



# CATH-B1 抑制肠外致病性大肠杆菌诱导小胶质细胞炎症反应的作用研究

许雅婷, 潘言迪, 徐刘溢, 方仁东, 江莎, 彭练慈\*

西南大学动物医学院, 重庆 400715

许雅婷, 潘言迪, 徐刘溢, 方仁东, 江莎, 彭练慈. CATH-B1 抑制肠外致病性大肠杆菌诱导小胶质细胞炎症反应的作用研究[J]. 微生物学报, 2024, 64(7): 2381-2393.

XU Yating, PAN Yandi, XU Liuyi, FANG Rendong, JIANG Sha, PENG Lianci. CATH-B1 inhibits extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*-induced inflammatory response in microglia[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(7): 2381-2393.

**摘要:** 【目的】探究抗菌肽 CATH-B1 对肠外致病性大肠杆菌 RS218 感染诱导小胶质细胞(BV2 细胞)炎症反应的影响及作用机制。【方法】使用 RS218 感染小胶质细胞作为炎症模型, 试验分为 Mock 组、RS218 感染组和 CATH-B1 预处理+RS218 感染组。采用 Cell Counting Kit-8 (CCK8)试剂盒检测细胞活力, 通过菌落计数法检测 CATH-B1 对细菌生长的影响和细菌的黏附入侵, 酶联免疫吸附测定法检测炎症因子白细胞介素(interleukin, IL)-1 $\beta$ 、IL-6、IL-12 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )含量, 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, RT-PCR)检测 IL-1 $\beta$  和 IL-6 mRNA 表达水平, 蛋白质印迹分析(Western blotting)法检测细胞中转录因子蛋白家族核因子  $\kappa$ B (nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B) P65 和 P-P65、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK) ERK 和 P-ERK 的蛋白表达水平。【结果】CATH-B1 显著降低了 RS218 诱导的促炎细胞因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-12 的水平, 同时显著抑制 IL-1 $\beta$  和 IL-6 mRNA 表达, 尽管 CATH-B1 对细菌的黏附入侵无显著影响, 但 CATH-B1 能够显著抑制 P65 和 ERK 磷酸化蛋白的表达。【结论】CATH-B1 通过抑制 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 信号通路的活化来发挥抑制炎症作用, 为阐明抗菌肽抗神经炎症机制提供了重要依据。

**关键词:** CATH-B1; 肠外致病性大肠杆菌; 小胶质细胞; 炎症; NF- $\kappa$ B/MAPK 信号通路

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFD1800800); 国家生猪技术创新中心项目(NCTIP-XD/C17); 重庆市生猪产业技术体系项目(CQMAITS202312); 西南大学研究生科研创新项目(SWUS23134)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1800800), the National Center of Technology Innovation for Pigs (NCTIP-XD/C17), the Chongqing Pig Industry Technology System (CQMAITS202312), and the Southwest University Graduate Research Innovation Project (SWUS23134).

\*Corresponding author. E-mail: penglianci@swu.edu.cn

Received: 2023-12-10; Accepted: 2024-03-18; Published online: 2024-03-18

# CATH-B1 inhibits extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*-induced inflammatory response in microglia

XU Yating, PAN Yandi, XU Liuyi, FANG Rendong, JIANG Sha, PENG Lianci\*

College of Veterinary Medicine, Southwest University, Chongqing 400715, China

**Abstract:** [Objective] To explore the effect and mechanism of the antimicrobial peptide CATH-B1 on extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (RS218)-induced inflammatory response in microglia. [Methods] We used RS218-infected mouse microglial BV2 cells as the inflammation model *in vitro* and set three groups: Mock, RS218 infection, and CATH-B1 pretreatment+RS218 infection. The Cell Counting Kit-8 (CCK-8) was used to determine cell viability. The colony counting assay was used to examine the growth, adhesion, and invasion of bacterial cells. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was employed to determine the concentrations of interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in the supernatant of cell culture. Quantitative real-time PCR (RT-PCR) was performed to determine the mRNA levels of IL-1 $\beta$  and IL-6. Western blotting was employed to determine the protein levels of nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) P65, the mitogen-activated protein kinase (MAPK) extracellular signal-regulated kinase (ERK), and their phosphorylated forms. [Results] CATH-B1 inhibited the RS218-induced secretion of IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-12 and mRNA expression of IL-1 $\beta$  and IL-6. However, CATH-B1 did not affect bacterial adhesion or invasion. In addition, CATH-B1 inhibited the expression of phosphorylated P65 and ERK. [Conclusion] CATH-B1 plays a vital role in reducing inflammation by inhibiting the activation of NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways. The finding provides a basis for elucidating the mechanism of antimicrobial peptides against neuroinflammation.

**Keywords:** CATH-B1; extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*; microglia; inflammation; NF- $\kappa$ B/MAPK signaling pathway

肠外致病性大肠杆菌(extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, ExPEC)能在宿主肠外正常组织器官中定殖并诱发感染,导致脑膜炎、肺炎、腹膜炎、败血症等疾病<sup>[1]</sup>,严重威胁着畜禽养殖、人类健康和公共卫生安全。入侵中枢神经系统是ExPEC感染最为严重的致病表型,可引起脑部的剧烈炎症反应,造成不可逆的中枢神经系统损伤,导致死亡和致残<sup>[2]</sup>。该病早期诊断困难,防治效果不佳,随着养殖业逐渐向无抗生素生产转变,寻找防治ExPEC的新方案势在必行。

小胶质细胞是中枢神经系统中驻留的先天免疫调节细胞,是免疫防御的巨噬细胞,能够清除大脑中损伤死亡的神经和感染性异物性物质,从而监控脑环境稳态<sup>[3]</sup>。小胶质细胞的激活,已被广泛评估为神经炎症的一个指标<sup>[4]</sup>。随着小胶质细胞 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLR)激活,转录因子蛋白家族核因子  $\kappa$ B (nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B)信号通路被激活,驱动下游炎症基因的表达,包括白细胞介素(interleukin, IL)-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis

factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )<sup>[5]</sup>。此外, 活化的小胶质细胞会激活丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路, 产生活性氧、活性氮和神经毒性物质, 从而诱导突触功能障碍、细胞外基质损伤和神经元死亡<sup>[6]</sup>。因此, 抑制小胶质细胞的激活可以成为神经炎症的治疗靶点。

抗菌肽是由生物有机体产生的前体, 然后经蛋白酶降解生成的具有生物学活性的小分子多肽, 是先天性免疫系统抗感染的重要组成部分<sup>[7]</sup>。抗菌肽具有抗炎、抗菌、抗病毒和抗癌等作用。鸡源抗菌肽 CATH-B1 是 cathelicidin 家族抗菌肽。研究表明, CATH-B1 可以结合细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS), 减少禽致病性大肠杆菌诱导的 TLR4 激活, 从而下调鸡巨噬细胞中促炎细胞因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达<sup>[8]</sup>。CATH-B1 通过直接与病毒颗粒结合从而阻止病毒进入细胞, 具有良好的抗病毒活性<sup>[9]</sup>。此外, CATH-B1 可以抑制 TLR4 和 c-Jun N 端激酶(c-Jun N-terminal protein kinase, JNK)信号传导的激活, 减少干扰素调节因子 1 (interferon regulatory factor 1, IRF1) 和干扰素  $\beta$  (interferon- $\beta$ , IFN- $\beta$ ) 激活, 从而对抗伪狂犬病毒的感染<sup>[10]</sup>。目前 CATH-B1 对于细菌性神经炎症的作用及作用机制尚未明确。

因此, 本研究首先使用 CATH-B1 进行预处理, 再以肠外致病性大肠杆菌 RS218 感染小胶质细胞(BV2 细胞)作为体外细胞炎症模型, 观察 CATH-B1 对细胞炎症因子表达分泌量和 IL-1 $\beta$ 、IL-6 mRNA 水平的影响, 探究 CATH-B1 对 BV2 细胞炎症的保护作用; 测定 CATH-B1 对细菌黏附侵袭细胞的影响, 探讨 CATH-B1 对细菌黏附入侵的直接作用; 最后研究 CATH-B1 对炎症通路 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 信号通路相关蛋白的调控, 来揭示 CATH-B1 对 RS218 诱导 BV2 细胞炎症的机制, 为抗菌肽抗细菌性神经炎症提供理论支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要试剂

BV2 小胶质细胞(CL-0493)购自武汉普诺赛生命科技有限公司; DMEM 培养基、青霉素、链霉素、胰酶、TRIzol、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  和 IL-12 酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自苏州双湖生物科技有限公司; LB 培养基购自青岛海博生物技术有限公司; Cell Counting Kit-8 (CCK-8)购自北京博迈德基因技术有限公司; Evo M-MLV 反转录预混型试剂盒购自湖南艾科瑞生物工程有限公司; Universal SYBR Green Fast qPCR Mix 购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; 琼脂粉和甲醇购自成都市科隆化学品有限公司; Acryl/Bis 30% Solution 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; BSA 购自北京酷来搏科技有限公司; 脱脂封闭奶粉购自武汉博士德生物工程有限公司; PBS 粉末和 1 $\times$ SDS-PAGE 电泳缓冲液购自上海泰坦科技股份有限公司; P65 抗体和 ERK 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司; P-P65、P-ERK 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司; LPS、RIP1 裂解液、曲拉通(TritonX-100)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、HRP 标记山羊抗鼠 IgG、WB 显影液、HRP 标记山羊抗兔 IgG 均购自上海碧云天生物技术股份有限公司。

### 1.2 抗菌肽

鸡源抗菌肽 CATH-B1 购自上海强耀生物科技有限公司, 采用 Fmoc-固相肽合成法, 通过反向高效液相色谱分离得到纯度>95%的 CATH-B1。用无菌水稀释 CATH-B1 至 1 600  $\mu$ mol/L 的储存浓度, 于-80  $^{\circ}$ C 冰箱冷冻保存。

### 1.3 肠外致病性大肠杆菌

致新生儿脑膜炎大肠杆菌菌株 RS218 由华

中农业大学王湘如教授惠赠。取实验室-80 °C 保存的菌液,在 LB 平板上用接种环平板分区划线,置于 37 °C 培养箱(ThermoFisher Scientific 公司)培养过夜复苏。挑取单菌落于 LB 液体培养基中,在 37 °C 恒温摇床(常州易晨仪器制造有限公司) 180 r/min 培养 6 h,取处于对数生长期的菌液,调整感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 5 进行细胞感染。

#### 1.4 细胞培养

BV2 细胞接种于含 10% FBS、1%青霉素以及 1%链霉素的 DMEM 培养基,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(ThermoFisher Scientific 公司)中培养。待细胞密度长至 80%时,用胰酶消化传代细胞。试验时,更换培养基为含 2% FBS、不含双抗的 DMEM 培养基,试验过程中细胞培养、抗菌肽稀释和细菌重悬等均使用该培养基。

#### 1.5 细胞毒性试验

根据细胞增殖及毒性检测试剂盒即 CCK-8 试剂盒的说明书,在 CATH-B1 预处理 2 h 后,向每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,在培养箱中孵育 3 h,用酶标仪(ThermoFisher Scientific 公司)测定在 450 nm 处的吸光度。

#### 1.6 细菌生长试验

将 CATH-B1 与 RS218 于 37 °C 培养箱共培养 1、2、4、8 h,1 000 倍稀释菌液,涂板过夜培养后计数。

#### 1.7 酶联免疫吸附试验(ELISA)

处理组使用 CATH-B1 预处理细胞 2 h, PBS 洗 3 遍,RS218 感染 2 h 后,加入 250 μg/mL 的庆大霉素,在培养箱中继续培养 22 h。Mock 组对应地加入新鲜培养基孵育 2 h, PBS 洗 3 遍,再加入新鲜培养基孵育 2 h 后,加入 250 μg/mL 的庆大霉素,在培养箱中继续培养 22 h。Mock 组与处理组对细胞的孵育和洗涤步骤同步进行,收集各组细胞裂解液和上清,严格按照 ELISA

试剂盒说明书的步骤,检测 IL-1β、IL-6、IL-12 和 TNF-α 的蛋白水平。在探究 CATH-B1 处理直接对 BV2 细胞的炎症因子分泌影响时,CATH-B1 预处理细胞 2 h, PBS 洗 3 遍,加入新鲜培养基继续孵育 24 h。Mock 组对应地加入新鲜培养基孵育 2 h, PBS 洗 3 遍,再次加入新鲜培养基继续孵育 24 h。收集各组细胞裂解液和上清,检测 IL-1β 和 IL-6 的分泌水平。

#### 1.8 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, RT-PCR)

CATH-B1 预处理细胞 2 h, PBS 洗 3 遍,RS218 感染 2 h 后,加入 250 μg/mL 的庆大霉素,在培养箱中继续培养 1 h 和 4 h 后,弃去培养上清, PBS 洗 3 遍。Mock 组使用对应的的新鲜培养基孵育,Mock 组与处理组对细胞的孵育和洗涤步骤同步进行。利用 TRIzol 法提取细胞总 RNA, Evo M-MLV 反转录预混型试剂盒反转为 cDNA,应用 RT-PCR 法扩增检测 IL-1β 和 IL-6 的 mRNA 水平。引物为 β-actin (F: 5'-TGG AATCCTGTG GCATCCATGAAAC-3'; R: 5'-TAAAACGCAGC TCAGTAACAGTCCG-3'), IL-1β (F: 5'-GAAATG CCACCTTTTGACAGTG-3'; R: 5'-TGGATGCTC TCATCAGGACAG), IL-6 (F: 5'-TCAATGAGGA GACTTGCCTG-3'; R: 5'-GATGAGTTGTCATGT CCTGC-3')。

#### 1.9 细菌黏附侵袭试验

CATH-B1 预处理细胞 2 h, PBS 洗 3 遍,RS218 感染 2 h 后, PBS 洗 3 遍,0.1% TritonX-100 室温裂解细胞 10 min,收集裂解液涂板计数即为黏附与侵袭细菌总数;CATH-B1 预处理 2 h, PBS 洗 3 遍,RS218 感染 2 h 后, PBS 洗 3 遍,250 μg/mL 的庆大霉素孵育 30 min 杀死胞外菌, PBS 洗 3 遍,0.1% TritonX-100 室温裂解细胞 10 min,收集裂解液涂板计数即为侵袭菌数,黏附菌数=黏附与侵袭细菌总数-侵袭菌数。

#### 1.10 细菌脂多糖刺激试验

处理组有 2 种方式,第一种是用 2.5 μmol/L

和 5.0  $\mu\text{mol/L}$  的 CATH-B1 分别与 LPS 共同处理 24 h 后, 收集各组细胞裂解液和上清。Mock 组只使用新鲜培养基孵育, 其余步骤与处理组一致。第二种是用浓度为 2.5  $\mu\text{mol/L}$  和 5.0  $\mu\text{mol/L}$  CATH-B1 分别预处理细胞 2 h, PBS 洗 3 遍, LPS 孵育 24 h 后, 收集各组细胞裂解液和上清。Mock 组只使用新鲜培养基孵育, 其余步骤与处理组一致。检测以上 2 种处理方式的细胞裂解液中的 IL-1 $\beta$  和细胞上清中的 IL-6。

### 1.11 蛋白质印迹分析(Western blotting)

CATH-B1 预处理 2 h 后, PBS 洗 3 遍, RS218 感染到指定时间, 即 15、30、60 min, 弃去上清, PBS 洗 2 遍, 1 $\times$ SDS 裂解细胞, 水浴煮沸 5 min 使蛋白质变性。Mock 组只使用新鲜培养基孵育, 其余步骤与处理组一致。使用 12% 的 SDS-PAGE, 湿转蛋白于 PVDF 膜上, 5% 的 BSA 封闭磷酸化蛋白, 5% 的脱脂奶粉封闭非磷酸化蛋白, 一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 二抗室温孵育 1 h, ECL 显色液显影, 软件 ImageJ 进行定量分析。在探究 CATH-B1 处理直接对 BV2 细胞炎症信号

通路的影响时, 处理组 CATH-B1 孵育细胞 2 h, Mock 组使用新鲜培养基孵育 2 h 后收集样品, 试验步骤和上述一致。

### 1.12 统计学分析

使用 SPSS 软件进行数据分析, GraphPad prism 软件进行绘图, \* ( $P<0.05$ ) 为有统计学差异, \*\* ( $P<0.01$ ) 为有显著的统计学差异, \*\*\* ( $P<0.001$ ) 为有极显著的统计学差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 CATH-B1 对 BV2 细胞活力和细菌生长的影响

采用 CCK8 试剂盒评估 CATH-B1 对 BV2 细胞活力的影响和菌落计数法评估 CATH-B1 对细菌 RS218 生长的影响, 设置 3 个试验组, 分别是对照组、2.5  $\mu\text{mol/L}$  CATH-B1 组和 5.0  $\mu\text{mol/L}$  CATH-B1 组。结果显示, 与对照组相比, 浓度为 2.5  $\mu\text{mol/L}$  CATH-B1 和 5.0  $\mu\text{mol/L}$  CATH-B1 对 BV2 细胞不具有毒性作用(图 1A), 浓度为 2.5  $\mu\text{mol/L}$  和 5.0  $\mu\text{mol/L}$  CATH-B1 对 RS218 的

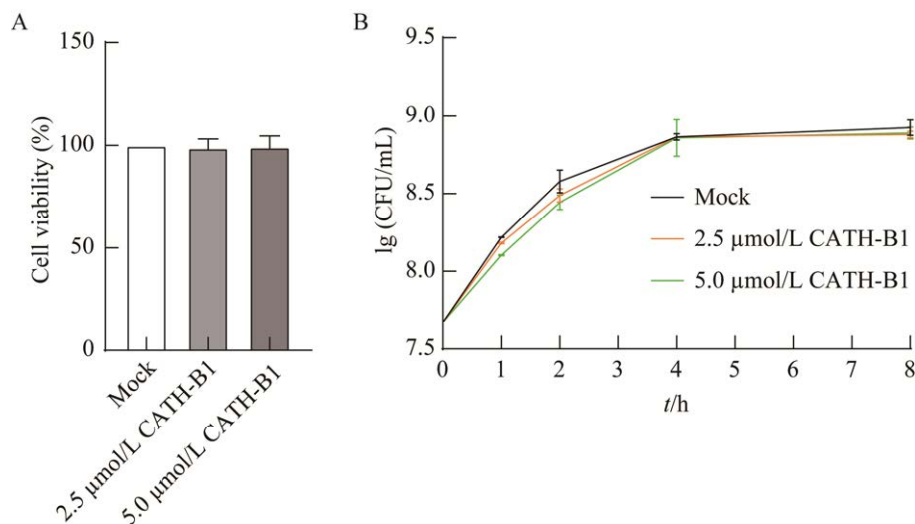


图 1 CATH-B1 对 BV2 细胞活性及对 RS218 生长的影响

Figure 1 Effects of CATH-B1 on the activity of BV2 cells and the growth of RS218. A: Effects of CATH-B1 on the activity of BV2 cells. B: Effects of CATH-B1 on the growth of RS218.

生长无明显影响(图 1B), 因此选取 2.5  $\mu\text{mol/L}$  和 5.0  $\mu\text{mol/L}$  这 2 个浓度进行后续试验。

## 2.2 CATH-B1 对 RS218 诱导 BV2 细胞炎性细胞因子分泌的影响

利用浓度为 2.5  $\mu\text{mol/L}$  和 5.0  $\mu\text{mol/L}$  的 CATH-B1 预处理 BV2 细胞 2 h, 然后用 RS218 感染 2 h, 通过 ELISA 法检测细胞裂解物中炎

性因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6, 以及培养基上清液中炎性因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-12 和 TNF- $\alpha$  的分泌水平。结果表明, CATH-B1 能显著剂量依赖性地抑制 BV2 细胞中 IL-1 $\beta$  ( $P<0.01$ )、IL-6 ( $P<0.05$ ) 和 IL-12 ( $P<0.01$ ) 的炎性细胞因子的产生, 但对 TNF- $\alpha$  的分泌无明显影响(图 2), 说明 CATH-B1 抑制了 RS218 诱导 BV2 细胞的炎性细胞因子分泌。

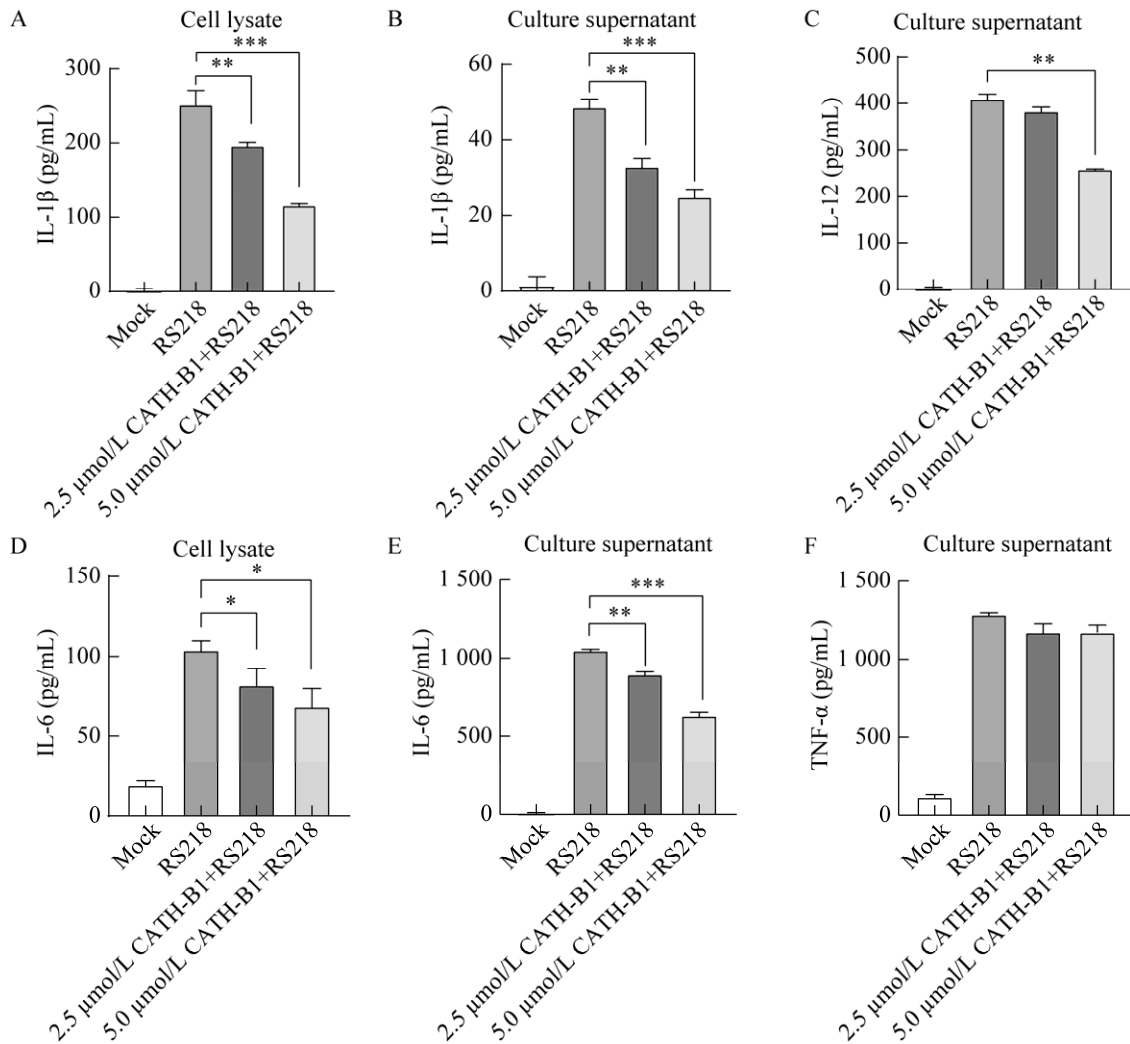


图 2 CATH-B1 对 RS218 诱导 BV2 细胞炎性细胞因子分泌的影响

Figure 2 Effects of CATH-B1 on the secretion of inflammatory cytokines in BV2 cells induced by RS218. A: Effects of CATH-B1 on IL-1 $\beta$  secretion in BV2 cells lysate induced by RS218. B: Effects of CATH-B1 on IL-1 $\beta$  secretion in BV2 cells supernatant induced by RS218. C: Effects of CATH-B1 on IL-12 secretion in BV2 cells supernatant induced by RS218. D: Effects of CATH-B1 on IL-6 secretion in BV2 cells lysate induced by RS218. E: Effects of CATH-B1 on IL-6 secretion in BV2 cells supernatant induced by RS218. F: Effects of CATH-B1 on TNF- $\alpha$  secretion in BV2 cells supernatant induced by RS218. \*: Significant difference ( $P<0.05$ ); \*\*: Significant difference ( $P<0.01$ ); \*\*\*: Significant difference ( $P<0.001$ ).

### 2.3 CATH-B1 对 RS218 诱导 BV2 细胞 IL-1 $\beta$ 和 IL-6 mRNA 表达的影响

为了进一步明确 CATH-B1 对 RS218 诱导的炎症的抑制作用, 利用浓度为 5.0  $\mu\text{mol/L}$  的 CATH-B1 预处理 2 h, 然后 RS218 感染 3 h 和 6 h, 通过 RT-PCR 检测 IL-1 $\beta$  和 IL-6 的 mRNA 水平。结果显示, 5.0  $\mu\text{mol/L}$  的 CATH-B1 显著降低 RS218 感染 3 h ( $P<0.01$ ) 和 6 h ( $P<0.05$ ) 的 IL-1 $\beta$  的转录水平, CATH-B1 处理组在感染 6 h 后, IL-6 的 mRNA 水平相较于 RS218 感染组显著下调( $P<0.01$ ) (图 3)。结果表明, CATH-B1 能显著抑制 RS218 诱导的 BV2 细胞中炎症因子 IL-1 $\beta$  和 IL-6 mRNA 的表达。

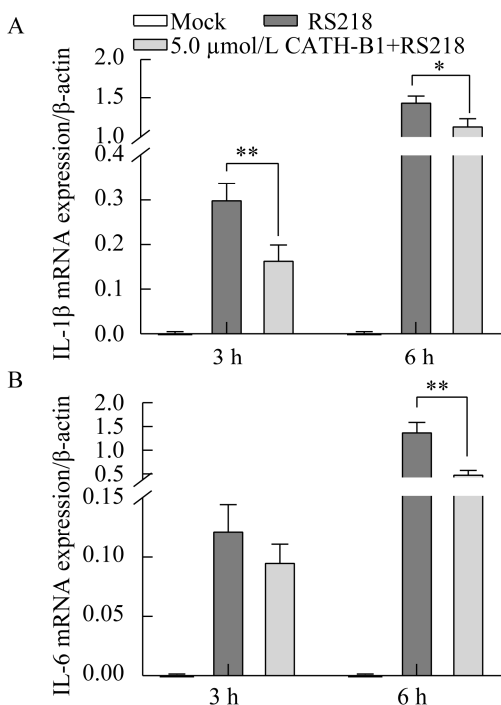


图 3 CATH-B1 对 RS218 诱导 BV2 细胞 IL-1 $\beta$  和 IL-6 mRNA 表达的影响

Figure 3 Effects of CATH-B1 on the expression of IL-1 $\beta$  and IL-6 mRNA in BV2 cells induced by RS218. A: Effects of CATH-B1 on the expression of IL-1 $\beta$  mRNA in BV2 cells induced by RS218. B: Effects of CATH-B1 on the expression of IL-6 mRNA in BV2 cells induced by RS218. \*: Significant difference ( $P<0.05$ ); \*\*: Significant difference ( $P<0.01$ ).

### 2.4 CATH-B1 对 RS218 感染 BV2 细胞的黏附侵袭的影响

通过菌落计数法探究 CATH-B1 对 RS218 感染 BV2 细胞的黏附侵袭的影响。结果显示, 5.0  $\mu\text{mol/L}$  CATH-B1 并未明显影响 RS218 对 BV2 细胞的黏附菌数和侵袭菌数。结果表明, CATH-B1 没有明显影响细菌黏附入侵细胞的能力(图 4), 说明 CATH-B1 降低炎症的作用是通过其他的免疫调节途径完成。

### 2.5 CATH-B1 对 LPS 诱导 BV2 细胞炎性细胞因子 IL-1 $\beta$ 和 IL-6 分泌的影响

为了进一步明确 CATH-B1 是否通过直接作用于细菌的 LPS 来发挥降低炎症细胞因子的作用, 对 BV2 细胞进行了 LPS 刺激。结果显示, 当 CATH-B1 与 LPS 共同处理时, CATH-B1 能显著降低 LPS 诱导的 IL-1 $\beta$  和 IL-6 炎性因子水平( $P<0.01$ ) (图 5A、5B)。当 CATH-B1 预孵

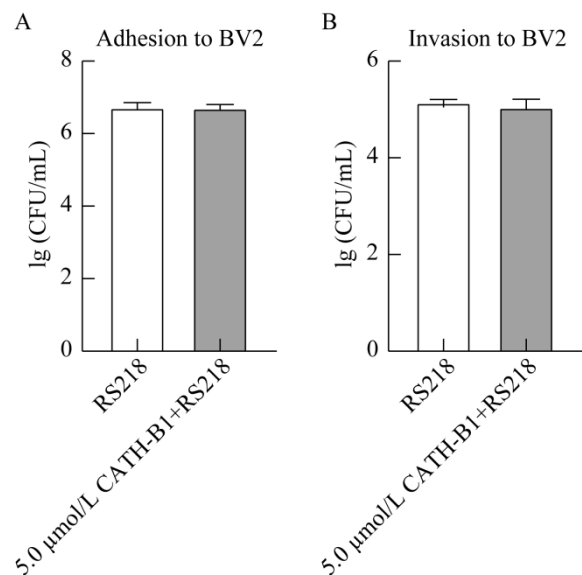


图 4 CATH-B1 对 RS218 感染 BV2 细胞的黏附侵袭的影响

Figure 4 Effects of CATH-B1 on adhesion and invasion of RS218-infected BV2 cells. A: Effect of CATH-B1 on adhesion of RS218-infected BV2 cells. B: Effect of CATH-B1 on invasion of RS218-infected BV2 cells.

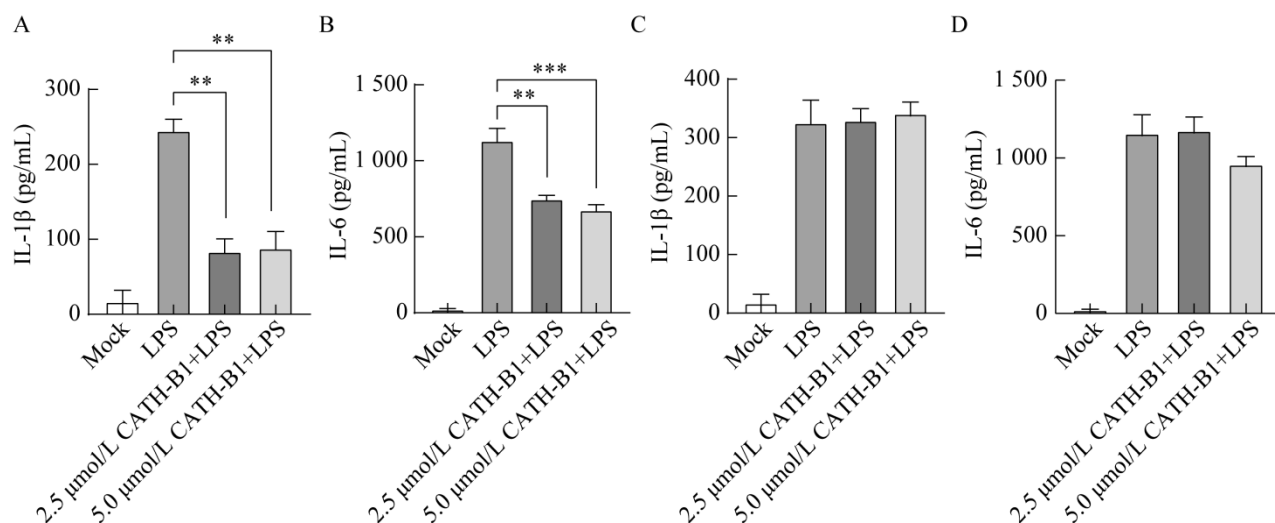


图 5 CATH-B1 对 LPS 诱导 BV2 细胞炎症细胞因子 IL-1 $\beta$  和 IL-6 分泌的影响

Figure 5 Effects of CATH-B1 on LPS-induced secretion of inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-6 in BV2 cells. A: Effects of co-incubation of CATH-B1 with LPS on the secretion of inflammatory cytokine IL-1 $\beta$ . B: Effects of co-incubation of CATH-B1 with LPS on the secretion of inflammatory cytokine IL-6. C: Effects of CATH-B1 preincubation on LPS-induced secretion of inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  in BV2 cells. D: Effects of CATH-B1 preincubation on LPS-induced secretion of inflammatory cytokines IL-6 in BV2 cells. \*\*: Significant difference ( $P < 0.01$ ); \*\*\*: Significant difference ( $P < 0.001$ ).

育后, LPS 再处理时, CATH-B1 对 LPS 诱导的炎症细胞因子 IL-1 $\beta$  和 IL-6 无明显的影响(图 5C、5D)。结果再次说明, CATH-B1 可能是通过启动细胞的相关免疫调节作用来发挥抗炎作用。

## 2.6 CATH-B1 对 RS218 诱导 BV2 细胞的 NF- $\kappa$ B/MAPK 信号通路关键蛋白的影响

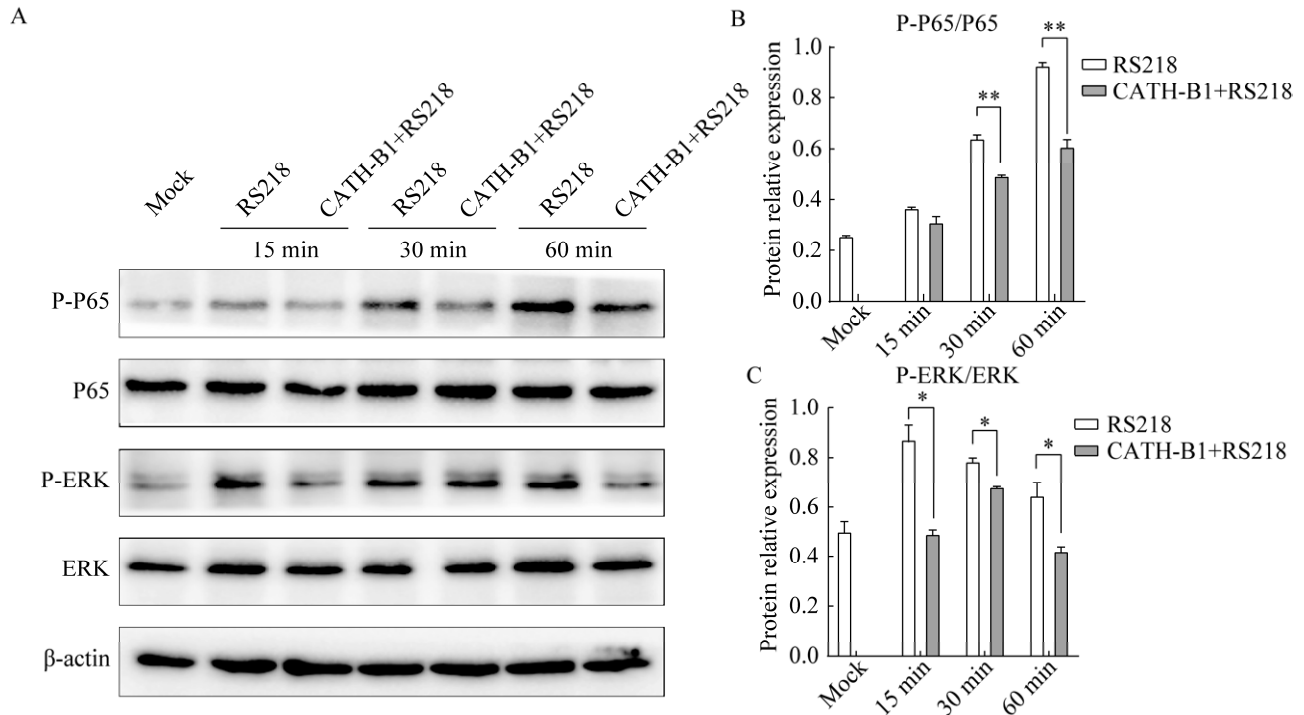
通过 Western blotting 检测 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 信号通路关键蛋白 P65 和 ERK 及其磷酸化水平的表达,结果显示,与 Mock 组相比,随着 RS218 的感染, NF- $\kappa$ B P65 磷酸化蛋白 P-P65 与 NF- $\kappa$ B P65 蛋白的蛋白表达量比值和 MAPK ERK 磷酸化蛋白 P-ERK 与 MAPK ERK 蛋白的蛋白表达量比值显著增加, CATH-B1 的预处理显著减少 P-P65/P65 蛋白表达量的比值 ( $P < 0.01$ ) 和 P-ERK/ERK 蛋白表达量的比值 ( $P < 0.05$ ) (图 6)。

结果表明, CATH-B1 通过降低 RS218 诱导 BV2 细胞中 NF- $\kappa$ B/MAPK 信号通路磷酸化蛋白的表达,从而发挥抑制炎症作用。

## 2.7 CATH-B1 对 BV2 细胞炎症细胞因子分泌和 NF- $\kappa$ B 信号通路关键蛋白的影响

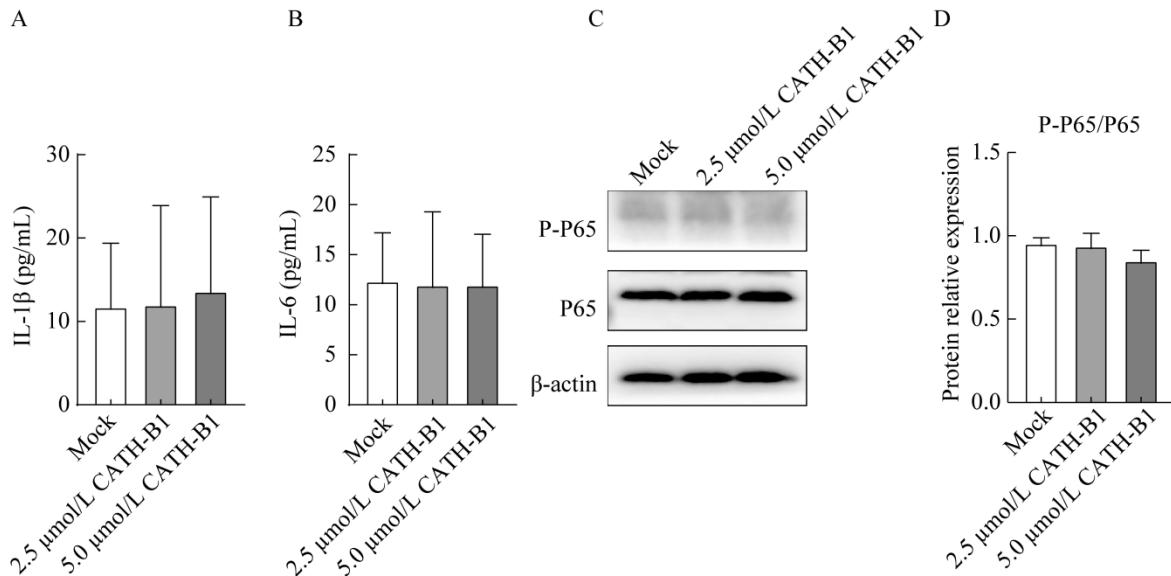
为了进一步明确单独的 CATH-B1 处理对 BV2 细胞炎症的影响,不同浓度的 CATH-B1 处理细胞后,通过 ELISA 和 Western blotting 检测 BV2 细胞的炎症状态。结果显示,与 Mock 组相比, CATH-B1 对 BV2 细胞炎症细胞因子 IL-1 $\beta$  和 IL-6 分泌没有明显影响(图 7A、7B),并且 NF- $\kappa$ B P65 磷酸化蛋白 P-P65 与 NF- $\kappa$ B P65 蛋白的蛋白表达量比值也没有明显变化(图 7C、7D)。结果表明, CATH-B1 预处理 BV2 细胞后,不会对细胞产生炎症反应方面的影响。





**图 6 CATH-B1 对 RS218 诱导 BV2 细胞的 NF-κB/MAPK 信号通路关键蛋白的影响**

Figure 6 Effects of CATH-B1 on key proteins of NF-κB/MAPK signaling pathway in RS218-induced BV2 cells. A: Effects of CATH-B1 on key proteins of NF-κB/MAPK signaling pathway in RS218-induced BV2 cells. B: Ratio of P65 phosphorylated protein to total protein. C: Ratio of ERK phosphorylated protein to total protein. \*: Significant difference ( $P < 0.05$ ); \*\*: Significant difference ( $P < 0.01$ ).



**图 7 CATH-B1 对 BV2 细胞炎症细胞因子分泌和 NF-κB 信号通路关键蛋白的影响**

Figure 7 Effects of CATH-B1 on inflammatory cytokine secretion and key proteins of NF-κB signaling pathway in BV2 cells. A: Effects of CATH-B1 on the secretion of inflammatory cytokine IL-1β in BV2 cells. B: Effects of CATH-B1 on the secretion of inflammatory cytokine IL-6 in BV2 cells. C: Effects of CATH-B1 on key proteins of NF-κB signaling pathway in BV2 cells. D: Ratio of P65 phosphorylated protein to total protein.

### 3 讨论与结论

抗菌肽是机体自身产生来对抗病原的防御性小分子肽，其来源广泛，动物、植物、微生物均可产生，在宿主固有免疫中发挥极其重要功能，是宿主维持自身健康的重要依靠。除了对入侵的病原微生物具有直接杀灭作用外，抗菌肽还参与调节宿主的免疫应答，例如增强巨噬细胞的吞噬功能，促进补体系统<sup>[11]</sup>，招募或趋化中性粒细胞<sup>[12]</sup>，通过 Toll 样受体、NF- $\kappa$ B、MAPK 等信号通路调节免疫反应<sup>[13]</sup>。中枢神经系统很少被细菌感染，主要得益于大脑具有血脑屏障的天然保护，然而血脑屏障的存在也使得抗感染抗炎药物难以进入脑部治疗。研究表明，阳离子型富含脯氨酸和精氨酸的抗菌肽不仅显示出调节细胞因子分泌和血管生成的免疫能力，还具有穿透细胞膜和穿过血脑屏障的特性，抗菌肽可以进入脑内皮细胞和脑实质，而且在大脑中活性稳定<sup>[14-16]</sup>，昆虫抗菌肽蜂毒素可以在短时间内安全、可逆地打开并进入血脑屏障<sup>[17]</sup>。鼠源抗菌肽 CRAMP 在脑膜炎球菌感染期间小鼠大脑中表达，随着感染时间增加，抗菌肽 CRAMP 表达量越多，来自感染小鼠的脑提取物比来自未感染小鼠的脑提取物显示出明显更高的抗脑膜炎球菌活性<sup>[18-19]</sup>，因此，抗菌肽在中枢神经系统的先天防御中也发挥了重要作用。然而，目前对于抗菌肽调控细菌性脑膜炎的作用机制尚不清楚。

肠外致病性大肠杆菌已证实可在人类和多种动物中存在，该类细菌易产生耐药性，严重威胁人类健康和畜牧业发展。肠外致病性大肠杆菌诱发的细菌性脑膜炎是该类病原菌感染人和动物主要的病症之一，其导致中枢神经系统的炎症反应，目前缺乏对其有效的防控和治疗方案。作为脑部的巨噬细胞，小胶质细胞以激活状态响应病原体入侵，从而促进炎症反应，

产生促炎因子，如 IL-6、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$ ，这些促炎因子会促进细胞毒性、急性炎症反应和血脑屏障渗透的发生<sup>[20-21]</sup>。

本研究通过 RS218 感染小鼠小胶质细胞 (BV2 细胞)，探讨抗菌肽 CATH-B1 对肠外致病性大肠杆菌诱导细胞炎症的保护作用。结果显示，与 Mock 组相比，RS218 感染后 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-12 和 TNF- $\alpha$  分泌水平显著增加，CATH-B1 预处理组剂量依赖性地降低 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-12 的表达，但不影响 TNF- $\alpha$  的表达水平。从基因水平来看，与 Mock 组相比，RS218 感染后 IL-1 $\beta$  和 IL-6 的 mRNA 表达显著升高，CATH-B1 预处理组显著降低 RS218 感染 3 h 和 6 h 的 IL-1 $\beta$  的转录水平，显著降低感染 6 h 的 IL-6 的转录水平。此外，据报道，CATH-B1 的细胞毒性很小，单独低剂量的 CATH-B1 不会对细胞产生刺激反应，更不会引起炎性细胞因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 等的分泌<sup>[8]</sup>，这也与本研究结果一致。

虽然我们的研究结果显示，在 RS218 感染的 2 h 内，CATH-B1 的预处理不会影响细菌对细胞的黏附侵袭，但有研究显示鸡源 cathelicidin 家族抗菌肽预孵育细胞后，可以在细菌感染的 48 h 内显著抑制肠炎沙门氏菌和白色念珠菌的生长，低浓度的鸡源 cathelicidin 家族抗菌肽预处理后的 24 h 内还能显著增加巨噬细胞的吞噬和增殖能力，同时减少细菌的载菌量<sup>[22-23]</sup>。这表明鸡源抗菌肽具有增强先天免疫系统的能力以及对宿主预防性保护的潜力，这也可能是 CATH-B1 抑制肠外致病性大肠杆菌引起的小胶质细胞神经炎症反应的原因。此外，研究结果显示 CATH-B1 预处理对细菌 LPS 诱导的炎性细胞因子 IL-1 $\beta$  和 IL-6 无明显影响。结合目前的研究，抗菌肽抑制 LPS 刺激诱导的炎症反应，大多数是通过与 LPS 直接结合，减少了 Toll 样受体的依赖性激活，从而中和促炎细胞因子的产生。

NF- $\kappa$ B 的经典炎症信号通路控制小胶质细胞的炎症反应<sup>[24]</sup>。在小胶质细胞表面, Toll 样受体 4 识别病原相关分子模式<sup>[25]</sup>, 招募关键的衔接蛋白髓样分化因子(myeloid differentiation factor 88, MyD88)。MyD88 驱动转化生长因子激酶 1 (TGF beta-activated kinase 1, TAK1)复合物的活化, 进一步磷酸化 NF- $\kappa$ B, 抑制核因子  $\kappa$ B 抑制蛋白  $\alpha$  (NF-kappa-B inhibitor alpha, I $\kappa$ B $\alpha$ ), 导致蛋白酶体降解, 并将 NF- $\kappa$ B 迁移到细胞核中以诱导促炎基因表达。研究证明抑制 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 途径, 可以有效调节阿尔茨海默病小鼠小胶质细胞炎症反应<sup>[26]</sup>。据报道, MAPK 途径参与小胶质细胞的激活并介导疾病的发生。MAPK 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族, 包括细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)、p38 和 JNK。在继发性脊髓损伤后, 小胶质细胞通过 MAPK 和 NF- $\kappa$ B 信号通路诱导焦亡和神经炎症<sup>[27]</sup>。此外, 新生儿败血症大鼠模型大脑通过 MAPK 和 ERK 信号通路诱导焦亡<sup>[28]</sup>。本研究通过蛋白免疫印迹法检测 NF- $\kappa$ B P65 蛋白和 MAPK ERK 蛋白及磷酸化 P-P65 和 P-ERK 蛋白的表达水平。结果显示, 与 Mock 组相比, RS218 感染后 P-P65/P65 蛋白和 P-ERK/ERK 蛋白比例显著升高, CATH-B1 预处理组显著逆转该比例的上调。结果表明 CATH-B1 可能是通过抑制 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 信号通路的活化来调控小鼠小胶质细胞的炎症。

另外, 相关报道指出, 抗菌肽的预处理会改变细胞的代谢水平, 增加糖酵解通量、新生嘧啶合成和细胞内中链、长链酰基肉碱水平, 抑制线粒体中的氧化磷酸化, 进而促进先天免疫记忆, 预防性增强对细菌感染的免疫力<sup>[23]</sup>。鸡源 cathelicidin 家族抗菌肽及其衍生物可以促进巨噬细胞极化倾斜, 使促炎 M1 型向抗炎 M2 型

转化, 从而影响单核细胞和巨噬细胞的激活状态<sup>[10,29-30]</sup>, 导致先天免疫反应的优化和适应性免疫反应的增强。还有研究显示, CATH-B1 预处理细胞后不仅减少了炎症细胞因子的分泌, 还可以增强抗炎细胞因子 IFN- $\beta$  和 IL-10 基因表达<sup>[8-9]</sup>。以上表明鸡源抗菌肽 CATH-B1 具有整体地预防性抵抗感染炎症的作用。以上可能是 CATH-B1 预处理的小胶质细胞能特异地减少 RS218 诱导的 P65 和 ERK 蛋白磷酸化比例水平及炎症因子分泌的原因。

综上所述, CATH-B1 对肠外致病性大肠杆菌诱导的小胶质细胞炎症具有保护作用, 其机制可能是通过调节细胞自身的免疫状态来抑制 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 信号通路的活化, 进而抑制促炎细胞因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-12 的表达, 从而起到抑制炎症作用。

## 参考文献

- [1] DENAMUR E, CLERMONT O, BONACORSI S, GORDON D. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2021, 19: 37-54.
- [2] KIM TG, KIM BG, KIM MY, CHOI JK, JUNG ES, YANG MS. Expression and immunogenicity of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit in transgenic rice callus[J]. *Molecular Biotechnology*, 2010, 44(1): 14-21.
- [3] FAN H, BAI QQ, YANG Y, SHI XF, DU GQ, YAN JQ, SHI J, WANG DM. The key roles of reactive oxygen species in microglial inflammatory activation: regulation by endogenous antioxidant system and exogenous sulfur-containing compounds[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2023, 956: 175966.
- [4] DELGADO M, VARELA N, GONZALEZ-REY E. Vasoactive intestinal peptide protects against beta-amyloid-induced neurodegeneration by inhibiting microglia activation at multiple levels[J]. *Glia*, 2008, 56(10): 1091-1103.
- [5] DUFFY CM, SWANSON J, NORTHROP W, NIXON JP, BUTTERICK TA. Microglial immune response to

- low concentrations of combustion-generated nanoparticles: an *in vitro* model of brain health[J]. *Nanomaterials*, 2018, 8(3): 155.
- [6] ZHANG Q, YAN YP. The role of natural flavonoids on neuroinflammation as a therapeutic target for Alzheimer's disease: a narrative review[J]. *Neural Regeneration Research*, 2023, 18(12): 2582-2591.
- [7] ZASLOFF M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms[J]. *Nature*, 2002, 415: 389-395.
- [8] PENG LC, SCHEENSTRA MR, van HARTEN RM, HAAGSMAN HP, VELDHUIZEN EJA. The immunomodulatory effect of cathelicidin-B1 on chicken macrophages[J]. *Veterinary Research*, 2020, 51(1): 122.
- [9] YE C, WAN C, CHEN J, LI G, LI YX, WANG Y, TAO Q, PENG LC, FANG RD. Cathelicidin CATH-B1 inhibits pseudorabies virus infection *via* direct interaction and TLR4/JNK/IRF3-mediated interferon activation[J]. *Journal of Virology*, 2023, 97(7): e0070623.
- [10] van HARTEN RM, TJEERDSMA-van BOKHOVEN JLM, de GREEFF A, BALHUIZEN MD, van DIJK A, VELDHUIZEN EJA, HAAGSMAN HP, SCHEENSTRA MR. D-enantiomers of CATH-2 enhance the response of macrophages against *Streptococcus suis* serotype 2[J]. *Journal of Advanced Research*, 2022, 36: 101-112.
- [11] CUPERUS T, KRAAIJ MD, ZOMER AL, van DIJK A, HAAGSMAN HP. Immunomodulation and effects on microbiota after *in ovo* administration of chicken cathelicidin-2[J]. *PLoS One*, 2018, 13(6): e0198188.
- [12] GAJSKI G, GARAJ-VRHOVAC V. Melittin: a lytic peptide with anticancer properties[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2013, 36(2): 697-705.
- [13] WU KP, YUAN Y, YU HH, DAI X, WANG S, SUN ZX, WANG F, FEI H, LIN QW, JIANG H, CHEN T. The gut microbial metabolite trimethylamine N-oxide aggravates GVHD by inducing M1 macrophage polarization in mice[J]. *Blood*, 2020, 136(4): 501-515.
- [14] MELONI BP, MASTAGLIA FL, KNUCKEY NW. Cationic arginine-rich peptides (CARPs): a novel class of neuroprotective agents with a multimodal mechanism of action[J]. *Frontiers in Neurology*, 2020, 11: 108.
- [15] LI WY, TAILHADES J, O'BRIEN-SIMPSON NM, SEPAROVIC F, OTVOS L, HOSSAIN MA, WADE JD. Proline-rich antimicrobial peptides: potential therapeutics against antibiotic-resistant bacteria[J]. *Amino Acids*, 2014, 46(10): 2287-2294.
- [16] STALMANS S, WYNENDAELE E, BRACKE N, KNAPPE D, HOFFMANN R, PEREMANS K, POLIS I, BURVENICH C, de SPIEGELEER B. Blood-brain barrier transport of short proline-rich antimicrobial peptides[J]. *Protein and Peptide Letters*, 2014, 21(4): 399-406.
- [17] LINVILLE RM, KOMIN A, LAN XY, DESTEFANO JG, CHU CY, LIU GS, WALCZAK P, HRISTOVA K, SEARSON PC. Reversible blood-brain barrier opening utilizing the membrane active peptide melittin *in vitro* and *in vivo*[J]. *Biomaterials*, 2021, 275: 120942.
- [18] BERGMAN P, TERMÉN S, JOHANSSON L, NYSTRÖM L, ARENAS E, JONSSON AB, HÖKFELT T, GUDMUNDSSON GH, AGERBERTH B. The antimicrobial peptide rCRAMP is present in the central nervous system of the rat[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2005, 93(5): 1132-1140.
- [19] BERGMAN P, JOHANSSON L, WAN H, JONES A, GALLO RL, GUDMUNDSSON GH, HÖKFELT T, JONSSON AB, AGERBERTH B. Induction of the antimicrobial peptide CRAMP in the blood-brain barrier and meninges after meningococcal infection[J]. *Infection and Immunity*, 2006, 74(12): 6982-6991.
- [20] LI JX, SHUI XY, SUN RZ, WAN L, ZHANG BX, XIAO B, LUO ZH. Microglial phenotypic transition: signaling pathways and influencing modulators involved in regulation in central nervous system diseases[J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2021, 15: 736310.
- [21] KUMAR V. Toll-like receptors in the pathogenesis of neuroinflammation[J]. *Journal of Neuroimmunology*, 2019, 332: 16-30.
- [22] SCHNEIDER VAF, van DIJK A, van der SAR AM, KRAAIJ MD, VELDHUIZEN EJA, HAAGSMAN HP. Prophylactic administration of chicken cathelicidin-2 boosts zebrafish embryonic innate immunity[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2016, 60: 108-114.
- [23] van DIJK A, ANTEN J, BAKKER A, EVERS N, HOEKSTRA AT, CHANG JC, SCHEENSTRA MR, VELDHUIZEN EJA, NETEA MG, BERKERS CR,

- HAAGSMAN HP. Innate immune training of human macrophages by cathelicidin analogs[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 777530.
- [24] WU LY, XIAN XH, XU GY, TAN ZX, DONG F, ZHANG M, ZHANG F. Toll-like receptor 4: a promising therapeutic target for Alzheimer's disease[J]. *Mediators of Inflammation*, 2022, 2022: 7924199.
- [25] GUO MF, ZHANG HY, LI YH, GU QF, WEI WY, WANG YY, ZHANG XJ, LIU XQ, SONG LJ, CHAI Z, YU JZ, MA CG. Fasudil inhibits the activation of microglia and astrocytes of transgenic Alzheimer's disease mice *via* the downregulation of TLR4/Myd88/NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Journal of Neuroimmunology*, 2020, 346: 577284.
- [26] YANG YQ, HAO TY, YAO XH, CHE Y, LIU YY, FANG MX, WANG YJ, ZHOU D, CHAI HF, LI N, HOU Y. Crebanine ameliorates ischemia-reperfusion brain damage by inhibiting oxidative stress and neuroinflammation mediated by NADPH oxidase 2 in microglia[J]. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 2023, 120: 155044.
- [27] LIU ZY, YAO XQ, JIANG WS, LI W, ZHU SY, LIAO CR, ZOU L, DING RT, CHEN JT. Advanced oxidation protein products induce microglia-mediated neuroinflammation *via* MAPKs-NF- $\kappa$ B signaling pathway and pyroptosis after secondary spinal cord injury[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 90.
- [28] ZHOU RX, YANG XY, LI XH, QU Y, HUANG Q, SUN XM, MU DZ. Recombinant CC16 inhibits NLRP3/caspase-1-induced pyroptosis through p38 MAPK and ERK signaling pathways in the brain of a neonatal rat model with sepsis[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 239.
- [29] KRAAIJ MD, van DIJK A, SCHEENSTRA MR, van HARTEN RM, HAAGSMAN HP, VELDHUIZEN EJA. Chicken CATH-2 increases antigen presentation markers on chicken monocytes and macrophages[J]. *Protein and Peptide Letters*, 2020, 27(1): 60-66.
- [30] SCHEENSTRA MR, van HARTEN RM, VELDHUIZEN EJA, HAAGSMAN HP, COORENS M. Cathelicidins modulate TLR-activation and inflammation[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 1137.