

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (10) :1350 – 1355; 4 October 2015
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi:10.13343/j.cnki.wsxb.20150210

大肠杆菌 EscI 蛋白 C-末端多肽诱导巨噬细胞炎性体应答

胡茂志^{1,2,3}, 李文华⁴, 严秋香¹, 耿士忠^{1,2}, 潘志明^{1,2}, 崔桂友⁴, 焦新安^{1,2*}

扬州大学¹江苏省高校动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, ²江苏省人兽共患病学重点实验室, ³江苏省动物预防医学重点实验室, ⁴旅游烹饪学院(食品科学与工程学院), 江苏 扬州 225009

摘要:【目的】分析 *E. coli* 的 EscI 蛋白 C-末端多肽诱导巨噬细胞 NLRC4 炎性体应答情况。【方法】以含有 *E. coli* 的 EscI 蛋白 C-末端氨基酸序列的多肽为材料, 通过体外导入小鼠腹腔巨噬细胞, 分析细胞的应答情况。【结果】利用脂多糖预先刺激后, 含有 EscI 蛋白 C-末端 15 个氨基酸的多肽能够明显地激活细胞内 NLRC4 炎性体应答, 细胞内半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1 被激活, 细胞发生 pyroptosis, 细胞培养上清中 IL-1 β 和 IL-18 的含量增加 ($P < 0.05$)。通过优化刺激条件发现, 以多肽/脂质体为 70 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的比例导入细胞并孵育 4 h 时, IL-1 β 的分泌量最高。【结论】含有 *E. coli* 的 EscI 蛋白 C-末端 15 个氨基酸的多肽能够明显地诱导巨噬细胞 NLRC4 炎性体应答。

关键词: 巨噬细胞, NLRC4 炎性体, EscI 蛋白, 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1 (caspase-1), IL-1 β

中图分类号: Q935 **文章编号:** 0001-6209(2015)10-1350-06

在天然免疫的众多模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR) 中, NOD 样受体 (NOD-like receptor, NLR) 能够识别胞内菌以及通过不同途径进入宿主细胞的胞外菌的效应蛋白^[1], 是天然免疫针对病原微生物感染的一类感受器和识别分子。不同的 NLR 识别胞质中不同的致病菌相关分子模式 (pathogen associated molecular pattern, PAMP) 和内源性分子, 从而激活下游的 caspase-1, 诱导 caspase-1 依赖性程序性细胞死亡 (pyroptosis); 另外, 活化的 caspase-1 对 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 进行剪切, 释放大量的促炎症因子 IL-1 β 和 IL-18^[2-3]。因此, 该通路在抗感染的天然免疫中起重要作用。

Tschopp 等将能够激活 caspase-1 的多蛋白复合体称为炎性体 (inflammasome)^[4-5]。自此以来, 关于炎性体机制的研究已经成为天然免疫应答分析的热点之一。NLRC4 (NLR family, CARD domain containing 4) 是 NLR 家族的成员之一。目前, 已经发现了众多能够激活 NLRC4 炎性体应答的活性成分, 如鞭毛蛋白 C-端以及以下组成细菌 III 型分泌系统 (type III secretion system, T3SS) 基座的 rod 蛋白: 沙门菌的 PrgJ 蛋白^[6]、类鼻疽假单胞菌的 BsaK 蛋白、*E. coli* 的 EprJ 蛋白 (EHEC) 和 EscI 蛋白 (EHEC 和 EPEC)、弗氏志贺氏菌的 MxiI 蛋白和绿脓假单胞菌的 PscI 蛋白。它们均有激活 NLRC4 炎性体所必需的 7 个氨基酸的序列 (V**L***)^[7]。

基金项目: 国家自然科学基金 (31372414, 31320103907); 江苏省动物预防医学重点实验室开放课题 (K13040); 江苏省高校优势学科建设工程项目

* 通信作者。Tel: +86-514-87971136; E-mail: jiao@yzu.edu.cn

作者简介: 胡茂志 (1976-), 男, 山东临沂人, 扬州大学副研究员, 主要从事微生物学和免疫学研究。

收稿日期: 2015-05-05; **修回日期:** 2015-06-16

巨噬细胞是研究炎性体应答的主要对象^[8]。为了建立炎性体应答体外分析方法,本研究以小鼠腹腔巨噬细胞为模型,通过用含有 EscI 蛋白 C-端序列的多肽体外刺激,分析细胞内炎性体应答的情况,并通过条件优化,初步建立了该炎性体应答分析技术,为炎性体机制的进一步研究奠定了技术基础。

1 材料和方法

1.1 材料

6-7 周龄 C57BL/6 小鼠 (H-2^d) 购自扬州大学比较医学中心。mouse IL-1 β flex set 为美国 BD Pharmingen 公司产品。胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 为美国 GIBCO 公司产品;无酚红 DMEM 为美国 Promega 公司产品。FLICATM caspase 1 detection kit 为美国 Immunochemistry Technologies 公司产品。mouse IL-18 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) detection kit 和 Lipofectamine 2000 (Lip2000) 为美国 Invitrogen 公司产品。大肠杆菌脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 为美国 Sigma 公司产品。

FACSAria 流式细胞仪 (分析软件为 FACSDiva) 为美国 BD 公司产品。TS100-F 倒置显微镜为日本尼康公司产品。

1.2 多肽 EscI-C15 的合成

根据文献 [7] 报道,选取 *E. coli* O157 菌株的 EscI 蛋白羧基端 (含有 C-末端 15 个氨基酸序列的多肽 EscI-C15) 为材料,其氨基酸序列为: ASLLSTSVTKLVSMQ, 由北京中科亚光生物科技有限公司合成,纯度为 95%。

1.3 腹腔巨噬细胞的制备

参考文献 [9-10] 方法并加以改进。用 10 mL 灭菌注射器吸取约 10 mL RPMI1640 培养基,注入小鼠腹腔,反复吹打并轻揉腹部后静置几分钟,然后尽量干净地吸取腹腔内的培养基,用 200 目不锈钢丝网过滤。将滤液离心,450 \times g, 5 min, 洗涤后,用 RPMI 1640 完全培养基 (含 10% FBS) 重悬细胞,调整细胞数量,备用。

1.4 细胞内炎性体的激活分析

1.4.1 体外刺激: 无菌取 C57BL/6 小鼠腹腔巨噬细胞,接种 96 孔板,培养过夜后,去除悬浮细胞,洗涤 2 次,保证 2×10^4 个/孔 (体积为 100 μ L)。然后换用含有 1 μ g/mL 的 *E. coli* LPS 的培养基,刺激 3 h

(诱导产生 pro-IL-1 β)。用无血清培养基洗涤两次后,将 140 ng 纯化的 EscI-C15 与 Lip2000 按照 70 ng/ μ L 的比例导入细胞并孵育 3 h^[11]。

1.4.2 细胞形态观察: 利用倒置显微镜观察细胞形态的变化。

1.4.3 细胞内 caspase-1 的激活: 收集细胞,用 FLICA 试剂盒检测 caspase-1 的激活。具体方法参照操作说明书进行。

1.4.4 细胞因子的分泌分析: 收集细胞培养上清,用 CBA (cytometric bead array system) 技术检测 IL-1 β 的分泌情况。利用 ELISA 试剂盒检测 IL-18 的产生。具体方法参照操作说明书进行。

1.5 不同的刺激因素对 IL-1 β 分泌的影响

在其他条件固定的条件下,分析刺激剂量、刺激时间以及刺激方式等因素的改变对 IL-1 β 分泌的影响。

2 结果

2.1 细胞内炎性体的激活分析结果

预先用 LPS 刺激,然后导入 EscI-C15 多肽 (多肽/脂质体 = 70 μ g/ μ L), 孵育 3 h。结果表明:(1) 倒置显微镜下,刺激组细胞出现贴壁性死亡现象,细胞膜损伤,细胞形态不完整。整个过程中未见明显的细胞悬浮等凋亡特征,而是呈现与 pyroptosis 一致的形态变化。对照组细胞形态正常 (图 1)。(2) 细胞内 caspase-1 的激活水平分析表明,刺激组 (3.5% 左右) 明显高于对照组 (0.6% 左右) ($P < 0.05$, 图 2)。(3) 培养上清中细胞因子的分泌情况分析表明,相对于对照组,刺激组能明显提高 IL-1 β 和 IL-18 的分泌 ($P < 0.05$, 图 3)。

2.2 不同刺激剂量对 IL-1 β 分泌的影响结果

分别按照多肽/脂质体为 17.5、35、70、140、280 和 560 μ g/ μ L 的比例导入细胞 (事先与培养基等混匀,然后替换原有培养基,2 μ L/100 μ L 培养基) 后,在其他条件一致的情况下,分析细胞上清中的 IL-1 β 的分泌情况。结果 (图 4) 表明,在低于 70 μ g/ μ L 时,随着比例的升高,IL-1 β 的分泌水平逐渐增加;当高于 70 μ g/ μ L 时,IL-1 β 的分泌水平逐渐下降。说明多肽/脂质体为 70 μ g/ μ L 的比例导入细胞是较好的选择。分析不同刺激剂量对细胞内 caspase-1 的激活水平表明,不同的刺激剂量对其激活水平的差异不明显,均处于 3%-5% 之间,这可能与活化

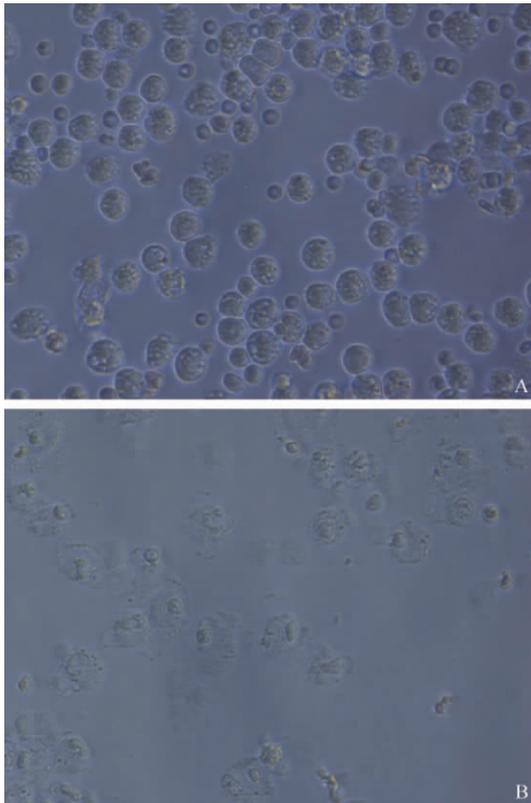


图 1. 小鼠腹腔巨噬细胞形态观察(400 ×)

Figure 1. Morphology of mouse peritoneal macrophages. A: Control; B: EscI-C15.

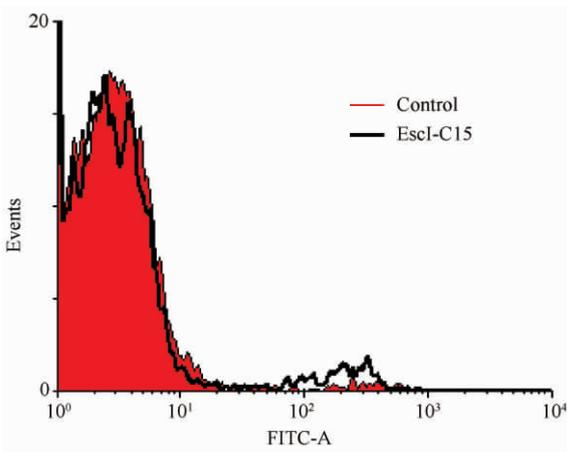


图 2. 巨噬细胞内 caspase-1 的活化分析

Figure 2. Activation of intracellular caspase-1 in macrophages.

细胞的死亡有关。

2.3 不同刺激时间对 IL-1 β 分泌的影响结果

预先用 LPS 刺激后, 分别在 EscI-C15 多肽导入细胞(多肽/脂质体为 70 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 后的不同时间收集细胞上清, 分析培养上清中 IL-1 β 的浓度表明, 4 h 以内, 随着时间的延长, IL-1 β 的浓度逐渐升高, 但

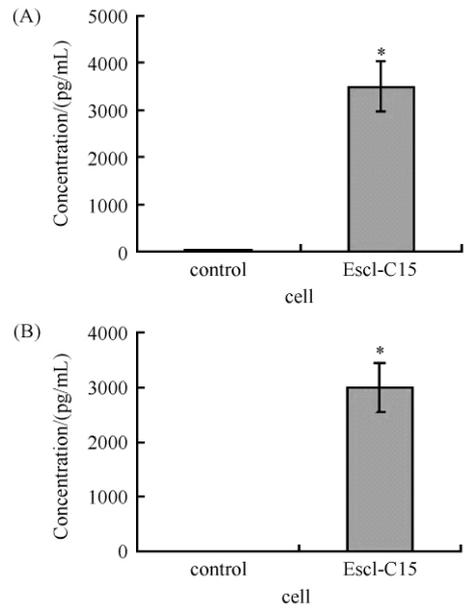


图 3. 培养上清中 IL-1 β (A) 和 IL-18 (B) 的含量分析结果

Figure 3. Contents of IL-1 β (A) and IL-18 (B) in supernatants.

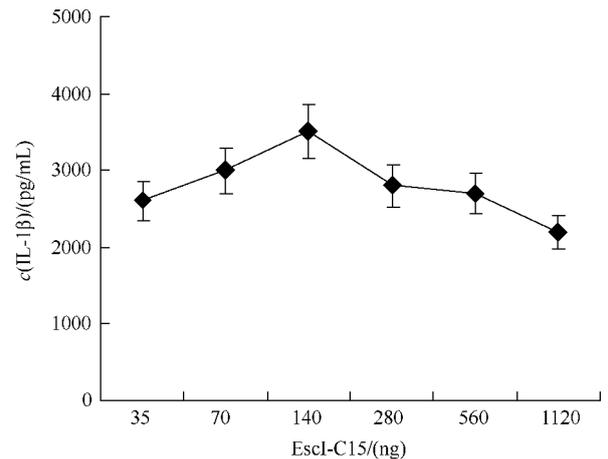


图 4. 不同刺激剂量对 IL-1 β 分泌的影响结果

Figure 4. Secretion of IL-1 β after delivery of EscI-C15 with different doses.

4 h 以后, 呈现下降趋势(图 5)。

2.4 刺激方式对 IL-1 β 分泌的影响结果

刺激 4 h 后分析结果(图 6)表明, 相对于对照组, 无 LPS 预先刺激、非导入条件下的 EscI-C15 多肽不能明显地诱导 IL-1 β 的分泌。预先用 LPS 刺激后, 虽然非导入条件下的 EscI-C15 多肽能诱导 IL-1 β 的分泌($P < 0.05$), 但其明显低于 EscI-C15 多肽导入条件下的刺激能力($P < 0.05$)。说明, EscI-C15 多肽的导入过程是诱导 IL-1 β 分泌的关键过程之一。

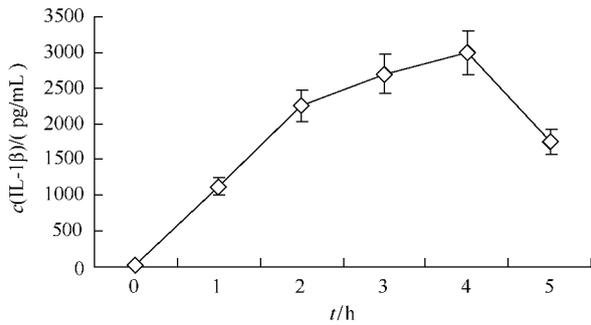


图 5. 不同刺激时间对 IL-1 β 分泌的影响结果

Figure 5. Secretion of IL-1 β after delivery for different time.

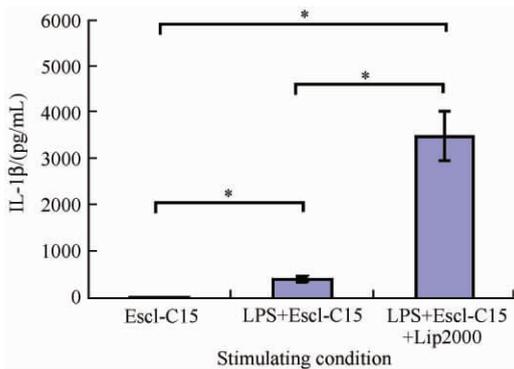


图 6. 不同刺激方式下 IL-1 β 分泌水平的比较结果

Figure 6. Secretion of IL-1 β with different stimulating condition. *, P<0.05

3 讨论

NLRs 由 3 个结构域组成: ①N-端为效应结构域 (PYD、CARD 或 BIR), 可与下游的接头分子和效应蛋白结合, 启动下游信号转导; ②中央的 NACHT 结构域负责 NLR 的寡聚化和活化; ③C-端富含亮氨酸重复序列 (leucine-rich repeats, LRRs) 负责探测和识别配体^[12-13]。NLR 通常以非活化状态存在, LRRs 折叠靠近 NACHT。当 LRRs 结合 PAMPs 后, NLR 构象发生变化, 暴露 NACHT, 触发寡聚化, 效应结构域通过同型互作, CARD (caspase recruitment domain) 或 PYD (pyrin domain) 分别募集含有 CARD 或 PYD 的效应分子 (如 caspase、激酶或接头蛋白), 使分子相互靠近形成炎性体, 从而激活炎性体应答^[12]。NLRC4 的 N-端效应结构域为 CARD, 可以通过 CARD-CARD 互作直接富集 pro-caspase-1, 其炎性体的激活不依赖于 ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain)^[14]。根据文献报道, 含有 *E. coli* 蛋白 EscI 的 C-末端 74 个氨基酸的多肽能够激活 NLRC4 炎性体^[7]。另外,

氨基酸序列比较分析表明, 在众多能够激活 NLRC4 炎性体的蛋白中均含有 7 个氨基酸的序列 (V**L***)^[7]。本研究利用根据这一分析合成的多肽刺激结果充分证实了这一点, 并且进一步表明, 包含 C-末端 15 个氨基酸的多肽即可显著地激活 NLRC4 炎性体应答。

caspase-1 是与炎症反应相关的 caspase 家族成员之一, 包括大亚基 P20、小亚基 P10 和长度可变的前域 (prodomain)^[15]。激活的巨噬细胞首先合成酶原 pro-caspase-1, 然后 pro-caspase-1 富集到炎性体, 经过自身催化裂解为 p10 和 p20 亚单位, 从而激活 caspase-1^[16]。在 caspase-1 活化分析过程中, caspase-1 抑制剂荧光染料 (Fluorochrome inhibitor of caspases, FLICA) FAM-YVAD-FMK 具有膜渗透性, 当其进入细胞后, 主要与活化的 caspase-1 的 P20 亚基的反应性半胱氨酸残基 (reactive cysteine residue) 共价结合而留在细胞内, 从而抑制酶活性。而未结合的荧光染料则能渗出细胞而被洗掉。因此, 可以通过荧光信号来检测细胞内 caspase-1 的活化情况。本研究用其标记后, 利用流式细胞术能成功地检测细胞内 caspase-1 的活化情况。但细胞数量较少, 这可能是由于 caspase-1 活化后, 细胞发生 pyroptosis 的缘故。

细胞的 pyroptosis 现象最初是由 Brennan 和 Cookson 等在伤寒沙门菌感染巨噬细胞的模型中发现的^[17], 并采用希腊文 pyro (发热) 和 ptosis (坠落) 将该现象命名为 pyroptosis^[18]。研究表明, caspase-1 的激活可以诱导细胞的 pyroptosis, 特征是细胞膜破裂和释放促炎症因子^[17]。据报道, 沙门菌感染或炭疽杆菌的致死毒素处理能够使细胞膜产生直径 1.1 - 2.4 nm 的孔, 该孔的形成依赖于 caspase-1 的激活。这破坏了细胞的离子梯度, 使渗透压增加, 细胞膨胀, 最后造成渗透性溶解和炎症成分的释放, 导致组织炎症。在鼠伤寒沙门菌感染巨噬细胞模型中发现, 感染 2.5 h 后即可形成孔^[19]。该孔的形成并非细菌的 T3SS 所导致的膜损伤, 而是宿主细胞中的炎性体及 caspase-1 等介导的一种防御反应^[20-22]。活化的 caspase-1 可局部堆积于单个炎性体中, 如超分子家族 pyroptosome^[23,24]。据推测, 较少的 caspase-1 活化不足以引发细胞渗透性改变; 而炎性体及 pyroptosome 等形成 caspase-1 活化中心后可引发足够的孔径, 诱发 pyroptosis^[25]。本研究利用多肽刺激后发现, 大部分细胞的细胞膜破裂, 细胞死亡现象明显, 符合 pyroptosis 的典型特征。

caspase-1 是 IL-1 β 转换酶, 能使无活性的 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 成熟^[7]。位于质膜或溶酶体膜上的 TLRs 及部分 NLR (如 NOD1、NOD2) 可介导

NF- κ B 信号途径,使 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 等在细胞内累积。在体外刺激巨噬细胞研究 NLR4 炎性体应答过程中,常用 LPS 预先刺激来诱导 pro-IL-1 β 的产生^[7, 26]。而炎性体活化 caspase-1 后,剪切、加工这些底物并释放出胞外。这两条信号途径协同,导致炎性因子增加。值得注意的是,细胞崩解与炎性因子的释放是两个相对独立的过程,炎性因子释放不要求细胞崩解^[19]。流式 CBA 技术是利用流式细胞术检测液体中可溶性细胞因子的方法,它首先通过结合捕获抗体的微球来捕捉溶液中的细胞因子,然后再加入荧光标记的检测抗体,最后通过检测微球的荧光强度来拟合细胞因子的浓度。本方法简便,检测速度快。本研究利用该技术检测结果表明,多肽刺激后,IL-1 β 和 IL-18 的分泌明显增强,说明 NLR4 炎性体被激活。同时发现,在多肽/脂质体比例为 70 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的条件下导入细胞,并继续培养 4 h 时,IL-1 β 的分泌最为明显。说明该条件是体外分析炎性体活化的最佳条件。

巨噬细胞内 caspase-1 的活化、细胞发生 pyroptosis 和细胞因子 (IL-1 β 和 IL-18) 的释放是 NLR4 炎性体激活过程中的典型特征。本研究通过分析和条件的优化,为炎性体机制和应用的研究奠定了技术基础。

参考文献

- [1] Ferrand J, Ferrero RL. Recognition of extracellular bacteria by NLRs and its role in the development of adaptive immunity. *Frontiers in Immunology*, 2013, 4: 344.
- [2] Dinarello CA. Interleukin-1 β , interleukin-18, and the interleukin-1 β converting enzyme. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1998, 856: 1-11.
- [3] Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song YL, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin JZ, Li XX, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type-2-associated cytokines. *Immunity*, 2005, 23 (5): 479-490.
- [4] Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-1 β . *Molecular Cell*, 2002, 10 (2): 417-426.
- [5] Chen MK, Wang HB, Chen W, Meng GX. Regulation of adaptive immunity by the NLRP3 inflammasome. *International Immunopharmacology*, 2011, 11 (5): 549-554.
- [6] Marlovits TC, Kubori T, Sukhan A, Thomas DR, Galán JE, Unger VM. Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science*, 2004, 306 (5698): 1040-1042.
- [7] Miao EA, Mao DP, Yudkovsky N, Bonneau R, Lorang CG, Warren SE, Leaf IA, Aderem A. Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLR4 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107 (7): 3076-3080.
- [8] Vance RE. The NAIP/NLRC4 inflammasomes. *Current Opinion in Immunology*, 2015, 32: 84-89.
- [9] Oliveros LB, Videla AM, Ramirez DC, Gimenez MS. Dietary fat saturation produces lipid modifications in peritoneal macrophages of mouse. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2003, 14 (7): 370-377.
- [10] Kumari M, Saxena RK. Relative efficacy of uptake and presentation of *Mycobacterium bovis* BCG antigens by type I mouse lung epithelial cells and peritoneal macrophages. *Infection and Immunity*, 2011, 79 (8): 3159-3167.
- [11] Simon R, Samuel CE. Interleukin-1 beta secretion is activated comparably by FliC and FljB flagellins but differentially by wild-type and DNA adenine methylase-deficient *Salmonella*. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2008, 28 (11): 661-666.
- [12] Sutterwala FS, Ogura Y, Flavell RA. The inflammasome in pathogen recognition and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 2007, 82 (2): 259-264.
- [13] Hu ZH, Yan CY, Liu PY, Huang ZW, Ma R, Zhang CL, Wang RY, Zhang YT, Martinon F, Miao D, Deng HT, Wang JW, Chang JB, Chai JJ. Crystal structure of NLR4 reveals its autoinhibition mechanism. *Science*, 2013, 341 (6142): 172-175.
- [14] Lu A, Wu H. Structural mechanisms of inflammasome assembly. *FEBS Journal*, 2015, 282 (3): 435-444.
- [15] Miao EA, Rajan JV, Aderem A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunological Reviews*, 2011, 243 (1): 206-214.
- [16] Broz P, Newton K, Lamkanfi M, Mariathasan S, Dixit VM, Monack DM. Redundant roles for inflammasome receptors NLRP3 and NLRC4 in host defense against *Salmonella*. *Journal of Experimental Medicine*, 2010, 207 (8): 1745-1755.
- [17] Brennan MA, Cookson BT. *Salmonella* induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Molecular Microbiology*, 2000, 38 (1): 31-40.
- [18] Cookson BT, Brennan MA. Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends in Microbiology*, 2001, 9 (3): 113-114.
- [19] Fink SL, Cookson BT. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cellular Microbiology*, 2006, 8 (11): 1812-1825.

- [20] Whitfield MA, Byrne BG, Swanson MS. Mouse macrophages are permissive to motile *Legionella* species that fail to trigger pyroptosis. *Infection and Immunity*, 2010, 78 (1) : 423-432.
- [21] Silveira TN, Zamboni DS. Pore formation triggered by *Legionella* spp. is an Nlr4 inflammasome-dependent host cell response that precedes pyroptosis. *Infection and Immunity*, 2010, 78 (3) : 1403-1413.
- [22] Bergsbaken T, Cookson BT. Macrophage activation redirects *Yersinia*-infected host cell death from apoptosis to caspase-1-dependent pyroptosis. *PLoS Pathogens*, 2007, 3 (11) : e 161.
- [23] Fink SL, Bergsbaken T, Cookson BT. Anthrax lethal toxin and *Salmonella* elicit the common cell death pathway of caspase-1-dependent pyroptosis via distinct mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105 (11) : 4312-4317.
- [24] Fernandes-Alnemri T, Wu J, Yu JW, Datta P, Miller B, Jankowski W, Rosenberg S, Zhang J, Alnemri ES. The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death and Differentiation*, 2007, 14 (9) : 1590-1604.
- [25] Peng Y, Gao H, Fang XM. Molecular mechanism of pyroptosis and inflammasome activation. *International Journal of Anesthesiology and Resuscitation*, 2011, 32 (3) : 314-319. (in Chinese)
彭银, 高鸿, 方向明. Pyroptosis 及炎性体活化的分子机制. 国际麻醉学与复苏杂志, 2011, 32 (3) : 314-319.
- [26] Li W, Yang JY, Zhang EJ, Zhong MH, Xiao Y, Yu J, Zhou DH, Cao Y, Yang Y, Li YM, Yan HM. Activation of NLRC4 downregulates TLR5-mediated antibody immune responses against flagellin. *Cellular & Molecular Immunology*, 2015, doi:10.1038/cmi.2015.033.

Inflammasome responses in macrophages induced by C-terminal peptides of *Escherichia coli* EscI protein

Maozhi Hu^{1,2,3}, Wenhua Li⁴, Qiuxiang Yan¹, Shizhong Geng^{1,2}, Zhiming Pan^{1,2}, Guiyou Cui⁴, Xin'an Jiao^{1,2*}

¹Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, ²Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, ³Key Laboratory of Jiangsu Preventive Veterinary Medicine, ⁴College of Tourism and Cuisine (College of Food Science and Engineering), Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] To analyze NLRC4 inflammasome responses in macrophages induced by C-terminal of *Escherichia coli* EscI protein. [Methods] NLRC4 inflammasome responses in mouse peritoneal macrophages were analyzed after delivery of the peptides containing C-terminal amino acid sequences of *E. coli* EscI protein *in vitro*. [Results] The peptides containing C-terminal 15 amino acids of EscI protein could significantly activate NLRC4 inflammasome responses in macrophages pre-stimulated with lipopolysaccharide. Intracellular caspase-1 was activated and pyroptotic dead cells were found after peptides delivery. The contents of cytokines, IL-1 β and IL-18, in supernatants were elevated significantly compared with that of the control ($P < 0.05$). Besides, through comparison of IL-1 β contents under different stimulation conditions, 4 h incubation after peptides delivery (peptides: lipofectamine 2000 = 70 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) could obviously promote the secretion of IL-1 β . [Conclusion] Peptides containing C-terminal 15 amino acids of *E. coli* EscI protein can significantly induce NLRC4 inflammasome activation in macrophages.

Keywords: macrophage, NLRC4 inflammasome, EscI protein, caspase-1, IL-1 β

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31372414, 31320103907), by the Open Project of Key Laboratory of Jiangsu Preventive Veterinary Medicine (K13040) and by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-514-87971136; E-mail: jiao@yzu.edu.cn

Received: 5 May 2015 / Revised: 16 June 2015