

β-连环蛋白在铜绿假单胞菌感染时的调节作用*

陈康^{1,2}, 傅强¹, 阙丽娟¹, 王霞¹, 孙世珺¹, 张秀明^{1△} (1. 广东省中山市人民医院检验医学中心 528403; 2. 南方医科大学附属南方医院, 广州 510515)

【摘要】目的 探讨在铜绿假单胞菌感染时 β-连环蛋白(β-catenin)对细菌感染引起的炎症反应和细菌清除的调节作用。**方法** 采用 Western-blot 和免疫荧光检测细菌感染前后 β-catenin 的表达;慢病毒感染后 Western-blot 检测 β-catenin 上调效果;实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测促炎性因子的表达;平板计数检测荷菌量。**结果** 在铜绿假单胞菌感染后,β-catenin 在巨噬细胞和中性粒细胞中的表达呈现一过性上调后逐渐降低;β-catenin 在细胞中抑制促炎因子的表达,并促进细菌清除。**结论** 在铜绿假单胞菌感染时 β-catenin 抑制炎症反应并促进细菌的清除。

【关键词】 β-连环蛋白; 铜绿假单胞菌; 炎症反应; 细菌清除

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.02.002 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2016)02-0147-03

Regulating role of β-catenin in Pseudomonas aeruginosa infection^{*} CHEN Kang^{1,2}, FU Qiang¹, KAN Li-juan¹, WANG Xia¹, SUN Shi-jun¹, ZHANG Xiu-ming^{1△} (1. Clinical Laboratory Medicine Center, Zhongshan Municipal People's Hospital, Zhongshan, Guangdong 528403, China; 2. Affiliated Southern Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

【Abstract】Objective To explore the regulating role of β-catenin in bacterial infection caused inflammation reaction and bacterial clearance after Pseudomonas aeruginosa infection. **Methods** Western-blot and immunofluorescence assay were used to determine the β-catenin expression in macrophage-like RAW264.7 cells and neutrophils before and after Pseudomonas aeruginosa infection; the upregulating effect of β-catenin after lentivirus infection was detected by Western-blot; the pro-inflammatory cytokine expression was examined by using real-time PCR(RT-PCR); the bacterial load was assessed by using the plate count assay. **Results** The β-catenin protein expression in Pseudomonas aeruginosa infected macrophages and neutrophils showed the transient upregulation and then was gradually decreased. β-catenin suppressed the expression of pro-inflammatory cytokines and promoted bacterial clearance in Pseudomonas aeruginosa infected macrophages and neutrophils. **Conclusion** β-catenin inhibits the inflammation reaction and enhances the bacterial clearance in Pseudomonas aeruginosa infection.

【Key words】 β-catenin; Pseudomonas aeruginosa; inflammation reaction; bacterial clearance

铜绿假单胞菌(PA)是革兰阴性条件致病菌,可引起医院获得性肺炎、急性化脓性角膜炎、烧伤伤口的感染及菌血症等。随着临床上抗菌药物的滥用和多重耐药菌株的出现,抗菌药物治疗不能达到满意的效果^[1]。因此,如何调动机体的免疫防御功能发挥抵抗细菌感染的作用成为治疗细菌感染的关注点。

β-连环蛋白(β-catenin)是一个多功能分子,参与调控细菌定植和机体炎症反应^[2-3],然而 β-catenin 在 PA 感染时的调控尚不清楚。β-catenin 是 Wnt/β-catenin 通路(经典 Wnt 通路)中核心分子。在没有 Wnt 配体时,β-catenin 被“降解复合体”磷酸化后降解。在 Wnt 与其受体结合后,β-catenin 不能被降解而在胞浆中累积并转移到胞核促进下游靶基因的转录。除了参与经典 Wnt 通路,β-catenin 与钙黏附素和 α-连环蛋白(α-catenin)构成细胞的黏附连接^[3]。尽管研究表明 β-catenin 在炎症性疾病如克罗恩病^[4]、类风湿关节炎^[5]中发挥调节作用,然而,β-catenin 在机体免疫应答中发挥抑炎作用还是促炎作用尚不清楚。此外,科学家发现经典 Wnt 通路中的一些分子包

括 Wnt2 和 Wnt11 可在沙门氏菌感染时在小肠上皮细胞中抑制细菌的定植,这些研究提示 β-catenin 可以抵抗细菌感染^[6-7]。然而,β-catenin 在 PA 感染时对荷菌量的调节尚不清楚。本研究发现,在 PA 感染时,β-catenin 在巨噬细胞和中性粒细胞中的表达呈一过性升高后随细菌刺激时间的延长逐渐下降。慢病毒感染过表达 β-catenin 后,β-catenin 抑制细菌感染引起的炎症反应并促进细菌的清除。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 人源胚胎肾细胞 293T 细胞和小鼠巨噬细胞样 RAW264.7 细胞在 Dulbecco's 改良培养基(DMEM)于 37℃,5%二氧化碳(CO₂)培养箱培养。小鼠骨髓来源中性粒细胞取自无特定病原(SPF)级 6 周龄雌性 C57BL/6 小鼠的骨髓细胞,应用 Percoll 密度梯度离心法分离中性粒细胞,在洛斯基帕克-1640(RPMI-1640)完全培养基于 37℃,5% CO₂ 培养箱培养。病毒感染时,在培养基中加入 8 g/mL 聚凝胺和慢病毒(MOI=10)感染细胞 6 h,更换培养基继续培养 24 h 后进行

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(81401645);广东省医学科研基金资助项目(B2014447);广东省中山市科技计划资助项目(2014A1FC098)。

作者简介:陈康,女,博士,主管检验技师,主要从事分子诊断与检验研究。△ 通讯作者,E-mail:zxm0760@163.com。

后续检测。

1.2 慢病毒的制备 氯化钙 (CaCl₂) 转染法应用三质粒包装系统进行慢病毒的制备。β-catenin 突变激活型质粒、相应空载质粒、包膜质粒及包装质粒购自 Addgene。转染时, 293T 细胞更换为含 25 mol/L 氯喹的 DMEM 完全培养基。10 g β-catenin 突变激活型质粒/相应空载质粒、3 g 包膜质粒和 10 g 包装质粒用无菌水调至 450 μL 后加入 50 μL 2.5 mmol/L CaCl₂ 后, 加入 500 μL 2×HBS 缓冲液, 充分混匀后逐滴加入每个细胞培养皿中。继续培养, 收集培养上清液。高速离心法收集病毒颗粒, 用 HIV p24 抗原检测试剂盒检测病毒滴度, 病毒滴度 >10⁹ TU/mL, -80 °C 保存备用。

1.3 蛋白质印迹法 (Western-blot) 为了检测慢病毒应用的有效性, 收集细胞悬液蛋白样品经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 后转膜至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉孵育以封闭非特异性结合, 4 °C 过夜孵育 β-catenin (1 : 1 000) 的一抗, 一抗孵育完成后孵育抗兔二抗 1 h。最后经曝光检测目的蛋白的水平。

1.4 实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-PCR) 用 TRIzol 法提取细胞 RNA。1 g RNA 转录成 cDNA, 用 SYBR Green 进行 RT-PCR 扩增。白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-1β (IL-1β)、巨噬细胞炎性蛋白-2 (MIP-2)、肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 和管家基因 β-actin 的引物序列, 见表 1。

表 1 PCR 扩增用引物序列

基因	引物序列 (5'~3')	
β-actin	GAT TAC TGC TCT GGC TCC TAG C	上游
	GAC TCA TCG TAC TCC TGC TTG C	下游
IL-6	CAC AAG TCC GGA GAG GAG AC	上游
	CAG AAT TGC CAT TGC ACA AC	下游
IL-1β	CGC AGC AGC ACA TCA ACA AGA GC	上游
	TGT CCT CAT CCT GGA AGG TCC ACG	下游
MIP-2	TGT CAA TGC CTG AAG ACC CTG CC	上游
	AAC TTT TTG ACC GCC CTT GAG AGT GG	下游
TNF-α	CAC AGA AAG CAT GAT CCG CGAC	上游
	TGC CAC AAG CAG GAA TGA GAA GAG	下游

1.5 免疫荧光检测 细胞滴入无菌载玻片上, 4% 甲醛固定后进行免疫荧光检测。载玻片先后孵育 β-catenin (1 : 500) 一抗 2 h, Cy3 标记二抗 1 h, 核染色剂 4, 6-联脒-2-苯基吡啶 (DAPI) 5 min, 封片后荧光显微镜下观察。

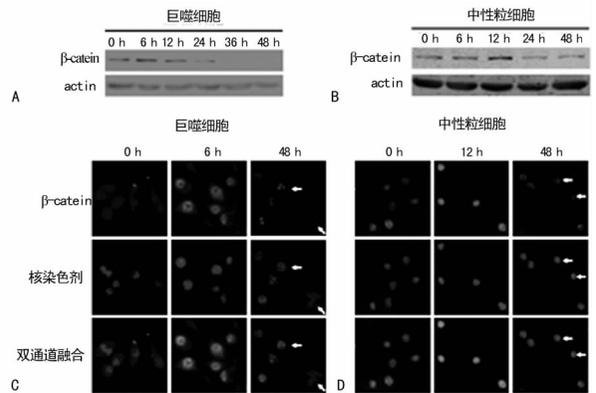
1.6 细菌杀伤实验 实验用 PA 为标准菌株 19660 购自美国典型菌种保藏中心 (ATCC)。实验步骤参照文献 [8], 具体如下。经慢病毒感染后细胞加入 PA (MOI=10) 1 h 后, 更换含 300 g/L 庆大霉素的完全培养基以杀伤细胞外细菌, 继续培养 1 h。收集 1 h 和 2 h 细胞悬液, 0.1% Triton-X 裂解细胞以释放细胞内细菌。细胞裂解液经 10 倍系列稀释后, 每个稀释梯度涂布于 3 块假单胞菌属分离用固体培养基上, 37 °C 过夜培养后计数菌落数, 以每 10⁶ 细胞数的菌落计数来表示细胞的荷菌量。

1.7 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件进行统计处理和分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 以 *P* < 0.05

为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PA 感染细胞后 β-catenin 的表达及亚细胞定位 在巨噬细胞和中性粒细胞中检测未感染及 PA 感染后不同时间点 β-catenin 水平的变化及亚细胞定位。实验结果显示, β-catenin 组成性表达于巨噬细胞 (图 1A 和 C, 0 h) 和中性粒细胞 (图 1B 和 D, 0 h) 中, 在细菌短时间刺激后 (图 1A 和 C, 巨噬细胞, 6 h; 图 1B 和 D, 中性粒细胞, 12 h) β-catenin 的表达达到最高并转位至核内 (表现为 Cy3 红色荧光和 DAPI 蓝色荧光的共定位), 但随着刺激时间的延长表达逐渐下调并于持续刺激后未见明显表达 (图 1A 和 C, 巨噬细胞, 48 h; 图 1B 和 D, 中性粒细胞, 48 h)。

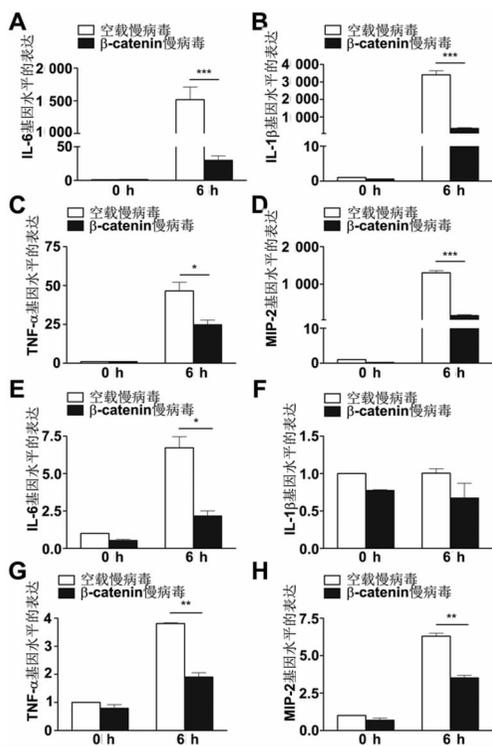


注: A、B 分别为在 PA 感染的巨噬细胞和中性粒细胞中用 Western-blot 法检测 β-catenin 蛋白水平的表达; C、D 分别为在 PA 感染前后的巨噬细胞和中性粒细胞中用免疫荧光的方法检测 β-catenin (红色荧光) 的亚细胞定位; 白色箭头所指是 β-catenin 表达降低的细胞, 放大倍数为 400 倍; 0、6、12、24、36、48 h 分别表示 PA 未感染及感染后时间。

图 1 PA 感染细胞中 β-catenin 的表达及亚细胞定位

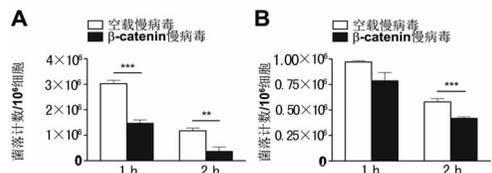
2.2 过表达 β-catenin 抑制促炎性因子的分泌 为了研究 β-catenin 的调节作用, 采用慢病毒感染细胞上调细胞内 β-catenin 的表达, 用 RT-PCR 的方法检测了 PA 感染后 β-catenin 过表达组和空载慢病毒组体外培养细胞中促炎性因子的表达。实验结果显示, 在巨噬细胞中过表达 β-catenin 在感染 6 h 抑制促炎性细胞因子 IL-6 (图 2A)、IL-1β (图 2B)、TNF-α (图 2C) 和 MIP-2 (图 2D) 的表达。在中性粒细胞中, 过表达 β-catenin 在 PA 感染 6 h 抑制促炎性细胞因子 IL-6 (图 2E)、TNF-α (图 2G) 和 MIP-2 (图 2H) 而对 IL-1β (图 2F) 的表达无明显作用。在巨噬细胞和中性粒细胞未受细菌感染时过表达 β-catenin 各细胞因子未见变化 (图 2A~H, 0 h)。此结果提示 β-catenin 在 PA 感染的巨噬细胞和中性粒细胞中抑制炎症反应。

2.3 过表达 β-catenin 降低细胞的荷菌量 细菌感染时, 过度炎症反应和细菌毒力是致病的主要因素。以上结果发现 β-catenin 在 PA 感染时发挥抑炎作用。随后, 用细菌平板计数法来检测在巨噬细胞和中性粒细胞中过表达 β-catenin 对细菌清除如何调节。实验结果显示, 在巨噬细胞中 (图 3A) β-catenin 组与空载慢病毒组相比在 PA 刺激 1 h 和 2 h 荷菌量都是明显降低。同样, 在中性粒细胞中 (图 3B) β-catenin 组与空载慢病毒组相比在细菌刺激 2 h (图 3B) 荷菌量明显降低而细菌刺激 1 h (图 3B) 时两组荷菌量无明显差异。此结果提示, β-catenin 在巨噬细胞和中性粒细胞中能够有效促进细菌的清除。



注:A~D、E~H 分别表示在 PA 感染前后的巨噬细胞和中性粒细胞中用 RT-PCR 法检测 β-catenin 慢病毒和空载慢病毒处理后 IL-6、IL-1β、TNF-α 和 MIP-2 基因水平的变化;与空载慢病毒组相比,* P<0.05,** P<0.01,*** P<0.001;0 h 和 6 h 分别表示 PA 未感染及感染后 6 h。

图 2 过表达 β-catenin 抑制促炎性因子的分泌



注:A、B 分别为在 PA 感染的巨噬细胞和中性粒细胞中用平板计数的方法检测细胞对细菌的杀伤作用。与空载慢病毒组相比,* P<0.05,** P<0.01,*** P<0.001;0 h 和 6 h 分别表示 PA 未感染及感染后 6 h。

图 3 过表达 β-catenin 降低细胞的荷菌量

3 讨论

作为经典 Wnt 通路中的核心分子,β-catenin 在众多病理和生理过程中发挥重要作用^[2-3]。然而,β-catenin 在调节机体炎症反应中的作用尚存争议。作者的研究发现 β-catenin 在 PA 刺激的巨噬细胞和中性粒细胞中抑制炎症反应并促进细菌清除,这为临床治疗 PA 感染提供备选方案。

以往研究发现 β-catenin 在沙门菌^[9]和结核分枝杆菌^[2]感染时表达下调,而在痢疾志贺菌^[10]刺激下表达上调。这些研究提示细菌感染引起 β-catenin 表达的不同取决于细菌的种类。作者研究发现,在 PA 刺激巨噬细胞和中性粒细胞后 β-catenin 表达呈一过性增高后随刺激时间的延长而逐渐下调。

PA 感染引起的 β-catenin 的下调提示 β-catenin 在该细菌感染时发挥调节作用。本研究发现,过表达 β-catenin 可在巨噬细胞中抑制促炎性细胞因子的分泌,这之前报道的 β-catenin 可抑制结核分枝杆菌刺激的巨噬细胞的炎症反应相一

致^[2]。然而,β-catenin 在中性粒细胞中的炎症调节作用未见报道。本研究发现,过表达 β-catenin 可在 PA 刺激的中性粒细胞中抑制促炎性因子的分泌(包括 IL-6、TNF-α 和 MIP-2),抑制细菌感染引起的炎症反应。炎症介质对宿主防御病原体的感染是必不可少的。同时本研究还发现 β-catenin 抑制炎症因子的分泌,同时促进细菌的清除,两者似乎相矛盾。以往报道为该结果提供了解释的依据。研究报道,β-catenin 可以在多种细胞类型中促进活性氧自由基^[11]和活性氮自由基^[12]的表达,两者是氧依赖性细菌清除机制中的重要分子;另外,β-catenin 下游转录因子-4(Tcf-4)可以促进防御素 5 和 6 的表达,防御素是非氧依赖性细菌清除机制的主要组成部分。这些研究提示,β-catenin 抑制炎症反应的同时,可能上调氧依赖性或非氧依赖性杀菌机制促进细菌的清除。

综上所述,β-catenin 在 PA 刺激的巨噬细胞和中性粒细胞中抑制炎症反应并促进细菌清除。本研究揭示了在 PA 感染时 β-catenin 的调节作用,为 PA 感染及感染引起的宿主炎症反应的治疗提供备选方案。

参考文献

- [1] Zou YM, Ma Y, Liu JH, et al. Trends and correlation of antibacterial usage and bacterial resistance: time series analysis for antibacterial stewardship in a Chinese teaching hospital (2009 - 2013) [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2015, 34(4): 795-803.
- [2] Schaale K, Neumann J, Schneider D, et al. Wnt signaling in macrophages: augmenting and inhibiting mycobacteria-induced inflammatory responses [J]. Eur J Cell Biol, 2011, 90(6/7): 553-559.
- [3] Silva-García O, Valdez-Alarcón JJ, Baizabal-Aguirre VM. The Wnt/beta-catenin signaling pathway controls the inflammatory response in infections caused by pathogenic bacteria [J]. Mediators Inflamm, 2014, 20(11): 310-318.
- [4] Koslowski MJ, Teltschik Z, Beisner J, et al. Association of a functional variant in the Wnt co-receptor LRP6 with early onset ileal Crohn's disease [J]. PLoS Genet, 2012, 8(2): e1002523.
- [5] Miao CG, Yang YY, He X, et al. Wnt signaling pathway in rheumatoid arthritis, with special emphasis on the different roles in synovial inflammation and bone remodeling [J]. Cell Signal, 2013, 25(10): 2069-2078.
- [6] Liu X, Lu R, Wu S, et al. Wnt2 inhibits enteric bacterial-induced inflammation in intestinal epithelial cells [J]. Inflamm Bowel Dis, 2012, 18(3): 418-429.
- [7] Liu X, Wu S, Xia Y, et al. Wingless homolog Wnt11 suppresses bacterial invasion and inflammation in intestinal epithelial cells [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011, 301(6): 992-1003.
- [8] Deng Q, Sun M, Yang K, et al. MRP8/14 enhances corneal susceptibility to Pseudomonas aeruginosa infection by amplifying inflammatory responses [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54(2): 1227-1234. (下转第 152 页)

病细胞表面细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的作用,可使细胞的迁移能力明显下降。白血病细胞黏附性的增强也是白血病细胞远处扩散及残留白血病细胞再次复发的重要原因^[6]。研究发现白血病患者血清 sICAM-1 和 sVCAM-1 水平与白血病的转归密切相关,血清 sICAM-1、sVCAM-1 水平显著升高,提示患者的预后不佳^[7-8]。因此,sICAM-1 和 sVCAM-1 的表达水平对白血病的转归及预后判断具有一定临床参考价值。

苦参是我国的一种传统中草药,其性苦、寒,具有清热燥湿、杀虫、利尿的功效。在干燥情况下可提取、分离出数十种药理活性成分,其中苦参碱是目前研究较多的一种生物碱。有研究显示,苦参碱对多种人肿瘤细胞增殖都具有明显抑制作用,可抑制细胞 DNA 合成和周期转换,诱导细胞早期凋亡等,被认为是一种较好的肿瘤诱导分化药物^[9-10]。临床研究发现,苦参注射液与临床化疗药物联用可有效逆转白血病细胞的耐药性,减少药物不良反应,缓解肿瘤疼痛,有效改善患者的生活质量^[11]。既往研究发现,苦参碱可抑制白血病细胞对多种炎性细胞因子的表达和分泌^[12],结合临床上苦参注射液广泛用于肝硬化、病毒性肝炎、皮肤及妇科炎症等的治疗,推测苦参碱的抗白血病作用可能与其免疫调节作用和抗炎性介质作用有关。

本研究结果显示急性白血病患者较健康对照者具有较高的血清 sICAM-1、sVCAM-1 水平,差异有统计学意义($P < 0.05$),单纯药物常规化疗或联用苦参注射液治疗均可明显降低患者血清中两种黏附分子的表达水平,其中苦参治疗组 sICAM-1、sVCAM-1 水平下降程度明显高于常规化疗组,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示 sICAM-1、sVCAM-1 与白血病的发生具有一定相关性,常规化疗药物可有效降低白血病患者血清中这两种黏附分子的表达水平,sICAM-1、sVCAM-1 可以作为化疗疗效判断的参考指标。苦参则可协同增强上述化疗药物对 sICAM-1、sVCAM-1 水平的降低作用。从临床治疗效果比较发现,苦参治疗组治疗有效率为 90.00%,高于常规化疗组的 67.67%,差异有统计学意义($P < 0.05$),也进一步验证了苦参在急性白血病中的治疗作用。

综上所述,临床联用苦参注射液可以通过降低急性白血病患者体内 sICAM-1、sVCAM-1 水平,改善常规化疗药物的临床疗效,抑制白血病的转归。

参考文献

[1] 朱飞跃,张卓,曹朝晖,等.黄芪对急性白血病患者血清黏

(上接第 149 页)

[9] Zhang YG,Wu S,Xia Y,et al. Axin1 prevents Salmonella invasiveness and inflammatory response in intestinal epithelial cells[J]. PLoS One,2012,7(4):e34942.

[10] Raja SB,Murali MR,Devaraj H,et al. Differential expression of gastric MUC5AC in colonic epithelial cells; TFF3-wired IL1 beta/Akt crosstalk-induced mucosal immune response against Shigella dysenteriae infection[J]. J Cell Sci,2012,125(Pt 3):703-713.

[11] Jiang S,Zhu L,Tang H,et al. Ape1 regulates WNT/beta-

附分子水平影响的临床研究[J]. 现代生物医学进展,2007,7(3):384-386.

[2] 刘健,欧阳清.急性白血病患者血清乳酸脱氢酶和 α -羟丁酸脱氢酶测定的临床意义[J]. 检验医学与临床,2011,8(1):69-70.

[3] 崔中光,吴春梅,汪洪毅,等.多发性骨髓瘤病人 sICAM-1 检测及临床意义[J]. 青岛大学医学院学报,2009,15(6):104-105.

[4] 居小萍,彭敏,徐小平,等.急性白血病细胞黏附分子的表达[J]. 中华血液学杂志,2001,23(11):581-583.

[5] 刘廷析,刘秀芳,向建平,等.急性髓系白血病细胞侵袭能力与黏附分子表达关系探讨[J]. 中华血液学杂志,1997,18(1):29-32.

[6] Si MY,Fan ZC,Li YZ,et al. The prognostic significance of serum and cerebrospinal fluid MMP-9, CCL2 and sVCAM-1 in leukemia CNS metastasis[J]. J Neurooncol,2015,122(2):229-244.

[7] 李学刚,侯丽君.复发性急性白血病患者血清和骨髓基质细胞培养上清液中血管细胞黏附分子-1 的变化[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2010,14(6):1101-1104.

[8] 吴凯,谢朝阳.急性髓细胞白血病患者血清 sICAM-1 和 sVCAM-1 水平变化及临床应用[J]. 海南医学院学报,2008,14(4):322-326.

[9] Zhang S,Zhang Y,Zhuang Y,et al. Matrine induces apoptosis in human acute myeloid leukemia cells via the mitochondrial pathway and Akt inactivation[J]. PLoS One,2012,7(10):e46853.

[10] Sun M,Cao H,Sun L,et al. Antitumor activities of kushen; literature review[J]. Evid Based Complement Alternat Med,2012,26(17):1744-1778.

[11] 马悦,张启伟,王智民,等.复方苦参注射液研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(23):213-215.

[12] Zhang L,Zhang H,Zhu Z,et al. Matrine regulates immune functions to inhibit the proliferation of leukemic cells[J]. Int J Clin Exp Med,2015,8(4):5591-6000.

(收稿日期:2015-08-05 修回日期:2015-10-01)

catenin signaling through its redox functional domain in pancreatic cancer cells[J]. Int J Oncol,2015,47(2):610-620.

[12] Ding H,Keller KC,Martinez IK,et al. NO-beta-catenin crosstalk modulates primitive streak formation prior to embryonic stem cell osteogenic differentiation[J]. J Cell Sci 2012,125(Pt 22):5564-5577.

(收稿日期:2015-07-14 修回日期:2015-09-08)