

DOI:10.13350/j.cjpb.230106

· 论著 ·

弓形虫 ROP16<sub>I/II</sub> 蛋白对 RAW 264.7 细胞增殖  
与凋亡的影响及相关机制\*李佳铭<sup>1</sup>, 杨宁爱<sup>2</sup>, 汪澎湃<sup>2</sup>, 王艺璇<sup>1</sup>, 马慧慧<sup>1</sup>, 刘春兰<sup>1</sup>, 兰敏<sup>1</sup>, 赵志军<sup>2,3\*\*</sup>

(1. 宁夏医科大学临床医学院, 宁夏银川 750004; 2. 宁夏临床病原微生物重点实验室; 3. 宁夏医科大学总医院医学实验中心)

**【摘要】** 目的 探讨弓形虫 I、II 型 ROP16 蛋白对小鼠腹腔巨噬细胞 RAW 264.7 细胞增殖和凋亡的影响及相关机制。方法 用构建的 I、II 型 ROP16 重组慢病毒表达载体转染 RAW 264.7 细胞,经嘌呤霉素筛选稳定后获得单克隆过表达细胞株。qRT-PCR 和 Western blot 法鉴定过表达效果,免疫荧光检测其定位,cck-8 法测定细胞增殖活性,流式细胞术检测细胞凋亡变化水平。Western blot 法检测细胞凋亡相关蛋白 Caspase 3、Caspase 9、Bax、Bcl-2 和信号通路相关蛋白 pTyr705-STAT3、total-STAT3、p-NF-κB p65 和 NF-κB p65 的相对表达水平,qRT-PCR 法检测细胞凋亡相关基因 Caspase 3、Caspase 9、Bax、Bcl-2 的相对转录水平。结果 重组慢病毒表达载体转染 RAW 264.7 细胞后可观察到强绿色荧光,并检测到 *rop16* 基因转录与蛋白表达,且该蛋白主要定位于 RAW 264.7 细胞核及其周围。cck-8 检测显示, I、II 型 ROP16 蛋白均可促进 RAW 264.7 细胞增殖。流式细胞术检测显示,过表达 overExp-ROP16<sub>I</sub> 组细胞凋亡率为 (5.35±0.0529)%,过表达组 overExp-ROP16<sub>II</sub> 组细胞凋亡率为 (5.2767±0.0651)%,均显著低于空白对照组 (10.4733±0.2178)% 和空载体对照组 (10.6533±0.0702)% (均  $P<0.01$ )。Western blot 及 qRT-PCR 检测显示过表达 overExp-ROP16<sub>I/II</sub> 组促凋亡因子 Caspase 3、Caspase 9、Bax 蛋白及其 mRNA 均显著升高,抗凋亡因子 Bcl-2 蛋白及其 mRNA 表达受抑制 (均  $P<0.01$ )。Western blot 检测过表达 overExp-ROP16<sub>I</sub> 组 pTyr705-STAT3 蛋白相对表达水平显著高于对照组 ( $P<0.01$ ),过表达 overExp-ROP16<sub>II</sub> 组 p-NF-κB p65 蛋白相对表达水平显著高于对照组 ( $P<0.01$ )。结论 I 型和 II 型 ROP16 蛋白可促进 RAW 264.7 细胞增殖并抑制其凋亡。

**【关键词】** 刚地弓形虫; ROP16; RAW 264.7 细胞; 凋亡; STAT3; NF-κB

**【中图分类号】** R382.5

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2023)01-0030-07

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Jan;18(1):30-36.]

Effect of ROP16<sub>I/II</sub> protein of *Toxoplasma gondii* on apoptosis of RAW 264.7 cell and related mechanism

LI Jia-ming<sup>1</sup>, YANG Ning-ai<sup>2</sup>, WANG Pen-tao<sup>2</sup>, WANG Yi-xuan<sup>1</sup>, MA Hui-hui<sup>1</sup>, LIU Chun-lan<sup>1</sup>, LAN Min<sup>1</sup>, ZHAO Zhi-jun<sup>2,3</sup> (1. School of Clinical Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. Ningxia Key Laboratory of Pathogenic Microbiology; 3. Medical Experiment Center, General Hospital of Ningxia Medical University)\*\*\*

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effects of *Toxoplasma gondii* type I and II ROP16 proteins on the proliferation and apoptosis of mouse peritoneal macrophages RAW 264.7 cells and the related mechanisms. **Methods** RAW 264.7 cells were transfected with a recombinant lentiviral expression vector of *Toxoplasma gondii* type I and II ROP16, and monoclonal overexpression cell lines were obtained after puromycin screening and stabilization. qRT-PCR and Western blot were used to identify the overexpression effect, immunoluminescence assay to detect its localization, cck-8 assay to determine cell proliferation activity, and flow cytometry to detect apoptotic changes in cells. The relative expression levels of apoptosis-related proteins Caspase 3, Caspase 9, Bax, Bcl-2 and signalling pathway-related proteins pTyr705-STAT3, total-STAT3, p-NF-κB p65 and NF-κB p65 were detected by Western blot. Determination of the relative transcript levels of apoptosis-related genes Caspase 3, Caspase 9, Bax and Bcl-2 by qRT-PCR. **Results** Strong green fluorescence was observed after transfection of RAW 264.7 cells with the recombinant lentiviral expression vector, *rop16* gene transcription and protein expression were detected, and the protein was mainly localized in and around the nucleus of RAW 264.7 cells. cck-8 assay showed that both type I and II ROP16 proteins promoted the proliferation of RAW

\* **【基金项目】** 国家自然科学基金地区项目(No. 81560333); 宁夏自然科学基金项目(No. 2022AAC03547); 宁夏医科大学校级科研资助项目(No. XM2021037)。

\*\* **【通讯作者】** 赵志军, E-mail: z15815z@163.com

**【作者简介】** 李佳铭(1998-), 女, 宁夏中卫人, 在读硕士研究生。研究方向: 临床病原微生物与免疫学。E-mail: 1151143915@qq.com

264.7 cells. Flow cytometry assay showed that the apoptosis rate was  $(5.35 \pm 0.0529)\%$  in the overExp-ROP16<sub>I</sub> group and  $(5.2767 \pm 0.0651)\%$  in the overExp-ROP16<sub>II</sub> group, both of which were significantly lower than that of the blank control  $(10.4733 \pm 0.2178)\%$  and the empty vector control. Western blot and qRT-PCR showed that the expression of the pro-apoptotic factors Caspase 3, Caspase 9, Bax protein and their mRNAs were significantly increased in the overExp-ROP16<sub>I/II</sub> group, while the expression of the anti-apoptotic factor Bcl-2 protein and its mRNA were suppressed ( $P < 0.01$  for both). The relative expression levels of pTyr705-STAT3 protein were significantly higher in the overExp-ROP16<sub>I</sub> group ( $P < 0.01$ ) and p-NF- $\kappa$ B p65 protein in the overExp-ROP16<sub>II</sub> group ( $P < 0.01$ ) than in the control group by Western blot. **Conclusion** Type I and type II ROP16 proteins promote proliferation and inhibit apoptosis in RAW 264.7 cells.

**【Key words】** *Toxoplasma gondii*; ROP16; RAW 264.7 cells; Apoptosis; STAT3; NF- $\kappa$ B

弓形虫(*Toxoplasma gondii*)是专性细胞内寄生虫,能够感染包括人类在内的绝大多数温血动物,在所有有核细胞中入侵和复制。据估计,全世界约30%的人感染了这种寄生虫<sup>[1]</sup>。弓形虫感染在健康人通常无明显症状,在免疫功能低下者弓形虫感染则后果严重甚至可能会危及生命,子宫内感染可能会导致胎儿出现重大缺陷<sup>[2-3]</sup>。在北美和欧洲,大多数弓形虫株属于克隆型I、II、III和XI谱系<sup>[4]</sup>,这些克隆谱系在许多表型上不同,包括毒力、迁移、对宿主信号通路的调节和对宿主免疫反应的敏感性等<sup>[5]</sup>。这些虫株特异性在很大程度上依赖于弓形虫顶端细胞器分泌的蛋白—棒状体蛋白(ROPs)和致密颗粒(GRAs)<sup>[6]</sup>。已有研究证明,ROP16是弓形虫入侵的关键蛋白,在弓形虫的三个致病阶段(快速生长的速殖子、组织包囊中的缓殖子和卵囊中的子孢子)均有表达,并显示出高度的致病性和免疫原性<sup>[7]</sup>,是弓形虫病诊断和疫苗研制的非常有前景的候选分子。

弓形虫通过逃避和破坏免疫系统在宿主中建立终身慢性感染。巨噬细胞作为抗原提呈细胞,在先天免疫和获得性免疫之间存在交互作用。有证据表明,弓形虫在宿主体内优先以单核/巨噬细胞系细胞、树突状细胞和中性粒细胞为目标<sup>[8]</sup>。在宿主感染期间,弓形虫要处理许多不同的巨噬细胞亚群<sup>[9]</sup>。Olias等<sup>[10]</sup>报道巨噬细胞能够在被IFN- $\gamma$ 和由LPS或TNF- $\alpha$ 提供的第二信号激活后控制弓形虫复制。在弓形虫感染后宿主的免疫应答过程中,通常由巨噬细胞与弓形虫在细胞水平和分子水平的相互作用共同决定感染的进程和转归<sup>[11]</sup>。基于此,本研究使用小鼠腹腔巨噬细胞系RAW 264.7细胞构建稳定表达I型RH株、II型ME49株ROP16蛋白的细胞株,探讨弓形虫I、II型ROP16蛋白对RAW 264.7细胞增殖及凋亡的影响,以揭示弓形虫的免疫逃避机制。

## 材料与方 法

### 1 材 料

**1.1 细胞和毒株** RAW 264.7细胞购自上海名劭生

物科技有限公司;pHBLV-ROP16<sub>I/II</sub>慢病毒和pHBLV-CMV空载体对照慢病毒购自北京汉恒生物有限公司。

**1.2 主要试剂** DMEM培养基和胎牛血清购自以色列BI公司;嘌呤霉素购自美国Thermo Scientific公司;TRIzol试剂购于美国Invitrogen公司;反转录试剂盒和RT-PCR试剂盒购于日本TaKaRa公司;抗His-tag、pTyr705-STAT3、STAT3、NF- $\kappa$ B p65、p-NF- $\kappa$ B p65、Caspase9抗体购自英国Abcam公司;抗Caspase3、Bax、Bcl-2抗体购于武汉爱博泰克生物科技有限公司;家兔抗人 $\beta$ -actin抗体购自德国CST公司;HRP标记山羊抗家兔IgG(IgG-HRP)购自美国Proteintech公司;目的基因扩增引物(表1)由上海擎科生物科技有限公司合成;凋亡检测试剂盒购自杭州联科生物技术股份有限公司。

表 1 PCR 扩增引物  
Table 1 Primers used for PCR in this study

引物名称 Primer names	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')	
	Forward primer	Reverse primer
GAPDH	GGTTGTCCTCGACTTCA	TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC
rop 16	CGGCTGAAGTAGGTCTCGG	GGTGAAAGCTGGGTTTGGT
Bax	TTGCCTCTTACTTTGCTAG	CCATGATGGTTCTGATCAGCTC
Bcl-2	GATGACTTCTCTCGTCTAC	GAACCAAGAAGGCCAACAATC
Caspase 3	AACAAAATGATTCTGTGAGCCC	TTGACAAAATGCTTTTCCCTGAG
Caspase 9	TGTGAATATCTTCAACGGGAGC	GAGTAGGACACAAGGATGTCAC

## 2 方 法

**2.1 细胞培养** 小鼠腹腔巨噬细胞 RAW 264.7 细胞培养于 DMEM 培养基,附加 10% 热灭活胎牛血清、10 U/ml 青霉素、10  $\mu$ g/ml 链霉素。细胞在 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养,待细胞生长到 90% 左右进行传代,连续传代 3 代以上。

**2.2 稳转细胞系的构建** 将处于对数生长期的 RAW 264.7 细胞计数后稀释至  $1 \times 10^5$  个/ml,加入 96 孔板,100  $\mu$ l/孔。试验分为 3 组:空白对照组、空载体对照组、过表达组。按说明书推荐的感染复数值(MOI 值)范围设置不同 MOI 值进行试验确定最佳

MOI 值,向各组细胞中加入相应体积慢病毒,培养 72 h 后观察荧光信号强度。转染成功后,用含嘌呤霉素的完全培养基进行筛选,直至空载体对照组和过表达组中无死亡细胞,得到稳定表达 ROP16 的 RAW 264.7 细胞株。

**2.3 免疫荧光法检测 ROP16 在 RAW 264.7 细胞中的定位** 将处于对数生长期的空白对照组、空载体对照组、过表达组细胞分别接种到玻璃盖玻片上,24 h 观察爬片情况。爬片成功的细胞用 4% 多聚甲醛固定 15 min,用 0.5% Triton X-100 在 PBS 中透膜 5 min,用 2% BSA 封闭 1 h;加入 2% BSA 稀释的特异性一抗(His-tag 抗体),孵育后洗涤;加入抗鼠 IgG-Cy3 二抗,孵育后洗涤;加入 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DAPI 室温避光染色 10 min,荧光显微镜下观察。

**2.4 Western blot 检测促凋亡蛋白表达水平** 提取全蛋白并将其定量为等质量等体积的蛋白样品,100  $^{\circ}\text{C}$  水浴 15 min,经 8%~10% SDS-PAGE 电泳后转膜,封闭后依次加入一抗(His-tag、pTyr705-STAT3、STAT3、NF- $\kappa\text{B}$  p65、p-NF- $\kappa\text{B}$  p65、Caspase 9、Caspase 3、Bax、Bcl-2、 $\beta$ -actin)及 HRP 标记的二抗孵育,加入显色液显色后在凝胶成像仪上成像,使用 Image Lab 软件分析灰度值,并以内参  $\beta$ -actin 蛋白的表达进行归一化处理。

**2.5 PCR 检测 rop16 基因表达水平** 提取各组细胞 DNA 并检测其浓度及纯度。以 DNA 为模板 PCR 扩增目的基因。反应体系: Taq PCR Master Mix 10  $\mu\text{L}$ , DNA 1  $\mu\text{L}$ ,上、下游引物各 1  $\mu\text{L}$ ,无酶水补足 20  $\mu\text{L}$ 。反应条件:94  $^{\circ}\text{C}$  5 min;94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,55  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  50 s,共 32 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。取 PCR 扩增产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,鉴定 rop16 基因的表达情况。

**2.6 RT-PCR 检测细胞凋亡因子 mRNA 转录水平** 提取各组细胞的总 RNA 并逆转录为 cDNA。通过罗氏 480 实时荧光定量 PCR 仪检测靶基因的 mRNA 水平。反应条件:95  $^{\circ}\text{C}$  30 s;95  $^{\circ}\text{C}$  5 s,60  $^{\circ}\text{C}$  30 s,共 40 个循环;95  $^{\circ}\text{C}$  5 s,60  $^{\circ}\text{C}$  1 min,50  $^{\circ}\text{C}$  30 s。通过  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  计算分析不同组中各基因(表 1)相对靶 mRNA 水平,并与 GAPDH 基因的 mRNA 转录水平进行归一化处理。

**2.7 CCK-8 试验检测 RAW 264.7 细胞增殖情况** 将处于对数生长期的空白对照组、空载体对照组、ROP16 过表达组细胞接种于 96 孔板,密度为  $4 \times 10^3$  个/孔,分别于培养 0、6、24、48、72 h 时加入 10  $\mu\text{l}$  cck-8 试剂。37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1.5 h 后使用酶标仪测定细胞在 450 nm 处的吸光度( $A_{450}$ )值。

**2.8 流式细胞术检测 RAW 264.7 细胞凋亡情况**

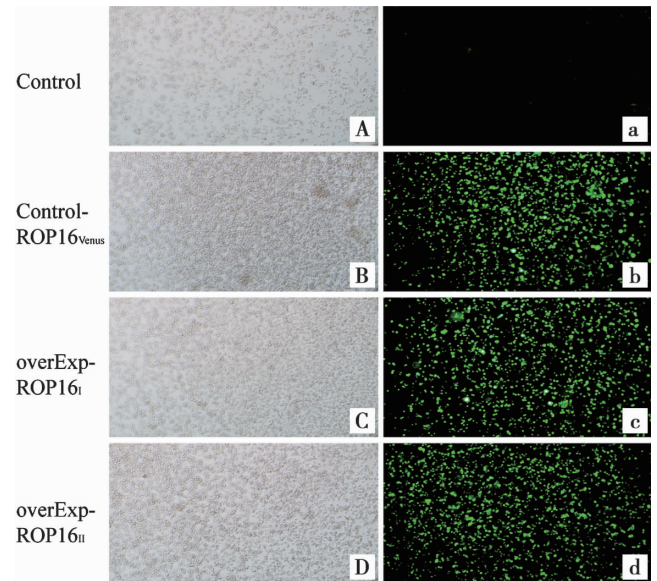
分别将处于对数生长期的空白对照组、空载体对照组、ROP16 过表达组细胞用 pH 7.4 的预冷 PBS 冲洗 2 次,收集  $(1 \sim 10) \times 10^5$  个细胞(包括培养上清中的细胞)。加入 500  $\mu\text{l}$  1  $\times$  Binding Buffer 重悬细胞,每管再加入 5  $\mu\text{l}$  Annexin V-APC 和 10  $\mu\text{l}$  7-AAD,轻柔涡旋混匀,室温避光孵育 5 min 后用流式细胞仪和 Cell Quest 软件在 1h 内对染色标本进行检测分析。

**2.9 统计学分析** 使用 Prism 9 进行统计学分析,通过单向或双向 ANOVA 以及成对或不配对  $t$  检验评估平均值间的差异性,检验水准为  $\alpha = 0.05$ 。

## 结果

### 1 ROP16 稳定转染细胞株的构建

分别用已包装的 pHBLV-ROP16<sub>I/II</sub> 慢病毒和 pHBLV-CMV 空载体对照慢病毒转染 RAW 264.7 细胞,72 h 后荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白高表达,pHBLV-CMV 空载体慢病毒及 pHBLV-ROP16<sub>I/II</sub> 慢病毒最佳感染复数均为 30(MOI=30)。细胞呈对数生长且状态良好时,用含嘌呤霉素的 DMEM 完全培养基进行筛选,1 周后荧光显微镜下观察视野中 90% 以上细胞均表达强绿色荧光(图 1),表明已成功构建稳定表达 ROP16<sub>I/II</sub> 和 pHBLV-CMV 空载体的 RAW 264.7 细胞株。



A-D 细胞形态(透射光,200 $\times$ ) a-d GFP 荧光表达情况(200 $\times$ )

图 1 稳定转染细胞株荧光蛋白表达情况

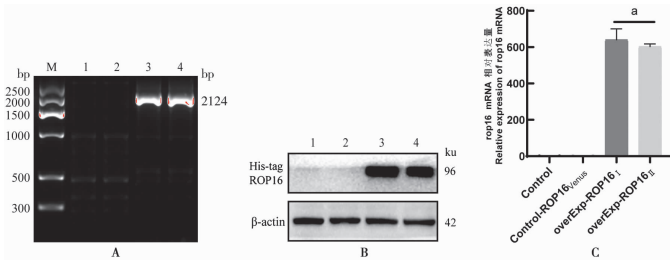
A-D Cell morphology (transmitted light, 200 $\times$ ) a-d GFP expression (fluorescence, 200 $\times$ )

Fig. 1 Fluorescence observation of stable cell lines

### 2 ROP16 在 RAW 264.7 细胞中的过表达情况

pHBLV-ROP16<sub>I/II</sub> 过表达载体转染 RAW 264.7 细胞后时行 PCR 检测,结果显示过表达组(overExp-ROP16<sub>I/II</sub>)均表达 rop16 基因(图 2A);Western blot

检测过表达组(overExp-ROP16<sub>I/II</sub>)ROP16蛋白相对表达水平较空白对照组和空载体对照组显著上调( $F=4935, P<0.01$ )(图2B); RT-PCR检测过表达组(overExp-ROP16<sub>I/II</sub>)rop16基因相对转录水平较空白对照组和空载体对照组显著上调( $F=273.2, P<0.01$ )(图2C)。表明ROP16<sub>I/II</sub>均在RAW 264.7细胞中稳定表达。



A、B 分别为 PCR 鉴定 rop16 基因表达和 Western blot 检测 ROP16 蛋白表达 M DNA 标志物 1 空白对照组 2 空载体 ROP16<sub>Venus</sub> 对照组 3 OverExp-ROP16<sub>I</sub> 过表达组 4 OverExp-ROP16<sub>II</sub> 过表达组 C RT-PCR 检测 rop16 基因转录(a 与 Control 组及 Control-ROP16<sub>Venus</sub> 组相比较,  $P<0.01$ )

图 2 RAW 264.7 细胞中 rop16 基因的转录和表达鉴定

A、B are used to identify rop 16 gene expression by PCR and Western blot to detect ROP 16 protein expression M DNA marker 1 Empty control group (Control) 2 Empty vector control group (Control-ROP16<sub>Venus</sub>) 3 Overexpression group (overExp-ROP16<sub>I</sub>) 4 Overexpression group (overExp-ROP16<sub>II</sub>) C The rop16 gene transcription was determined by RT-PCR (a Compared with Control group and Control-ROP16<sub>Venus</sub> group,  $P<0.01$ ).

Fig. 2 Identification of rop16 transcription and translation in RAW 264.7 cells

### 3 ROP16 在 RAW 264.7 细胞中的定位

用 DAPI 试剂对细胞核进行标记(蓝色荧光),用 His-tag 抗体对 ROP16<sub>I/II</sub> 蛋白进行标记(红色荧光),以空白对照组与空载体对照组为对照,激光共聚焦显微镜下观察。结果显示,空白对照组和空载体对照组无红色荧光,过表达组细胞中可见红色荧光且主要聚集在 RAW 264.7 细胞核,表明 ROP16<sub>I/II</sub> 在 RAW 264.7 细胞中过表达,且主要定位于细胞核(图 3)。

### 4 ROP16 过表达对 RAW 264.7 细胞增殖的影响

表 2 ROP16 过表达对 RAW 264.7 细胞增殖(A<sub>450</sub> 值)和凋亡(%)的影响

Table 2 Effects of ROP16 overexpression on the proliferation (A<sub>450</sub> value) and apoptosis(%) of RAW 264.7 cells

组别 Group	A <sub>450</sub> 值( $\bar{x}\pm s$ )					细胞凋亡(%) Apoptosis rate(%)
	0h	6h	24h	48h	72h	
Control	0.326±0.001	0.3843±0.0021	0.3663±0.0038	0.5147±0.0162	0.7337±0.0099	10.4733±0.2178
Control-ROP16 <sub>Venus</sub>	0.3187±0.0083	0.4023±0.0012	0.416±0.0095	0.5147±0.0162	0.736±0.009	10.6533±0.0702
OverExp-ROP16 <sub>I</sub>	0.309±0.0115	0.368±0.0061	0.49±0.0036	0.822±0.0026	1.2383±0.0165	5.35±0.0529 <sup>a</sup>
OverExp-ROP16 <sub>II</sub>	0.316±0.0204	0.3773±0.0021	0.4473±0.0067	0.7257±0.04	0.997±0.0082	5.2767±0.0651 <sup>a</sup>

注:a 同空白对照组与空载体对照组相比,  $P<0.01$ 。

### 5 ROP16 过表达对 RAW 264.7 细胞凋亡的影响

流式细胞检测显示, overExp-ROP16<sub>I</sub> 组细胞凋亡率为(5.35±0.0529)%, overExp-ROP16<sub>II</sub> 组凋亡率为(5.2767±0.0651)%,与空白对照组(10.4733±

CCK-8 试验显示, 各组细胞培养不同时间, ROP16<sub>I/II</sub> 蛋白对 RAW264.7 细胞的增殖表现为不同程度的促进作用, 呈时间依赖性。24 h 后, 同空白对照组和空载体对照组相比, 稳定表达 ROP16<sub>I/II</sub> 的 RAW 264.7 细胞活力均显著升高( $F$  值分别为 221、294、8681, 均  $P<0.01$ )(表 2, 图 4)。表明 ROP16<sub>I/II</sub> 蛋白均对 RAW 264.7 细胞的增殖具有较强的促进作用。

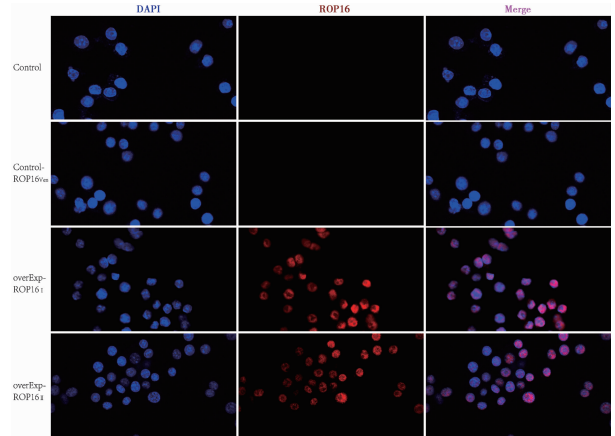
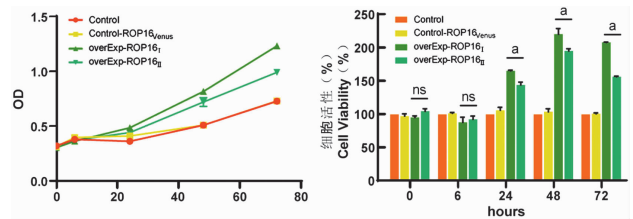


图 3 免疫荧光法检测 ROP16 在 RAW 264.7 细胞中的定位(600×)

Fig. 3 Localization of ROP16 in RAW 264.7 cells as measured by immunofluorescence(600×)



注: ns 与 Control 组及 Control-ROP16<sub>Venus</sub> 组比较,  $P>0.05$ ; a 与 Control 组及 Control-ROP16<sub>Venus</sub> 组比较,  $P<0.01$ 。

图 4 cck-8 检测 ROP16 过表达后 RAW 264.7 细胞增殖

Notes: ns Compared with the Control and Control-ROP16<sub>Venus</sub> groups,  $P>0.05$ ; a Compared with the Control and Control-ROP16<sub>Venus</sub> groups,  $P<0.01$ .

Fig. 4 RAW 264.7 cell proliferation was measured by cck-8 after ROP16 overexpression

0.2178)%和空载体对照组(10.6533±0.0702)%比较差异均有统计学意义( $F=1857, P<0.01$ )(表 2, 图 5)。Western blot 检测 ROP16 过表达组(overExp-ROP16<sub>I/II</sub>)细胞中促凋亡蛋白 Bax、Caspase 3、

Caspase 9 的相对表达水平均较空白对照组和空载体对照组显著降低( $F$  值分别为 19.1、532.7、149.6, 均  $P < 0.01$ ), 抑制凋亡蛋白 Bcl-2 相对表达水平显著升高( $F = 2021, P < 0.01$ ), Bax/Bcl-2 相对表达水平显著降低( $F = 668.6, P < 0.01$ )(图 6)。RT-PCR 检测 ROP16 过表达组(overExp-ROP16<sub>I/II</sub>)细胞中促凋亡蛋白 Bax、Caspase3、Caspase9 基因的相对转录水平均低于对照组( $F$  值分别为 335.6、173.9、178.6, 均  $P < 0.01$ ), 抑凋亡蛋白 Bcl-2 基因的相对转录水平高于对照组( $F = 59.81, P < 0.01$ ), Bax/Bcl-2 低于对照组( $F = 247.7, P < 0.01$ )(图 7), 与 Western blot 结果一致。表明 ROP16<sub>I/II</sub> 蛋白可保护 RAW 264.7 细胞, 抑制其凋亡。

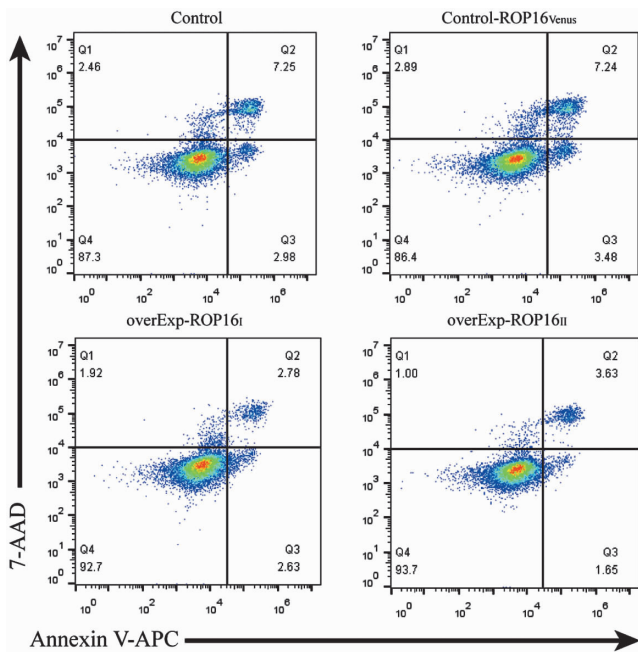
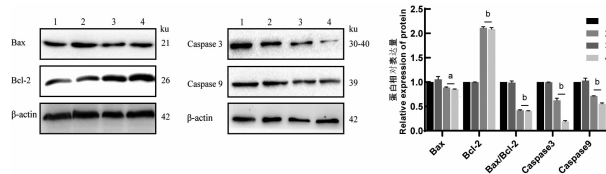


图 5 流式细胞术检测 ROP16 过表达后 RAW 264.7 细胞凋亡情况  
Fig. 5 Apoptosis of RAW 264.7 cells after ROP16 overexpression was determined by flow cytometry

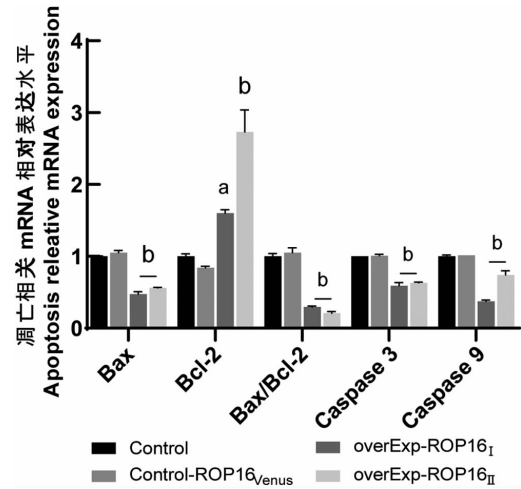


1 空白对照组 2 空载体 ROP16<sub>Venus</sub> 对照组 3 OverExp-ROP16<sub>I</sub> 过表达组 4 OverExp-ROP16<sub>II</sub> 过表达组 注:a 与 Control 组及 Control-ROP16<sub>Venus</sub> 组比较,  $P < 0.05$ ; b 与 Control 组及 Control-ROP16<sub>Venus</sub> 组比较,  $P < 0.01$ 。

图 6 Western blot 检测 ROP16 过表达后 RAW 264.7 细胞凋亡蛋白的表达

1 Empty control group (Control) 2 Empty vector control group (Control-ROP16<sub>Venus</sub>) 3 Overexpression group (overExp-ROP16<sub>I</sub>) 4 Overexpression group (overExp-ROP16<sub>II</sub>) Notes: a Compared with control group and control-ROP16<sub>Venus</sub> group,  $P < 0.05$ ; b Compared with control group and control-ROP16<sub>Venus</sub> group,  $P < 0.01$ .

Fig. 6 Western blot analysis of apoptotic protein expression in RAW 264.7 cells after ROP16 overexpression



注:a 与 Control 组及 Control-ROP16<sub>Venus</sub> 组比较,  $P < 0.05$ ; b 与 Control 组及 Control-ROP16<sub>Venus</sub> 组比较,  $P < 0.01$ 。

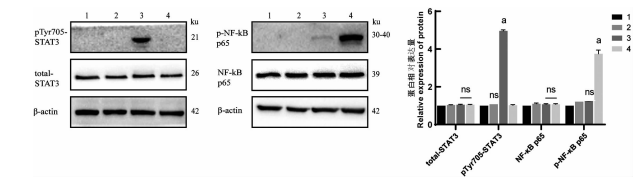
图 7 RT-PCR 检测 ROP16 过表达后 RAW 264.7 细胞凋亡因子 mRNA 转录水平

Notes: a Compared with Control group and Control-ROP16<sub>Venus</sub> group,  $P < 0.05$ ; b Compared with Control group and Control-ROP16<sub>Venus</sub> group,  $P < 0.01$ .

Fig. 7 Expression of apoptosis factors in RAW 264.7 cells after ROP16 overexpression

## 6 ROP16 过表达后 RAW 264.7 细胞相关信号通路变化

Western blot 检测显示, 空载体对照组 STAT3、pTyr705-STAT3、NF- $\kappa$ B p65、p-NF- $\kappa$ B p65 蛋白相对表达水平与空白对照组相比差异无统计学意义( $t$  值分别为 3.419、4.262、3.771、1.445,  $P > 0.05$ , 图 8); overExp-ROP16<sub>I</sub> 过表达组 pTyr705-STAT3 蛋白相对表达水平显著高于对照组( $F = 7142, P < 0.01$ , 图 8), 过表达组(overExp-ROP16<sub>II</sub>) p-NF- $\kappa$ B p65 蛋白相对表达水平显著高于对照组( $F = 330.8, P < 0.01$ , 图 8)。表明 ROP16<sub>I</sub> 蛋白可磷酸化 Tyr705-STAT3, ROP16<sub>II</sub> 蛋白可磷酸化 NF- $\kappa$ B p65。



1 空白对照组 2 空载体 ROP16<sub>Venus</sub> 对照组 3 OverExp-ROP16<sub>I</sub> 过表达组 4 OverExp-ROP16<sub>II</sub> 过表达组 注:ns 与 Control 组及 Control-ROP16<sub>Venus</sub> 组比较,  $P > 0.05$ ; a 与 Control 组及 Control-ROP16<sub>Venus</sub> 组比较,  $P < 0.01$ 。

图 8 Western blot 检测 ROP16 过表达后 RAW 264.7 细胞信号通路蛋白的表达

1 Empty control group (Control) 2 Empty vector control group (Control-ROP16<sub>Venus</sub>) 3 Overexpression group (overExp-ROP16<sub>I</sub>) 4 Overexpression group (overExp-ROP16<sub>II</sub>) Note: ns Compared with Control group and Control-ROP16<sub>Venus</sub> group,  $P > 0.05$ ; a Compared with Control group and Control-ROP16<sub>Venus</sub> group,  $P < 0.01$ .

Fig. 8 Western-blot expression of RAW 264.7 cells after ROP16 overexpression

## 讨 论

弓形虫入侵宿主细胞是虫体蛋白和宿主蛋白等多种因子相互作用的过程。ROPs 由弓形虫顶端细胞器分泌,包括两个家族:ROP1 和 ROP2 蛋白家族<sup>[12]</sup>。大部分 ROP2 家族成员在虫体入侵时定位于纳虫空泡膜(Parasitophorous vacuole membrane, PVM),辅助纳虫空泡(PV)的形成<sup>[13]</sup>,联系宿主细胞和 PV。Saeij 等<sup>[14]</sup>报道 ROP16 可在 10 min 内从棒状体迅速分泌到宿主细胞核,在 10 min 至 4 h 可检测到较强的荧光信号,且在 24 h 时仍能看到。该研究还发现 ROP16 分泌到宿主细胞核的浓度与胞内 PV 数量呈正相关,但与入侵虫体总数无关。Mukhopadhyay 等<sup>[15]</sup>的研究表明 ROP16 在巨噬细胞功能的调节中起主要作用。本研究分别用 RH 株 ROP16(ROP16<sub>I</sub>)和 ME49 株 ROP16(ROP16<sub>II</sub>)过表达慢病毒转染小鼠腹腔巨噬细胞 RAW 264. 7,发现 ROP16<sub>I/II</sub> 在 RAW 264. 7 细胞中稳定表达并主要定位于宿主细胞核,为进一步研究 ROP16 与巨噬细胞的相互作用机制奠定了基础。

ROP16 在入侵早期即可被迅速分泌到宿主细胞内,并通过核易位序列迅速转移到宿主细胞核内<sup>[16]</sup>,其序列存在丝氨酸/苏氨酸激酶区域,可发挥其蛋白激酶活性,参与宿主细胞内信号转导和转录激活因子(STAT)的磷酸化,干扰宿主细胞内信号通路传导,进而操纵宿主免疫反应,影响宿主细胞的增殖、分化和凋亡等功能<sup>[17-18]</sup>,从而决定寄生虫的毒力和感染后果<sup>[19]</sup>。ROP16 基因序列存在多态性,II 型与 I、III 型虫株等位基因核酸序列同源性存在差异<sup>[13,18]</sup>。Jensen 等<sup>[20]</sup>的研究证明,I 型和 III 型虫株激活 STAT3,导致 M2 巨噬细胞激活和炎症抑制,II 型虫株激活核转录因子 kB(NF-kB),导致 M1 巨噬细胞激活和炎症反应激活<sup>[9]</sup>。Yamamoto 等<sup>[17]</sup>的研究表明,I 型虫株的 ROP16 进入宿主细胞后会结合并磷酸化 Tyr705-STAT3,进而影响宿主的免疫反应以及宿主细胞的增殖、分化等。本研究中 RAW264. 7 细胞过表达 ROP16<sub>I</sub> 蛋白后胞内 pTyr705-STAT3 表达升高,RAW264. 7 细胞过表达 ROP16<sub>II</sub> 蛋白后胞内 p-NF-κB p65 表达升高,提示 RH 株 ROP16 诱导 STAT3 Tyr705 被激活磷酸化发挥相应功能,而 ME49 株 ROP16 诱导 NF-κB p65 被激活磷酸化发挥相应功能。

细胞增殖是生物体生长、发育、繁殖以及遗传的基础,细胞凋亡是由细胞基因表达模式的改变和翻译后修饰激活的程序性细胞死亡<sup>[21]</sup>。在分子水平上了解细胞凋亡和其他程序性细胞死亡的机制,可以更深入地了解各种疾病过程,从而可能影响治疗策略<sup>[22]</sup>。

Nash 等<sup>[23]</sup>曾经证实弓形虫入侵宿主细胞后宿主细胞具有明显的抗凋亡性,这一观点后来也被大量研究所证明。Caspase 级联反应在细胞凋亡中发挥重要调控作用,Caspase 在凋亡的作用下首先激活启动型 Caspase 引发 Caspase 级联反应,然后通过活化的执行型 Caspase 裂解导致,Caspase 9 作为关键的细胞凋亡启动者,收到信号后能通过自剪接而激活,进而产生 Caspase 级联反应。Caspase3 作为关键的调控分子,收到上游凋亡信号后被活化,生成 cleaved-Caspase 3,进而执行细胞凋亡<sup>[24-25]</sup>。本研究结果表明,在 RAW 264. 7 细胞中,ROP16<sub>I/II</sub> 蛋白均可减少细胞凋亡并抑制 Caspase 3、Caspase 9 的表达,提示该棒状体蛋白可能通过直接或间接调控 Caspase 级联反应来影响巨噬细胞凋亡。

此外,细胞凋亡过程中的早期变化与 Bcl-2 蛋白家族成员介导的线粒体变化有关,包括促凋亡的 Bax 蛋白和抗凋亡的 Bcl-2 蛋白。Jia 等<sup>[26]</sup>的研究表明,激活 STAT3 信号通路在诱发癌症细胞的产生、发展、侵袭与转化过程中起着举足轻重的作用。磷酸化后转位到细胞核的 STAT3 通过调控线粒体功能影响细胞进程,激活调节靶蛋白 Bax、Bcl-2 及细胞周期蛋白 D1 的表达,这些蛋白可以调节细胞增殖和凋亡,从而介导宿主细胞的启动、侵袭和进展<sup>[27]</sup>。此外,NF-κB 也在降低弓形虫引起的细胞凋亡中起一定作用<sup>[28]</sup>。本研究结果显示,ROP16<sub>I/II</sub> 蛋白分别能够诱导 Tyr705-STAT3、NF-κB p65 磷酸化,控制促凋亡蛋白 Bax 基因的表达,促进抗凋亡蛋白 Bcl-2 基因的表达,利用下调 Bax/Bcl-2 来控制巨噬细胞凋亡。

综上所述,ROP16<sub>I</sub> 蛋白能够诱导 Tyr705-STAT3 磷酸化,ROP16<sub>II</sub> 蛋白能够诱导 NF-κB p65 磷酸化,促进宿主细胞增殖,抑制宿主细胞凋亡。细胞凋亡被认为是一个受到严密调控的能量依赖性过程,虽然弓形虫感染后许多在凋亡途径中被激活或失活的关键凋亡蛋白已经被鉴定,但这些蛋白的作用或激活的分子机制并不完全清楚,是继续研究的重点。此外,细胞凋亡广泛参与弓形虫感染后的病理生理过程,在分子水平上了解细胞凋亡机制有助于更深入地了解弓形虫感染过程,从而可能影响治疗策略。

### 【参考文献】

- [1] Pappas G, Roussos N, Falagas ME. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis[J]. Int J Parasitol, 2009, 39(12): 1385-1394.
- [2] 孙慧, 王龙江, 李瑾, 等. 弓形虫微线蛋白 25 的生物信息学分析及其互作蛋白预测[J]. Ile, 2020, 11: 3-6.
- [3] Kim K, Weiss LM. Toxoplasma gondii: the model apicomplexan [J]. Int J Parasitol, 2004, 34(3): 423-432.

- [4] Lorenzi H, Khan A, Behnke MS, et al. Local admixture of amplified and diversified secreted pathogenesis determinants shapes mosaic *Toxoplasma gondii* genomes[J]. Nat Commun, 2016,7(1):1-13.
- [5] Saeij JPJ, Boyle JP, Boothroyd JC. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host[J]. Trends Parasitol, 2005,21(10):476-481.
- [6] Lima TS, Lodoen MB. Mechanisms of human innate immune evasion by *Toxoplasma gondii*[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019(9):103.
- [7] Zhang Y, Lai BS, Juhas M, et al. *Toxoplasma gondii* secretory proteins and their role in invasion and pathogenesis [J]. Microbiol Res, 2019,227:126293.
- [8] Chtanova T, Schaeffer M, Han SJ, et al. Dynamics of neutrophil migration in lymph nodes during infection[J]. Immunity, 2008, 29(3):487-496.
- [9] Geissmann F, Gordon S, Hume DA, et al. Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity[J]. Nat Rev Immunol, 2010,10(6):453-460.
- [10] Olias P, Etheridge RD, Zhang Y, et al. *Toxoplasma* effector recruits the Mi-2/NuRD complex to repress STAT1 transcription and block IFN- $\gamma$ -dependent gene expression[J]. Cell Host Microbe, 2016,20(1):72-82.
- [11] Boothroyd JC. Have it your way: how polymorphic, injected kinases and pseudokinases enable toxoplasma to subvert host defenses[J]. PLOS Pathog, 2013,9(4):e1003296.
- [12] Sabou M, Doderer-Lang C, Leyer C, et al. *Toxoplasma gondii* ROP16 kinase silences the cyclin B1 gene promoter by hijacking host cell UHRF1-dependent epigenetic pathways[J]. Cell Mol Life Sci, 2020,77(11):2141-2156.
- [13] 刘功振,王彬,王洪法. 弓形虫棒状体蛋白 ROP16 的研究进展 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2015,27(2):217-220.
- [14] Saeij JP, Coller S, Boyle JP, et al. *Toxoplasma* coopts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue[J]. Nature, 2007,445(7125):324-327.
- [15] Mukhopadhyay D, Saeij JPJ. Assays to Evaluate *Toxoplasma* Macrophage Interactions[M]//*Toxoplasma gondii*. Humana, New York, NY, 2020:347-370.
- [16] Chen L, Christian DA, Kochanowsky J A, et al. The *Toxoplasma gondii* virulence factor ROP16 acts in cis and trans, and suppresses T cell responses[J]. J Exp Med, 2020, 217(3).
- [17] Yamamoto M, Standley DM, Takashima S, et al. A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3[J]. J Exp Med, 2009,206(12):2747-2760.
- [18] 姜诗晨,魏海霞,何成,等. 刚地弓形虫入侵宿主细胞过程中棒状体蛋白 16 的分泌与分布[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2016,34(3):2.
- [19] Hakimi MA, Olias P, Sibley LD. *Toxoplasma* effectors targeting host signaling and transcription[J]. Clin Microbiol Rev, 2017, 30(3):615-645.
- [20] Jensen KDC, Wang Y, Wojno EDT, et al. *Toxoplasma* polymorphic effectors determine macrophage polarization and intestinal inflammation[J]. Cell Host Microbe, 2011,9(6):472-483.
- [21] Pietenpol JA, Stewart ZA. Cell cycle checkpoint signaling: Cell cycle arrest versus apoptosis[J]. Toxicol Lett, 2002(181):475-481.
- [22] Wu L, Wu L, Xi C, et al. *Toxoplasma Gondii* Rhoptyr Protein 16 (ROP16) Modifies Apoptosis in Human 293T Cells[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2020,20(1):24-30.
- [23] Nash PB, Burner MB, Leon RP, et al. *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis[J]. J Immunol, 1998,160(4):1824-1830.
- [24] Zhuang LK, Yang YT, Ma X, et al. MicroRNA-92b promotes hepatocellular carcinoma progression by targeting Smad7 and is mediated by long non-coding RNA XIST[J]. Cell Death Dis, 2016,7(4):e2203-e2203.
- [25] Pan Y, Hu J, Ma J, et al. MiR-193a-3p and miR-224 mediate renal cell carcinoma progression by targeting alpha-2, 3-sialyltransferase IV and the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt pathway[J]. Mol Carcinog, 2018,57(8):1067-1077.
- [26] Jia ZH, Jia Y, Guo FJ, et al. Phosphorylation of STAT3 at Tyr705 regulates MMP-9 production in epithelial ovarian cancer [J]. PloS one, 2017,12(8):e0183622.
- [27] Hirano T, Ishihara K, Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors[J]. Oncogene, 2000, 19(21):2548-2556.
- [28] 高德俊,常爽,单秀梅,等. 刚地弓形虫棒状体蛋白 ROP16 对小鼠脑神经细胞凋亡的影响[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2017,35(6):570-574.

【收稿日期】 2022-09-06 【修回日期】 2022-11-28