



齐佳欣,钟秋,刘芮伶,等. 猪源 CXCL17 的原核表达及其对猪巨噬细胞的趋化作用[J]. 南京农业大学学报,2024,47(5):932-940.

QI Jiaxin,ZHONG Qiu,LIU Ruiling,et al. Prokaryotic expression of porcine CXCL17 and its chemotactic effect on porcine macrophages[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2024,47(5):932-940.

猪源 CXCL17 的原核表达及其对猪巨噬细胞的趋化作用

齐佳欣,钟秋,刘芮伶,郑健,李昱辰*,杨倩

(南京农业大学动物医学院,江苏 南京 210095)

摘要:[目的]本研究旨在探究 CXC 趋化因子配体 17(CXC motif chemokine ligand 17,CXCL17)对巨噬细胞的趋化作用并解析其分子机制。[方法]构建表达猪 CXCL17 蛋白的重组菌,该菌经 IPTG 诱导后高效表达 CXCL17 蛋白,并主要以包涵体形式存在;包涵体经过变性、纯化和复性获得重组蛋白,利用 SDS-PAGE 和 Western blot 对纯化的 CXCL17 蛋白进行验证。通过 CCK-8 法筛选 CXCL17 蛋白对猪巨噬细胞的最佳作用浓度范围,并以此设置浓度梯度处理猪巨噬细胞,用 Transwell 试验检测 CXCL17 对巨噬细胞的趋化活性。通过免疫荧光和 Western blot 检测细胞微丝骨架的变化及相关通路的激活情况,以揭示 CXCL17 趋化巨噬细胞迁移的作用机制。[结果]重组菌在 IPTG 终浓度为 $1.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 诱导条件下表达 7 h,获得高表达量的重组猪 CXCL17 蛋白。该蛋白纯化后的纯度可高达 95%。重组猪 CXCL17 蛋白可以剂量依赖诱导猪巨噬细胞迁移,其机制为通过激活微丝骨架下游的 LIMK/Cofilin 信号通路引起细胞微丝骨架重排,促进细胞微丝骨架解聚、聚合,从而有利于巨噬细胞迁移。[结论]本研究重组表达了猪 CXCL17 蛋白,并发现 CXCL17 蛋白调控细胞微丝骨架诱导猪巨噬细胞迁移的分子机制,为 CXCL17 作为黏膜免疫增强剂提供了试验依据。

关键词:CXC 趋化因子配体 17;原核表达;巨噬细胞;迁移;黏膜免疫

中图分类号:S852.4

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)05-0932-09

Prokaryotic expression of porcine CXCL17 and its chemotactic effect on porcine macrophages

QI Jiaxin,ZHONG Qiu,LIU Ruiling,ZHENG Jian,LI Yuchen*,YANG Qian

(College of Veterinary Medicine,Nanjing Agricultural University,Nanjing 210095,China)

Abstract:[Objectives]The aim of this study was to examine the chemokine impact of CXC motif chemokine ligand 17(CXCL17) on macrophages and to elucidate its molecular mechanism. [Methods]The methods involved constructing a recombinant bacterium expressing porcine CXCL17 protein,inducing its expression with IPTG to efficiently produce CXCL17 protein primarily in the form of inclusion bodies. The recombinant protein was obtained through denaturation,purification,and renaturation of inclusion bodies,with the purified CXCL17 protein confirmed by SDS-PAGE and Western blot analysis. The study utilized the CCK-8 method to identify the optimal concentration range of CXCL17 protein for porcine macrophages,employing a concentration gradient in the treatment process. The chemotactic activity of CXCL17 on macrophages was assessed through the Transwell test. The alterations in the microfilament skeleton and activation of associated pathways were examined using immunofluorescence and Western blot techniques to elucidate the mechanism underlying CXCL17-induced macrophage migration. [Results]High expression of recombinant porcine CXCL17 protein was achieved with a final concentration of $1.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 7 h. The purity of the protein after purification reached as high as 95%. Furthermore,the recombinant porcine CXCL17 protein had been shown to induce the migration of porcine macrophages in a dose-dependent manner. This effect was primarily mediated by inducing rearrangement of the microfilament skeleton through activation of the LIMK/Cofilin signaling pathway downstream,thereby promoting depolymerization and polymerization of the microfilament skeleton and facilitating macrophage migration. [Conclusions] This study successfully demonstrated recombinant expression of porcine CXCL17 protein and elucidated its molecular mechanism in regulating cell microfilament skeleton to induce porcine macrophage migration. These findings provide an experimental basis for considering CXCL17 as a potential mucosal immune enhancer.

Keywords:CXC motif chemokine ligand 17;prokaryotic expression;macrophage;migration;mucosal immunity

收稿日期:2023-09-22

基金项目:江苏省自然科学基金青年基金项目(BK20240198,BK20200536)

*通信作者:李昱辰,博士,副教授,研究方向为动物黏膜免疫,E-mail:yuchenli2022@njau.edu.cn。

趋化因子是一类由细胞分泌的小分子蛋白质^[1],由 60~120 个氨基酸组成,它具有引导免疫细胞定向迁移的功能^[2]。在黏膜免疫中,趋化因子发挥着至关重要的作用^[3]。黏膜上皮细胞受到病原体入侵时,上皮细胞会分泌大量的趋化因子和细胞因子招募免疫细胞至炎症部位,从而产生免疫应答^[4]。目前研究最多的黏膜趋化因子主要有 CCL25 和 CCL28^[5]。在人和小鼠中,CCL25 在胸腺和肠上皮细胞中组成型表达,其与特定的受体 CCR9 结合后对 CCR9⁺免疫细胞具有趋化作用^[6]。而 CCL28 则主要在乳腺和唾液腺的柱状上皮细胞中表达,它可以促进表达 CCR10 和 CCR3 的 T 细胞、B 细胞和嗜酸性粒细胞的向黏膜趋化及归巢^[7]。最新发现的一种黏膜趋化因子 CXCL17,尽管报道较少,但已经得到了广泛关注。CXCL17 (C-X-C motif chemokine ligand 17)属于 CXC 家族,它的前体蛋白由 119 个氨基酸编码,其中含有 21 个氨基酸的切割片段,通过酶切割形成成熟的蛋白^[8]。CXCL17 主要在黏膜处表达,尤其是在呼吸道黏膜组织中具有很高的表达水平^[9]。在以往的研究报道中,人们发现 CXCL17 与巨噬细胞有一定的联系。如当人感染甲型 H1N1 流感病毒或 SARS-CoV-2 病毒后,肺部中的 CXCL17 表达量上调,而且会出现由巨噬细胞和多形核细胞组成的炎症浸润。进一步研究发现仅在巨噬细胞处检测到大量的 CXCL17^[10]。另有研究报道,WT 小鼠腹腔注射重组 CXCL17 蛋白可以显著增加其腹腔中的巨噬细胞和树突状细胞数量^[11],以上均提示 CXCL17 与巨噬细胞的募集密切相关。

目前,对于趋化因子 CXCL17 的研究主要集中在人和鼠方面,对猪的研究较少。因此,本试验将表达猪源重组 CXCL17 蛋白,并研究其对猪巨噬细胞的趋化作用及其涉及的分子机制,为 CXCL17 作为黏膜免疫增强剂提供了试验依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

基因组快速抽提试剂盒(DC103-01)、产物纯化试剂盒(DC301-01)、质粒小提试剂盒(DC201-01)、大肠杆菌 DH5 α 和大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞购自南京诺唯赞生物科技有限公司;EcoR I 和 Not I 限制性内切酶购自 TaKaRa 公司;T₄ DNA 连接酶购自 Thermo Fisher Scientific 公司;异丙基硫化- β -半乳糖苷(IPTG)、结晶紫购自南京寿德生物科技有限公司;兔 CXCL17 抗体(Ag12516)购自武汉三鹰生物技术有限公司;CCK-8 试剂盒、鼠 Trx 抗体、HRP-山羊抗鼠 IgG、HRP-山羊抗兔 IgG、HRP-GAPDH 抗体、肠激酶(20401ES60)和内毒素去除试剂盒(60404ES03)购自上海翌圣生物有限公司;RPMI 1640、胎牛血清培养基购自 Gibco 公司;兔 LIMK1 抗体(3842S)、兔 p-LIMK1/LIMK2 抗体(3841S)、兔 Cofilin 抗体(3318)和兔 p-Cofilin 抗体(3311)购自 Cell Signaling Technology 公司;鬼笔环肽(Phalloidin)和考马斯亮蓝快速染色液购自上海碧云天生物技术有限公司;显色试剂盒(ED0015-C)购自山东思科捷生物技术有限公司;细胞松弛素 D(cytochalasins D, Cyto D)购自 MedChemExpress 公司;蛋白分子质量标准购自金斯瑞生物科技股份有限公司;原核表达载体 pET32a 由本课题组保存。

1.2 引物设计与合成

根据 GenBank 中猪 CXCL17 基因的编码区序列(GenBank ID: KU978907.1),使用 Primer Premier 5.0 在线软件设计特异性引物扩增 CXCL17 基因,PCR 扩增目的片段大小为 326 bp。引物对序列如下:F:5'-GGATCCGAATTCATGAGCCCAATACA-3', R:5'-TCGAGTGC GGCCGCTATAAAGGCAGAGAA-3',下划线分别为 EcoR I 和 Not I 酶切位点。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 重组表达载体的构建

采用 TRIzol 法从猪肺组织中提取总 mRNA,并用反转录试剂盒合成 cDNA。通过 RT-PCR 方法从 cDNA 中扩增猪 CXCL17 基因序列。PCR 反应体系(50 μ L):2 \times Phanta Max Master Mix 25 μ L,上、下游引物(10 μ mol \cdot L⁻¹)各 2 μ L,cDNA(200 ng \cdot μ L⁻¹)5 μ L,ddH₂O 16 μ L。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火 15 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 扩增产物经 10 g \cdot L⁻¹琼脂糖凝胶电泳鉴定并回收,通过 EcoR I 和 Not I 两个位点酶切,利用 T₄ DNA 连接酶将目的基因序列与 pET-32a 载体连接,将连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞,再接种到含有氨苄抗性的 LB 平板上。挑取单菌落至有氨苄抗性 LB 培养基中培养,将阳性克隆菌液送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列鉴定。

1.4 蛋白诱导表达及条件优化

将测序正确的原核表达质粒 pET32a-sus-CXCL17 和 pET32a 空质粒分别转化至 BL21 感受态,接种至

氨苄抗性的 LB 固体培养基筛选阳性菌株,37 °C 培养过夜。挑取单克隆菌落于试管中,37 °C、200 r·min⁻¹ 振荡过夜培养,随后以 1:100 比例接种至 LB 液体培养基中,振荡培养约 4 h(菌液 D_{600} 值为 0.72),分别用终浓度为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mmol·L⁻¹ 的 IPTG 进行诱导,诱导结束后收集菌体,用 PBS 清洗菌体 3 次,超声破碎后收集上清液,利用 SDS-PAGE 鉴定上清液中的蛋白表达情况,确定最适诱导终浓度。分别收集最适 IPTG 终浓度下诱导 0、2、3、4、5、6 和 7 h 后的菌体,超声破碎后收集上清液,利用 SDS-PAGE 鉴定上清液中蛋白表达情况,优化 CXCL17 蛋白表达所需的时间。同时用未诱导菌液作对照,比较 16、25 与 37 °C 条件下诱导时蛋白在超声破碎后上清液和沉淀中的表达情况。各条件下的样品经 SDS-PAGE 分离及考马斯亮蓝染色后进行分析。

1.5 重组蛋白的分离纯化

收集的菌体用缓冲液 W1(20 mmol·L⁻¹ Tris, pH8.0)重悬,随后用超声波破碎仪破碎,低温高速离心后收集包涵体。为确保包涵体的纯净度,用包涵体洗涤液 W2(50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl、1 mmol·L⁻¹ EDTA、50 mmol·L⁻¹ NaCl、0.5% TritonX-100, pH8.0)清洗包涵体,离心(4 °C、12 000 r·min⁻¹、10 min)后收集沉淀。用 8 mmol·L⁻¹ 尿素溶解包涵体沉淀并搅拌加速溶解,离心(4 °C、12 000 r·min⁻¹、10 min)后收集沉淀,获得粗蛋白。Ni-NTA 树脂用 TBS 缓冲液(150 mmol·L⁻¹ NaCl、20 mmol·L⁻¹ Tris, pH8.0)预平衡,将上清液加至 Ni-NTA 亲和层析柱中结合,使用 10 倍柱体积的咪唑缓冲液浓度梯度(20、80、260、500 mmol·L⁻¹)洗脱蛋白并收集洗脱液。纯化后的蛋白用十二烷基肌氨酸钠(终浓度为 2 g·L⁻¹)复性,使用肠激酶 25 °C 过夜酶切去除 Trx 标签,通过镍柱结合 CXCL17 蛋白过滤杂蛋白。最后,使用内毒素去除试剂盒(60404ES03, 翌圣)去除内毒素。用 TBS 平衡琼脂糖树脂后以 0.25 mL·min⁻¹ 的速度将纯化的蛋白加载到树脂上。收集洗脱液后进行浓缩,用 BCA 法测定蛋白浓度后用于巨噬细胞免疫试验。

1.6 Western blot 检测重组蛋白

纯化后的蛋白样品通过 SDS-PAGE 分离,再将产物转移至 PVDF 膜上,用 50 g·L⁻¹ 脱脂奶粉 37 °C 封闭 1 h,再用兔 CXCL17 抗体(1:500)和鼠 Trx 抗体(1:1 000)4 °C 过夜孵育。用含 0.05% Tween-20 的 TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 5 min,再分别用 HRP-山羊抗兔 IgG 抗体(1:5 000)、HRP-山羊抗鼠 IgG 抗体(1:5 000)作为二抗 37 °C 孵育 1 h,用 TBST 洗膜 3 次后使用显色试剂盒进行检测。

1.7 CCK-8 法检测细胞毒性

采用 CCK-8 法测定 CXCL17 和 Cyto D 对巨噬细胞的毒性作用。用含 2% 胎牛血清的培养基在 96 孔板上的 5 个重复孔中培养 10⁴ 个细胞,使用不同浓度(20、100 和 500 ng·mL⁻¹) CXCL17 预处理巨噬细胞 24 h,或使用不同浓度(10⁻²、10⁻¹、1、10、20 和 50 nmol·L⁻¹) Cyto D 处理巨噬细胞 2 h,按照 CCK-8 试剂盒说明书检测猪源 CXCL17 或 Cyto D 对巨噬细胞活力的影响。

1.8 趋化因子 CXCL17 对巨噬细胞的趋化作用

根据 CCK-8 法测定猪源 CXCL17 蛋白对巨噬细胞的安全浓度范围,设置不同浓度梯度处理巨噬细胞。将 5×10⁵ mL⁻¹ 细胞 200 μL(细胞混液,含 2% 血清)接种于 5 μm 小室的上室,下室加入 600 μL 1640 培养基(含 10% 血清),把重组猪 CXCL17 蛋白加至下室,37 °C 共培养 24 h。PBS 清洗 1 次后用 4% 多聚甲醛将小室固定 30 min, PBS 清洗 2 次,用 10 g·L⁻¹ 结晶紫染色 15 min, PBS 清洗 3 次,用手术刀轻轻地将小室划开并用镊子取下,将小室贴在载玻片上,显微镜下观察并计数。

1.9 趋化因子 CXCL17 对巨噬细胞微丝骨架的影响

根据 CCK-8 法测定出的 Cyto D 对巨噬细胞的安全浓度范围,选择 10 μmol·L⁻¹ 的 Cyto D 或 DMSO 预处理巨噬细胞 1 h,再使用猪源 CXCL17 蛋白(100 ng·mL⁻¹)处理巨噬细胞 1 h,用 1:200 稀释的鬼笔环肽染色,共聚焦显微镜下检测巨噬细胞微丝骨架的变化情况。

1.10 数据的统计学分析

通过 Image J 软件对 Western blot 条带进行灰度值分析,得到的灰度值数据使用 GraphPad Prism 9.0 制作柱状图,并进行方差分析和差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 猪源 CXCL17 基因扩增及原核表达质粒构建

以猪肺组织来源的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增后获得目的基因序列,用 10 g·L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳鉴

定。结果显示:在 300~400 bp 处有明显单一扩增条带,符合预期目的片段长度 326 bp(图 1-B)。将目的片段转接 pET32a 载体,得到 pET32a-sus-CXCL17 质粒,大小为 6 163 bp(图 1-A)。对质粒进行酶切验证,结果显示载体片段及目的基因片段相符合(图 1-C),且测序结果与猪源 CXCL17 基因序列一致,表明原核表达质粒构建成功。

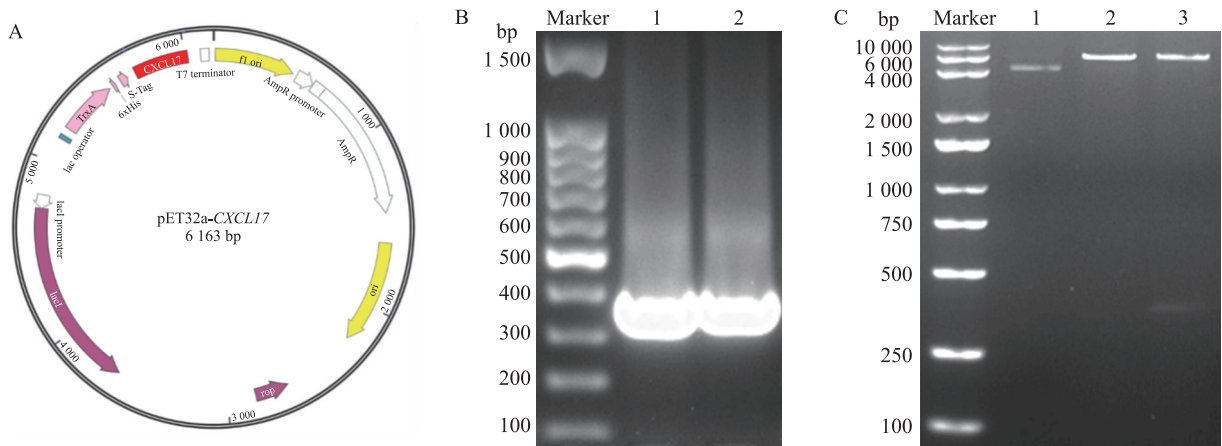


图 1 原核表达载体 pET32a-sus-CXCL17 的构建

Fig. 1 Construction of the prokaryotic expression vector pET-32a-sus-CXCL17 plasmid

A. 原核表达载体 pET32a-sus-CXCL17 质粒图谱;B. RT-PCR 产物的电泳分析(1 和 2 均为 CXCL17);C. pET32a-sus-CXCL17 质粒的酶切验证(1.空质粒对照;2.pET32a-sus-CXCL17 的 EcoR I 单酶切产物;3.pET32a-sus-CXCL17 的 Not I 和 EcoR I 双酶切产物)。

A. Map of the prokaryotic expression vector pET32a-sus-CXCL17 plasmid;B. Analysis of RT-PCR products by electrophoresis(both Lanes 1 and 2 are CXCL17);C. Verification of enzymatic digestion of the pET32a-sus-CXCL17 plasmid(1. Empty plasmid control;2. pET32a-sus-CXCL17 EcoR I digestion;3. Double enzyme cleavage product of pET32a-sus-CXCL17 Not I and EcoR I).

2.2 重组猪源 CXCL17 蛋白诱导表达

将重组 pET32a-sus-CXCL17 质粒转化 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞,挑取阳性单克隆菌落,加入 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 于 $16 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜诱导表达,同时使用未诱导菌液及空载体诱导菌液作为对照。超声波破碎后进行 SDS-PAGE 分析。结果显示,pET32a-sus-CXCL17 在相对分子质量 35×10^3 附近有 1 条十分明显的条带,与预期大小一致,在该诱导条件下重组蛋白主要以包涵体形式存在(图 2)。

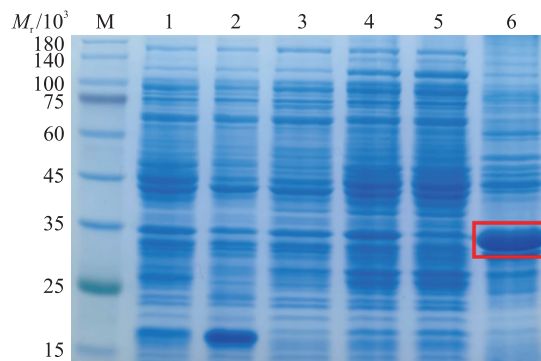


图 2 重组猪源 CXCL17 的诱导表达

Fig. 2 Recombinant porcine CXCL17 induced expression

M. 蛋白分子质量标准;1.空载体未诱导;2.空载体诱导;3.全菌未诱导;4.全菌诱导;5.pET32a-sus-CXCL17 诱导后上清液;6.pET32a-sus-CXCL17 诱导后沉淀(方框标示条带为可能要表达的目的蛋白)。

M. Protein marker;1. The empty vector, not induced;2. Empty vector, induced;3. Whole bacteria, not induced;4. Whole bacteria, induced;5. The supernatant of pET32a-sus-CXCL17 after induction;6. Precipitation after induction(The box marking strip may indicate the target protein to be expressed).

2.3 重组猪源 CXCL17 蛋白诱导表达条件的优化

对含有重组质粒 pET32a-sus-CXCL17 的大肠杆菌在不同条件下诱导表达,以确定蛋白表达的最佳诱导条件。首先,保持温度和诱导时间不变,使用不同浓度的 IPTG 诱导蛋白表达的结果显示,在 IPTG 浓度为 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时蛋白表达量最高(图 3-A)。随后对蛋白诱导的时间条件进行优化的结果显示,在诱导

7 h 时蛋白的表达量最高(图 3-B)。最后,对蛋白诱导温度条件进行优化的结果显示,在 37 °C 诱导时,猪重组 CXCL17 蛋白在包涵体中的表达量最高(图 4)。综上,在 1.0 mmol·L⁻¹ IPTG、37 °C 和诱导 7 h 条件下,重组猪源 CXCL17 表达量最高,且 CXCL17 蛋白主要以包涵体形式表达。以上述条件作用于后续试验。

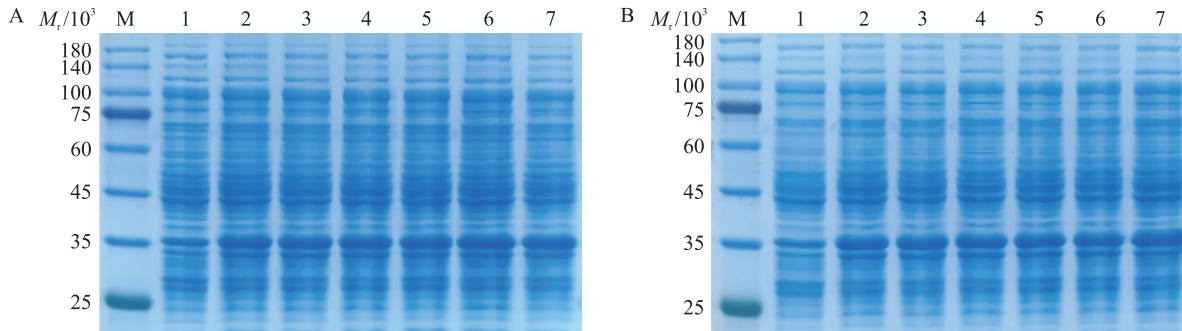


图 3 猪源 CXCL17 蛋白诱导表达的 IPTG 浓度(A)和时间(B)条件优化

Fig. 3 Optional induction concentration of IPTG(A) and time(B) for recombinant porcine CXCL17 protein

A. IPTG 诱导浓度的优化(M. 蛋白分子质量标准;1~7. IPTG 浓度依次为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 和 1.2 mmol·L⁻¹); B. IPTG 诱导时间的优化(M. 蛋白分子质量标准;1~7. 诱导时间依次为 0、2、3、4、5、6 和 7 h)。

A. IPTG optional induction concentration of IPTG (M. Protein marker; 1-7. IPTG concentrations were 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, and 1.2 mmol·L⁻¹); B. IPTG optional induction time (M. Protein marker; 1-7. The induction time is 0, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 h, respectively).

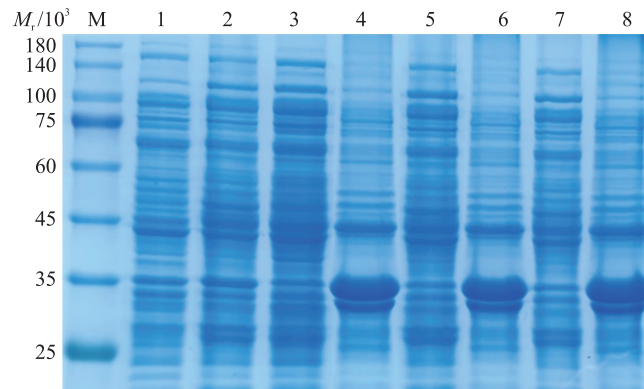


图 4 猪源 CXCL17 蛋白诱导表达温度优化

Fig. 4 Optional induction temperature for recombinant porcine CXCL17 protein

M. 蛋白分子质量标准;1. 未诱导全菌;2. 诱导全菌;3. 16 °C 诱导,上清液;4. 16 °C 诱导,沉淀;5. 25 °C 诱导,上清液;6. 25 °C 诱导,沉淀;7. 37 °C 诱导,上清液;8. 37 °C 诱导,沉淀。

M. Protein Marker; 1. Not induced whole cell; 2. Induced whole cell; 3. Supernatant after induction at 16 °C; 4. Precipitation after induction at 16 °C; 5. Supernatant after induction at 25 °C; 6. Precipitation after induction at 25 °C; 7. Supernatant after induction at 37 °C; 8. Precipitation after induction at 37 °C.

2.4 重组蛋白 CXCL17 表达形式的鉴定及纯化

将包涵体溶解于 8 mmol·L⁻¹ 尿素溶解液中以破坏其蛋白质结构中的氢键,以提高蛋白质可溶性。随后通过镍柱纯化蛋白,再用十二烷基肌氨酸钠(终含量为 2 g·L⁻¹)复性蛋白,最后通过 SDS-PAGE 和 Western blot 试验对纯化蛋白进行检测。结果表明,所获得的猪源 CXCL17 蛋白的纯度达到 95% 以上(图 5-A)。经 Western blot 验证该蛋白是猪 CXCL17 重组蛋白,且纯化效率高(图 5-B)。肠激酶切除 Trx 标签蛋白后可以得到猪 CXCL17 蛋白,相对分子质量约为 11×10³(图 5-C)。

2.5 重组蛋白 CXCL17 对猪肺泡巨噬细胞的趋化作用

根据猪源 CXCL17 的最佳使用浓度(10~500 ng·mL⁻¹),设置浓度梯度并处理巨噬细胞(图 6-A)。为探究趋化因子 CXCL17 对巨噬细胞迁移的影响,在小室上室接种巨噬细胞,在小室下室添加重组猪源 CXCL17 蛋白(20、100 和 500 ng·mL⁻¹)并作用 24 h,结晶紫染色后在光镜下观察巨噬细胞的迁移情况。结果显示: CXCL17 能够有效诱导巨噬细胞迁移,并具有明显的剂量依赖性($P < 0.05$);而空白组中仅观察到

少量巨噬细胞发生迁移(图 6-B 和 C)。这表明 CXCL17 能够有效诱导巨噬细胞发生细胞迁移。

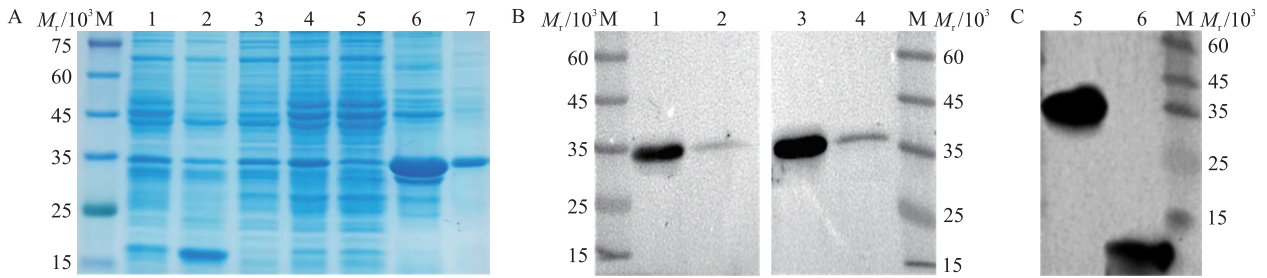


图 5 猪源 CXCL17 蛋白的纯化及鉴定

Fig. 5 Purification of CXCL17 recombinant protein

A. 重组 Trx-CXCL17 蛋白的纯化鉴定(M. 蛋白分子量标准;1. 空载体未诱导;2. 空载体诱导;3. 全菌未诱导;4. 全菌诱导;5. 诱导后上清液;6. 诱导后沉淀;7. 纯化后样品);B. 为浓缩后蛋白样品的 Trx 标签单抗(左)和 CXCL17 单抗(右)的 Western blot 鉴定(M. 蛋白分子量标准;1 和 3. 未纯化 Trx-CXCL17 蛋白;2 和 4. 已纯化 Trx-CXCL17 蛋白);C. 肠激酶切除 Trx 标签后用 CXCL17 单抗的 Western blot 鉴定(M. 蛋白质分子量标准;5. 纯化 Trx-CXCL17 蛋白;6. 切除 Trx 标签的 CXCL17 蛋白)。

A. Purification and identification of recombinant Trx-CXCL17 protein (M. Protein molecular weight standard;1. Empty carrier not induced; 2. Empty carrier induction;3. Whole bacteria not induced;4. Whole bacteria induction;5. Supernatant after induction;6. Precipitation after induction; 7. Purified sample); B. Western blot identification of TRX-labeled monoclonal antibodies (left) and CXCL17 monoclonal antibodies (right) of concentrated protein samples, respectively(M. Protein molecular quality standards;1 and 3. Unpurified Trx-CXCL17 protein;2 and 4. Purified Trx-CXCL17 protein);C. Western blot identification of CXCL17 monoclonal antibody after removal of Trx tags by enterokinase(M. Protein molecular quality standard;5. Purification of Trx-CXCL17 protein;6. Remove the CXCL17 protein of the Trx label).

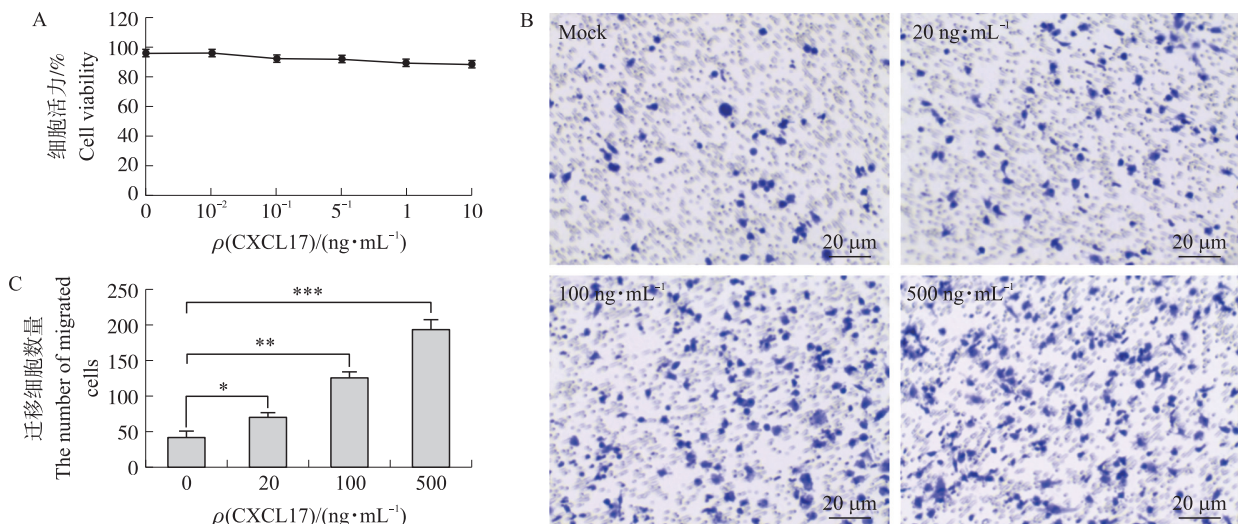


图 6 CXCL17 对巨噬细胞迁移能力的影响

Fig. 6 The effect of CXCL17 on macrophage migration ability

A. 用 CCK-8 方法检测不同浓度的猪源 CXCL17 处理 24 h 后的巨噬细胞活性;B. 以 CXCL17 的最佳使用浓度梯度作用于巨噬细胞 24 h 后,光学显微镜下观察巨噬细胞的迁移;C. 细胞计数显示巨噬细胞迁移的数量。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。下同。

A. Detecting the activity of macrophages by the CCK-8 assay after treating macrophages with varying concentrations of porcine CXCL17 for 24 h;B. Setting up a concentration gradient based on the screening of the optimal concentration of CXCL17 for use in (A), then observing macrophage migration under a light microscope 24 h after using pig-derived CXCL17 to interact with macrophages;C. Cell counting reveals the number of macrophage migration. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. The same below.

2.6 趋化因子 CXCL17 对巨噬细胞微丝骨架的影响

为了进一步探究猪源 CXCL17 调节巨噬细胞微丝骨架的作用机制,用免疫荧光法检测巨噬细胞微丝骨架变化。根据 CCK-8 试验测定出的猪源 Cyto D 的安全范围(图 7-A),用 Cyto D 预处理巨噬细胞,再使用猪源 CXCL17($100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)作用巨噬细胞 1 h 并收集细胞,经鬼笔环肽染色后,在共聚焦显微镜下观察巨噬细胞微丝骨架的变化情况。结果显示: CXCL17 能诱导巨噬细胞微丝骨架发生明显改变,表现为巨噬细胞的肌动蛋白向细胞膜的一侧聚集并形成突起。然而,使用 Cyto D 预处理巨噬细胞能够显著抑制 CXCL17 诱导的巨噬细胞微丝骨架变化(图 7-B)。

为了进一步探究趋化因子 CXCL17 调节巨噬细胞微丝骨架的作用机制,用 Western blot 试验检测细胞微丝骨架的变化及通路中的关键蛋白 Cofilin 和 LIMK 的表达水平。结果显示,猪源 CXCL17 处理巨噬细胞 1 h 后,CXCL17 蛋白能显著上调 LIMK 和 Cofilin 蛋白的磷酸化水平 ($P < 0.05$),表明 CXCL17 可以激活 LIMK/Cofilin 信号通路诱导巨噬细胞微丝骨架改变,从而诱导巨噬细胞迁移(图 8)。

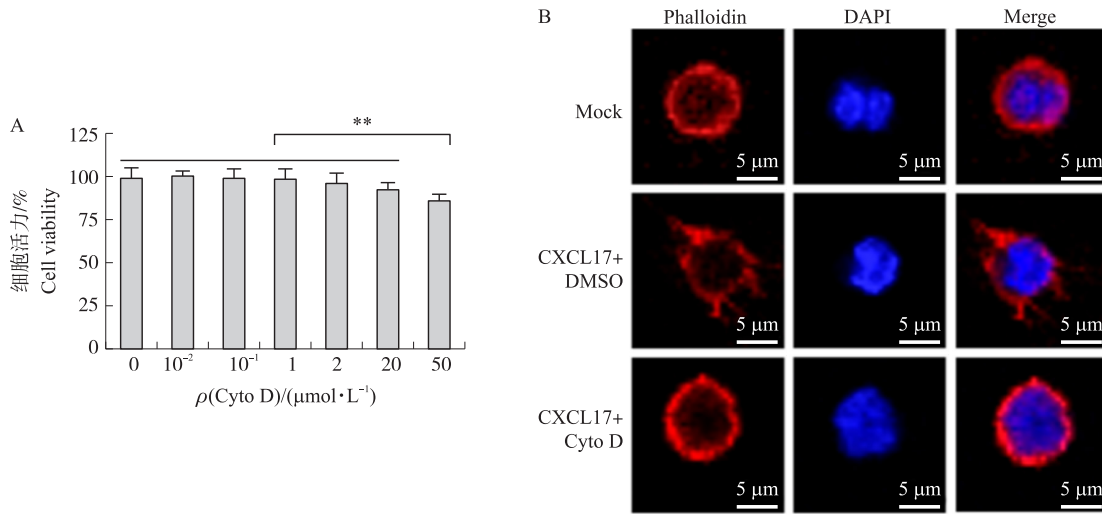


图 7 CXCL17 对细胞微丝骨架的影响

Fig. 7 The effect of CXCL17 on cellular microfilament cytoskeleton

A. 不同浓度 Cyto D 处理 1 h 后巨噬细胞的活性;B. Cyto D 最佳使用浓度 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 预处理巨噬细胞 1 h 后再用 CXCL17 处理巨噬细胞 1 h,共聚焦显微镜下观察巨噬细胞微丝骨架的变化情况。

A. After treating macrophages with different concentrations of Cyto D for 1 h, the activity of macrophages; B. After screening the optimal concentration ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) of Cyto D for pre-treatment macrophages 1 h, and then treat macrophages with porcine-derived CXCL17 for 1 h, and observe the changes in the microfilament cytoskeleton of macrophages using confocal microscopy.

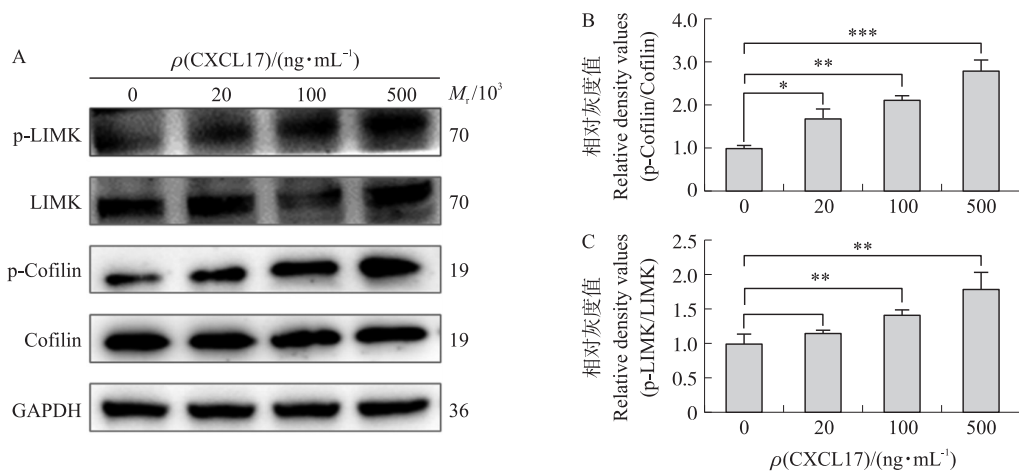


图 8 CXCL17 对巨噬细胞中微丝骨架调控信号途径相关蛋白表达的影响

Fig. 8 The effect of CXCL17 on the regulation signal pathways of microfilament cytoskeleton in macrophages

A. 微丝骨架调控信号途径中关键蛋白 p-LIMK、LIMK、p-Cofilin 和 Cofilin 的表达水平;B. Cofilin 和 p-Cofilin 的灰度值统计;C. LIMK 和 p-LIMK 的灰度值统计。

A. The expression levels of key proteins p-LIMK, LIMK, p-Cofilin and Cofilin in the microfilament skeleton regulate signaling pathways; B. Grayscale value statistics of Cofilin and p-Cofilin; C. Statistics of grayscale values of LIMK and p-LIMK.

3 讨论

黏膜免疫是机体免疫系统的重要组成部分,它与其他免疫系统协同作用,有效防御病原微生物的入侵^[12-13]。在控制及清除病原体感染的过程中,黏膜免疫系统发挥着关键作用,它通过精准招募特定的免疫细胞,识别和应对各种入侵的微生物。在这一复杂而精细的调控机制中,趋化因子作为关键的“信使”分子,发挥着不可或缺的作用。作为一类能调节免疫细胞在黏膜组织中迁移和定位的细胞因子,趋化因子

在黏膜组织中高表达^[14-16]。目前,有多种经典黏膜趋化因子如 CCL25、CCL28 和 CXCL14 等已经广为熟知,它们通过与免疫细胞表面的受体结合,能够激活细胞内信号通路,具有调控免疫细胞迁移、增殖和分化等功能^[17]。作为趋化因子 CXCL 家族的新成员,CXCL17 已被发现在气管、支气管和肺等呼吸系统组织黏膜中高表达^[9]。然而,目前关于该趋化因子的研究主要聚焦于其在肿瘤发生和发展中的作用^[18-19],关于 CXCL17 对黏膜免疫的影响研究还相对缺乏。因此,本研究在制备重组猪源 CXCL17 蛋白的基础上进一步探究了其对猪黏膜免疫细胞的调控作用。

巨噬细胞是黏膜中重要的免疫细胞,具有吞噬、呈递抗原和分泌炎症介质的能力^[20-21]。大部分巨噬细胞集中于固有层,仅有极少数巨噬细胞在上皮细胞间进行持续巡逻活动^[22]。当黏膜组织受到病原体入侵时,上皮细胞会分泌一系列的趋化因子,以形成一个独特的趋化梯度浓度,诱导巨噬细胞沿着梯度浓度向病原体所在的组织或细胞迁移^[23-25]。已有研究表明 CCL2^[26]、CCL20^[27] 和 CCL5^[28] 等趋化因子可以诱导巨噬细胞迁移。在本研究中,猪 CXCL17 同样能够诱导巨噬细胞迁移,且具有剂量依赖性。因此,当黏膜受到病原微生物入侵时,CXCL17 可以快速募集巨噬细胞到黏膜组织,这一行为有助于提高黏膜免疫反应的效率和准确性,从而有效消灭病原体。

已有研究证实,趋化因子可以通过调控细胞微丝骨架重排诱导细胞迁移^[29]。例如,Antonosante 等^[30]发现 CXCL8 通过激活微丝骨架相关的蛋白,如 FAK、RhoA、Cdc42 以及乙酰化 α -微管蛋白等,促进胶质母细胞瘤细胞迁移。在本研究中,猪 CXCL17 可以使巨噬细胞微丝骨架发生明显重排,在细胞前进的一侧生成突起。肌动蛋白是细胞微丝骨架的主要组成部分,它是一种相对分子质量为 42×10^3 的球状蛋白,可逆聚合成细丝(F-肌动蛋白),通过动态修饰肌动蛋白聚合引起细胞骨架重排实现细胞迁移^[31]。本研究发现,使用肌动蛋白的解聚剂 Cyto D 预处理,可有效阻断 CXCL17 对巨噬细胞微丝骨架的调节。Cofilin 是迁移细胞中肌动蛋白动力学的核心调控组分,它可以通过切断活性催化肌动蛋白聚合或解聚,参与细胞骨架的重塑和动态变化^[32-33]。而 LIM 激酶(LIM kinases, LIMK)作为 Cofilin 的上游蛋白,对 Cofilin 的 Ser3 有高度亲和力,能特异地将 Ser3 位点磷酸化使 Cofilin 失活,这一过程对肌动蛋白的解聚和聚合起到关键的调节作用^[34]。因此, LIMK/Cofilin 信号通路是细胞微丝骨架的重要调控途径。在本研究中,我们发现 CXCL17 能显著增强巨噬细胞中 LIMK 和 Cofilin 的磷酸化水平。这提示 CXCL17 通过增强 LIMK 磷酸化实现对 Cofilin 活性的调控,改变巨噬细胞微丝骨架,最终促使巨噬细胞迁移。

目前关于 CXCL17 的确切受体分子仍存在一些争议。尽管已有研究表明 CXCL17 的结合受体可能是 G 蛋白偶联受体家族分子 GPR35(G protein-coupled receptor 35,正式命名为趋化因子受体 CXCR8),且该受体与 CXCL17 具有相同的黏膜表达特性,能够在黏膜 DCs 和巨噬细胞等单核细胞中表达^[35-37]。但最近也有研究发现,抑制 CXCR8 并未影响 CXCL17 对人单核细胞系(THP-1)的招募,且过表达 CXCR8 后,THP-1 细胞对 CXCL17 的响应能力也未出现明显增强^[38]。因此,CXCL17 是否通过 GPR35 激活 LIMK/Cofilin 信号途径而引起巨噬细胞微丝骨架重排,仍有待于进一步研究。

本研究揭示了猪源黏膜趋化因子 CXCL17 通过调控 LIM/Cofilin 信号途径促进肌动蛋白聚合/解聚,引起细胞微丝骨架重排,诱导巨噬细胞迁移的分子机制。本研究结果有助于阐明黏膜趋化因子 CXCL17 增强猪鼻腔黏膜免疫的具体机制,为其在动物黏膜免疫中的有效应用提供理论依据。

参考文献 References:

- [1] Hughes C E, Nibbs R J B. A guide to chemokines and their receptors[J]. The FEBS Journal, 2018, 285(16): 2944-2971.
- [2] Kohli K, Pillarisetty V G, Kim T S. Key chemokines direct migration of immune cells in solid tumors[J]. Cancer Gene Therapy, 2022, 29: 10-21.
- [3] Korbecki J, Grochans S, Gutowska I, et al. CC chemokines in a tumor: a review of pro-cancer and anti-cancer properties of receptors CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, and CCR10 ligands[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(20): 7619.
- [4] Verma A, Gaffen S L, Swidergall M. Innate immunity to mucosal Candida infections[J]. Journal of Fungi, 2017, 3(4): 60.
- [5] Yang J Y, Yan H M. Mucosal epithelial cells: the initial sentinels and responders controlling and regulating immune responses to viral infections[J]. Cellular & Molecular Immunology, 2021, 18: 1628-1630.
- [6] Wu X, Sun M, Yang Z, et al. The roles of CCR9/CCL25 in inflammation and inflammation-associated diseases[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2021, 9: 686548.
- [7] Mohan T, Deng L, Wang B Z. CCL28 chemokine: an anchoring point bridging innate and adaptive immunity[J]. International Immunopharmacology, 2017, 51: 165-170.
- [8] Xiao S Y, Xie W H, Zhou L Y. Mucosal chemokine CXCL17: what is known and not known[J]. Scandinavian Journal of Immunology, 2021, 93(2): e12965.

- [9] Choreño-Parra J A, Thirunavukkarasu S, Zúñiga J, et al. The protective and pathogenic roles of CXCL17 in human health and disease: potential in respiratory medicine[J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2020, 53: 53–62.
- [10] Choreño-Parra J A, Jiménez-álvarez L A, Ramírez-Martínez G, et al. CXCL17 is a specific diagnostic biomarker for severe pandemic influenza A (H1N1) that predicts poor clinical outcome[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 633297.
- [11] Burkhardt A M, Maravillas-Montero J L, Carnevale C D, et al. CXCL17 is a major chemotactic factor for lung macrophages[J]. *Journal of Immunology*, 2014, 193(3): 1468–1474.
- [12] Paone P, Cani P D. Mucus barrier, mucins and gut microbiota; the expected slimy partners? [J]. *Gut*, 2020, 69(12): 2232–2243.
- [13] Riera-Romo M, Pérez-Martínez D, Castillo-Ferrer C. Innate immunity in vertebrates: an overview[J]. *Immunology*, 2016, 148(2): 125–139.
- [14] Mettelman R C, Allen E K, Thomas P G. Mucosal immune responses to infection and vaccination in the respiratory tract[J]. *Immunity*, 2022, 55(5): 749–780.
- [15] Jeong Y S, Bae Y S. Formyl peptide receptors in the mucosal immune system[J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2020, 52: 1694–1704.
- [16] Dhanushkodi N R, Prakash S, Quadiri A, et al. Mucosal CCL28 chemokine improves protection against genital herpes through mobilization of antiviral effector memory CCR10⁺CD44⁺CD62L-CD8⁺T cells and memory CCR10⁺B220⁺CD27⁺B cells into the infected vaginal mucosa[J]. *Journal of Immunology*, 2023, 211(1): 118–129.
- [17] Hernández-Ruiz M, Zlotnik A. Mucosal chemokines[J]. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2017, 37(2): 62–70.
- [18] Guo Y J, Zhou Y J, Yang X L, et al. The role and clinical significance of the CXCL17-CXCR8(GPR35) axis in breast cancer[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 493(3): 1159–1167.
- [19] Liu W M, Xie X K, Wu J Y. Mechanism of lung adenocarcinoma spine metastasis induced by CXCL17[J]. *Cellular Oncology*, 2020, 43(2): 311–320.
- [20] Takiguchi H, Yang C X, Yang C W T, et al. Macrophages with reduced expressions of classical M1 and M2 surface markers in human bronchoalveolar lavage fluid exhibit pro-inflammatory gene signatures[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 8282.
- [21] Hirayama D, Iida T, Nakase H. The phagocytic function of macrophage-enforcing innate immunity and tissue homeostasis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 19(1): 92.
- [22] Honda M, Surewaard B G J, Watanabe M, et al. Perivascular localization of macrophages in the intestinal mucosa is regulated by Nr4a1 and the microbiome[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 1329.
- [23] Zhang N, van Crombruggen K, Gevaert E, et al. Barrier function of the nasal mucosa in health and type-2 biased airway diseases[J]. *Allergy*, 2016, 71(3): 295–307.
- [24] Eckmann L, Bamias G. Mucosal immune system[M]//Wang T C, Camilleri M. Yamada's Textbook of Gastroenterology. Wiley-Blackwell, 2022: 242–270.
- [25] Smith J B, Herbert J J, Truong N R, et al. Cytokines and chemokines; the vital role they play in herpes simplex virus mucosal immunology[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 936235.
- [26] Cherry J D, Meng G Y, Daley S, et al. CCL2 is associated with microglia and macrophage recruitment in chronic traumatic encephalopathy[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 370.
- [27] Tan J H, Xu T H, Gou Y L, et al. CCL20/CCR6 axis mediates macrophages to promote proliferation and migration of ESCs by blocking autophagic flux in endometriosis[J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2022, 13(1): 294.
- [28] Li M, Sun X H, Zhao J, et al. CCL5 deficiency promotes liver repair by improving inflammation resolution and liver regeneration through M2 macrophage polarization[J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2020, 17: 753–764.
- [29] Hohmann T, Dehghani F. The cytoskeleton—a complex interacting meshwork[J]. *Cells*, 2019, 8(4): 362.
- [30] Antonosante A, Brandolini L, D'Angelo M, et al. Autocrine CXCL8-dependent invasiveness triggers modulation of actin cytoskeletal network and cell dynamics[J]. *Aging*, 2020, 12(2): 1928–1951.
- [31] Balta E, Kramer J, Samstag Y. Redox regulation of the actin cytoskeleton in cell migration and adhesion; on the way to a spatiotemporal view[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 8: 618261.
- [32] Wioland H, Jegou A, Romet-Lemonne G. Torsional stress generated by ADF/cofilin on cross-linked actin filaments boosts their severing[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(7): 2595–2602.
- [33] Jaswandkar S V, Katti K S, Katti D R. Molecular and structural basis of actin filament severing by ADF/cofilin[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2022, 20: 4157–4171.
- [34] Villalonga E, Mosrin C, Normand T, et al. LIM kinases, LIMK1 and LIMK2, are crucial node actors of the cell fate; molecular to pathological features[J]. *Cells*, 2023, 12(5): 805.
- [35] Srivastava R, Hernández-Ruiz M, Khan A A, et al. CXCL17 chemokine-dependent mobilization of CXCR8⁺CD8⁺ effector memory and tissue-resident memory T cells in the vaginal mucosa is associated with protection against genital herpes[J]. *Journal of Immunology*, 2018, 200(8): 2915–2926.
- [36] Hernandez M, Herrera C, Nguyen H T, et al. CXCL17 is a stomach-expressed chemokine and plays a role in diet-induced obesity[J]. *The Journal of Immunology*, 2017, 198(Suppl 1): 63–68.
- [37] Maravillas-Montero J L, Burkhardt A M, Hevezi P A, et al. Cutting edge; GPR35/CXCR8 is the receptor of the mucosal chemokine CXCL17[J]. *Journal of Immunology*, 2015, 194(1): 29–33.
- [38] Park S J, Lee S J, Nam S Y, et al. GPR35 mediates Iodoxamide-induced migration inhibitory response but not CXCL17-induced migration stimulatory response in THP-1 cells; is GPR35 a receptor for CXCL17? [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2018, 175(1): 154–161.