

自噬对巨噬细胞吞噬金黄色葡萄球菌的影响

吕允相 吴惠梅 方 磊 刘荣玉

摘要 目的 探讨金黄色葡萄球菌(简称金葡菌)对巨噬细胞自噬的影响,并研究其在巨噬细胞吞噬病原微生物中的作用。方法 以小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 为研究对象,以磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-MA)为干预药物,空白处理作为对照组,金葡菌感染作为实验组,3-MA 干预作为抑制组。金葡菌感染细胞后,Western blot 检测自噬蛋白 Beclin1、LC3 以及吞噬相关蛋白 Rac1 的表达,激光共聚焦显微镜观察自噬、吞噬现象。结果 金葡菌感染 RAW264.7 1 h 后,实验组 LC3 II 和 PI3K 蛋白表达最强($P < 0.05$),抑制组 Beclin1 和 LC3 II 表达显著降低($P < 0.05$),自噬颗粒聚集显著减少($P < 0.05$),Rac1 表达显著降低($P < 0.05$),同时,RAW264.7 吞噬金葡菌数目显著减少($P < 0.05$)。结论 金葡菌诱导的自噬增强了巨噬细胞吞噬能力,自噬抑制剂 3-MA 抑制 PI3K 活性的同时,减弱了巨噬细胞自噬吞噬金葡菌的能力。

关键词 吞噬;自噬;巨噬细胞;磷脂酰肌醇 3 激酶;金黄色葡萄球菌

中图分类号 R 378.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)06-0706-05

外来微生物进入身体无菌部位时,巨噬细胞通过趋化作用黏附、内化这些病原体,最终被清除,并产生细胞因子,诱导机体炎症反应,从而保护机体组织和器官^[1]。自噬是哺乳动物细胞降解自身老化细胞器和蛋白聚集体必不可少的稳态过程,营养缺乏和免疫信号激活都能够诱导自噬从而清除细胞自身成分。研究^[2]表明自噬具有桥接先天免疫和后天免疫的功能,自噬通路能够平衡免疫和炎症,从而对抗感染、自身免疫病和炎症性疾病。磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)家族是一类磷酸化酶,目前已知的有 I 型、II 型和 III 型。I

型和 III 型都在自噬中有重要作用, I 型 PI3K 通过激活下游蛋白参与自噬,而 III 型 PI3K 通过与 Beclin1 蛋白结合参与自噬过程^[3]。酵母多糖可以通过 Toll 样受体 2(Toll-like receptor 2, TLR2)招募 Beclin1 和激活 PI3K 诱导 RAW264.7 发生自噬^[4]。金黄色葡萄球菌(简称金葡菌)是一种革兰阳性球菌,临床上分为耐甲氧西林金葡菌与甲氧西林敏感性金葡菌,其致病性主要是其细胞壁成分及产生外毒素和酶,然而金葡菌刺激巨噬细胞后能否诱导其自噬,以及自噬过程的激活能否增强巨噬细胞吞噬病原微生物尚不清楚。该实验以小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 为研究对象,研究金葡菌诱导的巨噬细胞自噬对其吞噬能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系及菌株 小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 购于上海细胞库;金黄色葡萄球菌 NCTC8325 由中国科学技术大学生命科学学院孙宝林教授馈赠。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM 培养基、Lipofectamine 2000、胎牛血清、青霉素和链霉素购于美国 Invitrogen 公司;噻唑蓝(MTT)试剂盒购于中国 Solarbio 公司;3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)购于美国 Sigma 公司;LC3 多克隆抗体购于美国 Novus Biologicals 公司;PI3K、Beclin1 和 Rac1 单克隆抗体购于美国 Cell Signaling 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的 GAPDH 和 β -actin 一抗购于中国康城公司;HRP 标记的羊抗兔和兔抗鼠二抗购于美国 Santa Cruz Biotechnology 公司;ECL 化学发光检测试剂盒、细胞培养箱购于美国 Thermo 公司;细胞培养板购于美国 Corning 公司;LSM510 激光共聚焦显微镜购于德国蔡司公司;ELX800 酶标仪购于美国 Bio-Tek instruments 公司;蛋白电泳转移系统购于美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 RAW264.7 细胞用含 10% 胎牛血清、100 U/L 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 DMEM 培养于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱内,根据细胞数目形态

2014-02-17 接收

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:81270082、81170030);教育部高等学校博士学科点专项科研基金(编号:20113420110006);安徽省科技攻关项目(编号:12010402135);重点实验室计划项目(编号:1206c0805028)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院老年呼吸内科,合肥 230022

作者简介:吕允相 男 硕士研究生;

刘荣玉 女,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: rongyuliu@gmail.com

2~3 d 传代 1 次,保持细胞处于对数生长期。

1.2.2 细菌培养 金葡菌在 0.1% 氯霉素的 LB 培养基(胰蛋白胨 10 g/L; 酵母提取物 5 g/L; 氯化钠 10 g/L) 中培养 20 h 后,测定其 650 nm 处吸光度(optical density, OD_{650}) ($OD_{650} = 5.0$, 约 5×10^9 / ml), 16% 甘油冻存, -80°C 保存。

1.2.3 金葡菌感染细胞 将对数生长期的 RAW264.7 按 1×10^6 / ml 的密度分别接种 6 孔板,培养过夜。PBS 清洗金葡菌 3 次,用不含抗生素的 DMEM 培养基重悬并稀释,根据预实验结果,按感染复数(multiplicity of infection, MOI) 为 100:1 (细菌:细胞) 加入培养板中感染细胞。将实验分为 3 组:空白处理作为对照组,金葡菌感染作为实验组,3-MA 干预作为抑制组。

1.2.4 MTT 检测 3-MA 作用下 RAW264.7 活力 PBS 冲洗细胞后,加入 0.25% 胰酶消化,待细胞形态变圆时弃去胰酶,用培养基轻轻吹落细胞,计数将细胞密度控制在 5×10^4 / ml, 种于 96 孔板中 36 孔,每孔 100 μl 96 孔板四周孔加入 PBS,每孔 100 μl , 放入培养箱内培养过夜,待细胞完全贴壁,密度约 90% 后,分别加入 0、1.25、2.5、5 和 10 mmol/L 3-MA 处理 2 h 后,弃去培养基加入新鲜培养基,每孔加入 5% MTT (0.5 mg/ml) 10 μl , 继续培养 4 h 后,向每孔加入二甲基亚砜(DMSO) 150 μl , 在摇床上摇 15 min 整个过程避光操作。紫色结晶溶解后用酶标仪检测各孔于 490 nm 波长处的吸光值。细胞存活(%) = (加药组吸光度/对照组吸光度) \times 100%。

1.2.5 细胞转染及自噬吞噬观察 取对数期 RAW264.7, 计数约 1×10^6 / ml 接种于玻璃底动态皿中,培养过夜,按 Lipofectmine 2000 说明书转染 GFP-LC3 转染后,各组细胞处理如 1.2.3 所示,之后去除上清液,用 PBS 冲洗 2 次,加入 10% 甲醛固定 10 min,弃去甲醛用 PBS 冲洗 3 次,最后加入 1 ml PBS 4°C 保存待激光共聚焦显微镜镜下观察。

1.2.6 蛋白提取和 Western blot 法检测相关蛋白表达 12 孔板中细胞处理如 1.2.3 所示,之后加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂细胞裂解液在冰上裂解细胞 30 min,吹打裂解的细胞获取混合液于 4°C 12 000 r/min 离心 15 min,收集上清液加入等体积 $2 \times$ loading buffer 混匀,煮沸 10 min, -20°C 保存。采用 SDS-PAGE 凝胶电泳法,下层 12% 分离胶,上层 5% 浓缩胶,蛋白上样,120 V 恒压电泳 1.5 h 后,280 mA 恒流转膜 2 h 将蛋白转至 PVDF 蛋白膜上,

根据预染蛋白 Marker,剪下不同的蛋白于湿盒内孵育相应一抗(稀释比例: LC3 1:5 000; Beclin1 1:2 000; PI3K 1:1 000; Rac1 1:1 000; GAPDH 1:2 000; β -actin 1:2 000) 4°C 过夜后室温 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 15 min,室温孵育二抗 1 h(稀释比例: 1:2 000) ,TBST 洗膜 3 次,每次 15 min, ECL A、B 液等体积混合后敷于蛋白膜上,于化学发光成像 ChemiScope 显影。运用 Image J 软件对蛋白灰度值进行分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并进行方差齐性检验,各组均数采用方差分析,两两比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 3-MA 对 RAW264.7 活力的影响 3-MA 预处理 RAW264.7 2 h 后,MTT 比色法测得各组细胞活力相对百分比结果显示 3-MA 浓度为 5 mmol/L 时显著影响细胞活力($F = 20.08$, $P < 0.05$),见表 1。3-MA 是一种特异性自噬抑制剂,在不影响 RAW264.7 活力的情况下,根据结果选择其最适浓度为 2.5 mmol/L,因此在接下来的实验中使用 3-MA 的浓度为 2.5 mmol/L。

表 1 3-MA 预处理 2 h 对 RAW264.7 活力的影响($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

3-MA (mmol/L)	细胞活力 (%)
0	84.36 \pm 9.87*
1.25	81.38 \pm 2.22*
2.5	81.24 \pm 3.55*
5	59.43 \pm 3.16
10	40.77 \pm 2.05*

与 5 mmol/L 组比较: * $P < 0.05$

2.2 不同感染时间对 RAW264.7 PI3K 和 LC3 蛋白表达量的影响 研究金葡菌诱导的 RAW264.7 自噬作用,金葡菌感染时间分别设为 0、15、30、45、60、75、90、105、120、180 和 240 min。采用 Western blot 检测蛋白 PI3K 和 LC3 表达量。金葡菌感染 1 h,PI3K 和 LC3 II 表达量最高($P < 0.05$),见图 1。

2.3 抑制 PI3K 活性下调了 RAW264.7 自噬相关蛋白的表达和自噬颗粒的聚集 3-MA 预处理 RAW264.7 后,金葡菌感染后,Western blot 检测 PI3K、Beclin1 和 LC3 II 蛋白表达量。实验组和抑制组 PI3K 表达量差异无统计学意义($P > 0.05$);实验组与对照组 LC3 II 表达量差异有统计学意义($P = 0.0019$);实验组与抑制组 LC3 II 表达量差异有统计学意义($P = 0.0011$);对照组与抑制组 LC3 II

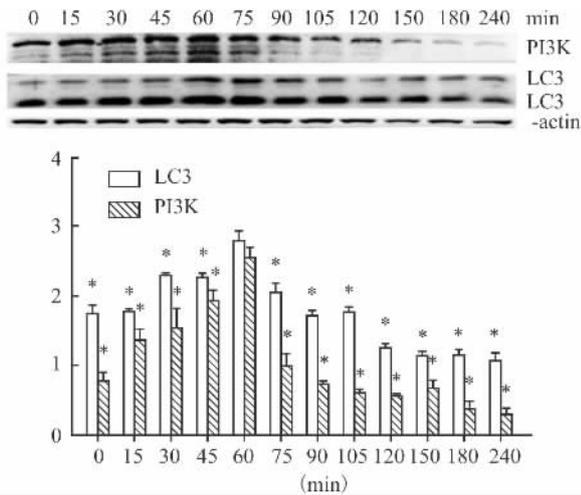


图1 金葡菌感染 RAW264.7 不同时间后, Western blot 检测 PI3K 和 LC3 II 蛋白表达量与金葡菌感染 60 min 组比较: * $P < 0.05$

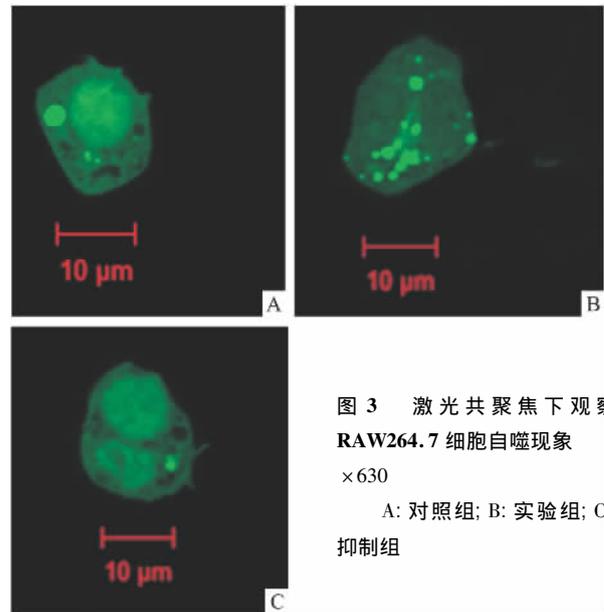


图3 激光共聚焦下观察 RAW264.7 细胞自噬现象 ×630
A: 对照组; B: 实验组; C: 抑制组

表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 对照组与实验组 Beclin1 表达量差异有统计学意义 ($P = 0.0219$); 实验组与抑制组 Beclin1 表达量差异有统计学意义 ($P = 0.0003$)。见图 2。同时, 激光共聚焦观察 LC3 自噬颗粒聚集。实验组 (6.27 ± 0.405) 带绿色荧光 LC3 自噬颗粒表达量较对照组 (1.16 ± 0.334)、抑制组 (2.17 ± 0.176) 显著增加 ($P < 0.01$), 见图 3。

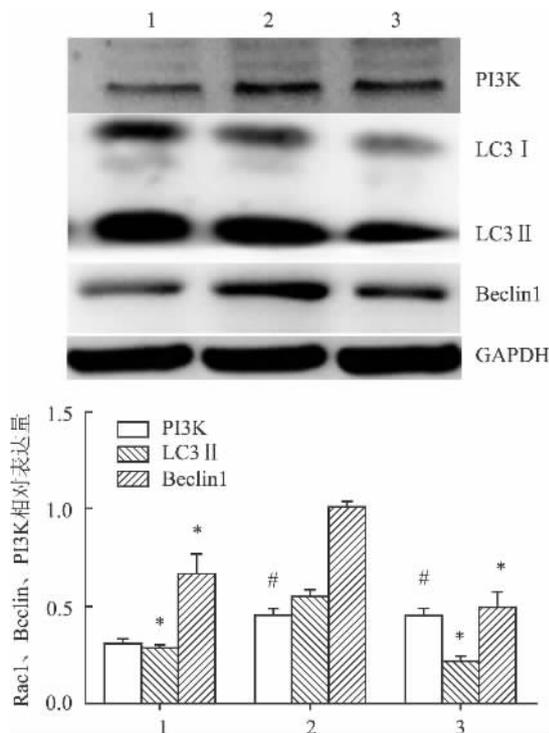


图2 金葡菌感染 RAW264.7 后 PI3K、LC3 II 及 Beclin1 表达量
1: 对照组; 2: 实验组; 3: 抑制组; 与实验组比较: * $P < 0.05$; 与对照组比较: # $P < 0.05$

2.4 抑制 PI3K 活性下调了 RAW264.7 吞噬相关蛋白的表达和吞噬金葡菌的数目 3-MA 预处理 RAW264.7 后, 用约 1×10^8 /ml 金葡菌感染细胞后, Western blot 检测 Rac1 蛋白表达量。对照组与实验组 Rac1 表达量差异有统计学意义 ($P = 0.0001$); 实验组与抑制组 Rac1 表达量差异有统计意义 ($P = 0.0473$), 见图 4。同时, 激光共聚焦观察 RAW264.7 吞噬金葡菌的数目。圆形或椭圆形表面有突起的是 RAW264.7 细胞上吞噬的圆点为金葡菌, 抑制组 (8.37 ± 0.397) RAW264.7 吞噬金葡菌比实验组 (11.90 ± 0.601) 显著减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 5。

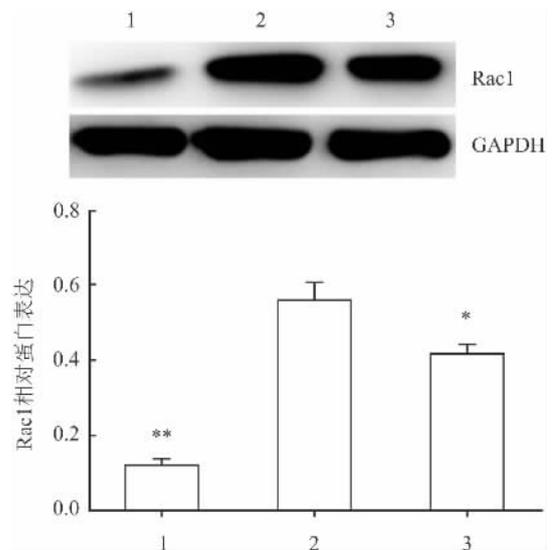


图4 金葡菌感染后 RAW264.7 Rac1 表达量
1: 对照组; 2: 实验组; 3: 抑制组; 与实验组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

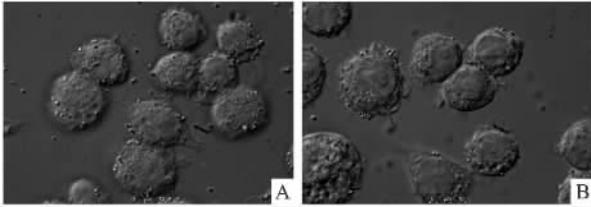


图5 激光共聚焦下观察 RAW64.7 吞噬现象 ×630
A: 实验组; B: 抑制组

3 讨论

金葡菌与过敏性疾病如哮喘相关,近期研究^[5]表明哮喘患者血清中常含有特异性金葡菌外毒素抗体 IgE,而且 IgE 浓度与哮喘严重程度呈正相关。金葡菌外空泡可以诱导气道中性粒细胞 Th1 和 Th17 反应,同时可以增强气道高反应性^[6]。因此,有效清除气道内金葡菌可能减轻哮喘症状及其发作。

肺泡巨噬细胞(alveolar macrophages, AMs)是气道先天性免疫的第一道屏障,能监测和清除病原体并启动早期宿主免疫反应,激素依赖性哮喘患者 AMs 吞噬凋亡细胞的能力明显降低^[7]。Simpson et al^[8]也发现嗜酸性粒细胞性哮喘患者痰中巨噬细胞吞噬凋亡细胞的能力也明显降低。临床上激素治疗嗜酸性粒细胞性哮喘不理想。因此,调控 AMs 对病原体的吞噬可能是哮喘治疗一个潜在策略。Rac1 是 Rho 家族蛋白之一,活化 Rac1 引起细胞骨架结构和细胞形态改变,进而膜褶皱形成吞噬杯调节吞噬^[9]。Tanaka et al^[10]在肺炎小鼠 AMs 中显示活化 Rac1 后上调对凋亡细胞的吞噬。本实验显示金葡菌感染 RAW264.7 1 h 后,PI3K 蛋白表达量明显升高。3-MA 抑制 PI3K 活性后,Rac1 蛋白表达量显著降低,吞噬率显著降低,提示活化 PI3K 可能参与了吞噬。同时,本实验显示抑制 Rac1 表达后,RAW264.7 吞噬金葡菌能力降低,与 Shen et al^[11]认为抑制 Rac1 活性减弱了肌动蛋白的聚集,降低了小鼠巨噬细胞对李斯特菌的吞噬的研究一致。以上结果提示 RAW264.7 Rac1 的活化是依赖 PI3K 的。

自噬蛋白 Beclin1 是 Atg6 的哺乳动物同源类似物,参与 III 类 PI3K 复合物的形成同时招募其他蛋白促进自噬吞噬体膜形成^[12]。LC3 是 Atg8 的哺乳动物同源物,通过 Atg4 水解 C 端形成胞质 LC3 I,之后与磷脂酰乙醇胺共价结合形成膜 LC3 II。LC3 II 持续存在于自噬体膜,是目前自噬吞噬体最可靠的

标志蛋白^[13]。研究^[14]显示,在中重度哮喘患者上皮细胞和成纤维细胞内发现了大量自噬颗粒聚集,也显示自噬基因 Atg5 固有单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs) rs 2212740 序列与哮喘相关,而且此序列与哮喘患者一秒用力呼气容积(forced expiratory volume in one second, FEV1)相关,因此推测自噬可能是参与气道重塑和肺功能降低的细胞机制。Mestre et al^[12]研究发现,金葡菌能够通过降低细胞内 cAMP 水平诱导宿主细胞自噬,本研究发现金葡菌感染 1 h 后,PI3K 蛋白表达量最高,Beclin1 和 LC3 II 蛋白表达显著升高,而且细胞 GFP-LC3 颗粒聚集显著升高,提示 PI3K 参与了金葡菌诱导的 RAW264.7 自噬;抑制 PI3K 活性后,自噬蛋白表达显著降低,GFP-LC3 颗粒聚集也显著降低,进一步提示金葡菌通过 PI3K 介导了 RAW264.7 的自噬。

本实验以小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 为研究对象,在金葡菌感染的情况下,抑制 PI3K 活性为手段,探讨 RAW264.7 自噬吞噬过程。该实验显示金葡菌诱导了 RAW264.7 自噬,且感染 1 h 时自噬蛋白表达量达到最高。3-MA 抑制 PI3K 活性后,RAW264.7 自噬蛋白表达和自噬颗粒聚集显著降低,且对金葡菌吞噬黏附也显著降低。总之,PI3K 介导的巨噬细胞自噬可能是调节其吞噬作用的机制。

综上所述,虽然本研究显示 PI3K 在金葡菌感染的小鼠单核巨噬细胞系诱导的自噬过程中起着很重要的作用,抑制 PI3K 活性下调了自噬和吞噬,此结果可能为研究金葡菌与 AMs 在哮喘中的作用提供理论基础,但此过程只局限于体外研究,小鼠巨噬细胞系并不能等同于 AMs。因此,本实验需要更进一步的研究去探索金葡菌诱导小鼠哮喘模型 AMs 自噬对吞噬的影响。

参考文献

- [1] Bozzaro S, Bucci C, Steinert M. Phagocytosis and host-pathogen interactions in *Dictyostelium* with a look at macrophages [J]. Int Rev Cell Mol Biol 2008; 271:253-300.
- [2] Kuballa P, Nolte W M, Castoreno A B, et al. Autophagy and the immune system [J]. Annu Rev Immunol 2012; 30:611-46.
- [3] Lin Y C, Kuo H C, Wang J S, et al. Regulation of inflammatory response by 3-methyladenine involves the coordinative actions on Akt and glycogen synthase kinase 3beta rather than autophagy [J].

- J Immunol 2012 ,189(8) : 4154 – 64.
- [4] Sanjuan M A , Dillon C P , Tait S W , et al. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis [J]. *Nature* 2007 450(7173) : 1253 – 7.
- [5] Bachert C , Gevaert P , Howarth P , et al. IgE to *Staphylococcus aureus* enterotoxins in serum is related to severity of asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol* 2003 ,111(5) : 1131 – 2.
- [6] Kim M R , Hong S W , Choi E B , et al. *Staphylococcus aureus*-derived extracellular vesicles induce neutrophilic pulmonary inflammation *via* both Th1 and Th17 cell responses [J]. *Allergy* 2012 , 67(10) : 1271 – 81.
- [7] Huynh M L , Malcolm K C , Kotaru C , et al. Defective apoptotic cell phagocytosis attenuates prostaglandin E2 and 15-hydroxyeicosatetraenoic acid in severe asthma alveolar macrophages [J]. *Am J Respir Crit Care Med* 2005 ,172(8) : 972 – 9.
- [8] Simpson J L , Gibson P G , Yang I A , et al. Impaired macrophage phagocytosis in non-eosinophilic asthma [J]. *Clin Exp Allergy* , 2013 43(1) : 29 – 35.
- [9] Wang Q Q , Li H , Oliver T , et al. Integrin beta 1 regulates phagosome maturation in macrophages through Rac expression [J]. *J Immunol* 2008 ,180(4) : 2419 – 28.
- [10] Tanaka T , Terada M , Ariyoshi K , et al. Monocyte chemoattractant protein-1 /CC chemokine ligand 2 enhances apoptotic cell removal by macrophages through Rac1 activation [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2010 399(4) : 677 – 82.
- [11] Shen Y , Kawamura I , Nomura T , et al. Toll-like receptor 2 and MyD88-dependent phosphatidylinositol 3-kinase and Rac1 activation facilitates the phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by murine macrophages [J]. *Infect Immun* 2010 78(6) : 2857 – 67.
- [12] Mestre M B , Colombo M I. *Staphylococcus aureus* promotes autophagy by decreasing intracellular cAMP levels [J]. *Autophagy* , 2012 8(12) : 1865 – 7.
- [13] Tanida I , Sou Y S , Ezaki J , et al. HsAtg4B/HsApg4B/autophagin-1 cleaves the carboxyl termini of three human Atg8 homologues and delipidates microtubule-associated protein light chain 3- and GABAA receptor-associated protein-phospholipid conjugates [J]. *J Biol Chem* 2004 279(35) : 36268 – 76.
- [14] Poon A , Eidelman D , Laprise C , et al. ATG5 , autophagy and lung function in asthma [J]. *Autophagy* 2012 8(4) : 694 – 5.

The effect of autophagy on the *Staphylococcus aureus* phagocytosized by macrophages

Lü Yunxiang , Wu Huimei , Fang Lei , et al

(Dept of Geriatrics Respiratory , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230022)

Abstract Objective To study the effect of *Staphylococcus aureus* on autophagy in macrophages and the role of autophagy in the pathogens phagocytosis by macrophages. **Methods** Mouse monocyte-macrophage cell line RAW264.7 was used , before infecting by *Staphylococcus aureus* , RAW264.7 cells were pretreated by phosphatidylinositol3-kinase (PI3K) inhibitor , 3-MA. Blank treatment was served as control group , infected by *Staphylococcus aureus* was served as experimental group and pretreated by 3-MA was served as inhibited group. The protein expression levels of LC3 , Beclin1 and Rac1 were measured by Western blot , the process of autophagy and phagocytosis were viewed by Confocal Scanning Laser Microscope. **Results** The protein expression levels of LC3 II and PI3K were increased after infected by *Staphylococcus aureus* for 1 h ($P < 0.05$) . Compared to that in experimental group , the protein expression levels of LC3 II and Beclin1 ($P < 0.05$) , the aggregation of autophagy puncta were significantly decreased in inhibited group ($P < 0.05$) . Similarly , the protein level of Rac1 ($P < 0.05$) and the phagocytosis of *Staphylococcus aureus* in RAW264.7 were significantly reduced in inhibited group ($P < 0.05$) . **Conclusion** Autophagy induced by *Staphylococcus aureus* strengthens the phagocytosis of macrophages , and autophagy and phagocytosis in macrophages are down-regulated *via* inhibiting PI3K activity by 3-MA.

Key words phagocytosis; autophagy; macrophage; phosphatidylinositol-3-kinase; *Staphylococcus aureus*