

论著 • 基础研究

糖原合成激酶 3β 抑制剂通过 p38 负调节感染性炎症反应的研究*

陈 康,傅 强,卢建强,梁培松,韩 慧,董 谦,王伟佳[△]
(广东省中山市人民医院检验医学中心,广东中山 528403)

摘 要:目的 探讨糖原合成激酶 3β(GSK3β)在铜绿假单胞菌感染中的免疫调控作用。方法 采用免疫印迹实验(Western blot)检测 GSK3β 失活型 9 位丝氨酸磷酸化[P-GSK3β(Ser9)]水平;使用 GSK3β 抑制剂后,采用实时荧光定量 PCR(qPCR)检测细胞因子水平,Western blot 检测丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族成员的磷酸化水平;抑制 GSK3β 活性的同时,使用 p38 抑制剂或 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)抑制剂,采用 qPCR 检测细胞因子水平的回复情况。**结果** Western blot 结果显示,感染铜绿假单胞菌时,P-GSK3β(Ser9)水平降低;qPCR 结果显示,GSK3β 抑制剂可促进抑炎性细胞因子的表达,抑制促炎性细胞因子的表达;Western blot 结果显示,GSK3β 抑制剂可上调 p38 和 JNK 的磷酸化水平;回复实验发现,p38 抑制剂可回复 GSK3β 抑制剂对细胞因子的调节。**结论** GSK3β 参与铜绿假单胞菌感染,GSK3β 抑制剂通过 p38 调节细胞因子的分泌发挥免疫负调作用。

关键词:GSK3β; 铜绿假单胞菌; p38; 细胞因子
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.21.002 **中图法分类号:**R392-33
文章编号:1673-4130(2019)21-2564-04 **文献标识码:**A

Negative regulation of infective inflammatory response by glycogen synthetase kinase 3β inhibitor through p38 *

CHEN Kang ,FU Qiang ,LU Jianqiang ,LIANG Peisong ,HAN Hui ,DONG Qian ,WANG Weijia[△]
(1. Department of Laboratory Medical Center ,Zhongshan People's Hospital ,Guangdong Province ,
Zhongshan ,Guangdong 528403 ,China)

Abstract: Objective To investigate the immunoregulatory role of glycogen synthetic kinase 3β (GSK3β) in Pseudomonas aeruginosa infection. **Methods** The expression level of GSK3β inactivated 9-position serine phosphorylation [P-GSK3β (Ser9)] was detected by Western blot. After GSK3β inhibitors were used, the expression level of cytokines was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR), the expression levels of mitogen-activated protein kinase (MAPK) family-related kinases were detected by Western blot. The activity of GSK3β was inhibited, and the recovery of cytokine levels was detected by qPCR using p38 inhibitor or c-Jun amino terminal kinase (JNK) inhibitor. **Results** Western blot showed that the expression level of P-GSK3β (Ser9) was decreased after Pseudomonas aeruginosa infection was induced. The results of qPCR showed that GSK3β inhibitor could promote the expression level of anti-inflammatory cytokines and inhibit the expression level of pro-inflammatory cytokines. Western blot showed that GSK3β inhibitor could up-regulate the phosphorylation levels of p38 and JNK. It was found that p38 inhibitor could restore the regulation of cytokines by GSK3β inhibitors. **Conclusion** GSK3β is involved in Pseudomonas aeruginosa infection. GSK3β inhibitors play a negative immunoregulatory role by regulating the secretion of cytokines through p38.

Key words:glycogen synthetic kinase 3β; Pseudomonas aeruginosa; p38; cytokines

铜绿假单胞菌是一种条件致病菌,可引起医院获得性肺炎、角膜炎等多种机会感染^[1-2]。尽管抗菌药

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(81401645);广东省医学科研基金资助项目(B2014447);中山市科技计划资助项目(2017B1009)。

作者简介:陈康,女,副主任技师,主要从事抗感染免疫方面的研究。 [△] 通信作者,E-mail:wwj0760@163.com。

本文引用格式:陈康,傅强,卢建强,等.糖原合成激酶 3β 抑制剂通过 p38 负调感染性炎症反应的研究[J].国际检验医学杂志,2019,40(21):2564-2567.

物可以杀伤细菌,却不能抑制因感染而激发的过度免疫应答。因此,如何有效抑制过度免疫应答是预防免疫病理损伤和治疗疾病的关键。糖原合成激酶 3 β (GSK3 β)是组织器官中广泛表达的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,可参与糖原合成,多种病理生理过程,如高血压、糖尿病、炎症肠病等^[3-5]。此外,还可参与多种病原体感染引起的免疫应答,如病毒、真菌等^[6-7]。磷酸化是调节 GSK3 β 活性最常见的方式,其中以失活型 9 位丝氨酸(Ser9)的磷酸化最为常见,当 Ser9 的磷酸化水平降低时,提示在该疾病中 GSK3 β 活性增高,破坏细胞的稳态,导致细胞发生氧化应激和炎症反应。丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)是调节炎症反应通路中的重要分子,GSK3 β 可与 MAPK 家族中成员包括 p38、c-Jun 氨基末端激酶(JNK)、细胞外调节蛋白激酶(ERK)协同调控细胞的炎症反应。GSK3 β 还可参与多种疾病的调控,被用作疾病治疗的靶点。GSK3 β 的小分子抑制剂 SB216763 可抑制其活性,调节免疫应答^[8],因此本研究旨在探讨感染铜绿假单胞菌时,GSK3 β 抑制剂调节细胞因子分泌及免疫功能的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 试剂 GSK3 β 抑制剂 SB216763、p38 抑制剂 SB203580、JNK 抑制剂 SP600125 均购自美国 MCE 公司;p38、磷酸化 p38(P-p38)、JNK、磷酸化 JNK(P-JNK)、ERK、磷酸化 ERK (P-ERK)、磷酸化 GSK3 β 失活型 9 位丝氨酸[P-GSK3 β (Ser9)]和 β -actin 的抗体均购自美国 CST 公司;Trizol、反转录试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;异丙醇和无水乙醇购自中国广州鼎国生物技术有限公司;实时荧光定量 PCR (qPCR)检测用 SYBR Green 试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 细胞培养 小鼠巨噬细胞购自美国菌种保藏中心,细胞培养于 DMEM 培养基中。将 4 $\times$ 10⁵ 个/mL 小鼠巨噬细胞铺入 12 孔细胞培养板中,采用 GSK3 β 抑制剂(10 μ mol/L)、p38 抑制剂(1 μ mol/L)或 JNK 抑制剂(1 μ mol/L)预处理细胞 1 h,加入铜绿假单胞菌(MOI = 1)刺激后,检测蛋白或 mRNA 水平的表达。

1.3 免疫印迹试验(Western blot) 用冷的磷酸盐缓冲液冲洗细胞培养板中的细胞 2 次,加入蛋白裂解液,收集细胞裂解碎片,冰上裂解 20 min。12 000 r/min 离心 10 min,收集蛋白裂解上清,考马斯亮蓝法进行蛋白定量。接着进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,并电转至硝酸纤维素膜上。将膜用 5%脱脂奶粉室温孵育 2 h,4 $^{\circ}$ C 过夜分别孵育一抗 p38(1 : 1 000)、P-p38

(1 : 1 000)、JNK(1 : 1 000)、P-JNK(1 : 1 000)、ERK (1 : 1 000)、P-ERK (1 : 1 000)、P-GSK3 β (Ser 9) (1 : 1 000)、 β -actin(1 : 5 000),室温下孵育二抗 1 h,采用电化学发光方法检测蛋白水平。

1.4 qPCR RNA 抽提试剂法进行 RNA 提取,分光光度计测 RNA 浓度和纯度,用于下一步实验。将提取后的 RNA (1 μ g) 转录为 cDNA,详细步骤如下: RNA 1 μ g, oligo (dT) 1 μ L, 补 DEPC 水至体积 12 μ L,混匀;65 $^{\circ}$ C, 5 min;每孔加入 5 $\times$ 反应液 4 μ L, 20 U/ μ L RNA 酶抑制剂 1 μ L, 10 mmol/L dNTP 2 μ L, 200 U/ μ L 反转录酶 1 μ L, 至总体积 20 μ L, 混匀;42 $^{\circ}$ C, 60 min, 70 $^{\circ}$ C, 5 min 终止反应。反转录的 cDNA 保存备用。应用 SYBR Green 试剂盒进行扩增,详述如下:SYBR Green (2 $\times$) 10 μ L, 引物上下游混合液 (5 μ mol/L) 1.6 μ L, cDNA 模板 2 μ L, 灭菌 H₂O 补齐总体积 20 μ L 充分混匀;按照两步法 PCR 扩增程序,第 1 步,95 $^{\circ}$ C 30 s, 1 个循环;第 2 步,95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环 PCR 反应。反应结束后确认 qPCR 的扩增曲线和溶解曲线,得到循环阈值(Ct) 值,采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法进行相对定量。IL-10、IL-6 和 β -actin 的引物序列见表 1。

表 1 引物序列	
引物名	引物序列(5'-3')
β -actin	GAT TAC TGC TCT GGC TCC TAG C
	GAC TCA TCG TAC TCC TGC TTG C
IL-10	AGC TGG ACA ACA TAC TGC TAA CCG AC
	CTT GAT TTC TGG GCC ATG CTT CTC TG
IL-6	CAC AAG TCC GGA GAG GAG AC
	CAG AAT TGC CAT TGC ACA AC

1.5 统计学处理 每个实验重复 3 次,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS11.0 统计软件进行统计分析,数据用非配对的 *t* 检验进行处理,*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 GSK3 β 参与铜绿假单胞菌感染中 实验结果显示,在铜绿假单胞菌感染小鼠巨噬细胞 6 h 后,P-GSK3 β (Ser9)水平增高,然后随感染时间的增加,水平下调。这些结果提示,GSK3 β 参与铜绿假单胞菌感染中。见图 1。

2.2 GSK3 β 抑制剂调节细胞因子的表达 实验结果显示,在铜绿假单胞菌感染巨噬细胞后,GSK3 β 抑制剂 SB216763 可促进细胞因子 IL-10 水平的表达,同时抑制细胞因子 IL-6 水平的表达。结果提示抑制 GSK3 β 可在铜绿假单胞菌感染中发挥免疫负调的作

用。见图 2。

2.3 GSK3β 抑制剂调节 MAPK 家族成员的磷酸化水平 实验结果显示,在铜绿假单胞菌感染后 15 min、30 min 和 2 h,GSK3β 抑制剂可上调 p38 和 JNK 的磷酸化水平,而对 ERK 的磷酸化水平无调节作用。实验结果同时发现,细菌感染前后,GSK3β 抑制剂对 p38、JNK 和 ERK 的蛋白水平无调节作用。见图 3。

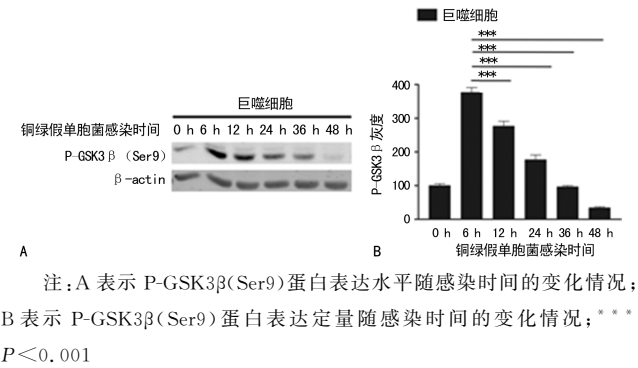


图 1 GSK3β 参与到铜绿假单胞菌感染中

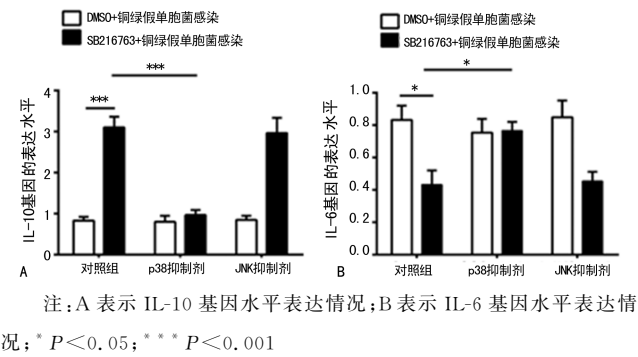


图 2 GSK3β 抑制剂通过 p38 调节细胞因子的表达

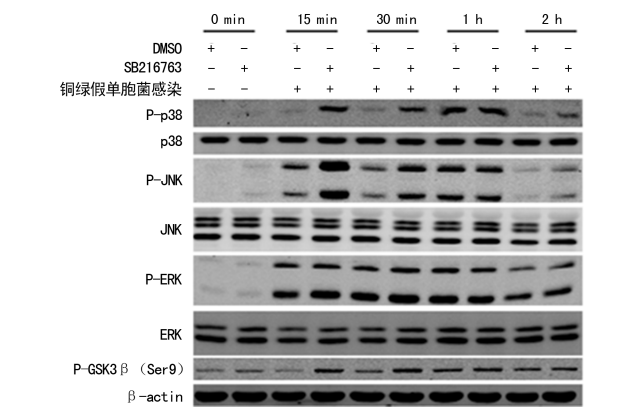


图 3 GSK3β 抑制剂调节 MAPK 的磷酸化水平

2.4 GSK3β 抑制剂通过 p38 调节细胞因子的表达 实验结果显示,GSK3β 抑制剂可上调细胞因子 IL-10 的表达,在应用 GSK3β 抑制剂的同时,应用 p38 抑制剂可抑制细胞因子 IL-10 的表达,应用 JNK 的抑制剂不可抑制 IL-10 的表达;GSK3β 抑制剂可下调细胞因子 IL-6 的表达,在应用 GSK3β 抑制剂的同时,应用 p38 抑制剂可上调细胞因子 IL-10 的表达,而同时应

用 JNK 的抑制剂不可上调 IL-10 的表达。这些结果提示,GSK3β 抑制剂通过 p38 MAPK 信号通路调节细胞因子的表达。见图 2。

3 讨 论

本研究发现,在感染铜绿假单胞菌时,GSK3β 活性增高;GSK3β 抑制剂可通过 p38 调节细胞因子的分泌,负调节免疫反应。

GSK3β 参与到多种疾病的致病过程和病原体感染中^[3-7],因此被用作疾病治疗的靶点。研究报道,GSK3β 的抑制剂可发挥免疫调控的作用^[8]。MAR-TIN 等^[9]报道,抑制 GSK3β 可抑制多种配体激活的炎症反应,抑制促炎性细胞因子的表达,同时促进抑炎性细胞因子 IL-10 的表达。在败血症休克中,抑制 GSK3β 可上调抑炎性因子 IL-10 的表达^[10]。然而,SHEN 等^[11]报道,GSK3β 抑制剂 SB216763 可在心肌细胞中促进脂多糖诱导肿瘤坏死因子的表达。本课题组研究发现,GSK3β 抑制剂 SB216763 可促进抑炎性细胞因子 IL-10 的表达,同时抑制促炎性细胞因子 IL-6 的表达,在铜绿假单胞菌感染中负调节免疫应答。

GSK3β 可参与多个信号通路的调控,可通过抑制 NF-κB 信号通路或上调环磷腺苷效应元件结合蛋白抑制免疫应答^[12]。NOH 等^[10]报道,GSK3β 抑制剂可通过抑制 ERK 的活性上调抑炎性因子 IL-10 的表达。本课题组研究发现,GSK3β 抑制剂可上调 p38 和 JNK 的磷酸化水平,并通过 p38 MAPK 信号通路调节细胞因子 IL-10 和 IL-6 的表达,发挥免疫负调节作用。

4 结 论

在感染铜绿假单胞菌后,GSK3β 的活性增高;应用 GSK3β 的抑制剂 SB216763 可调节细胞因子的表达,负调节免疫应答;进一步实验发现,GSK3β 抑制剂通过 p38 MAPK 信号通路调节细胞因子的表达。这些研究提示在铜绿假单胞菌感染中 GSK3β 可作为免疫调控的靶点。

参考文献

[1] STONE G G,NEWELL P,GASINK L B,et al. Clinical activity of ceftazidime/avibactam against MDR enterobacteriaceae and pseudomonas aeruginosa: pooled data from the ceftazidime/avibactam phase III clinical trial programme[J]. J Antimicrob Chemother,2018,73(9):2519-2523.

[2] CHEN K,YIN L,NIE X X,et al. β-Catenin promotes host resistance against pseudomonas aeruginosa keratitis[J]. J Infect,2013,67(6):584-594.

- [3] TAKAHASHI J, ORCHOLSKI M, YUAN K, et al. PDGF-dependent β -catenin activation is associated with abnormal pulmonary artery smooth muscle cell proliferation in pulmonary arterial hypertension[J]. FEBS Lett, 2016, 590(1):101-109.
- [4] WANG S, HE B, HANG W, et al. Berberine alleviates tau hyperphosphorylation and axonopathy-associated with diabetic encephalopathy via restoring PI3K/Akt/GSK3 β pathway[J]. J Alzheimers Dis, 2018, 65(4):1385-1400.
- [5] HOFMANN C, DUNGER N, SCHÖLMEICH J, et al. Glycogen synthase kinase 3- β : a master regulator of toll-like receptor-mediated chronic intestinal inflammation [J]. Inflamm Bowel Dis, 2010, 16(11):1850-1858.
- [6] MASVEKAR R R, EL-HAGE N, HAUSER K F, et al. GSK3 β -activation is a point of convergence for HIV-1 and opiate-mediated interactive neurotoxicity [J]. Mol Cell Neurosci, 2015, 65(3):11-20.
- [7] GARCÍA I, FALL Y, GÓMEZ G, et al. First computational chemistry multi-target model for anti-alzheimer, anti-parasitic, anti-fungi, and anti-bacterial activity of GSK-3 inhibitors in vitro, in vivo, and in different cellular lines[J]. Mol Divers, 2011, 15(2):561-567.
- [8] WANG H, BROWN J, MARTIN M. Glycogen synthase kinase 3: a point of convergence for the host inflammatory response[J]. Cytokine, 2011, 53(2):130-140.
- [9] MARTIN M, REHANI K, JOPE R S, et al. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3[J]. Nat Immunol, 2005, 6(8):777-784.
- [10] NOH K T, SON K H, JUNG I D, et al. Protein kinase C δ (PKC δ)-extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) signaling cascade regulates glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibition-mediated interleukin-10 (IL-10) expression in lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxemia[J]. J Biol Chem, 2012, 287(17):14226-14233.
- [11] SHEN E, FAN J, PENG T. Glycogen synthase kinase-3 β suppresses tumor necrosis factor- α expression in cardiomyocytes during lipopolysaccharide stimulation [J]. J Cell Biochem, 2008, 104(1):329-338.
- [12] BEUREL E, MICHALEK S M, JOPE R S. Innate and adaptive immune responses regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK3) [J]. Trends Immunol, 2010, 31(1):24-31.

(收稿日期:2019-02-18 修回日期:2019-05-02)

(上接第 2563 页)

- [5] LUND K, GAFFNEY D, SPOONER R, et al. Polymorphisms in VKORC1 have more impact than CYP2C9 polymorphisms on early warfarin International Normalized Ratio control and bleeding rates [J]. Br J Haematol, 2012, 158(2):256-261.
- [6] HUANG S W, XIANG D K, HUANG L, et al. Influence of GGX genotype on warfarin dose requirements in Chinese patients[J]. Thromb Res, 2011, 127(2):131-134.
- [7] LIMDI N A, BROWN T M, YAN Q, et al. Race influences warfarin dose changes associated with genetic factors [J]. Blood, 2015, 126(4):539-545.
- [8] LAM M P, CHEUNG B M. The pharmacogenetics of the response to warfarin in Chinese [J]. Br J Clin Pharmacol, 2012, 73(3):340-347.
- [9] GAIKWAD T, GHOSH K, SHETTY S. VKORC1 and CYP2C9 genotype distribution in Asian countries [J]. Thromb Res, 2014, 134(3):537-544.
- [10] WANG L, MCLEOD H L, WEINSHILBOUM R M. Genomics and drug response[J]. N Engl J Med, 2011, 364(12):1144-1153.
- [11] YU Z, DING Y L, LU F, et al. Warfarin dosage adjustment strategy in Chinese population[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(6):9904-9910.
- [12] 王启鑫, 任澎. 基因多态性对指导华法林应用的研究进展 [J]. 心血管病学进展, 2018, 39(6):479-482.
- [13] YE C, JIN H, ZHANG R, et al. Variability of warfarin dose response associated with CYP2C9 and VKORC1 gene polymorphisms in Chinese patients[J]. J Int Med Res, 2014, 42(1):67-76.
- [14] 胡婧, 肖瞳瞳, 潘美晨, 等. 潮汕地区人群 CYP2C9 基因多态性研究[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(19):2864-2868.
- [15] 程智, 朱雪萍, 赵宁民, 等. 基因导向华法林个体化治疗 [J]. 中国医药科学, 2015, 5(17):34-37.

(收稿日期:2019-02-18 修回日期:2019-05-02)