DOI:10.16016/j.2097-0927.202306111

肝实质细胞抑制细菌增殖作用及机制研究

马 娓[1,2],舒俊傑[2],陈地友[3,4],王 丽[1],杨 霞[2],高强国[1] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)基础医学院细胞生物学教研室[1];400042 重庆,陆军特色医学中心:野战外科研究部战伤感染与特需药品研究室[2],放射科[3],野战外科研究部军事交通伤防治研究室[4]

[摘要] **目的** 探讨肝细胞通过直接吞噬和抗菌蛋白介导抑制细菌增殖的作用及其机制。**方法** 利用正常小鼠 FL83B 肝细胞系建立大肠杆菌感染模型,以小鼠 Kupffer 细胞系为对照,观察肝细胞对大肠杆菌的增殖影响;建立细菌-细胞和(或)细胞上清共培养体系,通过 Kupffer/FL83B 细胞及其 6、12、24 h 的上清与大肠杆菌的共培养,检测大肠杆菌的致死情况,明确肝细胞直接抑菌效应;通过吞噬功能检测肝细胞的吞噬能力,qRT-PCR、Western blot 检测相关基因的表达。**结果** 将大肠杆菌与细胞共孵育,发现 FL83B 细胞与 Kupffer 细胞类似,可直接抑制大肠杆菌的增殖($P<0.05$),且肝细胞自身保持高存活率;通过吞噬功能检测,明确了 FL83B 细胞可直接吞噬细菌颗粒;与对照组相比,感染后肝细胞内吞噬相关基因 Fcgr1、Marco、Cdc42、RhoB mRNA 上调,抗原递呈相关基因 β2M mRNA 上调,NF-κB、MAPK、STAT3 通路活化,且介导抗菌作用的相关蛋白 iNOS、NOX2、RhoB 表达上调($P<0.05$)。**结论** 小鼠 FL83B 肝细胞可直接通过吞噬作用和抗菌相关蛋白介导抑制细菌增殖。

[关键词] 肝细胞;细菌感染;吞噬作用

[中图法分类号] R322.47;R329.28;R378 [文献标志码] A

Inhibitory effect and underlying mechanism of hepatocytes on bacterial proliferation

MA Wei[1,2], SHU Junjie[2], CHEN Diyou[3,4], WANG Li[1], YANG Xia[2], GAO Qiangguo[1] [1]Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [2]Department of Wound Infection and Drug, [3]Department of Radiology, [4]Department of Military Traffic Injury Prevention and Treatment, Army Medical Center of PLA, Chongqing, 400042, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the role and mechanism of hepatocytes in inhibiting bacterial proliferation by phagocytizing bacteria directly and mediating the expression of antibacterial proteins indirectly. **Methods** Cellular model of *Escherichia coli* (*E. coli*) infection was established in normal murine hepatocyte line FL83B and mouse Kupffer cells to determine the effects of the cells on the proliferation of bacteria. After the bacteria were co-cultured with Kupffer/FL83B cells and the 6-, 12-, and 24-hour supernatants, respectively, the lethality of *E. coli* was determined for the direct bacteriostatic effect of the hepatocytes. The phagocytizing ability of FL83B cells were measured with phagocytosis reagent kit. qRT-PCR and Western blotting were employed to detect the expression of related molecules at mRNA and protein levels. **Results** When the hepatocyte were incubated with *E. coli*, FL83B cells, as Kupffer cells, could directly inhibit the proliferation of the bacteria ($P<0.05$) and maintained a high survival rate at same time. Phagocytic function test showed that FL83B cells could directly phagocytize bacterial particles. Compared with the FL83B cells without *E. coli* infection, the mRNA levels of phagocytosis-related genes Fcgr1, Marco, Cdc42, and RhoB were increased, that of antigen presentation related gene β2M was also upregulated, the NF-κB, MAPK, and STAT3 signaling pathways were activated, and the protein levels of antibacterial-related proteins iNOS, NOX2, and

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81772717,82172134)

马娓与舒俊傑对本文有同等贡献

[通信作者] 杨 霞,E-mail:oceanyx@126.com

高强国,E-mail:qiangguogao@163.com

2097-0927/Copyright © 2023, 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/)

RhoB were also enhanced in the cells after infection (all $P<0.05$). **Conclusion** Mouse FL83B hepatocytes possess the ability to inhibit bacteria through direct phagocytosis and indirect upregulation of antibacterial-related proteins.

[**Key words**] hepatocytes; bacterial infection; phagocytosis

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81772717, 82172134). MA Wei and SHU Junjie contributed equally to the article. Corresponding author: YANG Xia, E-mail: oceanyx@126.com; GAO Qiangguo, E-mail: qiangguogao@163.com

肝脏作为抵御血源、肠源病原体的重要防线[1-2],含有丰富的巨噬细胞、自然杀伤细胞,以及体内最大的内皮细胞网络,其免疫监测对宿主的免疫和生存至关重要[3]。Kupffer(枯否)细胞是肝内常驻的巨噬细胞,占体内总组织巨噬细胞的80%~90%,是宿主防御细菌感染早期阶段的关键组成部分[4]。脓毒症发生后,巨噬细胞功能下降,主要表现为吞噬能力下降、炎症因子减少及细胞凋亡增多等,严重威胁脓毒症患者的生存及预后[5-6]。因此,当发生免疫抑制后,研究肝脏中最大的细胞群体肝实质细胞在感染中的作用具有重要的生物学意义。研究表明,细菌感染的单核细胞、巨噬细胞等分泌细胞因子(如IL-6、IL-1、TNF-α等)刺激肝细胞产生相关蛋白或介质,促进杀菌作用,主要机制有:①分泌调理素介导杀菌,如C-反应蛋白(C-reactive protein,CRP)和血清淀粉样蛋白P成分(serum amyloid P,SAP)与细菌结合,激活补体系统在细菌或感染的宿主细胞膜上形成攻膜复合物裂解靶细胞;此外血清淀粉样蛋白A(serum amyloid A,SAA)与细菌外膜蛋白A家族成员结合以激活吞噬细胞的吞噬作用;②产生LPS(脂多糖)配体或受体活化机体固有免疫,如LBP(LPS结合蛋白)、CD14、MD-2蛋白,LPS与其结合后,活化TLR4-MD2下游通路;③分泌铁代谢相关蛋白限制细菌生长:如转铁蛋白与游离铁结合,限制细菌对铁的利用;脂运载蛋白-2通过与铁载体结合降低细菌对铁的吸收;铁调素通过调节血铁浓度,抑制宿主体内病原菌生长;④产生凝血因子纤维蛋白原激活补体或募集中性粒细胞产生其胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps,NETs)清除病原菌[7-8]。除分泌介导抗菌的相关蛋白外,肝脏上皮细胞作为非专职吞噬细胞还可通过内吞作用吞噬凋亡和坏死细胞,发生细胞套亡,维持稳态,但肝细胞在病原体攻击时是否发挥直接作用并不明确[9]。本研究以FL83B肝细胞建立细菌感染模型为切入点,探讨肝细胞在感染中的作用,为研究免疫细胞失调后传统非免疫细胞的先天免疫能力提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 小鼠肝Kupffer细胞(GPC0448)购自中国典型培养物保藏中心细胞库,FL83B肝细胞(CRL-2390)购自ATCC,大肠杆菌购自北纳生物。

1.1.2 主要试剂 RPMI1640培养基、Ham's F-12K培养基、胎牛血清、PBS缓冲液、胰蛋白酶购自Gibco公司;无酚红Ham's F-12K培养基购自武汉普诺赛生命科技有限公司;胰蛋白胨、酵母提取物等购自英国Oxiod公司;台盼蓝、青霉素链霉素溶液、蛋白裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;碘化丙啶溶液(PI;00-6990-50)、吞噬作用检测试剂盒(V6694)购自ThermoFisher Scientific公司;RNAiso Plus(9109),定量PCR专用反转录试剂PrimeScript™(RR047A),快速qPCR试剂TB Green®(RR820A)购自TaKaRa公司;p-NF-κB p65(3033)、NF-κB p65(8242)、p-STAT3(9134)、STAT3(4904)、p-p38 MAPK(4511)、p38 MAPK(9212)、iNOS(13120)、β-Tublin(2128)抗体购自Cell Signaling Technology公司;RhoB(sc-8048)、NOX2(sc-130543)购自Santa Cruz Biotechnology公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 Kupffer和FL83B细胞采用常规传代培养,分别用RPMI1640培养基、Ham's F-12K培养基(含体积分数为10%的胎牛血清、1%青霉素-链霉素溶液)于37 ℃、5%CO_2培养箱中进行培养。

1.2.2 大肠杆菌的制备 将-80 ℃保存的大肠杆菌用三线法接种于固体LB平板上,37 ℃过夜,复苏菌株。次日挑选单个菌落,接种于液体LB培养基中,于37 ℃,速度200 r/min摇动过夜。LB液体培养基:酵母提取物5.0 g、蛋白胨10.0 g、氯化钠10.0 g加水1 L后高压灭菌备用;固体培养基则是在1 L LB培养基中加入琼脂粉15.0 g,高压灭菌后分装至6 cm的培养皿中备用。

1.2.3 大肠杆菌生长曲线的绘制 将含有5×10^5CFU的大肠杆菌接种到分别含LB培养基、无酚红细胞培养基、Kupffer细胞(5×10^6个)和无酚红细胞培养基、FL83B肝细胞(5×10^6个)和无酚红细胞培养基的培养瓶中,置于37 ℃、5%CO_2培养箱中进行培养,并于指定时间点测定每组培养基中大肠杆菌的菌落形成单位(colony forming units,CFU),以大肠杆菌相对数量为纵坐标,培养时间为横坐标,绘制大肠杆菌的生长曲线。

1.2.4 死菌的测定 为了评估共培养后细胞及上

清对细菌的影响,用碘化丙啶(PI)对细菌进行染色,因为 PI 无法进入质膜完整的细胞,膜受损的细胞被认为已经死亡或垂死,会染上红色。将细菌与 PI 共孵育 90 min,通过分光光度计分别在 535 nm 和 617nm 的激发和发射波长下测定相对荧光强度。

1.2.5 吞噬能力的检测 采用吞噬测定试剂盒检测 FL83B 肝细胞的吞噬能力,该试剂盒含有荧光素标记的大肠杆菌颗粒,吞入细胞的大肠杆菌可被分光光度计或者荧光显微镜检测到,细胞外的荧光可被试剂盒中的台盼蓝淬灭。将荧光素标记的大肠杆菌与细胞共培养 2 h(在无细胞孔中加入等量荧光菌作为阴性对照),用分光光度计分别在 480 nm 和 520 nm 的激发和发射波长下测定荧光强度;用 Olympus 荧光显微镜观察细胞吞噬情况并拍照。

1.2.6 qRT-PCR 实验 每组 FL83B 肝细胞约 2.5×10^6 个,将 1.5×10^6CFU 的大肠杆菌加入各组感染 6、12、24 h,收集细胞团块,使用 RNAiso Plus 试剂提取细胞总 RNA。按照定量 PCR 反转录试剂盒反转录成 cDNA。按照快速 qPCR 试剂盒说明书配制反应溶液,采用 CFX-96 real-time PCR system(Bio-Rad 公司)完成反应。引物由擎科生物设计合成,Fcgr1 上游:5′-FAGGTTCCTCAATGCCAAGTGA-3′,下游:5′-GCGACCTCCGAATCTGAAGA-3′;Marco 上游:5′-ACAGAGCCGATTTTGACCAAG-3′,下游:5′-CAGCAGTGCAGTACCTGCC-3′;Cdc42 上游:5′-TGGGTGCCTGAGATAACTCACC-3′,下游:5′-GCACTCCACATACTTGACAGCC-3′;RhoB 上游:5′-CAACTGCTGCAAGGTGCTATG-3′,下游:5′-CCAGCAGATGTCAGGCAGTC-3′;H2-K1 上游:5′-GGGAGCCCCGGTACATGGAA-3′,下游:5′-GGTGACTTTATCTTCAGGTCTGCT-3′;β2M 上游:5′-ATGGCTCGCTCGGTGACCCTG-3′,下游:5′-ATTGCTCAGCTATCTAGGATA-3′;GAPDH 上游:5′-CAGTGGCAAAGTGGAGATTGTTG-3′,下游:5′-TCGCTCCTGGAAGATGGTGAT-3′。

1.2.7 Western blot 实验 每组 FL83B 肝细胞约 5×10^6 个,将 3×10^6CFU 的大肠杆菌加入各组感染 6、12、24 h,收集细胞团块,加入适量含蛋白酶/磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液,冰上裂解细胞,12 000×g 离心 10 min 后取上清进行 BCA 蛋白定量,加入 5×loading buffer 制成蛋白样本,用于常规 Western blot 检测。抗体 p-NF-κB p65、NF-κB p65、p-STAT3、STAT3、p-p38 MAPK、p38 MAPK、iNOS、β-tublin 稀释比例均为 1∶1 000,RhoB、NOX2 稀释比例均为 1∶500。

1.3 统计学分析

每个实验均独立重复 3 次,采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行数据分析。采用 Student's t 检验或重复测量设计。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

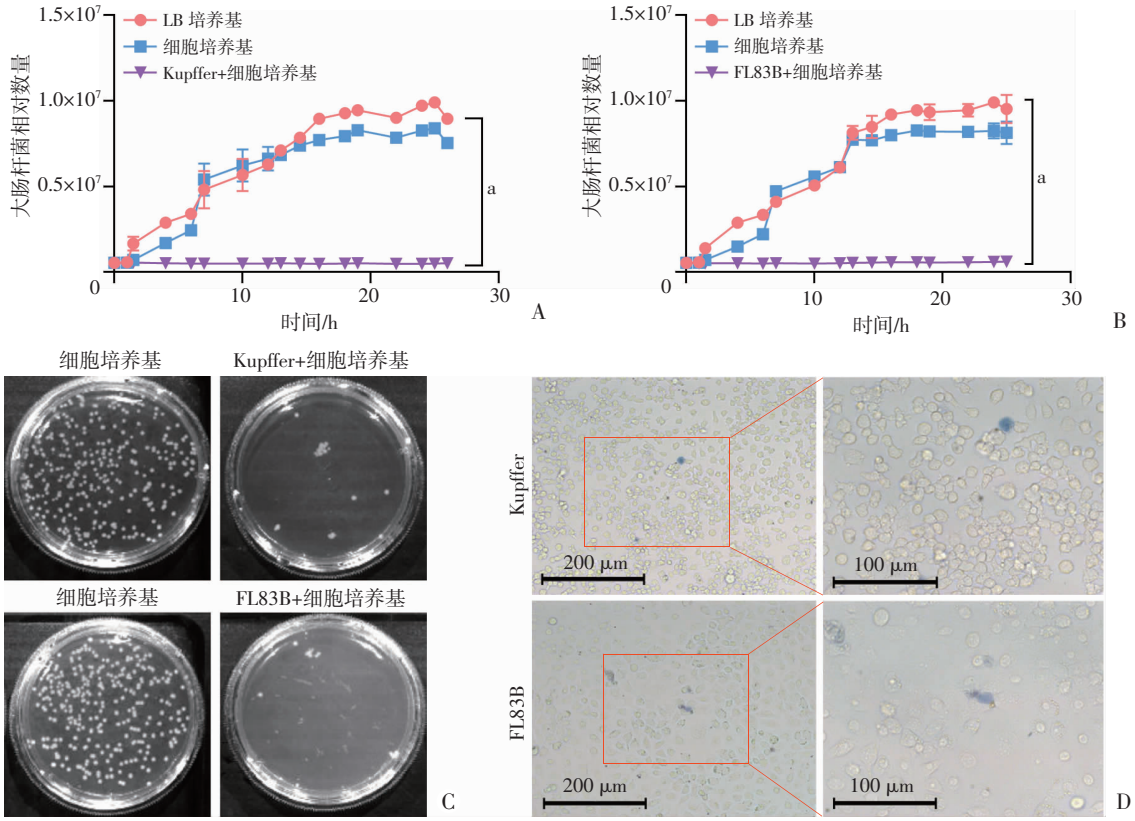
2 结果

2.1 FL83B 肝细胞可抑制大肠杆菌的增殖

为探究肝细胞是否发挥直接抑菌作用,前期通过预实验测定了细菌感染细胞系模型的最佳细菌/细胞比例,如果细菌细胞比例过大,细胞(包括免疫细胞)会迅速死亡,无法较好观察到抑菌现象;而比例过小,细菌增殖缓慢,无法成功构建细菌感染细胞系模型。最终确定了 5×10^5CFU(细菌)/5×10^6(细胞)的最佳比率进行本研究。在 Kupffer 细胞和 FL83B 肝细胞正常生长的培养瓶中分别接种等量的大肠杆菌,于不同时间点测定大肠杆菌的 CFU,评估其增殖情况,同步设置 LB 培养基、无酚红细胞培养基组为对照。接种大肠杆菌后,置于 37 ℃、5%CO_2 培养箱中进行培养,并于 0、1、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26 h 测定每组培养基中大肠杆菌的 CFU,以大肠杆菌数量为纵坐标,培养时间为横坐标,绘制大肠杆菌的生长曲线。如图 1A、B 所示,从 4 h 开始,相较于 LB 培养基组和细胞培养基组,与 Kupffer 细胞和 FL83B 肝细胞共培养的大肠杆菌增殖量显著减少($P<0.05$),说明与细胞共培养的大肠杆菌生长受到抑制;而细胞培养基与 LB 培养基两组的大肠杆菌生长差异无统计学意义,即所用的无酚红细胞培养基不影响细菌的生长。为直观显示大肠杆菌数量差异,取细胞培养基组、细胞共培养组 24 h 培养基稀释后涂于 LB 固体培养基上,结果显示与 Kupffer 细胞和 FL83B 肝细胞共培养的大肠杆菌数量明显少于细胞培养基组(图 1C)。为检测细胞存活率,将与细菌共培养 24 h 的两种细胞进行台盼蓝染色,两组均只有少量细胞死亡(图 1D)。以上结果说明肝细胞可抑制大肠杆菌的增殖,且自身细胞活性不受影响。

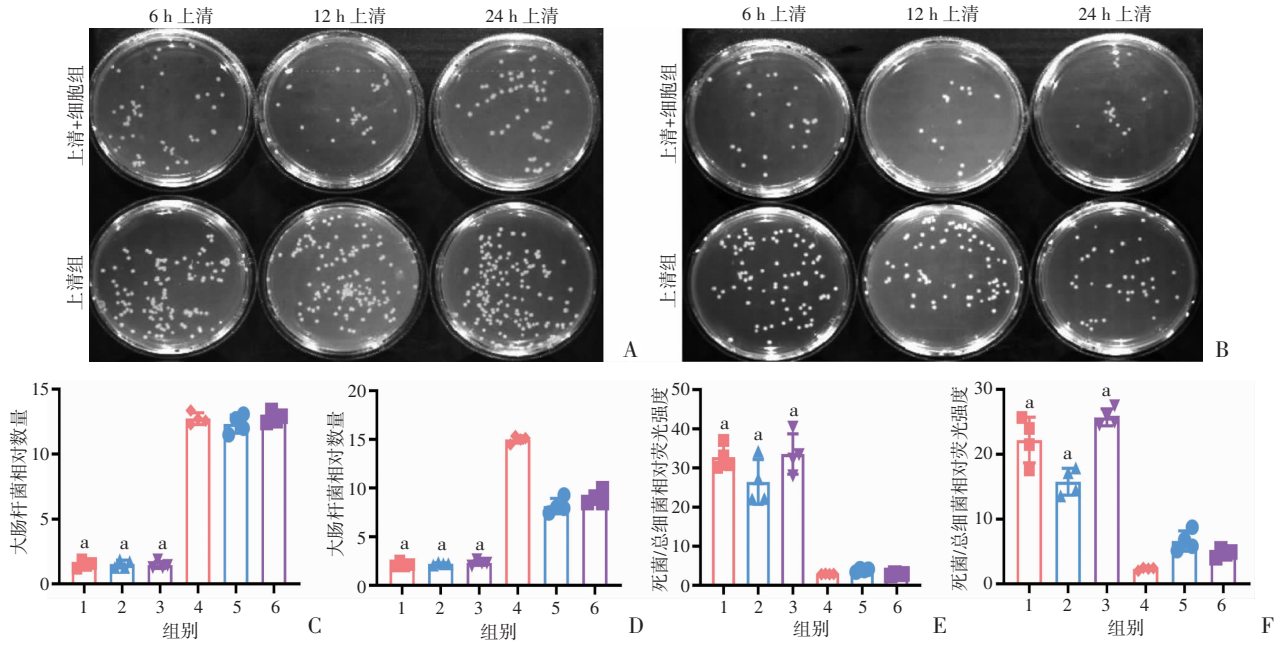
2.2 FL83B 肝细胞对大肠杆菌增殖发挥直接抑制作用

为明确 FL83B 肝细胞对细菌的抑制是直接作用还是通过分泌细胞因子等间接作用,在 6、12、24 h 收集正常培养的 Kupffer 和 FL83B 的细胞培养基,离心取上清,将 6、12、24 h 上清分别加入含细胞或空白培养孔中,并加入等量大肠杆菌共培养,检测大肠杆菌的增殖情况。将共培养的各组上清分别涂于 LB 平板上,发现上清联合细胞组的大肠杆菌菌落数低于单独上清组(图 2A、B),测量各组上清中大肠杆菌 CFU 也获得一致结果(图 2C、D),差异有统计学意义($P<0.05$)。为进一步研究对细菌的杀伤作用,对大肠杆菌进行 PI 染色,发现上清联合细胞组的相对死菌数量明显大于单独上清组($P<0.05$,图 2E、F),说明上清联合细胞组对细菌的杀伤作用大于单独上清组。即肝细胞可通过细胞接触直接抑制大肠杆菌增殖。



A、B:分别为 Kupffer 细胞、FL83B 肝细胞生长体系中大肠杆菌的生长曲线 a:$P<0.05$;C:Kupffer 细胞、FL83B 肝细胞生长体系中大肠杆菌在 LB 平板上生长菌落;D: Kupffer 细胞、FL83B 肝细胞台盼蓝染色

图 1 不同条件下大肠杆菌的生长情况和细胞完整性



1:细胞联合 6 h 细胞培养上清组;2:细胞联合 12 h 细胞培养上清组;3:细胞联合 24 h 细胞培养上清组;4:6 h 细胞培养上清组;5:12 h 细胞培养上清组;6:24 h 细胞培养上清组; a:$P<0.05$,分别与相应单独上清组比较
A、B:Kupffer 细胞、FL83B 肝细胞生长体系中大肠杆菌在 LB 平板上生长菌落;C、D:Kupffer 细胞、FL83B 肝细胞生长体系中大肠杆菌计数;E、F:Kupffer 细胞、FL83B 肝细胞生长体系中大肠杆菌总数中的相对死菌量

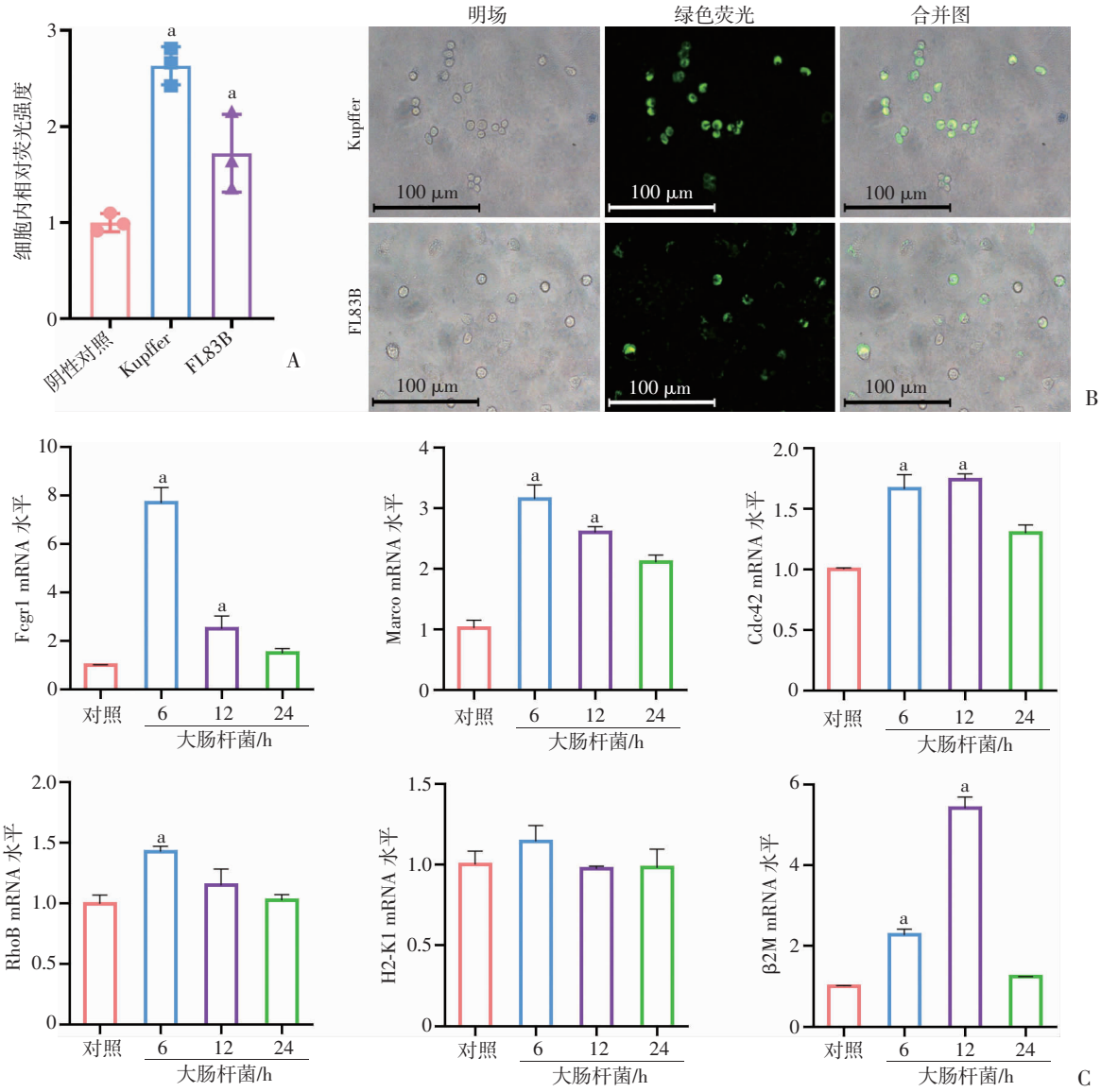
图 2 不同培养条件下大肠杆菌生长情况

2.3 FL83B 肝细胞可直接吞噬大肠杆菌

FL83B 肝细胞胞内荧光强度显著高于阴性对照(无细胞孔)($P<0.05$,图 3A)。用 Olympus 荧光显微镜观察各组荧光,结果显示,FL83B 细胞类似于 Kupffer 细胞,可在胞内观察到荧光颗粒(图 3B)。qRT-PCR 对吞噬和抗原递呈相关分子进行检测(图 3C),结果显示与未处理肝细胞相比,大肠杆菌感染 6 h 后,与吞噬相关受体 Fcgr1、Marco、Cdc42 和 RhoB mRNA 水平显著增加($P<0.05$);与 MHCI 抗原递呈相关分子检测发现,H2-K1 mRNA 在 6 h 出现升高趋势,但差异无统计学意义;β2M mRNA 在 6 h 后逐渐升高($P<0.05$),并于 12 h 到达峰值后迅速降低。以上结果显示,肝细胞在应对细菌感染时,具备细菌吞噬能力和抗原递呈能力。

2.4 大肠杆菌激活 FL83B 细胞的 NF-κB、MAPK、STAT3 信号通路

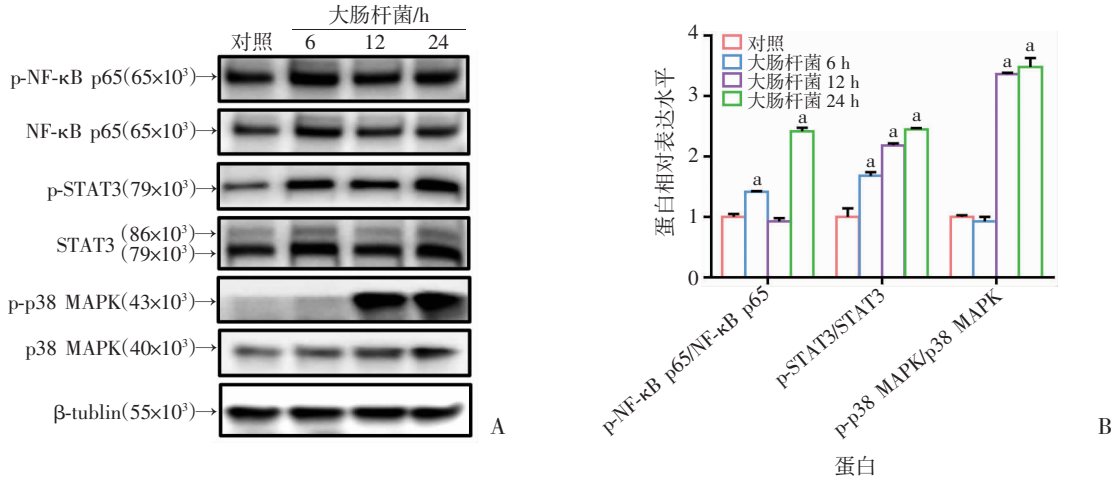
为探究细菌感染时肝细胞活化的信号通路,通过检测大肠杆菌感染 FL83B 肝细胞 6、12、24 h 的蛋白,发现 NF-κB 信号通路中 p-p65 的表达显著增加($P<0.05$),表明 NF-κB 信号通路被激活;p-STAT3 随大肠杆菌感染呈时间依赖性增加($P<0.05$);大肠杆菌感染 12、24 h 后,p-p38 MAPK 显著增加($P<0.05$),见图 4,表明 MAPK 通路活化。提示细菌感染可直接激活肝细胞内 NF-κB、MAPK、STAT3 信号通路。



a: $P<0.05$,与对照组比较

A:肝细胞吞噬细菌后荧光强度的表达;B:肝细胞吞噬细菌后细胞内荧光颗粒的检测;C:qRT-PCR 检测大肠杆菌感染后 FL83B 细胞中相关分子的 mRNA 表达

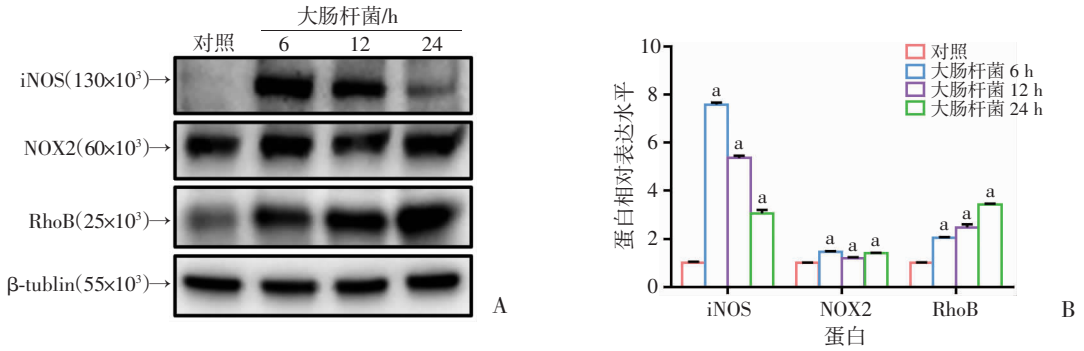
图 3 FL83B 的吞噬功能及相关分子 mRNA 表达水平



a: $P<0.05$,与对照组比较

A:Western blot 检测大肠杆菌感染 6、12、24 h 后 FL83B 细胞中蛋白表达;B:蛋白半定量分析

图 4　大肠杆菌感染 FL83B 细胞后通路蛋白表达



a: $P<0.05$,与对照组比较

A:Western blot 检测大肠杆菌感染 6、12、24 h 后 FL83B 细胞中介导抗菌作用的相关蛋白表达;B:蛋白半定量分析

图 5　大肠杆菌感染 FL83B 细胞后抗菌相关蛋白的表达

2.5　大肠杆菌感染 FL83B 细胞中抗菌相关蛋白的表达

上述活化的通路已报道可上调巨噬细胞表达 iNOS(诱导 NO 生成)、NOX2(诱导 ROS 生成)、RhoB(促进病原菌吞噬),为进一步明确 FL83B 细胞中是否也产生介导抗菌作用的相关蛋白,本研究对感染大肠杆菌 6、12、24 h 后的 FL83B 肝细胞进行检测,发现大肠杆菌感染后,FL83B 细胞中 iNOS 蛋白急剧增加,于 6 h 到达峰值,在 12、24 h 依次下降;NOX2 蛋白也呈现不同程度的增加;RhoB 蛋白呈时间依赖性增加($P<0.05$,图 5)。表明 FL83B 细胞在细菌感染时杀菌介质生成增强,促进吞噬的蛋白表达上调。

3　讨论

不同于专职吞噬细胞(如单核细胞、巨噬细胞等),非专职吞噬细胞(如上皮细胞、成纤维细胞等)吞噬颗粒能力有限[10-11]。肝脏上皮细胞是非专职吞噬细胞,可吞噬凋亡和坏死细胞形成细胞叠套结构,在炎症和癌症中意义重大[9,11-12]。目前报道的肝细胞内吞作用有胞葬、细胞侵入性死亡、伸入运动、胞壳溶解[9]。本研究发现肝细胞可直接吞噬细菌颗粒来发挥抑菌作用,丰富了对肝细胞作为非专职吞噬细胞的认识。且肝细胞在抗菌过程中也保持高存活率,说明细胞还存在除焦亡、自噬、胀亡、坏死性细胞死亡和细胞套亡方式之外的目前未知的抗菌方式,这也是本课题组后续关注的重点。

Fcgr1 属于 FcγR 家族,是细胞表面吞噬作用受体,Fcgr1 的 mRNA 水平与吞噬能力正相关[13-14]。Marco 敲低会导致巨噬细胞吞噬伪足的数量显著减少,并抑制细胞的吞噬作用;Marco 过表达促进巨噬细胞的吞噬作用,在宿主防御中起着关键作用[15-16]。有研究发现吞噬作用主要依赖于 Cdc42 和 RhoB 的激活[17-18]。本研究发现感染上调了 FL83B 细胞的 Fcgr1、

Marco、Cdc42 和 RhoB mRNA 水平,即提示在细菌感染后 FL83B 细胞吞噬细菌颗粒的能力提高。组织相容性复合体 MHC 是免疫系统中最主要的抗原呈递分子,本研究检测了经典的 MHCI 亚型 H2-K1,发现感染后虽然只有略微上调,但其在肝细胞中基础表达量较高,总体都维持高水平表达;MHCI 的辅因子 β2M mRNA 在 6 h 逐渐升高,并于 12 h 达到峰值,以上结果提示在 FL83B 肝细胞吞噬细菌颗粒后可进行抗原递呈[19]。

肝细胞是肝脏中数量最多的细胞,也是执行代谢、解毒、蛋白质合成等肝功能最主要的细胞。此前研究显示,肝细胞在免疫细胞的协同作用下参与了抗菌过程[7],细菌感染后,免疫细胞分泌如 IL-6、IL-1、TNF-α(肿瘤坏死因子)等细胞因子,激活 STAT3 和 NF-κB 来调节肝细胞产生介导抗菌作用的相关蛋白[8,20-21]。Kupffer 细胞是先天免疫的重要组成部分,支持肝脏在系统防御和区域防御中发挥着核心作用[22]。本研究以 Kupffer 细胞为对照,探究 FL83B 肝细胞在细菌攻击时的应答能力。与 Kupffer 细胞类似,FL83B 肝细胞也可抑制大肠杆菌的增殖,且细菌攻击可直接促进 FL83B 肝细胞中 STAT3 和 NF-κB 活化,即肝细胞可单独发挥抑菌作用,表明其直接参与免疫反应。

既往研究表明肝细胞分泌的介导抗菌作用的相关蛋白可在细菌表面形成孔洞状“膜攻击复合物”,使细菌内容物外漏破裂而亡[7]。在此基础上我们研究了 FL83B 肝细胞的抑菌途径,发现上清联合细胞组对大肠杆菌的生长抑制作用显著强于单独上清组,且 PI 染色显示上清联合细胞组对细菌的杀伤作用大于单独上清组,提示在此抑菌效应中有除分泌蛋白以外的细胞因素。为了阐明该现象,本研究进行吞噬检测,发现 FL83B 肝细胞可吞噬大肠杆菌。吞噬作用是有效清除病原体的早期和基本步骤,吞噬和杀死病原体的能力被认为是巨噬细胞的主要效应功能,是先天免疫防御第一道防线的重要组成部分[23]。这些结果提示肝细胞可通过吞噬作用和分泌介导抗菌作用的相关蛋白共同发挥直接免疫防御。

RhoB 是小 Rho-GTPases 家族的一员,细胞暴露于 LPS 或炎性细胞因子后可能以 NF-κB 依赖性途径快速上调[24],RhoB 可通过诱导 LC3 脂质化和自噬体形成来促进细胞内细菌清除[25]。在本研究中,我们发现在大肠杆菌攻击后,肝细胞中的 RhoB 蛋白水平显著增加,即肝细胞吞噬细菌后,可能通过 RhoB 促进胞内细菌清除。iNOS(一氧化氮合酶亚型)的激活比组成型表达的内皮 NOS 和神经元 NOS 能引发更多的 NO 生成,NO 可直接介导细菌的清除[26-27]。既往报道 NF-κB 和 p38 活化可诱导 iNOS 的表达[26-28],与本研究结果一致,即 p38-MAPK、NF-κB、iNOS 途径也可能是肝细胞发挥抑菌作用的机制。NADPH 氧化酶是一种与吞噬细胞相关的氧化剂生成系统,NADPH 氧化酶 NOX2 将电子从细胞质 NADPH 穿梭到吞噬体或细胞外空间中的分子氧,以产生氧化剂,支持吞噬细胞的抗菌活性[29]。本研究显示,肝细胞在细菌攻击后 NOX2 的表达量也进一步增加,提示肝细胞抑菌的可能机制。更深入的分子机制仍需要进一步探索,这将是我们后续关注的重点。

综上所述,本研究发现肝细胞可直接吞噬细菌并上调介导抗菌功能的相关蛋白来发挥直接抑菌作用。由此可见,肝细胞可与驻守肝脏的传统免疫细胞一样直接参与免疫防御,颇似“平时为民,战时为兵”的细胞民兵。作为组成肝脏的主要细胞,肝细胞的直接抗菌功能不容忽视。考虑到脓毒症时免疫细胞难以纠正的功能失衡,寻找调控肝细胞直接免疫功能的关键靶点是值得进一步探索的方向。本研究为肝细胞免疫防御提供新理论、新思路,对研究非专职吞噬细胞的生理活动及宿主先天免疫功能具有重要的科学意义。

作者贡献声明 马娓和舒俊傑负责方法设计、实验试剂材料准备、实验操作、数据整理及分析、实验结果可视化、初稿撰写等;陈地友、王丽负责实验操作、数据整理、实验结果可视化等;高强国、杨霞负责实验构思与设计、结果的审核、实验监督管理、稿件审阅和修改等

参考文献:

[1] SON G, KREMER M, HINES I N. Contribution of gut bacteria to liver pathobiology[J]. Gastroenterol Res Pract, 2010, 2010: 453563. DOI: 10.1155/2010/453563.

[2] BERG R D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract[J]. Trends Microbiol, 1995, 3(4): 149-154. DOI: 10.1016/S0966-842X(00)88906-4.

[3] VAN DER HEIDE D, WEISKIRCHEN R, BANSAL R. Therapeutic targeting of hepatic macrophages for the treatment of liver diseases[J]. Front Immunol, 2019, 10: 2852. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02852.

[4] BILZER M, ROGGEL F, GERBES A L. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease[J]. Liver Int, 2006, 26(10): 1175-1186. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2006.01342.x.

[5] QIU P, LIU Y, ZHANG J. Review: the role and mechanisms of macrophage autophagy in sepsis[J]. Inflammation, 2019, 42(1): 6-19. DOI: 10.1007/s10753-018-0890-8.

[6] XIE J F, WANG H L, KANG Y, *et al*. The epidemiology of sepsis in Chinese ICUs: a national cross-sectional survey[J]. Crit Care Med, 2020, 48(3): e209-e218. DOI: 10.1097/CCM.0000000000004155.

[7] ZHOU Z, XU M J, GAO B. Hepatocytes: a key cell type for innate immunity[J]. Cell Mol Immunol, 2016, 13(3): 301-315. DOI: 10.1038/cmi.2015.97.

[8] NORRIS C A, HE M, KANG L I, *et al*. Synthesis of IL-6 by hepatocytes is a normal response to common hepatic stimuli [J]. PLoS One, 2014, 9(4): e96053. DOI: 10.1371/journal.pone.0096053.

[9] DAVIES S P, TERRY L V, WILKINSON A L, *et al*. Cell-in-cell structures in the liver: a tale of four E's[J]. Front Immunol, 2020, 11: 650. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00650.

[10] SEEBERG J C, LOIBL M, MOSER F, *et al*. Non-professional phagocytosis: a general feature of normal tissue cells[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 11875. DOI: 10.1038/s41598-019-48370-3.

[11] SCHWEGLER M, WIRSING A M, DOLLINGER A J, *et al*. Clearance of primary necrotic cells by non-professional phagocytes[J]. Biol Cell, 2015, 107(10): 372-387. DOI: 10.1111/boc.201400090.

[12] DAVIES S P, REYNOLDS G M, STAMATAKI Z. Clearance of apoptotic cells by tissue epithelia: a putative role for hepatocytes in liver efferocytosis[J]. Front Immunol, 2018, 9: 44. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00044.

[13] NIÑO D F, CAUVI D M, DE MAIO A. Itraconazole, a commonly used antifungal, inhibits Fcγ receptor-mediated phagocytosis: alteration of Fcγ receptor glycosylation and gene expression[J]. Shock, 2014, 42(1): 52-59. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000169.

[14] MATUSZEWSKA M, CIESLIK M, WILKANIEC A, *et al*. The role of bromodomain and extraterminal (BET) proteins in controlling the phagocytic activity of microglia *in vitro*: relevance to alzheimer's disease[J]. Int J Mol Sci, 2022, 24(1): 13. DOI: 10.3390/ijms24010013.

[15] CARPENTIER K S, DAVENPORT B J, HAIST K C, *et al*. Discrete viral E2 lysine residues and scavenger receptor MARCO are required for clearance of circulating alpha viruses[J]. eLife, 2019, 8: 49163. DOI: 10.7554/elife.49163.

[16] XING Q Q, FENG Y X, SUN H M, *et al*. Scavenger receptor MARCO contributes to macrophage phagocytosis and clearance of tumor cells[J]. Exp Cell Res, 2021, 408(2): 112862. DOI: 10.1016/j.yexcr.2021.112862.

[17] ZHANG J M, ZHU J P, BU X, *et al*. Cdc42 and RhoB activation are required for mannose receptor-mediated phagocytosis by human alveolar macrophages[J]. Mol Biol Cell, 2005, 16(2): 824-834. DOI: 10.1091/mbc.e04-06-0463.

[18] O'CALLAGHAN A A, DEMPSEY E, IYER N, *et al*. Intestinal metabolites influence macrophage phagocytosis and clearance of bacterial infection[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 622491. DOI: 10.3389/fcimb.2021.622491.

[19] MANGOLD C A, MASSER D R, STANFORD D R, *et al*. CNS-wide sexually dimorphic induction of the major histocompatibility complex 1 pathway with aging[J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2017, 72(1): 16-29. DOI: 10.1093/gerona/glv232.

[20] EDER C. Mechanisms of interleukin-1beta release[J]. Immunobiology, 2009, 214(7): 543-553. DOI: 10.1016/j.imbio.2008.11.007.

[21] BODE J G, ALBRECHT U, HÄUSSINGER D, *et al*. Hepatic acute phase proteins—Regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF-κB-dependent signaling[J]. Eur J Cell Biol, 2012, 91(6/7): 496-505. DOI: 10.1016/j.ejcb.2011.09.008.

[22] LI P Z, HE K, LI J Z, *et al*. The role of Kupffer cells in hepatic diseases[J]. Mol Immunol, 2017, 85: 222-229. DOI: 10.1016/j.molimm.2017.02.018.

[23] SCHUMANN J. It is all about fluidity: fatty acids and macrophage phagocytosis[J]. Eur J Pharmacol, 2016, 785: 18-23. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.04.057.

[24] VEGA F M, RIDLEY A J. The RhoB small GTPase in physiology and disease[J]. Small Gtpases, 2018, 9(5): 384-393. DOI: 10.1080/21541248.2016.1253528.

[25] MIAO C H, YU M Y, PEI G, *et al*. An infection-induced RhoB-Beclin 1-Hsp90 complex enhances clearance of uropathogenic *Escherichia coli*[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 2587. DOI: 10.1038/s41467-021-22726-8.

[26] YOSHIDA T, DAS N A, CARPENTER A J, *et al*. Minocycline reverses IL-17A/TRAF$_3$IP$_2$-mediated p38 MAPK/NF-κB/iNOS/NO-dependent cardiomyocyte contractile depression and death[J]. Cell Signal, 2020, 73: 109690. DOI: 10.1016/j.cellsig.2020.109690.

[27] CAPUTA G, MATSUSHITA M, SANIN D E, *et al*. Intracellular infection and immune system cues rewire adipocytes to acquire immune function[J]. Cell Metab, 2022, 34(5): 747-760.e6. DOI: 10.1016/j.cmet.2022.04.008.

[28] CHEN H I, HU W S, HUNG M Y, *et al*. Protective effects of luteolin against oxidative stress and mitochondrial dysfunction in endothelial cells[J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2020, 30(6): 1032-1043. DOI: 10.1016/j.numecd.2020.02.014.

[29] NAUSEEF W M. The phagocyte NOX2 NADPH oxidase in microbial killing and cell signaling[J]. Curr Opin Immunol, 2019, 60: 130-140. DOI: 10.1016/j.coi.2019.05.006.

(收稿:2023-06-28;修回:2023-08-03)

(编辑 张 维)