

## Wip1 正调控 TLR4 信号介导 I 型干扰素的表达

刘莹<sup>1</sup>, 周纯<sup>2</sup>, 刘晶华<sup>2</sup>, 陈霞<sup>2</sup>, 张文举<sup>1</sup>, 肖晖<sup>2\*</sup>

(1. 上海大学生命科学学院, 上海 200444; 2. 中国科学院上海巴斯德研究所, 上海 200031)

**摘要:** Wip1 是由基因 *ppm1d* 编码的丝氨酸/苏氨酸磷酸酶, 不仅在细胞应激反应、增殖分化中起重要作用, 还参与调控炎症反应和肿瘤发生等过程。Wip1 能抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 NF- $\kappa$ B 激活, 而 NF- $\kappa$ B 又是 TLR4 信号通路中的重要组分, 因此推测 Wip1 在 LPS 诱导的 TLR4 信号通路中可能起调控作用。Western 印记结果显示, 在 Wip1 基因敲除的小鼠胚胎成纤维细胞 (MEFs, Mouse embryonic fibroblasts) 中, TLR4 信号诱导的 IRF3 磷酸化程度显著降低。与此相一致, 实时荧光定量 PCR 实验揭示, 受 LPS 刺激后, Wip1 基因敲除的 MEFs 比野生型细胞产生更少的 I 型干扰素 IFN- $\beta$  和干扰素诱导基因 (Interferon-stimulated genes, ISGs), 如 *Mx1*, *Mx2* 和 *Rasd2*。将野生型和磷酸酶失活的 Wip1 分别回补进 Wip1 缺失的 MEFs, 构建了野生型和突变体 Wip1 回补的细胞系进一步验证该结果。通过实时荧光定量 PCR 研究, 发现野生型和磷酸酶失活的 Wip1 均能促进 LPS 诱导的 ISGs 的表达, Wip1 不依赖于其磷酸酶活性来促进 TLR4 介导的 I 型干扰素反应。研究首次发现 Wip1 能通过增强 IRF3 的磷酸化来促进 I 型干扰素的表达, 揭示了机体抵御病毒感染的新机制。

**关键词:** Wip1; TLR4; IRF3; IFN- $\beta$

中图分类号: Q71

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2017)05-0844-08

### Wip1 positively regulates TLR4-induced type I interferon response

LIU Ying<sup>1</sup>, ZHOU Chun<sup>2</sup>, LIU Jinghua<sup>2</sup>, CHEN Xia<sup>2</sup>, ZHANG Wenju<sup>1</sup>, XIAO Hui<sup>2</sup>

(1. School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444;

2. Institut Pasteur of Shanghai, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

**Abstract:** Wip1 is a serine/threonine phosphatase encoded by the *ppm1d* gene and plays important roles in cell differentiation/proliferation, stress response, inflammation as well as tumorigenesis. In this study, we investigated the function of Wip1 in LPS-induced TLR4 signaling and interferon response. Western blotting analysis indicated that LPS-induced phosphorylation of IRF3 was diminished in Wip1-deficient mouse embryonic fibroblasts (MEFs). Moreover, Wip1-deficient MEFs expressed less IFN- $\beta$  and interferon-stimulated genes (ISGs) *Mx1*, *Mx2* and *Rasd2*, compared to the wild-type MEFs. Next, we constructed viral vectors expressing wild-type or phosphatase-dead mutant of Wip1 into Wip1-deficient MEFs, and tested their effects on LPS-induced IFN response. Real-time PCR assay showed that both wild-type and phosphatase-dead mutant of Wip1 were able to restore LPS-induced IFN response in Wip1-deficient MEFs, suggesting that Wip1 regulates IFN response independent of its phosphatase activity. Together, these results suggest a novel role for Wip1 in the regulation of IRF3 activation and LPS-induced IFN response.

**Key words:** Wip1; TLR4; IRF3; IFN- $\beta$

天然免疫 (innate immunity) 是哺乳动物抵御外来病原微生物入侵的第一道防线。天然免疫系统通过模式识别受体 (pattern-recognition receptors, PRRs) 识别病原体携带的保守的分子结构——病原

体相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 来激活天然免疫细胞, 包括巨噬细胞和树突细胞等, 启动天然免疫反应<sup>[1]</sup>。Toll 样受体 (toll-like receptor, TLR) 是最早发现的一类

收稿日期: 2017-02-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31470847) 资助。

作者简介: 刘莹, 硕士研究生。E-mail: yliu@ips.ac.cn

\* 通信作者: 肖晖, 研究员, 博士生导师。E-mail: huixiao@ips.ac.cn

重要的模式识别受体, 包括 TLR2、TLR3 和 TLR4 等 13 种成员。TLR4 可以识别革兰氏阴性菌细胞壁的成分脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS), 启动髓样分化因子 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 依赖和  $\beta$  干扰素 TIR 结构域衔接蛋白 (TIR-domain-containing adaptor inducing interferon- $\beta$ , TRIF) 依赖的 2 条信号通路, 诱导促炎细胞因子、趋化因子和 I 型干扰素的表达<sup>[2-3]</sup>。其中 MyD88 介导的信号通路主要促进核转录因子 kappa B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 和丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 的活化, 负责诱导促炎细胞因子和趋化因子的产生<sup>[3]</sup>; 而 TRIF 介导的信号通路则能通过激活 TANK 结合激酶 1 (TANK-binding kinase 1, TBK1) 和干扰素调节因子 3 (interferon regulatory factor 3, IRF3), 诱导 I 型干扰素 IFN- $\beta$  的表达<sup>[3]</sup>。IFN- $\beta$  通过 Jak1/Tyk2 激活转录因子信号传导及转录激活因子 (signal transducers and activators of transcription 1, STAT1), 诱导几百种基因的表达, 被统称为干扰素诱导基因 (interferon-stimulated genes, ISGs)<sup>[4]</sup>。虽然 IFN- $\beta$  在抗病毒反应中发挥着重要作用, 但过度表达也能导致系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病, 因此机体存在多种方式来精细调节 IFN- $\beta$  的表达<sup>[5]</sup>。IRF3 活性的调控是影响 IFN- $\beta$  表达的重要环节。IRF3 被 TBK1/IKKi 磷酸化后被激活, 发生构象变化和二聚化, 然后转位到细胞核内促进 IFN- $\beta$  的表达<sup>[6]</sup>。但行使完功能后, IRF3 的活性会通过不同的调节方式回复到正常水平。例如, 泛素连接酶 c-Cbl 可以通过促进 IRF3 的泛素化降解来负调 IRF3 的活性和 IFN- $\beta$  信号<sup>[7]</sup>; 蛋白磷酸酶 PP1 可以通过直接作用于 IRF3, 导致其去磷酸化来抑制 TLRs 和 RIG-I 样受体 (RIG-I-like receptors, RLRs) 引发的 IFN- $\beta$  表达<sup>[8]</sup>。此外, 蛋白激酶 CK2 可以通过激活磷酸酶 PP2A 来控制 IRF3 的活性<sup>[9]</sup>。

Wip1 (wild-type p53-induced phosphatase 1) 是由 *ppm1d* 编码的属于 PP2C 磷酸酶家族的丝氨酸/苏氨酸磷酸酶, 最初被认定为 p53 的一个靶基因, 受电离辐射诱导<sup>[10]</sup>。随后发现 Wip1 是一种原癌基因, 在许多肿瘤细胞中高表达, 如人乳腺肿瘤、神经母细胞瘤和成神经管细胞瘤等<sup>[11]</sup>。Wip1 在细胞 DNA 损伤应激反应中也发挥重要作用, 它能抑制紫外辐射诱导的 p53 及 p53 的正调因子 p38 的磷酸化, 从而抑制细胞凋亡<sup>[12]</sup>。Wip1 还在免疫细胞的成熟和发育中扮演着重要的角色, 如 Wip1 敲除会影响胸腺中 T 细胞的发育<sup>[13]</sup>, 和骨髓中 B 细胞的发育<sup>[14]</sup>,

以及嗜中性粒细胞的成熟<sup>[15]</sup>。研究表明, Wip1 还参与免疫反应的调节, 特别是对 NF- $\kappa$ B 通路有负调作用。在肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 刺激下, Wip1 可以通过去磷酸化 p65 来控制炎症反应的强度<sup>[16]</sup>; 反过来, NF- $\kappa$ B 又是促进 Wip1 表达的一个关键转录因子<sup>[17]</sup>。在嗜中性粒细胞中, Wip1 可以通过负调 LPS 诱导的 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活来抑制免疫反应<sup>[18]</sup>。

以上研究表明, Wip1 在 NF- $\kappa$ B 的信号通路中发挥着重要作用, 但它是否参与调控 I 型干扰素的表达还不清楚。通过在鼠胚胎成纤维细胞 (mouse embryonic fibroblasts, MEFs) 中系统地研究了 Wip1 对 TLR4 通路的调节作用, 发现 Wip1 在 IRF3 的磷酸化和 I 型干扰素表达中起重要的调节作用, 且该功能不依赖 Wip1 的磷酸酶活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒、试剂和细胞** 表达 ENV、GAG 的逆转录病毒包装质粒为新加坡国立大学杨潞龄医学院张勇良老师实验室馈赠。质粒 pBABE-SV40 LT、pIP-HA 和 pCDH-GFP 为上海大学生命科学学院实验室所有。

PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司; 限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 New England Biolabs 公司; PCR 胶回收试剂盒购自上海莱枫生物科技有限公司; DNA 纯化回收试剂盒和质粒小量制备试剂盒购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 反转录试剂盒 (DRR037A) 购自 TaKaRa 公司; DMEM 培养基、PBS 和青霉素-链霉素溶液购自 HyClone 公司; 血清购自 Biological Industries 公司; 蛋白酶抑制剂购自 Roche 公司; NaF、Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 和 PMSF 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 浓缩胶缓冲液购自北京普利莱基因技术有限公司; LPS 购自 Invivogen 公司; Trizol 购自 Invitrogen 公司。

HEK293T 细胞系为本实验室保存的细胞系; 小鼠胚胎成纤维细胞来自饲养于 SPF 级动物房的野生型和 Wip1 基因敲除的 C57BL/6 小鼠。

**1.1.2 实验仪器** 流式细胞分选仪购自美国的 BD 公司; 超速冷冻离心机和专用离心管购自 Beckman 公司; 细胞培养箱购自 Thermo scientific 公司; 生物安全柜购自 Heal Force 公司; 化学发光图像分析仪购自上海天能科技有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 原代小鼠胚胎成纤维细胞的制备与培养** 用

基因型为 *Wip1*<sup>+/-</sup> 的雄鼠和雌鼠进行交配, 每天早晨检查雌鼠阴栓。以检测到阴栓那天记作 0.5 天, 于第 13.5 或 14.5 天时以断颈法处死雌鼠。在生物安全柜中分离小鼠胚胎, 剪去胎鼠的头部、四肢和尾巴, 并去除脏器。随后用眼科剪剪碎躯干, 用 3 mL 胰酶在 4℃ 冰箱消化过夜。次日用 10 mL 含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和 1% 青霉素和链霉素的 DMEM 培养基终止消化。用枪头吹打, 制成单细胞, 并铺于 15 cm 培养皿中, 在 37℃ 细胞培养箱中 (5% CO<sub>2</sub> 和 90% 相对湿度) 进行培养和传代。

**1.2.2 细胞裂解液 (Whole cell lysate) 制备及 Western 印记实验方法** 将 MEFs 铺在 6 cm 培养皿中进行培养 ( $2.5 \times 10^5$  个  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>), 待细胞长满后用 LPS ( $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  或  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 刺激不同时间长度 (0~4 h)。刺激完成后将培养皿置于冰上, 吸去培养基, 用 3 mL 预冷的 PBS 洗 1 遍后, 加入 200 mL 细胞裂解液 ( $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl [pH7.4],  $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl, 1% Triton X-100,  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA [pH8.0], 罗氏蛋白酶抑制剂,  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>,  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  PMSF,  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaF), 刮下细胞并转移至 1.5 mL Eppendorf (EP) 管中。涡旋振荡 5 s 破碎细胞, 然后放置在冰上孵育 20 min。于 4℃,  $15\ 700 \text{ g} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min, 去除不容的细胞碎片, 将细胞蛋白裂解液转移至新的 1.5 mL EP 管。取 200 mL 裂解液与 50  $\mu$ L 5×Loading buffer ( $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl [pH6.8], 10% SDS, 0.5% Bromophenol blue, 50% Glycerol, 5% 2-ME) 混匀, 95℃ 加热 5 min 使蛋白变性。取 20  $\mu$ L 蛋白样品在 10% SDS-PAGE 上进行电泳, 浓缩胶电泳电压为 100 V, 分离胶电泳电压为 120 V。电泳完成后, 在 4℃ 下用 100 V 恒压将胶上蛋白转移至经甲醇活化的 PVDF 膜上, 时间为 90 min。转膜完成后室温下用封闭液 (5% 脱脂牛奶, 1×TBST buffer) 封闭 1 h, 随后室温孵育一抗 2 h, 用 1×TBST buffer (TBS buffer, 0.05% tween-20) 清洗 3 次, 再与带辣根过氧化物酶的二抗孵育 1 h, 最后利用蛋白质印迹化学发光试剂 (ECL-PLUS) 显色, 并用 Tanon 5200 multi 采集图像。

**1.2.3 逆转录病毒包装** 铺 HEK293T 细胞于 10 cm 培养皿, 待细胞密度达 50%~60% 时, 利用磷酸钙转染法, 共转逆转录病毒载体 pBABE SV40LT (6  $\mu$ g), 包装质粒 ENV (6  $\mu$ g), GAG (6  $\mu$ g)。转染 18 h 后更换新鲜培养基, 继续培养 24 h 后收集细胞上清。于 4℃,  $800 \text{ g} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min 去除细胞碎片。

取上清进行超速离心, 4℃ 下用  $12\ 500 \text{ g} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 2 h。弃上清, 用 1 mL 的 PBS 重悬逆转录病毒, 分装后保存于 -80℃ 冰箱, 避免反复冻融, 以免降低病毒活性。

**1.2.4 逆转录病毒感染原代 MEFs** 于 10 cm 培养皿中培养原代 MEFs, 待细胞传至第 2 代, 细胞密度达到 20%~30% 时向培养皿中加入 160  $\mu$ L 浓缩逆转录病毒。感染 48 h 后更换新鲜 DMEM 培养基继续培养。待细胞长满后进行连续传代, 9 代后的细胞即为永生化的 MEFs。

**1.2.5 构建 pCDH-GFP-*Wip1* 质粒** 以野生型 C57BL/6 骨髓巨噬细胞反转而来的 cDNA 为模板, 根据 NCBI Gene Bank 中的 *Wip1* 基因序列, 针对其全长编码区设计引物:

上游引物: 5'-TTTGGATCCGCCATGGCGGGGCTGTACTC-3', 引入酶切位点: *Bam*H I。

下游引物: 5'-TTTGC GGCCGCTCAGCACACACACTGTTTTC-3', 引入酶切位点 *Not* I。

利用 *Bam*H I 和 *Not* I 将 *Wip1* 克隆入 pIP-HA 载体。利用限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Not* I 将带 HA 标签的 *Wip1* 片段切下来, 克隆至 pCDH-GFP 载体上。

**1.2.6 构建 *Wip1* 磷酸酶活性突变体质粒 (pCDH-GFP-*Wip1* D307A)** 以质粒 pIP-*Wip1* 为模板, 通过重叠 PCR (Overlapping) 的方法构建质粒。引物设计如下:

正向引物: 5'-AAAGATATCATGGCGGGGCTGTACTCG-3', 引入酶切位点: *Eco*R V;

反向引物: 5'-AAAGCGGCCGCTCAGCACACACTGTT-3', 引入酶切位点: *Not* I;

Overlap 正向引物: 5'-TCCTGGGAAGTGCTGGACTTTGGAATATGGTTC-3';

Overlap 反向引物: 5'-TTCCAAAGTCCAGC ACTTCCCAGGATAATATACT-3'。

利用 *Eco*R V 和 *Not* I 将 *Wip1* D307A 克隆入 pIP-HA 载体。再利用限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Not* I 将带 HA 标签的 *Wip1* 片段切下来, 克隆至 pCDH-GFP 载体上。

**1.2.7 慢病毒包装** 铺 293T 细胞于 10 cm 培养皿中, 待细胞密度长至 50%~60% 时, 用磷酸钙转染法将质粒 PCDH-GFP (10  $\mu$ g)、PCDH-GFP-*Wip1* (10  $\mu$ g)、PCDH-GFP-*Wip1* D307A (10  $\mu$ g) 分别和包装质粒 VSV-G (5  $\mu$ g)、 $\Delta$ 8.9 (7.5  $\mu$ g) 共转入细胞内。16 h 后更换新的 DMEM 培养基。48 h 后收集上清。于 4℃,  $800 \text{ g} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min 去除细胞碎片, 收集上清冻存于 -80℃ 冰箱或直接使用。注意避免反复冻

融。

**1.2.8 慢病毒感染** 将永生化的 Wip1 KO MEFs 铺于 10 cm 培养皿中, 细胞密度达到 50% 左右时, 吸去部分旧培养基, 加入病毒液 7 mL。感染 24 h 后更换新鲜 DMEM 培养基继续培养。细胞长满后利用流式细胞分选仪分选出 GFP 阳性细胞群。

**1.2.9 RNA 抽提、反转录和实时荧光定量 PCR**  
**RNA 抽提:** 将细胞铺于 6 孔板中进行培养, LPS (100 ng·mL<sup>-1</sup> 或 1 μg·mL<sup>-1</sup>) 刺激后, 将 6 孔板置于冰上, 吸去培养基, 用 1 mL 预冷的 PBS 洗一遍并吸尽, 每孔加入 Trizol 500 μL, 充分吹打后转移至 1.5 mL EP 管中。向每管中加入 100 μL 氯仿, 涡旋振荡 30 s, 室温静置 2~3 min。于 4℃, 9 300 g·min<sup>-1</sup> 离心 10 min。小心吸去上层水相并转移至新的 1.5 mL EP 管中, 每管加入等体积的异丙醇并颠倒混匀, 室温静置 10~20 min。于 4℃, 9 300 g·min<sup>-1</sup> 离心 15 min。弃上清, 向每管中加入 500 μL 70% 乙醇 (70% 无水乙醇+30% RNase-free 水) 进行洗涤, 于 4℃, 9 300 g·min<sup>-1</sup> 离心 5 min。弃上清, 室温晾置 10 min。根

据 RNA 白色沉淀的量, 每管加入 20~50 μL RNase-free 水。涡旋振荡并快速离心, 于 55℃ 煮 5 min。然后将 RNA 置于冰上, 用 Nanodrop 1000 测定 RNA 浓度。

**反转录:** 反转录试剂盒为 TaKaRa 反转录试剂盒。反应体系为: 500 ng RNA、反转录酶 0.5 μL、OligodT 0.5 μL、反应缓冲液 2 μL、RNase free ddH<sub>2</sub>O 补至 10 μL。混匀后进行 PCR。PCR 程序为 37℃ 反应 45 min, 85℃ 变性 5 s。反应完成后, 每管样品中加入 90 μL 灭菌 ddH<sub>2</sub>O 稀释, 保存于 -20℃ 冰箱。

**实时荧光定量 PCR:** 使用 SYBR green PCR 混合体系, 反应体系为 cDNA 3 μL、2×SYBR green 0.48 μL、rTaq 酶 0.06 μL、10×Taq 缓冲液 1.2 μL、2.5 mmol·L<sup>-1</sup> dNTP 1.2 μL、DMSO 0.6 μL、PCR 正反向引物各 0.24 μL, ddH<sub>2</sub>O 补至 12 μL。PCR 程序为: 第 1 步, 95℃ 3 min; 第 2 步, 95℃ 15 s, 55℃ 30 s, 72℃ 15 s, 以此进行 40 个循环。以 GAPDH 作为内参。最后运用 ΔΔct 的方法计算各基因的相对表达量。

Real-time PCR 引物信息见表 1。

表 1 Real-time PCR 引物  
Table 1 Primers used in real-time PCR

| 基因 Gene       | 正向引物 Forward primer (5'-3') | 反向引物 Reverse primer (5'-3') |
|---------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <i>mIFN-β</i> | GCACTGGGTGGAATGAGACTATTG    | TTCTGAGGCATCAACTGACAGGTC    |
| <i>mMx1</i>   | CTGAGATGACCCAGCACCTGAA      | CTCCAGGAACCAGCTGCACTTAC     |
| <i>mMx2</i>   | GTGCGGCCCTGCATTGACCT        | GGCCACTCCAGACAGTGCTTCTAGT   |
| <i>mRsd2</i>  | TGGGGATGCTGGTGCCCACT        | ACCCCGGACCTGTGGCTGTT        |
| <i>Wip1</i>   | CCTGTCAGAAGGAGCACAGTCA      | GTGGACACTGGTGTCTGGTTCA      |
| <i>GAPDH</i>  | TGGAGAAACCTGCCAAGTATGA      | CTGTTGAAGTCGCAGGAGACAA      |

### 1.3 统计学分析

所有数据采用 Student's *T*-test 进行统计分析。*P*<0.05 被认为具有显著差异。

## 2 结果与分析

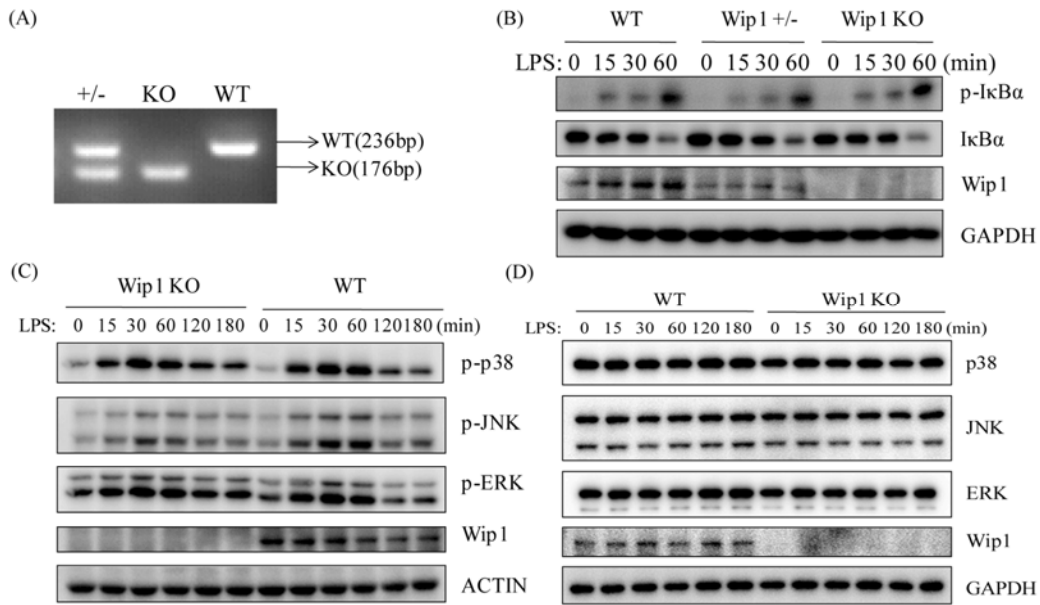
### 2.1 Wip1 对 TLR4 通路中 NFκB 和除 JNK 外的 MAPKs 信号的激活没有明显影响

从父母杂合型的小鼠胚胎中分离成纤维细胞, 通过基因型鉴定得到了野生型 (Wild-type, WT), 杂合型 (+/-) 和 Wip1 缺陷型 (KO) 的 3 种细胞 (图 1A)。通过 Western 印记检测这 3 种细胞中 Wip1 的表达量, 发现 Wip1 蛋白的表达在 Wip1 +/- 细胞中比 WT 细胞明显减少, 而在 Wip1 KO 的细胞中则完全检测不到 Wip1 的表达 (图 1B), 与基因型鉴定的结果相一致。用 LPS 刺激 MEFs 后, 通过特异性识

别蛋白磷酸化的抗体进行 Western 杂交, 可以明显地检测到 NF-κB 和 MAPKs 信号通路的激活 (图 1B, 1C)。IκBα 是转录因子 NF-κB 的关键抑制分子, 它受上游蛋白激酶 IKKβ 磷酸化后, 很快通过泛素化依赖途径而降解, 从而导致 NF-κB 的入核和活化。LPS 刺激 15 min 后, IκBα 被磷酸化, 在 60 min 后达到最高; 同时在 LPS 刺激 60 min 时, IκBα 蛋白被明显降解, 但 IκBα 的磷酸化程度和降解量在 3 种细胞中没有明显的区别 (图 1B)。这一结果表明 Wip1 可能不参与 LPS 诱导的 NF-κB 激活过程。MAPKs 包括 p38, 细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinases, ERKs), c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinases, JNKs) 3 种激酶<sup>[19]</sup>。经 LPS 刺激后, p38、ERK 和 JNK 均被磷酸化而得到激活 (图 1C)。与 WT 细胞相比,

Wip1 KO 细胞中 p38 和 ERK 的磷酸化程度和蛋白表达量均没有明显变化 (图 1C、1D); 虽然 JNK 的蛋白表达量在 WT 细胞和 Wip1 KO 细胞中是一致的, 但它的磷酸化程度有所降低 (图 1C、1D)。以

上结果说明, Wip1 可能在 TLR4 信号通路中参与促进 JNK 的激活, 但对 p38 和 ERK 的激活没有影响。



A. 从第 14.5 天的小鼠胚胎中分离 MEFs, 鉴定基因型。 B.用 100 ng·mL<sup>-1</sup> LPS 刺激 Wip1 WT、Het 和 KO MEFs 15、30 和 60 min, 裂解细胞, 提取细胞总蛋白, 通过 Western 印迹检测 Wip1 的蛋白表达量, 以及 IkBα 的磷酸化水平和蛋白表达量。 C 和 D.用 100 ng·mL<sup>-1</sup> LPS 刺激 Wip1 WT、 Het 和 KO MEFs 15、30、60、120 和 180 min, 通过 Western 印迹检测 p38、JNK 和 p-ERK 的磷酸化水平和蛋白表达量, 以及 Wip1 的蛋白表达量

A.Genotyping the MEFs isolated from Day 14.5 embryos. B.Wip1 WT, Het, KO MEFs were treated with 100 ng·mL<sup>-1</sup> LPS for 15 min, 30 min and 60 min, followed by cell lysis. The phosphorylation and expression of IkBα and expression of Wip1 were detected by Western blot. C and D.Wip1 WT and KO MEFs were treated with 100 ng·mL<sup>-1</sup> LPS for 15 min, 30 min, 60 min, 120 min and 180 min. Then the phosphorylation and the expression of p38, JNK and ERK, as well as the expression of Wip1, were detected by Western blot

图 1 Wip1 参与 TLR4 信号通路中 JNK 的激活

Figure 1 Wip1 is involved in the activation of JNK by TLR4 signaling

### 2.2 Wip1 在激活 IRF3 和诱导 IFN-β 表达中起关键作用

除了激活 NF-κB 和 MAPKs 外, LPS 还能通过 TLR4 激活 TBK1/IRF3 通路, 诱导 IFN-β 表达。Western 印记结果显示, 经过 LPS 刺激后, WT 细胞, Wip1 Het (heterozygous) 和 Wip1 KO 细胞中 TBK1 的激活没有明显变化 (图 2A)。但是, IRF3 的磷酸化程度在 Wip1 Het 细胞中比 WT 细胞中略有降低, 在 Wip1 KO 细胞中则进一步减少了 (图 2A)。Real-time PCR 结果显示, LPS 刺激 3 h 后, WT 细胞中表达大量的 I 型干扰素 IFN-β, 干扰素再通过自分泌作用于 MEFs, 导致大量的干扰素诱导基因的表达, 包括 *Mx1*、*Mx2* 和 *Rsad2* (图 2B)。和 WT 细胞相比, 发现 Wip1 KO 细胞表达 I 型干扰素 IFN-β 的能力明显减弱, 相应地, 干扰素诱导基因 *ISGs* (*Mx1*、*Mx2* 和 *Rsad2*) 在 Wip1 KO 细胞中的表达也显著降低 (图 2B)。而且在 Wip Het MEFs 中,

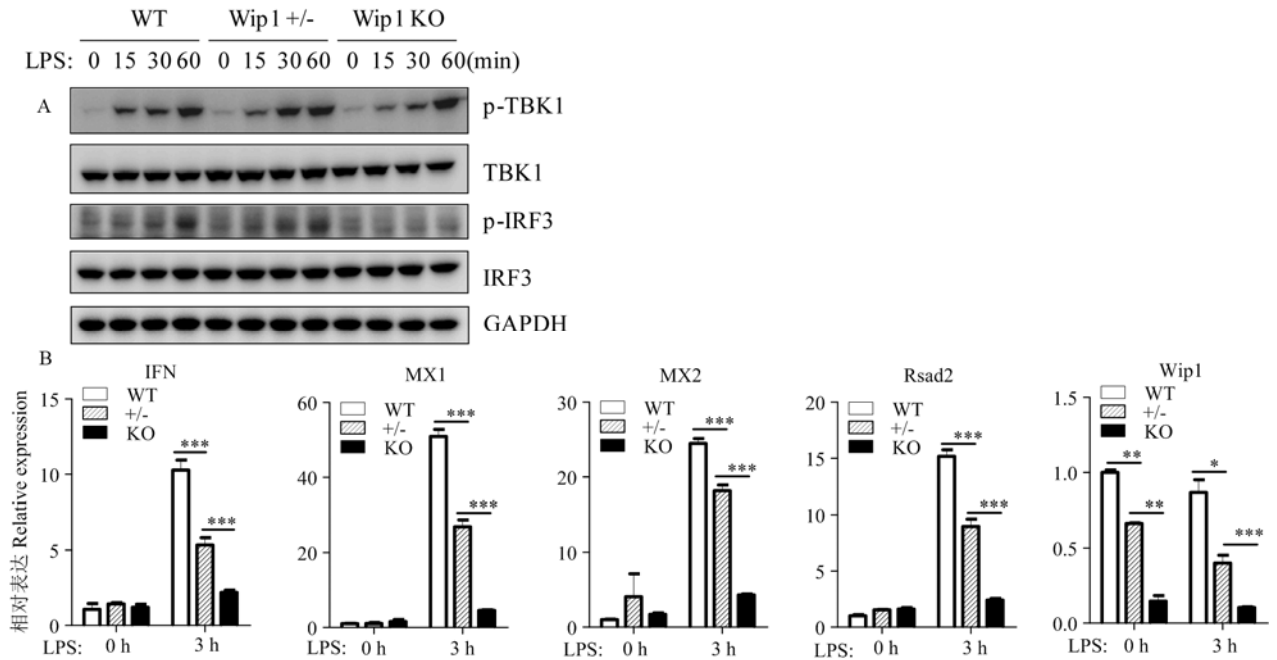
干扰素和 ISGs 的表达比野生型细胞也略有减少 (图 2B)。因此在 MEFs 中, Wip1 在 TLR4 信号激活 IRF3 的过程中起关键作用, 参与诱导 I 型干扰素 IFN-β 的表达。

### 2.3 构建表达野生型 Wip1 或无磷酸酶活性 Wip1 突变体的 MEFs 细胞系

接下来进一步研究了 Wip1 调节 TLR4 诱导的 IFN-β 表达的作用, 特别是 Wip1 的磷酸酶活性所起的作用。因为原代 MEFs 细胞传代次数有限, 且据文献报道, *Wip1* 敲除的原代 MEFs 生长缓慢、容易死亡<sup>[20]</sup>。因此, 为了能在稳定的细胞系中对 Wip1 的功能进行研究, 首先对 *Wip1* 基因敲除的 MEFs 进行了永生化, 得到了能永久传代的野生型和 Wip1 KO 的 MEFs 细胞系。将利用 pBABE 表达 SV40 的 Large Antigen 的逆转录病毒载体感染 MEFs 后, 连续传代 9 次以上, 获得永生化 MEFs 细胞系。文献报道将 Wip1 的第 307 位天冬氨酸突变为丙氨酸,

可以导致 Wip1 失去磷酸酶活性<sup>[21]</sup>。因此构建了表达野生型 Wip1 和无磷酸酶活性 Wip1(Wip1 D307A)的质粒, 将它们转入永生化的 Wip1 KO MEFs 细胞系中。通过流式细胞分选法分选 GFP 阳性细胞得到

Wip1 和 Wip1 D307A 回补细胞系。结果显示, GFP 阳性细胞均占总细胞的 80% 以上, 转染效果良好(表 2)。Western 印记结果显示, 回补细胞系能够表达野生型和突变体 Wip1 蛋白(图 3)。



(A) 用 100 ng·mL<sup>-1</sup> LPS 刺激 Wip1 WT, Het 和 KO MEFs 15、30 和 60 min, 通过 Western 印迹检测 TBK1 和 IRF3 的磷酸化水平和蛋白表达量。(B) 用 100 ng·mL<sup>-1</sup> LPS 处理 Wip1 WT, Het 和 KO MEFs 3 h, 通过实时荧光定量 PCR 检测 IFN-β, ISGs 和 Wip1 的表达。\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 (Student's t-test)

(A) Wip1 WT, Het, KO MEFs were treated with 100 ng·mL<sup>-1</sup>LPS for 15 min, 30 min and 60 min. The phosphorylation and expression of TBK1 and IRF3 were detected by Western blot. (B) Wip1 WT, Het and KO MEFs were treated with 100 ng·mL<sup>-1</sup> LPS for 3 h and the expression of IFN-β, ISGs and Wip1 were detected by real-time PCR. \*P< 0.05, \*\*P < 0.01 and \*\*\*P< 0.001 (Student's t-test).

图 2 Wip1 在 TLR4 诱导的 IRF3 激活和 IFN-β 产生中起关键作用

Figure 2 Wip1 plays a crucial role in TLR4-induced IRF3 activation and IFN-β production

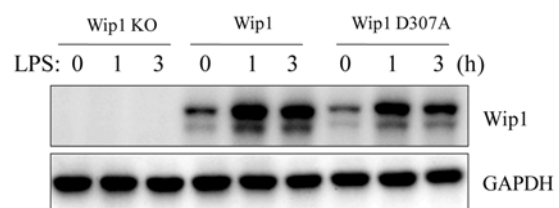
表 2 Wip1 敲除 MEFs 中慢病毒的转导效率

Table 2 The efficiency of lenti-viral transduction in Wip1-knockout MEFs

| Cell line  | GFP+ ratio |
|------------|------------|
| Wip1       | 80%~90%    |
| Wip1 D307A | 80%~90%    |

### 2.4 Wip1 的磷酸酶活性不参与调节 LPS 诱导的 ISGs 表达

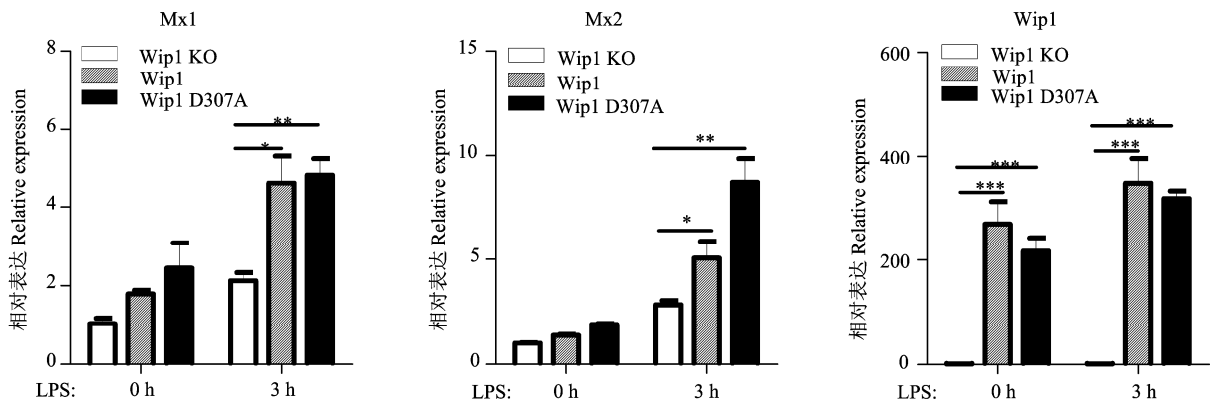
接下来用 LPS 刺激回补细胞系, 利用 Real-time PCR 检测 ISGs, Mx1 和 Mx2 的表达。和 Wip1 KO 细胞相比, 在回补野生型或突变型 Wip1 的细胞中, Wip1 和 Wip1 D307A 均能促进 LPS 诱导的 Mx1 和 Mx2 的表达(图 4)。以上结果说明, 在 MEFs 中, Wip1 在 LPS 诱导的 I 型干扰素 IFN-β 反应中起关键性作用, 但该功能不依赖于 Wip1 的磷酸酶活性。



将对照、Wip1 WT 或 Wip1 D307A 回补的 MEFs 用 1 μg·mL<sup>-1</sup>LPS 处理 1 h 和 3 h, 提取细胞总蛋白, 通过 Western 印迹检测 Wip1 蛋白的表达

The expression of wild-type and mutant of Wip1 was assessed in the restored cell lines. The total proteins were isolated from Wip1 KO and Wip1 WT or mutant-expressing MEFs after stimulation with 1 μg·mL<sup>-1</sup> LPS for 1 h and 3 h. Expression of Wip1 protein was detected by Western blot

图 3 回补 Wip1 和 Wip1 D307A 在 Wip1-KO MEFs 中表达  
Figure 3 Re-expression of Wip1- and Wip1 D307A in Wip1-KO MEFs



将对照、Wip1 WT 或 Wip1 D307A 回补的 MEFs 用  $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  LPS 处理 3 h。分离细胞的总 RNA, 通过实时荧光定量 PCR 检测 *Mx1*, *Mx2* 和 *Wip1* 的表达。\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  (Student's *t*-test)

The control, Wip1 WT or Wip1 D307A rescued MEFs were treated with  $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  LPS for 3 h. The total RNAs were isolated and the expression of *Mx1*, *Mx2* and *Wip1* were detected by real-time PCR. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$  (Student's *t*-test)

图 4 Wip1 的磷酸酶活性不参与 LPS 诱导的 IFN 应答

Figure 4 The phosphatase activity of Wip1 is not required for LPS-induced IFN response

### 3 讨论

在天然免疫中, I 型干扰素在抵抗病毒感染中发挥着重要的作用, 但是 I 型干扰素表达失调对宿主却是十分有害的, 如 I 型干扰素过量表达会引起败血性休克综合征<sup>[5]</sup>。因此 I 型干扰素的表达需要受到严格的调控。IRF3 作为促进 I 型干扰素 IFN- $\beta$  表达的关键分子, 其活性也受到严格且复杂的调控。一般认为, 磷酸酶会使 IRF3 去磷酸化, 避免 IRF3 的过度活化。但是有研究发现, 磷酸酶 PTEN 是 IRF3 的正调分子, 可以通过对 IRF3 的 Ser97 位点去磷酸化而促进 IRF3 的入核, 增强 IFN- $\beta$  的表达<sup>[6]</sup>。本研究发现, *Wip1* 也可以调节 IRF3 的活性, 并介导 IFN- $\beta$  的表达。

研究报道, *Wip1* 可以调控 TNF- $\alpha$  诱导的 NF- $\kappa$ B 信号转导。因此研究了 *Wip1* 是否对 TLR4 信号通路也有调节作用, 尤其是对 TRIF 介导的 IFN- $\beta$  表达的影响。结果显示, *Wip1* 敲除后, 不影响 LPS 诱导的 p-I $\kappa$ B $\alpha$ , p-ERK 和 p-p38, 但是 JNK 的激活有所减弱 (图 1B, C, D)。结果还显示, *Wip1* 敲除的细胞中, IRF3 的 Ser396 位点磷酸化水平显著降低 (图 2A)。说明在 TLR4 信号通路中, *Wip1* 主要参与调节 TRIF 介导的 TBK1/IRF3 信号通路。Real-time PCR 结果印证了 IFN- $\beta$  的表达, 及其 IFN 反应都受到 *Wip1* 的调节 (图 2B)。同时也研究了 *Wip1* 调控 IFN- $\beta$  表达的机制。*Wip1* 作为磷酸酶可以通过去磷酸化作用参与调控细胞的生理过程, 因此构建了 *Wip1* 磷酸酶失活的突变体 *Wip1* D307A, 并将其回补至 *Wip1* KO MEFs 中。实验结果表明,

磷酸酶活性突变的 *Wip1* 与野生型 *Wip1* 的作用相似 (图 4), 说明 *Wip1* 的磷酸酶活性没有参与到调节 IFN 反应中。

根据研究结果猜测, *Wip1* 可能存在除了磷酸酶活性之外的其他作用方式。有文献报道, 甲基转移酶 Dnmt3a 可以促进组蛋白 HDAC9 的高表达, 然后 HDAC9 通过脱乙酰作用增强 TBK1 的激酶活性, 进而增强 IRF3 的磷酸化, 促进 IFN- $\beta$  的表达<sup>[22]</sup>。因此推测, *Wip1* 可能通过增强 TBK1 激酶活性来起作用, 或者抑制参与负调 IRF3 的磷酸酶, 促进 IRF3 的激活。但是确切的调节机制还需要进一步的研究。IRF3 不仅能被 TLR4 信号激活, 还能被识别 RNA 的 TLR3、RIG-I 和识别病毒 DNA 的 cGAS/STING 信号通路激活, 参与诱导 IFN- $\beta$  的表达<sup>[23]</sup>。因此, *Wip1* 可能也参与这些信号通路, 调节 IRF3 的活化, 在抗病毒免疫中发挥重要作用。有文献报道, 在嗜中性粒细胞中 *Wip1* 能抑制 LPS 诱导的 NF- $\kappa$ B 活性, 而本研究发现在 MEFs 中 *Wip1* 对 TLR4 通路中的 NF- $\kappa$ B 的激活没有明显影响, 提示 *Wip1* 可能在不同的细胞中行使不同的功能。

综上所述, 本研究首次发现 *Wip1* 可以通过增强 TLR4 诱导的 IRF3 磷酸化来促进 IFN- $\beta$  的表达, 但并不依赖其磷酸酶活性来行使这一功能, 为全面认识机体如何调节干扰素反应提供了新的机制。

### 参考文献:

- [1] AKIRA S, UEMATSU S, TAKEUCHI O. Pathogen recognition and innate immunity[J]. Cell, 2006, 124(4): 783-801.
- [2] JIN M S, LEE J O. Structures of the Toll-like receptor

- family and its ligand complexes[J]. *Immunity*, 2008, 29(2): 182-191.
- [3] KAWAI T, AKIRA S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(5): 373-384.
- [4] MCNAB F, MAYER-BARBER K, SHER A, et al. Type I interferons in infectious disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 5(2): 87-103.
- [5] SIN W X, LI P, YEONG J P, et al. Activation and regulation of interferon- $\beta$  in immune responses[J]. *Immunol Res*, 2012, 3(1/2/3): 25-40.
- [6] LI S, ZHU M, PAN R, et al. The tumor suppressor PTEN has a critical role in antiviral innate immunity[J]. *Nat Immunol*, 2016, 17(3): 241-249.
- [7] ZHAO X, ZHU H, YU J, et al. TBK1-associated protein in endolysosomes (TAPE) is an innate immune regulator modulating the TLR3 and TLR4 signaling pathways[J]. *Cell Signal*, 2016, 28(11): 1683-1693.
- [8] GU M, ZHANG T, LIN W, et al. Protein phosphatase PP1 negatively regulates the Toll-like receptor- and RIG-I-like receptor-triggered production of type I interferon by inhibiting IRF3 phosphorylation at serines 396 and 385 in macrophage[J]. *Cell Signal*, 2014, 26(12): 2930-2939.
- [9] DU M, LIU J, CHEN X, et al. Casein kinase II Controls TBK1/IRF3 activation in IFN response against viral infection[J]. *J Immunol*, 2015, 194(9): 4477-4488.
- [10] FISCELLA M, ZHANG H, FAN S, et al. Wip1, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(12): 6048-6053.
- [11] EMELYANOV A, BULAVIN D V. Wip1 phosphatase in breast cancer[J]. *Oncogene*, 2015, 34(34): 4429-4438.
- [12] TAKEKAWA M, ADACHI M, NAKAHATA A, et al. P53-inducible wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation[J]. *EMBO J*, 2000, 19(23): 6517-6526.
- [13] SCHITO M L, DEMIDOV O N, SAITO S, et al. Wip1 phosphatase-deficient mice exhibit defective T cell maturation due to sustained p53 activation[J]. *J Immunol*, 2006, 176(8): 4818-4825.
- [14] YI W, HU X, CHEN Z, et al. Phosphatase Wip1 controls antigen-independent B-cell development in a p53-dependent manner[J]. *Blood*, 2015, 126(5): 620-628.
- [15] LIU G, HU X, SUN B, et al. Phosphatase Wip1 negatively regulates neutrophil development through p38 MAPK-STAT1[J]. *Blood*, 2013, 121(3): 519-529.
- [16] CHEW J, BISWAS S, SHREERAM S, et al. WIP1 phosphatase is a negative regulator of NF-kappaB signaling[J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(5): 659-666.
- [17] LOWE J M, CHA H, YANG Q, et al. Nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) is a novel positive transcriptional regulator of the oncogenic Wip1 phosphatase[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(8): 5249-5257.
- [18] SUN B, HU X, LIU G, et al. Phosphatase Wip1 negatively regulates neutrophil migration and inflammation [J]. *J Immunol*, 2014, 192(3): 1184-1195.
- [19] KYRIAKIS J M, AVRUCH J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol[J]. Physiol Rev*, 2012, 92(2): 689-737.
- [20] CHOI J, NANNENGA B, DEMIDOV O N, et al. Mice deficient for the wild-type p53-induced phosphatase gene (Wip1) exhibit defects in reproductive organs, immune function, and cell cycle control[J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(4): 1094-1050.
- [21] NANNENGA B, LU X, DUMBLE M, et al. Augmented cancer resistance and DNA damage response phenotypes in PPM1D null mice[J]. *Mol Carcinog*, 2006, 45(8): 594-604.
- [22] LI X, ZHANG Q, DING Y, et al. Methyltransferase Dnmt3a upregulates HDAC9 to deacetylate the kinase TBK1 for activation of antiviral innate immunity[J]. *Nat Immunol*, 2016, 17(7): 806-815.
- [23] RUSTAGI A, GALE M J R. Innate antiviral immune signaling, viral evasion and modulation by HIV-1[J]. *J Mol Biol*, 2014, 426(6): 1161-1177.