

# 肌动蛋白解聚对巨噬细胞TLRs的表达及细胞凋亡的影响

贺静荣 陈全\* 吴蕊鑫 刘佳霖 王毅 刘革力 张路渝  
(重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心, 基础医学院免疫学教研室, 重庆 400016)

**摘要** 在肺癌等的癌细胞中, 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)等致炎因子介导的促瘤效应涉及Toll样受体(Toll like receptors, TLRs)/纤维型肌动蛋白(fibrous actin, F-actin)通路。本研究探讨了外源性松胞菌素D(cytochalasin D, cytD)和细胞内源过表达的重组肌动蛋白解聚因子丝切蛋白(Cofilin-1)所诱导的肌动蛋白解聚对巨噬细胞TLR2、TLR4和TLR9的表达和细胞凋亡水平的影响。分别用6种不同浓度的cytD处理RAW264.7小鼠巨噬细胞48 h, 用Western blot检测6组细胞TLR2、TLR4、TLR9的表达水平。构建重组pEGFP-N1-Cofilin-1质粒并转染RAW264.7细胞, 设置空质粒对照和空白细胞对照组。用Real-time PCR法和Western blot检测细胞转染前后Cofilin-1表达水平; Western blot检测巨噬细胞TLR2、TLR4、TLR9的表达情况; 用流式细胞术检测3组细胞的凋亡水平。结果显示, 终浓度 $\geq 1.5 \mu\text{mol/L}$ 的cytD处理细胞后, RAW264.7细胞表达TLR2明显降低( $P < 0.05$ ); 终浓度 $\geq 1.0 \mu\text{mol/L}$ 的cytD处理细胞后, 巨噬细胞表达TLR4、TLR9明显降低( $P < 0.05$ )。重组质粒转染组细胞的*cofilin-1* mRNA及Cofilin-1蛋白水平均高于空质粒对照组和空白细胞对照组( $P < 0.05$ ), 且其TLR2、TLR4、TLR9蛋白表达水平和细胞凋亡水平均显著低于空质粒对照组和空白细胞对照组( $P < 0.05$ )。结果表明, 外源性cytD和巨噬细胞内源性高表达的Cofilin-1蛋白均可下调巨噬细胞TLR2、TLR4、TLR9的表达, 其中, 细胞高表达的Cofilin-1蛋白还显著降低了细胞凋亡率。该文通过揭示肌动蛋白解聚对巨噬细胞TLRs的表达及细胞凋亡的抑制, 为进一步研究炎症与肿瘤的关系及分子机制奠定了基础。

**关键词** 巨噬细胞; F-actin; Cofilin-1; TLRs; 凋亡

## Effects of Actin Depolymerization on TLRs Expression and Apoptosis in Macrophages

He Jingrong, Chen Quan\*, Wu Ruixin, Liu Jialin, Wang Yi, Liu Geli, Zhang Luyu  
(Molecular Medicine and Cancer Research Centre, Department of Immunology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** In lung cancer and other tumor cells, the tumor-promoting effect mediated by lipopolysaccharide (LPS) involves the TLRs/F-actin pathway. This study investigated the effect of actin depolymerization induced by exogenous cytochalasin D and over-expressed recombinant Cofilin-1 in cells on the expression of TLR2, TLR4 and

收稿日期: 2018-08-01 接受日期: 2018-09-30

重庆市渝中区科技计划项目(批准号: 20130139)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-68485248, E-mail: chenquan@cqmu.edu.cn

Received: August 1, 2018 Accepted: September 30, 2018

This work was supported by Science and Technology Project of Chongqing Yuzhong District (Grant No.20130139)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-68485248, E-mail: chenquan@cqmu.edu.cn

网络出版时间: 2018-11-29 14:38:46

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20181129.1438.014.html>

TLR9 and the apoptosis level in macrophages. After the RAW264.7 cells were treated with 6 different concentrations of cytD for 48 h, the expression levels of TLR2, TLR4 and TLR9 in each group were detected by Western blot respectively. The pEGFP-N1-Cofilin-1 recombinant plasmids were constructed and then transfected into RAW264.7 cells, and the blank plasmid control group and the blank cell control group were set up. The mRNA and protein expression level of Cofilin-1 were detected by Real-time PCR and Western blot respectively. The TLRs expression level were detected by Western blot, and the cell apoptosis level of the three groups was detected by flow cytometry. The results showed that the expression of TLR2 in RAW264.7 cells significantly decreased after cytD treatment with a concentration no less than 1.5  $\mu\text{mol/L}$  and the expression of TLR4 and TLR9 was significantly decreased after cytD treatment with a concentration no less than 1.0  $\mu\text{mol/L}$  ( $P < 0.05$ ). The level of *cofilin-1* mRNA and Cofilin-1 protein in the cells transfected with recombinant plasmid were higher than that in the negative control group and blank control group ( $P < 0.05$ ), and the protein level of TLR2, TLR4, TLR9 and the apoptosis level in the cells transfected with recombinant plasmid were significantly lower than those in the control groups ( $P < 0.05$ ). Above all, cytD could reduce the expression of TLR2, TLR4 and TLR9 in macrophages. *cofilin-1* mRNA and Cofilin-1 protein expression in macrophage transfected with the recombinant plasmid significantly increased. High expression of Cofilin-1 protein inhibited the expression of TLR2, TLR4 and TLR9 in macrophages, and reduced apoptosis rate. All results showed that the exogenous cytD and the endogenous over-expression of Cofilin-1 protein both could down regulate the expression of TLR2, TLR4 and TLR9 in macrophages, and the over-expression of Cofilin-1 protein also significantly reduced the apoptosis rate. The inhibition effect of actin depolymerization on TLRs expression and apoptosis of macrophages could lay a foundation for further study on the relationship between inflammation and tumor and its molecular mechanism.

**Keywords** macrophage; F-actin; Cofilin-1; TLRs; apoptosis

巨噬细胞(macrophage)是机体重要的固有免疫细胞之一,不但参与免疫防御作用,也与肿瘤、动脉粥样硬化、血管炎及高血压等疾病的发生与发展有关<sup>[1-3]</sup>。巨噬细胞通过其表面的模式识别受体(pattern recognition receptor, PRRs)识别病原相关模式分子(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs),从而启动吞噬病原体或活化杀菌<sup>[4-5]</sup>。TLR是巨噬细胞重要的PRR之一,作用类似于细胞的“感受器”,其感受LPS等致炎因子刺激后,启动巨噬细胞相关的炎症反应。在TLRs相关的经典信号途径中,TLRs接收炎症刺激后可通过依赖髓样分化因子88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)途径活化肿瘤坏死因子相关因子6(tumor necrosis factor receptor associated factor 6, TRAF6),也可招募含TIR结构域的衔接受体TRIF(TIR-domain-containing adaptor),最终激活核转录因子(nuclear factor-kappa B, NF- $\kappa$ B)、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)等信号通路,产生肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、诱导性一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、白介素-1(interleukin-1,

IL-1)等促炎性细胞因子,参与炎症反应<sup>[5]</sup>。也有研究表明,TLRs识别相应配体后还可通过肌动蛋白聚合介导细胞骨架重排,进一步激活NF- $\kappa$ B、MAPK等通路,产生促炎因子,引发炎症反应<sup>[6]</sup>。值得关注的是,肿瘤细胞可通过F-actin参与肿瘤的发展和转移,且肺癌、卵巢癌及结肠癌等肿瘤细胞可高表达TLR2、TLR4、TLR9等受体,参与肿瘤的发生与发展<sup>[7]</sup>,再结合上述炎症相关的TLRs/F-actin信号通路,提示肿瘤、TLR、F-actin之间存在密切关系。本课题组在前期研究中发现,肌动蛋白聚合抑制剂cytD可反馈抑制RAW264.7细胞的TLR2、TLR4及TLR9的表达和细胞凋亡水平<sup>[8]</sup>。本研究将继续探讨cytD抑制TLRs表达的量效关系,并研究内源性过表达的Cofilin-1所诱导的F-actin解聚对巨噬细胞TLRs的表达和细胞凋亡的影响。目前,针对“TLRs/F-actin”通路的顺向研究模式已有报道,但是研究“干预F-actin”反馈抑制细胞表面的TLRs的表达,尚未见报道。明确肌动蛋白解聚对巨噬细胞TLRs的表达及细胞凋亡的效应及机制,可为炎症控制、肿瘤的防治以及某些自身免疫病的防治提供新思路。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 主要材料与试剂

小鼠巨噬细胞RAW264.7由重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心保存; pEGFP-N1真核表达质粒载体购于上海和元生物技术有限公司; DMEM高糖培养基购于Hyclone公司; 胰蛋白酶购于Gibco公司; 青霉素-链霉素溶液(penicillin-streptomycin solution)(100×)购于上海碧云天生物技术有限公司; 胎牛血清购于Naticor-Industria Biologica公司; cytD购于美国Sigma公司; 转染试剂脂质体Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent购于Invitrogen公司; RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒、TB Green™ Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) RT-PCR试剂盒均购于TaKaRa公司; 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成; RIPA裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、PVDF膜(0.2 μm/0.45 μm)购于北京鼎国昌盛生物技术公司; SDS-PAGE凝胶试剂盒购于金斯瑞生物科技公司; 小鼠TLR2单克隆抗体、兔TLR4多克隆抗体、小鼠TLR9单克隆抗体购于美国Abcam公司; 兔抗鼠Cofilin-1单克隆抗体购于Cell Signaling Technology公司; β-actin多克隆内参抗体购于Cell Signaling Technology公司; 羊抗兔IgG二抗、羊抗鼠IgG二抗购于Proteintech公司。

### 1.2 RAW264.7细胞培养及分组

将RAW264.7细胞培养于含15%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的高糖DMEM培养基中, 然后放置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的培养箱培养。观察细胞状态, 细胞生长至对数期时, 用PBS清洗3次, 调整细胞密度至6×10<sup>5</sup>/孔, 接种于6孔板中。将细胞分为6组, 分别以0 μmol/L、0.5 μmol/L、1.0 μmol/L、1.5 μmol/L、2.0 μmol/L、2.5 μmol/L cytD处理RAW264.7细胞48 h后观察细胞状态。

### 1.3 重组质粒构建及转染

根据GenBank中*cofilin-1*(GenBank ID: NM007687)的基因序列设计引物。上游引物: 5'-GCG AAT CCA TGG CCT CTG GTG TGG CT-3'; 下游引物: 5'-GCG GAT CCT CAC AAA GGC TTG CCC TCC A-3'。提取RAW264.7细胞的总RNA, 按逆转录试剂盒说明将其逆转录为cDNA, 以cDNA为模板PCR扩增*cofilin-1*目的片段。用BamH I和EcoR I双酶切PCR回收产物和质粒pEGFP-N1使其具有相同的黏性末端, 酶切产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳后进行回收, *cofilin-1*基因片

段和pEGFP-N1载体大片段按4:1的摩尔数比用DNA连接酶于16 °C过夜连接。转化感受态DH5α大肠杆菌, 用含卡那霉素(50 mg/L)的LK培养基筛选, 挑取阳性克隆菌落进行培养, 提取质粒后, 通过双酶切与目的基因测序鉴定所构建的重组质粒, 构建的重组质粒命名为pEGFP-N1-Cofilin-1(简称为pEGFP-N1-CFL1)。用Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent将pEGFP-N1-CFL1质粒和pEGFP-N1空质粒载体瞬时转染RAW264.7细胞。细胞分为3组: 未转染质粒的RAW264.7空白细胞组(即空白组或blank control)、转染pEGFP-N1空质粒载体的空质粒对照组(即阴性对照组或negative control)和转染pEGFP-N1-CFL1重组质粒的质粒转染组(即实验组或The plasmid treated)。转染24 h后荧光显微镜观察荧光密度。

### 1.4 Real-time PCR法检测细胞*cofilin-1* mRNA的转录水平

按RNA提取试剂盒说明分别提取质粒转染组、空质粒对照组、空白组3组细胞总RNA, 将其逆转录成cDNA, 以cDNA为模板用SYBR嵌合荧光法进行PCR扩增, 测定各组细胞*cofilin-1* mRNA水平。PCR反应条件为: 95 °C预变性30 s; 95 °C变性5 s, 60 °C退火30 s, 共39个循环; 熔解曲线95 °C 10 s, 65 °C 5 s, 95 °C 5 s, 每个反应做3个复孔。扩增完毕后, 对结果用2<sup>-ΔΔCt</sup>法进行相对定量分析, ΔΔCt=对照组ΔCt(目的基因Ct-管家基因Ct)-各组ΔCt(目的基因Ct-管家基因Ct)。引物序列如下。内参GAPDH上游引物: 5'-AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG-3'; GAPDH下游引物: 5'-GGG GTC GTT GAT GGC AAC A-3'; *cofilin-1*引物同同1.3部分。

### 1.5 Western blot法检测细胞TLR2、TLR4、TLR9、Cofilin-1蛋白的表达

1.5.1 cytD处理组及重组质粒转染组细胞的TLR2、TLR4、TLR9的表达水平检测 PBS洗涤细胞后, 用RIPA裂解液分别提取不同条件处理的RAW264.7细胞, BCA蛋白定量试剂盒检测各组蛋白浓度后, 调整上样体积使总蛋白浓度一致。总蛋白经SDS-PAGE 10%的分离胶和5%的浓缩胶电泳分离, 恒流电转至PVDF膜(0.45 μm)上。转至50 g/L脱脂牛奶室温封闭2 h后, 分别加入小鼠TLR2单克隆抗体(1:100)、兔TLR4多克隆抗体(1:1 000)、小鼠TLR9单克隆抗体(1:500)和β-actin内参抗体(1:1 000), 于4 °C摇床孵育过夜; 加入HRP标记的山羊抗鼠IgG(1:2 000)、

HRP标记的山羊抗兔IgG(1:2 000), 室温条件下孵育2 h, TBST缓冲液洗涤后, 用ECL化学发光试剂盒在Bio-Rad凝胶成像仪上显影, 使用Image Lab分析条带灰度值。

**1.5.2 重组质粒转染组细胞的Cofilin-1的表达水平检测** 用RIPA裂解液分别提取质粒转染组、空质粒对照组、空白细胞组3组细胞的总蛋白, 测定蛋白浓度后调整至浓度一致。含Cofilin-1的总蛋白经SDS-PAGE 12%的分离胶和5%的浓缩胶电泳分离后, 恒流电转至PVDF膜(0.20  $\mu\text{m}$ )上。加入兔抗鼠Cofilin-1单克隆抗体(1:1 000)、 $\beta$ -actin内参抗体(1:1 000), 4  $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜; 二抗孵育、发光条件同上, 使用Image Lab分析条带灰度值。

### 1.6 流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测质粒转染细胞的凋亡率

于相同条件下培养质粒转染组、空质粒对照组和空白细胞组3组细胞, 胰酶消化细胞后, 收集培养瓶中内容物于离心管中, 900 r/min离心3 min, 加入400  $\mu\text{L}$  PBS缓冲液重悬细胞, 调整细胞浓度至 $1 \times 10^6/\text{mL}$ ,

FCM检测细胞凋亡率。

### 1.7 统计学分析

所有实验均独立重复3次, 数据采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 使用SPSS 22.0软件进行数据分析, 各组间比较用单因素方差分析法(One-Way ANOVA); 两组数据的比较使用独立样本的*t*检验;  $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 重组pEGFP-N1-CFL1质粒的鉴定及转染

**2.1.1 酶切鉴定** pEGFP-N1-CFL1重组质粒经*Bam*H I和*Eco*R I双酶切之后, 观察到约4.7 Kb的大片段及约0.5 Kb的小片段, 与预期相符(图1)。

**2.1.2 pEGFP-N1-CFL1重组质粒转染RAW264.7细胞** 如图2所示, 质粒转染细胞24 h后, 用荧光显微镜观察到细胞荧光密度达到50%, 提示转染效率约为50%。

### 2.2 cytD处理组细胞TLR2、TLR4、TLR9的表达

Western blot结果显示, cytD不同程度地下

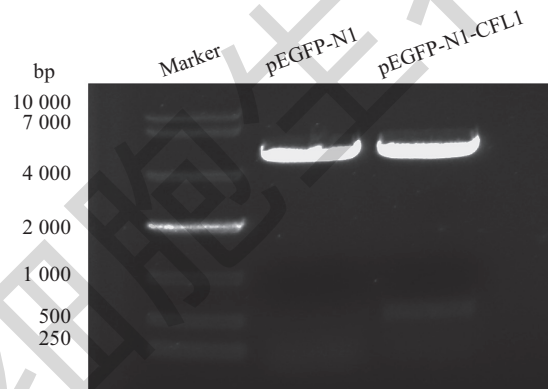
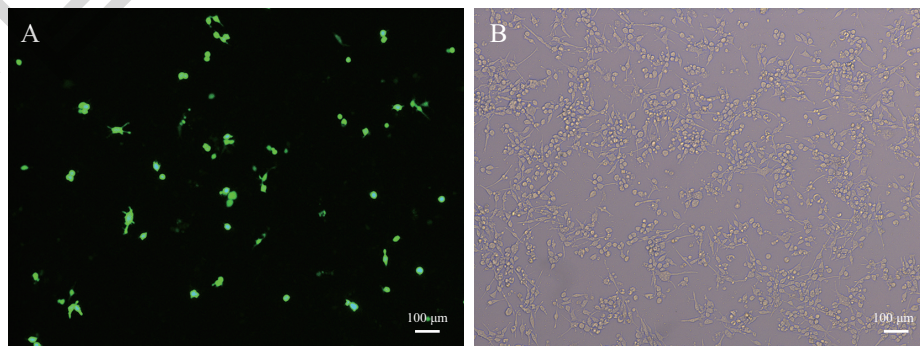


图1 pEGFP-N1-CFL1重组质粒的双酶切鉴定

Fig.1 Identification of pEGFP-N1-CFL1 recombinant plasmid by restriction enzyme digestion



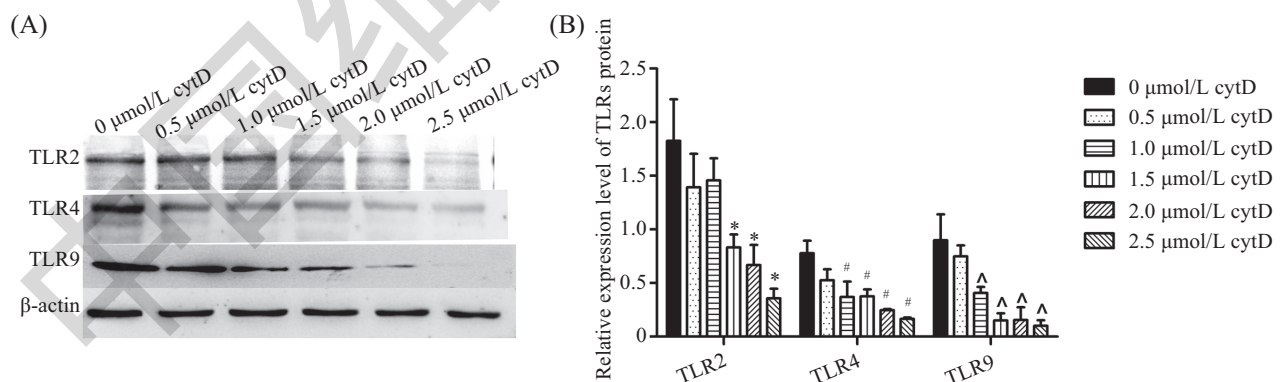
A: 重组质粒转染RAW264.7细胞24 h后(相差显微镜); B: 重组质粒转染RAW264.7细胞24 h后(荧光显微镜)。

A: the plasmid transfected cells under ordinary optical microscopy; B: the plasmid transfected cells under fluorescence microscope.

图2 荧光显微镜观察pEGFP-N1-CFL1重组质粒转染RAW264.7的绿色荧光

Fig.2 Observation of plasmid transfected into RAW264.7 cell using fluorescence microscope

调了巨噬细胞TLR2、TLR4、TLR9的表达量。TLR2蛋白的相对表达量从高至低分别为: 0  $\mu\text{mol/L}$  cytD( $1.87 \pm 0.67$ ) > 1.0  $\mu\text{mol/L}$  cytD( $1.46 \pm 0.36$ ) > 0.5  $\mu\text{mol/L}$  cytD( $1.39 \pm 0.54$ ) > 1.5  $\mu\text{mol/L}$  cytD( $0.83 \pm 0.21$ ) > 2.0  $\mu\text{mol/L}$  cytD( $0.67 \pm 0.32$ ) > 2.5  $\mu\text{mol/L}$  cytD( $0.36 \pm 0.16$ ); TLR4蛋白的相对表达量从高至低分别为: 0  $\mu\text{mol/L}$  cytD( $0.87 \pm 0.20$ ) > 0.5  $\mu\text{mol/L}$  cytD( $0.53 \pm 0.18$ ) > 1.5  $\mu\text{mol/L}$  cytD( $0.38 \pm 0.11$ ) > 1.0  $\mu\text{mol/L}$  cytD( $0.37 \pm 0.25$ ) > 2.0  $\mu\text{mol/L}$  cytD( $0.25 \pm 0.02$ ) > 2.5  $\mu\text{mol/L}$  cytD( $0.17 \pm 0.02$ ); TLR9蛋白的相对表达量从高至低分别为: 0  $\mu\text{mol/L}$  cytD( $0.90 \pm 0.42$ ) > 0.5  $\mu\text{mol/L}$  cytD( $0.75 \pm 0.71$ ) > 1.0  $\mu\text{mol/L}$  cytD( $0.41 \pm 0.10$ ) > 1.5  $\mu\text{mol/L}$  cytD( $0.15 \pm 0.18$ ) > 2.0  $\mu\text{mol/L}$  cytD( $0.15 \pm 0.21$ ) > 2.5  $\mu\text{mol/L}$  cytD( $0.10 \pm 0.09$ ) (图3A)。经过两两间比较, 发现与未处理组(0  $\mu\text{mol/L}$ )细胞表达的TLR2有统计学差异( $P < 0.05$ )的处理组为1.5  $\mu\text{mol/L}$ 处理组、2.0  $\mu\text{mol/L}$ 处理组和2.5  $\mu\text{mol/L}$ 处理组。与未处理组细胞表达的TLR4、TLR9有统计学意义( $P < 0.05$ )的处理组为1.0  $\mu\text{mol/L}$ 处理组、1.5  $\mu\text{mol/L}$ 处理组、2.0  $\mu\text{mol/L}$ 处理组及2.5  $\mu\text{mol/L}$ 处理组(图3B)。结果显示, cytD可以抑制RAW264.7细胞的TLR2、TLR4、TLR9表达, 这种抑制作用是波动的而非线性的下调。cytD对TLR2抑制作用的最低浓度是1.5  $\mu\text{mol/L}$ , 对TLR4、TLR9抑制作用的最低浓度均为1.0  $\mu\text{mol/L}$ 。2.5  $\mu\text{mol/L}$ 的cytD对TLR2、TLR4的抑制作用最明显。



A: 不同浓度cytD处理组细胞TLR2、TLR4、TLR9的Western blot检测结果; B: 不同浓度cytD处理组细胞TLR2、TLR4、TLR9的蛋白表达的水平; \* $P < 0.05$ , 与未处理组表达的TLR2比较; # $P < 0.05$ , 与未处理组表达的TL4比较; ^ $P < 0.05$ , 与未处理组表达的TLR9比较。

A: Western blot detection results of protein levels of TLR2, TLR4 and TLR9 in cells treated with cytD with different concentrations. B: the relative protein level of TLR2, TLR4 and TLR9 in cells treated with cytD with different concentrations; \* $P < 0.05$  compared with TLR2 in blank control group; # $P < 0.05$  compared with TLR4 in blank control group; ^ $P < 0.05$  compared with TLR9 in blank control group.

### 图3 Western blot检测不同浓度cytD处理细胞的TLR2、TLR4、TLR9的蛋白表达水平

Fig.3 The protein levels of TLR2, TLR4 and TLR9 in macrophages treated with cytD with different concentrations detected by Western blot

### 2.3 RAW264.7细胞的cofilin-1 mRNA的转录水平

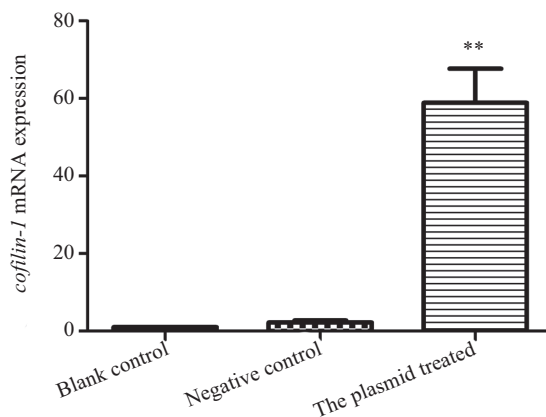
Real-time PCR结果显示, 质粒转染RAW264.7细胞24 h后, 3组细胞cofilin-1 mRNA的相对转录水平为: 质粒转染组( $58.87 \pm 15.32$ ) > 空质粒对照组( $2.21 \pm 0.96$ ) > 空白细胞组(定为1)。质粒转染组与各对照组之间的差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ), 但是空质粒对照组与空白细胞组的cofilin-1 mRNA表达水平的差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(图4)。结果表明, pEGFP-N1-CFL1质粒显著增高了RAW264.7细胞cofilin-1 mRNA的转录水平, 而pEGFP-N1质粒对RAW264.7细胞cofilin-1 mRNA的转录水平并无显著影响。

### 2.4 RAW264.7细胞的Cofilin-1蛋白表达水平

经Western blot检测, 3种细胞的Cofilin-1蛋白的相对表达水平为: 质粒转染组( $1.99 \pm 0.77$ ) > 空质粒对照组( $0.66 \pm 0.39$ ) > 空白细胞组( $0.42 \pm 0.33$ )(图5)。通过组间比较, 质粒转染组与空白细胞组之间差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ); 而空质粒对照组与空白细胞组之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。以上结果说明, 质粒转染组的Cofilin-1蛋白表达水平显著高于空白组及阴性对照组, 从而实现了在RAW264.7细胞中过表达Cofilin-1的目的。

### 2.5 RAW264.7细胞的TLR2、TLR4、TLR9蛋白表达水平

Western blot检测3组细胞TLR2、TLR4、TLR9蛋白表达水平, 结果显示, 3组Cofilin-1蛋白表达水平

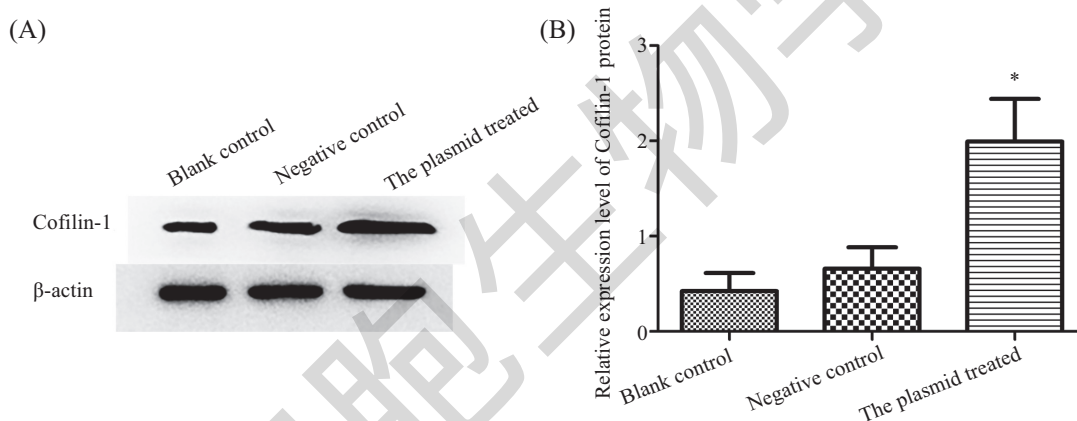


Blank control: 空白组或未转染质粒的RAW264.7空白细胞组; Negative control: 阴性对照组或转染pEGFP-N1空质粒载体的空质粒对照组; The plasmid treated: 实验组或转染pEGFP-N1-CFL1重组质粒的质粒转染组; \*\* $P < 0.01$ , 与空白组RAW264.7比较。

Blank control: the cells treated do not treated; Negative control: the cells transfected with pEGFP-N1 empty plasmid; The plasmid treated: the cells transfected with pEGFP-N1-CFL1 recombinant plasmid; \*\* $P < 0.01$  compared with the blank control group.

图4 RT-PCR法检测巨噬细胞 $cofilin-1$  mRNA水平

Fig.4 mRNA level of  $cofilin-1$  in macrophage detected by RT-PCR



A: 3组细胞Cofilin-1的Western blot检测结果; B: 3组细胞Cofilin-1蛋白的相对表达水平。Blank control: 空白组或未转染质粒的RAW264.7空白细胞组; Negative control: 阴性对照组或转染pEGFP-N1空质粒载体的空质粒对照组; The plasmid treated: 实验组或转染pEGFP-N1-CFL1重组质粒的质粒转染组; \* $P < 0.05$ , 与空白组比较。

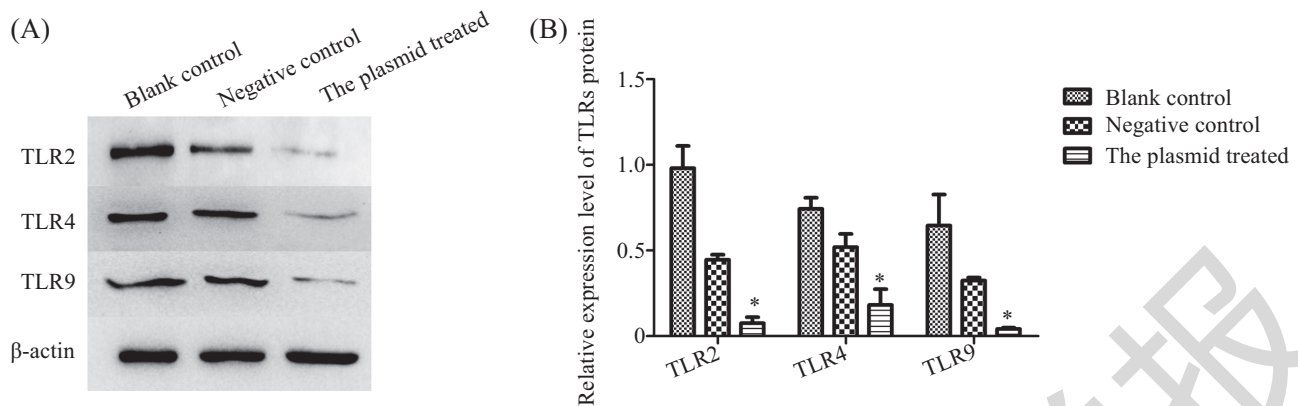
A: Western blot detection results of protein levels of Cofilin-1 in the 3 groups; B: the relative protein level of Cofilin-1 in the 3 groups. Blank control: the cells do not treated; Negative control: the cells transfected with pEGFP-N1 empty plasmid; The plasmid treated: the cells transfected with pEGFP-N1-CFL1 recombinant plasmid; \* $P < 0.05$  compared with the blank control group.

图5 Western blot检测巨噬细胞Cofilin-1蛋白表达水平

Fig.5 Protein levels of Cofilin-1 of macrophages detected by Western blot

不同的细胞, TLR2、TLR4、TLR9的表达量不同(图6)。TLR2的相对表达水平为空白细胞组( $0.98 \pm 0.22$ ) > 空质粒对照组( $0.45 \pm 0.05$ ) > 质粒转染组( $0.08 \pm 0.06$ ), 通过两两组间比较, 质粒转染组和空白组、质粒转染组与空质粒对照组表达的TLR2差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ); TLR4的相对表达水平为空白细胞组( $0.74 \pm 0.11$ ) > 空质粒对照组( $0.52 \pm 0.13$ ) > 质粒转染组( $0.18 \pm 0.16$ ), 质粒转染组和空白细胞组、质粒转染组和空质粒对照组细胞的TLR4水平的差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 但空白细胞组和空质粒对照

组之间比较则无显著差异( $P > 0.05$ ); TLR9的相对表达水平为空白细胞组( $0.65 \pm 0.31$ ) > 空质粒对照组( $0.32 \pm 0.03$ ) > 质粒转染组( $0.04 \pm 0.01$ ), 质粒转染组和空白细胞组、质粒转染组与空质粒对照组之间的差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 空白细胞组和空质粒对照组无显著差异( $P > 0.05$ )。Cofilin-1蛋白表达量最高的质粒转染组, 其TLR2、TLR4、TLR9的蛋白表达量都为3组中最低。结果表明, 丝切蛋白Cofilin-1的过表达可下调TLR2、TLR4、TLR9蛋白的表达。



A: 质粒转染组和空白组及阴性对照组3组细胞TLR2、TLR4、TLR9的Western blot检测结果; B: 质粒转染组和空白组及阴性对照组3组细胞TLR2、TLR4、TLR9的蛋白表达的水平; Blank control: 空白组或未转染质粒的RAW264.7空白细胞组; Negative control: 阴性对照组或转染pEGFP-N1空质粒载体的空质粒对照组; The plasmid treated: 实验组或转染pEGFP-N1-CFL1重组质粒的质粒转染组; \* $P < 0.05$ , 与空白组比较。

A: Western blot detection results of protein levels of TLR2, TLR4 and TLR9 in the 3 groups; B: the relative protein level of TLR2, TLR4 and TLR9 in the 3 groups; Blank control: the cells do not treated; Negative control: the cells transfected with pEGFP-N1 empty plasmid; The plasmid treated: the cells transfected with pEGFP-N1-CFL1 recombinant plasmid; \* $P < 0.05$  compared with the blank control group.

图6 Western blot检测巨噬细胞TLR2、TLR4、TLR9蛋白表达水平

Fig.6 Protein levels of TLR2, TLR4 and TLR9 of macrophages detected by Western blot

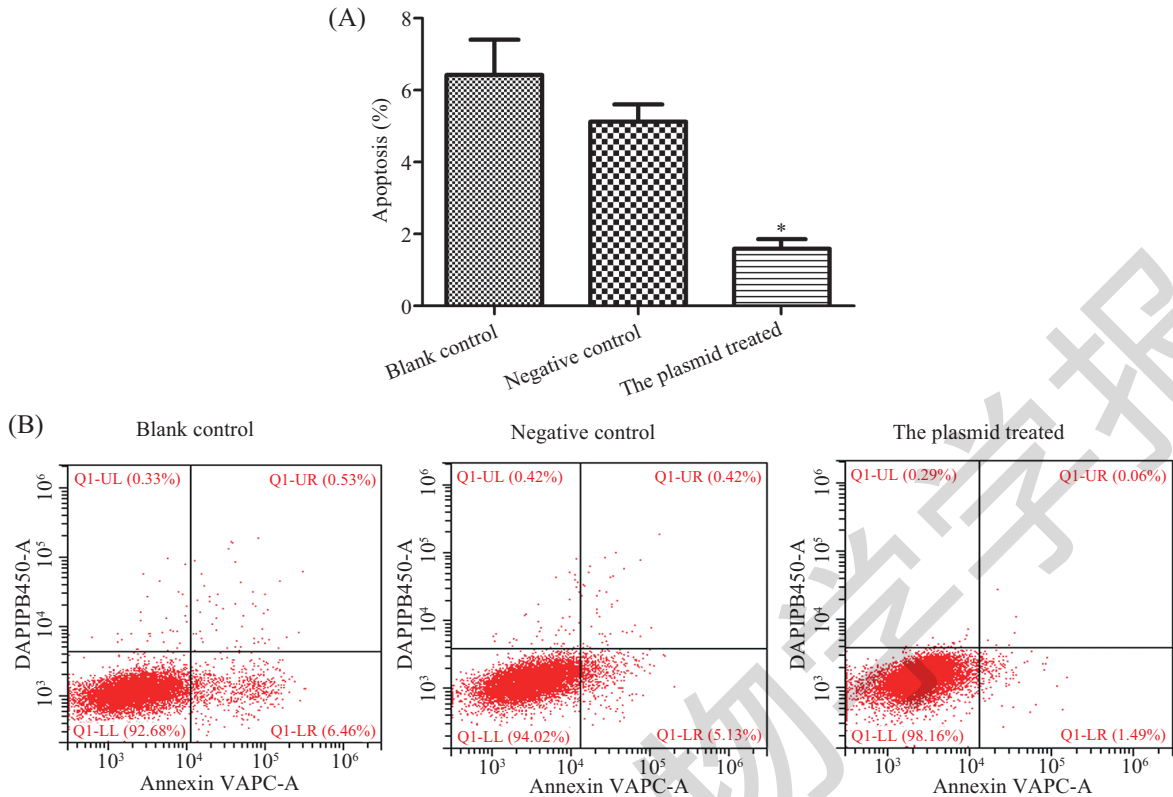
## 2.6 Cofilin-1过表达对细胞凋亡率的影响

Annexin-V-PE/APC-A染色之后,用流式细胞术(FCM)检测质粒转染组、空质粒对照组、空白细胞组3组细胞同时时间段的细胞凋亡率,结果显示,3组细胞凋亡率分别为:质粒转染组( $1.59\% \pm 0.46\%$ ) < 空质粒对照组( $5.13\% \pm 0.83\%$ ) < 空白细胞组( $6.42\% \pm 1.69\%$ )(图7);经两两组间比较,质粒转染组与空白细胞组及空质粒对照组凋亡率有显著性差异( $P < 0.05$ ),空质粒对照组与空白细胞组之间比较,细胞凋亡率无明显差异( $P > 0.05$ )。质粒转染组的早期凋亡和晚期凋亡都明显低于空白细胞组及空质粒对照组,其中晚期凋亡下降得更明显。结果表明,Cofilin-1蛋白高表达的质粒转染组细胞的凋亡率显著低于空白细胞组,也显著低于空质粒对照组。丝切蛋白Cofilin-1的高表达下调了巨噬细胞RAW264.7的凋亡率。

## 3 讨论

TLRs在机体的固有免疫中发挥重要作用,对于感知入侵的病原体或启动固有免疫反应至关重要。然而,TLRs也是一把“双刃剑”。TLRs引发的炎症反应异常激活可导致炎症性疾病和自身免疫疾病等。目前,多种信号分子被证实通过参与TLR通路的调控从而维持机体免疫平衡<sup>[9-13]</sup>,如,C末端Src激酶(C-terminal Src kinase, Csk)、磷酸肌苷3激酶、NLRC3(nucleotide-binding domain and leucine-

rich repeat family CARD-containing 3)、MHC类I/II类分子和酪氨酸磷酸酶等分子,而是否存在其他未知的调控因子还有待进一步研究。有研究发现,松弛素可下调TLR4信号,使巨噬细胞极化向M2表型转移<sup>[14]</sup>。细胞骨架被细胞松弛素B和siRNA破坏后,脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)介导的炎症反应以及一系列信号的表达被强烈下调,如PGE2、TNF- $\alpha$ 的表达以及PI3K/AKT和IKK的信号转导被下调<sup>[6]</sup>。研究者们使用茶多酚A引起了F-actin微丝的快速破坏和球状肌动蛋白(globular actin, G-actin)的聚合,促进细胞释放TNF- $\alpha$ 杀伤肿瘤,表明诱导G-actin成核可作为靶向肿瘤相关巨噬细胞清除肿瘤细胞的潜在策略<sup>[15]</sup>。由此可见,大量研究表明,骨架重排可能是巨噬细胞极化和炎症反应调节的一个关键事件。本研究进一步验证了cytD对巨噬细胞TLR2、TLR4、TLR9的抑制作用及这种作用的剂量关系。为了更直观、有效地从细胞外在和内在原因探讨F-actin解聚与TLR2、TLR4、TLR9表达的关系,本研究设计了梯度的cytD处理组以说明肌动蛋白解聚与TLR2、TLR4、TLR9表达水平下调的关系,构建了在巨噬细胞中高表达Cofilin-1的pEGFP-N1-CFL1重组质粒,来研究空白细胞组、空质粒对照组、质粒转染组3组细胞的*cofilin-1* mRNA和Cofilin-1蛋白水平以及对巨噬细胞的TLRs表达水平的影响和细胞凋亡的影响。



A: 空白细胞组、空质粒对照组和质粒转染组细胞的凋亡情况; B: 空白细胞组、空质粒对照组和质粒转染组细胞的凋亡率。Blank control: 空白组或未转染质粒的RAW264.7空白细胞组; Negative control: 阴性对照组或转染pEGFP-N1空质粒载体的空质粒对照组; The plasmid treated: 实验组或转染pEGFP-N1-CFL1重组质粒的质粒转染组; \* $P < 0.05$ , 与空白组比较。

A: apoptosis of cells with different treatments in the blank control group, negative control group and the plasmid treated group. B: the apoptosis rate of the blank control group, negative control group and the plasmid treated group. Blank control: the cells do not treated; Negative control: the cells transfected with pEGFP-N1 empty plasmid; The plasmid treated: the cells transfected with pEGFP-N1-CFL1 recombinant plasmid; \* $P < 0.05$  compared with the blank control group.

图7 流式细胞术检测RAW264.7细胞的凋亡情况

Fig.7 Apoptosis rate of RAW264.7 by flow cytometry

本研究使用不同浓度的cytD处理细胞,发现巨噬细胞表达TLR2、TLR4、TLR9均有不同程度下调。随着cytD处理浓度的升高,细胞表达的TLR2、TLR4、TLR9蛋白在逐渐降低。终浓度 $\geq 1.5 \mu\text{mol/L}$  cytD处理之后TLR2表达水平的下降具有统计学意义( $P < 0.05$ )。终浓度 $\geq 1.0 \mu\text{mol/L}$  cytD处理后TLR4表达水平的下降有统计学意义( $P < 0.05$ ),TLR4的表达在cytD处理浓度为 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 和 $1.5 \mu\text{mol/L}$ 处有波动。经终浓度 $\geq 1.0 \mu\text{mol/L}$  cytD处理后,TLR9的下降有统计学差异( $P < 0.05$ ),TLR9的表达在cytD浓度为 $1.5 \mu\text{mol/L}$ 和 $2.0 \mu\text{mol/L}$ 处有波动。以上说明,cytD对TLRs的下调作用是阶段性的、波动性的而非线性的下调,在 $2.5 \mu\text{mol/L}$  cytD处理细胞时,细胞表达的TLR2、TLR4、TLR9最低。本研究进一步明确了cytD下调巨噬细胞TLRs的表达与cytD的浓度相关,肌动蛋白的解聚可能潜在地调控TLR2、TLR4、

TLR9的表达。肌动蛋白的解聚因子丝切蛋白Cofilin-1可与F-actin结合,使微丝解聚、分离,从而调控细胞骨架重组的动力学<sup>[16]</sup>。已有研究表明,Cofilin-1与肿瘤发展、细胞凋亡、侵袭能力及相关细胞因子的分泌有关<sup>[17-18]</sup>,提示F-actin解聚可能为巨噬细胞分泌相关炎症分子的关键事件。为了明确由细胞内源表达的Cofilin-1导致的细胞F-actin解聚对细胞TLRs表达的反馈调节,进而验证确为“F-actin解聚”而非cytD其他效应反馈调节了细胞的TLRs,本研究构建了可在巨噬细胞内表达Cofilin-1的pEGFP-N1-CFL1重组质粒,经Real-time PCR和Western blot验证,转染质粒组细胞 $cofilin-1$  mRNA的转录水平及Cofilin-1蛋白表达水平都显著高于空白细胞组和空白质粒对照组。为了探究F-actin解聚与TLRs表达的关系,本研究对比了3组细胞的TLR2、TLR4、TLR9的表达水平。结果表明,细胞内源性表达的Cofilin-1也可显



著下调巨噬细胞TLR2、TLR4、TLR9的表达。活化的TLRs信号通路可使M2型巨噬细胞分泌TNF- $\alpha$ 、IL-12等因子杀伤肿瘤细胞,促进巨噬细胞向M1型转化,对肿瘤微环境具有正向调节作用<sup>[15,19]</sup>。F-actin解聚下调巨噬细胞TLRs表达也提示其在炎症、肿瘤微环境的转换具有重要意义。本研究流式结果显示,质粒转染组的细胞凋亡率显著低于空白细胞组与空质粒对照组;前期研究发现,过表达的Coronin-1蛋白和cytD处理可下调TLRs的表达并抑制细胞凋亡<sup>[8]</sup>,与本研究结果相符。由此推论,巨噬细胞Cofilin-1高表达可下调TLR2、TLR4、TLR9的表达和凋亡水平。目前,关于Cofilin-1调控细胞凋亡的机制未完全明了,但已知Cofilin-1在细胞凋亡的早期和晚期都发挥了巨大作用,激活的Cofilin-1可以在细胞色素C释放之前转移入线粒体<sup>[20]</sup>;也可通过影响线粒体渗透性过渡孔的通透性,促进细胞色素C的释放<sup>[21]</sup>;在凋亡后期,Cofilin-1还可在凋亡小泡中定位,参与调控凋亡相关形态<sup>[22]</sup>。以上说明,Cofilin-1是启动细胞凋亡和调控凋亡后期的重要因子。本研究发现,Cofilin-1的高表达下调了细胞的凋亡率,且晚期凋亡率的下降更明显。细胞凋亡率的下降是否与Cofilin-1未受到上游信号丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶LIMK1的激活有关,以及巨噬细胞凋亡率的下降与TLRs的高表达是否有关等问题还有待进一步探索。有研究表明,巨噬细胞吞噬颗粒后将导致细胞骨架重构,破坏巨噬细胞吞噬能力<sup>[23-24]</sup>。巨噬细胞吞噬病原体后即可启动凋亡程序清除病原体,本研究中,Cofilin-1的高表达引起细胞骨架重排后,细胞的吞噬能力被破坏,可能影响了巨噬细胞下一步凋亡的启动。Cofilin-1的生物学功能与其磷酸化与去磷酸化有关,本研究只检测了Cofilin-1总蛋白水平对TLRs表达及细胞凋亡的影响,其磷酸化与去磷酸化效应以及相关信号通路将在后续进行研究。本研究探索了cytD下调巨噬细胞表达TLRs的量效关系,揭示了外源性和内源性F-actin解聚均可反馈调节TLRs的表达,并抑制细胞的凋亡,为进一步研究巨噬细胞与炎症及肿瘤的关系及机制奠定了基础。

### 参考文献 (References)

- Shirai T, Hilhorst M, Harrison DG, Goronzy JJ, Weyand CM. Macrophages in vascular inflammation—from atherosclerosis to vasculitis. *Autoimmunity* 2015; 48(3): 139-51.
- Villalonga N, David M, Bielanska J, Vicente R, Comes N, Valenzuela C, *et al.* Immunomodulation of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels in macrophages: molecular and biophysical consequences. *J Gen Physiol* 2010; 135(2): 135-47.
- Zhu H, Yan L, Gu J, Hao W, Cao J. Kv1.3 channel blockade enhances the phagocytic function of RAW264.7 macrophages. *Science China. Life Sci* 2015; 58(9): 867-75.
- Mills CD. M1 and M2 macrophages: oracles of health and disease. *Crit Rev Immunol* 2012; 32(6): 463-88.
- Gordon S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 2002; 111(7): 927-30.
- Kim JY, Lee YG, Kim MY, Byeon SE, Rhee MH, Park J, *et al.* Src-mediated regulation of inflammatory responses by actin polymerization. *Biochem Pharmacol* 2010; 79(3): 431-43.
- Cherfilsvicini J, Platonova S, Gillard M, Laurans L, Validire P, Caliandro R, *et al.* Triggering of TLR7 and TLR8 expressed by human lung cancer cells induces cell survival and chemoresistance. *J Clin Invest* 2010; 120(4): 1285-97.
- 周静瑶, 陈全, 周芳妮, 刘革力, 张路渝. 冠蛋白-1不同表达水平对巨噬细胞iNOS、TLRs表达以及凋亡的影响. *中国细胞生物学学报*(Zhou Jingyao, Chen Quan, Zhou Fangni, Liu Geli, Zhang Luyu. The effects of Coronin-1 with different expression levels on iNOS and TLRs expression and apoptosis in RAW264.7 cells. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2017; 39(2): 148-56.
- Schneider M, Zimmermann AG, Roberts RA, Zhang L, Swanson KV, Wen H, *et al.* The innate immune sensor NLRC3 attenuates Toll-like receptor signaling via modification of the signaling adaptor TRAF6 and transcription factor NF- $\kappa$ B. *Nat Immunol* 2012; 13(9): 823-31.
- Zhang P, Liu X, Li Y, Zhu X, Zhan Z, Meng J, *et al.* Protein tyrosine phosphatase with proline-glutamine-serine-threonine-rich motifs negatively regulates TLR-triggered innate responses by selectively inhibiting I $\kappa$ B kinase  $\beta$ /NF- $\kappa$ B activation. *J Immunol* 2013; 190(4): 1685-94.
- Ha TZ, Hua F, Ma J. Modulation of TLR2 induces cardioprotection through a phosphoinositide 3-kinase dependent mechanism. *Astronomy Astrophys* 2010; 515(5): 549-54.
- Aki D, Mashima R, Saeki K, Minoda Y, Yamauchi M, Yoshimura A. Modulation of TLR signalling by the C-terminal Src kinase (Csk) in macrophages. *Genes Cells* 2005; 10(4): 357-68.
- 刘娟, 曹雪涛. 2013年国内外免疫学研究重要进展. *中国免疫学杂志*(Liu Juan, Cao Xuetao. Important progress in immunology research in 2013. *Chinese Journal of Immunology*) 2014; 30(1): 1-13.
- Chen L, Sha ML, Li D, Zhu YP, Wang XJ, Jiang CY, *et al.* Relaxin abrogates renal interstitial fibrosis by regulating macrophage polarization via inhibition of Toll-like receptor 4 signaling. *Oncotarget* 2017; 8(13): 21044-53.
- Pergola C, Schubert K, Pace S, Ziereisen J, Nikels F, Scherer O, *et al.* Modulation of actin dynamics as potential macrophage subtype-targeting anti-tumour strategy. *Sci Rep* 2017; 7(7): 41434.
- Mizuno K. Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation. *Cell Signal* 2013; 25(2): 457-69.
- Shishkin S, Eremina L, Pashintseva N, Kovalev L, Kovaleva M. Cofilin-1 and other ADF/Cofilin superfamily members in human malignant cells. *Int J Mol Sci* 2017; 18(1): 10.
- Xu YL, Wang DQ, Chen YH, Yang Z. Silencing of cofilin-1 gene attenuates biological behaviours of stromal cells derived from

- eutopic endometria of women with endometriosis. *Hum Reprod* 2010; 25(10): 2480-8.
- 19 Zhang X, Tian W, Cai X, Wang X, Dang W, Tang H, *et al.* Hydrazinocurcumin encapsulated nanoparticles “re-educate” tumor-associated macrophages and exhibit anti-tumor effects on breast cancer following STAT3 suppression. *PLoS One* 2013; 8(6): e65896.
- 20 Chua BT, Volbracht C, Tan KO, Li R, Yu VC, Li P. Mitochondrial translocation of cofilin is an early step in apoptosis induction. *Nat Cell Biol* 2003; 5(12): 1083-9.
- 21 Klamt F, Zdanov S, Levine RL, Pariser A, Zhang Y, Zhang B, *et al.* Oxidant-induced apoptosis is mediated by oxidation of the actin-regulatory protein cofilin. *Nat Cell Biol* 2009; 11(10): 1241.
- 22 Mannherz HG, Gonsior SM, Gremm D, Wu X, Pope BJ, Weeds AG. Activated cofilin colocalises with Arp2/3 complex in apoptotic blebs during programmed cell death. *Eur J Cell Biol* 2005; 84(4): 503-15.
- 23 夏强, 胡淑婷, 曾晓丽, 包海荣, 刘晓菊. 细颗粒物加剧慢性阻塞性肺疾病小鼠肺泡巨噬细胞吞噬功能缺陷的PI3K $\Delta$ -RhoA细胞骨架机制. *中华医学杂志*(Xia Qiang, Hu Shuting, Zeng Xiaoli, Bao Hairong, Liu Xiaojue. Mechanisms of cytoskeleton and PI3K $\Delta$ -RhoA in fine particulate matter deteriorating phagocytosis defect of alveolar macrophage in mice with chronic obstructive pulmonary disease. *National Medical Journal of China*) 2017; 97(24): 1893-8.
- 24 Yue H, Wei W, Yue Z, Lv P, Wang L, Ma G, *et al.* Particle size affects the cellular response in macrophages. *Eur J Pharm Sci* 2010; 41(5): 650-7.

中国细胞生物学学报