

# 铜绿假单胞菌分泌蛋白Pec1抑制巨噬细胞自噬及影响铜绿假单胞菌清除效应初步观察

张长文 林少清 吕敏捷 金霄 朱常军 冯旰珠

**【摘要】目的** 观察铜绿假单胞菌(PA)分泌蛋白Pec1通过抑制小鼠肺泡巨噬细胞(MH-S)自噬而影响其对铜绿假单胞菌清除效应。**方法** 体外予Pec1蛋白、PAO1灭活菌、PAO1灭活菌+Pec1蛋白、PAO1活菌、Pec1蛋白敲除活菌(PAO1 $\Delta$ pec1)与小鼠肺泡巨噬细胞(MH-S)共培养,实时定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测自噬标志物微管相关蛋白轻链3(LC3)的mRNA表达水平;Western blot检测自噬标志物LC3蛋白表达水平;透射电镜下观察MH-S细胞自噬小体的形成;通过细菌探针荧光原位杂交技术(FISH)联合激光扫描共聚焦显微镜检测MH-S细胞胞内活菌、MH-S细胞破壁后菌落计数,计算MH-S细胞胞内杀菌效率。LC3的mRNA及蛋白表达水平、透射电镜下MH-S细胞自噬小体的数量、MH-S细胞胞内杀菌效率呈正态分布,组间比较采用两独立样本t检验。**结果** Pec1蛋白组、PAO1灭活菌+Pec1蛋白组和PAO1活菌组自噬标志物LC3的mRNA表达水平分别为(0.624±0.071)、(0.614±0.069)和(0.752±0.098),分别低于对照组(1.071±0.147)( $t=2.723$ 、 $P=0.044$ )、PAO1灭活菌组(1.098±0.144)( $t=2.950$ 、 $P=0.028$ )和Pec1蛋白敲除活菌组(1.214±0.229)( $t=2.816$ 、 $P=0.037$ ),差异均有统计学意义;Pec1蛋白组、PAO1灭活菌+Pec1蛋白组和PAO1活菌组蛋白LC3-II/LC3-I比值分别为(0.396±0.063)、(0.384±0.070)和(0.771±0.080),分别低于对照组(1.000±0.043)( $t=8.130$ 、 $P<0.001$ )、PAO1灭活菌组(0.947±0.055)( $t=7.573$ 、 $P<0.001$ )和Pec1蛋白敲除活菌组(1.080±0.185)( $t=4.166$ 、 $P=0.002$ ),差异均有统计学意义;Pec1蛋白组、PAO1灭活菌+Pec1蛋白组和PAO1活菌组自噬小体数量分别为(1.330±0.577)、(1.670±0.577)和(1.330±0.577),分别低于对照组(4.330±0.577)( $t=5.692$ 、 $P<0.001$ )、PAO1灭活菌组(4.670±0.577)( $t=5.692$ 、 $P<0.001$ )和Pec1蛋白敲除活菌组(4.000±1.000)( $t=5.060$ 、 $P<0.001$ ),差异均有统计学意义。通过细菌探针FISH联合激光扫描共聚焦显微镜检测MH-S胞内活菌,计算出MH-S细胞对PAO1及PAO1 $\Delta$ pec1的胞内杀菌效率分别为(39.3±3.4)%和(82.2±1.3)%,两组差异具有统计学意义( $t=4.908$ 、 $P=0.005$ );通过菌落计数计算出MH-S细胞对PAO1及PAO1 $\Delta$ pec1的胞内杀菌效率分别为(18.4±4.1)%和(42.2±1.4)%,差异具有统计学意义( $t=8.576$ 、 $P<0.001$ )。**结论** Pec1可能通过抑制MH-S细胞自噬削弱对铜绿假单胞菌清除。

**【关键词】** 铜绿假单胞菌; Pec1; 肺泡巨噬细胞; 自噬

**Inhibition of autophagy of macrophages by secreted protein Pec1 of *Pseudomonas aeruginosa* and its effect on clearance of *Pseudomonas aeruginosa*** Zhang Changwen, Lin Shaoqing, Lv Minjie, Jin Xiao, Zhu Changjun, Feng Ganzhu. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, The Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University 210011, China

Corresponding author: Feng Ganzhu, Email: zhu1635253@163.com

**【Abstract】Objective** To investigate the effect of secreted protein Pec1 of *Pseudomonas aeruginosa* on the clearance of *Pseudomonas aeruginosa* by inhibiting the autophagy of mouse alveolar macrophages (MH-S). **Methods** Pec1, inactivated bacteria of PAO1, inactivated bacteria of PAO1 + Pec1, viable bacteria of PAO1, Pec1 protein knockout viable bacteria of PA (PAO1 $\Delta$ Pec1) and mouse alveolar macrophages (MH-S) were co-cultured in vitro. The mRNA expression level of autophagy marker microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) was detected by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). The levels of autophagy

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2022.06.003

基金项目: 国家自然科学基金(No. 81870009)

作者单位: 210011 南京市, 南京医科大学第二附属医院呼吸与危重症学科

通信作者: 冯旰珠, zhu1635253@163.com

marker LC3 protein was detected by Western blot. The formation of autophagosomes in MH-S cells was observed by transmission electron microscopy. The count of MH-S intracellular viable bacteria was detected by microbial fluorescence in situ hybridization (FISH) combined with confocal laser scanning microscope and the intracellular bacterial load was evaluated by colony-forming units (CFU) assay, and the intracellular bactericidal efficiency of MH-S cells was calculated. The mRNA and protein expression levels of LC3, the number of autophagosomes in MH-S cells under transmission electron microscope, and the intracellular bactericidal efficiency of MH-S cells were normally distributed, and the comparison between groups was performed by two independent samples *t*-test.

**Results** The mRNA expression levels of autophagy marker LC3 in Pec1 protein group, inactivated bacteria of PAO1 + Pec1 protein group and viable bacteria of PAO1 group were  $(0.624 \pm 0.071)$ ,  $(0.614 \pm 0.069)$  and  $(0.752 \pm 0.098)$ , respectively, which were significantly lower than those of control group  $(1.071 \pm 0.147)$  ( $t = 2.723$ ,  $P = 0.044$ ), inactivated bacteria of PAO1 group  $(1.098 \pm 0.144)$  ( $t = 2.950$ ,  $P = 0.028$ ) and Pec1 protein knockout viable bacteria group  $(1.214 \pm 0.229)$  ( $t = 2.816$ ,  $P = 0.037$ ), with significant differences. The LC3-II/LC3-I ratios of Pec1 protein group, inactivated bacteria of PAO1 + Pec1 protein group and live bacteria of PAO1 group were  $(0.396 \pm 0.063)$ ,  $(0.384 \pm 0.070)$  and  $(0.771 \pm 0.080)$ , respectively, which were significantly lower than those of the control group  $(1.000 \pm 0.043)$  ( $t = 8.130$ ,  $P < 0.001$ ), inactivated bacteria of PAO1 group  $(0.947 \pm 0.055)$  ( $t = 7.573$ ,  $P < 0.001$ ) and Pec1 protein knockout viable bacteria group  $(1.080 \pm 0.185)$  ( $t = 4.166$ ,  $P = 0.002$ ), with significant differences. The number of autophagosomes in Pec1 protein group, inactivated bacteria of PAO1 + Pec1 protein group and live bacteria of PAO1 group were  $(1.330 \pm 0.577)$ ,  $(1.670 \pm 0.577)$  and  $(1.330 \pm 0.577)$ , respectively, which were significantly lower than those of control group  $(4.330 \pm 0.577)$  ( $t = 5.692$ ,  $P < 0.001$ ), inactivated bacteria of PAO1 group  $(4.670 \pm 0.577)$  ( $t = 5.692$ ,  $P < 0.001$ ) and Pec1 protein knockout viable group  $(4.000 \pm 1.000)$  ( $t = 5.060$ ,  $P < 0.001$ ), with significant differences. The intracellular viability of MH-S cells was detected by bacterial probe FISH combined with confocal laser scanning microscope. The intracellular bactericidal efficiency of MH-S cells against PAO1 and PAO1 $\Delta$ Pec1 were calculated  $(39.3 \pm 3.4)\%$  and  $(82.2 \pm 1.3)\%$ , with significant difference ( $t = 4.908$ ,  $P = 0.005$ ). By the colony-forming units (CFU) assay, the intracellular bactericidal efficiency of MH-S cells against PAO1 and PAO1 $\Delta$ Pec1 was calculated as  $(18.4 \pm 4.1)\%$  and  $(42.2 \pm 1.4)\%$ , respectively, with significant difference ( $t = 8.576$ ,  $P < 0.001$ ). **Conclusion** Pec1 may inhibit the clearance of *Pseudomonas aeruginosa* by inhibiting autophagy in MH-S cells.

**【Key words】** *Pseudomonas aeruginosa*; Pec1; Alveolar macrophage; Autophagy

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, PA) 是一种自然界广泛存在的专性需氧的非发酵革兰阴性杆菌, 其可分泌多种毒力因子, 包括弹性蛋白酶、III型分泌系统的毒力因子、群体感应 (quorum sensing, QS) 系统和外溶素等, 可导致机体呼吸系统、血液系统、泌尿系统及中枢神经系统等多系统感染<sup>[1-2]</sup>。有研究发现, PA于医院获得性肺炎患者中检出率逐年上升, 在我国医院获得性肺炎病原谱中居第2位, 尤其见于慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary diseases, COPD)、囊性纤维化 (cystic fibrosis, CF) 以及支气管扩张症等患者<sup>[3-4]</sup>。随着多重耐药及泛耐药菌株的出现, 防治PA感染已成为备受关注的公共卫生问题<sup>[5]</sup>。当PA入侵机体时, 主要由巨噬细胞、中性粒细胞及NK细胞等固有免疫细胞进行防御<sup>[6]</sup>。有研究发现, 肺泡巨噬细胞在抵抗PA导致的肺部感染过程中发挥着关键作用<sup>[7]</sup>。

自噬是由溶酶体介导的分解代谢过程, 通过降解不同的细胞质成分, 有助于维持细胞内外压力下的细胞平衡与生存<sup>[8]</sup>。自噬可对入侵的病原体, 如

细菌、病毒和寄生虫等发挥防御效应: 宿主细胞可通过“自噬小体-溶酶体”融合方式消除入侵机体的病原体<sup>[9]</sup>。研究发现, PA的III型分泌系统分泌的毒力因子可抑制人II型肺泡上皮细胞自噬, 从而有利于PA在II型肺泡上皮细胞的定植与繁殖; 相关动物实验则发现, PA III型分泌系统野生株与敲除株分别同时感染小鼠后, 野生株组生存率显著下降<sup>[10]</sup>。可见, 自噬在机体防御PA感染中发挥了重要作用。

近年来研究发现, 自噬也参与了巨噬细胞抵御病原体的过程中, 但具体机制研究相对较少。Pec1蛋白系最新发现的PA一种潜在毒力因子, 其在PA感染机体过程中发挥的作用及机制未见报道<sup>[11]</sup>。故本研究拟观察PA分泌蛋白Pec1对小鼠肺泡巨噬细胞株MH-S细胞自噬及对铜绿假单胞菌的清除效应的影响, 报道如下。

## 材料与方法

### 一、材料

小鼠肺泡巨噬细胞株MH-S细胞 (上海中乔新

舟公司)；RPMI-1640、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、总RNA提取试剂(Invitrogen公司, 美国)；铜绿假单胞菌标准株(PAO1)为南京医科大学第二附属医院临床医学检验中心保存株；Pec1敲除株PAO1 $\Delta$ pec1购自广州诺晶生物技术有限公司；Pec1蛋白(南京金斯瑞生物有限公司合成)；LB培养基、qPCR Master Mix、逆转录cDNA试剂盒、RIPA裂解液、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、PVDF膜(武汉塞维尔生物科技有限公司)；血平板(上海科玛嘉微生物技术有限公司)；雷帕霉素(Rapamycin)、3-甲基腺嘌呤(3-MA)、TritonX-100、戊二醛、钨酸(上海源叶生物科技有限公司)；细菌探针(EUB338, 广州外显子生物技术有限公司)；微管相关蛋白轻链3(microtubule-associated protein light chain 3, LC3)、 $\beta$ -actin引物(苏州瑞博生物技术股份有限公司合成)；SDS-PAGE凝胶快速配置试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司)；抗-LC3、抗- $\beta$ -actin、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L)(CST公司, 美国)；醋酸铀-柠檬酸铅(北京海德创业生物技术有限公司)；铜网(北京中镜科仪技术有限公司)。

## 二、方法

1. 体外培养小鼠肺泡巨噬细胞株MH-S细胞：RPMI-1640 + 20% FBS含双抗完全培养基，置于CO<sub>2</sub>培养箱(5% CO<sub>2</sub>, 37 °C)静置培养，待细胞生长融合至80%~90%时，用0.25%胰酶(含0.02% EDTA)消化细胞，显微镜下见细胞变圆、细胞间隙变大，加入完全培养基终止消化，离心5 min、1 000 r/min(离心半径r = 20 cm)，去除胰酶，按1:5传代，选取生长良好的细胞用于实验。

2. 细菌的培养及灭活：①复苏：从-80 °C冰箱取出PAO1及PAO1 $\Delta$ pec1，涂布血平板，过夜培养约18 h；②摇菌：配制LB液体培养基，取血平板上菌落，过夜振荡培养约18 h；③PAO1的灭活：灭活菌系PAO1于90 °C水浴锅中加热1 h。

3. 实时定量逆转录聚合酶链反应(quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR)：将Pec1蛋白、PAO1灭活菌、PAO1灭活菌 + Pec1蛋白、PAO1活菌、Pec1蛋白敲除活菌(PAO1 $\Delta$ pec1)分别与MH-S细胞共培养(感染复数MOI均为10:1)，另设空白组、3-MA(3-甲基腺嘌呤，自噬抑制剂)组、Rap(雷帕霉

素，自噬激动剂)组，即实验分8组。6 h后，收集MH-S细胞，提取其总RNA，逆转成cDNA。根据LC3序列设计荧光定量PCR引物：LC3上游引物(F)：5'-TTATAGAGCGATAACAAGGGGAG-3'；LC3下游引物(R)：5'-CGCCGTCTGATTAT-CTTGATGAG-3'。以 $\beta$ -actin作为内参， $\beta$ -actin上游引物(F)：5'-GTGACGTTGACATCCGTAAAGA-3'； $\beta$ -actin下游引物(R)：5'-GCCGGACTCATCG-TACTCC-3'。PCR反应体系20  $\mu$ l。反应条件为预变性：95 °C、3 min；95 °C、30 s，55 °C、30 s，72 °C、10 s，40次循环，72 °C、5 min。采用2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>表示LC3相对表达水平。

4. 蛋白免疫印迹法(Western blot)：分组及处理方式同3，6 h后收集MH-S细胞，采用RIPA裂解MH-S细胞，10% SDS-PAGE分离等数量的蛋白，转移到PVDF膜上。5%BSA封闭后与LC3一抗孵育过夜，洗涤3次后，室温与二抗孵育1 h，洗涤3次后曝光。

5. 菌落计数：同时分别将PAO1及PAO1 $\Delta$ pec1感染MH-S细胞(MOI均为10:1)，1 h后将其中一组原先培养基替换为含300  $\mu$ g/ml庆大霉素的培养基，以杀灭胞外菌，0.5 h后弃掉培养基，4 °C的PBS清洗3次后，加入含0.3% TritonX-100的PBS溶液，放冰上于摇床裂解20 min，收集破壁裂解液，以10倍梯度稀释后涂布血平板，置入生物培养箱37 °C培养约18 h后进行菌落计数。另外一组于2 h后，以相同的方法处理。计算胞内杀菌效率，胞内杀菌效率(%) = (1 h-2 h) CFU/1 h CFU  $\times$  100%。

6. 细菌探针FISH联合激光扫描共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)观察胞内活菌：同时分别将PAO1及PAO1 $\Delta$ pec1感染MH-S细胞(MOI均为10:1)，1 h后将其中一组原先培养基替换为含300  $\mu$ g/ml庆大霉素的培养基，以杀灭胞外菌，0.5 h后弃掉培养基，予4 °C的PBS清洗3次后收集细胞，制成细胞涂片，另一组于2 h后以相同的方法处理。然后根据细菌探针说明书作荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridization, FISH)检测，继之于CLSM下观察胞内活菌，运用Image J软件计算胞内荧光强度，根据荧光强度计算胞内杀菌效率：胞内杀菌效率(%) = (1 h-2 h) 荧光强度/1 h荧光强度  $\times$  100%。

7. 透射电镜(transmission electron microscopy, TEM)观察自噬小体：分组及处理方式同3，12 h后收集细胞，4 °C条件下3%戊二醛固定2 h，再用2%的

钨酸重复固定2 h, 脱水、包埋与聚合, 利用超薄切片机将包埋好的样品切制成70 nm厚度的切片, 放置于附着薄膜的铜网上, 醋酸铀-柠檬酸铅染色, TEM下观察各组MH-S细胞自噬小体的数量。

8. 观察自噬激动剂对MH-S细胞胞内杀菌效率的影响: 将雷帕霉素(4 μmol/L)与MH-S细胞共培养6 h后, 予PAO1以MOI = 10:1感染MH-S细胞, 并同时PAO1以相同感染复数感染无任何处理的MH-S细胞, 计算两组胞内杀菌效率, 方法同5。

### 三、统计学处理

应用SPSS 22.0及GraphPad Prism 8统计软件对数据进行统计学分析, 计量资料LC3的mRNA及蛋白表达水平、透射电镜下MH-S细胞自噬小体的数量、MH-S细胞胞内杀菌效率呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用独立样本t检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

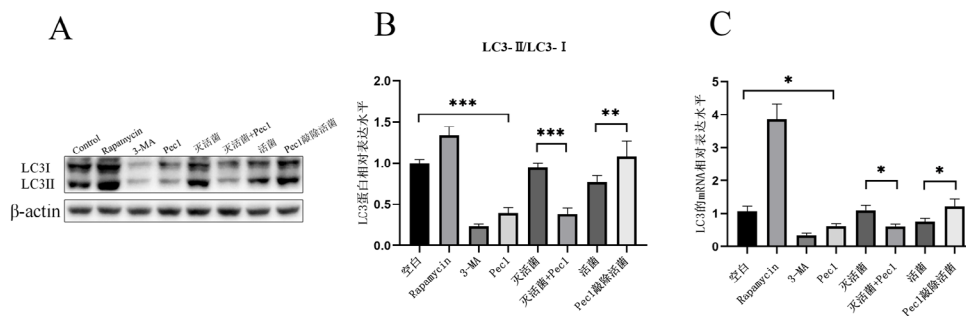
### 一、Pec1蛋白抑制MH-S细胞的自噬标记物LC3的蛋白及mRNA表达水平

将Pec1蛋白、PAO1灭活菌、PAO1灭活菌 + Pec1蛋白、PAO1活菌、Pec1蛋白敲除活菌(PAO1Δpec1)分别与MH-S细胞共培养(MOI均为10:1), 另设空白组、3-MA组和Rap组, 6 h后行Western blot、qRT-PCR分别检测各组MH-S细胞自噬标记物LC3的蛋白及mRNA表达水平, 结果发现,

Pec1蛋白组、PAO1灭活菌 + Pec1蛋白组和PAO1活菌组蛋白LC3-II/LC3-I比值分别为(0.396 ± 0.063)、(0.384 ± 0.070)和(0.771 ± 0.080), 分别低于对照组(1 ± 0.043) ( $t = 8.130, P < 0.001$ )、PAO1灭活菌组(0.947 ± 0.055) ( $t = 7.573, P < 0.001$ )和PAO1Δpec1组(1.080 ± 0.185) ( $t = 4.166, P = 0.002$ ), 差异均有统计学意义。Pec1蛋白组、PAO1灭活菌 + Pec1蛋白组和PAO1活菌组LC3的mRNA相对表达水平分别为(0.624 ± 0.071)、(0.614 ± 0.069)和(0.752 ± 0.098), 分别低于对照组(1.071 ± 0.147) ( $t = 2.723, P = 0.044$ )、PAO1灭活菌组(1.098 ± 0.144) ( $t = 2.950, P = 0.028$ )和PAO1Δpec1组(1.214 ± 0.229) ( $t = 2.816, P = 0.037$ ), 差异具有统计学意义, 见图1。

### 二、Pec1蛋白抑制MH-S细胞自噬小体形成

予Pec1蛋白、PAO1灭活菌、PAO1灭活菌 + Pec1蛋白、PAO1活菌、PAO1Δpec1(MOI均为10:1)分别与MH-S细胞共培养, 另设空白组、3-MA组、Rap组, 12 h后透射电镜观察各组MH-S细胞自噬小体的数量, 每组随机观察3个视野, 结果发现Pec1蛋白组、PAO1灭活菌 + Pec1蛋白组、PAO1活菌组自噬小体数量分别为(1.330 ± 0.577)、(1.670 ± 0.577)和(1.330 ± 0.577), 分别低于对照组(4.330 ± 0.577) ( $t = 5.692, P < 0.001$ )、灭活菌组(4.670 ± 0.577) ( $t = 5.692, P < 0.001$ )和Pec1蛋白敲除活菌组(4.000 ± 1.000) ( $t = 5.060, P < 0.001$ ), 差异均有统计学意义, 见表1及图2。



注: A、B分别为Western blot及其半定量比较; C: 各组LC3 mRNA相对表达水平  
图1 Pec1蛋白刺激对MH-S细胞LC3蛋白及mRNA表达水平的影响

表1 TEM单个视野下(×15 000)各组MH-S细胞自噬小体的数量

研究组	对照组	t值	P值
1.330 ± 0.577 (Pec1组)	4.330 ± 0.577 (空白组)	5.692	< 0.001
1.670 ± 0.577 (PAO1灭活菌 + Pec1组)	4.670 ± 0.577 (PAO1灭活菌组)	5.692	< 0.001
1.330 ± 0.577 (PAO1活菌组)	4.000 ± 1.000 (PAO1Δpec1组)	5.060	< 0.001

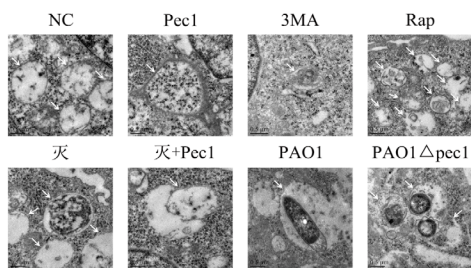
### 三、Pec1蛋白抑制MH-S细胞对PA的清除

通过菌落计数计算出MH-S细胞对PAO1活菌及PAO1Δpec1的胞内杀菌效率，结果发现两组胞内杀菌效率分别为(18.4 ± 4.1)%和(42.2 ± 1.4)%，差异具有统计学意义( $t = 8.576$ 、 $P < 0.001$ )。以细菌探针行FISH检测，共聚焦显微镜下观察胞内活菌生长情况，并计算MH-S细胞对上述两种菌株的胞内杀菌效率。两组胞内杀菌效率分别为(39.3 ± 3.4)%和(82.2 ± 1.3)%，差异具有统计学意义( $t =$

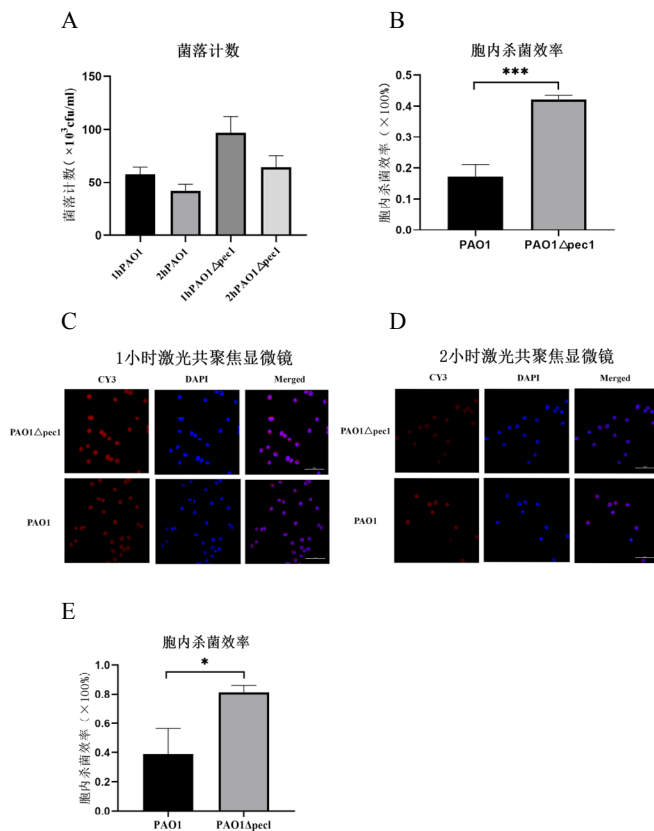
4.908、 $P = 0.005$ )，见图3。

### 四、自噬激动剂Rap可以增强MH-S细胞对PA的清除

分别设Rap预处理组(与MH-S细胞共培养6 h)及MH-S细胞空白对照组，以MOI = 10 : 1的PAO1活菌感染两组细胞，分别于1 h、2 h将MH-S细胞破壁裂解后行菌落计数，计算两组胞内杀菌效率，结果分别为(30.1 ± 2.3)%和(17.3 ± 2.1)%，两组差异具有统计学意义( $t = 3.71$ 、 $P = 0.021$ )，见图4。

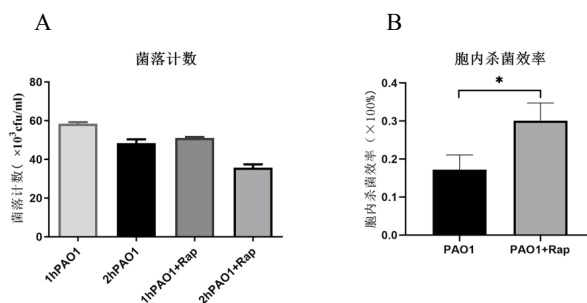


注：白色箭头示MH-S细胞内自噬小体(× 15 000)  
图2 TEM下观察各组MH-S细胞自噬小体形成



注：A、B分别为PAO1活菌及PAO1Δpec1感染MH-S细胞1 h及2 h破壁裂解后的菌落计数、相应胞内杀菌效率；C、D为CLSM下MH-S细胞吞入胞内的PAO1活菌及PAO1Δpec1情况(× 600)，DAPI(蓝)染细胞核，CY3(红)染PAO1及PAO1Δpec1；E为根据CLSM观察结果计算的胞内杀菌效率

图3 Pec1蛋白对MH-S细胞清除PA的影响



注: A、B为两种不同处理方式后的菌落计数及胞内杀菌效率

图4 自噬激动剂Rap促进MH-S细胞对PA的清除

## 讨 论

肺泡巨噬细胞作为机体固有免疫的主要细胞,防御病原菌侵犯起着举足轻重的作用。吞噬是肺泡巨噬细胞清除病原菌的主要方式,吞噬功能下降是造成下呼吸道感染的重要原因<sup>[12-13]</sup>。Liu等<sup>[14]</sup>研究中发现,利用抗菌肽-BF可以提高小鼠肺泡巨噬细胞的自噬水平,并增强其清除PA的能力。Yuan等<sup>[15]</sup>研究也发现,用雷帕霉素处理MH-S细胞后,可以提高其清除PA的效率,相反,予以3-MA处理后,MH-S细胞清除PA的效率显著下降。由此可见,肺泡巨噬细胞的自噬在清除PA过程中发挥了重要作用。但其他相关研究发现,自噬也会抑制机体对PA的清除<sup>[16-17]</sup>。自噬的过程包括:自噬前体的形成、自噬体的形成、自噬溶酶体的融合以及自噬体的溶解<sup>[18]</sup>。LC3表达水平和自噬小体的形成是细胞自噬活性一个重要指标<sup>[19]</sup>。Pec1是PA感染状态下分泌的一种可溶性蛋白,由275个氨基酸构成,前期研究发现Pec1具有潜在的毒力<sup>[11]</sup>。本研究主要探究Pec1对MH-S细胞自噬及清除PA效率的影响。

Jabir等<sup>[20]</sup>研究发现,PA可抑制肺泡巨噬细胞的自噬,但未能进一步证实是否系其毒力因子发挥作用。Rao等<sup>[10]</sup>研究发现,PA的III型分泌系统分泌的毒力因子可抑制人II型肺泡上皮细胞的自噬。Pec1作为近期新发现的PA潜在毒力因子,可能在PA抑制肺泡巨噬细胞的自噬中发挥了重要作用。本研究中,将Pec1和PAO1处理MH-S细胞后,MH-S细胞自噬标记物LC3表达水平分别较对照组和PAO1 $\Delta$ pec1处理组下降,同时其自噬小体也相应减少。由此证实,Pec1可以抑制MH-S细胞的自噬水平。为了进一步探究Pec1抑制MH-S细胞自噬后,是否影响其清除PA的效率,将PAO1及PAO1 $\Delta$ pec1以相同感染复数感染MH-S细胞,结果发现MH-S细

胞对PAO1的胞内杀菌效率低于PAO1 $\Delta$ pec1,该结果提示Pec1可以抑制MH-S细胞对PA的清除。本课题组前期研究发现,Pec1可以抑制肺泡巨噬细胞的吞噬功能<sup>[21]</sup>;为进一步验证自噬在肺泡巨噬细胞清除PA中的作用,本研究予自噬激动剂处理MH-S细胞后,观察其对PA的清除效率,结果发现清除效率较对照组显著提高。综上,Pec1通过抑制MH-S细胞的自噬,从而影响其清除PA的效率。

通过对自噬调控网络内的基因之间的相互调控关系的研究,可以归纳出以下主要的几个自噬调控通路:PI3K-AKT-mTOR通路,Ras/PKA通路,LKB1-AMPK通路和P53/DRAM通路<sup>[22-23]</sup>,其中mTOR在自噬的各种信号转导通路中发挥着核心的作用<sup>[24]</sup>。PI3K/AKT/mTOR通路是近期研究最多的信号转导通路之一。其中Ferreira-Marques等<sup>[25]</sup>研究中发现PI3K/AKT/mTOR和ERK1/2-MAPK信号转导通路参与了皮层神经元中由热量限制诱导的自噬。本课题组将在以后的机制研究中,探索Pec1是否通过上述几个自噬的信号通路抑制MH-S细胞的自噬。

综上,本研究体外实验发现PA分泌蛋白Pec1通过抑制MH-S细胞的自噬,从而影响其清除PA的效率。该研究结果可能为临床抗PA提供一个新思路 and 策略,为将来更好地解决PA耐药问题开辟一个新的道路。

## 参 考 文 献

- [1] 陈思遐,沈自燕,冯肝珠.铜绿假单胞菌毒力因子的研究进展[J].国际呼吸杂志,2018,38(18):1410-1413.
- [2] 郑多金,林淑瑜,殷超,等.315株铜绿假单胞菌医院感染的临床分布与耐药性分析[J/CD].中华实验和临床感染病杂志(电子版),2015,9(1):61-64.
- [3] 中华医学会呼吸病学分会感染学组.中国铜绿假单胞菌下呼吸道感染诊治专家共识(2022年版)[J].中华结核和呼吸杂志,2022,45(8):739-752.

- [4] Zhang Y, Yao Z, Zhan S et al. Disease burden of intensive care unit-acquired pneumonia in China: a systematic review and meta-analysis[J]. *Int J Infect Dis*,2014,29(12):84-90.
- [5] Rodrigo-Troyano A, Sibila O, The respiratory threat posed by multidrug resistant Gram-negative bacteria[J]. *Respirology*, 2017,22(7):1288-1299.
- [6] Flannagan RS, Cosio G, Grinstein S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies[J]. *Nat Rev Microbiol*,2009,7(5):355-366.
- [7] Cheung DO, Halsey K, Speert DP. Role of pulmonary alveolar macrophages in defense of the lung against *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Infect Immun*,2000,68(8):4585-4592.
- [8] Feng Y, He D, Yao Z, et al. The machinery of macroautophagy[J]. *Cell Res*,2014;24(1):24-41.
- [9] Deretic V. Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes[J]. *Immunol Rev*,2011,240(1):92-104.
- [10] Rao L, De La Rosa I, Xu Y, et al. *Pseudomonas aeruginosa* survives in epithelia by ExoS-mediated inhibition of autophagy and mTOR[J]. *EMBO Rep*,2021,22(2):e50613.
- [11] Zrieq R, Sana TG, Vergin S, et al. Genome-wide screen of *Pseudomonas aeruginosa* in *Saccharomyces cerevisiae* identifies new virulence factors[J]. *Front Cell Infect Microbiol*,2015,5(11):81.
- [12] Jain N, Moeller J, Vogel V. Mechanobiology of macrophages: how physical factors coregulate macrophage plasticity and phagocytosis[J]. *Annu Rev Biomed Eng*,2019,21(6):267-297.
- [13] Marriott HM, Dockrell DH. The role of the macrophage in lung disease mediated by bacteria[J]. *Exp Lung Res*,2007,33(10):493-505.
- [14] Liu C, Qi J, Shan B, et al. Pretreatment with cathelicidin-BF ameliorates *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in mice by enhancing NETosis and the autophagy of recruited neutrophils and macrophages[J]. *Int Immunopharmacol*,2018,65(12):382-391.
- [15] Yuan K, Huang C, Fox J, et al. Autophagy plays an essential role in the clearance of *Pseudomonas aeruginosa* by alveolar macrophages[J]. *J Cell Sci*,2012,125(Pt 2):507-515.
- [16] Deng Q, Wang Y, Zhang Y, et al. *Pseudomonas aeruginosa* triggers macrophage autophagy to escape intracellular killing by activation of the NLRP3 inflammasome[J]. *Infect Immun*,2015,14,84(1):56-66.
- [17] Wu Y, Li D, Wang Y, et al. *Pseudomonas aeruginosa* promotes autophagy to suppress macrophage-mediated bacterial eradication[J]. *Int Immunopharmacol*,2016,38(9):214-222.
- [18] Yu L, Chen Y, Tooze SA. Autophagy pathway: cellular and molecular mechanisms[J]. *Autophagy*,2018,14(2):207-215.
- [19] Burman C, Ktistakis NT. Autophagosome formation in mammalian cells[J]. *Semin Immunopathol*,2010,32(4):397-413.
- [20] Jabir MS, Ritchie ND, Li D, et al. Caspase-1 cleavage of the TLR adaptor TRIF inhibits autophagy and  $\beta$ -interferon production during *Pseudomonas aeruginosa* infection[J]. *Cell Host Microbe*,2014,15(2): 214-227.
- [21] 林少清, 舒磊, 杜兴冉, 等. 铜绿假单胞菌分泌蛋白 Pcc1 抑制肺巨噬细胞吞噬功能的初步研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*,2021,41(9):1304-1309.
- [22] He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy[J]. *Annu Rev Genet*,2009,43(11):67-93.
- [23] Bressan C, Saghatelian A. AMPK-induced autophagy as a key regulator of cell migration[J]. *Autophagy*,2021,17(3):828-829.
- [24] Wan G, Xie W, Liu Z, et al. Hypoxia-induced MIR155 is a potent autophagy inducer by targeting multiple players in the MTOR pathway[J]. *Autophagy*,2014,10(1):70-79.
- [25] Ferreira-Marques M, Carvalho A, Cavadas C, et al. PI3K/AKT/MTOR and ERK1/2-MAPK signaling pathways are involved in autophagy stimulation induced by caloric restriction or caloric restriction mimetics in cortical neurons[J]. *Aging (Albany NY)*,2021,13(6):7872-7882.

(收稿日期: 2022-09-12)

(本文编辑: 孙荣华)

张长文, 林少清, 吕敏捷, 等. 铜绿假单胞菌分泌蛋白 Pcc1 抑制巨噬细胞自噬及影响铜绿假单胞菌清除效应初步观察 [J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*, 2022,16(6):370-376.