

· 论 著 ·

EGR1 与 TGF- β 1 基因在肝包虫病表达情况的研究

董入嘉 张娇 朱娜 杨玉荣^(通讯作者)

(宁夏医科大学基础医学院病原生物与医学免疫学系 宁夏 银川 750004)

[摘要] 目的: 在包虫病病人肝组织 mRNA 表达差异基因筛选基础上, 进一步检测并评估 EGR1 与 TGF- β 1 两种基因的相关性。方法: 构建 EG95 刺激人源巨噬细胞 THP-1 包虫免疫细胞模型。采用 qRT-PCR 及 Western-blot 实验方法对两种基因进行检测, 验证两种基因在细胞模型中的表达, ELISA 检测细胞因子的表达变化。结果: qRT-PCR 和 Western-Blot 实验结果显示, 与对照组相比, EGR1 与 TGF- β 1 基因表达水平和蛋白表达水平显著性增高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。炎症细胞因子表达量也显著增高。结论: EGR1 与 TGF- β 1 基因在包虫免疫细胞模型中表达水平显著高于对照组。为进一步检测并评估 EGR1 基因与 TGF- β 1/Smad 信号通路的相关性提供基础。

[关键词] 包虫病; THP-1 细胞; EGR1; TGF- β 1

[Abstract] Objective: Based on the screening differential genes of liver tissue in patients with hydatid, to further evaluate the expression of EGR1 and TGF- β 1 genes. Methods: EG95 antigen was used to act on THP-1 cells to establish a cell model of hydatid infection. The two genes were verified by qRT-PCR and Western-blot experiments. ELISA was used to detect the expression changes of cytokines. Results: In the cell model, after the THP-1 cells were treated with EG95, the secretion of EGR1 and TGF- β 1 levels at mRNA and protein aspects were also statistically significant (< 0.05), respectively. The expression of inflammatory cytokines was also significantly increased. Conclusion: The expression levels of EGR1 and TGF- β 1 genes in hydatid immune cell model were significantly higher than those in control group. It provides a basis for further detection and evaluation of the correlation between EGR1 gene and TGF- β 1/Smad signaling pathway.

[Keywords] Hydatidosis; THP-1; EGR1; TGF- β 1

棘球蚴病(echinococcosis)又称包虫病(Hydatid disease), 是由棘球绦虫 (echinococcus) 的幼虫寄生于宿主体内而引起的一种人兽共患寄生虫病^[1], 主要流行于西北地区如青海、内蒙古、宁夏、甘肃、新疆等地。^[2]

本课题组前期通过对肝包虫病病人和健康对照的组织 mRNA 基因芯片表达差异筛选, 在诸多差异表达基因中发现早期生长应答基因 1 (early growth response gene1, EGR1) 和转化生长因子 β (Transforming growth factor- β , TGF- β) 病人组高表达内容。^[3]

因此, 本文用 Real-time qPCR 和 Western Blot 进行芯片分析结果的验证; 观察这两个芯片差异表达基因在包虫抗原 EG95 作用后的人单核巨噬细胞模型中的表达情况, 旨在研究包虫病中 EGR1 和 TGF- β 1 因子的表达变化相关性, 为阐明 EGR1 和 TGF- β 1/Smad 信号通路相互作用的分子机制奠定基础, 从而为包虫病治疗提供新的理论依据及治疗靶点。

材料与方法

材料

1. 组织及细胞

1.1 细胞: 人单核细胞 THP-1 购自中国科学院细胞库, 实验室应用方法见说明。

2. 试剂

2.1 EG95 重组疫苗, 购自重庆澳龙生物制品有限公司; RPMI1640 培养基, 购自 GIBICO 公司; CCK-8 细胞活力检测试剂盒, 购自美国 APEX BIO 公司; Lonsera 胎牛血清购自 Lonsera 公司; 佛波醇肉豆蔻酸乙酸钠 (Phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA), 购自北京 Solarbio 公司; 总 RNA 提取试剂盒购自美国 Omega Bio-Tek 公司; PrimeScript™ RT reagent Kit 试剂盒和 TB Green™ Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) 试剂盒, 购自 TaKaRa 公司; 引物由上海生工技术公司合成; 兔多克隆抗体 EGR1, 兔抗人 GAPDH 抗体购自 Proteintech 公司; 兔多克隆抗体 TGF- β , 购自 Affinity 公司; 全蛋白提取试剂盒、SDS 凝胶试剂盒, 均购自凯基公司。人 IFN- γ 、TNF- α 、IL-6、IL-10 ELISA 试剂盒购自博士德。

方法

1. 细胞培养及 CCK-8 试验

THP-1 细胞采用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养, 3d 进行传代。THP-1 细胞处于对数生长期且状态良好时, 将培养瓶细胞稀释成 1×10^5 /ml 接种于 96 孔板中, 每孔 100ul, 设 5 个复孔。同时加入 50ng/ml PMA 刺激贴壁。分别使用浓度为 0、0.5、1、2、3、4、5、10 μ g/ml 的 EG95 刺激 thp-1 细胞 24h, 设置对照组, 每孔加 10ul CCK-8 溶液培养箱孵育 1h, 酶标仪测

450nm 处吸光度, 计算细胞存活率, 确定最佳反应浓度。

2.实时荧光定量 PCR 检测 mRNA 水平

利用 OMEGA RNA 提取试剂盒提取 EG95 抗原共培养 THP-1 细胞不同 (0h、3h、6h、12h、24h) 时间后的总 RNA。并用超微量核酸蛋白检测仪测定其含量及纯度。利用 TAKARA 逆转录试剂盒逆转 RNA 获得 cDNA 后, 使用 Real-Time PCR 扩增仪进行荧光定量 PCR 扩增。反应条件为 95℃ 30s; 95℃ 5s, 60℃ 30s。检测对照组和不同时间段下 EG95 刺激 EGR1、TGF-β 1 mRNA 水平变化, 根据 2-ΔΔCT 计算。引物见表 1。

表 1 引物序列

基 因 名	Forward Primer(5'-3')	Reverse Primer(5'-3')
EGR1	GGTCAGTGGCCTAGTGAGTGCCTGAGTAAATGGC	GA
TGF-β 1	CTGTACATTGACTTCCG CAAG	TGTCCAGGCTCCAAATGT AG
GAPDH	CAGGAGGCATTGCTGATGAAGGCTGGGGCTCATTGAT	

3.Western Blot 检测蛋白水平

采用全蛋白提取试剂盒提取 THP-1 细胞全蛋白, 进行 BCA 蛋白定量。配制 10% 分离胶和 5%浓缩胶, 每孔上样 60ug, 然后进行 SDS-PAGE 电泳, 80V 跑 30min 后调整电压为 120V 直至样本泳到底部后停止电泳, 转膜 2h 后, 8%脱脂牛奶室温慢摇封闭 2h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10min, 孵一抗过夜, 次日室温慢摇 1h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10min, 孵二抗慢摇 2h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10min, 用 ECL 显色液显色, 蛋白成像系统曝光, 检测对照组和不同时间段下 EG95 刺激 EGR1、TGF-β 1 蛋白水平变化。

4.ELISA 检测细胞因子

收取干预组和对照组细胞培养上清, 按照 ELISA 实际和说明书进行操作, 检测对照和 EG95 刺激组细胞因子 IFN-γ、TNF-α、IL-6、IL-10 的变化。

5.统计学分析

所有数据均采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析。计量资料采用均数 ± 标准差表示, 组间均数采用 Student's t 检验。多组均数 进行 One-Way ANOVA 检验, P<0.05 认为差异具有统计学意义。

结果

1. EG95 对 THP-1 细胞存活率的影响

用 EG95 浓度为 1μg/ml 与 THP-1 细胞共培养时, THP-1 细胞活性处于最好状态。

使用 50ng/ml pma 刺激 THP-1 细胞贴壁, 在加入不同浓度梯度 EG95 (0、0.5、1、2、3、4、5、10 μg/ml) 后, 用 cck8 法检测细胞存活率。结果显示, EG95 浓度为 1μg/ml 时, Thp-1 活性约为 80%-90%。(图 1)

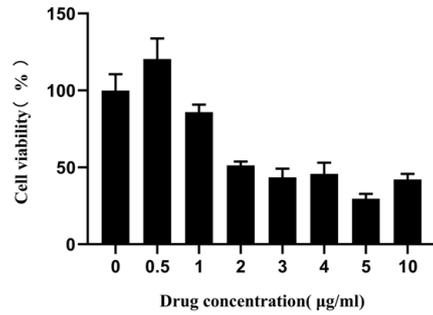


图 1 cck8 检测不同浓度 EG95 刺激 THP-1 巨噬细胞后细胞活力

Fig.1 Cell viability of THP-1 macrophage was detected by CCK-8 when used different concentrations of EG95

2.EGR1 和 TGF-β 1 的 mRNA 表达

在 THP-1 细胞中, EG95 刺激时, EGR1 和 TGF-β 1 表达量明显升高, 且在 24h 时 mRNA 表达量最高。(图 2)

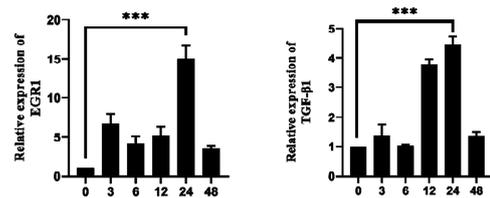


图 2 EG95 刺激 THP-1 巨噬细胞后不同时间, EGR1 和 TGF-β 1 的 mRNA 表达情况, 与 0 h 比较, *** P < 0. 001

Fig. 2 mRNA expression of EGR1 and TGF-β 1 in THP-1 cells stimulated by EG95 at different time ,compared with 0 h, ** *P<0. 01.

3. EGR1 和 TGF-β 1 蛋白表达

EG95 作用 THP-1 巨噬细胞模型时, 使用 1ug /mL EG95 刺激 THP-1 细胞检测 EGR1 和 TGF-β 1 表达情况, 结果显示: 48h 时 EGR1 蛋白水表达最高, TGF-β 1 蛋白水平 12h 表达量最高。(图 3)

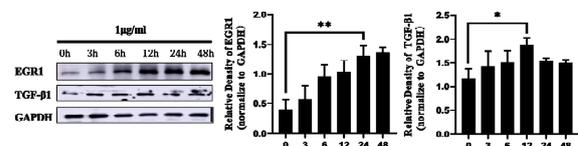


图 3 EG95 刺激 THP-1 巨噬细胞后不同时间, EGR1 和 TGF-β 1 的蛋白表达情况, 与 0h 比较, * P < 0. 05, ** P < 0. 01

Fig.6 Expression of EGR1 和 TGF-β 1 gene proteins in THP-1 cells stimulated by EG95 at different time ,compared with 0 h, *P<0. 05, **P<0. 01.

4.不同细胞因子的表达

在 EG95 的刺激下, IFN-γ、TNF-α、IL-6、IL-10 因子的表达较对照组显著升高。(图 4)

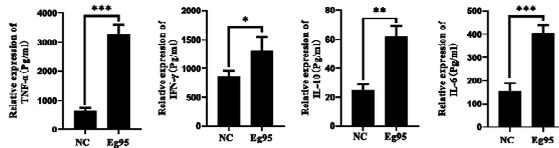


图 4 IFN- γ 、TNF- α 、IL-6、IL-10 因子的表达情况，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$

Fig.4 Expression of IFN- γ ，TNF- α ，IL-6 and IL-10，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$

讨论

包虫病免疫机制研究表明，细粒棘球绦虫感染人体后，通过胃肠道和血液系统到肝脏寄生。^[4]此时树突状细胞通过激活 T 细胞参与抵抗棘球绦虫的免疫反应，刺激机体分泌大量 INF- γ 和 IL-12 等细胞因子。^[5]单核巨噬细胞也在固有免疫阶段发挥作用。感染后，M1 型巨噬细胞通过分泌 IL-6，THF- α 等因子清除病原体，在棘球绦虫死亡后，可诱导 M2 巨噬细胞分泌 IL-10，TGF- β 1 等因子促进机体组织修复。^[6]本研究通过 EG95 刺激 thp-1 巨噬细胞，建立包虫免疫细胞模型，检测 IFN- γ 、TNF- α 、IL-6、IL-10 因子的表达情况均高于正常组，证明此细胞模型发生了免疫反应，相应的炎症因子已被激活。

EGR1 是早期生长应答基因家族成员^[7]。大量研究证实 EGR1 基因对肿瘤的发生、转移及血管生成等环节都发挥十分重要的调控作用。EGR1 通过调节多个基因的转录调控多个信号转导通路，发挥对肿瘤进展的双向调控作用^[8]。TGF- β 1 是一种调节细胞分化、增殖、血管生成和免疫反应的多功能细胞因子^[9]。目前已有大量研究表明，包虫病灶和实验动物外周血中 TGF- β 1 因子表达明显上调，TGF- β 1/Smad 信号传导在细粒棘球绦虫的早期感染免疫抑制过程中起着重要作用^[10-12]。研究发现，在肿瘤、肺纤维化等疾病中，EGR1 基因可以通过上调 TGF- β 1 激活 TGF- β 1/Smad 信号通路的表达。但在包虫病中，TGF- β 1/Smad 信号通路的与 Egr1 的关系尚未明确。

本研究通过建立包虫免疫细胞模型，验证结果显示 EGR1 和 TGF- β 1 的 mRNA 表达量显著上升，在刺激 24h 时，mRNA 表达量最高。EGR1 和 TGF- β 1 的蛋白表达量也明显上升，但是两种基因最大表达量的刺激时间不同。因此，认为在机体感染棘球绦虫时发生一系列的免疫反应。这一反应发生时，EGR1 和 TGF- β 1 两种基因表达均显著上调。同时，IFN- γ 、TNF- α 、IL-6、IL-10 因子的表达量也有所上升，推测两种基因都与包虫炎症反应相关。

综上所述，本研究证实了 EGR1 和 TGF- β 1 两个因子参与包虫免疫反应，但具体的通路分子机制有待我们进一步研究。

参考文献

- [1]. Anvari, D., et al., Current situation and future prospects of Echinococcus granulosus vaccine candidates: A systematic review. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2020.
- [2]. Deplazes, P., et al., Global Distribution of Alveolar and Cystic Echinococcosis. Vol. 95. 2017, England: Elsevier. 315-493.
- [3]. 尹媛婕等, 囊型包虫病患者包囊钙化相关基因研究. *中华预防医学杂志*, 2016. 50(05): 第 434-438 页.
- [4]. Gottstein, B., et al., Immunology of Alveolar and Cystic Echinococcosis (AE and CE). *Advances in parasitology*, 2017. 96: p. 1-54.
- [5]. 徐岩等, CD11C~+CD45RA~-髓样树突状细胞在泡球绦虫感染小鼠中的水平变化. *新疆医科大学学报*, 2016. 39(05): 第 565-568 页.
- [6]. Noël, W., et al., Alternatively activated macrophages during parasite infections. *Trends in parasitology*, 2004. 20(3): p. 126-133.
- [7]. Koldamova, R., et al., Genome-wide approaches reveal EGR1-controlled regulatory networks associated with neurodegeneration. *Neurobiology of disease*, 2014. 63: p. 107-114.
- [8]. Veldhoen, M., et al., Transforming growth factor- β 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nature immunology*, 2008. 9(12): p. 1341.
- [9]. Attisano, L. and J.L. Wrana, Signal transduction by the TGF- β superfamily. *Science*, 2002. 296(5573): p. 1646-7.
- [10]. Chen, Y., et al., Transforming growth factor β signaling pathway: A promising therapeutic target for cancer. *Journal of cellular physiology*, 2019. 235(3): p. 1903-1914.
- [11]. Pang, N., et al., TGF- β /Smad signaling pathway positively up-regulates the differentiation of Interleukin-9-producing CD4+ T cells in human Echinococcus granulosus infection. *Journal of Infection*, 2018. 76(4): p. 406-416.
- [12]. Mejri, N., et al., Intraperitoneal Echinococcus multilocularis infection in mice modulates peritoneal CD4+ and CD8+ regulatory T cell development. *Parasitology international*, 2010. 60(1): p. 45-53.

基金项目：国家自然科学基金(NO.81460311、81960604)

作者简介：董入嘉(1996-)，女，硕士研究生，主要从事包虫免疫方面的研究

*通信作者及指导教师：杨玉荣(1962-)，女，博士，宁夏医科大学病原生物与免疫学教研室教授