

肌动蛋白亚型在巨噬细胞吞噬脑膜炎 大肠杆菌中的作用

赵文心^{1#} 马岚^{2#} 杨雪婷^{2#} 李晶莹^{1#} 杜书嵩³ 张雪薇³ 赵伟东^{3*}

(¹中国医科大学临床一系, 沈阳 110122; ²中国医科大学生物科学与生物技术系, 沈阳 110122;

³中国医科大学生命科学学院发育细胞生物学教研室, 教育部医学细胞生物学重点实验室
暨卫健委细胞生物学重点实验室, 沈阳 110122)

摘要 该研究利用诱导后的THP-1单核细胞系作为巨噬细胞的模式细胞, 鉴定了在巨噬细胞中表达的肌动蛋白亚型, 发现 β -肌动蛋白和 γ -肌动蛋白在巨噬细胞中表达; 接着利用共聚焦显微成像发现, β -肌动蛋白和 γ -肌动蛋白在巨噬细胞受到脑膜炎大肠杆菌感染时均出现了不同程度的聚集; 进一步利用RNA干扰技术实现了对巨噬细胞中的 β -肌动蛋白和 γ -肌动蛋白的特异性下调, 并发现单独下调 β -肌动蛋白和 γ -肌动蛋白以及联合下调 β -和 γ -肌动蛋白都使得巨噬细胞吞噬脑膜炎大肠杆菌的能力呈明显下降。这些结果表明, 不同亚型的肌动蛋白在巨噬细胞吞噬脑膜炎大肠杆菌过程中发挥着重要作用。

关键词 肌动蛋白亚型; 巨噬细胞; β -肌动蛋白; γ -肌动蛋白; 细菌吞噬作用

The Roles of Actin Isoforms in the Phagocytosis of Meningitic *Escherichia coli* by Macrophages

ZHAO Wenxin^{1#}, MA Lan^{2#}, YANG Xueting^{2#}, LI Jingying^{1#}, DU Shusong³, ZHANG Xuewei³, ZHAO Weidong^{3*}

(¹The First Clinical Department of China Medical University, Shenyang 110122, China;

²Department of Biological Science and Biotechnology, China Medical University, Shenyang 110122, China;

³Department of Developmental Cell Biology, Key Laboratory of Cell Biology, Ministry of Public Health, and
Key Laboratory of Medical Cell Biology, Ministry of Education, China Medical University, Shenyang 110122, China)

Abstract In this study, the THP-1 monocytic cells were induced to macrophages and the expression of actin isoforms was analyzed. We found that β -actin and γ -actin were expressed in macrophages. Results from confocal imaging showed that β -actin and γ -actin in macrophages were differentially polymerized upon infection with meningitic *E. coli*. Then the β -actin and γ -actin in macrophages were specifically downregulated by siRNA-mediated knockdown. We found that downregulation of β -actin and γ -actin resulted in significant reduction in the phagocytosis of meningitic *E. coli* by macrophages. Our results thus pointed out that different isoforms of actin played an important role during the phagocytosis of meningitic *E. coli* by macrophages.

Keywords actin isoform; macrophage; β -actin; γ -actin; bacterial phagocytosis

肌动蛋白(actin)是真核生物细胞骨架微丝的主要组成分子, 球状肌动蛋白(G-actin)单体通过聚合

生成纤维状肌动蛋白(F-actin), 进而组装形成肌动蛋白微丝^[1]。肌动蛋白微丝参与多种生命活动, 包括维

收稿日期: 2019-12-03

接受日期: 2020-03-05

国家自然科学基金(批准号: 31670845、31870832)资助的课题

[#]共同第一作者

*通讯作者。Tel: 024-31939316, E-mail: wdzhao@cmu.edu.cn

Received: December 3, 2019

Accepted: March 5, 2020

This work was supported by the National Nature Science Foundation of China (Grant No.31670845, 31870832)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-24-31939316, E-mail: wdzhao@cmu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5222>

持细胞形状、细胞运动、细胞分裂、吞噬过程以及细胞内物质运输等^[2]。目前在哺乳动物中已发现6种不同的肌动蛋白亚型,除了在肌肉组织中发现的4种亚型(α -骨骼肌肌动蛋白、 α -心肌肌动蛋白、 α -平滑肌肌动蛋白和 γ -平滑肌肌动蛋白)外, β -肌动蛋白和 γ -肌动蛋白则是广泛存在于大多数真核细胞中的亚型^[3]。

巨噬细胞是机体固有免疫系统的重要组成部分。在病原菌感染时,巨噬细胞通过一系列过程识别病原菌,并对病原菌进行吞噬^[4]。在吞噬病原菌后,巨噬细胞还能发挥抗原呈递和免疫调节等作用,调节机体免疫应答反应^[5]。因此,巨噬细胞在宿主抵御病原菌入侵过程中发挥重要作用。研究表明,巨噬细胞吞噬细菌的过程包括巨噬细胞对细菌表面分子的识别、肌动蛋白微丝重塑、吞噬杯的形成、辅助受体的进一步参与、吞噬体闭合等多个过程,其中,肌动蛋白微丝的重塑是关键的一环^[6]。目前,肌动蛋白亚型在巨噬细胞吞噬细菌中的作用尚不明确。

本研究利用诱导后的THP-1单核细胞作为巨噬细胞的模式细胞,分析了 β -肌动蛋白和 γ -肌动蛋白这两种不同亚型的肌动蛋白在巨噬细胞中的表达情况,及其在巨噬细胞吞噬脑膜炎大肠杆菌时的变化,并利用细菌吞噬实验分析了不同肌动蛋白亚型在巨噬细胞吞噬细菌过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

人单核细胞株 THP-1 购自美国模式培养物集存库(American type culture collection);脑膜炎大肠杆菌 K1 株 RS218(O18:K1:H7)由新生儿大肠杆菌性脑膜炎患者脑脊液中分离^[7],E44 菌株为该菌株的抗利福平突变株。胎牛血清购自北京赛澳美细胞技术有限公司;RPMI-1640 细胞培养基购自美国 Hyclone 公司;BHI(brain heart infusion)培养基购自美国 BD(Becton, Dickinson and Company)公司;佛波酯(phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA)购自上海碧云天生物技术有限公司;总 RNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;反转录试剂和荧光定量预混液购自南京诺唯赞生物科技有限公司;PCR 引物由生工生物(上海)工程股份有限公司合成;小干扰 RNA 由上海吉玛制药技术有限公司合成;Lipofectamine 2000 和细胞松弛素 D(cytochalasin

D)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; β -actin 抗体购自北京全式金生物技术有限公司;红海海绵素 B(latrunculin B)、 γ -actin 抗体、大肠杆菌的抗体购自美国 Abcam 公司;异硫氰酸标记的鬼笔环肽(FITC-phalloidin)和罗丹明标记的鬼笔环肽(TRITC-phalloidin)购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养 将脑膜炎大肠杆菌 E44 菌株于含有 100 mg/L 利福平的 BHI 培养基(37 g/L)中, 37 °C, 90 r/min, 培养 17 h。

1.2.2 细胞培养 将 THP-1 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中, 置于 37 °C、5% CO₂、100% 湿度的培养箱培养, 每 2~3 天更换新鲜培养液, 待细胞数达到 1×10^6 个/mL 时传代。

1.2.3 细胞诱导 将 THP-1 细胞以 2.5×10^5 个/孔(或者其他特定数量)接种于 24 孔板, 更换为含 PMA(50 ng/mL)^[8]的培养液, 置于 37 °C、5% CO₂、100% 湿度的细胞培养箱中培养 72 h, 在倒置显微镜下观察诱导后的 THP-1 细胞的形态变化, 并拍照记录。

1.2.4 细胞转染 将 THP-1 细胞以 1×10^6 个/孔的密度接种于 6 孔板, PMA 诱导 72 h 后, 更换为普通培养液继续培养, 待细胞密度达到 70%~80% 时, 将 Lipofectamine 2000 与 siRNA 混合后转染细胞。转染 6 h 后, 更换为含 10% 血清的 RPMI-1640 培养液继续培养 24~72 h。

1.2.5 逆转录 PCR 收集细胞, 用总 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA, 取 1 μ g 总 RNA 进行反转录合成 cDNA, 以此 cDNA 为模板扩增 α -actin、 β -actin 和 γ -actin 基因, 以 GAPDH 基因作为内参照(引物序列见表 1)。PCR 反应条件如下: 98 °C 30 s, 55 °C 15 s, 72 °C 30 s(30 个循环), 72 °C 7 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像分析系统进行记录。

1.2.6 免疫印迹 将细胞用预冷的 PBS 洗 3 次, 加入 RIPA 裂解液(含蛋白酶抑制剂)于冰上裂解 30 min, 然后用细胞刮刀刮取细胞至 1.5 mL 离心管中, 于 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min。取上清, 加入等体积 2 $\times$ 蛋白上样缓冲液, 99 °C 5 min。制备 10% 聚丙烯酰胺凝胶, 将蛋白样品上样后进行电泳, 电泳结束后, 将凝胶取出, 转印至 PVDF 膜。将 PVDF 膜以 5% 脱脂奶粉封闭 1.5 h, 分别加入 β -肌动蛋白抗体、 γ -肌动蛋白

表1 PCR引物序列
Table 1 Sequence of PCR primers

引物 Primer	方向 Direction	序列 Sequence	长度/bp Length /bp
<i>α-actin</i>	Forward	5'-GGC AAG TGA TCA CCA TCG GA-3'	100
	Reverse	5'-GTG GTT TCA TGG ATG CCA GC-3'	
<i>γ-actin</i>	Forward	5'-CTC GCA CTC TGT TCT TCC G-3'	117
	Reverse	5'-GCA AAA CCA GCT TTG CAC AT-3'	
<i>β-actin</i>	Forward	5'-GCA CAG AGC CTC GCC TT-3'	112
	Reverse	5'-CCT TGC ACA TGC CGG AG-3'	
<i>GAPDH</i>	Forward	5'-AAG GTG AAG GTC GGA GTC AAC-3'	102
	Reverse	5'-GGG GTC ATT GAT GGC AAC AAT A-3'	

抗体(稀释液为1% BSA、0.1% Tween20、PBS), 4 °C 孵育过夜。洗3次后加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育1 h, 再洗3次后, 去除膜上残余液体, 滴加化学发光试剂, 以化学发光成像仪进行记录。

1.2.7 免疫荧光 将接种于盖玻片的细胞用PBS洗3次, 以4%甲醛室温固定30 min, PBS洗3次后, 以0.1% Triton X-100处理1 min, PBS洗3次, 以5% BSA室温封闭30 min, 分别加入稀释的荧光染料标记的鬼笔环肽、大肠杆菌抗体、β-肌动蛋白或γ-肌动蛋白抗体, 4 °C过夜后PBS洗3次, 再以相应的荧光标记的二抗室温孵育1 h, PBS洗3次后, 加入4',6'-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸盐(4',6'-diamidino-2-phenylindole, DAPI)(10 μg/mL)染色2 min, PBS洗3次后, 去离子水漂洗1次, 用封片剂封片, 以共聚焦激光扫描显微镜观察并采集图像。

1.2.8 实时定量PCR 将细胞用PBS洗2次后, 用总RNA提取试剂盒提取细胞总RNA, 取1 μg总RNA进行反转录, 以cDNA为模板, 采用染料法对各组中的*β-actin*、*γ-actin*、*GAPDH*(内参)进行荧光实时定量PCR反应, 反应条件为: 95 °C 10 s, 60 °C 30 s(40个循环), 所用引物见表1。以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行相对定量分析。

1.2.9 巨噬细胞吞噬细菌实验 参照文献报道的方法进行巨噬细胞吞噬细菌实验^[9]。简述如下: 将PMA诱导后的THP-1来源的巨噬细胞接种至24孔板(2.5×10^5 个/孔), 在加入细菌之前将培养液更换为实验培养液(5% FBS、RPMI-1640), 然后每孔加入 2.5×10^7 个过夜培养的大肠杆菌E44株, 使感染复数为100:1, 置于37 °C、5 % CO₂、100%湿度的培养箱中1 h后, 弃去实验培养液, 以RPMI-1640洗3次, 加入含有庆大霉素(200 U/mL)的实验培养液继续培养1 h以杀灭细胞外的细菌。PBS洗3次后加入无菌水裂

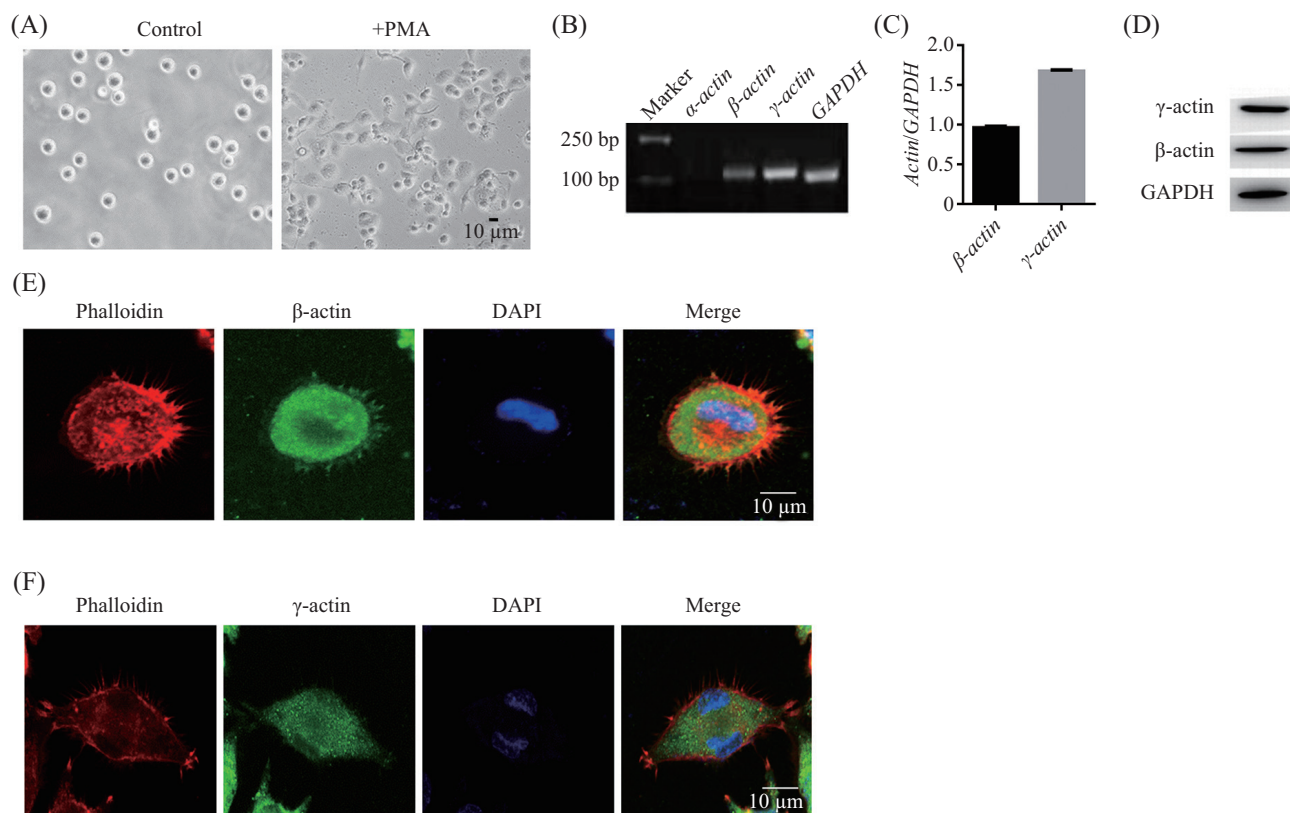
解细胞, 将细胞裂解液进行梯度稀释后, 涂布在含利福平的LB琼脂营养平板上, 过夜培养, 计数菌落形成单位(colony forming unit, CFU)。

1.2.10 统计学分析 数据均使用GraphPad Prism 6软件进行统计学分析。所有实验至少重复3次。两组数据比较时采用*t*检验法, 多组数据比较时采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。*P* < 0.05时认为差异具有统计学差异。

2 结果

2.1 巨噬细胞中肌动蛋白亚型的表达情况

为了获得体外培养的巨噬细胞, 将培养的人单核细胞系THP-1用PMA进行诱导, 使其分化为巨噬细胞。正常THP-1细胞为悬浮状态, 呈圆球形; 经佛波酯诱导72 h后, THP-1细胞变为贴壁生长, 呈不规则形或多角形, 细胞周边出现伪足, 即分化为巨噬细胞(图1A)。接着, 利用逆转录PCR方法, 对巨噬细胞中的肌动蛋白编码基因的转录本进行了检测, 发现β-肌动蛋白和γ-肌动蛋白均有表达, 而α-肌动蛋白则未见表达(图1B)。以荧光定量PCR方法对β-肌动蛋白和γ-肌动蛋白的转录本进行了定量和比较, 发现γ-肌动蛋白的mRNA表达水平较高, 是β-肌动蛋白的1.67倍左右(图1C)。免疫印迹结果显示, 在巨噬细胞中可以检测到β-肌动蛋白和γ-肌动蛋白的表达, 且γ-肌动蛋白的表达量高于β-肌动蛋白(图1D)。进一步利用免疫荧光技术, 以针对肌动蛋白亚型的特异性抗体对巨噬细胞进行染色, 同时以荧光标记的鬼笔环肽对纤维状肌动蛋白进行共同染色, 分析肌动蛋白亚型在巨噬细胞中的分布及其与纤维状肌动蛋白的定位关系。结果显示, β-肌动蛋白和γ-肌动蛋白在巨噬细胞的细胞质中表达较高, 而纤维状肌动蛋白



A: 培养的THP-1细胞经过PMA诱导72 h后, 利用倒置相差显微镜对细胞的形态进行观察; B: 提取THP-1细胞的总RNA, 逆转录后进行PCR反应, 分析 α -、 β -和 γ -肌动蛋白的mRNA的表达情况; C: 将THP-1细胞的总RNA逆转录后进行荧光定量PCR, 比较 β -和 γ -肌动蛋白的mRNA表达水平; D: 获取THP-1细胞的蛋白裂解液, 利用免疫印迹方法检测 β -和 γ -肌动蛋白的蛋白表达; E、F: 将THP-1细胞接种于盖玻片上, 固定, 利用免疫荧光技术, 以罗丹明标记的鬼笔环肽对纤维状肌动蛋白进行染色, 同时以 β -肌动蛋白抗体(E)和 γ -肌动蛋白抗体(F)进行染色, 以DAPI(4',6'-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸盐)对细胞核进行染色后, 利用共聚焦显微镜进行成像。

A: THP-1 cells were induced to macrophages after PMA treatment for 72 h and the changes of cell shape were imaged under phase-contrast microscope; B: the total RNA of THP-1 cells were isolated followed by reverse-transcription PCR to assess the mRNA expression of α -actin, β -actin and γ -actin; C: reverse-transcription quantitative PCR to analyze the mRNA levels of β -actin and γ -actin; D: the cell lysates of the THP-1 macrophages were obtained to detect the protein expression of β -actin and γ -actin by western blot; E,F: the THP-1 cells were seeded on coverslips and fixed. Immunostaining were performed with TRITC-phalloidin together with β -actin antibody (E) and γ -actin antibody (F). DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) was used for counter staining. The coverslips were mounted and imaged by confocal microscopy.

图1 THP-1来源的巨噬细胞中肌动蛋白亚型的表达情况

Fig.1 Expression of actin isoforms in THP-1 macrophages

则在细胞膜边缘呈明显聚集, 并形成向外延伸的丝状伪足结构; β -肌动蛋白和 γ -肌动蛋白在细胞膜边缘处与纤维状肌动蛋白有共定位(图1E和图1F)。这些结果表明, 巨噬细胞中主要表达 β -肌动蛋白和 γ -肌动蛋白两种肌动蛋白亚型, 且这两种亚型的表达水平存在一定的差异。

2.2 巨噬细胞受到脑膜炎大肠杆菌感染后其肌动蛋白出现局部聚集

为了分析巨噬细胞受到病原菌感染时其肌动蛋白的变化, 将过夜培养的脑膜炎大肠杆菌 K1(*Escherichia coli* K1)^[10]加入至佛波酯诱导后的THP-1来源的巨噬细胞的培养环境中进行感染, 30 min后将

细胞固定后进行免疫荧光染色, 分析纤维状肌动蛋白的变化。结果发现, 在巨噬细胞受到脑膜炎大肠杆菌感染后, 丝状伪足变短或消失, 细胞膜边缘的纤维状肌动蛋白明显增强, 说明细菌感染可以诱发巨噬细胞膜边缘处的肌动蛋白发生解聚和聚集的动态变化, 即肌动蛋白的重组装(rearrangement)(图2A)。进一步, 对大肠杆菌感染的巨噬细胞中 β -肌动蛋白和 γ -肌动蛋白亚型的表达进行了分析。结果显示, 细菌感染可以导致巨噬细胞的 β -肌动蛋白在细胞膜边缘发生明显聚集(图2B), 这与纤维状肌动蛋白的变化趋势是一致的。对于 γ -肌动蛋白而言, 在细菌感染后其在细胞膜边缘处则没有明显的聚集现象,

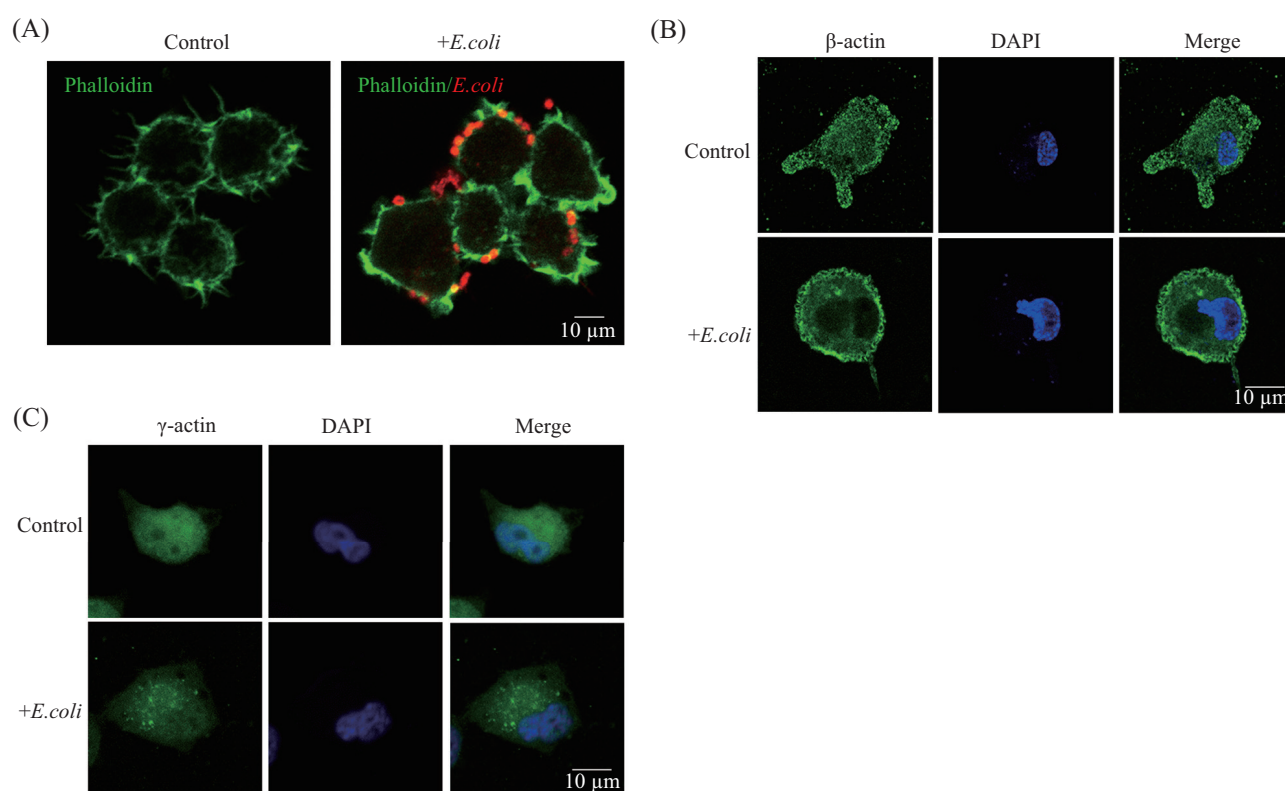
但在细胞质中可见 γ -肌动蛋白呈斑点状聚集(图2C)。这些结果表明, 巨噬细胞受到脑膜炎大肠杆菌感染后, 其肌动蛋白出现了聚集和解聚的动态变化; 其中, β -肌动蛋白在细胞膜边缘处出现了明显的聚集, 而 γ -肌动蛋白在细胞质中出现了一定程度的聚集。

2.3 阻断肌动蛋白的聚合可以明显减少巨噬细胞吞噬大肠杆菌

为了建立巨噬细胞吞噬脑膜炎大肠杆菌的检测方法, 进行了细菌吞噬实验^[9], 分别以不同的细胞数量(1.25×10^5 、 2.50×10^5 、 4.00×10^5 、 5.00×10^5 个/孔)将诱导后的THP-1细胞接种于24孔板中, 然后加入脑膜炎大肠杆菌, 感染1 h后将细胞外黏附的细菌杀灭, 获得巨噬细胞裂解液并涂板计数, 从而评估被巨噬细胞吞噬进入胞内细菌的数量。结果显示, 随着接种细胞数量的增多, 巨噬细胞吞噬细菌的数量呈

逐渐增多的趋势; 在接种细胞数量达 4×10^5 个/孔后则吞噬细菌数量的增长变缓, 趋近饱和(图3A)。因此, 拟按照 2.5×10^5 个/孔的细胞接种量进行后续的细菌吞噬实验研究。

为了进一步分析肌动蛋白在巨噬细胞吞噬细菌中的作用, 分别用两种不同的肌动蛋白聚集抑制剂——细胞松弛素D以及红海海绵素B对巨噬细胞进行预处理30 min, 然后进行细菌吞噬实验。结果显示, 不同浓度的细胞松弛素D预处理巨噬细胞后, 其细菌吞噬的效率明显降低, 且呈剂量依赖性; 在细胞松弛素D浓度为1.0 mg/mL时, 巨噬细胞吞噬细菌的数量下降至约25%(图3B)。利用红海海绵素B预处理巨噬细胞后, 也能够剂量依赖性地抑制巨噬细胞吞噬细菌; 在红海海绵素B浓度为0.128 mg/mL时, 巨噬细胞吞噬细菌的数量下降至约11%(图3C), 说明红海



A: 将脑膜炎大肠杆菌与PMA诱导后的接种于盖玻片上的THP-1来源的巨噬细胞共培养30 min(以未与细菌共培养的细胞作为对照), 固定, 利用免疫荧光技术, 以异硫氰酸荧光素标记的鬼笔环肽对纤维状肌动蛋白进行染色(绿色), 同时以大肠杆菌抗体对细菌进行染色(红色), 利用共聚焦显微镜进行成像; B、C: 分别以 β -肌动蛋白抗体(B)和 γ -肌动蛋白抗体(C)对与细菌共培养的THP-1细胞进行染色, 以DAPI对细胞核进行染色后, 利用共聚焦显微镜进行成像。

A: the THP-1 macrophages seeded on coverslips were infected with meningitic *E. coli* for 30 min, with uninfected cells as controls. Then the cells were fixed and stained with FITC-phalloidin (green) together with antibody against *E. coli* (red). Then the coverslips were mounted and visualized by confocal microscopy; B,C: the *E. coli*-infected THP-1 cells were stained with β -actin antibody (B) and γ -actin antibody (C), and DAPI was used for counter staining. Then the cells were visualized by confocal microscopy.

图2 脑膜炎大肠杆菌感染THP-1来源的巨噬细胞后引起巨噬细胞肌动蛋白聚集

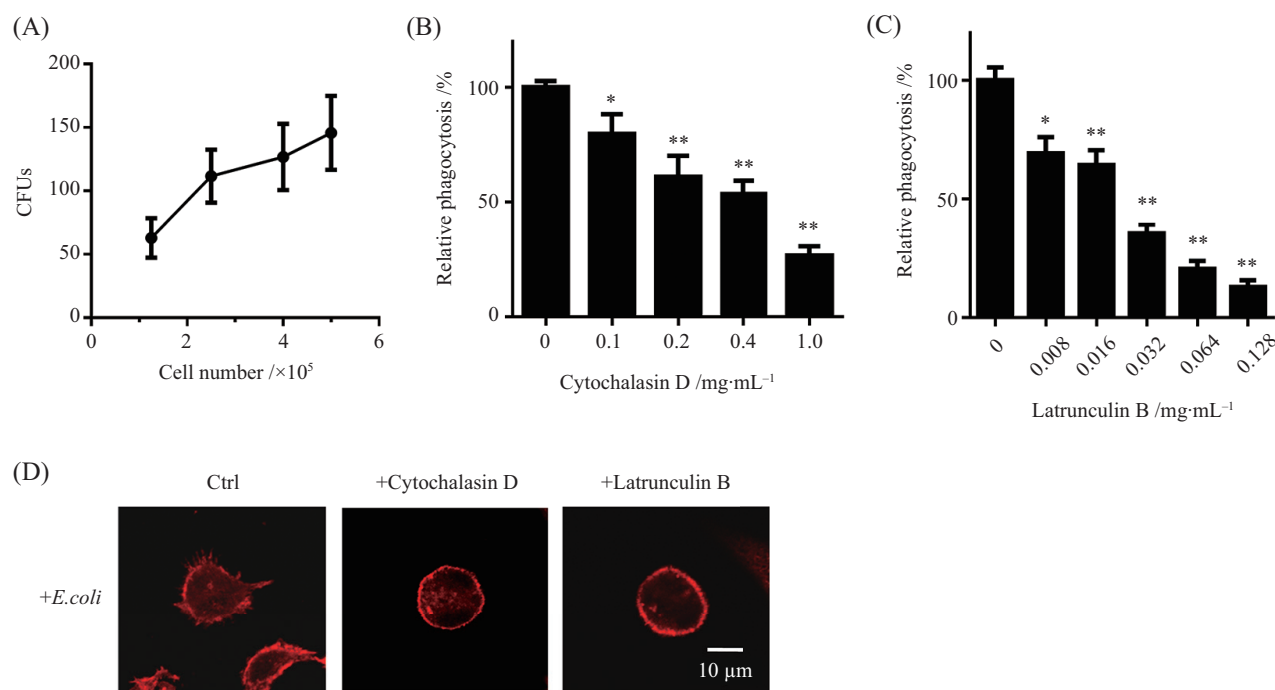
Fig.2 Actin polymerization in THP-1 macrophages upon meningitic *E. coli* infection

海绵素B抑制巨噬细胞吞噬细菌的作用明显强于细胞松弛素D。进一步的实验结果显示, 细胞松弛素D和红海海绵素B可以明显阻断脑膜炎大肠杆菌所诱发的细胞膜边缘的纤维状肌动蛋白聚集(图3D)。这些结果表明, 巨噬细胞吞噬脑膜炎大肠杆菌的过程中, 需要肌动蛋白单体的聚合, 这与图2中显示的大肠杆菌感染巨噬细胞时可导致细胞膜边缘处肌动蛋白发生聚集的现象是一致的。

2.4 不同肌动蛋白亚型在巨噬细胞吞噬大肠杆菌中的作用分析

为了探讨不同肌动蛋白亚型在巨噬细胞吞噬

脑膜炎大肠杆菌中的作用, 分别设计了针对 β -肌动蛋白和 γ -肌动蛋白的小干扰RNA(siRNA), 转染至诱导后的THP-1来源的巨噬细胞, 对巨噬细胞中的 β -肌动蛋白和 γ -肌动蛋白进行分别敲降和联合敲降。荧光定量PCR结果显示, 与阴性对照组(转染了无义siRNA)相比, 单独转染 β -肌动蛋白的siRNA能够明显下调巨噬细胞中 β -肌动蛋白mRNA的水平(降至对照组的约52.2%, $P<0.01$), 且这种下调作用是 β -肌动蛋白特异性的, 因为此时 γ -肌动蛋白的mRNA水平并没有降低, 反而有些升高(约127.5%)(详见讨论)(图4A)。单独转染 γ -肌动蛋白的siRNA则可以特

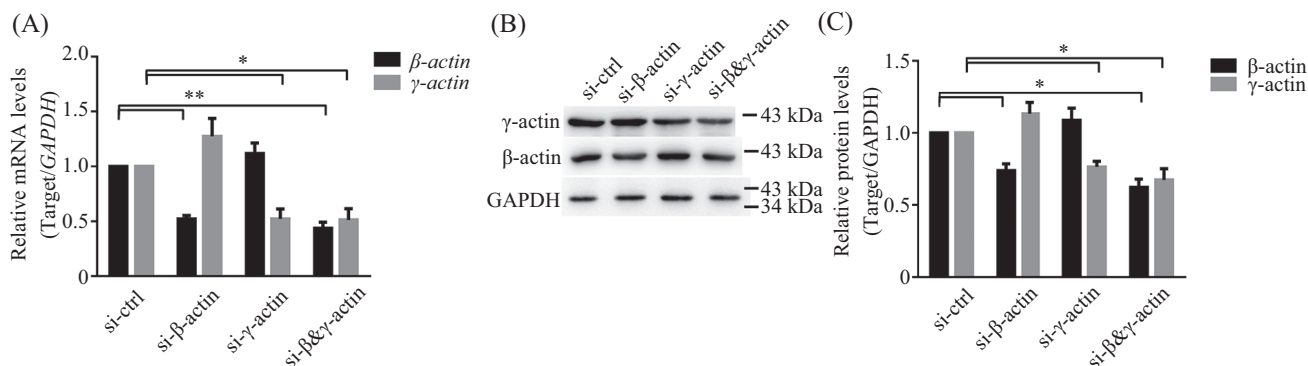


A: 将不同数量的诱导后的THP-1来源的巨噬细胞接种于24孔板中, 然后加入过夜培养的脑膜炎大肠杆菌(感染复数MOI为100:1), 1 h后以庆大霉素(200 U/mL)将细胞外的细菌杀灭, 然后加入无菌水裂解细胞, 将裂解液涂布于LB琼脂平板, 过夜培养后计数克隆形成单位CFU; B、C: 将 2.5×10^5 诱导后的THP-1来源的巨噬细胞接种于24孔板中, 分别以不同浓度的细胞松弛素D(B)和红海海绵素B(C)进行预处理30 min, 然后加入过夜培养的脑膜炎大肠杆菌, 1 h后以庆大霉素将细胞外的细菌杀灭, 然后加入无菌水裂解细胞, 将裂解液涂布于LB琼脂平板, 过夜培养后计数克隆形成单位。显示的数据为来自6次独立实验的均值 $\pm$ 标准差。以对照组作为100%, 所有数据都以对照组做归一化。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ ($n=6$); D: 将PMA诱导后的THP-1来源的巨噬细胞分别以细胞松弛素D(0.2 mg/mL)和红海海绵素B(0.032 mg/mL)进行预处理30 min, 再加入脑膜炎大肠杆菌共培养30 min, 固定, 利用免疫荧光技术, 以罗丹明标记的鬼笔环肽对纤维状肌动蛋白进行染色(红色), 利用共聚焦显微镜进行成像。

A: different amounts of PMA-induced THP-1 macrophages were seeded into 24-well plates and incubated with meningitic *E. coli* (MOI, 100:1) for 1 h, then gentamycin (200 U/mL) was added to kill the extracellular bacteria. Sterile water was used to lyse the cells. The released intracellular bacteria were plated on LB plates and incubated at 37 °C overnight to count the colony formation unit (CFU); B,C: PMA-induced THP-1 macrophages were seeded into 24-well plates and treated with cytochalasin D (B) and latrunculin B (C) for 30 min, then the cells were infected with meningitic *E. coli* for 1 h. The extracellular bacteria were killed by gentamycin and the intracellular bacteria were released by addition of sterile water. The CFUs were counted after plating on LB plates and incubated at 37 °C overnight. Data are $\bar{x}\pm s$ of six independent experiments. All the data were normalized to control which was defined as 100%. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ ($n=6$); D: the THP-1 macrophages seeded on coverslips were pre-treated with cytochalasin D (0.2 mg/mL) and latrunculin B (0.032 mg/mL) for 30 min, and then infected with meningitic *E. coli* for 30 min. Then the cells were fixed and stained with rhodamine-phalloidin (red). The coverslips were mounted and visualized by confocal microscopy.

图3 肌动蛋白抑制剂可以明显减少巨噬细胞吞噬脑膜炎大肠杆菌

Fig.3 Inhibitors of actin polymerization attenuated phagocytosis of meningitic *E. coli* by THP-1 macrophages



A: 设计并合成针对β-肌动蛋白编码基因的siRNA(si-β-actin)和针对γ-肌动蛋白编码基因的siRNA(si-γ-actin), 以无意义序列的siRNA作为对照组(si-ctrl)。分别将针对β-和γ-肌动蛋白的siRNA以及将二者合并(si-β&γ-actin)转染至PMA诱导的THP-1来源的巨噬细胞, 48 h后提取细胞的总RNA, 利用荧光定量逆转录PCR对β-和γ-肌动蛋白的mRNA进行检测; B: 提取上述细胞的蛋白裂解液, 利用免疫印迹方法对β-和γ-肌动蛋白的蛋白质水平进行检测, 同时以GAPDH作为内参照; C: 以ImageJ软件分析上述免疫印迹结果里相应条带的灰度值, 以对照组作为1, 所有数据都以对照组做归一化。显示的数据为来自3次独立实验的均值±标准差。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ ($n=3$)。

A: the siRNA targeting β-actin (si-β-actin) and γ-actin (si-γ-actin) were designed and synthesized, with non-silencing siRNA as control (si-ctrl). The siRNA were transfected into PMA-induced THP-1 macrophages, respectively. When indicated, the si-β-actin and si-γ-actin were co-transfected into the macrophages (si-β&γ-actin). The total RNA of the transfected macrophages was extracted and the mRNA levels of β-actin and γ-actin were measured by quantitative reverse-transcription PCR; B: the cell lysates were prepared and the protein levels of β-actin and γ-actin were assessed by western blot, with GAPDH as loading control; C: the band density of Western blot was analyzed by ImageJ software. Data are $\bar{x} \pm s$ of three independent experiments. All the data were normalized to control which was defined as 1. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ ($n=3$).

图4 利用RNA干扰技术下调THP-1来源的巨噬细胞中的肌动蛋白亚型
Fig.4 Knockdown of actin isoforms by siRNA in THP-1 macrophages

异性下调γ-肌动蛋白mRNA的水平(降至约52.3%, $P<0.05$), 而此时β-肌动蛋白的mRNA水平并没有下降, 而是有些升高(约111.9%)(详见讨论)(图4A)。另外, 我们还把针对β-肌动蛋白和γ-肌动蛋白的siRNA同时转染至巨噬细胞, 对β-肌动蛋白和γ-肌动蛋白进行联合RNA干扰, 结果显示, 联合干扰可以使β-肌动蛋白和γ-肌动蛋白的转录本同时下调(分别降至约43.6%和51.3%, $P<0.01$ 和 $P<0.05$)(图4A)。

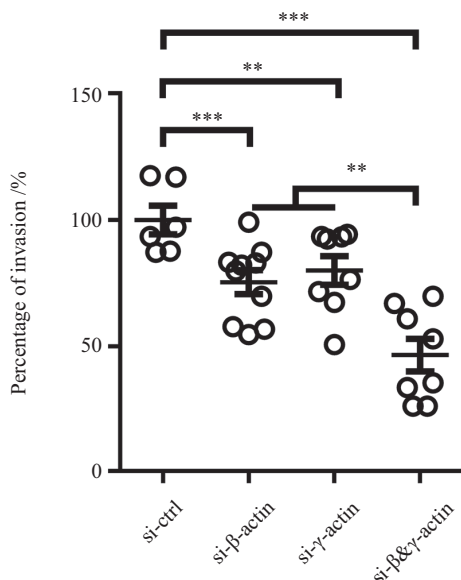
为了在蛋白水平进一步验证RNA干扰的效应, 利用免疫印迹技术对单独RNA干扰和联合RNA干扰后巨噬细胞中肌动蛋白的表达情况进行了检测。结果显示, 针对β-肌动蛋白的siRNA可以特异性下调巨噬细胞中β-肌动蛋白的水平(降至对照组的约73.9%, $P<0.05$), 针对γ-肌动蛋白的siRNA可特异性下调γ-肌动蛋白的水平(降至约76.5%, $P<0.05$), 联合干扰则可使β-肌动蛋白和γ-肌动蛋白同时下调(分别降至约62.2%和约67.3%, $P<0.05$)(图4B和图4C)。这些结果表明, 利用RNA干扰技术可以分别对THP-1来源的巨噬细胞的β-肌动蛋白和γ-肌动蛋白的表达进行特异性下调, 也能在THP-1来源的巨噬细胞中同时下调β-肌动蛋白和γ-肌动蛋白的表达。

利用上述获得的β-肌动蛋白和γ-肌动蛋白分别

敲降和联合敲降的巨噬细胞, 进行细菌吞噬实验, 分析对巨噬细胞吞噬脑膜炎大肠杆菌的影响。结果显示, 单独敲降β-肌动蛋白后, 巨噬细胞吞噬细菌的数量与对照组相比明显下降(降至对照组的约75.4%, $P<0.001$); 单独敲降γ-肌动蛋白后, 巨噬细胞吞噬细菌的数量也明显下降(降至约79.9%, $P<0.01$), 这说明, β-肌动蛋白和γ-肌动蛋白都在巨噬细胞吞噬细菌的过程中发挥了作用。与对照组比较, 联合敲降β-肌动蛋白和γ-肌动蛋白的巨噬细胞, 其细菌吞噬能力也明显降低(降至对照组的约46.6%, $P<0.001$); 进一步分析发现, 联合敲降β-肌动蛋白和γ-肌动蛋白组与β-肌动蛋白和γ-肌动蛋白单独敲降组相比较, 细菌吞噬量呈进一步下降, 统计学分析具有显著性差异($P<0.01$)(图5), 即表现为叠加效应, 这说明, β-肌动蛋白和γ-肌动蛋白在巨噬细胞吞噬细菌过程中可能发挥着相对独立的作用。

3 讨论

肌动蛋白作为细胞骨架微丝的主要组分, 在巨噬细胞的吞噬过程中发挥着重要作用。目前, 对巨噬细胞吞噬机制的研究较多关注在调控肌动蛋白的上游信号分子上, 如Arp2/3^[11]、Rho GTP酶^[12]、磷酸



将 2.5×10^5 个诱导后的THP-1来源的巨噬细胞接种于24孔板中, 分别以不同的siRNA进行转染, 48 h后加入过夜培养的脑膜炎大肠杆菌, 1 h后以庆大霉素将细胞外的细菌杀灭, 然后加入无菌水裂解细胞, 将裂解液涂布于LB琼脂平板, 过夜培养后计数克隆形成单位。显示的数据为来自6次独立实验的均值 $\pm$ 标准差。以对照组作为100%, 所有数据都以对照组做归一化。*** $P < 0.01$, **** $P < 0.001$ ($n=6$)。

2.5×10^5 PMA-induced THP-1 macrophages were seeded into 24-well plates and transfected with indicated siRNA for 48 h. Then the cells were infected with meningitic *E. coli* for 1 h. The extracellular bacteria were killed by gentamycin and the intracellular bacteria were released by addition of sterile water. The CFUs were counted after plating on LB plates. Data are $\bar{x} \pm s$ of six independent experiments. All the data were normalized to control which was defined as 100%. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ($n=6$).

图5 下调肌动蛋白亚型对巨噬细胞吞噬脑膜炎大肠杆菌的影响

Fig.5 The effects of downregulation of actin isoforms on phagocytosis of meningitic *E. coli* by THP-1 macrophages

肌醇-3激酶^[13]等, 而对肌动蛋白本身在吞噬过程中的作用则不甚了解。本研究以诱导后的THP-1细胞作为巨噬细胞的模式细胞, 首先鉴定了其中表达的肌动蛋白亚型, 发现巨噬细胞主要表达 β -肌动蛋白和 γ -肌动蛋白, 而不表达 α -肌动蛋白, 并观察到巨噬细胞在受到脑膜炎大肠杆菌感染时其 β -肌动蛋白和 γ -肌动蛋白均出现不同程度的聚集, 而肌动蛋白聚集的抑制剂则可以明显阻断巨噬细胞对细菌的吞噬作用。进一步研究发现, 分别下调巨噬细胞中 β -肌动蛋白和 γ -肌动蛋白的表达后, 可以减少巨噬细胞对细菌的吞噬; 而联合下调 β -肌动蛋白和 γ -肌动蛋白则能进一步减少巨噬细胞对细菌的吞噬, 说明 β -肌动蛋白和 γ -肌动蛋白均参与了巨噬细胞吞噬细菌的过程, 其发挥的作用可能是相互独立的。

关于肌动蛋白在真核细胞摄入细菌过程中的作用, 已有部分文献报道, 例如, 红海海绵素可以抑制肠上皮细胞内吞禽结核分枝杆菌(*Mycobacterium avium*)^[14], 细胞松弛素可以抑制巨噬细胞吞噬化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)^[15], 但这些研究都是利用肌动蛋白的化学抑制剂进行的实验研究。由

于肌动蛋白抑制剂无法区分细胞中肌动蛋白的亚型, 因此, 目前关于肌动蛋白亚型在巨噬细胞吞噬细菌中的作用仍不清楚。本研究首次利用特异性的小干扰RNA, 在巨噬细胞中建立了分别下调特定肌动蛋白亚型的方法, 克服了肌动蛋白抑制剂无法区分肌动蛋白亚型的局限, 并首次发现 β -肌动蛋白和 γ -肌动蛋白参与了巨噬细胞吞噬细菌的过程。我们还发现, 巨噬细胞中 γ -肌动蛋白表达量较 β -肌动蛋白高, 但是分别下调 β -肌动蛋白和 γ -肌动蛋白后对巨噬细胞吞噬细菌的影响程度却比较接近, 这说明, β -肌动蛋白在巨噬细胞吞噬细菌时的作用要强于 γ -肌动蛋白的作用。

本研究的结果显示, 当特异性下调 β -肌动蛋白时, 巨噬细胞的 γ -肌动蛋白的转录水平和蛋白水平都有一定的代偿性升高; 类似地, 下调 γ -肌动蛋白时 β -肌动蛋白则有一定代偿性升高, 这说明, 肌动蛋白亚型的表达是互相影响的。有研究报道, p53家族成员(包括p53、p63、p73等转录因子)就表现为能够通过结合于成员基因的启动子区来互相调控转录及表达^[16]。与p53家族不同的是, 肌动蛋白并非转录因子,

不能直接结合于启动子区。近年来有研究表明,肌动蛋白不仅在细胞质中表达,在细胞核中也存在^[17];游离的肌动蛋白还能结合巨核细胞白血病(megakaryocytic acute leukemia, MAL)蛋白直接调控血清反应因子 (serum response factor, SRF) 的转录活性^[18-19]。据此我们认为,这种 β -肌动蛋白和 γ -肌动蛋白互相影响的表达调控是通过间接影响某个(或某些)相关的转录因子来实现的,但是具体是通过哪个(或某些)转录因子值得深入研究。

参考文献 (References)

- [1] MILLONIG R, SALVO H, AEBI U. Probing actin polymerization by intermolecular cross-linking [J]. *J Cell Biol*, 1988, 106(3): 785-96.
- [2] BLANCHON L, BOUJEMAA-PATERSKI R, SYKES C, et al. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility [J]. *Physiol Rev*, 2014, 94(1): 235-63.
- [3] VEDULA P, KUROSAKA S, LEU NA, et al. Diverse functions of homologous actin isoforms are defined by their nucleotide, rather than their amino acid sequence [J]. *Elife*, 2017, 6(6): 1-16.
- [4] BOSEDASGUPTA S, PIETERS J. Macrophage-microbe interaction: lessons learned from the pathogen *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Semin Immunopathol*, 2018, 40(6): 577-91.
- [5] JAUMOUILLE V, GRINSTEIN S. Molecular mechanisms of phagosome formation [J]. *Microbiol Spectr*, 2016, 4(3): 1-18.
- [6] COPPOLINO MG, DIERCKMAN R, LOIJENS J, et al. Inhibition of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase I α impairs localized actin remodeling and suppresses phagocytosis [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(46): 43849-57.
- [7] HUANG SH, CHEN YH, FU Q, et al. Identification and characterization of an *Escherichia coli* invasion gene locus, *ibeB*, required for penetration of brain microvascular endothelial cells [J]. *Infect Immun*, 1999, 67(5): 2103-9.
- [8] CHIURCHIÙ V, IZZI V, D'AQUILIO F, et al. Brain natriuretic peptide (BNP) regulates the production of inflammatory mediators in human THP-1 macrophages [J]. *Regul Pept*, 2008, 148(1/2/3): 26-32.
- [9] SUKUMARAN SK, SHIMADA H, PRASADARAO NV. Entry and intracellular replication of *Escherichia coli* K1 in macrophages require expression of outer membrane protein A [J]. *Infect Immun*, 2003, 71(10): 5951-61.
- [10] ZHAO WD, LIU DX, WEI JY, et al. Caspr1 is a host receptor for meningitis-causing *Escherichia coli* [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2296.
- [11] ROTTJ JD, BRIGHTON HE, CRAIG SL, et al. Arp2/3 complex is required for macrophage integrin functions but is dispensable for FcR phagocytosis and *in vivo* motility [J]. *Developmental Cell*, 2017, 42(5): 498-513.
- [12] MAO Y, FINNEMAN SC. Regulation of phagocytosis by Rho GTPases [J]. *Small GTPases*, 2015, 6(2): 89-99.
- [13] LOVEWELL RR, HAYES SM, O'TOOLE GA, et al. *Pseudomonas aeruginosa* flagellar motility activates the phagocyte PI3K/Akt pathway to induce phagocytic engulfment [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014, 306(7): 698-707.
- [14] SANGARI FJ, GOODMAN J, PETROFSKY M, et al. *Mycobacterium avium* invades the intestinal mucosa primarily by interacting with enterocytes [J]. *Infect Immun*, 2001, 69(3): 1515-20.
- [15] DELWIG AV, BAILEY E, GIBBS DM, et al. The route of bacterial uptake by macrophages influences the repertoire of epitopes presented to CD4 T cells [J]. *Eur J Immunol*, 2002, 32(12): 3714-9.
- [16] MARCEL V, PETIT I, MURRAY F, et al. Diverse p63 and p73 isoforms regulate $\Delta 133p53$ expression through modulation of the internal TP53 promoter activity [J]. *Cell Death Differ*, 2011, 19(5): 816-26.
- [17] BAARLINK C, PLESSNER M, SHRRARD A, et al. A transient pool of nuclear F-actin at mitotic exit controls chromatin organization [J]. *Nat Cell Biol*, 2017, 19(12): 1389-99.
- [18] BAARLINK C, WANG HC, GROSSE R. Nuclear actin network assembly by formins regulates the SRF [J]. *Science*, 2013, 340(6134): 864-7.
- [19] MIRALLES F, POSERN G, ZAROMYTIDOU A, et al. Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL [J]. *Cell*, 2003, 113(3): 329-42.