

研究论文

双特异性磷酸酶5过表达/干扰RAW264.7 细胞株建立及其对自噬调控的影响

骆佳 曾瑾 杨易 王玉炯*

(宁夏大学, 西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室, 银川 750021)

摘要 为探究双特异性磷酸酶5(dual-specificity phosphatase 5, DUSP5)在巨噬细胞RAW264.7自噬中的调控作用, 该研究采用慢病毒转染的技术方法建立DUSP5过表达/干扰RAW264.7细胞株, 并用自噬激活剂雷帕霉素(rapamycin, Rapa)和抑制剂巴弗洛霉素A1(bafilomycin A1, Baf A1)分别对其进行刺激, 使用蛋白免疫印迹技术(Western blot)、荧光定量PCR(Real-time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR)、单丹磺酰尸胺(monodansylcadaverine, MDC)染色以及免疫荧光等方法探究过表达或抑制DUSP5后对巨噬细胞RAW264.7自噬的影响。结果显示: DUSP5过表达/干扰慢病毒转染RAW264.7可显著提高/抑制DUSP5 mRNA和蛋白的表达量($P < 0.01$); Rapa刺激后, 过表达DUSP5抑制自噬相关蛋白Beclin1和LC3II表达且自噬体形成减少, 而抑制DUSP5表达结果与此相反; 用Baf A1阻断DUSP5干扰RAW264.7稳定转染细胞株自噬流, DUSP5干扰RAW264.7稳定转染细胞株中LC3II表达量和自噬体数量均显著上调($P < 0.01$)。由此说明, DUSP5参与调控巨噬细胞自噬, 可能通过抑制自噬体合成来阻碍巨噬细胞自噬进程。此结论为进一步探究巨噬细胞自噬调控机制提供了新的研究思路。

关键词 双特异性磷酸酶5; 巨噬细胞; 自噬

Establishment of Dual-Specific Phosphatase Overexpressed/Interfered RAW264.7 Cell Strain and Its Effect on Autophagy

Luo Jia, Zeng Jin, Yang Yi, Wang Yujiong*

(Key Lab of Ministry of Education for Protection and Utilization of Special Biological Resources in
Western China, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract To study the effect of dual-specificity phosphatase 5 (DUSP5) on the autophagy of macrophages, they established DUSP5 overexpressed/interfered RAW264.7 cell strain by transfecting lentivirus vector. Besides, rapamycin (Rapa) and bafilomycin A1 (Baf A1) were used to stimulate the cell strains. Western blot, realtime fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR), Monodansylcadaverine (MDC) staining and immunofluorescence were all applied to this research. The results showed that RAW264.7 transfected with DUSP5 overexpression/interference lentivirus could significantly increase/inhibit ($P < 0.01$) the expression of DUSP5 mRNA and protein.

收稿日期: 2017-12-16 接受日期: 2018-04-28

国家自然科学基金项目(批准号: 31572494)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0951-2062033, E-mail: wyj@nxu.edu.cn

Received: December 16, 2017 Accepted: April 28, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31572494)

*Corresponding author. Tel: +86-951-2062033, E-mail: wyj@nxu.edu.cn

网络出版时间: 2018-07-25 10:48:20

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180725.1048.004.html>

Overexpressing DUSP5 inhibited the expression of autophagy-related proteins Beclin1 and LC3II and the formation of intracellular autophagosomes after Rapa stimulation, however, suppressing DUSP5 expression had reversed result. The expression of LC3II and the number of autophagosomes were significantly increased after blocking autophagy flux of DUSP5 interfered RAW264.7 cell strain with Baf A1. In a conclusion, DUSP5 plays a role in the regulation of macrophages autophagy, it may inhibit autophagy by interrupting autophagosomes formation. This finding will provide a new idea for further exploring the regulation mechanism of macrophage autophagy.

Keywords dual-specificity phosphatase 5; macrophages; autophagy

自噬(autophagy)是一种高度保守的细胞自我调节过程。细胞通过自噬降解自身中长寿蛋白和衰老或功能障碍的细胞器,为细胞供能并维持细胞正常生理功能。此外,细胞还可通过自噬清除胞内病原菌。因此,自噬在维持细胞稳态^[1]和抵抗诸如营养匮乏^[2]、低氧^[3]以及病原菌感染^[4]等不良因素的影响中有着重要的意义。巨噬细胞(macrophages)是机体中重要的一类免疫细胞,它构成了机体第一道免疫防线,并通过吞噬和分泌细胞因子调节机体的免疫功能,在抵御病原体入侵中扮演着重要的角色。已有报道显示,巨噬细胞可通过自噬作用抑制并清除胞内菌^[5],从而达到抗感染的目的。

双特异性磷酸酶(dual-specificity phosphatases, DUSPs)是一类特殊的酪氨酸蛋白磷酸酶,由于其结构特性,它可以使同一底物的磷酸酪氨酸残基和磷酸丝氨酸/磷酸苏氨酸残基同时去磷酸化^[6],从而调节诸如免疫^[7-8]、炎症^[9]以及自噬^[10]等多种生物学过程。DUSP5是DUSPs蛋白家族成员之一,相关研究表明,DUSP5参与调控肝脏细胞^[11]和人脑神经瘤细胞系(SH-SY5Y)自噬^[12],但DUSP5是否参与巨噬细胞自噬调控却鲜有报道。

本研究以小鼠巨噬细胞系RAW264.7作为研究对象,用慢病毒转染的方法建立并筛选出DUSP5过表达/干扰稳定转染细胞株;用雷帕霉素(rapamycin, Rapa)诱导稳定转染细胞株发生自噬并建立自噬诱导模型,检测自噬相关蛋白LC3II、Beclin1的相对表达量;用单丹磺酰尸胺(monodansylcadaverine, MDC)染色观察胞内自噬体形成,探究DUSP5蛋白对巨噬细胞自噬的影响。用巴弗洛霉素A1(bafilomycin A1, Baf A1)阻断DUSP5干扰RAW264.7稳定转染细胞株自噬流,从蛋白以及形态学水平上分析DUSP5对巨噬细胞自噬的调控作用。这为探究巨噬细胞自噬机制和深入探索巨噬

细胞在对抗病原微生物感染时所产生的应答机制提供新的研究思路。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

小鼠巨噬细胞RAW264.7购自中国科学院细胞库;小鼠DUSP5过表达和干扰慢病毒、10 mg/mL聚凝胺(polybrene)购自上海吉凯基因科技有限公司;胎牛血清购自Gibco公司;DMEM培养基、双抗、PBS、购自Hyclone公司;嘌呤霉素(puromycin)购自Solarbio公司;细胞总RNA提取试剂盒购自OMEGA公司;RIPA(强)蛋白提取试剂盒购自苏州碧云天生物技术有限公司;Prime Script RT Master Mix(Perfect Real Time)、SYBR Premix Ex Taq II试剂盒购自TaKaRa公司;BCA蛋白定量试剂盒购自南京凯基生物发展有限公司;MDC购自Sigma公司;Rapa和Baf A1购自MedChem Express公司;兔抗LC3抗体、兔抗Beclin1抗体、兔抗 β -actin抗体购自美国Proteintech公司;兔抗DUSP5抗体购自美国Abcam公司;IRDye 800CW(goat anti-rabbit) IgG购自Licor公司;Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit IgG购自Thermo Fisher公司。

1.2 小鼠DUSP5过表达/干扰慢病毒载体的建立

在NCBI Gene数据库中检索小鼠DUSP5基因序列(Gene ID: 240672),根据小鼠DUSP5 mRNA的CDS序列设计并包装DUSP5过表达慢病毒载体以及3个不同干扰靶点的DUSP5 RNAi干扰慢病毒载体,并根据各自的空载体包装相应的空载对照慢病毒载体(干扰序列设计及慢病毒包装工作均由上海吉凯基因科技有限公司完成,干扰慢病毒RNAi序列见表1)。

1.3 DUSP5过表达/干扰RAW264.7稳定转染细胞株的建立

培养RAW264.7细胞至对数生长期,调整细胞

密度为 $(1.5\sim 3)\times 10^4$ /孔接种于12孔板中, 37 °C、5% CO₂及饱和湿度恒温培养箱中过夜培养12 h后, 更换含有聚凝胺(终浓度为5 μg/mL)的新鲜完全培养基, 加入感染复数(MOI)=10的DUSP5过表达/干扰慢病毒液, 置于培养箱中孵育12 h后更换完全培养基, 继续培养72 h。荧光显微镜下观察细胞感染效率, 更换为含有4 μg/mL嘌呤霉素的完全培养基进行稳定转染细胞的筛选。筛选4~5天, 每2~3天更换新鲜培养基。将筛选后所得到的细胞扩大培养, 建立DUSP5过表达/干扰RAW264.7稳定转染细胞株。

1.4 荧光定量PCR检测稳定转染细胞株中DUSP5 mRNA表达水平

将处于对数生长期、状态良好的稳定转染细胞株以密度为 $(5\sim 6)\times 10^5$ /孔接种于6孔板中, 过夜培养12 h。设置以下实验组: 空白对照组、DUSP5过表达空载对照组、DUSP5过表达组、DUSP5干扰空载对照组、DUSP5干扰组。用OMEGA公司的细胞总RNA提取试剂盒提取细胞总RNA(具体实验步骤按照试剂盒说明书进行)。将所得到的RNA立即用TaKaRa公司的反转录试剂盒进行反转录合成cDNA(反转录体系根据试剂盒说明书进行加样)。反转录条件如下: 37 °C 15 min; 85 °C 5 s(酶失活); 4 °C终止。以所得到的cDNA作为模板进行荧光定量PCR(qRT-PCR)(实验步骤按照TaKaRa SYBR Premix Ex Taq II试剂盒说明书进行)。qRT-PCR反应条件如下: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 循环30次。qRT-PCR实验数据用2^{-ΔΔCt}法分析各实验组中

DUSP5 mRNA的相对表达水平, qRT-PCR所需引物见表2。

1.5 Western blot检测DUSP5及自噬相关蛋白LC3II、Beclin1表达水平

将处于对数生长期、生长良好的DUSP5过表达/干扰RAW264.7稳定转染细胞株以细胞密度为 $(5\sim 6)\times 10^5$ /孔接种于6孔板中, 设置以下实验组: DUSP5过表达空载组、DUSP5过表达空载+Rapa组、DUSP5过表达组、DUSP5过表达+Rapa组、DUSP5干扰空载组、DUSP5干扰空载+Rapa组、DUSP5干扰空载+Baf A1组、DUSP5干扰组、DUSP5干扰+Baf A1组。过夜培养12 h后, 在Rapa处理组和Baf A1处理组中分别加入适量的Rapa(终浓度为100 nmol/L)和Baf A1(终浓度为100 nmol/L)继续培养2.5 h, 提取细胞总蛋白, BCA检测蛋白浓度后进行15% SDS-PAGE凝胶电泳, PVDF膜转印后, 加入Beclin1(1:1 000)、LC3(1:500)、DUSP5(1:500)、β-actin(1:1 000)抗体, 用Odyssey Sa近红外荧光成像系统检测各蛋白所对应的特异性条带, 收集图像并用ImageJ图片分析软件对所得到的图片进行灰度值分析, 以定量分析LC3II、Beclin1和DUSP5蛋白表达水平。

1.6 MDC染色检测DUSP5过表达/干扰RAW264.7稳定转染细胞株内自噬体

将处于对数生长期的RAW264.7 DUSP5过表达/干扰稳定转染细胞株以细胞密度 $(2\sim 3)\times 10^5$ /孔接种于12孔板中, 实验分组同1.5, 过夜培养12 h后, 去除培养

表1 DUSP5基因的RNAi序列
Table 1 RNAi sequence of DUSP5 gene

引物名称 Primer name	RNAi序列(5'→3') RNAi sequences (5'→3')
R1	GCC CTG ATG TGC AGG CTT CAT TTC
R2	CAC CTG AAG GAA GCC TTT
R3	TGG GAA ATC AGT GCT CAA CAT

表2 qRT-PCR的引物序列
Table 2 Primer sequence of qRT-PCR

基因 Genes	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')
DUSP5	F: TGC ACC ACC CAC CTA CAC TA R: CCT CCT TCT TCC CTG ACA CA
β-actin	F: GGC TGT ATT CCC CTC CAT CG R: CCA GTT GGT AAC AAT GCC ATG T

基, 避光加入含有适量MDC(终浓度为0.05 mmol/L)的PBS溶液, 37 °C孵育30 min, 置于荧光倒置显微镜下, 紫外光激发, 观察细胞荧光强度。

1.7 免疫荧光检测自噬体

将处于对数生长期的DUSP5干扰RAW264.7稳定转染细胞株以细胞密度为 $(2\sim 3)\times 10^5$ /孔接种于12孔板中的盖玻片上, 过夜培养12 h后, 加入适量的Baf A1(终浓度为100 nmol/L), 继续培养2.5 h。弃培养基, 4%多聚甲醛室温固定20 min, 0.1% Triton X-100透膜处理10 min, 10%山羊血清37 °C封闭1 h后, 用LC3一抗(1:200)于4 °C孵育过夜, 用Alexa Fluor 647标记的荧光二抗37 °C孵育30 min, DAPI染核封片, 荧光倒置显微镜下观察自噬体。

1.8 统计学分析

数据均采用SPSS 17.0软件进行显著性差异分析, 数据用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 DUSP5过表达/干扰RAW264.7稳定转染细胞株的建立及鉴定

2.1.1 DUSP5过表达RAW264.7稳定转染细胞株的建立及鉴定 DUSP5过表达慢病毒和相应的空载对照慢病毒分别转染RAW264.7 72 h, 经嘌呤霉素筛选4~5天后, 如图1A所示, 荧光显微镜下观察, DUSP5过表达组和过表达空载对照组细胞均有绿色荧光蛋白表达。qRT-PCR检测结果如图1B所示, DUSP5过表达组中DUSP5 mRNA的相对表达量显著高于空白对照组和过表达空载对照组($P<0.01$)。Western blot结果如图1C所示, DUSP5过表达组中DUSP5蛋白的相对表达水平显著高于空白对照组和DUSP5过表达空载对照组并存在极显著差异($P<0.01$)。以上结果表明, DUSP5过表达RAW264.7稳定转染细胞株建立成功。

2.1.2 DUSP5干扰RAW264.7稳定转染细胞株的建立及鉴定 将RNAi干扰序列为R1、R2、R3(表1)的DUSP5干扰慢病毒以及干扰空载对照慢病毒分别转染4组RAW264.7细胞, Western blot检测RAW264.7中DUSP5蛋白表达量。如图2A所示, RNAi干扰序列R2可显著降低DUSP5蛋白表达水平($P<0.05$), 因此, 选用RNAi干扰序列为R2的DUSP5干扰慢病毒载体(后称R2干扰慢病毒)建立DUSP5干扰RAW264.7稳定转染细胞株。

R2干扰慢病毒和相应的空载对照慢病毒分别转染RAW264.7 72 h并用嘌呤霉素筛选4~5天后, 如图2B所示, 荧光显微镜下观察可见DUSP5干扰组和干扰空载对照组的细胞均可表达绿色荧光蛋白且慢病毒转染效率可达90%。qRT-PCR检测结果如图2C所示, DUSP5干扰组中DUSP5 mRNA的相对表达量显著低于空白对照组和干扰空载对照组($P<0.01$)。Western blot结果(图2D)显示, DUSP5干扰组中DUSP5蛋白的相对表达水平显著低于空白对照组和干扰空载对照组, 且差异极显著($P<0.01$)。

2.2 DUSP5抑制自噬相关蛋白Beclin1、LC3II的表达

2.2.1 DUSP5过表达后自噬相关蛋白Beclin1、LC3II表达量下调 Western blot检测Rapa刺激DUSP5过表达RAW264.7稳定转染细胞株及其相应空载对照组细胞中Beclin1以及LC3II蛋白表达量如图3所示。经灰度值计算结果表明: 与DUSP5过表达空载对照组相比, DUSP5过表达组细胞中Beclin1和LC3II蛋白的表达量显著降低($P<0.01$); Rapa刺激DUSP5过表达空载对照组和DUSP5过表达组细胞后, 自噬相关蛋白Beclin1和LC3II表达量均显著上调, 然而, DUSP5过表达组中Beclin1和LC3II蛋白的表达量仍显著低于DUSP5过表达空载组($P<0.05$)。这说明, DUSP5表达量上调抑制了自噬相关蛋白Beclin1和LC3II的表达。

2.2.2 DUSP5干扰后自噬相关蛋白Beclin1、LC3II表达量上调 为了进一步验证DUSP5对RAW264.7自噬的影响, 用Western blot方法检测Rapa刺激后, DUSP5干扰RAW264.7稳定转染细胞株及其相应干扰空载对照组细胞中Beclin1和LC3II蛋白表达量如图4所示。干扰DUSP5蛋白表达后, Beclin1和LC3II蛋白的表达量较干扰空载组升高显著; 经Rapa刺激后, Beclin1和LC3II表达量均上调, 且DUSP5干扰组细胞中Beclin1和LC3II蛋白表达量显著高于DUSP5干扰空载组($P<0.01$)。这说明, 抑制DUSP5表达促进了Beclin1和LC3II的表达。

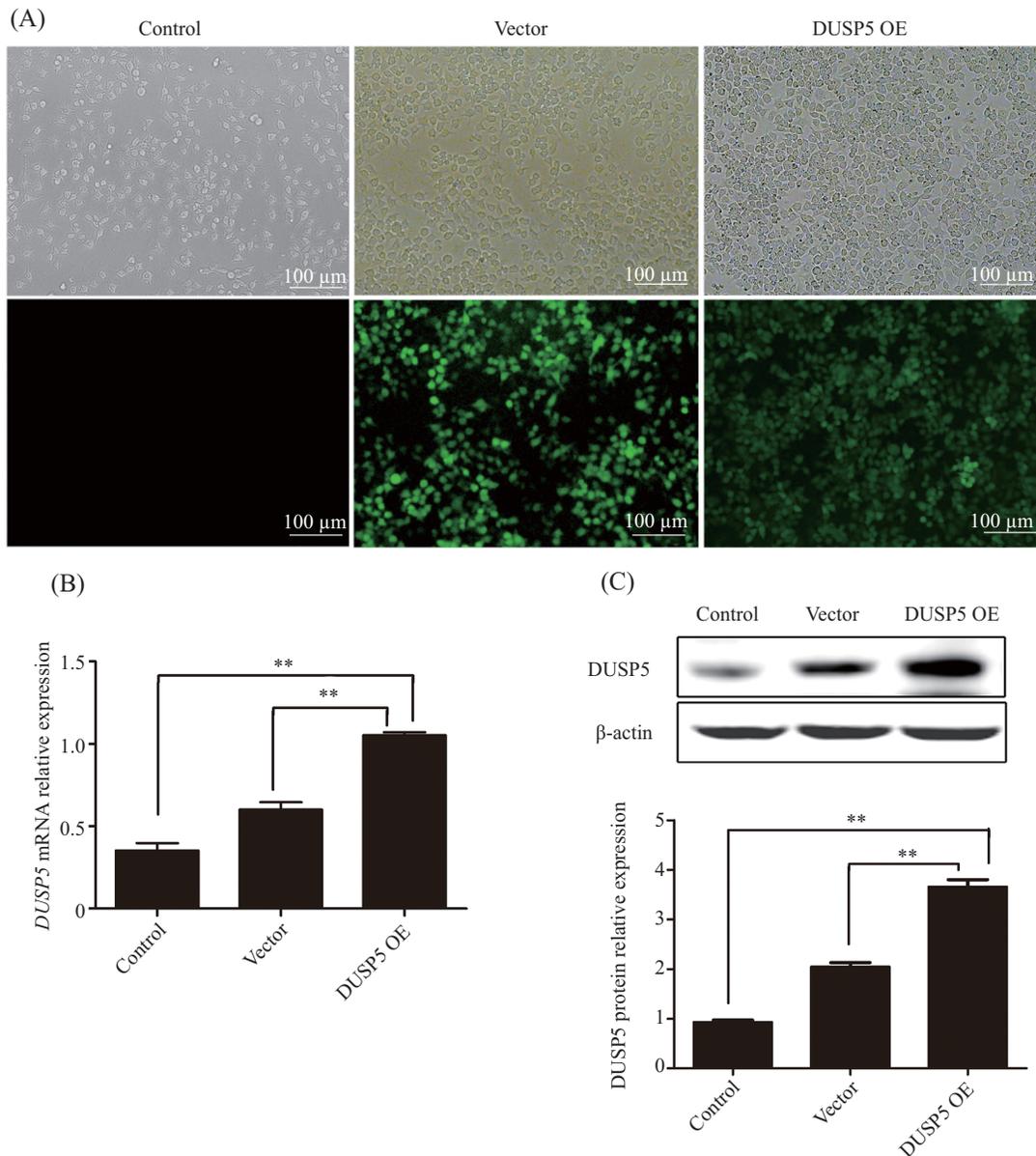
2.3 DUSP5抑制RAW264.7巨噬细胞系自噬体产生

MDC染色后细胞形态学观察如图5所示: DUSP5过表达组中细胞的荧光强度弱于DUSP5过表达空载对照组; 用Rapa刺激后, DUSP5过表达组细胞的荧光强度虽有加强, 但其荧光强度仍弱于DUSP5

过表达空载组。在DUSP5干扰的RAW264.7稳定转染细胞中, DUSP5干扰组细胞的荧光强度较DUSP5干扰空载对照组加强, Rapa刺激后, DSUP5干扰空载对照组和DUSP5干扰组细胞的荧光强度均有加强, 且DUSP5干扰组细胞荧光强度强于DUSP5干扰空载对照组。这说明, Rapa刺激诱导了DUSP5过表达/干扰RAW264.7稳定转染细胞株中产生自噬体, 而DUSP5对其产生有抑制作用。

2.4 DUSP5抑制RAW264.7巨噬细胞中自噬体合成

为探究DUSP5对巨噬细胞RAW264.7自噬流的影响, 用Western blot方法和免疫荧光方法检测Baf A1刺激DUSP5干扰对照组细胞和DUSP5干扰组细胞前后LC3II蛋白表达情况以及胞内自噬体数量。结果如图6所示, Baf A1刺激后, DUSP5干扰空载组和DUSP5干扰组细胞LC3II表达量较Baf A1未刺激时显著上升, 然而在Baf A1抑制作用下, DUSP5干扰

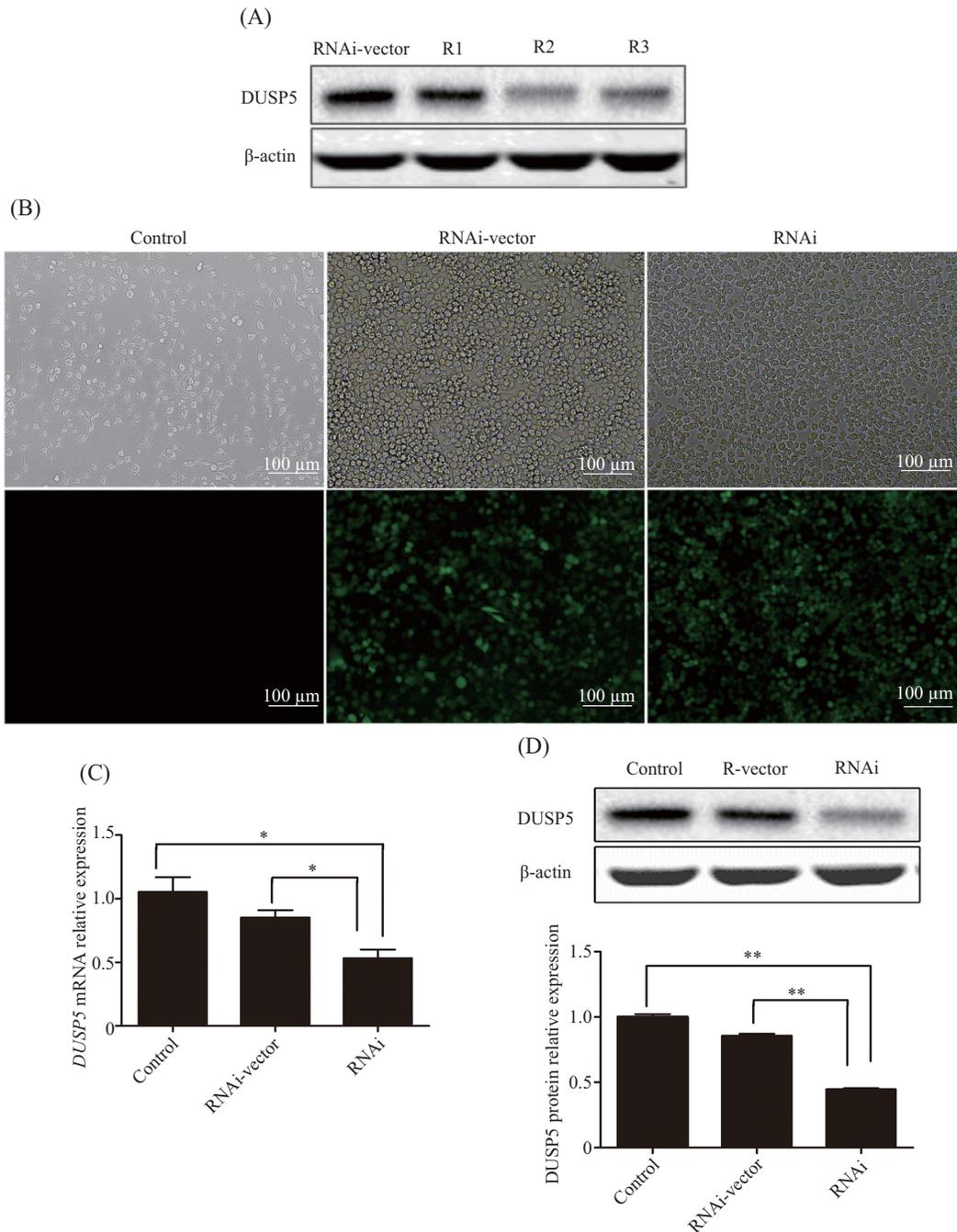


A: 过表达空载对照和DUSP5过表达慢病毒转染RAW264.7的荧光显微照片; B: 不同实验组RAW264.7细胞中DUSP5 mRNA的相对转录水平; C: 各实验组RAW264.7细胞中DUSP5蛋白的相对表达量。Control: 空白对照组; Vector: DUSP5过表达空载对照组; DUSP5 OE: DUSP5过表达组; ** $P < 0.01$ 。

A: transfection efficiency of DUSP5 overexpression empty vector and DUSP5 overexpressed lentivirus in RAW264.7; B: relative expression of DUSP5 mRNA in RAW264.7 cell strain; C: expression of β -actin and DUSP5 protein in RAW264.7 cell strain and DUSP5/ β -actin in each treatment. Control: blank group; Vector: DUSP5 overexpression empty vector control group; DUSP5 OE: DSUP5 overexpression group; ** $P < 0.01$.

图1 DUSP5过表达RAW264.7稳定转染细胞株的建立与鉴定

Fig.1 The establishment and identification of RAW264.7 DUSP5 stably overexpressed cell strain



A: 不同干扰RNAi序列对RAW264.7细胞中DUSP5蛋白的干扰效率; B: 干扰空载对照和DUSP5干扰慢病毒转染RAW264.7的荧光显微镜照片; C: *DUSP5* mRNA在各实验组中的相对转录水平; D: 各实验组RAW264.7细胞中DUSP5蛋白的相对表达量。Control: 空白对照组; RNAi-vector: DUSP5干扰空载对照组; RNAi: DUSP5干扰组; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: interference efficiency of different RNAi sequences on DUSP5 protein; B: transfection efficiency of DUSP5 interference empty vector and DUSP5 interference lentivirus in RAW264.7; C: relative expression of *DUSP5* mRNA in RAW264.7 cell strain; D: expression of β-actin and DUSP5 protein in RAW264.7 cell strain and DUSP5/β-actin in each treatment. Control: blank group; RNAi-vector: DUSP5 interference empty vector control group; RNAi: DSUP5 interference group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图2 DUSP5干扰RAW264.7稳定转染细胞株的建立与鉴定

Fig.2 The establishment and identification of DUSP5 stably interfered cell strain

稳定转染细胞株LC3II蛋白表达量上调, 并显著高于DUSP5空载对照组($P < 0.01$)(图6A), 且胞内自噬体数量也出现增多的现象(图6B)。这提示, DUSP5可能通过作用于自噬体的形成过程, 参与调节巨噬细

胞自噬。

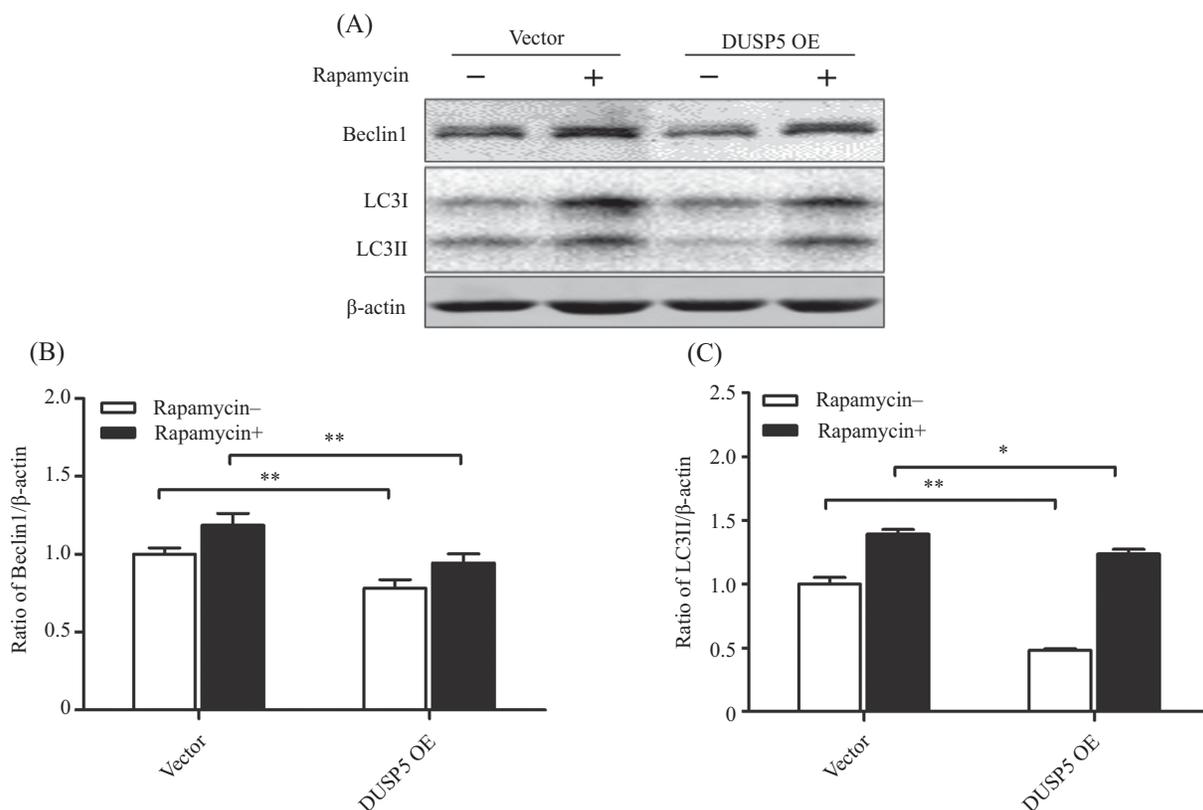
3 讨论

巨噬细胞是机体重要的免疫细胞之一, 它通过

吞噬、分泌炎症因子等作用, 在抑制病原菌繁殖、调节机体免疫中扮演着重要的角色。在病原菌感染中, 巨噬细胞形成具有双层膜结构的自噬体将病原菌与胞质隔离, 自噬体逐渐与溶酶体融合, 并在溶酶体中酸性水解酶的作用下降解病原菌, 从而达到抑菌、抗感染的作用^[5,13]。因此, 研究巨噬细胞自噬对增强巨噬细胞抗感染能力、提高机体免疫功能有着重要的研究意义。

DUSP5是DUSPs家族中的重要组成成员之一, 由于它仅分布于细胞胞核内, 且血清、炎症因子以及生长因子等刺激可诱导其表达水平上升^[14], 因此, DUSP5属于核内诱导型DUSPs^[15-16]。DUSP5作为ERK1/2核锚定蛋白, 可以选择性地和特异性地作用于细胞核中ERK1/2, 调节ERK1/2信号通路的活性^[17], 进而调控多种生物学功能。Kovanen等^[18]在DUSP5转基因小鼠研究中发现, DUSP5可抑制T淋

巴细胞分化和成熟, 转基因小鼠伴随有皮肤溃疡、肾小球肾炎等自体免疫症状。Hwang等^[19]使用虫草素抑制肾腺癌细胞系TK-10中DUSP5的表达从而诱导细胞发生凋亡。Grasset等^[20]研究发现, 巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)可诱导巨噬细胞中DUSP5过表达并促进M-CSF依赖性巨噬细胞增殖, 且可以显著降低巨噬细胞分化。由此可见, DUSP5在调控细胞免疫、凋亡、增殖及分化等细胞生理活动中发挥着重要的作用。随着DUSP5作用的深入研究, DUSP5在调控细胞自噬中的作用也逐渐被报道。Han等^[11]在miR-26a的研究中指出, miR-26a可靶向抑制DUSP5蛋白的表达, 进而增强肝脏细胞自噬, 从而防止由于酒精引起的肝细胞的急性损伤。Wang等^[12]在lncRNA H19的研究中发现, lncRNA H19通过抑制DUSP5蛋白表达, 诱导SH-SY5Y细胞系自噬的发生, 进而诱发脑缺血再灌注损伤。但DUSP5对巨噬细胞

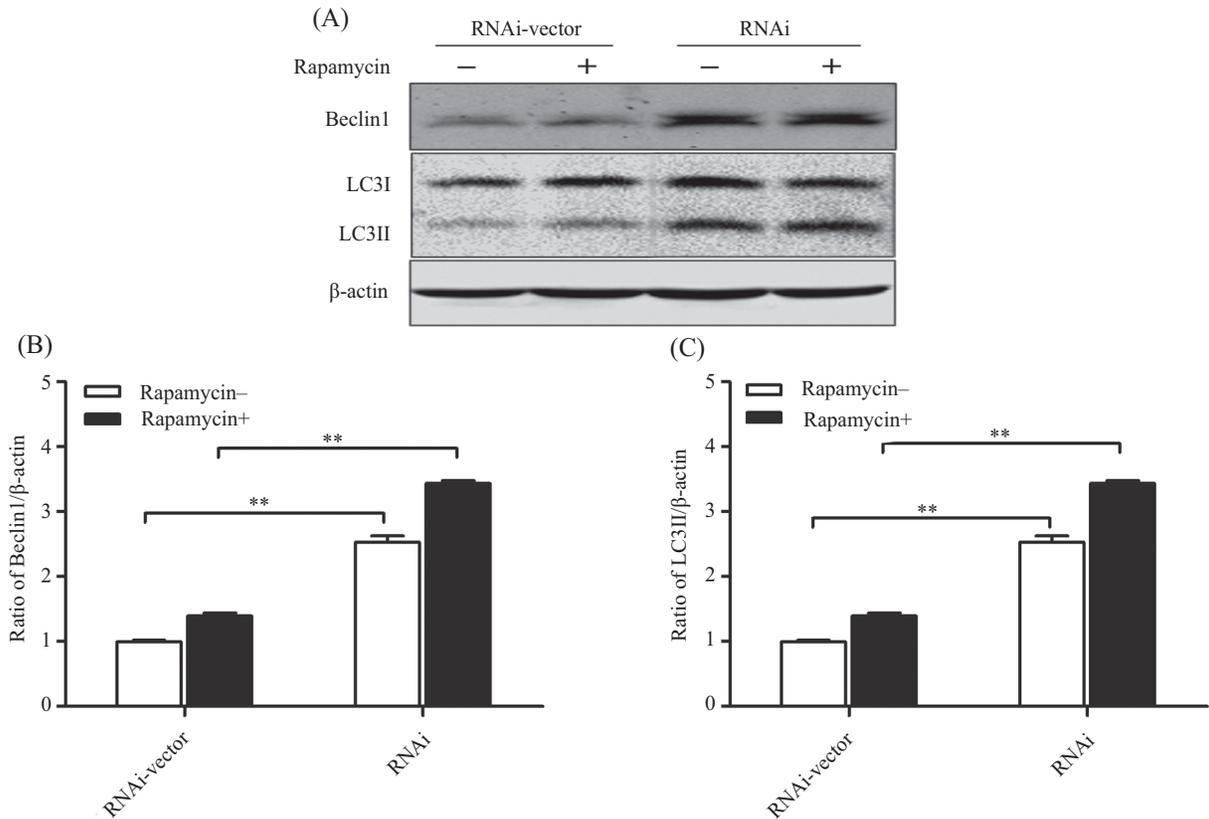


A: DUSP5过表达后, Rapa刺激DUSP5过表达空载体组细胞和DUSP5过表达RAW264.7稳定转染细胞前后自噬相关蛋白Beclin1、LC3II的Western blot检测结果。B、C: 自噬相关蛋白Beclin1、LC3II相对表达量。Vector: 转染DUSP5过表达空载对照慢病毒载体GV358的RAW264.7细胞; DUSP5 OE: 转染DUSP5过表达慢病毒的RAW264.7细胞。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: results of Western blot of autophagy-related protein Beclin1 and LC3II in each treatment. B,C: relative expression of autophagy-related protein Beclin1 and LC3II in each treatment. Vector: RAW264.7 transfected with DUSP5 overexpression empty vector GV358; DUSP5 OE: RAW264.7 transfected with DUSP5 overexpression lentivirus. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图3 Beclin1、LC3II蛋白在DUSP5过表达稳定转染RAW264.7细胞系中表达水平

Fig.3 The expression of Beclin1 and LC3II in DUSP5 stably interfered RAW264.7 cell strain



A: DUSP5干扰后, Rapa刺激DUSP5干扰空载体细胞和DUSP5干扰RAW264.7稳定转染细胞前后自噬相关蛋白Beclin1、LC3II的Western blot检测结果。B、C: 自噬相关蛋白Beclin1、LC3II相对表达量。RNAi-vector: 转染DUSP5干扰空载体对照慢病毒载体GV493的RAW264.7细胞; RNAi: 转染DUSP5干扰慢病毒的RAW264.7细胞。** $P < 0.01$ 。

A: Western blot of autophagy-related protein Beclin1, LC3II in each treatment. B,C: relative expression of autophagy-related protein Beclin1, LC3II in each treatment. RNAi-vector: RAW264.7 transfected with DUSP5 interference empty vector GV493; RNAi: RAW264.7 transfected with DUSP5 interference lentivirus. ** $P < 0.01$.

图4 Beclin1、LC3II蛋白在DUSP5干扰稳定转染RAW264.7细胞系中表达水平

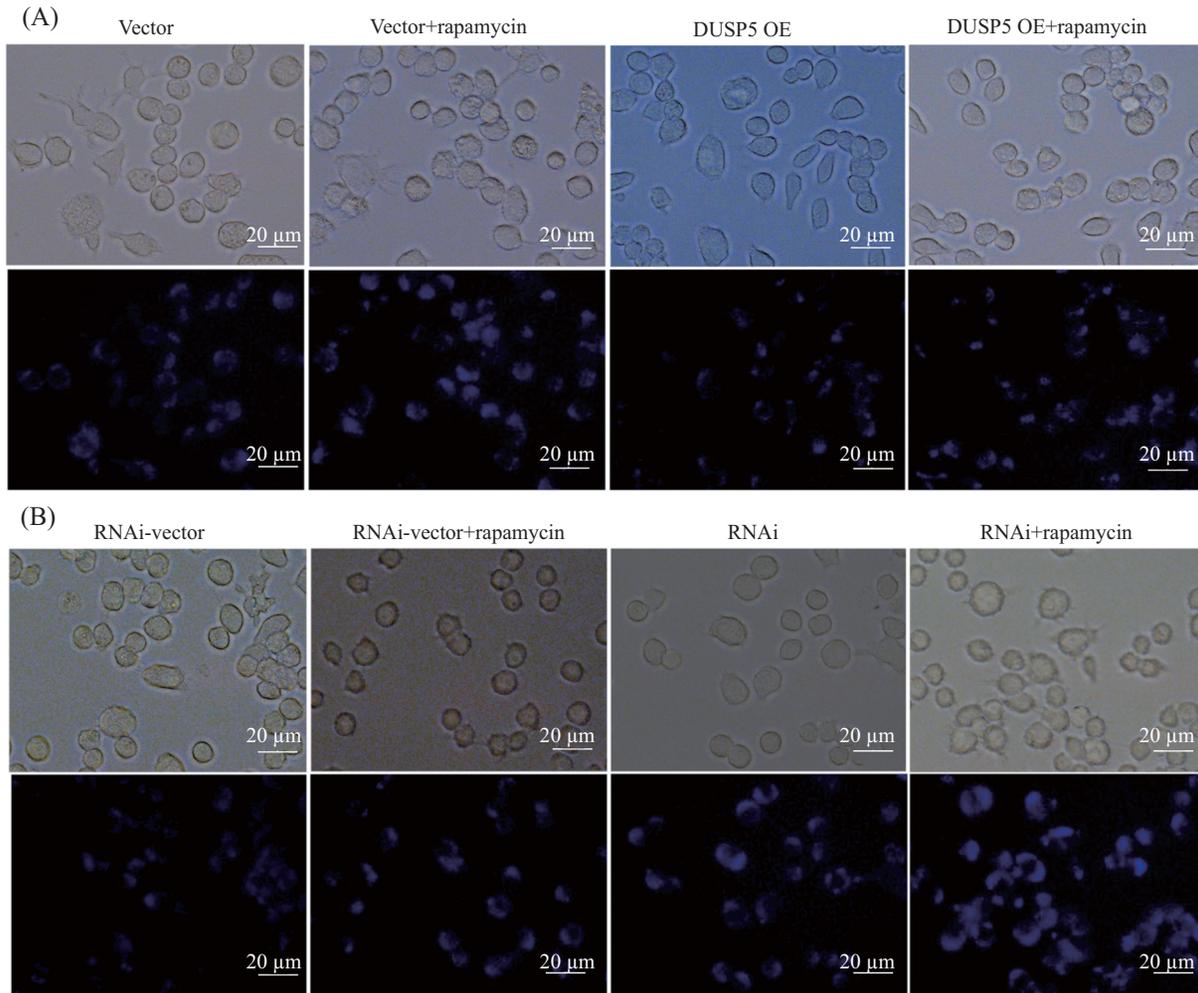
Fig.4 The expression of Beclin1 and LC3II in DUSP5 stably interfered RAW264.7 cell strain

的自噬调控却未见有相关研究报道。

慢病毒(lentivirus)载体是以人类免疫缺陷-I型病毒(HIV-1)为基础发展起来的基因治疗载体, 与其他逆转录病毒载体相比, 它可以将外源基因插入到宿主细胞基因组中。因此, 慢病毒载体作为一种有效且稳定的外源基因运输工具, 广泛用于机体内外实验研究和基因治疗中。本实验用慢病毒载体将DUSP5及DUSP5 RNAi外源基因整合至细胞中, 由于巨噬细胞RAW264.7转染效率不够理想, 慢病毒感染72 h荧光显微镜下观察细胞绿色荧光蛋白表达效率仅有30%, 因此用含有4 μg/mL嘌呤霉素的完全培养基对转染后的细胞进行抗性筛选。经筛选4天后, RAW264.7细胞绿色荧光蛋白表达效率提高到90%以上, 且用qRT-PCR和Western blot方法分别从基因和蛋白水平上检测DUSP5在各组细胞中的表达情况。结果显示: DUSP5过表达稳定转染细胞中,

DUSP5 mRNA和蛋白水平均显著升高; 而DUSP5干扰稳定转染细胞中DUSP5 mRNA和蛋白水平均显著降低。由此可见, DUSP5过表达/干扰RAW264.7稳定转染细胞株建立成功, 且可用于DUSP5对巨噬自噬调节的研究。

Rapa是一种常用的自噬诱导剂, 它通过抑制细胞mTOR蛋白磷酸化促进自噬, 并用于多种细胞自噬模型的建立^[21]。Beclin1是自噬的起始蛋白, 参与自噬体双层膜的形成^[22]。LC3是自噬标志物, 自噬形成时, 胞质型LC3(LC3I)酶解掉一小段多肽转变为(自噬体)膜型LC3(LC3II)而结合于自噬体膜上。LC3II和Beclin1均与细胞自噬强度呈现正相关^[23]。本实验用Rapa诱导DUSP5过表达/干扰稳定转染细胞株自噬, 检测各组细胞中Beclin1和LC3II蛋白表达情况。Rapa刺激后的结果显示: DUSP5过表达组RAW264.7细胞Beclin1和LC3II的表达量显著低于



A: DUSP5过表达后荧光显微镜下MDC染色细胞荧光强度; B: 干扰DUSP5表达后MDC染色细胞荧光强度。Vector: DUSP5过表达空载对照组; Vector+rapamycin: DUSP5过表达空载+rapamycin组; DUSP5 OE: DUSP5过表达组; DUSP5 OE+rapamycin: DUSP5过表达+rapamycin组; RNAi-vector: DUSP5干扰空载对照组; RNAi-vector+rapamycin: DUSP5干扰空载+rapamycin组; RNAi: DUSP5干扰组; RNAi+rapamycin: DUSP5干扰+rapamycin组。

A: MDC stain of DUSP5 stably overexpressed RAW264.7 cell strain; B: MDC stain of DUSP5 stably interfered RAW264.7 cell strain. Vector: DUSP5 overexpression empty vector control group; Vector+rapamycin: DUSP5 overexpression empty vector control treated with rapamycin group; DUSP5 OE: DUSP5 stably overexpressed RAW264.7 cell strain group; DUSP5 OE+rapamycin: DUSP5 stably overexpressed RAW264.7 cell strain treated with rapamycin group; RNAi-vector: DUSP5 interference empty vector control group; RNAi-vector+rapamycin: DUSP5 interference empty vector control treated with rapamycin group; RNAi: DUSP5 stably interfered RAW264.7 cell strain group; RNAi+rapamycin: DUSP5 stably interfered RAW264.7 cell strain treated with rapamycin group.

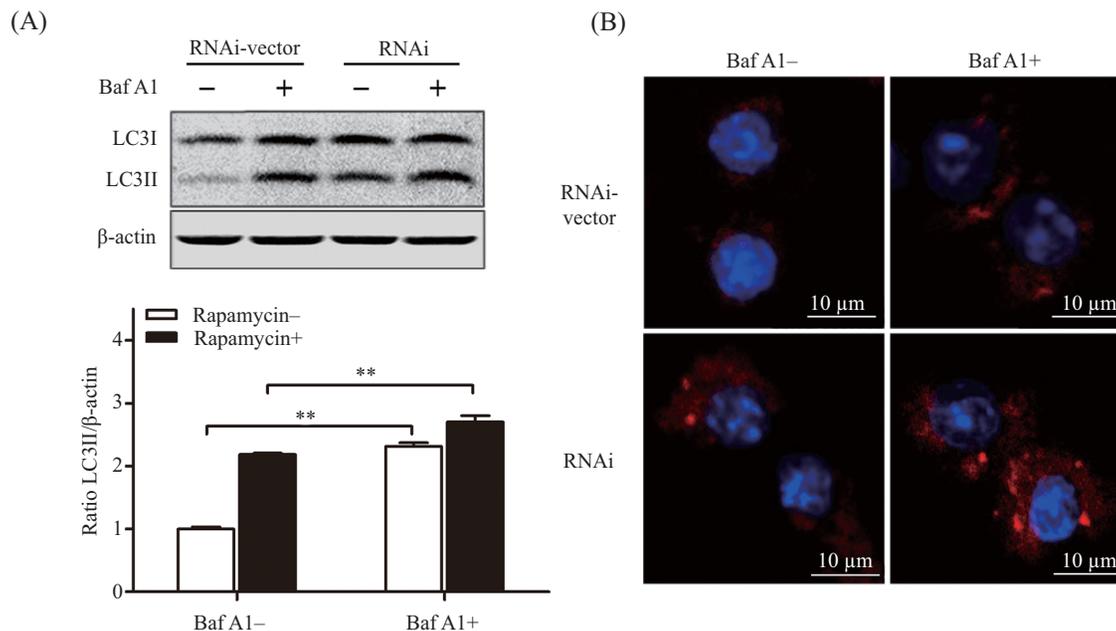
图5 DUSP5过表达/抑制稳定转染RAW264.7细胞株MDC染色形态学观察
Fig.5 MDC staining of DUSP5 stably overexpressed/interfered RAW264.7 cell strain

过表达空载组细胞; DUSP5干扰组RAW264.7细胞Beclin1和LC3II的表达量显著高于干扰空载组细胞。以上结果表明, DUSP5参与调控巨噬细胞自噬, 并可能在巨噬细胞自噬中发挥负调控作用。

单丹磺酰尸胺(MDC)是自噬体的选择性荧光标记物, 根据染色细胞的荧光强度可判断胞内是否有大量自噬体产生。因此, 为了进一步验证DUSP5在巨噬细胞自噬中的调控作用, 本实验用MDC染色, 从形态学上验证DUSP5过表达或者干扰后对巨噬

细胞自噬体形成的影响^[24-25]。Rapa处理后的染色结果显示: DUSP5过表达组细胞荧光强度弱于DUSP5过表达空载组; 而与DUSP5干扰空载对照组相比, DUSP5干扰组细胞荧光强度增强。因此, 根据MDC染色结果, 从形态学上进一步说明, DUSP5参与巨噬细胞自噬过程。

自噬是一种动态降解过程, 自噬体的形成、自噬体与溶酶体的融合以及自噬溶酶体的降解过程中任一环节障碍都将造成自噬流中断, 导致自噬无法



A: Baf A1刺激DUSP5干扰空载对照组细胞和DUSP5干扰组细胞, 自噬相关蛋白LC3II表达水平; B: Baf A1刺激DUSP5干扰空载对照组细胞和DUSP5干扰组细胞, 细胞中自噬体的形成。RNAi-vector: DUSP5干扰空载对照稳定转染RAW264.7细胞; RNAi: DUSP5干扰稳定RAW264.7细胞。 ** $P < 0.01$ 。

A: expression of LC3II protein in DUSP5 stably interfered RAW264.7 cell strain after Baf A1 stimulate. B: formation of autophagosomes in DUSP5 stably interfered RAW264.7 cell strain. RNAi-vector: DUSP5 interference empty vector control; RNAi: DSUP5 interference. ** $P < 0.01$.

图6 DUSP5对RAW264.7巨噬细胞系自噬流的影响

Fig.6 Effect of DUSP5 on autophagy flux in RAW264.7 cell strain

完成其生物学功能^[26]。Baf A1是自噬晚期抑制剂, 它通过抑制自噬体与溶酶体融合, 抑制自噬溶酶体降解, 从而使自噬体在细胞中聚集^[27]。在上述的实验中, 通过建立RAW264.7巨噬细胞系自噬模型, 初步得出DUSP5在其自噬过程中发挥负调控作用, 但对于DUSP5如何调节自噬却未有探究。因此, 为探究DUSP5对自噬流的影响, 本实验用Baf A1刺激DUSP5干扰稳定转染细胞株, 并检测细胞中LC3II的表达量以及自噬体的聚集。结果显示, Baf A1刺激后, DUSP5干扰组细胞LC3II表达量显著上升, 细胞中自噬体数量增加, 说明干扰DUSP5表达促进自噬体形成过程, 使自噬体在细胞中聚集。因此, DUSP5通过抑制RAW264.7巨噬细胞中自噬体的形成, 抑制其自噬。

以上结果说明, DUSP5可通过抑制自噬体合成抑制巨噬细胞RAW264.7自噬, 从而参与其自噬调控。因此, 本研究为进一步探索巨噬细胞在对抗病原微生物感染时所产生的应答机制提供新的研究思路, 且为以DUSP5为靶点开发新型抑制剂进而增强巨噬细胞自噬和抑菌能力提供了新的研究方向。

参考文献 (References)

- 1 Kulkarni VV, Maday S. Compartment-specific dynamics and functions of autophagy in neurons. *Dev Neurobiol* 2018; 78(3): 298-310.
- 2 Ruan HB, Ma Y, Torres S, Zhang B, Feriod C, Heck RM, *et al.* Calcium-dependent O-GlcNAc signaling drives liver autophagy in adaptation to starvation. *Genes Dev* 2017; 31(16): 1655-65.
- 3 Nishimura K, Goto K, Nakagawa H. Effect of erythropoietin production induced by hypoxia on autophagy in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 495(1): 1317-21.
- 4 Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2013; 13(10): 722-37.
- 5 Bah A, Vergne I. Macrophage autophagy and bacterial infections. *Front Immunol* 2017; 8: 1483.
- 6 Denu JM, Dixon JE. Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Curr Opin Chem Biol* 1998; 2(5): 633-41.
- 7 Kutty RG, Xin G, Schauder DM, Cossette SM, Bordas M, Cui W, *et al.* Dual specificity phosphatase 5 is essential for T cell survival. *PLoS One* 2016; 11(12): e0167246.
- 8 Low HB, Zhang Y. Regulatory roles of MAPK phosphatases in cancer. *Immune Netw* 2016; 16(2): 85-98.
- 9 Cornell TT, Rodenhouse P, Cai Q, Sun L, Shanley TP. Mitogen-activated protein kinase phosphatase 2 regulates the inflammatory response in sepsis. *Infect Immun* 2010; 78(6): 2868-76.
- 10 Zhou JY, Kho D, Reiners JJ Jr, Wu GS. Role for DUSP1 (dual-specificity protein phosphatase 1) in the regulation of autophagy.

- Autophagy 2016; 12(10): 1791-803.
- 11 Han W, Fu X, Xie J, Meng Z, Gu Y, Wang X, *et al.* MiR-26a enhances autophagy to protect against ethanol-induced acute liver injury. *J Mol Med (Berl)* 2015; 93(9): 1045-55.
 - 12 Wang J, Cao B, Han D, Sun M, Feng J. Long non-coding RNA H19 induces cerebral ischemia reperfusion injury via activation of autophagy. *Aging Dis* 2017; 8(1): 71-84.
 - 13 Kuo CJ, Hansen M, Troemel E. Autophagy and innate immunity: Insights from invertebrate model organisms. *Autophagy* 2018;14(2): 233-42.
 - 14 Patterson KI, Brummer T, O'Brien PM, Daly RJ. Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *Biochem J* 2009; 418(3): 475-89.
 - 15 Buffet C, Catelli MG, Hecale-Perlemoine K, Bricaire L, Garcia C, Gallet-Dierick A, *et al.* Dual specificity phosphatase 5, a specific negative regulator of ERK signaling, is induced by serum response factor and Elk-1 transcription factor. *PLoS One* 2015; 10(12): e0145484.
 - 16 Kucharska A, Rushworth LK, Staples C, Morrice NA, Keyse SM. Regulation of the inducible nuclear dual-specificity phosphatase DUSP5 by ERK MAPK. *Cell Signal* 2009; 21(12): 1794-805.
 - 17 Mandl M, Slack DN, Keyse SM. Specific inactivation and nuclear anchoring of extracellular signal-regulated kinase 2 by the inducible dual-specificity protein phosphatase DUSP5. *Mol Cell Biol* 2005; 25(5): 1830-45.
 - 18 Kovanen PE, Bernard J, Al-Shami A, Liu C, Bollenbacher-Reilly J, Young L, *et al.* T-cell development and function are modulated by dual specificity phosphatase DUSP5. *J Biol Chem* 2008; 283(25): 17362-9.
 - 19 Hwang JH, Joo JC, Kim DJ, Jo E, Yoo HS, Lee KB, *et al.* Cordycepin promotes apoptosis by modulating the ERK-JNK signaling pathway via DUSP5 in renal cancer cells. *Am J Cancer Res* 2016; 6(8): 1758-71.
 - 20 Grasset MF, Gobert-Gosse S, Mouchiroud G, Bourette RP. Macrophage differentiation of myeloid progenitor cells in response to M-CSF is regulated by the dual-specificity phosphatase DUSP5. *J Leukoc Biol* 2010; 87(1): 127-35.
 - 21 Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS, *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 2008; 8(4): 445-544.
 - 22 Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, *et al.* Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 1999; 402(6762): 672-6.
 - 23 Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 2016; 12(1): 1-222.
 - 24 Biederbick A, Kern HF, Elsasser HP. Monodansylcadaverine (MDC) is a specific *in vivo* marker for autophagic vacuoles. *Eur J Cell Biol* 1995; 66(1): 3-14.
 - 25 Liu F, Gao S, Yang Y, Zhao X, Fan Y, Ma W, *et al.* Curcumin induced autophagy anticancer effects on human lung adenocarcinoma cell line A549. *Oncol Lett* 2017; 14(3): 2775-82.
 - 26 Kroemer G. Autophagy: a druggable process that is deregulated in aging and human disease. *J Clin Invest* 2015; 125(1): 1-4.
 - 27 Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 2010; 140(3): 313-26.