

引文格式：

逯晓旭, 邓湉, 张鹏超, 等. CD317 促进巨噬细胞 TLR4 信号转导的作用机制研究 [J]. 集成技术, 2021, 10(5): 1-11.  
 Lu XX, Deng T, Zhang PC, et al. The mechanism of CD317 in promoting TLR4 signaling in macrophage [J]. Journal of Integration Technology, 2021, 10(5): 1-11.

## CD317 促进巨噬细胞 TLR4 信号转导的作用机制研究

逯晓旭<sup>1,2</sup> 邓 涪<sup>1</sup> 张鹏超<sup>1,2</sup> 章桂忠<sup>1\*</sup> 万晓春<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>(中国科学院深圳先进技术研究院 深圳 518055)

<sup>2</sup>(中国科学院大学 北京 100049)

**摘要** Toll 样受体 4 (TLR4) 是一个重要的模式识别受体, 在抗感染天然免疫过程中发挥重要作用。CD317 是一个结构独特的 II 型跨膜糖蛋白, 兼具病毒束缚和信号调节功能, 但目前尚不清楚其对 TLR4 介导的信号转导是否有调控作用。该研究利用基因敲除鼠来源的原代腹腔巨噬细胞和 THP-1 诱导的人巨噬细胞为模型, 探讨了 CD317 对 TLR4 信号转导的作用。结果显示, CD317 能够被 TLR4 激动剂脂多糖诱导表达, 并反馈性增强脂多糖介导的 NF-κB 活化及 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 等促炎细胞因子的产生。CD317 敲除或敲减均能够显著抑制 TLR4 介导信号活化及细胞因子的产生。进一步利用免疫共沉淀证实 CD317 能够与 TLR4 下游的关键蛋白 MyD88、TRAF6 相结合, 提示 CD317 可能是通过 MyD88-TRAF6 信号转导, 增强 TLR4 介导的 NF-κB 活化。该研究不仅加深了对 CD317 在抗感染天然免疫调控中作用的认识, 也为相关疾病的治疗策略开发提供了新的靶点和理论指导。

**关键词** CD317; 巨噬细胞; Toll 样受体 4 (TLR4); 信号转导; NF-κB

**中图分类号** Q 291    **文献标志码** A    doi: 10.12146/j.issn.2095-3135.20210304001

## The Mechanism of CD317 in Promoting TLR4 Signaling in Macrophage

LU Xiaoxu<sup>1,2</sup> DENG Tian<sup>1</sup> ZHANG Pengchao<sup>1,2</sup> ZHANG Guizhong<sup>1\*</sup> WAN Xiaochun<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>(Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

<sup>2</sup>(University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

\*Corresponding Author: gz.zhang@siat.ac.cn; xc.wan@siat.ac.cn

**Abstract** TLR4 is an important pattern recognition receptor that plays important roles in innate immunity against infections. CD317 is a type II transmembrane glycoprotein with unique structure that endows it

收稿日期: 2021-03-04 修回日期: 2021-04-07

基金项目: 国家自然科学基金委员会青年科学基金项目(82001688); 深圳市科技创新委员会基础研究面上项目(JCYJ20190807164001762)

作者简介: 逯晓旭, 硕士, 研究方向为 CD317 在巨噬细胞天然免疫应答中的作用机制; 邓湉, 博士, 研究方向为细胞与分子免疫; 张鹏超, 博士, 研究方向为细胞与分子免疫; 章桂忠(通讯作者), 博士, 副研究员, 研究方向为肿瘤细胞信号转导、肿瘤免疫及天然免疫, E-mail: gz.zhang@siat.ac.cn; 万晓春(通讯作者), 博士, 研究员, 研究方向为抗体药物研发、免疫细胞信号转导、炎症/自身免疫性疾病及癌症的治疗等, E-mail: xc.wan@siat.ac.cn。

viral tethering and signaling potential. However, it is not clear yet whether CD317 regulates TLR4-mediated signal transduction. Herein, we investigated the role of CD317 on TLR4 signal transduction by using primary peritoneal macrophages derived from *CD317* knockout mice and THP-1-derived human macrophages, and found that the expression of CD317 could be induced by TLR4 agonist (Lipopolysaccharide), which, in a feedback loop, further enhanced the TLR4-mediated NF- $\kappa$ B activation and subsequent release of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6, etc.). *CD317* knockdown or knockout markedly impaired the TLR4 signal transduction and cytokine production. By using co-immunoprecipitation, we found that CD317 could interact with both MyD88 and TRAF6, suggesting that CD317 probably enhanced the TLR4-mediated NF- $\kappa$ B activation through MyD88-TRAF6 signal transduction pathway. Conclusively, our study not only extends the understanding on the role of CD317 in innate immune regulation, but also provides new targets and theoretical guidance for the development of effective strategies for related diseases.

**Keywords** CD317; macrophage; TLR4; signal transduction; NF- $\kappa$ B

**Funding** This work is supported by National Natural Science Foundation of China (82001688); Shenzhen Science and Technology Innovation Commission (JCYJ20190807164001762)

**Ethical Statement** The study was approved by the Institutional Review Board of the Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences (ID number: SIAT-IACUC-210310-YY-S-ZGZ-A1783)

## 1 引言

天然免疫是机体抵御病原微生物入侵的第一道防线。天然免疫细胞(如巨噬细胞、树突状细胞等)通过表达其上的模式识别受体(Pattern Recognition Receptors, PRRs)识别特定病原相关分子模式(Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs)<sup>[1-2]</sup>, 激活下游免疫应答信号, 发挥抗感染作用。其中, PRRs 是天然免疫应答的关键, 负责对病原体 PAMPs, 如双链 RNA、非甲基化 CpG DNA、细菌蛋白及脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)等的识别。PRRs 包含 Toll 样受体(TLRs)、Nod 样受体(NLRs)、视黄酸诱导基因 I(Retinoic Acid-Inducible Gene I, RIG-I)样受体(RLRs)、甘露糖受体(MR)、清道夫受体(SR), 这些受体能各自识别对应的病原体 PAMPs<sup>[3-6]</sup>。

Toll 样受体 4(TLR4)是 TLRs 家族中第一个被鉴定的成员<sup>[7]</sup>, 主要定位于细胞膜上, 能特异地识别细菌微生物并将细胞外抗原识别

信息向细胞内传递。TLR4 是 I 类跨膜模式识别受体, 其胞外域识别 LPS<sup>[8-9]</sup>, 通过胞内 Toll/IL-1 受体(TIR)结构域与骨髓分化初级反应蛋白 88(Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88, MyD88)、TNF 受体相关因子 6(TNF Receptor Associated Factor 6, TRAF6)等接头蛋白结合, 激活下游的核因子  $\kappa$ B(Nuclear Factor Kappa-B, NF- $\kappa$ B)以及丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-Activated Protein Kinase, MAPK)等信号通路<sup>[10-11]</sup>, 发挥抗感染作用。TLR4 信号缺陷会导致机体对革兰阴性菌高度易感, 表现为炎症因子释放减少, 对革兰阴性菌的清除能力下降, 生存率降低<sup>[12]</sup>。反之, TLR4 信号异常激活会造成免疫损伤, 诱发多种炎症疾病, 如结肠炎、肾炎、肺炎、肝炎和新生儿坏死性小肠结肠炎(Necrotizing Enterocolitis)等<sup>[13-14]</sup>, 而敲除小鼠的 *Tlr4* 对局灶性脑缺血有神经保护作用<sup>[15]</sup>。近年来越来越多的研究表明, 肿瘤的形成也与慢性感染、炎症刺激相关。其中, TLR4 信号异常是一

个常见因素, 迄今已知与 TLR4 相关的肿瘤至少有 9 种<sup>[16]</sup>。因此, 需要加深对 TLR4 信号通路的认识, 寻找合适的调控靶点, 为相关疾病的诊疗、干预提供指导。

CD317 又称为骨髓基质细胞抗原 2 (Bone Marrow Stromal Cell Antigen 2)、Tetherin 或 HM1.24, 分布于细胞膜和其他细胞内膜上, 有着独特的脂筏相关的双跨膜“桥式”蛋白结构<sup>[17]</sup>。基于其特殊的结构, CD317 可以将囊膜病毒束缚在宿主细胞表面, 抑制病毒扩散或将病毒内吞后通过泛素依赖的途径降解<sup>[18-21]</sup>。不仅如此, CD317 还具有信号转导、免疫调节等功能。有文献指出, CD317 可以激活 NF-κB 调控机体的抗病毒炎症反应<sup>[22-23]</sup>; 或通过与 ILT7 相互作用抑制类浆性树突状细胞活化, 从而减少干扰素的产生<sup>[24]</sup>。此外, CD317 还可以通过招募 E3 泛素连接酶 MARCH8 (Membrane Associated RING-CH Proteins) 将线粒体抗病毒信号蛋白 (Mitochondrial Antiviral Signaling Protein) 靶向核点蛋白 52 (Nuclear Dot Protein 52) 介导的自噬途径, 负调控视黄酸诱导基因 I 样受体介导的干扰素 (Interferon, IFN) 产生的作用<sup>[25]</sup>。尽管如此, 目前仍未清楚 CD317 对 TLR4 信号转导是否有调控作用。

## 2 材料和方法

### 2.1 实验材料

THP-1、HEK293T 细胞购于美国模式培养物集存库 (American Type Culture Collection, ATCC)。细胞培养基 RPMI-1640、磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffered Saline, PBS)、青霉素-链霉素混合双抗均购于美国 Hyclone 公司。DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium)、胎牛血清 (澳源)、Opti-MEM I 购于美国 Gibco 公司。佛波酯 (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate,

PMA)、脂多糖 (LPS) 购于美国 Sigma-Aldrich 公司。Lipofectamine 3000 购于 Invitrogen 公司。TransZol Up Plus RNA Kit、One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 及 SYBR GreenRealtime PCR Mix 购于北京全式金公司。巯基乙酸盐肉汤培养基 (211716) 购于美国 BD 公司。Phospho-NF-κB p65 (Ser536) (93H1) Rabbit mAb (3033)、Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) Rabbit mAb (4511) 购于美国 Cell Signaling Technology (CST) 公司。BST-2 (M-100) (Rabbit pAb, sc-99193) 购于美国 Santa 公司。APC Goat anti-mouse IgG poly 4053 (405308)、HRP-anti-HA.11 抗体 (901519) 购于 Biolegend 公司。GAPDH (MB001) 购于美国 Bioworld Technology 公司。小鼠抗 β-Actin 单克隆抗体 (A5441) 购于美国 Sigma 公司。小鼠抗 CD317 单克隆抗体 (1C12C6) 由本文作者团队制备。HRP-anti-Flag 抗体 (200-303-383) 购于 Rockland 公司。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 细胞培养

THP-1 细胞采用 RPMI-1640 完全培养基 (含 10% 血清和 1% 青链霉素混合双抗) 进行培养、传代; HEK293T 细胞采用 DMEM 完全培养基 (含 10% 血清和 1% 青链霉素混合双抗) 进行传代培养。培养箱环境为 37 °C、5% CO<sub>2</sub>。

#### 2.2.2 CD317 敲基因小鼠制备及基因型鉴定

本实验委托赛业生物公司制备 CD317 敲基因小鼠——利用 CRISPR/Cas9 技术敲除 CD317 位于 1~3 号外显子附近长度约为 2 500 bp 的 DNA 片段。小鼠基因型鉴定采用聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 扩增方法, 所用 gRNA 序列及 PCR 扩增引物序列如下。

gRNA1:

5'-AACAGTGGCTGTCCGCCGGCGG-3';

gRNA2:

5'-AGCTGGGGTTCTATTAGTCAGG-3';

Mouse *CD317*-F:

5'-CACGATCCTTCGTGAATGGAGAC-3';

Mouse *CD317*-R:

5'-TGTTCCCTGGACTGGATGAAACTG-3';

Mouse *CD317*-Wt/He-R:

5'-GATTCCAGGCTTACCACGGTCAG-3'。

### 2.2.3 小鼠腹腔巨噬细胞诱导和提取

选取 6~8 周龄小鼠，连续 3 天向其腹腔注射 1 mL 3% (w/v) 的巯基乙酸肉汤培养基，然后脱颈处死；用 75% 的乙醇溶液浸泡小鼠 5 min 后，用注射器向其腹腔注射 10 mL 经 4 °C 预冷的 PBS 缓冲液；轻揉小鼠腹部 3 min 后，将其腹腔内液体吸出并置于离心管中；400 g 离心 10 min，弃上清液，用含 10% 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) 的 DMEM 培养基将细胞密度调整至  $1.5 \times 10^6$  cell/mL 并接种到细胞板中。在 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 恒温箱培养过夜后，用 PBS 缓冲液冲洗去除未贴壁的细胞，即得到小鼠腹腔巨噬细胞 (Peritoneal Macrophages, PMs)。本文实验动物方案经由中国科学院深圳先进技术研究院动物伦理委员会审查 (SIAT-IACUC-210310-YY-S-ZGZ-A1783) 通过。

### 2.2.4 THP-1 来源的人巨噬细胞诱导

THP-1 来源的人巨噬细胞 (THP-1 Drived Macrophages, TDMs) 采用 PMA 诱导法，取状态良好的 THP-1 细胞，离心 (150 g、5 min) 并重悬后进行细胞计数，调整细胞密度至  $1 \times 10^6$  cell/mL，同时加入 25 ng/mL PMA，混匀后将其接种到细胞板中，在培养箱诱导分化 18 h 后，用 PBS 缓冲液清洗 3 遍并加入完全培养基。

### 2.2.5 转染

采用汇合度 60%~80% 左右、生长状态良好的细胞作为受体细胞，利用 Lipofectamine 3000 转染试剂进行小干扰 RNA (siRNA) 或质粒的转染，Plvx-hCD317-HA 质粒由本文作者所在实验室构建，pEnter-hTRAF6-flag-His 和 pEnter-

hMyD88-flag-His 购于山东维真生物科技有限公司；所用 siRNA 序列共 3 个。

① NC siRNA

正义链：

5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT-3'；

反义链：

5'-ACGUGACACGUUCGGAGAAdTdT-3'。

② CD317 siRNA 432-450

正义链：

5'-CCAGGTCTTAAGCGTGAGAdTdT-3'；

反义链：

5'-TCTCACGCTTAAGACCTGGdTdT-3'。

③ CD317 siRNA 452-470

正义链：

5'-TCGCGGACAAGAACGACTAdTdT-3'；

反义链：

5'-TAGTACTTCTTGTCCGCGAdTdT-3'。

### 2.2.6 RNA 提取、逆转录及实时荧光定量 PCR

PMs 铺板过夜或者 TDMs 转染 siRNA 48 h 后，去除培养基，加 LPS 刺激并于刺激后 0 h、2 h、4 h、6 h 收集细胞。使用 TRIZOL 剂提取总 RNA，进一步利用试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA，以用于实时荧光定量 PCR 检测。所用引物由金唯智公司合成，引物序列见表 1。扩增结束后，以 *ATCB* 和 *Atcb* 为内参基因，采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法对数据进行相对定量分析。

### 2.2.7 免疫共沉淀 (co-IP)

将 Plvx-hCD317-HA/pEnter-hTRAF6-flag-His 或 Plvx-hCD317-HA/pEnter-hMyD88-flag-His (1 μg/1 μg) 质粒组合转染至 HEK293T 细胞中。48 h 后收集细胞，将其用 IP (Immunoprecipitation) 裂解液重悬并在冰上裂解 30 min；将裂解液以 13 000 r/min 离心 15 min 后收集上清液；每个样品取部分作为上样对照 (Input)，将剩余上清液平均分配后分别加入 1 μg 小鼠抗 Flag 抗体或小鼠 IgG 抗体；混匀后将其在 4 °C 旋转孵育 1 h；随

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因名称	上游引物	下游引物
<i>Actb</i>	TGCGTGACATCAAAGAGAAG	TCCATACCAAGAAGGAAGG
小鼠 <i>CD317</i> ( <i>mCD317</i> )	TGTTCGGGGTTACCTTAGTCA	GCAGGAGTTGCCTGTGTCT
<i>Tnf</i>	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGCTACAG
<i>Il1b</i>	TTCAGGCAGGCAGTATCACTC	GAAGGTCCACGGAAAGACAC
<i>Il6</i>	TAGTCCTCCTACCCAATTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTC
<i>Il12b</i>	TGGTTGCCATCGTTGCTG	ACAGGTGAGGTTCACTGTTCT
<i>ACTB</i>	AGGATTCCATGTGGCGAC	ATAGCACAGCCTGGATAGCAA
人 <i>CD317</i> ( <i>hCD317</i> )	CACACTGTGATGGCCCTAACG	GTCCGCGATTCTCACGCTT
<i>TNF</i>	GAGGCCAAGCCCTGGTATG	CGGGCCGATTGATCTCAGC
<i>IL1B</i>	AGCTACGAATCTCCGACCAC	CGTTATCCCATGTGTCGAAGAA
<i>IL6</i>	ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG	CCATCTTGGAAAGGTTCAAGGTTG
<i>IL12B</i>	GCGGAGCTGCTACACTCTC	CCATGACCTCAATGGGCAGAC

后再将其加入经 IP 裂解液洗涤的 Protein A/G 磁珠(ThermoFisher, 88802), 4 °C 转动孵育过夜。孵育结束后, 以预冷的 IP 裂解液洗涤磁珠 5 次, 用 2×SDS Loading Buffer 重悬磁珠, 并于 100 °C 加热 8 min 进行蛋白变性。最后样品采用蛋白质免疫印迹法(Western Blot)进行检测, 所用抗体为 HRP-anti-HA.11(1:5 000) 和 HRP-anti-Flag(1:20 000)。

### 2.2.8 蛋白质免疫印迹法

收集细胞并用 RIPA 裂解液重悬, 冰上裂解 30 min 后, 以 13 000 r/min 离心 15 min, 转移上清液至新的 EP 管; 取适量样品用 BCA 定量法测定蛋白浓度, 其余加入 5×SDS Loading Buffer 混匀至终浓度为 1×, 并在 100 °C 变性 8 min。蛋白样品经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜及 5% 牛血清白蛋白(Bovine Albumin)封闭后, 加入按建议比例稀释的一抗工作液, 置于往复式摇床 4 °C 孵育过夜; 使用 PBST 充分洗涤以去除残留抗体, 加入辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP)标记的二抗, 室温孵育 1 h; PBST 清洗后用多功能成像仪检测蛋白信号。

### 2.2.9 流式分析

用 100 ng/mL LPS 刺激 PMs 后收集细

胞, 将其用 PBS 充分洗涤并重悬, 加入 Anti-CD317(M100) 抗体(1/100), 在 4 °C 下孵育 30 min; 经 PBS 充分洗涤以去除未结合抗体, 而后加入 APC anti-mouse IgG(1/200), 避光孵育 30 min 后, 再用 PBS 洗涤 3 遍, 流式检测 APC(别藻青蛋白) 荧光信号。

### 2.3 统计分析

使用 GraphPad Prism 8.0 软件对所有组内及组间数据进行分析并作图。所有数值均以“平均值±标准误差”表示; 采用非配对 t 检验分析组间数据是否具有统计学差异。当  $P < 0.05$  时, 认为两组数据间具有统计学差异; 当  $P < 0.01$  时, 认为两组数据间具有显著统计学差异; 当  $P < 0.001$  时, 认为两组数据间具有极显著统计学差异。

## 3 实验结果

### 3.1 TLR4 信号激活上调 CD317 的表达

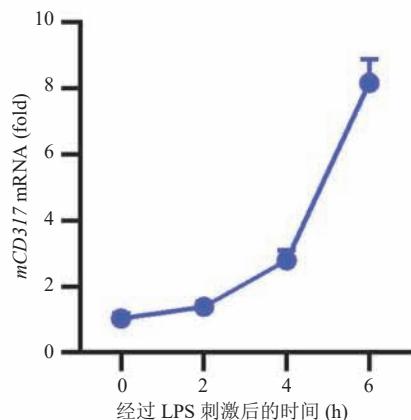
为了研究 CD317 对 TLR4 信号转导的作用, 首先用 LPS 刺激小鼠腹腔内的巨噬细胞(PMs)和 THP-1 来源的人巨噬细胞(TDMs); 然后, 分别于 LPS 刺激后 0 h、2 h、4 h、6 h 收集细胞; 最后, 利用荧光定量 PCR 技术对 *CD317* mRNA

的表达水平进行检测。图 1(a, b)结果显示，LPS 刺激显著促进小鼠和人巨噬细胞中 CD317 的表达。进一步利用蛋白质免疫印迹法或流式细胞术对蛋白水平进行验证，结果与 mRNA 水平的变化趋势一致，LPS 刺激可以显著提高 PMs 和 TDMs 细胞中 CD317 的表达(图 1(c, d))。这些结果说明 CD317 能够被 TLR4 信号诱导表达，极可能参与 TLR4 信号转导或功能实现过程。

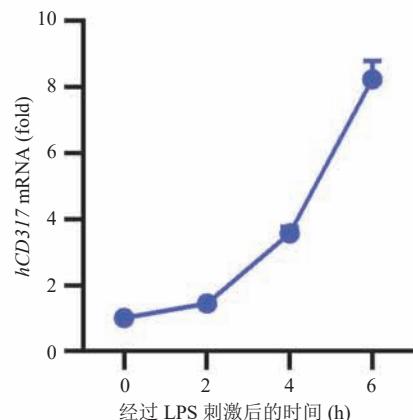
### 3.2 CD317 基因敲除小鼠构建

为了研究 CD317 是否参与 TLR4 信号转导调控，利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术靶向敲除

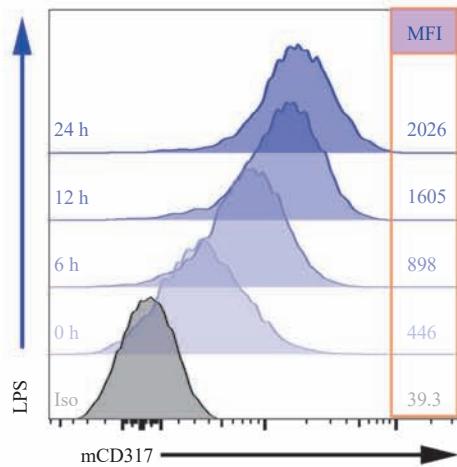
*CD317* 基因 1~3 号外显子，构建基因敲除小鼠(图 2(a))，并利用 PCR 对子代小鼠基因进行鉴定，结果如图 2(b)所示。与杂合子小鼠相比，纯合子基因敲除鼠由于片段缺失，Primer-Wt/Het-R 引物失去互补位点，PCR 反应只能由 Primer-F 和 Primer-R 介导，因此仅约有 540 bp 的扩增片段。这表明成功获得了 *CD317* 基因敲除小鼠。随后，进一步分离野生型(Wild Type, WT)和敲基因(Knock Out, KO)小鼠的腹腔巨噬细胞并利用流式细胞术对 CD317 表达进行检测，从蛋白水平对敲除效果进行验证。图 2(c)结果显示，



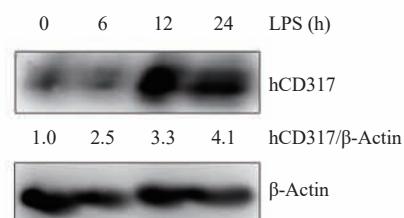
(a) LPS 刺激后小鼠腹腔巨噬细胞中 *CD317* mRNA 表达变化



(b) LPS 刺激后人巨噬细胞中 *CD317* mRNA 表达变化



(c) LPS 刺激后小鼠腹腔巨噬细胞中 CD317 蛋白表达变化



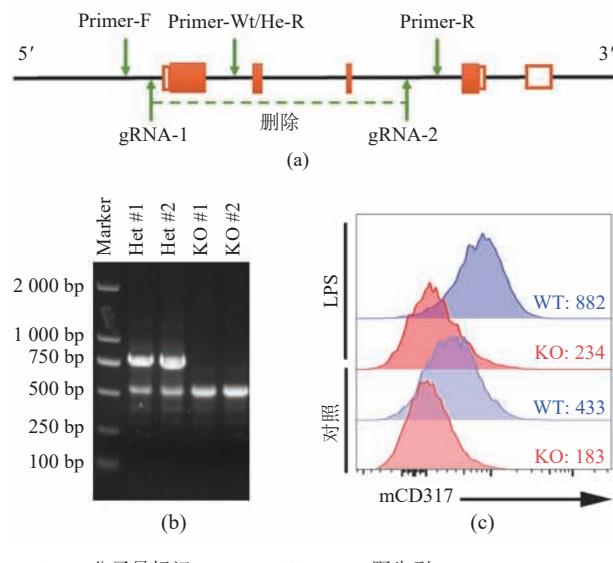
(d) LPS 刺激后人巨噬细胞中 CD317 蛋白表达变化

LPS: 脂多糖；MFI: Mean Fluorescence Intensity，平均荧光强度；fold: 基因相对表达量升高的倍数

图 1 LPS 刺激对 THP-1 诱导的巨噬细胞和小鼠原代腹腔巨噬细胞 *CD317* 表达的影响

Fig. 1 The expression of *CD317* in THP-1-induced macrophage and primary peritoneal macrophage induced by LPS

不管是在正常状态还是 LPS 刺激后, KO 小鼠腹腔巨噬细胞均未检出阳性信号; 而 WT 小鼠的 CD317 表达阳性且表达水平随着 LPS 刺激的增强而升高。该结果从蛋白水平验证了 *CD317* 的敲除效果。



Marker: 分子量标记; WT: Wild Type, 野生型; Het: Heterozygote, 杂合子; KO: Knock Out, 敲除型; LPS: 脂多糖

(a) *CD317* 敲基因小鼠制备及基因型鉴定示意图; (b) *CD317* 敲基因小鼠纯合子与杂合子基因型鉴定; (c) 流式细胞术验证野生型和敲基因小鼠腹部巨噬细胞中 *CD317* 的表达情况

图 2 *CD317* 基因敲除鼠构建及鉴定

**Fig. 2 Creation and identification of *CD317* knockout mouse**

### 3.3 *CD317* 敲减/敲除抑制促炎细胞因子的表达

为了研究 *CD317* 对 TLR4 信号转导的影响, 首先用 LPS 刺激 WT 和 *CD317* KO 小鼠来源的腹腔巨噬细胞, 于不同时间点收集细胞。通过实时荧光定量 PCR 技术对 *CD317* 以及 *Tnf*、*Il1b*、*Il6* 等促炎细胞因子 mRNA 的表达进行检测, 结果如图 3(a~d) 所示。LPS 以时间依赖的方式上调 WT 小鼠腹腔巨噬细胞中 *CD317* 以及相关促炎细胞因子的表达, 而 KO 小鼠腹腔巨噬细胞由于缺失了 *CD317*, *Tnf*、*Il1b*、*Il6* 以及 *Il12b* mRNA 的表达都受到不同程度的影响, 总体水平显著低于 WT 小鼠腹腔巨噬细胞。结果表明, *CD317* 促进

TLR4 介导的促炎细胞因子表达。这一观点在人源 TDMs 细胞中也得到了验证, 如图 3(e~i) 所示。这表明 *CD317* 敲减显著抑制了 LPS 诱导的 *CD317* 以及相关促炎细胞因子的表达。

### 3.4 *CD317* 敲减/敲除抑制 NF-κB 信号通路

为进一步研究 *CD317* 影响 TLR4 介导的促炎细胞因子产生的机制, 对 TLR4 下游关键的通路进行分析。结果发现, *CD317* 敲除显著抑制了腹腔巨噬细胞中 NF-κB 的活化, 而对 p38 信号通路基本没有影响(图 4(a))。这一结果在 *CD317* 敲减的 TDMs 细胞模型中也得到了验证(图 4(b))。

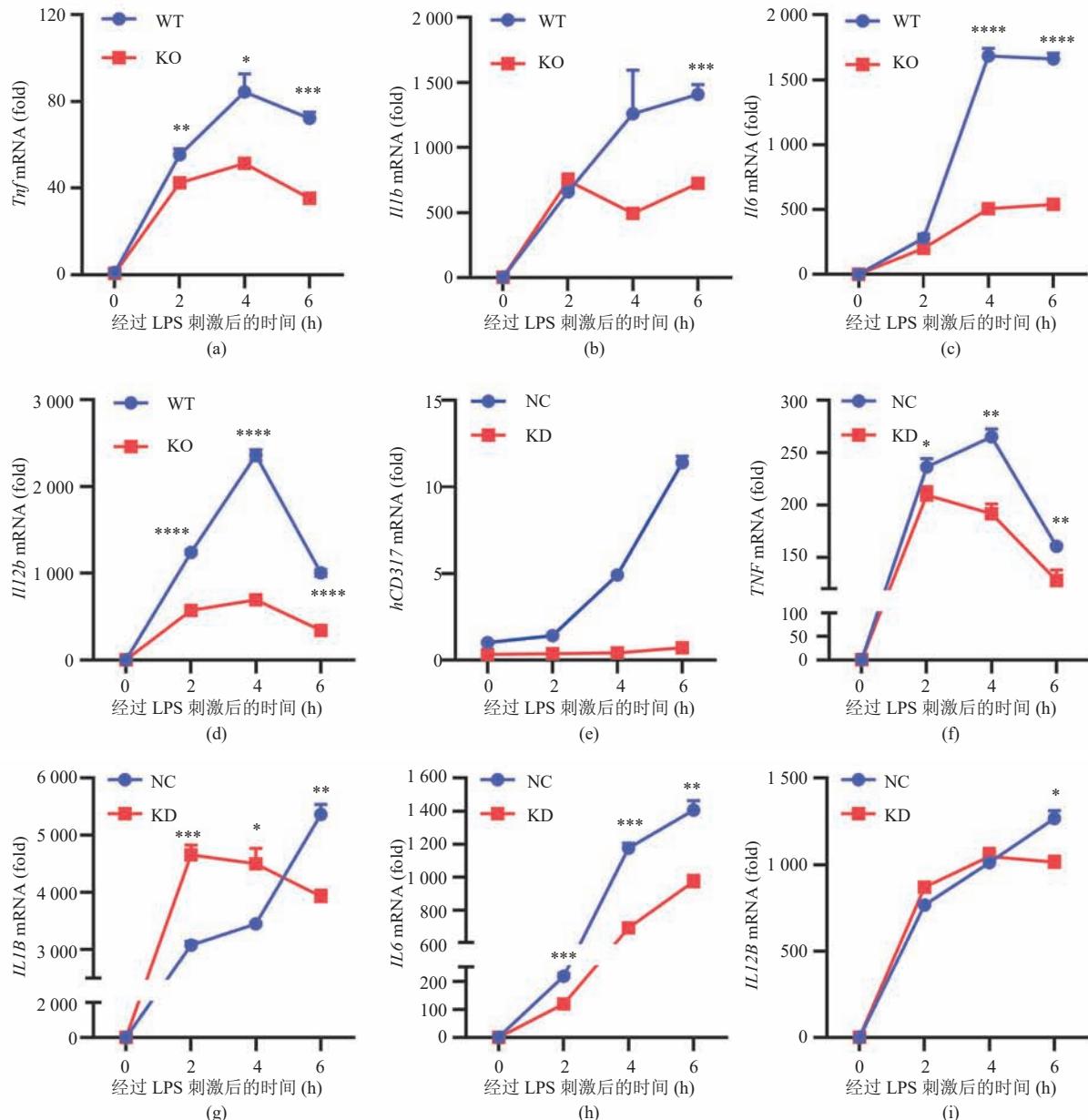
### 3.5 *CD317* 和 MyD88、TRAF6 存在相互作用

为进一步探索 *CD317* 参与 TLR4 信号调控的可能机制, 将 *CD317* 分别和 MyD88、TRAF6 表达质粒在 HEK293T 中共表达, 然后利用免疫共沉淀方法研究 *CD317* 是否能够与 TLR4 下游关键蛋白 MyD88、TRAF6 相互作用。图 5 显示, *CD317* 能够与 MyD88、TRAF6 相互作用。因此, *CD317* 可能通过与 MyD88、TRAF6 的相互作用来增强 NF-κB 活化, 但具体的分子机制还需要进一步研究。

## 4 讨论与分析

TLR4 是一个重要的固有免疫识别受体, 在机体抗感染免疫中发挥重要作用。TLR4 信号异常不仅与细菌感染相关, 同时也是一些自身免疫疾病, 如类风湿性关节炎 (Rheumatoid Arthritis)、系统性红斑狼疮 (Systemic Lupus Erythematosus) 等的致病因素<sup>[26~28]</sup>。因此, TLR4 信号需要被精准调控, 以确保其适度的活化。对 TLR4 信号转导关键调控蛋白的研究和鉴定, 有助于理解 TLR4 免疫机制和开发新的临床干预方法。

*CD317* 是一个结构独特的 II 型跨膜糖蛋白, 可被干扰素等抗病毒细胞因子诱导表达, 并在囊膜病毒束缚和免疫功能调节方面发挥重要作用。



\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ ; fold: 基因相对表达量升高的倍数; WT: Wild Type, 野生型; KO: Knock Out, 敲除型; hCD317: 人  $CD317$  基因; LPS: 脂多糖; NC: Negative Control, 阴性对照; KD:  $CD317$  Knock Down,  $CD317$  敲减

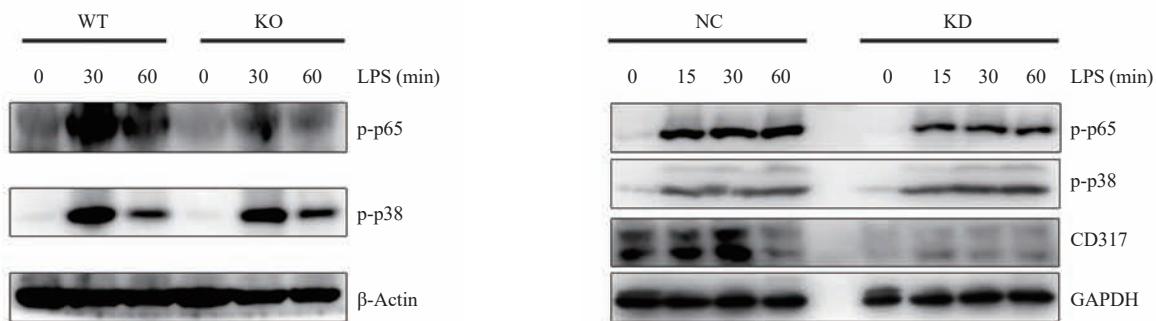
(a~d)  $CD317$  敲除后 LPS 诱导的 PMs 细胞中  $Tnf$ 、 $Il1b$ 、 $Il6$  以及  $Il12b$  mRNA 表达水平受到抑制; (e~i)  $CD317$  敲减后 LPS 诱导的 TDMs 细胞中  $Tnf$ 、 $Il1b$ 、 $Il6$  以及  $Il12b$  mRNA 表达水平受到抑制

图 3  $CD317$  敲减/敲除抑制巨噬细胞促炎细胞因子表达水平

Fig. 3  $CD317$  knockout/knockdown inhibited the expression of pro-inflammatory cytokines in macrophages

本研究进一步发现,  $CD317$  可被 TLR4 配体 LPS 诱导表达, 并促进 TLR4 介导的 NF- $\kappa$ B 信号活化及促炎因子产生, 进一步丰富了对  $CD317$  免疫调节功能的认识和理解。Tokarev 等<sup>[22]</sup>的研究

发现,  $CD317$  胞内段 YxY 基序具有激活 NF- $\kappa$ B 信号通路的功能, 充当传感器, 将病毒感染信息转为相应的免疫应答。Rizk 等<sup>[29]</sup>的研究也表明,  $CD317$  可以诱导 NF- $\kappa$ B 激活, 并且不依赖



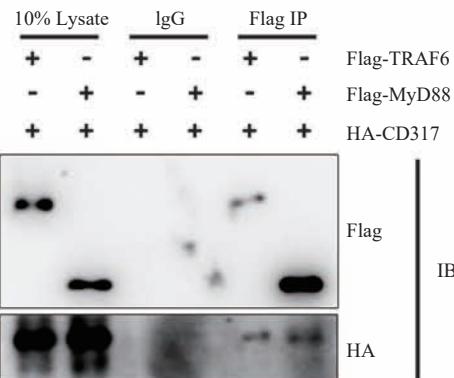
(a) CD317 敲除对 PMs 细胞中 p65 和 p38 磷酸化水平的影响

(b) CD317 敲减对 TDMs 细胞中 p65 和 p38 磷酸化水平的影响

WT: Wild Type, 野生型; KO: Knock Out, 敲除型; LPS: 脂多糖; NC: Negative Control, 阴性对照; KD: CD317 Knock Down, CD317 敲减

图 4 CD317 敲减/敲除抑制 LPS 诱导的巨噬细胞 NF-κB 通路活化

Fig. 4 CD317 knockdown/knockout suppresses LPS-mediated NF-κB activation in macrophage



Lysate: 裂解物; HA: 带有 HA 标签的蛋白; IB: Immunoblotting, 免疫印迹

图 5 CD317 与 MyD88、TRAF6 存在相互作用

Fig. 5 CD317 interacts with MyD88 and TRAF6

于 CD317 对病毒的束缚。本文研究从 TLR4 受体的角度进一步证实了 CD317 调控 NF-κB 的作用，并初步发现 CD317 可以与 TLR4 下游关键蛋白 MyD88、TRAF6 相互作用。其中，MyD88 是 TLR4 信号转导所必需的，而 TRAF6 是一个重要的天然免疫激酶，通过直接激活 TAK1 来激活 NF-κB 信号<sup>[30]</sup>。因此，CD317 可能是通过促进 MyD88-TRAF6 信号转导，增强 TLR4 介导的 NF-κB 活化。CD317 通常以二聚体形式存在，其胞内段较短，只有一个已知的 YxY 基序被证实具有信号转导功能。因此，CD317 可能通过 YxY 基序同时招募 MyD88 和 TRAF6，增强这两个关键蛋白的相互作用，从而促进 TLR4 介导的

NF-κB 活化。当然，这一观点还有待后续更多的实验验证。

尽管 CD317 具有病毒束缚功能，但人类免疫缺陷病毒 (Human Immunodeficiency Virus, HIV)、乙型肝炎病毒 (HBV)、SARS-CoV 等多种病毒可以通过不同机制逃避该作用<sup>[31-32]</sup>。以 HIV 为例，病毒可以通过 Vpu、Env 等蛋白与 CD317 结合从而将其从细胞膜移除或靶向蛋白酶体途径的降解<sup>[20, 33]</sup>。这种病毒介导的逃避机制可能无意中降低了被感染巨噬细胞 CD317 的表达水平，从而损伤 TLR4 信号转导，造成病毒/细菌复合感染。世界卫生组织 (WHO) 统计数据显示，HIV-1 感染者患结核病的风险是未感染者的 16~27 倍，仅 2015 年 1 年就有 39 万艾滋病毒感染者的死亡与结核病有关<sup>[34]</sup>。结核杆菌的主要免疫清除机制是巨噬细胞介导的吞噬作用以及呼吸爆发产生的杀菌效应<sup>[35]</sup>。巨噬细胞通过 TLR4 等模式识别受体识别结核杆菌<sup>[36]</sup>，诱发炎症反应抵抗感染<sup>[37]</sup>，对结核病的转归具有关键的作用。在 HIV 感染过程中，除了 CD4<sup>+</sup> T 细胞，巨噬细胞也是其主要的宿主细胞<sup>[38]</sup>。因此，HIV 感染巨噬细胞后，Vpu 等蛋白介导的 CD317 降解可能损伤 TLR4 信号转导，导致巨噬细胞天然免疫应答受到抑制，无法有效应对结核分枝杆菌等微生物的侵袭。从这个角度来看，本文研究结果为临幊上 HIV 患者易

感结核杆菌提供了一种潜在的解释，也为 HIV 等病毒损伤固有免疫应答提供了新的证据。

## 5 结 论

本研究利用敲基因小鼠腹腔巨噬细胞和 THP-1 来源的人巨噬细胞，较为系统地研究了 CD317 对 TLR4 信号通路的影响。结果显示，CD317 促进 TLR4 介导的 NF- $\kappa$ B 活化及促炎细胞因子的产生，并初步发现 CD317 与 TLR4 信号转导关键蛋白 MyD88、TRAF6 存在相互作用，为分子机制探索指明了方向。该研究结果不仅丰富了对 CD317 功能尤其是其在抗感染天然免疫调控中的作用的认识，也为相关疾病的治疗策略开发提供新的靶点和理论指导。

## 参 考 文 献

- [1] Amarante-Mendes GP, Adjemian S, Branco LM, et al. Pattern recognition receptors and the host cell death molecular machinery [J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 2379.
- [2] Fitzgerald KA, Kagan JC. Toll-like receptors and the control of immunity [J]. *Cell*, 2020, 180(6): 1044-1066.
- [3] Sahoo BR. Structure of fish Toll-like receptors (TLR) and NOD-like receptors (NLR) [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 161: 1602-1617.
- [4] Meng S, Chanda P, Thandavarayan RA, et al. Transflammation: innate immune signaling in nuclear reprogramming [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2017, 120: 133-141.
- [5] Tsuchiya K, Suzuki Y, Yoshimura K, et al. Macrophage mannose receptor CD206 predicts prognosis in community-acquired pneumonia [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 18750.
- [6] Mineo C. Lipoprotein receptor signalling in atherosclerosis [J]. *Cardiovascular Research*, 2020, 116(7): 1254-1274.
- [7] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway Jr CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity [J]. *Nature*, 1997, 388(6640): 394-397.
- [8] Vu A, Calzadilla A, Gidfar S, et al. Toll-like receptors in mycobacterial infection [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2017, 808: 1-7.
- [9] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity [J]. *Cell*, 2006, 124(4): 783-801.
- [10] Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways [J]. *Seminars in Immunology*, 2004, 16(1): 3-9.
- [11] Ding JY, Liu QQ. Toll-like receptor 4: a promising therapeutic target for pneumonia caused by Gram-negative bacteria [J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2019, 23(9): 5868-5875.
- [12] Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, et al. *TLR4* mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans [J]. *Nature Genetics*, 2000, 25(2): 187-191.
- [13] Roy A, Srivastava M, Saqib U, et al. Potential therapeutic targets for inflammation in Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated signaling pathways [J]. *International Immunopharmacology*, 2016, 40: 79-89.
- [14] Mihi B, Good M. Impact of Toll-like receptor 4 signaling in necrotizing enterocolitis: the state of the science [J]. *Clinics in Perinatology*, 2019, 46(1): 145-157.
- [15] Hyakkoku K, Hamanaka J, Tsuruma K, et al. Toll-like receptor 4 (TLR4), but not TLR3 or TLR9, knock-out mice have neuroprotective effects against focal cerebral ischemia [J]. *Neuroscience*, 2010, 171(1): 258-267.
- [16] Kutikhin AG. Impact of Toll-like receptor 4 polymorphisms on risk of cancer [J]. *Human Immunology*, 2011, 72(2): 193-206.
- [17] Schubert HL, Zhai Q, Sandrin V, et al. Structural and functional studies on the extracellular domain of BST2/tetherin in reduced and oxidized conformations [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(42): 17951-17956.
- [18] Swiecki M, Omattage NS, Brett TJ. BST-2/tetherin: structural biology, viral antagonism, and immunobiology of a potent host antiviral factor [J]. *Molecular Immunology*, 2013, 54(2): 132-139.

- [19] Neil SJD, Zang T, Bieniasz PD. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu [J]. *Nature*, 2008, 451(7177): 425-430.
- [20] Neil SJD, Eastman SW, Jouvenet N, et al. HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane [J]. *PLoS Pathogens*, 2006, 2(5): e39.
- [21] Kueck T, Neil SJD. A cytoplasmic tail determinant in HIV-1 Vpu mediates targeting of tetherin for endosomal degradation and counteracts interferon-induced restriction [J]. *PLoS Pathogens*, 2012, 8(3): e1002609.
- [22] Tokarev A, Suarez M, Kwan W, et al. Stimulation of NF- $\kappa$ B activity by the HIV restriction factor BST2 [J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(4): 2046-2057.
- [23] Galão RP, Le Tortorec A, Pickering S, et al. Innate sensing of HIV-1 assembly by tetherin induces NF $\kappa$ B-dependent proinflammatory responses [J]. *Cell Host & Microbe*, 2012, 12(5): 633-644.
- [24] Cao W, Bover L, Cho M, et al. Regulation of TLR7/9 responses in plasmacytoid dendritic cells by BST2 and ILT7 receptor interaction [J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2009, 206(7): 1603-1614.
- [25] Jin S, Tian S, Luo M, et al. Tetherin suppresses type I interferon signaling by targeting MAVS for NDP52-mediated selective autophagic degradation in human cells [J]. *Molecular Cell*, 2017, 68(2): 308-322.
- [26] Arjumand S, Shahzad M, Shabbir A, et al. Thymoquinone attenuates rheumatoid arthritis by downregulating TLR2, TLR4, TNF- $\alpha$ , IL-1, and NF $\kappa$ B expression levels [J]. *Biomedecine & Pharmacotherapie*, 2019, 111: 958-963.
- [27] Ma K, Li J, Wang X, et al. TLR4 $^{+}$ CXCR4 $^{+}$  plasma cells drive nephritis development in systemic lupus erythematosus [J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2018, 77(10): 1498-1506.
- [28] Pérez-Ferro M, Castillo CSD, Sánchez-Pernaute O. Cell membrane-bound TLR2 and TLR4: potential predictors of active systemic lupus erythematosus and lupus nephritis [J]. *The Journal of Rheumatology*, 2016, 43(7): 1444-1445.
- [29] Rizk MG, Basler CF, Guatelli J. Cooperation of the Ebola virus proteins VP40 and GP<sub>1,2</sub> with BST2 to activate NF- $\kappa$ B independently of virus-like particle trapping [J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(22): e01308-17.
- [30] Cohen P, Strickson S. The role of hybrid ubiquitin chains in the MyD88 and other innate immune signalling pathways [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2017, 24(7): 1153-1159.
- [31] Han Z, Lv M, Shi Y, et al. Mutation of glycosylation sites in BST-2 leads to its accumulation at intracellular CD63-positive vesicles without affecting its antiviral activity against multivesicular body-targeted HIV-1 and hepatitis B virus [J]. *Viruses*, 2016, 8(3): 62.
- [32] Wang SM, Huang KJ, Wang CT. Severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein counteracts BST2-mediated restriction of virus-like particle release [J]. *Journal of Medical Virology*, 2019, 91(10): 1743-1750.
- [33] Le Tortorec A, Neil SJD. Antagonism to and intracellular sequestration of human tetherin by the human immunodeficiency virus type 2 envelope glycoprotein [J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(22): 11966-11978.
- [34] World Health Organization. Global tuberculosis report 2020: executive summary [EB/OL]. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/337538/9789240016095-eng.pdf>.
- [35] Simmons JD, Stein CM, Seshadri C, et al. Immunological mechanisms of human resistance to persistent *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. *Nature Reviews, Immunology*, 2018, 18(9): 575-589.
- [36] Pahari S, Negi S, Aqdas M, et al. Induction of autophagy through CLEC4E in combination with TLR4: an innovative strategy to restrict the survival of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Autophagy*, 2020, 16(6): 1021-1043.
- [37] Branger J, Leemans JC, Florquin S, et al. Toll-like receptor 4 plays a protective role in pulmonary tuberculosis in mice [J]. *International Immunology*, 2004, 16(3): 509-516.
- [38] Moeser M, Nielsen JR, Joseph SB. Macrophage tropism in pathogenic HIV-1 and SIV infections [J]. *Viruses*, 2020, 12(10): 1077.