

# Arl8a与树突状细胞TLR4两条下游途径的相关性

唐 蓓\*

(重庆师范大学生命科学学院, 重庆 401331)

**摘要** 为探讨Arl8a(ADP-ribosylation factor-like 8A)与树突状细胞(dendritic cells, DCs)TLR4两条下游信号途径的关系, 用Arl8a和GEFH1(guanine nucleotide-exchange factors H1)的siRNA转染来自野生型小鼠的DC, 进行LPS刺激或未刺激处理后, 检测TLR4-TRIF途径中RhoB靶蛋白MYH9的mRNA表达。然后从野生型和IFN $\alpha$ / $\beta$ 受体基因敲除小鼠中分离和培养DC, LPS刺激后收集细胞扩增总cDNA, 通过实时定量PCR检测Arl8a的mRNA表达。再用Arl8a的siRNA转染DC, LPS刺激后检测IL-6和IL-12a的mRNA表达。结果表明, Arl8a和GEFH1的siRNA均能显著抑制LPS介导的MYH9的mRNA表达( $P < 0.01$ ), 而且在LPS刺激后, Arl8a的mRNA表达在野生型小鼠的DC中增加, 在IFN $\alpha$ / $\beta$ 受体基因敲除小鼠的DC中则未被上调。此外, Arl8a的siRNA对IL-6和IL-12a的mRNA表达没有显著效应。以上结果提示, 在转录水平, Arl8a和GEFH1均对MYH9的表达有影响, 并且Arl8a基因的表达与TRIF-IFN $\beta$ 途径有关, Arl8a可能与MyD88途径中细胞因子IL-6和IL-12a的表达无关。

**关键词** Arl8a; TLR4信号途径; GEFH1; MYH9; RhoB

## Crosstalk between Arl8a and TLR4 Signaling in Dendritic Cells

Tang Bei\*

(College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

**Abstract** To elucidate the crosstalk between Arl8a and two downstream pathways of TLR4 signaling in dendritic cells (DCs), we silenced guanine nucleotide-exchange factors H1 (GEFH1) and Arl8a in DCs from wild-type (WT) mice with small interference RNAs (siRNA), and examined the mRNA levels of MYH9 which was targeted by RhoB in TLR4-TRIF pathway, with or without LPS stimulation. Then, we used Real-time PCR to detect Arl8a mRNA level in LPS stimulated DCs isolated from wild-type and IFN $\alpha$ / $\beta$  receptor knockout mice (IFN $\alpha$ / $\beta$  RKO). We also analyzed IL-6 and IL-12a mRNA expression in DCs after Arl8a silenced by siRNA. The results showed that Arl8a and GEFH1 siRNA significantly suppressed the LPS-mediated up-regulation of MYH9 mRNA ( $P < 0.01$ ). In addition, the up-regulation of Arl8a mRNA was observed in DC from WT mice but not in DC from IFN $\alpha$ / $\beta$  RKO after LPS incubation, indicating that LPS-induced up-regulation of Arl8a was attenuated by knockout of IFN $\alpha$ / $\beta$  receptor. However, Arl8a siRNA failed to alter IL-6 and IL-12a mRNA level in DC after LPS stimulation. In conclusion, GEFH1 and RhoB were proved to be able to regulate MYH9 expression, while the Arl8a level could be modified by TRIF-IFN $\beta$  pathway in DC. There was no evidence that Arl8a is involved in MyD88-dependent signaling induced cytokines IL-6 and IL-12a expression.

**Key words** Arl8a; TLR4 signaling; GEFH1; MYH9; RhoB

收稿日期: 2013-11-10 接受日期: 2014-02-21

重庆市教委科学技术研究项目(批准号: KJ120603)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-65910315, E-mail: xiaobt26@126.com

Received: November 10, 2013 Accepted: February 21, 2014

This work was supported by Chongqing Education Department Science and Technology Project (Grant No. KJ120603)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-65910315, E-mail: xiaobt26@126.com

网络出版时间: 2014-05-16 14:55 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.06.0370.html>

树突状细胞(dendritic cells, DCs)是唯一可激活静息T细胞的抗原提呈细胞<sup>[1-2]</sup>, 已有研究表明, 树突状细胞中的TRIF-GEFH1-RhoB信号途径与适应性免疫应答的启动有关<sup>[3]</sup>。其中, RhoB为小G蛋白Rho家族中的成员, 通过作用于靶蛋白而产生多种生物学效应, 在调节细胞骨架重组、囊泡转运, 细胞周期、细胞运动和凋亡等过程中发挥重要作用<sup>[4-6]</sup>。鸟苷酸交换因子H1(guanine nucleotide-exchange factors H1, GEFH1)可使RhoB蛋白由GDP结合的无活性形式转变为GTP结合的活性形式<sup>[3]</sup>。

*Arl8a*(ADP-ribosylation factor-like 8A)属于小G蛋白Ras超家族ADP-核糖基化因子(ADP-ribosylation factor, Arf)亚家族一个亚类Arl(Arf-like)中的成员<sup>[7]</sup>。有研究报道, 其与有丝分裂过程中的染色体分离及溶酶体的转运有关, 但其众多生物学功能尚待进一步研究<sup>[8-10]</sup>。在研究和寻找与树突状细胞MHCII转运有关的分子时, 有研究表明, *Arl8a*的超表达可使溶酶体朝细胞外围重新分布, 这引起了我们的关注。我们的研究发现, *Arl8a*的表达与TRL4-TRIF途径有关, 且*Arl8a*与GEFH1、RhoB在转录水平相互作用<sup>[11]</sup>。我们鉴定到了RhoB的靶蛋白MYH9<sup>[12]</sup>, MYH9是RhoB的下游分子, 因而我们研究了*Arl8a*和GEFH1是否对MYH9有影响, 同时也研究了*Arl8a*与TLR4两条下游途径MyD88和TRIF的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

C57BL/6小鼠和C57BL/6/IFN $\alpha$ / $\beta$ 受体基因敲除小鼠来自大阪大学免疫发生学研究室。FCS、RPMI-1640培养基为Gibco公司产品; GM-CSF购自Immunogenex公司; Mouse Dendritic Cell Enrichment Set试剂盒购自BD公司; RNeasy mini总RNA抽提试剂盒、QiAquick Gel Extraction试剂盒购自Qiagen公司; M-MLV反转录试剂盒购自Sigma公司; GenePORTER转染试剂为Genlantis公司产品, 混合荧光染料SYBR Green PCR Master Mix购自Applied Biosystems公司。荧光定量PCR仪为Applied Biosystems公司, 型号为Gene Amp 5700 sequence Detection System。

### 1.2 小鼠骨髓来源DC的分离和培养

C57BL/6小鼠和IFN $\alpha$ / $\beta$ 受体基因敲除小鼠骨髓来源DC的分离和培养参考文献<sup>[13]</sup>, 具体过程如下: 无菌条件下取小鼠后肢股骨、胫骨和肱骨, 用RPMI-

1640培养液冲洗骨髓腔制备骨髓悬液, 红细胞裂解液去除红细胞后, 用RPMI-1640全培养液调细胞密度为 $2 \times 10^6$ /mL, 加入GM-CSF(1 000 U/mL), 混匀, 分装直径100 mm培养皿中, 10 mL/皿, 37 °C、5% CO<sub>2</sub>条件下培养。每两天换1次液, 去除非贴壁细胞, 并补充等剂量的GM-CSF, 到第6 d时未成熟DC的纯度可达80%以上。在第6 d, 加入终浓度为100 ng/mL的LPS进行刺激, 分别处理0, 12 h后收集细胞, 用Mouse Dendritic Cell Enrichment Set试剂盒纯化备用。

### 1.3 总RNA提取及cDNA制备

用总RNA抽提试剂盒提取细胞的总RNA(具体按试剂盒说明进行)。cDNA的制备使用M-MLV反转录试剂盒, 按照操作说明进行反转录反应。合成的cDNA经分光光度计测浓度后于-20 °C保存备用。

### 1.4 siRNA序列的设计

小鼠*Arl8a*基因和*GEFH1*基因的siRNA由日本Sigma-Aidrich公司合成。经筛选后有效应的*Arl8a*的siRNA序列为: 正义链: 5'-GAA AAC GAU CCU UGU AAC UGU-3', 反义链: 5'-AGU UAC AAG GAU CGU UUU CCA-3'。*GEFH1*的siRNA序列为: 正义链: 5'-GAU UUA CAA CCG AAU GGA UCC-3', 反义链: 5'-AUC CAU UCG GUU GUA AAU CUC-3'。以效应siRNA的随机序列作为实验的对照siRNA。

### 1.5 siRNA转染

siRNA的转染采用GenePORTER转染试剂, 首先将4  $\mu$ L siRNA和5  $\mu$ L Geneporter以无血清培养基RPMI1640分别调体积至500  $\mu$ L, 混合后室温静置30 min, 然后添加到原代培养4 d的DC中, 转染3~5 h后换新鲜培养液, 继续培养24 h, 进行LPS刺激和未刺激处理后, 收集细胞备用。

### 1.6 荧光定量PCR用引物的设计

参考GenBank中小鼠*Arl8a*、*MYH9*、*IL-6*、*IL-12a*基因和内参*HPRT*基因的核苷酸序列, 分别设计特异性引物。*Arl8a*基因的上游引物: 5'-CAC CAA AGG GAA TGT GAC CA-3', 下游引物: 5'-ATC CGC AGC ATC CAC CAT A-3'。*MYH9*的上游引物: 5'-TGG GAA GAA GGT GAA GGT GA-3', 下游引物: 5'-ATA AGG GTT GAT GAC CAC ACA GA-3'。*IL-6*的上游引物: 5'-AGA CTT CCA TCC AGT TGC CTT C-3', 下游引物: 5'-TCT CAT TTC CAC GAT TTC CCA GAG-3'。*IL-12a*的上游引物: 5'-ACC AAA CCA GCA CAT TGA AGA-3', 下游引物: 5'-GCT ACC AAG GCA CAG GGT

CA-3'。HPRT上游引物: 5'-GAT TAG CGA TGA TGA ACC AGG-3', 下游引物: 5'-CCT CCC ATC TCC TTC ATG ACA-3'。

### 1.7 实时荧光定量PCR反应

以总RNA反转录合成的cDNA为模板, 利用上述引物进行普通PCR反应, 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定后, 从凝胶中纯化回收相应的DNA片段, 紫外分光光度计测定浓度后, 进行10倍梯度稀释以备作标准曲线。建立以下定量PCR反应体系: 模板1  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物各0.01 nmol/L, 10  $\mu\text{L}$  SYBR Green PCR Master Mix, 无RNase水补足至20  $\mu\text{L}$ 。扩增条件为: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性10 min; 然后95  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 进行45个循环。循环结束后, 利用GeneAmp 5700 SDS荧光定量分析软件自动绘制扩增曲线、标准曲线和熔解曲线。每次检测都包括不含反应模板的阴性对照, 同时每个样本重复3次, 以均值来表示结果。以目的基因与内参照的相对比值表示目的基因的相对含量, 并进行独立的3次试验。

### 1.8 统计学分析

数据采用SPSS 15.0统计软件处理, 用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 并进行 $t$ 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 Arl8a和GEFH1的siRNA抑制MYH9 mRNA表达

用Arl8a和GEFH1的siRNA转染DCs, 以对照siRNA为对照, 进行LPS刺激和未刺激处理, 收集细胞后扩增细胞总cDNA, 通过实时定量PCR检测MYH9 mRNA的表达。结果如图1, 以LPS未刺激时MYH9的mRNA相对含量为100进行标准化处理, 在LPS刺激后, MYH9的mRNA在对照DC中明显增加, 但在转染Arl8a和GEFH1 siRNA的DC中其表达上调则被显著抑制( $P<0.01$ )。

### 2.2 野生型与IFN $\alpha/\beta$ 受体基因敲除小鼠Arl8a的mRNA表达

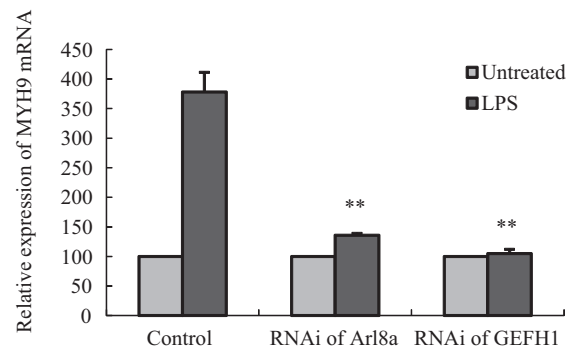
对从野生型和IFN $\alpha/\beta$ 受体基因敲除小鼠中分离和培养的DC进行LPS刺激和未刺激处理, 通过实时定量PCR检测Arl8a mRNA的表达。结果如图2, 在野生型C57BL/6小鼠的DC中, 随LPS刺激时间的延长, Arl8a的mRNA表达也增加, 差异极显著, 而在IFN $\alpha/\beta$ 受体基因敲除小鼠的DC中, LPS刺激后Arl8a的mRNA表达上调则被显著抑制( $P<0.01$ )。

### 2.3 Arl8a siRNA对IL-6的作用

用Arl8a的siRNA转染DC, 以对照siRNA为对照, 进行LPS刺激和未刺激处理, 收集细胞后扩增细胞总cDNA, 通过实时定量PCR检测IL-6 mRNA的表达。结果如图3, LPS刺激后, 与对照相比, IL-6的mRNA表达虽略有增加, 但差异不显著( $P>0.05$ ), 表明Arl8a的siRNA对IL-6 mRNA的表达没有明显效应。

### 2.4 Arl8a siRNA对IL-12a的作用

用Arl8a的siRNA转染DC, 以对照siRNA为对照, 进行LPS刺激和未刺激处理, 收集细胞后扩增细胞总cDNA, 通过实时定量PCR检测IL-12a mRNA的表达。结果如图4所示, LPS刺激后, Arl8a的siRNA对IL-12a mRNA的表达未表现出显著效应( $P>0.05$ )。

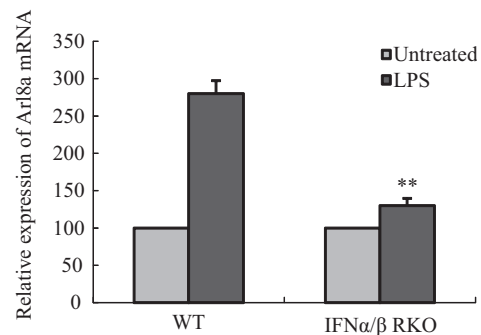


\*\* $P<0.01$ , 与对照的LPS刺激组比较。

\*\* $P<0.01$  compared with control group of LPS treatment.

图1 Arl8a和GEFH1 siRNA对MYH9 mRNA的作用

Fig.1 Effects of Arl8a and GEFH1 small interfering RNA (siRNA) on MYH9 mRNA



WT: 来自野生型小鼠DC的Arl8a mRNA表达; IFN $\alpha/\beta$  RKO: 来自IFN $\alpha/\beta$ 受体基因敲除小鼠DC的Arl8a mRNA表达; \*\* $P<0.01$ , 与WT的LPS刺激组比较。

WT: expression of Arl8a mRNA in DC from wild type mice; IFN $\alpha/\beta$  RKO: expression of Arl8a mRNA in DC from IFN $\alpha/\beta$  receptor knockout mice; \*\* $P<0.01$ , compared with wild type of LPS treatment.

图2 Arl8a mRNA在DC中的表达

Fig.2 Expression of Arl8a mRNA in DC

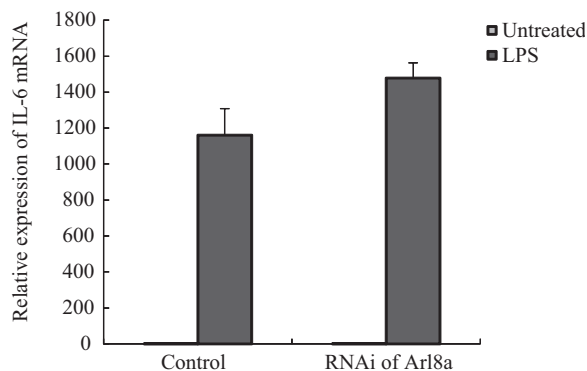


图3 Arl8a siRNA对IL-6 mRNA的作用

Fig.3 Effects of Arl8a small interfering RNA (siRNA) on IL-6 mRNA

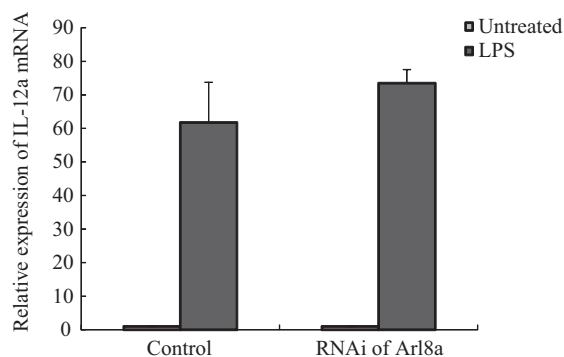


图4 Arl8a siRNA对IL-12a mRNA的作用

Fig.4 Effects of Arl8a small interfering RNA (siRNA) on IL-12a mRNA

### 3 讨论

用LPS刺激树突状细胞, TLR4信号途径被启动, 该途径活化后, 在其下游, 至少有两条信号途径被激活, 一条依赖于TRIF, 一条依赖于MyD88<sup>[14-15]</sup>。已有的研究表明, TRIF-GEFH1-RhoB信号途径与适应性免疫应答的启动有关。在此前的研究中, 我们发现小G蛋白Arl8a的表达也与TRL4-TRIF途径有关, Arl8a的活化离不开TRL4-TRIF途径的活化。同时, 分别针对GEFH1和Arl8a的siRNA阻断均可明显抑制*RhoB*基因的表达, 而GEFH1的siRNA也可抑制*Arl8a*基因的表达<sup>[11]</sup>。

此外, 在TLR4-TRIF途径中我们鉴定到了RhoB的一种靶蛋白MYH9<sup>[12]</sup>, 在用LPS刺激DC后, MYH9可与RhoB的活性形式结合, 提示其可能作为TLR4-TRIF途径中RhoB下游的一种马达分子, 驱动由RhoB介导的囊泡转运。既然Arl8a和GEFH1的siRNA均可明显抑制*RhoB*基因的表达, 那么是否也会影响RhoB的靶蛋白MYH9呢? 我们进行了研究, 结果显示, Arl8a和GEFH1的siRNA均可显著抑

制MYH9基因的表达, 这说明至少在转录水平, Arl8a和GEFH1均对MYH9有影响, Arl8a和GEFH1可能在RhoB-MYH9介导的某些蛋白转运中作为其上游分子而发挥作用。

接下来我们继续探讨了Arl8a与TLR4两条下游途径表达产物之间的关系。我们知道, TRIF途径活化后, 导致了IFN $\beta$ 的表达, IFN $\beta$ 又是DCs的活化因子<sup>[16-17]</sup>, 那么TRIF途径的诱导产物IFN $\beta$ 与Arl8a之间是否会有关系呢? 我们研究了IFN $\alpha/\beta$ 受体敲基因小鼠中*Arl8a*的基因表达。结果表明, 在该小鼠中, LPS刺激后Arl8a的mRNA表达被显著下调, 这说明*Arl8a*基因的表达与TRIF-IFN $\beta$ 途径有关, 由于IFN $\beta$ 诱导了DC中共刺激分子和MHCII的细胞表面表达<sup>[18]</sup>。因此, Arl8a是否也与这一过程有关, 这需要进一步研究。

TLR4的另一下游途径是MyD88, 这一途径最后诱导了炎症细胞因子如IL-6、IL-12等的合成与释放, Arl8a的转录虽与这一途径无关, 但Arl8a本身是否会影响这些细胞因子的表达呢? 我们用Arl8a的siRNA分别对*IL-6*和*IL-12a*基因实施了干涉。结果显示, 在LPS刺激后, Arl8a的siRNA对*IL-6*和*IL-12a*的基因表达均未表现出明显效应, 暗示Arl8a可能与这一途径中细胞因子的形成无关。

本文的研究结果表明, TLR4-TRIF途径中Arl8a和GEFH1均影响RhoB靶蛋白MYH9的基因表达, 同时, DC中TRIF-IFN $\beta$ 途径与*Arl8a*的基因表达有关, *Arl8a*的基因表达与MyD88途径无关, *Arl8a*基因本身也与MyD88途径诱导的细胞因子IL-6和IL-12的基因表达无关。本文的研究结果为进一步研究Arl8a在DC中的功能奠定了基础。

致谢——

感谢日本大阪大学免疫发生学研究室的平野俊夫教授为本研究提供了相应的实验条件。

### 参考文献 (References)

- 1 Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767-811.
- 2 Steinman RM, Pack M, Inaba K. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunol Rev* 1997; 156: 25-37.
- 3 Kamon H, Kawabe T, Kitamura H, Lee J, Kamimura D, Kaisho T, et al. TRIF-GEFH1-RhoB pathway is involved in MHCII expression on dendritic cells that is critical for CD4 T-cell activation.

- EMBO J 2006; 25(17): 4108-19.
- 4 Huang M, Prendergast GC. RhoB in cancer suppression. *Histol Histopathol* 2006; 21(2): 213-8.
  - 5 Huang M, Satchell L, Duhadaway JB, Prendergast GC, Laury-Kleintop LD. RhoB links PDGF signaling to cell migration by coordinating activation and localization of Cdc42 and Rac. *J Cell Biochem* 2011; 112(6): 1572-84.
  - 6 Huang M, Duhadaway JB, Prendergast GC, Laury-Kleintop LD. RhoB regulates PDGFR-beta trafficking and signaling in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(12): 2597-605.
  - 7 Pasqualato S, Renault L, Cherfils J. Arf, Arl, Arp and Sar proteins: A family of GTP-binding proteins with a structural device for 'front-back' communication. *EMBO Rep* 2002; 3(11): 1035-41.
  - 8 Okai T, Araki Y, Tada M, Tateno T, Kontani K, Katada T. Novel small GTPase subfamily capable of associating with tubulin is required for chromosome segregation. *J Cell Sci* 2004; 117(pt 20): 4705-15.
  - 9 Hofmann I, Munro S. An N-terminally acetylated Arf-like GTPase is localized to lysosomes and affects their motility. *J Cell Sci* 2006; 119(pt 8): 1494-503.
  - 10 Bagshaw RD, Callahan JW, Mahuran DJ. The Arf-family protein, Arl8b, is involved in the spatial distribution of lysosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 344(4): 1186-91.
  - 11 唐 蓓. Arl8a与树突状细胞TLR4-TRIF信号途径的相关性. *中华微生物学和免疫学杂志*(Tang Bei. Relationship of the Arl8a with TLR4-TRIF pathway in dendritic cells. *Chin J Microbiol Immunol*) 2011; 31(1): 1-5.
  - 12 唐 蓓, 唐 彦. RhoB分子靶蛋白MYH9的鉴定. *中国细胞生物学学报*(Tang Bei, Tang Yan. Identification of target protein with RhoB. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2013; 35(3): 341-5.
  - 13 Park SJ, Nakagawa T, Kitamura H, Atsumi T, Kamon H, Sawa S, *et al.* IL-6 regulates *in vivo* dendritic cell differentiation through STAT3 activation. *J Immunol* 2004; 173(6): 3844-54.
  - 14 Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 2004; 430(6996): 257-63.
  - 15 Akira S. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* 2003; 278(40): 38105-8.
  - 15 Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, *et al.* Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003; 301(5633): 640-3.
  - 17 Hoshino K, Kaisho T, Iwabe T, Takeuchi O, Akira S. Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. *Int Immunol* 2002; 14(10): 1224-31.
  - 18 Hoebe K, Janssen EM, Kim SO, Alexopoulou L, Flavell RA, Han J, *et al.* Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways. *Nat Immunol* 2003; 4(12): 1223-9.