

RhoA蛋白对结核杆菌侵袭A549细胞的影响

邵圣文¹ 周洪昌¹ 徐伯赢¹ 张 慧¹ 薛利军^{2*}

(¹湖州师范学院医学院创新实验室, 湖州 313000; ²南京军区南京总医院肿瘤内科, 南京 210002)

摘要 探讨结核杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)侵袭A549细胞过程中RhoA蛋白功能。构建靶向*RhoA*基因的小干扰RNA(siRNA)表达载体si-RhoA, 转染A549细胞, 36 h后进行MTB黏附和侵袭细胞实验, 蛋白印迹法(Western blot)检测RhoA蛋白表达水平, 电镜观察细胞超微结构改变, 激光共聚焦显微镜观察细胞微丝骨架变化并计算F-actin重排指数, 定量PCR法测量细胞黏附和内吞的MTB数量。结果显示, si-RhoA转染A549细胞后, RhoA蛋白表达下降84.7%, 细胞对MTB的黏附能力未改变。MTB侵袭细胞实验显示, si-RhoA转染组细胞F-actin重排指数和内吞细菌数量分别是(63.0±3.1)%和(3.19±0.26)×10³拷贝, 无关siRNA组分别是(84.5±1.8)%和(4.45±0.29)×10³拷贝, 前者均少于后者($P<0.01$)。由此可见, 结核杆菌侵袭A549细胞需要RhoA蛋白参与, 可能通过“拉链”机制介导结核杆菌侵袭非吞噬细胞。

关键词 结核杆菌; 侵袭; *RhoA*基因; A549细胞

The Effect of RhoA Protein on *Mycobacterium tuberculosis* Invasion of A549 Cells

Shao Shengwen¹, Zhou Hongchang¹, Xu Baiying¹, Zhang Hui¹, Xue Lijun^{2*}

(¹Laboratory of Innovation, Medical School of Huzhou Teachers College, Huzhou 313000, China; ²Department of Medical Oncology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing 210002, China)

Abstract This paper was to investigate the role of RhoA protein in the process of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) invasion of A549 cell line (human lung adenocarcinoma cells). Small interfering RNA (siRNA) expressing vector targeting *RhoA* gene (si-RhoA) was constructed and transferred to A549 cells. MTB adhesion and invasion of A549 cells assays were performed 36 hours post transfection; The level of RhoA protein was determined by Western blot; The ultrastructural changes of cells were observed by electron microscope; Changes of filaments actin (F-actin) cytoskeleton were detected by laser scanning confocal microscope (LSCM), and the number of MTB adhering to cell and internalized by cell were measured by quantitative polymerase chain reaction (PCR). These results showed that the level of RhoA protein decreased by 84.7% after A549 cells transferred by si-RhoA, with the capacity of MTB adhering to cell no change. The test of MTB invasion of cells showed that the index of F-actin rearrangement and the number of MTB internalized by cell were (63.0±3.1)% and (3.19±0.26)×10³ copies for A549 cells transferred by si-RhoA, while they were (84.5±1.8)% and (4.45±0.29)×10³ copies for A549 cells transferred by scramble siRNA, and the former was significantly less than the latter ($P<0.01$). All these results indicate that the protein of RhoA has a role on MTB invasion of A549 cells, which may mediate MTB invasion of non phagocytic cells by zipper mechanism.

Key words *Mycobacterium tuberculosis*; invasion; *RhoA* gene; A549 cell

收稿日期: 2013-07-12 接受日期: 2013-09-02

国家自然科学基金(批准号: 30800988)资助的课题

*通讯作者. Tel: 025-80863175, E-mail: xljhy2001@hotmail.com

Received: July 12, 2013 Accepted: September 2, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30800988)

*Corresponding author. Tel: +86-25-80863175, E-mail: xljhy2001@hotmail.com

网络出版时间: 2013-10-29 11:12 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20131029.1112.001.html>

结核病由结核杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)引起。全球1/3人口受到过结核杆菌感染,约150万人死于结核病^[1]。更为严峻的是,临床上出现的多耐药(multi-drug resistant, MDR)、泛耐药(extendedly drug resistant, XDR)乃至全耐药(totally drug resistant, TDR)结核杆菌菌株,给结核病防治带来了严峻挑战^[2-3],迫切需要发展新的防治药物和方法。MTB对宿主细胞的侵袭机制尚不十分明确,阻碍了新的结核病诊断及治疗措施的发展,也给抗结核病的新型疫苗开发带来了困难。国外学者报道, Rho家族蛋白参与耶尔森菌及李斯特菌侵袭细胞^[4-5]。Rho家族蛋白成员之一的RhoA蛋白,通过调节细胞微丝骨架,参与致病性大肠杆菌(*enteropathogenic escherichia coli*, EPEC)侵袭非吞噬性细胞^[6]。而目前关于在MTB侵袭非吞噬性细胞的过程中是否需要RhoA蛋白的参与报道较少,本文将对此进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

MTB标准株H37Rv由浙江中医药大学朱明利教授赠送。兔RhoA抗体购自美国Santa Cruz公司;小鼠GAPDH抗体购自上海康成生物公司;脂质体Lipofectamine 2000(Lip2000)、FITC-Phalloidin、DMEM培养基和胎牛血清均购自美国Invitrogen公司。

1.2 构建siRNA表达质粒pGCsi-RhoA

针对*RhoA*基因的nt 710~728片段设计siRNA分子真核表达质粒,相应siRNA分子的两条DNA模板为:正义链5'-GAT CCC CAG AGA TAT GGC AAA CAG GAT TTC AAG AGA ATC CTG TTT GCC ATA TCT CTG TTT TTG GAT-3',反义链5'-AGC TAT CCA AAA ACA GAG ATA TGG CAA ACA GGA TTC TCT TGA AAT CCT GTT TGC CAT ATC TCT GGG-3'。采用化学法合成上述DNA模板,溶解于缓冲液中,退火后得到双链DNA分子;应用*Bam*H I和*Hind* III对pGCsi-U6载体进行双酶切,回收酶切片段,将其与双链DNA分子连接;连接产物转化感受态DH5 α , 100 μ g/mL氨苄青霉素筛选转化子,PCR法初步鉴定重组子,挑选阳性克隆进行DNA测序,得到pGCsi-RhoA质粒,能够表达靶向*RhoA*基因nt 710~728片段的siRNA分子。

1.3 细胞转染

A549细胞以 5×10^6 /孔接种于细胞培养板,加

入含10%胎牛血清的DMEM培养基,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养16~18 h,细胞生长至60%融合度时,按脂质体转染说明书进行转染。实验用A549细胞分3组: A组加入4 μ L脂质体(空白对照组), B组转染20 nmol/L无关siRNA分子表达载体(无关对照组), C组转染20 nmol/L pGCsi-RhoA分子(si-RhoA组)。转染12 h后,更换新鲜的含10%胎牛血清的DMEM培养基继续培养24 h,进行MTB侵袭细胞实验。

1.4 细菌侵袭细胞

细胞采用1.3方法进行转染,然后向各组细胞孔内加入MTB菌(MOI为20:1),37 $^{\circ}$ C、5% CO₂混合培养2 h, DMEM培养基洗3次,加入含100 μ g/mL卡那霉素的新鲜DMEM培养基,继续培养2 h, DMEM培养基洗3次,加入含10%胎牛血清新鲜DMEM培养基继续培养6 h,胰酶消化收集细胞进行以下检查: RhoA蛋白表达水平、细胞内吞MTB数量、细胞微丝重排、细胞超微结构。各组实验重复3次。

采用Western blot法检测细胞RhoA蛋白表达水平。一抗为兔RhoA抗体(1:200稀释),二抗为AP标记的羊抗兔IgG(1:1 000稀释),BCIP/NBT显色后拍照,条带灰度值代表RhoA蛋白表达量。根据公式“(空白孔灰度值-转染孔灰度值)/转染孔灰度值”,计算RhoA蛋白相对表达水平。各组设立平行3孔测量,数据以($\bar{x} \pm s$)表示。

细胞内吞MTB能力测定: MTB侵袭A549细胞后,胰酶消化收集细胞,取10 μ L进行细胞计数,向其余细胞中加入细胞裂解液,采用本实验室建立的实时荧光定量法测定MTB拷贝数。PCR扩增结核杆菌16S rDNA基因片段,正向引物P_f序列为5'-AAG GCG ACG ACG GGT AGC-3',反向引物P_r序列为5'-GAA GGC CGT CAT CCC CCA-3'(详细方法参见文献[7])。设平行3孔测量,计算1 000个细胞内的MTB拷贝数,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,代表细胞对MTB的内吞能力。

细胞微丝重排检查^[8]: 细胞经3.7%甲醛室温固定10 min,加入含0.1% Triton X100的PBS处理10 min,加入10 μ g/mL FITC-Phalloidin的PBS溶液,室温染色40 min, Leica TCS SP5型激光共聚焦显微镜观察,激发光495 nm,发射光515 nm。计算F-actin重排积分指数: 细胞出现典型F-actin聚集计1分(膜突起、片状伪足、丝状伪足,出现2~3项以上改变),非典型聚集计0.5分(出现1项改变),无聚集计0分,计算200个细胞, F-actin重排积分指数=(积分总值/200)×100%。

各组实验重复3次, F-actin重排积分指数以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 可反映各组细胞F-actin重排情况。

细胞超微结构检查: 细胞经2.5%戊二醛4 °C固定16 h, 常规方法制备电镜标本, Hitachi-7650型TEM电镜观察细胞超微结构。

1.5 细菌黏附细胞能力检测

细胞采用1.2方法分别进行转染, 再向各组细胞培养孔内加入MTB菌(MOI为20:1), 4 °C放置2 h, 吸弃培养基, PBS洗3次, 胰酶消化收集细胞, 取10 μ L进行细胞计数。向其余细胞中加入细胞裂解液, 采用实时荧光定量法测定MTB拷贝数, 计算1 000个细胞黏附的MTB拷贝数, 实验重复3次, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 可反映各组细胞对MTB黏附能力。

1.6 统计学分析

采用SPSS 15.0软件进行统计分析, 方差分析采用 F 检验, 组间均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。

2 结果

2.1 siRNA对A549细胞RhoA基因表达的抑制作用

图1显示, 20 nmol/L的si-RhoA转染A549细胞(3泳道)36 h后, *RhoA*基因表达受到抑制, 对应的蛋白表达水平为对照组(1泳道)的15.3%, 抑制率为84.7%。

2.2 MTB对A549细胞的黏附能力

表1显示, 对照组(A组)、无关siRNA组(B组)以及si-RhoA组(C组)细胞对MTB的黏附能力无统计学差别。以上结果提示, 抑制A549细胞*RhoA*基因的表达, 不影响MTB对A549细胞的黏附能力。

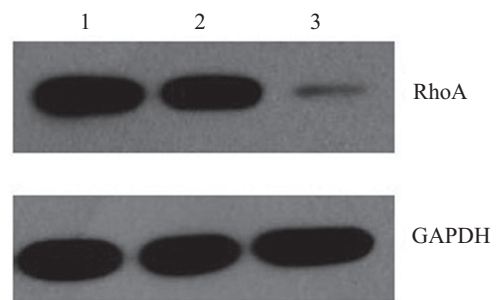
2.3 MTB侵袭A549细胞对细胞结构的影响

图2显示, 结核杆菌H37Rv毒力株侵袭A549细

胞, 细胞结构出现以下改变: 对照组和无关siRNA组细胞的微丝短、散在分布、排列紊乱, 内质网及线粒体受损严重、出现空泡, 细胞内有被吞噬的细菌(图2A和2B); si-RhoA组细胞的微丝长、排列整齐, 内质网及线粒体轻微受损(图2C)。

2.4 MTB侵袭A549细胞引起细胞微丝重排

A549细胞经si-RhoA处理36 h, 采用H37Rv毒力株侵袭A549细胞, 2 h后观察细胞微丝重排情况, 结果见图3。图3显示: 对照组和无关siRNA组细胞微丝重排明显, 多见细胞膜突起、片状伪足或丝状伪足(图3A和3B); si-RhoA组细胞微丝重排不明显, 少



1: 对照; 2: 无关siRNA; 3: si-RhoA。

1: control; 2: scramble siRNA; 3: si-RhoA.

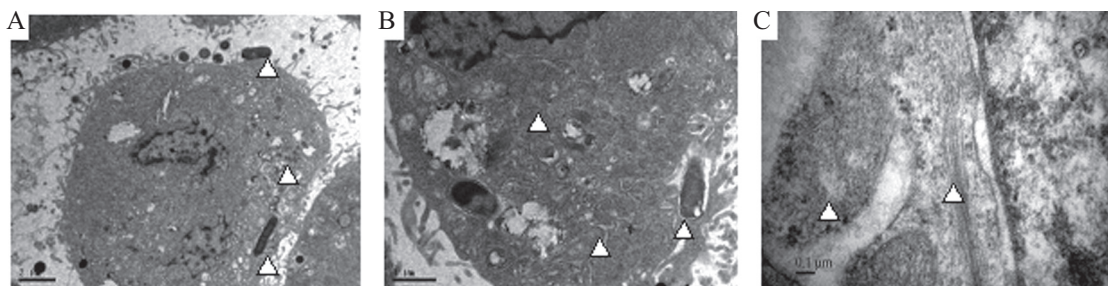
图1 siRNA抑制A549细胞RhoA蛋白表达

Fig.1 Down-regulated expression of RhoA protein of A549 cell line by siRNA

表1 MTB对A549细胞的黏附能力($\times 10^4$ 拷贝)

Table 1 Adhesion capacity of MTB to A549 cell line ($\times 10^4$ copies)

组别 Group	黏附的MTB数量 Number of MTB adhesion to cell
A (control)	2.66 $\pm$ 0.23
B (scramble siRNA)	2.65 $\pm$ 0.21
C (si-RhoA)	2.62 $\pm$ 0.16



A: 对照(4 000 $\times$), 内质网空泡、内吞的MTB(Δ); B: 无关siRNA(10 000 $\times$), 线粒体空泡、凌乱的短微丝、内吞的MTB(Δ); C: si-RhoA(40 000 $\times$), 线粒体轻微受损、整齐的长微丝(Δ)。

A: control (4 000 $\times$), vacuolar endoplasmic reticulum and internalized MTB(Δ); B: scramble siRNA (10 000 $\times$), vacuolar mitochondria, short and disorganized filaments, and internalized MTB(Δ); C: si-RhoA (40 000 $\times$), slightly damaged mitochondria, and long filaments with good order (Δ).

图2 MTB对A549细胞结构的影响(侵袭2 h)

Fig.2 Effect of MTB invasion on structure of A549 cell line (2 hours post invasion)

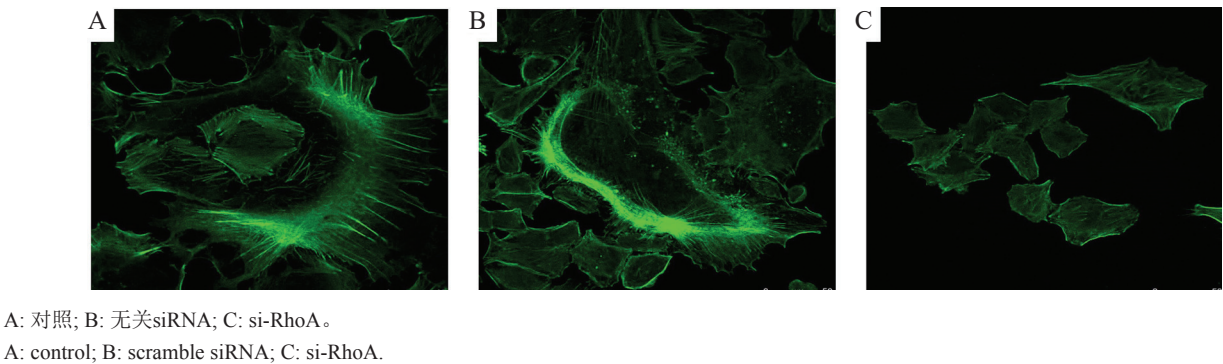


图3 MTB对A549细胞微丝骨架的影响(400×)
Fig.3 Effect of MTB invasion on actin cytoskeleton of A549 cell line (400×)

表2 MTB侵袭A549细胞的F-actin重排指数(%)	
Table 2 Index of F-actin rearrangement by MTB invasion	
A549 cell line (%)	
组别	重排指数(%)
Group	Index of rearrangement (%)
A (control)	85.7±1.5
B (scramble siRNA)	84.5±1.8
C (si-RhoA)	63.0±3.1▲

▲*P*<0.01, 与B组比较。
▲*P*<0.01 vs B group.

表3 A549细胞对MTB的内吞能力(×10 ³ 拷贝)	
Table 3 The capacity of A549 cell internalization MTB	
(×10 ³ copies)	
组别	内吞的MTB数量
Group	Number of MTB internalized
A (control)	4.49±0.34
B (scramble siRNA)	4.45±0.29
C (si-RhoA)	3.19±0.26▲

▲*P*<0.01, 与B组比较。
▲*P*<0.01 vs B group.

见细胞膜突起、片状伪足或丝状伪足(图3C)。

计算各组细胞的F-actin重排指数, 结果见表2。表2显示, si-RhoA组细胞的F-actin重排指数显著低于无关siRNA组(*P*<0.01), 其他各组细胞的F-actin重排指数差别无统计学意义。

2.5 A549细胞对MTB的内吞能力

A549细胞经si-RhoA处理36 h, 采用H37Rv毒力株侵袭A549细胞, 2 h后检测细胞内吞细菌数目, 结果见表3。表3显示, si-RhoA组细胞内的细菌数目显著低于无关siRNA组(*P*<0.01), 其他组细胞内吞细菌数目差别无统计学意义。

3 讨论

侵袭力是细菌致病性的重要影响因素之一。对于细胞内寄生的细菌, 侵入宿主细胞是造成宿主感染的第一个环节。胞内寄生菌对宿主细胞的侵袭能力, 是细菌毒力的重要影响因素, 直接决定细菌致病性强弱。阻止胞内寄生菌侵入细胞能够阻止感染发生。研究表明, 细菌侵入宿主细胞的侵袭机制主要有两种: “拉链(zipper)”机制和“触发(trigger)”机制^[9-10]。细菌表面的配体分子与宿主细胞表面的受体直接结合, 启动信号分子级联反应, 引起细胞骨架重排, 形成

吞噬小泡, 包绕细菌并使之内化, 此为“拉链”机制^[9], 耶尔森菌及李斯特菌多以此机制侵入细胞。“触发”机制多见于沙门菌^[10]。

RhoA蛋白属于Rho蛋白家族成员之一, 主要参与细胞极性形成、细胞运动以及细胞骨架重排等细胞事件^[11-12]。有证据表明, RhoA通过“触发”机制参与某些细菌侵袭非吞噬细胞过程。B群链球菌侵入HeLa细胞或内皮细胞时, RhoA蛋白发挥了GTP酶作用。一旦RhoA蛋白的GTP酶活性结构域发生突变, 侵入细胞的B群链球菌数目显著减少^[13-14]。金黄色葡萄球菌侵袭肺泡上皮细胞时, RhoA相关信号通路被激活^[15]。MTB可以侵袭非吞噬细胞A549细胞, 并且能够在细胞内增殖^[16]。但是, 在MTB侵袭非吞噬细胞的过程中, RhoA蛋白功能尚不明确。

细菌黏附能力与细胞表面分子密切相关。在细菌侵袭细胞的“触发”机制中, 决定细菌侵袭细胞能力大小的关键因素是细菌黏附能力。在细菌侵袭细胞的“拉链”机制中, 决定细菌侵袭细胞能力大小的关键因素有两个, 即细菌黏附能力和细菌侵入能力。细胞对细菌的内吞数量反映细菌侵入能力。本文采用RNA干扰技术抑制A549细胞*RhoA*基因表达, 然后应用MTB标准株H37Rv细菌侵袭A549细胞, 观察到

以下改变: 细胞对MTB的黏附能力未改变, 细胞微丝重排能力下降, 细胞对MTB的内吞能力下降。以上结果提示, 非吞噬细胞的*RhoA*基因表达下调后, 结核杆菌黏附细胞能力没有受到明显影响, 但是结核杆菌侵入细胞能力下降。因此, 本文认为: 在结核杆菌侵袭非吞噬细胞的过程中, 需要RhoA蛋白参与, RhoA蛋白可能是通过“拉链”机制来发挥功能。在细菌侵袭细胞的过程中, Rho蛋白家族的功能与细菌及细胞种类有关。未来研究中, 对于Rho蛋白家族在结核杆菌侵袭细胞过程中的信号通路激活途径与顺序, 值得深入研究。

参考文献 (References)

- 1 WHO. WHO global tuberculosis control report 2010. Cent Eur J Public Health 2010; 18(4): 237.
- 2 Babu GR, Laxminarayan R. The unsurprising story of MDR-TB resistance in India. Tuberculosis (Edinb) 2012; 92(4): 301-6.
- 3 Migliori GB, Centis R, D'Ambrosio L, Spanevello A, Borroni E, Cirillo DM, *et al.* Totally drug-resistant and extremely drug-resistant tuberculosis: the same disease? Clin Infect Dis 2012; 54(9): 1379-80.
- 4 Roppenser B, Röder A, Hentschke M, Ruckdeschel K, Aepfelbacher M. *Yersinia enterocolitica* differentially modulates RhoG activity in host cells. J Cell Sci 2009; 122(Pt 5): 696-705.
- 5 Kirchner M, Higgins DE. Inhibition of ROCK activity allows InlF-mediated invasion and increased virulence of *Listeria monocytogenes*. Mol Microbiol 2008; 68(3): 749-67.
- 6 Berger CN, Crepin VF, Jepson MA, Arbeloa A, Frankel G. The mechanisms used by enteropathogenic *Escherichia coli* to control filopodia dynamics. Cell Microbiol 2009; 11(2): 309-22.
- 7 徐菊玲, 徐伯赢, 周洪昌, 张慧, 段劲, 薛利军, 等. 结核分枝杆菌荧光定量PCR检测方法建立. 中国公共卫生(Xu Juling, Xu Baiying, Zhou Hongchang, Zhang Hui, Duan Jin, Xue Lijun, *et al.* Establishment of fluorescence quantitative PCR assay in detection of *Mycobacterium tuberculosis*. Chin J Public Health) 2011; 27(10): 1250-2.
- 8 Peiffer I, Servin AL, Bernet-Camard MF. Piracy of decay-accelerating factor (CD55) signal transduction by the diffusely adhering strain *Escherichia coli* C1845 promotes cytoskeletal F-actin rearrangements in cultured human intestinal INT407 cells. Infect Immun 1998; 66(9): 4036-42.
- 9 Cossart P, Pizarro Cerda J, Lecuit M. Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: Functional mimicry to subvert cellular functions. Trends Cell Biol 2003; 13(1): 23-31.
- 10 Hänisch J, Stradal TE, Rottner K. A novel contractility pathway operating in Salmonella invasion. Virulence 2012; 3(1): 81-6.
- 11 Zhou X, Zhan W, Bian W, Hua L, Shi Q, Xie S, *et al.* GOLPH3 regulates the migration and invasion of glioma cells through RhoA. Biochem Biophys Res Commun 2013; 433(3): 338-44.
- 12 Vega FM, Fruhwirth G, Ng T, Ridley AJ. RhoA and RhoC have distinct roles in migration and invasion by acting through different targets. J Cell Biol 2011; 193(4): 655-65.
- 13 Burnham CA, Shokoples SE, Tyrrell GJ. Rac1, RhoA, and Cdc42 participate in HeLa cell invasion by group B streptococcus. FEMS Microbiol Lett 2007; 272(1): 8-14.
- 14 Shin S, Kim KS. RhoA and Rac1 contribute to type III group B streptococcal invasion of human brain microvascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 2006; 345(1): 538-42.
- 15 Soong G, Martin FJ, Chun J, Cohen TS, Ahn DS, Prince A. Staphylococcus aureus protein A mediates invasion across airway epithelial cells through activation of RhoA GTPase signaling and proteolytic activity. J Biol Chem 2011; 286(41): 35891-8.
- 16 Garcia-Perez BE, Mondragon-Flores R, Luna-Herrera J. Internalization of *Mycobacterium tuberculosis* by macropinocytosis in non-phagocytic cells. Microb Pathog 2003; 35(2): 49-55.