

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2016.20160822

## 过表达锌指蛋白 A20 可抑制肺泡巨噬细胞炎症反应

朱晓丹, 王 颖, 毕 晶, 童 琳, 刘 洁, 宋元林, 白春学\*

复旦大学附属中山医院呼吸内科, 上海 200032

**[摘要]** **目的:**通过建立 A20 过表达肺泡巨噬细胞株,研究 A20 对肺泡巨噬细胞炎症反应的影响及调控机制。**方法:**构建携带 A20 基因的慢病毒载体,转染大鼠肺泡巨噬细胞(NR8383),筛选出稳定过表达 A20 基因的细胞株并行体外培养。向培养基中加入脂多糖(LPS, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )进行干预,并于刺激后 0.5、1、2、4 h 收集上清液及细胞。ELISA 法测定上清液中细胞因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ )及核因子  $\kappa\text{B}$ (NF- $\kappa\text{B}$ )活性。Western 印迹方法检测 A20 蛋白及核内 p65 含量。实时荧光定量 PCR 法测定 A20 mRNA 含量。**结果:**LPS 刺激后,A20 过表达组(A20 组)及正常对照组(VEC 组)A20 蛋白及 mRNA 含量都升高,并于 1 h 达高峰,之后逐渐下降;且 A20 组较 VEC 组 A20 水平明显升高( $P<0.05$ )。与 VEC 组相比,A20 组培养上清液中细胞因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ )水平明显降低( $P<0.05$ );NF- $\kappa\text{B}$  DNA 结合活性及核内 p65 含量也降低( $P<0.05$ )。**结论:**A20 能够抑制肺泡巨噬细胞 NF- $\kappa\text{B}$  活性及 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  分泌,进而抑制肺泡巨噬细胞炎症反应活性。

**[关键词]** 急性呼吸窘迫综合征;A20 蛋白;肺泡;巨噬细胞;炎症反应

**[中图分类号]** R 563.8 **[文献标志码]** A

## A20 regulates the inflammatory responses of alveolar macrophage

ZHU Xiao-dan, WANG Ying, BI Jing, TONG Lin, LIU Jie, SONG Yuan-lin, BAI Chun-xue\*

Department of Respiratory Medicine, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

**[Abstract]** **Objective:** To study the effects of A20 on the inflammatory response of alveolar macrophages and its regulation mechanism through establishing A20 over-expressing alveolar macrophage cell lines. **Methods:** Lentivirus-mediated expression vector carrying A20 gene was constructed, then it was transfected into rat alveolar macrophage cell lines (NR8383), and the cell lines which stably overexpressed A20 gene were screened and cultured *in vitro*. Lipopolysaccharide (LPS, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was added into the medium to intervene, the culture supernatants and cells were collected 0.5, 1, 2, 4 hours after stimulation, ELISA method was used to determine the activity of cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) and nuclear factor (NF- $\kappa\text{B}$ ). Western blotting method was used to detect A20 protein and nuclear p65 content, and real-time fluorescence quantitative PCR method was used to determine the content of A20 mRNA. **Results:** After LPS stimulation, the levels of A20 protein and mRNA in A20 overexpression group (A20 group) and the normal control group (VEC group) both increased and reached the peak at 1 h, and then gradually decreased. The A20 level of A20 group was significantly higher than that of VEC group ( $P<0.05$ ). Compared with VEC group, the levels of cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) in culture supernatants of A20 group significantly reduced ( $P<0.05$ ), and the DNA binding activity of NF- $\kappa\text{B}$  and nuclear p65 content of A20 group also significantly reduced ( $P<0.05$ ). **Conclusions:** A20 can inhibit the activity of NF- $\kappa\text{B}$  and the secretion of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , and then inhibit the inflammatory reaction activity of alveolar macrophages, thereby reducing the inflammatory response of acute respiratory distress syndrome (ARDS).

**[Key Words]** acute respiratory distress syndrome; A20 protein; alveolar; macrophage; inflammatory response

急性呼吸窘迫综合征(ARDS)是造成重症肺炎、重症急性呼吸综合征(SARS)、爆发性禽流感等疾病死亡的主要原因。ARDS 病死率高,在美国,其死亡人数相当于每年因乳腺癌、结肠癌和前

列腺癌死亡的人数总和<sup>[1]</sup>。其诱因主要为肺部感染和全身性感染。其中在脂多糖(LPS)导致的 ARDS 中,促炎及抗炎反应失衡是根本原因。肺泡巨噬细胞在其中起始动作用,并与核因子(NF- $\kappa\text{B}$ )炎症信

**[收稿日期]** 2016-08-19 **[接受日期]** 2016-11-01

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金(81300055,81500025),国家自然科学基金重点项目(30930090). Supported by National Natural Science Youth Foundation of China (81300055,81500025) and Key Project of National Natural Science Foundation of China (30930090).

**[作者简介]** 朱晓丹,博士,住院医师。E-mail: dan\_yt@126.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-64041990-2963, E-mail: bai\_chunxue@zs-hospital.sh.cn

号通路过度反应密切相关<sup>[2-3]</sup>。

A20 蛋白, 又称肿瘤坏死因子  $\alpha$  诱导蛋白 3 (TNFAIP3), 是一种泛素修饰酶<sup>[4]</sup>。既往研究<sup>[5-8]</sup>发现, A20 基因多态性与多种炎症性疾病有关, 并可负性调节 NF- $\kappa$ B。在呼吸系统中 A20 基因 SNP 位点(rs4755453)与急性肺损伤的易感性有关<sup>[9]</sup>。A20 基因敲除小鼠能产生严重的炎症反应, 并在 TNF- $\alpha$  及 LPS 干预之后更明显, 提示 A20 能够抑制机体肿瘤坏死因子(TNF)诱导的 NF- $\kappa$ B 活化<sup>[10]</sup>。NF- $\kappa$ B 在肺泡巨噬细胞炎症反应中具有重要作用, 而 A20 能够调控 NF- $\kappa$ B 活化。因此本研究主要探讨 A20 蛋白对肺泡巨噬细胞炎症活性的影响。

## 1 材料与方法

1.1 肺泡巨噬细胞体外培养 选取 NR8383 大鼠肺泡巨噬细胞株(中国科学院细胞库), 采用含 20% 胎牛血清的 F12K 培养基(Sigma, 货号: N3520), 添加 NaHCO<sub>3</sub> 2.5 g/L、1% P/S (100 U/mL 青霉素+100  $\mu$ g/mL 链霉素)、2 mol/L L-谷氨酰胺溶液, 置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱常规培养。取对数生长期细胞进行后续实验。

1.2 A20 质粒转染 采用 RT-PCR 法(按照 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书进行, 上游引物: 5'-GTT GGC AAA GCA TAC AAC TGA AAG G-3'; 下游引物: 5'-GGC TGT GAC GAA GGA AGA GCT TA-3')扩增小鼠 A20 cDNA(购于康为世纪)。在 EcoR I 和 BamH I 酶切位点将上述 cDNA 插入 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP 载体, 并进行测序验证。按照 Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, 11 668-019)产品说明书将上述含有 A20 目的基因的载体转染 NR 8383 肺泡巨噬细胞, 并进行体外培养, 荧光显微镜下观察转染是否成功。实时荧光定量 PCR、Western 印迹法检测细胞中 A20 基因和蛋白的表达。

1.3 LPS 刺激肺泡巨噬细胞 将体外培养慢病毒包装后的肺泡巨噬细胞株分为 A20 过表达组(A20 组)和过表达空载组(VEC 组)。向培养基中加入 LPS(1  $\mu$ g/mL)进行刺激, 分别于刺激后 0.5、1、2、4 h, 将培养液离心, 吸取上清液, 并收获细胞。细胞提取细胞蛋白及总 RNA, 采用 Western 印迹法检测 A20、NF- $\kappa$ B 蛋白表达情况, 实时荧光定量 PCR 法检测细胞中 A20 mRNA 表达情况(A20 引物, 上游引物: 5'-GCA GTG TAA AAG GCA GGC TAA C-3', 下游引物: 5'-TGG GGT TCT CTC TCG TAT CTT

C-3';  $\beta$ -actin 引物上游引物: 5'-GGA GATT AGT GCC CTG GCT CCT A-3', 下游引物: 5'-GAC TCA TCG TAC TCC TGC TTG CTG-3')。

1.4 NF- $\kappa$ B 活性及细胞因子检测 用非放射性 NF- $\kappa$ B p65 转录因子活性检测试剂盒(Active Motif)检测上清液中 NF- $\kappa$ B 活性; ELISA 试剂盒(R&D)检测上清液 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 11.5 软件进行数据分析, 计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)及  $t$  检验, 检验水准( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 荧光显微镜下观察 A20 过表达肺泡巨噬细胞 将携带 A20 基因的病毒载体转染肺泡巨噬细胞(A20 过表达肺泡巨噬细胞), 感染 24 h 后, 可在荧光显微镜下观察到绿色荧光(图 1)。

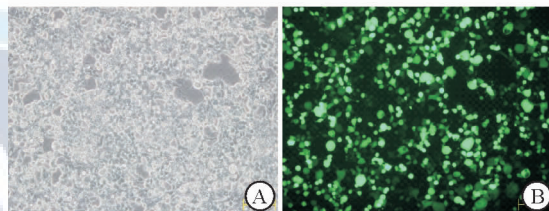


图 1 荧光显微镜下观察 A20 过表达肺泡巨噬细胞  
A: 明视野; B: 荧光视野。Original magnification:  $\times 200$

2.2 A20 过表达大鼠肺泡巨噬细胞的 A20 表达鉴定 采用 Western 印迹及实时荧光定量 PCR 鉴定 A20 过表达肺泡巨噬细胞中 A20 的表达情况。结果显示, A20 过表达肺泡巨噬细胞(A20)中 A20 蛋白及 mRNA 含量较 VEC 组明显升高, 可用于后续研究(图 2)。

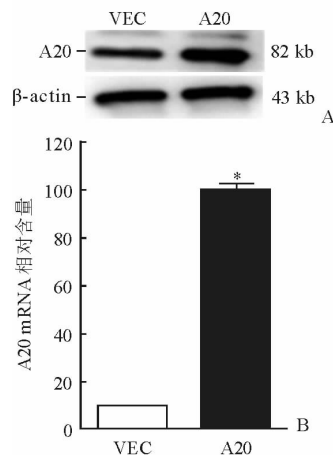


图 2 A20 过表达肺泡巨噬细胞中 A20 表达情况

A: Western 印迹结果; B: 定量分析结果。\*  $P < 0.05$  与 VEC 组比较;  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.3 LPS 刺激后大鼠肺泡巨噬细胞 A20 表达情况 VEC 组及 A20 组 LPS 刺激后 A20 蛋白及 mRNA 含量均较刺激前升高,且于 1 h 达高峰,之后逐渐下降;LPS 刺激后 A20 组中 A20 蛋白及 mRNA 的含量高于 VEC 组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ,图 3)。

2.4 A20 对 LPS 刺激后肺泡巨噬细胞中细胞因子

分泌的影响 LPS 刺激后,与 0 h 比较,其他各个时间点各组细胞培养上清液中的 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  均明显升高(图 4);A20 组各个时间点较 VEC 组培养上清液中的细胞因子水平(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ )均明显降低,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),表明 A20 能抑制 LPS 刺激后肺泡巨噬细胞中的细胞因子分泌(图 4)。

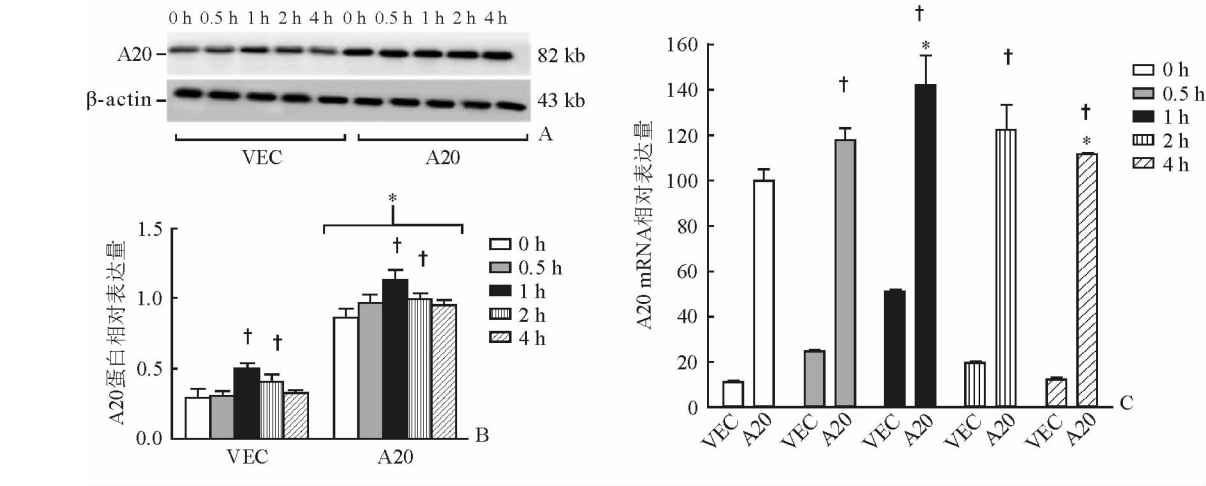


图3 各时间点肺泡巨噬细胞中 A20 蛋白及 mRNA 含量

A: Western 印迹结果; B: A20 蛋白相对表达量; C: 实时荧光定量 PCR 结果. † $P<0.05$  与 0 h 比较; \* $P<0.05$  与 VEC 组比较.  $n=3, \bar{x}\pm s$

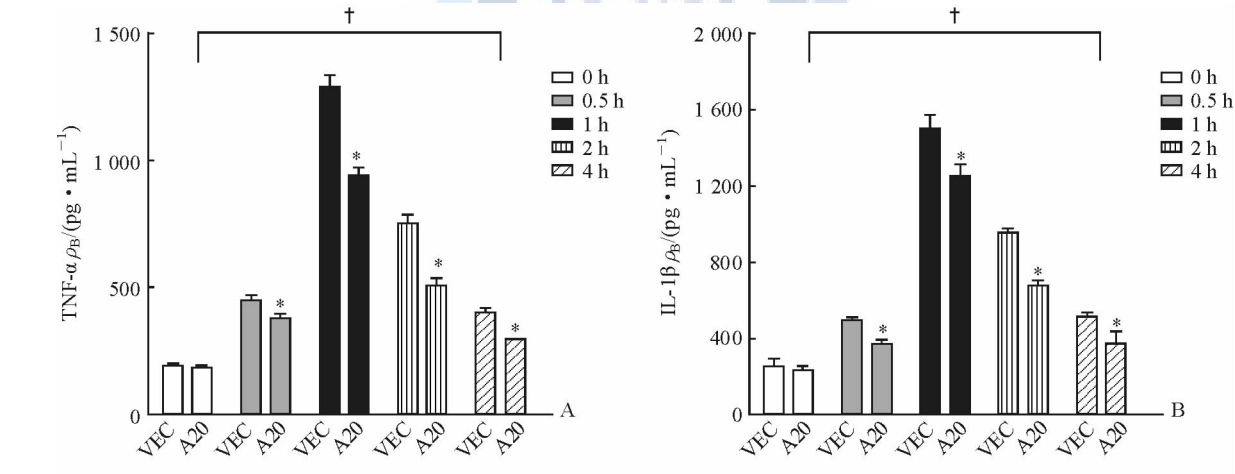


图4 ELISA 法测定细胞培养上清液中 TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  水平

A: TNF- $\alpha$  水平; B: IL-1 $\beta$  水平. † $P<0.05$  与 0 h 比较; \* $P<0.05$  与 VEC 组比较.  $n=3, \bar{x}\pm s$

2.5 A20 对 LPS 刺激后肺泡巨噬细胞中 NF- $\kappa$ B 的影响 给予 LPS 刺激后,与 0 h 比较,其他各个时间点各组核内 p65 蛋白含量(图 5A、5B)及 NF- $\kappa$ B DNA 结合活性(图 5C)升高;与 VEC 组相比, A20 组各个时间点核内 p65 蛋白含量(图 5A、5B)及 NF- $\kappa$ B DNA 结合活性(图 5C)均降低,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),表明 A20 能抑制肺泡巨噬细胞 NF- $\kappa$ B 表达及活性。

3 讨论

过度放大的炎症反应是 ARDS 重要的病理生理特征,而肺泡巨噬细胞在其中起始动作用。通常认为,ARDS 具有双期炎症过程,晚期依赖于中性粒细胞,早期肺泡巨噬细胞为启动 ARDS 炎症瀑布发挥着巨大作用<sup>[11]</sup>。当外界刺激因子作用于机体时,首先激活巨噬细胞,释放并活化一系列促炎因子,

如 TNF、IL-1、IL-6、IL-8 等,进而作用于各种效应细胞,导致炎症反应过度放大及失衡,最终造成 ARDS。此外,肺巨噬细胞产生的细胞因子,因不能被血清灭活,而在肺内不断蓄积,使始动因素持续存在,造成 ARDS 继续。在 LPS 所致的 ARDS 中,

LPS 能够导致肺泡巨噬细胞中 NF- $\kappa$ B 介导的炎症信号通路过度反应,诱导上述细胞因子活化,进而造成肺损伤。因此,有效地抑制肺泡巨噬细胞中 NF- $\kappa$ B 活性可能是延缓或抑制 ARDS 炎症反应行之有效的方法。

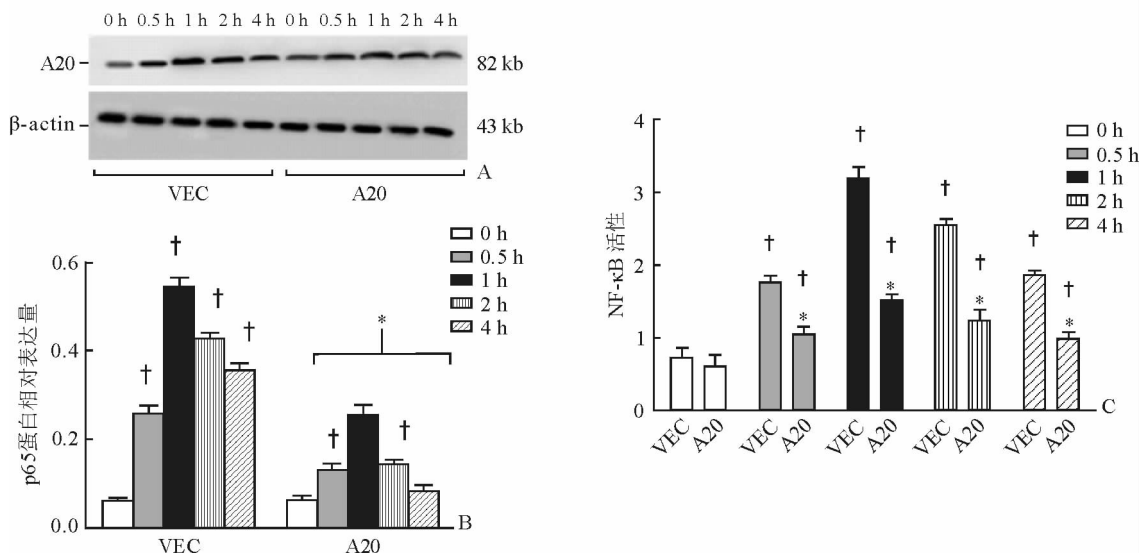


图 5 LPS 干预后肺泡巨噬细胞中 A20、NF- $\kappa$ B 蛋白表达及活性变化

A: Western 印迹结果; B: 核内 p65 蛋白相对表达量; C: NF- $\kappa$ B DNA 结合活性。† $P$  < 0.05 与 0 h 比较; \* $P$  < 0.05 与 VEC 组比较。

$n = 3, \bar{x} \pm s$

A20 是相对分子质量约 80 000 的胞内锌指蛋白,最早在人脐静脉内皮细胞中被发现。目前,它被认为是重要的炎症负性调节因子。多种炎症因子刺激,如 LPS、IL-1 $\beta$  及 CD40 等,能够诱导 A20 表达。本研究中,体外 LPS 刺激大鼠肺泡巨噬细胞后,A20 表达增加,这与以往的研究<sup>[5]</sup>相似。本研究发现,A20 表达高峰期在 LPS 刺激后 1 h,与 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  的分泌时相一致,提示 A20 与肺泡巨噬细胞细胞因子的分泌有关。

本研究结果显示,LPS 刺激后该细胞株中 A20 蛋白及 mRNA 含量较 VEC 组明显升高,而 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  水平明显降低,表明 A20 能够抑制肺泡巨噬细胞分泌 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$ 。研究<sup>[11-12]</sup>认为,IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  是与 ARDS 有关的主要近端细胞因子,在 ARDS 早期主要由巨噬细胞分泌,并通过刺激肺部的各种效应细胞产生远端细胞因子,启动细胞因子瀑布。本研究中 A20 能抑制这两种细胞因子的分泌,提示 A20 可能通过抑制肺泡巨噬细胞分泌 TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  来调控 ARDS。

NF- $\kappa$ B 在细胞因子瀑布的调节中起重要作用<sup>[13-15]</sup>。在 LPS 诱导的 ARDS 中,NF- $\kappa$ B 通路是

主要的炎症信号通路之一,它能够调节多种促炎因子的表达及分泌,如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 等。NF- $\kappa$ B 的结合序列在巨噬细胞来源的很多细胞因子(包括 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-8)启动子中被发现。既往研究<sup>[4]</sup>发现,A20 能够抑制 NF- $\kappa$ B 活化及 TNF- $\alpha$  和 IL-1 诱导的信号通路传导。NF- $\kappa$ B 活化过程涉及多个蛋白的泛素化,包括 MALT1、TRAF6,而 A20 蛋白能够脱去这些蛋白的泛素化链,从而调控 NF- $\kappa$ B 的活化。本研究中给予 LPS 刺激后,与 VEC 组相比,A20 组各个时间点核内 p65 蛋白含量及 NF- $\kappa$ B DNA 结合活性都明显降低,表明 A20 能抑制肺泡巨噬细胞 NF- $\kappa$ B 表达及活性。由于 NF- $\kappa$ B 能调节 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  分泌,故综合以上研究结果,A20 可能通过抑制 NF- $\kappa$ B 而调控 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  分泌,进而抑制肺泡巨噬细胞炎症反应,在 ARDS 炎症反应中起负性调节作用。

## 参考文献

- [1] RUBENFELD G D, CALDWELL E, PEABODY E, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury[J]. N Engl J Med, 2005,353(16):1685-1693.
- [2] FUJIWARA N, KOBAYASHI K. Macrophages in

- inflammation[J]. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2005, 4(3):281-286.
- [3] 马杰飞,何义舟,罗哲,等. 高迁移率族蛋白 1 在呼吸机相关性肺损伤大鼠中的表达变化[J]. *中国临床医学*, 2015, 22(1): 29-32.
- [4] IGARASHI H, YAHAGI A, SAIKA T, et al. A pro-inflammatory role for A20 and ABIN family proteins in human fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis[J]. *Immunol Lett*, 2012, 141(2):246-253.
- [5] SHEMBADE N, MA A, HARHAJ E W. Inhibition of NF-kappaB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes[J]. *Science*, 2010, 327(5969):1135-1139.
- [6] SONG X, YAO Z, YANG J, et al. HCV core protein binds to gC1qR to induce A20 expression and inhibit cytokine production through MAPKs and NF- $\kappa$ B signaling pathways[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(23):33796-33808.
- [7] VEREECKE L, BEYAERT R, VAN LOO G. Genetic relationships between A20/TNFAIP3, chronic inflammation and autoimmune disease[J]. *Biochem Soc Trans*, 2011, 39(4):1086-1091.
- [8] FAN Y, TAO J H, ZHANG L P, et al. The association between BANK1 and TNFAIP3 gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis[J]. *Int J Immunogenet*, 2011, 38(2):151-159.
- [9] SONG Z, YAO C, YIN J, et al. Genetic variation in the TNF receptor-associated factor 6 gene is associated with susceptibility to sepsis-induced acute lung injury[J]. *J Transl Med*, 2012, 10:166.
- [10] LEE E G, BOONE D L, CHAI S, et al. Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice[J]. *Science*, 2000, 289(5488):2350-2354.
- [11] ZHAO M, FERNANDEZ L G, DOCTOR A, et al. Alveolar macrophage activation is a key initiation signal for acute lung ischemia-reperfusion injury[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 291(5):L1018-L1026.
- [12] MATTHAY M A, ZIMMERMAN G A. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005, 33(4):319-327.
- [13] MILLAR F R, SUMMERS C, GRIFFITHS M J, et al. The pulmonary endothelium in acute respiratory distress syndrome: insights and therapeutic opportunities [J]. *Thorax*, 2016, 71(5):462-473.
- [14] CASTELLHEIM A, BREKKE O L, ESPEVIK T, et al. Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis [J]. *Scand J Immunol*, 2009, 69(6):479-491.
- [15] FAN J, YE R D, MALIK A B. Transcriptional mechanisms of acute lung injury[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, 281(5):L1037-L1050.

[本文编辑] 廖晓瑜, 贾泽军