

摘要

背景:

脓毒症是一种由感染反应失调引发的威胁生命的多器官功能障碍综合征 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS),具有高发病率、高病死率的特点。炎症反应失衡作为脓毒症病理生理的机制之一,在其中起到了十分重要的作用。谷氨酰胺是人体中含量最丰富,用途最广的氨基酸。现如今谷氨酰胺已经被广泛研究,发现能维持脓毒症时期器官的形态以及相应的功能,减轻脑、心脏、肝脏、肠道以及肾脏等一系列重要器官。及时有效的补充谷氨酰胺可以减轻炎症反应、抑制炎症因子的释放。14-3-3 蛋白家族是一类高度保守细胞蛋白质家族,在所有真核动物中广泛表达。如今的研究也发现 14-3-3 蛋白与炎症有着紧密的联系,但谷氨酰胺抗炎的作用机制是否与 14-3-3 蛋白有关还有待研究。

方法:

细胞实验

利用 LPS 刺激 RAW264.7 细胞构建细胞炎症模型,通过谷氨酰胺促进 14-3-3 蛋白的表达。然后通过慢病毒干扰 14-3-3 mRNA 的表达以减少 14-3-3 蛋白的表达。RT-qPCR 方法检测 14-3-3 基因的表达水平。WB 检测 ERK1/2、P-ERK1/2、JNK、P-JNK、p38、P-p38 的表达情况,Elisa 法检测炎症因子 TNF- α 以及 IL-6 的水平。

结果:

谷氨酰胺会使处于 LPS 刺激下的 RAW264.7 细胞过表达 14-3-3 蛋白

谷氨酰胺通过使 14-3-3 蛋白过表达从而抑制 MAPK 信号通路抑制炎症反应

结论:

本研究通过体外实验表明了谷氨酰胺与 14-3-3 蛋白在 MAPK 信号通路上调节炎症的机制。研究发现:(1)谷氨酰胺会使处于 LPS 刺激下的 RAW264.7 细胞过表达 14-3-3 蛋白;(2)谷氨酰胺的抗炎作用通过 14-3-3 蛋白抑制 MAPK 信号通路来实现。

关键词: 谷氨酰胺 14-3-3 炎症 MAPK 信号通路

ABSTRACT

Background:

Sepsis is a kind of life-threatening multiple organ dysfunction syndrome (multiple organ dysfunction syndrome, MODS) caused by infection response disorder, which has the characteristics of high incidence and high mortality. As one of the pathophysiological mechanisms of sepsis, inflammatory imbalance plays a very important role in sepsis. Glutamine is the most abundant and widely used amino acid in human body. Nowadays, glutamine has been widely studied, and it has been found that glutamine can protect the morphology and corresponding function of organs during sepsis, and reduce a series of important organs such as brain, heart, liver, intestine and kidney. Timely and effective glutamine supplementation can reduce inflammatory response and inhibit the release of inflammatory factors. 14-3-3 protein family is a kind of highly conserved cellular protein family, which is widely expressed in all eukaryotes. Current studies have also found that 14-3-3 protein is closely related to inflammation, but whether the anti-inflammatory mechanism of glutamine is related to 14-3-3 protein remains to be studied.

Methods

Macrophage inflammation model was established by stimulating RAW264.7 macrophages with LPS, and the changes of 14-3-3 protein were observed by adding glutamine. Then lentivirus interferes with the expression of 14-3-3 mRNA to reduce the expression of 14-3-3 protein. The expression level of 14-3-3 gene was detected by RT-qPCR. The expression of ERK1/2, P-ERK1/2, JNK, P-JNK, p38, P-p38, NF- κ B and p-I κ B was detected by WB.

Results

1. Glutamine can cause overexpression of 14-3-3 protein in RAW264.7 cells stimulated by LPS
2. Glutamine inhibits inflammatory response by overexpression of 14-3-3 protein to inhibit MAPK signal pathway.

Conclusion

This study demonstrated the mechanism of glutamine and 14-3-3 protein regulating inflammation in MAPK signal pathway in vitro. It was found that: (1) Glutamine can induce the overexpression of 14-3-3 protein in RAW264.7 cells stimulated by LPS. (2) the anti-inflammatory effect of glutamine is realized by 14-3-3 protein inhibiting MAPK signal pathway.

Key words: Glutamine 14-3-3 inflammatory MAPK signal pathway

目 录

引 言	1
第 1 章 谷氨酰胺对 LPS 诱导下的 RAW264.7 细胞炎症的影响.....	2
1.材料与方法.....	2
1.1 研究对象.....	2
1.2 主要试剂与仪器.....	2
1.3 研究方法.....	4
2.结果.....	9
2.1 不同浓度的谷氨酰胺对 LPS 刺激下的 RAW264.7 细胞形态的影响.....	9
2.2 CCK8 测定不同浓度的谷氨酰胺对 LPS 刺激下的 RAW264.7 细胞活性的影响.....	10
2.3 谷氨酰胺对 LPS 刺激下的 RAW264.7 巨噬细胞 NO 产生的影响.....	11
2.4 谷氨酰胺对 LPS 刺激下的 RAW264.7 巨噬细胞 14-3-3 蛋白生成的影响.....	12
3.讨论.....	13
3.1 谷氨酰胺的抗炎作用.....	13
3.2 谷氨酰胺对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 14-3-3 蛋白表达量的研究.....	14
第 2 章 稳定低表达 14-3-3 蛋白细胞株构建.....	15
1 材料与方法.....	15
1.1 研究对象.....	15
1.2 主要试剂与耗材.....	15
1.3 主要仪器.....	15
1.4 研究方法.....	15
2 结果.....	17
2.1 慢病毒重组质粒测序鉴定.....	17
2.2 Real-time PCR 鉴定敲低效果.....	17
2.3 蛋白质印迹法鉴定干扰效果.....	18

2.4 敲低 14-3-3 后对 RAW264.7 细胞存活率的影响	19
3.讨论.....	20
第 3 章 探讨谷氨酰胺经 14-3-3 蛋白调控炎症反应的机制研究	22
1.材料与方法.....	22
1.1 研究对象.....	22
1.2 主要试剂与仪器	22
1.3 研究方法.....	22
1.3 统计分析	23
2 结果.....	23
2.1 谷氨酰胺对 LPS 诱导下 RAW264.7 细胞 TNF- α 以及 IL-6 释放的影响	23
2.2 谷氨酰胺可以抑制 LPS 诱导下 RAW264.7 细胞 MAPK 信号通路的激活	24
2.3 谷氨酰胺对 LPS 诱导下 sh-14-3-3 RAW264.7 细胞 MAPK 信号通路的影响	25
3.讨论.....	26
结 论	29
致 谢	30
参考文献	31
攻读学位期间的研究成果	34
综 述	35

中英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
LPS	Lipopolysaccharide	脂多糖
Gln	Glutamine	谷氨酰胺
TNF- α	Tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子
IL-6	Interleukin-6	人白细胞介素-6
IL-1 β	Interleukin-1 β	人白细胞介素-1 β
ERK1/2	Extracellular signal regulated kinases	调节蛋白 1/2
JNK	C-Jun N-terminal Kinase	C-Jun 氨基末端激酶
P38	Protein 38	促分裂素原活化蛋白激酶 38
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
AP	Ammonium persulfate	过硫酸铵
Elisa	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
MKP-1	Mitogen-activated protein	丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶-1
PPI	Protein-Protein Interaction, PPI	蛋白质与蛋白质相互作用

引言

现如今，脓毒症依然是全世界中发病率与死亡率最高的疾病之一，每年都需要耗费巨额的医疗资源^[1]。炎症反应失衡是脓毒症的重要生理机制。脓毒症期间，炎症反应的平衡失调导致宿主的器官功能紊乱，免疫失调^[2]。因此维持适当的炎症反应对于机体有免疫增强作用，但当促炎因子与抗炎因子之间的相对平衡被打破时，可发生级联放大效应，引起急、慢性炎症反应。

谷氨酰胺是体内含量最为丰富的氨基酸，但是在受到严重创伤或者感染时，体内的谷氨酰胺被迅速消耗^[3]。目前的研究已经证实谷氨酰胺是巨噬细胞吞噬以及分泌细胞因子^[4]、淋巴细胞^[5]以及中性粒细胞^[6]增殖所必需的氨基酸。因此，谷氨酰胺被认为是“免疫系统的燃料”，低浓度的谷氨酰胺会损害免疫细胞的功能，导致器官功能受损，增加患者死亡的风险^[7]。

14-3-3 蛋白家族是一类高度保守细胞蛋白质家族，在所有真核动物中广泛表达^[8]。1967年由 Moore 和 Perez 从脑组织中首次提取，目前在哺乳动物中共发现七个亚型分别为 β 、 γ 、 ε 、 ζ 、 η 、 σ 、 τ 。该家族在细胞生物学中扮演着重要的角色，他们参与新陈代谢、蛋白质运输、信号转导、细胞凋亡以及细胞周期调节^[9]。近年研究发现，14-3-3 蛋白与炎症反应有着密切关系，扰乱 14-3-3 蛋白参与的环节可能导致炎症反应的失调，尤其是炎症相关的信号通路。

综上所述，谷氨酰胺作为“条件必需”氨基酸对于脓毒症患者是不可或缺的。而 14-3-3 蛋白参与了体内的炎症反应，其表达的量影响了巨噬细胞炎症因子的分泌以及信号通路的激活。但是其两者的机制尚不清楚。本研究通过 LPS 构建 RAW264.7 细胞的炎症模型，而后利用慢病毒敲低 14-3-3 蛋白的表达，进一步探索两者可能参与炎症的调控机制，为缓解炎症损伤提供新的观点。

第 1 章 谷氨酰胺对 LPS 诱导下的 RAW264.7 细胞炎症的影响

谷氨酰胺是人体中含量最丰富的氨基酸，在日常的生理活动中起到了多种作用。然而，在脓毒症的患者中，谷氨酰胺的含量明显降低甚至耗尽，使得当前状态下的谷氨酰胺成为了“条件必需”氨基酸。首先谷氨酰胺为快速分裂细胞提供增殖所必需的营养，尤其是肠道上皮细胞，有助于维持肠道屏障的功能完整，保护机体免受肠道细菌的侵袭^[10]。并且谷氨酰胺作为谷胱甘肽的重要底物，能够及时的合成谷胱甘肽从而减少脓毒症期间细胞凋亡，进而预防感染性休克的发生^[11]。现如今谷氨酰胺已经成为外科手术以及危重症疾病患者不可或缺的一种营养补充剂。及时的补充谷氨酰胺能够有效的改善由于外伤、手术以及脓毒症所导致的器官功能障碍、减少伤口感染、减少住院时间^[12]。虽然目前关于谷氨酰胺的研究很多，但是其对脓症患者炎症调节的机制仍然不是十分清楚。本研究采用 RAW264.7 细胞构建炎症模型，详细探讨谷氨酰胺抗炎机制。

1.材料与方法

1.1 研究对象

RAW264.7 细胞，购自武汉普诺赛生命科技有限公司，将其分为六组，分别是 Control 组；LPS 组；LPS+0.5mmol/L 谷氨酰胺组；LPS+4mmol/L 谷氨酰胺组；LPS+8mmol/L 谷氨酰胺组；LPS+16mmol/L 谷氨酰胺组。

1.2 主要试剂与仪器

1.2.1 主要试剂与耗材

试剂名称	厂家	货号
RAW264.7 细胞专用培养基	Procell	CM-0190
PBS	Solarbio	P1010
巴氏吸管 3ml	NEST	318012

96 孔板	NEST	701121
6 孔板	NEST	703002
T25 培养瓶	NEST	707001
细胞冻存管	NEST	606003
50 ml、15ml 摇管	NEST	788211
细胞培养皿	NEST	704001
LPS (脂多糖)	SIGMA	L5668
谷氨酰胺溶液	SIGMA	G7513
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	BOSTER	AR0146
苯甲基硫酰氟 (PMSF)	Solarbio	P8340
CCK8	Solarbio	CA1210
RIPA 蛋白裂解液	BOSTER	AR0102
6X protein loadingbuffer	全式金	DL101
十二烷基硫酸钠 (SDS)	BOSTER	AR1164
过硫酸钠 (AP)	BOSTER	AR1166
预染蛋白 maker	赛默飞	26616
一抗二抗稀释液	BOSTER	AR1017
甘氨酸	Solarbio	G8200
1.0mmol/L Tris	BOSTER	AR1163
1.5mmol/L Tris	BOSTER	AR1162
10% BSA 封闭液	BOSTER	AR0004
30%丙烯酰胺 29: 1	BOSTER	AR1161
PVDF 膜	Millipore	GVWP02500
超敏化学发光检测试剂盒	Uelandy	S6009M
普敏化学发光检测试剂盒	Uelandy	S6008M
qRT-PCR 扩增试剂盒	TAKARA	3806
逆转录试剂盒	全式金	Ae311
GAPDH	武汉三鹰	60004
14-3-3 鼠抗单克隆抗体	Santa	SC-59421
山羊抗鼠二抗	武汉三鹰	PR30012
NO 检测试剂盒	碧云天	S0021S

1.2.2 主要仪器

仪器名	生产厂家
超净工作台	上海博讯实业有限公司
生物安全柜	Spantech
CO ₂ 恒温培养箱	Thermo
移液枪	Eppendorf
荧光显微镜	OLYMPUS
电泳仪	Bio-rad
实时荧光定量 PCR 仪	ABI Stepone plus
-80℃冰箱	Sanyo
多功能酶标仪	Thermo
实验室超纯水仪	Millipore
高温灭压锅	上海博讯实业有限公司
倒置显微镜	OLYMPUS
荧光显微镜	OLYMPUS
-20℃冰箱	海尔公司
细胞计数板	Bio-rad
微型高速冷冻离心机	德国 Eppendorf
高速台式离心机	湘仪离心机有限公司

1.2.3 主要试剂的配置

LPS 储备液: 将 10mg 的 LPS 粉末溶于 10ml 的 PBS 中, 充分混匀后分装至 1.5ml 棕色 EP 管中, 浓度为 1mg/ml。

BCA 工作液: A 液: B 液为 50:1, 根据样品所需量按比例配置, 充分混匀后室温保存, 需实验当天配置。

1.3 研究方法

1.3.1 RAW264.7 细胞培养

I. 细胞复苏

将冻存的 RAW264,7 细胞从 -80℃ 冰箱中取出, 移至 37℃ 水浴中, 使其快速解冻。解冻完成后, 迅速将其移至 15ml 离心管内, 并加入 3-4ml 的完全培养基。移至低速离心机上离心, 转速 1200r/min, 离心三分钟。离心完成后, 用巴氏吸管吸取上清、弃置。然后加入 5-6ml 完全培养基, 重悬后移至 25T 培养瓶中。

置于 37℃, 5%CO₂ 的培养箱中培养。

II. 细胞传代

1. 在光学显微镜下观察细胞形态, 若长至培养瓶空间的 80%-90%且细胞形态圆润, 无伪足或触角生成, 则提示可以传代。

2. 喷洒少量酒精于培养瓶表面消毒后, 放置于超净工作台上, 将其中的废液用巴氏吸管吸尽, 弃置于废液桶中。

3. 加入 3ml 的 PBS, 轻轻摇晃 30S 左右, 弃置。重复一遍

4. 在培养瓶中加入 2ml 的培养基, 用 1000ul 容量的移液枪轻轻将 RAW264.7 细胞吹打下来, 避免用力过猛刺激到细胞使其极化。将重悬液移至 15ml 离心管中, 然后离心 3min, 1200r/min。

5. 离心完成后弃置上清, 加入 3ml 完全培养基重悬后接种到装有新的培养基的 T25 培养瓶中。

III. 细胞处理

按照实验分组一共分为六组, Control 组不做处理, 其余组均加入脂多糖 (LPS) (1ug/ml), LPS 组不加入谷氨酰胺, 其余组分别加入谷氨酰胺使其浓度分别为 0.5mmol/l、4mmol/l、8mmol/l、16mmol/l。

1.3.2 CCK8 实验步骤

1 收集细胞, 使用细胞计数板计数, 将细胞密度配成 5×10^4 个/ml, 用移液枪加入到 96 孔板, 每个孔加入 100ul 的细胞重悬液, 放置于 37℃、5%CO₂ 的培养箱中过夜, 使其贴壁。

2 第二天按照各个处理组加入不同的药物, 相同条件下培养 4、12、16、24 小时。

3 在培养时间到达后, 每个孔加入 10ul 的 CCK 8 溶液, 培养 1-4 个小时。

4 在多功能酶标仪中, 使用 450nm 的波长测量各个孔的 OD 值。

1.3.3 NO 含量测定

1 种板 收集细胞, 使用细胞计数板计算出细胞密度, 在六孔板中以每个孔 300W 个细胞的数量种板, 完成后置于 37℃、5%CO₂ 的培养箱过夜, 使细胞贴壁。

2 处理 按照实验要求在各个孔中加入 LPS 以及谷氨酰胺, 相同条件下培养 4、12、16、24 小时。

3 取出一氧化氮检测试剂盒, 并配置标准品。使标准品的浓度为 0、1、2、

5、10、40、60、100 μ m。在 96 孔板中分别加入标准品以及待测样品，每个样品三个复孔。完成后在各个孔分别加入 50 μ l 的 Griess Reagent I 试剂以及 Griess Reagent II 试剂。室温下等待 3min。

4 在多功能酶标仪上用 540nm 的波长检测吸光度，并且绘制标准曲线。

1.3.4 Western blotting 实验

I. 蛋白提取

将预先处理好的细胞从培养箱取出，吸取培养液，加入 3ml 的 PBS 清洗三遍，吸去 PBS。每个培养瓶加入 1ml 的 PBS，使用细胞刮将细胞全部刮净后重悬放置于 1.5ml 的 EP 管中。高速离心机 3000r/min 离心 3 分钟，弃置上清，按照 1×10^6 个细胞加入含有 PMSF 的 RIPA 细胞裂解液 200 μ l，在 4 $^{\circ}$ C 的条件下充分裂解细胞，期间需充分震荡，使细胞完全溶解，共 15 分钟。完成后高速离心机 12000r/min 离心 3 分钟。将上清吸取到另一个新的 EP 管中，做好标记。为下一步蛋白定量做好准备。

II. 蛋白定量

1.配置标准液：按照 BCA 蛋白定量试剂盒说明，将标准品浓度分别配成 2mg/ml、1mg/ml、0.5mg/ml、0.25mg/ml、0.125mg/ml、0.0625mg/ml。首先取出 300 μ l 2mg/ml 的原液，加入到 1.5ml 的 EP 管中，再加入 300 μ l 的 PBS 使标准品浓度变成 1mg/ml。混匀后再取出 300 μ l 1mg/ml 的标准品转移到一个新的 EP 管中，再加入 300 μ l 的 PBS 使浓度变为 0.5mg/ml。依次重复直到配全部需要的标准品浓度。

2.配置 BCA 工作液：根据上样孔数算出需要的 BCA 工作液的总量，按照 A 液：B 液为 1:50 的比例配置 BCA 工作液，需要在避光的条件下配置以及上样，每个孔 200 μ l 的 BCA 工作液。

3.上样：取 20 μ l 的各个浓度的标准品到 9 孔板中，重复三遍。取 2 μ l 的样品和 18 μ l 的 PBS 于 96 孔板中，重复三遍。然后在每个孔加入 200 μ l 的 BCA 工作液。上样完成后锡纸包裹避光，放置于 37 $^{\circ}$ C 恒温孵育箱中孵育 30 分钟。

4.检测 OD 值：孵育完成后将 96 孔板放置于酶标仪中 562nm 波长处检测 OD 值，根据各标准品的浓度以及 OD 值做出标准曲线回归方程，根据方程算出各个检测样品的浓度。根据各自的浓度加入适量的 Protein loading buffer 将各蛋白浓度调整成一致，煮沸 10 分钟后放置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

III.SDS-PAGE 电泳

1.制胶：将玻璃板洗净并放置于 37℃恒温箱中晾干，待充分晾干后放置于制胶架上夹紧，按照制胶表配置分离胶并加到适合的位置，而后加入无水乙醇压实。待分离胶凝固后倒出无水乙醇。等到无水乙醇蒸发后再加入浓缩胶、插入梳子，等其凝固。

试剂	10%分离胶	5%浓缩胶
ddH ₂ O	1.7	1.4
30%丙烯酰胺	0.3	0.33
1.5M Tris HCL	1.9	----
1.0M Tris HCL	----	0.25
10% SDS	0.05	0.02
AP	0.05	0.02
TEMED	0.003	0.002

单位：ml

2.上样：将待测样品取出 100℃处理 10 分钟。将配置好的凝胶放置于专用电泳芯上，并加入配置好的电泳缓冲液。拔出梳子，用 200ul 的移液枪将孔内残留的少许凝胶絮状物吹出，处理干净后便按照实验分组加入待测样品，一般上样不超过 15ul。加完样品后在其两侧分别加入 3.5ul 的预染 maker。

3.电泳：上样完成后将装有凝胶的电泳芯放入电泳槽中。首先用 80V 的电压电泳，待蛋白分子跑出浓缩胶后电压转至 120v 直到蛋白跑到合适位置处停止。

4.转膜：电泳完成后切出目的蛋白以及内参蛋白所在的凝胶部位，根据大小裁剪出合适的 PVDF 膜放置到专用转膜夹上。PVDF 膜需要事先用无水乙醇激活。在确保 PVDF 膜与凝胶之间无气泡后便可将其置于转膜槽中，260mA 恒流，冰浴下转膜。

5.封闭：转膜完成后做好标记，用 TBST 清洗一遍后放置于 5%的 BSA 封闭液中封闭一个小时。

6.一抗孵育：封闭完成用 TBST 洗去表面的 BSA，用剪刀将目的蛋白所在的 PVDF 膜裁剪下，并放置到对应的抗体工作液中 4℃孵育过夜。

7.洗膜：将孵育过夜的条带用 TBST 清洗三遍，每遍十分钟。而后根据抗体种属用所对应的二抗孵育一小时。孵育完成后再清洗三遍，每遍十分钟。

8.条带显影及分析：按照说明书配置所需的 ECL 发光液，在暗室中均匀覆盖在条带上，而后开始曝光。利用 Image J 以及 GraphPad Prism 处理并分析条

带。

1.3.5 Real-time PCR

I .RNA 提取

1.取出实验处理后的细胞，PBS 清洗两边后加入 1mlTrizol，用 1ml 移液枪反复吹打，直到细胞完全脱落，然后将其一直 1.5mlEP 管中做好标记。放置于震荡机上剧烈震荡 30S，静置 5 分钟待细胞完全破碎溶解。

2.在每个 EP 管中加入 200ul 的氯仿，剧烈震荡 30S，室温放置 5 分钟。而后于 4℃ 离心机下离心 15 分钟，12000rpm。

3.离心结束后液体分为三层，上层无色透明含有我们所提取的 RNA，将其缓慢的转移到新的 EP 管中。

4.吸取 300-400ul 的上清到核酸纯化柱中，再加入等量的无水乙醇，离心三分钟，1200rpm。重复两遍。再紧接着空离一遍直至无水乙醇完全分离。

5.将核酸纯化柱的上层柱子置于新的 EP 管中，在柱子中心位置处加入 30-50ul 的无核酶水。室温静置 5 分钟后放置于 4℃ 离心机中离心三分钟，1200rpm。

II .RNA 浓度与纯度测定

将得到的 RNA 溶液充分混匀，在紫外分光光度计上检测 260nm 以及 280nm 处吸光值的比值。一般情况下在 1.8-2.0 之间。若 <1.8，则提示 RNA 不纯。若 >2 则说明 RNA 发生降解。根据所测得的 RNA 浓度，将其浓度调整为 1000ng/ul。

III.逆转录

1. 按下表所示配置 PCR 反应液

PCR 反应液试剂用量表

试剂	容量
Total RNA	5ug
OligdT	1.0ul
DEPC 水	加到 12.5ul

2.在 PCR 仪上进行逆转录，按照说明书上的步骤进行反应

3.得到的 CDNA 放置到 4℃ 下保存

IV.引物设计

根据相关基因的基因序列，引物序列如表所示，以 GAPDH 作为管家基因。

Genes	Forward primer(5'-3')	Reverse primer(5'-3')
GAPDH	GGCAAATTCAACGGCACAGTCAAG	TCGCTCCTGGAAGATGGTGATGG
14-3-3	GGCGTGTCATCTCCAGCATCG	GTCCAACAGCTCCAGCACATCG
TNF- α	GGACTAGCCAGGAGGGAGAACAG	GCCAGTGAGTGAAAGGGACAGAAC
IL-6	CTTCTTGGGACTGATGCTGGTGAC	TCTGTTGGGAGTGGTATCCTCTGTG
IL-1 β	CACTACAGGCTCCGAGATGAACAAC	TGTCGTTGCTTGGTTCTCCTTGAC

V. 实时荧光 PCR 反应条件

通过加入上表中的引物，进行 Real Time-qPCR 反应，用 GAPDH 作为管家基因对目的基因进行校正，Real Time-qPCR 反应液的组成分别有 CDNA 1ul、SYBA RT-Qpcr MIX 5ul、上下引物分别 0.5ul、以及无核酶水，构成 10ul 的反应体系。配好体系后加入 PCR 板中，放置到荧光定量 PCR 仪中实时监测荧光，通过 EXCEL 表格进行分析，并用 GraphPad Prism 软件做统计图进行分析。

1.3.6 统计分析

每组实验设置三个平行，用 GraphPad Prism 软件作图分析实验数据均采用 One-way ANOVA 进行统计学分析。P<0.05 代表有统计学意义。

2. 结果

2.1 不同浓度的谷氨酰胺对 LPS 刺激下的 RAW264.7 细胞形态的影响

本研究的目的是观察谷氨酰胺对 LPS 刺激下的 RAW264.7 细胞形态的影响。在加入 LPS (1 μ g/mL) 之前，用不同浓度的谷氨酰胺 (0.5、4、8 和 16 mmol/L) 预处理细胞 1 小时。未经处理的对照组 RAW264.7 巨噬细胞为圆形，细胞边缘光滑，无伪足生成，而用 LPS (1 μ g/mL) 刺激后具有巨噬细胞活化的特性，并且凋亡率明显增加。而用谷氨酰胺预处理的组中，可以观察到细胞形态结构以及存活率以浓度依赖性的方式得到改善。将细胞与不同浓度的谷氨酰胺预处理 1 小时，LPS (1 μ g/mL) 再孵育 24 小时。以上研究结果说明谷氨酰胺能够保护 LPS 刺激下的巨噬细胞，抑制巨噬细胞极化。

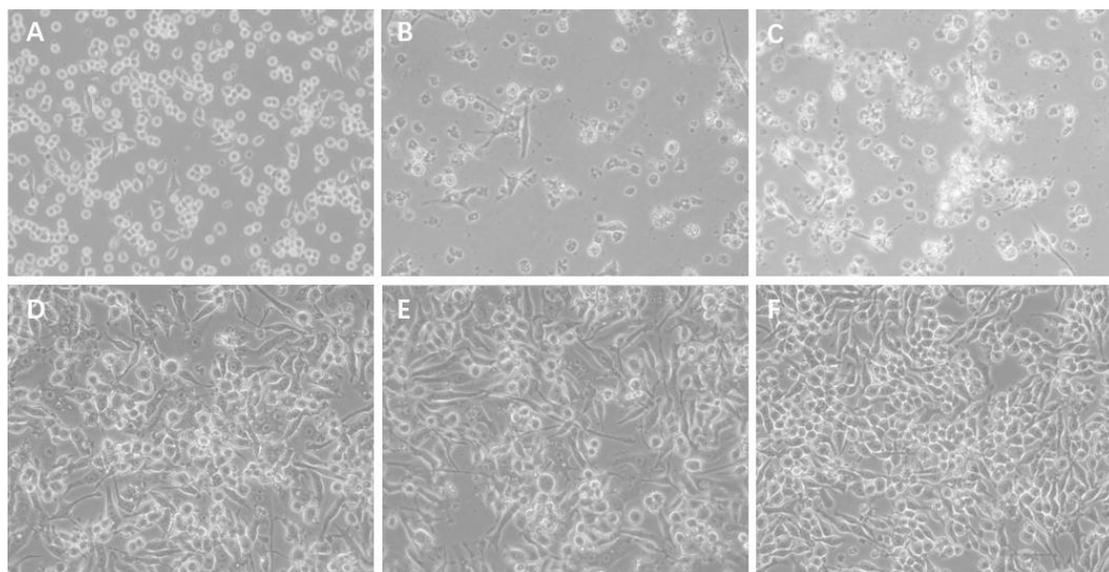


图 1 RAW264.7 巨噬细胞用不同浓度的谷氨酰胺预处理 1 小时，而后用 LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) 再孵育 24 小时 (放大倍数 $\times 400$)。 (A): Control 组; (B): LPS 刺激组; (C): LPS+0.5mmol/L 谷氨酰胺; (D): LPS+4mmol/L 谷氨酰胺; (E): LPS+8mmol/L 谷氨酰胺; (F): LPS+16mmol/L 谷氨酰胺

2.2 CCK8 测定不同浓度的谷氨酰胺对 LPS 刺激下的 RAW264.7 细胞活性的影响

通过 CCK8 法测定 Control 组、; LPS 组; LPS+0.5mmol/L 谷氨酰胺组; LPS+4mmol/L 谷氨酰胺组; LPS+8mmol/L 谷氨酰胺组; LPS+16mmol/L 谷氨酰胺组对细胞活性的影响。相同条件下培养 4 小时以后，测定各组之间的细胞活性无统计学差异， $P > 0.05$ 。在培养 12 小时后，LPS 组的活性相比于 Control 组有所下降， $P < 0.01$ ，差异具有统计学意义。LPS 组与 LPS+0.5mmol/L 谷氨酰胺组差异无统计学意义，而 LPS+4mmol/L 谷氨酰胺组; LPS+8mmol/L 谷氨酰胺组; LPS+16mmol/L 谷氨酰胺组相比于 LPS 组细胞活性下降不明显，相比于 Control 组来说，活性下降不明显，但是仍具有统计学意义。在相同条件下培养 16 小时后，LPS 组的活性相比于 Control 组有所下降， $P < 0.001$ 。LPS+4mmol/L 谷氨酰胺组; LPS+8mmol/L 谷氨酰胺组; LPS+16mmol/L 谷氨酰胺组相比于 LPS 组细胞活性下降明显，相比于 Control 组来说，活性下降明显， $P < 0.01$ 。LPS+8mmol/L 谷氨酰胺组与 LPS+16mmol/L 谷氨酰胺组细胞活性相比，无统计

学差异, $P > 0.05$ 。而 24 小时后各组细胞活性变化与 16 小时相似。以上结果表明, 谷氨酰胺浓度在 8mmol/L 以上的时候, 对 LPS 刺激下的巨噬细胞有较好的保护作用。

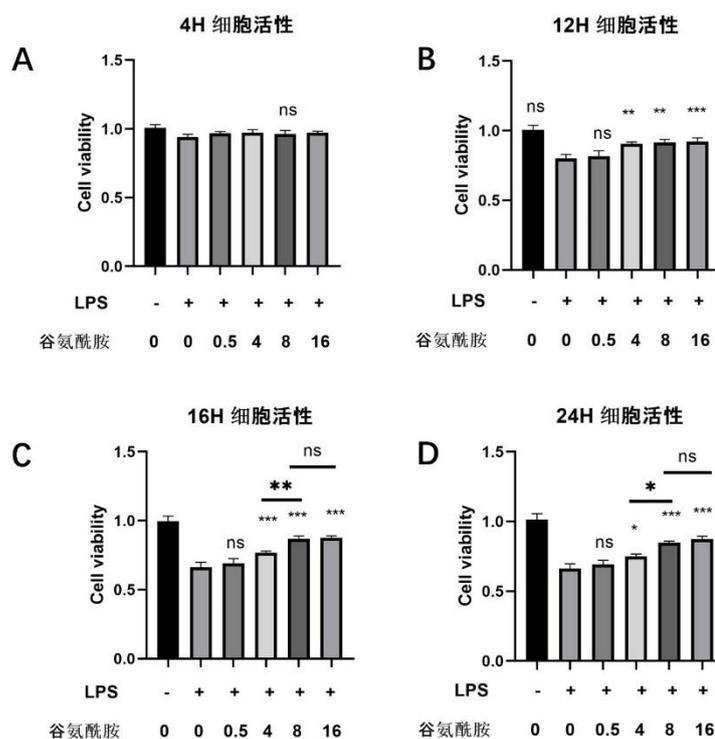


图 2.谷氨酰胺对 LPS 诱导下的 RAW264.7 细胞活力结果。(A): 4H 的细胞活性; (B): 12H 的细胞活性; (C): 16H 的细胞活性; (D): 24H 的细胞活性。Ns 表示差异无统计学意义, * $P < 0.05$, ** P 小于 0.01, *** P 小于 0.001。

2.3 谷氨酰胺对 LPS 刺激下的 RAW264.7 巨噬细胞 NO 产生的影响

为了构建 RAW264.7 巨噬细胞的炎症模型, 利用 LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) 刺激 RAW264.7 巨噬细胞, 分为 Control 组、LPS 组、LPS+0.5mmol/L 谷氨酰胺组、LPS+4mmol/L 谷氨酰胺组、LPS+8mmol/L 谷氨酰胺组、LPS+16mmol/L 谷氨酰胺组。分别于 4h、8h、16h、24h 后收集上清, 通过 Grisee 法检测其 NO 的含量。相同条件下培养 4h 后, 测定各组的 NO 含量无统计学意义, $P > 0.05$ 。而培养 12h 后, LPS 组较 NC 组 NO 的含量上升, 但是 LPS+0.5mmol/L 谷氨酰胺组以及 LPS+4mmol/L 谷氨酰胺组相较于 LPS 组其 NO 的含量无明显差异, $P > 0.05$, 差

异没有统计学意义。LPS+8mmol/L 谷氨酰胺组和 LPS+16mmol/L 谷氨酰胺组 NO 含量下降明显，与 LPS 组相比较 $P < 0.01$ ，差异具有统计学意义。16h 与 24h 的 NO 含量变化与 12h 的 NO 含量变化结果相似，但是 16h 的 LPS+8mmol/L 谷氨酰胺组和 LPS+16mmol/L 谷氨酰胺组 NO 含量相较于 12h 与 24h 的 NO 含量值最低，谷氨酰胺抑制 NO 的生成最为明显。上述结果提示谷氨酰胺在 16H 的时候对 NO 含量的抑制最明显，对炎症反应的抑制效果最明显。

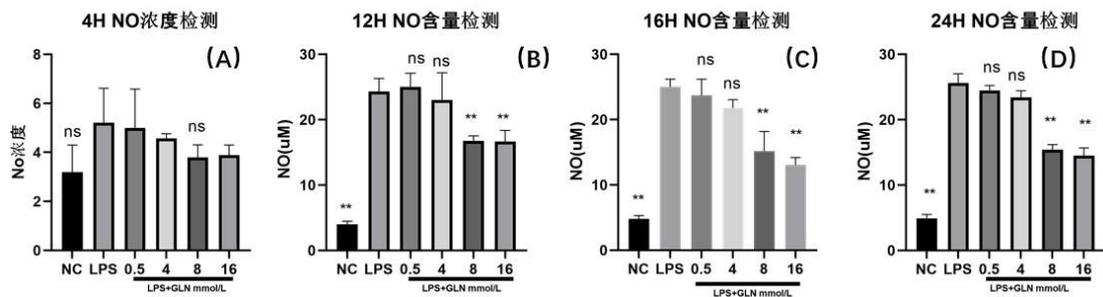


图 3 谷氨酰胺对处于 LPS 刺激下的 RAW264.7 巨噬细胞分泌 NO 的影响。将 RAW264.7 细胞用不同浓度的谷氨酰胺预处理 1 小时。再加入 LPS (1ug/mL) 分别孵育 4H、8H、16H 以及 24H。(A) 4H 的 NO 含量检测；(B) 12H 的 NO 含量检测；(C) 16H 的 NO 含量检测；(D) 24H 的 NO 含量检测。ns 表示差异无统计学意义，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

2.4 谷氨酰胺对 LPS 刺激下的 RAW264.7 巨噬细胞 14-3-3 蛋白生成的影响

在 LPS (1 μ g/mL) 的刺激下，向 RAW264.7 细胞添加谷氨酰胺 (8mmol/L) 分别培养 4h、12h、6h、24h、48h 后提取蛋白进行 western blotting 实验。结果发现 14-3-3 蛋白的表达量在 4h 的时候轻微升高，在 12h、6h、24h 的时候升高明显，但是在 48h 的时候表达量和对照组没有差别。现取 16h 的时间节点，在 LPS (1ug/ml) 的诱导下，向 RAW264.7 细胞分别添加 0.5mmol/L、4mmol/L、8mmol/L、16mmol/L 的谷氨酰胺，分别分为 Control 组、LPS 组、LPS+0.5mmol/L 谷氨酰胺组、LPS+4mmol/L 谷氨酰胺组、LPS+8mmol/L 谷氨酰胺组、LPS+16mmol/L 谷氨酰胺组。结果发现，正常情况下，RAW264.7 细胞

14-3-3 蛋白的表达量很低，但是经过 LPS 的刺激后，14-3-3 蛋白的表达量增加，而且在添加谷氨酰胺后，14-3-3 的分泌量呈浓度依赖性方式上升。上述结果显示，谷氨酰胺在 24h 内表达量一直增加，而在 48h 的时候下降。并且浓度越高 14-3-3 的表达量也越高。

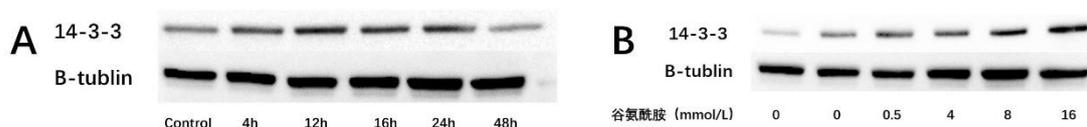


图 4 (A):14-3-3 蛋白在 LPS (1 μg/mL) 的诱导下各个时间段的蛋白表达量;(B): 14-3-3 蛋白在 LPS (1 μg/mL) 以及不同浓度的谷氨酰胺刺激下 16h 的 14-3-3 的蛋白表达量

3. 讨论

3.1 谷氨酰胺的抗炎作用

脓毒症是由感染引起宿主全身性炎症反应以及免疫反应失调的危及生命的器官功能障碍的临床综合征。炎症反应通常情况下是有益的，一旦炎症反应失衡，炎症因子大量释放，将导致器官功能的严重受损，宿主的生命将受到严重威胁。因此，维持炎症反应的平衡以及减少炎症因子的释放有助于保护器官功能的完整。

RAW264.7 细胞作为体内最重要的免疫细胞，对于免疫失调以及炎症的发生进展起着十分重要的作用。在炎症不同阶段有不同的表型，M1 型巨噬细胞的特点是高表达 IL-1 β 、TNF- α 以及 IL-6，M1 型极化会提高促炎细胞因子的释放，增加抗菌以及肿瘤杀伤的能力。M2 型极化的特点是高效的吞噬性。M2 型极化则与免疫抑制和组织修复相关。LPS 能够诱导 RAW264.7 细胞向着 M1 方向极化，进一步加剧炎症反应，导致细胞受损，器官功能障碍^[13]。

谷氨酰胺作为人体中含量最为丰富的氨基酸，虽然人体可以合成谷氨酰胺，但是在人体遭受重大创伤以及严重感染的时候，谷氨酰胺作为细胞代谢以及增殖的原材料被大量消耗，导致谷氨酰胺耗竭。因此在特殊条件下谷氨酰胺也被称为“条件必需”氨基酸。在以往的研究中，谷氨酰胺已经作为一种免疫营养

素普遍被认为能够控制炎症的失衡。

本研究首先通过光学显微镜观察 LPS 诱导后的 RAW264.7 细胞形态的变化, 经过 LPS 的诱导后, RAW264.7 细胞凋亡率增加, 并且长出伪足, 形态不规则, 这表现为 M1 极化的特点, 说明在 LPS 诱导下, RAW264.7 细胞朝向 M1 方向极化, 炎症反应进一步加剧, 这与以往的研究结果相一致。在加入不同浓度的谷氨酰胺之后, RAW264.7 细胞的死亡率相较于 LPS 组有着不同程度的降低。并且细胞的形态较 LPS 组更为圆润, 伪足较少, 我们可以得出谷氨酰胺能够抑制 RAW264.7 细胞朝着 M1 方向极化, 减轻炎症反应。其次, 我们检测各个时期的经 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 含量, 发现在 16h 时 NO 含量下降明显, 与 24h 的 NO 含量无明显差别。并且添加的谷氨酰胺浓度越大, NO 含量降低越明显。为此我们得出结论, RAW264.7 炎症模型在 LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) 诱导 16h 后构建成功, 在谷氨酰胺浓度为 8mmol/l 的浓度以上, NO 含量下降明显, 一定程度上说明炎症受到抑制。

3.2 谷氨酰胺对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 14-3-3 蛋白表达量的研究

14-3-3 最早在 1967 年在牛脑中被发现, 哺乳动物中有七种不同的亚型。到目前为止已经确定了 200 多个不同的蛋白与 14-3-3 通过蛋白质-蛋白质相互作用的方式, 参与调控细胞周期、细胞凋亡、胞内蛋白运输以及信号传导。而炎症反应的调节普遍认为是通过激活信号通路以及改变基因的表达实现的。现如今也有越来越多的证据证明 14-3-3 参与到炎症调节的过程中来。

本研究首先检测了在 LPS ($1\mu\text{g/ml}$) 的诱导下 RAW264.7 细胞的 14-3-3 蛋白的表达量。在 LPS 的刺激下, 在 4h 时 14-3-3 蛋白的表达量增加, 并随着刺激时间的增加, 14-3-3 的表达量也随之增加。在 16h 时, 14-3-3 蛋白表达量最高, 但是在 48h 时, 14-3-3 的表达量出现下降。因此我们将细胞分为六组, 分别为 Control 组、LPS 组、LPS+ 0.5mmol/L 谷氨酰胺组、LPS+ 4mmol/L 谷氨酰胺组、LPS+ 8mmol/L 谷氨酰胺组、LPS+ 16mmol/L 谷氨酰胺组, 相同条件下培养 16h。研究结果表明, 谷氨酰胺对刺激 14-3-3 蛋白的表达增加, 并且谷氨酰胺的浓度越高, 14-3-3 的表达量也更多。我们猜测谷氨酰胺能够刺激 RAW264.7 细胞表达 14-3-3 蛋白, 可能是谷氨酰胺参与细胞内的代谢过程, 并且能够减轻炎症反应, 为 14-3-3 蛋白的表达提供更加便利的环境。

第 2 章 稳定低表达 14-3-3 蛋白细胞株构建

14-3-3 蛋白在真核生物中高度保守且广泛表达，以同源或异源二聚体的形式存在。最早是由 Moore 和 Perez 在牛脑中提取得到并根据其 DEAE-纤维素层析的片段数目和在凝胶电泳中迁移位置将其命名为 14-3-3 的蛋白。14-3-3 蛋白在哺乳动物体内拥有 7 种亚型，包括 β 、 γ 、 ϵ 、 η 、 σ 、 θ 以及 ζ 亚型，亚细胞定位显示 14-3-3 是一种典型的细胞质蛋白，其分子量大约 28~33 KD。14-3-3 蛋白可以识别细胞内的磷酸丝氨酸以及磷酸苏氨酸的结合基序，并在真核细胞的信号转导通路中发挥重要作用。14-3-3 蛋白主要通过蛋白与蛋白之间相互作用实现其功能。

1 材料与方法

1.1 研究对象

RAW264.7 细胞，购自武汉普诺赛公司。将其分为四组，分别是 Control 组、shRNA-14-3-3 A 组、shRNA-14-3-3 B 组、shRNA-14-3-3 C 组。

1.2 主要试剂与耗材

试剂名称	厂家	货号
嘌呤霉素 (Puromycin)	碧云天	St-551

1.3 主要仪器

同第一章

1.4 研究方法

同第一章

1.4.1 引物的设计与合成

参照 NCBI 中目的基因序列，应用 Primer5.0 软件设计引物（表 1），引物由上海生工生物公司合成

1.4.2 14-3-3 shRNA 慢病毒载体的构建及鉴定

根据 shRNA 设计原则，设计 3 条干扰靶点序列，并合成其 shRNA，靶点序列分别为 shRNA-14-3-3 A（5' -GCAGCTATGAAGGCCGTAACA-3'）、shRNA-14-3-3 B

（5' -GCTGGAGCTGTTGGACAAATA-3'）和 shRNA-14-3-3 C（5' -GCCTA AGCCTTGCAAAGATGG-3'）。将合成的 shRNA DNA 单链退火形成双链，利用 T4 噬菌体 DNA 连接酶将酶切后的慢病毒穿梭质粒与退火后的双链 DNA 进行连接反应，将连接后产物转化至感受态细胞 TOP10，摇菌后向转化产物加入 500ul 无抗性 SOB 培养基，37℃振荡培养 45min，而后涂板过夜。随机挑选单克隆，并扩大培养，进行菌落 PCR 鉴定实验，并将 PCR 阳性克隆进行测序鉴定。

1.4.3 慢病毒载体包装

将 293T 细胞接种到 15cm 培养皿中，待细胞融合度达 80%~90%时进行病毒包装，将含有目的序列的穿梭质粒和包装质粒(pGag/Pol, pRev, pVSV-G)经转染试剂 RNAi-Mate 共转染进 293T 细胞，6h 后将转染液换成 10%FBS 的 DMEM 培养基继续培养。72h 后将细胞培养上清液收集起来，0.45 μm 滤器过滤、超速离心获得病毒浓缩液，分装后保存于-80℃备用。

1.4.5 慢病毒感染及稳定表达 14-3-3shRNA 的细胞株筛选

将 RAW264.7 细胞以密度为 1.5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中，等第二天细胞贴壁后，加入慢病毒，慢病毒数量=细胞个数*20 倍的滴度加入转染细胞内，同时每个孔加入 5 μg/ml 的 polybrene。在 37℃、5%CO₂ 的细胞孵箱中孵育 24h，而后更换为完全培养基，第三天的时候观察荧光强度。然后添加终浓度为 1μg/ml 的嘌呤霉素，筛选细胞两周后再利用 Real-time PCR 和 Western blotting 法检测 14-3-3 蛋白的 mRNA 以及蛋白表达。确定 14-3-3 蛋白的敲低效率后扩大冻存保存。

1.4.6 Real-time PCR

同第一部分

1.4.7 Western blotting

同第一部分

1.4.8 统计分析

每组实验设置三个平行，用 GraphPad Prism 软件作图分析。实验数据均采用 One-way ANOVA 进行统计学分析。P<0.05 代表有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒重组质粒测序鉴定

3 个慢病毒质粒 Ywhab-shRNA1、Ywhab-shRNA2、Ywhab-shRNA3。经测序鉴定正确。插入的 DNA 序列与设计的序列完全一致，无碱基突变（如图 5），表明慢病毒质粒构建成功。



图 5.慢病毒质粒检测序列

2.2 Real-time PCR 鉴定敲低效果

慢病毒感染 RAW264.7 巨噬细胞稳定筛选两周后，分别提取对照组以及 14-3-3 干扰组细胞提取总 RNA，Real-time PCR 检测 14-3-3 的表达水平。结果显示，三个 14-3-3 敲低组的相对表达量分别为 0.19、0.45 以及 0.55，表明 14-3-3 的四条特异性干扰序列均能下调 14-3-3 mRNA 的表达。其四组的干扰效率分别为 81%、55%以及 45%。差异均具有统计学意义

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/968002064010006030>