

NODs 信号通路在 RAW264.7 细胞抗烟曲霉刺激中的作用

罗阔丹[△] 张海红[△] 苏明声 梁永红 饶振华 谢小梅^{*}

(江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室 江西 南昌 330004)

摘要: 【目的】通过培养 RAW264.7 细胞, 并运用 siRNA 沉默 NOD2 基因来研究 NODs 信号通路在体外抗烟曲霉中的作用。【方法】体外培养 RAW264.7 细胞, 接种 2×10^5 个/孔细胞于六孔板中, 分为正常对照组(N)和正常沉默组[NOD2(RNAi), 正常+烟曲霉孢子刺激组(N+Af)和正常沉默+烟曲霉孢子刺激组[NOD2(RNAi)+Af], 每组三复孔。通过 RT-PCR 法检测细胞中 NOD1、NOD2、RIP2 mRNA 表达; Western blot 法检测细胞中分泌蛋白 TNF- α 表达。【结果】与 N 组比较, N+Af 组 NOD1、NOD2 mRNA 和 TNF- α 蛋白表达显著上升。与阴性对照组(Nctrol)相比, NOD2(RNAi)组 NOD2 mRNA 表达明显受到抑制, 沉默效果达到 80% 以上, 说明 RAW264.7 细胞中 NOD2 基因被成功沉默。与 NOD2(RNAi)组比较, NOD2(RNAi)+Af 组 NOD1、RIP2 mRNA 和 TNF- α 蛋白表达小幅上升, 但无显著性差异 ($P > 0.05$)。与 NOD2 基因沉默前比较发现: 与 N 组比较, NOD2(RNAi)组, TNF- α 蛋白表达显著性升高 ($P < 0.05$)。与 N+Af 组比较, NOD2(RNAi)+Af 组, TNF- α 蛋白显著性降低 ($P < 0.05$); NOD1、RIP2 mRNA 在各组中表达均未见显著性差异。【结论】NODs 信号通路在 RAW264.7 细胞抗烟曲霉中发挥作用, 尤以 NOD2 的作用较突出。

关键词: NODs, 烟曲霉菌, RAW264.7 细胞, siRNA

The role of NODs signaling pathway in RAW264.7 cells against the stimulate of *Aspergillus fumigatus*

LUO Hong-Dan[△] ZHANG Hai-Hong[△] SU Ming-Sheng LIANG Yong-Hong

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30760236)

*通讯作者: Tel: 86-791-7118707; 信箱: jxxm1964@sina.com

[△]并列第一作者

收稿日期: 2011-07-12; 接受日期: 2011-09-30

RAO Zhen-Hua XIE Xiao-Mei*

(Key Laboratory of Modern Preparations of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang, Jiangxi 330004, China)

Abstract: [Objective] To study the role of NODs signaling pathway against the stimulate of *Aspergillus fumigatus* in RAW264.7 cells by using siRNA to silence NOD2 gene. **[Methods]** RAW 264.7 cells were inoculated in six-well plate, and then divided into four groups: normal control group (N), normal control group with NOD2 gene silence group, normal with *Aspergillus fumigatus* spores stimulation group (N+Af) and normal with *Aspergillus fumigatus* spores stimulation with NOD2 gene silence group. Each groups has three duplicate wells. The expressions of NOD1、NOD2 and RIP2 mRNA in each group were studied by RT-PCR and the expression of TNF- α in each group was detected by western blot assay. **[Results]** Compared with the N group, expressions of NOD1、NOD2 mRNA and TNF- α protein increased significantly in N+Af group; Compared with negative control group, the expression of NOD2 mRNA was significantly suppressed in NOD2(RNAi) group, the silencing effect was reached to 80%, indicating that NOD2 gene in RAW264.7 cells was successfully silenced. Compared with NOD2(RNAi) group, the expressions of NOD1、NOD2 mRNA and TNF- α protein were slightly increased, but no significant difference ($P>0.05$). Compared with N group, the expression of TNF- α protein was increased significantly in NOD2(RNAi) group; Compared with N+Af group, the expression of TNF- α protein was lowered significantly in NOD2(RNAi)+ Af group. The expressions of NOD1、RIP2 mRNA in each group were changed slightly. **[Conclusion]** NODs and its signaling pathway play a role in resistance to *Aspergillus fumigatus* in RAW264.7 cells, particularly the role of NOD2 more prominent.

Keywords: NODs, *Aspergillus fumigatus*, RAW264.7 cells, siRNA

烟曲霉菌(*Aspergillus fumigatus*)为空气中常见的条件致病菌,其直径很小,可以被人体直接吸入呼吸道。正常机体可以通过免疫反应清除或杀灭入侵的烟曲霉菌,在免疫受损机体可引起严重的肺部感染疾病。

天然免疫是机体免疫系统直接抵御病原体入侵的最初阶段,通过机体自身的特异性模式识别受体(PRRs)来识别病原体特有的保守结构病原相关分子模式(PAMPs)。细胞内 NOD 样受体(NLRs)是胞浆型 PRRs 中的一个重要家族, NOD1 主要表达于单核细胞、骨髓来源的巨噬细胞和各种上皮细胞; NOD2 主要表达于单核细胞、巨噬细

胞、树突状细胞、粒细胞和少量 T 细胞等^[1-2]病原体侵袭细胞可上调 NODs 表达,启动机体的免疫应答和炎症反应,在机体天然免疫应答中发挥独特的功能。

本实验室现已经通过体内实验证明了 NODs 信号通路中的 NOD1、NOD2 受体及下游分泌的白介素、肿瘤坏死因子和干扰素等在机体抗烟曲霉菌感染中发挥了重要作用^[3]。鉴于体内研究的复杂性,本文拟从体外选小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7,通过 siRNA 沉默 NOD2 基因来研究 NODs 受体及其信号通路在机体抗烟曲霉菌中的作用,以期进一步了解机体的天然免疫反应在

抗真菌中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

烟曲霉菌(临床分离株, 分离号: 3910)购于中国医学真菌菌种保藏管理中心; RAW264.7 细胞(小鼠单核巨噬细胞系)购于上海生命科学院细胞库; LipofectamineTM2000、Trizol 试剂, Invitrogen 公司; NOD2-siRNA 序列, 广州锐博公司合成; RNA 提取试剂盒, TaKaRa 公司; 山羊抗 TNF- α 多克隆抗体(Santa Cruz 公司); 兔抗羊 Ig-G/辣根酶标记(Santa Cruz 公司); ECL 发光剂(北京中杉公司); PCR 引物(Invitrogen 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组: 培养 RAW264.7 细胞, 接种 2×10^5 个/孔细胞于六孔板中, 分为正常对照组(N)、正常+烟曲霉孢子刺激组(N+Af)、正常沉默组[NOD2(RNAi)]和正常沉默+烟曲霉孢子刺激组[NOD2(RNAi)+Af], 每组三复孔。

1.2.2 烟曲霉孢子刺激 RAW264.7 细胞: 将烟曲霉菌孢子 100°C 加热 60 min, 刺激 RAW264.7, 孢子刺激细胞数(Multiplicity of infection, MOI)为 1:5, 刺激时间为 12 h。作用完毕后弃菌, 无菌 PBS

洗涤 2 遍, 加 10%胎牛血清 RPMI1640 培养液继续培养细胞 2 d 后, 弃去培养液进行后续试验。

1.2.3 siRNA 沉默 RAW264.7 细胞 NOD2 表达: 取传代 2-4 代处于对数生长期的 RAW264.7 细胞, 按 2×10^5 个/孔接种于六孔板中, 培养 12 h 后换液。配制 NOD2-Lipo2000 复合物, 转染细胞, 6 h 后换新鲜的培养液, 继续培养 24 h 后加入灭活烟曲霉孢子刺激, 作用 12 h 后收集细胞。

1.2.4 RT-PCR 法检测细胞中 TLR2、TLR4、MyD88 mRNA 表达变化: 细胞培养板中的细胞吹散收集或者直接在板中裂解, 用 Trizol 法提取细胞总 RNA, 利用 TaKaRa 逆转录试剂盒合成 cDNA 后, 采用 β -actin 作为内参, 扩增各目的基因。引物序列及反应条件见表 1。

1.2.5 Western blot 检测细胞上清中 TNF- α 蛋白表达变化: 上清液利用 Millipore 超滤离心管 NMVL=1/3 (目的分子量), $5\,000 \times g$ 离心, 获得浓缩蛋白, 变性后以 $80\ \mu\text{g}$ 总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜, 封闭, 杂交, 与一抗(1:250)和二抗(1:8 000) 37°C 各孵育 1 h, 显色, 以 β -actin 作为内参, 灰度扫描后, Image J 软件分析。

1.2.6 统计学分析: 采用 SPSS 统计软件分析, 组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 有统计学差异。

表 1 引物序列及 PCR 反应条件
Table 1 Primer sequences and PCR reactive conditions

基因名称 Name	序列 Sequence (5'→3')	退火温度 Annealing temperature ($^\circ\text{C}$)	产物长度 PCR product (bp)
β -actin	Reverse: ACGGCCAGGTCATCACTATT Anti-reverse: TAACAGTCCGCTAGAAGCA	59.3	409
NOD1	Reverse: AAGCATTTCTGCTACCCGGAG Anti-reverse: AAAGACATCGGTTCAGGGTCAC	67.7	513
NOD2	Reverse: CCGTGTCTCTGTTAACCTTTG Anti-reverse: AGGATCAGCAGGTACATGTC	59.3	438
RIP2	Reverse: GCCATTGTGAGCCAGATGA Anti-reverse: ATTTGAAGGCGGTGCTTTG	59.3	264

2 结果

2.1 沉默 NOD2 基因前, 各组细胞 NOD1、NOD2、RIP2 mRNA 和 TNF- α 蛋白的表达: 结果显示, 与 N 组比较, N+Af 组 NOD1、NOD2 mRNA 和 TNF- α 蛋白表达显著性升高($P < 0.05$), RIP2 mRNA 小幅升高, 无显著性差异($P > 0.05$)。见图 1-4。

2.2 转染 NOD2-siRNA 后各组 NOD2 mRNA 表达比较: 结果显示: NOD2(RNAi)组与 Nctrol 组比较显著性降低($P < 0.05$); Nctrol 组与 N 组比较无

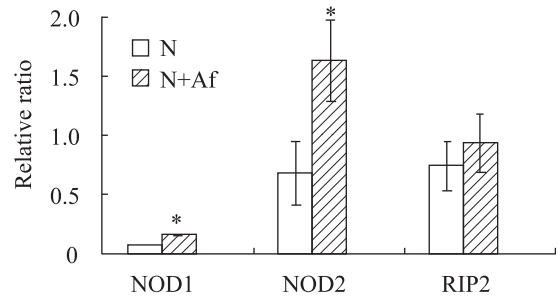


图 1 不同组细胞 NOD1、NOD2、RIP2 mRNA 表达比较
Fig. 1 Comparison of mRNA expression level of NOD1、NOD2 and RIP2 in each group of cells

Note: * $P < 0.05$, vs the normal group.

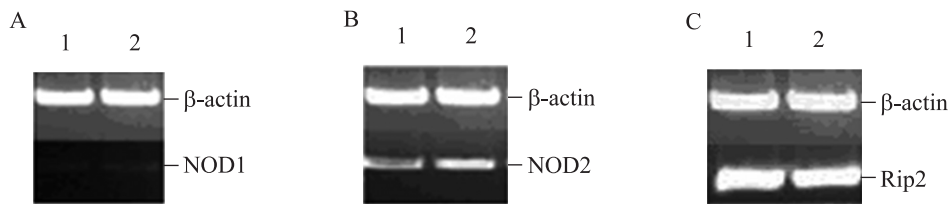


图 2 NOD1 (A)、NOD2 (B)、RIP2 (C) RT-PCR 产物电泳图

Fig. 2 The product's electrophoretogram of NOD1 (A)、NOD2 (B) and RIP2 (C)

Note: 1: The normal group; 2: The normal group with Af stimulation.

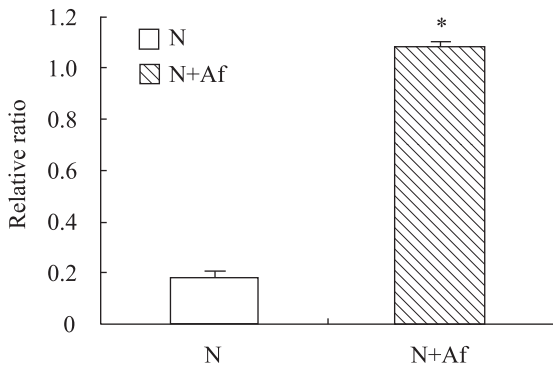


图 3 不同组细胞 TNF- α 蛋白表达比较

Fig. 3 Comparison of protein expression level of TNF- α in each group of cells

Note: * $P < 0.05$, vs the normal group.

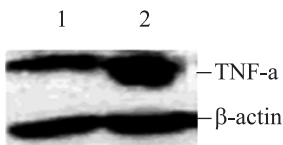


图 4 不同组细胞 TNF- α 蛋白 Western blot 电泳图

Fig. 4 The western blotting gram of TNF- α protein in each group of cells

Note: 1: The normal group; 2: The normal group with Af stimulation.

显著性差异($P > 0.05$), 说明 RAW264.7 细胞转染 NOD2-siRNA 成功, 得沉默效果达到 80%以上, 达到后续实验的要求; 同时, 其余各 NOD2 沉默组与 Nctrol 组比较, NOD2 mRNA 表达显著性降低, 均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 5-6。

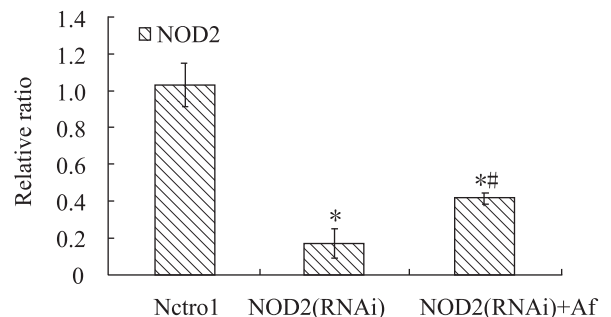


图 5 转染 NOD2-siRNA 后各组 NOD2 mRNA 表达比较

Fig. 5 Comparison of mRNA expression level of NOD2 in each group after NOD2-siRNA transfection

Note: * $P < 0.05$, vs Nctrol group; # $P > 0.05$, vs NOD2(RNAi) group.

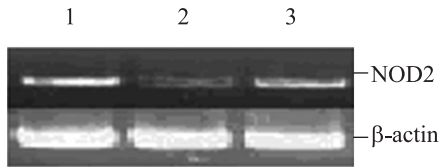


图 6 转染 NOD2-siRNA 后各组 NOD2 mRNA RT-PCR 电泳图

Fig. 6 The product's electrophoretogram of NOD2 in each group

Note: 1: The netrol group; 2: The NOD2(RNAi) group; 3: The NOD2(RNAi) with Af stimulation group.

2.3 沉默 NOD2 基因后, 各组 NOD1、RIP2 mRNA 和 TNF- α 蛋白的表达: 结果显示: 与 NOD2(RNAi) 组比较, NOD2(RNAi)+Af 组 NOD1、RIP2 mRNA 表达均有小幅上升, 但都没有显著性差异($P>0.05$); 而 TNF- α 蛋白表达小幅下降, 也无显著性差异($P>0.05$)。见图 7-8。

2.4 NOD2 基因沉默前后同组 NOD1、NOD2、RIP2 mRNA 和 TNF- α 蛋白的表达比较: 结果表明: 与 N 组比较, NOD2(RNAi)组 TNF- α 蛋白表达显著性升高($P<0.05$)。与 N+Af 组比较, NOD2(RNAi)+Af 组, NOD1、RIP2 mRNA 的表达虽有下降的趋势, 但差异无显著性意义($P>0.05$); TNF- α 蛋白显著性降低, 具有统计学意义($P<0.05$)。见图 9-10。

3 讨论

迄今为止 NOD 蛋白在机体对多种病原微生物感染免疫中都发挥了重要作用。Girardin 等^[4]

指出, NOD1 参与了弗氏志贺菌介导的 NF- κ B 活化和促炎细胞因子 TNF- α 和 IL-6 的释放, 启动抗入侵微生物的天然免疫反应。Optiz 等^[5-6]通过体外内皮细胞研究显示, 李斯特菌通过 NOD1 受体诱导活化 p38MAPK 和 IL-8 分泌。Rosenstiel 等^[7]体外实验发现, 幽门螺旋菌刺激 HEK293 细胞时, 能激活 NF- κ B 通路, 上调 NOD1 和 NOD2 的表达量, 印证了胃炎患者胃粘膜 NOD1/NOD2 的高表达, 说明 NOD1/NOD2 受体识别幽门螺旋菌诱导活化 NF- κ B, 促进下游炎性分子的分泌。但 NOD 蛋白在抗真菌免疫中的作用, 现在研究仍然很少, Netea 与 Bryant^[8-9]学者研究发现 NOD 蛋白在口腔上皮细胞清除真菌白色念珠菌中发挥重要作用。Netea 发现 NOD 蛋白识别真菌的多蛋白复

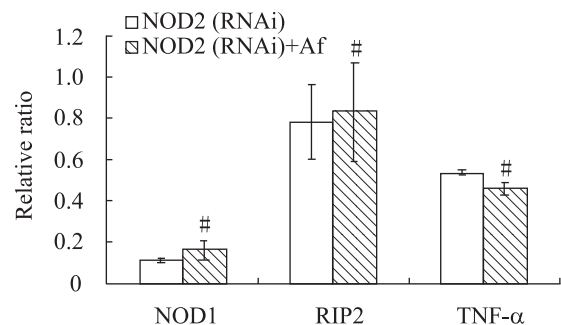


图 7 沉默 NOD2 基因后, 各组 NOD1、RIP2 mRNA 和 TNF- α 蛋白的表达比较

Fig. 7 Comparison of mRNA expression level of NOD1、RIP2 and protein expression level of TNF- α in each group after silencing NOD2 gene

Note: # $P>0.05$, vs NOD2(RNAi) group.

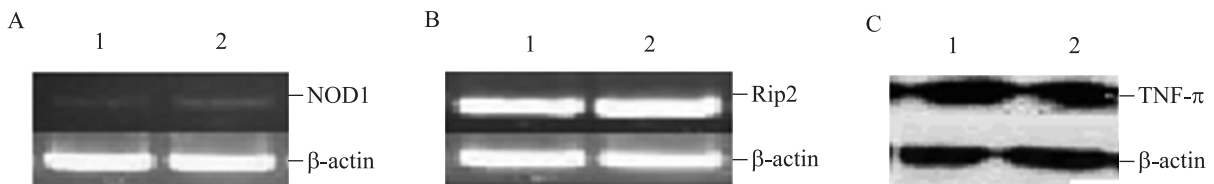


图 8 沉默 NOD2 基因后, 各组 NOD1、RIP2 mRNA RT-PCR 电泳图和 TNF- α 蛋白 Western blot 电泳图表达

Fig. 8 The product's electrophoretogram of NOD1、RIP2 and the western blotting gram of TNF- α protein in each group after silencing NOD2 gene

Note: A: NOD1; B: RIP2; C: TNF- α ; 1: NOD2(RNAi) group; 2: NOD2(RNAi)+Af group.

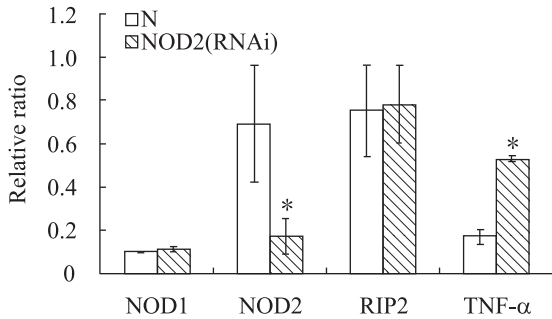


图 9 NOD2 基因沉默前后, 正常对照组 NOD1、NOD2、RIP2 mRNA 和 TNF- α 蛋白的表达比较
Fig. 9 Comparison of mRNA expression level of NOD1、NOD2、RIP2 and protein expression level of TNF- α in normal group and normal group with NOD2 silense
Note: * $P < 0.05$, vs the normal group.

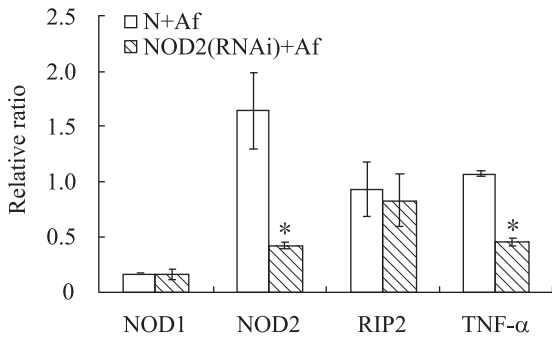


图 10 NOD2 基因沉默前后, 正常+烟曲霉孢子刺激组 NOD1、NOD2、RIP2 mRNA 和 TNF- α 蛋白的表达比较
Fig. 10 Comparison of mRNA expression level of NOD1、NOD2、RIP2 and protein expression level of TNF- α in normal with Af stimulation group and normal with Af stimulation and NOD2 silense group
Note: * $P < 0.05$, vs normal with Af stimulation group.

合物后, 引发炎症反应激活 Caspase-1, 一种蛋白水解酶, 并且分泌细胞因子激活白细胞介素-1 β 和 IL-18。张辉军^[10]等发现烟曲霉分生孢子通过鼻腔途径感染小鼠后, 小鼠肺组织内 NOD2 蛋白的表达量上升。本实验室前期通过建立小鼠侵袭性肺曲霉病模型, 检测到 NODs 蛋白在小鼠体内抗烟曲霉感染中发挥重要作用, 并能引起 NODs 信号通路中下游基因的表达上调。基于体内实验

干扰因素比较多, 对于研究机理问题不易解释, 因此本实验选择体外利用 RAW264.7 细胞, 并运用 siRNA 沉默 NOD2 基因来研究 NODs 信号通路在体外抗烟曲霉中的作用。

首先在 NOD2 基因沉默前, 与 N 组比较, N+Af 组 NOD1、NOD2 mRNA 表达均显著性上升, TNF- α 蛋白表达显著性上升, RIP2 mRNA 表达小幅上升。说明在正常细胞抗烟曲霉孢子刺激中, NODs 及下游分泌蛋白 TNF- α 都发挥了重要作用, 提示在 RAW264.7 细胞抗烟曲霉菌刺激中 NODs 信号通路发挥了作用。

RAW264.7 细胞经 NOD2-siRNA 转染后, 与阴性对照组比较, NOD2(RNAi)组 NOD2 mRNA 表达显著性降低, 说明 RAW264.7 细胞 NOD2 基因被特异性沉默。可以进行后续实验。

研究发现在沉默 NOD2 基因后, 与 NOD2(RNAi)组比较, NOD1、RIP2 mRNA 在 NOD2(RNAi)+Af 组的表达虽有升高, TNF- α 蛋白表达下降, 但差异无统计学意义, 说明 NOD2 基因被沉默后, NOD1 信号通路在体外抗烟曲霉感染中并未发挥明显作用, 结合 NOD2 基因沉默前的实验结果分析, 进而提示在 NODs 信号通路在体外抗烟曲霉过程中, 发挥主要作用的是 NOD2, 它的沉默可能影响了 NOD1 受体对烟曲霉孢子的识别及信号通路的激活。

比较 NOD2 基因沉默前后同组 NOD1、RIP2 mRNA 及分泌蛋白 TNF- α 的表达变化。发现在 N+Af 组中, NOD1、RIP2 mRNA 的表达虽有下降的趋势, 但差异无显著性意义, 但 TNF- α 的表达显著性下降, 提示 NOD2 在对 TNF- α 蛋白的分泌和释放的调控上可能起重要作用。

本实验室前期体内实验研究结果表明 NOD1、NOD2 高表达及下游因子 TNF- α 的合理高表达在正常小鼠抗烟曲霉菌感染中发挥了重要的作用^[11]; 体外实验结果与体内实验结果相

吻合,也与国内学者张辉军通过利用 A549 和 THP1 抗烟曲霉菌刺激得出的 NOD2、TNF- α 表达上调^[12]这一结果一致。多方证实 NODs 信号通路在抗烟曲霉菌刺激中发挥了作用,其中以 NOD2 的作用更为重要。

参 考 文 献

- [1] Inohara N, Koseki T, Peso LD, et al. Nod1, an apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor- κ B[J]. *Biological Chemistry*, 1999, 274(21): 14560-14567.
- [2] Ogura Y, Inohara N, Benito A, et al. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF- κ B[J]. *Biological Chemistry*, 2001, 276(7): 4812-4818.
- [3] 李祥. NODs 信号通路在侵袭性肺曲霉病中的作用[D]. 南昌: 江西中医学院硕士毕业论文, 2010, 7.
- [4] Girardin SE, Tournebise R, Macris M, et al. CARD4/Nod1 mediates NF- κ B and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*[J]. *EMBO Reports*, 2001, 2(8): 736-742.
- [5] Opitz B, Forster S, Hocke AC, et al. Nod1-mediated endothelial cell activation by *Chlamydomyces pneumoniae*[J]. *Circulation Research*, 2005, 96(3): 319-326.
- [6] Opitz B, Püschel A, Schmeck B, et al. Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279: 36426-36432.
- [7] Rosenstiel P, Hellmig S, Hampe J, et al. Influence of polymorphisms in the *NOD1/CARD4* and *NOD2/CARD15* genes on the clinical outcome of *Helicobacter pylori* infection[J]. *Cellular Microbiology*, 2006, 8(7): 1188-1198.
- [8] Bryant C, Fitzgerald KA. Molecular mechanisms involved in inflammasome activation[J]. *Trends in Cell Biology*, 2009, 19(9): 455-464.
- [9] Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, et al. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system[J]. *Nature Reviews Microbiol*, 2008, 6(1): 67-78.
- [10] 张辉军, 瞿介明, 邵长周, 等. NOD 相关蛋白在烟曲霉感染小鼠肺组织中的表达[J]. *中国临床医学*, 2005, 12(6): 1007-1009.
- [11] 石青, 李祥, 罗阔丹, 等. 烟曲霉菌感染小鼠肺组织中 NOD1 信号通路的激活[J]. *免疫学杂志*, 2010, 26(5): 419-422.
- [12] Zhang ZH, Liu RY, Noordhoek JA, et al. Interaction of airway epithelial cells (A549) with spores and mycelium of *Aspergillus fumigatus*[J]. *Journal of Infection*, 2005, 51(5): 375-382.

稿件书写规范

论文中有关正、斜体的约定

物种的学名: 菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写, 其余小写, 属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体, 首字母大写。

限制性内切酶: 前 3 个字母用斜体, 后面的字母和编码正体平排, 例如: *Bam*H I、*Msp* I、*Sau*3A I 等。

氨基酸和碱基的缩写: 氨基酸缩写用 3 个字母表示时, 仅第一个字母大写, 其余小写, 正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体, 蛋白质符号首字母大写, 用正体。