

## 研究简报

## 双载蛋白对果蝇S2细胞吞噬大肠杆菌的影响

孙保贞 朱 斐\*

(浙江农林大学动物科技学院, 杭州 311300)

**摘要** 该文研究了双载蛋白(amphiphysin, Amph)对果蝇S2细胞吞噬大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)的影响。在S2细胞吞入*E. coli*后, *Amph* mRNA的表达水平明显升高; 但用Amph-siRNA处理后的S2细胞, 其Amph蛋白质水平显著低于正常和吞噬*E. coli*的S2细胞。透射电镜观察发现, S2细胞可以吞噬热灭活的*E. coli*, 且细胞内存在典型的吞噬小体, 而用Amph-siRNA处理的S2细胞内则未发现吞噬小体, 说明Amph可能对吞噬体形成起关键作用。Amph-siRNA处理的S2细胞对*E. coli*的吞噬率显著低于未用Amph-siRNA处理的S2细胞, 说明敲低Amph会显著地抑制S2细胞对*E. coli*的吞噬率。上述结果表明, Amph在果蝇S2细胞吞噬*E. coli*的过程中起重要的调节作用。

**关键词** 双载蛋白; 果蝇; S2细胞; 吞噬; 大肠杆菌

## The Effect of Amphiphysin on the Phagocytosis of *Escherichia coli* by *Drosophila* S2 Cells

Sun Baozhen, Zhu Fei\*

(College of Animal Science and Technology, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Hangzhou 311300, China)

**Abstract** The effect of amphiphysin (Amph) on the phagocytosis of *Escherichia coli* (*E. coli*) by *Drosophila* S2 cells was studied in this paper. The observation under electron microscopy showed that heat-inactivated *E. coli* was phagocytosed by S2 cells, and there were typical phagocytic bodies in the S2 cells. The phagocytic bodies were not found in the S2 cells treated with Amph-siRNA. After S2 cells phagocytosed *E. coli*, the mRNA level of *Amph* gene was significantly increased. However, the protein level of Amph in Amph-siRNA S2 cells was significantly lower than that of normal S2 cells and S2 cells which phagocytosed *E. coli*. These results indicated that Amph plays an important role in the process of phagocytosis of *E. coli* in *Drosophila* S2 cells.

**Keywords** amphiphysin; *Drosophila*; S2 cells; phagocytosis; *Escherichia coli*

吞噬过程在多细胞生物免疫反应中是一个关键而高度保守的过程, 宿主通过特异性吞噬细胞快速吞噬病原体或凋亡细胞<sup>[1]</sup>。在吞噬过程中, 胞外粒子被识别并结合到细胞表面, 细胞膜内化成吞噬体, 吞没周围的细胞器形成材料<sup>[2-3]</sup>。在研究宿主细胞的先天免疫反应方面, 果蝇S2细胞作为一个很好的模

型被广泛应用<sup>[4-6]</sup>。

双载蛋白(amphiphysin, Amph)与网格蛋白(clathrin)介导的内吞作用有关, 被认为是一类能与抗原分子上相应表位发生特异性结合的具有免疫功能的球蛋白, 可以通过SH3结构域与发动蛋白(dynamin)相互作用<sup>[7-8]</sup>。Amph的SH3结构域在内

收稿日期: 2016-09-18 接受日期: 2016-11-22

国家自然科学基金(批准号: 31370050)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0571-88981127, E-mail: zhufei@zju.edu.cn

Received: September 18, 2016 Accepted: November 22, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31370050)

\*Corresponding author. Tel: +86-571-88981127, E-mail: zhufei@zju.edu.cn

网络出版时间: 2016-12-29 15:23:21

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161229.1523.002.html>

吞作用中是发动蛋白多聚化循环的重要调节器<sup>[8]</sup>。Amph在大脑、肾上腺、垂体前、后叶中均有表达,但在其他组织中并没有发现表达<sup>[9]</sup>。Amph高度集中在神经末梢,在突触小泡的内吞中,被认为是网格蛋白和发动蛋白的连接体<sup>[10]</sup>。在细胞质膜上,网格蛋白介导的内吞是突触小泡在神经元上重复利用的一个主要途径<sup>[11]</sup>。Amph在体外可通过SH3结构域与鸟苷三磷酸酶相互作用,而在活细胞中显性抑制该蛋白的SH3结构域可以有效地阻碍网格蛋白介导的内吞作用<sup>[11]</sup>。Amph是一类脑浓缩蛋白,在突触小泡的内吞中被认为是网格蛋白和发动蛋白的连接体<sup>[13]</sup>。Amph在类肿瘤性僵人综合征病人中,是一类主要的自身抗原物质<sup>[9]</sup>。患乳腺癌伴僵人综合征的患者自身抗体(glutamic acid decarboxylase antibody, GAD-Ab)呈阴性,但Amph呈阳性,这一发现对于研究乳腺癌伴僵人综合征的发病机制至关重要<sup>[14]</sup>。Amph1对于吞噬作用是十分重要的,尤其是它会参与肌动蛋白(actin)的聚合过程<sup>[15]</sup>。Amph2参与受体介导的内吞作用,通过招募GTPase(guanosine triphosphatase)给新生的内吞体,这对于巨噬细胞内吞体的形成至关重要<sup>[16]</sup>。

关于Amph对于细胞吞噬细菌时所发挥的作用则较少被研究和报道<sup>[17]</sup>。已有研究发现,Amph参与了果蝇S2细胞吞噬病毒的过程,是完成细胞吞噬过程的关键蛋白质之一<sup>[17-18]</sup>。本研究旨在揭示Amph对巨噬细胞吞噬细菌作用的影响。

本实验所使用的大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)DH5 $\alpha$ 由本实验室保藏。果蝇S2细胞株购自Invitrogen公司。Rhodamine-Phalloidin、DAPI和FITC均购自Invitrogen公司。

本实验采用siRNA体外转录试剂盒(*In vitro* Transcription T7 Kit for siRNA Synthesis TaKaRa)合成Amph-siRNA。siRNA序列如下: scramble-siRNA: 5'-GCG CAA AGA UGA UGU CAA ATT UUU GAC AUC AUC UUU GCG CTT-3'; Amph-siRNA: 5'-GCA GAA GAA ACU AGG UAA UTT AUU ACC UAG UUU CUU CUG CTT-3'。

本实验采用荧光染色,大肠杆菌在热灭活后用FITC标记,按5:1比例将标记过的细菌与S2细胞于27 °C温浴1 h。取100  $\mu$ L滴在多聚赖氨酸处理过的载玻片上,室温吸附30 min。用PBS轻轻洗去未被S2细胞吞噬的细菌和多余的染料。用台盼蓝(1 mg/mL)

处理20 min以淬灭游离的细菌上的荧光,再用PBS洗3遍。加入含5  $\mu$ L Rhodamine-Phalloidin的PBS 150  $\mu$ L,染色30 min,用PBS洗3遍。加入DAPI(4,6-二脒基-2-苯基吡啶)染色15 min后,再用PBS洗3遍。加封片剂封片,室温水平放置约1 h。用激光共聚焦显微镜进行观察并拍摄图像。

本实验采用细胞吞噬试验评价细胞吞噬能力,首先培养S2细胞,将6孔板铺满,实验开始前5 h加入siRNA,实验开始加入灭活的细菌,轻轻混匀,放入培养箱继续培养1 h后取出,用1%多聚甲醛固定后用流式细胞仪检测; 3 000  $\times$ g离心收集细胞,戊二醛固定后进行电镜制片,用透射电镜观察并拍摄图像。

本实验采用RT-qPCR检测Amph的mRNA水平。根据分子信标原理设计分子探针及两端引物,并以Rp49(ribosomal protein 49)作为对照。引物如下: Amph-F: 5'-GGT CTG AAT GCG AGT GCC AAG-3', Amph-R: 5'-TGC TCC CTC AGT TTC CGA TGG-3', Amph探针: FAM-CAA CCA CAA CCA CGC AGA CAT CGC C-Eclipse; Rp49-F: 5'-CCG CTT CAA GGG ACA GTA TCT G-3', Rp49-R: 5'-CAC GTT GTG CAC CAG GAA CTT-3', Rp49探针: FAM-GGC AGC ATG TGG CGG GTG CGC TT-Eclipse。首先,培养S2细胞,将6孔板铺满,实验开始前5 h加入siRNA,实验开始按5:1比例加入灭活的细菌到培养皿中,轻轻混匀,放入培养箱继续培养。培养1 h后取出,收集细胞并提取细胞的总RNA,逆转录合成cDNA。在离心管中依次加入两端引物(10  $\mu$ mol/L)各1  $\mu$ L、探针2  $\mu$ L(10  $\mu$ mol/L)、10 $\times$ PCR buffer 2.5  $\mu$ L、dNTP(2.5  $\mu$ mol/L)各4  $\mu$ L、Ex Taq酶1  $\mu$ L、cDNA模板1  $\mu$ L,加灭菌水补足至25  $\mu$ L。RT-qPCR反应条件: 50 °C预热2 min; 95 °C 45 s, 52 °C 45 s, 72 °C 45 s, 45个循环。

本实验采用Western blot检测Amph蛋白质水平。在4 °C条件下,加入裂解液提取果蝇S2细胞中的蛋白质,用BCA Protein Assay Kit测定样品蛋白质含量。每个样本取50  $\mu$ g蛋白质进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳并转至PVDF膜上,用含5%脱脂奶粉的TBST溶液室温封闭1 h,加入1:200稀释倍数的Amph兔多克隆抗体于4 °C孵育过夜, TBST漂洗3次,每次10 min,加入二抗,室温孵育1 h后, TBST漂洗3次,每次10 min,用Bio-Rad凝胶成像系统进行扫描成像。

应用统计学原理来分析实验数据, 定量数据用  $\text{mean} \pm \text{S.D.}$  表示, 3个独立的实验所得数据用单向方差分析法计算均值和标准差, 各组之间的统计学差异分析选用方差分析(One-Way ANOVA)。显著性差异用SPSS 19软件进行分析。 $P < 0.01$ 为极显著性差异。

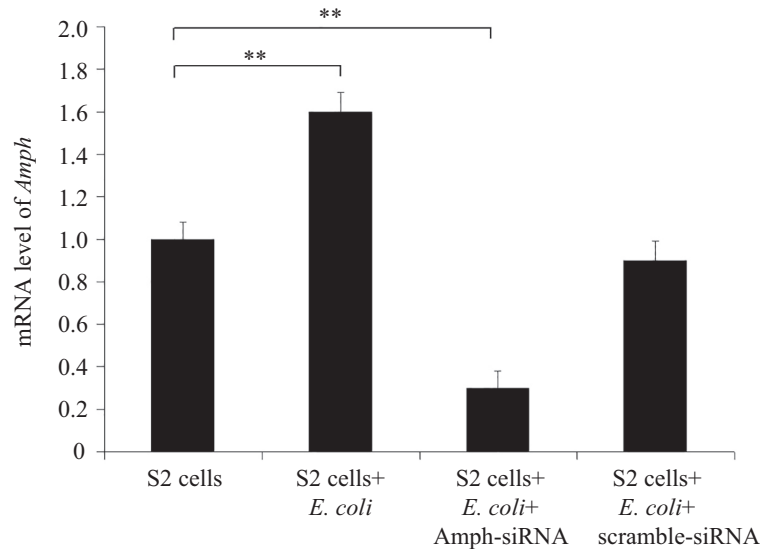
## 双载蛋白在果蝇S2细胞吞噬大肠杆菌中表达上调

用 siRNA 处理果蝇 S2 细胞后, 通过荧光定量 PCR 检测果蝇 S2 细胞 *Amph* mRNA 水平(图1)。结果显示, S2 细胞吞入 *E. coli* 后, *Amph* mRNA 水平明显升高; 但是用 *Amph*-siRNA 处理过后的 S2 细胞 *Amph* mRNA 水平显著低于正常和吞噬 *E. coli* 的 S2 细胞

( $P < 0.01$ )。而 scramble-siRNA 处理的 S2 细胞的 *Amph* mRNA 水平与正常细胞吞噬 *E. coli* 相比没有显著差异。果蝇 S2 细胞在加入灭活的 *E. coli* 1 h 后, 通过 Western blot 检测果蝇 S2 细胞中 *Amph* 蛋白质水平。结果发现, S2 细胞在加入 *E. coli* 后, *Amph* 蛋白质水平明显升高(图2)。*Amph* 在很多研究中被证实与网格蛋白介导的内吞作用有关<sup>[10-11]</sup>。本研究发现, 在加入热灭活 *E. coli* 后, 果蝇 S2 细胞的 *Amph* 在转录与翻译水平都显著上升, 这与之前研究中的结果相似<sup>[18]</sup>。

## 敲低双载蛋白表达可阻断S2细胞吞噬大肠杆菌

siRNA 处理的果蝇 S2 细胞在加入灭活的 *E. coli* 1 h 后, 通过 Western blot 检测果蝇 S2 细胞中 *Amph* 蛋



\*\* $P < 0.01$ .

图1 荧光定量检测果蝇S2细胞*Amph* mRNA水平

Fig.1 The mRNA level profile analysis of *Amph* from *Drosophila* S2 cells analyzed by RT-qPCR

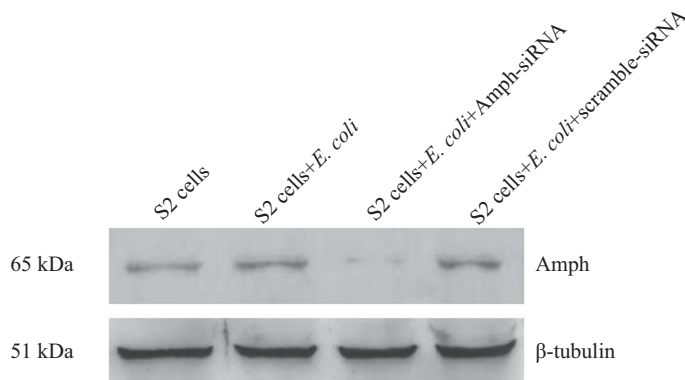


图2 Western blot检测果蝇S2细胞*Amph*蛋白质水平

Fig.2 Protein level of *Amph* detected by Western blot in *Drosophila* S2 cells

白质水平(图2)。结果发现, 在S2细胞加入*E. coli*后, *Amph*水平明显升高; 但是用*Amph*-siRNA处理过后的S2细胞*Amph*水平显著低于正常和吞噬*E. coli*的S2细胞; 而scramble-siRNA处理过的S2细胞的*Amph*水平与正常细胞吞噬*E. coli*相比没有显著差异。将果蝇S2细胞的*Amph*基因表达敲低, 由于siRNA介导的是在转录后mRNA水平上关闭目的基因表达的序列特异性基因沉默机制, 所以mRNA水平的降低是在转录水平的抑制。

用siRNA处理后的S2细胞吞噬热灭活的大肠杆菌*E. coli* 1 h后进行透射电镜观察(图3)。镜下可以观察到细胞内有典型的吞噬体, 内有杆状的菌体。*Amph*-siRNA处理过的S2细胞未见明显的吞噬体。加入scramble-siRNA组的细胞与正常细胞吞噬结果没有明显的差异。有研究发现, 细胞基底外侧早期内体的再利用需要GTPase Rab-10和BAR(Bin-*Amph*-Rvs)结构域蛋白 *Amph*结合到TBC-2(tulip bulb chitinase-2), 并帮助招募RAB-5(Ras-related

protein-5)、GAP(GTPase activating protein)和TBC-2到内吞体<sup>[19]</sup>。这说明, *Amph*在吞噬过程的中期就开始发挥重要的作用, 并对吞噬体的形成起关键作用。

分别用不同siRNA处理过的S2细胞分别加入FITC标记的*E. coli*, 在细胞吞噬1 h后检测。结果显示, 用*Amph*-siRNA处理的S2细胞吞噬率极显著低于未用*Amph*-siRNA处理的S2细胞( $P < 0.01$ ); 用scramble-siRNA处理的S2细胞吞噬*E. coli*效果与未用*Amph*-siRNA处理的S2细胞相比差异并不显著(图4)。结果说明, 敲低*Amph*会显著地抑制S2细胞对*E. coli*的吞噬率。

将S2细胞加入FITC标记的*E. coli*进行染色后用荧光共聚焦显微镜观察。结果发现, S2细胞内有FITC标记的大肠杆菌; 但是*Amph*-siRNA处理的S2细胞内则观察不到FITC标记的大肠杆菌, 仅有极少数大肠杆菌附着在细胞表面(图5)。scramble-siRNA处理过的S2细胞内有FITC标记的大肠杆菌, 与正常S2细胞相比无明显差异。敲低

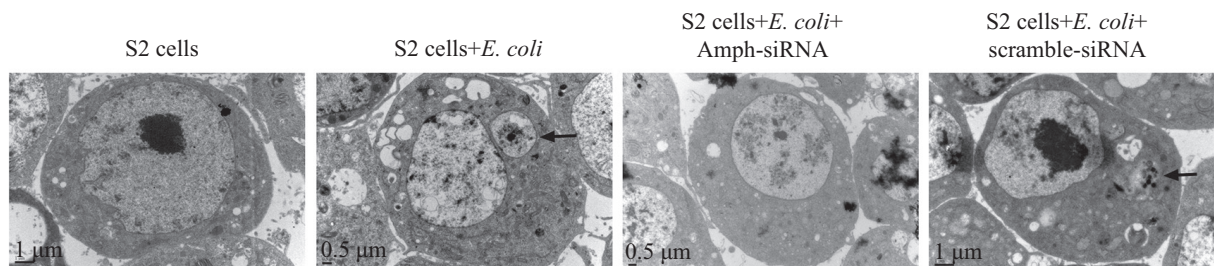
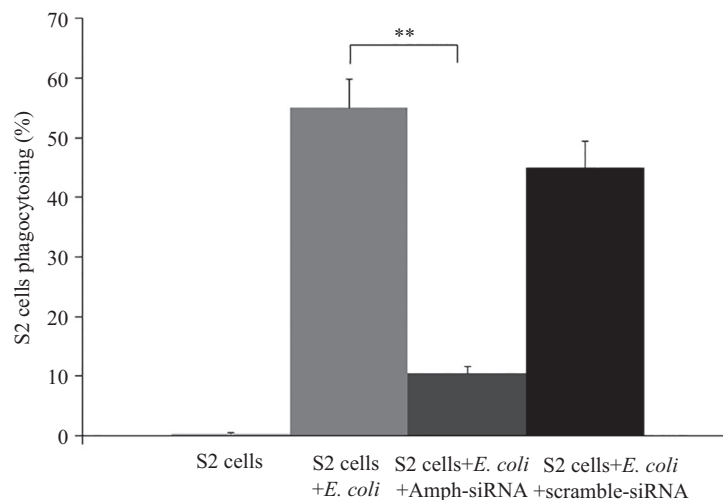


图3 果蝇S2细胞吞噬热灭活*E. coli*的电镜观察

Fig.3 The transmission electron microscopy of phagocytosis of heat-inactivated *E. coli* in S2 cells



\*\* $P < 0.01$ .

图4 S2细胞吞噬*E. coli*的流式细胞术检测

Fig.4 Quantification of phagocytosis of *E. coli* by S2 cells by FACS

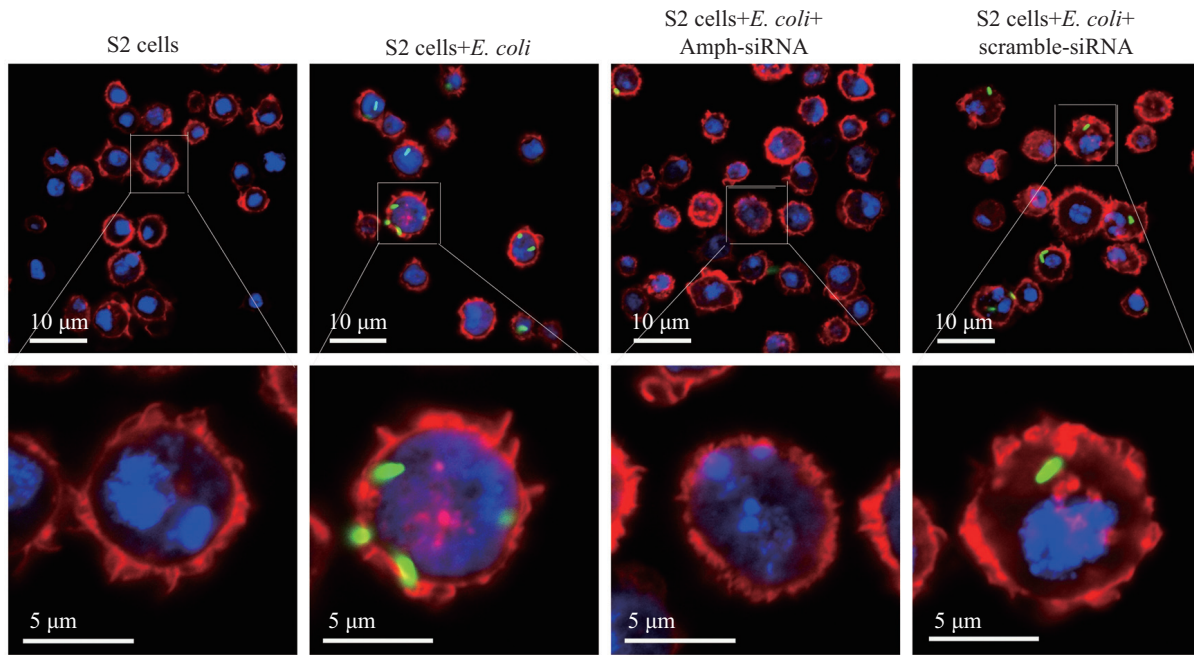


图5 果蝇S2细胞吞噬*E. coli*的共聚焦显微镜观察

Fig.5 Confocal microscopy of phagocytosis of *E. coli* by *Drosophila* S2 cells

*Amph*基因表达后, S2细胞对热灭活*E. coli*的吞噬率明显降低, 且胞内观察不到明显的绿色荧光粒子, 透视电镜结果胞内观察不到典型的吞噬小体, 说明下调*Amph*会抑制S2细胞的吞噬作用。研究发现, *Amph*通过调控肌动蛋白(actin)的聚合过程来调节细胞吞噬作用<sup>[15]</sup>。*Amph1*能和发动蛋白dynamins共同协作, 在支持细胞内的磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)依赖的吞噬过程中起重要作用<sup>[20]</sup>。综上所述, *Amph*对果蝇S2细胞的吞噬作用起重要的调节作用, 是完整的吞噬过程必不可少的因子。

致谢——

感谢浙江大学电子显微镜中心的帮助。

### 参考文献 (References)

- 1 Stuart LM, Ezekowitz RL. Phagocytosis: Elegant complexity. *Immunity* 2005; 22(5): 539-50.
- 2 Underhill DM, Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: Complexity in action. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 825-52.
- 3 Stuart LM, Ezekowitz RL. Phagocytosis and comparative innate immunity: Learning on the fly. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(2): 131-41.
- 4 Hoffmann JA, Reichhart JM. *Drosophila* innate immunity: An evolutionary perspective. *Nat Immunol* 2002; 3(2): 121-6.
- 5 Cheng LW, Viala JPM, Stuurman N, Wiedemann U, Vale RD, Portnoy DA. Use of RNA interference in *Drosophila* S2 cells to identify host pathways controlling compartmentalization of an intracellular pathogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(38): 13646-51.
- 6 Elwell C, Engel JN. *Drosophila melanogaster* S2 cells: A model system to study *Chlamydia* interaction with host cells. *Cell Microbiol* 2005; 7(5): 725-39.
- 7 Lichte B, Veh RW, Meyer HE, Kilimann MW. Amphiphysin, a novel protein associated with synaptic vesicles. *EMBO J* 1992; 11(7): 2521-30.
- 8 Owen DJ, Wigge P, Vallis Y, Moore JDA, Evans PR, McMahon HT. Crystal structure of the amphiphysin-2 SH3 domain and its role in the prevention of dynamin ring formation. *EMBO J* 1998; 17(18): 5273-85.
- 9 Su J, Chow B, Boulianne GL, Wilde A. The BAR domain of amphiphysin is required for cleavage furrow tip-tubule formation during cellularization in *Drosophila* embryos. *Mol Biol Cell* 2013; 24(9): 1444-53.
- 10 Takei K, Slepnev VI, Haucke V, De Camilli P. Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin mediated endocytosis. *Nat Cell Biol* 1999; 1(1): 33-9.
- 11 McMahon HT, Wigge P, Smith C. Clathrin interacts specifically with amphiphysin and is displaced by dynamin. *FEBS Lett* 1997; 413(2): 319-22.
- 12 David C, McPherson PS, Mundigl O, de Camilli P. A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(1): 331-5.
- 13 Wigge P, McMahon HT. The amphiphysin family of proteins and their role in endocytosis at the synapse. *Trends Neurosci* 1998; 21(8): 339-44.
- 14 Razaqa A, Robinson IM, McMahon HT, Skepper JN, Su Y, Zehlf AC, et al. Amphiphysin is necessary for organization of the excitation-contraction coupling machinery of muscles, but

- not for synaptic vesicle endocytosis in *Drosophila*. *Genes Dev* 2001; 15(22): 2967-79.
- 15 Yamada H, Ohashi E, Abe T, Kusumi N, Li SA, Yoshida Y, *et al*. Amphiphysin 1 is important for actin polymerization during phagocytosis. *Mol Biol Cell* 2007; 18(11): 4669-80.
- 16 Gold ES, Morrisette NS, Underhill DM, Guo J, Bassetti M, Aderem A. Amphiphysin II $\alpha$ , a novel amphiphysin II isoform, is required for macrophage phagocytosis. *Immunity* 2000; 12(3): 285-92.
- 17 Zhu F, Zhang XB. The Wnt signaling pathway is involved in the regulation of phagocytosis of virus in *Drosophila*. *Sci Rep* 2013; 3: 2069.
- 18 Zhu F, Ding HJ, Zhu BN. Transcriptional profiling of *Drosophila* S2 cells in early response to *Drosophila C* virus. *Virology* 2013; 10: 210.
- 19 Liu O, Grant BD. Basolateral endocytic recycling requires RAB-10 and AMPH-1 mediated recruitment of RAB-5 GAP TBC-2 to endosomes. *PLoS Genet* 2015; 11(9): e1005514.
- 20 Nakanishi A, Abe T, Watanabe M, Takei K, Yamada H. Dynamin 2 cooperates with amphiphysin 1 in phagocytosis in sertoli cells. *Acta Med Okayama* 2008; 62(6): 385-91.