

肺上皮细胞自噬体在结核分枝杆菌感染中保护作用的分子机制*

郭旭光^{1,2} 夏 勇¹ 马越云² 郝晓柯^{2Δ}

(1 广州医学院第三附属医院检验科 广东 广州 510150;

2 第四军医大学西京医院全军临床检验医学中心 陕西 西安 710032)

摘要 目的: 构建 Atg5- 真核表达载体并瞬时转染肺上皮细胞细胞株, 探讨自噬在结核分枝杆菌感染上皮细胞中保护作用的分子机制。方法: 设计针对 Atg5 的 RNAi 序列, 化学合成后经过变性, 退火连接到 pSilencer™ 3.1-H1 hygro 真核表达载体, 经测序验证其正确性。脂质体法瞬时转染真核细胞 A549, 免疫印迹法检测瞬时转染的效果。用结核分枝杆菌分别感染正常和自噬表达低下的 A549 细胞, 通过检测 LDH 来观察细胞的坏死情况。结果: 成功的构建了 pSilencer™ 3.1-H1 hygro 真核表达载体并建瞬时转染了 A549 细胞株, 成功抑制了细胞的自噬功能。Atg5- 细胞对结核杆菌的抵抗能力下降。结论: 在自噬表达低下的细胞中, 细胞对结核分枝杆菌的抵抗能力有明显下降。在结核分枝杆菌感染上皮细胞的过程中, 自噬是一种保护机制。

关键词: 自噬; 自噬体; 结核分枝杆菌; 肺泡上皮细胞

中图分类号: R378.911, Q78 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273 (2011) 21-4019-05

The Effect of Autophagy on Mycobacterium Tuberculosis Infections of Lung Epithelial Cells and its Mechanism*

GUO Xu-guang^{1,2}, XIA Yong¹, MA Yue-yun², HAO Xiao-ke^{2Δ}

(1 Department of Clinical Laboratory Medicine, The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical university, Guangzhou 510150, China; 2 Center of Clinical Laboratory Medicine of People's Liberation Army, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT Objective: To construct the eukaryotic plasmid of Atg5 and transfect A549 cells, and to investigate the role of autophagy on Mycobacterium Tuberculosis infections of lung epithelial cells and its mechanism. **Methods:** The RNAi primer of Atg5 was designed, and the Oligos of 64 base pairs for hairpin RNA targeting Atg5 were synthesized. Eukaryotic victor pSilencer™ 3.1-H1 hygro was connected and DNA sequencing. The recombinant vector was transfected into A549 cells by lipofectamine™ 2000. Transient transfected A549 cell line was established and identified by Western blot. **Results:** The eukaryotic expression vector pSilencer™ 3.1-H1 hygro was constructed, and transient transfected A549 cell line was established. The protein was inhibited successfully. A549 cells and transient transfected A549 cell were infected with Mycobacterium Tuberculosis, and the LDH were detected. **Conclusions:** The capacity of A549 to resistance of Mycobacterium Tuberculosis was declined significantly in the cells with low autophagy. Autophagy is a defense mechanism in infected lung epithelial cells.

Key words: Autophagy; Autophagosome; Mycobacterium Tuberculosis; Lung Epithelial Cell

Chinese Library Classification: R378.911, Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273 (2011)21-4019-05

前言

结核分枝杆菌(Mycobacterium Tuberculosis, MTb)是人类重要的病原菌之一, 可侵入人体全身各种器官, 其中主要是肺脏, 引起肺结核病^[1]。过去大量的研究都关注于 MTb 与巨噬细胞的相互作用, 最近人们开始意识到肺泡上皮细胞在 MTb 感染中的重要性^[2]。MTb 不仅可以侵入上皮细胞, 在上皮细胞内复制, 而且比寄生在巨噬细胞内的 MTb 有更高的复制活性, 并刺激其分泌 γ - 干扰素等细胞因子, 产生细胞毒性, 促进 MTb 的播散和结核病的发生、发展^[3]。而自噬作为上皮细胞对细菌的一种保护机制目前国内外研究尚少。因此, 本课题拟深入研究

自噬与结核菌相互作用的分子机制, 对于了解 MTb 感染播散的发生以及应用 AEC II 的这一独特免疫功能进行防治研究都具有十分重要的意义。

RNAi 的作用提供了一种经济、快捷、高效的抑制特异基因表达的技术手段, 有助于研究基因在生物模型系统中的作用, 是研究基因功能的重要工具, 并且逐步成为病毒性疾病、遗传性疾病以及肿瘤等的基因治疗研究的一种手段^[4-6]。为研究自噬体在抵抗结核分枝杆菌过程中的作用, 本研究特设计了针对 Atg5 序列的 RNAi 序列, 并将其导入到表达载体 pSilencer™ 3.1-H1 hygro, 经测序鉴定, 序列完全正确。然后将测序正确的质粒转染 A549 细胞, 用 Western Blot 检测转染效果, 结果表明

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (30872358) 广州医学院青年基金项目 (2010A026)

作者简介: 郭旭光 (1983-), 男, 硕士, 主要研究方向: 临床分子生物学, 电话 020-81292243, E-mail: 44303291@qq.com

Δ 通讯作者: 郝晓柯, 电话: 029-84775455, E-mail: haoxkg@fmmu.edu.cn

(收稿日期: 2011-04-11 接受日期: 2011-05-05)

有很好的基因抑制效果。后进一步用该细胞模型验证自噬体在结核分枝杆菌感染中的作用。

1 材料与方法

1.1 RNAi 专用质粒

pSilencer™ 3.1-H1 hygro: 原核克隆表达载体, 购于 Ambion 公司。全长 4552bp, 为 RNAi 专用的表达载体, 含 H1 启动子, 复制起始点为 ColE1, 具有氨苄青霉素抗性, 潮霉素抗性, 含有 BamH I 和 HindIII 酶切位点(图 1)。

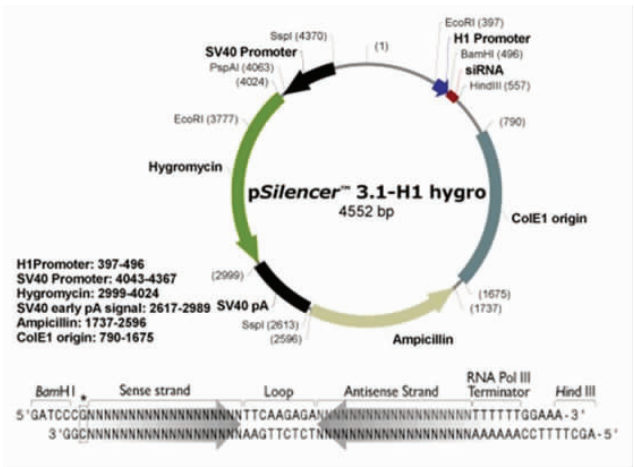


图 1 pSilencer™ 3.1-H1 hygro 质粒载体图谱
Fig.1 The Map of plasmid pSilencer™ 3.1-H1 hygro

1.2 菌株及细胞株

大肠杆菌 DH5a、BCG 菌株、肺泡 II 型上皮细胞 A549 细胞均由本室保存。

1.3 常用试剂

1.0mol · L⁻¹ Tris · HCl⁺、0.2mol · L⁻¹ NaH₂PO₄、1.74mg · ml⁻¹ (10mmol · L⁻¹) PMSF、0.2 mol · L⁻¹ Na₂HPO₄、10% 过硫酸铵 (AP)、10% SDS、0.5mol · L⁻¹ Tris · HCl (PH=6.8)、1.5mol · L⁻¹ Tris · HCl (PH=8.8)、40% Acr/Bic (37.5: 1)、20% Tween20、单去污剂裂解液 (PMSF)、0.01 mol · L⁻¹ PBS(PH=7.2-7.4)、0.15mol l · L⁻¹ NaCl、10% 的分离胶和 4% 的浓缩胶、10× 蛋白电泳缓冲液、5× SDS Loading Buffer、1× 蛋白电泳转移缓冲液、TBST 缓冲液、10× TBS 缓冲液、封闭液、抗体洗脱缓冲液、定影液、5× 显影液、固定液均有本室自行制备。抗体用 TBST 稀释至一定浓度, 一抗稀释浓度为 1:500, 二抗稀释浓度为 1:1000, 化学发光试剂 A 和试剂 B 均购于 Santa Cruz 公司。

1.4 RNAi 引物的设计

从 Genebnk 数据库中检索出 Atg5 基因的保守 mRNA 序列, 利用 Invitrogen 公司的在线设计软件得到 shRNA 的靶序列。根据 RNAi 引物设计的以下三个原则:(1) 从转录本 (mRNA) 的 AUG 起始密码开始, 寻找 "AA" 二连序列, 并记下其 3' 端的 19 个碱基序列, 作为潜在的 siRNA 靶位点。有研究结果显示 GC 含量在 45%-55%左右的 siRNA 要比那些 GC 含量偏高的更为有效。(2)在设计 siRNA 时不要针对 5' 和 3' 端的非编码区 (untranslated regions, UTRs), 原因是这些地方有丰富的调

控蛋白结合区域, 而这些 UTR 结合蛋白或者翻译起始复合物可能会影响 siRNP 核酸内切酶复合物结合 mRNA 从而会影响 siRNA 的效果。(3)将潜在的序列和相应的基因组数据库 (人, 或者小鼠, 大鼠等等) 进行比较, 排除那些和其他编码序列或 EST 同源的序列。例如使用 BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) (4) 选出合适的目标序列进行合成。通常一个基因需要设计多个靶序列的 siRNA, 以找到最有效的 siRNA 序列。

根据以上原则挑选了两个靶序列作为干扰的目的片段, 5'-GCAACTCTGGATGGGATTG-3', 5'-ATGGCATTATCCAAT-TGGT-3' 进而设计并合成两条互补的寡核苷酸序列, 插入 siRNA 表达载体 pSilencer3.1H1。序列如下:

Pr023:5'-GATCCGCAACTCTGGATGGGATTGTTCAAG-AGACAATCCCATCCAGAGTTGCTTTTTTGGAAA-3';

Pr024:5'-AGCTTTTCCAAAAAAGCAACTCTGGATGGG-ATTGTCTCTTGAACAATCCCATCCAGAGTTGCG-3';

Pr025:5'-GATCCATGGCATTATCCAATTGGTTTCAAGA-GAACCAATTGGATAATGCCATTTTTTGGAAA-3';

Pr026:5'-AGCTTTTCCAAAAAATGGCATTATCCAAT-GGTTCTCTTGAAACCAATTGGATAATGCCATG-3'。引物设计完成后, 送北京奥科生物技术有限责任公司合成。使用 Promega 质粒提取试剂盒提取并纯化质粒, 应用 M13 通用引物测序以确定是否有异常碱基的存在。

1.5 RNAi 质粒的构建

将线性化的质粒载体 pSilencer™ 3.1-H1 hygro 与退火的引物连接, 转化大肠杆菌感受态 E.coli DH5α, 并涂含有 100mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养基平板, 过夜后培养后挑取生长状态良好的菌落用含氨苄青霉素的 LB 培养液增菌。待菌液饱和后, 提取重组质粒, 取 10μl 提取的质粒送北京奥科生物技术有限责任公司用通用引物 M13F (40) 测序。测序引物为 M13F (-40): 5'-GTTTCCCAGTCACGAC-3', 3.0rev:5'-GAGTTAGCTCACT-CATTAGGC-3'。将测序正确的质粒瞬时转染 A549 细胞, 按试剂盒操作说明书中量抽提质粒, 按脂质体 lipofectamine2000 转染试剂盒操作说明书转染 A549 细胞。

1.6 Western Blot 鉴定

检测细胞用预冷的裂解液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1 mmol/L EDTA, 1% Triton X-100, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L 二硫苏糖醇, 10%甘油, 0.2 mmol/L 苯甲基磺酰氟、蛋白酶抑制剂) 裂解, 冰上孵育 30 min, 4℃, 15 000 r/min, 离心 20 min, 取上清液。用 Bio-Rad 公司的蛋白质分析试剂盒测定蛋白质浓度, 等量蛋白上样。12%的聚丙烯酰胺凝胶分离样品, 转移到硝酸纤维素膜上。一抗杂交后, 再用标有辣根过氧化酶的二抗杂交。洗膜后, ECL 发光剂检测曝光 X 线胶片。

1.7 细菌感染试验

将 A549 细胞接种于 3 个 6 孔板中, 每个实验组做 3 个复孔, 待细胞长至 80%-90%, 换液, 按以下分组要求加入每组应加的试剂。分组如下: Nomal, BCG, RNAi-D, RNAi-V 四组。按以上要求加好样品后, 培养板置于 37℃ 5%的 CO₂ 孵箱中孵育。分别于 4h, 8h, 16h, 24h 取 50μl 上清液测 LDH 的 OD (490nm)。

1.8 统计学分析

本研究各分组所得计量数据采用均数± 标准差 ($\bar{X} \pm S$)表示,用 SPSS10.0 软件处理数据,两组间均数比较用 t 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 RNAi 载体的构建

阳性菌落序列测定表明,成功构建了针对 Atg5 的 shRNA 干扰分子表达载体。分别命名为 pSilencer™ 3.1-H1-RNAi-D 和

pSilencer™ 3.1-H1 -RNAi-V。

转染 shRNA-LC3、shRNA-LC3 和 Control 后 72 h, 转染的 Blast 比对结果 (图 3) 显示在插入序列的第 16 个位点存在突变,原来设计的是 A,测序结果显示是 G,仔细对照测序结果发现,为电脑判断错误,在测序结果(图 2)第 127 位,测序峰为绿色,对应的碱基应该是 A,而电脑记录为 G,因此 pSilencer™ 3.1-H1-RNAi-D 插入的序列完全正确,可以使用。

Blast 比对结果(图 5)和测序结果(图 4)显示插入序列完全正确,载体 pSilencer™ 3.1-H1-RNAi-V 可以使用。

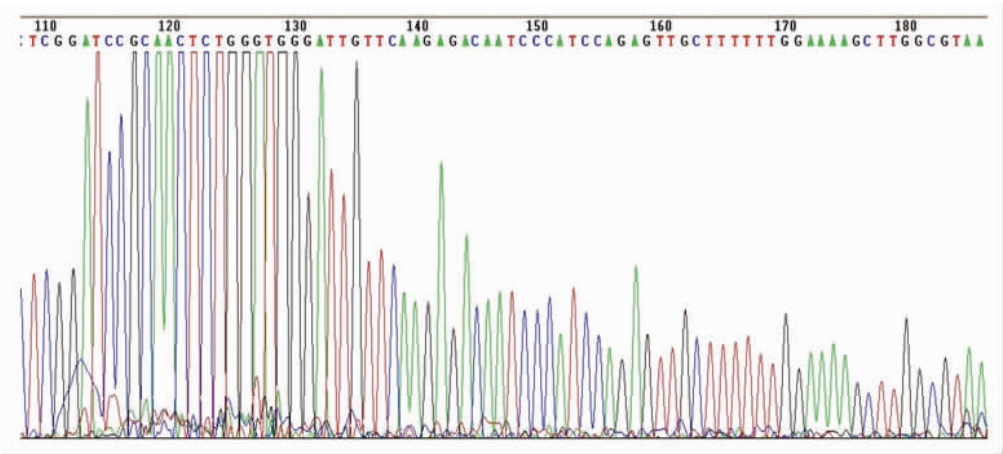


图 2 pSilencer™ 3.1-H1-RNAi-D 测序结果
Fig.2 Sequencing results of pSilencer™ 3.1-H1-RNAi-D

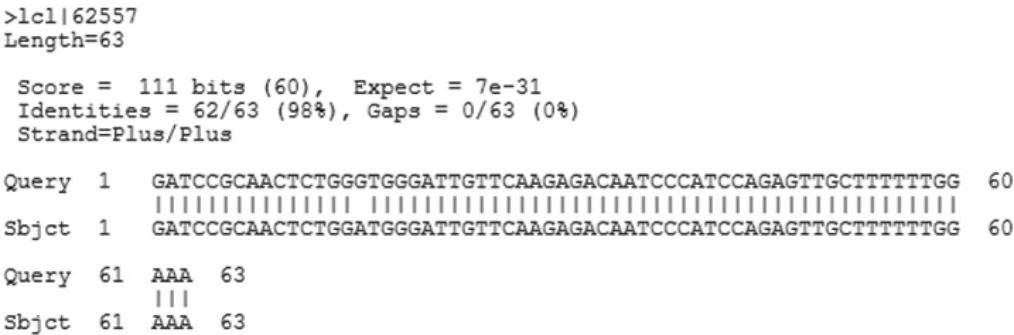


图 3 pSilencer™ 3.1-H1-RNAi-D 测序结果与设计序列的比对
Fig.3 Alignment results of pSilencer™ 3.1-H1-RNAi-D with the nucleotide sequences which we designed

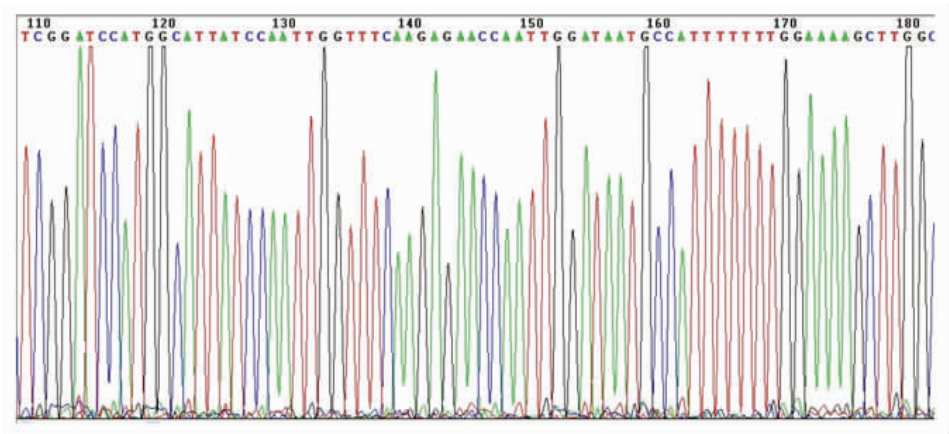


图 4 pSilencer™ 3.1-H1-RNAi- 测序结 V 果
Fig.4 Sequencing results of pSilencer™ 3.1-H1-RNAi-V

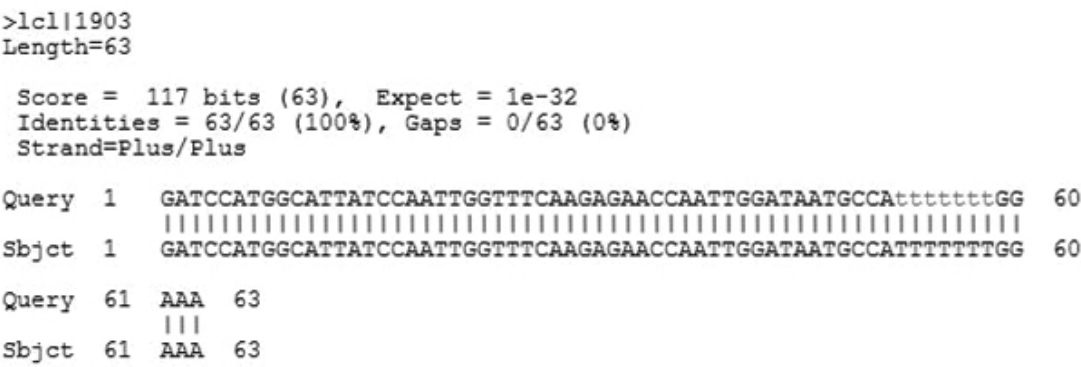


图 5 pSilencer™ 3.1-H1-RNAi-V 测序结果与设计序列的比对
Fig.5 Alignment results of pSilencer™ 3.1-H1-RNAi-V with the nucleotide sequences which we designed

2.2 RNAi 对 LC3 抑制作用的检测

结果显示所构建的重组质粒 pSilencer™ 3.1-H1-RNAi-D 和 pSilencer™ 3.1-H1-RNAi-V 能显著抑制 LC II 的表达,对 LC I 表达的影响不大(图 6)。主要是因为 LC I 到 LC3 II 的转化需要一系列的酶促反映,其中 Atg5-Atg12 复合物在其中发挥这重要的作用。我们用 RNAi 的方法把 Atg5 表达水平降低,有效的阻止了 LC I 到 LC3 II 的转变,影响了自噬体的成熟。应用此细胞模型可以进一步研究自噬体的其他作用。

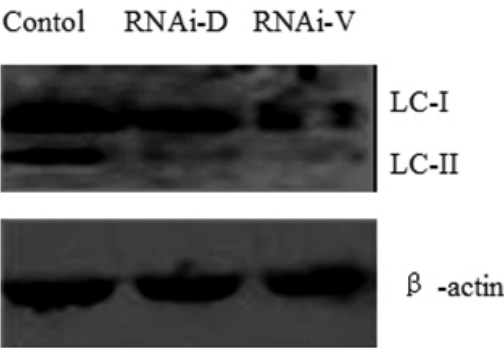


图 6 RNAiD 和 RNAiV 转染后 Western Blot 检测 LC3
Fig.6 Dtection of LC3 by Western Blot after transfection

2.3 自噬被抑制后 A549 细胞上清液中 LDH 的检测

将 A549 细胞接种于 96 孔板中,待细胞长至 80%-90%,换液,每孔加入含 100 ml·l⁻¹ 小牛血清的 RPMI-1640 培养液 150 ul 和密度为 1× 10¹¹·l⁻¹ 的结核分枝杆菌 50μl 使细菌:细胞≈ 10:1。设立对照组,组。置于 37℃ 5%的 CO₂ 孵箱中孵育。分别于 4h,8h,16h,24h 取 50μl 上清液测 LDH 的 OD (490nm)。LDH 的检测严格按照 Non-Radioactive Cytocity Assay 说明书进行。

以上结果表明,和正常的细胞相比,BCG 感染 A549 后,LDH 释放量有所增加(P<0.05)。说明 A549 在受到 BCG 的感染后,细胞坏死增加。而用我们设计的 pSilencer™ 3.1-H1-RNAi-D 和 pSilencer™ 3.1-H1-RNAi-V 质粒转染细胞,使自噬体的活性降低。再用 BCG 感染细胞,细胞 LDH 的释放明显增加(P<0.05)。说明自噬被抑制后,A549 细胞对 BCG 的抵抗能力下降。

而 BCG 可以造成 A549 细胞的坏死,进而有利于其在细胞间的传播。

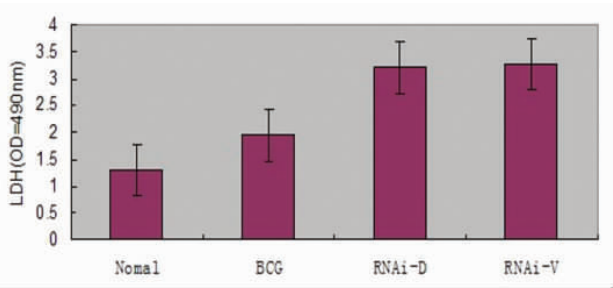


图 7 RNAi 后 BCG 对 A549 的作用
Fig.7 The effection of BCG to A549 after RNAi

在 BCG 感染 24h 后,结果尤为明显,自噬抑制组 pSilencer™ 3.1-H1-RNAi-D 和 pSilencer™ 3.1-H1-RNAi-V 相比 BCG 感染组,LDH 明显升高(P<0.05),说明自噬对 A549 细胞而言,是一种保护机制(图 8)。

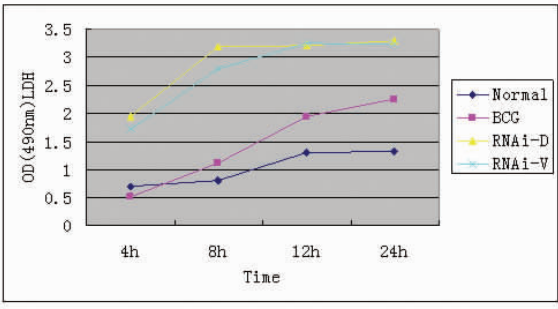


图 8 RNAi 24h 后 BCG 对 A549 的作用
Fig.8 The Effect of BCG to A549 after RNAi for 24h

3 讨论

自噬作用是近年发现的具有防御胞内病原菌的天然免疫和获得性免疫新途径^[7-10]。自噬体起源于内质网,由内质网膜包围细胞质成分(特别是膜性细胞器)而成。之后自噬体与次级溶酶体融合,形成自噬溶酶体,使内含物得以消化。它是真核细胞

自我新陈代谢的主要方式,是降解细胞内物质(包括损伤细胞器),以再利用,从而保持细胞生长和发育平衡的有效手段^[11-12]。自噬具有细胞保护作用,在氨基酸饥饿或胞浆细胞器遭受亚致死性损伤情况下,细胞自噬作用增强,以加强分解代谢或去除缺陷细胞器,为细胞补充营养和能量,抵御环境压力;但是长时间营养压力情况下,则会最终消耗尽包括线粒体在内的所有胞浆内结构,导致细胞死亡,即自噬性死亡 (Autophagic cell death),是细胞坏死途径之一^[13-15]。

本研究表明,在结核分枝杆菌感染上皮细胞的过程中,自噬作用是一种保护机制。结核分枝杆菌可以通过抑制上皮细胞自噬进而削弱细胞的抵抗能力,致使其坏死增加,从而促进结核分枝杆菌的扩散。本实验结果与前期的研究结果相一致,用 3-MA^[16-17]抑制细胞的自噬作用后,细胞对结核分枝杆菌的抵抗能力下降^[8]。但是结核分枝杆菌可以通过多种粘附分子与上皮细胞受体结合,其中最主要的是肝素结合血凝素(Heparin-binding hemagglutinin adhesion, HBHA)^[9-10]。研究表明 HBHA 可以黏附上皮细胞,如 Hep-2, A549, CHO 等,但是不能粘附巨噬细胞。BCG 是否通过 HBHA 抑制了上皮细胞的自噬,有待于进一步的研究。

本实验成功的构建了 pSilencer™ 3.1-H1-RNAi-D 和 pSilencer™ 3.1-H1-RNAi-V 表达载体,经测序鉴定序列完全正确。用以上重组质粒载体构建了人肺泡 II 型上皮细胞 Atg5 缺陷细胞株,经 Western Blot 验证了构建质粒的有效性。该质粒能明显降低 LC3 II 在 A549 细胞内的表达。为进一步研究自噬在上皮细胞抵抗结核分枝杆菌过程中的作用奠定了基础。

参考文献(References)

[1] Biketov S, Potapov V, Ganina E, et al. The role of resuscitation promoting factors in pathogenesis and reactivation of Mycobacterium tuberculosis during intra-peritoneal infection in mice [J]. BMC Infect Dis, 2007, 7(1):146-153

[2] Sharma M, Sharma S, Roy S, et al. Pulmonary epithelial cells are a source of interferon-gamma in response to Mycobacterium tuberculosis infection [J]. Immunol Cell Biol, 2007, 85(3):229-237

[3] Bermudez EL, Goodman J. Mycobacterium tuberculosis invades and replicates within type II alveolar cells [J]. Infect Immun, 1996, 64(4): 1400-1406

[4] Lau NC, Seto AG, Kim J, et al. Characterization of the piRNA Complex from Rat Testes[J]. Science, 2006, 21: 363-367

[5] Girard A, Sachidanandam A R, Hannon G J, et al. Agermline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins [J]. Nature, 2006, 442: 199-202

[6] Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S, et al. A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes[J]. Nature, 2006, 442: 203-207

[7] Beth Levine, Vojo Deretic. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity[J]. Nature Immunology, 2007, 7:767-777

[8] Ciechanover A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005, 6(1): 79-87

[9] Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy and cell death [J]. Curr Top Dev Biol, 2007,78:217-245

[10] Vergne I, Singh S, Roberts E, et al. Autophagy in immune defense against Mycobacterium tuberculosis [J]. Autophagy, 2006, 2 (3): 175-178

[11] Deretic V. Autophagy, an immunologic magic bullet: Mycobacterium tuberculosis phagosome maturation block and how to bypass it[J]. Future Microbiol, 2008, 5(3):517-524

[12] Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation [J]. Science, 2000, 290(5497): 1717-1721

[13] Marino G, Uria JA, Puente XS, et al. Human autophagins, a family of cysteine proteinases potentially implicated in cell degradation by autophagy [J]. J Biol Chem, 2003,278(6): 3671-3678

[14] Terman A, Gustafsson B, Brunk UT. Autophagy, organelles and ageing[J]. J Pathol, 2007, 211(2):134-243

[15] Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy and cell death [J]. Curr Top Dev Biol, 2007, 78: 217-245

[16] Li J, Hou N, Faried A, et al. Inhibition of autophagy by 3-MA enhances the effect of 5-FU-induced apoptosis in colon cancer cells [J]. Ann Surg Oncol,2009,16(3):761-771

[17] Punnonen EL, Marjomaki VS, Reunanen H. 3-Methyladenine inhibits transport from late endosomes to lysosomes in cultured rat and mouse fibroblasts[J]. Eur J Cell Biol, 1994,65(1): 14-25

[18] 郭旭光,马越云,周珊,等. 肺泡 II 型上皮细胞自噬体与结核分枝杆菌相互作用的研究[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(5): 810-813

Guo Xu-guang, Ma Yue-yun, Zhou Shan, et al. The Interaction between Mycobacterium tuberculosis and autophagy in Alveolar epithelial cell type II [J]. Progress In Modern Biomedicine, 2010,10(5): 810-813 (In Chinese)

[19] Menozzi FD, Reddy VM, Cayet D, et al. Mycobacterium tuberculosis heparin-binding haemagglutinin adhesin (HBHA) triggers receptor-mediated transcytosis without altering the integrity of tight junctions [J]. Microbes Infect,2006, 8(1): 1-9

[20] De Lima CS, Marques MA, Debie AS, et al. Heparin-binding hemagglutinin (HBHA) of Mycobacterium leprae is expressed during infection and enhances bacterial adherence to epithelial cells [J]. FEMS Microbiol Lett, 2009, 292(2): 162-169