

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.15.008

β-catenin 调控 LL-37 促进铜绿假单胞菌的清除^{*}

傅 强, 王伟佳, 黄福达, 缪丽韶, 杨山虹, 陈 康[△]
广东省中山市人民医院检验医学中心, 广东中山 528403

摘 要:目的 探讨 β-连环蛋白(β-catenin)促进铜绿假单胞菌清除的机制。方法 在过表达 β-catenin 的小鼠巨噬样 RAW264.7 细胞和骨髓来源巨噬细胞中,铜绿假单胞菌感染后,采用平板计数法检测细菌的清除情况;在过表达 β-catenin 的 RAW264.7 细胞和骨髓来源巨噬细胞中,铜绿假单胞菌感染前后,采用实时荧光定量聚合酶链反应(Real-time PCR)的方法检测抗菌肽 LL-37 基因的表达;在过表达 β-catenin 的 RAW264.7 细胞和骨髓来源巨噬细胞中,应用 LL-37 小干扰 RNA(siRNA)沉默 LL-37,铜绿假单胞菌感染后,采用平板计数法检测 LL-37 回复 β-catenin 介导的细菌清除作用。结果 在 RAW264.7 细胞和骨髓来源巨噬细胞中,β-catenin 促进铜绿假单胞菌的清除;在 RAW264.7 细胞和骨髓来源巨噬细胞中,铜绿假单胞菌感染后,β-catenin 促进 LL-37 基因的表达;进一步实验发现,LL-37 可回复 β-catenin 介导的细菌清除作用。结论 β-catenin 通过调控 LL-37 促进铜绿假单胞菌的清除。

关键词:β-连环蛋白; 铜绿假单胞菌; LL-37; 细菌清除

中图法分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)15-2173-04

β-catenin promotes elimination of *Pseudomonas aeruginosa* via regulating LL-37^{*}

FU Qiang, WANG Weijia, HUANG Fuda, MIAO Lishao, YANG Shanhong, CHEN Kang[△]
Laboratory Medicine Center, Zhongshan Municipal Peoples' Hospital,
Zhongshan, Guangdong 528403, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of β-catenin in promoting to elimination *Pseudomonas aeruginosa*. **Methods** In over-expressed β-catenin macrophage-like mouse RAW264.7 cells and bone marrow in over expressed β-catenin RAW264.7 cells and bone marrow derived macrophages derived macrophages, the bacterial killing after *Pseudomonas aeruginosa* infection was counted by the plate count method; the antimicrobial peptide LL-37 gene expression before and after *Pseudomonas aeruginosa* infection was detected by adopting the Real-time PCR; in over-expressed β-catenin RAW264.7 cells and bone marrow derived macrophages, after silencing LL-37 by LL-37 siRNA and *Pseudomonas aeruginosa* infection, the plate counting method was used to detect the β-catenin mediated bacterial elimination effect reverted by LL-37. **Results** β-catenin promoted the elimination of *Pseudomonas aeruginosa* in RAW264.7 cells and bone marrow derived macrophages; β-catenin promoted the expression of LL-37 gene in RAW264.7 cells and bone marrow derived macrophages after *Pseudomonas aeruginosa* infection; the further experiment found that LL-37 could revert β-catenin-mediated bacterial elimination. **Conclusion** β-catenin promotes the elimination of *Pseudomonas aeruginosa* via regulating LL-37.

Key words:β-catenin; *Pseudomonas aeruginosa*; LL-37; bacterial elimination

铜绿假单胞菌为革兰阴性杆菌,是引起院内感染的常见条件致病菌,可引起多种组织器官的感染,如肺部、皮肤、角膜等^[1-2]。临床上抗菌药物的使用可以改善患者的病情,然而,随着抗菌药物的不合理使用,导致铜绿假单胞菌的耐药性越发严重,致使应用抗菌

药物后不能达到满意的治疗效果^[1-2]。因此,如何发挥宿主的能动性、提高免疫防御功能是抗感染免疫的研究热点。

Wnt/β-连环蛋白(β-catenin)信号通路是进化高度保守的通路,尽管参与该通路的分子众多,β-catenin

^{*} 基金项目:广东省中山市社会公益科技研究专项资金立项项目(2018B1032)。

作者简历:傅强,男,副主任技师,主要从事临床检验诊断学方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: ck521620@163.com。

本文引用格式:傅强,王伟佳,黄福达,等. β-catenin 调控 LL-37 促进铜绿假单胞菌的清除[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(15): 2173-2175.

是该通路中的核心分子。当 Wnt/ β -catenin 通路未被激活时, β -catenin 被降解失活。当 Wnt/ β -catenin 通路被激活后, β -catenin 在细胞质中累积并转移至细胞核促进下游靶基因的转录, 参与胚胎的发育和多器官的稳态^[1,3-4]。有报道显示, β -catenin 可参与病原体的感染过程, 且因病原体的种类不同, 发挥不同的作用。有研究报道, β -catenin 抑制人类免疫缺陷病毒(HIV)的复制, 抑制 DNA 病毒的感染, 抑制伤寒沙门菌的感染^[5-7]; 另一方面, β -catenin 促进 I 型牛疱疹病毒的感染^[8]。然而, β -catenin 在铜绿假单胞菌感染中的作用还需研究。抗菌肽 LL-37 是具有广谱抗菌作用的多肽, 可促进铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌等病原体的清除^[9-11]。在结肠癌中, β -catenin 和 LL-37 相伴增高^[12]。然而 β -catenin 是否通过调控 LL-37 来促进铜绿假单胞菌的清除还需进一步研究。

本研究发现, 在 RAW264.7 细胞和骨髓来源巨噬细胞中, β -catenin 促进铜绿假单胞菌的清除; 同时实验发现, β -catenin 促进 LL-37 的基因表达; 进一步实验发现, LL-37 可回复 β -catenin 介导的细菌清除作用, 具体报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 小鼠成纤维细胞株 L929 和小鼠巨噬细胞样 RAW264.7 细胞在含 10% 胎牛血清的高糖达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM)中于 37℃ 5% 二氧化碳(CO₂)条件下培养。L929 细胞培养 7 d 后, 收集细胞培养上清液, 4℃ 3 000 r/min 离心 10 min 去除细胞碎片, 经 0.22 μ m 滤器过滤后分装, -80℃ 保存备用。L929 细胞上清液中富含集落刺激分子, 可诱导骨髓细胞分化为巨噬细胞。过表达 β -catenin 的 RAW264.7 细胞和对照细胞以 1×10⁶ 个/毫升细胞数铺入 6 孔板中, 培养过夜, 铜绿假单胞菌感染后进行后续细菌平板计数和实时荧光定量聚合酶链反应(Real-time PCR)。

1.2 小鼠骨髓来源巨噬细胞分离培养 无特定病原体(SPF)级 6 周龄雌性 C57BL/6 小鼠, 处死后无菌条件下取股骨和胫骨中的骨髓细胞, 制备单细胞悬液, 1×10⁷ 铺入 10 cm 培养皿中, 置于含 5% 胎牛血清、10% L929 培养上清液的高糖 DMEM 中培养 7 d, 诱导成骨髓来源巨噬细胞。用 β -catenin 慢病毒和对照慢病毒感染骨髓来源巨噬细胞, 过表达 β -catenin^[13]。然后, 以 5×10⁵ 个/毫升细胞数铺入 6 孔板中, 培养过夜, 铜绿假单胞菌感染后进行后续细菌平板计数和 Real-time PCR。

1.3 小 RNA 干扰实验 小鼠 LL-37 的小干扰 RNA (siRNA) 和小干扰 RNA 对照 (siNC) 购于 Santa Cruz Biotechnology 公司。按照说明书采用阳离子脂质体

2000 转染, 以 5 μ mol/L 为 siRNA 的终水平沉默细胞中 LL-37, 进行后续的细菌清除实验。

1.4 Real-time PCR 采用 Trizol 法提取 RAW 264.7 细胞和骨髓来源巨噬细胞的总 RNA。用反转录试剂盒将 1 μ g RNA 反转录成 cDNA, 采用双链 DNA 嵌合燃料(SYBR Green)按照试剂盒说明书配置反应体系进行 Real-time PCR。扩增结果采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法分析过表达 β -catenin 的 RAW264.7 细胞和骨髓来源巨噬细胞中铜绿假单胞菌感染后 LL-37 的基因表达, 数据以 $\bar{x}\pm s$ 来表示, 数据来源于 3 次独立实验。抗菌肽 LL-37 和 β -actin 的引物序列见表 1。

表 1 引物序列	
基因	引物序列 (5'-3')
β -actin	上游: GAT TAC TGC TCT GGC TCC TAG C
	下游: GAC TCA TCG TAC TCC TGC TTG C
LL-37	上游: AGC TAC AGG GAT GCT GTG CT
	下游: TCA CTC GGA ACC TCA GAC T

1.5 细菌清除实验 RAW264.7 细胞和骨髓来源巨噬细胞加入铜绿假单胞菌共孵育 1 h 后, 更换含 300 μ g/mL 庆大霉素的培养基作用 30 min 清除胞外菌, 磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后, 设置两个复孔, 一个复孔收集 1 h 细胞悬液, 0.1% 曲拉通-X 裂解细胞释放细胞内细菌, 平板计数计算 1 h 菌落数; 另一个复孔继续培养 1 h, 收集 2 h 细胞悬液, 0.1% 曲拉通-X 裂解细胞释放细胞内细菌, 平板计数计算 2 h 菌落数。细菌清除率=(1 h 菌落数-2 h 菌落数)/1 h 菌落数×100%。

1.6 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行统计处理和分析, 正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 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 β -catenin 促进铜绿假单胞菌的清除 铜绿假单胞菌感染过表达 β -catenin 的 RAW264.7 细胞和骨髓来源巨噬细胞后, 细菌平板计数检测细菌清除情况。实验结果发现, 在 RAW264.7 细胞(图 1A)和骨髓来源巨噬细胞(图 1B)中, β -catenin 促进细菌的清除, 差异有统计学意义(*P*<0.05)。

2.2 铜绿假单胞菌感染时, β -catenin 促进 LL-37 基因的表达 实验结果发现, 在 RAW264.7 细胞中细菌感染 12 h 后, β -catenin 促进抗菌肽 LL-37 的表达(图 2A); 同样发现, 在骨髓来源巨噬细胞细菌感染 12 h 后, β -catenin 促进抗菌肽 LL-37 的表达(图 2B)。

2.3 β -catenin 调控 LL-37 促进铜绿假单胞菌的清除 在过表达 β -catenin 的 RAW264.7 细胞和骨髓来

源巨噬细胞中,铜绿假单胞菌感染后,采用平板计数的方法检测细菌清除率。实验结果发现,过表达 β -catenin 可在 RAW264.7 细胞(图 3A)和骨髓来源巨噬细胞(图 3B)中促进细菌清除;实验结果进一步显示,LL-37 可在 RAW264.7 细胞(图 3A)和骨髓来源巨噬细胞(图 3B)中回复 β -catenin 的杀菌作用。

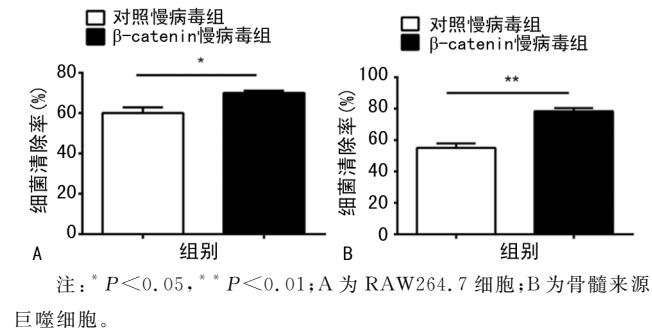


图 1 β -catenin 促进铜绿假单胞菌的清除

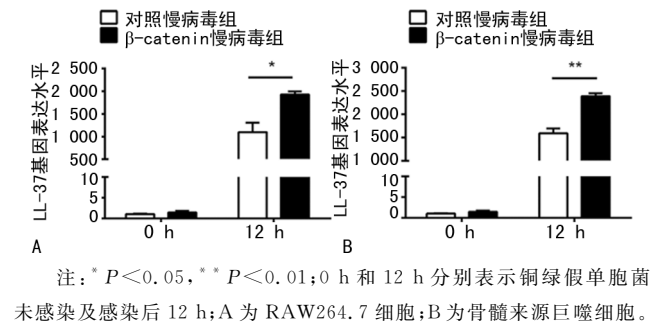


图 2 铜绿假单胞菌感染前后 LL-37 基因的表达

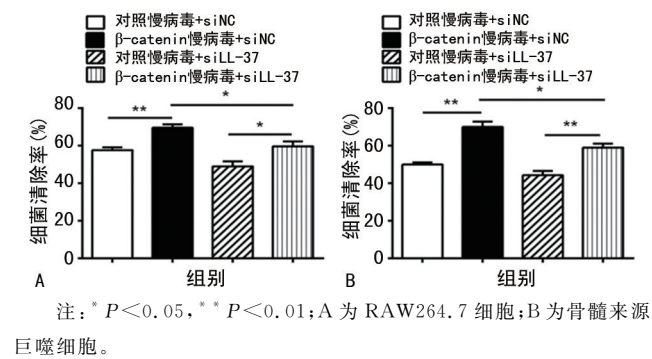


图 3 β -catenin 调控 LL-37 促进铜绿假单胞菌的清除

3 讨 论

β -catenin 是进化高度保守的 Wnt/ β -catenin 通路中的核心分子,不仅在生理状态下发挥重要作用^[3-4],还可在病理条件下如多种病原体感染中发挥调控作用,且因病原体不同发挥的作用不尽相同^[5-8]。本研究发现,在铜绿假单胞菌感染时, β -catenin 促进铜绿假单胞菌的清除。

β -catenin 促进铜绿假单胞菌清除的机制如何,还有待于进一步研究。研究报道,在不同病原体感染中 β -catenin 促进病原体清除的机制不尽相同。据报道,在伤寒沙门菌感染时, β -catenin 可通过上调小肠上皮

细胞的核心岩藻糖基化而上调肠道菌群来对抗细菌感染^[7];在 HIV 感染时, β -catenin 可在胶质细胞中抑制 HIV 长末端重复序列的转录,抑制病毒的感染^[5];在 DNA 病毒感染时, β -catenin 可协调环磷酸鸟苷-腺苷酸合成酶(cGAS)/干扰素基因刺激因子(STING)介导的干扰素信号通路,抑制感染^[6];在猪生殖和呼吸系统综合征病毒感染时, β -catenin 可通过增强核因子活化 B 细胞 κ 轻链增强子(NF- κ B)介导的自身免疫应答抑制病毒的复制^[14]。本实验结果发现 β -catenin 可上调抗菌肽 LL-37 的表达。

LL-37 是具有广谱杀菌作用的抗菌肽。研究报道,LL-37 可抑制铜绿假单胞菌生物膜的形成,可促进中性粒细胞释放活性氧自由基,促进中性粒细胞体外诱捕网的形成,从而达到促进铜绿假单胞菌清除的作用^[10-11]。本实验结果发现,在铜绿假单胞菌感染的巨噬细胞中, β -catenin 通过调控 LL-37 促进铜绿假单胞菌的清除,然而本研究未涉及 LL-37 促进细菌清除的机制。

综上所述,本研究发现 β -catenin 在巨噬细胞中通过调控 LL-37 促进铜绿假单胞菌的清除,揭示了 β -catenin 促进铜绿假单胞菌清除的机制,为铜绿假单胞菌感染的治疗提供备选方案。

参考文献

- [1] JEUKENS J, FRESCHI L, KUKAVICA-IBRULJ I, et al. Genomics of antibiotic-resistance prediction in pseudomonas aeruginosa[J]. Ann N Y Acad Sci, 2019, 1435(1): 5-17.
- [2] DESHPANDE R, ZOU C. Pseudomonas aeruginosa induced cell death in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(15): 5356-5359.
- [3] GOU L, REN X, JI P. Canonical Wnt signaling regulates branching morphogenesis of submandibular gland by modulating levels of lama5[J/OL]. Int J Dev Biol, 2021 [2021-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33629734/>.
- [4] WILD S L, ELGHAIJI A, GRIMALDOS RODRIGUEZ C, et al. The canonical Wnt pathway as a key regulator in liver development, differentiation and homeostatic renewal[J]. Genes (Basel), 2020, 11(10): 1163-1167.
- [5] AL-HARTHI L. Interplay between Wnt/beta-catenin signaling and HIV: virologic and biologic consequences in the CNS[J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2012, 7(4): 731-739.
- [6] YOU H, LIN Y, LIN F, et al. β -Catenin is required for the cGAS/STING signaling pathway but antagonized by the herpes simplex virus 1 US3 protein[J]. J Virol, 2020, 94(5): e01847.

(下转第 2179 页)

- [2] STROBER W, MURRAY P J, KITANI A, et al. Signaling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2[J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(1): 9-20.
- [3] HELD H D, BOETTCHER S, HAMANN L, et al. Ventilation-induced chemokine and cytokine release is associated with activation of nuclear factor- κ B and is blocked by steroids[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163(3): 711-716.
- [4] GUARDA G, STAEHLI F, CABALZAR K, et al. T cells dampen innate immune responses through inhibition of NLRP1 and NLRP3 inflammasomes[J]. *Nature*, 2009, 460(7252): 269-273.
- [5] ZHANG H, FU R, GUO C H, et al. Anti-dsDNA antibodies bind to TLR4 and activate NLRP3 inflammasome in lupus monocytes-macrophages[J]. *J Transl Med*, 2016, 14(1): 156-159.
- [6] STOREK K M, MO D M. Bacterial recognition pathways that lead to inflammasome activation[J]. *Immunol Rev*, 2015, 265(1): 112-129.
- [7] 李文兴, 王一丁, 石楠. 系统性红斑狼疮患者补体 C3、C4 水平变化的临床意义[J]. *现代仪器与医疗*, 2018, 24(1): 67-69.
- [8] MACIEJ L, GEORG L, ONKAR K, et al. NLRP3 and ASC suppress lupus-like autoimmunity by driving the immunosuppressive effects of TGF- β receptor signalling[J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(12): 2224-2235.
- [9] ZHEN M, HONG S, JI L, et al. Expression and clinical significance of the NEK7-NLRP3 inflammasome signaling pathway in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *J Inflamm(Lond)*, 2018, 15(3): 16-17.
- [10] YANG Q, YU C, YANG Z, et al. Deregulated NLRP3 and NLRP1 inflammasomes and their correlations with disease activity in systemic lupus erythematosus[J]. *J Rheumatol*, 2014, 41(3): 444-452.
- [11] 陈斯玲, 陶怡, 陈瑞林. 系统性红斑狼疮患者血清 IL-1 β 和 IL-18 的表达及意义[J]. *广东医学*, 2017, 38(16): 2473-2475.
- [12] FRANÇOIS C, CAMILLO R, MARTEN T, et al. Identification of highly active systemic lupus erythematosus by combined type I interferon and neutrophil gene scores vs classical serologic markers[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2020, 59(11): 3468-3478.
- [13] ELKON K, WIEDEMAN A. Type I IFN system in the development and manifestations of SLE[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2012, 24(5): 499-505.
- [14] GUARDA G, BRAUN M, STAEHLI F, et al. Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation[J]. *Immunity*, 2011, 34(2): 213-223.
- [15] INOUE M, WILLIAMS K L, OLIVER T, et al. Interferon-beta therapy against EAE is effective only when development of the disease depends on the NLRP3 inflammasome[J]. *Sci Signal*, 2012, 5(225): ra38.
- [16] VEERANKI S, DUAN X, PANCHANATHAN R, et al. IFI16 protein mediates the anti-inflammatory actions of the type-I interferons through suppression of activation of caspase-1 by inflammasomes[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e27040.

(收稿日期: 2021-01-27 修回日期: 2021-05-25)

(上接第 2175 页)

- [7] HAO S, FAN Q, BAI Y, et al. Core fucosylation of intestinal epithelial cells protects against salmonella typhi infection via up-regulating the biological antagonism of intestinal microbiota[J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 1097-1101.
- [8] CHANG L, YUAN W, ZHU L. β -cantenin is potentially involved in the regulation of c-Jun signaling following bovine herpesvirus 1 infection[J]. *Vet Microbiol*, 2020, 248: 108804-108807.
- [9] SUTTON M T, FLETCHER D, GHOSH S K, et al. Antimicrobial properties of mesenchymal stem cells: therapeutic potential for cystic fibrosis infection, and treatment[J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 5303048.
- [10] HACIOGLU M, OYARDI O, BOZKURT-GUZEL C, et al. Antibiofilm activities of ceragenins and antimicrobial peptides against fungal-bacterial mono and multispecies biofilms[J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 2020, 73(7): 455-462.
- [11] XIE F, ZAN Y, ZHANG X, et al. Differential abilities of mammalian cathelicidins to inhibit bacterial biofilm formation and promote multifaceted immune functions of neutrophils[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5): 1871-1875.
- [12] ZHU W, FANG C, GRAMATIKOFF K, et al. Proteins and an inflammatory network expressed in colon tumors[J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(5): 2129-2139.
- [13] CHEN K, YIN L, NIE X, et al. Beta-Catenin promotes host resistance against *Pseudomonas aeruginosa* keratitis[J]. *J Infect*, 2013, 67(6): 584-594.
- [14] WANG J, GONG L, ZHANG W, et al. Wnt/ β -catenin signaling pathway inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication by enhancing the nuclear factor- κ B-dependent innate immune response[J]. *Vet Microbiol*, 2020, 251: 108904.

(收稿日期: 2021-02-26 修回日期: 2021-05-25)