

# Rig-I对LPS诱导的巨噬细胞增殖、凋亡及功能的作用研究

王金霞 张洪信 陆顺元 唐凌云 王铸钢\*

(上海交通大学医学院附属瑞金医院实验医学研究中心, 上海 200025)

**摘要** 该研究旨在探讨维甲酸诱导基因I(retinoic acid-inducible gene I, *Rig-I*)对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的巨噬细胞增殖、凋亡和细胞因子分泌等生物学功能的影响及其作用机制。以不同剂量的LPS刺激*Rig-I*基因沉默和过表达的小鼠巨噬细胞系Raw264.7细胞, 采用CCK-8和流式细胞术检测细胞的生长状态, 采用qPCR方法检测细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-1和IL-6相关基因的表达水平, 并采用Western blot方法检测LPS诱导的TLR4信号通路的相关蛋白表达水平。CCK-8和流式细胞术结果显示, *Rig-I*促进巨噬细胞的增殖并抑制LPS诱导的细胞凋亡; qPCR结果表明, *Rig-I*促进巨噬细胞中TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-1和IL-6基因的表达。进一步的实验证实, *Rig-I*通过激活AKT及其下游蛋白p-38、NF- $\kappa$ B和Bcl-xL等抑制细胞凋亡并促进细胞因子的表达。该研究首次证实了*Rig-I*可通过AKT信号通路对LPS诱导的巨噬细胞增殖、凋亡及功能进行调节。

**关键词** *Rig-I*; 细胞因子; TLR4信号通路

## Effect of Rig-I on Proliferation, Apoptosis and Function of LPS-induced Macrophages

Wang Jinxia, Zhang Hongxin, Lu Shunyuan, Tang Lingyun, Wang Zhugang\*

(Research Center for Experimental Medicine of Rui Jin Hospital Shanghai Jiao Tong University  
School of Medicine, Shanghai 200025, China)

**Abstract** To investigate the biology function and mechanism of Rig-I on lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophages such as proliferation, apoptosis and cytokines secretion, macrophages (Raw264.7) with *Rig-I* gene knock-down or overexpression were treated with different doses of LPS for indicated times. The viability was analyzed by CCK-8 and apoptosis was measured by flow cytometry. The expression levels of related cytokines were examined by qPCR. The Toll like receptor-4 (TLR4) signaling induced by LPS was detected by Western blot. CCK-8 and flow cytometry analyses showed that Rig-I promoted the proliferation of macrophages and inhibited LPS-induced apoptosis. qPCR results indicated that Rig-I upregulated the expression of TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-1 and IL-6 in macrophage cells. These effects caused by Rig-I were further demonstrated by activation of AKT and its downstream p-38, NF- $\kappa$ B and Bcl-xL. These data firstly suggested that Rig-I could regulate proliferation, apoptosis and function of LPS-induced macrophages through AKT signaling pathway.

**Keywords** *Rig-I*; cytokines; TLR4 signaling pathway

收稿日期: 2015-02-10 接受日期: 2015-03-31

上海市科委基础研究重点项目(批准号: 10JC1410300)

\*通讯作者. Tel: 021-64370045-662320, E-mail: zhugang.wang@163.com

Received: February 10, 2015 Accepted: March 31, 2015

The work was supported by Shanghai Science and Technology Committee Foundation (Grant No.10JC1410300)

\*Corresponding author. Tel: +86-21-64370045-662320, E-mail: zhugang.wang@163.com

网络出版时间: 2015-06-03 16:31

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150603.1631.002.html>

Rig-I(retinoic acid-inducible gene I)是细胞质内病原模式识别受体的一种,通过特异性识别外源RNA在宿主抗病毒先天免疫功能中发挥重要作用<sup>[1]</sup>。Rig-I蛋白结构主要包括两个串联的caspase活化和募集结构域(caspase recruitment domain, CARD)、羧基端结构域(repression domain, RD)和一个DEXD/H家族解旋酶结构域<sup>[2-3]</sup>。在病毒感染情况下, Rig-I通过其RD结构域识别相应病毒RNA,并在ATP存在的条件下发生构象改变暴露出CARD结构域,与下游信号分子 $\beta$ -干扰素启动子刺激蛋白(interferon-beta promoter stimulator 1, IPS-1/MAVS/Caf1d1/VISA)发生相互作用,从而激活下游的IRF3(IFN regulatory factor 3)和NF- $\kappa$ B信号通路,产生I型干扰素和炎症因子,抵抗病毒入侵<sup>[4-7]</sup>。除抗病毒免疫以外,更多的研究表明, Rig-I参与抗细菌免疫反应。合作课题组的研究显示, Rig-I可以与干扰素下游效应性信号分子STAT1结合,增强干扰素抗肿瘤效应<sup>[8]</sup>。本课题组发现, *Rig-I*基因剔除纯合子小鼠眼部及颈部皮肤易发生条件性致病菌——木糖型葡萄球菌(*S. xylosus*)感染,容易发生结肠炎和粒细胞的过度增殖<sup>[9-10]</sup>; Rig-I蛋白与细胞内源性NF- $\kappa$ B1 mRNA结合,调控其蛋白翻译和活性<sup>[11]</sup>; 体外细胞培养发现, Rig-I可以通过调节GTP酶家族Rac/Cdc42的活性来影响细胞骨架蛋白actin的重组,从而促进吞噬细胞的吞噬作用,因此, *Rig-I*<sup>-/-</sup>小鼠巨噬细胞对细菌的吞噬能力减弱,易感染大肠杆菌*E. coli*<sup>[12]</sup>。而在抗细菌免疫反应中,巨噬细胞除对病原体的吞噬作用以外,还可以通过激活Toll样受体(Toll like receptor)识别病原体,产生前炎性分子来消灭病原体<sup>[13]</sup>。位于革兰氏阴性菌细胞壁外膜的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是巨噬细胞的潜在激活剂, LPS持续刺激机体单核巨噬细胞系统会使之产生大量的细胞因子、活性氧、溶酶体酶、NO等生物活性物质,引起细胞损伤和凋亡,最终引起败血症等其他失控性炎症反应,但是适量的细胞因子能够有效抵御感染和修复损伤的组织<sup>[14]</sup>。这是由于LPS激活Toll样受体4(TLR4)从而激活巨噬细胞,分泌大量的细胞因子,包括IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 和IL-10<sup>[14]</sup>。TLR4在与LPS结合以后通过招募髓样分化因子88(Myeloid differentiation primary response gene 88, MyD88)、白介素-1受体相关激酶(interleukin-1 receptor-associated kinase, IRAK)以及肿瘤坏死因子受体相关6(tumor necrosis factor receptor associated

factor 6, TRAF6)等接头蛋白,激活下游的PI3K/AKT、NF- $\kappa$ B和MAPK通路等多条信号转导通路<sup>[14-15]</sup>。这些分子对于活化聚集免疫细胞共同抵抗细菌感染是非常重要的。

合作课题组发现, *Rig-I*基因敲除的小鼠巨噬细胞对细菌的吞噬能力减弱,易感染大肠杆菌<sup>[12]</sup>。在此基础上,为进一步探讨*Rig-I*基因在宿主抗细菌天然免疫反应中的生物学功能,本课题主要以LPS激活巨噬细胞为模型,研究*Rig-I*基因在巨噬细胞的增殖、凋亡及细胞因子分泌过程中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

小鼠Raw264.7巨噬细胞细胞株由本实验室冻存; pcDNA3.1空质粒及pcDNA3.1-Rig-I重组质粒由本实验室冻存; *Rig-I* siRNA病毒由上海血液学研究所诸江教授惠赠。

### 1.2 实验试剂

TRIzol试剂(Invitrogen公司); AMV反转录试剂盒、荧光定量PCR试剂SYBR Green PCR kit(TaKaRa公司); DMSO和LPS(Sigma公司); RPMI-1640培养基及胎牛血清、PBS(Gibco公司); 蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂(Roche公司); Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I(BD公司); NF- $\kappa$ B1多克隆抗体(Stress-gene公司); Rig-I单克隆抗体(Abcam公司); p44/p42 MAPK(Erk1/2)抗体、p38抗体、Phospho-38抗体、P-AKT抗体、AKT抗体及Bcl-xL抗体(CST公司)。

流式细胞仪(BD公司); 电转染仪(BTX公司); 细胞计数仪(Beckman Coulter公司); Real-time PCR仪(Eppendorf公司); 多功能酶标仪(BioTek公司); 纯水仪(Millipore公司); 高压灭菌锅(Panasonic公司); 倒置相差显微镜和荧光显微镜(Nikon公司); 电泳装置(Bio-Rad公司); 凝胶成像系统(Tanon公司)。

### 1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 小鼠Raw264.7巨噬细胞在含10%热灭活胎牛血清的DMEM培养基中, 5% CO<sub>2</sub>、37 °C的湿润条件下培养,并按照常规程序传代维持。

1.3.2 *Rig-I*基因沉默Raw264.7细胞株构建 *Rig-I* siRNA病毒由上海血液学研究所诸江教授惠赠,转染程序如下:取2 $\times$ 10<sup>6</sup> Raw264.7细胞,悬浮于2 mL *Rig-I* siRNA病毒及对照病毒悬液中,接种于6 cm培养皿内,加入聚凝胺(polybrene)至终浓度为4  $\mu$ g/mL,

以提高病毒感染细胞的效率。24 h后弃上清, 0.25%胰酶消化, 室温1 500 r/min离心5 min, PBS洗涤3次, 将细胞重悬于5 mL含10% FBS的新鲜DMEM培养基中。48 h后通过流式分选GFP阳性细胞, 用10% FBS的DMEM培养基调节细胞浓度为300/mL, 接种于6 cm培养皿中继续培养, 隔1 d换液。72 h后, 挑选单克隆扩增, 收取部分细胞, 采用Western blot方法鉴定Rig-I表达, 选其中Rig-I基因沉默效果最明显的一个克隆用于后续实验, 以Rig-I RNAi来表示, 对照组以Control RNAi表示。

**1.3.3 Rig-I高表达Raw264.7细胞株的构建** 将培养至对数生长期的Raw264.7细胞株消化, 用PBS洗涤2次, 用无血清培养基调节细胞密度为 $1 \times 10^7$ /mL, 将Sca-I线性化的pcDNA3.1空质粒或者pcDNA3.1-Rig-I重组质粒与细胞混匀, 电压350 V, 脉冲时间30 ms, 电击1次。24 h后加入G418至终浓度为800  $\mu$ g/mL, 每两天换液, 筛选1周, 用400  $\mu$ g/mL的G418继续筛选2周, 挑单克隆, 扩增后经Western blot鉴定, 得到稳定的阳性细胞, 分别命名为Raw264.7/pcDNA3.1细胞和Raw264.7/pcDNA3.1-Rig-I细胞。

**1.3.4 LPS处理Raw264.7细胞株** LPS处理细胞: 将小鼠Raw264.7巨噬细胞按 $1 \times 10^6$ /mL的密度接种于6 cm培养皿中, 用3 mL含10%胎牛血清的DMEM培养。用不同浓度LPS刺激细胞并置于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>的培养箱中, 在指定的时间收集标本。

**1.3.5 细胞增殖-毒性检测试剂盒(CCK-8)检测细胞增殖** 将小鼠巨噬细胞株Raw264.7以 $5 \times 10^4$ /mL的密度接种于96孔板内, 每孔加入100  $\mu$ L细胞悬液。围绕细胞接种孔外圈孔内加入等量的PBS, 以减少培养基蒸发造成的误差。细胞在培养箱中培养24 h, 移除原有培养基, 加入含有不同浓度LPS的培养基, 分别诱导培养24, 48, 72 h, 每孔加入10  $\mu$ L CCK-8溶液, 将培养板在培养箱内孵育2.5 h。用酶标仪测定在450 nm处的吸光度(D)值。每组设4个复孔。

**1.3.6 流式细胞术检测细胞凋亡** 将小鼠巨噬细胞株Raw264.7以 $1 \times 10^6$ /mL的密度接种于6 cm培养皿内, 加入3 mL细胞悬液, 设置LPS和正常对照组, LPS终浓度1  $\mu$ g/mL, 每组3孔, LPS刺激12 h后, 收获细胞, 用预冷的PBS洗涤2次, 将细胞浓度调整为 $1 \times 10^6$ /mL, 取1 mL细胞悬液于5 mL流式管底部, 250  $\times$ g离心10 min, 倒掉上清, 加入含有Annexin V抗体的100  $\mu$ L Annexin V binding buffer, 室温避光反应15 min。用Annexin V

binding buffer洗涤, 离心取上清, 用100  $\mu$ L Annexin V binding buffer重悬, 加5  $\mu$ L PI反应15 min后, 继续加入400  $\mu$ L Annexin V binding buffer, 缓慢混匀, 放在冰上, 1 h内用流式细胞仪检测。

**1.3.7 qPCR检测细胞因子的表达量** 将小鼠巨噬细胞株Raw264.7/pcDNA3.1和Raw264.7/pcDNA3.1-Rig-I接种于12孔板内( $1.5 \times 10^6$ /孔), 在不同浓度LPS刺激12 h后, 收取细胞, 用TRIzol试剂抽取总的RNA, 通过AMV反转录酶将1  $\mu$ g的RNA反转录成cDNA, 以0.5  $\mu$ L的cDNA作为qPCR的模板和GAPDH为内参, 采用SYBR Green PCR Kit检测相关因子mRNA的表达水平。反应条件为: 95  $^{\circ}$ C 2 min变性; 95  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 20 s, 扩增40个循环, 以95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 1 min, 95  $^{\circ}$ C 15 s作为熔解曲线, 每个样本重复3个复孔。以基因相对于内参GAPDH的表达量即 $\Delta\Delta Ct$ 的值来衡量细胞因子mRNA的表达水平。

**1.3.8 Western blot检测** 用0.25%胰酶-EDTA消化收集细胞, PBS洗涤3次, 按每 $1 \times 10^6$ 细胞加100  $\mu$ L裂解液的比例加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的NETN(100 mmol/L NaCl, 6 mmol/L EDTA, 20 mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 0.5% NP40)缓冲液裂解细胞, 冰浴30 min, 4  $^{\circ}$ C下12 000 r/min离心20 min。取上清用BCA法定量蛋白浓度, 取等量的总蛋白加入适量6 $\times$ loading buffer, 100  $^{\circ}$ C变性5 min后迅速置于冰上, 上样, 10%的SDS-PAGE电泳分离条带, 电泳结束后转移到硝酸纤维素膜上, 用含5%牛奶的PBS和1% NaN<sub>3</sub>的封闭液室温封闭2 h, 加入封闭液稀释的一抗孵育过夜, PBST洗膜3次, PBS洗膜1次, 每次5 min, 加入封闭液稀释的相对应种属二抗(1:10 000)室温避光孵育60 min, PBST洗膜3次, PBS洗膜1次, 然后用Odyssey双色红外激光成像系统扫描仪扫描。

## 1.4 统计分析

所有的数量值均采用平均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )来表示, 小鼠巨噬细胞株Control RNAi和Rig-I RNAi以及pcDNA3.1和pcDNA3.1-Rig-I两组之间的差异采用 $t$ 检验。 $P < 0.05$ 为差异显著,  $P < 0.01$ 为差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 Rig-I基因促进巨噬细胞的增殖

为研究Rig-I基因对巨噬细胞增殖的影响, 成功构建Rig-I基因沉默的Raw264.7细胞。结果表明, Control RNAi(Si-ctrl)细胞中Rig-I的表达水平明显比



*Rig-I* RNAi(Si-*Rig-I*)细胞高(图1A)。采用不同浓度的LPS诱导Control RNAi和*Rig-I* RNAi细胞, CCK-8检测相应细胞增殖水平, 巨噬细胞被LPS激活且具有剂量依赖性, *Rig-I*基因沉默细胞增殖水平明显低于对照组细胞, 且*Rig-I*基因表达水平的降低增强了LPS对巨噬细胞增殖的抑制作用(图1B)。为进一步探讨*Rig-I*在巨噬细胞增殖中的作用, 成功构建*Rig-I*过表达的Raw264.7细胞(图1C)。同样的方法处理和检测Raw264.7/pcDNA3.1细胞和Raw264.7/pcDNA3.1-*Rig-I*细胞表明, *Rig-I*可促进巨噬细胞的增殖, 同时减弱LPS对巨噬细胞增殖的抑制作用(图1D)。

## 2.2 *Rig-I*基因抑制LPS诱导的巨噬细胞凋亡

为探讨*Rig-I*在LPS诱导的巨噬细胞凋亡中的作用, 用LPS处理Control RNAi和*Rig-I* RNAi细胞, 流式细胞术检测相应细胞Annexin V表达水平。结果表明, *Rig-I* RNAi细胞凋亡有明显的提高(图2A)。为进一步证明*Rig-I*在巨噬细胞凋亡中的作用, 同样的方法处理和检测Raw264.7/pcDNA3.1和Raw264.7/pcDNA3.1-*Rig-I*过表达的细胞, 同样发现过表达的

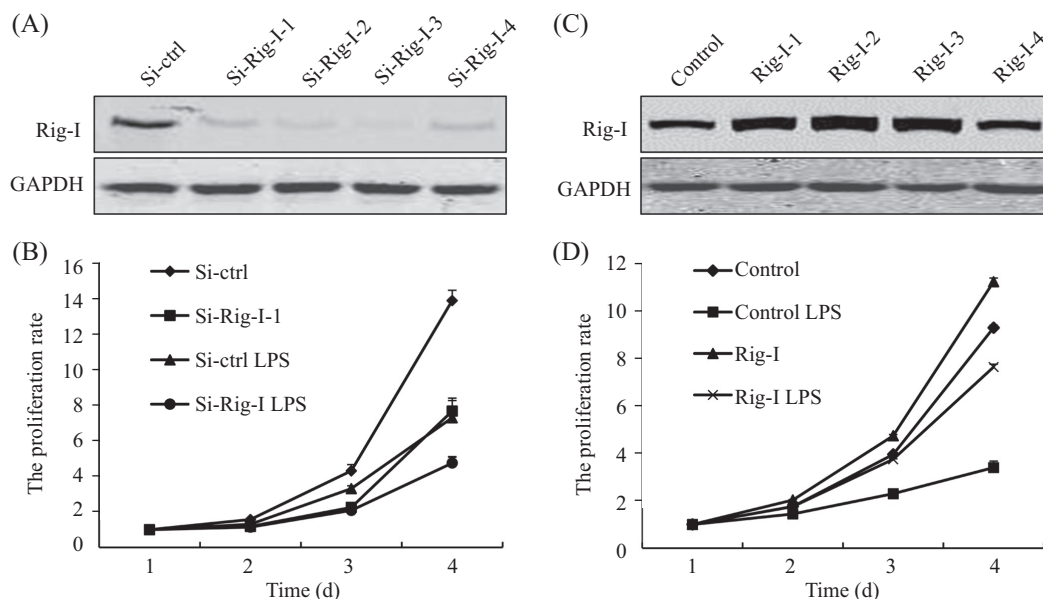
细胞凋亡明显减少(图2B)。以上数据说明, *Rig-I*基因抑制LPS诱导的巨噬细胞凋亡。

## 2.3 *Rig-I*基因促进LPS诱导的巨噬细胞细胞因子的表达

巨噬细胞在LPS诱导的情况下被激活, 分泌大量的细胞因子, 包括IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 和IL-10<sup>[14]</sup>。用不同浓度的LPS诱导Raw264.7/pcDNA3.1和Raw264.7/pcDNA3.1-*Rig-I*细胞, 通过RT-PCR方法检测细胞因子IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 和IL-10 mRNA的表达水平。结果表明, *Rig-I*基因过表达的细胞其细胞因子的表达水平更高, 对LPS的反应性更强, 且对其浓度具有剂量依赖性(图3)。

## 2.4 *Rig-I*基因促进LPS诱导的AKT磷酸化和下游NF- $\kappa$ B通路的激活

细胞凋亡或抗凋亡均是多样性、偶联性和多途径的信号转导过程, 在内外生存因子的刺激下, 细胞通过激活PI3K/AKT及其下游靶蛋白等多种信号偶联途径抑制凋亡<sup>[14-15]</sup>。上述实验显示, 在LPS的刺激下, 巨噬细胞的凋亡更加显著。为进一步研究*Rig-I*对LPS诱导的巨噬细胞增殖、凋亡和细胞因子

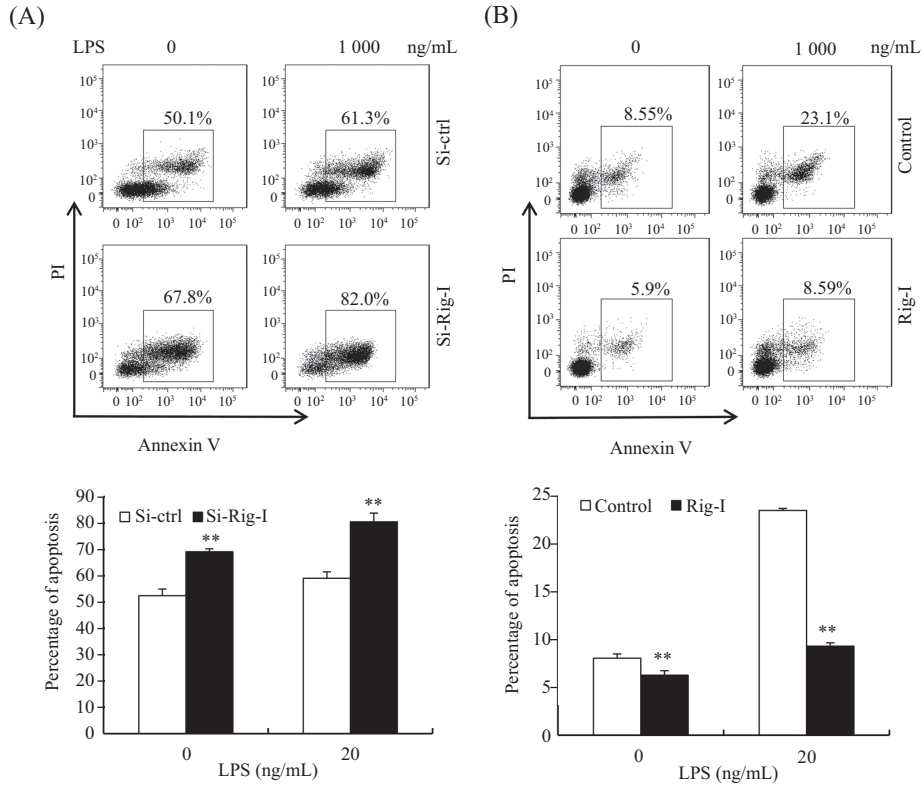


A: Raw264.7细胞经*Rig-I* siRNA病毒感染后, 采用Western blot鉴定4个单克隆(Si-*Rig-I*-1~4)细胞中*Rig-I*的表达; C: Raw264.7细胞电转*Rig-I*基因和pcDNA3.1质粒后, 采用Western blot鉴定4个单克隆(*Rig-I*-1~4)细胞中*Rig-I*的表达; B、D: *Rig-I*基因沉默和过表达的Raw264.7细胞经LPS (10 ng/mL)刺激, 分别于1, 2, 3, 4 d加入CCK-8并检测在450 nm处的吸光度值, 以第1 d为参照进行计算。

A: after Raw264.7 cells infected with *Rig-I* siRNA virus, the expression of *Rig-I* in Raw264.7 monoclonal cells (Si-*Rig-I*-1~4) was detected by Western blot; C: after electroporation was used to transfect *Rig-I* gene and pcDNA3.1 vector, the expressions of *Rig-I* in Raw264.7 monoclonal cells (*Rig-I*-1~4) were detected by Western blot; B,D: *Rig-I* gene knock-down and overexpression cells were treated with LPS (10 ng/mL), and the proliferation rate was detected by adding CCK-8 and the absorption was measured in 405 nm. Day 1 was settled as baseline.

图1 *Rig-I*促进巨噬细胞的增殖

Fig.1 *Rig-I* increased the proliferation of macrophages

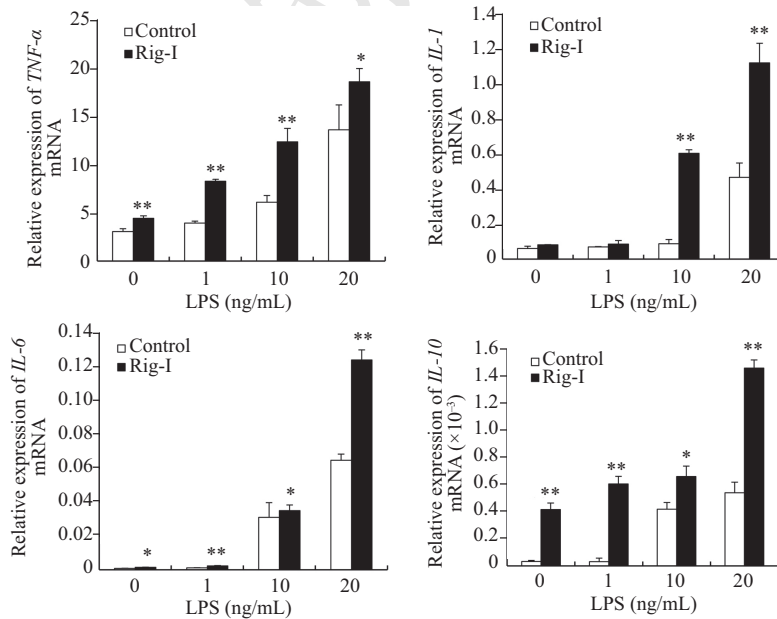


A、B: *Rig-I*基因沉默Raw264.7细胞control RNAi(Si-ctrl)和*Rig-I* RNAi(Si-Rig-I)与*Rig-I*过表达Raw264.7/pcDNA3.1(control)和Raw264.7/pcDNA3.1-*Rig-I*(*Rig-I*)细胞经LPS(1 μg/mL)刺激12 h后, 流式检测细胞的凋亡率。 \*\* $P < 0.01$ , 与对照组相比。

A,B: after treated with LPS (1 μg/mL) for 12 h, apoptosis of RNAi(Si-ctrl) and *Rig-I* RNAi (Si-Rig-I) or Raw264.7/pcDNA3.1 (control) and Raw264.7/pcDNA3.1-*Rig-I* (*Rig-I*) cells was detected by flow cytometry. \*\* $P < 0.01$  compared with control group.

图2 *Rig-I*基因抑制LPS诱导的巨噬细胞的凋亡

Fig.2 *Rig-I* inhibited the apoptosis of macrophages induced by LPS

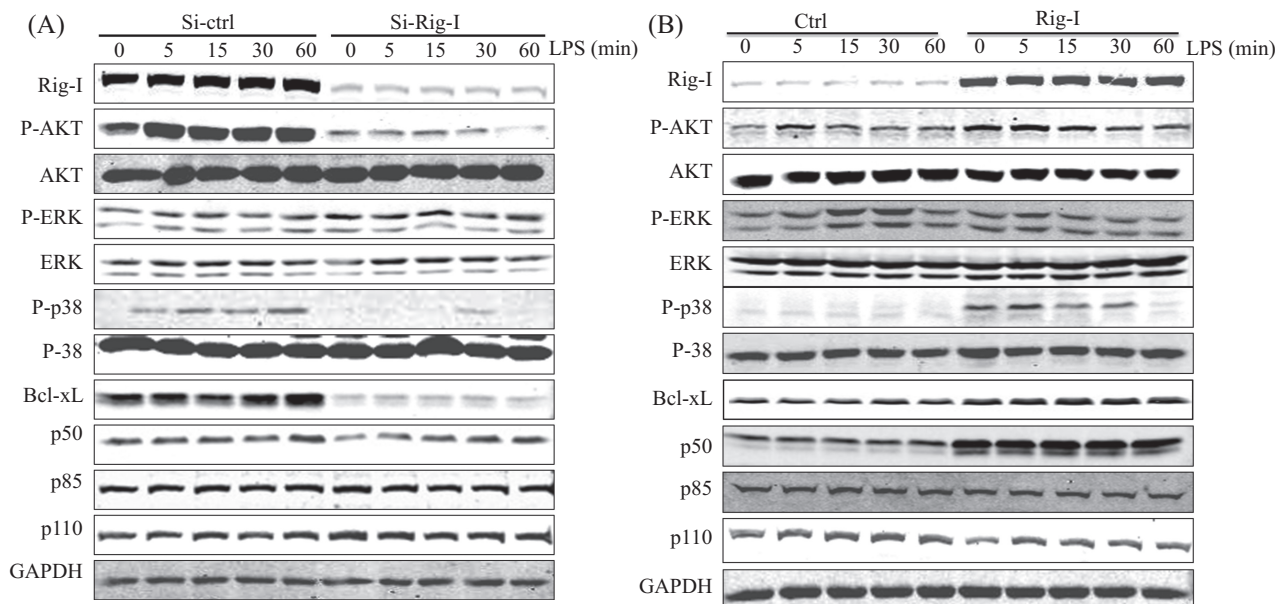


LPS刺激Raw264.7/pcDNA3.1(control)和Raw264.7/pcDNA3.1-*Rig-I*(*Rig-I*)细胞12 h后, 检测*IL-1*、*IL-6*、*TNF-α*和*IL-10* mRNA的表达水平。 \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与对照组相比。

The relative expressions of *IL-1*, *IL-6*, *TNF-α* and *IL-10* mRNA were determined by qPCR in Raw264.7/pcDNA3.1 (control) and Raw264.7/pcDNA3.1-*Rig-I* (*Rig-I*) cells after LPS treatment for 12 h. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with control group.

图3 *Rig-I*促进LPS诱导细胞因子的表达

Fig.3 *Rig-I* increased the expression of cytokines induced by LPS



A、B: Western blot分别检测LPS(20 ng/mL)处理不同时间后 control RNAi(Si-ctrl)和 *Rig-I* RNAi(Si-Rig-I)以及 Raw264.7/pcDNA3.1(control)和 Raw264.7/pcDNA3.1-*Rig-I*(*Rig-I*)细胞总蛋白中TLR4信号通路蛋白的磷酸化水平。

A,B: cell signaling of TLR4 in *Rig-I* knock-down (control RNAi and *Rig-I* RNAi) and overexpression (Raw264.7/pcDNA3.1 and Raw264.7/pcDNA3.1-*Rig-I*) cells were detected by Western blot with induction by LPS (20 ng/mL) for indicated time.

图4 Rig-I调节LPS诱导的巨噬细胞增殖、凋亡和细胞因子的释放

Fig.4 Rig-I regulated proliferation, apoptosis and cytokines secretion in LPS-induced macrophages

分泌生物学功能的机制,通过LPS刺激*Rig-I* RNAi Raw264.7细胞,用Western blot检测PI3K/AKT的磷酸化水平(图4A)。结果发现,在*Rig-I*沉默细胞中,LPS诱导磷酸化的AKT活性显著增强。进一步检测AKT下游信号蛋白P38、NF- $\kappa$ B1/p50和Bcl-xL的表达,结果证实,P-p38磷酸化水平增强以及NF- $\kappa$ B1/p50和Bcl-xL的蛋白水平明显升高。用同样的方法处理pcDNA3.1和pcDNA3.1/*Rig-I*过表达的细胞,同样的结果证明,在过表达的Raw264.7细胞中磷酸化的AKT、P-p38、NF- $\kappa$ B1/p50和Bcl-xL的活性显著增强(图4B)。LPS通过激活TLR4和下游的AKT以及NF- $\kappa$ B1/p50,促进巨噬细胞分泌大量的细胞因子,包括IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 和IL-10<sup>[14]</sup>。这些实验证明,*Rig-I*通过激活PI3K/AKT信号通路发挥抗凋亡作用和促进巨噬细胞的生存,同时增强下游蛋白NF- $\kappa$ B1/p50的表达,从而参与LPS诱导巨噬细胞细胞因子的表达过程。

### 3 讨论

在天然免疫系统中,宿主依赖TLRs和helicase家族成员抵抗病毒和细菌的感染<sup>[16]</sup>。而目前,大量的研究表明,helicase家族的Rig-I可以识别外源的

RNA,启动抗病毒天然免疫反应<sup>[1]</sup>;也可以通过调节GTP酶家族促进吞噬细胞的吞噬作用参与抗细菌免疫反应<sup>[12]</sup>。另有文献报道,革兰氏阴性菌的细胞壁成分(LPS)持续刺激机体单核巨噬细胞系统会被TLR4识别激活,使之产生大量的细胞因子,抵御细菌的感染<sup>[14]</sup>。巨噬细胞在天然免疫系统中发挥重要作用,但Rig-I对巨噬细胞的增殖、凋亡和细胞因子分泌等其他生物学功能的作用尚不清楚。本研究发现,*Rig-I*沉默的巨噬细胞在LPS刺激下增殖降低、凋亡增加以及细胞因子分泌减少。

LPS刺激巨噬细胞产生大量的活性氧、溶酶体酶、NO等生物活性物质,引起细胞损伤和凋亡<sup>[14]</sup>。本研究用高浓度的LPS刺激*Rig-I*基因沉默和过表达的细胞,结果*Rig-I*基因沉默后的细胞凋亡更加明显,证明Rig-I参与LPS诱导的巨噬细胞的凋亡过程。有文献报道,巨噬细胞在LPS的刺激下,激活TLR4并诱导下游的AKT在473位丝氨酸残基处磷酸化<sup>[17]</sup>。PI3K/AKT信号通路中磷酸化的AKT通过多种途径对靶蛋白进行磷酸化而发挥抗凋亡作用,AKT既可以通过激活核因子 $\kappa$ B的抑制蛋白(inhibitor of NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B)激酶(inhibitor of nuclear factor  $\kappa$ B kinase  $\alpha$ , IKK $\alpha$ ),导致NF- $\kappa$ B抑制剂I $\kappa$ B的降解,从而使NF- $\kappa$ B

从细胞质中释放出来进行核转位, 激活其靶基因而促进细胞的存活, 也可以通过磷酸化Bcl-2家族成员Bad, 导致Bad与Bcl-xL解聚, 从而使游离的Bcl-xL发挥抗凋亡作用<sup>[14-15]</sup>。Western blot结果显示, Rig-I通过促进AKT活化从而促进下游NF- $\kappa$ B/p50和抗凋亡蛋白Bcl-xL的表达, 这证明Rig-I通过参与调控PI3K/AKT信号通路发挥抗凋亡作用, 促进巨噬细胞的生存。

LPS是炎症反应的激活剂, 激活巨噬细胞产生大量的因子如TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6和IL-10。适量的细胞因子能够有效抵御感染和修复损伤的组织, 但是分泌过量的炎性因子会导致严重的系统性并发症<sup>[18-19]</sup>。LPS识别TLR4, 激活AKT和下游的NF- $\kappa$ B/p50后促进细胞因子的表达<sup>[20]</sup>。qPCR的结果显示, Rig-I过表达的细胞对LPS诱导的细胞因子表达效果更明显, 说明Rig-I能够增强巨噬细胞抵御细菌的能力。这些细胞因子的表达主要是由于巨噬细胞经过LPS刺激, 胞质内与NF- $\kappa$ B结合的抑制分子I $\kappa$ B $\alpha$ 发生磷酸化, 致使NF- $\kappa$ B由细胞质转到细胞核内与启动子结合, 诱导细胞因子表达<sup>[18]</sup>。本研究结果表明, Rig-I可以通过上调NF- $\kappa$ B1的表达调节细胞因子的分泌, 在天然免疫中发挥作用。

综上所述, Rig-I可以通过促进AKT的磷酸化及其下游信号通路的活化, 抑制LPS诱导的巨噬细胞凋亡、促进细胞增殖和增加细胞因子分泌来增加宿主抵御细菌感染的的能力。这有助于更加深入地了解Rig-I基因在宿主天然免疫反应中的生物学功能, 并为认识和治疗相关疾病提供新的理论基础和研究思路。

### 参考文献 (References)

- Dixit E, Kagan JC. Intracellular pathogen detection by RIG-I-like receptors. *Adv Immunol* 2013; 117: 99-125.
- Cui S, Eisenacher K, Kirchhofer A, Brzozka K, Lammens A, Lammens K, *et al.* The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I. *Mol Cell* 2008; 29(2): 169-79.
- Takahashi K, Yoneyama M, Nishihori T, Hirai R, Kumeta H, Narita R, *et al.* Nonself RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses. *Mol Cell* 2008; 29(4): 428-40.
- Civril F, Bennett M, Moldt M, Deimling T, Witte G, Schiesser S, *et al.* The RIG-I ATPase domain structure reveals insights into ATP-dependent antiviral signalling. *EMBO Rep* 2011; 12(11): 1127-34.
- Saito T, Owen DM, Jiang F, Marcotrigiano J, Gale M Jr. Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature* 2008; 454(7203): 523-7.
- Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF- $\kappa$ B and IRF 3. *Cell* 2005; 122(5): 669-82.
- Leung DW, Amarasinghe GK. Structural insights into RNA recognition and activation of RIG-I-like receptors. *Curr Opin Struct Biol* 2012; 22(3): 297-303.
- Wang Y, Ludwig J, Schubert C, Goldeck M, Schlee M, Li H, *et al.* Structural and functional insights into 5'-ppp RNA pattern recognition by the innate immune receptor RIG-I. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17(7): 781-7.
- Wang Y, Zhang HX, Sun YP, Liu ZX, Liu XS, Wang L, *et al.* RIG-I<sup>-/-</sup> mice develop colitis associated with downregulation of G alpha i2. *Cell Res* 2007; 17(10): 858-68.
- Zhang NN, Shen SH, Jiang LJ, Zhang W, Zhang HX, Sun YP, *et al.* RIG-I plays a critical role in negatively regulating granulocytic proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(30): 10553-8.
- Zhang HX, Liu ZX, Sun YP, Zhu J, Lu SY, Liu XS, *et al.* RIG-I regulates NF- $\kappa$ B activity through binding to Nf-kappab1 3'-UTR mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(16): 6459-64.
- Kong L, Sun L, Zhang H, Liu Q, Liu Y, Qin L, *et al.* An essential role for RIG-I in toll-like receptor-stimulated phagocytosis. *Cell Host Microbe* 2009; 6(2): 150-61.
- Akira S and Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(7): 499-511.
- Meng F, Lowell CA. Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn. *J Exp Med* 1997; 185(9): 1661-70.
- Beutler B, Krays V. Lipopolysaccharide signal transduction, regulation of tumor necrosis factor biosynthesis, and signaling by tumor necrosis factor itself. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 25 Suppl 2: S1-8.
- Hargreaves DC, Medzhitov R. Innate sensors of microbial infection. *J Clin Immunol* 2005; 25(6): 503-10.
- Laird MH, Rhee SH, Perkins DJ, Medvedev AE, Piao W, Fenton MJ, *et al.* TLR4/MyD88/PI3K interactions regulate TLR4 signaling. *J Leukoc Biol* 2009; 85(6): 966-77.
- Muroi M, Muroi Y, Yamamoto K, Suzuki T. Influence of 3' half-site sequence of NF- $\kappa$ B motifs on the binding of lipopolysaccharide-activatable macrophage NF- $\kappa$ B proteins. *J Biol Chem* 1993; 268(26): 19534-9.
- Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: Roles of the receptor complex. *Pharmacol Ther* 2003; 100(2): 171-94.
- Becker S, Mundandhara S, Devlin RB, Madden M. Regulation of cytokine production in human alveolar macrophages and airway epithelial cells in response to ambient air pollution particles: Further mechanistic studie. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 207(2 Suppl): 269-75.