno, 2011, 32(8): 373-9.
- [6] Mayor A, Martinon F, De Smedt T, et al. A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses [J]. Nat Immunol, 2007, 8(5): 497-503.
- [7] Hu Y, Mao K, Zeng Y, et al. Tripartite-motif protein 30 negatively regulates NLRP3 inflammasome activation by modulating reactive oxygen species production [J]. Immunol, 2010, 185(12): 7699-705.
- [8] Bullido M J, Martinez-Garcia A, Tenorio R, et al. Double stranded RNA activated EIF2 alpha kinase (EIF2AK2; PKR) is associated with Alzheimer's disease [J]. Neurobiol Aging, 2008, 29(8): 1160-6.
- [9] Martinon F, Petrilli V, Mayor A T, et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome [J]. Nature, 2006, 440(7081): 237-41.
- [10] Cassel S L, Eisenbarth S C, Iyer S S, et al. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis [J]. P Natl Acad Sci USA, 2008, 105(26): 9035-40.
- [11] Westermark P, Andersson A, Westermark G T. Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus [J]. Physiol Rev, 2011, 91(3): 795-826.
- [12] Halle A, Hornung V, Petzold G C, et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta [J]. Nat Immunol, 2008, 9(8): 857-65.
- [13] Niso-Santano M, Shen S, Adjemian S, et al. Direct interaction between STAT3 and EIF2AK2 controls fatty acid-induced autophagy [J]. Autophagy, 2013, 9(3): 415-7.

Investigation of EIF2AK2 interaction with NLRP3 and effect on the release of IL-1 β

Ju Xiaoli¹, Wang Qiang²

(¹School of Medicine, ²Institute of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212013)

Abstract Objective To investigate the effect of EIF2AK2 on the activation of NLRP3 inflammasome and the release of IL-1 β . **Methods** NLRP3 inflammasome was re-constructed in HEK-293 cells to examine the release of IL-1 β by overexpression of EIF2AK2. The co-immunoprecipitation was performed to investigate the interaction between EIF2AK2 and NLRP3. Finally siRNA of EIF2AK2 in THP-1 cells was performed to examine the release of IL-1 β . **Results** Overexpression of EIF2AK2 in HEK-293 cells activated NLRP3 inflammasome and increased IL-1 β release. IL-1 β release increased greatly when expression level of EIF2AK2 increased. The co-immunoprecipitation results demonstrated that EIF2AK2 interacted with NLRP3 in HEK-293 cells. IL-1 β release was reduced when EIF2AK2 expression was inhibited by siRNA in THP-1 cells. **Conclusion** These results suggest that EIF2AK2 regulates the activation of NLRP3 inflammasome and then affects IL-1 β release.

Key words NLRP3 inflammasome; EIF2AK2; IL-1 β release; protein interaction