

# 不可分型流感嗜血杆菌诱导14-3-3 $\epsilon$ 表达 负向调控肺部炎症反应

颜红霞<sup>1</sup> 霍佳雯<sup>1</sup> 魏大飞<sup>1</sup> 谭雄<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>南华大学附属第二医院儿科, 衡阳 421001; <sup>2</sup>南华大学附属第二医院血管瘤儿童普外科, 衡阳 421001)

**摘要** 该文旨在观察14-3-3 $\epsilon$ 在不可分型流感嗜血杆菌(NTHi)诱导人支气管上皮细胞分泌促炎细胞因子中的作用,并研究其作用机制。分别采用感染复数(MOI)为5、10和20的NTHi感染BEAS-2B细胞,实时定量PCR或Western blot检测感染前后细胞内14-3-3 $\epsilon$ 的表达情况以及酪氨酸激酶c-Src在其中的作用。同时通过免疫共沉淀检测14-3-3 $\epsilon$ 与TLR2的结合水平。采用RNA干扰或使细胞内过表达14-3-3 $\epsilon$ ,免疫荧光和ELISA等方法测定其对NF- $\kappa$ B的活化以及培养上清中TNF- $\alpha$ 和IL-6浓度的影响。最后通过动物实验观察抑制14-3-3 $\epsilon$ 的活性对NTHi感染后肺部炎症反应的影响。结果显示,NTHi感染上皮细胞后,14-3-3 $\epsilon$ 的蛋白和mRNA水平随着MOI的递增而增高,采用ActD和CHX预处理细胞后,14-3-3 $\epsilon$ 表达水平和对照组相比分别降低了71.05%和59.21%。NTHi感染15 min后BEAS-2B细胞中c-Src磷酸化水平增高了3.63倍,而抑制c-Src活性后14-3-3 $\epsilon$ 表达水平降低了50.60%。免疫共沉淀结果也显示不同MOI NTHi感染后,14-3-3 $\epsilon$ 与TLR2的结合分别增高了1.78、4.33和6.89倍。沉默14-3-3 $\epsilon$ 表达后,NF- $\kappa$ B的抑制因子I $\kappa$ B的含量降低了75.24%,其细胞核内p65亚基水平增加了36.9%,TNF- $\alpha$ 和IL-6的分泌水平分别由(269.24 $\pm$ 16.71) pg/mL和(116.08 $\pm$ 5.61) pg/mL增高至(332.27 $\pm$ 20.57) pg/mL和(172.32 $\pm$ 9.78) pg/mL。而细胞内过表达14-3-3 $\epsilon$ 后,TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 水平分别降至(145.34 $\pm$ 22.16) pg/mL和(65.22 $\pm$ 11.74) pg/mL,以上差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。此外,NTHi感染C57BL/6小鼠后肺组织中14-3-3 $\epsilon$  mRNA表达水平也有所增高,预先采用14-3-3 $\epsilon$ 抑制剂R18腹腔注射后,小鼠肺组织病理评分由(6.42 $\pm$ 1.52)增高至(11.86 $\pm$ 1.63),肺泡灌洗液中TNF- $\alpha$ 和IL-6的含量由(186.39 $\pm$ 16.71) pg/mL和(76.21 $\pm$ 12.63) pg/mL增高至(258.91 $\pm$ 32.05) pg/mL和(151.25 $\pm$ 23.87) pg/mL。以上结果表明,NTHi感染能诱导气道上皮细胞表达14-3-3 $\epsilon$ ,后者能下调TLR2/NF- $\kappa$ B通路活性,最终负向调控肺部炎症反应。

**关键词** 不可分型流感嗜血杆菌; 14-3-3 $\epsilon$ ; NF- $\kappa$ B; 细胞因子

## Non-Typeable *Haemophilus influenzae* Induces Expression of 14-3-3 $\epsilon$ to Negatively Regulate Pulmonary Inflammatory Response

YAN Hongxia<sup>1</sup>, HUO Jiawen<sup>1</sup>, WEI Dafei<sup>1</sup>, TAN Xiong<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Pediatrics, the Second Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421001, China;

<sup>2</sup>Department of Vascular and Hernia Surgery, the Second Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421001, China)

收稿日期: 2023-01-06 接受日期: 2023-08-21

南华大学新冠肺炎疫情防控科研攻关专项(批准号: nk20200335)和衡阳市科技局科技计划(批准号: 2020jh042)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0734-8899682, E-mail: 252506000@qq.com

Received: January 6, 2023 Accepted: August 21, 2023

This work was supported by the COVID-19 Prevention and Control Scientific Research Emergency Special Project of the University of South China (Grant No.nk20200335) and the Scientific Project of the Hengyang Science and Technology Bureau (Grant No.2020jh042)

\*Corresponding author. Tel: +86-734-8899682, E-mail: 252506000@qq.com

**Abstract** This paper aimed to investigate the effect of 14-3-3ε on the secretion of proinflammatory cytokines by human bronchial epithelial cells induced by NTHi (non-typeable *Haemophilus influenzae*) and its mechanism. BEAS-2B cells were infected with NTHi with MOI (multiplicity of infection) of 5, 10, and 20, respectively. Real-time quantitative PCR or Western blot were used to detect the expression of 14-3-3ε in the cells and the role of tyrosine kinase c-Src before and after infection. The binding levels of 14-3-3ε and TLR2 were detected by co-immunoprecipitation. The activation of NF-κB and the concentration of TNF-α and IL-6 in the culture supernatant after RNA interference or BEAS-2B cell overexpression of 14-3-3ε were measured by immunofluorescence and ELISA. Finally, the effects of 14-3-3ε inhibitor treatment on pulmonary inflammation after NTHi infection were observed in animal experiments. The results showed that following the infection of epithelial cells with NTHi, there was an observed elevation in the protein and mRNA levels of 14-3-3ε concomitant with increasing MOI. However, upon pre-treatment of cells with ActD and CHX, the expression levels of 14-3-3ε decreased by 71.05% and 59.21% respectively, in comparison to the control group. At 15 minutes post NTHi infection, the phosphorylation levels of c-Src in BEAS-2B cells surged by 3.63-fold. However, upon inhibition of c-Src activity, the expression of 14-3-3ε decreased by 50.60%. Immunoprecipitation results also revealed that following infection with varying MOI of NTHi, the binding of 14-3-3ε to TLR2 was augmented by 1.78, 4.33, and 6.89-fold respectively. Silencing of 14-3-3ε expression led to a decrease in the inhibitor of NF-κB, IκB, by 75.24% and an intranuclear increase of the p65 subunit by 36.9%. The secretion levels of TNF-α and IL-6 were elevated from (269.24±16.71) pg/mL and (116.08±5.61) pg/mL to (332.27±20.57) pg/mL and (172.32±9.78) pg/mL respectively. Conversely, cellular overexpression of 14-3-3ε resulted in reduced levels of TNF-α and IL-1β to (145.34±22.16) pg/mL and (65.22±11.74) pg/mL respectively. All aforementioned differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). Additionally, following NTHi infection in C57BL/6 mice, there was a noticeable increase in the mRNA expression levels of 14-3-3ε in lung tissues. However, prior intraperitoneal injection with the 14-3-3ε inhibitor R18 led to an escalation in the pathological scoring of mouse lung tissue from 6.42±1.52 to 11.86±1.63. The levels of TNF-α and IL-6 in bronchoalveolar lavage fluid were increased from (186.39±16.71) pg/mL and (76.21±12.63) pg/mL to (258.91±32.05) pg/mL and (151.25±23.87) pg/mL respectively. These results indicated that infection with NTHi leads to the upregulation of 14-3-3ε expression in airway epithelial cells. Subsequently, 14-3-3ε acts to downregulate the activity of the TLR2/NF-κB signaling pathway, culminating in the negative modulation of pulmonary inflammatory responses.

**Keywords** nontypeable *Haemophilus influenzae*; 14-3-3ε; NF-κB; cytokines

不可分型流感嗜血杆菌(non-typeable *Hemophilus influenzae*, NTHi)是寄生于呼吸道的一种条件致病菌,是导致中耳炎、肺炎及支气管炎的常见病原体之一。除了呼吸道感染外,NTHi也可引起脑膜炎、败血症等重症感染<sup>[1-2]</sup>。在NTHi致病过程中,其主要通过黏附于呼吸道表面诱导炎性细胞因子分泌进而引发炎症损伤。因此,明确NTHi感染后,其与宿主免疫系统的相互作用机制对于预防控制NTHi感染引起的疾病至关重要。

14-3-3蛋白是一类广泛存在于真核生物中的高保守酸性蛋白家族,其能够特异性结合磷酸化的丝

氨酸、苏氨酸,从而参与细胞生长增殖以及炎症反应等功能<sup>[3]</sup>。14-3-3ε作为该家族中的重要成员,广泛参与肿瘤发生<sup>[4]</sup>、神经细胞分化以及凋亡调控等病理生理过程<sup>[5]</sup>。也有研究显示,14-3-3ε是一种炎症反应的负向调控因子<sup>[6]</sup>,能和Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs)信号通路下游多种分子结合从而调节炎症反应的强度。但是14-3-3ε在NTHi引起的炎症反应中是否能够发挥类似的作用尚不清楚。由于NTHi感染所导致的炎症反应与TLR2有关<sup>[7]</sup>,我们推测NTHi感染后其在活化TLR2的同时,也能反馈性上调14-3-3ε表达。随后14-3-3ε能直接和TLR2结

合从而在一定程度上拮抗下游信号分子如核因子 $\kappa$ B(nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B)的过度活化从而负向调控炎症反应。因此本研究旨在探讨NTHi感染对14-3-3 $\epsilon$ 表达的影响,并研究其在炎症反应中的调控机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要实验试剂

NTHi(TD-4, ATCC-49247)购自美国ATCC;人支气管上皮细胞BEAS-2B购自中国典型培养物保存中心。细胞总蛋白提取试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;放线菌素D(actinomycin D, ActD)、放线菌酮(cycloheximide, CHX)以及PP1购自Sigma-Adrich公司;鼠抗人Src多克隆抗体(磷酸化与非磷酸化)以及鼠抗人I $\kappa$ B $\alpha$ 单克隆抗体购自CST公司;鼠抗人GAPDH、14-3-3 $\epsilon$ 、p65及Cy2标记二抗抗体购自Santa Cruz公司;免疫沉淀试剂盒购自Millipore公司;人TNF- $\alpha$ 和IL-6细胞因子试剂盒购自武汉华美生物技术有限公司。pcDNA3.0-14-3-3 $\epsilon$ 质粒载体由上海生物工程股份有限公司构建;14-3-3 $\epsilon$  siRNA由广州市瑞博生物科技有限公司合成。

### 1.2 细胞培养、NTHi感染与分组

BEAS-2B细胞用BEGM培养基(Lonza)于37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ 条件下培养。待细胞生长至视野的80%~90%时,根据参考文献[8]提供的方法,加入不同感染复数(multiplicity of infection, MOI)(5、10、20)的NTHi感染。随后获取细胞总蛋白或培养上清用于下一步研究。在研究NTHi感染对14-3-3 $\epsilon$ 表达的影响,进行c-Src磷酸化实验以及TLR2免疫共沉淀实验时,实验分为未处理组以及不同MOI、不同时间感染组。在研究放线菌素D和放线菌酮对14-3-3 $\epsilon$ 表达的影响时,实验分为未感染组、NTHi感染组(20 MOI)和NTHi+抑制剂组。在抑制剂实验中(Src抑制剂和14-3-3 $\epsilon$ 抑制剂),实验分为未感染组、单纯抑制剂组、NTHi组和NTHi+抑制剂组。在RNA干扰以及质粒过表达实验中,实验分为未感染组、NTHi感染组、NTHi+对照siRNA(或空质粒)组和NTHi+siRNA(或过表达质粒)组。

### 1.3 实时定量PCR检测NTHi对14-3-3 $\epsilon$ mRNA表达的影响

经上述处理后的细胞,采用Trizol提取细胞总

RNA。随后采用Life公司的逆转录试剂盒将RNA逆转录为cDNA。随后进行实时定量PCR扩增(ABI 7500),反应如下:80 $^{\circ}$ C预变性5 min;随后92 $^{\circ}$ C变性25 s,60 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸20 s,共35个循环。扩增引物如下所示。14-3-3 $\epsilon$ 上下游引物:5'-TGC AGA ACT GGA TAC GCT GAG TGA-3'、5'-TCA CCC TGC ATG TCT GAA GTC CAT-3'。GAPDH上下游引物:5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3'、5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'。

### 1.4 Western blot检测NTHi感染对14-3-3 $\epsilon$ 、I $\kappa$ B表达以及c-Src磷酸化的影响

提取细胞总蛋白,测定其浓度后取10  $\mu$ L进行SDS-PAGE凝胶电泳,并于电转膜仪中转膜40 min。随后取出PVDF膜并加入5%牛血清白蛋白37 $^{\circ}$ C封闭2 h。充分洗膜后加入一抗(1:1 000)4 $^{\circ}$ C孵育12 h,随后再加入HRP标记的二抗(1:5 000)室温孵育1 h。最后进行ECL发光、显影。

### 1.5 免疫共沉淀测定NTHi感染对TLR2和14-3-3 $\epsilon$ 之间结合能力的影响

收集NTHi感染后的BEAS-2B细胞,提取细胞总蛋白,加入蛋白A/G琼脂糖珠(Sigma-Adrich)和抗TLR2抗体(Santa Cruz)共孵育。4 $^{\circ}$ C、8 000  $\times$ g离心10 min后收集与裂解物和TLR2抗体结合的珠粒,并用裂解缓冲液洗涤3次。随后加入2 $\times$  SDS上样缓冲液煮沸后用于Western blot分析。经转膜、洗涤后,加入抗14-3-3 $\epsilon$ 以及TLR2的抗体4 $^{\circ}$ C孵育12 h,然后加入HRP标记二抗(1:5 000)室温孵育2 h后化学发光、显影。

### 1.6 RNA干扰实验

本研究中使用的所有siRNA均由广州市瑞博生物科技有限公司合成。简单地说,将生长于6孔板中的BEAS-2B细胞(密度约 $1 \times 10^5$ /mL)用Lipofectamine 3000(Invitrogen)将100 nmol/L siRNA转染至细胞内。转染6 h后,将培养基更换为新鲜培养基,并根据不同的实验目的加入NTHi感染相应时长。最后提取细胞总蛋白用于Western blot分析RNA的干扰效果,并测定培养上清中细胞因子浓度以及I $\kappa$ B的表达水平。本文所用的14-3-3 $\epsilon$  siRNA序列为:5'-GUG AUA UUG CAA UGA CAG A-3'和5'-UCU GUC AUU GCA AUA UCA C-3'。对照组siRNA为:5'-GAU CAU ACG UGC GAU CAG A-3'和5'-UCU GAU CGC ACG UAU GAU C-3'。

## 1.7 间接免疫荧光检测NTHi感染对NF-κB p65亚基核转位的影响

生长于玻片上的BEAS-2B细胞经NTHi感染4 h后,采用多聚甲醛于37 °C条件下固定15 min。随后加入Triton X-100通透20 min。充分洗涤后加入鼠抗人p65多克隆抗体(1:200) 4 °C孵育过夜。PBS洗3次后分别加入稀释的Cy2标记的二抗以及DAPI(1:400以及1:1 000)避光孵育1.5 h。PBS避光洗涤3次后,荧光显微镜下观察NF-κB的核转位情况。

## 1.8 14-3-3ε过表达实验

采用Lipofectamine 3000(Life Technologies)将0.5 mg构建好的pcDNA3.0-14-3-3ε过表达质粒载体转染至BEAS-2B细胞中(约 $4 \times 10^5$ ), 24 h后更换为完全培养基后继续培养48 h。随后提取细胞总蛋白, Western blot检测14-3-3ε的转染效果, 或经NTHi感染24 h后测定培养上清中TNF-α和IL-6的浓度。

## 1.9 ELISA检测沉默或过表达14-3-3ε后细胞培养上清中TNF-α和IL-6的浓度

细胞处理结束后,获取培养上清,并按照武汉华美生物技术有限公司提供的ELISA试剂盒测定细胞上清中TNF-α以及IL-6的浓度。简而言之, TNF-α和IL-6经双抗体夹心法检测后,置于酶标仪上测定450 nm处的吸光度值。并按照试剂盒中提供的标准曲线制作方法计算培养上清中TNF-α和IL-6的浓度。

## 1.10 动物体内实验

6~8周龄C57BL/6雄性小鼠被随机分为PBS对照组、NTHi感染组、单纯抑制剂和NTHi+抑制剂, 每组3~7只。实验前于SPF环境下适应性饲养1周。将生长状态良好的NTHi菌液浓度调整为 $1 \times 10^7$  CFU/40 μL, 取40 μL菌液从小鼠鼻腔缓慢滴入, 待菌液通过鼻腔到达下呼吸道后将小鼠放回笼内。对照组小鼠以同样方式滴鼻40 μL生理盐水, 抑制剂组腹腔注射R18(0.2 μg/kg·d), 连续注射5次。处理结束后, 处死小鼠, 获取其肺泡灌洗液用于测定TNF-α和IL-6浓度。本实验经南华大学伦理委员会批准(医学伦理编号: 2022-05-02331)。随后将获取的肺组织一部分用于实时定量PCR扩增14-3-3ε的表达, 另一部分用于组织学分析。

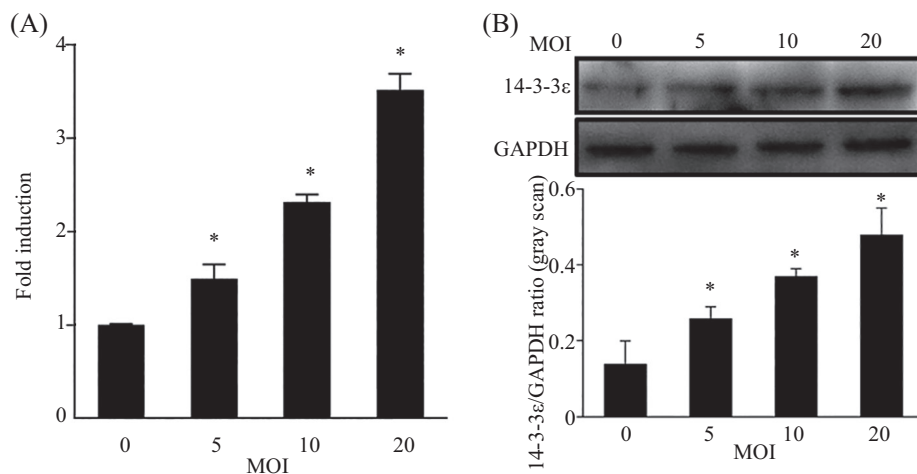
## 1.11 统计学方法

所有计量资料采用均数±标准差表示。组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用Tukey's事后检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 NTHi诱导气道上皮细胞14-3-3ε表达

实时定量PCR结果显示, MOI为0的对照组细胞内14-3-3ε mRNA表达水平较低。而采用MOI为5、10和20的NTHi感染24 h后, 细胞内14-3-3ε mRNA水平分别是对照组的1.52、2.32和3.52倍(图1A)。此外,

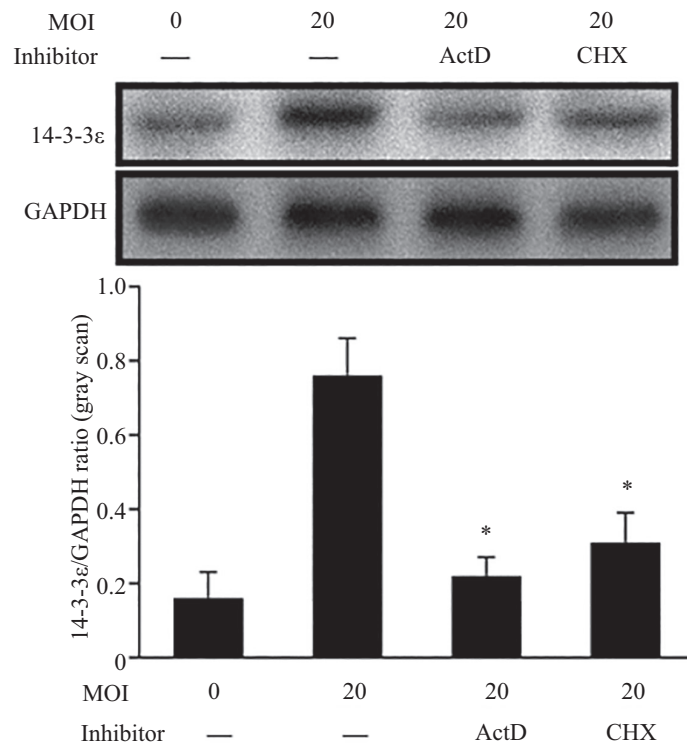


A: NTHi感染对14-3-3ε mRNA表达的影响; B: NTHi感染对14-3-3ε蛋白的表达的影响。\* $P < 0.05$ , 与MOI=0的对照组相比;  $n=3$ 。

A: expression of 14-3-3ε mRNA by NTHi infection; B: expression of the 14-3-3ε protein by NTHi infection. \* $P < 0.05$  compared with the control group (MOI=0);  $n=3$ .

图1 不同MOI对14-3-3ε mRNA和蛋白表达的影响

Fig.1 Effect of different MOI on the expression of 14-3-3ε mRNA and protein



\* $P < 0.05$ , 与对照组(MOI=0)相比;  $n=3$ 。

\* $P < 0.05$  compared with the control group (MOI=0);  $n=3$ 。

图2 ActD和CHX对14-3-3ε表达的影响

Fig.2 Effects of ActD and CHX on the expression of 14-3-3ε

Western blot结果也显示, NTHi感染后 BEAS-2B 细胞内 14-3-3ε 蛋白的表达水平也具有类似的趋势(图 1B)。

## 2.2 NTHi诱导14-3-3ε表达发生在转录及翻译水平

如图2所示, BEAS-2B 分别加入 5 ng/mL 转录及翻译抑制剂 ActD 或 CHX 预处理 30 min, 随后用 NTHi 感染 24 h 后细胞内 14-3-3ε 蛋白表达水平和未经抑制剂处理组相比明显降低(分别降低了 71.05% 和 59.21%, 图2)。

## 2.3 NTHi诱导14-3-3ε表达受c-Src的调控

Western blot 结果显示, NTHi 感染 BEAS-2B 细胞 5 min 后即可活化酪氨酸激酶 c-Src, 主要表现为磷酸化蛋白的增多。随着感染时间的延长, 磷酸化水平逐渐增高, 在 15 min 左右时其水平比对照组的增加了 3.63 倍。而细胞内总 c-Src 保持不变(图 3A)。采用 50 μmol/L c-Src 抑制剂 PP1 预处理细胞 1 h 后, NTHi 诱导 14-3-3ε 表达水平比处理前降低了 50.60%(图3B)。

## 2.4 NTHi诱导14-3-3ε和TLR2结合

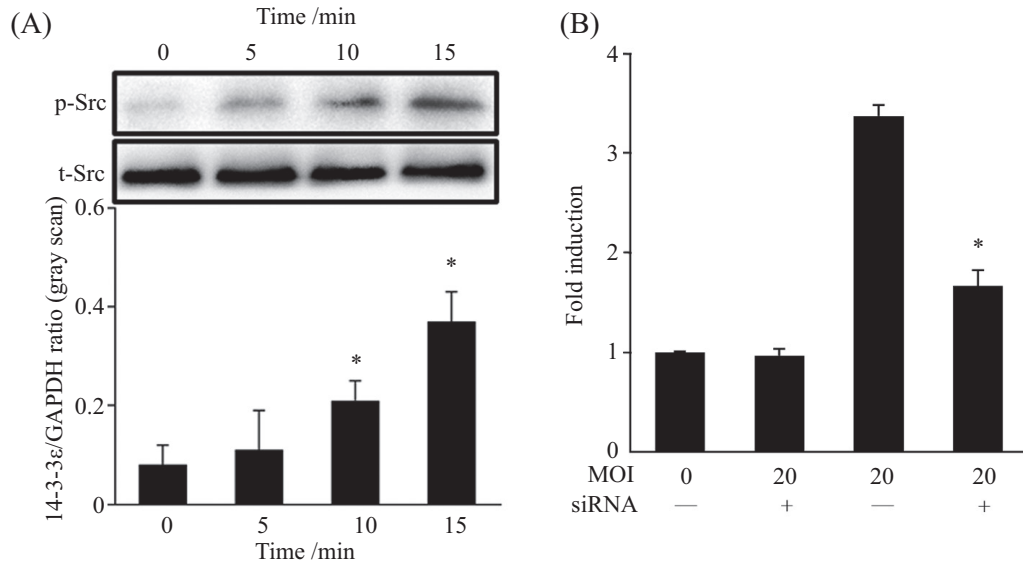
免疫共沉淀结果显示, 分别用 MOI 为 5、10 和 20 的 NTHi 感染细胞 24 h, 均可显著增强 14-3-3ε 和 TLR2 之间的结合能力, 分别为对照组的 2.78、5.33 和 7.89 倍(图4)。

## 2.5 沉默14-3-3ε促进NTHi进一步激活NF-κB

采用 RNA 干扰 14-3-3ε 表达后(图 5A), Western blot 以及免疫荧光实验结果显示, MOI 为 20 的 NTHi 感染 4 h 可明显诱导 IκB 降解, 并能促进 NF-κB p65 亚基从细胞质转移至细胞核(图 5B 和图 5C)。此外, 采用 siRNA 沉默 BEAS-2B 细胞中 14-3-3ε 的表达后, NTHi 感染后 IκB 的水平降低了 75.24%(图 5B), 同时细胞核内 p65 亚基的转位水平增加了 36.9%(图 5C 和图 5D), 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

## 2.6 沉默14-3-3ε促进TNF-α和IL-6分泌

siRNA 沉默 14-3-3ε 的表达后, 对照 siRNA 组 TNF-α 和 IL-6 浓度分别为 (269.24±16.71) pg/mL 和 (116.08±5.61) pg/mL, 14-3-3ε siRNA 组 TNF-α

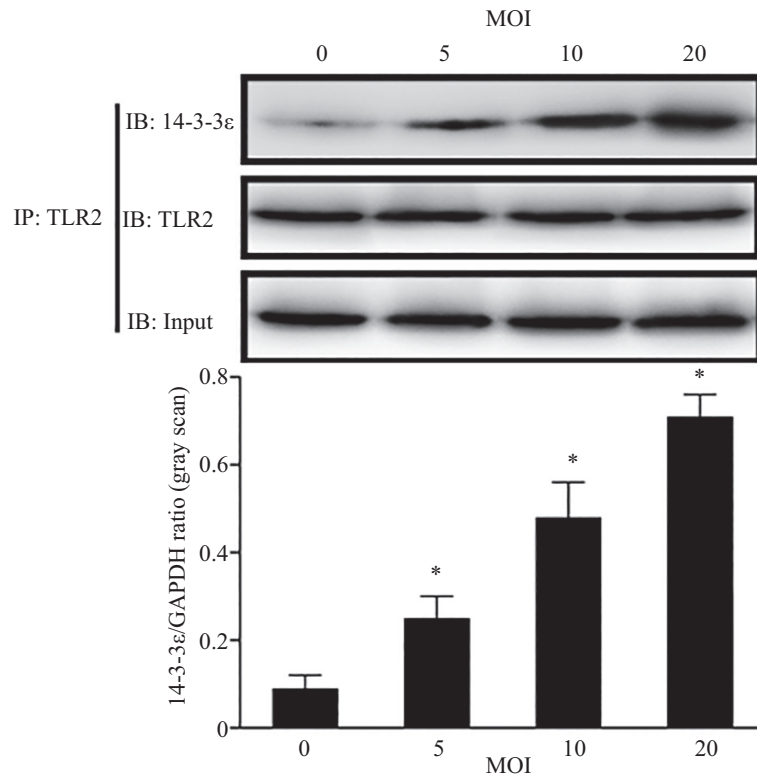


A: NTHi感染对c-Src磷酸化的影响; \*P<0.05, 与0 min的对照组相比; B: 抑制c-Src对14-3-3ε mRNA表达的影响; \*P<0.05, 与单纯NTHi组相比; n=3。

A: phosphorylation of c-Src by NTHi infection, \*P<0.05 compared with the control group (0 min); B: inhibition of c-Src on the expression of 14-3-3ε mRNA, \*P<0.05 compared with the NTHi group; n=3.

图3 NTHi诱导c-Src磷酸化调控14-3-3ε表达

Fig.3 c-Src phosphorylation regulates the expression of 14-3-3ε induced by NTHi

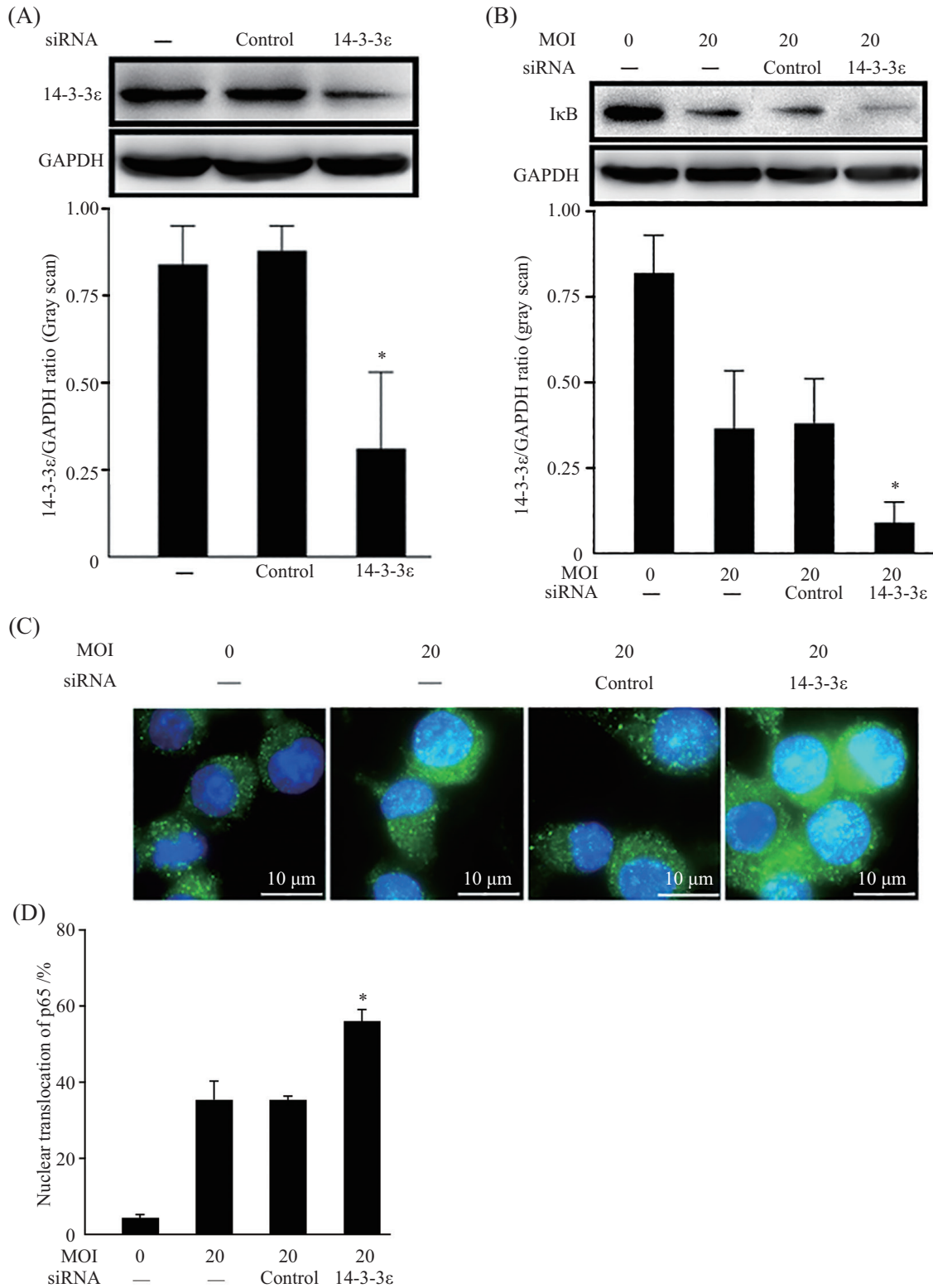


\*P<0.05, 与对照组(MOI=0)相比; n=3。

\*P<0.05 compared with the control group (MOI=0); n=3.

图4 14-3-3ε与TLR2的结合水平

Fig.4 The binding level of 14-3-3ε and TLR2

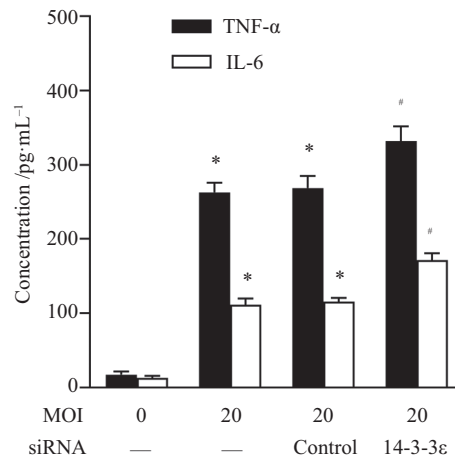


A: 14-3-3ε的沉默效果分析; B: 沉默14-3-3ε对BEAS-2B细胞内IκB表达的影响; C: 沉默14-3-3ε对NF-κB p65亚基核转位的影响(绿色荧光); D: NF-κB核转位定量分析; \* $P < 0.05$ , 与对照siRNA组相比;  $n = 3$ 。

A: the silencing efficiency of 14-3-3ε; B: the effect of silencing of 14-3-3ε on the expression of IκB in BEAS-2B cells; C: the effect of silencing of 14-3-3ε on the nuclear translocation of p65 subunit of NF-κB (green); D: quantitative analysis of NF-κB nuclear translocation; \* $P < 0.05$  compared with the control siRNA group;  $n = 3$ .

图5 RNA干扰14-3-3ε对NF-κB活性的影响

Fig.5 The effect of silencing of 14-3-3ε on the activation of NF-κB by siRNA

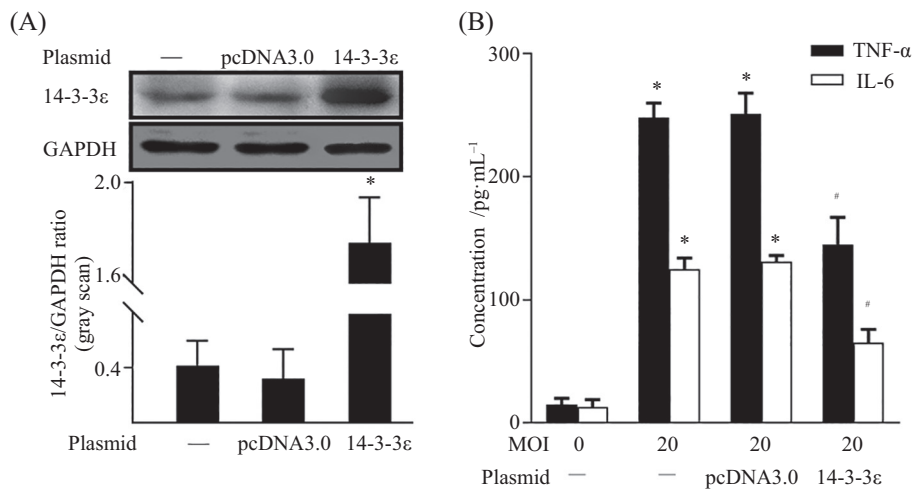


\* $P < 0.05$ , 与对照组相比; # $P < 0.05$ , 与对照siRNA组相比;  $n = 3$ 。

\* $P < 0.05$  compared with the control group (MOI=0); # $P < 0.05$  compared with the control siRNA;  $n = 3$ .

图6 沉默14-3-3ε对NTHi感染后培养上清中TNF-α和IL-6的影响

Fig.6 The levels of TNF-α and IL-6 after silence of the 14-3-3ε in the culture supernatant



A: Western blot检测pcDNA3.0-14-3-3ε转染效率; B: ELISA检测TNF-α以及IL-6的分泌。\* $P < 0.05$ 与对照组相比(MOI=0); # $P < 0.05$ , 与对照质粒组相比;  $n = 3$ 。

A: the transfection efficiency of pcDNA3.0-14-3-3ε by Western blot; B: detection of the secretion of TNF-α and IL-6 by ELISA. \* $P < 0.05$  compared with the control group (MOI=0); # $P < 0.05$  compared with the control siRNA;  $n = 3$ .

图7 过表达14-3-3ε对NTHi感染后TNF-α和IL-6分泌的影响

Fig.7 The effect of overexpress the 14-3-3ε on the secretion of TNF-α and IL-6

和IL-6的分泌水平均增高至(332.27±20.57) pg/mL和(172.32±9.78) pg/mL, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ , 图6)。

### 2.7 BEAS-2B过表达14-3-3ε后抑制TNF-α和IL-6分泌

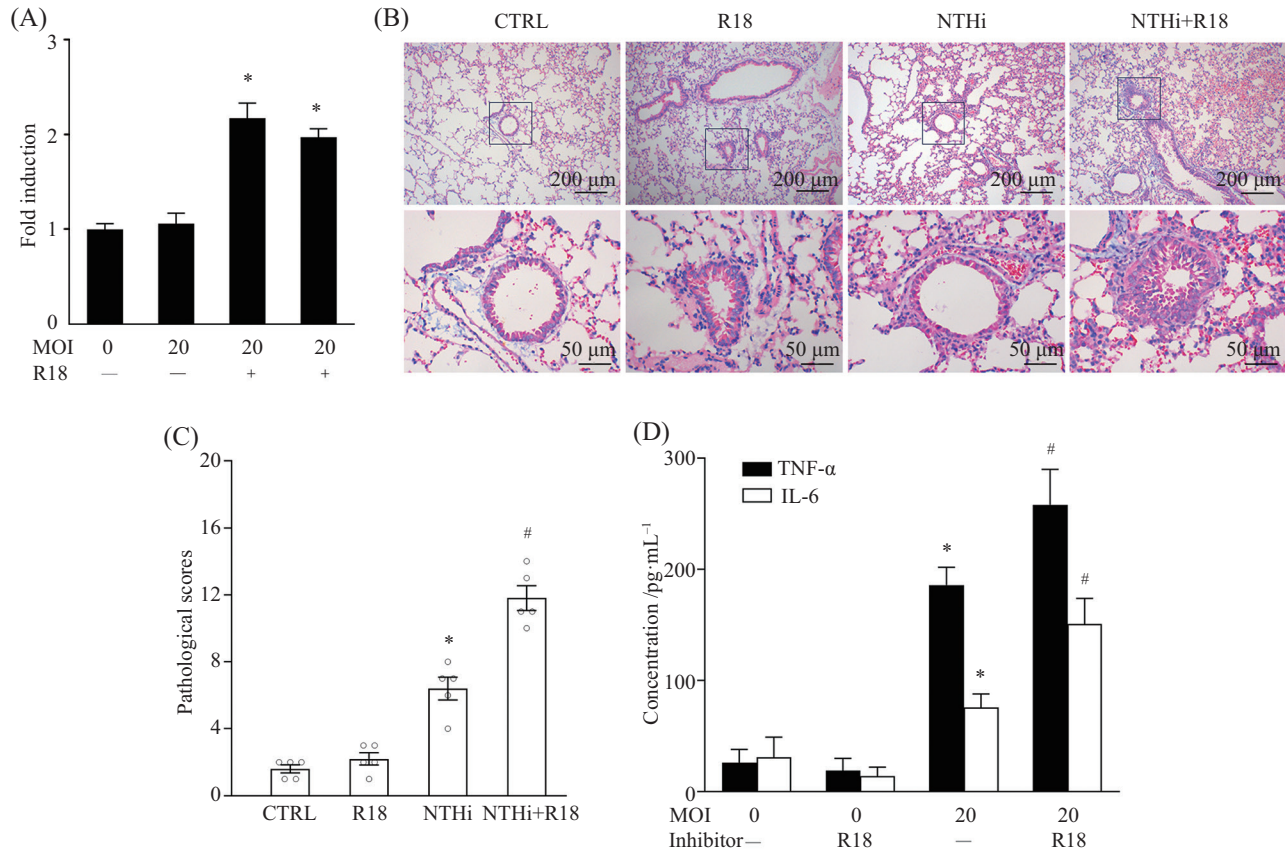
为了进一步验证14-3-3ε在介导TNF-α和IL-6分泌中的作用, 我们通过在细胞内转染pcDNA3.0-14-3-3ε, 并使其过表达14-3-3ε(图7A), 再随后加入NTHi感染24 h。结果显示, 空质粒对照组TNF-α和IL-1β水平为(251.97±17.28) pg/mL和

(131.46±6.07) pg/mL, 过表达14-3-3ε后, TNF-α和IL-1β水平分别降至(145.34±22.16) pg/mL和(65.22±11.74) pg/mL, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ , 图7B)。

### 2.8 抑制14-3-3ε活性增强NTHi感染后小鼠肺部炎症反应

动物实验结果显示, NTHi感染后C57BL/6小鼠肺组织中14-3-3ε mRNA明显增高, 而预先采用14-3-3ε抑制剂R18(0.2 μg/kg·d)腹腔注射后, 对小鼠肺组织中14-3-3ε mRNA表达水平无明显影响, 但肺组织





A: NTHi感染C57BL/6小鼠后肺组织中14-3-3ε mRNA的表达; B: 抑制14-3-3ε活性对NTHi感染后肺部炎症反应的影响; C: 抑制14-3-3ε活性对NTHi感染后肺部病理评分的影响; D: 抑制14-3-3ε活性对NTHi感染后肺泡灌洗液中TNF-α和IL-6的影响; \* $P < 0.05$ , 与对照组(MOI=0)相比; # $P < 0.05$ , 与单纯NTHi组相比。

A: expression of 14-3-3ε mRNA in the lung tissue after NTHi infection in C57BL/6 mice; B: effect of the inhibition of the activity of 14-3-3ε on the pulmonary inflammatory response; C: effect of the inhibition of the activity of 14-3-3ε in the pulmonary pathological scores; D: effect of the inhibition of the activity of 14-3-3ε on the secretion of TNF-α and IL-6 in bronchoalveolar lavage fluid; \* $P < 0.05$  compared with the control group (MOI=0), # $P < 0.05$  compared with the NTHi group.

图8 抑制14-3-3ε活性对NTHi感染后肺部炎症反应的影响

Fig.8 The effect of inhibition of the 14-3-3ε activity on pulmonary inflammatory response after NTHi infection

炎症反应明显增高,病理评分由(6.42±1.52)增高至(11.86±1.63)。肺泡灌洗液中TNF-α和IL-6的含量由(186.39±16.71) pg/mL和(76.21±12.63) pg/mL增高至(258.91±32.05) pg/mL和(151.25±23.87) pg/mL,两组比较差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ,图8D)。

### 3 讨论

NTHi是寄居于健康人群呼吸道的正常菌群,但在机体免疫力低下时也可导致中耳炎、支气管炎及COPD等疾病<sup>[9]</sup>。由于呼吸道上皮细胞是人体免疫系统的第一道防线,胞外病原体入侵可诱导呼吸道上皮细胞分泌多种趋化因子以及促炎细胞因子进而活化免疫系统,清除病原体<sup>[10-11]</sup>。然而,机体的炎症反应是受多种机制严格调控的过程,在NTHi感染后

气道上皮细胞如何精细调控炎症反应,是避免炎症反应失控以及组织损伤的重要环节,因此探究NTHi感染后呼吸道上皮细胞如何负向调控炎症反应的机制对了解病原微生物和宿主细胞的相互作用具有重要意义。

14-3-3ε是大小为25~33 kDa的高度保守酸性蛋白,能够参与细胞周期调控、有丝分裂发生、细胞骨架改变以及凋亡等细胞内过程,与细胞生理活动密切相关<sup>[12-13]</sup>,如在呼吸道综合症病毒感染的Marc-145细胞中14-3-3ε呈异常表达<sup>[14]</sup>。近年的研究也显示,14-3-3ε也能负向调控炎症反应,如14-3-3ε作为TNF受体(tumor necrosis factor receptor, TNFR)复合物的的重要组成部分,下调其表达后,会加剧骨关节炎的发展<sup>[15]</sup>。此外,14-3-3ε在TNFR2信号通路

介导的巨噬细胞极化的转化过程中发挥至关重要作用<sup>[16]</sup>。此外,14-3-3 $\epsilon$ 也能作用于TLR通路,从而降低炎症反应的强度<sup>[12]</sup>。为了研究14-3-3 $\epsilon$ 在NTHi感染后炎症反应中的作用,我们首先采用不同感染复数的NTHi感染支气管上皮细胞,结果发现细胞内14-3-3 $\epsilon$ 蛋白以及mRNA水平均显著增高,而采用ActD和CHX预处理则可明显抑制细胞内14-3-3 $\epsilon$ 蛋白表达,提示NTHi感染后通过从头合成途径诱导14-3-3 $\epsilon$ 表达。为了进一步明确NTHi感染后14-3-3 $\epsilon$ 表达的机制,我们着重研究了TLR2活化在介导14-3-3 $\epsilon$ 表达中的作用,因为固有免疫系统主要通过TLR2识别NTHi<sup>[11]</sup>。TLR2活化后的早期,酪氨酸激酶c-Src发挥重要作用<sup>[14]</sup>。c-Src是由原癌基因*c-Src*编码的一种非受体型酪氨酸激酶,它由N-端的豆蔻酰化序列、单一序列、SH2域、SH3域、激酶区和C-端调节序列组成<sup>[17]</sup>。未激活状态下,c-Src的C-端酪氨酸残基Y527处于磷酸化状态,并与SH2区域结合而使蛋白头尾卷曲而处于抑制状态。各种外源性刺激后,Y527发生去磷酸化,同时诱导Y416发生自身磷酸化从而使c-Src处于开放构象而发挥激酶活性。c-Src不但参与固有免疫系统TLR信号转导通路,同时具有负调控炎症反应的作用<sup>[17-18]</sup>。如LEE等<sup>[19]</sup>发现,LTA可通过激活c-Src而诱导支气管平滑肌细胞表达HO-1。本研究也证实,NTHi感染5 min后即可检测出磷酸化的c-Src,其磷酸化水平持续至15 min以上。抑制c-Src的活性后,NTHi感染后14-3-3 $\epsilon$ 表达水平明显下降。这表明NTHi感染后c-Src的活化是上调14-3-3 $\epsilon$ 表达的重要机制。然而NTHi和TLR2相互作用后c-Src的活化机制尚不明确,但早期酪氨酸磷酸化是c-Src活化的重要环节,在该过程中,Btk发挥重要作用<sup>[18]</sup>,且TLR2活化后本身也可激活Btk,但NTHi是否也通过Btk发挥作用有待进一步研究。

由于14-3-3 $\epsilon$ 与多种蛋白质相互作用,因此其在炎症反应中的确切的功能依赖于特定的细胞环境。如14-3-3 $\epsilon$ 对滑膜细胞和软骨细胞具有促炎效应,并能诱导巨噬细胞去极化<sup>[20]</sup>。而甲型流感病毒非结构蛋白1(non-structural protein 1, NS1)则通过14-3-3 $\epsilon$ 抑制I型干扰素的表达<sup>[21]</sup>。因此我们对NTHi感染后的炎症反应发挥何种作用进行了研究。由于14-3-3 $\epsilon$ 的表达依赖TLR2的活化,因此我们用免疫共沉淀检测了两者之间的相互作用,结果显示,NTHi感染能以时间依赖性方式促进14-3-3 $\epsilon$ 结合至TLR2,因

此我们推测c-Src介导14-3-3 $\epsilon$ 表达可能进一步结合TLR2从而阻断其信号级联。为了证实该设想,我们测定了TLR2下游NF- $\kappa$ B活性的变化,因为NF- $\kappa$ B是TLRs通路中最重要的核转录因子。细胞静息条件下,NF- $\kappa$ B位于细胞质内,TLRs活化会诱导NF- $\kappa$ B的抑制因子I $\kappa$ B发生降解,随后NF- $\kappa$ B的亚基p65亚基转移至细胞核内和靶基因的启动子结合而启动其转录<sup>[22]</sup>。因此测定I $\kappa$ B的降解和p65的核转位是判定TLR2信号通路活化的重要指标。我们的结果也显示,NTHi感染后能显著促进I $\kappa$ B降解以及p65核转位,而采用siRNA沉默14-3-3 $\epsilon$ 表达后,结果显示NF- $\kappa$ B的抑制因子I $\kappa$ B进一步减少,p65亚基核转位增加,表明降低14-3-3 $\epsilon$ 表达水平后能下调NF- $\kappa$ B的活性。与预期一致的是,下调14-3-3 $\epsilon$ 表达后,TNF- $\alpha$ 等细胞因子分泌水平也增高,表明14-3-3 $\epsilon$ 对TLR2/NF- $\kappa$ B信号通路具有抑制作用,参与对细胞因子的负向调控。为了从另一层面证实该假说,我们在细胞内通过转染表达质粒使其过表达14-3-3 $\epsilon$ ,结果发现TNF- $\alpha$ 和IL-6的水平明显低于对照质粒组,表明14-3-3 $\epsilon$ 通过和TLR2结合,阻断了下游信号级联从而抑制NF- $\kappa$ B的活化,最终减少了NTHi感染后细胞因子分泌。随后我们的动物体内试验也进一步证明了这一点,即小鼠呼吸道NTHi感染能上调14-3-3 $\epsilon$ 表达,并能显著增高支气管肺泡灌洗液中细胞因子浓度并诱导明显的肺部炎症反应。抑制14-3-3 $\epsilon$ 活性后,肺泡灌洗液中细胞因子浓度有所增高,肺部炎症反应进一步增强,表明14-3-3 $\epsilon$ 能够与TLR2结合,抑制下游NF- $\kappa$ B通路进而减轻炎症反应。但在本研究过程中,并未对14-3-3 $\epsilon$ 所结合的TLR2的精确位点加以鉴定。有研究显示14-3-3 $\epsilon$ 还可结合至TLR2信号通路中的适配分子MyD88和Mal,以及其下游的TRAF3和TRAF6<sup>[21]</sup>上。由此可见,14-3-3 $\epsilon$ 对炎症信号的抑制作用可能具有多向性,而NTHi除了能被TLR2识别外,TLR4也是重要的模式识别受体,TLRs的多样性决定了下游通路的复杂性,也是未来重要的研究方向。

综上所述,本研究初步证实14-3-3 $\epsilon$ 能够通过TLR2/NF- $\kappa$ B信号通路负向调控NTHi诱导人支气管上皮细胞分泌促炎因子TNF- $\alpha$ 和IL-6。但由于NTHi菌株极易发生基因变异,导致不同血清型或分离株之间表面毒力因子存在较大的异质性,因此本研究使用的标准株并不一定能全面反映所有菌株的特性。此外,炎症反应的调控机制十分复杂,

往往涉及到多条信号通路分子, 因此在未来的研究中我们将采用其他不同类型的NTHi开展更深入研究, 以便进一步阐明宿主免疫系统和NTHi相互作用机制。

### 参考文献 (References)

- [1] CARDINES R, GIUFRE M, POMPILIO A, et al. *Haemophilus influenzae* in children with cystic fibrosis: antimicrobial susceptibility, molecular epidemiology, distribution of adhesins and biofilm formation [J]. *Int J Med Microbiol*, 2012, 302(1): 45-52.
- [2] TSANG R, ULANOVA M. The changing epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* disease: emergence and global presence of serotype a strains that may require a new vaccine for control [J]. *Vaccine*, 2017, 35(33): 4270-5.
- [3] 孔令印, 张耀洲. 14-3-3蛋白家族及其临床应用研究进展[J]. *生物工程学报*(KONG L Y, ZHANG Y Z. The basics of 14-3-3 protein family and research progress on therapeutic applications of 14-3-3 protein [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*), 2007, 23(5): 781-8.
- [4] LU K, RUI G, LIU F, et al. 14-3-3ε is a nuclear matrix protein, and its altered expression and localization are associated with curcumin-induced apoptosis of MG-63 cells [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(1): 338-46.
- [5] HE Q Q, WU X, LIU X P, et al. 14-3-3 epsilon plays an important role in testicular germ cell apoptosis: a functional proteomic study of experimental varicocele [J]. *Andrologia*, 2019, 51(6): e13275.
- [6] NEFLA M, SUDRE L, DENAT G, et al. The pro-inflammatory cytokine 14-3-3ε is a ligand of CD13 in cartilage [J]. *J Cell Sci*, 2015, 128(17): 3250-62.
- [7] BROWN M A, MORGAN S B, DONACHIE G E, et al. Epithelial immune activation and intracellular invasion by non-typeable *Haemophilus influenzae* [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13: 1141798.
- [8] PICKERING J, TEO T H, THORNTON R B, et al. *Bacillus licheniformis* in geogenic dust induces inflammation in respiratory epithelium [J]. *Environ Res*, 2018, 164: 248-54.
- [9] PICKERING J, SMITH-VAUGHAN H, BEISSBARTH J, et al. Diversity of nontypeable *Haemophilus influenzae* strains colonizing Australian aboriginal and non-aboriginal children [J]. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(5): 1352-7.
- [10] KNOWLES M R, BOUCHER R C. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(5): 571-7.
- [11] LI J D. Exploitation of host epithelial signaling networks by respiratory bacterial pathogens [J]. *J Pharmacol Sci*, 2003, 91(1): 1-7.
- [12] AITKEN A. 14-3-3 proteins on the MAP [J]. *Trends Biochem Sci*, 1995, 20(3): 95-7.
- [13] LALLE M, VISCONTI S, MARRA M, et al. ZmMPK6, a novel maize MAP kinase that interacts with 14-3-3 proteins [J]. *Plant Mol Biol*, 2005, 59(5): 713-22.
- [14] CAO S, CONG F, TAN M, et al. 14-3-3ε acts as a proviral factor in highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection [J]. *Vet Res*, 2019, 50(1): 16.
- [15] FU W, HETTINGHOUSE A, CHEN Y, et al. 14-3-3 epsilon is an intracellular component of TNFR2 receptor complex and its activation protects against osteoarthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2021, 80(12): 1615-27.
- [16] FU W, HU W, YI Y S, et al. TNFR2/14-3-3ε signaling complex instructs macrophage plasticity in inflammation and autoimmunity [J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(16): e144016
- [17] BYEON S E, YI Y S, OH J, et al. The role of Src kinase in macrophage-mediated inflammatory responses [J]. *Mediators Inflamm*, 2012, 2012: 512926.
- [18] BAO Y, ZHENG J, HAN C, et al. Tyrosine kinase Btk is required for NK cell activation [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(28): 23769-78.
- [19] LEE I T, WANG S W, LEE C W, et al. Lipoteichoic acid induces HO-1 expression via the TLR2/MyD88/c-Src/NADPH oxidase pathway and Nrf2 in human tracheal smooth muscle cells [J]. *J Immunol*, 2008, 181(7): 5098-110.
- [20] MILLERAND M, SUDRE L, NEFLA M, et al. Activation of innate immunity by 14-3-3ε, a new potential alarmin in osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2020, 28(5): 646-57.
- [21] WANG T, WEI F, JIANG Z, et al. Influenza virus NS1 interacts with 14-3-3ε to antagonize the production of RIG-I-mediated type I interferons [J]. *Virology*, 2022, 574: 47-56.
- [22] 袁静蕾, 廖志权, 张瑞, 等. 选择性自噬受体TAX1BP1的研究进展及意义[J]. *中国细胞生物学学报*(YUAN J L, LIAO Z Q, ZHANG R, et al. Research progress and significance of selective autophagy receptor TAX1BP1 [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2022, 44(3): 492-9.