

学校编码: 10384

分类号 密级

学号: 24520141153504

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**TFF2 调控脂多糖诱导的巨噬细胞活化并拮  
抗炎症的功能与机制**

**TFF2 Regulates LPS-induced Macrophages  
Polarization and Inhibits Inflammation**

吴晓玲

指导教师姓名: 任建林教授

专业名称: 内科学

论文提交日期: 2017年4月

论文答辩日期: 2017年5月

学位授予日期: 2017年6月

2017年5月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

IL-12s调控脂多糖诱导的巨噬细胞活化并拮抗炎症的功能与机制  
吴晓玲

指导教师

任建林

厦门大学

2.5cm

2.5cm

## 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( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )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

## 摘要

病原感染修复过程中，不同极化分型的巨噬细胞与微环境相互作用，启动促炎或抗炎机制：一方面，巨噬细胞 M1 型活化，释放炎症介质，导致炎症发生，进而损伤；另一方面，巨噬细胞 M2 型活化参与炎症控制和寄生虫感染抵抗，并在组织修复与重建、脂类代谢、过敏反应和肿瘤形成中发挥作用。两种机制相互拮抗共同决定着炎症的发生发展及转归。因此，巨噬细胞不仅是重要的疾病治疗靶点，其极化调控也成为研究热点之一。最新研究进展提示脂多糖（LPS）是炎症和巨噬细胞 M1 型极化的强大诱导剂。LPS 主要通过 TLRs 受体激活 NF- $\kappa$ B 信号通路，使炎症介质释放增加，随后进一步促进巨噬细胞极化，包括形态学变化、抗原提呈及促炎因子分泌，在幽门螺杆菌感染性胃炎的损伤机制中扮演重要角色。胃肠道黏液细胞分泌的可溶性小分子多肽三叶因子在黏膜损伤修复、信号转导、炎症保护、细胞凋亡调节等方面具有多重生物学功能，并被报道为潜在的新型肿瘤标志物。其中，TFF2 因子作为 TFFs 中的一员，在炎症发展过程中具有关键的调控作用，可以减弱炎症部位对巨噬细胞的募集，影响相关配体与趋化因子受体结合激活，并负调控介导炎症介质的表达与分泌，与幽门螺杆菌(HP)感染后的胃黏膜病变密切相关，但机制尚不明确。

本课题探讨TFF2在脂多糖诱导的巨噬细胞活化与炎症发生发展中的功能与机制。首先，探讨感染性炎症中TFF2的表达特征：应用组织芯片免疫组化法对正常人胃黏膜以及胃溃疡患者胃黏膜进行TFF2表达检测，结果表明发生胃溃疡的患者胃黏膜中TFF2表达水平上调；应用LPS对正常胃黏膜细胞GES-1进行不同时间或浓度的诱导处理，结果表明TFF2表达呈时间及浓度梯度依赖性上调。上述结果提示感染促进TFF2表达上调，而LPS是重要的诱导因素。其次，探究TFF2对LPS-TLR4-NF- $\kappa$ B通路激活的影响：正常胃黏膜细胞GES-1中进行内源TFF2表达敲减，Western Blotting检测发现TFF2表达削减后促进LPS诱导的NF- $\kappa$ B与I $\kappa$ B的磷酸化，免疫荧光共聚焦检测发现TFF2表达削减后促进LPS诱导的NF- $\kappa$ B入核，QPCR检测发现TFF2表达削减后促进NF- $\kappa$ B下游靶基因炎症介质IL-6、IL-8表达；反之，Western Blotting检测发现Raw264.7细胞中TFF2表达量也受LPS诱导性上调，

Raw264.7中过表达TFF2后Western Blotting检测发现NF- $\kappa$ B的磷酸化入核被抑制。上述结果提示TFF2拮抗LPS诱导的NF- $\kappa$ B激活。再次，进一步探讨TFF2对巨噬细胞Raw264.7活化的影响：免疫荧光共聚焦显微观察发现过表达TFF2抑制LPS与巨噬细胞膜上TLR4 受体结合，电镜显微观察发现过表达TFF2减少巨噬细胞伪足伸展及吞噬泡形成，流式细胞术检测发现过表达TFF2削弱巨噬细胞对荧光抗原的内吞能力。上述结果提示TFF2抑制巨噬细胞浸润吞噬能力。最后，应用正常胃黏膜细胞与巨噬细胞的共培养体系高度模拟体内环境，探讨正常胃黏膜细胞分泌的TFF2作用于巨噬细胞并在巨噬细胞介导的炎症反应中的调控作用：Western Blotting检测发现TFF2抑制巨噬细胞中NF- $\kappa$ B激活，蛋白芯片检测表明TFF2抑制巨噬细胞中炎症因子的表达与分泌，流式细胞术检测发现TFF2削弱巨噬细胞M1型极化。上述结果提示TFF2抑制巨噬细胞M1型极化并拮抗炎症。

综上，我们得出结论TFF2调控脂多糖诱导的巨噬细胞活化并拮抗炎症的功能与机制。本课题不仅丰富了TFF2生物学功能及表达调控的理论研究，首次明确了TFF2是巨噬细胞极化的重要调控因子，而且探讨了TFF2在细菌感染引发的胃微生态相关性粘膜炎症中的功能与机制，树立TFF2为幽门螺杆菌相关性胃炎/胃癌的治疗靶点，有助于促进消化系统感染性炎症的基础研究与科学技术进展，而且体现了理论服务于实践，具有重大的临床应用价值。

**关键词：**TFF2；巨噬细胞极化；脂多糖

## Abstract

The polarization of macrophages plays an important role in the repair of pathogen infection. On the one hand, macrophage M1 initiates the inflammatory mechanism, activates and releases the inflammatory mediators, causing the inflammation to occur and thus result in damage. On the other hand, macrophage M2 induces the anti-inflammatory mechanisms, mainly involved in inflammation and parasitic infection resistance control, and plays a role in tumor formation. Different types of macrophages interact with the microenvironment to initiate proinflammatory or anti-inflammatory mechanisms that determine the development and progression of inflammation. Therefore, Macrophage is not only an important target for disease treatment, but its polarization is also one of the hot topics in the research filed.

The latest researches in macrophage polarization suggest that lipopolysaccharide (LPS) is a powerful inducer of inflammation and macrophage M1 polarization, which plays a key role in the mechanism of Helicobacter pylori infection gastritis injury. Otherwise, a large number of studies have shown that soluble small molecule peptides secreted by gastrointestinal mucus cells have multiple biological functions in mucosal injury repair, inflammatory protection and tumor development, which are reported as potential novel tumor markers. As a member of TFFs, Trefoil factor 2 (TFF2) is also closely related to the pathological changes of gastric mucosa after Helicobacter pylori infection.

This study involves in the function and mechanism of the regulation in LPS-induced macrophages polarization and inflammation by TFF2. This study intends to explore: 1) the expression induction pattern of TFF2 by LPS; 2) the inhibitory effect and molecular mechanism of TFF2 on macrophage M1 polarization; 3) TFF2 inhibits inflammation induced by LPS antagonists; 4) the inhibition effects of TFF2 on macrophage polarization and inflammatory after H. pylori infection. After reasonable design and a large number of experiments, this study puts forward the TFF2 upregulation of macrophage polarization stress inhibits LPS induced

macrophages polarization and inflammation. Thus, this paper will establish TFF2 as a macrophage polarization control factor and a gastric mucosal inflammation therapeutic target.

**Keywords:** Trefoil factor 2; Macrophage polarization ; Lipopolysaccharid

厦门大学博硕士论文摘要库



## 目 录

中文摘要 .....	I
英文摘要 .....	III
第一章前言 .....	1
1.1 炎症反应与吞噬细胞 .....	1
1.2 脂多糖诱导炎症反应 .....	1
1.2.1 TLR4 受体调节蛋白 .....	1
1.2.2 LPS-TLR4-NF- $\kappa$ B 信号通路激活 .....	2
1.2.3 脂多糖诱导巨噬细胞极化 .....	3
1.2.4 NF- $\kappa$ B 信号通路在炎症中的作用机制 .....	4
1.3 巨噬细胞功能及其分型 .....	6
1.3.1 巨噬细胞来源与功能 .....	6
1.3.2 巨噬细胞分型与极化 .....	7
1.3.3 巨噬细胞极化调控研究进展 .....	7
1.4 TFF2 调控炎症 .....	8
1.4.1 TFF 结构与表达 .....	9
1.4.2 TFF2 与炎性病变 .....	9
1.4.3 TFF2 受 LPS 诱导性上调 .....	10
1.5 幽门螺旋杆菌感染性胃炎 .....	10
1.5.1 幽门螺旋杆菌病原学特征及致病机理 .....	10
1.5.2 幽门螺旋杆菌感染多途径诱发炎症 .....	11
1.5.3 幽门螺旋杆菌感染与 TFFS .....	11

1.6 研究目的及意义	12
<b>第二章材料与amp;方法</b>	<b>14</b>
2.1 实验材料	14
2.1.1 细胞株	14
2.1.2 质粒载体	14
2.1.3 Si RNAOligo 合成	14
2.1.4 实验所用抗体	14
2.1.5 试剂	15
2.1.6 仪器与耗材	17
2.1.7 实验室自行配置试剂	19
2.2 实验方法	21
2.2.1 细胞培养与刺激	21
2.2.2 共培养体系模型构建	23
2.2.3 流式细胞术检测	23
2.2.4 PCR 检测 TFF2 表达量	24
2.2.5 小鼠巨噬细胞 Raw264.7 的吞噬荧光颗粒实验	26
2.2.6 小鼠巨噬细胞 Raw264.7 的吸附 LPS-FITC 实验	26
2.2.7 细胞转染	26
2.2.8 细胞蛋白提取:	27
2.2.9 Bradford 法测定蛋白浓度	27
2.2.10 蛋白质免疫共沉淀:	28
2.2.11 Western blotting:	29
2.2.12 免疫荧光共聚焦观察	30
2.2.13 核浆分离	31

2.2.14 组织免疫荧光 .....	32
2.2.15 蛋白芯片 .....	32
2.2.16 电镜 .....	34
<b>第三章结果和分析 .....</b>	<b>36</b>
3.1 感染促使 TFF2 表达上调 .....	36
3.2 正常胃黏膜细胞中 TFF2 表达敲减促进 LPS 诱导的 NF- $\kappa$ B 激活 .....	37
3.2.1 TFF2 表达敲减促进 LPS 诱导的 NF- $\kappa$ B 磷酸化 .....	37
3.2.2 TFF2 表达敲减促进 LPS 诱导的 NF- $\kappa$ B 入核及下游基因表达 .....	38
3.3 巨噬细胞 Raw264.7 中过表达 TFF2 拮抗 LPS 诱导的 NF- $\kappa$ B 激活 .....	39
3.4 TFF2 调控巨噬细胞 Raw264.7 极化并抑制其浸润吞噬能力 .....	39
3.5 共培养体系中 TFF2 抑制巨噬细胞炎症因子表达与分泌 .....	40
<b>第四章讨论 .....</b>	<b>42</b>
4.1 TFF2 调控巨噬细胞极化与炎症 .....	42
4.2 结论与展望 .....	43
<b>附录 .....</b>	<b>45</b>
附录 1 图表索引 .....	45
附录 2 缩略语表 .....	46
<b>参考文献 .....</b>	<b>48</b>

<b>Abstract in Chinese.....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract in English .....</b>	<b>III</b>
<b>Chapter 1 Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Inflammation and phagocytes .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 LPS-induced inflammation .....</b>	<b>1</b>
<b>1.3 Macrophage polarization and function .....</b>	<b>6</b>
<b>1.4 TFF2 regulates inflammation.....</b>	<b>8</b>
<b>1.5 Helicobacter pylori infection gastritis .....</b>	<b>10</b>
<b>1.6 Aim and Significance of Research .....</b>	<b>12</b>
<b>Chapter 2 Materials and Methods .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Materials .....</b>	<b>14</b>
<b>2.2 Methods .....</b>	<b>21</b>
<b>Chapter 3 Experimental results and Conclusion.....</b>	<b>36</b>
<b>3.1: Infection upregulated TFF2 expression .....</b>	<b>36</b>
<b>3.2: TFF2 feedback blocked the activation of LPS-TLR4-NF-<math>\kappa</math>B pathway in GES-1.....</b>	<b>37</b>
<b>3.3: TFF2 over-expression inhibited the activation of LPS-TLR4-NF-<math>\kappa</math>B pathway in Raw264.7 .....</b>	<b>39</b>
<b>3.4: TFF2 regulated the activation of macrophage polarization in Raw264.7 .....</b>	<b>39</b>
<b>3.5: TFF2 restricted the expression of inflammation factors in macrophage in Co-culture system .....</b>	<b>40</b>
<b>Chapter 4 Discussion and Conclusion .....</b>	<b>42</b>
<b>4.1 TFF2 regulated macrophage polarization and inflammation .....</b>	<b>42</b>
<b>4.2 Conclusion and expectation.....</b>	<b>43</b>
<b>References .....</b>	<b>48</b>

## 第一章 前言

### 1.1 炎症反应与吞噬细胞

炎症是机体抵御损伤因素的主要防御反应。炎症反应是一个极其复杂的过程，通常根据炎症病程可将炎症分为急性炎症和慢性炎症两大类，根据引起炎症的刺激因子来源又可进一步分为感染性炎症和无菌性炎症两大类<sup>[1]</sup>。侵入人体的外源性刺激因子本身和其所造成的细胞损伤和组织坏死，以及人体代谢过程中所产生的衰老、死亡细胞等，均需经吞噬细胞吞噬、消化等处理，予以清除。所以，吞噬细胞又被誉为“人体健康的卫士”。吞噬细胞从形态上可分为大吞噬细胞和小吞噬细胞两类。小吞噬细胞由中性粒细胞和嗜酸性粒细胞组成，以中性粒细胞为主<sup>[2]</sup>。大吞噬细胞由单核细胞和巨噬细胞组成，具有强大的吞噬功能。单核细胞占白细胞总数的 3-8%，来源于骨髓中的前体细胞，是血液中最大的细胞，直径为 14-20 微米左右，圆形或卵圆形。胞质内含有丰富的细胞器，其中嗜天青颗粒即溶酶体，内含多种水解酶，如过氧化物酶、酸性磷酸酶和溶菌酶等，其主要功能是进行细胞内消化。寿命可长达 75 天左右。当单核细胞进入一已受损的组织时，局部组织胺和细胞因子浓度升高，因化学趋向性而被化学物质的刺激吸引至受损处，并转化为巨噬细胞。总之，单核-巨噬细胞系统是机体重要的免疫屏障，在抗感染、抗肿瘤和免疫调节等方面发挥重要作用<sup>[3]</sup>。

### 1.2 脂多糖诱导炎症反应

#### 1.2.1 TLR4 受体调节蛋白

Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 存在于免疫细胞膜上,是一类跨膜受体。TLR4 受体的激活需要四种蛋白的调节,包括髓样分化蛋白 88 (myeloid differentiation factor 88, MYD 88)、MyD 88 接头蛋白 (MyD 88-adaptor like, MAL)、TLRS 相关的干扰素活化因子 (TRIF) 和 TRIF 的接头分子 (TRIF-related adaptor molecule, TRAM), 这四种接头蛋白受刺激因子激活后均能够将信号传递到 TIR 的结构域,从而启动下游 MYD 88 非赖途径和 MYD 88 依赖途径<sup>[4]</sup>。

### 1.2.2 LPS-TLR4-NF- $\kappa$ B 信号通路激活

Toll 样受体在抗炎免疫的机制研究中具有非常重要的意义。Toll 样受体能够识别病原微生物中的细菌脂多糖分子，在抗炎免疫中的作用日益受到重视，与先天性免疫介导相关，同时发现 TLRs 与临床上炎症疾病关系密切<sup>[5]</sup>。其中，人们最早发现了 TLR4 受体，该受体属于模式识别受体家族，是高度保守的受体识别其为病原体守恒的分子模式(PAMPs)，因此代表对感染的第一道防线<sup>[1]</sup>。TLR4 一直被公认为革兰氏阴性脂多糖(LPS) 的传感受体，该受体被激活后能够通过信号传导激活 NF- $\kappa$ B，NF- $\kappa$ B 对其它的基因的表达进行调控，其中，可以调节血多炎症介质和细胞因子的表达，起到抗炎免疫调节的作用。LPS 与其结合蛋白 LBP 结合后在细胞膜 TLR4 受体上形成复合物，TLR4 发生二聚化后招募下游分子 MyD88，随后发生 IKK 磷酸化并引起 I $\kappa$ B 磷酸化与泛素化降解，从而 NF- $\kappa$ B 激活进而转运入核发生磷酸化，结合相应序列并调控各种下游基因的转录水平，尤其是一些炎性因子如白介素-1、6、肿瘤坏死因子等表达增高，从而激活炎性细胞并释放炎症介质，导致炎性损伤<sup>[6]</sup>。

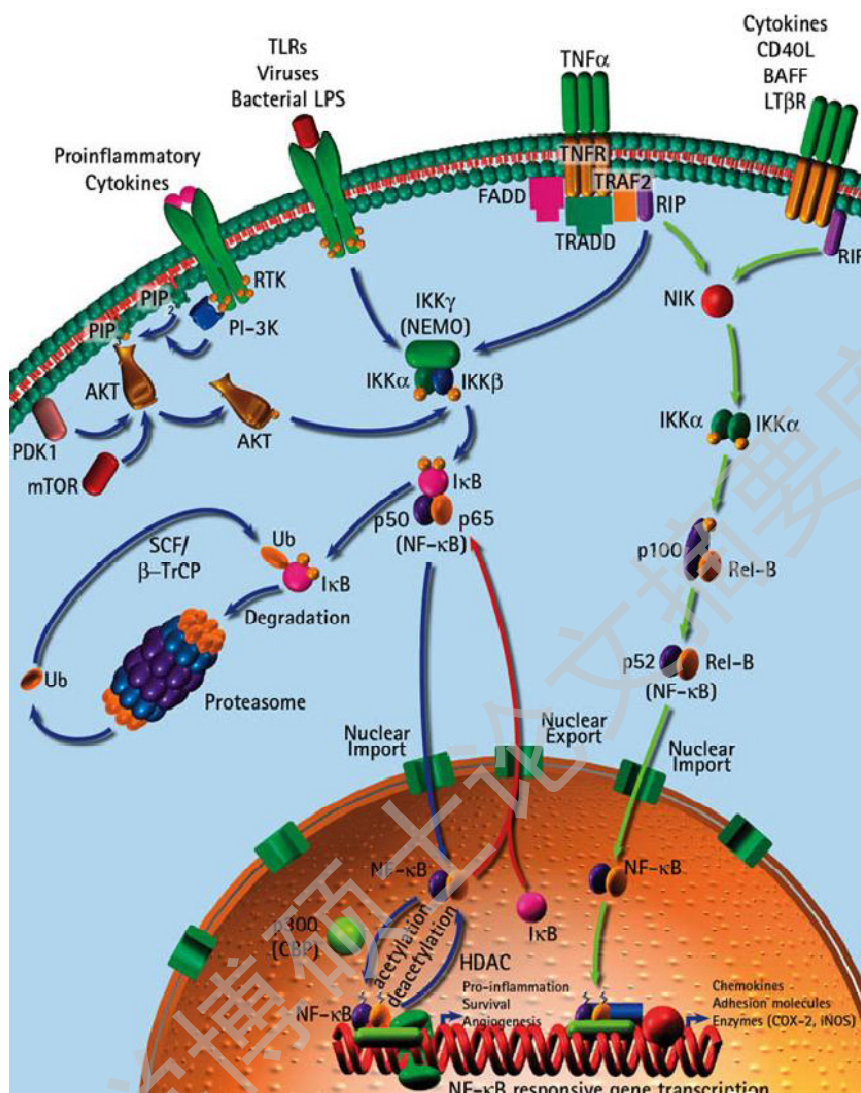


图 1 LPS-TLR4-NF-κB 信号通路示意图

### 1.2.3 脂多糖诱导巨噬细胞极化

细菌及其产物脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 是炎症的强大诱导剂, 可以经典地激活巨噬细胞M1极化。LPS主要通过TLRs受体激活NF-κB信号通路, 随后进一步促进巨噬细胞活化, 包括形态学变化、抗原提呈及促炎因子分泌。其中促炎因子TNFα与自然杀伤细胞分泌的干扰素-γ (IFN-γ)协同作用, 刺激单核细胞分化为M1型巨噬细胞<sup>[7]</sup>。

作为革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分, LPS激活TLR4信号通路的过程为: LPS与其结合蛋白LBP结合后在TLR4上形成复合物, TLR4发生二聚化后招募下游分子包括MyD88, 随后发生IKK磷酸酶酸化并引起IκBα磷酸化与泛素化降解, 最后激活NF-κB信号通路, 使NF-κB转位入核并调控相关细胞因子和趋化因子的

基因表达。NF- $\kappa$ B的激活可使TNF- $\alpha$ 、IL-1的转录增强，后者反馈进一步增加NF- $\kappa$ B的活化。巨噬细胞M1型极化后释放IL-1、NO等促炎因子杀伤病原菌并激活适应性免疫反应。炎症反应若不能被及时控制将进一步恶化成严重的脓毒血症。因此，由细菌感染引发的炎症病灶，M1型巨噬细胞浸润后清除坏死组织，随后M1型巨噬细胞发生凋亡或者极化成M2型，保护宿主不受过度的损伤并促进组织愈合<sup>[8]</sup>。

## 1.2.4 NF- $\kappa$ B 信号通路在炎症中的作用机制

### 1.2.4.1 NF- $\kappa$ B 及其家族成员

NF- $\kappa$ B是一种重要的核转录因子，在体内各种类型细胞中普遍存在，参与调控免疫应答、炎症反应、细胞增殖、分化和细胞凋亡等多种生理病理过程，并调控相关细胞因子及粘附分子等的基因表达，在机体的免疫应答、炎症反应和细胞的生长发育中起重要作用。

NF- $\kappa$ B于1986年首次在成熟B细胞、浆细胞中发现，它是一种能够与免疫球蛋白轻链启动子特异结合的核蛋白<sup>[9]</sup>。NF- $\kappa$ B/Rel家族为转录因子蛋白家族，包括RelA(p65)、c-Rel、RelB、NF- $\kappa$ B-B1(p50/p105)、NF- $\kappa$ B-B2(p52/p100)，以同源或异源复合物存在，p65/p50异二聚体是其活性的主要形式且最为常见。家族成员具有共同的结构特征，包括N端由约300个氨基酸组成的相同保守的Rel同源区(RHD)、C端反式激活结构域(TD)。RHD结构域负责形成二聚体，结合DNA以及与其抑制子I $\kappa$ B的结合，同时它还含有核定位序列(NLS)，介导活化的NF- $\kappa$ B进入核内行使功能。p50和p52只有RHD结构域而缺乏TD结构域，因此p50和p52同源二聚体并不能完成基因转录激活，而是在细胞内作为一种抑制分子通常各自以其前体p105和p100的形式存在<sup>[10]</sup>。

### 1.2.4.1 NF- $\kappa$ B 激活途径

NF- $\kappa$ B是一种重要的核转录因子，当细胞处于静息状态时，NF- $\kappa$ B被其抑制子I $\kappa$ B通过其C端序列覆盖NSL结合位点，阻止其向核内转移<sup>[11]</sup>。

NF- $\kappa$ B的激活包括经典途径与非经典途径两条通路。经典途径中，p65/p50组成的异源二聚体由于结合了NF- $\kappa$ B抑制蛋白I $\kappa$ B $\alpha$ ，使NLS序列被覆盖而不能入核。细菌、病毒以及多种细胞因子的刺激将信号传递到I $\kappa$ B激酶复合物IKK $\beta$ ，磷酸化I $\kappa$ B $\alpha$ 并使其进一步泛素化而被蛋白酶体降解。从而NF- $\kappa$ B复合物



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](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库