

赵为民,涂 枫,王 丽,等. 猪 *PKM2* 基因在肺炎支原体感染 3D4/21 细胞后的互作蛋白质鉴定与分析[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(6): 1381-1389.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.06.016

## 猪 *PKM2* 基因在肺炎支原体感染 3D4/21 细胞后的互作蛋白质鉴定与分析

赵为民<sup>1,2</sup>, 涂 枫<sup>1,2</sup>, 王 丽<sup>1,2</sup>, 任守文<sup>1,2</sup>, 付言峰<sup>1,2</sup>, 李碧侠<sup>1,2</sup>, 徐小波<sup>1,2</sup>, 陈 哲<sup>1,2</sup>, 方晓敏<sup>1,2</sup>

(1. 江苏省农业科学院畜牧研究所/江苏省农业种质资源保护与利用平台, 江苏 南京 210014; 2. 农业部种养结合重点实验室, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 通过构建含有 *HA* 标签的 *PKM2* 过表达质粒转染 3D4/21 细胞, 利用免疫共沉淀 (Co-IP) 与液相色谱-质谱联用 (LC-MS/MS) 技术分析并鉴定猪 *PKM2* 基因在肺炎支原体感染猪肺泡巨噬细胞 3D4/21 后的互作蛋白质, 并对这些互作蛋白质进行 GO 与 KEGG 通路分析。结果显示肺炎支原体感染 3D4/21 细胞后, *PKM2* 在 mRNA 水平和蛋白质水平上表达上调, 其表达水平呈现剂量与时间依赖性。免疫共沉淀反应结果显示 IP 与 IgG 组共鉴定到 72 个蛋白质, 这 2 组鉴定到的蛋白质数分别为 60 和 19, 其中 7 个蛋白质在 2 组中同时鉴定到。GO 分析结果表明 IP 组的互作蛋白质主要参与了 NAD 代谢过程、NADH 代谢过程、肌原纤维组装、NADH 再生和葡萄糖代谢丙酮酸等生物过程, 其中大多数与能量代谢有关。KEGG pathway 分析结果表明互作蛋白质参与了致病性大肠杆菌感染、军团杆菌病、糖酵解/糖异生、丙酮酸代谢和癌症中的中枢碳代谢等通路, 这些通路与细菌感染和能量代谢有关。

**关键词:** 猪; *PKM2* 基因; 肺炎支原体; 互作蛋白质; 免疫共沉淀

中图分类号: S852.62 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2019)06-1381-09

## Identification and analysis of interaction proteins of porcine *PKM2* gene in 3D4/21 cells during *Mycoplasma pneumoniae* infection

ZHAO Wei-min<sup>1,2</sup>, TU Feng<sup>1,2</sup>, WANG Li<sup>1,2</sup>, REN Shou-wen<sup>1,2</sup>, FU Yan-feng<sup>1,2</sup>, LI Bi-xia<sup>1,2</sup>, XU Xiao-bo<sup>1,2</sup>, CHEN Zhe<sup>1,2</sup>, FANG Xiao-min<sup>1,2</sup>

(1. Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Jiangsu Germplasm Resources Protection and Utilization Platform, Nanjing 210014, China; 2. Key Laboratory of Crop and Livestock Integration, Ministry of Agriculture, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** 3D4/21 cells were transfected with *HA*-tagged *PKM2*-overexpression plasmid, and the co-immunoprecipitation (Co-IP) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) technique were used to identify and analyze the interaction protein of porcine *PKM2* gene in porcine alveolar macrophages 3D4/21 during *Mycoplasma pneumoniae* infection.

收稿日期: 2019-03-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31601928); 江苏省农业重大新品种创制项目 (PZCZ201733); 江苏省农业科学院基本科研业务专项 [ZX(15)4002]

作者简介: 赵为民 (1983-), 男, 湖北钟祥人, 博士, 副研究员, 主要从事猪的抗病育种, (E-mail) zhaoweimin1983@aliyun.com

通讯作者: 方晓敏, (E-mail) fxmw2000@163.com

Gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway annotations were performed on these interaction proteins. The results showed that *PKM2* was up-regulated at mRNA and protein levels after *Mycoplasma pneumoniae* infection in 3D4/21, and its expression level was dose and time-dependent. A total of 72 proteins were identified in the IP and IgG groups in the

co-immunoprecipitation reaction. The number of proteins identified in the above two groups was 60 and 19, respectively, and seven proteins were identified in both groups. GO analysis for biological processes showed that the interaction proteins of IP group were mainly involved in NAD metabolism process, NADH metabolism process, myofibril assembly, NADH regeneration and glucose catabolic process to pyruvate, most of which were related to energy metabolism. The KEGG pathway results indicated that the interacting proteins were involved in pathogenic *Escherichia coli* infection, legionellosis, glycolysis/gluconeogenesis, pyruvate metabolism, and central carbon metabolism in cancer, which were related to bacteria infection and energy metabolism.

**Key words:** porcine; *PKM2* gene; *Mycoplasma pneumoniae*; interaction protein; co-immunoprecipitation (Co-IP)

丙酮酸激酶 M2 型 (*PKM2*) 是糖酵解 (Glycolysis) 途径中的关键限速酶,它在糖酵解的最后一步反应中催化底物磷酸烯醇式丙酮酸 (Phosphoenolpyruvate, PEP) 为丙酮酸 (Pyruvate),并伴有 ATP 的产生,进而为细胞生长提供能量。由于糖酵解为癌症的主要能量代谢方式<sup>[1]</sup>,因而 *PKM2* 在癌症代谢及肿瘤生长中起着重要作用<sup>[2-5]</sup>。近年来,研究发现 *PKM2* 在免疫反应中也有着重要的调控作用。*PKM2* 在脂多糖 (Lipopolysaccharides, LPS) 诱导小鼠巨噬细胞的炎症反应中通过结合 HIF1 $\alpha$  来调控炎症因子 HMGB1 和 IL-1B 的表达<sup>[6-7]</sup>,*PKM2* 还可通过结合 STAT3 调控炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-1B 的表达<sup>[8]</sup>,这表明 *PKM2* 与其他蛋白质的互作是调控免疫反应的一种重要方式。

我们在之前的研究中发现,*PKM2* 基因在猪感染肺炎支原体的肺组织中表达显著上升,而且在梅山猪与长白猪两个易感性有明显差别的品种中,*PKM2* 基因的表达量也存在差异<sup>[9]</sup>。此外,在猪肺泡巨噬细胞感染猪繁殖与呼吸综合征病毒的强弱毒株时,*PKM2* 基因的表达量也存在着显著差异<sup>[10]</sup>,这表明 *PKM2* 作为一个抗病候选基因研究具有重要意义。因此鉴定 *PKM2* 基因在肺炎支原体感染过程中的互作蛋白质能够进一步理解其在猪支原体肺炎发病中的作用机理。本研究通过免疫共沉淀 (Co-IP) 与液相色谱-质谱联用 (LC-MS/MS) 技术分析与鉴定猪 *PKM2* 基因在肺炎支原体感染猪肺泡巨噬细胞 3D4/21 后的互作蛋白质,并对这些互作蛋白质可能参与的生物学功能进行初步分析,为深入研究 *PKM2* 在猪支原体肺炎发病中的作用机理奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞、菌株与质粒

DH5 $\alpha$  感受态购于北京全式金生物技术有限公

司。猪肺炎支原体 J 株、猪肺泡巨噬细胞 3D4/21 由江苏省农业科学院兽医所馈赠。pcDNA3.1-Zeo(+) 由本实验室保存。

### 1.2 试剂

RNA 提取试剂盒 (Takara MiniBEST Universal RNA Extraction Kit)、限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I、T4 连接酶、DNA marker、pMD19-T 载体、SYBR Premix *Ex Taq*<sup>TM</sup> II 定量 PCR 试剂、cDNA 反转录试剂盒 (PrimeScript RT Master Mix)、DNA 聚合酶 PrimerSTAR Max Premix、蛋白质上样缓冲液 4 $\times$ loading buffer 和 BCA 蛋白定量试剂盒购于 TaKaRa 公司,*PKM2*、HA 抗体购于 Abcam 公司,无内毒素质粒试剂盒购于 Omega 公司,DNA 纯化回收试剂盒 (DNA Clean & Concentrator) 购于 Zymo Research 公司,NP-40 裂解液、PMSF、蛋白酶抑制剂、BeyoECL Plus、蛋白质 marker、PAGE 预制胶 (Tris-Gly, 10%) 购于碧云天公司,Protein A/G agarose beads 购于 Pierce 公司,1640 培养基购于武汉博士德公司,青链霉素、胎牛血清和 Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 购于 Thermo Fisher 公司。引物合成与测序验证由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

### 1.3 RNA 提取、反转录与定量 PCR

按照 TaKaRa RNA 提取试剂盒说明书提取 RNA,用 NanoDrop 2000 测定 RNA 的浓度与吸光度。参照 TaKaRa cDNA 合成试剂盒反转录 1  $\mu$ g RNA, cDNA 产物保存于 -20  $^{\circ}$ C 冰箱。将反转录的 cDNA 稀释 5 倍后进行定量 PCR 反应,反应条件参照 SYBR Premix *Ex Taq*<sup>TM</sup> II 定量 PCR 试剂盒说明书。采用 *HPRT1* 基因为内参基因,用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法分析数据,定量引物见表 1。

### 1.4 pcDNA3.1-*PKM2*-HA 质粒构建

*PKM2* (NCBI 登录号:XM\_001929069.5) 的全长 CDS 克隆由本实验室保存。在 *PKM2* 全长 CDS 的克隆载体上通过引物设计引入 HA 标签抗体位点,

引物序列为 PKM2-HA-F: CGGGATCCGCCACCAT-GCCGAAGCCCCACAGT, PKM2-HA-R: CGGAATTC-TCAGGCCGTAGTCAGGCACGTCGTAAGGATAAGAGCCTCCACCCCCCGGCACAGGCACTACGCG, 单下划线为引入酶切位点(分别为 BamH I 和 EcoR I), 双下划线为 HA 标签抗体基因结合位点, 斜体碱基为 PKM2 蛋白与 HA 标签连接的 linker。

表 1 引物序列信息

Table 1 Primer sequence information

引物名称	引物序列 (5'→3')	退火温度 (°C)	扩增长度 (bp)
PKM2-F	GGGCCATAATCGTCCTCACC	60	164
PKM2-R	CTCCTGCACTGGGTCTTAC		
HPRT1-F	CCCAGCGTCGTGATTACTGA	60	191
HPRT1-R	TTGAGCACACAGAGGGCTAC		

PCR 扩增后, 琼脂糖凝胶回收 PCR 扩增产物。然后进行 T 载体克隆, 对正确克隆提取质粒进行 BamH I 和 EcoR I 双酶切, 同时也双酶切 pcDNA3.1-Zeo(+). 回收酶切产物后进行 T4 连接酶连接, 16 °C 1 h。然后转化感受态 DH5a, 挑选阳性克隆进行 PCR 鉴定与测序验证, 正确克隆进行无内毒素质粒的提取。

### 1.5 细胞培养与质粒转染

猪肺泡巨噬细胞 3D4/21 培养在含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素的 1640 培养基中, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中, 每 2 d 换 1 次培养液。汇合度达到 80% 时进行细胞消化与传代。

质粒转染参考 Lipofectamine® 3000 实验方案。在一只 EP 管中用 opti-MEM 稀释适量质粒, 并加入 P3000™, 充分混匀; 另一只 EP 管中用 opti-MEM 稀释适量的 Lipofectamine® 3000, 充分混匀。将两 EP 管互相混匀室温孵育 15 min, 滴加入细胞继续培养 24~48 h。

### 1.6 Western blot 检测

利用 NP-40 裂解液提取细胞总蛋白质, 进行 BCA 蛋白定量检测。Western blot 主要步骤如下: 总蛋白质在 loading buffer 中 98 °C 加热 10 min, 然后在 PAGE 预制胶(Tris-Gly, 10%) 上进行电泳, 80 V 30 min, 然后 120 V 60 min, 再进行转膜, 经过一抗和二抗孵育, PBST 洗涤后用 BeyoECL Plus 检测。

### 1.7 免疫共沉淀 (CO-IP)

pcDNA3.1-PKM2-HA 质粒转染 3D4/21 细胞, 设置 3 个生物学重复, 接着用肺炎支原体感染细胞 24 h, 再用 IP 裂解液 [50 mmol/L Tris (pH 7.5)、150 mmol/L NaCl、1% NP-40、0.5% 脱氧胆酸钠、2 mmol/L EDTA<sub>2</sub>Na、1 mmol/L DTT、1 mmol/L PMSF、1×蛋白酶抑制剂] 裂解细胞, 冰上放置 30 min, 12 000 r/min 4 °C 离心 20 min 取上清液, 利用浓度为 50% 的 ProteinG 珠子去除上清液非特异性杂蛋白。将上清液等量分为试验组和对照组, 试验组加入 10 μg 兔源 HA 抗体, 对照组加入等量的兔源 IgG, 4 °C 旋转孵育过夜。然后两组分别加入 50 μl Protein G (浓度 50%), 4 °C 缓慢摇动与抗原抗体混合物孵育 6 h, 14 000 r/min 瞬时离心 5 s, 收集琼脂糖珠-抗原抗体复合物, 用洗涤液 [50 mmol/L Tris (pH 7.5)、150 mmol/L NaCl、0.1% NP-40] 洗涤珠子 4 次, 每次 5 min。用 100 μl 2×上样缓冲液将琼脂糖-抗原抗体复合物重悬, 煮沸 5 min 用于后续的 Western blot 检测以及银染鉴定。

### 1.8 PKM2 互作蛋白的 LC-MS/MS 与鉴定

对在 IgG 和 IP 组免疫共沉淀洗脱下来的蛋白质进行全胶电泳, 然后进行胶内酶解。使用 C18 柱对过夜酶解产生的多肽进行除盐, 抽干后用 15 μl Loading Buffer (0.1% 甲酸, 3% 乙腈) 溶解多肽, 最后上机 LC-MS/MS (eksperTMnanoLC ; AB Sciex TripleTOF 5600-plus) 对多肽进行分析与评估。下机后, 将原始数据提交到 AB SCIEX Triple TOF™ 5600 plus 质谱仪连接的 ProteinPilot 软件中进行数据库检索分析, 参数见表 2。

表 2 ProteinPilot 的检索参数

Table 2 Search parameters for ProteinPilot

项目	参数
Type of search	Identification
Enzyme	Trypsin
Cys Alkylation	Iodoacetamide
Instrument	Triple TOF 5600
Bias Correction	TRUE
Background Correction	TRUE
ID focus	Biological modifications
Search Effort	Thorough ID
Protein Mass	Unrestricted
Database	NCBI.GCF_Sus_scrofa_protein.fasta

## 1.9 GO与KEGG分析

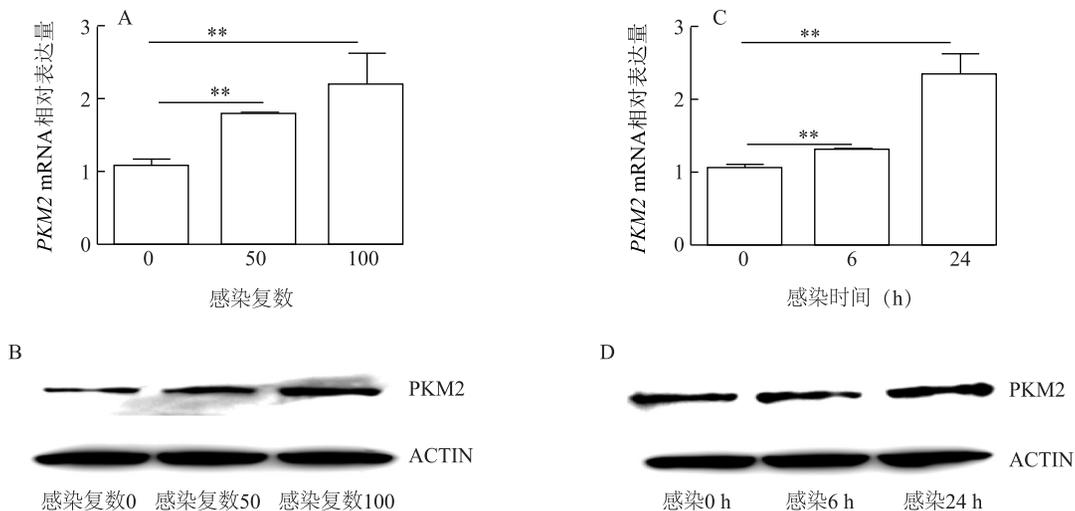
使用 Cytoscape 中的 ClueGO 对互作蛋白质进行 GO (Gene Ontology) 和 KEGG 通路 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway) 分析, 研究这些蛋白质编码基因参与的生物学功能与途径, 筛选条件  $P\text{-value} \leq 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 PKM2 基因在肺炎支原体感染 3D4/21 细胞后的表达规律

为了探讨 PKM2 在 3D4/21 细胞受肺炎支原体感染后的表达情况, 将肺炎支原体以 0、50、100 感染复数 (Multiplicity of infection, MOI) 感染细胞 24 h, 检测 PKM2 在 mRNA 水平和蛋白质水平上的表达

情况。图 1A 显示, 与对照组相比 PKM2 mRNA 表达水平在肺炎支原体感染后显著增高 ( $P < 0.01$ ), 且其表达水平随着感染复数的增加而显著增高。与对照组相比 PKM2 蛋白质在肺炎支原体感染后表达也增高, 其表达水平随着感染复数的增加而增高 (图 1B)。为了探讨 PKM2 在 3D4/21 细胞受肺炎支原体感染后不同时间的表达情况, 在肺炎支原体 (100 MOI) 感染 3D4/21 细胞后 0 h、6 h 和 24 h, 检测 PKM2 在 mRNA 水平和蛋白质水平上的表达情况。图 1C 显示, 与对照组相比 PKM2 mRNA 表达水平随着感染时间的增加而显著增高 ( $P < 0.01$ )。与对照组相比, PKM2 蛋白表达水平在感染 6 h 增高不明显, 而在感染 24 h 后表达增高 (图 1D)。



A: PKM2 基因 mRNA 在不同支原体感染剂量下的表达; B: PKM2 蛋白在不同支原体感染剂量下的表达; C: PKM2 基因 mRNA 在支原体感染不同时间点的表达; D: PKM2 蛋白在支原体感染不同时间点的表达。

图 1 PKM2 基因在 3D4/21 细胞受肺炎支原体感染后的表达

Fig.1 The expression of PKM2 gene in 3D4/21 cell infected by *Mycoplasma hyopneumoniae*

### 2.2 pcDNA3.1-PKM2-HA 重组质粒的鉴定

pcDNA3.1-PKM2-HA 重组质粒经过 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切后, 切出了约 5.4 kb 的 pcDNA3.1 骨架与 1.6 kb 的 PKM2-HA 条带 (图 2), 其长度与预期相符。

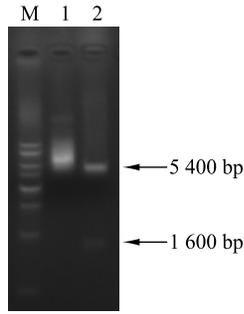
### 2.3 PKM2-HA 在 3D4/21 细胞中的过表达检测

通过脂质体将 pcDNA3.1-PKM2-HA 与 pcDNA3.1 空载体分别转染 3D4/21 细胞 36 h 后, 通过 Western blot 检测标签蛋白 HA。结果 (图 3) 显示, 转染 pcDNA3.1-PKM2-HA 载体的过表达组中 PKM2-HA

融合蛋白表达量大于转染 pcDNA3.1 空载体的对照组。

### 2.4 PKM2-HA 蛋白的免疫共沉淀验证

对 IP 和 IgG 组免疫共沉淀洗脱下来的蛋白质进行 PKM2-HA 基因的 Western blot 检测, 以验证蛋白质沉淀中是否含有 PKM2-HA 蛋白, 同时进行 Input 对照。结果 (图 4) 显示, IgG 组没有鉴定到 PKM2-HA 蛋白, IP 组鉴定到了 PKM2-HA 蛋白。Input 是全细胞裂解液, 也鉴定到了 PKM2-HA 蛋白, 说明利用 HA 抗体成功进行了 PKM2 基因的免



M: 1 kb DNA ladder; 1: pcDNA3.1-*PKM2*-HA 质粒; 2: pcDNA3.1-*PKM2*-HA 质粒的 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切。

图 2 pcDNA3.1-*PKM2*-HA 质粒的酶切鉴定

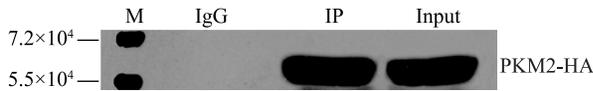
Fig.2 Identification of pcDNA3.1-*PKM2*-HA plasmid by enzyme digestion



*GAPDH* 为内参。

图 3 *PKM2*-HA 在 3D4/21 细胞中的过表达检测

Fig.3 Detection of *PKM2*-HA overexpression in the 3D4/21 cell



M: 蛋白 marker; IgG: 阴性对照; IP: 目的基因抗体; Input: 阳性对照。

图 4 *PKM2*-HA 蛋白的免疫共沉淀验证

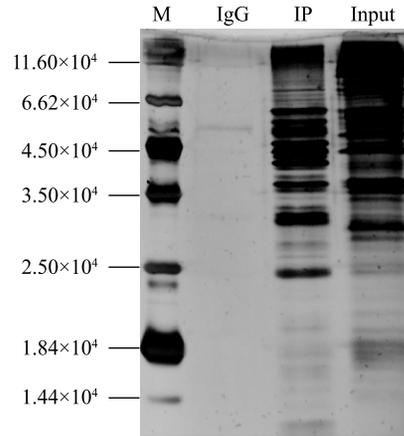
Fig.4 Validation of co-immunoprecipitation (Co-IP) for *PKM2*-HA protein

疫共沉淀试验。通过对 IP 和 IgG 组免疫共沉淀洗脱下来的蛋白质进行银染胶图(图 5)分析发现, IP 组与 IgG 组蛋白也有着明显的差异。

### 2.5 *PKM2* 互作蛋白质的质谱鉴定与分析

在可信度 Confidence  $\geq 95\%$ 、Unique peptides  $\geq 1$  时, IP 与 IgG 组质谱产生的二级谱图数分别为 8 487 和 1 526, 解析的二级谱图数分别为 1 286 和 166, 鉴定到的肽段数分别为 423 和 58。

经 Protein Pilot 软件检索分析, 在可信度 Confidence  $\geq 95\%$ 、Unused ProtScore  $\geq 1.3$ , 而且至少包含 1 个 unique 肽段时, IP 与 IgG 组共鉴定到 72 个



M: 蛋白 marker; IgG: 阴性对照; IP: 目的基因抗体; Input: 阳性对照。

图 5 IP 与 IgG 组免疫共沉淀蛋白质的银染胶图比较

Fig.5 Comparison of silver staining gel graphs of Co-IP protein between IP and IgG groups

蛋白质, IP 和 IgG 组鉴定到的蛋白质数分别为 60 和 19, 其中 7 个蛋白质在 2 组中同时鉴定到, IP 与 IgG 独有蛋白质数分别为 53 和 12(图 6)。在 IP 组样品中, 得到的肽段数最多且 unused ProtScore 数值最高。IP 与 IgG 组鉴定的所有蛋白质信息见表 3。

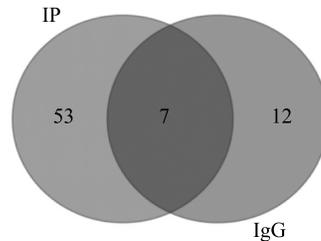


图 6 IP 与 IgG 组鉴定的蛋白质数量的韦恩图

Fig.6 Venn diagram of protein number identified in IP and IgG groups

### 2.6 *PKM2* 互作蛋白质参与的 GO 分析

为了探讨 *PKM2* 的互作蛋白质的生物学功能, 对 IP 组独有的 53 个蛋白进行了 GO 分析。GO 分析包括生物过程 (Biological process)、细胞组分 (Cellular component) 和分子功能 (Molecular function)。结果显示这些互作蛋白质一共参与了 44 个 GO term ( $P < 0.05$ ), 其中生物过程 22 个(图 7), 细胞组分 16 个(图 8), 分子功能 6 个(图 9)。以显著

表3 IP与IgG组鉴定的蛋白质信息

Table 3 Information of proteins identified in IP and IgG groups

组别	GenBank 登录号	基因名称	Unused (1.3)	Peptide	Unique Peptide	组别	GenBank 登录号	基因名称	Unused (1.3)	Peptide	Unique Peptide
IP 组	XP_005674537.3	<i>ACTBL2</i>	2.00	17	5	IgG 组	XP_005668163.1	<i>VIM</i>	45.24	27	27
	XP_003122400.2	<i>TUBB4B</i>	2.00	6	1		XP_020922659.1	<i>LOC110255312</i>	18.00	13	7
	XP_005668054.2	<i>LAD1</i>	2.00	1	1		XP_020945361.1	<i>SYNCRIP</i>	4.00	2	2
	XP_005654459.1	<i>EEF1A1</i>	2.03	1	1		XP_020926752.1	<i>PCBP3</i>	2.00	1	1
	XP_020943882.1	<i>SPTBN1</i>	2.06	1	1		XP_020939991.1	<i>HNRNPFI</i>	2.00	1	1
	NP_001230836.1	<i>HSPA8</i>	6.57	5	4		NP_001026958.1	<i>RAB11A</i>	2.00	1	1
	XP_003128181.1	<i>RPS5</i>	2.00	1	1		NP_001193288.1	<i>GAPDH</i>	4.00	2	2
	XP_020918037.1	<i>LOC100515788</i>	2.00	1	1		XP_020955511.1	<i>LOC100525821</i>	4.00	2	2
	XP_013849361.2	<i>SPTAN1</i>	2.02	1	1		NP_001153087.1	<i>KRT8</i>	34.22	18	14
	XP_020947258.1	<i>LOC100127131</i>	9.04	5	5		XP_001929104.1	<i>PKM2</i>	233.40	130	130
	XP_005652636.3	<i>KRT18</i>	15.40	10	8		NP_001005208.1	<i>ALB</i>	8.65	4	4
	NP_001157121.1	<i>TRIM21</i>	2.01	1	1		XP_020944105.1	<i>LMNA</i>	4.00	2	2
	XP_005671033.1	<i>ACTA1</i>	4.00	23	2		XP_020951792.1	<i>MRLC2</i>	2.00	1	1
	XP_020953965.1	<i>MFGE8</i>	2.05	1	1		XP_020946040.1	<i>PLEC</i>	27.27	13	13
	NP_001038077.1	<i>TUBB</i>	12.15	6	1		NP_001231082.1	<i>MDH2</i>	2.00	1	1
	XP_020938897.1	<i>VCP</i>	2.00	1	1		XP_020947197.1	<i>MYH9</i>	46.49	23	21
	XP_020957928.1	<i>RPS3</i>	2.00	1	1		XP_020924489.1	<i>HSPA5</i>	26.35	14	13
	XP_003357976.1	<i>ACTG1</i>	4.00	41	2		XP_020955505.1	<i>LOC100512420</i>	1.55	1	1
	XP_020922794.1	<i>PHB</i>	4.00	2	2		XP_020927845.1	<i>ACTA2</i>	2.00	4	1
	NP_001241645.1	<i>HSP60</i>	4.00	2	2		XP_020947350.1	<i>LOC733618</i>	2.04	4	2
	XP_020929677.1	<i>UBC</i>	2.00	1	1		XP_020920167.1	<i>PKP1</i>	2.00	1	1
	XP_020942084.1	<i>MVP</i>	2.00	1	1		XP_020922661.1	<i>LOC110255272</i>	6.50	7	5
	XP_020944416.1	<i>YWHAZ</i>	2.00	1	1		XP_005656114.2	<i>LOC100620900</i>	2.00	1	1
	NP_001007519.1	<i>HSPB1</i>	4.00	2	2		NP_999488.1	<i>JUP</i>	2.21	1	1
	XP_020927834.1	<i>VDAC2</i>	2.03	1	1		XP_020947339.1	<i>KRT80</i>	1.85	1	1
	XP_020934641.1	<i>HNRNPA2B1</i>	2.00	1	1		XP_020947911.1	<i>LDHB</i>	2.00	1	1
	XP_003483583.1	<i>PGAM1</i>	2.01	1	1		XP_005668164.1	<i>VIM</i>	2.00	1	1
	NP_001172071.1	<i>ATP5F1A</i>	4.10	2	2		XP_003126216.4	<i>LOC100525745</i>	2.69	3	1
	XP_020955499.1	<i>LOC110261668</i>	4.00	2	2		XP_003128216.2	<i>DSP</i>	3.50	3	3
	XP_020923522.1	<i>MYH10</i>	2.00	3	1		IP+IgG	XP_020941706.1	<i>ACTB</i>	72.44	41
XP_005661752.1	<i>HSPA9</i>	10.02	5	5	XP_003126221.1	<i>KRT5</i>	10.15	9	5		
XP_003131485.1	<i>KRT19</i>	34.12	17	12	XP_003481635.2	<i>KRT1</i>	20.55	13	11		
XP_020946771.1	<i>MYL6</i>	4.00	2	2	XP_020934123.1	<i>LOC100302368</i>	18.36	10	10		
NP_001230485.1	<i>PHB2</i>	2.10	1	1	XP_013848366.1	<i>ANXA2</i>	4.01	2	2		
XP_001929445.4	<i>ATP5B</i>	10.00	5	5	XP_005668904.1	<i>KRT10</i>	10.36	10	7		
XP_020937318.1	<i>LDHA</i>	2.00	1	1	NP_001092053.1	<i>KRT2</i>	10.00	5	5		

性富集程度排序,生物过程前5个分别是GO:0019674 NAD metabolic process (NAD代谢过程)、GO:0006734 NADH metabolic process (NADH代谢过程)、GO:0030239 myofibril assembly (肌原纤维组装)、GO:0006735 NADH regeneration (NADH再生)

和GO:0061718 glucose catabolic process to pyruvate (葡萄糖代谢丙酮酸过程),可以看出这前5个生物过程中绝大部分与能量代谢有关;细胞组分前5个分别是GO:0043209 myelin sheath (髓鞘)、GO:0030864 cortical actin cytoskeleton (皮质肌动蛋白细

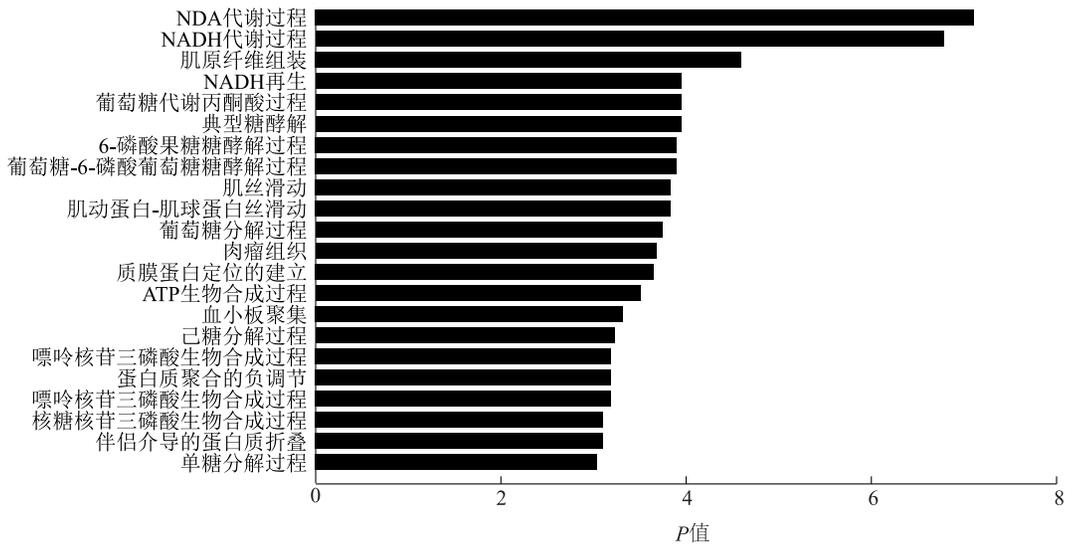


图 7 PKM2 互作蛋白质参与的生物过程

Fig.7 The interaction protein of PKM2 in participating in biological processes

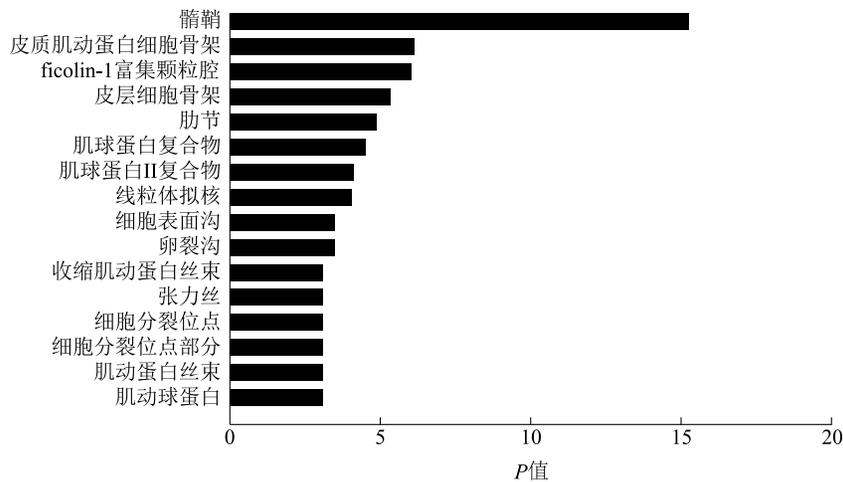


图 8 PKM2 互作蛋白质参与的细胞组分

Fig.8 The interaction protein of PKM2 in participating in cellular component

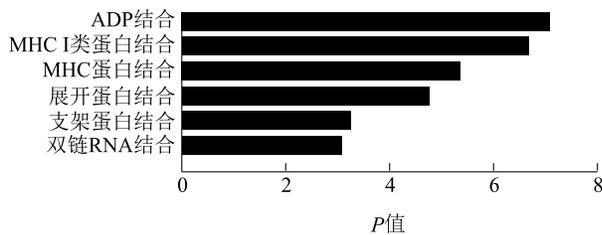


图 9 PKM2 互作蛋白质参与的分子功能

Fig.9 The interaction protein of PKM2 in participating in molecular function

胞骨架)、GO:1904813 ficolin-1-rich granule lumen (ficolin-1 富集颗粒腔)、GO:0030863 cortical cytoskeleton (皮层细胞骨架)和 GO:0043034 costamere

(肋节);分子功能前 5 个分别是 GO:0043531 ADP binding(ADP 结合)、GO:0042288 MHC class I protein binding (MHC I 类蛋白结合)、GO:0042287 MHC protein binding(MHC 蛋白结合)、GO:0051082 unfolded protein binding(展开蛋白结合)和 GO:0097110 scaffold protein binding(支架蛋白结合),这前 5 个分子功能主要与蛋白质结合有关。

### 2.7 PKM2 互作蛋白质参与的 KEGG pathways 分析

为了进一步理解 PKM2 的互作蛋白质的生物学功能,对 IP 组独有的 53 个蛋白质进行 KEGG pathways 分析。结果显示这些互作蛋白质中 14 个蛋白质一共参与了 5 个通路( $P < 0.05$ ) (表 4),它们分别

是 Pathogenic *Escherichia coli* infection(致病性大肠杆菌感染)、Legionellosis(军团杆菌病)、Glycolysis / Gluconeogenesis(糖酵解/糖异生)、Pyruvate metabolism(丙酮酸代谢)和 Central carbon metabolism in cancer(癌症中的中枢碳代谢),其中前2个通路与细菌感染有关,后3个与能量代谢有关。

表4 *PKM2* 的互作蛋白参与的 KEGG pathways

Table 4 The interaction protein of *PKM2* in participating in Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG) pathways

KEGG ID	通路	基因	<i>p</i> 值
KEGG:05130	病原性大肠杆菌感染	<i>ACTG1</i> 、 <i>KRT18</i> 、 <i>TUBB</i> 、 <i>TUBB4B</i> 、 <i>YWHAZ</i>	0.000 017 605
KEGG:05134	军团杆菌病	<i>EEF1A1</i> 、 <i>HSPA8</i> 、 <i>HSPD1</i> 、 <i>VCP</i>	0.000 358 116
KEGG:00010	糖酵解/糖异生	<i>GAPDH</i> 、 <i>LDHA</i> 、 <i>PGAM1</i> 、 <i>PKM2</i>	0.000 616 177
KEGG:00620	丙酮酸代谢	<i>LDHA</i> 、 <i>MDH2</i> 、 <i>PKM2</i>	0.001 265 545
KEGG:05230	癌症的中心碳代谢	<i>LDHA</i> 、 <i>PGAM1</i> 、 <i>PKM2</i>	0.002 798 965

### 3 讨论

巨噬细胞作为先天性免疫系统的重要效应细胞,在先天性免疫反应中起着中枢作用<sup>[11-12]</sup>。研究表明肺泡巨噬细胞在小鼠抵御肺炎支原体的感染过程中发挥着关键作用<sup>[13-14]</sup>。因此以猪的肺泡巨噬细胞 3D4/21 为模型,研究 *PKM2* 基因在肺炎支原体感染过程中的互作蛋白质对揭示其在猪支原体肺炎发病的作用机理具有重要意义。

研究结果显示 *PKM2* 在巨噬细胞受到外源病菌刺激时表达显著上调<sup>[6-8]</sup>。我们发现当肺炎支原体感染 3D4/21 细胞后,*PKM2* 在 mRNA 水平和蛋白质水平上都上调表达,而且它们的表达水平呈现剂量与时间依赖性,这表明 *PKM2* 基因在肺炎支原体感染过程中可能发挥重要作用。*HA* 标签来自编码人类流感血凝素(HA)分子的98~106位氨基酸序列,鉴于其不影响目的基因的活性而且方便目的基因的检测及分离,在很多表达载体中已被广泛作为通用表位的标签。已有文献报道使用 *HA* 标签来研究 *PKM2* 基因在肿瘤细胞中的转录活性调控<sup>[15]</sup>。由于还没有适合猪物种的 *PKM2* 免疫沉淀抗体,因而我们利用 *HA* 标签融合 *PKM2* 基因,通过 *HA* 抗体进

行免疫共沉淀来鉴定 *PKM2* 的互作蛋白质。

*PKM2* 基因除了在免疫反应中与其他蛋白质结合发挥功能<sup>[6-8]</sup>外,*PKM2* 可结合 *b-catenin* 来调控 *CCND1* 基因的表达从而促进肿瘤细胞的生长<sup>[16]</sup>,此外,*PKM2* 还可结合 *Oct4* 来调控脑胶质瘤细胞的死亡与分化<sup>[17]</sup>。这表明 *PKM2* 与其他蛋白质的互作是发挥其生物功能多样性的重要方式。本研究利用免疫共沉淀与液相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)技术分析鉴定 *PKM2* 基因的互作蛋白质信息,结果表明相对于 IgG 对照组,*PKM2* 的互作蛋白质主要参与能量代谢、细菌感染与细胞骨架等生物过程。之前研究结果表明能量代谢与巨噬细胞的免疫反应有重要关联,当巨噬细胞受到外源病菌感染而激发先天性免疫反应时,细胞急需大量能量去增殖和分泌炎症因子,因此此时细胞代谢方式主要为糖酵解<sup>[18-20]</sup>。

在鉴定的 *PKM2* 互作蛋白质中,通过 GO 与 KEGG pathway 分析发现 *PKM2* 主要与 *MDH2*、*LDHA*、*GAPDH*、*PGAM1* 参与了包括糖酵解形式的能量代谢,而文献报道上述酶的互作对于糖酵解的发生具有关键作用<sup>[21-22]</sup>,进一步验证了 *PKM2* 介导的糖酵解在 3D4/21 细胞与肺炎支原体感染互作中的作用。另一方面,在互作蛋白质的分析中 *PKM2* 与 *ACTG1*、*KRT18*、*YWHAZ* 参与致病性大肠杆菌感染通路。*ACTG1*、*KRT18*、*TUBB* 和 *TUBB4B* 基因参与肌纤维及其细胞骨架的组成,有研究表明这种细胞骨架的完整性在免疫细胞抵御病菌侵入中具有重要防御作用<sup>[23]</sup>。此外,*PKM2* 还与 *HSPA8*、*HSPD1*、*EEF1A1* 和 *VCP* 参与了军团杆菌病的发生。军团杆菌大多数为人类肺炎的病原,与肺炎支原体一样也参与人类肺炎的发生<sup>[24-25]</sup>,而热休克蛋白家族中的 *HSPA8* 和 *HSPD1* 在炎症发生的过程中起着重要作用<sup>[26-28]</sup>,这表明 *PKM2* 与这些基因的互作可能在肺炎支原体感染所导致的炎症反应中也发挥一定的作用。综上所述,*PKM2* 参与的糖酵解、肌纤维与细胞骨架组成在细胞抵御肺炎支原体感染中起到重要作用,其结果有待进一步验证。

### 参考文献:

- [1] VANDER HEIDEN M G, CANTLEY L C, THOMPSON C B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation[J]. *Science*, 2009, 324(5930):1029-1033.
- [2] CHRISTOFK H R, VANDER HEIDEN M G, HARRIS M H, et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer

- metabolism and tumour growth [J]. *Nature*, 2008, 452(7184): 230-233.
- [3] WONG N, OJO D, YAN J, et al. PKM2 contributes to cancer metabolism [J]. *Cancer Lett*, 2015, 356(2):184-191.
- [4] DAYTON T L, JACKS T, VANDER HEIDEN M G. PKM2, cancer metabolism, and the road ahead [J]. *EMBO Rep*, 2016, 17(12):1721-1730.
- [5] SIDDIQUI F A, PRAKASAM G, CHATTOPADHYAY S, et al. Curcumin decreases Warburg effect in cancer cells by down-regulating pyruvate kinase M2 via mTOR-HIF1 $\alpha$  inhibition [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):8323.
- [6] YANG L, XIE M, YANG M, et al. PKM2 regulates the Warburg effect and promotes HMGB1 release in sepsis [J]. *Nat Commun*, 2014, 5:4436.
- [7] PALSSON-MCDERMOTT E M, CURTIS A M, GOEL G, et al. Pyruvate kinase M2 regulates Hif-1 $\alpha$  activity and IL-1 $\beta$  induction and is a critical determinant of the warburg effect in LPS-activated macrophages [J]. *Cell Metabolism*, 2015, 21(1):65-80.
- [8] YANG P, LI Z, LI H, et al. Pyruvate kinase M2 accelerates pro-inflammatory cytokine secretion and cell proliferation induced by lipopolysaccharide in colorectal cancer [J]. *Cell Signal*, 2015, 27(7):1525-1532.
- [9] 方晓敏,赵为民,付言峰,等.猪支原体肺炎发生的品种敏感差异及分子基础 [J]. *中国农业科学*, 2015, 48(14):2839-2847.
- [10] ZHOU Y J, ZHU J P, ZHOU T, et al. Identification of differentially expressed proteins in porcine alveolar macrophages infected with virulent/attenuated strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(1):1-11.
- [11] MCGUIRE K, GLASS E J. The expanding role of microarrays in the investigation of macrophage responses to pathogens [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2005, 105(3/4):259-275.
- [12] LU J, WU X, HONG M, et al. A potential suppressive effect of natural antisense IL-1 $\beta$  RNA on lipopolysaccharide-induced IL-1 $\beta$  expression [J]. *J Immunol*, 2013, 190(12):6570-6578.
- [13] DAVIS J K, DAVIDSON M K, SCHOEB T R, et al. Decreased intrapulmonary killing of *Mycoplasma pulmonis* after short-term exposure to NO<sub>2</sub> is associated with damaged alveolar macrophages [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1992, 145(2 Pt 1):406-411.
- [14] LOVE W, DOBBS N, TABOR L, et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) plays a major role in innate resistance in the lung against murine *Mycoplasma* [J]. *PLoS ONE*, 2010, 5(5):e10739.
- [15] GAO X, WANG H, YANG J J, et al. Pyruvate kinase M2 regulates gene transcription by acting as a protein kinase [J]. *Mol Cell*, 2012, 45(5):598-609.
- [16] YANG W, XIA Y, JI H, et al. Nuclear PKM2 regulates  $\beta$ -catenin transactivation upon EGFR activation [J]. *Nature*, 2011, 480(7375):118-122.
- [17] MORFOUACE M, LALIER L, OLIVER L, et al. Control of glioma cell death and differentiation by PKM2-Oct4 interaction [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5:e1036.
- [18] GALVAN-PENA S, O'NEILL L A. Metabolic reprogramming in macrophage polarization [J]. *Front Immunol*, 2014, 5:420.
- [19] ALVES-FILHO J C, PALSSON-MCDERMOTT E M. Pyruvate kinase M2: A potential target for regulating inflammation [J]. *Front Immunol*, 2016, 7:145.
- [20] GABER T, STREHL C, BUTTGEREIT F. Metabolic regulation of inflammation [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2017, 13(5):267-279.
- [21] MAKANJI Y, TAGLER D, PAHNKE J, et al. Hypoxia-mediated carbohydrate metabolism and transport promote early-stage murine follicle growth and survival [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2014, 306(8):893-903.
- [22] SHENG H, TANG W. Glycolysis inhibitors for anticancer therapy: A review of recent patents [J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2016, 11(3):297-308.
- [23] IVANOV A I, PARKOS C A, NUSRAT A. Cytoskeletal regulation of epithelial barrier function during inflammation [J]. *Am J Pathol*, 2010, 177(2):512-524.
- [24] CUNHA B A. Atypical pneumonias: current clinical concepts focusing on Legionnaires' disease [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2008, 14(3):183-194.
- [25] SHARMA L, LOSIER A, TOLBERT T, et al. Atypical pneumonia: Updates on legionella, chlamydia, and mycoplasma pneumonia [J]. *Clin Chest Med*, 2017, 38(1):45-58.
- [26] GENG J, LI H, HUANG C, et al. Functional analysis of HSPA1A and HSPA8 in parturition [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 483(1):371-379.
- [27] SWAROOP S, SENGUPTA N, SURYAWANSHI A R, et al. HSP60 plays a regulatory role in IL-1 $\beta$ -induced microglial inflammation via TLR4-p38 MAPK axis [J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13:27.
- [28] SUN Y, ZHENG J, XU Y, et al. Paraquat-induced inflammatory response of microglia through HSP60/TLR4 signaling [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2018, 37(11):1161-1168.

(责任编辑:张震林)