

• 论 著 •

β -catenin 通过 ASK1 抑制铜绿假单胞菌引起的炎症反应*

傅 强, 王伟佳, 黄福达, 缪丽韶, 杨山虹, 陈 康[△]

中山市人民医院检验医学中心, 广东中山 528403

摘 要:目的 探讨 β -catenin 抑制铜绿假单胞菌感染引起的炎症反应的机制。方法 采用普通聚合酶链反应(PCR)的方法和 Western-blot 的方法在过表达 β -catenin 的 RAW264.7 细胞和对照细胞中验证差异表达细胞凋亡信号调节激酶 1(ASK1)转录水平和蛋白的表达;应用小干扰 RNA(siRNA)沉默 ASK1,在铜绿假单胞菌感染的 RAW264.7 细胞中,检测炎症因子白细胞介素-6(IL-6)和 IL-1 β 的表达;构建铜绿假单胞菌角膜炎的动物模型,应用 siRNA 沉默 ASK1,观察 ASK1 在体内对炎症反应的调控;应用 ASK1 质粒,在过表达 β -catenin 的 RAW264.7 细胞中,采用实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测细胞因子 IL-6 和 IL-1 β 的基因水平,观察 ASK1 对 β -catenin 介导的炎症反应的回复作用。结果 在过表达 β -catenin 的 RAW264.7 细胞中 ASK1 的转录水平和蛋白水平明显降低。在感染铜绿假单胞菌后,沉默 ASK1 可抑制炎症因子 IL-6 和 IL-1 β 的表达;构建铜绿假单胞菌角膜炎的动物模型,实验结果发现沉默 ASK1 后临床评分降低,角膜炎症程度和范围降低,同时可抑制角膜中 IL-6 和 IL-1 β 的表达。进一步机制探讨发现 ASK1 可减弱 β -catenin 对炎症的抑制作用。结论 β -catenin 通过调控 ASK1 抑制铜绿假单胞菌感染引起的炎症反应。

关键词: β -catenin; 铜绿假单胞菌; 细胞凋亡信号调节激酶 1; 炎症反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.14.004 中图法分类号:R440

文章编号:1673-4130(2021)14-1679-04 文献标志码:A

β -catenin inhibited *Pseudomonas aeruginosa*-induced inflammation via suppressing ASK1 expression*

FU Qiang, WANG Weijia, HUANG Fuda, MIAO Lishao, YANG Shanhong, CHEN Kang[△]

Center of Laboratory Medicine, Peoples' Hospital of Zhongshan City,

Zhongshan, Guangdong 528403, China

Abstract: **Objective** To explore the underlying mechanism of β -catenin in *Pseudomonas aeruginosa*-induced inflammation. **Methods** The mRNA levels and protein levels of apoptosis signal regulated kinase 1 (ASK1) were detected by PCR and Western-blot in β -catenin overexpressing RAW264.7 cells and control cells respectively. The expression of IL-6 and IL-1 β were detected by Real-time PCR in *Pseudomonas aeruginosa* infected RAW264.7 cells after silencing ASK1 by using siRNA. *Pseudomonas aeruginosa* keratitis were constructed, and ASK1 was silenced by siRNA to observe the regulation of ASK1 on inflammatory response in vivo. The expression of IL-6 and IL-1 β were detected by Real-time PCR in overexpressing RAW264.7 cells, followed by ASK1 vector application. **Results** The mRNA levels and protein levels of ASK1 were down-regulated in β -catenin overexpressing RAW264.7 cells. The expression of IL-6 and IL-1 β were down-regulated in *Pseudomonas aeruginosa* infected RAW264.7 cells after silencing ASK1. *Pseudomonas aeruginosa* keratitis were constructed, and the results showed that ASK1 silencing could reduce the clinical score, the degree and scope of keratitis, and inhibit the expression of IL-6 and IL-1 β in cornea. Further data showed that ASK1 could reduce the suppression of inflammatory cytokine regulated by β -catenin overexpression. **Conclusion** β -catenin inhibited *Pseudomonas aeruginosa*-induced inflammation via suppressing ASK1 expression.

Key words: β -catenin; *Pseudomonas aeruginosa*; apoptosis signal regulated kinase 1; inflammation

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81401645);广东省中山市社会公益科技研究项目(2018B1032)。

作者简介:傅强,男,副主任技师,主要从事临床检验诊断学方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: ck521620@163.com。

本文引用格式:傅强,王伟佳,黄福达,等. β -catenin 通过 ASK1 抑制铜绿假单胞菌引起的炎症反应[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(14):

铜绿假单胞菌是广泛分布于自然界的细菌,是引起慢性感染和医院感染常见的病原体之一,可引起尿路感染、肺部感染、皮肤感染、角膜感染等^[1-2]。天然免疫和参与天然免疫的初始免疫细胞(如巨噬细胞)是病原体感染时发挥免疫防御作用的第一道防线。病原体感染启动机体的炎性反应,激活的炎性反应可以促进病原体的清除,然而,过度的炎性反应会造成机体的免疫病理损伤^[1-2]。因此,如何发挥机体的免疫防御功能,同时抑制过度炎性反应造成的病理损伤在感染性疾病中至关重要。

β -catenin 是经典 Wnt 通路中的核心分子,当 Wnt 信号通路被激活后, β -catenin 在胞浆中聚集并转位至胞核,调节细胞的多种病理、生理过程。有报道, β -catenin 可在自身免疫性疾病^[3]、炎症相关的疾病^[4-5]及多种病原体感染^[6-7]中发挥重要的免疫调控作用。在以往研究中发现,当感染铜绿假单胞菌时, β -catenin 会抑制角膜的炎性反应^[6]。然而, β -catenin 在铜绿假单胞菌感染中的免疫调控机制尚不清楚。凋亡信号调节激酶 1(ASK1)是科学家于 90 年代发现的有丝分裂原激酶(MAPK)上游的信号分子,通过调节 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)MAPK 和 P38 MAPK 参与天然免疫调控和炎症性疾病^[8-11]。 β -catenin 通过 ASK1 调节 P38 在内毒素血症中发挥炎症调节作用^[12]。那么,ASK1 在铜绿假单胞菌感染中的作用如何, β -catenin 是否通过 ASK1 在铜绿假单胞菌感染中发挥免疫调控作用还有待于进一步的研究。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 RAW264.7 细胞、过表达 β -catenin 的 RAW264.7 细胞和对照细胞在含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中,于 37℃ 5%二氧化碳(CO₂)条件下培养^[6]。ASK1 质粒购自 addgene 公司,按照说明书采用阳离子脂质体 2 000 转染,以 5 μ g 的终浓度应用于细胞,进行后续回复实验。siASK1 购自 Santacruz 公司,按照说明书采用阳离子脂质体 2 000 转染,以 5 μ mol/L 的终浓度应用于细胞,进行后续检测。

1.2 普通聚合酶链反应(PCR) 采用 TRIzol 法提取细胞的 RNA,用反转录试剂盒转录成 cDNA,采用 PCR 扩增试剂盒进行普通 PCR 扩增。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,UVP 成像系统观察扩增条带。ASK1 的引物序列见表 1。

1.3 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR) 采用 TRIzol 法提取细胞的 RNA。用反转录试剂盒转录成 cDNA,采用 SYBR Green 按照试剂盒说明书配制反应体系进行 Real-time PCR。扩增结果采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法分析细胞中白细胞介素 6(IL-6)、IL-1 β 的基因表达。

IL-6、IL-1 β 和 β -actin 的引物序列,见表 1。

表 1 引物序列		
项目	引物序列	内参基因
β -actin	GAT TAC TGC TCT GGC TCC TAG C	上游
	GAC TCA TCG TAC TCC TGC TTG C	下游
ASK1	AGG GAA GGG CAC TTA TGG	上游
	AAG CCA ATC GTC TGT TCG	下游
IL-6	CAC AAG TCC GGA GAG GAG AC	上游
	CAG AAT TGC CAT TGC ACA AC	下游
IL-1 β	CGC AGC AGC ACA TCA ACA AGA GC	上游
	TGT CCT CAT CCT GGA AGG TCC ACG	下游

1.4 Western-blot 收集细胞的蛋白样品,经 SDS-PAGE 后转膜至硝酸纤维膜上,分别孵育 5%脱脂奶粉、ASK1(1 : 1 000)的一抗、抗兔二抗。经曝光后观察目的蛋白的水平。

1.5 铜绿假单胞菌角膜炎动物模型的构建 铜绿假单胞菌角膜炎动物模型构建参考以往研究^[6]。简述如下:选取 6~8 周龄雌性 SPF 级 C57BL/6 小鼠 20 只,麻醉后划伤左眼角膜并滴加铜绿假单胞菌菌液,构建角膜炎模型。分别于 1、3、5 d 观察角膜的浑浊程度和范围,进行临床评分,并于感染 5 d 拍摄角膜的裂隙灯照片。临床评分标准:0 级,角膜清澈或轻度浑浊;+1 级,角膜轻度浑浊,部分或完全遮盖眼前段;+2 级,角膜中度浑浊,完全遮盖眼前段;+3 级,角膜高度浑浊,完全遮盖眼前段;+4 级,角膜溃疡穿孔。结膜下注射 siASK1 和 siNC 以 10 μ mol/L 的终浓度应用于动物模型,进行后续实验。

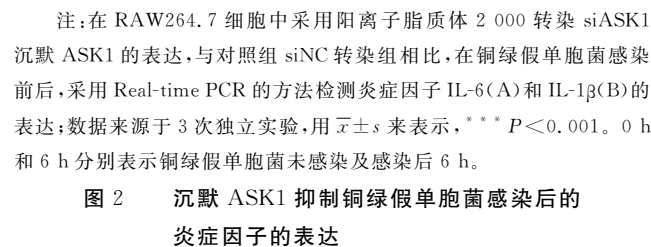
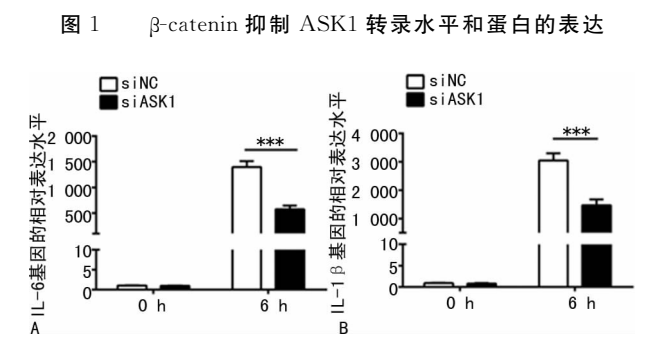
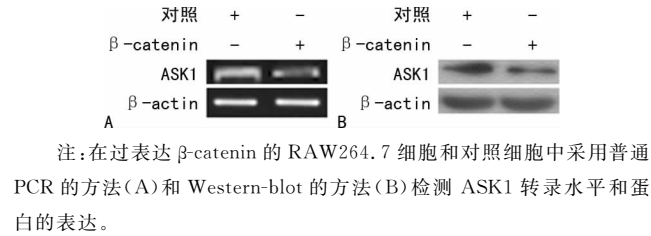
1.6 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计处理和分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 β -catenin 抑制 ASK1 转录水平和蛋白的表达 为了探讨 β -catenin 抑制铜绿假单胞菌感染诱导的炎性反应的机制,在过表达 β -catenin 的 RAW264.7 细胞和对照细胞中检测差异表达的 mRNA。实验结果显示过表达 β -catenin 可以抑制 ASK1 转录水平,与对照组相比,ASK1 mRNA 水平降低了 2.6 倍,差异有统计学意义(*P* < 0.001)。采用 PCR 和 Wester-blot 的方法进一步验证 ASK1 转录水平和蛋白的表达,结果发现过表达 β -catenin 明显抑制了 ASK1 转录水平(图 1A)和蛋白(图 1B)的表达。

2.2 沉默 ASK1 抑制铜绿假单胞菌感染后的炎症因子的表达 ASK1 作为调节天然免疫和炎性反应的重要分子,在铜绿假单胞菌感染中的作用还未知。为了

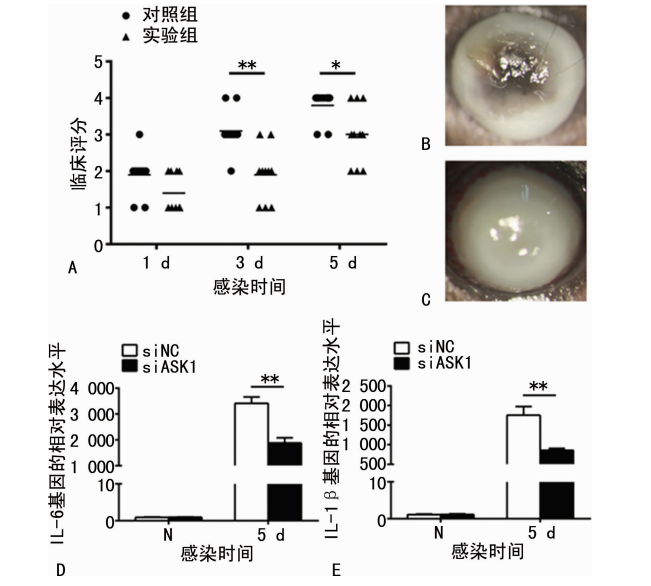
探讨 ASK1 在铜绿假单胞菌感染中的免疫调控作用, 本文应用 ASK1 的 siRNA 在转录水平沉默 ASK1 基因, 实验结果发现, 铜绿假单胞菌感染后, 沉默 ASK1 可以抑制炎症因子 IL-6(图 2A)和 IL-1 β (图 2B)基因水平的表达。



2.3 沉默 ASK1 抑制铜绿假单胞菌感染的角膜炎性反应 铜绿假单胞菌角膜炎是急性化脓性角膜炎, 该病的致病机制主要是由过度炎性反应造成的免疫病理损伤。为了进一步确认 ASK1 在铜绿假单胞菌感染诱导的炎性反应中的调控作用, 构建铜绿假单胞菌角膜炎的动物模型, 沉默 ASK1 观察疾病变化。临床评分结果发现, 沉默 ASK1 后, 在感染后 3 d 和 5 d, 临床评分降低(图 3A)。裂隙灯结果显示, 沉默 ASK1 后角膜重度浑浊覆盖眼前端, 临床评分为 +3(图 3C), 而对照组角膜溃疡穿孔, 临床评分为 +4(图 3B)。Real-time PCR 结果显示, 在铜绿假单胞菌感染 5 d 后, 沉默 ASK1 可以抑制 IL-6(图 3D)和 IL-1 β (图 3E)的表达。应用铜绿假单胞菌角膜炎的动物模型, 体内实验再次验证沉默 ASK1 可以抑制铜绿假单胞菌感染引起的炎性反应。

2.4 β -catenin 通过 ASK1 抑制铜绿假单胞菌引起的炎性反应 以上实验结果发现, β -catenin 可在转录水平和蛋白水平抑制 ASK1, 同时发现沉默 ASK1 可在铜绿假单胞菌感染的体内外模型中抑制炎性反应。那么, β -catenin 是否通过抑制 ASK1 发挥免疫调控功能呢? 实验结果发现, 在过表达 β -catenin 的同时过表

达 ASK1 可减弱炎症因子 IL-6(图 4A)和 IL-1 β (图 4B)表达的抑制作用。



达 ASK1 可减弱炎症因子 IL-6(图 4A)和 IL-1 β (图 4B)表达的抑制作用。

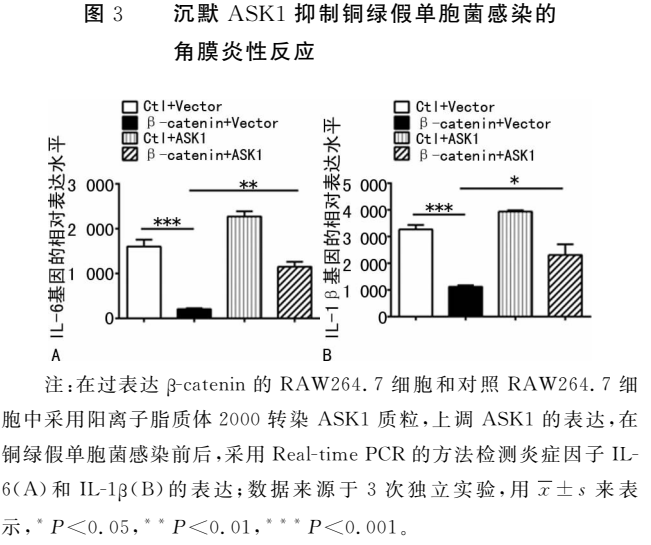


图 4 β -catenin 通过 ASK1 抑制铜绿假单胞菌引起的炎性反应

3 讨论

Wnt/ β -catenin 是进化高度保守的信号通路, β -catenin 是经典 Wnt 通路中核心分子。当通路被激活时, β -catenin 转位至细胞核内诱导下游基因的表达, 参与多种生理和病理过程^[3-7]。有文献研究发现, 在铜绿假单胞菌感染时, β -catenin 抑制感染细胞和角膜的炎性反应^[6]。然而, β -catenin 在通路假单胞菌感染中的免疫调控机制尚不清楚。

ASK1 是免疫调控的重要分子, 可通过 JNK MAPK 和 P38 MAPK 参与天然免疫调控和炎症性疾病

病^[8-9]。有研究报道,在幽门螺杆菌感染时,ASK1 参与细胞凋亡和炎症反应,从而参与胃癌的发生^[10];爱德华菌属中的新型毒素可通过 ASK1-MAPK 通路促进疾病的发生^[11]。然而,ASK1 在铜绿假单胞菌感染中的免疫调节作用还未知。本研究发现,在铜绿假单胞菌感染的细胞模型和动物模型中,沉默 ASK1 可在细胞模型和动物模型中抑制炎症反应。

有研究报道,在内毒素血症中, β -catenin 可抑制 ASK1-P38 信号通路,抑制内毒素引起的炎症反应^[12];在脆弱拟杆菌肠毒素刺激下, β -catenin 通过抑制 NF- κ B 的活性抑制 IL-8 的表达,抑制炎症反应^[13];在化学剂硫酸吡啶酚诱导的炎症反应中, β -catenin 可通过抑制巨噬细胞向 M1 极化抑制炎症反应^[14];在肾脏炎症反应中, β -catenin 通过与 Foxo 相互作用诱导 T 细胞向 Treg 转化,抑制肾脏纤维化和炎症反应^[15]。然而,在铜绿假单胞菌感染中, β -catenin 调节炎症反应的分子机制还有待于进一步研究。本研究发现, β -catenin 可以在转录水平和蛋白水平抑制 ASK1 的表达;进一步研究发现,ASK1 可减弱 β -catenin 对炎症的抑制作用。这些结果提示, β -catenin 通过调控 ASK1 抑制铜绿假单胞菌感染诱导的炎症反应。

本研究发现,在过表达 β -catenin 的 RAW264.7 细胞中 ASK1 的转录水平和蛋白水平明显降低;沉默 ASK1 可在铜绿假单胞菌感染的细胞模型和动物模型中抑制炎症反应;进一步实验发现,ASK1 可减弱 β -catenin 对炎症的抑制作用。综上所述, β -catenin 通过调控 ASK1 抑制铜绿假单胞菌感染引起的炎症反应。

参考文献

[1] BERRA L,SAMPSON J,WIENER-KRONISH J. Pseudomonas aeruginosa;acute lung injury or ventilator-associated pneumonia? [J]. Minerva Anesthesiol,2010,76(10): 824-832.

[2] JEUKENS J,FRESCHI L,KUKAVICA-IBRULJ I,et al. Genomics of antibiotic-resistance prediction in Pseudomonas aeruginosa[J]. Ann N Y Acad Sci,2019,1435(1): 5-17.

[3] SWAFFORD D,SHANMUGAM A,RANGANATHAN P,et al. Canonical wnt signaling in CD11c(+) APCs regulates microbiota-induced inflammation and immune cell homeostasis in the colon[J]. J Immunol,2018,200(9): 3259-3268.

[4] YAO L,ZHAO H,TANG H,et al. ,Blockade of beta-catenin signaling attenuates toluene diisocyanate-induced

experimental asthma[J]. Allergy,2017,72(4):579-589.

[5] YANG F,HUANG D,XU L,et al. Wnt antagonist secreted frizzled-related protein 1 (sFRP1) may be involved in the osteogenic differentiation of periodontal ligament cells in chronic apical periodontitis[J]. Int Endod J,2021,54(5):768-779.

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

[7] LI Z,WANG Y,LIU X,et al. Interleukin-32epsilon induces caspase-independent apoptosis mediated by N-Myc interactor in macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis[J]. FEBS J,2019,286(3):572-583.

[8] TAKEDA K,NOGUCHI T,NAGURO I,et al. Apoptosis signal-regulating kinase 1 in stress and immune response [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol,2008,48:199-225.

[9] NYGAARD G,DI PAOLO J A,HAMMAKER D,et al. Regulation and function of apoptosis signal-regulating kinase 1 in rheumatoid arthritis[J]. Biochem Pharmacol, 2018,151:282-290.

[10] HAYAKAWA Y,HIRATA Y,KINOSHITA H,et al. , Differential roles of ASK1 and TAK1 in Helicobacter pylori-induced cellular responses[J]. Infect Immun,2013,81(12):4551-4560.

[11] YANG D,LIU X,XU W,et al. The Edwardsiella piscicida thioredoxin-like protein inhibits ASK1-MAPKs signaling cascades to promote pathogenesis during infection [J]. PLoS Pathog,2019,15(7):e1007917.

[12] NOH K T,PARK Y M,CHO S G,et al. GSK-3beta-induced ASK1 stabilization is crucial in LPS-induced endotoxin shock[J]. Exp Cell Res,2011. 317(12):1663-1668.

[13] JEON J I,KO S H,KIM J M. Intestinal Epithelial Cells Exposed to Bacteroides fragilis Enterotoxin Regulate NF-kappaB Activation and Inflammatory Responses through beta-Catenin Expression[J]. Infect Immun,2019,87(11): 312-319.

[14] LI Y,YAN J,WANG M,et al. Uremic toxin indoxyl sulfate promotes proinflammatory macrophage activation by regulation of beta-catenin and YAP pathways[J]. J Mol Histol,2021,52(2):197-205.

[15] QIAO X,RAO P,ZHANG Y,et al. Redirecting TGF-beta signaling through the beta-Catenin/Foxo complex prevents kidney fibrosis[J]. J Am Soc Nephrol,2018,29(2): 557-570.