

基础研究论著

模拟微重力下小鼠巨噬细胞感染空间诱变大肠埃希菌对炎症因子分泌和核因子 κ B 表达的影响

裴雪枫¹, 张晓毅², 姚静³, 刘蓉³, 刘长庭⁴, 王静宇⁵, 袁明⁵¹锦州医科大学研究生学院 火箭军总医院基地, 辽宁锦州 121001; ²火箭军总医院 泌尿外科, 北京 100088;³石河子大学医学院, 新疆石河子 832000; ⁴解放军总医院南楼 呼吸科, 北京 100853; ⁵中国航天员科研训练中心 航天医学基础与应用国家重点实验室, 北京 100094

摘要: **目的** 研究模拟微重力状态下小鼠巨噬细胞感染空间诱变大肠埃希菌(T1-13)后炎症反应及NF- κ B表达的变化。**方法** 巨噬细胞随机分为4组: 对照组(Con)、对照染菌组(Con+T1-13)、模拟微重力组(SM)、模拟微重力染菌组(SM+T1-13)。细胞回转器模拟微重力效应, RT-qPCR检测细胞内炎症因子及NF- κ B p65 mRNA表达; 液相悬浮芯片多因子检测平台技术及硝酸还原酶法检测细胞培养液中炎症因子和总一氧化氮浓度变化; Western blot检测细胞中NF- κ B信号通路相关蛋白表达。**结果** 染菌后, 对照染菌和模拟微重力染菌组细胞分泌的炎症因子浓度、细胞内炎症因子及NF- κ B p65 mRNA表达均显著升高; 与对照组相比, 模拟微重力组细胞培养液中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6分别升高168%、77.6%和187%; 与对照染菌组相比, 模拟微重力染菌组分泌炎症因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6分别升高1.06%、6.78%、27.1%。巨噬细胞感染空间诱变大肠埃希菌后NF- κ B p65 mRNA表达量显著升高, 但是蛋白表达量显著下降, 细胞内NF- κ B激酶抑制剂 β (IKK β)、核因子 κ B激酶抑制剂 α (IKK α)、磷酸化NF- κ B p65蛋白表达量也显著下降。**结论** 模拟微重力可诱导巨噬细胞炎症因子分泌升高, 空间诱变大肠埃希菌刺激后这种升高反应受到抑制, 可能与NF- κ B蛋白表达下调有关。

关键词: 空间诱变大肠埃希菌; 模拟微重力; 巨噬细胞; 核因子 κ B; 炎症因子

中图分类号: R 85 文献标志码: A 文章编号: 2095-5227(2017)05-0459-05 DOI: 10.3969/j.issn.2095-5227.2017.05.020

网络出版时间: 2017-03-24 11:08 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3275.R.20170324.1108.002.html

Effects of infection with space mutagenic E.coli on the inflammatory cytokines secretion and NF- κ B expression in RAW264.7 macrophages under simulated microgravity

PEI Xuefeng¹, ZHANG Xiaoyi², YAO Jing³, LIU Rong³, LIU Changting⁴, WANG Jingyu⁵, YUAN Ming⁵

¹Postgraduate School, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China; ²Department of Urinary, Chinese PLA General Hospital of Rocket Army, Beijing 100088, China; ³The Medical College of Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; ⁴Department of Geriatric Respiratory, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ⁵The Key Laboratory of Space Medicine Fundamentals and Application, China Astronaut Research and Training Center, Beijing 100094, China
Corresponding author: YUAN Ming. Email: yuanming7711@aliyun.com; ZHANG Xiaoyi. Email: doctorzhxy@163.com

Abstract: Objective To explore the effects of infection with space mutagenic E.coli on secretion of inflammatory cytokines and NF- κ B expression in RAW264.7 macrophages under simulated microgravity. **Methods** RAW264.7 macrophages were randomly divided into four groups as Control group(Con), Conrol+T1-13 group(Con+T1-13), Simulated microgravity group (SM) and Simulated microgravity + T1-13 group(SM+T1-13), in which T1-13 is space mutagenic E.coli. A clinostat was used to simulate microgravity on cultured macrophages, then RAW264.7 macrophages were co-cultured with T1-13 E.coli in Con+T1-13 and SM+T1-13 groups for 6 hours. The mRNA expression of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and NF- κ B p65 in macrophages were determined by RT-qPCR, the cytokines concentrations of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in culture medium were determined by multiplex immunoassay of Luminex xMAP platform, and the total Nitric Oxide Assay Kit was used to detect total NO in cell culture medium. Western Blot was used to detect the protein expression of NF- κ B pathway related molecules. **Results** Compared with Con group, TNF- α , IL-1 β and IL-6 concentration in SM group increased by 168%, 77.6% and 187%, respectively. While compared with Con+T1-13 group, TNF- α , IL-1 β and IL-6 concentration in SM+T1-13 group only increased by 1.06%, 6.78% and 27.1%, respectively. After infected by space mutagenic E.coli, the NF- κ B p65 mRNA expression in RAW264.7 increased significantly. Interestingly, the protein expression of IKK β , IKK α and Phospho-NF- κ B p65 and NF- κ B p65 decreased significantly. **Conclusion** Simulated microgravity induces the increased cytokine secretion in macrophages, which can

收稿日期: 2017-01-05

基金项目: 国家重点基础研究发展计划课题(2014CB744404)

Supported by the National basic research program of China (2014CB744404)

作者简介: 裴雪枫, 男, 在读硕士。研究方向: 空间微生物。Email: doctorpeixuefeng@163.com

通信作者: 袁明, 男, 博士, 副研究员。Email: yuanming7711@aliyun.com; 张晓毅, 男, 博士, 主任医师, 硕士生导师。Email: doctorzhxy@163.com

be inhibited by infection of space mutagenic E.coli. Such inhibition effects might be related with decreased protein expression of NF- κ B.

Keywords: space mutagenic E.coli; simulated microgravity; macrophages; NF- κ B; inflammatory cytokines

研究表明,在空间特殊环境中细菌基因发生不同程度改变,毒力增加,生长速度加快^[1-7],使得太空感染性疾病的防控更为复杂。巨噬细胞是免疫系统重要的组成部分,对微重力敏感^[8-9]。我们前期研究发现以毒力增强的空间诱变大肠埃希菌感染尾吊模拟失重小鼠后可致小鼠免疫功能降低,炎症反应增强^[10]。但目前针对微重力下感染毒力增强的空间诱变菌后巨噬细胞的炎症反应机制尚无报道。本研究拟通过模拟微重力后空间诱变大肠埃希菌感染的小鼠巨噬细胞 RAW264.7,观察在模拟微重力效应与空间诱变细菌毒力增强的双重因素下巨噬细胞的炎症反应特征。

材料和方法

1 空间诱变大肠埃希菌 空间诱变型大肠埃希菌 T1-13 由解放军总医院南楼呼吸科提供,该菌株搭载神舟十号飞船在轨飞行 15 d,返回后测序分析发现存在耐药及毒力基因突变,动物实验结果表明毒力增强^[11]。

2 实验试剂和仪器 小鼠巨噬细胞 RAW264.7(美国模式培养物集存库 ATCC);胎牛血清、DMEM 培养基、青霉素、链霉素、BCA 检测试剂盒(北京赛默飞世尔生物化学制品有限公司);总 RNA 提取试剂(RNAiso plus)、反转录试剂盒、核酸凝胶染料荧光定量试剂盒(大连宝生物工程有限公司);液相悬浮芯片多因子检测试剂盒(联科生物技术有限公司);总一氧化氮检测试剂盒(碧云天生物技术公司);磷酸化 NF- κ B p65 抗体、NF- κ B p65 抗体、IKK α 抗体、IKK β 抗体、GAPDH、辣根过氧化物酶标记的二抗(美国 CST 公司);CO₂ 培养箱;电热恒温培养箱(上海森信实验仪器有限公司);细胞回转器(中国科学院生物物理研究所);超净工作台(吴江市净化总设备厂);PCR 扩增仪(艾本德中国有限公司);电泳仪、电转仪(美国伯乐公司);天能 5200 成像系统(北京原平皓生物科技有限公司)。

3 细胞培养 RAW264.7 细胞复苏,在 5% CO₂、37℃ 恒温培养箱中培养。随机分为 4 组:对照组(Con),对照染菌组(Con + T1-13),模拟微重力组(SM),模拟微重力染菌组(SM + T1-13)。

4 细胞回转模拟微重力处理 模拟微重力组和模拟微重力染菌组细胞灌满培养液,塞紧瓶塞,排空气泡,置于细胞回转器上在 37℃ 恒温箱中培养,转速 30 r/min^[12,12]。对照组和对照染菌组也灌满培

养液,置于 37℃ 恒温箱中静置培养,72 h 后,均更换为无双抗培养基 5 ml/瓶。

5 空间诱变大肠埃希菌和细胞共培养 空间诱变大肠埃希菌 T1-13 菌株配置成 3 × 10⁷ CFU/ml 浓度菌液备用,细胞更换无双抗培养基后,对照染菌组和模拟微重力染菌组细胞立即加入空间诱变大肠埃希菌 0.5 ml/瓶,继续培养 6 h 收集细胞培养液,提取各组细胞总 RNA 和蛋白。

6 细胞培养液中炎症因子浓度测定 收集细胞培养液,使用联科生物 eBioscience Mouse Th1/Th2 Extended 11plex ProcartaPlex™ 多因子试剂盒以液相悬浮芯片多因子检测系统检测细胞培养液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的浓度;按碧云天总一氧化氮检测试剂盒的操作步骤检测细胞培养液中总 NO 浓度。

7 RT-qPCR 检测细胞内炎症因子及 NF- κ B p65 mRNA 表达 将各组细胞以 RNAiso plus 提取细胞总 RNA,以反转录试剂盒反转录为 cDNA 后进行 Real-time qPCR,分别检测细胞中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、NF- κ B p65 mRNA 的表达,PCR 引物序列为内参 GAPDH-F:5'-ATCTCCTTGGTCTGCTG CAC-3',GAPDH-R:5'-GGCCTCACCCCATTTGAT G-3';TNF- α -F:5'-CGAGTGACAAGCCTGTAGCC-3',TNF- α -R:5'-AAGAGAACCTGGGAGTAGACA AG-3';IL-1 β -F:5'-TGACGGACCCCAAAGATG AAGG-3';IL-1 β -R:5'-CCACGGGAAAGACACAG GTAGC-3';IL-6-F:5'-CCGGAGAGGAGACTTCAC AG-3';IL-6-R:5'-TCCACGATTTCCAGAGAAC-3';NF- κ B p65-F:5'-CCGGAGAGGAGACTTCACA G-3';NF- κ B p65-R:5'-ACTGGAAGCACGGATGA CAG-3'。反应程序设置:95℃ 预变性 30 s;95℃ 变性 5 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 20 s,40 个循环;95℃ 15 s、60℃ 15 s、95℃ 15 s 进行溶解曲线分析。采用 2^{- $\Delta\Delta$} 法分析目标基因的表达变化。

8 Western blot 检测细胞内 NF- κ B 信号通路相关蛋白表达 收集各组细胞提取总蛋白,采用二辛可宁酸法(BCA 法)检测蛋白浓度。蛋白溶液加入上样缓冲液后 100℃ 水浴 5 min,进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后转印至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,之后加入稀释好的核因子 κ B p65、磷酸化 NF- κ B p65、IKK α 、IKK β 及内参抗体甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH),4℃ 孵育过夜。加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入免疫印迹化学发光试剂避光反应 2 min,

以天能 5200 成像系统显像, 并以 Tanon Gis 软件进行蛋白条带灰度分析。目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白条带面积灰度值 / 内参条带面积灰度值。
9 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 GraphPad Prism5.0 分析软件对实验数据进行统计分析, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Newman-Keuls 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 模拟微重力下 RAW264.7 巨噬细胞感染空间诱变大肠埃希菌后细胞培养液中炎症因子度变化
 与 Con 组相比, Con+T1-13 组和 SM+T1-13 组细胞培养液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、NO 均显著升高 ($P < 0.001$), SM 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 NO 分别升高了 168%、77.6%、187% 和 9.78%; 与 SM 组相比, SM + T1-13 组细胞培养液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、NO 均显著升高 ($P < 0.001$)(表 1)。与 Con + T1-13 组相比, SM + T1-13 组细胞培养液中分泌炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 NO 分别升高了 1.02%、6.78%、27.1% 和 13%。

表 1 模拟微重力下巨噬细胞染菌后细胞培养液中炎症因子浓度变化

Tab. 1 Changes of inflammatory cytokines concentration in four groups (n=6)

	TNF- α (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	NO(μ mol/L)
Con	490.9 \pm 25.9	0.76 \pm 0.2	1.46 \pm 0.19	27.6 \pm 3.6
Con+T1-13	3 813 \pm 295.8 ^b	5.16 \pm 0.6 ^b	1 034 \pm 237.6 ^b	74.6 \pm 6 ^b
SM	1 316 \pm 38.4 ^a	1.35 \pm 0.2	4.19 \pm 0.25	30.3 \pm 4.4
SM+T1-13	3 852 \pm 300.9 ^{b/c}	5.51 \pm 0.26 ^{b/c}	1 314 \pm 138.9 ^{b/c}	84.3 \pm 11 ^{b/c}

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.001$, vs control group; ^c $P < 0.001$, vs SM group

2 模拟微重力下小鼠巨噬细胞感染空间诱变大肠埃希菌后炎症因子及 NF- κ B p65 mRNA 表达变化
 与 Con 组相比, Con + T1-13 组和 SM + T1-13 组巨噬细胞 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、NF- κ B p65 mRNA 表达均显著升高 ($P < 0.01$), SM 组上述指标表达有升高趋势但无统计学意义。与 SM 组相比, SM + T1-13 组巨噬细胞 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、NF- κ B p65 mRNA 表达均显著升高 ($P < 0.01$, 见图 1)。与 Con + T1-13 组相比, SM + T1-13 组 NF- κ B p65 mRNA 表达升高了 14.75%。

3 模拟微重力下 RAW264.7 巨噬细胞感染空间诱变大肠埃希菌后 NF- κ B 通路关键分子蛋白表达变化
 与 Con 组相比, Con + T1-13 组和 SM + T1-13 组 IKK β 、IKK α 、磷酸化 NF- κ B p65、NF- κ B p65 蛋白表达均显著下降 ($P < 0.01$), SM 组上述指标差异无统计学意义; 与 SM 组相比, SM + T1-13

组 IKK β 、IKK α 、P-NF- κ B p65、NF- κ B p65 均显著下降 ($P < 0.01$)(图 2)。与 Con + T1-13 组相比, SM + T1-13 组核因子 κ B p65 升高了 45.4%, P-NF- κ B p65 升高了 219%。

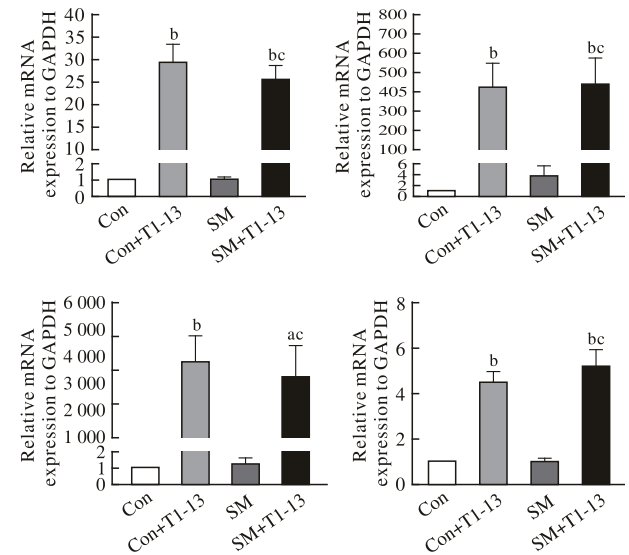


图 1 模拟微重力下巨噬细胞染菌后 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、NF- κ B p65 mRNA 表达变化 (n=6)

Fig.1 Changes of mRNA expressions of TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、NF- κ B p65 in four groups (n=6) (^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs control group; ^c $P < 0.01$, vs SM group)

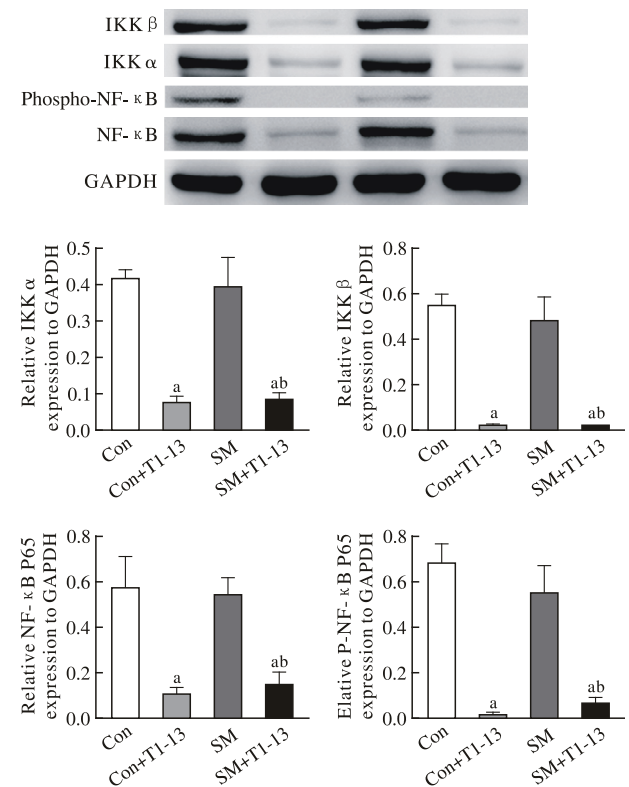


图 2 模拟微重力下巨噬细胞染菌后 NF- κ B 通路关键分子蛋白表达情况 (n=6)

Fig.2 The protein expression of key molecule from NF- κ B pathway in RAW264.7 macrophages in four groups (n=6) (1: Con; 2: Con+T1-13; 3: SM; 4: SM+T1-13. ^a $P < 0.01$, vs Con group; ^b $P < 0.01$, vs SM group)

讨 论

大量航天医学研究表明,失重可造成航天员的免疫功能下降,且随时间的延长程度加重^[12]。巨噬细胞是免疫系统的重要组成部分,为深入研究模拟微重力下宿主免疫细胞和空间诱变菌相互作用的机制,实验共培养空间诱变大肠埃希菌和模拟微重力处理后的巨噬细胞,以研究巨噬细胞炎性因子分泌和 NF- κ B 表达变化。

本研究发现单纯模拟微重力处理,巨噬细胞培养液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 分别升高 168%、77.6%、187%,说明巨噬细胞本身对模拟微重力比较敏感,模拟微重力即可导致巨噬细胞炎性因子分泌发生变化。但当以空间诱变大肠埃希菌感染细胞时,模拟微重力下的巨噬细胞分泌的炎性因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 仅较相同条件感染的对照组细胞升高了 1.02%、6.78%、27.1%,说明模拟微重力条件下,受空间诱变大肠埃希菌感染后,巨噬细胞分泌 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的功能受到抑制。

巨噬细胞感染大肠埃希菌时,细胞膜上 TLR 受体识别病原体相关分子模式后,IKK 复合体被激活,IKK α 、IKK β 是 IKK 复合体的两个催化亚基,进而激活 NF- κ B 信号通路,启动下游抗感染相关基因和炎性因子的转录。但是我们发现巨噬细胞感染大肠埃希菌 6 h 后 NF- κ B p65 mRNA 显著升高,而磷酸化 NF- κ B p65 蛋白和总 NF- κ B p65 蛋白却显著降低,NF- κ B 信号通路中的 IKK α 、IKK β 蛋白水平也显著降低。王佳贺等^[13]的研究中发现人巨噬细胞 NF- κ B 的表达随着大肠埃希菌浓度的增加而逐渐降低。张丽和邵峰等^[14]研究中发现大肠埃希菌效应蛋白 NleE(non-LEE encoded effector E)通过半胱氨酸甲基化修饰来抑制感染诱导 NF- κ B 炎症通路的激活,敲除 NleE 基因的 EPEC 菌株感染时不能抑制 NF- κ B 通路^[15]。效应蛋白借助于其强大和特异的酶学活性来改变宿主信号通路中重要蛋白质的结构和功能,从而使宿主无法通过正常的信号转导来对抗病原菌的入侵和实现对病原菌的有效清除。Newton 等^[16]的研究中也发现大肠埃希菌通过三型分泌系统将效应蛋白 NleE 或 NleB 注入到宿主细胞内,阻止 NF- κ B p65 蛋白的翻译。Pallett 等^[17]的研究中提出肠致病性大肠埃希菌和肠出血性大肠埃希菌采用 3 型分泌系统在感染过程中操纵宿主的炎症反应,效应蛋白 NleE、NLEC 或 NleF 通过多种易位效应抑制 NF- κ B 信号通路。有

研究发现 NleE 作为一类新颖的 S-腺苷甲硫氨酸依赖的甲基转移酶,甲基化修饰 TAB2/3 锌指结构域中一个整合锌离子的半胱氨酸残基,使得锌指结构域失去锌离子,无法结合来自上游的泛素链信号,最终导致 NF- κ B 信号通路被病原菌抑制^[18]。

本实验中染菌组与非染菌组比较,磷酸化 NF- κ B p65 蛋白、总 NF- κ B p65 蛋白、IKK α 、IKK β 蛋白显著降低,推测空间诱变大肠埃希菌可能产生效应蛋白 NleE,通过半胱氨酸甲基化修饰,导致宿主细胞 NF- κ B 信号通路中重要蛋白质的翻译受到抑制。

综上所述,模拟微重力抑制了空间诱变大肠埃希菌感染后巨噬细胞炎性因子的分泌功能,同时伴有 NF- κ B 信号通路蛋白分子表达的下降,NF- κ B 蛋白水平表达受抑可能是导致模拟微重力后巨噬细胞感染空间诱变菌后炎性因子分泌功能下降的原因。

参考文献

- 1 Sonnenfeld G, Butel JS, Shearer WT. Effects of the space flight environment on the immune system [J]. Rev Environ Health, 2003, 18 (1): 1-17.
- 2 Chopra V, Fadl AA, Sha J, et al. Alterations in the virulence potential of enteric pathogens and bacterial-host cell interactions under simulated microgravity conditions [J]. J Toxicol Environ Health A, 2006, 69 (14): 1345-1370.
- 3 Takahashi A, Ohnishi K, Takahashi S, et al. The effects of microgravity on induced mutation in Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae [J]. Adv Space Res, 2001, 28 (4): 555-561.
- 4 Wilson JW, Ott CM, Ramamurthy R, et al. Low-Shear modeled microgravity alters the Salmonella enterica serovar typhimurium stress response in an RpoS-independent manner [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68 (11): 5408-5416.
- 5 Wilson JW, Ott CM, Honer zu Bentrup K, et al. Space flight alters bacterial gene expression and virulence and reveals a role for global regulator Hfq [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104 (41): 16299-16304.
- 6 保鹏涛,刘长庭.空间环境诱导几种常见细菌变异的蛋白质组学研究现状 [J].解放军医学院学报,2014,35(9):967-969.
- 7 邓忠伟,姜福全,崔彦.失重环境中感染性疾病的防治研究进展 [J].解放军医药杂志,2015,27(6):14-18.
- 8 罗海英,王重振,丰美福,等.微重力对免疫细胞影响的研究进展 [J].科学通报,2013,58(26):2679-2689.
- 9 Paulsen K, Tauber S, Dumrese C, et al. Regulation of ICAM-1 in cells of the monocyte/macrophage system in microgravity [J/OL]. https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/538786.
- 10 姚静,程江,裴雪枫,等.尾吊小鼠感染空间诱变大肠埃希菌炎症反应增强 [J].中国比较医学杂志,2016,26(3):1-5.
- 11 王俊锋,李天志,张学林,等.大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌空间诱变后的毒力变化分析 [J].解放军医学院学报,2016,37(6):644-646.
- 12 Crucian B, Stowe R, Mehta S, et al. Immune system dysregulation occurs during short duration spaceflight on board the space shuttle [J]. J Clin Immunol, 2013, 33 (2): 456-465.

(下转 477 页)

(上接462页)

- 13 王佳贺, 张毅, 周一军, 等. 大肠埃希菌感染与人巨噬细胞系 U937 细胞凋亡的关系及 NF- κ B 的变化 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2007, 16 (3): 288-292.
- 14 张丽, 邵峰. 病原菌效应蛋白翻译后修饰宿主免疫防御通路 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2014, 41 (10): 1047-1055.
- 15 邵峰. 病原细菌和宿主天然免疫系统相互拮抗的机制研究 [J]. 中国基础科学, 2012, 14 (1): 7-13.
- 16 Newton HJ, Pearson JS, Badea L, et al. The type III effectors NleE and NleB from enteropathogenic *E. coli* and OspZ from *Shigella* block nuclear translocation of NF- κ B p65 [J] . PLoS Pathog, 2010, 6 (5): e1000898.
- 17 Pallett MA, Berger CN, Pearson JS, et al. The type III secretion effector NleF of enteropathogenic *Escherichia coli* activates NF- κ B early during infection [J] . Infect Immun, 2014, 82 (11): 4878-4888.
- 18 Zhang L, Ding X, Cui J, et al. Cysteine methylation disrupts ubiquitin-chain sensing in NF- κ B activation [J] . Nature, 2011, 481 (7380): 204-208.