

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002000

野生型肺炎链球菌溶血素通过 PI3K-I/Akt/mTOR 途径诱导 A549 细胞自噬

涂朝林¹, 李 朴¹, 周小兰², 陈维贤¹

(1. 重庆医科大学附属第二医院检验科, 重庆 400010; 2. 重庆医科大学附属第二医院病案科, 重庆 400010)

【摘要】目的:研究肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, Sp)诱导人肺上皮细胞自噬发生的现象及其机制。**方法:**常规培养人肺上皮 A549 细胞与野生型 Sp; 将 GFP-LC3 真核载体转染 A549 细胞, 分为实验组(Sp, MOI=30:1)、阴性对照组[渥曼青霉素(wortmannin, WT), 2 μmol/L 2 h, 自噬抑制剂]、阳性对照组[雷帕霉素(rapamycin, Rapa), 1 mmol/L 10 h, mTOR 抑制剂]和参照组(WT 和 Sp 共同处理), 各组处理时间均为 1、2、3 和 4 h; 荧光显微镜观察各组自噬点形成, 透射电镜观察各组细胞自噬体结构, Western blot 检测各组微管相关蛋白轻链- I/II (microtubule-associated protein light chain 3- I/II, LC3- I/II)、磷酸化 UNC-51-K 激酶 1 (phosphorylated UNC-51-like kinase1, P-ULK1) 和螯体 1 (sequestosome 1, P62) 的表达; 将溶血素表达载体 RFP-PLY (red fluorescent protein-pneumolysin)、GFP-LC3 或(和)RFP-PLY 转染/共转染 A549 细胞, Western blot 检测各组磷酸肌醇 3-激酶- I/III (phosphoinositide 3-kinase- I/III, PI3K- I/III)、蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、Beclin-1 蛋白 (Beclin 1 protein, Beclin-1) 和哺乳动物雷帕霉素靶 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 的表达。**结果:**处理 A549 细胞 3 h 后, 与阴性对照组 (WT) 相比, Sp 感染后, 自噬点明显增多 ($t=41.313, P=0.001$), 电镜观察到典型的自噬体结构, LC3-II 蛋白表达明显上调 ($t=121.592, P=0.000$); A549 细胞转染 RFP-PLY 处理 3 h 后, 与阴性对照组 (WT) 相比, Sp 感染同样观察到明显的自噬现象, PI3K-I/Akt 蛋白和 mTOR 表达下调 ($t_{PI3K-I}=16.544, P_{PI3K-I}=0.004$; $t_{Akt}=22.679, P_{Akt}=0.002$; $t_{mTOR}=19.503, P_{mTOR}=0.003$), 而 PI3K-III 和 Beclin-1 水平无明显差异 ($t_{PI3K-III}=3.572, P_{PI3K-III}=0.070$; $t_{Beclin-1}=0.799, P_{Beclin-1}=0.508$)。**结论:**野生型 Sp 诱导 A549 细胞自噬可能通过 PI3K-I/Akt/mTOR 信号途径。

【关键词】自噬; 肺炎链球菌溶血素; 磷酸肌醇 3-激酶-I; 蛋白激酶 B; 哺乳动物雷帕霉素靶

【中图分类号】R378.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-09-26

Wild-type *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin induces autophagy in A549 cells through the PI3K-I/Akt/mTOR pathway

Tu Chaolin¹, Li Pu¹, Zhou Xiaolan², Chen Weixian¹

(1. Department of Laboratory Medicine, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Medical Records Department, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To study the *Streptococcus pneumoniae* (Sp)-induced autophagy in human pulmonary epithelial cells and its mechanism. **Methods:** Human pulmonary epithelial A549 cells and wild-type Sp strain were cultured by routine methods. The A549 cells were transfected with the eukaryotic expression vector green fluorescent protein-light chain 3 (GFP-LC3) and were divided into experimental group (Sp, MOI=30:1), negative control group (wortmannin [an autophagy inhibitor], 2 μmol/L, 2 h), positive control group (rapamycin [an mTOR inhibitor], 1 mmol/L, 10 h), and reference control group (co-treated with wortmannin and Sp); each group was treated for 1 h, 2 h, 3 h, or 4 h. Each group was observed for the formation of autophagic spots by fluorescence microscopy, for the structure of autophagosomes by transmission electron microscopy (TEM), and for the expression of microtubule-associated protein light

作者介绍: 涂朝林, Email: tuchaoлин@126.com,

研究方向: 病原微生物与宿主相互作用。

通信作者: 陈维贤, Email: chenweixian75@163.com。

基金项目: 重庆市科学技术委员会前沿与应用基础研究计划资助项目 (编号: CSTC2015jcyjA10079); 重庆市教委科学技术研究资助项目 (编号: KJ1702036)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20190305.1614.004.html> (2019-03-07)

chain 3- I/II (LC3- I/II), phosphorylated UNC-51-like kinase1 (P-ULK1), and sequestosome 1 (P62) by Western blot. The A549 cells were transfected/co-transfected with red fluorescent protein-tagged pneumolysin (RFP-PLY) or/and GFP-LC3. The expression levels of phosphoinositide 3-kinase- I/III (PI3K- I/III), protein kinase B (Akt), Beclin 1 protein (Beclin-1), and mammalian target of rapamycin (mTOR) were determined by

Western blot. **Results:** After treatment of the A549 cells for 3 hours, compared with the negative control group, the Sp-infected groups had a significantly increased number of autophagic spots ($t=41.313, P=0.001$) and a significantly up-regulated expression level of LC3-II ($t=121.592, P=0.000$), with typical structures of autophagosomes observed under the TEM. After transfection of the A549 cells by RFP-PLY for 3 hours, compared with the negative control group, the Sp-infected groups also showed obvious autophagy with significantly down-regulated expression of PI3K-I, Akt, and mTOR ($t_{PI3K-I}=16.544, P_{PI3K-I}=0.004; t_{Akt}=22.679, P_{Akt}=0.002; t_{mTOR}=19.503, P_{mTOR}=0.003$), but there were no significant differences between the above groups in the expression level of PI3K-III or Beclin-1 ($t_{PI3K-III}=3.572, P_{PI3K-III}=0.070; t_{Beclin-1}=0.799, P_{Beclin-1}=0.508$). **Conclusion:** Wild-type Sp may induce autophagy in A549 cells through the PI3K-I/Akt/mTOR signaling pathway.

[Key words] autophagy; *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin; phosphoinositide 3-kinase-I; protein kinase B; mammalian target of rapamycin

肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*, Sp) 是引发人呼吸道感染的一种主要病原菌。Sp 可释放过量毒素, 导致机体不能完全清除。其主要毒素是 Sp 溶血素 (pneumolysin, PLY)。PLY 具有多种免疫调节作用, 如早期肺部感染抗炎、DNA 损伤阻滞细胞周期和激活补体经典途径等^[1-2]。呼吸道上皮细胞和肺在抵抗黏膜病原体侵袭时发挥关键作用^[3], 但作用机制尚不明确。

自噬 (autophagy) 是一个胞内发生的过程, 主要受内质网应激形成自噬体^[4]。几种显著相关途径均可调节自噬过程, 如 PI3K、Akt 和 mTOR 等途径, 经典的 PI3K-I 抑制自噬的途径是通过触发哺乳动物 mTOR。最近报道自噬能够防御呼吸道病原体感染肺上皮细胞, 如 A 型链球菌和铜绿假单胞菌等^[5-6], 表明自噬可以介导病原微生物的清除而发挥免疫效应。目前 Sp 所引起自噬现象及其作用机制仍不清楚。

本研究拟在人肺上皮细胞 (A549 细胞系) 中, 加入野生型 Sp 感染 A549 细胞并上调表达 PLY, PLY 通过 PI3K/AKT/mTOR 抑制因子途径诱导细胞自噬发生, 为呼吸道 Sp 感染及机体黏膜免疫的机制提供新的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系和载体 A549 细胞购于美国 ATCC 公司; 野生型 Sp 35A 菌株 (st35A) 来源于重庆医科大学附属第二医院检验科; 真核表达载体 pMV158GFP 与 RFP-PLY 以及溶血素突变菌株 mut-PLY 由西班牙生物医学研究中心 Espinosa 教授馈赠; GFP-LC3 质粒由香港中文大学陈娟教授提供; GFP-LC3 或 (和) RFP-PLY 转染 A549 细胞, 按说明书在 DMEM 培

养基上用 Lipofectamine2000 试剂完成。

1.1.2 主要试剂 抗肺炎链球菌溶血素抗体、P62 单克隆抗体购于美国 Abcam 公司; 磷酸化 PI3 激酶 p85/p55 抗体、PI3 激酶-III 抗体、磷酸化 AktXP 兔单克隆抗体、磷酸化 ULK1 兔单克隆抗体、mTOR 兔单克隆抗体、磷酸化 mTOR 抗体、磷酸蛋白-1 抗体、Beclin-1 兔单克隆抗体和兔抗 β -肌动蛋白单克隆抗体购于美国 Cell Signaling Technology 公司; 兔多克隆抗体抗 LC3B (轻链 3B)、Rapa、3-甲基腺嘌呤 (3-methyladenine, 3-MA, PI3K-III 抑制剂) 和 WT 购于中国上海西格玛生命科学; PIK-93 (Class-I PI3 激酶抑制剂) 购于美国 Selleck Chemicals 公司; Lipofectamine 2000 试剂购于美国 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及感染 在 37℃ 和 5% CO₂ 条件下, 在添加有 1% 酵母的肉汤培养基中培养细菌 15 h, 5 000 r/min 离心, 再放入 10 mL 新鲜肉汤中, 直到增殖对数周期出现。测定 600 nm 处光密度 (optical density, OD) 值, 调整 OD 值 0.25 (0.1 OD=1 × 10⁸ cells/mL)。常规培养 A549 细胞并转染 GFP-LC3 载体, 以感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 30:1 (细菌:细胞) 浓度加入 Sp 至细胞培养基中, 继续培养 1 h 后, 将感染的细胞用缓冲液冲洗 3 遍, 用抗生素 (100 mg/L 庆大霉素和 250 g/L 头孢曲松钠) 杀死细胞外细菌。将上述感染 Sp 的 A549 细胞作为实验组, 同样将 GFP-LC3 载体转染到 A549 细胞, 加入 Rapa (1 mmol/L, 10 h) 激发自噬作为阳性对照, 加入 WT (2 μ mol/L, 2 h) 作为阴性对照, 加入 WT 和 Sp 共同处理作为参照组, 各处理组 A549 细胞在指示时间内 (1、2、3 和 4 h) 进一步培养。

1.2.2 透射电子显微镜观察细胞超微结构 各处理组 A549 细胞培养 3 h, 2.5% 戊二醛固定细胞, 进行常规电镜标本的固定、脱水 and 包埋, 用乙酸双氧和柠檬酸盐保存超薄切片, 采用日立 H7600 电子显微镜观察并照片。

1.2.3 Western blot 检测蛋白 各处理组 A549 细胞培养 3 h 后, 收集细胞加入裂解液, 添加蛋白酶抑制剂并定量。细胞裂解后加上样缓冲液煮沸 5 min, 离心收集上清液, 加至 15% SDS-PAGE 凝胶进行电泳分离。分离的蛋白质转移到 PVDF

膜,室温下封闭 2 h,PVDF 膜在有牛血清白蛋白缓冲液(1:1 000)的一抗中 4 ℃孵育过夜,然后用含 0.5%吐温的 TBS 冲洗 3 遍,HRP 标记的二抗(1:2 000)室温孵育反应 2 h。洗膜后在化学发光仪中显影曝光。

1.3 统计学处理

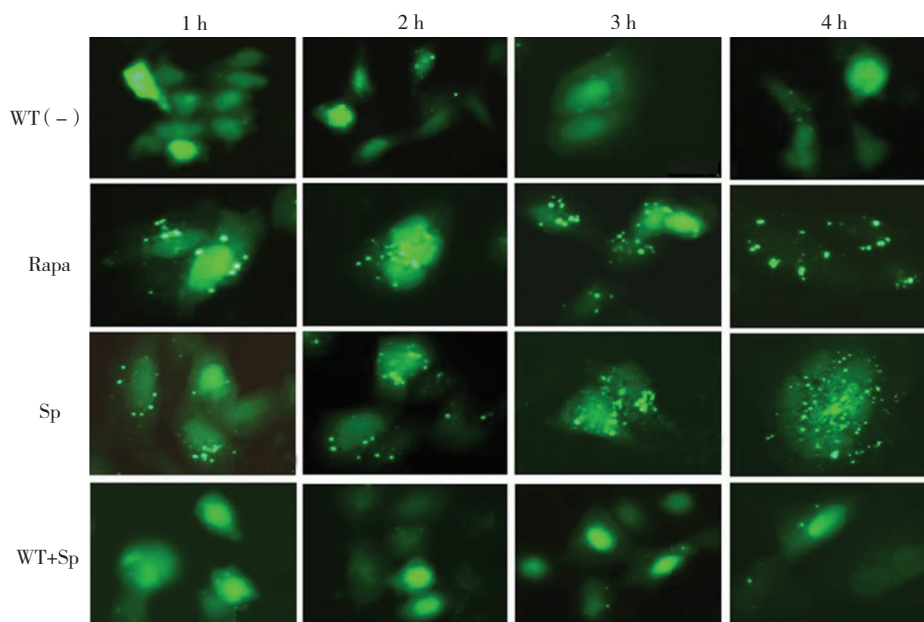
采用 SPSS 15.0 软件进行统计学分析,所有数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,同一时间点各组间比较采用配对 t 检验,两两比较时对检验水准 α 进行 Bonferroni 校正。对不同剂量 Sp 感染 A549 细胞诱发自噬体的比较,采用重复测量资料的方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 Sp 感染诱导 LC3 自噬点及自噬体形成

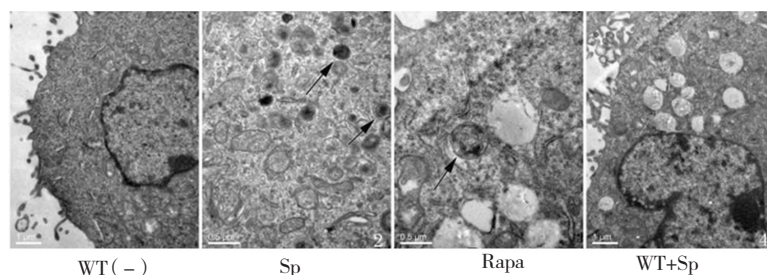
当用 MOI 为 30:1 的 Sp 感染时,细胞可出现典型绿色荧光点状自噬体(图 1A),同时可以观察到典型的自噬体结构(图 1B)。各处理 A549 细胞 3 h 后,除外 Sp 和 Rapa 诱导自噬 GFP-LC3 点状细胞比率差异无统计学意义($t=0.364, P=0.751$),

其余各处理均有统计学差异($t_{WT-Sp}=41.313, P_{WT-Sp}=0.001; t_{WT-Rapa}=32.521, P_{WT-Rapa}=0.001; t_{WT-WT+Sp}=20.788, P_{WT-WT+Sp}=0.002; t_{Sp-WT+Sp}=25.375, P_{Sp-WT+Sp}=0.002; t_{Rapa-WT+Sp}=20.205, P_{Rapa-WT+Sp}=0.002$) (图 2A)。因此,Sp 感染 A549 细胞可诱导 LC3 自噬点形成。关于 Sp 感染 A549 细胞诱发的自噬具有剂量和时间的相关性,用重复测量方差分析,不满足球形检验($P=0.046$),采用 Greenhouse-Geisser 方法进行校正,剂量主效应有统计学意义($F=67.042, P=0.000$),时间主效应有统计学意义($F=342.977, P=0.000$),剂量与时间交互作用有统计学意义($F=63.343, P=0.000$)。由于存在交互作用,进一步做简单效应检验,发现除外 2 h 与 3 h、3 h 与 4 h、2 h 与 4 h 之间自噬体诱发情况无统计学意义($t_{2-3h}=2.717, P_{2-3h}=0.026; t_{3-4h}=2.169, P_{3-4h}=0.062; t_{2-4h}=2.903, P_{2-4h}=0.020$),其他时间点之间自噬体诱发情况有统计学意义($P<0.05$)。对各时间点上不同处理剂量的比较发现,除外 1 h 时 MOI 为 1:30 与 1:1、1:1 与 30:1 无统计学意义(P 值依次为 0.563、0.124),其余时间点各剂量均有统计学意义($P<0.05$) (图 2B)。因此,Sp 感染 A549 细胞诱发的自噬具有剂量和时间依赖性。



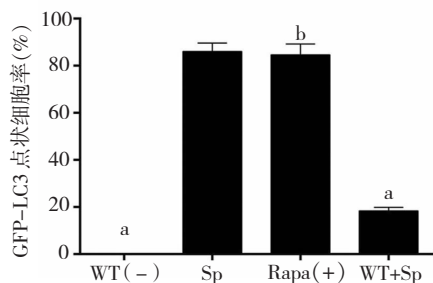
注:WT(-), 渥曼青霉素;Rapa:雷帕霉素;Sp:肺炎链球菌;WT+Sp:渥曼青霉素和肺炎链球菌共同处理

A. 不同处理 A549 细胞后 GFP-LC3 点状自噬(400 $\times$)



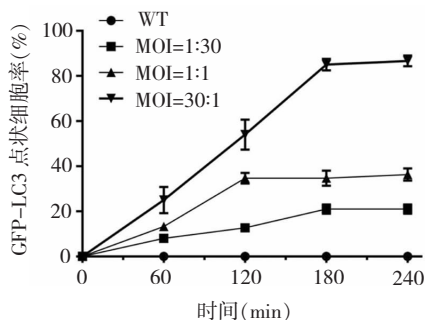
B. 电镜下细胞超微结构(10 000 $\times$)

图 1 不同处理 A549 细胞后 GFP-LC3 点状自噬和电镜下细胞超微结构



注: a, WT(-)、WT+Sp 与 Sp 比较, $P<0.05$; b: Rapa 与 Sp 比较, $P>0.05$

A. 不同处理 A549 细胞 3 h 后 GFP-LC3 点状细胞率比较



B. Sp 感染 A549 细胞诱发自噬体的剂量和时间依赖性

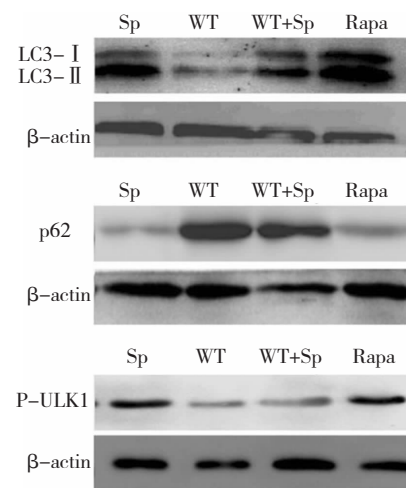
图 2 不同处理 A549 细胞 3 h 后 GFP-LC3 点状细胞率比较和 Sp 感染 A549 细胞诱发自噬体的剂量和时间依赖性比较

2.2 Sp 感染诱导 LC3-II 蛋白表达上调

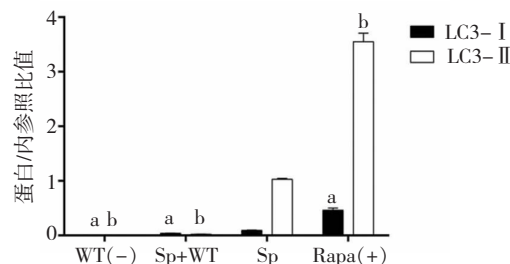
为判断 Sp 感染 A549 细胞诱发自噬的具体效应, 分别用 Sp、WT、WT+Sp 和 Rapa 处理 A549 细胞 3 h, 然后用 Western blot 检测 LC3-I/II、P-ULK1 和 P62 蛋白表达水平。结果显示, LC3-I 水平, 各处理组间比较均有统计学差异 ($P<0.05$) (图 3B); LC3-II 水平, 各处理组间比较均有统计学差异 ($P<0.05$) (图 3B); P62 水平, 除外 Rapa 与 Sp 比较无统计学差异 ($t=3.443, P=0.075$), 其余各组间有统计学差异 ($P<0.05$) (图 3C); P-ULK1 水平, 除外 Rapa 与 Sp 比较无统计学差异 ($t=2.110, P=0.169$), 其余各组间有统计学差异 ($P<0.05$) (图 3D)。因此, Sp 感染 A549 细胞后可引起 LC3-I、LC3-II 和 P-ULK1 水平上调和 P62 水平下降。

2.3 PLY 是 A549 细胞自噬的启动剂

为判断 PLY 是细胞自噬的启动剂, 分别用 WT、WT+Sp、Rapa 和 PLY 缺陷菌株(mut-PLY)处理 A549 细胞 3 h (MOI=30:1), mut-PLY 处理后不能诱导细胞 LC3 点状形成(图 4A)。GFP-LC3 或(和)RFP-PLY 转染/共转染 A549 细胞 3 h, PLY 处理组得到 LC3 点状的累积(图 4B)。Western blot 检测各处理 A549 细胞 3 h 的 LC3-II 和 P62 表达水平, LC3-II 水平, 未处理(-)、WT 和 mut-PLY 处理与 PLY 比较有统计学差异 ($t_{(-)}=121.031, P_{(-)}=0.000; t_{WT}=122.062, P_{WT}=0.000; t_{mut-PLY}=120.291, P_{mut-PLY}=0.000$), 其余各组间无统计学差异(图 5B); P62 水平, 未处理(-)、WT 和 mut-PLY 处理与 PLY 比较有统计学差异 ($t_{(-)}=59.415, P_{(-)}=0.000; t_{WT}=47.408, P_{WT}=0.000; t_{mut-PLY}=17.512, P_{mut-PLY}=0.003$), 其余各组间无统计学差异(图 5B)。因此, PLY 是 A549 细胞自噬的启动剂。

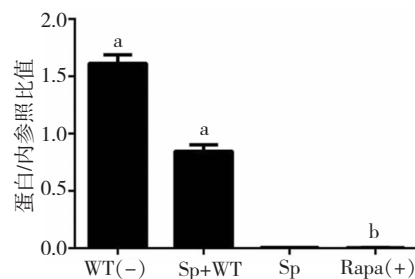


A. 不同蛋白表达水平



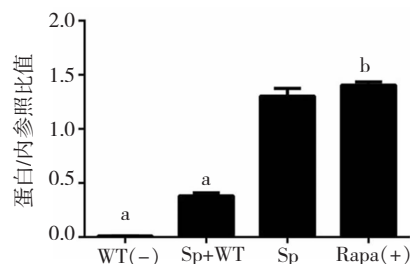
注: a, WT(-)、Sp+WT、Rapa 与 Sp 比较 LC3-I 水平, $P<0.05$; b: WT(-)、Sp+WT、Rapa 与 Sp 比较 LC3-II 水平, $P<0.05$

B. LC3-I 和 LC3-II 蛋白相对水平



注: a, WT(-)、Sp+WT 与 Sp 比较, $P<0.05$; b: Rapa 与 Sp 比较, $P>0.05$

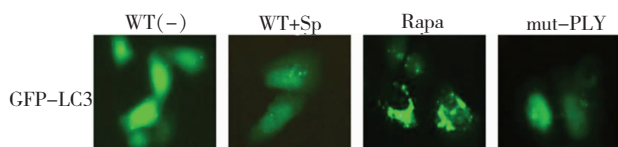
C. P62 蛋白相对水平



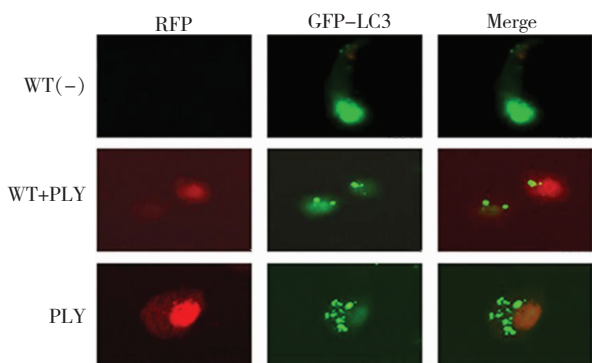
注: a, WT(-)、Sp+WT 与 Sp 比较, $P<0.05$; b: Rapa 与 Sp 比较, $P>0.05$

D. P-ULK1 蛋白相对水平

图 3 Western blot 检测不同处理 A549 细胞 3 h 的蛋白水平

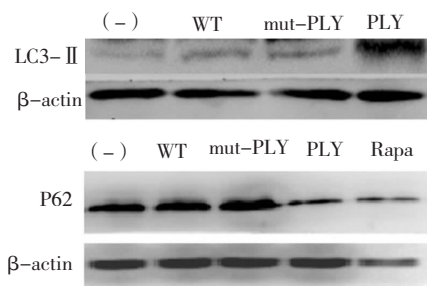


A. 不同处理 A549 细胞后 GFP-LC3 自噬情况(400×)



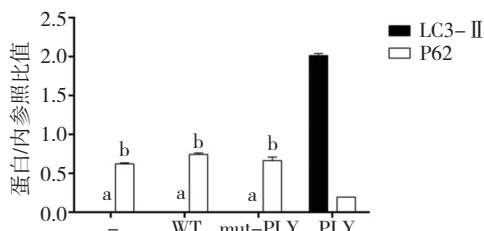
B. GFP-LC3 或 (和)RFP-PLY 转染/共转染 A549 细胞自噬情况 (400×)

图 4 不同处理 A549 细胞 3 h GFP-LC3 自噬情况和 GFP-LC3 或 (和) RFP-PLY 转染/共转染 A549 细胞自噬情况



注: (-) 指未处理组

A. LC3-II 和 P62 表达水平



注: a, (-)、WT、mut-PLY 与 PLY 比较 LC3-II 水平, $P<0.05$; b, (-)、WT、mut-PLY 与 PLY 比较 P62 水平, $P<0.05$

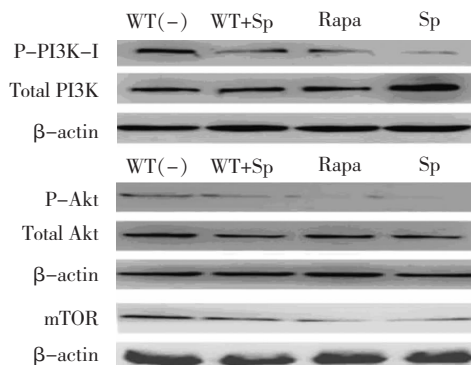
B. LC3-II 和 P62 相对水平

图 5 Western blot 检测不同处理 3 h 后 A549 细胞的蛋白水平

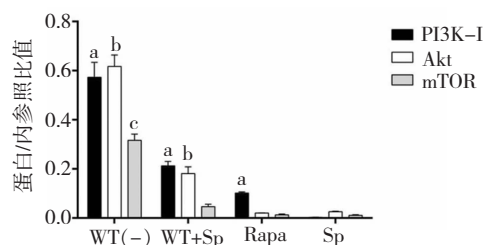
2.4 PLY 通过 PI3K-I/AKT/mTOR 途径诱导 A549 细胞自噬

载体 RFP-PLY 转染 A549 细胞后, 分别用 WT、WT+Sp、Rapa 和 Sp 处理 A549 细胞 3 h, Western blot 检测 PI3K-I/II、Akt 蛋白、mTOR 和 Beclin-1 水平。结果显示, PI3K-I 水平, 除 WT、WT+Sp 与 Rapa 比较无统计学差异 ($t_{WT}=14.681$, $P_{WT}=0.005$; $t_{WT+Sp}=13.884$, $P_{WT+Sp}=0.05$), 其余各组间有统计学差异 ($P<0.05$) (图 6B); Akt 蛋白水平, WT+Sp、Rapa 和 Sp 与 WT 比较有统计学差异 ($t_{WT+Sp}=38.934$, $P_{WT+Sp}=0.001$; $t_{Rapa}=22.045$, $P_{Rapa}=0.002$; $t_{Sp}=22.679$, $P_{Sp}=0.002$), 其余各组间无统计学差异 ($P>$

0.05) (图 6B); mTOR 水平, Rapa、Sp 与 WT 比较有统计学差异 ($t_{Rapa}=19.274$, $P_{Rapa}=0.003$; $t_{Sp}=19.503$, $P_{Sp}=0.003$), 其余各组间无统计学差异 ($P>0.05$) (图 6B); PI3K-III 水平, Sp、WT+Sp 和 WT 与 3-MA (3-甲基腺嘌呤, PI3K-III 抑制剂) 比较有统计学差异 ($t_{Sp}=36.033$, $P_{Sp}=0.001$; $t_{WT+Sp}=24.462$, $P_{WT+Sp}=0.002$; $t_{WT}=84.493$, $P_{WT}=0.000$), 其余各组间无统计学差异 ($P>0.05$) (图 6C); Beclin-1 水平比较, 各组间无统计学差异 ($P>0.05$) (图 6C)。因此, Sp 感染 A549 细胞后可引起 PI3K-I、Akt 蛋白和 mTOR 表达下调, 而 PI3K-III 和 Beclin-1 水平无明显变化。

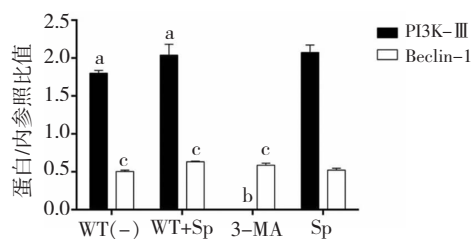


A. 不同蛋白表达水平



注: a, WT(-)、WT+Sp、Rapa 与 Sp 比较 PI3K-I 水平, $P<0.05$; b, WT(-)、WT+Sp 与 Sp 比较 Akt 水平, $P<0.05$; c, WT(-) 与 Sp 比较 mTOR 水平, $P<0.05$

B. PI3K-I、Akt 和 mTOR 蛋白相对表达水平



注: a, WT(-)、WT+Sp 与 Sp 比较 PI3K-III 水平, $P>0.05$; b, 3-MA 与 Sp 比较 PI3K-III 水平, $P<0.05$; c, WT(-)、WT+Sp、3-MA 与 Sp 比较 Beclin-1 水平, $P>0.05$

C. PI3K-III 和 Beclin-1 相对表达水平

图 6 Western blot 检测不同处理 A549 细胞 3 h 后蛋白水平

3 讨论

细菌感染性疾病中自噬的作用及其调控机制尚不明确,自噬在机体的自我保护中发挥重要作用^[7-8]。Sp 是引起肺炎的主要病原菌之一^[9],是一种细胞外的病原菌,Sp 许多毒力因子,如 PLY 和荚膜多糖可能是引起细胞外病原学特征的因素。但 Sp 感染后是否诱导细胞自噬尚不清楚。本研究证实 Sp 感染后通过 PI3K-I/Akt/mTOR 信号诱导细胞自噬。在细菌感染和压力条件下,内源性 LC3-I 蛋白和 PE 结合形成 LC3-II。和位于细胞质的 LC3-I 不同,LC3-II 可联系自噬体膜的内侧和外侧,因此,在自噬体形成中是一个典型的标记物。监测 LC3 点状形成并证实在 Sp 野生型 st35A 菌株感染的 A549 细胞中显著自噬体的形成。当自噬抑制后 P62 蛋白开始累积,而当自噬诱导时,P62 水平下降,因此,P62 被用来监测自噬的标记。但 LC3-II 的增加和 P62 的降低并无明显相关。因此,本研究采用 LC3-II 与 P62 表达水平共同监测自噬。

自噬调控机制主要为 PI3Ks,它有 3 个亚型,其中只有 I 和 III 亚型起作用,但二者调控作用相反。PI3K-III 介导自噬因子募集到刚形成的自噬体膜,在典型自噬中起作用^[10],本研究中 PI3K-III 水平未受影响,相反 PI3K-I 触发 AKT/mTOR 信号途径抑制自噬;还发现关键自噬上游调节器 PI3K-I 被 Sp 感染抑制,为判断其关键下游自噬相关蛋白,进一步检测磷酸化 Akt(P-Akt)和 mTOR 表达水平,结果显示 P-Akt 和 mTOR 水平显著降低,这与 PI3K-I 表达模式符合。

为判断 Sp 主要毒力因子 PLY 是诱导细胞自噬的因素,笔者研究了 PLY 对自噬诱导的作用,发现毒力因子 PLY 参与自噬诱导。PLY 是 Sp 释放的强有力的毒力因子,它因孔隙形成和毒素诱导的凋亡导致细胞死亡。实验进一步将 PLY 突变体,转染到 A549 细胞中过表达,未观察到明显的凋亡改变。但

转染 RFP-PLY 质粒的 A549 细胞中有明显的自噬发生,而 PLY 阴性突变株阻碍了自噬的发生,表明 PLY 参与细胞自噬的诱导。

总之,本研究证实了 Sp 通过 PI3K-I/Akt/mTOR 信号通路引起细胞自噬形成,且毒力因子 PLY 在其中发挥了重要作用。本研究为进一步了解呼吸道 Sp 感染时自噬的作用提供了新的实验依据。

参 考 文 献

- [1] Martin W, Florence P, Daniel L, et al. The NLRP3 inflammasome is differentially activated by pneumolysin variants and contributes to host defense in pneumococcal pneumonia[J]. J Immunol, 2011, 187: 434-440.
- [2] Rai P, Fang H, Kwang J, et al. Pneumococcal pneumolysin induces DNA damage and cell cycle arrest[J]. Sci Rep, 2016, 6: 22972.
- [3] Eddens T, Kolls JK. Host defenses against bacterial lower respiratory tract infection[J]. Curr Opin Immunol, 2012, 24(4): 424-430.
- [4] Fan T, Chen L, Huang Z, et al. Autophagy activation by rapamycin before hypoxia-reoxygenation reduces endoplasmic reticulum stress in alveolar epithelial cells[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 41: 79-90.
- [5] Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, et al. Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*[J]. Science, 2004, 306: 1037-1040.
- [6] 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: 507-515.
- [7] Naomi H, Claudia T, Yukiko K, et al. *Vibrio parahaemolyticus* effector proteins suppress inflammasome activation by interfering with host autophagy signaling[J]. PLoS Pathog, 2013, 9: e1003142.
- [8] De Leo A, Colavita F, Ciccocanti F, et al. Inhibition of autophagy in EBV-positive Burkitt's lymphoma cells enhances EBV lytic genes expression and replication[J]. Cell Death Dis, 2015, 6: e1876.
- [9] Rai P, Parrish M, Tay I J, et al. *Streptococcus pneumoniae* secretes hydrogen peroxide leading to DNA damage and apoptosis in lung cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112: E3421-3430.
- [10] Yu P, Zhang Y, Li C, et al. Class III PI3K-mediated prolonged activation of autophagy plays a critical role in the transition of cardiac hypertrophy to heart failure[J]. J Cell Mol Med, 2015, 19: 1710-1719.

(责任编辑:张辉洁)