

LBP 基因沉默对 LPS 诱导水牛单核巨噬细胞炎症相关基因表达的影响^①

谢亮亮¹, 黄时海², 汤 龙¹,
韦英明¹, 石德顺¹, 李湘萍¹

1. 广西大学 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 南宁 530005;

2. 广西大学 生命科学与技术学院, 南宁 530005

摘要: 为了探讨抑制脂多糖结合蛋白(LBP)基因表达对水牛单核巨噬细胞在内毒素(LPS)诱导下炎症相关基因的表达, 首先采用三质粒慢病毒包装系统包装 *LBP* 基因 *shRNA* 重组质粒 pSicoR-GFP-*shLBP774*, 利用病毒颗粒感染水牛单核巨噬细胞, 进行荧光定量 qRT-PCR 及 ELISA 检测. 结果显示, 单核巨噬细胞在用 5×10^8 IU/mL 滴度的 *LBP-shRNA774* 慢病毒颗粒, 感染指数(MOI)为 300、感染 7 d 的条件下, 感染效率超过 50%. qRT-PCR 检测结果显示, 与 LPS 对照组相比, *shLBP774* 感染组可极显著抑制 *LBP* 基因的表达($p < 0.01$), *CD14*, *TLR4*, *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-8* 等基因表达显著降低($p < 0.05$). ELISA 检测结果发现, 与对照组相比, 细胞分泌的 *TNF- α* , *IL-1 β* 蛋白量显著降低($p < 0.05$). 以上结果表明, 抑制 *LBP* 基因表达可以有效降低 LPS 诱导下单核巨噬细胞炎症相关基因的表达, 进而调控 LPS 引发的炎症反应, 提示可将 *LBP* 作为靶基因深入研究水牛单核巨噬细胞免疫功能和 LPS 致炎信号传导分子机制.

关键词: 脂多糖结合蛋白; RNAi; 水牛; 单核巨噬细胞; LPS; 基因表达

中图分类号: S823.8⁺3

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2018)07-0009-09

先天免疫细胞包括单核巨噬细胞、树突细胞及 NK 细胞等, 在外周血中单核巨噬细胞来源丰富, 并作为先天免疫反应抵御病原体第一道防线. 外源及内源刺激如细菌均可诱导细胞炎性激活, 引发细胞因子级联释放, 触发炎症反应. 脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)构成革兰氏阴性菌细胞壁主要毒力因子^[1], 也是致炎及先天免疫的诱因^[2]. 脂多糖结合蛋白(LPS-binding protein, LBP)主要由肝脏合成、相对分子质量约为 6×10^4 大小, 因具有与 LPS 结合能力得名, 还能与活菌及病原体模式识别分子结合^[3]. 它不仅表达于肝细胞, 还包括呼吸道上皮细胞、肠道上皮细胞及人牙龈上皮细胞等^[4-5]. 它属于先天免疫系统的核心分子, 位于细胞 Toll 样模式识别受体 4(*TLR4*)的上游, 其 N 端结合革兰氏阴性菌 LPS 类脂 A, 形成 LPS/LBP 复合物, 将其运送至白细胞分化抗原(*CD14*)并被其识别和结合, 激活 *TLR4*, 启动胞内依赖髓样分化因子 88(*MYD88*)和非依赖 *MYD88* 路径信号传导, 促进 *I κ B* 磷酸化和降解, 刺激 *NF- κ B* 活化, 诱导早期促炎因子如 *IL-1 β* , *IL-6* 和 *TNF- α* 释放, 触发宿主先天免疫及炎症反应^[6-9], 严重时可致机体死亡.

① 收稿日期: 2018-05-22

基金项目: 农业部重大专项(2009ZX08007-009B); 广西创新驱动发展专项(AA17204051); 广西自然科学基金项目(2016GXNSFDA380030).

作者简介: 谢亮亮(1986-), 女, 博士研究生, 主要从事动物细胞与基因工程研究.

通信作者: 李湘萍, 研究员.

研究发现, LBP 可增强 LPS 对免疫细胞的诱导效应, 其高表达水平与多种炎症疾病密切相关, 可作为多种炎症疾病潜在生物标志物, 如败血症^[10]、类风湿关节炎^[11]、脂肪代谢综合征^[12-13]、帕金森^[14]等, 也可作为机体感染后外在表现指标。近来发现 LBP 基因多态性^[15]和甲基化^[16]亦与脂肪代谢、大肠杆菌感染等诊治联系紧密。一些涉及胃肠部位的炎症疾病如胰腺炎^[17], 可见非常高水平的 LBP 基因表达。Toddono 等^[18]报道发现, LBP(-/-)基因敲除小鼠通过介导 LBP/TLR4 信号通路, 对革兰氏阴性菌识别和致炎过程发生迟缓, 导致 LPS 刺激后未能释放细胞因子, 说明在该感染模型中 LBP 基因缺失对机体不利, LBP 基因在抵抗细菌引起感染中是必需的。Sun 等^[19]报道发现, 添加牛重组 LBP 蛋白可调节奶牛乳腺上皮细胞 LPS 致炎反应。Pretorius 等^[20]指出, 添加合适浓度的 LBP 可能被用来防治 2 型糖尿病。而 Fang 等^[21]发现 LBP 抑制肽(MP12 和 P1)阻塞 LBP 和 CD14 结合, 进而导致 NF- κ B 活性、促炎细胞因子 TNF- α 基因表达和蛋白分泌显著降低($p < 0.01$), 抵抗 LPS 诱发大鼠炎症。类似地, 最近报道指出新合成抗菌肽 AWRK6 在小鼠内毒素血症模型中可降低血清中 IL-1 β , IL-6 和 TNF- α 水平, 逆转 LPS 诱导 TLR4 高表达, 改善机体肝脏和肺损伤, 有效抑制 LPS 炎症反应^[22]。Huang 等^[23]借助 LBPshRNA 质粒转染 A549 细胞, 发现沉默 LBP 基因能抑制 p38 MAPK 和 p65 NF- κ B 活化, 从而改善 LPS 诱导大鼠肺损伤。总之, 采用基因敲除、重组 LBP 蛋白、LBP 抑制肽、LBPshRNA 瞬时转染等方法研究该基因功能, 虽在不同疾病模型中效果存在差异, 但都可调控免疫炎症反应, 在一定程度上降低促炎因子表达, 从而削弱过度炎症, 维持机体稳态。然而, 目前多数有关 LBP 基因的功能研究仅局限于鼠与人, 对大型家畜研究报道较少。

水牛(*Bubalus bubalis*)是我国南方具有重要经济价值的大型家畜^[24], 目前对影响其健康和生产力的病原体或寄生虫的免疫反应机制的研究进展十分有限, 关于其基因功能注释信息及免疫疾病研究相对较少。由于免疫系统与黄牛及奶牛存在物种差异^[25], 免疫相关分子信息挖掘亟待开展, 如 Toll 样受体、干扰素、细胞因子及受体等免疫分子信息大部分尚未解析。因此, 为了深入了解水牛 LBP 基因在 LPS 致炎反应中的作用及其致炎信号传导分子调控机制, 本研究以广西本地水牛外周血单核巨噬细胞为材料, 利用慢病毒包装并感染原代单核巨噬细胞, 研究体外靶向抑制水牛 LBP 基因表达对 LPS 诱导下炎症相关基因表达的影响, 为探究 LPS 致炎分子机制提供理论基础及水牛抗病育种提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

水牛外周血样采自广西大学牧场, 雌性健康水牛 3 年龄, 每头 80 mL。由 pSicoR-GFP, VSVG 和 NRF 组成的慢病毒载体包装系统 3 质粒, 293T 细胞系、重组质粒 pSicoR-GFP-LBPshRNA774(前期实验已验证该小 RNA 片段有抑制活性^[26])、pSicoR-GFP-1864(NC 阴性对照)均由本实验室保存。宿主菌为商品化大肠杆菌 DH5 α 菌株。红细胞裂解液购自康为世纪公司。TRIzol Reagent 购自 Invitrogen 公司。RPMI1640 基础培养液, 青链霉素混合液, FBS 血清购自 Gibco 公司。LPS 购自美国 Sigma 公司, Focill 分离液购自 STELL CELL 公司。PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成。牛细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β 的 ELISA 试剂盒购自南京奥青生物技术公司; SYBR Green PCR 试剂盒和逆转录试剂盒购自美国 Takara 公司。

1.2 慢病毒感染原代单核巨噬细胞方法

体外分离培养水牛原代单核巨噬细胞, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱贴壁培养 2~4 h 后, 洗去未贴壁细胞即可获得纯化的原代单核巨噬细胞, 培养 3~4 d, 单核巨噬细胞鉴定采用墨汁吞噬实验和 CD14 特异性抗原免疫组化等, 方法参见文献^[27], 细胞纯度和活性大于 95% 可用于后续实验。LBP-shRNA 绿色荧光蛋白(GFP)慢病毒表达载体由本实验室设计合成, 选取抑制效率最好者(基因位点 774)^[26]进行实验, 阴性对照采用无序片段 shRNA1864。慢病毒包装采用三质粒系统, 磷酸钙法进行扩增并高速离心进行滴度浓缩。绿色荧光便于观察病毒感染效率。慢病毒感染原代单核巨噬细胞的具体方法: 细胞接种于 12 孔板, 约 6×10^6 个/孔, 吸弃原培养上清液。每孔细胞中加入含慢病毒(MOI=300)的无血清培养

液, 置于 37 ℃, 5% CO₂ 培养箱培养 4~12 h, 弃上清, 换成含 10% FBS+2.5% 自体血清的培养液, 继续培养 5~7 d. 最后, 以终浓度为 1 μg/mL LPS 刺激 6 h. 收集细胞和培养上清液用于后续实验. *LBP*-shRNA774 慢病毒感染水牛单核巨噬细胞实验分为 6 组: ① 空白组 (Blank); ② LPS 刺激组 (LPS); ③ NC-shRNA1864 组 (NC); ④ NC-shRNA1864+LPS 组 (NC+LPS); ⑤ *LBP*-shRNA774 组 (774); ⑥ *LB*-PshRNA774+LPS 组 (774+LPS). 实验各重复 3 次.

1.3 荧光定量 PCR(real-time PCR)验证

采用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA. 以总 RNA 作为模板用于第一链 cDNA 的合成. 引物设计借助 Primer Premier 6.0 软件设计, 基因检测引物序列见表 1. Real-time PCR 操作方法按试剂盒说明书进行. 反应体系: Takara SYBR Green master mix (2×) 10 μL, 正、反义链引物各 0.5 μL, ROX solution 0.4 μL, DNA 模板 1 μL, 加灭菌蒸馏水至 20 μL. 在 ABI 7500 仪器中按两步法进行扩增: 第一步: 50 ℃ 2 min, 1 个循环; 第二步: 95 ℃ 5 min, 1 个循环; 95 ℃ 15 s, 40 个循环; 60 ℃ 60 s, 40 个循环. *GAPDH* 作为内参照. 检测结束后, 得到各样本的 *Ct* 值, 用实验组减去该组内参的 *Ct* 值, 得到 ΔC_t 值; 处理组所得 ΔC_t 值减去正常对照组的 ΔC_t 值, 得到 $\Delta\Delta C_t$ 值, 再用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算出各组相对表达.

表 1 基因引物序列

基因名称	引 物 序 列
<i>TNF-α</i>	5'-GCTCCAGAAGTTGCTTGTGC-3'; 5'-AACCAGAGGGCTGTTGATGG-3'
<i>IL-1β</i>	5'-CTTCATTGCCAGGTTTCTG-3'; 5'-CAGGTGTTGGATGCAGCTCT-3'
<i>IL-6</i>	5'-ATCAGAACACTGATCCAGATCC-3'; 5'-CAAGGTTTCTCAGGATGAGG-3'
<i>IL-8</i>	5'-AGAACTTCGATGCCAATGCAT-3'; 5'-GGGTTTAGGCAGACCTCGTTT-3'
<i>TLR4</i>	5'CTGCCTGAGAACCGAGAGTTG3'; 5'GCTCCATGCACTGGTAAC TAATGT3'
<i>CD14</i>	5'CCGTTCAGTGGTAATGGTTGC-3'; 5'TGGTGTGCGCTCCCTTGAG-3'
<i>MYD88</i>	5'CGCGACGACGTGCTGATGGA-3'; 5'TCGCTGGGGCAGTAGCAGATGA-3'
<i>MD-2</i>	5'-GAGTTGCCGAAGCGTAAG-3'; 5'-GCGGTGAATGATGGTGAA-3'
<i>IL-4</i>	5'-ACCAGCTGATCCCAGTGCTGGTC3'; 5'TGCTACAGGCAGCTCCATGCA-3'
<i>IFN-γ</i>	5'-CTCCGGCCTAACTCTCTCCT-3'; 5'-AGGCCCACCCTTAGCTACAT-3'
<i>IL-10</i>	5'-TGCGTTGGTTTGGATAGTGA-3'; 5'-AGACCAGAGGGGATGGAGTT-3'
18S	5'-TCGCGGAAGGATTTAAAGTG-3'; 5'-AAACGGCTACCACATCCAAG-3'
<i>GAPDH</i>	5'GGCGTGAACCACGAGAAGTATAA3'; 5'CCCTCCACGATGCCAAAGT3'

1.4 酶联免疫反应 (ELISA)

采用双抗体夹心酶联免疫技术检测细胞上清液 *TNF-α*, *IL-1β*, 操作过程按照南京奥青试剂盒说明书进行, 每份标本取 3 个复孔, 结果取均值. 实验重复 3 次.

1.5 数据统计分析

各目的基因的相对表达量采用 $\Delta\Delta C_t$ 法计算, 结果均用“平均值±标准差”表示, 其中各基因表达量结果均经内参基因校正, 数据采用 SPSS 18.0 统计软件进行 *t* 检验分析.

2 结 果

2.1 *LBP* shRNA 慢病毒感染细胞对目的基因抑制效果分析

原代单核巨噬细胞培养 24 h 后, 细胞完全贴壁, 多数成长梭状或多边形, 细胞边缘不平整, 会伸展出伪足, 呈不规则型. 在干扰慢病毒感染指数 MOI 为 300, 感染持续 7 d 的条件下, 利用荧光倒置显微镜观察细胞, 发现细胞内表达大量绿色荧光蛋白, 病毒感染效率约为 60% (图 1).

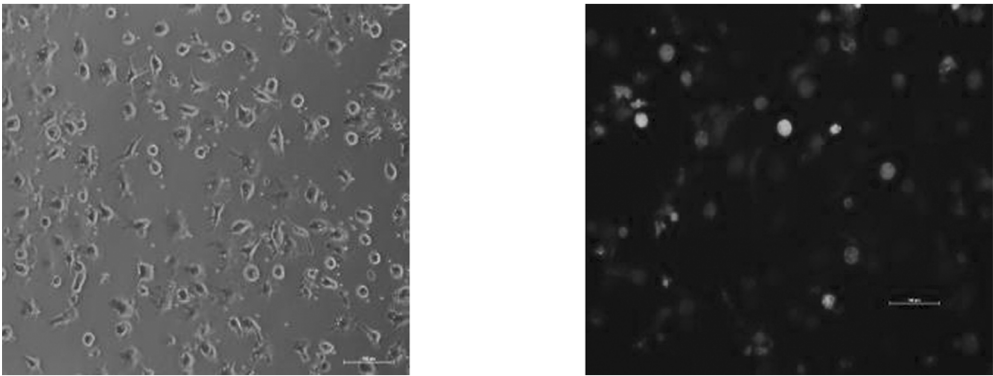
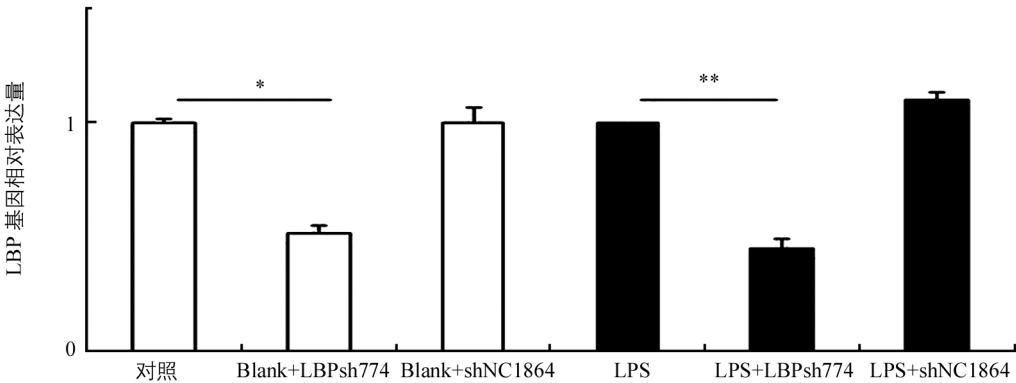


图 1 单核巨噬细胞病毒感染效率(100×)

收取慢病毒感染细胞进行荧光定量 PCR 检测, 结果发现与对照组比较, LBP shRNA774 组可显著抑制内源性 LBP 基因表达, 抑制率为 49.2%($p<0.05$); 而在 LPS 诱导下, 该组抑制率为 58.9%, 差异极具有统计学意义($p<0.01$)(图 2).

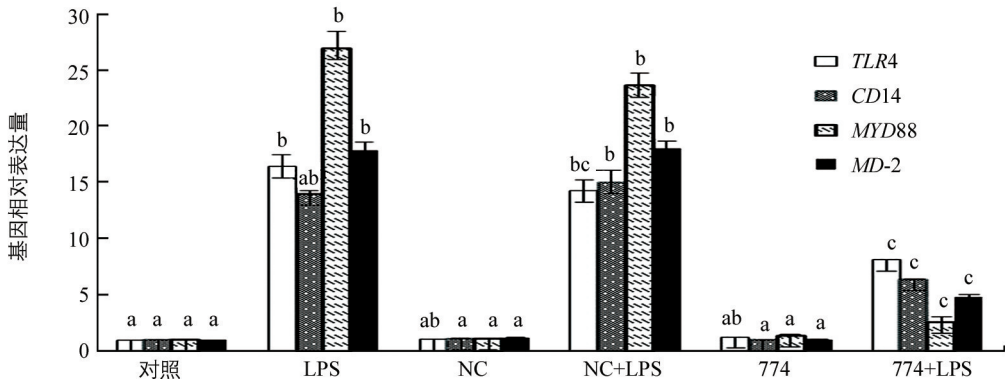


Note: * means $p<0.05$, compared with Blank; * * means $p<0.01$, compared with LPS.

图 2 LBPsh774 靶向沉默 LBP 基因抑制效果

2.2 干扰 LBP 基因表达对其下游相关基因表达的影响

采用 LBP shRNA 慢病毒感染水牛巨噬细胞, 收取各组细胞, 采用荧光定量 PCR 方法检测 LBP 信号通路下游基因表达. 结果发现, 在 LPS 诱导条件下, LBPsh774+LPS 组中 *TLR4*, *MYD88*, *CD14* 和 *MD-2* 基因表达均下调, 且差异具有统计学意义($p<0.05$); NC 组、774 组与对照组比差异不具有统计学意义(图 3).



不同字母表示差异具有统计学意义, $p<0.05$.

图 3 LBP 基因沉默下游相关蛋白基因表达量变化

2.3 干扰 *LBP* 基因表达对炎症细胞因子基因表达的影响

采用上述相同的方法, 对 *LBP* shRNA 慢病毒感染后水牛巨噬细胞中的炎症细胞因子进行定量分析. 结果表明, 在 LPS 诱导条件下, *LBP*sh774 处理组中的 *TNF- α* , *IL-6*, *IL-8*, *IL-1 β* 等促炎细胞因子表达大幅降低, 抑制 *LBP* 基因表达后, 抗炎因子 *IL-4* 表达显著上升, *IL-10* 及 *IFN- γ* 基因表达显著下降 ($p < 0.05$) (图 4).

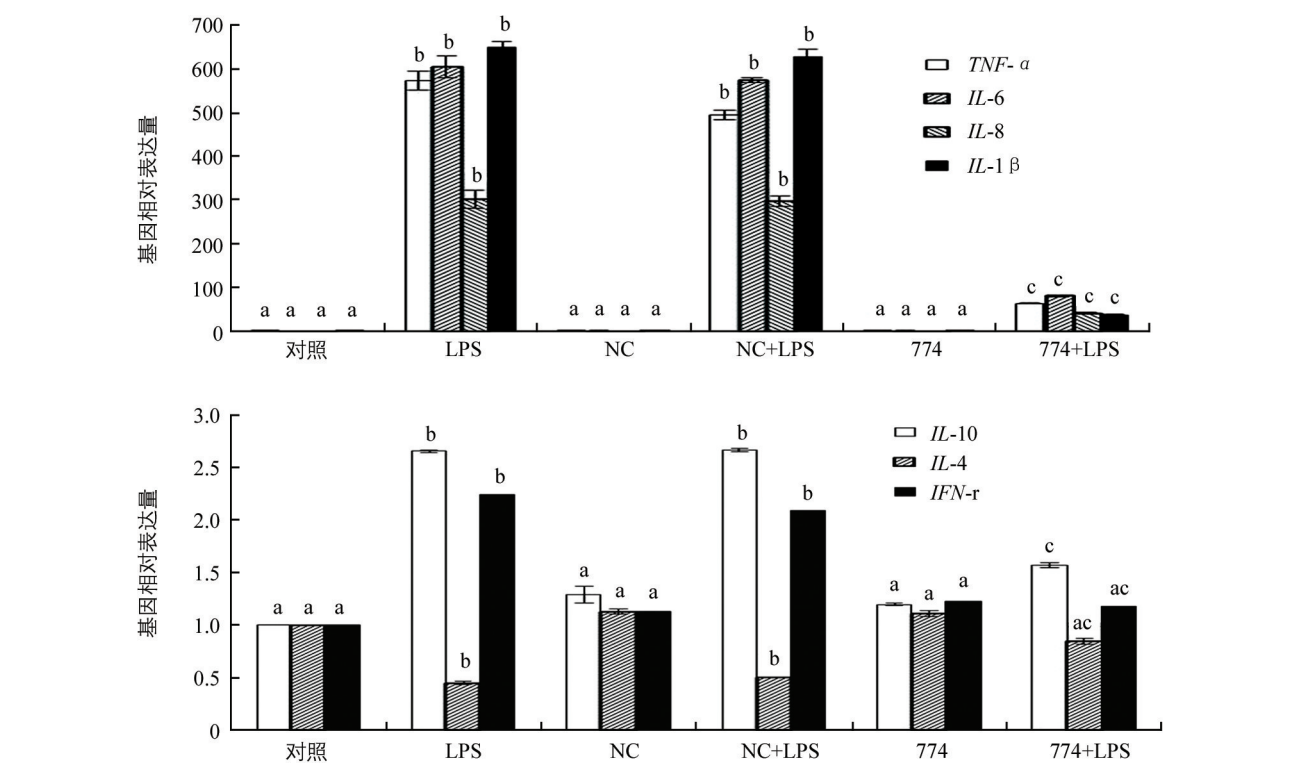


图 4 *LBP* 基因沉默对炎症细胞因子基因的表达影响

2.4 干扰 *LBP* 基因表达对细胞分泌 sLBP 蛋白的影响

对各实验组水牛单核巨噬细胞中可溶性 *LBP* 蛋白分泌水平进行检测, 经统计学分析发现, LPS 刺激下 *LBP*sh774 干扰组样品中 sLBP 蛋白浓度为 217.62 ng/mL, 仅为 LPS 组 (448.24 ng/mL) 的 48.54%, 分泌量极显著降低 ($p < 0.01$), 这与该基因定量 PCR 分析结果一致; NC 组与对照组相比, sLBP 蛋白量稍有上升, 但差异不具有统计学意义 (图 5).

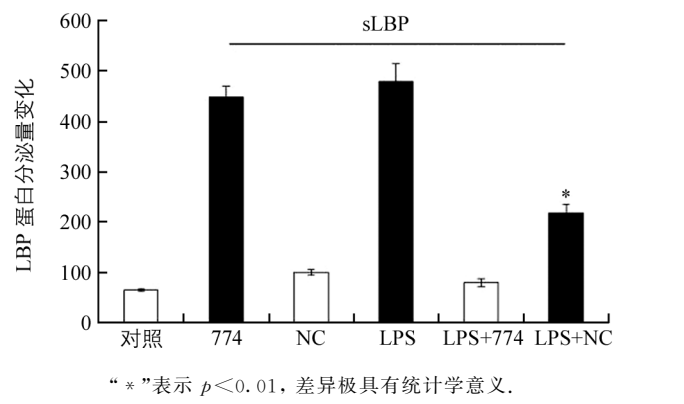
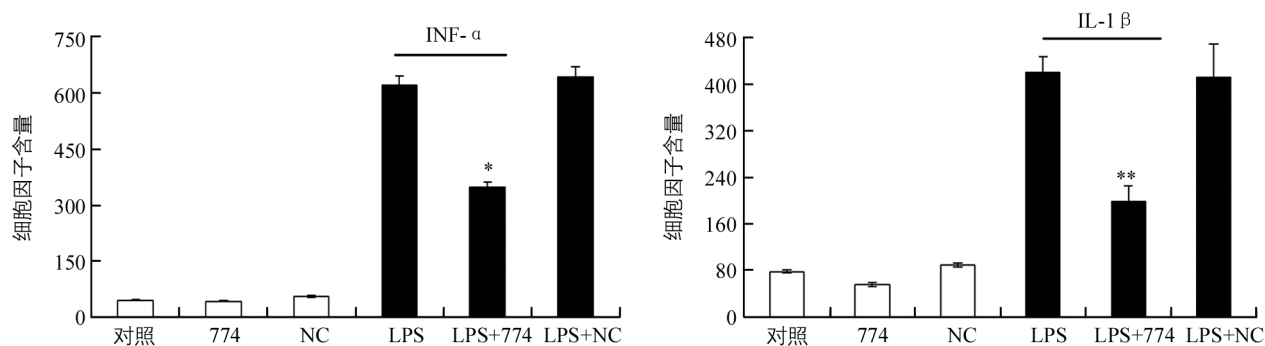


图 5 ELISA 方法检测上清液中 sLBP 蛋白的浓度

2.5 干扰 *LBP* 基因表达对 LPS 介导的 *TNF- α* 与 *IL-1 β* 蛋白分泌量的影响

收集细胞上清液, 采用 ELISA 方法检测实验各组细胞的 *TNF- α* 与 *IL-1 β* 蛋白分泌量. 结果表明, 与 LPS 组相比, *LBP* 基因沉默组 (LPS+shRNA774) 的促炎细胞因子 *TNF- α* 及 *IL-1 β* 蛋白分泌量分别为 (349.28 ± 15.31) pg/mL [vs (623.92 ± 36.23) pg/mL] 和 (198.39 ± 26.85) pg/mL [vs (407.64 ± 19.97) pg/mL], 均显著降低. 与对照组相比, NC 组和 774 组差异不具有统计学意义 (图 6).



* 表示 $p < 0.05$, 差异具有统计学意义; ** 表示 $p < 0.01$, 差异极具有统计学意义。

图 6 细胞因子 $TNF-\alpha$ 与 $IL-1\beta$ 分泌表达量变化

3 讨 论

单核-巨噬细胞对动物机体免疫至关重要, 对其进行疾病及药物研究等意义重大. 巨噬细胞来源于单核细胞, 作为先天免疫系统的重要效应细胞, 能识别和攻击外来入侵者. 目前体外培养单核巨噬细胞技术已经比较完善, 主要应用于免疫机制, 疾病模型及治疗的药物靶点等机制研究, 来源主要包括小鼠腹腔巨噬细胞、骨髓、小胶质细胞及鸡、羊、牛等外周血单核巨噬细胞等. 由于人、鼠与大型家畜之间存在物种及组织差异性^[28], 故本研究采用水牛原代外周血单核巨噬细胞为材料.

LBP 作为 TLRs 信号上游关键分子, 调控炎症反应, 与多种炎症疾病密切相关. 目前有关 *LBP* 的绝大多数研究是以小鼠和人为对象, 主要借助基因敲除小鼠、抑制肽、外源重组蛋白方法, 未见有利用慢病毒介导的 shRNA 干扰技术研究 *LBP* 基因在水牛抗炎方面的报道. 为此, 本研究以水牛单核巨噬细胞为材料, 采用慢病毒载体介导的 RNAi 技术抑制 *LBP* 基因表达, 分析在 LPS 诱导条件下, *LBP* 基因对 *LPS*/*TLR4* 信号通路相关基因表达的影响, 为深入了解该基因在 LPS 跨膜信号传导及致炎过程中的分子机制奠定基础.

为了探讨在 LPS 诱导条件下, *LBP* 基因沉默对水牛单核巨噬细胞 *TLR4* 信号通路关键基因表达的影响, 采用荧光定量 PCR 方法检测了 *LBP*, *CD14*, *TLR4* 基因表达, 发现干扰 *LBP* 基因表达后, *CD14*, *TLR4*, *MYD88* 基因表达量显著降低, 说明沉默 *LBP* 基因能有效抑制 *LPS*/*TLR4* 信号传导通路上游关键蛋白分子的表达, 进而阻滞 LPS 信号传导. Ren 等^[29]发现, 人源重组 LBP 蛋白可显著降低人牙龈纤维细胞 *IL-6* 及 *CD14* 表达, 抑制大肠杆菌 LPS 诱导 *IL-1\beta*, *TLR2/4* 的表达, 这与本实验结果基本一致.

细胞因子几乎涉及免疫和炎症的各个方面, 在免疫应答和激活宿主防御网络中发挥重要作用, 其活化后会发应级联反应. 为了研究 *LBP* 基因沉默对 *TLR4* 信号传导通路下游炎症细胞因子表达的作用, 我们定量检测了 *TNF-\alpha*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-1\beta* 等细胞因子的表达. 发现干扰 *LBP* 基因表达, 对 LPS 诱导的水牛单核巨噬细胞中 *TNF-\alpha*, *IL-6*, *IL-8* 和 *IL-1\beta* 促炎细胞因子产生抑制效果, 这与大多数报道发现的敲低或敲除 *LBP* 基因会抑制促炎相关细胞因子的表达、削弱疾病进程结果基本一致. 不同的是, 抗炎细胞因子 *IL-4* 表达显著上升, *IL-10* 及 *IFN-\gamma* 基因表达显著下降. 事实上, 许多细胞因子同时具有促炎和抗炎潜力, 由存在的免疫细胞和它们对细胞因子的应答状态来决定, 对于 *IL-10* 和 *IL-10* 相关基因尤其如此, 该家族高度多效. 再者, 巨噬细胞功能受局部组织环境和免疫应答类型的强烈影响, 其功能极化对机体抗病原菌感染及损伤修复的质量和效率很关键^[30]. 有报道指出, 干扰素对猪巨噬细胞表型和功能具有调节作用, *IFN-\gamma* 促进 LPS 诱导的 *IL-6* 和 *IL-12* 表达, 增强促炎性的 M1 型巨噬细胞极化^[30-31]. 笔者推测本实验中水牛 *IFN-\gamma* 基因表达降低, 可能对 LPS 刺激巨噬细胞 M1 型极化造成削弱, 抑制促炎因子基因表达, 说明 *LBP* 基因沉默可抑制巨噬细胞炎症反应, 维持细胞内稳态. 鉴于物种之间的差异性, 还需要深入探讨.

为了进一步研究 *LBP* 基因沉默对细胞因子蛋白分泌水平的影响, 本实验中采用 ELISA 方法检测细胞上清液 sLBP, TNF- α , IL-1 β 蛋白含量变化. 发现相对于 LPS 组, IL-1 β 表达量极显著降低, sLBP, TNF- α 含量也显著减少, 说明干扰组可不同程度地削减促炎细胞介质及 *LBP* 蛋白分泌量, 缓解炎症. 目前在临床上, 血清中 sLBP 作为多种炎症疾病如脓毒症^[32]、子宫内膜炎^[33]、帕金森^[34]、多囊卵巢综合征^[35]、肥胖^[36-37]、癌症^[38-39] 预测诊断标志物, 具有敏感性高、特异性强的优点, 与疾病发生发展进程紧密联系. Bonsale 等^[33] 发现, 亚临床型子宫内膜炎组的泌乳荷斯坦奶牛子宫内膜组织中的 TNF- α , IL-1 β , CXCL8 基因 mRNA 表达, 以及血浆中 TNF- α , sLBP 蛋白平均浓度均高于健康奶牛组, 这与我们的结果一致. 由此可见, 沉默水牛 *LBP* 基因对 LPS 刺激下的下游炎症相关基因核酸和蛋白水平平均产生抑制效果, *LPS/TLR4* 致炎信号传导受阻, 可有效控制机体炎症损伤, 维持机体稳态.

4 结 论

抑制水牛 *LBP* 基因表达对 LPS 诱导的单核巨噬细胞 *LPS/TLR4* 信号传导通路发挥抑制作用, 显著降低促炎因子表达, *LBP* 基因可作为靶基因进一步深入探讨其对水牛免疫应答的影响.

参考文献:

- [1] ROSADINI C V, KAGAN J C. Early Innate Immune Responses to Bacterial LPS [J]. Current Opinion in Immunology, 2017, 44: 14-19.
- [2] LUO Q, YANG X, YU S, et al. Structural Basis for Lipopolysaccharide Extraction by ABC Transporter LptB2FG [J]. Nat Struct Mol Biol, 2017, 24(5): 469-474.
- [3] HEUMANN D, LAUENER R, RYFFEL B. The Dual Role of LBP and CD14 in Response to Gram-Negative Bacteria or Gram-Negative Compounds [J]. J Endotoxin Res, 2003, 9(6): 381-384.
- [4] WEISS J. Bactericidal/Permeability-Increasing Protein (BPI) and Lipopolysaccharide-Binding Protein (LBP): Structure, Function and Regulation in Host Defence Against Gram-Negative Bacteria [J]. Biochem Soc Trans, 2003, 31(4): 785-790.
- [5] HU B, WEN C, ZHANG M, et al. Identification and Characterization of Two LBP/BPI Genes Involved in Innate Immunity from *Hyriopsis cumingii* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 60: 436-446.
- [6] KIM S J, KIM H M. Dynamic Lipopolysaccharide Transfer Cascade to TLR4/MD2 Complex Via LBP and CD14 [J]. BMB Rep, 2017, 50(2): 55-57.
- [7] LU Y C, YEH W C, OHASHI P S. LPS/TLR4 Signal Transduction Pathway [J]. Cytokine, 2008, 42(2): 145-151.
- [8] DING P H, JIN L J. The Role of Lipopolysaccharide-Binding Protein in Innate Immunity: a Revisit and Its Relevance to Oral/Periodontal Health [J]. Journal of Periodontal Research, 2014, 49(1): 1-9.
- [9] RYU J K, KIM S J, RAH S H, et al. Reconstruction of LPS Transfer Cascade Reveals Structural Determinants within LBP, CD14, and TLR4-MD2 for Efficient LPS Recognition and Transfer [J]. Immunity, 2017, 46(1): 38-50.
- [10] GONZALEZ-SARRIAS A, ROMO-VAQUERO M, GARCIA-VILLALBA R, et al. The Endotoxemia Marker Lipopolysaccharide-Binding Protein is Reduced in Overweight-Obese Subjects Consuming Pomegranate Extract by Modulating the Gut Microbiota: A Randomized Clinical Trial [J]. Mol Nutr Food Res, 2018, 62(11): e1800160.
- [11] KIM D, MUN S, LEE J, et al. Proteomics Analysis Reveals Differential Pattern of Widespread Protein Expression and Novel Role of Histidine-Rich Glycoprotein and Lipopolysaccharide-Binding Protein in Rheumatoid Arthritis [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 109: 704-710.
- [12] GONZALEZ-QUINTELA A, ALONSO M, CAMPOS J, et al. Determinants of Serum Concentrations of Lipopolysaccharide-Binding Protein (LBP) in the Adult Population: the Role of Obesity [J]. PLoS One, 2013, 8(1): e54600.
- [13] MORENO-NAVARRETE J M, JOVÉ M, PADRÓ T, et al. Adipocyte Lipopolysaccharide Binding Protein (LBP) is Linked to a Specific Lipidomic Signature [J]. Obesity, 2017, 25(2): 391-400.
- [14] PRETORIUS E, PAGE M J, MBOTWE S, et al. Lipopolysaccharide-Binding Protein (LBP) Can Reverse the Amyloid

- State of Fibrin Seen or Induced in Parkinson's Disease [J]. PLoS One, 2018, 13(3): e192121.
- [15] VILADÉS C, ESCOTÉ X, LÓPEZ-DUPLA M, et al. Involvement of the LPS-LPB-CD14-MD2-TLR4 Inflammation Pathway in HIV-1/HAART-Associated Lipodystrophy Syndrome (HALS) [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2014, 69(6): 1653—1659.
- [16] QIN W Y, GAN L N, SUN L, et al. LBP Gene Methylation Involved in mRNA Expression and Resistance to *E. coli* F18 in Weaned Piglets [J]. Pol J Vet Sci, 2017, 20(4): 643—650.
- [17] CHAND S K, SINGH R G, PENDHARKAR S A, et al. Interplay Between Innate Immunity and Iron Metabolism After Acute Pancreatitis [J]. Cytokine, 2018, 103: 90—98.
- [18] TADDONIO M A, DOLGACHEV V, BOSMANN M, et al. Influence of Lipopolysaccharide-Binding Protein on Pulmonary Inflammation in Gram-Negative Pneumonia [J]. Shock, 2015, 43(6): 612—619.
- [19] SUN Y, LI L, WU J, et al. Bovine Recombinant Lipopolysaccharide Binding Protein (BRLBP) Regulated Apoptosis and Inflammation Response in Lipopolysaccharide-Challenged Bovine Mammary Epithelial Cells (BMEC) [J]. Molecular Immunology, 2015, 65(2): 205—214.
- [20] PRETORIUS E, PAGE M J, ENGELBRECHT L, et al. Substantial Fibrin Amyloidogenesis in Type 2 Diabetes Assessed Using Amyloid-Selective Fluorescent Stains [J]. Cardiovascular Disbetology, 2017, 16(1): 141.
- [21] FANG L, XU Z, WANG G S, et al. Directed Evolution of an LBP/CD14 Inhibitory Peptide and Its Anti-Endotoxin Activity [J]. PLoS One, 2014, 9(7): e101406.
- [22] WANG Q, JIN L, WANG H, et al. AWRK6, A Synthetic Cationic Peptide Derived from Antimicrobial Peptide Dybowskin-2CDYa, Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(2): 600.
- [23] HUANG X, ZENG Y, JIANG Y, et al. Lipopolysaccharide-Binding Protein Downregulates Fractalkine through Activation of p38 MAPK and NF-kappaB [J]. Mediators Inflamm, 2017, 2017(12): 9734837.
- [24] WARRIACH H M, MCGILL D M, BUSH R D, et al. A Review of Recent Developments in Buffalo Reproduction-a Review [J]. Asian-Australas J Anim Sci, 2015, 28(3): 451—455.
- [25] YANG J, FU Z, HONG Y, et al. The Differential Expression of Immune Genes Between Water Buffalo and Yellow Cattle Determines Species-Specific Susceptibility to *Schistosoma Japonicum* Infection [J]. PLoS One, 2015, 10(6): e130344.
- [26] 路新梅, 李美青, 乔树叶, 等. 水牛脂多糖结合蛋白基因表达载体构建及其 shRNA 片段的筛选 [J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(7): 29—35.
- [27] LI X, LI M, HUANG S, et al. The Effect of Buffalo CD14 shRNA on the Gene Expression of TLR4 Signal Pathway in Buffalo Monocyte/Macrophages [J]. Cell Mol Biol Lett, 2014, 19(4): 623—637.
- [28] 杨月春, 王士勇, 李钟淑, 等. 延边黄牛体细胞核移植胚胎编码抗氧化酶基因表达研究 [J]. 江西农业大学学报, 2016, 38(4): 706—710.
- [29] REN L, LEUNG W K, LOO T W, et al. Lipopolysaccharide-Binding Protein Down-Regulates the Expression of Interleukin-6 by Human Gingival Fibroblast [J]. J Periodontal Res, 2005, 40(5): 407—416.
- [30] ZHU L, YANG T, LI L, et al. TSC1 Controls Macrophage Polarization to Prevent Inflammatory Disease [J]. Nat Commun, 2014, 5(5): 4696.
- [31] SAUTTER C A, AURAY G, PYTHON S, et al. Phenotypic and Functional Modulations of Porcine Macrophages by Interferons and Interleukin-4 [J]. Dev Comp Immunol, 2018, 84: 181—192.
- [32] MUSSAP M, NOTO A, FRAVEGA M, et al. Soluble CD14 Subtype Presepsin (sCD14-ST) and Lipopolysaccharide Binding Protein (LBP) in Neonatal Sepsis: New Clinical and Analytical Perspectives for Two Old Biomarkers [J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2011, 24(增 2): 12—14.
- [33] BONSALE R, SEYED S R, DIRANDEH E, et al. Endocannabinoids as Endometrial Inflammatory Markers in Lactating Holstein Cows [J]. Reprod Domest Anim, 2018, 53(3): 769—775.
- [34] PRETORIUS E, PAGE M J, MBOTWE S, et al. Lipopolysaccharide-Binding Protein (LBP) Can Reverse the Amyloid State of Fibrin Seen or Induced in Parkinson's Disease [J]. PLoS One, 2018, 13(3): e192121.
- [35] ZHU Q, ZHOU H, ZHANG A, et al. Serum LBP Is Associated with Insulin Resistance in Women with PCOS [J].

PLoS One, 2016, 11(1): e145337.

[36] MORENO-NAVARRETE J M, BLASCO G, PUIG J, et al. Neuroinflammation in Obesity: Circulating Lipopolysaccharide-Binding Protein Associates with Brain Structure and Cognitive Performance [J]. Int J Obes (Lond), 2017, 41(11): 1627–1635.

[37] OTT B, SKURK T, HASTREITER L, et al. Effect of Caloric Restriction on Gut Permeability, Inflammation Markers, and Fecal Microbiota in Obese Women [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 11955.

[38] GARCÍA DE GUADIANA-ROMUALDO L, ESPAÑOL-MORALES I, CEREZUELA-FUENTES P, et al. Value of Lipopolysaccharide Binding Protein as Diagnostic Marker of Infection in Adult Cancer Patients with Febrile Neutropenia: Comparison with C-Reactive Protein, Procalcitonin, and Interleukin 6 [J]. Supportive Care in Cancer, 2015, 23(7): 2175–2182.

[39] CITRONBERG J S, WILKENS L R, LE MARCHAND L, et al. Plasma Lipopolysaccharide-Binding Protein and Colorectal Cancer Risk: a Nested Case-Control Study in the Multiethnic Cohort [J]. Cancer Causes Control, 2018, 29(1): 115–123.

Effects of LBP Gene Silencing on Gene Expression in Water Buffalo Monocyte-Macrophages Post-LPS Stimulation

XIE Liang-liang¹, HUANG Shi-hai², TANG Long¹,
WEI Ying-ming¹, SHI De-shun¹, LI Xiang-ping¹

1. State Key Laboratory of Subtropical Bioresource Conservation and Utilization at Guangxi University, Nanning 530005, China;
2. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China

Abstract: In order to investigate the effect of inhibition of LBP (lipopolysaccharide binding protein) gene expression on LPS-induced expression of macrophage inflammatory genes in buffalo mononuclear macrophages, LBP-shRNA 774 recombinant plasmid was used to package the virus, and the suitable conditions for target cell infection were explored. Then inflammation-related genes in virus-infected cells were detected with the qRT-PCR and ELISA methods. The results showed that the virus titer of LBP-shRNA774 was $> 5 \times 10^8$ IU/mL, MOI was 300, and after 7 days, the infection rate was more than 50%. qRT-PCR showed that compared with the LPS control group, the mRNA level of LBP gene was reduced by 50%, meanwhile CD14, TLR4, TNF- α , IL-1 β and IL-8 were decreased significantly ($p < 0.05$). ELISA demonstrated that the contents of cytokine TNF- α and of IL-1 β in the LBP-shRNA774 group were significantly lower than in the LPS control group ($p < 0.05$). Also, the content of soluble LBP (s LBP) protein was significantly lower ($p < 0.05$), only accounting for 48.54%. The above results suggested that inhibition of LBP gene expression can effectively reduce the expression of LPS-induced inflammation-related genes of monocyte-macrophage, and regulate the LPS-induced inflammatory response.

Key words: lipopolysaccharide binding protein (LBP); RNAi; water buffalo (*Bubalus bubalis*); monocyte-macrophages; lipopolysaccharides (LPS); gene expression

