

真核起始因子 6 调控巨噬细胞迁移及抑制炎症因子

王珍珍¹ 鲜雪梅² 杨 帅² 李 欣² 陈仁金²

1徐州医科大学肿瘤生物治疗研究所 江苏徐州 221004;

2徐州医科大学生命科学院 江苏徐州 221004

【摘 要】 探索真核起始因子 6 (Eukaryotic initiation factor-6, eIF6) 对巨噬细胞的影响。eIF6 慢病毒载体和空载体转染 RAW264.7 细胞, 通过梯度嘌呤霉素筛选, 获得 eIF6 过表达细胞和空载体对照组细胞。荧光显微镜下检测细胞荧光表达; Real time PCR 检测细胞系中 eIF6 的 mRNA 表达及各炎症因子的表达。细胞划痕实验检测 eIF6 过表达对巨噬细胞迁移的影响。结果显示 eIF6 过表达巨噬细胞细胞的迁移速率显著低于阴性对照组 ($P < 0.05$); eIF6 过表达细胞中促炎标记物 (iNOS, IL-1 β , IL-4 和 MCP-1) 表达显著升高 ($P < 0.05$), 抗炎标记物 (CD163, IL-10 和 TGF- β 1) 表达显著降低 ($P < 0.05$)。eIF6 调节巨噬细胞迁移及炎症因子的变化。

【关键词】 真核起始因子 6, 巨噬细胞迁移, 炎症因子

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是一种慢性心血管疾病, 该病在全球具有较高的罹患率和致死率, 人类的生命健康受到严重威胁^[1]。巨噬细胞在动脉粥样硬化的发展中起着核心作用, 其有助于维持局部炎症反应, 影响斑块发展并促进血栓形成。巨噬细胞的这些作用及其可塑性使巨噬细胞成为阻止和加速现有动脉粥样硬化发展的有吸引力的治疗靶标^[2]。有研究显示, 巨噬细胞作为一种免疫细胞, 通过分泌炎症因子、生长因子等促进创面修复和后期纤维化^[3]。此外, 巨噬细胞能够通过吞噬病原菌清除坏死细胞和组织; 分泌促炎症因子和抑炎症因子影响炎症的发展过程。在动脉粥样硬化中, 巨噬细胞的异质性是现在公认的概念^[3]。真核细胞起始因子 6 (eukaryotic initiation factor-6, eIF6) 可对真核生物的翻译起始阶段进行调控。在细胞核内 eIF6 参与核糖体生成和蛋白质翻译过程^[2]。研究表明, 与野生型 (WT) 相比, eIF6 杂合 (het) 细胞表达 50% eIF6, 具有正常的基础翻译^[4]。eIF6^{-/-} 细胞保留足够的核仁 eIF6 和正常的核糖体生物发生^[2]。本研究目的探索 eIF6 对巨噬细胞的调控作用, 为未来的研究炎症研究提供更多的支持。

1 材料与方法

1.1 细胞

RAW264.7 细胞系及 eIF6^{-/-} 和 eIF6^{+/+} 小鼠腹腔巨噬细胞。

1.2 慢病毒 eIF6 转染 RAW264.7

eIF6 慢病毒制备由上海吉玛生物构建。

1.3 划痕修复实验

取用 100 μ L 无菌塑料黄枪头在单层细胞表面划一条垂直于板底水平线的直线。细胞继续培养 24 小时, 显微镜下观察细胞迁移变化, 并拍照记录。

1.4 定量 PCR

细胞: 按 5×10^6 个细胞加入 1 mL RNAiso Plus 试剂, 提取 RNA。Takara 反转录试剂盒进行反转录, 实时荧光定量 PCR 对一下基因进行检测, 引物参照^[5]。

1.5 统计方法

数据采用 SPSS26.0 分析处理, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较用 t 检验。多组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA)。假设检验水准按 $\alpha = 0.05$ 判定。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建 eIF6 过表达和空载体对照细胞系

eIF6 慢病毒表达载体和对照载体分别感染 RAW264.7 细胞, 嘌呤霉素筛选后在荧光显微镜下检测荧光表达变化, 结果显示 eIF6 与 Control 组均有绿色荧光表达 (图 1A)。实时荧光定量 PCR 结果显示, 与 Control 组

相比,eIF6 过表达转染组细胞中 eIF6 含量显著升高(图 1B)。荧光检测与实时荧光定量 PCR 结果表明 eIF6 慢病毒载体转染成功。

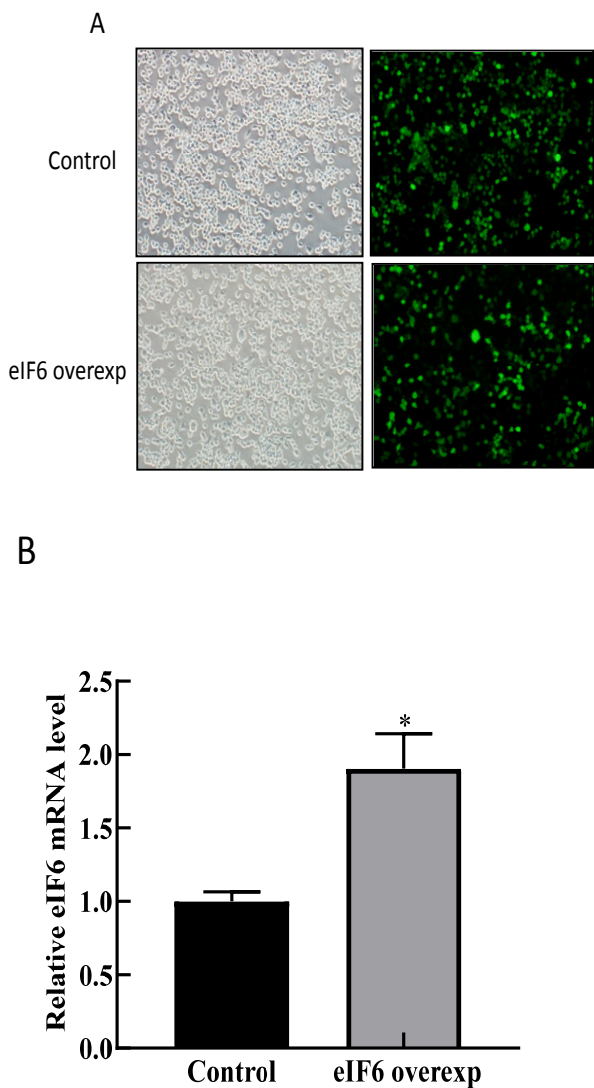


图 1 荧光检测和 qPCR 检测 eIF6 慢病毒表达载体转染效率

(A) 通过荧光显微镜检测慢病毒感染后转染效率;
(B) 通过实时荧光定量 PCR 检测各组细胞内 eIF6 的表达。
(注: Scale bar=50 μ m. vs. the control group, *P<0.05)

2.2 高水平 eIF6 抑制 RAW264.7 细胞迁移

本实验运用细胞划痕实验,观察 eIF6 对巨噬细胞的迁移能力的影响。从图 2 中可以看出,与 eIF6 阴性对照组相比,eIF6 过表达细胞的迁移速率较慢。结果表明高水平 eIF6 能显著抑制巨噬细胞的迁移速率。

2.3 高水平 eIF6 上调促炎因子表达且下调抑炎因子表达

实时荧光定量 PCR 检测 eIF6 过表达和阴性对照细胞中炎症因子表达变化。从图 3 中可以看出,与 eIF6 阴性组相比,eIF6 过表达细胞中促炎因子(MCP-1、iNOS、IL-6、IL-1β)的表达显著升高,而抑炎因子(TGF-β1、IL-10、CD163)的表达显著降低。结果表明高水平 eIF6 能促进促炎因子表达,抑制抑炎因子的表达。

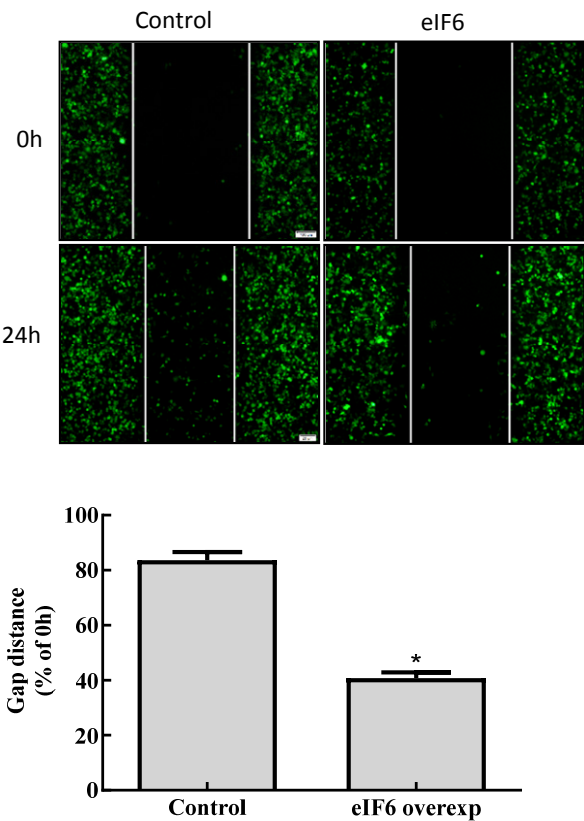


图 2 划痕法检测 eIF6 过表达对巨噬细胞迁移能力的影响

(注: Scale bar=100 μ m. vs. the control group, *P<0.05)

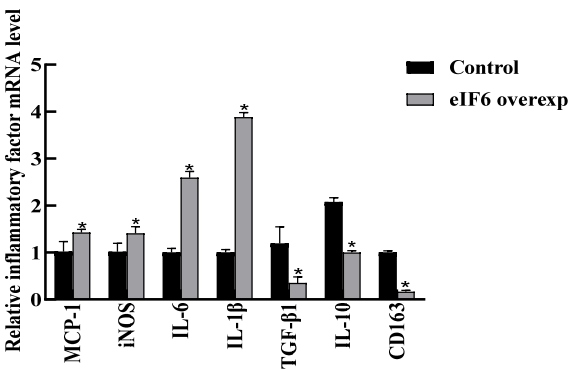


图 3 qPCR 检测过表达 eIF6 和 Control 组细胞中炎症因子的表达

(注: vs. the control group, *P<0.05)

3. 讨论

动脉粥样硬化是一种慢性炎症,炎症贯穿于动脉粥样硬化发展的各个阶段。巨噬细胞在动脉粥样硬化的微环境中具有重要作用,其不同的活化状态和功能影响动脉粥样硬化斑块大小^[6]。真核生物基因表达调控的一种机制是控制翻译速率,翻译调控在细胞生长,增殖和发育中起着关键作用。可以在翻译的起始、伸长和终止中的每一步控制翻译速率^[7]。eIF6作为一种真核翻译起始因子,在细胞核中通过与核糖体亚基 60S 结合以抑制 80S 核糖体的形成,进而调节真核生物的初始翻译^[8]。eIF6 可调控组蛋白乙酰化及限速性脂肪酸合成酶 mRNA 的表达量。近年研究表明,eIF6 能够在瘢痕形成以及肾纤维化等过程中调节巨噬细胞及其相关信号通路的表达影响疾病的发展^[9]。本研究中,对 RAW264.7 细胞进行慢病毒过表达转染 eIF6,细胞经诱导成 M1 型和 M2 型巨噬细胞后发现 M1 型中 eIF6 表达显著高于 M2 型中 eIF6 表达。

本研究发现,巨噬细胞 M1 型中 eIF6 表达显著高于 M2 型。由于 eIF6 基因的转录受 Notch-1 受体调控,控制着在发育,细胞分化和增殖中极为重要的进化保守信号转导途径^[10]。稳定表达 eIF6 不会显著改变细胞增殖的速度,但对细胞迁移和侵袭具有深远的影响^[11]。本研究对转染后 RAW264.7 细胞进行细胞划痕实验观察到 eIF6 过表达明显抑制巨噬细胞的迁移速率。eIF6 可能在动脉粥样硬化过程中高表达,其表达具有细胞类型特异性,这种调节可能与组织特异性因子和蛋白合成途径相关。

参考文献:

- [1]GISTERA A, GK HANSSON. The Immunology of Atherosclerosis[J]. Nat Rev Nephrol, 2017, 13 (6) : 368-380.
- [2]ROBBINS CS, I HILGENDORF, GF WEBER, et al. Local Proliferation Dominates Lesional Macrophage Accumulation in Atherosclerosis[J]. Nat Med, 2013, 19 (9) : 1166-1172.
- [3]ZHANG J, J MURI, G FITZGERALD, et al. Endothelial Lactate Controls Muscle Regeneration from Ischemia by Inducing M2-Like Macrophage Polarization[J]. Cell Metab, 2020, 31 (6) : 1136-1153 e1137.

[4]GANDIN V, A MILUZIO, AM BARBIERI, et al. Eukaryotic Initiation Factor 6 Is Rate-Limiting in Translation, Growth and Transformation[J]. Nature, 2008, 455 (7213) : 684-688.

[5]CHEN Y, Z WANG, X XIAN, et al. Eukaryotic Initiation Factor 6 Repression Mitigates Atherosclerosis Progression by Inhibiting Macrophages Expressing Fasn[J]. IUBMB Life, 2023, 75 (5) : 440-452.

[6]KOELWYN GJ, EM CORR, E ERBAY, et al. Regulation of Macrophage Immunometabolism in Atherosclerosis[J]. Nat Immunol, 2018, 19 (6) : 526-537.

[7]BRINA D, A MILUZIO, S RICCIARDI, et al. Eif6 Coordinates Insulin Sensitivity and Lipid Metabolism by Coupling Translation to Transcription[J]. Nat Commun, 2015, 6: 8261.

[8]YANG SS, JL TAN, DS LIU, et al. Eukaryotic Initiation Factor 6 Modulates Myofibroblast Differentiation at Transforming Growth Factor-β1 Transcription Level Via H2a.Z Occupancy and Sp1 Recruitment[J]. J Cell Sci, 2015, 128 (21) : 3977-3989.

[9]SHU Q, J TAN, VD ULRIKE, et al. Involvement of Eif6 in External Mechanical Stretch-Mediated Murine Dermal Fibroblast Function Via Tgf-β1 Pathway[J]. Sci Rep, 2016, 6: 36075.

[10]ARTAVANIS-TSAKONAS S, MD RAND, RJ LAKE. Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development[J]. Science, 1999, 284 (5415) : 770-776.

[11]BENELLI D, S CIALFI, M PINZAGLIA, et al. The Translation Factor Eif6 Is a Notch-Dependent Regulator of Cell Migration and Invasion[J]. PLoS One, 2012, 7 (2) : e32047.

作者简介:王珍珍,实验师,研究方向:免疫与代谢性疾病。

基金项目:江苏省高等学校基础科学(自然科学)研究重大项目(22KJA320005)。

*通讯作者:陈仁金,副教授,研究发现:人类动物模型的建立与免疫代谢。