

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 21620141152494

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**FAM114A1 调控 LPS 引起的免疫应答及其
机制的初步分析**

**FAM114A1 regulates the immune response caused by LPS
and the preliminary analysis of its mechanism**

邵志强

指导教师姓名: 杨云青 教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2017 年 4 月

论文答辩时间: 2017 年 5 月

学位授予日期: 2017 年 6 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2017 年 月

FAM114A1 调控 LPS 引起的免疫应答及其机制的初步分析

邵志强

指导教师

杨云青

教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(杨云青)课题(组)的研究成果,获得(杨云青)课题(组)经费或实验室的资助,在(杨云青)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博硕

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文,并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版),允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索,将学位论文的标题和摘要汇编出版,采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于:

() 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文,于
年 月 日解密,解密后适用上述授权。

() 2. 不保密,适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文,未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的,默认为公开学位论文,均适用上述授权。)

声明人(签名):

年 月 日

目录

摘要.....	I
ABSTRACT.....	II
第一章 前言	1
1.1 天然免疫系统	1
1.2 炎症反应与细胞因子	9
1.3 获得性免疫	13
1.4 LPS 与免疫应答	16
1.5 CARDs 简介	17
1.5 FAM114A1	18
1.6 项目背景、内容及研究意义	18
第二章 实验材料与方法	20
2.1 实验材料	20
2.2 实验方法	24
2.3 数据处理与统计学分析	39
第三章 实验结果与分析	40
3.1 FAM114A1 负调控 THP1 细胞内 NF κ B、ISRE 和 IFN- α/β 荧光素酶报告基因的 转录活性	40
3.2 FAM114A1 调控 LPS 诱导的细胞内免疫应答	41
3.3 <i>Fam114a1</i> 缺失上调 LPS 诱导的细胞因子	50
3.4 <i>Fam114a1</i> 缺失抑制 LPS 和 R848 诱导的免疫细胞表面 Cd69 的表达	51
第四章 讨论.....	52

缩略词表.....	56
参考文献.....	57
致谢.....	63

厦门大学博硕

CONTENT

ABSTRACT	I
CHAPTER 1 INTRODUCTION	1
1.1 Innate Immunity	1
1.2 Inflammatory responses and cytokines	9
1.3 Adaptive Immunity	13
1.4 LPS and immune response	16
1.5 CARDs introduction	17
1.5 FAM114A1 introduction	18
1.6 Research background ,content and the meaning of this project	18
CHAPTER 2 MATERIALS AND METHODS	20
2.1 Research materials	20
2.2 Methods	24
CHAPTER 3 RESULTS AND ANALYSIS	40
3.1 FAM114A1 downregulated the transcriptional activity of NFκB,ISRE and IFN-α/β luciferase reporters in THP1 cells	40
3.2 <i>FAM114A1</i> regulated the intracellular immune response induced by LPS	41
3.3 <i>Fam114a1</i> deficiency upregulated cytokines raised by LPS	50
3.4 <i>Fam114a1</i> deficiency suppressed the expression of CD69 induced by LPS and R848	51
CHAPTER 4 DISCUSSION	54
ACRONYM TABLE	56

REFERENCES.....57

ACKNOWLEDGEMENT.....63

厦门大学博硕士

摘要

脂多糖 (LPS) 是位于革兰氏阴性菌细胞壁含糖脂类物质, 又名类毒素。在许多细胞表面, 特别是单核/巨噬细胞、树突状细胞、嗜中性粒细胞和 B 淋巴细胞, LPS 能够与 CD14/TLR4/MD2 受体复合物相结合, 引起下游许多促炎细胞因子的分泌, 也能够上调许多淋巴细胞表面 CD69 分子的表达。

半胱天冬酶募集结构域 (CARD domain) 是一种广泛存在于多种参与细胞凋亡、细胞增殖与免疫炎症的信号蛋白中的相互作用模序。在包括 RIG- I、MAVS、NLRCs、NLRP1、凋亡蛋白 caspase 和许多细胞因子中, 都可以发现 CARDs 的身影。

FAM114A1 是一种由 563 个氨基酸构成的, 在神经系统中高度表达的蛋白, 其氨基酸序列中, 第 263-340 氨基酸构成了半胱天冬酶募集结构域 (CARD domain), 第 347-477 氨基酸构成了谷氨酸富集序列, 因此 FAM114A1 可能参与细胞的凋亡、增殖及免疫调控。

在本项研究中, 我们探究了 FAM114A1 在免疫应答调控中的潜在作用。首先, 我们在 THP1 中过表达 FAM114A1, 通过萤火虫荧光素酶报告基因实验发现可以负调控 NF κ B、ISRE 和 IFN α/β 的转录活性, 并且能够下调 LPS 诱导的 TNF- α 的表达。同时, 在 RAW264.7 中, 运用 RNA 干扰技术敲降 Fam114a1, 在 mRNA 水平上, 可以增强 LPS 诱导的 Tnf- α 、Il-6 的转录。蛋白质免疫印迹试验中, 我们发现, 在经 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞中, 过表达 Fam114a1 可以上调 I κ b α 和 p-Stat1 的蛋白水平并抑制 p-I κ b α 、p65 的表达。在体内实验中, 我们通过小鼠腹腔注射 LPS, 发现相比于野生型小鼠, Fam114a1^{-/-} 小鼠的血清、脾脏中的 Tnf- α 、Il-6 显著上调。这些现象提示着 FAM114A1 可能负调控 LPS 诱导的免疫应答。然而, 分离各小鼠脾脏细胞, 经 LPS/R848 刺激后做流式分析, 结果发现相比于野生型小鼠, Fam114a1 缺失能够抑制 B220⁺ B 细胞、Cd3⁺ T 细胞表面的 Cd69 分子的表达, 这提示 FAM114A1 可能正调控淋巴细胞的激活。

这些研究表明, FAM114A1 在 LPS 诱导的免疫应答中, 可通过负调控 NF κ B 信号通路起到了抑制促炎因子的作用; 但是同时淋巴细胞的激活又有赖于 FAM114A1 的存在。

关键词: LPS; 免疫应答; FAM114A1

ABSTRACT

Lipopolysaccharide (LPS) is a kind of lipid polysaccharide substances which is located in the cytomembrane of gram-negative bacteria, also known as toxoid. Included many types of immune cells, especially mononuclears, DCs, macrophages cells, neutrophilic granulocyte, and B-leukomonocyte, LPS can bind to CD14/TLR4/MD2 receptor complexes, promotes the production of many proinflammatory cytokines in downstream pathways. In addition, LPS can upregulate the expression of CD69 of lymphocytes.

Caspase recruitment domains(CARDs) are interaction motifs which involved in processes about apoptosis, proliferation and immune inflammation, including RIG-I, MAVS, NLRs, NLRP1, caspases, and other cytokines.

FAM114A1 (Family With Sequence Similarity 114 Member A1) is a kind of protein consist of 563 amino acids and highly expressed in the nervous system. Since it contains a CARD domain [amino acids(aa) 263–340] and a glutamic acid-rich region (aa 347–477), thus FAM114A1 may participate in cell apoptosis, proliferation and immune regulation.

After a series of experiments, we explored the potential role of FAM114A1 in the immune response regulation. First of all, we found overexpression of FAM114A1 in THP1 cells that have a negative regulation on NF κ B, ISRE, IFN α/β luciferase reporters' transcription activity and the expression of *TNF- α* caused by LPS. At the same time, in RAW264.7 cell line, Fam114a1 knocking down by RNA interference(RNAi) can enhance the transcription level of *Tnf- α* and *Il-6* raised by LPS. By western blot, we found that in RAW264.7 cells, overexpression of Fam114a1 could increase protein levels of I κ b- α and p-Stat1, but inhibited the expression of p-I κ b α and p65 caused by LPS stimulation. By intraperitoneal injection of LPS in vivo, we found that compared with wild type mice, Tnf- α , Il-6 level can be upregulated significantly in the serum and spleens of *Fam114a1*^{-/-} mice. These phenomena indicated that FAM114A1 seems to play a negative role in the immune response induced by LPS. Nevertheless, Flow analysis showed that, compared with wild type mice, in the

splenocytes stimulated by LPS which were harvested from *Fam114a1*^{-/-} mice, the expression of CD69 on the surface of B220⁺ B cells and Cd3⁺ T cells decreased. This prompted FAM114A1 may positively regulate the activation of lymphocytes

In conclusion, these findings suggest that FAM114A1 may downregulate proinflammatory factor by inhibition of NFκB pathway. Nevertheless, activation of immune cells seems to depend on FAM114A1.

Keywords: LPS; Immune response;FAM114A1

廈門大學博碩

第一章 前言

1.1 天然免疫系统

1.1.1 免疫屏障

哺乳动物中，免疫系统主要由天然免疫（Innate immunity）和获得性免疫（Adaptive immunity）两种方式组成。相比于获得性免疫需要较长时间接触抗原才能唤起，天然免疫能够较为快速地抵御病原微生物（细菌、病毒、真菌和寄生虫等）的入侵。天然免疫系统主要由解剖学上的屏障结构，包括物理屏障和化学屏障组成。其中，物理屏障是机体的第一道防线，包括皮肤，黏膜，肌肉，腺体，生殖道等组织，能够阻止病原微生物直接进入机体；化学屏障包括皮肤表面分泌的抗菌肽，汗液 pH 值等物质，能够在一定程度上消灭病原微生物。因此，病原体只有在突破机体的物理屏障和化学屏障之后，损伤或者感染上皮细胞层，在细胞外间隙中存活下来，才有可能复制、繁殖，感染到机体的其他部分[1]。

对于突破机体外围屏障的病原微生物，细胞内的天然免疫反应十分迅速、及时，大概在入侵几分钟之后就可以快速启动了。通过细胞表面和细胞内部的一系列受体识别病原体的一些保守的分子成分，可以引起细胞内一系列的免疫应答。一些白细胞（PBMC、 $m\phi$ 、neutrophil、DC 和 NK）被激活之后，通过吞噬作用，将细胞外的病原微生物内吞，降解，最终消灭掉[2]。另外细胞内外的受体通过与配体结合之后，能够启动一系列免疫反应，分泌各种细胞因子（cytokines），例如 IL-1 β 、IL-6、TNF- α/β 、IFN- α/β 、MCP-1，以及各种抗菌肽、补体成分等，能够激活、募集和引导各种免疫细胞到达感染部位，引起肿胀、疼痛等一系列症状，称为炎症（Inflammation）[3]。特别的是，天然免疫系统中有一些自然杀伤性细胞（NK）可以识别被病毒感染的细胞，进而通过吞噬作用，通过酶促降解、抗菌蛋白质和多肽，活性氧毒性（ROS），活性氮（RNS），降解掉那些已被入侵的细胞内的细菌、病毒。细胞因子和趋化因子可以通过引起机体全面的一系列反应起到抗感染的作用。另外，也可以和树突状细胞一起将抗原传递给淋巴细胞，启动获

得性免疫应答。

1.1.2 模式识别受体

模式识别受体(PRRs)在天然免疫系统中是重要的组成部分。PRRs 由细胞合成,存在于细胞表面或者细胞质、内含体中,主要识别两大类分子:微生物病原体的病原体相关分子模式(PAMPs)和细胞损伤或死亡时释放的损伤相关分子模式(DAMPs)。它们又被称为原始模式识别受体,因为他们进化在免疫系统的其他部分之前,特别是适应性免疫。

病原体相关分子模式(PAMPs) [4]包括细菌的糖类物质和碳水化合物(如脂多糖、甘露糖等)、细菌肽(鞭毛蛋白,微管伸长因子)、昆虫几丁质、肽聚糖和磷壁酸(革兰氏阳性细菌)、核酸(如细菌或病毒的DNA/RNA)、壳蛋白、脂蛋白和真菌葡聚糖和壳质等物质。

内生的压力信号分子被称为损伤相关分子模式(DAMPs)。DAMP 的分类很大程度上取决于细胞类型(如上皮细胞或间质细胞)和损伤的组织。蛋白质类的 DAMPs 包括胞内蛋白,如热休克蛋白或 HMGB1,以及来源于损伤组织的多糖类物质碎片。非蛋白质的 DAMPs 包括 ATP、尿酸、硫酸肝素和 DNA、RNA (细菌、病毒、真菌或寄生虫) [5] PRRs 主要是根据配体特异性,功能,位置,或者进化之间的关系进行分类的。根据基本功能划分, PRRs 可以分为介导内吞作用 PRRs 和信号转导 PRRs。

信号转导的 PRRs 包括 Toll 样受体(TLRs)、RIG-I 样受体(RLRs)和 NOD 样受体(NLRs) 等几类功能不同、位置不同的模式识别受体[6]。

介导内吞的 PRRs 可以在不依赖胞内信号的情况下,促进吞噬细胞对病原微生物粘附,内吞以及在胞内细胞器的分布。这些模式识别受体可以识别糖类、碳水化合物之类的配体,例如 m ϕ 表面的 MR, 或者发现于几乎所有吞噬细胞表面,识别并清除各种凋亡细胞的清道夫受体。

1.1.3 Toll 样受体 (TLRs)

在早期抗感染过程中,感知病原体入侵和危险信号对于机体而言十分重要,位于细胞

的 Toll 样受体 (TLRs) 是在非特异性免疫系统中最先发现的扮演着非常重要的角色的一类模式识别受体 (PRRs), 它们通常是一类表达在一些岗哨细胞表面, 跨膜的但不具催化性的蛋白质受体, 能够识别病原微生物中较为保守的组分, 启动早期的宿主防御。当病原微生物突破机体的物理屏障, 例如皮肤、肌肉或者肠粘膜等组织, 就会被细胞表面的 TLRs 识别, 进而启动细胞内部的免疫应答。

Toll 样受体 (TLRs) 主要位于细胞膜和内体小泡中的 I 型跨膜蛋白, 主要作负责识别细胞外环境中的 PAMPs。位于细胞膜的 TLRs 主要特异性识别疏水性脂类和蛋白, 而位于内体小泡中的 TLRs 主要是识别核酸类物质。

迄今为止, 总共有 10 种 TLRs 在人类中鉴定出来, 13 种发现于鼠类动物, 其中, TLRs1-10 都在人类和鼠类动物中比较保守, TLR10 在鼠类中尚未发现其功能, TLR10-13 只存在于鼠类中。TLR1、TLR2、TLR4、TLR5 和 TLR6 都位于细胞膜中, 但是 TLR3、TLR7、TLR8 和 TLR9 位于内含体中[7, 8] (图 1-3)。所有的 Toll 样受体都由一个胞外的亮氨酸富集重复序列(leucine-rich repeats, LRRs)和一个胞内的 TLR/IL-1 受体结构域 (TIR domain)组成 (图 1-1)。TLRs 和 IL-1R 在胞内的部分有一个保守的大约 200 个氨基酸的结构, 这就是被称为 Toll/IL-1R (TIR domain) 的结构域, 在这个结构域中, 包含着三个高度同源的保守区域, 称之为 Boxes。这些 boxes 区域对于 TLRs 的信号转导至关重要。在细胞外部分, TLRs 有着 19-25 个 LRR 模体的串联重复区域, 每个重复区域包含 24-29 个氨基酸和亮氨酸富集序列 (XLXXLXLXX) 以及比较保守的 XØXXØXFXXLX, 其中 X 代表任意的 aa 残基, Ø代表疏水性 aa 残基[7]。

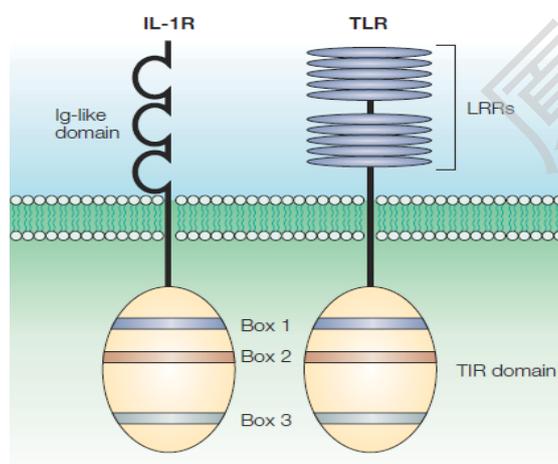


图 1-1 Toll 样受体 (TLRs) 结构图

Fig.1-1 Structure of a TLR polypeptide chain[7].

1.3.1 细胞表面的 TLRs

TLRs 中最先被发现的是 TLR4(图 1-2),是革兰氏阴性菌外膜组分之一的脂多糖(LPS)的受体[9]。TLR4 与 MD2 (又名淋巴细胞抗原 96) 形成复合体, LPS 6 条脂质链中的 5 条与 MD2 相结合, 另外一条与 TLR4 相结合, 形成 TLR4-MD2-LPS 复合体, 招募 TIRAP (TIR 结构域衔接蛋白; 又名 MyD88 样衔接蛋白, MAL) 和髓样分化因子 (MyD88), 启动核因子- κ B 信号途径, 让其暴露入核序列, 从而进入细胞核中, 促进各种炎症因子的产生 (MyD88 依赖途径); 然后, TLR4-MD2-LPS 复合体内化, 定位于内含体中, 随之募集 TRAM 和 TRIF, 激活 IRF-3 和 NF κ B, 产生 I 型干扰素 (TRIF 依赖途径)。除了 LPS 之外, TLR4 的配体还包括一些病毒蛋白、多糖、和各种内源性如低密度脂蛋白, β -防卫素,热休克蛋白等[7]。

TLR2 主要识别革兰性阳性菌的肽聚糖、支原体的脂肽。TLR2 与 TLR1、TLR6 分别形成异二聚体, 特异性识别二酰基或者三酰基脂肽。TLR2 还可以与非 Toll 样受体协作, 具有识别更多种类抗原的作用。例如 TLR2 能够和凝集素-1 (dectin-1) 协作, 识别真菌的酵母聚糖。dectin-1 介导的信号通路, 也能够加强 TLR2 介导的相关基因的转录[10]。

TLR5 识别鞭毛虫的鞭毛蛋白, TLR5 胞外结构域的 386-407 位氨基酸序列直接与鞭毛蛋白相结合[11]。体内注射鞭毛蛋白可以诱导一系列的免疫反应, 包括引起促炎因子 (Th2、IL-17、IL-22) 和 Treg 细胞的激活[5]。TLR5 基因缺陷鼠, 或者人类中减少 75% TLR5 的表达发现抗鞭毛蛋白的抗体应答水平有所降低[12]; TLR 基因缺陷鼠中发现, 注射鞭毛蛋白, 盲肠和排泄物中的抗鞭毛蛋白抗体 IgA 和 IgG 也有所减少[13]。TLR5 它已被证明参与许多疾病的发生, 其中包括炎症性肠病。最近的研究也表明, TLR5 缺失可能与破骨细胞形成和骨质流失相关。另外, TLR5 功能异常与胃、宫颈、子宫内膜及卵巢癌症的发病息息相关。

老鼠 TLR11 在肾脏和膀胱有高表达。TLR11 能够识别致肾盂肾炎大肠埃希菌[14]以及来源于刚地弓形虫的抑制蛋白样蛋白[15], 通过 MyD88 依赖途径, 引起 TNF- α 、IL-12[16]以及 IFN- γ [17]的分泌。有文献显示, TLR11 缺失的老鼠容易感染这类病原微

生物。

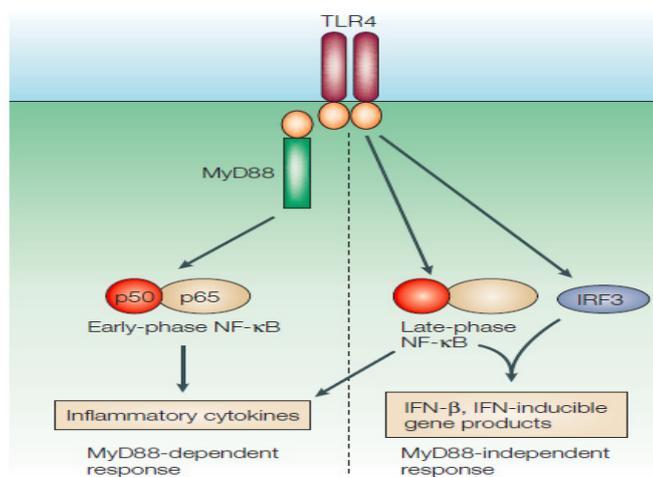


图 1-2 TLR4 信号转导示意图

Fig.1-2 TLR4 signalling: MyD88-dependent and independent pathways[7]

1.3.2 核酸敏感型 TLRs

TLR3 主要识别双链 RNA (dsRNA) 以及聚肌胞苷酸 (poly(I:C)), poly(I:C) 能够模拟病毒感染, 引发机体抗病毒免疫应答, 产生 I 型干扰素和炎症因子[18]。

TLR3 的胞外域有一个马蹄形结构, 它的功能很有可能是增加表面面积, 促进识别 dsRNA。dsRNA 能够结合在 TLR3 胞外域的 N 端或者 C 端凸面结构的侧面, 然后借着 C 端结构区, TLR3 二聚体化。除了识别 poly(I:C), TLR3 还能够识别呼吸道肠道病毒的基因组 RNA。TLR3 主要通过产生 I 型干扰素和炎症因子起到抗病毒和免疫调控的作用, TLR3 缺陷鼠在感染鼠巨细胞病毒时容易致死, 而人类 TLR3 缺陷者则易感单纯性疱疹病毒-1 (HSV-1) [19]。

TLR7 最初确定具有为识别咪唑啉衍生物如咪唑莫特和瑞唑莫德(R848)和鸟嘌呤类似物如洛索立宾(有抗病毒和抗肿瘤特性)的功能, 也能识别源自 RNA 病毒如疱疹性口炎病毒、流感和人类免疫缺陷病毒的 ssRNA。后面发现, TLR7 也能识别合成聚(U)RNA 和某些小干扰 RNAs。在高表达 TLR7 的浆细胞样树突状细胞 (pDCs 中, 病毒感染后, 能够产生大量 I 型干扰素和细胞因子。这些提示, pDCs 针对 RNA 病毒的免疫应答是

完全依赖于 TLR7, 表明 TLR7 能作为感染的感染感受器, 识别 ssRNA 病毒。有文章发现, TLR7 缺陷鼠在接受咪喹莫特和瑞喹莫德(R848)刺激后, 会影响 DC (树突状细胞) 的成熟和 I 型干扰素和炎症因子的产生[5]。

TLR8 与 TLR7 高度同源, 位于 X 染色体上。人 TLR8 主要在肺脏、外周血白细胞中表达。TLR8 能够识别富含 GU 的单链 RNA, ssRNA 病毒, 例如 HIV、HCV、流感病毒、仙台病毒、柯萨奇病毒。TLR8 识别病毒 RNA 后, 能够募集 MyD88, 然后会刺激下游的 IRF7 信号通路, 诱导 I 型干扰素, 起到抗病毒的作用。TLR7 在人和鼠中都有功能, 但是迄今为止, TLR8 在老鼠中尚未发现其免疫功能[6]。

TLR9 能够识别细菌或者病毒 DNA 的多鸟嘌呤胞嘧啶(CpG), CpG 能够作为 TLR9 的配体, 直接激活腹腔 $m\phi$ 、DCs 和 leukomonocyte。DNA 序列的核糖骨干以及 2'端磷酸二酯键对于 TLR9 识别非常重要[20]。pDCs 中有高表达的 TLR9, 能够作为传感器的识别 DNA 病毒, 例如小鼠巨细胞病毒、I 型单纯疱疹病毒和 HSV-2。除了识别 DNA, TLR9 还能识别疟原虫色素的不溶性晶体, 它是机体消化疟原虫血红蛋白之后的副产品。

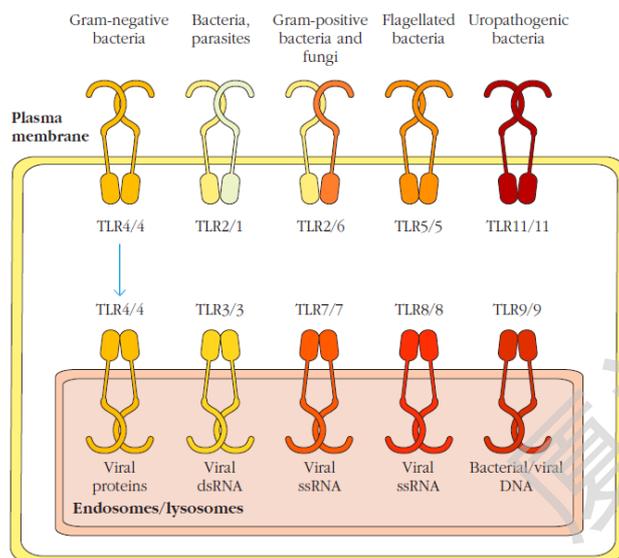


图 1-3 TLRs 的细胞内定位

Fig.1-3 Cellular location of TLRs[21]

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

廈門大學博碩