

MRSA 对巨噬细胞系 RAW264.7 自噬的影响

朱军 吴本权 杨洋 朱家馨 张天托

【摘要】 目的 探讨耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 感染对于巨噬细胞自噬的影响。**方法** 以小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 为研究对象,以革兰阳性菌 MRSA 感染 3 h 组作为实验组,设立空白对照组 (对照组),另设 MRSA 感染 0、30、60、120、150、180 min 组。以 MRSA 感染细胞后,荧光定量 PCR 检测自噬相关基因 5 (ATG5)、ATG7、ATG12 的表达情况,蛋白免疫印迹法检测自噬相关蛋白 Beclin1 及微管相关蛋白轻链 3 (LC3) 的表达情况。**结果** 感染 MRSA 3 h 后,实验组 RAW264.7 细胞中 ATG5、ATG7、ATG12 的 mRNA 表达水平均高于对照组 (P 均 <0.01),LC3 蛋白相对表达量也比对照组增加 ($P < 0.01$),2 组间 Beclin1 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。ATG7、ATG12 mRNA 和 LC3 及 Beclin1 蛋白相对表达量均在感染 MRSA 180 min 组最高,ATG5 mRNA 在感染 MRSA 150 min 组最高。**结论** MRSA 可以诱导巨噬细胞发生自噬,自噬基因激活存在先后顺序,自噬可能为巨噬细胞吞噬胞外菌 MRSA 的另一种免疫灭活形式。

【关键词】 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;巨噬细胞;自噬

Effect of MRSA on the autophagy of RAW264.7 macrophage cell line Zhu Jun, Wu Benquan, Yang Yang, Zhu Jiaxin, Zhang Tiantuo. Department of Respiratory, ICU, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China

Corresponding author, Wu Benquan, E-mail: zswbq@163.com

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) infection upon the autophagy of macrophages. **Methods** Mouse monocyte-macrophage cell line RAW264.7 was used. In the experimental groups, RAW264.7 cells were infected with Gram-positive MRSA for different time points including 0, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 min. In the control group, the cells were left untreated. After MRSA infection, the expression of ATG5, ATG7 and ATG12 was measured by fluorescence quantitative PCR, and the expression levels of autophagy-related protein (Beclin1) and microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) were measured by Western blot. **Results** At 3 h after MRSA infection, the expression levels of ATG5, ATG7 and ATG12 mRNA in the experimental group were significantly higher compared with those in the control group (all $P < 0.01$). The relative expression of LC3 in the experimental group was considerably higher than that in the control group ($P < 0.01$), where the relative expression of Beclin1 did not significantly differ between two groups ($P > 0.05$). The relative expression levels of ATG7, ATG12 mRNA, LC3 and Beclin1 proteins peaked at 180 min following MRSA infection, and the level of ATG5 mRNA achieved the peak at 150 min after MRSA infection. **Conclusions** MRSA could induce autophagy in macrophages. The autophagy genes were activated in a certain sequence. Autophagy probably acted as an alternative immune process of phagocytosis of MRSA by macrophages.

【Key words】 Methicillin-resistant staphylococcus aureus; Macrophage; Autophagy

自噬是与真核生物关系密切的基础生理过程,通过细胞自我消化累积的蛋白质细胞器等各类复杂的细胞质成分,从而调节控制真核生物细胞内成分的数量与质量。现今,已有自噬与各种疾病的关系

研究^[1]。随着近年研究的逐步深入,巨噬细胞的自噬对于清除胞内病原体有何重要作用逐渐受到关注^[2-3]。自噬的作用机制在肺部疾病中,尤其在 COPD、特发性肺纤维化、肺结核等疾病中已有较

透彻的研究^[4]。关于自噬与肺部感染性疾病,如胞外菌感染的研究仍较少。近年,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)已成为引起医院内和社区相关性感染的重要致病菌之一,其治疗形式较为严峻^[5]。已有研究发现,自噬可以清除某些胞内菌,如李斯特菌、沙门菌和结核分枝杆菌^[6]。对于胞外菌 MRSA 感染细胞,巨噬细胞除吞噬外能否产生自噬的相关研究仍较少。本研究以小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 为对象,观察自噬在 MRSA 肺部感染中的作用,旨在探讨 MRSA 感染巨噬细胞对其自噬功能的影响。

材料与方法

一、材料

1. 细胞系及菌株

小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 购于中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心;MRSA 菌株为我院呼吸科实验室分离鉴定的临床菌株。

2. 主要试剂及仪器

DMEM 高糖培养基、胎牛血清、青霉素和链霉素购于美国 Life 公司, Syber Green Mix 实时定量 PCR 检测试剂盒购于美国 Life 公司。LC3 多克隆兔抗体购于美国 Sigma 公司;Beclin1 单克隆抗体购于美国 Cell Signaling Technology 公司,内参抗体 β -actin 兔一抗购于中国谷歌生物公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗购于广州威佳科技有限公司,增强化学发光(ECL)检测试剂盒购于广州聚研生物科技有限公司,细胞培养 6 孔板购于美国 Corning 公司。凯基全蛋白提取试剂盒及凯基 BCA 法蛋白浓度检测试剂盒购于广州杰特伟生物科技有限公司,蛋白质印迹法配胶成分 30% 聚丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)缓冲液、10% 十二烷基硫酸钠(SDS)溶液、过硫酸铵(APS)购于广州威佳科技有限公司,蛋白电泳转膜系统购于美国 Bio-Rad 公司。

二、方法

1. 细胞培养

RAW264.7 细胞用含 10% 胎牛血清、100 kU/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 DMEM 高糖培养基培养于 25 ml 的透气盖培养瓶内,将培养瓶置于 37℃、5% CO₂ 培养箱内,根据细胞数目形态,当细胞融合至 60%~70% 时将细胞传代,平均约 2~3 d 传代 1 次,保持实验用细胞处于对数生长期,细胞状态良好,在普通光学显微镜下折光度透亮,

未见大量颗粒及细胞碎片。

2. 细菌培养

将冻存于 -80℃ 的 MRSA 菌种在室温下解冻后,接种于血琼脂培养基,置于 37℃ 温箱培养 24 h,然后测定其在 600 nm 处吸光度(OD₆₀₀),当 OD₆₀₀ = 0.6,即约 1×10^9 /ml 时,置于 16% 甘油在 -80℃ 冻存。

3. MRSA 感染细胞

将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞按 1×10^6 /ml 的密度接种于 6 孔板,每孔加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液 2 ml,培养过夜,待每孔细胞数增至 2×10^6 时开始感染,根据预实验结果,按细菌:细胞 = 10:1 将 MRSA 加入培养板中感染细胞。第一部分的实验分为 2 组:空白处理作为对照组,MRSA 感染作为实验组。第二部分的实验为 MRSA 刺激时间点检测:将细胞均匀种于 6 孔板中,共分 7 组,第 1 组为对照组、第 2 组加入 MRSA 作用 30 min、第 3 组加入 MRSA 作用 60 min,组间相隔 30 min,以此类推,第 7 组 MRSA 作用时间为 180 min。每组实验重复 3 次,取均值作为结果。

4. ATG mRNA 表达水平的检测

采用荧光定量 PCR(qPCR)法:根据 Gen Bank 数据库的 ATG 基因序列,分别设计 ATG5、ATG7、ATG12 特异性引物,由美国 Life 公司合成,引物序列见表 1。收集上述各组细胞,在 6 孔板每孔加入 1 ml Trizol 提取细胞总 RNA 并进行模板 DNA 第一链合成,然后加入 10 μ l Syber Green 混合物,反应体系总体积 20 μ l,采用 ABI 7500 系统进行 PCR 反应。反应条件为:50℃ 2 min,95℃ 2 min 预变性,95℃ 15 s 变性,60℃ 1 min 退火,共 40 个循环,95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 30 s,60℃ 15 s 延伸。反应后得到溶解曲线,记录目的基因与内参基因达到某一阈值的 Ct 值,将目的基因与内参基因 Ct 值进行比较后再与对照组比较,计算 ATG mRNA 相对表达量:ATGmRNA = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

5. 自噬相关蛋白 Beclin1 及微管相关蛋白轻链 3(LC3)表达水平的检测

MRSA 感染细胞后,收集细胞加入现配的蛋白裂解液(每孔 50 μ l),用细胞刮刮取蛋白,收集混合液于 4℃ 以 12 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,于 562 nm 波长下用二喹啉甲酸(BCA)法检测蛋白浓度,加入 5 倍体积蛋白上样缓冲液混匀,煮沸 10 min,-80℃ 保存。采用十二烷基硫酸

钠聚丙烯酰胺（SDS-PAGE）凝胶电泳法，下层12%分离胶，上层5%浓缩胶，蛋白上样量20 μg，85 V恒压电泳，待蛋白标记物分出条带后，将电压调为110 V，当电泳至条带接近底端时，停止电泳，260 mA恒流转膜1.5 h将蛋白转至聚偏氟乙烯（PVDF）膜上，根据预染蛋白标记物，剪下不同的目的蛋白于湿盒内孵育，加入5%脱脂奶粉室温封闭1 h，TBST缓冲液洗膜3次，每次洗10

min，一抗稀释比例LC3为1:1 000、Beclin1为1:2 000、β-actin为1:2 000，4℃过夜后，TBST缓冲液洗膜3次，每次10 min，室温孵育二抗1 h（稀释比例为1:2 000），TBST缓冲液洗膜3次，每次15 min，ECL发光液A液、B液等体积混合后敷于蛋白膜上，于Chemi Scope化学发光成像系统显影，运用Image J软件分析LC3（取LC-I条带）及Beclin1的蛋白灰度值，作为其蛋白相对表达量。

表1		引物序列	
引物	正向	反向	
ATG5	CTTGCATCAAGTTCAGCTCTTCC	AAGTGAGCCTCAACCGCATCCT	
ATG7	CCTGTGAGCTTGGATCAAAGGC	GAGCAAGGAGACCAGAACAGTG	
ATG12	GAAGGCTGTAGGAGACACTCCT	GGAAGGGGCAAAGGACTGATTC	
β-actin	CATTGCTGACAGGATGCAGAAGG	TGCTGGAAGGTGCACAGTGAGG	

三、统计学处理
采用SPSS 22.0软件统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，并进行方差齐性检验，2组间比较采用*t*检验。多组完全随机设计资料比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用LSD-*t*检验。*P* < 0.05为差异有统计学意义。

结 果

一、感染MRSA对RAW264.7细胞中ATG表达的影响

感染MRSA 3 h后，实验组RAW264.7细胞的ATG5、ATG7、ATG12的mRNA表达水平均高于对照组（*P*均<0.01），见表1。

表1 感染MRSA 3 h后RAW264.7细胞中ATG表达情况 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	<i>n</i>	ATG5	ATG7	ATG12
实验组	6	3.64 ± 0.06	2.32 ± 0.03	6.94 ± 0.53
对照组	6	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
<i>t</i> 值		75.173	72.299	19.412
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

二、感染MRSA不同时间点RAW264.7细胞中的ATG表达情况

感染MRSA不同时间点组的RAW264.7细胞中，ATG5、ATG7、ATG12 mRNA表达水平比较差异均有统计学意义（*F*分别为36.551、41.073、19.662，*P*均<0.001）。其中ATG7、ATG12 mRNA相对表达量在感染MRSA 180 min组最高，ATG5 mRNA相对表达量在感染MRSA 150 min组

最高。180 min组的ATG7 mRNA表达水平为4.07 ± 0.54，高于90 min组的2.08 ± 0.01（*t* = 9.025，*P* < 0.001）；180 min组的ATG12 mRNA表达水平为3.54 ± 0.46，高于90 min组的1.66 ± 0.19（*t* = 9.253，*P* < 0.001）；150 min组的ATG5 mRNA表达水平为2.49 ± 0.14，高于90 min组的1.83 ± 0.25（*t* = 2.650，*P* = 0.024），见图1。

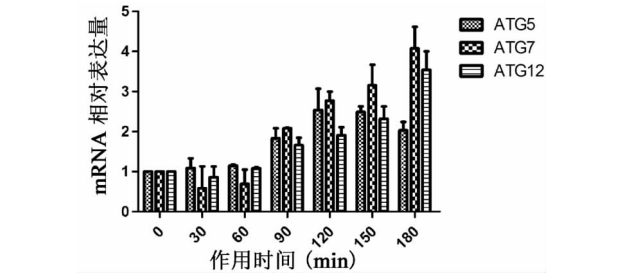


图1 感染MRSA不同时间点后RAW264.7细胞中ATG的表达情况

三、感染MRSA对RAW264.7细胞中LC3及Beclin1蛋白表达的影响

感染MRSA 3 h后，RAW264.7细胞中LC3蛋白相对表达量在实验组为48 523 ± 12 692、对照组为7 450 ± 1 550，2组比较差异有统计学意义（*t* = 14.692，*P* < 0.001）；Beclin1蛋白相对表达量在实验组为13 765 ± 2 267、对照组为12 522 ± 3 347，2组比较差异无统计学意义（*t* = 0.533，*P* = 0.619），见图2。

四、感染MRSA不同时间点RAW264.7细胞中LC3及Belin1蛋白的表达情况

感染MRSA不同时间点组的RAW264.7细胞中，LC3及Belin1蛋白相对表达量比较差异均有统

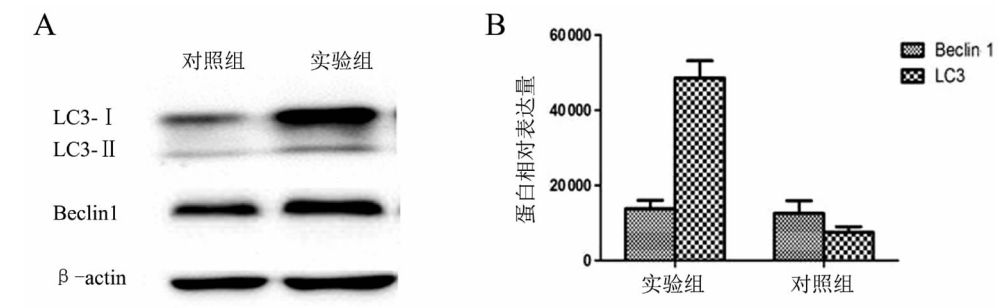


图 2 感染 MRSA 后 RAW264.7 细胞中 LC3 及 Beclin1 的表达情况

A: 蛋白免疫印迹法结果; B: 定量分析结果

计学意义 (F 分别为 5.235、3.938, P 均 < 0.05)。LC3、Beclin1 蛋白相对表达量均在感染 MRSA 180 min 组最高。其中 LC3 蛋白相对表达量在 180 min 组为 $57\,010 \pm 3\,978$, 在 60 min 组为 $45\,383 \pm 6\,273$, 2 组比较差异有统计学意义 ($t =$

3.210, $P = 0.009$)。Beclin1 蛋白相对表达量在 180 min 组为 $86\,440 \pm 5\,024$ 、60 min 组为 $70\,685 \pm 2\,776$, 2 组比较差异有统计学意义 ($t = 6.273$, $P < 0.001$), 见图 3。

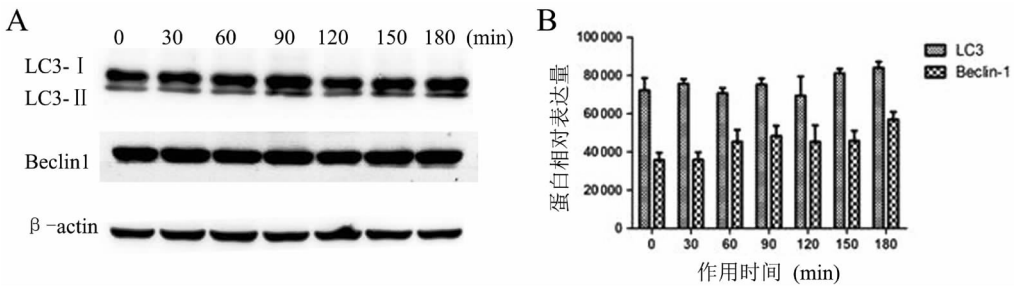


图 3 感染 MRSA 不同时间点 RAW264.7 细胞中 LC3 及 Belin1 蛋白的表达情况

A: 蛋白免疫印迹法结果; B: 定量分析结果

讨 论

巨噬细胞是固有免疫系统重要组成部分, 在外来病原体入侵机体时, 可以通过吞噬等非特异性免疫作用来杀伤病原体, 并且可以通过抗原提呈诱导特异性免疫进一步杀死病原体。肺部感染性疾病中, 巨噬细胞对于肺部的宿主防御功能必不可少, 其能够监视暴露的气道, 调节固有和适应性免疫^[7]。

自噬是真核生物细胞内回收利用细胞质成分的一种降解机制。自噬过程包括将长寿命蛋白及胞内较大体积的细胞器成分隔离进入双层膜囊泡状结构, 然后再运送至溶酶体进行降解, 降解后的成分重新用来供应细胞能量及合成大分子的需要。因此, 自噬被视为胞内回收机制^[8]。最早对于自噬分子机制的研究从酵母菌开始, 随后发现大多数自噬基因出现于高等真核生物, 表明自噬是一种进化高度保守的过程。在酵母菌中, 自噬主要涉及适应饥饿, 在多细胞生物体内, 该途径涉及多条通路, 例如程序性细胞死亡、胞内破损细胞器及沉积蛋白

质的清除等^[9]。从整体上而言, 自噬与多种病理生理过程相关, 包括肿瘤、神经退行性病变、感染等^[10]。随着研究的逐步深入, 学者们发现自噬与疾病的治疗相关, 已有研究证明自噬与肿瘤治疗相关, 可以提高肿瘤细胞对化学治疗药物的敏感性^[11]。与哺乳动物自噬相关的基因统一命名为 ATG。在哺乳动物细胞自噬泡形成过程中, 由 ATG3、ATG5、ATG7、ATG10、ATG12 和 LC3 参与组成的 2 条泛素样蛋白加工修饰通路, 在自噬过程起着至关重要的作用。LC3 是酵母 ATG8 的类似物, 当 LC3 前体形成后, 首先加工成胞浆可溶性形式 LC3-I, 并暴露出其羧基末端的甘氨酸残基, 然后 LC3-I 被 ATG7 活化, 转移并被修饰成膜结合形式 LC3-II^[12-13]。本实验中 LC3-I 较 LC3-II 表达明显增多, 考虑是否由于自噬属于动态过程, LC3-II 已逐渐被溶酶体降解, 故取 LC3-I 条带作定量分析。

近几年, 关于自噬与感染性疾病的研究逐渐增多^[14]。金黄色葡萄球菌是可以引起人体从表皮感染至严重血源性感染等侵袭性感染的胞外菌, 其感

染率和患者病死率极高^[15]。其中 MRSA 感染更为当前临床治疗的难题。虽然经典的研究证实,金黄色葡萄球菌是胞外菌,但其可逃避吞噬细胞的杀伤作用而存活于多种吞噬细胞中。更为严重的是,有研究显示其可存活于单核细胞、巨噬细胞、甚至中性粒细胞中^[16]。 β -内酰胺类和糖肽类抗菌药均难以进入上述免疫细胞,故治疗失败率高。因此,研究自噬对于胞内生存的 MRSA 有何作用及其与吞噬的关系,对阐明胞外病原体灭活及其免疫逃避机制均有重要意义。

已有研究表明,在肺泡上皮细胞 A549 受到结核分枝杆菌、A 型链球菌和铜绿假单胞菌感染时,自噬可以清除病原体,对机体起到清除病原体的保护作用^[17]。另外,自噬对于结核分枝杆菌亦具有杀伤作用^[18]。目前,对金黄色葡萄球菌入侵单核细胞系 MEF 及 Hela 细胞系产生自噬已有相关研究^[19]。本研究主要观察 MRSA 感染巨噬细胞对自噬的影响,结果显示巨噬细胞在感染 MRSA 后,ATG5、ATG7、ATG12 mRNA 及 LC3 蛋白相对表达升高,从基因水平及蛋白质水平证明感染 MRSA 可以激活巨噬细胞自噬,参与自噬过程的相关基因表达水平达峰时间不完全一致,表明自噬是一动态过程,基因激活存在先后顺序。但对于该类自噬的具体信号通路机制仍然未明,其是否与革兰阴性菌内毒素成分脂多糖诱导自噬过程类似,还是通过 MRSA 表面细胞壁某种成分诱导产生自噬,对此仍需要进一步研究^[20]。另外,MRSA 是否能够逃避自噬,自噬能否起到免疫作用,对肺炎预后有何影响,还需进一步实验研究^[21]。

参 考 文 献

- [1] Deretic V, Levine B. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe*, 2009, 5 (6): 527-549.
- [2] Chow A, Brown BD, Merad M. Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11 (11): 788-798.
- [3] Araya J, Hara H, Kuwano K. Autophagy in the pathogenesis of pulmonary disease. *Intern Med*, 2013, 52 (20): 2295-2303.
- [4] Weiss G, Schaible UE. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol Rev*, 2015, 264 (1): 182-203.
- [5] Otto M. MRSA virulence and spread. *Cell Microbiol*, 2012, 14 (10): 1513-1521.
- [6] Huang J, Brumell JH. Autophagy in immunity against intracellular bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2009, 335: 189-215.
- [7] Vlahos R, Bozinovski S. Role of alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease. *Front Immunol*, 2014, 5: 435.
- [8] Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*, 2010, 221 (1): 3-12.
- [9] He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet*, 2009, 43: 67-93.
- [10] Bialik S, Kimchi A. Autophagy and tumor suppression: recent advances in understanding the link between autophagic cell death pathways and tumor development. *Adv Exp Med Biol*, 2008, 615: 177-200.
- [11] 刘穗玲, 李小毛. 自噬与紫杉醇敏感性. *新医学*, 2014, 45 (4): 218-222.
- [12] Tal MC, Iwasaki A. Autophagy and innate recognition systems. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2009, 335: 107-121.
- [13] Ryter SW, Cloonan SM, Choi AM. Autophagy: a critical regulator of cellular metabolism and homeostasis. *Mol Cells*, 2013, 36 (1): 7-16.
- [14] Smeekeens SP, Malireddi RK, Plantinga TS, Buffen K, Oosting M, Joosten LA, Kullberg BJ, Perfect JR, Scott WK, van de Veerdonk FL, Xavier RJ, van de Vosse E, Kanneganti TD, Johnson MD, Netea MG. Autophagy is redundant for the host defense against systemic *Candida albicans* infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2014, 33 (5): 711-722.
- [15] O'Keefe KM, Wilk MM, Leech JM, Murphy AG, Laabei M, Monk IR, Massey RC, Lindsay JA, Foster TJ, Geoghegan JA, McLoughlin RM. Manipulation of autophagy in phagocytes facilitates *Staphylococcus aureus* bloodstream infection. *Infect Immun*, 2015, 83 (9): 3445-3457.
- [16] Garzoni C, Kelley WL. *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. *Trends Microbiol*, 2009, 17 (2): 59-65.
- [17] Li P, Shi J, He Q, Hu Q, Wang YY, Zhang LJ, Chan WT, Chen WX. *Streptococcus pneumoniae* induces autophagy through the inhibition of the PI3K-I/Akt/mTOR pathway and ROS hypergeneration in A549 cells. *PLoS One*, 2015, 10 (3): e0122753.
- [18] Ní Cheallaigh C, Keane J, Lavelle EC, Hope JC, Harris J. Autophagy in the immune response to tuberculosis: clinical perspectives. *Clin Exp Immunol*, 2011, 164 (3): 291-300.
- [19] Schnaith A, Kashkar H, Leggio SA, Addicks K, Krönke M, Krut O. *Staphylococcus aureus* subvert autophagy for induction of caspase-independent host cell death. *J Biol Chem*, 2007, 282 (4): 2695-2706.
- [20] Xu Y, Jagannath C, Liu XD, Sharafkhaneh A, Kolodziejaska KE, Eissa NT. Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity*, 2007, 27 (1): 135-144.
- [21] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 2008, 451 (7182): 1069-1075.

(收稿日期: 2015-11-22)

(本文编辑: 林燕薇)