

# 肝再生磷酸酶 2 缺失促进巨噬细胞的杀菌功能

杜新月<sup>1</sup>, 殷岑楠<sup>1</sup>, 房艳<sup>1</sup>, 吴健桦<sup>1</sup>, 赵蔚<sup>1</sup>, 翁永强<sup>2</sup>, 吴琛耘<sup>1</sup>, 王兆军<sup>1</sup>

(1. 上海交通大学医学院 免疫学与微生物学系, 上海 200025; 2. 复旦大学附属华东医院 普外科, 上海 200040)

**摘要:** 肝再生磷酸酶 2 (protein phosphatase of regenerating liver 2, PRL-2) 是肝再生磷酸酶家族成员, 其在免疫系统中的作用未有研究。文章对免疫器官组织中 PRL-2 的表达及其在巨噬细胞中的作用进行了初探。研究发现, PRL-2 在免疫组织与器官中均高表达, *PRL-2*<sup>-/-</sup> 小鼠的脾脏与胸腺中免疫细胞的类群及比例与 WT 小鼠相比无显著差异。体外研究显示, PRL-2 的缺失不影响小鼠原代巨噬细胞细胞因子的产生及细菌吞噬能力, 但 PRL-2 缺失后巨噬细胞杀伤细菌的能力显著增强。综上, PRL-2 可能通过调控固有免疫细胞的杀菌能力在抗感染免疫中发挥作用。

**关键词:** 肝再生磷酸酶 2; 巨噬细胞; 杀菌

**中图分类号:** R392.12

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-2478(2019)04-0282-06

肝再生磷酸酶 2 (protein phosphatase of regenerating liver 2, PRL-2) 是肝再生磷酸酶家族的一员<sup>[1-2]</sup>。这个家族由蛋白酪氨酸磷酸酶 4A (protein tyrosine phosphatase type IV A, PTP4A) 基因家族编码, 含 PRL-1、PRL-2 和 PRL-3 3 个成员。以往 PRL 家族的研究多集中于 PRL 与肿瘤的相关性, 尤其是 PRL-3 以及 PRL-1 已被证实在多种肿瘤组织中特异性高表达, 与肿瘤的预后以及转移相关<sup>[1, 3]</sup>。不同于 PRL-3, PRL-2 广泛表达于正常成年人的各种组织与器官, 提示其可能与宿主的生理功能相关<sup>[4]</sup>。本研究对 PRL-2 在宿主免疫组织器官中的表达及其缺失对宿主免疫系统与细胞的影响进行了初步探索。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 6~8 周龄, 体质量 20~24 g, 雄性清洁级 C57BL/6 小鼠, 购自中科院上海实验动物中心, *PRL-2*<sup>-/-</sup> 小鼠及其对照小鼠由实验室自行繁育。实验鼠饲养于上海交通大学医学院实验动物科学部 SPF 环境中。动物实验经上海交通大学实验动物伦理委员会批准并按规定操作。

**1.2 主要试剂和仪器** 抗 CD3-APC、CD4-PerCP-

Cy5.5、CD8-PE、CD62L-FITC、CD11b-PE、Ly6G-PerCP-Cy5.5、B220-FITC、CD4-PE、CD8-FITC、CD44-APC、CD25-PerCP-Cy5.5 抗体均购自 eBioscience 公司, LPS 和酵母多糖购自 Sigma-Aldrich 公司。另有试剂抗 PRL-2 抗体 (Millipore 公司)、抗  $\beta$ -actin 抗体 (CST 公司)、RNA 抽提试剂盒与 Fast-Start Universal SYBR Green Master (RoX) (Roche 公司)、RNA 反转录试剂盒 (Thermo Scientific 公司)、SuperSignal West Pico 化学发光底物 (Thermo Scientific 公司)、BCA 蛋白定量试剂盒 (Thermo Scientific 公司)。仪器有 Canto II 流式细胞仪 (BD 公司)、ImageQuant LAS 4000 (GE 公司)、7500 Fast Real-time PCR 仪 (Applied Biosystems 公司)。

**1.3 小鼠组织细胞的分离提取** 麻醉小鼠后眼球取血, 用红细胞裂解液裂解红细胞, 留取外周血有核细胞备用。安乐处死小鼠, 依次取出腋下淋巴结、脾脏、胸腺以及腿骨。将淋巴结、胸腺和脾脏分别放在细胞过滤器上, 加入 PBS 研磨成单细胞悬液备用。分离小鼠的股骨和胫骨, 用生理盐水将骨髓细胞冲出, 裂解红细胞后备用。

**1.4 小鼠骨髓来源巨噬细胞 (bone marrow-derived macrophage, BMDM) 的分离与培养** 取小鼠骨髓细胞以含有 50 ng/mL 巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)、10% 小牛血清的 DMEM 培养液诱导分化 7 d 获取小鼠 BMDM。

**1.5 FACS 检测** 分别取出 *PRL-2*<sup>-/-</sup> 小鼠以及 WT 小鼠胸腺和脾脏, 研磨成单细胞悬液后, 计数

收稿日期: 2018-07-23

基金项目: 国家自然科学基金 (81471971、81172808); 上海市浦江人才计划 (A 类) (14PJ1406000)

作者简介: 杜新月 (1996-), 女, 博士生, 主要从事感染与免疫方面研究

通信作者: 王兆军 (E-mail: zjwang@sjtu.edu.cn)

细胞并取  $1 \times 10^6$  个/管于流式管, 加入相应抗体。4 ℃ 避光孵育 30 min 后, 洗去未与细胞结合的抗体, FCM 上样分析。

**1.6 real-time qPCR** 参照说明书使用 RNA 抽提试剂盒对样品进行 RNA 抽提。检测抽提出的 RNA 浓度, 应用 RNA 反转录试剂盒, 参照说明书将 RNA 反转录成 cDNA。备好 PCR 所需引物以及 SYBR Green, 通过 real-time qPCR 分析样本。SYBR Green 检测程序为 95 ℃ 10 min, 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 其中第 2、3、4 步骤重复 40 个循环。每个样本做 3 个复孔, 板中设置管家基因检测孔和 PRL-2 检测孔。real-time qPCR 所用引物序列如下(表 1)。

表 1 real-time qPCR 引物

基因	序列(5'→3')
PRL-2	F: CTCTTATGAGAACATGCGTTTTCTG
	R: CCGTACTTCTTAAGTTCCTCTGTGAA
IL-1 $\beta$	F: CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG
	R: GATCCACACTCTCCAGCTGCA
IL-6	F: TAGTCAATTCCAGAAACCGCTATG
	R: GTAGGGAAGGCCGTGGTTGT
TNF- $\alpha$	F: GACGTGGAAGTGGCAGAAGAG
	R: GCCACAAGCAGGAATGAGAAG
$\beta$ actin	F: TGTCCACCTTCCAGCAGATGT
	R: AGCTCAGTAACAGT CCGCCTAGA
GAPDH	F: TGAAGCAGGCATCTGAGGG
	R: CGAAGGTGGAAGAGTGGGA

**1.7 Western blotting 检测蛋白表达** 用 10% SDS-PAGE 分离蛋白, 100 V 恒压 60 min 转印至

硝酸纤维素膜。5%脱脂牛奶 TBS 封闭液室温振荡封闭 2 h。一抗 4 ℃ 振荡孵育过夜, 洗膜后将其浸没于二抗中, 室温振荡孵育 1 h 后取出, 洗膜后加底物, 使用 ImageQuant LAS 4000 显影。

**1.8 细胞吞噬与杀伤能力检测** 消化成熟小鼠 BMDM 后计数并铺板(铺于 12 孔板, 各铺 6 孔, 细胞密度  $1 \times 10^6$  个/孔)。过夜培养后, 将细胞培养液更换为不含双抗的培养液, 静息培养至少 2 h。向各孔中加入相应细菌, 室温  $800 \times g$  离心 2 min 后将板放回培养箱孵育 30 min。孵育结束后, 除去细胞培养上清并用 DMEM 清洗 2 次, 每孔加入 1 mL 含有 50  $\mu$ g/mL 庆大霉素的培养液, 培养箱孵育。孵育结束后, 除去培养液, PBS 清洗 2 次, 加入 0.1% TritonX-100 裂解细胞, 将得到的裂解液按不同比例稀释涂板并置于细菌培养箱培养 24 h 后计数单克隆, 对结果进行分析。

**1.9 统计学处理** 使用 Graphpad Prism 5 软件对实验结果进行统计分析。数据采用单因素方差分析, 所有统计假设检验均为双侧检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 PRL-2 在免疫器官与组织中的表达** 为了更好地了解 PRL-2 在免疫系统中的表达, 研究者使用 Western blotting 以及 real-time qPCR 对小鼠各个免疫器官和组织中 PRL-2 的表达进行了检测。结果表明, 在小鼠胸腺、骨髓、脾脏、淋巴结和血液中, PRL-2 在 mRNA 和蛋白质水平上都呈现高表达(图 1)。

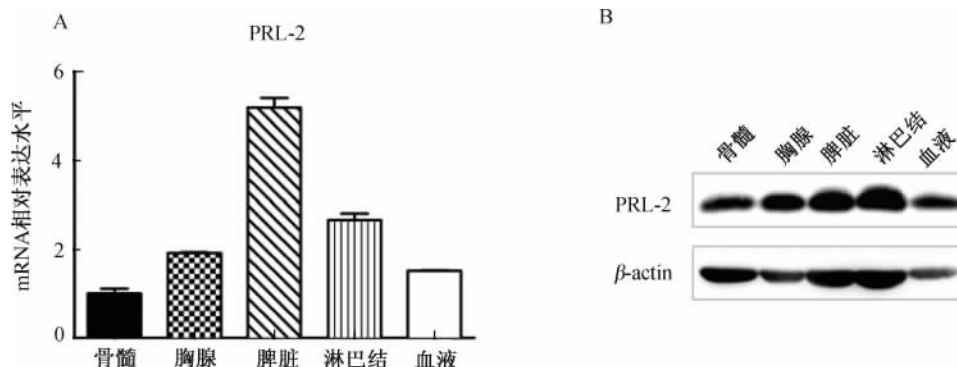


图 1 PRL-2 及其蛋白在小鼠免疫组织器官中的表达

注: A. real-time qPCR 检测正常小鼠免疫组织器官 PRL-2 的 mRNA 水平; B. Western blotting 检测 PRL-2 在正常小鼠免疫组织器官中的表达

## 2.2 $PRL-2^{-/-}$ 小鼠与 WT 小鼠的免疫系统比较

为进一步研究 PRL-2 在免疫系统中的作用,研究者对  $PRL-2^{-/-}$  以及 WT 小鼠的基本情况进行比较。研究者发现,  $PRL-2$  全身性敲除后,小鼠体质量明显低于 WT 小鼠 ( $P < 0.01$ ),脾质量也明显低于 WT 小鼠 ( $P < 0.01$ ),但脾质量与体质量

之比并没有明显差异(图 2A)。此外, WT 及  $PRL-2^{-/-}$  小鼠脾脏、胸腺、淋巴结与肝脏等主要免疫器官的免疫组织化学结果表明两组间无明显差异(图 2B)。对小鼠脾脏细胞以及胸腺细胞类别及比例进行 FACS 检测,结果显示两组间相比差异无统计学意义(图 3)。

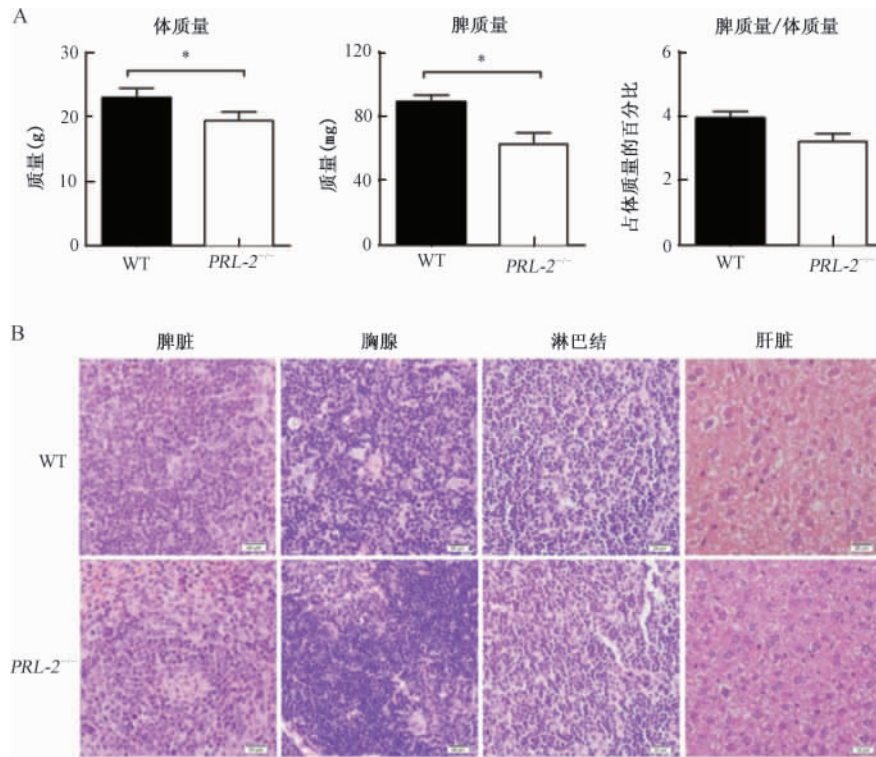


图2  $PRL-2^{-/-}$  小鼠的体质量与脾质量及主要免疫器官免疫组织化学结果( $\times 400$ )

注: A. WT 以及  $PRL-2^{-/-}$  小鼠的体质量及脾质量差异比较; B. WT 及  $PRL-2^{-/-}$  小鼠脾脏、胸腺、淋巴结与肝脏免疫组织化学结果; \* $P < 0.01$

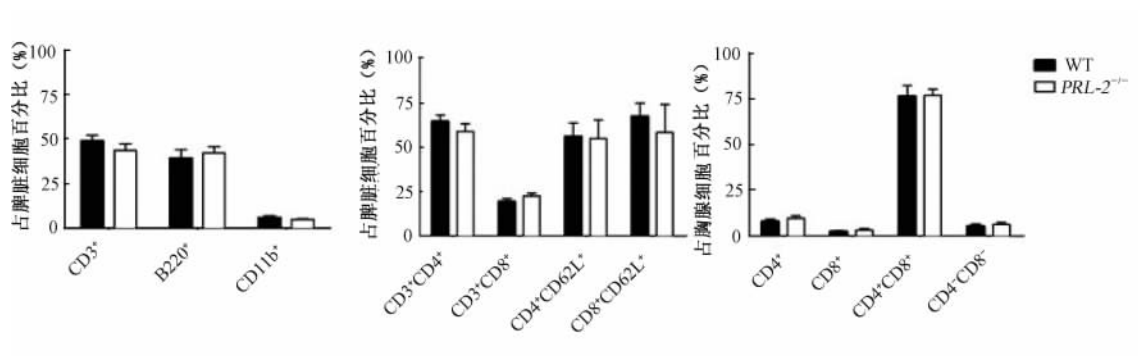
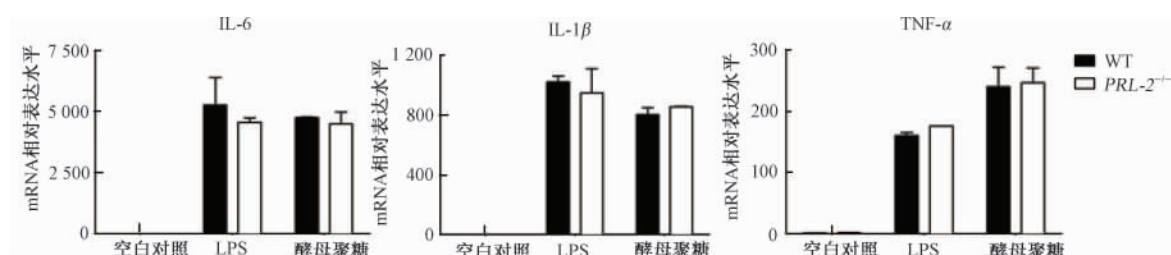


图3  $PRL-2^{-/-}$  小鼠脾脏与胸腺细胞 FACS 检测结果

注: 取 WT 及  $PRL-2^{-/-}$  小鼠的胸腺和脾脏组织, 研磨成单细胞悬液后进行荧光抗体染色, 使用 FCM 对染色结果进行分析, 数据为 3 次独立实验的平均结果

2.3  $PRL-2^{-/-}$  巨噬细胞受外界刺激后细胞因子的产生 为对 PRL-2 在免疫系统中的作用进行探究,研究者对  $PRL-2^{-/-}$  小鼠 BMDM 受外界刺激

后产生细胞因子的能力进行了检测。以细菌与酵母的主要组分 LPS 和酵母聚糖刺激 WT 与  $PRL-2^{-/-}$  BMDM 2 h, 收集细胞 RNA, real-time

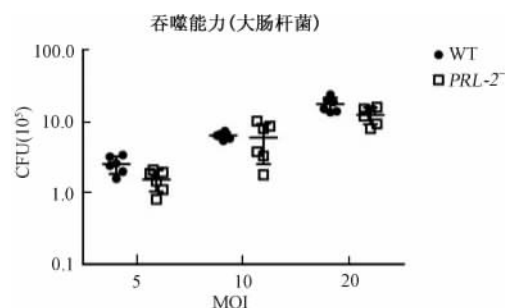
图4 *PRL-2* 敲除对 BMDM 细胞因子产生的影响

注：以 LPS 或者酵母聚糖刺激成熟 BMDM 2 h 后收样，抽提细胞 RNA，反转录成 cDNA，并使用 real-time qPCR 对细胞因子 mRNA 水平进行检测。数据为 3 次独立实验的平均结果

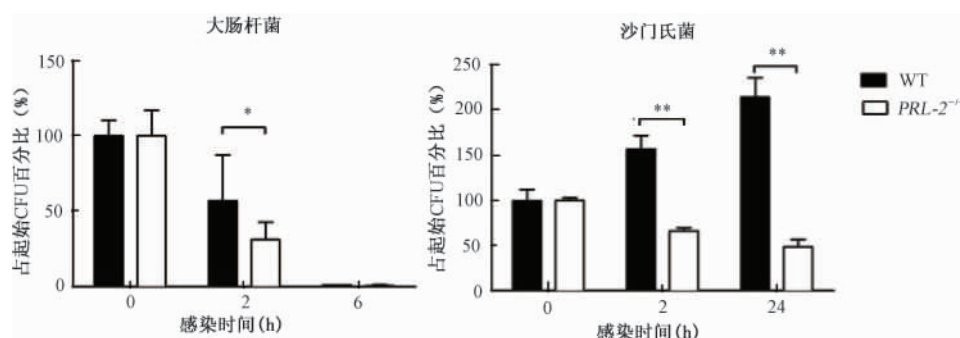
qPCR 检测 IL-6、TNF- $\alpha$  与 IL-1 $\beta$  的产生。结果显示，*PRL-2* 的有无对小鼠 BMDM 细胞因子的产生并无显著影响(图 4)。

## 2.4 *PRL-2* 敲除对 BMDM 吞噬和杀菌能力的影响

巨噬细胞在机体抗感染免疫过程中吞噬并杀伤细菌的能力对机体极其重要，研究者检测了 *PRL-2* 敲除对 BMDM 吞噬和杀菌能力的影响。结果表明，*PRL-2*<sup>-/-</sup> BMDM 的细菌吞噬能力与 WT 细胞相比无明显区别(图 5)，但细菌杀伤能力明显高于 WT 细胞 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ , 图 6)，*PRL-2*<sup>-/-</sup> BMDM 可更有效地杀伤大肠杆菌并抑制胞内沙门氏菌的生长。

图5 *PRL-2* 敲除未影响 BMDM 细菌吞噬能力

注：使用对数生长期的大肠杆菌以细菌与细胞的倍数比即感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 5、10、20 刺激正常小鼠以及 *PRL-2*<sup>-/-</sup> 小鼠 BMDM，通过细菌克隆形成单位(colony-forming unit, CFU)测定 *PRL-2* 对 BMDM 吞噬能力的影响，数据为 3 次独立实验的平均结果

图6 *PRL-2*<sup>-/-</sup> BMDM 杀菌能力的改变

注：以 MOI 为 1，使用对数生长期的大肠杆菌及沙门氏菌感染 WT 小鼠以及 *PRL-2*<sup>-/-</sup> 小鼠 BMDM，通过细菌 CFU 测定 *PRL-2* 对 BMDM 杀菌能力的影响。数据为 3 次独立实验的平均结果。\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

## 3 讨论

*PRL-2* 作为蛋白酪氨酸磷酸酶 PRL 家族的一员，其在结构上与家族成员 *PRL-1* 以及 *PRL-3* 一样，具有 CAAX 修饰以及 C(X)5R 结构域，其中 CAAX 结构域被认为与蛋白质翻译后定位相关，C(X)5R 结构域则被认为是蛋白磷酸酶活性结构

域<sup>[1-2, 5]</sup>。鉴于 *PRL-1* 以及 *PRL-3* 与肿瘤关系密切并且 *PRL-2* 编码基因所在的 1p35 染色体上的基因多与肿瘤相关，人们对 *PRL-2* 的研究一直集中于其与肿瘤发生发展以及与肿瘤患者预后的相关性<sup>[6]</sup>，而对于 *PRL-2* 病理生理作用的研究却极少<sup>[7]</sup>。最近研究发现，*PRL-2* 不仅参与维持细胞内镁离子的平衡<sup>[8]</sup>，还在脂肪酸合成、能量代谢中发

挥重要作用<sup>[9]</sup>。

不同于家族中其他2名成员, PRL-2在正常成年人各个组织与器官中广泛表达, 且在免疫系统相关组织和器官中高表达。本研究以PRL-2在免疫系统中的作用为切入点, 突破了PRL-2研究的局限性。研究证实PRL-2分子确实小鼠的免疫系统中普遍表达。为对PRL-2在免疫系统中的作用进行研究, 研究者构建培育了PRL-2 loxp转基因小鼠并使之与E2a Cre小鼠杂交获得了PRL-2全身敲除小鼠PRL-2<sup>fl/fl</sup>E2a-Cre小鼠。E2a-Cre小鼠Cre的表达由腺病毒E2a启动子控制, 使得Cre在胚胎发育早期即可在组织中广泛表达, 由此PRL-2<sup>fl/fl</sup>E2a-Cre小鼠中的PRL-2分子的表达在胚胎发育早期即会受到影响, 小鼠出生后表现为全身性PRL-2缺失。对PRL-2<sup>fl/fl</sup>E2a-Cre小鼠的表型进行分析后, 研究者发现PRL-2<sup>-/-</sup>小鼠虽然在固有免疫细胞的发育上未见明显异常, 但全身敲除后小鼠体重明显减轻。Zhang等<sup>[10]</sup>曾通过在小鼠基因组中直接敲除PRL-2获得PRL-2<sup>-/-</sup>小鼠, 研究发现PRL-2的敲除可影响小鼠的精子生成与胎盘发育, 使雄性小鼠生殖能力下降, 成年敲除小鼠个体较小。本研究培育的PRL-2<sup>-/-</sup>小鼠与Zhang实验室的敲除小鼠在表型上类似, 即小鼠个体较小, 但成年小鼠免疫器官、组织与细胞未见明显异常。鉴于以上表型, 此小鼠主要适用于提供原代免疫细胞用于体外细胞学实验。

研究者自PRL-2<sup>-/-</sup>小鼠中分离骨髓细胞, 体外诱导分化获取BMDM并对PRL-2<sup>-/-</sup>BMDM的功能进行了初探。研究发现PRL-2的敲除虽对LPS与酵母聚糖刺激下BMDM细胞因子的分泌以及细胞细菌吞噬能力无显著影响, 但PRL-2<sup>-/-</sup>BMDM的杀菌能力明显增强。现有报道指出PRL家族可影响Rac GTPase活性<sup>[11]</sup>, 而Rac GTPase作为NADPH氧化酶体的重要组成部分<sup>[12]</sup>在固有免疫细胞呼吸爆发杀伤病原体的过程中发挥着重要作用, PRL-2是否可以通过Rac相关的NADPH氧化酶通路来调控吞噬细胞的杀菌功能有待于进一

步研究。

## 参考文献

- [1] Campbell AM, Zhang ZY. Phosphatase of regenerating liver: A novel target for cancer therapy[J]. Expert Opin Ther Targets, 2014, 18(5): 555-569.
- [2] Rios P, Li X, Köhn M. Molecular mechanisms of the PRL phosphatases[J]. FEBS J, 2013, 280(2): 505-524.
- [3] Rios P, Nunes-Xavier CE, Tabernero LA, et al. Dual-specificity phosphatases as molecular targets for inhibition in human disease[J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 20(14): 2251-2273.
- [4] Dumauil CM, Sandusky GE, Crowell PL, et al. Cellular localization of PRL-1 and PRL-2 gene expression in normal adult human tissues[J]. J Histochem Cytochem, 2006, 54(12): 1401-1412.
- [5] Rubio T, Koehn M. Regulatory mechanisms of phosphatase of regenerating liver (PRL)-3[J]. Biochem Soc Trans, 2016, 44(5): 1305-1312.
- [6] Pulido R, Stoker AW, Hendriks WJ. PTPs emerge as PIPs: Protein tyrosine phosphatases with lipid-phosphatase activities in human disease[J]. Hum Mol Genet, 2013, 22(R1): R66-R76.
- [7] 殷岑楠, 吴琛耘, 王兆军. 肝再生磷酸酶-2的最新研究进展[J]. 生命科学, 2016, 28(7): 777-780.
- [8] Hardy S, Uetani N, Wong N, et al. The protein tyrosine phosphatase PRL-2 interacts with the magnesium transporter CNNM3 to promote oncogenesis[J]. Oncogene, 2015, 34(8): 986-995.
- [9] Uetani N, Hardy S, Gravel SP, et al. PRL2 links magnesium flux and sex-dependent circadian metabolic rhythms[J]. JCI Insight, 2017, 2(13): e91722.
- [10] Dong Y, Zhang L, Bai Y, et al. Phosphatase of regenerating liver 2(PRL2) deficiency impairs Kit signaling and spermatogenesis[J]. J Biol Chem, 2014, 289(6): 3799-3810.
- [11] Nakashima M, Lazo JS. Phosphatase of regenerating liver-1 promotes cell migration and invasion and regulates filamentous actin dynamics[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2010, 334(2): 627-633.
- [12] Weidinger A, Kozlov AV. Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: Oxidative stress versus signal transduction[J]. Biomolecules, 2015, 5(2): 472-484.

## ***PRL-2* deficient enhanced bactericidal activity in macrophages**

DU Xin-yue<sup>1</sup>, YIN Cen-nan<sup>1</sup>, FANG Yan<sup>1</sup>, WU Jian-hua<sup>1</sup>, ZHAO Wei<sup>1</sup>, WENG Yong-qiang<sup>2</sup>, WU Chen-yun<sup>1</sup>, WANG Zhao-jun<sup>1</sup> (1. *Department of Immunology and Microbiology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China*; 2. *Department of General Surgery, Huadong Hospital affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China*)

**Abstract:** PRL-2 (protein phosphatase of regenerating liver 2) is a member of protein phosphatase of regenerating liver family. The role of PRL-2 in the immune system is still unknown. Our study focused on the role of PRL-2 in the immune system. We found that PRL-2 was constitutively expressed in mouse immune tissues. We generated *PRL-2* knockout mice and found that there was no significant change in the development of the immune system compared to WT mice. *In vitro* experiments showed that, mouse bone marrow derived macrophage (BMDM) with or without PRL-2 showed no difference in cytokine production and phagocytosis, but *PRL-2* deficient BMDMs have significantly enhanced bactericidal activity compared to WT cells. Taken together, PRL-2 might play a role in the immune defense against bacterial infection through regulating bactericidal ability of the innate immune cells.

**Key words:** protein phosphatase of regenerating liver 2; macrophage; bactericidal activity