

• 基础研究 •

TBK1对NLRC4炎症小体的作用及其机制研究

曾 强, 张在奎, 孙乃双, 陈允梓*

南京医科大学基础医学院免疫学系, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的: 探究TANK结合激酶1(TANK-binding kinase 1, TBK1)调控核苷结合寡聚化结构域样受体4(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor 4, NLRC4)炎症小体激活的作用及其机制。方法: 在鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*, S.T)感染的永生化骨髓巨噬细胞(imortalized bone marrow derived macrophage, IBMDM)中, Western blot检测NLRC4炎症小体激活及其下游分子半胱天冬蛋白酶1(cysteine aspartic acid specific protease 1, Caspase-1)和Gasdermin D(GSDMD)的剪切情况; 乳酸脱氢酶检测试剂盒检测细胞培养基上清中乳酸脱氢酶的含量; 蛋白质免疫共沉淀实验确定TBK1与NLRC4的相互作用及其具体结构域; 细胞免疫荧光实验确定TBK1与NLRC4的空间定位; GST pull-down实验确定TBK1与NLRC4是否存在直接相互作用; 凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)寡聚化检测实验验证NLRC4炎症小体组装。构建S.T感染C57BL/6小鼠动物模型, 观察小鼠生存情况。涂板计数腹腔灌洗液和肺的细菌负荷量; 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测腹腔灌洗液及血清中的肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 和白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 的含量; 流式细胞术检测腹腔灌洗液中的中性粒细胞比例。结果: 在S.T感染的IBMDM中, 抑制TBK1可减弱NLRC4炎症小体激活, NLRC4磷酸化水平下降, Caspase-1与GSDMD的剪切减少; TBK1与NLRC4存在相互作用, TBK1的N端与NLRC4的NACHT结构域相互作用; TBK1与NLRC4存在空间上的共定位; TBK1可以磷酸化NLRC4的Ser533位点。S.T动物模型实验显示, 抑制TBK1活性可以显著提高小鼠的生存率; 减低小鼠腹腔灌洗液和肺中的细菌负荷量; 降低血清以及腹腔灌洗液中的IL-1 β 、TNF- α 的表达水平; 减少腹腔灌洗液中的中性粒细胞比例。结论: TBK1与NLRC4相互作用, 磷酸化NLRC4 Ser533位点, 促进NLRC4炎症小体的激活, 为治疗相关疾病提供理论依据和新的潜在靶点。

[关键词] NLRC4炎症小体; TBK1; 鼠伤寒沙门氏菌

[中图分类号] R393

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2024)05-595-10

doi: 10.7655/NYDXBNSN231080

The effects and mechanisms of TBK1 on NLRC4 inflammasome

ZENG Qiang, ZHANG Zaikui, SUN Naishuang, CHEN Yunzi*

Department of Immunology, School of Basic Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism by which TANK binding kinase 1 (TBK1) regulates the activation of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor 4 (NLRC4) inflammasome. **Methods:** Western blot was used to detect the activation of NLRC4 inflammasome and their downstream molecules cysteine aspartic acid-specific protease 1 (Caspase-1) and Gasdermin D (GSDMD) in immortalized bone marrow-derived macrophages (IBMDM) infected with *Salmonella typhimurium* (S.T). A lactate dehydrogenase detection kit was used to detect the content of lactate dehydrogenase in the supernatant of cell culture medium. The interaction between TBK1 and NLRC4 and their specific interaction domain was determined through protein co-immunoprecipitation experiments. Cellular immunofluorescence assay was used to determine the spatial localization of TBK1 and NLRC4. The GST pull-down experiment confirmed the direct interaction between TBK1 and NLRC4. The assembly of NLRC4 inflammasome was verified using apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) oligomerization detection experiments. The S.T infected animal model of C57BL/6 mice was built and the survival of mice was observed. The bacterial load of lung tissues and peritoneal cavity-flushed fluid was analyzed through smear analysis. ELISA was used to detect the content of tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-1 β in peritoneal cavity-flushed fluid and serum. Flow cytometry was used to detect the proportion of neutrophils in peritoneal cavity-flushed fluid. **Results:** In S.T infected IBMDM, inhibiting TBK1 led to a weakened activation of NLRC4

[基金项目] 国家自然科学基金(82171723)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: chenyunzi@njmu.edu.cn

inflammasomes, decreased phosphorylation levels of NLRC4, and reduced cleavage of Caspase - 1 and GSDMD. There was an interaction between TBK1 and NLRC4, and the N-terminal of TBK1 interacted with the NACHT domain of NLRC4. TBK1 and NLRC4 had spatial co-localization. TBK1 phosphorylated the NLRC4 Ser533 site. S.T animal model experiments showed that inhibiting TBK1 activity significantly improved the survival rate of mice, weakened the bacterial load in the peritoneal cavity-flushed fluid and lung tissues of mice, reduced the content of IL-1 β and TNF- α in serum and peritoneal cavity-flushed fluid, and reduced the proportion of neutrophils in peritoneal cavity-flushed fluid. **Conclusion:** TBK1 interacts with NLRC4, phosphorylates the NLRC4 Ser533 site, and promotes the activation of NLRC4 inflammasome, which providing a theoretical basis and new potential targets for treating related diseases.

[Key words] NLRC4 inflammasome; TBK1; *Salmonella typhimurium*

[J Nanjing Med Univ, 2024, 44(05): 595-603, 614]

炎症小体是由多种蛋白质组成的复合体,是天然免疫系统的重要组成部分^[1-2]。其中核苷结合寡聚化结构域样受体4(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor 4, NLRC4)作为最重要的炎症小体之一,能够感知一系列胞内细菌的感染,在先天免疫反应中发挥关键作用^[3]。当宿主细胞受到鼠伤寒沙门氏菌感染之后,该菌利用其3型分泌系统(type 3 secretion system, T3SS)将杆状蛋白(PrgJ)以及鞭毛蛋白(Flagellin, FLIC)释放到胞内,与核苷酸结合富含亮氨酸重复受体(nucleotide-binding leucine-rich repeat-containing receptor, NLR)家族凋亡抑制蛋白(NLR family of apoptosis inhibitory protein, NAIP)相互作用并激活它们。诱导NAIP-NLRC4炎症小体的组装,激活Caspase-1,促进白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 以及IL-18的成熟,同时剪切Gasdermin D(GSDMD)介导细胞焦亡^[4-5]。与NLR家族蛋白成员一样,NLRC4具有典型的3种结构域,包括N末端半胱天冬酶激活和募集结构域(Caspase-activation and recruitment domain, CARD)、中央NACHT核苷酸结合结构域和C末端富含亮氨酸重复序列(Leucine-rich repeat, LRR)结构域^[6]。NLRC4炎症小体的激活需要NAIP蛋白参与,其可以感知胞质中的细菌成分。虽然NLRC4炎症小体的特异性配体已经有大量研究,但是NAIP-NLRC4炎症小体组装的上游调节因子仍不明确。

TANK结合激酶1(TANK-binding kinase 1, TBK1)首先被鉴定为与小鼠中的TANK相互作用的蛋白^[7],其不仅在核因子 κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)介导的应答中起作用,还在干扰素调节因子(interferon regulatory factor, IRF)的激活中发挥重要作用^[8]。事实上,TBK1已被证明在炎症和自噬等多种细胞通路中具有关键作用^[9-10]。随着对其结构及

功能的深入研究,TBK1已成为治疗炎症性疾病、自身免疫性疾病、癌症、代谢性疾病和神经退行性疾病的潜在靶点^[11-13]。由此可见,TBK1是多种炎症途径和多种干扰素诱导途径的交叉点^[14]。最近有研究表明TBK1可以参与调节NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)炎症小体的激活^[9,15]。

本研究利用鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*, S.T)处理永生骨髓巨噬细胞(immortalized bone marrow-derived macrophage, IBMDM),构建NLRC4炎症小体急性炎症感染模型,通过抑制TBK1的表达及功能以观察TBK1在NLRC4炎症小体信号通路中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

胰蛋白酶、酵母提取物(Oxiod公司,美国);琼脂粉(北京Solarbio公司);氨苄青霉素(Sigma公司,美国);TBK1抑制剂GSK8612(Med ChemExpress公司,美国),TBK1抑制剂氨来咕诺(Amlexanox, AML)(Abcam公司,美国);DSS交联剂(MCE公司,美国),DMEM、RPMI1640培养基(Gibco公司,美国);TMD显色试剂、小鼠肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α ELISA试剂盒、小鼠IL-1 β ELISA试剂盒(BD Biosciences公司,美国),胶回收试剂盒(Omega Biotek公司,美国),质粒小提试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司),乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒(上海碧云天生物技术公司)。

Anti-NLRC4、Anti-p-NLRC4、Anti-GSDMD、Anti-Myc、Anti-Flag(Abcam公司,美国),Anti-凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)(Santa Cruz公司,美国),

Anti-Caspase-1 (AdipoGen 公司, 美国), Anti-p-Ser (Santa 公司, 美国), Anti-TBK1 (CST 公司, 美国), Anti-p-TBK1 (武汉 ABcolond 公司), Anti-GAPDH (Proteintech 公司, 美国); Cy3 标记的山羊抗兔 IgG (H+L)、FITC 标记的山羊抗鼠 IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, 美国), HRP 标记的山羊抗兔 (H+L)、HRP 标记的山羊抗鼠 (H+L) (北京中杉金桥公司), APC-CD11b、PE-Ly6G (eBioscience 公司, 美国)。

质粒: pcDNA3.1-Flag-TBK1、pcDNA3.3-Myc-TBK1、pcDNA3.3-Myc-TBK1-N 端、pcDNA3.3-Myc-TBK1-C 端、pcDNA3.1-Flag-TBK1Ser172A、pcDNA3.1-Flag-TBK1Ser172D、pgex6p1-GST-TBK1、pet28a-HIS-NLRC4、pcDNA3.3-Myc-NLRC4、pcDNA3.3-Myc-NLRC4- Δ CARD、pcDNA3.3-Myc-NLRC4-NACHT、pcDNA3.3-Myc-NLRC4-LRR、pcDNA3.3-Myc-NLRC4 Ser533A、pcDNA3.3-Myc-NLRC4 Ser533D 由本实验室构建。pcDNA3.1-Flag-NLRC4、pet28a-LFN-FLIC 由北京生命科学研究院邵峰实验室赠送。shTBK1 由本实验构建。

S.T 菌株 SL1344, 小鼠胚胎成纤维细胞 Cre-J2、小鼠成纤维细胞 L929、人胚胎肾细胞 HEK293T 和小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 RAW264.7 购自美国模式培养物集存库 (American type culture collection, ATCC), IBMDM 为本实验室保存。

6~8 周龄的 C57BL/6 雄性小鼠由南京医科大学实验动物中心提供。动物实验严格遵循实验动物饲养及操作规范, 由南京医科大学实验动物福利伦理委员会审核 (IACUC-2003010)。

1.2 方法

1.2.1 骨髓巨噬细胞的分离与 IBMDM 的诱导

提前将 Cre-J2 细胞复苏, 用含 20% 血清的 DMEM 在 75 cm² 细胞培养瓶中培养。待铺满 75 cm² 细胞瓶且培养 48 h 后收细胞上清, 使用 0.45 μ m 滤器进行过滤, 细胞上清冻存于 -80 $^{\circ}$ C, 备用。将 L929 细胞复苏, 使用含 10% 血清的 DMEM 在 75 cm² 细胞培养瓶培养 7 d 后, 收细胞上清, 使用 0.45 μ m 滤器过滤, 细胞上清冻存于 -80 $^{\circ}$ C, 备用。

C57BL/6 小鼠麻醉后脱臼处死, 75% 乙醇消毒小鼠皮肤 3 min。在超净台中取出双下肢的胫骨及股骨, 使用 75% 乙醇浸泡消毒 30 s, 移入 4 $^{\circ}$ C 1 \times PBS 中浸泡, 剪去骨头两端, 暴露骨髓腔, 使用 1 mL 注射器吸 4 $^{\circ}$ C RPMI 1640 培养基将骨髓从股骨、胫骨中吹出, 反复吹打, 使细胞团块分散, 使用 70 μ m 滤

器过滤后, 转移至 15 mL 离心管内, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入红细胞裂解液重悬, 静置 5 min 后, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用 1 mL 含 10% 血清的 DMEM 完全培养基重悬骨髓细胞, 将细胞混悬液加入至 25 cm² 培养瓶中, 随后加入含有 1 mL L929 细胞培养上清、2.5 mL Cre-J2 细胞培养上清、5 μ L 浓度为 8 mg/mL 的 Polybrene 和 500 μ L 完全培养基的诱导培养基, 于 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 隔天更换诱导培养基, 5 d 后, 使用完全培养基继续培养细胞, 直到细胞增殖, 获得 IBMDM。

1.2.2 shTBK1 敲减实验

在室温下, 将 PolyJetTM Reagent 转染试剂 (3 μ L) 与 1 000 ng/ μ L 的 shTBK1 (1 μ L) 混合于 100 μ L 的 DMEM 中并静置 15 min, 随后滴加到 RAW264.7 细胞中, 37 $^{\circ}$ C 继续培养 48 h。

1.2.3 S.T 菌株 SL1344 的培养及刺激方法

在无菌 15 mL 离心管中, 用 5 mL LB 液体培养基 (无抗生素) 于 37 $^{\circ}$ C 培养 S.T 菌株 SL1344 12 h。1:100 比例稀释菌液, 于 37 $^{\circ}$ C 继续培养 3 h。随后收取 1 mL 菌液, 在室温下, 5 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用 2 mL 无菌 PBS 重悬。吸取 S.T 菌株 SL1344 悬液 (MOI: 50) 滴加到待刺激的 IBMDM 或 RAW264.7 细胞中, 混匀, 37 $^{\circ}$ C 刺激 2 h 后收集细胞培养上清以及细胞裂解液备用。

1.2.4 LDH 检测

收集 S.T (MOI: 50) 刺激后的 IBMDM 或 RAW264.7 细胞培养上清, 400 g 离心 5 min。按 LDH 检测试剂盒操作说明检测。

1.2.5 Western blot 实验

通过 RIPA 裂解缓冲液 (0.225 mol/L Tris-HCl、50% 甘油、5% SDS 和 0.05% 溴酚蓝) 或 Loading buffer 从 IBMDM、RAW264.7 或 HEK293T 细胞中提取总蛋白。BCA 法用于检测蛋白质浓度。每个样品取 20 μ g 蛋白质进行 SDS-PAGE 分离, 然后转移到 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶封闭后, 使用相应的一抗 (Caspase-1、GSDMD、GAPDH、p-TBK1、p-NLRC4 等) 在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜, 室温下相应二抗孵育 1 h。通过化学发光试剂和化学发光成像系统获得图像。

1.2.6 S.T 鞭毛毒力蛋白 FLIC 的制备和纯化

将质粒 pet28a-LFN-FLIC 转化到大肠杆菌 BL21 中培养, 37 $^{\circ}$ C 过夜。挑取单克隆菌落于液体 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 下振荡过夜。将细菌溶液以 1:100 的比例接种到 LB 中, 37 $^{\circ}$ C 下培养。当 $D(600 \text{ nm})$ 为 0.5~0.7 时, 将 0.5 mmol/L 异丙基 β -D-1-硫代吡喃半乳糖

昔(IPTG)加入到细菌溶液中,并在22℃下诱导表达12 h。4℃ 3 000 r/min离心20 min后收集菌体。超声波裂解后,按照HIS标签蛋白纯化试剂盒的说明获得纯化的FLIC蛋白。

1.2.7 毒力蛋白激活NLRC4炎症小体

在室温下,将PolyJet™ Reagent转染试剂(3 μL)与含有5 μg/mL的FLIC蛋白溶液(20 μL)混合于100 μL DMEM中并静置15 min,随后滴加到IBMDM细胞中,37℃继续培养24 h。收集细胞培养上清,使用Loading buffer裂解细胞,收集细胞裂解液,进行Western blot检测,方法同1.2.5。

1.2.8 重组GST-TBK1及HIS-NLRC4蛋白的制备、纯化及GST pull-down

将含有TBK1和NLRC4的重组质粒pgex6p1-GST-TBK1、pet28a-HIS-NLRC4转化到大肠杆菌BL21中。使用0.1 mmol/L IPTG在20℃下诱导重组蛋白GST-TBK1表达12 h;0.5 mmol/L IPTG诱导HIS-NLRC4表达14 h。按照GST标记蛋白质纯化试剂盒或HIS标记蛋白质纯化试剂盒提供的说明进行纯化。将纯化的蛋白质混合在同一离心管中,孵育过夜后,加入镍柱或谷胱甘肽磁珠混合2 h,再用1×PBST(含有1% TritonX-100)洗涤磁珠3次以去除抗原非特异性结合,样品用2×Loading buffer重悬,并在95℃下煮沸5 min,进行Western blot检测,方法同1.2.5。

1.2.9 免疫共沉淀(co-immunoprecipitation, Co-IP)实验

检测TBK1是否与NLRC4相互作用:将pcDNA3.1-Flag-NLRC4、pcDNA3.3-Myc-TBK1在HEK293T中过表达16 h。然后用含有1%蛋白酶抑制剂PMSF的RIPA裂解液裂解细胞,4℃下以12 000 r/min离心10 min,收集上清。加入Anti-Myc或Anti-Flag抗体,4℃下过夜,加入蛋白A/G磁珠混合1 h,然后用1×PBST(含有1% TritonX-100)洗涤磁珠3次,将Co-IP样品用2×Loading buffer重悬,并95℃煮沸5 min。后续加入一抗Anti-Flag、Anti-Myc及相应二抗进行Western blot检测。

检测TBK1与NLRC4的结合区域:将pcDNA3.1-Flag-TBK1、pcDNA3.3-Myc-NLRC4、pcDNA3.3-Myc-NLRC4-ΔCARD、pcDNA3.3-Myc-NLRC4-NACHT、pcDNA3.3-Myc-NLRC4-LRR;pcDNA3.3-Myc-TBK1、pcDNA3.3-Myc-TBK1-N端、pcDNA3.3-Myc-TBK1-C端、pcDNA3.1-Flag-NLRC4在HEK293T中过表达16 h,Co-IP方法同上,后续加入一抗Anti-Flag、Anti-Myc、Anti-TBK1及相应二抗进行Western blot检测。

检测TBK1的酶活性是否影响与NLRC4的相互作用:将pcDNA3.1-Flag-TBK1、pcDNA3.1-Flag-TBK1Ser172A、pcDNA3.1-Flag-TBK1Ser172D、pcDNA3.3-Myc-NLRC4在HEK293T中过表达16 h,Co-IP方法同上,后续加入一抗Anti-Flag、Anti-Myc及相应二抗进行Western blot检测。

检测NLRC4 Ser533位点的磷酸化水平是否影响与TBK1的作用:将pcDNA3.1-Flag-TBK1、pcDNA3.3-Myc-NLRC4、pcDNA3.3-Myc-NLRC4 Ser533A、pcDNA3.3-Myc-NLRC4 Ser533D在HEK293T中过表达16 h,Co-IP方法同上,后续加入一抗Anti-Flag、Anti-Myc及相应二抗进行Western blot检测。

1.2.10 免疫沉淀(immunoprecipitation, IP)实验

为了检测TBK1是否磷酸化NLRC4,将pcDNA3.1-Flag-TBK1、pcDNA3.3-Myc-NLRC4、pcDNA3.3-Myc-NLRC4 Ser533A在HEK293T中过表达16 h后,用含有1%蛋白酶抑制剂PMSF的RIPA缓冲液裂解细胞,4℃ 12 000 r/min离心10 min,收集上清。加入Anti-Myc抗体,4℃过夜,加入蛋白A/G磁珠混合1 h,然后用1×PBST(含有1% TritonX-100)洗涤磁珠3次,将IP样品用2×Loading buffer重悬,并95℃煮沸5 min,后续加入Anti-p-Ser、Anti-p-NLRC4、Anti-Myc、Anti-Flag及相应二抗进行Western blot。

1.2.11 细胞免疫荧光

S.T(MOI:10)刺激后的IBMDM,用1×PBS洗涤3次,4%多聚甲醛室温固定15 min,在0.02% NP-40中通透10 min,使用快速封闭液封闭15 min,并用Anti-ASC抗体(1:100)孵育过夜。荧光标记的二抗(FITC标记的山羊抗鼠IgG)室温避光孵育细胞60 min,DAPI复染,通过荧光显微镜观察。同法处理过表达TBK1及NLRC4的HEK293T细胞,加入Anti-Flag、Anti-Myc抗体(1:100)及相应二抗孵育后,荧光显微镜观察。

1.2.12 ASC寡聚化实验

将IBMDM铺于细胞孔板中,待其密度达到50%,使用S.T菌株(MOI:10)刺激细胞2 h,4℃裂解细胞30 min。收集细胞悬液,离心取上清备用。剩余细胞沉淀加入1×PBS重悬,加入DSS交联剂充分混匀,室温静置后离心,弃上清,加入Loading buffer煮样。所有样品进行Western blot检测,加入一抗Anti-ASC及相应二抗孵育。通过化学发光试剂和化学发光成像系统获得图像。

1.2.13 S.T感染小鼠模型构建及相关炎症指标检测

将野生型(wild type, WT)C57BL/6小鼠分为

对照组与实验组,对照组用1×PBS灌胃预处理7 d,实验组用25 mg/kg AML灌胃预处理7 d,通过腹腔注射不同浓度的S.T来感染小鼠以检测小鼠生存率及相关炎症指标等。

取对照组和实验组小鼠各5只,每只小鼠腹腔内注射 1×10^2 CFU的S.T,观察和记录小鼠死亡时间。

取对照组和实验组小鼠各3只,每只小鼠在腹腔内注射 1×10^4 CFU的S.T,感染24 h。依次收集小鼠的血清、腹腔灌洗液、肺脏。炎症因子检测:小鼠腹腔灌洗液在4℃下1 500 r/min离心10 min,收集上清,ELISA试剂盒检测血清及腹腔灌洗液中的IL-1 β 和TNF- α 含量。细菌负荷量检测:将肺脏称重,并置于含有1 mL无菌1×PBS 1.5 mL离心管中利用组织研磨仪进行组织研磨(60 Hz, 2~5 min)。按梯度稀释法稀释得到组织匀浆,取200 μ L稀释后的混合液,涂板,将平板置于37℃过夜,拍照、计数统计小鼠S.T感染后肺脏的细菌负荷量,同法统计腹腔灌洗液中的细菌负荷量。中性粒细胞比例检测:取小鼠腹腔灌洗液4℃下1 500 r/min离心10 min,收集细胞沉淀,向细胞沉淀加入2 mL红细胞裂解液重悬裂解2 min,并加入8 mL 1×PBS终止裂解,并在4℃1 500 r/min离心10 min,弃上清。用200 μ L 1×PBS重悬,滤网过滤后,加入含有APC-CD11b、PE-Ly6G抗体(1:400)的混合液重悬,冰上孵育30 min。孵育结束后,在1.5 mL EP管中加入200 μ L 1×PBS漂洗抗体,3 000 r/min 4℃离心7 min,弃上清,使用400 μ L 1×PBS重悬,流式细胞仪检测腹腔灌洗液中的中性粒细胞比例。

1.3 统计学方法

统计学分析及相关绘图通过GraphPad Prism 7.0软件实现。所有实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,Kaplan-Meier方法分析小鼠死亡率。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TBK1参与调控NLRC4炎症小体激活

为了检测TBK1是否参与调控NLRC4炎症小体的活化,使用TBK1抑制剂(GSK8612)预处理小鼠IBMDM细胞,在S.T刺激作用下,抑制TBK1可导致Caspase-1和GSDMD剪切条带明显减少(图1A、B);在S.T感染的RAW264.7中,同样观察到,抑制TBK1可以抑制Caspase-1和GSDMD的剪切(图1C、D)。使用制备的NLRC4特异性激动剂S.T鞭毛蛋白

(FLIC)刺激IBMDM也显示相同的结果(图1E、F)。为了进一步确认TBK1对NLRC4炎症小体诱导的细胞焦亡的作用,分别检测在S.T或FLIC刺激下,IBMDM和RAW264.7的细胞培养上清中的LDH含量,结果显示,抑制TBK1降低了IBMDM和RAW264.7细胞培养上清中LDH的含量(图1G、H、I)。在RAW264.7细胞中采用shRNA敲减TBK1,同样观察到敲减TBK1可以抑制Caspase-1和GSDMD的剪切(图1J、K)以及LDH的释放(图1L)。以上数据表明,在巨噬细胞中,TBK1参与调控NLRC4炎症小体的活化。

2.2 TBK1与NLRC4相互作用

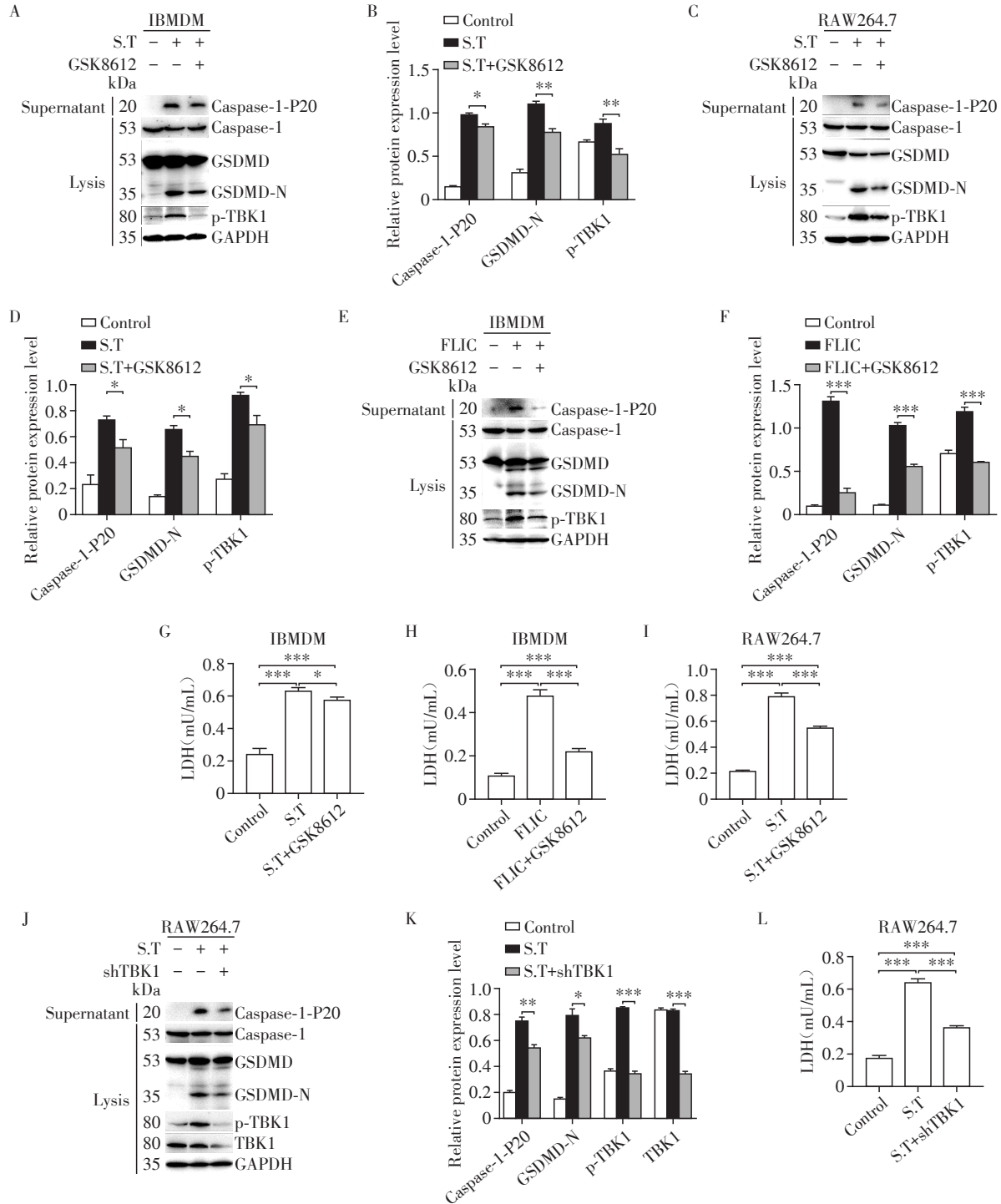
有研究报道NLR家族中的NLRP3与TBK1具有相互作用,而NLRC4与NLRP3具有高度相似的结构,同样包括NACHT与LRR结构域,所以推测NLRC4与TBK1可能也存在相互作用。在HEK293T细胞中过量表达Flag-NLRC4、Myc-TBK1,Co-IP结果表明NLRC4与TBK1具有相互作用(图2A、B)。为进一步确定二者是否有直接相互作用,使用纯化的His-NLRC4以及GST-TBK1蛋白,进行GST pull-down实验,结果显示,NLRC4与TBK1具有直接的相互作用(图2C、D)。并且,在HEK293T细胞中过量表达Flag-TBK1、Myc-NLRC4,免疫荧光实验结果显示TBK1与NLRC4在空间上共定位(图2E)。为了确定TBK1与NLRC4相互作用的具体结构域,构建了一系列TBK1与NLRC4的截短体,并通过Co-IP实验证明了TBK1的N端与NLRC4的NACHT结构域存在相互作用(图2F、G)。并且发现影响TBK1的激酶永久活性形式(Ser172D)和永久非活性形式(Ser172A)都不会改变TBK1与NLRC4的相互作用(图2H),表明TBK1的激酶活性不影响其与NLRC4的相互作用。以上结果表明TBK1可以和NLRC4相互作用。

2.3 TBK1影响ASC寡聚物的形成

激活NLRC4炎症小体会诱导ASC在内的大分子复合物组装,活化的NLRC4与ASC结合并与ASC斑点共定位。为了检验TBK1是否影响炎症小体组装,检测抑制TBK1对NLRC4炎症小体的ASC斑点形成的影响。实验结果显示,与S.T组相比,TBK1抑制剂GSK8612处理组的ASC斑点明显减少(图3A),同时其ASC寡聚物也显著降低(图3B)。以上数据表明抑制TBK1可以减少ASC寡聚体形成,影响ASC-NLRC4复合体的组装。

2.4 TBK1磷酸化NLRC4 Ser533位点

已有研究表明,NLRC4的第533位丝氨酸的磷酸



After two hours of pre-treatment with GSK8612, using S.T(MOI: 50) stimulated IBMDM(A, B) or RAW264.7(C, D) for 2 h, or activated NLR4 inflammasomes by transfecting flagellin (FLIC) into IBMDM(E, F), and Western blot was used to detect expression levels of related proteins in cell lysate and culture supernatant samples. Simultaneously, a lactate dehydrogenase(LDH) detection kit was used to detect the secretion of LDH in cell culture supernatant(G, H, I). After knockingdown TBK1 in RAW264.7 cells, expression levels of related proteins in cell lysate and cell culture supernatant samples were detected(J, K), and the secretion of LDH in cell culture supernatant was detected(L). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ ($n=3$).

图1 TBK1参与调控NLR4炎症小体激活

Figure 1 TBK1 regulates the activation of NLR4 inflammasome

化对于NLR4炎症小体的激活至关重要^[11],因此本研究检测磷酸化酶TBK1能否磷酸化NLR4。在

HEK293T细胞中过量表达Flag-TBK1和Myc-NLRC4或Myc-NLRC4(Ser533A)(NLR4的永久非磷酸

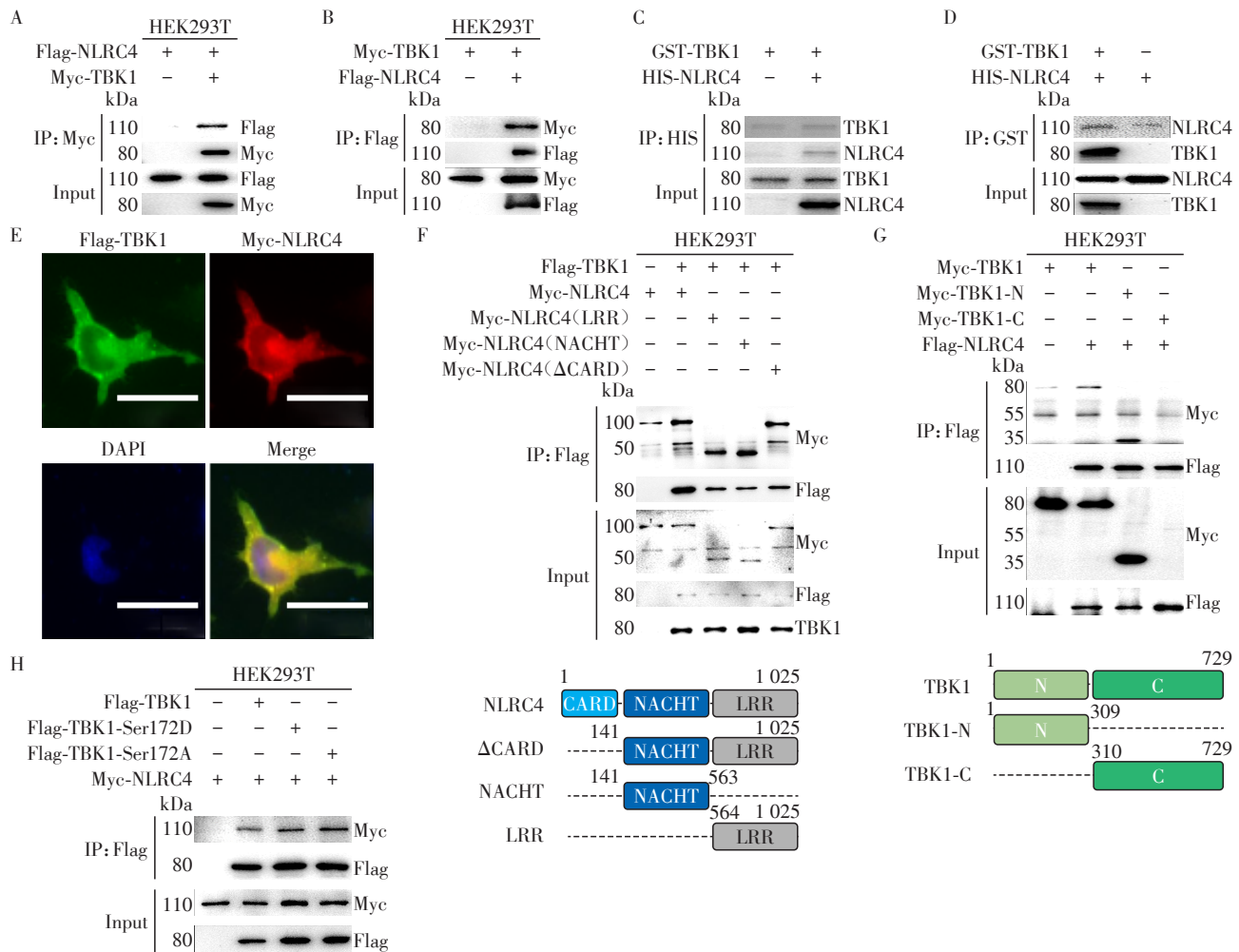


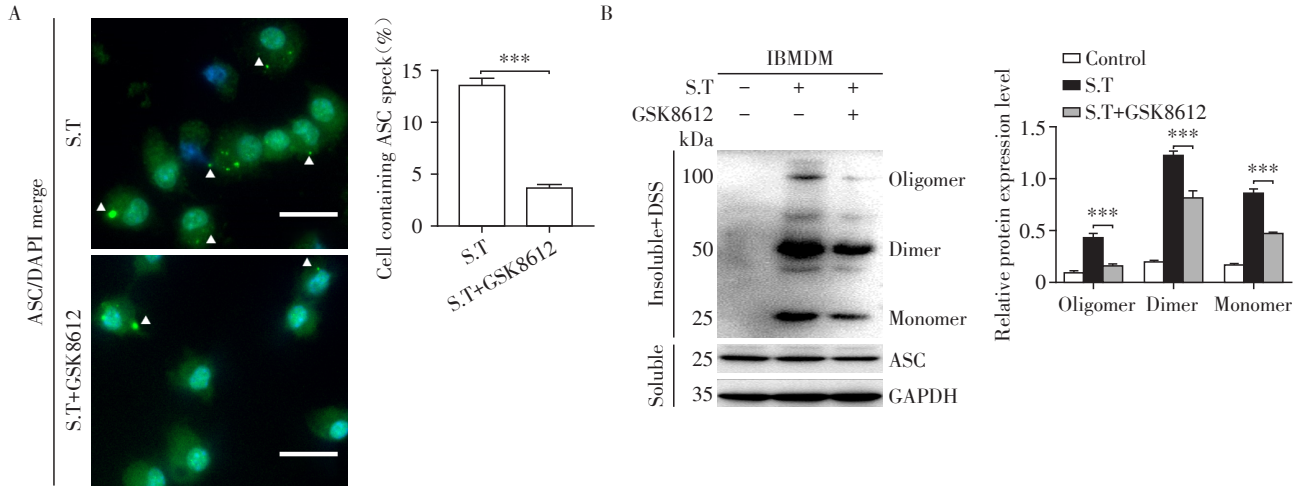
图2 TBK1与NLRC4相互作用
Figure 2 TBK1 interacts with NLRC4

化变体), 通过免疫沉淀收集 Myc-NLRC4 或 Myc-NLRC4(Ser533A), 采用 Anti-p-NLRC4(Ser533) 磷酸化抗体检测, 结果显示, TBK1 促进 Myc-NLRC4 的 Ser533 磷酸化, 而阴性对照 Myc-NLRC4(Ser533A) 无信号(图4A)。而且, 在 HEK293T 细胞中分别过量表达 Myc-NLRC4、Myc-NLRC4(Ser533A)、Myc-NLRC4(Ser533D)(NLRC4 的永久磷酸化变体) 和 Flag-TBK1, 免疫共沉淀和 Western blot 检测表明, NLRC4 Ser533 位点的磷酸化并不影响其与 TBK1 的相互作用(图4B)。以上结果说明, TBK1 可以磷酸化

NLRC4 Ser533 位点。

2.5 抑制 TBK1 可提高小鼠防御 S.T 感染能力

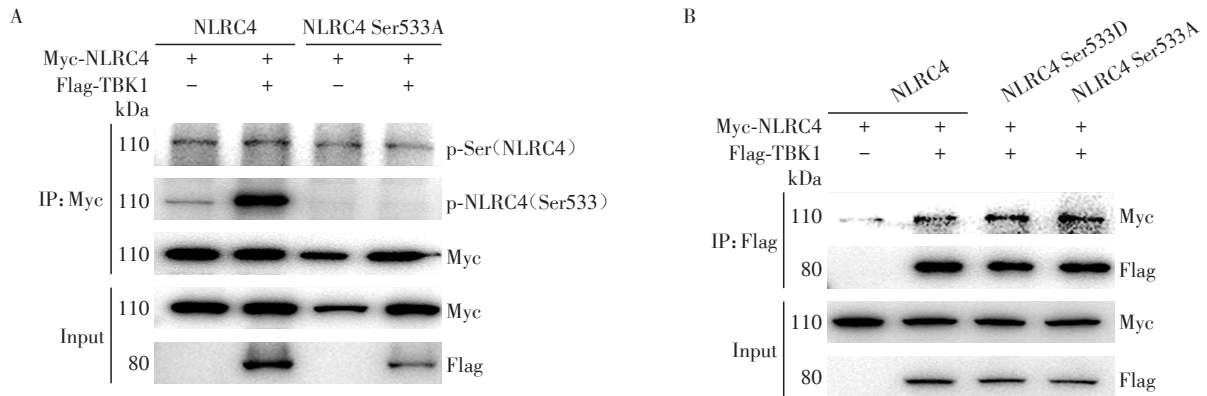
ELISA 结果显示, 与对照组相比, 实验组小鼠的血清及腹腔灌洗液中的 IL-1 β 和 TNF- α 含量减少(图 5A~D), 细菌负荷量也明显降低(图 5E、F), 差异有统计学意义。流式细胞术结果也同样显示实验组小鼠腹腔灌洗液中的中性粒细胞(CD11b⁺/Ly6G⁺) 比例下降(图 5G、H), 实验组小鼠的生存率显著提高(图 5I), 差异有统计学意义。以上结果说明抑制 TBK1 可以通过控制 NLRC4 炎症小体的过度活化, 稳定免疫微



A: S.T.(MOI: 10) was used to infect IBMDM for 2 h, and endogenous ASC specks were detected by immunofluorescence (arrow). Scale bar: 20 μ m. B: After infecting IBMDM with S.T.(MOI: 10) for 2 h, insoluble samples crosslinked with DSS were taken for protein immunoblotting to detect oligomerization. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ ($n=3$).

图3 抑制TBK1减弱NLRC4炎症小体的ASC寡聚化和斑点化

Figure 3 The inhibited TBK1 expression reduces ASC speck formation and oligomerization of NLRC4 inflammasome



A: The overexpression of Myc-NLRC4 or its mutant NLRC4 Ser533A and Flag-TBK1 in HEK293T cells was performed to immunoprecipitation and Western blot analysis. B: The overexpression of Myc-NLRC4 or its mutant NLRC4 Ser533A/Ser533D with Flag-TBK1 in HEK293T cells was performed for co-immunoprecipitation and Western blot analysis.

图4 TBK1磷酸化NLRC4 Ser533位点

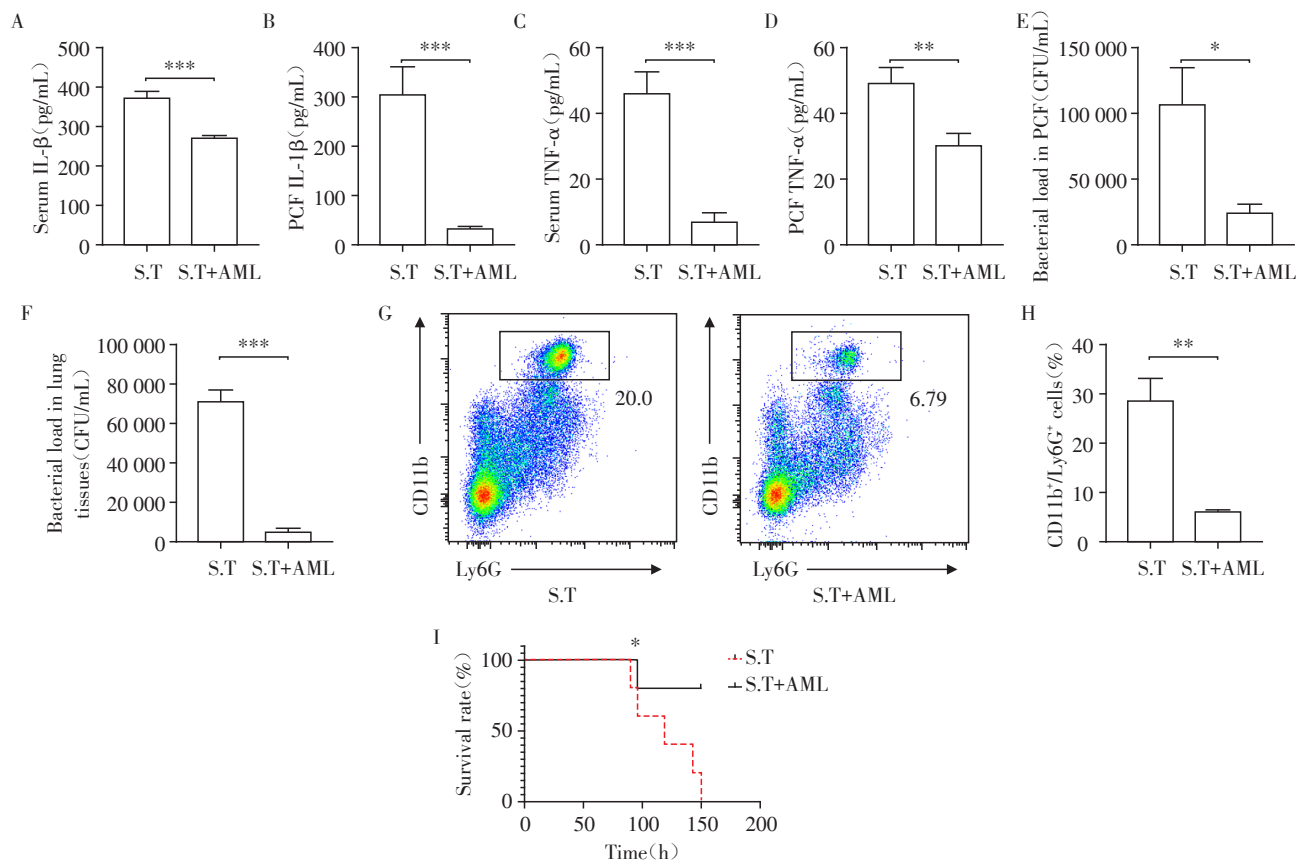
Figure 4 TBK1 phosphorylates NLRC4 Ser533

环境,提高小鼠防御S.T感染的能力。

3 讨论

NLRC4炎症小体在防御胞内菌感染过程中发挥了重要作用,当宿主细胞受到胞内菌(如S.T)感染时,S.T通过其T3SS分泌系统将毒力蛋白分泌到胞内,随后被胞内受体NAIP识别并结合,激活后的NAIP与NLRC4结合并解除其自身抑制结构,从而招募ASC等蛋白组装形成炎症小体。激活Caspase-1,促进IL-1 β 和IL-18的成熟,切割GSDMD,诱导细胞焦亡。然而,对于NLRC4炎症小体的具体调控机制仍然不清。

NLRC4炎症小体激活的调节机制是近来研究的热点。本研究发现TBK1与NLRC4相互作用,抑制TBK1的活性可以下调S.T诱导的NLRC4炎症小体活化。TBK1作为重要的炎症调节激酶参与多种炎症通路的调节^[9-10],本研究发现TBK1对NLRC4炎症小体的调节作用,为多种信号通路炎症小体通路的交叉调节提供了新线索。NLRC4 Ser533位磷酸化作为NLRC4炎症小体调节的重要环节,已发现蛋白激酶C- δ (protein kinase C- δ , PKC- δ)对其的磷酸化作用^[3],而本研究发现TBK1可以作为NLRC4的磷酸化酶对其活性进行调节,丰富了该位点调节的多样性,符合炎症调节网络化的特性。炎症小体的过度激



A-D: The IL-1 β (A, B) and TNF- α (C, D) in serum and peritoneal cavity-flushed fluid (PCF) of mice were detected by ELISA kit ($n=3$). E, F: The bacterial load in PCF (E) and lung tissues (F) was measured ($n=3$). G: The proportion of neutrophils (CD11b⁺/Ly6G⁺) in mouse PCF was detected by flow cytometry ($n=3$). H: The statistical chart of flow detection ($n=3$). I: The survival curve of mice ($n=5$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$.

图5 抑制TBK1可以增强小鼠抵抗S.T感染的能力

Figure 5 Inhibiting TBK1 enhances the ability of mice to resist S.T infection

活会导致炎症因子风暴, 最终引起脓毒症^[16-17]。在S.T感染小鼠模型中, 本研究发现TBK1抑制剂AML处理的小鼠腹腔灌洗液及肺脏中的细菌负荷量显著减少, 血清及腹腔灌洗液中的IL-1 β 和TNF- α 含量降低, 腹腔灌洗液的中性粒细胞比例也同样下降, 小鼠生存率显著提高, 其关键在于AML抑制了NLRC4炎症小体的过度激活, 稳定了免疫微环境。值得注意的是, 本研究虽然证明了TBK1和NLRC4存在相互作用, TBK1的活性是调节NLRC4炎症小体的关键, 但是并不能排除TBK1通过相互作用间接影响了PKC- δ 或其他磷酸化酶对NLRC4的533位丝氨酸磷酸化修饰的可能性, 并存在多种激酶共同影响NLRC4磷酸化的可能, 其具体机制还有待深入研究。

综上所述, 本研究发现TBK1通过与NLRC4相互作用, 磷酸化NLRC4 Ser533位点, 促进NLRC4炎症小体激活, 提出了TBK1精细调控NLRC4炎症小体抵御胞内细菌感染的新机制。

[参考文献]

- [1] YUK J M, SILWAL P, JO E K. Inflammasome and mitophagy connection in health and disease[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(13): 4714
- [2] SHARMA B R, KANNEGANTI T D. Inflammasome signaling in colorectal cancer[J]. Transl Res, 2023, 252: 45-52
- [3] DUNCAN J A, CANNA S W. The NLRC4 inflammasome[J]. Immunol Rev, 2018, 281(1): 115-123
- [4] BAUER R, RAUCH I. The NAIP/NLRC4 inflammasome in infection and pathology[J]. Mol Aspects Med, 2020, 76: 100863
- [5] WEN J X, XUAN B, LIU Y, et al. Updating the NLRC4 inflammasome: from bacterial infections to autoimmunity and cancer[J]. Front Immunol, 2021, 12: 702527
- [6] SUNDARAM B, KANNEGANTI T D. Advances in understanding activation and function of the NLRC4 inflammasome[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(3): 1048

(下转第614页)

- schizophrenia[J]. *Biol Psychiatry*, 2018, 83(9): 739–750
- [22] YOSHIMI N, FUTAMURA T, BERGEN S E, et al. Cerebrospinal fluid metabolomics identifies a key role of isocitrate dehydrogenase in bipolar disorder: evidence in support of mitochondrial dysfunction hypothesis[J]. *Mol Psychiatry*, 2016, 21(11): 1504–1510
- [23] TAKEHANA S, YOSHIDA H, OZAWA S, et al. The effects of pre-analysis sample handling on human plasma amino acid concentrations[J]. *Clin Chim Acta*, 2016, 455: 68–74
- [24] MARTIN D, SWARTZWELDER H S. Ethanol inhibits release of excitatory amino acids from slices of hippocampal area CA1[J]. *Eur J Pharmacol*, 1992, 219(3): 469–472
- [25] SÁNCHEZ-LÓPEZ E, MARCOS A, AMBROSIO E, et al. Investigation on the combined effect of cocaine and ethanol administration through a liquid chromatography - mass spectrometry metabolomics approach[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 140: 313–321
- [26] ZHAO Z H, WANG Z X, ZHOU D, et al. Sodium butyrate supplementation inhibits hepatic steatosis by stimulating liver kinase B1 and insulin-induced gene [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2021, 12(3): 857–871
- [27] LIU J D, BAYIR H O, COSBY D E, et al. Evaluation of encapsulated sodium butyrate on growth performance, energy digestibility, gut development, and Salmonella colonization in broilers [J]. *Poult Sci*, 2017, 96(10): 3638–3644
- [28] 梁胜男, 柯楚新, 黄鹤, 等. 肠道内产丁酸细菌及其产物丁酸生理功能的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(3): 948–959
- [收稿日期] 2023-11-10
(本文编辑: 戴王娟)

(上接第 603 页)

- [7] ZHOU R Y, ZHANG Q, XU P L. TBK1, a central kinase in innate immune sensing of nucleic acids and beyond [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2020, 52(7): 757–767
- [8] YUM S, LI M H, FANG Y, et al. TBK1 recruitment to STING activates both IRF3 and NF- κ B that mediate immune defense against tumors and viral infections [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(14): e2100225118
- [9] FISCHER F A, MIESL F M, NIZAMI S, et al. TBK1 and IKK ϵ act like an off switch to limit NLRP3 inflammasome pathway activation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(38): e2009309118
- [10] SPARRER K M J, GABLESKE S, ZURENSKI M A, et al. TRIM23 mediates virus-induced autophagy via activation of TBK1 [J]. *Nat Microbiol*, 2017, 2(11): 1543–1557
- [11] GHOSH M, SAHA S, BETTKE J, et al. Mutant p53 suppresses innate immune signaling to promote tumorigenesis [J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(4): 494–508
- [12] REVACH O Y, LIU S M, JENKINS R W. Targeting TANK-binding kinase 1 (TBK1) in cancer [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2020, 24(11): 1065–1078
- [13] LI T, YUM S, LI M H, et al. TBK1 recruitment to STING mediates autoinflammatory arthritis caused by defective DNA clearance [J]. *J Exp Med*, 2022, 219(1): e20211539
- [14] XIANG S, SONG S K, TANG H T, et al. TANK-binding kinase 1 (TBK1): an emerging therapeutic target for drug discovery [J]. *Drug Discov Today*, 2021, 26(10): 2445–2455
- [15] 宋宁, 陈相健, 王子盾, 等. NLRP3 炎症小体参与 HSV-1 诱导病毒性心肌炎的实验研究 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2014, 34(6): 699–704
- [16] WU R L, WANG N, COMISH P B, et al. Inflammasome-dependent coagulation activation in sepsis [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 641750
- [17] DANIELSKI L G, GIUSTINA A D, BONFANTE S, et al. The NLRP3 inflammasome and its role in sepsis development [J]. *Inflammation*, 2020, 43(1): 24–31
- [收稿日期] 2023-11-22
(本文编辑: 陈汐敏)