

论著·基础研究

3-O-C₁₂-HSL 通过 PPAR γ 拮抗树突状细胞 表达 RP11-367F23.2^{*}

张 轩¹, 王 昊², 罗燕芬¹, 李有强^{1 Δ}

(1. 广东省中医院/广州中医药大学第二附属医院检验科, 广东广州 510120;

2. 广州血液中心检验科, 广东广州 510095)

摘要:目的 研究 N-3-氧代十二烷酰-L-同型丝氨酸内酯(3-O-C₁₂-HSL)是否抑制单核细胞来源树突状细胞(Mo-DCs)表达 RP11-367F23.2, 该抑制作用是否通过过氧化物酶增殖物激活受体 γ (PPAR γ)介导。方法 采用密度梯度离心法分离单核细胞来源的 Mo-DCs; 将 Mo-DCs 细胞分为 4 组: 脂多糖(LPS)组、3-O-C₁₂-HSL 组、GW9662 组和 PBS 组, 18 h 后收集细胞; 荧光定量 PCR 检测 4 组中 RP11-367F23.2 表达情况。结果 Mo-DCs 经 3-O-C₁₂-HSL 刺激后, RP11-367F23.2 表达量降低, 3-O-C₁₂-HSL 组和 LPS 组 RP11-367F23.2 表达量比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); Mo-DCs 经 GW9662 处理后, 细胞中的 RP11-367F23.2 表达量升高, 3-O-C₁₂-HSL 组和 GW9662 组 RP11-367F23.2 表达量比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 3-O-C₁₂-HSL 通过 PPAR γ 拮抗 Mo-DCs 表达 RP11-367F23.2。

关键词: N-3-氧代十二烷酰-L-同型丝氨酸内酯; 长链非编码 RNA; RP11-367F23.2; 过氧化物酶增殖物激活受体 γ ; 单核细胞来源树突状细胞

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2019.14.003

中图法分类号: R446.6

文章编号: 1673-4130(2019)14-1674-03

文献标识码: A

3-O-C₁₂-HSL inhibition the expression of RP11-367F23.2 dependent on PPAR γ in dendritic cells^{*}

ZHANG Xuan¹, WANG Hao², LUO Yanfen¹, LI Youqiang^{1 Δ}

(1. Department of Clinical Laboratory, Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine/the Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510120, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Guangzhou Blood Center, Guangzhou, Guangdong 510095, China)

Abstract: Objective To study whether N-3-oxododecanoyl-L-homoserine lactone (3-O-C₁₂-HSL) inhibits RP11-367F23.2 expression in monocytes derived-dendritic cells (Mo-DCs), and whether the inhibition is mediated by PPAR γ . **Methods** Density gradient centrifugation was used to separate Mo-DCs from monocytes. Mo-DCs cells were divided into four groups: LPS group, 3-O-C₁₂-HSL group, PBS group, and GW9662 group. Cells were collected 18 h after treated, and real-time PCR was used to detect RP11-367F23.2 expression in four groups. **Results** After 3-O-C₁₂-HSL treatment of Mo-DCs, the expression of RP11-367F23.2 decreased, and the expression of RP11-367F23.2 in 3-O-C₁₂-HSL group and LPS group had significant difference ($P < 0.05$); the expression of RP11-367F23.2 in Mo-DCs cells increased after GW9662 treatment, and the expression of RP11-367F23.2 in 3-O-C₁₂-HSL group and GW9662 group had significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion** 3-O-C₁₂-HSL inhibition the expression of RP11-367F23.2 dependent on PPAR γ in dendritic cells.

Key words: N-3-oxododecanoyl-L-homoserine lactone; long non-coding RNA; RP11-367F23.2; peroxisome proliferator-activated receptor γ ; monocytes derived-dendritic cells

铜绿假单胞菌是医院常见的条件致病菌, 常感染 癌症、严重皮肤烧伤、囊性肺纤维化及各种免疫力低

^{*} 基金项目: 广东省医学科学技术研究基金项目(A2018193); 国家自然科学基金青年科学基金项目(81601736); 广东省科技计划项目(2014A020212267)。

作者简介: 张轩, 女, 主管技师, 主要从事病原微生物的感染与免疫研究。 Δ 通信作者, E-mail: liyouqiang21@126.com。

本文引用格式: 张轩, 王昊, 罗燕芬, 等. 3-O-C₁₂-HSL 通过 PPAR γ 拮抗树突状细胞表达 RP11-367F23.2[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(14): 1674-1676.

下患者^[1]。3-O-C₁₂-HSL 是铜绿假单胞菌重要的毒力分子之一,可调节铜绿假单胞菌的耐药和宿主的免疫功能,介导免疫逃逸^[2-3]。长链非编码 RNA(LncRNA)是长度大于 200 个核苷酸的非编码 RNA,可调控基因的表达,涉及的调控层面包括转录调控,翻译水平调控和表观遗传调控,调控方式包括染色体修饰、转录激活或干扰等^[4]。有研究表明^[5],从单核细胞分化为单核细胞源性树突状细胞(Mo-DCs)过程中,LncRNA 表达谱出现了明显差异,LncRNA Lnc-DC 被发现可与转录因子 STAT3 结合,阻碍 SHP1 介导的去磷酸化作用,从而调控 Mo-DCs 的分化。前期研究发现 3-O-C₁₂-HSL 在阻碍 Mo-DCs 成熟过程中 LncRNA 的表达谱也出现了明显差异。本文以长链非编码 RNA RP11-367F23.2 为切入点,研究 3-O-C₁₂-HSL 是否抑制 Mo-DCs 表达 RP11-367F23.2,该抑制作用是否经过氧化物酶增殖物激活受体 γ (PPAR γ)介导。

1 材料与方法

1.1 材料

RPMI 1640 和胎牛血清(Life 公司);脂多糖(LPS)、3-O-C₁₂-HSL 和 GW9662(Sigma 公司);人淋巴细胞分离液 Ficoll(Axis-shield 公司);磷酸缓冲盐溶液(PBS)、二甲基亚砜(DMSO)和 Trizol(invitrogen 公司);FITC-CD14(eBioscience 公司);抗人 CD14 磁珠(BD 公司);人白细胞介素-4(hIL-4)和人粒单核细胞集落刺激因子(hGM-CSF)和 PPAR γ (Peprotech 公司);PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 和 SYBR® Premix Ex Taq™ II (TAKARA 公司);ABI Vii7 高产率荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪(美国 ABI 公司)。

1.2 方法

1.2.1 Mo-DCs 分离和培养

选取健康人外周血 50 mL,加入等量的 PBS 混匀后,加入到 100 mL 人淋巴细胞分离液上面,密度梯度离心法获得单个核细胞。PBS 洗涤后用 CD14 磁珠分选 CD14⁺单核细胞,加入完全培养基(含 10%胎牛血清 RPMI 1640 培养基、终浓度 500 U/mL 的 hIL-4 和 500 U/mL 的 hGM-CSF),细胞密度为 1×10⁶/mL。3 d 后半量换液,5 d 后获得 Mo-DCs。

1.2.2 Mo-DCs 的分组和处理

将 Mo-DCs 细胞分为 4 组:LPS 组为模型组,加入 0.1 μ g/mL LPS;3-O-C₁₂-HSL 组为实验组 1,加入终浓度为 25 μ mol/L 的 3-O-C₁₂-HSL(同时加入 0.1 μ g/mL LPS);GW9662 组为实验组 2,加入终浓度为 10 μ mol/L GW9662, GW9662 处理 30 min 后分别加入 3-O-C₁₂-HSL 和 LPS;PBS 组为对照组,加入等体积的含有 0.1%DM-SO 的 PBS。每组设 3 个复孔。18 h 后收集细胞。3-O-C₁₂-HSL 为脂溶性小分子物质(MW 282 道尔顿),无免疫原性,需要在 LPS 等完全抗原活化免疫细胞后才能发挥作用。因此,本实验过程中 3-O-C₁₂-

HSL 需和 LPS 同时添加。

1.2.3 荧光定量 PCR 检测 RP11-367F23.2

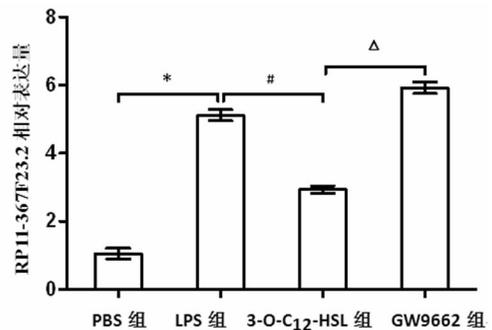
提取细胞 RNA,按照试剂盒操作说明将 RNA 逆转录为 cDNA,对 RP11-367F23.2 进行定量测定。RP11-367F23.2 正向引物为 5'-TCA GCC ACC TCC ACT CTT TT-3',反向引物为 5'-CCC AGC TTT TCC TGA CTC TG-3',引物由 invitrogen 公司合成。

1.3 统计学处理

采用 SPSS22.0 统计软件进行数据分析,组间均数比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

处理细胞 18 h 后,RP11-367F23.2 在 4 组相对表达量:PBS 组(1.000 ± 0.058)、LPS 组(5.200 ± 0.374)、3-O-C₁₂-HSL 组(2.995 ± 0.347);GW9662 组(5.900 ± 0.473);LPS 组与 PBS 组 RP11-367F23.2 表达量比较,差异有统计学意义($P = 0.0004 < 0.05$);3-O-C₁₂-HSL 组与 LPS 组 RP11-367F23.2 表达量比较,差异有统计学意义($P = 0.011 < 0.05$);GW9662 组与 3-O-C₁₂-HSL 组 RP11-367F23.2 表达量比较,差异有统计学意义($P = 0.0008 < 0.05$),各组长链非编码 RNA RP11-367F23.2 表达量的变化见图 1。



注:与 LPS 组比较,* $P < 0.05$;与 3-O-C₁₂-HSL 组比较,# $P < 0.05$;与 GW9662 组比较,Δ $P < 0.05$

图 1 各组 RP11-367F23.2 分泌情况

3 讨论

树突状细胞(DC)是人体专职抗原递呈细胞(APC),能摄取、加工及提呈抗原,是启动、调控、维持 Th 细胞免疫应答的中心环节^[6]。DC 的分化和成熟状态对免疫应答反应起着重要的作用^[7]。前期研究发现铜绿假单胞菌分泌的信号分子 3-O-C₁₂-HSL 能够通过作用于 Mo-DCs,促进 CD4⁺T 细胞向 Th2 方向极性分化,参与免疫逃逸^[2-3]。

LncRNA 是长度大于 200 个核苷酸的非编码 RNA,在真核细胞中普遍表达,随着芯片和测序技术的不断发展,越来越多的 LncRNA 被发现在多种层面上调控基因的表达水平,在细胞增殖分化和细胞周期等众多生命活动中发挥重要作用^[8-9]。本课题组前期用 LncRNA 芯片技术筛选出 3-O-C₁₂-HSL 阻碍 Mo-

DCs 成熟过程中有差异性表达的基因^[10], 本文从表达差异 5 倍以上 LncRNA 中选择了一条 RP11-367F23.2 作为候选 LncRNA。RP11-367F23.2 位于 9 号染色体长臂上, 长约 4 818 bp, 目前国内外均未见有关 RP11-367F23.2 的相关报道。LncRNA 被发现对肿瘤细胞、干细胞和突触细胞等多种细胞的分化成熟起到调控作用^[11-12], 但对其在免疫细胞分化成熟中的作用研究的还比较少, 对于这些 LncRNA 参与的宿主防御机制还没有完全清楚。因此, 研究 3-O-C₁₂-HSL 是否抑制 Mo-DCs 表达 RP11-367F23.2, 该抑制作用是否通过 PPAR γ 介导, 对丰富长链非编码 RNA 在免疫反应中的生物学功能及病理生理过程具有重要意义。

PPAR γ 在人体多种免疫细胞中都有表达, 如 DC、脂肪细胞、单核细胞、巨噬细胞和淋巴细胞等。PPAR γ 是一类核受体, 由 N 末端的 DNA 结合区和 C 末端的配体结合区组成, 通过与配体结合而被激活。激活后的 PPAR γ 发挥抗炎作用, 可使肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 和白细胞介素-6 (IL-6) 等促炎因子表达减少。PPAR γ 可影响丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路, 将受体传递的信息传入细胞核内, 从而调控基因的表达、细胞的增殖分化和死亡^[13]。GW9662 是 PPAR γ 的不可逆性拮抗剂, 可以使 PPAR γ 配体结合区第 285 号半胱氨酸残基芳香化, 从而阻碍 PPAR γ 与其他配体的结合。GW9662 被广泛地应用于抑制 PPAR γ 的活性^[14-15]。

本课题组研究发现, LPS 诱导的 Mo-DCs 与单核细胞相比, RP11-367F23.2 显著升高, 说明 RP11-367F23.2 参与了 Mo-DCs 的成熟过程, 与炎症反应相关。Mo-DCs 经 3-O-C₁₂-HSL 刺激后, RP11-367F23.2 表达量显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); Mo-DCs 经 GW9662 处理后再加入 3-O-C₁₂-HSL, 细胞中的 RP11-367F23.2 表达又显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示 3-O-C₁₂-HSL 通过 PPAR γ 拮抗 Mo-DCs 表达 RP11-367F23.2。

4 结 论

本文证实了 3-O-C₁₂-HSL 通过 PPAR γ 拮抗 Mo-DCs 表达 RP11-367F23.2, 为深入研究 LncRNA 的生物学功能及其与疾病的关系提供了实验依据, 进一步丰富了铜绿假单胞菌的致病机理, 可为临床提供新的思路 and 应对策略。

参考文献

[1] MORADALI M F, GHODS S, REHMB H A. Pseudomonas aeruginosa lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence[J]. Front Cell Infect Microbiol,

2017, 7(4):39.

- [2] 张云燕, 李有强, 冉炜, 等. 3-O-C₁₂-HSL 通过阻碍人树突细胞成熟介导 Th2 细胞极化[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2013, 33(3):197-200.
- [3] LI Y, ZHOU H, ZHANG Y, et al. N-3-(oxododecanoyl)-L-homoserine lactone promotes the induction of regulatory T-cells by preventing human dendritic cell maturation[J]. Exper Biol Med, 2015, 240(7):896-903.
- [4] FRANCESCO P, MARCHESE, IVAN R, et al. The multidimensional mechanisms of long noncoding RNA function[J]. Genome Biol, 2017, 18(1):206.
- [5] WANG P, XUE Y, HAN Y, et al. The STAT3-binding long non coding RNA Inc-DC controls human dendritic cell differentiation[J]. Science, 2014, 344(6181):310-313.
- [6] CAROLINA O, RAJESH K, MANUEL A, et al. Update on dendritic cell-induced immunological and clinical tolerance[J]. Front Immunol, 2017, 8(1):1514.
- [7] BRETON G, ZHENG S, VALIERIS R, et al. Human dendritic cells (DCs) are derived from distinct circulating precursors that are precommitted to become CD1c⁺ or CD141⁺ DCs[J]. J Exp Med, 2016, 213(13):2861-2870.
- [8] CHEN L L. Linking long noncoding RNA localization and function[J]. Trends Biochem Sci, 2016, 41(1):761-772.
- [9] HON C C, RAMIŁOWSKI J A, HARSHBARGER J, et al. An atlas of human long non-coding RNAs with accurate 5' ends[J]. Nature, 2017, 543(1):199-204.
- [10] 李有强. PPAR γ 在铜绿假单胞菌信号分子 3-O-C₁₂-HSL 阻碍 Mo-DCs 成熟中的作用[D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.
- [11] YIN Y, YAN P, LU J, et al. Opposing roles for the lncRNA haunt and its genomic locus in regulating HOXA gene activation during embryonic stem cell differentiation [J]. Cell stem cell, 2015, 16(5):504-516.
- [12] JIA Q, JIANG W, NI L. Down-regulated non-coding RNA (LncRNA-ANCR) promote osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells[J]. Archive Soforal Biol, 2015, 60(2):234-241.
- [13] FORTES P, MORRIS K V. Long noncoding RNAs in viral infections[J]. Virus Res, 2016, 212(1):1-11.
- [14] UMESH B M, GOVIND C, CHANDRAGOUDA R P, et al. The protective effect of apigenin on myocardial injury in diabetic rats mediating activation of the PPAR- γ pathway[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(4):756.
- [15] YOUSEFNIA S, MOMENZADEH S, SEYED F F, et al. The influence of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) ligands on cancer cell tumorigenicity[J]. Gene, 2018, 649(5):14-22.

(收稿日期:2018-11-26 修回日期:2019-03-12)