doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.04.001

·基础研究·

ISG15 过表达抑制 THP-1 细胞的增殖与吞噬 *

郭 琳 宗兆运 冯 杉 张 麟 邓海腾△

（清华大学生命科学学院 教育部生物信息学重点实验室 北京 100084）

摘要 目的：干扰素刺激基因 15 蛋白（Interferon-stimulated Gene 15，ISG15）是由 I 型干扰素诱导产生的类泛素蛋白，在先天免疫中起重要作用，本文旨在阐明 ISG15 的表达水平对巨噬细胞功能的影响并进一步探究其作用机制。**方法：**构建 ISG15 过表达质粒并通过慢病毒感染的方法整合进入 THP-1 细胞中，通过流式细胞仪分选出单克隆 ISG15 过表达细胞系，利用 Western Blotting 的方法验证 ISG15 在细胞内的过表达效果。在构建成功的细胞系中进行 CCK8 细胞增殖实验和 Latex Beads 细胞吞噬实验，最后通过定量蛋白质组学的方法观察细胞内蛋白质水平上变化。**结果：**Western Blotting 的结果验证了 ISG15 在 THP-1 巨噬细胞系中的过表达效果，证明了 ISG15 过表达巨噬细胞系的成功构建。CCK8 细胞增殖实验的结果表明，ISG15 过表达的细胞系与对照组细胞系相比其增殖能力减弱；Latex beads 细胞吞噬实验显示 ISG15 过表达细胞系的吞噬能力发生下降，并在蛋白质组学数据中找到糖酵解相关酶和膜转运蛋白下调的证据。**结论：**ISG15 过表达能够降低与糖酵解相关的蛋白从而导致增殖能力的下降；同时也引起膜转运相关蛋白下调造成吞噬能力降低。

关键词：干扰素刺激基因 15 蛋白；巨噬细胞；吞噬；定量蛋白质组学

中图分类号：R-33；Q78；Q511；R33-33 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2019)04-601-07

Overexpression of ISG15 in THP-1 Inhibits Cell Proliferation and Phagocytosis*

GUO Lin, ZONG Zhao-yun, FENG Shan, ZHANG Lin, DENG Hai-teng△

(School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing, 100084, China)

ABSTRACT Objective: ISG15 (Interferon-stimulated Gene 15) is a type I IFN-stimulated ubiquitin-like protein and plays an important role in innate immunity. Here, we investigated the effect of ISG15 overexpression on cell proliferation and endocytosis of THP-1 cells, then futher speculated underlying machanism. **Methods:** ISG15 overexpresing plasmids were transfected into THP-1 by using lentivirus infection and cytometry was used to selecte monoclonal cell line. The ISG15 overexpression efficiency was confirmed by Western Blotting. We employed CCK8 proliferation assay and Latex Beads phagocytosis assay to analyze phenotype alteration. Quantitative proteomics was carried out to investigate the effects of ISG15 overexpression on cell proteome. **Results:** Using CCK8 assay, we showed that ISG15 overexpression decreased the cell growth. We performed the endocytosis assay and showed that ISG15 overexpression decreased phagocytosis in THP-1 cells. Proteomic analysis indicated that glycolytic enzymes and proteins associated with membrane transport were downregulated. **Conclusions:** ISG15 overexpression decreases cell proliferation by downregulating glycolytic enzymes and the downregulation of membrane transport-associated proteins cause the decrease of endocytosis.

Key words: Interferon-stimulated Gene 15; Macrophage; Phagocytosis; Quantitative proteomics

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q78; Q511; R33-33 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2019)04-601-07

前言

干扰素刺激基因 15 蛋白（Interferon-stimulated Gene 15，ISG15）是由 I 型干扰素诱导产生的分子质量为 15 kDa 的类泛素蛋白[1,2]。I 型干扰素与细胞膜表面的干扰素受体结合后，激活下游的 JAK-STAT 信号通路进而调控 ISGs，ISG15 就是其中一种 ISGs[3]。通过对 ISG15 的结构解析可以得知，ISG15 有两个与泛素同源的结构域在 N 端和 C 端，分别与泛素有 33%和 32%的同源性[4]。ISG15 可以以单体或者共价结合到目的蛋白的形式存在，以结合形式的 ISG15 称为 ISG15 化修饰[5-7]。ISG15 化修饰过程分别由 E1 酶 UBE1L、E2 酶 UBCH 和 E3 酶 HERC5 以及去 ISG15 化酶 USP18 调控[8-13]。ISG15 化修饰过程

* 基金项目：国家重点研究与发展计划项目（2017YFA0505103）

作者简介：郭琳（1991-），硕士研究生，主要研究方向：生物学（蛋白质组学），E-mail: guol15@mails.tsinghua.edu.cn

△通讯作者：邓海腾，博士生导师，教授，主要研究方向：生物学（蛋白质组学），E-mail: dht@mails.tsinghua.edu.cn，电话：010-62789415

（收稿日期：2018-06-23 接受日期：2018-07-18）

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

中相关的酶均可由 IFN 诱导表达[14]。目前,通过蛋白质组学已经鉴定出上百种与 ISG15 有相互作用的蛋白,涵盖细胞内的转录调控、翻译调控以及炎症反应等过程[15]。巨噬细胞作为人类先天免疫中重要的一种免疫细胞,其源于单核细胞,巨噬细胞在组织修复和抗病原体的免疫反应中扮演着重要角色。因此基于这种认识,巨噬细胞几乎涉及人类的每一种疾病,巨噬细胞的功能增强或减弱都会影响疾病的进程与结果。作为研究人巨噬细胞常用的细胞系 THP-1, 经 PMA 刺激后的人单个核细胞系 THP-1 细胞可分化成为巨噬细胞, 并用以研究巨噬细胞功能的多种研究中[16-18]。

近年来的研究表明,ISG15 与机体的先天免疫、抗病毒过程有密切联系。例如,在体外和动物模型中证明 ISG15 可以抑制辛德毕斯病毒、HIV 病毒、疱疹病毒和乙型流感病毒等多种病毒的增殖[19-22],可见 ISG15 治疗病毒感染疾病上有着巨大的潜力。然而,大多数的研究聚焦在 ISG15 抗病毒的机制研究上,因此其对细胞表型和相应的蛋白质组的影响仍有待探索。鉴于此,本研究以 THP-1 细胞为研究对象,构建稳定高表达 ISG15 的 THP-1 细胞系,并通过测定增殖曲线、吞噬能力以及蛋白质组学分析等实验方法,探索 ISG15 对其细胞表型的影响,为下一步深入的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

实验中所用 293T 和 THP-1 细胞系均由本实验室保存。pLVX-IRES-ZsGreen1 的慢病毒质粒载体, 辅助质粒 VSVG、pLP1 和 pLP2 均由实验室提供。大肠杆菌感受态 DH5α 购自天根公司。细胞培养所用的 DMEM、RPMI1640 和消化细胞所用的胰蛋白酶购自维森特公司, 胎牛血清 FBS 购自 PAN 公司。佛波酯(Phorbol Myristate Acetate, PMA)购自碧云天生物科技有限公司。Western Blotting 所用的 ISG15 抗体购自 Sigma 公司,山羊抗兔二抗购自 CST 公司。生长曲线所用的 CCK8(Cell Counting Kit-8)试剂购自日本同仁公司。吞噬实验所用的 latex beads 购自 Sigma(L3030)。构建质粒所用的限制性内切酶以及 T4 连接酶购自 Takara 公司。蛋白组学中所用的二硫苏糖醇(DTT)、碘代乙酰胺(IAM)购自 Sigma 公司,Trysin 酶购自 Promega 公司。

1.2 实验方法与步骤

1.2.1 细胞培养 293T 细胞培养在含 10%胎牛血清、链霉素(100 μg/mL) 和青霉素 (100 U/mL) 的新鲜 DMEM 培养基中。THP-1 细胞培养在含 10%胎牛血清、非必需氨基酸、链霉素(100 μg/mL) 和青霉素(100 U/mL)的新鲜 RPMI1640 培养基中。细胞培养在 5% CO_2、37℃ 的培养箱中。当 293T 密度达到 80%左右,用胰蛋白酶消化,800 rpm 离心机离心后传代。THP-1 培养则浓度不超过 1× 10^9/L,隔一天传代一次。

1.2.2 THP-1-ISG15-OE 过表达细胞系的构建 在包装病毒的前一天在 10 cm 皿中铺上 293T 细胞, 供第二日包装病毒使用。构建并测序成功的含有 ISG15 的主质粒 pLVX-IRES-ZsGreen1 以及另外三种辅助质粒按一定的比例配制加入空培养基中配制成转染复合物,配置完成后将其静置 30 min。在静置后的转染复合物中加入 5 %的胎牛血清,轻轻摇匀。换去 293T 原有的培养基,加入上述所配置的转染复合物。6 h 后,将转染复合物弃去,加入正常 DMEM 培养基(含血清和双抗)。24 h 后,再加入适量 DMEM 培养基。48 h 后,收集病毒上清液并加入 PEG 6000 离心浓缩,即可得具有感染能力的慢病毒颗粒。

在慢病毒感染前,确保细胞状态良好,铺入 12 孔板中。放入适量的慢病毒颗粒, 并加入 8 μg/mL 助感染剂 Polybrene (Sigma)。感染 8 h 后,将含有慢病毒颗粒的培养基换成普通培养基,继续细胞培养 60 h,在荧光显微镜下观察细胞是否有绿色荧光,使用流式细胞仪分选阳性单克隆细胞。分选后的细胞在 96 孔板中培养约三周即可获得单克隆细胞系,然后用 Western Blotting 进行验证。使用相同的方法构建对照组 pLVX-IRES-ZsGreen1 空载细胞系。

1.2.3 THP-1-ISG15-OE 细胞系生长速率的测定 将验证后生长状态良好的 THP-1-ISG15-OE 细胞系离心收集,加入适当的培养基重悬, 细胞计数后每孔 3500 个细胞加入 96 孔板中,设有三个重复孔。分别在 0 h、12 h、24 h、36 h、48 h、60 h 时加入 CCK8 试剂,1.5 h 后使用酶标仪在 450 nm 处测量吸光度。测定结束后,根据吸光度绘制生长曲线。

CCK-8 试剂中含有 WST-8, 该化合物在电子螯合剂的存在下会被线粒体中的脱氢酶还原生成橙黄色的甲臜,而颜色的深浅则与细胞的数目成正比,细胞数目越多则颜色越深。因此利用这一原理, 通过酶标仪在 450 nm 处测吸光度可以间接得知细胞生长速率。

1.2.4 PMA 诱导 THP-1-ISG15-OE 细胞分化成巨噬细胞 离心收集生长状态良好的 THP-1-ISG15-OE 细胞系, 用适量的 RPMI 1640 培养基重悬,细胞重悬后计数,取 1× 10^5 细胞铺入六孔板中, 设有三个重复孔。向六孔板中加入终浓度为 10 ng/mL 的 PMA 进行诱导。PMA 诱导 24 h 后, 弃去含有 PMA 的培养基, 用 PBS 轻轻荡洗两次后加入普通培养基继续培养 48 h。需要使用分化好的巨噬细胞时,换液后再进行后续实验。

1.2.5 ISG15 过表达细胞的吞噬实验 在成功诱导 THP-1-ISG15-OE 细胞成为贴壁的巨噬细胞后, 加入脂多糖(LPS) 活化巨噬细胞 2 h,Latex Beads 使用前需要在 37℃ 中活化 30 min。六孔板中加入均等并过量的带荧光的 latex beads 孵育,孵育的时间分别为 1 h、2 h、4 h。到了相应的时间点后,立即吸去培养基, 用 PBS 溶液荡洗两次, 用胰蛋白酶消化细胞后 1000 rpm 离心,除去上清,重悬细胞。由流式细胞仪分析细胞吞噬 Latex Beads 的效率。

1.2.6 溶液内酶解与基于 TMT labeling 的定量蛋白质组学 分别培养 3 盘 10 cm 皿的过表达细胞系和对照组细胞系,收集后用 PBS 缓冲溶液洗涤三遍。收集好的细胞在 0.2%的 Triton X-100 冰上裂解 20 min,裂解后蛋白溶液经 12,000 rpm 高速离心 15 min,取上清液。将上清液中的蛋白用 BCA 试剂盒测蛋白浓度,各取 100 μg 的蛋白,加入终浓度为 10 mM 的 DTT,50℃ 放置 20 min 再室温放置 30 min, 再加入终浓度为 25 mM 的 IAM,室温避光 30 min。随后加入 5 倍体积量的在 -20℃ 预冷的丙酮沉淀 4 h,高速离心弃上清,晾干。使用 100 mM 的 TEAB 复溶后加入 2 μg 的胰蛋白酶酶解 12 h。终止酶解后, 加入 TMT 试剂标定酶解后的肽段。在 TMT 试剂室温标记 1 h 后加入 4 μL 5%羟胺终止。将以上六组样品混合,HPLC 分样后真空

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

离心浓缩至 12 个组分,送入 LC-MS/MS 分析。

1.2.7 LC-MS/MS 分析及组学数据处理 实验中定量蛋白质组学所用的 LC-MS/MS 分析使用的是 Thermo 公司的 Q-Exactive (QE)仪器。液相中流动相 A 是含有 0.1%甲酸的水溶液,流动相 B 是含有 0.1%甲酸的乙腈溶液。蛋白质组学中的样品使用 0.25 μL/min 的流速,120 min 梯度洗脱。在液相分析中串联使用了预柱及分析柱。其中预柱柱长 2 cm,内径为 100 μm,填充材料为 5 μm 颗粒直径 100 Å 的 C18 树脂;分析柱是为 C18 填料(300 Å,5 μm,Varian, Lexington,MA)石英毛细柱(75 μm 内径,150 mm 长;Upchurch, Oak Harbor, WA)。肽段先后流经预柱和分析柱,洗脱后进入 Q-Exactive (QE)仪器。QE 使用的是 Data-dependent acquisition mode,一张全扫描的一级质谱(400-1800 m/z,30000 分辨率)采集 20 张数据依赖的二级质谱图。一级质谱分辨率为 75000,扫描范围在 300-1800 m/z。二级扫描的 isolation window 为 2 Da,动态排除时间为 60 s,碎片能量为 30% HCD。质谱数据用 Xcalibur 2.0.7 软件分析。

所得的质谱图被送入 Proteome Discoverer 2.1 软件中使用来自 Uniprot 的 human.fasta 进行搜索,搜索时设置的条件是:Trysin 酶切、carbamidomethylation (C)和 TMT sixplex (K and N-teminal)作为固定修饰、oxidation (M)作为可变修饰、precursor ion mass torlerances 设为 10 ppm、fragment ion mass 设为 20 ppm。

1.3 统计分析

做图及统计分析在 Graphpad5 软件中完成,实验结果以平均数± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,所得数据使用 t 检验进行统计分析,其中 * 代表 $P<0.05$,** 代表 $P<0.01$,*** 代表 $P<0.001$。

2 结果

2.1 ISG15 过表达细胞系的构建及其诱导分化

使用 Western Blotting 对 ISG15 在 THP-1 中过表达效果进行验证,在荧光显微镜下可以观测到细胞发出强烈的荧光,同时通过使用 Western Blotting 的方法发现过表达组与对照组的 β-actin 参照基本一致,ISG15 过表达的效果明显(图 1)。实验结果证明本研究成功建立了 THP-1-ISG15-OE 过表达细胞系。构建好的 THP-1-ISG15-OE 过表达细胞系,生长状态良好,呈单细胞或小聚团状态悬浮生长经过 24 h 后,绝大部分细胞贴壁并呈现出有树突状分支。

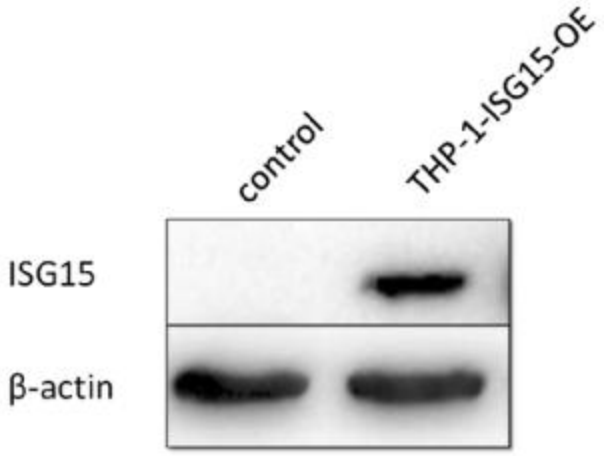

图 1 ISG15 在 THP-1 中过表达 Western Blotting 验证图

Fig.1 Verification of ISG15 overexpression in THP-1 cells by Western Blotting

2.2 ISG15 过表达对细胞增殖的影响

采用构建好的 ISG15 过表达细胞系及其对照组进行细胞增殖速率实验。在 96 孔板中铺好等量的细胞并在 0 h、12 h、24 h、36 h、48 h、60 h 时加入 CCK8 试剂,1.5 h 后在 450 nm 处检测吸光度。通过吸光度可以看出,在 0 h 和 12 h 处两组细胞系的吸光度相近,但随着测量的时间推进可以看见过表达细胞系与对照组之间的差异逐渐扩大,说明两者之间的增殖速率呈明显分开的趋势,过表达组的生长速率低于对照组。在 48 h 处两组细胞数量均达到最高,随后下降。由此可见,ISG15 过表达细胞系的生长速度明显低于其对照组,这说明 ISG15 的过表达使得 THP-1 的增殖生长速率降低(图 2)。

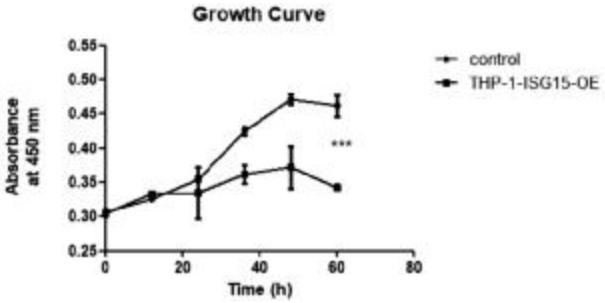

图 2 CCK-8 测出 ISG15 过表达细胞系与对照组的生长曲线,每个时间点有三次重复取平均值,*** 代表 $P<0.001$。

Fig.2 Growth rate measured for ISG15 overexpressing cells and control cells by CCK-8. Results are the mean of three experiments, *** $P<0.001$.

2.3 ISG15 过表达对细胞吞噬能力的影响

为了探讨 ISG15 在细胞吞噬中的作用,Latex Beads 被用于分析 ISG15 对 THP-1 细胞吞噬作用的影响。Latex Beads 是一种成熟的可用于模仿细胞吞噬病原体的替代物[23]。实验中,将经过 PMA 刺激分化好的 ISG15 的过表达细胞系及其对照组经过 LPS 的活化后,与 Latex Beads 共同孵育。孵育时间分别为 1 h、2 h、4 h,经 PBS 荡洗和离心后通过流式细胞仪分析细胞的吞噬效率。由实验结果可知,过表达细胞的吞噬能力在不同的时间段均低于其对照组(图 3),可以看出 ISG15 在 THP-1 中的过表达降低了其吞噬能力。

2.4 ISG15 过表达细胞系的蛋白质组学分析

ISG15 会影响体内多种生物学过程,例如转录调控,信号转导和炎症反应等,因此认为 ISG15 能够调控巨噬细胞内的蛋白质水平的变化,从而引起以上表型的变化。为了验证这一猜想,本研究进行了以 TMT labeling 为基础的定量蛋白质组学实验(图 4),结合 PD2.1 软件和 PANTHER 聚类分析等,系统地探讨 ISG15 过表达对巨噬细胞蛋白质表达水平变化的影响。

TMT 标记是目前蛋白质组学中常用的一种定量方法,试剂分子包含了分子量报告基团(Mass Reporter)、质量标准化基团(Mass Normalizer)和氨基反应基团(NH2 Reactive Group),其中的氨基反应基团会与肽段的 N 端以及赖氨酸的侧链氨基反应[24]。相同序列的肽段被 TMT 标记后,其 TMT 试剂中的报告离子在二级质谱中断裂释放在低质荷比区域,产生质量近似为 126、127、128、129、130、131 的六标试剂离子碎片,其强度反应了在蛋白在相对表达量信息。

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

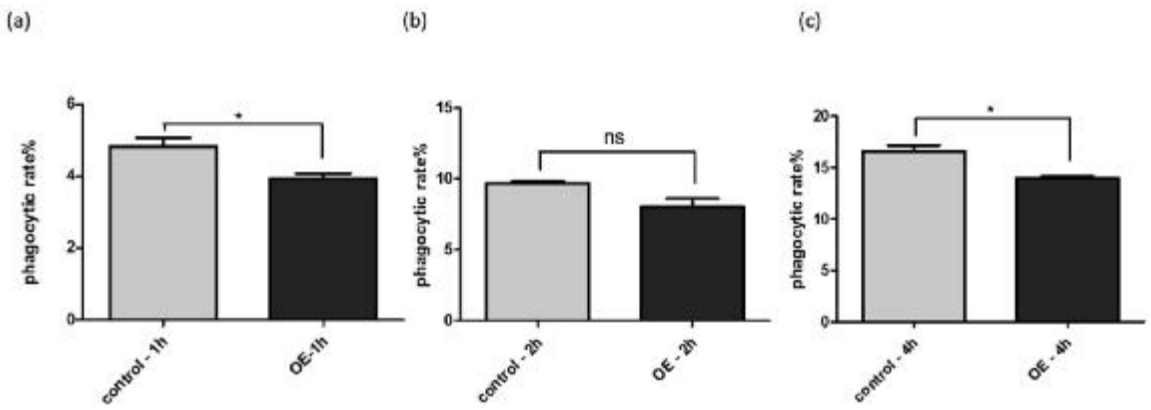

图 3 ISG15 过表达细胞系与对照组的吞噬实验。经 LPS 活化后,(a)细胞与 Latex Beads 孵育 1 小时;(b) 细胞与 latex beads 孵育 2 小时;(c) 细胞与 Latex Beads 孵育 4 小时,* 代表 P＜0.05。

Fig.3 Phagocytic assay for ISG15 overexpressing cells and control cells. After LPS treatment, (a) cells were incubated with latex beads for 1h, (b) cells were Incubated with latex beads for 2h, and (c) cells was incubated with latex beads for 4h, *P＜0.05.

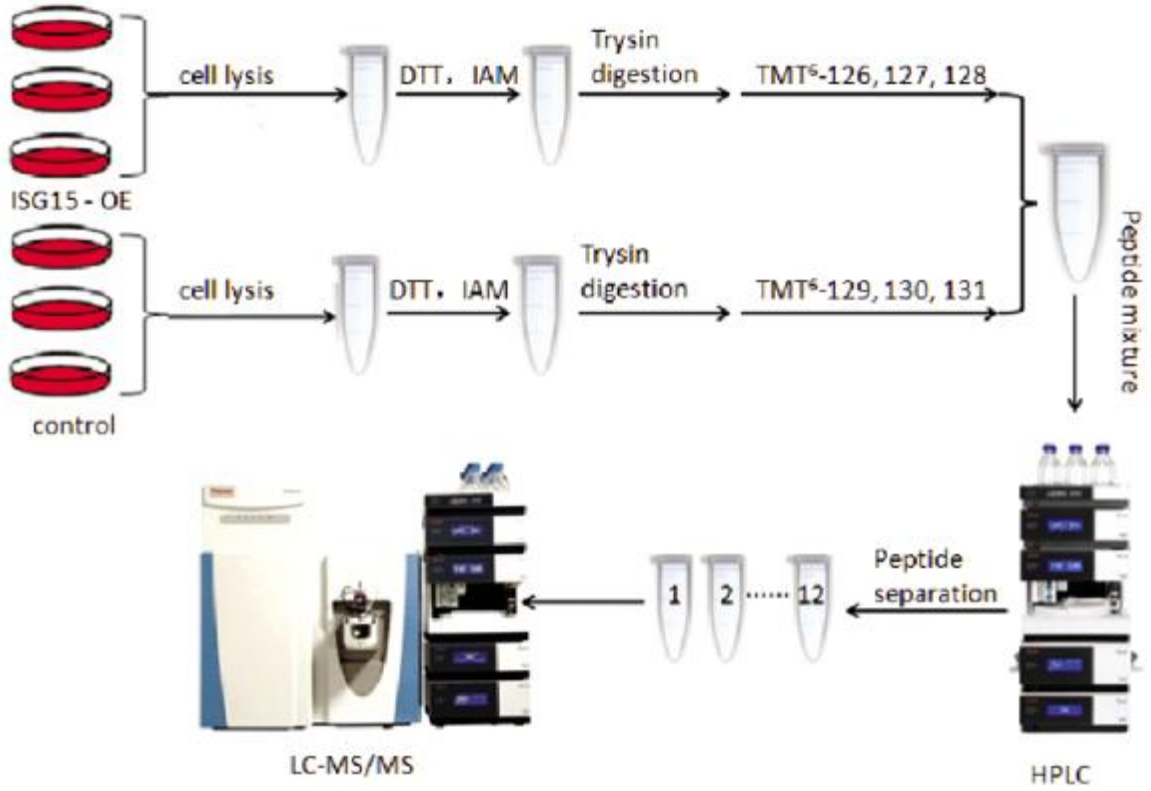

图 4 基于 TMT 标记的定量蛋白质组学流程图

Fig.4 Flow chart of TMT-based quantitative proteomics

经过三次重复,本研究一共在 ISG15 过表达细胞中鉴定到 6438 个在 SEQUEST 中 score 大于 5 分的蛋白,其中有 529 个上调 1.5 倍以上的蛋白和 172 个下调 30%以下的蛋白，其中 ISG15 蛋白显示有 2.8 倍的过表达效果。随后,使用 PATHER 对这些显著变化的蛋白进行聚类分析(图 5a)。从生物过程上来看,ISG15 过表达对细胞的影响是多方面的,涉及代谢过程、胞内过程、定位和生物调控等。随后对聚类分析中占比较大的细胞过程(33%)和代谢过程(28%)进行进一步的细化分析(图 5b, c)。除了以上提及的两类占比较大的过程外,其它例如细胞成分组织或生物起源、生物调节、定位、对刺激的反应等也占有从 5～12 %不等的比例。

从蛋白质组学数据中,糖酵解过程中有一个关键酶:丙酮酸激酶,有 0.7 倍的下调,同时也观察到糖酵解中其他的酶虽然没有达到 0.7 倍以下的显著下调，但也有不同程度地下调:磷酸果糖激酶(0.8)、缩醛酶(0.9)、丙糖磷酸异构酶(0.9)、甘油磷酸激酶(0.8)、磷酸甘油酸变位酶(0.9)、烯醇化酶(0.8)(图 5d)，说明在 ISG15 过表达细胞中 ISG15 通过某种途径参与到了糖酵解的过程,并影响了糖酵解过程的关键酶,使其表达量下降,结果表明这些糖酵解相关酶的下调使得过表达细胞系的供能不足,从而造成细胞生长速率减慢。除此之外,注意到例如 EHD2(0.7)、JAGN1(0.7)、RAB6B(0.7),以及下调程度较小的 AP2M1(0.8)、AP3B1(0.8)、CLTC(0.8)等与膜转运相关的蛋白的下调(图 5e),结果说明这些蛋白的下调有可能造成细胞吞噬能力的下降。ISG15 在目前研究中被人所熟知的角色是在先天

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

免疫系统中的作用，通过 PANTHER 的蛋白分类，在上调蛋白中 IL10RB(1.7)、NCR3LG1(1.7)和 SDC2(2.6)与人体的免疫防卫有关(图 5f)，其中 IL10RB 是细胞表面多种细胞因子的受体(例如 IL10, IL22)，二者结合后激活 JAK/STAT 信号通路，诱导 IFN-stimulated genes(ISGs)使细胞处于抵抗病毒感染的状态[25]，而 NCR3LG1 在人体中激活 NCR3 依赖的 NK 细胞[26]，以上的数据表明 ISG15 可能通过调节以上蛋白的以增强人体中的先天免疫系统。

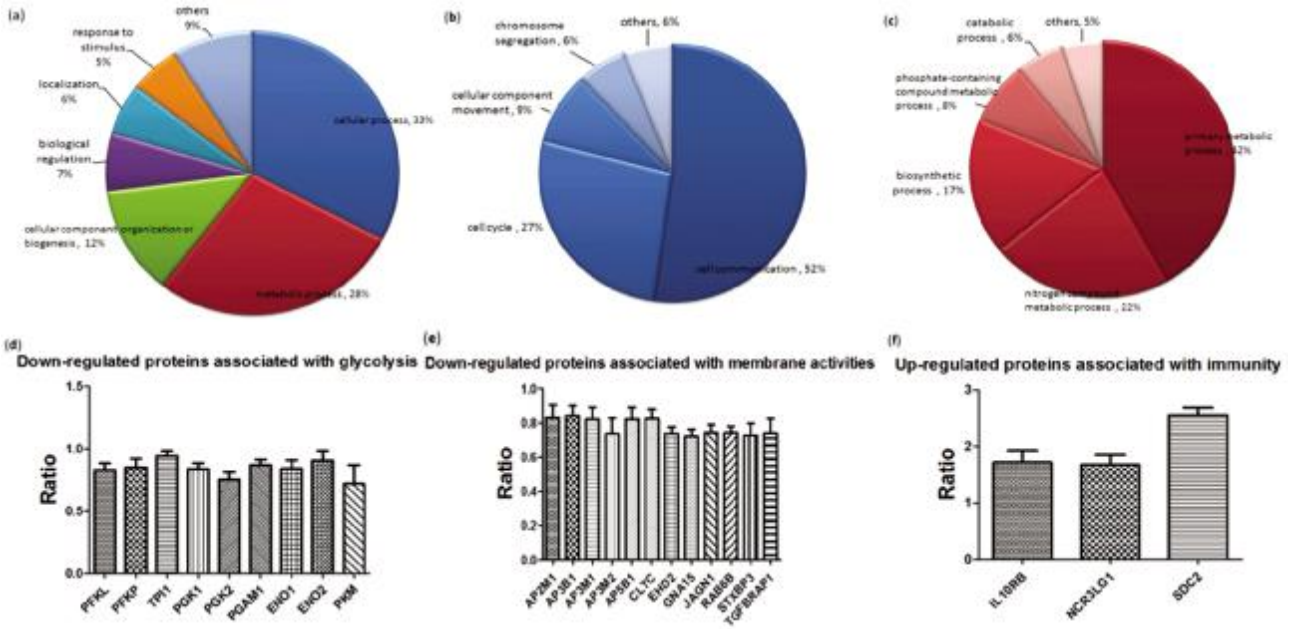

图 5 ISG15 过表达引起的显著变化蛋白的聚类分析。(a)图是显著上下调蛋白的总聚类分析图；(b)图是 cellular process 中的分析；(c)图是 metabolic process 中的分析；(d)是 9 个与糖酵解相关的酶，分别有不同程度地下调：ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type、ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type、Triosephosphate isomerase、Phosphoglycerate kinase 1、Phosphoglycerate kinase 2、Phosphoglycerate mutase 1、Alpha-enolase、Gamma-enolase 和 Pyruvate kinase；(e)是 12 个与膜转运相关的下调蛋白：AP-2 complex subunit mu、AP-3 complex subunit beta-1、AP-3 complex subunit mu-1、AP-3 complex subunit mu-2、AP-5 complex subunit beta-1、Clathrin heavy chain、EH domain-containing protein、Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-15、Protein jagunal homolog 1、Ras-related protein Rab-6B、Syntaxin-binding protein 3 和 Transforming growth factor-beta receptor-associated protein 1；(f)是三个与免疫相关的上调蛋白：Interleukin-10 receptor subunit beta、Natural cytotoxicity triggering receptor 3 ligand 1 和 Syndecan-2。

Fig.5 Functional classification of differentially expressed proteins between ISG15 expressing cells and control cells. (a) Functional classification of all differentially expressed proteins. (b) Cellular processes associated with differentially expressed proteins. (c) Metabolic processes associated with differentially expressed proteins. (d) Nine downregulated proteins associated with glycolysis: ATP-dependent 6-phosphofructokinase (liver type), ATP-dependent 6-phosphofructokinase(platelet type), Triosephosphate isomerase, Phosphoglycerate kinase 1, Phosphoglycerate kinase 2, Phosphoglycerate mutase 1, Alpha-enolase, Gamma-enolase, Pyruvate kinase. (e) Twelve downregulated membrane-associated proteins: AP-2 complex subunit mu, AP-3 complex subunit beta-1, AP-3 complex subunit mu-1, AP-3 complex subunit mu-2, AP-5 complex subunit beta-1, Clathrin heavy chain, EH domain-containing protein, Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-15, Protein jagunal homolog 1, Ras-related protein Rab-6B, Syntaxin-binding protein 3, Transforming growth factor-beta receptor-associated protein 1. (f) Three upregulated proteins associated with immunity: Interleukin-10 receptor subunit beta、Natural cytotoxicity triggering receptor 3 ligand 1 和 Syndecan-2。

3 讨论

ISG15 作为一类类泛素蛋白，与泛素不同的是泛素在跨物种间有将近 100%的保守性而 ISG15 在不同物种之间的保守性很低。这种在物种间的低保守性暗示在不同种属之间 ISG15 在免疫系统扮演的角色可能并不相同。在 Lenschow 等人[27]的实验中 ISG15 缺失的小鼠相比于野生型小鼠表现出对病毒抵抗力下降的现象，但是在 Speer 等人[28]的实验中可以看到 ISG15 缺失的病人中并没有显示出对病毒易感性的增加，可见 ISG15 在机体免疫中作用远比想象中的复杂，证明不同种属之间显示出不同表型的原因在于是否需要游离的 ISG15 来稳定 USP18。在 ISG15 表达的过程中，当干扰素与细胞表面上的干扰素受体复合物 IFNAR2 结合后，下游的 JAK1 与 TYK2 被磷酸化，随后激活并磷酸化下游的 JAK/STAT，诱发下游的 ISGs 的表达。在正常的人体中，ISG15 与 USP18 相互作用并与 JAK1 竞争结合在干扰素复合体上，导致下游的信号传导被阻断，ISGs 不表达；在 ISG15 缺失的病人中，因为没有 ISG15 的存在，USP18 被泛素化通过 SKP-2 介导进而被蛋白酶体降解，此时，JAK1 和 TYK2 磷酸化，激活下游信号表达 ISGs。而在小鼠体中，不管是否存在 ISG15，USP18 都能稳定结合在干扰素复合体上，因此不论是野生型小鼠还是 ISG15 敲除小鼠，USP18 都会导致 ISGs 表达的下调[28]。

USP18 除了与干扰素复合体中 IFNAR2 有相互作用外，还与 STAT2 有相互作用。STAT2 是 IFN α/β 信号通路中关键的

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

信号因子,STAT2 会招募 USP18 到干扰素受体复合物中的 IFNAR2 亚基上,这对于 USP18 负调控 IFN 引起的 JAK1 磷酸化至关重要[29]。从以上的叙述可知,USP18 主要有两个功能:一是作为特异地识别 ISG15 并从目的蛋白上移除 ISG15 修饰的酶,二是与细胞膜上的干扰素受体结合,阻碍下游 IFN α/β 信号的传导。Basters 等人[30,31]解析出 USP18 和 USP18-ISG15 复合物的结构,证明 ISG15 的 C 端结构对于 USP18 识别至关重要。选择性地使 USP18 失活能增强小鼠对病毒的抵抗能力,这暗示着通过设计出抑制 USP18 的活性的抑制剂[32],增加细胞内 ISG15 化的程度,可能是一个潜在的抗病毒治疗中的新策略。

除了在抗病毒先天免疫中,ISG15 和 ISG15 化仍有许多值得深入研究的地方,越来越多的证据表明 ISG15 及 ISG15 化在抗肿瘤领域也表现出巨大的潜力。ISG15 是由 I 型干扰素激活 IFN α/β 信号通路的产物,但同时 ISG15 能通过抑制 NF-κB 信号通路传导从而引起细胞凋亡,从而达到控制肿瘤生长的效果。Mao 等人[33]研究发现,ISG15 的上调会引起 K562、O-CI-AML2 和 OPM2 细胞增殖活性的下降,并引起肿瘤细胞凋亡,同时能抑制 IKKβ 和 p-p65,它们是 NF-κB 信号通路中关键的组成因子。Guo 等人[34]证明,在大多数肿瘤中 USP18 的 mRNA 水平和蛋白水平都是上调的。Kim 等人[35]研究的肌肉浸润性膀胱癌患者中,USP18 低表达的患者生存率高于 USP18 的高表达患者,这研究说明抑制 USP18 对于抑制肿瘤发生有积极的作用,并认为 USP18 可以作为一个可靠的肌肉浸润性膀胱癌患者预后生存指标。在乳腺癌患者中,超过 70%乳腺癌患者中 ER α+ 阳性,其余的 30%患者是 ER α- 阴性,现有的药物氟维司群和泰莫西芬用于治疗 ER α+ 患者,而对于 ER α- 患者目前没有有效的药物[36,37]。然而 Tecalco-Cruz 等人[38]证实在乳腺癌中 ISG15 的高表达,而且在 ER α+ 和 ER α- 不同亚型的患者中没有明显区别,在使用 IFN-γ 刺激后游离态的 ISG15 和结合态的 ISG15 表达均上升。在不同乳腺癌类型细胞中游离 ISG15 主要在细胞质中高表达,然而结合态的 ISG15 则因细胞类型的结合的靶蛋白分布不同[38],说明 ISG15 可以作为乳腺癌的生物标志并且依据 ISG15 修饰的靶蛋白类型的选择不同的治疗方案。

与上述抗病毒机制和抗癌机制研究不同,本课题研究 ISG15 在巨噬细胞过表达后在细胞水平和蛋白质水平上引起的变化:ISG15 在 THP-1 中的过表达导致 THP-1 的增殖速率延缓,吞噬能力下降。在 700 多个显著变化的蛋白中找到糖酵解酶和膜转运蛋白的显著下调。得出结论,糖酵解相关蛋白的下调导致细胞增殖速度降低,同时膜转运相关蛋白的下调引起细胞吞噬能力的下降。

综上所述,ISG15 不仅在调节 USP18 与干扰素信号通路上起着中重要作用,ISG15 化与去 ISG15 化在调控癌症显示出巨大的潜力,本课题研究证明 ISG15 还能通过影响糖酵解酶和膜转运过程从而改变细胞表型,可见 ISG15 在细胞内影响的范围十分广泛,其功能研究仅露出冰山一角,尚需深入了解。本研究结果为深入理解 ISG15 在抗病毒先天免疫以及抗癌中的生物学功能提供了新的实验数据。

参 考 文 献(References)

[1] Recht M, Borden EC, Knight E Jr. A human 15 kDa IFN-induced protein induces the secretion of IFN-gamma [J]. Journal of Immunology, 1991, 147: 2617

[2] Farrell PJ, Robert JB, Peter L. Accumulation of an mRNA and protein in interferon-treated Ehrlich ascites tumour cells [J]. Nature, 1979, 279: 523-5255

[3] Nobuyuki T, Tadatsugu T. The interferon regulatory factors and oncogenesis[J]. Seminars in Cancer Biology, 2000, 10: 73-81

[4] Narasimhan J, Ming W, Zhu JF, et al. Crystal structure of the interferon-induced ubiquitin-like protein ISG15[J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280: 27356-27365

[5] Skaug B, Zhijian JC. Emerging Role of ISG15 in Antiviral Immunity [J]. Cell, 2010, 143: 187-190

[6] Tien YH, Chen Z, Robert MK. Interferon-Induced ISG15 Conjugation Inhibits Influenza A Virus Gene Expression and Replication in Human Cells[J]. Journal of Virology, 2009, 83: 5971-5977

[7] Joo JY, Hee MY, Chin HC. ISG15 and immune diseases [J].BBA - Molecular Basis of Disease, 2010, 1802: 485-496

[8] Weiming Y, Robert MK. Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein [J]. Embo Journal, 2001, 20: 362-371

[9] Chen Z, Sylvie L B, Melissa L K, et al. The UbcH8 ubiquitin E2 enzyme is also the E2 enzyme for ISG15, an IFN-α/β-induced ubiquitin-like protein [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101: 7578-7582

[10] Keun II K, Nadia V G, Herbert W V, et al. Interferon-inducible ubiquitin E2, Ubc8, is a conjugating enzyme for protein ISGylation [J]. Molecular and Cellular Biology, 2004, 24: 9592-9600

[11] Anahita D, Sylvie B, Melissa K, et al. Herc5, an interferon-induced HECT E3 enzyme, is required for conjugation of ISG15 in human cells[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281: 4334-433

[12] Joyce J YW, Yuh FP, Newman S KS, et al. HERC5 Is an IFN-Induced HECT-Type E3 Protein Ligase That Mediates Type I IFN-Induced ISGylation of Protein Targets [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103: 10735-10740

[13] Michael PM, Oxana AM, Keun II K, et al. UBP43 (USP18) specifically removes ISG15 from conjugated proteins [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277: 9976-9981

[14] Anthony JS, Bryan R GW. IFN-inducible antiviral effectors [J]. Nature Reviews Immunology, 2008, 8: 559-568

[15] Chen Z, Carilee D, Jon M H, et al. Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102: 10200-10205

[16] Auwerx J. The human leukemia cell line, THP-1: a multifacetted model for the study of monocyte-macrophage differentiation [J]. Experientia, 1991, 47: 22-31

[17] Qin Z. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature[J]. Atherosclerosis, 2012, 221: 2-11

[18] Peter D, Heike S. Protein kinase C-α and -β play antagonistic roles in

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

the differentiation process of THP-1 cells [J]. Cellular Signalling, 2000, 12: 297-302

[19] Anthony JS , Bryan R. G.W. Interferon-inducible antiviral effectors [J]. Nature reviews. Immunology, 2008, 8: 559-568

[20] Ian FP, Paula MP. Viral Defense, Carcinogenesis and ISG15: Novel Roles for an Old ISG[J]. Cytokine & growth factor reviews, 2007, 18: 409-417

[21] Sen GC, Sarkar SN. The Interferon-Stimulated Genes: Targets of Direct Signaling by Interferons, Double-Stranded RNA, and Viruses. in Interferon: The 50th Anniversary: 233-250

[22] Jung HK, Jiann KL, Dong EZ. The Level of Hepatitis B Virus Replication Is Not Affected by Protein ISG15 Modification but Is Reduced by Inhibition of UBP43 (USP18) Expression[J]. Journal of Immunology, 2008, 181: 6467-6472

[23] Emilio Y, Alicia G, Alao F, et al. ISG15 Regulates Peritoneal Macrophages Functionality against Viral Infection[J]. Plos Pathogens, 2013, 9: e1003632

[24] Helen LB, James C, Peter V U, et al. Candidate verification of iron-regulated Neisseria meningitidis proteins using isotopic versions of tandem mass tags (TMT) and single reaction monitoring[J]. Journal of Proteomics, 2009, 73: 231-239

[25] Donnelly PR, Faruk S, Sergei VK, et al. The expanded family of class II cytokines that share the IL-10 receptor-2 (IL-10R2) chain[J]. Journal of Leukocyte Biology, 2004, 76: 314-321

[26] Cameron SB, Myriam B, Eugene CY, et al. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans [J]. The Journal of experimental medicine, 2009, 206: 1495-1503

[27] Deborah JL, Caroline L, Natalia FS, et al. IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, 104: 1371-1376

[28] Scott DS, Zhi L, Sofija B, et al. ISG15 deficiency and increased viral resistance in humans but not mice [J]. Nature communications, 2016, 7: 11496

[29] Keiichiro A, Sara L, Samuel AS, et al. STAT2 is an essential adaptor in USP18-mediated suppression of type I interferon signaling [J]. Nature Structural and Molecular Biology, 2017, 24: 279-289

[30] Anja B, Klaus-Peter K, Günter F. How USP18 deals with ISG15–modified proteins: structural basis for the specificity of the protease [J]. Febs Journal, 2017

[31] Anja B, Paul PG, Annaka R, et al. Structural basis of the specificity of USP18 toward ISG15 [J]. Nature Structural and Molecular Biology, 2017, 24 (3)

[32] Lars K, Ronny H, David JM, et al. Selective inactivation of USP18 isopeptidase activity in vivo enhances ISG15 conjugation and viral resistance [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112: 1577-1582

[33] Hongwu M, Man W, Biyin C, et al. Interferon-stimulated gene 15 induces cancer cell death by suppressing the NF-κB signaling pathway [J]. Oncotarget, 2016, 7: 70143-70151

[34] Yong LG, Fadzai C, Andrey VD, et al. Evidence for the Ubiquitin Protease UBP43 as an Antineoplastic Target [J]. Molecular cancer therapeutics, 2012, 11: 1968

[35] Ye HK, Won TK, Pildu J, et al. Novel combination markers for predicting survival in patients with muscle invasive bladder cancer: USP18 and DGCR2[J]. Journal of Korean Medical Science, 2014, 29: 351-356

[36] Angeles CT, Josué OR. Mechanisms that Increase Stability of Estrogen Receptor Alpha in Breast Cancer [J]. Clinical Breast Cancer, 2016, 17: 1-10

[37] Angeles CT, Issis AP, Josué OR, et al. Nucleo-cytoplasmic transport of estrogen receptor alpha in breast cancer cells [J]. Cellular Signalling, 2017, 34: 121

[38] Angeles CT, Eduardo CR. Protein ISGylation and free ISG15 levels are increased by interferon gamma in breast cancer cells[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2018, 499: 973-978

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn