

过表达 pellino-1 在 Kupffer 细胞内毒素耐受时对 TRAF3 泛素化及 MAPK 信号通路的调控

张译尹¹, 李培志¹, 廖 锐², 龚建平¹

(重庆医科大学 1. 附属第二医院肝胆外科; 2. 附属第一医院肝胆外科, 重庆 400016)

摘要:【目的】探讨上调 pellino-1 在 Kupffer 细胞(KC)内毒素耐受时对肿瘤坏死因子受体相关因子 3(TRAF3)泛素化、促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路及下游细胞因子分泌情况的影响。【方法】分离、培养 C57BL/6 小鼠 KC, 随机分为 2 组:①空载对照组:转染空载质粒 48 h 后,先给予小剂量 LPS(10 ng/mL)刺激 24 h,再给予大剂量 LPS(300 ng/mL)刺激。②过表达组:过表达 pellino-1 慢病毒转染 48 h 后,先给予小剂量 LPS(10 ng/mL)刺激 24 h,再给予大剂量 LPS(300 ng/mL)刺激。两组分别于处理后 0、5、10、30、60 min 收获细胞,蛋白质免疫印迹试验(Western blot)检测 pellino-1、K48 泛素化(K48 ubiquitin, K48-Ub)、TRAF3、JNK、p-JNK、p38、p-p38 蛋白水平表达变化;酶联免疫吸附法(ELISA)检测细胞培养上清液中 IL-1 β 、TNF- α 及 IL-10 的分泌情况。【结果】与空载对照组相比,过表达组 pellino-1 蛋白表达量在各个时间点均明显升高;K48-Ub 水平明显升高;TRAF3 蛋白表达量明显降低;JNK、p38 蛋白表达量没有明显变化,但 p-JNK 及 p-p38 蛋白表达量显著升高;过表达组细胞上清中 IL-1 β 及 TNF- α 的量明显升高($P < 0.05$),而 IL-10 的量则明显降低($P < 0.05$)。【结论】过表达 pellino-1 可促进 TRAF3 蛋白 K-48 泛素化降解,导致 TRAF3 蛋白表达量降低,激活下游的 MAPK 信号,从而抑制内毒素耐受的形成。

关键词: kupffer 细胞;内毒素耐受;pellino-1;肿瘤坏死因子受体相关因子 3

中图分类号:R657.3

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2017)05-0658-07

Role of Pellino-1 Overexpression on Ubiquitin of Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factors 3 and MAPK Signaling Pathway in Endotoxin-tolerant Kupffer Cells

ZHANG Yi-yin¹, LI Pei-zhi¹, LIAO Rui², GONG Jian-ping¹

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

2. Department of Hepatobiliary Surgery, The first Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Corresponding to: GONG Jian-ping, E-mail: gongjianping11@126.com

Abstract: 【Objective】 To investigate the effect of pellino-1 gene overexpression by lentivirus vector on the ubiquitin of tumor necrosis factor receptor-associated factors 3 (TRAF3) and the activation of mitogen-activated protein kinases (MAPK) signaling pathway in endotoxin-tolerant kupffer cells (KCs). 【Methods】 Isolated KCs of C57BL/6 mouse were randomly divided into two groups: control group, which transfected with control lentivirus vector for 48 h, then pretreated with 10 ng/mL lipopolysaccharide (LPS) for 24 h, and next treated with 300 ng/mL LPS; overexpression group, which transfected with pellino-1 gene overexpression lentivirus vector for 48 h, then pretreated with 10 ng/mL lipopolysaccharide (LPS) for 24 h, and next treated with 300 ng/mL LPS. The protein expressions of pellino-1, K48-Ub, TRAF3, p38, p-p38, c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p-JNK were analyzed by Western blot. The level of interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-10 (IL-10) in supernatants were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). 【Results】 Compared with control group, the protein expressions of pellino-1, K48-Ub, p-JNK and p-p38 and the levels of IL-1 β ($P < 0.05$), TNF- α ($P < 0.05$) in supernatants was in-

收稿日期:2017-04-07

基金项目:国家自然科学基金青年基金(81401622;81301656);重庆市科委基础科学与前沿技术研究专项(重点,cstc2015 jcyjBX0070)

作者简介:张译尹,硕士,住院医师,研究方向:脓毒症内毒素耐受,E-mail:595633794@qq.com;龚建平,通信作者,E-mail:gongjian-

ping11@126.com

creased in overexpression group, while the protein levels of TRAF3 and the levels of IL-10 ($P < 0.05$) in supernatants were decreased. 【Conclusion】 Overexpression of pellino-1 can promote TRAF3 K48 ubiquitination degradation, decrease the protein expression of TRAF3, activate the downstream MAPK signaling pathway, and thus impair the formulation of endotoxin tolerance.

Key words: Kupffer cells; endotoxin tolerance; pellino-1; TRAF3

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(5):658-664]

脓毒症是当今世界范围内严重威胁人类健康、导致各类急危重症和创伤患者死亡的最主要原因之一。脓毒症的发病率和病死率很高,据统计,在美国,住院病人中约2%患有严重脓毒症,其中有一半住进了重症监护室(ICU),这些患者占了ICU患者的10%^[1-2]。全球每年有1 900万人患脓毒症,其中美国至少有75万人,且以每年1.5%~8%的速度持续增长^[3-4]。美国每年大约有25万例患者死于脓毒症,是各种重症患者的首要死亡原因^[5]。内毒素耐受(endotoxin tolerance, ET)是指预先用小剂量的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)处理机体或者细胞后,机体或细胞对随后给予的更大剂量的LPS不产生反应或者低反应^[6]。内毒素耐受是针对脓毒症炎症反应的一种十分重要的自身保护机制。Kupffer细胞(KC)是定植于肝血窦内的肝脏巨噬细胞,占全身巨噬细胞数量的80%~90%^[7]。由于肠道血流会经门静脉进入肝脏,KC会持续暴露于在来自肠道的细菌、内毒素及微生物产物中。而内毒素耐受对KC维持炎症反应的精密调控至关重要。因此,研究KC潜在内毒素耐受机制可为临床脓毒症的防治提供新思路。研究表明,内毒素耐受的形成被认为与TLR信号通路的多种负性调节因子表达上调、多种促炎基因选择性的沉默、特异性针对NF- κ B途径产物的microRNA的产生以及染色质的修饰和基因重组等因素密切相关^[8-11]。Pellino-1是近年来新发现的一种泛素连接酶,在固有免疫细胞和获得性免疫细胞中参与蛋白降解等,与炎症和自身免疫密切相关^[12]。在KC内毒素耐受中,peellino-1是否参与调节肿瘤坏死因子受体相关因子3(tumor necrosis factor receptor-associated factors 3, TRAF3)的K48泛素化降解,目前还未见报道。本研究旨在观察KC内毒素耐受时,过表达peellino-1对TRAF3泛素化及促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)信号通路的影响,试图证明peellino-1参与TRAF3的泛素化降解及MAPK信号通路的调控,以期进一步

阐明内毒素耐受形成的机制,从而为诱导内毒素耐受治疗脓毒症提供新的思路。

1 材料与方 法

1.1 材 料

健康雄性C57BL/6小鼠,8~12周龄,体质量(23 ± 1.8)g,共12只,购自重庆医科大学实验动物中心,实验符合关于重庆医科大学实验动物伦理保护标准及国家相关法律规定。IV型胶原酶和LPS购自美国Sigma公司。DMEM培养基和胎牛血清购自美国Hyclone公司。BCA蛋白浓度测定试剂盒和细胞及IP裂解液购自碧云天试剂公司。过表达peellino-1的慢病毒购自上海吉凯基因化学技术有限公司。小鼠IL-1 β 、IL-10及TNF- α ELISA检测试剂盒及兔抗 β -actin抗体购自博士德公司。兔抗peellino-1单克隆抗体购自Cell Signaling Technology公司。兔抗TRAF3单克隆抗体、兔抗JNK多克隆抗体、兔抗p-JNK多克隆抗体、兔抗p38多克隆抗体及兔抗p-p38多克隆抗体购自Abcam公司。兔抗Anti-Ubiquitin, Lys48-Specific单克隆抗体购自Millipore公司。

1.2 KC的分离、培养和鉴定

每次取4只健康雄性C57BL/6小鼠,乙醚吸入麻醉,打开右侧胸腔及上腔静脉放血,PBS液灌注肝脏,离断肝周韧带及肝门,分离肝脏,镊子快速碎肝,0.1% IV型胶原酶消化,37℃水浴振荡反应30 min,200目金属滤网过滤获得单细胞悬液,于4℃、50 \times g离心3 min,将肝实质细胞与非实质细胞分开,获得的非实质细胞悬液,离心,弃上清,重悬后接种于六孔板中,在37℃、体积分数为95%空气、5%CO₂培养条件的孵箱中培养2 h,换液洗去非贴壁细胞,所得贴壁细胞即为KC^[13]。流式细胞仪检测FITC-F4/80抗体阳性细胞数以检测细胞纯度,吞墨实验检测细胞吞噬功能,台盼蓝染色检测细胞活性。细胞纯度及活性均为95%,且吞噬功能良好。

1.3 实验分组

分离、培养的KC随机分为两组:空载对照组,转染空载慢病毒48 h后加入10 ng/mL LPS的含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基中培养24 h,然后改换加入300 ng/mL LPS的DMEM培养基培养;过表达组,过表达Pellino-1的慢病毒转染48 h后给予10 ng/mL LPS刺激24 h,然后再给予300 ng/mL LPS刺激。

1.4 ELISA法检测IL-1 β 、TNF- α 及IL-10

两组分别在处理后0、1、6、12、24 h收集细胞上清,按照武汉博士德ELISA检测试剂盒说明书进行检测上清中IL-1 β 、IL-10及TNF- α 水平。

1.5 Western blot检测pellino-1、TRAF3、K48-Ub、p38、p-p38、JNK及p-JNK蛋白表达

两组细胞分别作用0、5、10、30、60 min后,PBS洗涤,每孔加入含1% PMSF的细胞裂解液200 μ L裂解细胞,4 $^{\circ}$ C下12 000 r/min($r = 8$ cm)离心10 min获取细胞总蛋白,BCA法检测蛋白浓

度,制备蛋白样品,80 V恒定电压电泳30 min后调节为120 V继续电泳90 min,切胶、转膜,5%脱脂奶粉封闭,孵育一抗、二抗,ECL显色,BioRad系统曝光,Quantity one分析图片。

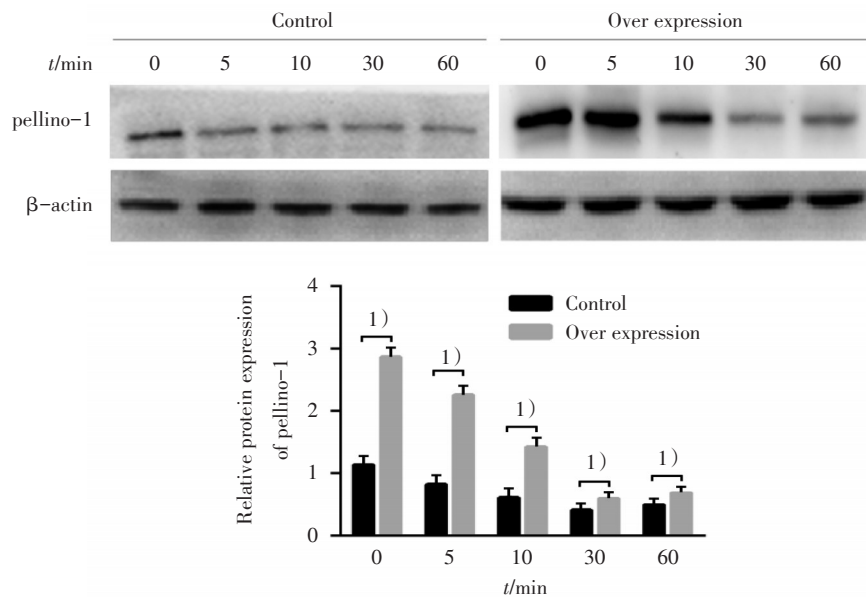
1.6 统计学分析

各实验均重复3次,采用SPSS 17.0统计软件处理数据,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用方差分析进行统计学检验,两两比较采用LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组KCs中Pellino-1的蛋白表达变化

在0 min时,过表达组KC内的Pellino-1的蛋白表达明显高于空载对照组($P < 0.05$),表明慢病毒转染成功。同时,两组KC内Pellino-1的蛋白表达均随着时间的推移而逐渐降低,且过表达组的蛋白水平在各个时间点均显著高于空载对照组($P < 0.05$;图1)。



Western blot show that lentivirus infection can increase the protein levels of pellino-1 in endotoxin-tolerant KCs. $n = 3$, 1) $P < 0.05$ vs Control

图1 两组KC内各时间点pellino-1的蛋白表达

Fig.1 Protein levels of pellino-1 in two groups

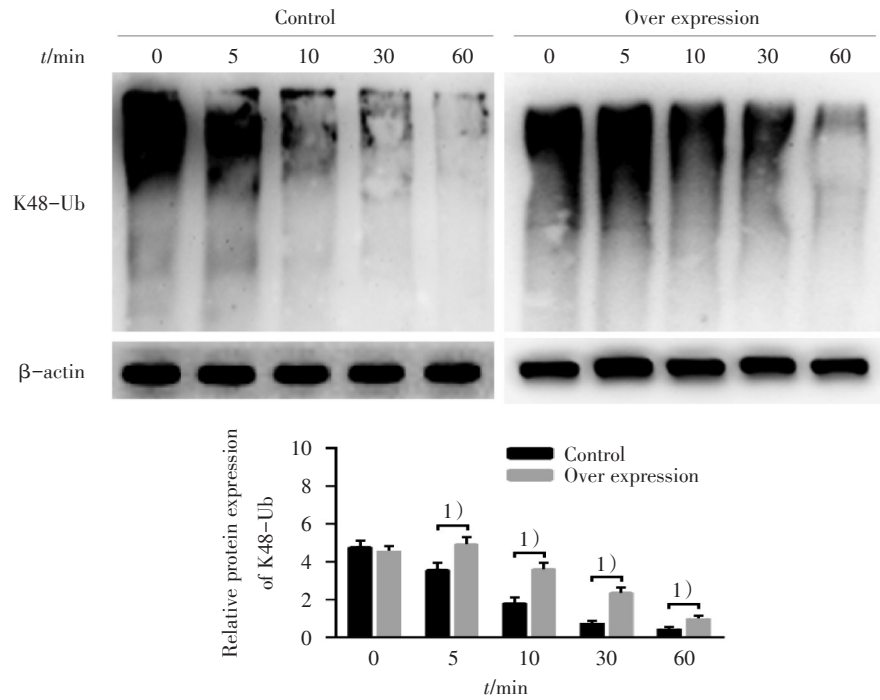
2.2 两组KC中K48泛素化(K48-Ub)水平的变化

两组KC内K48-Ub水平随着时间的推移均逐渐降低,且在0 min时无明显差异($P > 0.05$);而在其余时间点时,过表达组K48-Ub水平显著高于

空载对照组($P < 0.05$;图2)。

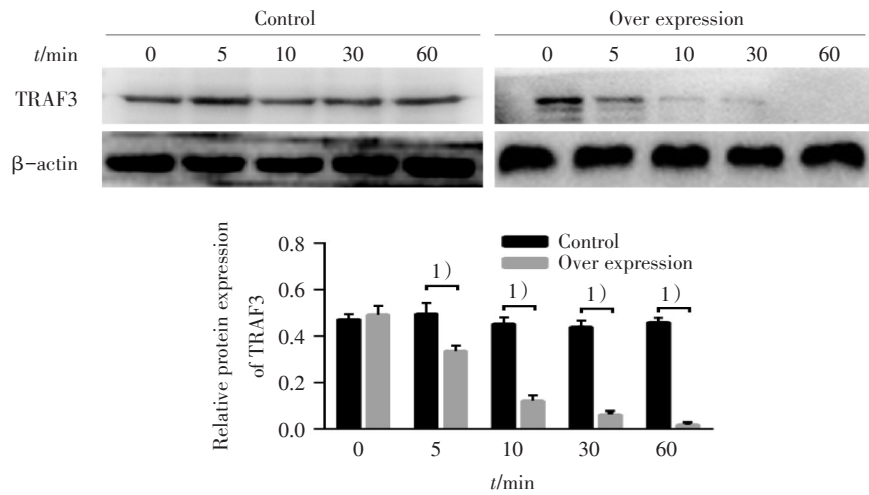
2.3 两组KC中TRAF3的蛋白表达变化

空载对照组KC中TRAF3蛋白表达水平随时间推移无明显变化;而过表达组TRAF3的表达随



Western blot show that over-expression of pellino-1 can increase the levels of K48-Ub in endotoxin-tolerant KCs. $n = 3$, ¹⁾ $P < 0.05$ vs Control

图2 两组KC内各时间点K48泛素化水平
Fig.2 Protein expressions of K48-Ub in two groups



Western blot show that over-expression of pellino-1 can decrease the levels of TRAF3 in endotoxin-tolerant KCs. $n = 3$, ¹⁾ $P < 0.05$ vs Control.

图3 两组各时间点TRAF3的蛋白表达
Fig.3 Protein expressions of TRAF3 in two groups

着时间的推移逐渐降低。在 0 min 两组 TRAF3 蛋白水平无显著差异 ($P > 0.05$), 而在其余时间点, 过表达组则显著低于空载对照组 ($P < 0.05$; 图 3)。

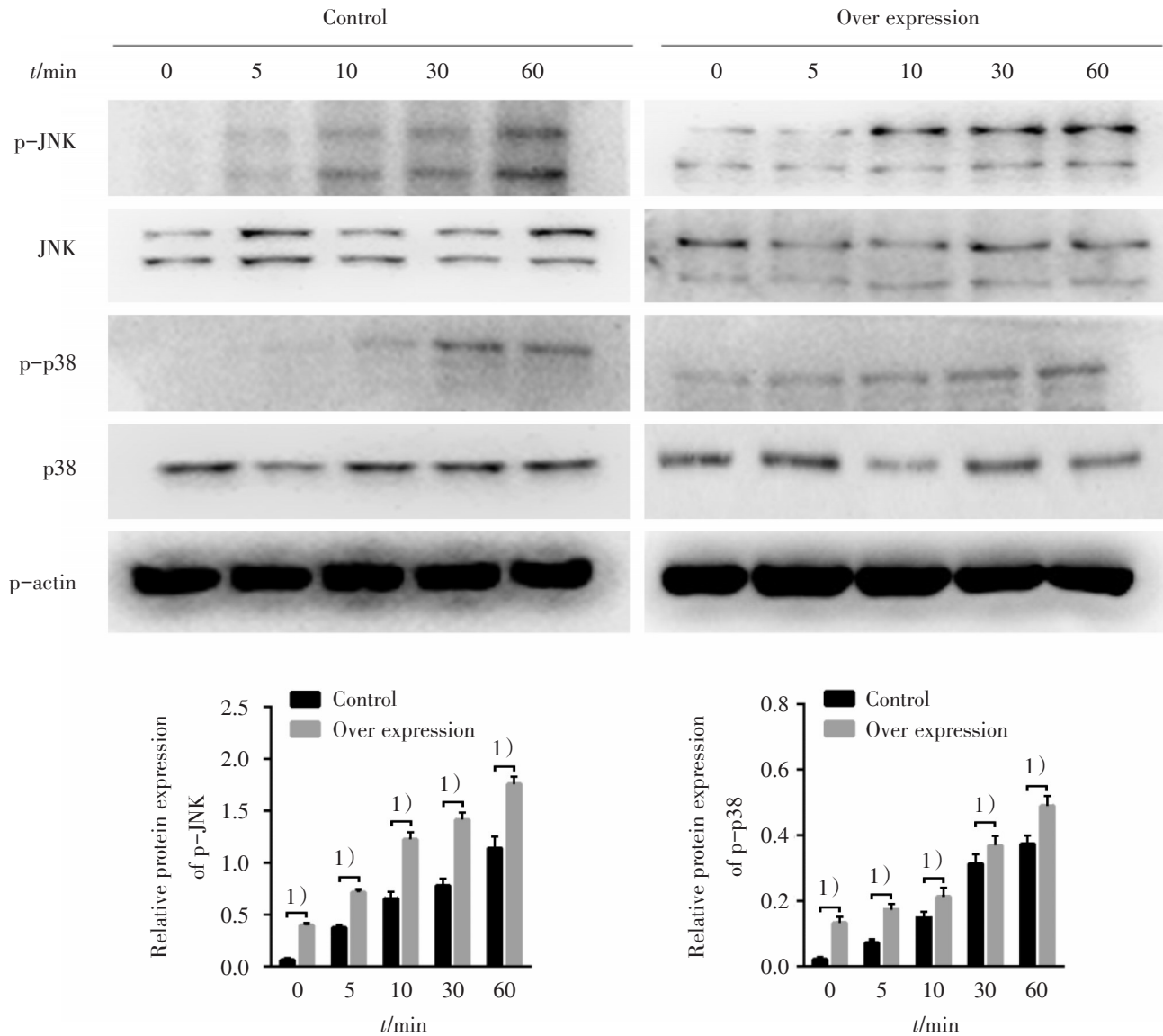
2.4 两组 KC 中 MAPK 信号通路的变化

两组 KC 中 p38 及 JNK 的蛋白表达水平无显

著变化, 而 p-p38 及 p-JNK 的蛋白表达量则随着时间推移逐渐升高, 且过表达组 p-p38 及 p-JNK 的蛋白表达显著高于空载对照组 ($P < 0.05$; 图 4)。

2.5 两组细胞上清中炎症因子变化情况

随着时间的推移, 空载对照组上清中 IL-1 β 、



Western blot show that over-expression of pellino-1 can increase the levels of p-JNK and p-P38 in endotoxin-tolerant KCs. $n = 3$, 1) $P < 0.05$ vs Control.

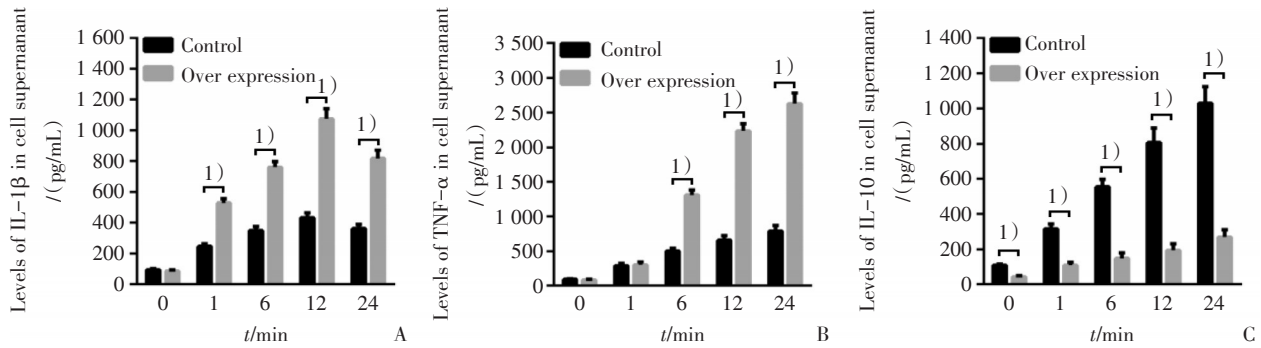
图4 两组各时间点MAPK信号通路的蛋白表达

Fig.4 Protein expressions of MAPK signaling pathway in two groups at different times

TNF- α 均增加不明显,IL-10显著增加;而过表达组上清中IL-1 β 、TNF- α 显著增加,而IL-10增加不明显。在0 h时间点,两组细胞上清中IL-1 β 水平无统计学差异($P > 0.05$),在1、6、12及24 h时间点,过表达组显著高于空载对照组($P < 0.05$)。对于TNF- α ,在0及1 h,两组无统计学差异($P > 0.05$),在6、12及24 h,过表达组明显高于空载对照组($P < 0.05$)。IL-10水平在0、1、6、12及24 h均具有统计学差异,过表达组显著低于空载对照组($P < 0.05$;图5)。

3 讨论

目前许多在内毒素耐受中扮演重要角色的关键蛋白逐渐被发现。同时,大量研究表明,内毒素耐受与蛋白的泛素化修饰密切相关。Lee等^[14]的研究发现:革兰阳性菌细胞壁成分胞壁酰二肽(muramyl dipeptide, MDP)诱导的内毒素耐受可导致Nod2蛋白的降解,该过程与其多聚泛素化有关。Perkins等^[15]的研究发现:直接LPS刺激可导



ELISA show that over-expression of pellino-1 can increase the levels of IL-1β and TNF-α, decrease the levels of IL-10 in endotoxin-tolerant KCs. $n = 3, 1) P < 0.05$ vs Control.

图5 两组各时间点细胞上清中IL-1β(A)、TNF-α(B)及IL-10(C)水平

Fig.5 The levels of IL-1 IL-1β(A), TNF-α(B), and IL-10(C) in cell supernatant at different times

致蛋白激酶 R (protein kinase R, PKR) 先后发生 K63 及 K48 泛素化;而在内毒素耐受状态下,PKR 则以 K48 泛素化占主导。Chang 等^[16]的研究则发现:内毒素耐受树突状细胞中 IL-10 的产生依赖于髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 途径,该过程与 MyD88 的泛素化降解有关。

Pellino-1 是近年来新发现的一种泛素连接酶,在固有免疫细胞和获得性免疫细胞中参与蛋白的泛素化调控,且与炎症的调控及肿瘤的发生密切相关。Jeon 等^[17]研究发现:pellino-1 通过调控 Slug 及 Snail 蛋白的 K63 多聚泛素化,从而促进肺部肿瘤的发生。同时,pellino-1 也可通过促进 BCL6 蛋白的 K63 多聚泛素化从而促进淋巴瘤的产生^[18]。在实验性自身免疫性脑脊髓炎中, pellino-1 参与小神经胶质细胞中 toll 样受体 (toll-like receptor, TLR) 信号通路的调控,从而促进 TRAF3 的 K48 泛素化降解^[19]。单次大剂量内毒素刺激时, pellino-1 的 mRNA 及蛋白表达升高。而在单核-巨噬细胞内毒素耐受时 pellino-1 的表达则明显受到抑制,同时 pellino-1 可促进 IRAK-1、TBK-1、TAK-1 及 TRAF6 的 K63 多聚泛素化,从而正性调控 TLR2 及 TLR4 信号通路^[20]。本课题组前期研究发现^[21]:一次性大剂量 LPS 刺激 Raw264.7 细胞时,利用 shRNA 下调 pellino-1 的表达可减少 TRAF3 的 K48 泛素化降解,从而抑制 MAPK 信号通路的激活,使细胞形成类似内毒素耐受的状态。然而,内毒素耐受时,上调 pellino-1 的表达能否逆转耐受状态,目前还不得而知。

本研究通过分离 KCs,利用过表达 pellino-1 慢病毒转染进行转染,再诱导其发生内毒素耐受,进而检测 pellino-1、K48-Ub、TRAF3、MAPK 蛋白水平变化以及 IL-1β、TNF-α 及 IL-10 的分泌情况,结果发现:利用慢病毒可成功上调 pellino-1 的表达,且在内毒素耐受时其表达逐渐降低。过表达内毒素耐受 KCs 内 pellino-1 水平后,细胞内 K48-Ub 的表达显著增加,TRAF3 水平明显下降, p-p38 及 p-JNK 蛋白水平明显上调,促炎因子 IL-1 和 TNF-α 分泌显著增加,抗炎因子 IL-10 的分泌显著降低。上述结果提示:KCs 内毒素耐受时, pellino-1 可促进 TRAF3 的泛素化降解,从而正性调节 MAPK 信号通路激活。

参考文献

- [1] Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care [J]. Crit Care Med, 2001, 29(7): 1303-1310.
- [2] Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, et al. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS): A prospective study [J]. JAMA, 1995, 273(2): 117-123.
- [3] Adhikari NK, Fowler RA, Bhagwanjee S, et al. Critical care and the global burden of critical illness in adults [J]. Lancet, 2010, 376(9749): 1339-1346.
- [4] Lagu T, Rothberg MB, Shieh MS, et al. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007 [J]. Crit Care Med, 2012, 40(3): 754-761.

- [5] Martin GS, Mannino DM, Moss M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis [J]. *Crit Care Med*, 2006, 34(1): 15-21.
- [6] Wu Y, Lan C, Ren D, et al. Induction of siglec-1 by endotoxin tolerance suppresses the innate immune response by promoting TGF- β 1 production [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(23): 12370-12382.
- [7] Jager J, Aparicio-Vergara M, Aouadi M. Liver innate immune cells and insulin resistance: The multiple facets of Kupffer cells [J]. *J Intern Med*, 2016, 280(2): 209-220.
- [8] Ho PC, Tsui YC, Feng X, et al. NF- κ B-mediated degradation of the coactivator RIP140 regulates inflammatory responses and contributes to endotoxin tolerance [J]. *Nat Immunol*, 2012, 13(4): 379-386.
- [9] Fairfax BP, Davenport EE, Makino S, et al. A common haplotype of the TNF receptor 2 gene modulates endotoxin tolerance [J]. *J Immunol*, 2011, 186(5): 3058-3065.
- [10] Xiong Y, Medvedev AE. Induction of endotoxin tolerance in vivo inhibits activation of IRAK4 and increases negative regulators IRAK-M, SHIP-1, and A20 [J]. *J Leukoc Biol*, 2011, 90(6): 1141-1148.
- [11] Park SH, Park-Min KH, Chen J, et al. Tumor necrosis factor induces GSK3 kinase-mediated cross-tolerance to endotoxin in macrophages [J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(7): 607-615.
- [12] 陈方如, 郝飞. 泛素连接酶 Pellino1 蛋白研究进展 [J]. *免疫学杂志*, 2015, 31(07): 633-636.
Chen FR, Hao F. Research progresses of Pellino-1 ubiquitin ligase [J]. *J Immunol*, 2015, 31(07): 633-636.
- [13] Li PZ, Li JZ, Li M, et al. An efficient method to isolate and culture mouse Kupffer cells [J]. *Immunol Lett*, 2014, 158(1-2): 52-56.
- [14] Lee KH, Biswas A, Liu YJ, et al. Proteasomal degradation of Nod2 protein mediates tolerance to bacterial cell wall components [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(47): 39800-39811.
- [15] Perkins DJ, Qureshi N, Vogel SN. A Toll-like receptor-responsive kinase, protein kinase R, is inactivated in endotoxin tolerance through differential K63/K48 ubiquitination [J]. *MBio*, 2010, 1(5): 239-410.
- [16] Chang J, Kunkel SL, Chang CH. Negative regulation of MyD88-dependent signaling by IL-10 in dendritic cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(43): 18327-18332.
- [17] Jeon YK, Kim CK, Hwang KR, et al. Pellino-1 promotes lung carcinogenesis via the stabilization of Slug and Snail through K63-mediated polyubiquitination [J]. *Cell Death Differ*, 2017, 24(3): 469-480.
- [18] Park HY, Go H, Song HR, et al. Pellino 1 promotes lymphomagenesis by deregulating BCL6 polyubiquitination [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(11): 4976-4988.
- [19] Xiao Y, Jin J, Chang M, et al. Peli1 promotes microglia-mediated CNS inflammation by regulating Traf3 degradation [J]. *Nat Med*, 2013, 19(5): 595-602.
- [20] Murphy M, Xiong Y, Pattabiraman G, et al. Pellino-1 positively regulates toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 signaling and is suppressed upon induction of endotoxin tolerance [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(31): 19218-19232.
- [21] Li P, Liu H, Zhang Y, et al. Endotoxin tolerance inhibits degradation of tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 by suppressing Pellino 1 expression and the K48 ubiquitin ligase activity of cellular inhibitor of apoptosis protein 2 [J]. *J Infect Dis*, 2016, 214(6): 906-915.

(编辑 徐杰)