



嗜肺军团菌重组免疫原蛋白(IP)对 RAW264.7 细胞自噬的影响

贺瑞霞¹, 曹秀琴², 陈民佳¹, 郑荣慧¹, 杨志伟^{1*}

1 宁夏医科大学基础医学院病原生物学与医学免疫学系, 宁夏 银川 750004

2 宁夏医科大学生育力保持省部级共建教育部重点实验室, 宁夏 银川 750004

贺瑞霞, 曹秀琴, 陈民佳, 郑荣慧, 杨志伟. 嗜肺军团菌重组免疫原蛋白(IP)对 RAW264.7 细胞自噬的影响. 微生物学报, 2022, 62(10): 3886–3898.

He Ruixia, Cao Xiuqin, Chen Minjia, Zheng Ronghui, Yang Zhiwei. Effect of *Legionella pneumophila* recombinant immunogenic protein (IP) on autophagy in RAW264.7 cells. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(10): 3886–3898.

摘要: 【目的】观察嗜肺军团菌重组免疫原蛋白(immunogenic protein, IP)对 RAW264.7 细胞自噬流及自噬相关因子表达水平的影响并探讨其作用机制。【方法】采用 His 标签蛋白纯化试剂盒纯化嗜肺军团菌重组免疫原蛋白(IP), 并用 CCK-8 法检测 IP 对 RAW264.7 细胞半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)。采用低浓度(0.05×IC₅₀)、中浓度(0.1×IC₅₀)、高浓度(0.2×IC₅₀) IP 与 RAW264.7 细胞进行体外共培养 1、3、6、12 h, 并设细胞对照组, 应用自噬双标质粒 pmCherry-C1-EGFP-LC3B 检测巨噬细胞自噬流的变化, 筛选最佳浓度进行后续实验; 最佳浓度 IP 与 RAW264.7 细胞进行体外共培养 6、12、24 h, 并设细胞对照组, RT-qPCR 检测各组自噬相关蛋白 Beclin1、微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)、SQSTM 1 (sequestosome 1, p62)及组蛋白去乙酰化酶 6 (histone deacetylase 6, HDAC6)的 mRNA 表达水平; Western blotting 法检测各组自噬相关因子的蛋白表达水平; 免疫荧光检测各组自噬相关因子的表达。【结果】根据 CCK-8 结果计算 IC₅₀ 为 0.26 μg/μL。自噬双标质粒 pmCherry-C1-EGFP-LC3B 检测自噬流结果显示, 与对照组相比, 中浓度(0.026 μg/μL)IP 与 RAW264.7 细胞进行体外共培养后自噬流抑制显著。RT-qPCR 及 Western blotting 检测结果显示, 与对照组相比, IP 与 RAW264.7 细胞共培养 6 h, P62 表达水平升高, LC3B、HDAC6、Beclin1

基金项目: 国家自然科学基金(82060362)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (82060362)

*Corresponding author. E-mail: yangzhw0817@163.com

Received: 21 February 2022; Revised: 31 March 2022; Published online: 10 May 2022

表达水平均降低, $P < 0.05$; 与 6 h 组相比, 12 h 组 LC3B 表达水平降低, P62、HDAC6 及 Beclin1 表达水平均升高, $P < 0.05$; 与 12 h 组相比, 24 h 组 Beclin1 表达水平升高, $P < 0.05$ 。IP 一定程度上以时间依赖的方式降低了 LC3-II/LC3-I 比值并升高了 P62 蛋白的表达水平, $P < 0.05$ 。免疫荧光结果基本与 RT-qPCR 及 Western blotting 检测结果一致。【结论】嗜肺军团菌 IP 抑制巨噬细胞自噬, 可能与通过影响自噬小体-溶酶体融合途径, 干扰自噬小体及自噬溶酶体的形成、成熟等过程有关。

关键词: 嗜肺军团菌; 免疫原蛋白; 巨噬细胞; 自噬

Effect of *Legionella pneumophila* recombinant immunogenic protein (IP) on autophagy in RAW264.7 cells

HE Ruixia¹, CAO Xiuqin², CHEN Minjia¹, ZHENG Ronghui¹, YANG Zhiwei^{1*}

¹ Department of Pathogenic Biology and Medical Immunology, School of Basic Medical Science, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia, China

² Ministry-of-Educating Key Laboratory of Fertility Preservation and Maintenance, School of Basic Medical Science, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia, China

Abstract: [Objective] To investigate the effect of *Legionella pneumophila* recombinant immunogenic protein (IP) on RAW264.7 cell autophagy and the mechanism. **[Methods]** We purified the *L. pneumophila* IP using the His-tag protein purification kit and determined the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of the IP on RAW264.7 cells with cell counting kit-8 (CCK-8) assay. We co-cultured RAW264.7 cells with different concentration (0.05×IC₅₀, 0.1×IC₅₀, 0.2×IC₅₀) of IP for 1, 3, 6, and 12 h, respectively, and set up a cell control group. In addition, we used the pmCherry-GFP-LC3B tandem fluorescent protein to monitor changes in autophagy flux in RAW264.7 cells, and chose the optimal concentration for subsequent experiments. We co-cultured RAW264.7 cells with the optimal concentration of IP for 6, 12, and 24 h, separately, and established a cell control group. Apart from that, the mRNA and protein expression levels of autophagy-related factors Beclin1, microtubule-associated protein 1 light chain 3B (LC3B), SQSTM1 (sequestosome 1, p62), and histone deacetylase 6 (HDAC6) were detected by RT-qPCR, Western blotting, and immunofluorescence staining. **[Results]** The IC₅₀ was calculated to be 0.26 μg/μL. When RAW264.7 cells were co-cultured with medium-concentration (0.026 μg/μL) IP, the autophagy flux was clearly inhibited, as monitored by pmCherry-C1-EGFP-LC3B. As revealed by the results of RT-qPCR and Western blotting analysis, when RAW264.7 cells were co-cultured with IP for 6 h, the expression level of P62 increased, but the expression levels of LC3B, HDAC6, and Beclin1 decreased ($P < 0.05$). The expression of LC3B reduced and the expression of P62, HDAC6, and Beclin1 rose at 12 h compared with those at 6 h ($P < 0.05$). Beclin1 expression was higher at 24 h than that at 12 h ($P < 0.05$). According to the RT-qPCR and Western blotting results, IP decreased the LC3-II/LC3-I ratio and increased the expression level of P62 in a time-dependent manner ($P < 0.05$). The immunofluorescence results were essentially consistent with the RT-qPCR and Western blotting results. **[Conclusion]** *L. pneumophila* recombinant IP can inhibit autophagy flux in

macrophages. Moreover, IP may affect the autophagosome-lysosome fusion pathway and interfere with the formation and maturation of autophagosome and autophagolysosome.

Keywords: *Legionella pneumophila*; immunogenic protein; macrophages; autophagy

嗜肺军团菌是一种广泛分布于自然界，具有机会致病性的兼性胞内菌^[1]。人因吸入含有军团菌的气溶胶而感染^[2]，其可侵入肺泡巨噬细胞并进行增殖，免疫功能低下的患者感染军团后死亡率很高^[3]。而吞噬作用和自噬是巨噬细胞抵御微生物所必需的^[4]，细菌通过巨噬细胞的吞噬作用侵入宿主细胞，自噬通过捕获病原体并将其运送到溶酶体进行降解，并对入侵的病原体做出免疫应答^[5]。但许多胞内菌已经进化出独特的方法来逃避或利用宿主自噬以促进感染^[6]，研究认为嗜肺军团菌的致病机制可能与其侵入宿主细胞后通过多种效应机制抑制异体自噬受体的识别而扰乱宿主自噬有关^[7]。军团菌的脂多糖、鞭毛、菌毛、II型分泌系统和一些外膜蛋白等都与军团菌的致病性有关^[8]，但其具体机制目前尚不清楚。由嗜肺军团菌主要免疫原基因 *ip* 编码产生的 29 kDa 外膜蛋白(29 kDa immunogenic protein, IP)是机体免疫应答反应的主要免疫原，也是重要的致病因子^[9]。本课题组前期研究发现嗜肺军团菌重组蛋白(IP)能够下调巨噬细胞的吞噬功能，增强巨噬细胞的迁移能力及趋化功能^[10]，但其对细胞自噬的影响尚不清楚，因此，我们希望通过探索嗜肺军团菌 IP 对细胞自噬的影响，更好地了解嗜肺军团菌 IP 对巨噬细胞功能的影响。微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)是目前公认的自噬标记物，与自噬小体的发育和成熟有关，可用于监测自噬活性^[11]。SQSTM1 (sequestosome 1, p62)作为自噬的重要受体可与 LC3 结合，靶向自噬体并促进泛素化蛋白的清除，从而作为自噬降解的指标^[12]。

组蛋白去乙酰化酶 6 (histone deacetylase 6, HDAC6)与自噬接头蛋白 P62 相互作用，参与聚集形成，并通过自噬使其降解^[13]。Beclin1 是磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)复合物的亚基，Beclin1 与自噬前体结合启动自噬体的形成，引导相关蛋白定位于自噬体膜^[14]。我们将嗜肺军团菌 IP 与 RAW264.7 巨噬细胞进行共培养，观察其对 RAW264.7 巨噬细胞自噬流及自噬相关因子 LC3B、P62、HDAC6 及 Beclin1 表达水平的影响，进一步探索嗜肺军团菌重组免疫原蛋白 IP 对巨噬细胞自噬的影响及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

嗜肺军团菌重组质粒 pET-pip、大肠杆菌 DH5 α 菌株、RAW264.7 细胞、真核过表达质粒 pmCherry-C1-EGFP-LC3B 均由本实验室保存。His-tag Protein Purification Kit 及 Lipo6000 转染试剂均购自碧云天生物科技公司。Endo-free Plasmid Mini Kit II 及 E.Z.N.A.[®]HP Total RNA Kit 购自 Omega 公司；全蛋白提取试剂盒购自凯基生物公司；CCK-8 试剂盒购自 AbMole；HiScript[®] III All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR 及 ChamQ[™] SYBR qPCR Master Mix 试剂盒购自 Vazyme；引物由上海生工合成；一抗 LC3B (3868S)、Beclin1 (D40C5)、SQSTM1/ P62 (D1Q5S)、HDAC6 (D21B10)均购自 Cell Signaling Technology, GAPDH (10494-1-AP)购自 Proteintech, 二抗 HRP Goat Anti-Rabbit IgG(H+L) (M21002) 购自 Abmart 公司。

1.2 重组蛋白 IP 的纯化

菌株复苏及蛋白纯化参考卢敬敬^[10]的方法。分别收集流穿液、洗涤液、洗脱液, 经 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色分析纯化结果, 并进行 Western blotting 鉴定。

1.3 CCK-8 法检测 IP 对 RAW264.7 细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)

培养 RAW264.7 细胞以 5 000 个/孔铺于 96 孔板, 置 37 °C、5% CO₂ 培养过夜, 次日换液, 用完全培养基将纯化的 IP 依次倍比稀释, 同时设置空白组和对照组, 每组设 3 个复孔, 置 37 °C、5% CO₂ 培养 24 h。按 10 μL/孔加入 CCK-8 溶液, 37 °C 孵育 4 h, 酶标仪检测 450 nm 处各孔的 OD 值, 计算细胞活力, 确定 IP 的半数抑制浓度(IC₅₀)。

1.4 pmCherry-C1-EGFP-LC3B 质粒转染 RAW264.7 细胞监测自噬流的变化

将 RAW264.7 细胞以 1×10⁵ 个/孔铺于置有无菌圆形盖玻片的 24 孔板中, 待细胞密度达到 70% 时进行 pmCherry-C1-EGFP-LC3B 质粒转染, 转染 24 h 后, 用 1 μmol/L 雷帕霉素(rapamycin, RAPA)处理巨噬细胞 1.5 h, 激活自噬, 并采用低浓度(0.05×IC₅₀)、中浓度(0.1×IC₅₀)、高浓度(0.2×IC₅₀)重组免疫原蛋白 IP 与 RAW264.7 细胞进行体外共培养 1、3、6、12 h 后, 收集细胞, 加入 4% 多聚甲醛固定, 滴加 DAPI, 在荧光显微镜下观察各组细胞自噬流的变化, 并筛选重组免疫原蛋白 IP 的最佳浓度进行后续实验。图像采集后用 Image J 软件计数胞内的红色及黄色光斑。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测 mRNA 的表达水平

分别收集对照组及与实验组的细胞, 用 E.Z.N.A.[®]HP Total RNA Kit 提取各组细胞总 RNA, 并测定总 RNA 浓度, 然后定量至 500 ng,

使用 HiScript[®] III All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR 反转录为 cDNA 后进行实时荧光定量 PCR 检测, 以 GAPDH 为内参, 进行相对含量计算。引物序列见表 1。

1.6 Western blotting 检测蛋白表达水平

分别收集对照组与各实验组的细胞, 加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液提取各组细胞的总蛋白, BCA 法测定蛋白含量, 将各组蛋白定量至 40 μg, 100 °C 变性 5 min。进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白并转至 PVDF 膜上, 5% BSA 室温封闭 2 h。加入相应要检测的蛋白一抗(1:1 000) 4 °C 孵育过夜; 次日, TBST 洗涤后加入二抗(1:5 000), 室温摇床孵育 2 h; TBST 洗涤后, ECL 显色, 曝光成像, 用 Image J 软件统计灰度值并以 GAPDH 作为内参照计算蛋白相对表达量。

1.7 免疫荧光分析 IP 对 RAW264.7 细胞的影响

将 RAW264.7 巨噬细胞以 1×10⁵ 个/孔铺于置有无菌圆形盖玻片的 24 孔板中, 加入 500 μL DMEM 完全培养基。37 °C、5% CO₂ 培养过夜, 与重组免疫原蛋白 IP 进行体外共培养 6、12、24 h 后, 吸出培养基, 经 4% 多聚甲醛固定, 0.5% Triton X-100 通透后, 使用山羊血清封闭 1 h,

表 1 引物序列

Table 1 Sequence of primers

Primer	Sequence (5'→3')
LC3B-F	TTATAGAGCGATACAAGGGGGAG
LC3B-R	CGCCGTCTGATTATCTTGATGAG
Beclin1-F	CGGTAGAACGAGCCTGGGTG
Beclin1-R	TTTCGCCTGGGCTGTGGT
P62-F	TCACAGATCACATTGGGGTG
P62-R	AGGATGGGGACTTGGTTGC
HDAC6-F	AGAAGATGATGAGTCACTGCAA
HDAC6-R	GTGACACATGATGCGTAAGATG
GAPDH-F	CCCTGTTGCTGTAGCCGTAT
GAPDH-R	TGTTCTACCCCAATGTGT

一抗 4 °C 孵育过夜, PBS 洗涤, 荧光二抗避光室温孵育 1 h, 用 PBS 洗涤, 滴加含有抗淬灭封片剂的 DAPI 于载玻片, 将盖玻片倒置于载玻片使用荧光显微镜对细胞进行观察并采集图像。

1.8 统计学处理

用 SPSS 27.0 软件分析数据, 计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 对于服从正态分布且方差齐的计量资料多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。利用 GraphPad Prism 8.0 进行图表绘制。

2 结果与分析

2.1 纯化嗜肺军团菌重组免疫原蛋白 IP

嗜肺军团菌重组免疫原蛋白 IP 用组氨酸标签蛋白纯化试剂盒(His-tag protein purification kit)进行纯化, 经 SDS-PAGE 凝胶电泳, 考马斯亮蓝染色及 Western blotting 鉴定, 结果显示在约 49 kDa 出现一条特异性条带, 细菌裂解液 (cell lysate, CL)、上样流穿液(flow through, FT)、洗涤液(wash, W)中除目的条带外均有杂带, 洗

脱液(elution, E)中目的条带单一, 为纯化的嗜肺军团菌重组主要免疫原蛋白 IP (图 1), IP 蛋白浓度为 2.91 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

2.2 CCK-8 法检测 IP 对 RAW264.7 细胞的 IC₅₀

根据 CCK-8 法检测结果, 确定 IP 的 IC₅₀ 为 0.26 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。依此确定低浓度 IP 为 0.013 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (0.05×IC₅₀)、中浓度 IP 为 0.026 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (0.1×IC₅₀)、高浓度 IP 为 0.052 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (0.2×IC₅₀), 以此剂量进行后续实验。

2.3 自噬双标质粒 pmCherry-C1-EGFP-LC3B 检测巨噬细胞自噬流的变化

应用自噬双标质粒 pmCherry-C1-EGFP-LC3B 检测巨噬细胞自噬流的变化, 黄色光斑代表自噬小体, 红色光斑代表自噬溶酶体, 通过监测黄色光斑及红色光斑数量变化观察各组自噬流变化。雷帕霉素(RAPA)激活巨噬细胞自噬, 观察到早期(1 h)呈现弥散黄, 中期(3 h)出现黄色光斑, 晚期(6、12 h)黄色光斑减少, 红色光斑增多, 自噬被激活, 自噬流顺畅(图 2A, 2E)。与雷帕霉素激活自噬组相比, 低浓度(0.013 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)、

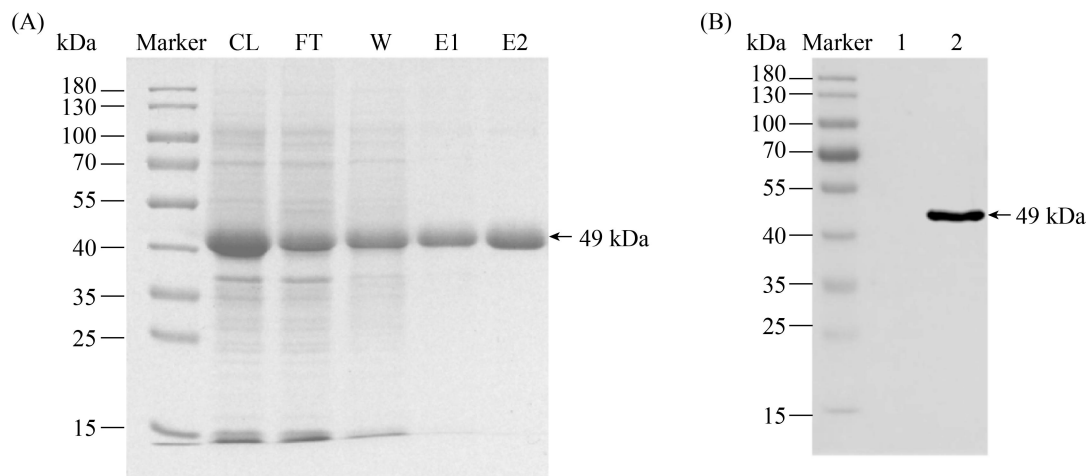


图 1 纯化重组免疫原蛋白 IP SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色及 Western blotting 鉴定结果

Figure 1 The results of purified recombinant immunogenic protein IP. A: coomassie brilliant blue staining. CL: cell lysate; FT: flow through; W: wash; E1–E2: elution 1–2. B: purified protein IP Western blotting analysis. Lane 1: negative control; lane 2: E2, the purified protein IP.

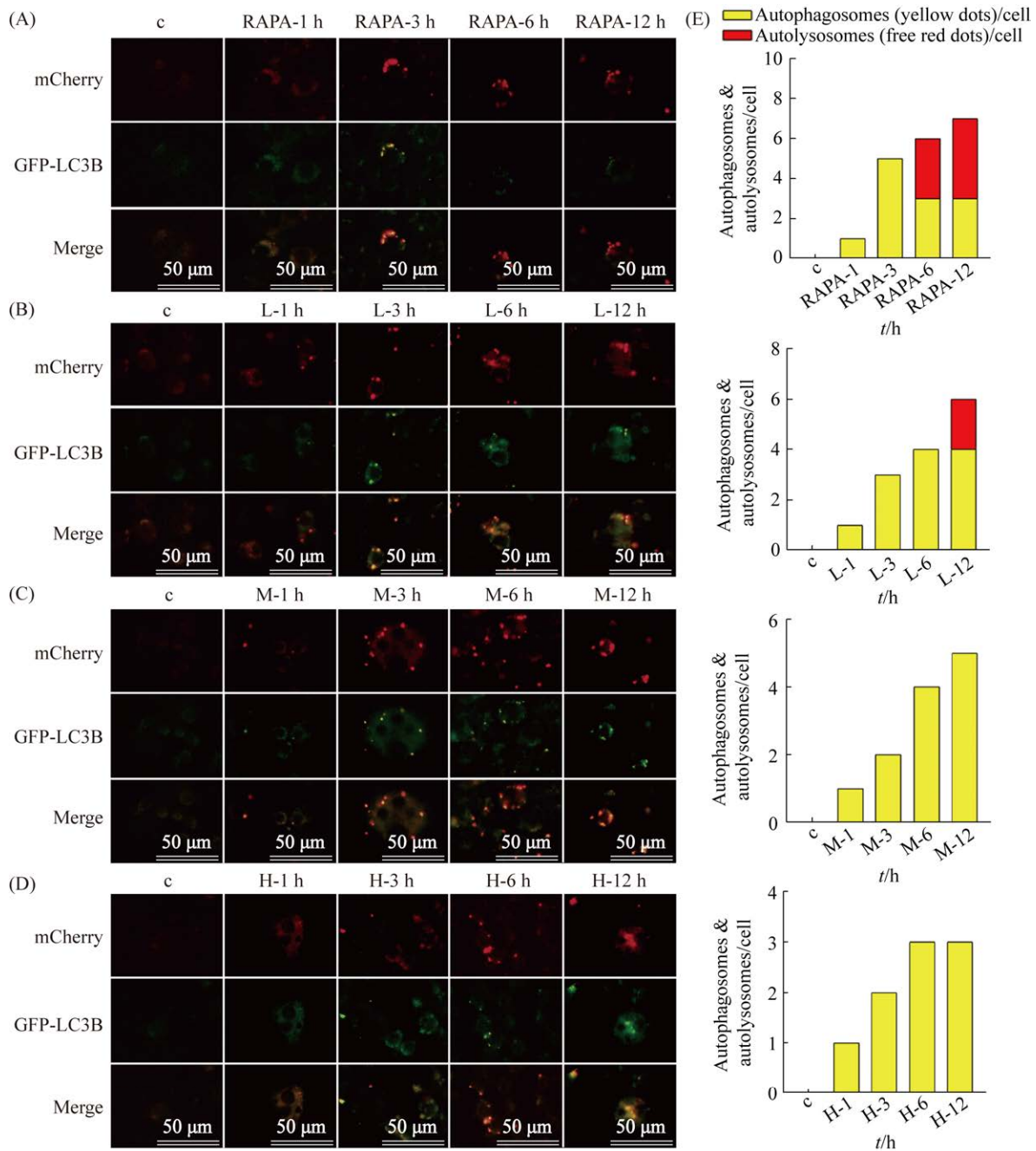


图 2 荧光显微镜检测不同浓度 IP 与 RAW264.7 细胞共培养不同时间点自噬流的变化(荧光显微镜, 400×)
 Figure 2 Immunogenic protein (IP) inhibits autophagy flux in macrophages, representative photos of fluorescence microscope. RAW264.7 cells (10^5 cells) were treated with or without 1 μmol/L RAPA approximately 1.5 h before infection. Then the cells were co-cultured with IP for 1, 3, 6, and 12 h, and culture medium was used as a control. Autolysosomes are represented by red dots, while autophagosomes are represented by yellow dots. Scale bar, 50 μm. A: RAW264.7 cells were treated with 1 μmol/L RAPA; B: RAW264.7 cells were co-cultured with low concentration IP (0.013 μg/μL), “L” stands for low concentration; C: RAW264.7 cells were co-cultured with medium concentration IP (0.026 μg/μL), “M” stands for medium concentration; D: RAW264.7 cells were co-cultured with high concentration IP (0.052 μg/μL), “H” stands for high concentration; E: the statistics of the number of autophagosomes and autolysosomes in A–D, respectively.

中浓度(0.026 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)、高浓度(0.052 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)重组免疫原蛋白 IP 与 RAW264.7 细胞进行体外共培养,中期(3 h)黄色光斑减少,自噬小体生成减少,6、12 h 红色光斑均减少,自噬溶酶体减少,自噬流受阻,IP 抑制巨噬细胞自噬,呈一定的剂量依赖模式(图 2B–D)。低浓度 IP 抑制作用较弱(图 2B),中浓度 IP 抑制作用最明显,筛选其为最佳浓度进行后续实验(图 2C)。图 2E 为对各组自噬小体及自噬溶酶体的数量统计。

2.4 IP 对 RAW264.7 细胞中 HDAC6、P62、Beclin1、LC3B mRNA 表达水平的影响

RT-qPCR 检测结果显示,IP 与 RAW264.7 细胞共培养后,与对照组相比,6、12、24 h 组

HADC6 mRNA 相对表达水平(分别为 0.56 ± 0.06 、 1.26 ± 0.07 、 1.38 ± 0.05)先降低后升高,6 h 组 mRNA 相对表达水平明显降低,12 h 和 24 h 组 mRNA 相对表达水平均显著升高,且 24 h 组明显高于 12 h 组,差异均具有统计学意义($F=122.35$, $P<0.05$, 图 3A)。与对照组相比,6、12、24 h 组 P62 mRNA 相对表达水平(分别为 1.50 ± 0.13 、 1.69 ± 0.26 、 1.57 ± 0.23)均明显升高,且 12 h 组显著升高,差异均具有统计学意义($F=5.47$, $P<0.05$, 图 3B)。与对照组相比,6、12、24 h 组 Beclin1 mRNA 相对表达水平(分别为 0.66 ± 0.03 、 1.39 ± 0.15 、 1.65 ± 0.29)先降低后升高,6 h 组 mRNA 相对表达水平明显降低,12 h 和 24 h 组 mRNA

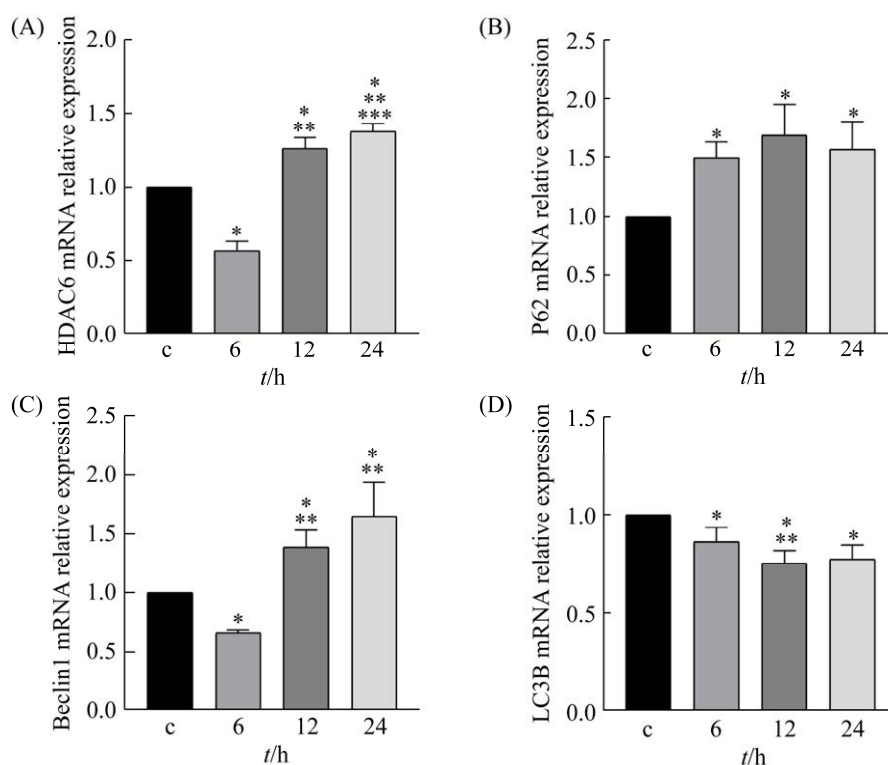


图 3 RT-qPCR 检测 IP 与 RAW264.7 细胞共培养不同时间点自噬相关因子 mRNA 表达水平的变化

Figure 3 RT-qPCR was used to detect the mRNA expression levels of autophagy related factors in RAW264.7 cells co-cultured with IP. RAW264.7 cells were co-cultured with IP (0.026 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) for 6, 12, and 24 h, and culture medium was used as a control. A–D: the mRNA relative expression of HDAC6, P62, Beclin1 and LC3B in RAW264.7 cells. The result was represented as the mean \pm SEM ($n=3$). All experiments were repeated three times. “c” stands for control, compared with the control group, *: $P<0.05$; compared with the 6 h group, **: $P<0.05$; compared with the 12 h group, ***: $P<0.05$.

相对表达水平均显著升高, 差异均具有统计学意义($F=20.86$, $P<0.05$, 图 3C)。与对照组相比, 6、12、24 h 组 LC3B mRNA 相对表达水平(分别为 0.86 ± 0.07 、 0.75 ± 0.06 、 0.77 ± 0.07)均明显降低, 12 h 组 mRNA 相对表达水平明显低于 6 h 组, 差异均具有统计学意义($F=10.04$, $P<0.05$, 图 3D)。

2.5 IP 对 RAW264.7 细胞中 HDAC6、P62、Beclin1、LC3B 蛋白表达水平的影响

Western blotting 检测结果显示(图 4A), IP 与 RAW264.7 细胞共培养后, 与对照组(1.28 ± 0.11)相比, 6、12、24 h 组 HDAC6 蛋白表

达水平(分别为 0.97 ± 0.08 、 1.26 ± 0.12 、 1.33 ± 0.13)先降低后升高, 6 h 组蛋白表达水平明显降低, 12 h 和 24 h 组蛋白表达水平均显著升高, 差异均具有统计学意义, 方差分析结果为 $F=6.36$, $P<0.05$ (图 4B)。与对照组(0.63 ± 0.07)相比, 6、12、24 h 组 P62 蛋白表达水平(分别为 1.07 ± 0.06 、 1.28 ± 0.08 、 1.22 ± 0.10)均明显升高, 且 12 h 组蛋白表达水平明显高于 6 h 组, 差异均具有统计学意义, 方差分析结果为 $F=41.37$, $P<0.05$ (图 4C)。与对照组(0.82 ± 0.05)相比, 6、12、24 h 组 Beclin1 蛋白表达水平(分别为 0.65 ± 0.03 、 0.73 ± 0.01 、 0.89 ± 0.02)先降低后升

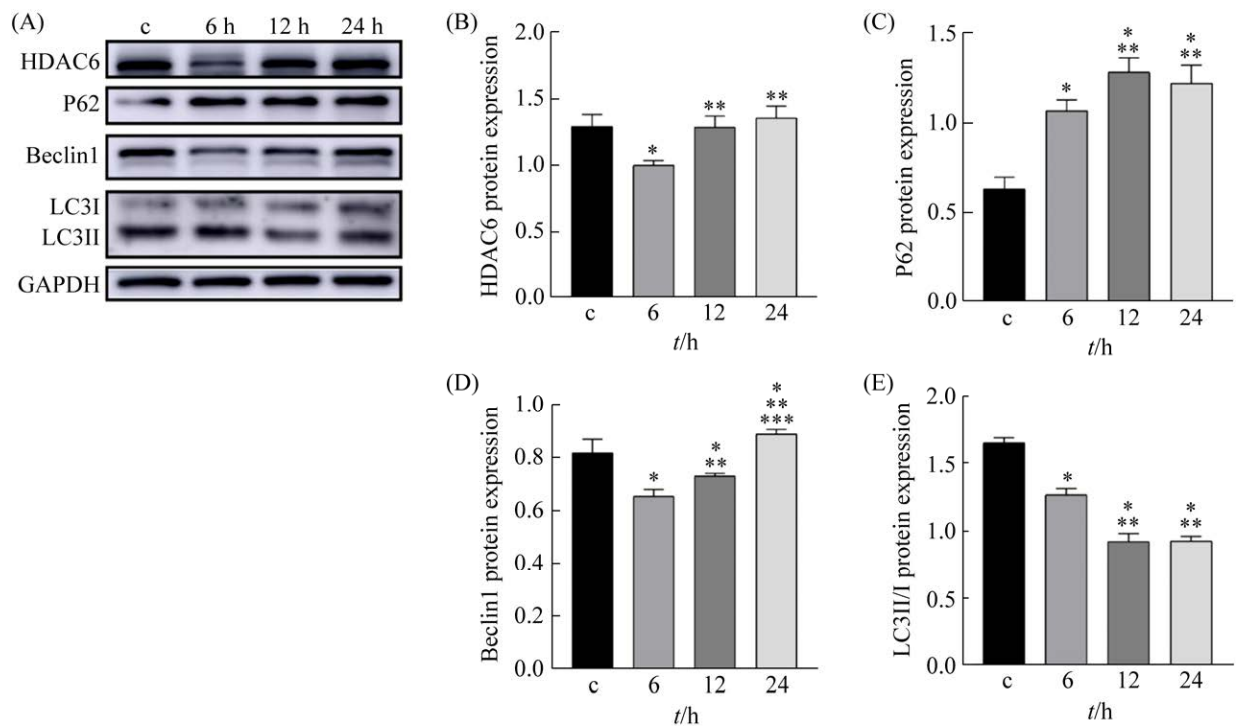


图 4 Western-blotting 检测 IP 与 RAW264.7 细胞共培养不同时间点自噬相关因子蛋白水平表达

Figure 4 Western blotting was used to detect the protein expression levels of autophagy related factors in RAW264.7 cells co-cultured with IP. A: RAW264.7 cells were co-cultured with IP ($0.026 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) for 6, 12, and 24 h, and culture medium was used as a control. The lysates of the cells were analyzed by Western blotting with the indicated antibodies. B–E: the ratios of HDAC6, P62, Beclin1 and LC3B to GAPDH are presented. The result was represented as the mean \pm SEM ($n=3$). Similar experiments were repeated three times. “c” stands for control, compared with the control group, *: $P<0.05$; compared with the 6 h group, **: $P<0.05$; compared with the 12 h group, ***: $P<0.05$.

高, 且 6 h 组降低最明显, 24 h 组蛋白表达显著升高, 差异均具有统计学意义, 方差分析结果为 $F=33.88, P<0.05$ (图 4D)。与对照组(1.65 ± 0.04)相比, 6、12、24 h 组 LC3 II/I 比值(分别为 1.27 ± 0.04 、 0.92 ± 0.06 、 0.93 ± 0.03)均明显降低, 且 12、24 h 组 LC3 II/I 比值均明显低于 6 h 组, 差异均具有统计学意义, 方差分析结果为 $F=181.16, P<0.05$ (图 4E)。

2.6 免疫荧光分析 IP 对 RAW264.7 细胞的影响

免疫荧光分析嗜肺军团菌重组免疫原蛋白 IP 与 RAW264.7 巨噬细胞进行体外共培养 6、

12、24 h 各组自噬相关因子的表达。对照组中, LC3B 点状光斑较多, 即自噬体膜的 II 型 LC3 (LC3-II) 较多, P62 荧光强度较弱, 说明自噬活性较强。与对照组相比, 6 h 时 HDAC6 荧光强度减弱; 与 6 h 组相比, 12 h 和 24 h 时 HDAC6 荧光强度逐渐增强(图 5A)。与对照组相比, 6、12、24 h 时 P62 荧光斑点增多, 即聚集型 P62 增多, 12 h 时荧光斑点增多最明显(图 5B); 与对照组相比, 6 h 时 Beclin1 荧光强度减弱; 与 6 h 组相比, 12 h 和 24 h 时 Beclin1 荧光强度逐渐增强(图 5C)。与对照组相比, 6、12、24 h 时 LC3B 点状光斑逐渐减少, 即 LC3-II 减少(图 5D)。

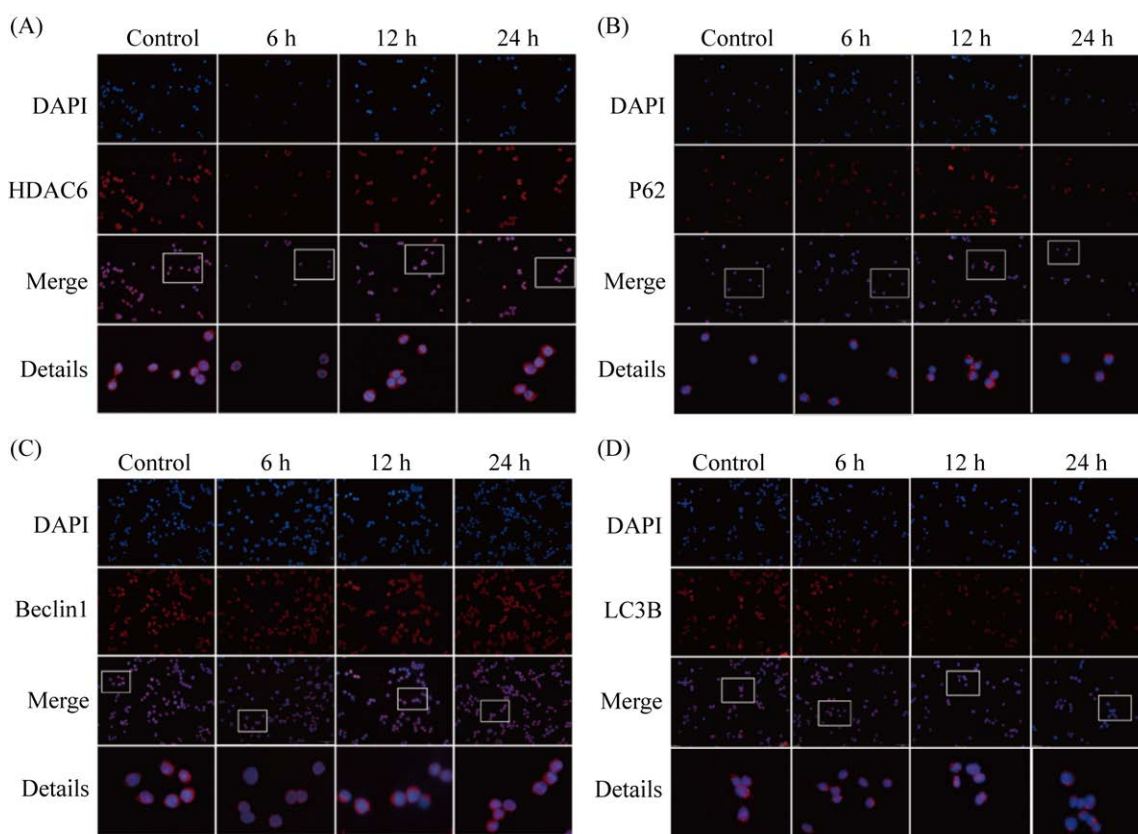


图 5 免疫荧光法检测 IP 对 RAW264.7 细胞 HDAC6、P62、Beclin1 及 LC3B 蛋白水平表达的影响(免疫荧光染色, 400 \times)

Figure 5 Immunofluorescent analysis of RAW264.7 cells. Cells were co-cultured with IP (0.026 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) for 6, 12, and 24 h, and culture medium was used as a control. A–D: imaging of RAW264.7 was collected by staining HDAC6, P62, Beclin1 and LC3B antibody (red). The second-step reagent was CoraLite594-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG antibodies. DAPI was redyed (blue). Scale bar=50 μm .

3 讨论

嗜肺军团菌可侵入肺泡巨噬细胞并在胞内长期存活,致严重肺炎(军团菌病)^[15]。其致病性主要与2个因素有关,一是细菌的表面结构,包括鞭毛、菌毛和膜蛋白,二是与分泌系统相关的致病岛(pathogenicity island, PAI)^[16]。由嗜肺军团菌主要免疫原基因 *ip* 编码产生的 29 kDa 外膜蛋白是嗜肺军团菌中最丰富的外膜蛋白,具有黏附作用、抗吞噬作用,与细菌的毒力密切相关^[9]。研究表明细菌毒力因子可以通过抑制自噬诱导信号、损害自噬识别或直接减弱自噬蛋白的功能来阻断自噬^[17]。然而,IP 对 RAW264.7 细胞自噬的影响及其作用机制目前尚未报道。LC3 是目前公认的自噬标记物,与自噬小体的发育和成熟有关,可用于监测自噬活性,其主要有2种形式,即 LC3-I 与 LC3-II。mCherry-GFP-LC3B 是一种可特异性观察自噬通量水平融合蛋白。当自噬发生时,胞质可溶的 I 型 LC3 (LC3-I) 转变为结合于自噬体膜的 II 型 LC3 (LC3-II),参与自噬小体的生物合成^[18]。由于 mCherry (红光)与 GFP (绿光)共同表达,融合蛋白未与溶酶体融合呈现黄色荧光,即自噬体和溶酶体融合被抑制,自噬流被阻断。当自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体后,酸性的溶酶体环境使酸敏感的 GFP 荧光淬灭,而 mCherry 不受影响,即红色荧光显示融合蛋白在溶酶体或自噬溶酶体中,提示自噬流顺畅^[19]。本研究中 IP 与 RAW264.7 细胞共培养,黄色光斑与红色光斑均减少,自噬流减弱,提示 IP 可能通过影响自噬小体及自噬溶酶体的形成等过程阻断自噬,并呈现一定的时效/量效关系。此外,一些研究表明,LC3 对于招募某些 ATG 到细菌是不可或缺的,而 LC3 靶向自噬体膜是由

ATG16L1 复合物决定的,ATG16L1 也被认为是连接自噬和炎症的基因^[20]。Xu 等发现沙门氏菌通过独特 III 型分泌系统 (type III secretion system, T3SS) 效应蛋白 SopF 介导 V-ATPase 亚基 VoC 发生 ADP-核糖基化修饰,特异地阻断 V-ATPase 和 ATG16L1 复合体的相互作用,阻碍自噬标记蛋白 LC3 活化,抑制内吞泡与溶酶体融合,从而抑制宿主细胞异源自噬^[21]。与此结果相似,我们发现将嗜肺军团菌免疫原蛋白 IP 与巨噬细胞共培养,LC3-II 与 LC3-I 比值明显降低,自噬流抑制。推测 IP 可能阻碍 LC3 活化,阻断自噬体-溶酶体途径,从而抑制细胞自噬。大量研究表明,自噬作为核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体的负调控因子发挥着重要作用^[22],同时,NLRP3 炎症小体的激活通过多种机制调节自噬小体的形成^[23]。Yue 等的研究结果显示 ATG16L1 诱导的自噬可以降低 NLRP3 炎症小体的激活^[24]。课题组前期研究结果发现中浓度 IP 明显上调 NOD1、NLRP3 及 caspase-1 等因子的表达水平,通过 NOD1/NOD/RIP2 及 NLRP3/caspase 信号通路下调巨噬细胞吞噬功能,增强巨噬细胞的迁移趋化功能^[10]。本研究结果中浓度(0.1×IC₅₀) IP 明显抑制 RAW264.7 细胞自噬,其可能是中浓度 IP 明显激活 NLRP3 进而使其对自噬的抑制作用更明显。另外,Wu 等的研究表明阻断自噬体-溶酶体途径会降低 APC 的吞噬能力及抗原加工和呈递的功能^[25]。因此,我们推测 IP 下调巨噬细胞吞噬功能还可能与其阻断自噬体-溶酶体途径,抑制自噬有关。

越来越多的研究表明,HDAC6 通过不同的机制在 NLRP3 炎症小体的自噬和功能调节中

发挥重要作用^[26], 而且 HDAC6 和 p62 作为两种泛素结合蛋白, 是有效自噬所必需的, 可靶向蛋白聚集和受损的线粒体^[27]。P62 作为自噬的重要受体其 LIR (LC3-interacting region, LIR) 结构域可与 LC3-II 相互作用, 并在自噬小体的形成和降解中发挥关键作用^[28]。有研究显示 HDAC6 可以促进自噬小体-溶酶体融合, P62 与 HDAC6 的比值维持了自噬过程的稳态^[29-30]。本研究结果显示, 嗜肺军团菌免疫原蛋白 IP 与 RAW264.7 巨噬细胞共培养初期, LC3、HDAC6、Beclin1 的 mRNA 及蛋白表达水平降低, 而 P62 的 mRNA 及蛋白表达水平升高, 随着时间的延长, HDAC6、Beclin1 的 mRNA 及蛋白表达水平升高, 其机制可能与 HDAC6- P62-LC3 信号通路有关。当 RAW264.7 细胞识别免疫原蛋白 IP 后, 其可通过 NOD1/NOD/RIP2 及 NLRP3/caspase 信号通路影响巨噬细胞功能, 同时影响 LC3- I 向 LC3- II 转化, 导致 LC3 活化受到抑制, 自噬体与溶酶体融合受阻, 引起 P62 堆积, 进而抑制 HDAC6。Jung 等研究发现在 HDAC6 诱导的自噬过程中, JNK 通路被激活, 并诱导了 Beclin1 的表达^[31]。Beclin1 是 PI3KIII 复合物的核心成分。该复合物在自噬的膜运输和重组中发挥重要作用^[32]。哺乳动物 Beclin1 作为 PI3KC3 复合物(PI3KC3-C1 和 PI3KC3-C2) 的变构调节物, PI3KC3-C1 在自噬小体形成的初始阶段的自噬囊泡去核中发挥作用, PI3KC3-C2 参与自噬溶酶体成熟^[33]。本研究中 Beclin1 表达水平降低, 进一步证明可能是 IP 抑制自噬, 引起 P62 堆积, 导致 HDAC6 受到抑制。随着时间的延长, 巨噬细胞功能逐渐恢复, IP 的抑制作用减弱, HDAC6 活性逐渐恢复, 表达水平逐渐升高, 诱导表达的 Beclin1

表达水平升高, PI3KC3 复合物形成增多, 自噬小体的形成及自噬溶酶体的成熟等过程逐渐恢复。

综上所述, 嗜肺军团菌重组免疫原蛋白 IP 与 RAW264.7 巨噬细胞共培养, 自噬流减弱, 抑制巨噬细胞自噬, 其机制可能与 IP 通过 HDAC6-P62-LC3 信号通路影响自噬体-溶酶体融合途径, 干扰自噬小体及自噬溶酶体的形成、成熟等过程有关。本研究为嗜肺军团菌免疫原蛋白 IP 对巨噬细胞功能的影响提供新的思路, 并希望为军团菌的致病机制提供帮助。

参考文献

- [1] Gonçalves IG, Simões LC, Simões M. *Legionella pneumophila*. *Trends in Microbiology*, 2021, 29(9): 860–861.
- [2] Abd El Maksoud AI, Elebeedy D, Abass NH, Awad AM, Nasr GM, Roshdy T, Khalil H. Methylopic changes of autophagy-related genes by *Legionella* effector Lpg2936 in infected macrophages. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2020, 7: 390.
- [3] Herwaldt LA, Marra AR. *Legionella*. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 2018, 31(4): 325–333.
- [4] Ma L, Li WY, Zhang YB, Qi LL, Zhao Q, Li N, Lu Y, Zhang LQ, Zhou F, Wu YC, He YN, Yu HX, He YL, Wei B, Wang HY. FLT4/VEGFR3 activates AMPK to coordinate glycometabolic reprogramming with autophagy and inflammasome activation for bacterial elimination. *Autophagy*, 2022, 18(6): 1385–1400.
- [5] Omotade TO, Roy CR. *Legionella pneumophila* excludes autophagy adaptors from the ubiquitin-labeled vacuole in which it resides. *Infection and Immunity*, 2020, 88(8): e00793-19.
- [6] Thomas DR, Newton P, Lau N, Newton HJ. Interfering with autophagy: the opposing strategies deployed by *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii* effector proteins. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020, 10: 599762.
- [7] Siqueira M, Ribeiro RM, Travassos LH. Autophagy and its interaction with intracellular bacterial pathogens. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 935.

- [8] Zhan XY, Hu CH. *Legionella* pathogenesis and virulence factors. *Annals of Clinical and Laboratory Research*, 2015, 3(2): DOI: 10.21767/2386-5180.100015.
- [9] Xu JN, Yang ZW, Chen JP, Chen DL, Wang T, Liu MJ, Zhang L, Yang BB. Protective immunity against Legionnaires' disease in an A/J mouse model using a DNA vaccine composed of an outer membrane protein (29 kDa) and the PileE fusion protein. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2012, 73(1): 9–15.
- [10] 卢敬敬. 嗜肺军团菌重组蛋白 IP、MOMP 及 PILE 调控 RAW264.7 巨噬细胞功能的初步研究. 宁夏医科大学硕士学位论文, 2017.
- [11] Schaaf MBE, Keulers TG, Vooijs MA, Rouschop KMA. LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions. *The FASEB Journal*, 2016, 30(12): 3961–3978.
- [12] Berkamp S, Mostafavi S, Sachse C. Structure and function of p62/SQSTM1 in the emerging framework of phase separation. *The FEBS Journal*, 2021, 288(24): 6927–6941.
- [13] Lee JY, Koga H, Kawaguchi Y, Tang WX, Wong E, Gao YS, Pandey UB, Kaushik S, Tresse E, Lu JR, Taylor JP, Cuervo AM, Yao TP. HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *The EMBO Journal*, 2010, 29(5): 969–980.
- [14] Xu HD, Qin ZH. Beclin 1, Bcl-2 and Autophagy. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2019, 1206: 109–126.
- [15] Sprenger M, Kasper L, Hensel M, Hube B. Metabolic adaptation of intracellular bacteria and fungi to macrophages. *International Journal of Medical Microbiology*, 2018, 308(1): 215–227.
- [16] Yang ZH, Chen YY, Zhang Q, Chen XD, Deng Z. Major outer membrane protein from *Legionella pneumophila* inhibits phagocytosis but enhances chemotaxis of RAW264.7 macrophages by regulating the FOXO1/coronin-1 axis. *Journal of Immunology Research*, 2021, 2021: 9409777.
- [17] Zhao Y, Codogno P, Zhang H. Machinery, regulation and pathophysiological implications of autophagosome maturation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2021, 22(11): 733–750.
- [18] Runwal G, Stamatakou E, Siddiqi FH, Puri C, Zhu Y, Rubinsztein DC. LC3-positive structures are prominent in autophagy-deficient cells. *Scientific Reports*, 2019, 9: 10147.
- [19] Nowosad A, Jeannot P, Callot C, Creff J, Perchey RT, Joffre C, Codogno P, Manenti S, Besson A. p27 controls Ragulator and mTOR activity in amino acid-deprived cells to regulate the autophagy-lysosomal pathway and coordinate cell cycle and cell growth. *Nature Cell Biology*, 2020, 22(9): 1076–1090.
- [20] Harris J, Lang TL, Thomas JPW, Sukkar MB, Nabar NR, Kehrl JH. Autophagy and inflammasomes. *Molecular Immunology*, 2017, 86: 10–15.
- [21] Xu Y, Zhou P, Cheng S, Lu QH, Nowak K, Hopp AK, Li L, Shi XY, Zhou ZW, Gao WQ, da Li, He HB, Liu XY, Ding JJ, Hottiger MO, Shao F. A bacterial effector reveals the V-ATPase-ATG16L1 axis that initiates xenophagy. *Cell*, 2019, 178(3): 552–566.e20.
- [22] Zhou H, Feng LL, Xu F, Sun Y, Ma YX, Zhang X, Liu HL, Xu G, Wu XF, Shen Y, Sun Y, Wu XD, Xu Q. Berberine inhibits palmitate-induced NLRP3 inflammasome activation by triggering autophagy in macrophages: a new mechanism linking berberine to insulin resistance improvement. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 89: 864–874.
- [23] Lai MY, Yao H, Shah SZA, Wu W, Wang D, Zhao Y, Wang L, Zhou XM, Zhao DM, Yang LF. The NLRP3-caspase 1 inflammasome negatively regulates autophagy via TLR4-TRIF in prion peptide-infected microglia. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2018, 10: 116.
- [24] Yue CC, Yang XD, Li J, Chen XC, Zhao XD, Chen Y, Wen Y. Trimethylamine N-oxide prime NLRP3 inflammasome via inhibiting ATG16L1-induced autophagy in colonic epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 490(2): 541–551.
- [25] Wu YQ, Tian MP, Zhang YD, Peng HM, Lei Q, Yuan XF, Liu SJ, Xiong YL, Lin XS, Jo-Lewis BN, Yao ZJ, Fu H, Fan XL. Deletion of BCG_2432c from the *Bacillus Calmette-Guérin* vaccine enhances autophagy-mediated immunity against tuberculosis. *Allergy*, 2022, 77(2): 619–632.
- [26] Chang PP, Li H, Hu H, Li YQ, Wang TB. The role of HDAC6 in autophagy and NLRP3 inflammasome. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 763831.
- [27] Lee JY, Nagano Y, Taylor JP, Lim KL, Yao TP. Disease-causing mutations in parkin impair mitochondrial ubiquitination, aggregation, and

- HDAC6-dependent mitophagy. *The Journal of Cell Biology*, 2010, 189(4): 671–679.
- [28] Jeong SJ, Zhang XY, Rodriguez-Velez A, Evans TD, Razani B. p62/SQSTM1 and selective autophagy in cardiometabolic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2019, 31(6): 458–471.
- [29] Liu WJ, Ye L, Huang WF, Guo LJ, Xu ZG, Wu HL, Yang C, Liu HF. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2016, 21: 29.
- [30] Wang RX, Tan JQ, Chen TT, Han HL, Tian RY, Tan Y, Wu YM, Cui JY, Chen F, Li J, Lv L, Guan XJ, Shang S, Lu JH, Zhang ZH. ATP13A2 facilitates HDAC6 recruitment to lysosome to promote autophagosome-lysosome fusion. *The Journal of Cell Biology*, 2019, 218(1): 267–284.
- [31] Jung KH, Noh JH, Kim JK, Eun JW, Bae HJ, Chang YG, Kim MG, Park WS, Lee JY, Lee SY, Chu IS, Nam SW. Histone deacetylase 6 functions as a tumor suppressor by activating c-Jun NH₂-terminal kinase-mediated beclin 1-dependent autophagic cell death in liver cancer. *Hepatology*, 2012, 56(2): 644–657.
- [32] Shi BH, Ma MQ, Zheng YT, Pan YY, Lin XH. mTOR and Beclin1: two key autophagy-related molecules and their roles in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(8): 12562–12568.
- [33] Vega-Rubín-de-Celis S. The role of beclin 1-dependent autophagy in cancer. *Biology*, 2019, 9(1): 4.