DOI:10.16016/j.1000-5404.202104087

冠蛋白-1 通过调控 CD14 的表达影响巨噬细胞极化

范晓霞,陈 全,孙雪花,田若源 400016 重庆,重庆医科大学基础医学院免疫学教研室

[摘要] **目的** 探讨冠蛋白-1(Coronin-1)与巨噬细胞极化的相关性及可能机制。**方法** 建立 M1、M2 型 RAW264.7 鼠巨噬细胞模型,通过 Real-time PCR 和 Western blot 检测 Coronin-1 的表达;构建过表达(Coronin-1 Plus)、敲除(Coronin-1 KO)细胞系,通过 Real-time PCR 和 Western blot 检测过表达、敲除和正常表达 Coronin-1 细胞组的一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)水平;利用蛋白质互作网络(PPI)和 GO 分析 Coronin-1 和 CD14 相关蛋白的互作与富集,再通过 Real-time PCR 和 Western blot 检测过表达、敲除和正常表达 Coronin-1 细胞组的 CD14 水平以及经脂多糖(lipopolysaccharide,LPS,100 ng/mL)处理后的 iNOS 水平;构建 CD14 敲减的细胞系(Control-CD14 KD)、CD14 敲减的 Coronin-1 Plus 细胞系(Coronin-1 Plus-CD14 KD),经 LPS (100 ng/mL)处理后,通过 Real-time PCR 和 Western blot 检测 iNOS 的表达。**结果** 成功构建 M1、M2 型巨噬细胞模型,M1 型 Coronin-1 表达显著高于对照组($P<0.05$);Coronin-1 Plus 组 iNOS mRNA 的表达显著低于对照组($P<0.01$),Coronin-1 Plus 组 CD14 的表达显著高于对照组($P<0.05$);经 LPS 处理后,Coronin-1 Plus 组 iNOS 的表达显著高于对照组($P<0.01$);经 LPS 处理的 Control-CD14 KD、Coronin-1 Plus-CD14 KD 组细胞的 iNOS 水平与对照组比较,差异无统计学意义。**结论** 巨噬细胞向 M1 型极化导致了 Coronin-1 的高表达,而 Coronin-1 过表达并不能直接导致细胞向 M1 型极化,但 Coronin-1 过表达可导致 CD14 表达上调,Coronin-1 可通过 CD14 途径促进 LPS 诱导巨噬细胞向 M1 型极化。

[关键词] 巨噬细胞;冠蛋白-1;一氧化氮合酶;CD14;脂多糖
[中图法分类号] R341; R392.12; R392.2 [文献标志码] A

Effect of Coronin-1 on macrophage polarization by regulating the expression of CD14

FAN Xiaoxia, CHEN Quan, SUN Xuehua, TIAN Ruoyuan Department of Immunology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the correlation between Coronin-1 and macrophage polarization and its possible mechanism. **Methods** Firstly, M1 and M2 RAW246.7 macrophage cells were established, and the expression of Coronin-1 at mRNA and protein level was detected by real-time PCR and Western blotting. Then, over-expressed (Coronin-1 Plus) and knockout (Coronin-1 KO) cell lines were constructed in RAW246.7 cells, and the expression levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in over-expressed, knockout and normal-expressed Coronin-1 cells were detected by real-time PCR and Western blotting. The interaction and enrichment of Coronin-1 and CD14 related proteins were analyzed by protein-protein interaction (PPI) network and Gene Ontology (GO) enrichment analysis. Real-time PCR and Western blotting were used to detect the expression level of CD14 in over-expressed, knockout and normal Coronin-1 cells, and the expression level of iNOS after treatment with 100 ng/mL LPS. Then, CD14 knockdown cell lines (Control-CD14 KD) and CD14 knockdown Coronin-1 Plus cell lines (Coronin-1 Plus-CD14 KD) were constructed. After treatment with LPS (100 ng/mL), the expression of iNOS was detected by real-time PCR and Western

[通信作者] 陈 全,E-mail: chenquan@cqmu.edu.cn

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

blotting. **Results** M1 and M2 macrophage models were successfully constructed, and the expression of Coronin-1 in M1 type macrophages was significantly higher than that in the Control group ($P<0.05$). The mRNA expression of iNOS was significantly lower in Coronin-1 Plus group than control group ($P<0.01$), and the expression of CD14 was obviously higher in Coronin-1 Plus group than Control group ($P<0.05$). After LPS treatment, the expression of iNOS in Coronin-1 Plus group was significantly higher than that in Control group ($P<0.01$). There was no significant difference in iNOS level of the LPS treated Control-CD14 KD and Coronin-1 Plus-CD14 KD groups with the Control group ($P>0.05$). **Conclusion** The M1 polarization of macrophages leads to higher expression of Coronin-1, but the over-expression of Coronin-1 does not directly lead to the M1 polarization of macrophages. Its over-expression can lead to up-regulation of CD14 expression, and Coronin-1 can promote LPS-induced macrophages to M1 type polarization through the CD14 pathway.

[**Key words**] macrophages; Coronin-1; inducible nitric oxide synthase; CD14; lipopolysaccharide

Corresponding author: CHEN Quan, E-mail: chenquan@cqmu.edu.cn

Coronins 是一种保守的肌动蛋白细胞骨架调节因子家族,Coronin-1 又名 actin-binding protein P57 或 TACO(tryptophan aspartate containing coat protein),广泛表达于中性粒细胞、巨噬细胞及淋巴细胞等白细胞中,其涉及钙离子稳态[1]、细胞骨架动力学[2]、免疫[3]及炎症反应[4]等多种细胞功能。巨噬细胞的表型与胞内寄生菌感染[5]、肿瘤等疾病的发生、发展有关[6]。在肿瘤的发生、发展过程中,巨噬细胞受到肿瘤微环境调控进而发生表型的转换,由促炎的 M1 型转换为免疫抑制相关的 M2 型,为肿瘤的生成及其转移提供了有利的条件[7]。Toll 样受体(Toll-like receptor,TLR)4 能被脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)激活,LPS-TLR4 通路是介导巨噬细胞极化为 M1 型的重要通路[8],研究表明 Coronin-1 的表达可抑制 TLR4 及其下游通路[9-10],而 TLR4 与 LPS 的结合需要 CD14 的参与[11]。

巨噬细胞冠蛋白-1(Coronin-1)与其介导的炎症反应有关,而巨噬细胞表型极化状态又决定了其促炎或抑炎功能的发挥。为了探讨巨噬细胞 Coronin-1 与其极化的相关性及可能机制,本研究拟将巨噬细胞诱导为 M1、M2 型,检测 Coronin-1 蛋白表达是否存在差异;用 pEGFP-C1 质粒构建过表达 Coronin-1 的巨噬细胞系,用 CRISPR/Cas9 构建敲除 Coronin-1 的巨噬细胞系,探讨不同表达水平的 Coronin-1 对巨噬细胞的极化是否有影响以及与极化的因果关系;利用 GeneMANIA 数据库,对 Coronin-1 与 CD14 之间的蛋白互作关系进行分析,用 shRNA 构建 Coronin-1 过表达 CD14 沉默的巨噬细胞系和 Coronin-1 正常表达 CD14 沉默的巨噬细胞系,探讨 Coronin-1 在 LPS 介导的 M1 型巨噬细胞极化中的影响以及该影响是否通过 CD14 途径,明确 Coronin-1 蛋白在巨噬细胞极化中的作用及其机制,可为肿瘤的防治、炎症控制等提供新思路。

1 材料与方法

1.1 细胞株、主要材料与试剂

小鼠巨噬细胞 RAW264.7、HEK293T 由重庆医科大学免疫学研究中心保存;pEGFP-C1、lentiCRISPR-v2、psi-LVRU6P、pMD2.G、psPAX2 质粒由重庆医科大学免疫学研究中心保存。其他材料与试剂:小鼠重组 γ-干扰素、小鼠重组白介素-4(美国 Proteintech 公司);LPS(美国 Sigma 公司);DMEM 高糖培养基、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);青霉素-链霉素溶液(碧云天公司);胎牛血清(Natocor-Industria Biologica 公司,阿根廷);Lipofectamine™ 3000(美国 Invitrogen 公司);RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、PrimeSTAR HS DNA Polymerase 试剂盒、TB Green™ Premix Ex Taq™(Tli RNaseH Plus)RT-PCR 试剂盒、DNA 提取试剂盒(日本 TaKaRa 公司);引物由天津擎科生物技术有限公司合成;RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、PVDF 膜(0.2 μm/0.45 μm)(鼎国昌盛公司);SDS-PAGE 凝胶试剂盒(雅酶公司);兔一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase,iNOS)多克隆抗体、小鼠 Coronin-1 单克隆抗体(英国 Abcam 公司);小鼠 ARG-1 单克隆抗体、兔 CD14 多克隆抗体、小鼠 β-actin 单克隆内参抗体(美国 Proteintech 公司);辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG、羊抗鼠 IgG(美国 Abbkine 公司)。

1.2 M1、M2 型巨噬细胞的诱导

分别用含有终浓度为 20 ng/mL 的小鼠重组 IFN-γ+终浓度为 100 ng/mL 的 LPS、终浓度为 20 ng/mL 的小鼠重组 IL-4 的培养液处理 RAW264.7 细胞 48 h,诱导成 M1 和 M2 型巨噬细胞[12],以未经处理的 RAW264.7 细胞为空白对照组(Control)。

1.3 过表达 Coronin-1 细胞系的建立

1.3.1 重组质粒 pEGFP-C1-Coronin-1 的构建 根据

GenBank(AF143955.1)设计合成目的基因 Coronin-1 引物(扩增目的基因长度为 1 386 bp)。上游引物为 5′-GCGTCGACGCCACCATGAGCCGGCAGGTGGT-3′,下游引物为 5′-GCGGATCCCTACTTGGCCTGAACAGTCTCCT-3′。裂解 RAW264.7 细胞后用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,按逆转录试剂盒说明书逆转录为 cDNA,以 cDNA 为模板 PCR 扩增 Coronin-1 目的片段。用 *Bam*HⅠ和 *Sal*Ⅰ双酶切 PCR 回收产物和质粒 pEGFP-C1,使其具有相同的黏性末端,纯化回收目的基因和载体大片段,用 DNA 连接酶于 16 ℃下连接 4 h,转化至感受态 TOP10 大肠杆菌,卡那霉素抗性筛选并挑取阳性克隆,酶切鉴定及测序鉴定,构建的重组质粒命名为 pEGFP-C1-Coronin-1。

1.3.2 RAW264.7-pEGFP-C1-Coronin-1 细胞系的建立 将 pEGFP-C1-Coronin-1 质粒用 Lipofectamine™3000 转染 RAW264.7 细胞,转染 24 h 后置于倒置荧光显微镜下观察荧光表达情况,将细胞以 1∶6比例传代,用 G418 加压筛选,挑单克隆筛选出表达绿色荧光的 RAW264.7-pEGFP-C1-Coronin-1 稳定转染细胞株(Coronin-1 Plus)。

1.4 CRISPR/Cas9 敲除 Coronin-1 细胞系的建立

1.4.1 CRISPR/Cas9 基因敲除质粒 lentiCRISPR-v2-Coronin-1 的构建 根据 GenBank(NM_001301374.1)设计能有效敲除 Coronin-1 的 sgRNA 模板序列,sgRNA-上游为 5′-CACCGCCACGTGTTTGGACAGCCAGCCA-3′,sgRNA-下游为 5′-AAACTGGCTGGCTGTCCAAACACGTGGC-3′,在 PCR 仪上退火。用 *Esp*3Ⅰ酶切 lentiCRISPR-v2 质粒,使其具有相同的黏性末端,纯化回收以后用 DNA 连接酶于 16 ℃下连接 4 h,转化至感受态 Stbl3 大肠杆菌,氨苄西林抗性筛选并挑取阳性克隆,测序鉴定,构建的重组质粒命名为 lentiCRISPR-v2-Coronin-1。

1.4.2 RAW264.7-lentiCRISPR-v2-Coronin-1 细胞系的建立 采用 lentiCRISPR-v2-Coronin-1、pMD2.G、psPAX2 三质粒包装系统,用 Lipofectamine™ 3000 转染 HEK293T 细胞,48 h 后收集慢病毒上清离心过滤,于-80 ℃保存。将慢病毒、10 μg/mL polybrene 加入 RAW264.7 细胞,6 h 后补齐培养液,24 h 后更换新鲜培养液,感染 48 h 加入嘌呤霉素筛选。将细胞铺至 96 孔板中,挑单克隆筛选鉴定出 Coronin-1 基因敲除的稳定细胞株 RAW264.7-lentiCRISPR-v2-Coronin-1(Coronin-1 KO)。

1.5 CD14 沉默的细胞系的建立

1.5.1 shRNA 慢病毒重组质粒 psi-LVRU6P-CD14 的构建 根据 GenBank(NM_009841.4)设计能有效沉默 CD14 的 shRNA 模板序列,shRNA-上游为 5′-GATCGTATCAAGTCTCTGTCCTTAAACTCGAGTTTAAGGACAGAGACTTGATACTTTTTG-3′,shRNA-下游为 5′-AATTCAAAAAGTATCAAGTCTCTGTCCTTAAACTCGAGTTTAAGGACAGAGACTTGATAC-3′,在 PCR 仪上退火。用 *Bam*HⅠ和 *Eco*RⅠ酶切 psi-LVRU6P 质粒,使其具有相同的黏性末端,纯化回收以后用 DNA 连接酶于 16 ℃下连接 4 h,转化至感受态 Stbl3 大肠杆菌,氨苄西林抗性筛选并挑取阳性克隆,测序鉴定,构建的重组慢病毒质粒命名 psi-LVRU6P-CD14。

1.5.2 RAW264.7-psi-LVRU6P-CD14 细胞系的建立 采用 psi-LVRU6P-CD14、pMD2.G、psPAX2 三质粒包装系统,用 Lipofectamine™ 3000 转染 HEK293T 细胞,48 h 后收集慢病毒上清离心过滤,于-80 ℃保存。将慢病毒、10 μg/mL polybrene 加入 RAW264.7 细胞,6 h 后补齐培养液,24 h 后更换新鲜培养液,感染 48 h 加入嘌呤霉素筛选,以获得 CD14 基因稳定沉默的 RAW264.7-psi-LVRU6P-CD14 细胞系(Control-CD14 KD)。

1.5.3 RAW264.7-Coronin-1 Plus-psi-LVRU6P-CD14 细胞系的建立 采用 psi-LVRU6P-CD14、pMD2.G、psPAX2 三质粒包装系统用 Lipofectamine™ 3000 转染 HEK293T 细胞,48 h 后收集慢病毒上清离心过滤,于-80 ℃保存。将慢病毒、10 μg/mL polybrene 加入 Coronin-1 Plus 细胞,6 h 后补齐培养液,24 h 后更换新鲜培养液,感染 48 h 加入嘌呤霉素筛选,以获得 CD14 基因稳定沉默的 RAW264.7-Coronin-1Plus-psi-LVRU6P-CD14 细胞系(Coronin-1 Plus-CD14 KD)。

1.6 Real-time PCR 检测

按 RNA 提取试剂盒说明分别提取各组细胞的 RNA,将其逆转录成 cDNA,以 cDNA 为模板进行实时定量 PCR 扩增,测定细胞 iNOS mRNA、ARG-1 mRNA、Coronin-1 mRNA、CD14 mRNA、内参 GAPDH mRNA 转录水平,引物序列见表 1。每个反应做 3 个复孔,结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析,ΔΔCt=对照组 ΔCt(目的基因 Ct-管家基因 Ct)-各组 ΔCt(目的基因 Ct-管家基因 Ct)。

表 1 Real-time PCR 引物序列与扩增长度

基因	引物序列(5′→3′)	扩增长度/bp
iNOS	上游 5′-CCCTTCAATGGTTGGTACATGG-3′ 下游 5′-ACATTGATCTCCGTGACAGCC-3′	127
ARG-1	上游 5′-CATATCTGCCAAAGACATCGT-3′ 下游 5′-CCAGCTTGTCTACTTCAGTCA-3′	185
Coronin-1	上游 5′-CACCCGGACACAATCTACAGC-3′ 下游 5′-CTCGATGACACGAACTCGCTT-3′	90
CD14	上游 5′-ATACCTTCTAAAGCGTGTGGAC-3′ 下游 5′-GGCTCCGAATAGAATCCGACT-3′	127
GAPDH	上游 5′-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3′ 下游 5′-GGGGTCGTTGATGGCAACA-3′	126

1.7　Western blot 检测

RIPA 裂解液提取各组细胞的总蛋白,BCA 试剂用于检测各组蛋白浓度。经 SDS-PAGE 电泳,恒流电转至 PVDF 膜。用 5%脱脂牛奶封闭 1~2 h,加入相应的一抗于 4 ℃过夜孵育;TBST 洗涤后,加入 HRP 标记的兔/鼠二抗,室温条件下孵育 2 h,TBST 洗涤后,用 ECL 化学发光试剂盒在 Bio-Rad 凝胶成像仪上显影,使用 Image Lab 分析条带灰度值。

1.8　蛋白质互作网络(PPI)、GO 功能富集分析

使用 GeneMANIA(http://genemania.org/)生物数据库[13],基于已知和预测的蛋白质相互作用,构建蛋白质相互作用网络。借助 R 语言对 GO 的结果进行可视化处理。

1.9　统计学分析

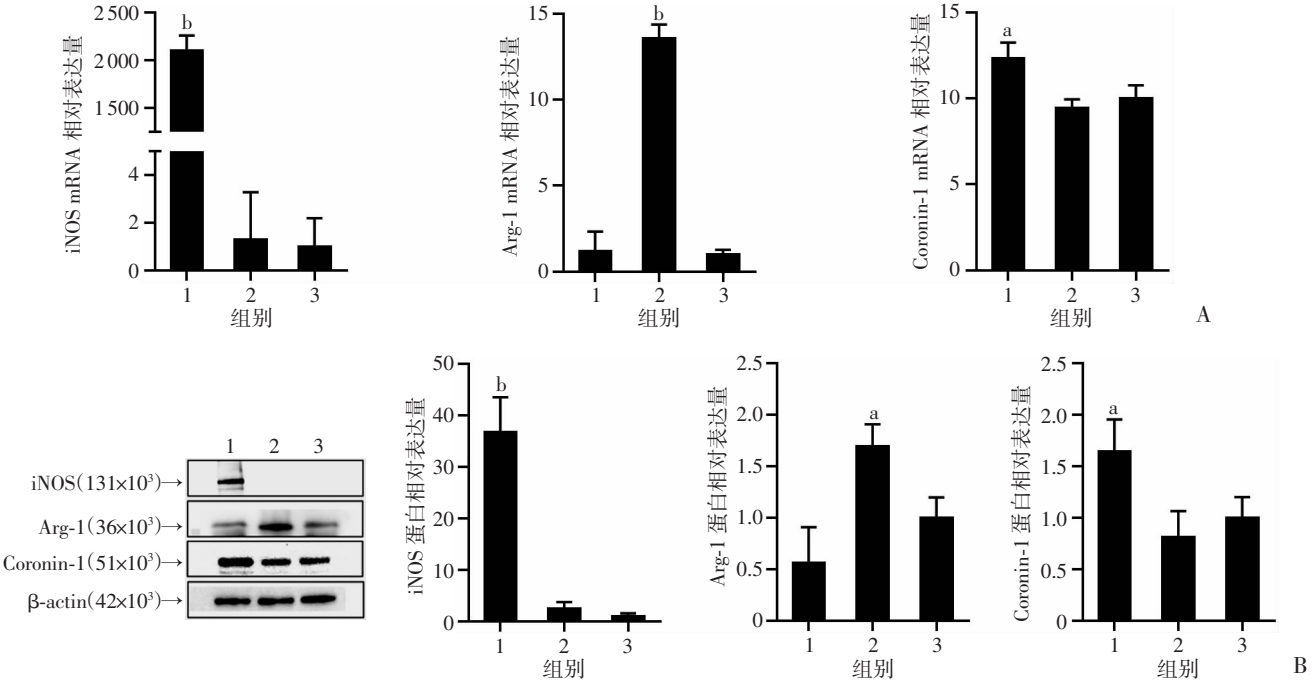
实验均独立重复 3 次,数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据分析,各组间比较用单因素方差分析;两组数据的比较使用独立样本 t 检验。检验水准:$\alpha=0.05$。

2　结果

2.1　M1、M2 型巨噬细胞 Coronin-1 的表达

2.1.1　M1、M2 型巨噬细胞表型的鉴定　Real-time PCR 结果显示(图 1A):处理细胞 48 h 后,IFN-γ+LPS 处理组的 iNOS mRNA 表达显著高于 Control 组($P<0.01$),IL-4 处理组与 Control 组之间的差异无统计学意义。IL-4 处理组的 ARG-1 mRNA 表达显著高于 Control 组($P<0.01$),IFN-γ+LPS 处理组与 Control 组之间的差异无统计学意义。Western blot 结果显示(图 1B):IFN-γ+LPS 处理组的 iNOS 蛋白表达显著高于 Control 组($P<0.01$),IL-4 处理组与 Control 组之间的差异无统计学意义。IL-4 处理组的 ARG-1 蛋白表达显著高于 Control 组($P<0.05$),IFN-γ+LPS 处理组与 Control 组之间的差异无统计学意义。以上结果表明:IFN-γ+LPS 刺激诱导细胞后,iNOS 高表达;IL-4 刺激诱导细胞后,ARG-1 高表达。M1、M2 型巨噬细胞诱导成功。

2.1.2　M1、M2 型巨噬细胞 Coronin-1 的表达　Real-time PCR 结果显示(图 1A):IFN-γ+LPS 处理组的 Coronin-1 mRNA 表达显著高于 Control 组($P<0.05$),IL-4 处理组与 Control 组之间的差异无统计学意义。Western blot 结果显示(图 1B):IFN-γ+LPS 处理组的 Coronin-1 蛋白表达显著高于 Control 组($P<0.05$),而 IL-4 处理组与 Control 组之间的差异无统计学意义。以上结果显示:M1 型巨噬细胞的 Coronin-1 mRNA 和蛋白水平显著高于 M2 型巨噬细胞及对照组。



1:IFN-γ+LPS 处理组;2:IL-4 处理组;3:Control 组;a:$P<0.05$, b: $P<0.01$,与 Control 组比较

A: Real-time PCR 检测各组细胞 iNOS、Arg-1、Coronin-1 mRNA 转录水平; B: Western blot 检测各组细胞 iNOS、Arg-1、Coronin-1 蛋白表达

图 1　M1、M2 型巨噬细胞表型鉴定以及 Coronin-1 的表达

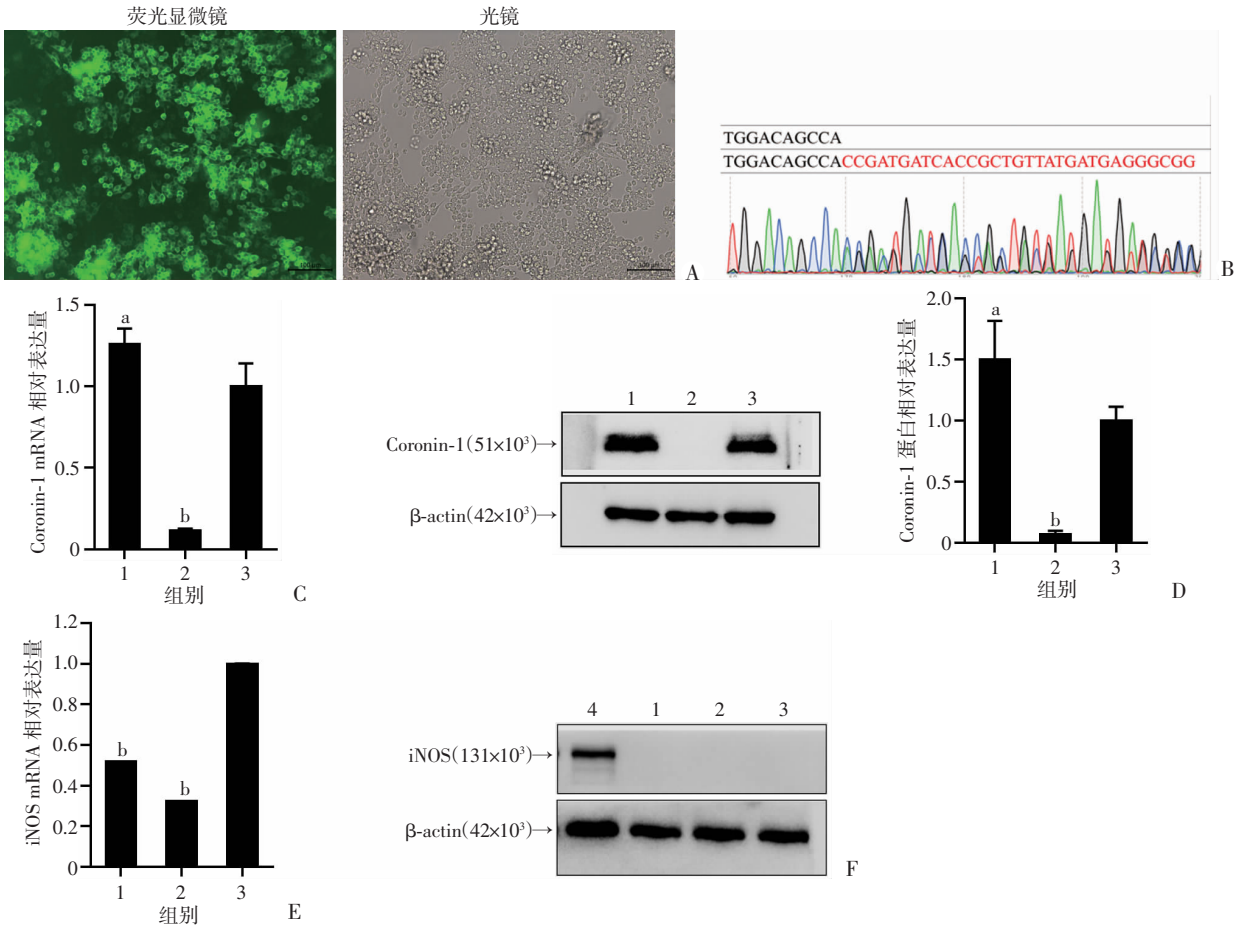
2.2　过表达或敲除 Coronin-1 对 M1 型巨噬细胞极化的影响

2.2.1　过表达 Coronin-1 细胞系的建立　　将 pEGFP-C1-Coronin-1 质粒转染 RAW264.7 细胞,经 G418 加压筛选后,RAW264.7-pEGFP-C1-Coronin-1 细胞均带绿色荧光,提示稳定转染细胞系构建成功(图 2A)。

2.2.2　CRISPR/Cas9 敲除 Coronin-1 细胞系的建立　　用 lentiCRISPR-v2-Coronin-1 慢病毒感染 RAW264.7 细胞,经嘌呤霉素筛选后,通过对扩增产物进行测序,结果显示(图 2B):RAW264.7-lentiCRISPR-v2-Coronin-1 发生碱基插入及缺失,并在靶点的测序峰图显示有套峰现象,表明 CRISPR/Cas9 敲除细胞系构建成功。

2.2.3　Coronin-1 过表达、敲除细胞系的鉴定　　Real-time PCR 结果显示(图 2C):过表达组(Coronin-1 Plus)的 Coronin-1 mRNA 表达显著高于 Control 组($P<0.05$),敲除组(Coronin-1 KO)的 Coronin-1 mRNA 表达显著低于 Control 组($P<0.01$)。Western blot 结果显示(图 2D):Coronin-1 Plus 组的 Coronin-1 蛋白表达显著高于 Control 组($P<0.05$),Coronin-1 KO 的 Coronin-1 蛋白显著低于 Control($P<0.01$)。Coronin-1 Plus 过表达率为 50.2%,Coronin-1 KO 敲除率为 93.0%,表明 Coronin-1 Plus 细胞系和 Coronin-1 KO 细胞系构建成功。

2.2.4　Coronin-1 过表达、敲除细胞系 iNOS 的检测　　Real-time PCR 结果显示(图 2E):Coronin-1 Plus 组的 iNOS mRNA 表达显著低于 Control 组($P<0.01$)。Western blot 结果显示(图 2F):Coronin-1 Plus、Coronin-1 KO、Control 均不表达 iNOS 蛋白。以上结果表明:M1 型巨噬细胞 Coronin-1 表达显著高于 M2 型巨噬细胞及 Control,而过表达 Coronin-1 不能将巨噬细胞极化为 M1 型,Coronin-1 的高表达是由 M1 型巨噬细胞极化导致的。



1:Coronin-1 Plus 组;2:Coronin-1 KO 组;3:Control 组;4:Control+LPS 阳性对照;a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与 Control 组比较

A:镜下观察 pEGFP-C1-Coronin-1 质粒稳定转染 RAW264.7 细胞的变化(×100);B:RAW264.7/lentiCRISPR-v2-Coronin-1 测序结果;C:Real-time PCR 检测 Coronin-1 mRNA 转录水平;D:Western blot 检测 Coronin-1 蛋白表达;E:Real-time PCR 检测 iNOS mRNA 转录水平;F:Western blot 检测 iNOS 蛋白表达

图 2　过表达或敲除 Coronin-1 对 M1 型巨噬细胞极化的影响

2.3 PPI、GO 分析

构造蛋白质互作网络(图 3A),PPI 分析结果显示:Tlr4、Capzb、Dkk1、Lbp、Tlr6、Ncf4、Ly96、Myd88 等 20 个基因与 Coronin-1 和 CD14 存在相互作用关系。GO 分析结果显示:这些基因主要富集在受体复合物、脂筏、膜微结构域、Toll 样受体信号通路、模式识别受体信号通路、脂多糖介导的信号通路、肿瘤坏死因子的产生等(图 3B)。以上结果表明:Coronin-1 不但参与 LPS 诱导的 M1 型巨噬细胞极化,而且与 CD14 存在直接或者间接的相互作用关系。

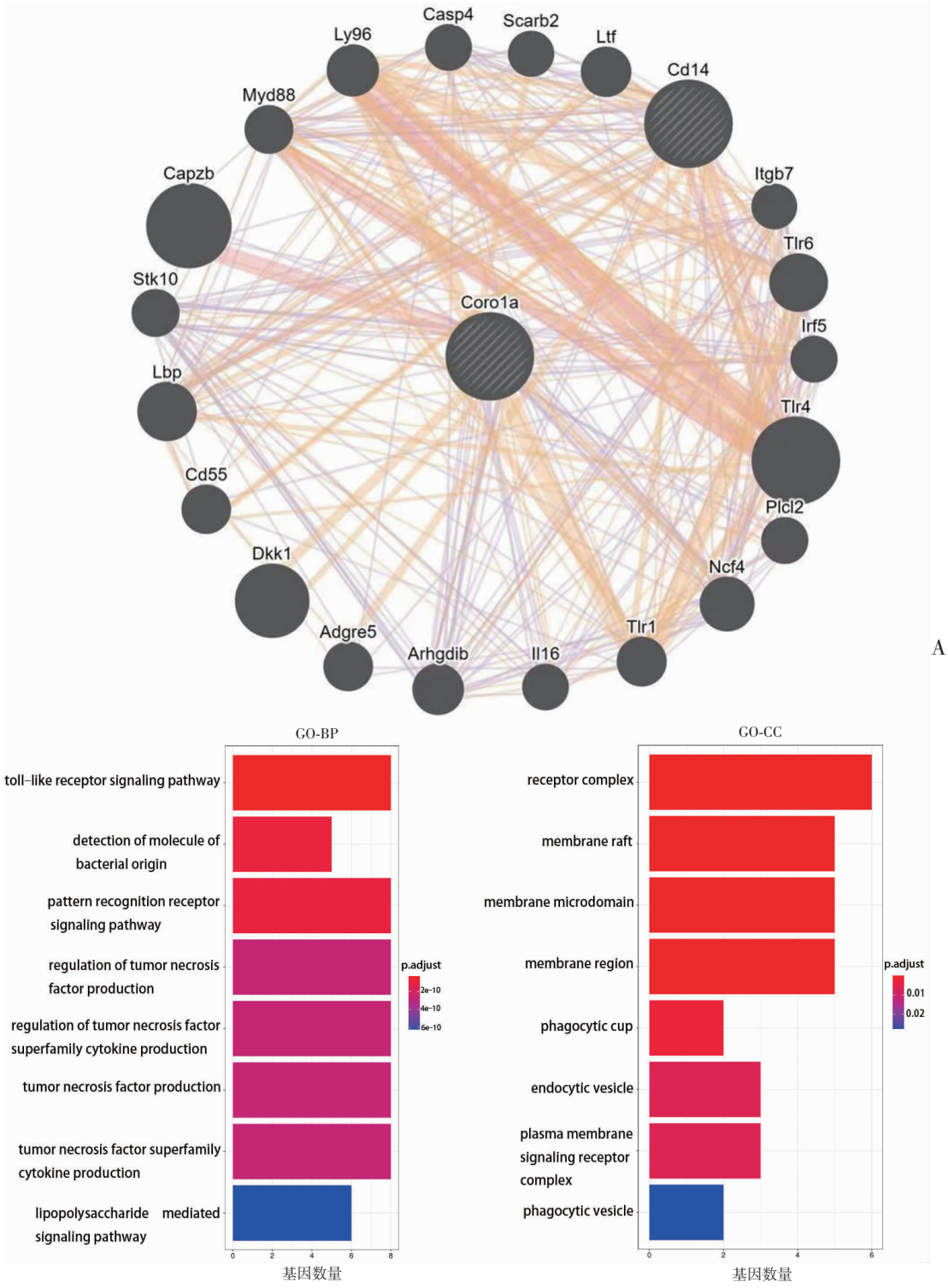


图 3 Coronin-1 与 CD14 共表达基因的 PPI(A)、GO 分析(B)

2.4 过表达或敲除 Coronin-1 对 CD14 表达的影响

Real-time PCR 结果显示(图 4A):Coronin-1 Plus 组的 CD14 mRNA 表达显著高于 Control 组($P<0.05$),Coronin-1 KO 组与 Control 组之间的差异无统计学意义。Western blot 结果显示(图 4B):Coronin-1 Plus 组的 CD14 蛋白表达显著高于 Control 组($P<0.05$),Coronin-1 KO 组与 Control 组之间的差异无统计学意义。以上结果表明:Coronin-1 过表达会引起 CD14 高表达。

2.5 过表达或敲除 Coronin-1 对 LPS 介导的 M1 型巨噬细胞极化的影响

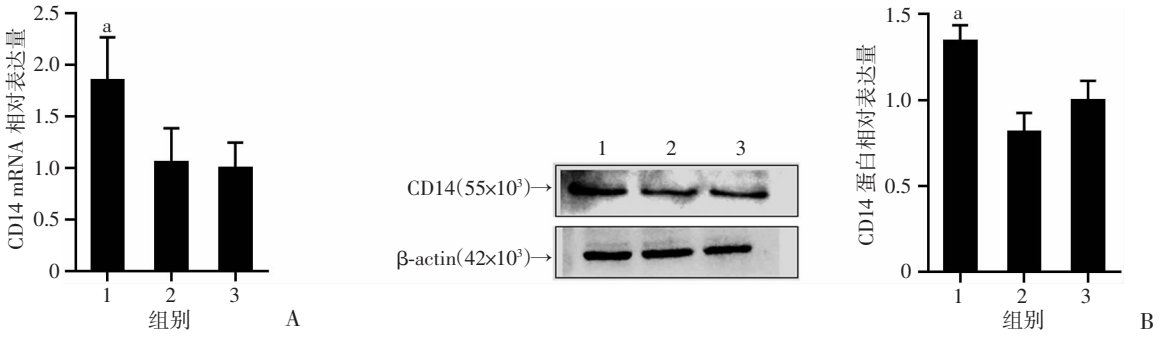
Real-time PCR 结果显示(图 5A):LPS(100 ng/mL)处理 48 h 后,Coronin-1 Plus+ LPS 组的 iNOS mRNA 表达显著高于 Control+LPS 组($P<0.01$),Coronin-1 KO+LPS 组与 Control+LPS 组之间的差异无统计学意义。Western blot 结果显示(图 5B):Coronin-1 Plus+LPS 组的 iNOS 蛋白表达显著高于 Control+LPS 组($P<0.01$),而 Coronin-1 KO+LPS 组与 Control+LPS 组之间的差异无统计学意义。以上结果表明:Coronin-1 过表达对 LPS 介导的 M1 型巨噬细胞极化有促进作用。

2.6 Coronin-1 正常表达、Coronin-1 过表达 CD14 沉默的细胞系的建立

2.6.1 Coronin-1 正常表达 CD14 沉默的细胞系的鉴定 Real-time PCR 结果显示(图 6A):Control-CD14 KD 组的 CD14 mRNA 表达显著低于 Control 组($P<0.05$)。Western blot 结果显示(图 6B):Control-CD14 KD 组的 CD14 蛋白表达显著低于 Control 组($P<0.05$)。以上结果表明:Control-CD14 KD 细胞系构建成功,其沉默效率为 54.3%。

2.6.2 Coronin-1 过表达 CD14 沉默的细胞系的鉴定

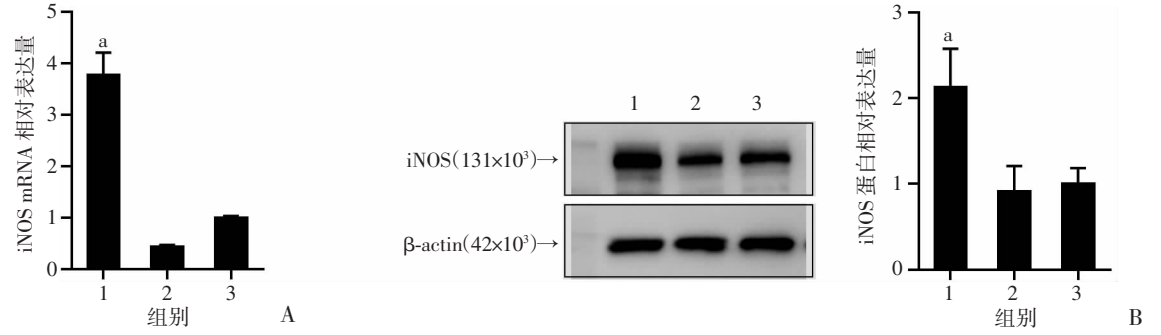
Real-time PCR 结果显示(图 6A):Coronin-1 Plus-CD14 KD 组的 CD14 mRNA 表达显著低于 Coronin-1 Plus 组($P<0.01$)。Western blot 结果显示(图 6B):Coronin-1 Plus-CD14 KD 组的 CD14 蛋白表达显著低于 Coronin-1 Plus($P<0.05$)。以上结果表明:Coronin-1 Plus-CD14 KD 细胞系构建成功,其沉默效率为 62.1%。



1:Coronin-1 Plus 组;2:Coronin-1 KO 组;3:Control 组;a:$P<0.05$,与 Control 组比较

A:Real-time PCR 检测 CD14 mRNA 转录水平; B:Western blot 检测 CD14 蛋白表达

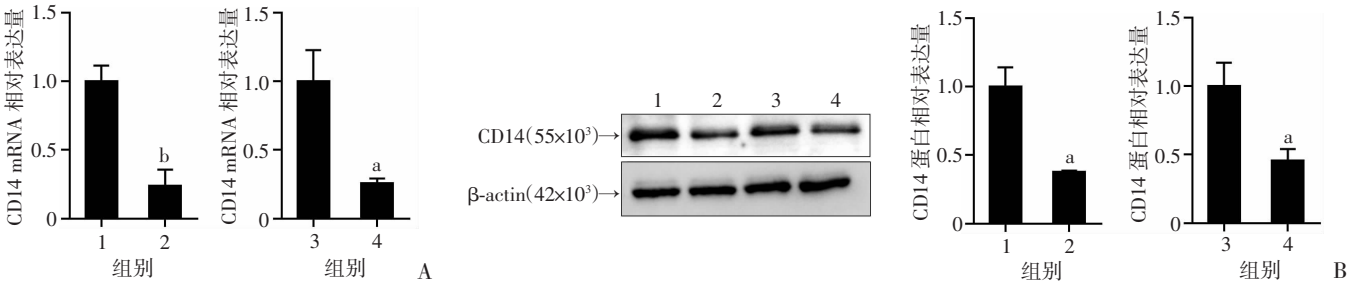
图 4 Coronin-1 不同表达水平细胞 CD14 mRNA 和蛋白表达



1:Coronin-1 Plus+LPS 组;2:Coronin-1 KO+LPS 组;3:Control+LPS 组;a:$P<0.01$, 与 Control+LPS 组比较

A:Real-time PCR 检测 iNOS mRNA 转录水平; B:Western blot 检测 iNOS 蛋白表达

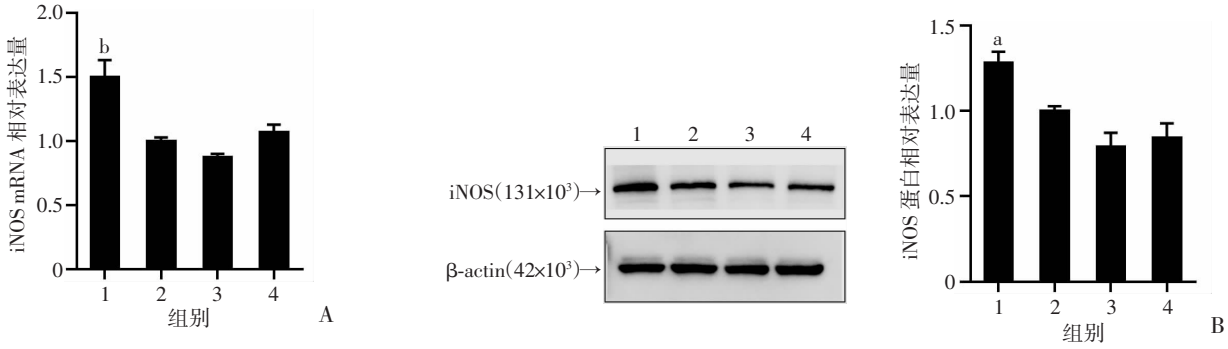
图 5 LPS 处理后 Coronin-1 不同表达水平细胞 iNOS mRNA 和蛋白表达



1：Coronin-1 Plus 组；2：Coronin-1 Plus-CD14 KD 组；3：Control 组；4：Control-CD14 KD 组；a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 Coronin-1 Plus 组或 Control 组比较

A：Real-time PCR 检测 CD14 mRNA 转录水平；B：Western blot 检测 CD14 蛋白表达

图 6　CD14 沉默的细胞系鉴定



1：Coronin-1 Plus+LPS 组；2：Control+LPS 组；3：Coronin-1 Plus-CD14 KD+LPS 组；4：Control-CD14 KD+LPS 组；a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 Control+LPS 组比较

A：Real-time PCR 检测 iNOS mRNA 转录水平；B：Western blot 检测 iNOS 蛋白表达

图 7　CD14 在 Coronin-1 过表达的巨噬细胞 M1 型极化中的作用

2.7　CD14 在 Coronin-1 过表达的巨噬细胞 M1 型极化中的作用

Real-time PCR 结果显示(图 7A)：LPS(100 ng/mL)处理 48 h 后，Coronin-1 Plus+LPS 组的 iNOS mRNA 表达显著高于 Control+LPS 组($P<0.01$)，Control-CD14 KD +LPS、Coronin-1 Plus-CD14 KD+LPS 组与 Control+LPS 组之间的差异无统计学意义。Western blot 结果显示(图 7B)：Coronin-1 Plus+LPS 组的 iNOS 蛋白表达显著高于 Control+LPS 组($P<0.05$)，Control-CD14 KD+LPS、Coronin-1 Plus-CD14 KD+LPS 组与 Control+LPS 组之间的差异无统计学意义。以上结果表明：Coronin-1 过表达在 LPS 介导的 M1 型巨噬细胞极化是通过 CD14 来发挥促进作用的。

3　讨论

巨噬细胞活化可被分成 M1 型巨噬细胞、M2 型巨噬细胞两大类[14]，其中 M2 型又可分为 M2a、M2b 和 M2c 三种类型[6]。M1(经典活化型)，通常是由 IFN-γ、LPS 等刺激诱导巨噬细胞分化而来，CD86 和 MHC Ⅱ 表达增高，分泌促炎介质 iNOS、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor alpha，TNF-α)、白细胞介素(interleukin，IL)-1、IL-6、IL-12 等。M1 具有防御病原体侵入、抗肿瘤等功能。M2(替代活化型)通常是由 IL-4 或 IL-13 刺激诱导巨噬细胞分化而来，高表达 CD206 和 Arg-1，在促进伤口的愈合以及组织重构等重要过程中发挥作用。肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophage，TAM)是存在于肿瘤微环境中最为丰富的免疫细胞，约占其中免疫细胞的 50%以上，研究表明 TAM 多具有 M2 的表型和功能[15]，为肿瘤发生、发展和侵袭转移提供了便利条件。Coronins 肌动蛋白细胞骨架调节因子家族共有 7 个成员，包括 Coronin 1A(Coronin-1，p57，TACO，ClipinA)、Coronin 1B(Coronin-2，coroninSE)、Coronin 1C(Coronin-3)、Coronin 2A(Coronin-4，IR10，ClipinB，WDR2)、Coronin 2B(Coronin-5，ClipinC)、

Coronin 6、Coronin 7(POD)[16]。Coronin-1 广泛表达于白细胞中[17],对巨噬细胞中结核杆菌的持留[18]、T 细胞的生存[1]至关重要。课题组在前期研究发现 Coronin-1 过表达能抑制巨噬细胞 TLR4 的表达[10],鉴于 TLR4 是 M1 型巨噬细胞诱导的重要途径,故推断 Coronin-1 可能参与了巨噬细胞的极化。本研究构建了 M1、M2 型巨噬细胞模型,研究了 Coronin-1 蛋白在不同极化类型中的表达量。结果显示 M1 型巨噬细胞 Coronin-1 的表达量高于 M2 组和对照组,证实了巨噬细胞的极化状态与 Coronin-1 存在一定的相关性。本研究构建了 Coronin-1 过表达、敲除细胞系,在此基础上研究巨噬细胞中 Coronin-1 不同表达水平能否引起巨噬细胞极化为 M1 型。结果显示 M1 型巨噬细胞 Coronin-1 高表达,但过表达 Coronin-1 不会使巨噬细胞极化为 M1 型。证实了 Coronin-1 与巨噬细胞极化的因果关系,即巨噬细胞极化可导致 Coronin-1 的高表达,但是 Coronin-1 的高表达不能直接导致巨噬细胞极化为 M1 型,提示 Cononin-1 参与了巨噬细胞极化的某个环节。

CD14 是 LPS 受体,通过识别、结合 LPS/LBP 蛋白复合物,将 LPS 呈递给 TLR4/MD-2[19]。本研究通过 PPI 和 GO 分析了 Coronin-1 和 CD14 蛋白互作和相关通路的富集,结果显示 Tlr4、Capzb、Dkk1、Lbp、Tlr6、Ncf4、Ly96、Myd88 等 20 个基因与 Coronin-1 和 CD14 存在相互作用关系。GO 分析结果显示这些基因主要富集在受体复合物、脂筏、膜微结构域、Toll 样受体信号通路、模式识别受体信号通路、LPS 介导的信号通路、肿瘤坏死因子的产生等。本研究检测了 Coronin-1 不同表达水平的 CD14 表达量,结果显示 Coronin-1 过表达能引起 CD14 的高表达。用 LPS 处理 Coronin-1 过表达、敲除、正常表达 3 组细胞,结果显示 Coronin-1 过表达组的 iNOS 表达量高于对照组。为了探究 Coronin-1 过表达组经 LPS 处理后,iNOS 的高表达是否是因为 CD14 的高表达引起,本研究构建了 Coronin-1 正常表达 CD14 沉默、Coronin-1 过表达 CD14 沉默的细胞系,经 LPS 处理后,结果显示 Coronin-1 过表达 CD14 沉默组和 Coronin-1 正常表达 CD14 沉默组 iNOS 表达量没有差异,这表示 Coronin-1 过表达对 LPS 介导的巨噬细胞 M1 型极化的促进是通过 CD14 来发挥促进作用的,而 Coronin-1 正常表达 CD14 沉默组和对照组 iNOS 表达量没有差异。FU 等[20]研究发现 CD14 沉默对 TLR4 的表达没有影响,CD14 沉默的 RAW264.7 细胞中,高浓度的 LPS 仍能激活炎症反应通路。ESPARZA 等[21]研究结果显示:在没有 CD14 的情况下,白蛋白可以在没有 LBP 的帮助下结合 LPS 单体,并将它们递送到 TLR4/MD-2。由此推论:过表达 Coronin-1 引起的 CD14 上调在 LPS 刺激下能引起 iNOS 表达量升高,而沉默 CD14 后,LPS 以 CD14 非依赖方式激活了炎症通路,iNOS 表达量显示不具有显著性差异。目前,Coronin-1 对 CD14 的影响机制尚不清楚,本研究结果可为进一步探讨 Coronin-1 与 CD14 的关系及其在巨噬细胞极化中的作用及机制奠定基础。

参考文献:

[1] MUELLER P, MASSNER J, JAYACHANDRAN R, *et al*. Regulation of T cell survival through coronin-1-mediated generation of inositol-1, 4, 5-trisphosphate and calcium mobilization after T cell receptor triggering[J]. Nat Immunol, 2008, 9(4): 424-431. DOI:10.1038/ni1570.

[2] PICK R, BEGANDT D, STOCKER T J, *et al*. Coronin 1A, a novel player in integrin biology, controls neutrophil trafficking in innate immunity[J]. Blood, 2017, 130(7): 847-858. DOI:10.1182/blood-2016-11-749622.

[3] HARALDSSON M K, LOUIS-DIT-SULLY C A, LAWSON B R, *et al*. The lupus-related Lmb3 locus contains a disease-suppressing Coronin-1A gene mutation[J]. Immunity, 2008, 28(1): 40-51. DOI:10.1016/j.immuni.2007.11.023.

[4] KAMINSKI S, HERMANN-KLEITER N, MEISEL M, *et al*. Coronin 1A is an essential regulator of the TGFβ receptor/SMAD3 signaling pathway in Th17 $CD4^+$ T cells[J]. J Autoimmun, 2011, 37(3): 198-208. DOI:10.1016/j.jaut.2011.05.018.

[5] FERRARI G, LANGEN H, NAITO M, *et al*. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of Mycobacteria[J]. Cell, 1999, 97(4): 435-447. DOI:10.1016/s0092-8674(00)80754-0.

[6] SCHMIEDER A, MICHEL J, SCHÖNHAAR K, *et al*. Differentiation and gene expression profile of tumor-associated macrophages[J]. Semin Cancer Biol, 2012, 22(4): 289-297. DOI:10.1016/j.semcancer.2012.02.002.

[7] CHEN J J W, LIN Y C, YAO P L, *et al*. Tumor-associated macrophages: the double-edged sword in cancer progression[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(5): 953-964. DOI:10.1200/jco.2005.12.172.

[8] OH H, PARK S H, KANG M K, *et al*. Asaronic acid attenuates macrophage activation toward M1 phenotype through inhibition of NF-κB pathway and JAK-STAT signaling in glucose-loaded murine macrophages[J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(36): 10069-10078. DOI:10.1021/acs.

jafc.9b03926.

[9] TANIGAWA K, SUZUKI K, KIMURA H, *et al*. Tryptophan aspartate-containing coat protein (CORO1A) suppresses Toll-like receptor signalling in Mycobacterium leprae infection [J]. Clin Exp Immunol, 2009, 156(3): 495-501. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2009.03930.x.

[10] 周静瑶, 陈全, 周芳妮, 等. 冠蛋白-1 不同表达水平对巨噬细胞 iNOS、TLRs 表达以及凋亡的影响[J]. 中国细胞生物学学报, 2017, 39(2): 148-156. DOI:10.11844/cjcb.2017.02.0271.
ZHOU J Y, CHEN Q, ZHOU F N, *et al*. The effects of coronin-1 with different expression levels on iNOS and TLRs expression and apoptosis in RAW264.7 cells[J]. Chin J Cell Biol, 2017, 39(2): 148-156. DOI:10.11844/cjcb.2017.02.0271.

[11] PŁÓCIENNIKOWSKA A, HROMADA-JUDYCKA A, BORZECKA K, *et al*. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling [J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72(3): 557-581. DOI:10.1007/s00018-014-1762-5.

[12] EDWARDS J P, ZHANG X, FRAUWIRTH K A, *et al*. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations[J]. J Leukoc Biol, 2006, 80(6): 1298-1307. DOI:10.1189/jlb.0406249.

[13] WARDE-FARLEY D, DONALDSON S L, COMES O, *et al*. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function[J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(web server issue): W214-W220. DOI:10.1093/nar/gkq537.

[14] ITALIANI P, BORASCHI D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical *vs*. functional differentiation[J]. Front Immunol, 2014, 5: 514. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00514.

[15] MANTOVANI A, SOZZANI S, LOCATI M, *et al*. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes [J]. Trends Immunol, 2002, 23(11): 549-555. DOI: 10.1016/s1471-4906(02)02302-5.

[16] UETRECHT A C, BEAR J E. Coronins: the return of the crown[J]. Trends Cell Biol, 2006, 16(8): 421-426. DOI:10.1016/j.tcb.2006.06.002.

[17] GATFIELD J, ALBRECHT I, ZANOLARI B, *et al*. Association of the leukocyte plasma membrane with the actin cytoskeleton through coiled coil-mediated trimeric coronin 1 molecules[J]. Mol Biol Cell, 2005, 16(6): 2786-2798. DOI:10.1091/mbc.e05-01-0042.

[18] JAYACHANDRAN R, SUNDARAMURTHY V, COMBA-LUZIER B, *et al*. Survival of Mycobacteria in macrophages is mediated by coronin 1-dependent activation of calcineurin [J]. Cell, 2007, 130(1): 37-50. DOI:10.1016/j.cell.2007.04.043.

[19] CIESIELSKA A, MATYJEK M, KWIATKOWSKA K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling[J]. Cell Mol Life Sci, 2021, 78(4): 1233-1261. DOI:10.1007/s00018-020-03656-y.

[20] FU Y J, XU B, HUANG S W, *et al*. Baicalin prevents LPS-induced activation of TLR4/NF-κB p65 pathway and inflammation in mice *via* inhibiting the expression of CD14 [J]. Acta Pharmacol Sin, 2021, 42(1): 88-96. DOI:10.1038/s41401-020-0411-9.

[21] ESPARZA G A, TEGHANEMT A, ZHANG D, *et al*. Endotoxin{middle dot}albumin complexes transfer endotoxin monomers to MD-2 resulting in activation of TLR4[J]. Innate Immun, 2012, 18(3): 478-491. DOI:10.1177/1753425911422723.

(**收稿**:2021-04-14;**修回**:2021-06-07)

(编辑 王 红)