

结核分枝杆菌 19 kDa 脂蛋白诱导 THP-1 细胞凋亡的研究

韦 莉, 金齐力, 刘 勇, 夏佩莹

[摘要] 目的: 观察结核分枝杆菌 19 kDa 脂蛋白(Mtb P19)对 THP-1 细胞凋亡的影响。方法: 从培养的结核杆菌 H37Ra 制备 Mtb P19, 以 5、10、20 μg/ml Mtb P19 作用于佛波醇酯(PMA)分化的 THP-1 细胞, 37 ℃、5% CO₂ 孵箱孵育 4 h。Wright-Giemsa 染色观察细胞形态变化; AnnexinV-FITC 染色, 用流式细胞仪检测细胞凋亡。结果: 终浓度为 5 μg/ml 的 Mtb P19 即可诱导 THP-1 细胞凋亡, 且凋亡率随 Mtb P19 作用浓度的升高而增加(P < 0.01); Wright-Giemsa 染色镜下可见部分细胞体积变小、圆缩, 核固缩, 核断裂。结论: 结核分枝杆菌 P19 以剂量依赖方式诱导 THP-1 细胞凋亡。

[关键词] 细胞凋亡; 结核分枝杆菌 19 kDa 脂蛋白; THP-1 细胞

[中国图书资料分类法分类号] R 329.25 [文献标识码] A

Study on apoptosis of THP-1 cells induced by *Mycobacterium tuberculosis* 19 kDa lipoprotein

WEI Li, JIN Qi-li, LIU Yong, XIA Pei-ying

(Department of Microbiology, Bengbu Medical College;

Anhui Key Laboratory of Infection and Immunity at Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] Objective: To observe the influence of *Mycobacterium tuberculosis* 19 kDa(Mtb P19) on the apoptosis of THP-1 cells. Methods: Mtb P19 was prepared from cultured Mtb H37Ra. Phorbol myristate acetate-differentiated THP-1 cells were incubated with P19 at the concentrations from 5 μg/ml to 20 μg/ml at 37 ℃, 5% CO₂ for up to 4 hours. The change of cells was observed by Wright-Giemsa stain, and the apoptosis rate was detected by flowcytometry. Results: Mtb P19 could induce THP-1 cells apoptosis at final concentration of 5 μg/ml, and the apoptosis rate increased with the concentration of P19(P < 0.01). Round shrinkage, pyknosis or nuclear fragmentation were observed in some cells by Wright-Giemsa stain. Conclusions: Mtb P19 induces apoptosis in THP-1 cells in a dose-dependent manner.

[Key words] apoptosis; *Mycobacterium tuberculosis* 19-Kilodalton; THP-1 cell

结核病(tuberculosis)是由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)引起的慢性传染病^[1],至今仍严重威胁人们的生命健康。Mtb 是兼性胞内寄生菌,感染人体后主要被巨噬细胞吞噬,未

被机体免疫系统清除而潜伏下来的 Mtb 也主要寄生于巨噬细胞内。巨噬细胞的凋亡可以杀死寄生于其内的 Mtb,阻止体内播散,并激活临近未感染细胞,增强机体对 Mtb 的杀伤能力。因此,巨噬细胞的凋亡情况对于寄生于其内的 Mtb 的命运至关重要。由于 Mtb 不产生内、外毒素,其致病与其菌体成分及机体对菌体成分产生的免疫损伤密切相关, Mtb 细胞壁富含的脂质是公认的主要致病物质。Mtb 的细胞壁成分与巨噬细胞凋亡密切相关^[2]。确定 Mtb 诱导细胞凋亡的具体成分可以帮助我们更加深入地理解其致病机制,并且为疾病的预防和治疗提供新的思路。Mtb 细胞壁上 19 kDa 脂蛋白(P19)是一种糖

[收稿日期] 2008-01-04

[基金项目] 安徽省高校省级自然科学研究计划项目(KJ2008B320);安徽省省级重点实验室重点科研项目(2004sys008)

[作者单位] 蚌埠医学院病原生物学教研室,安徽省感染与免疫重点实验室,安徽蚌埠 233030

[作者简介] 韦莉(1981-),女,硕士研究生,助教。

[通讯作者] 夏佩莹,研究生导师,教授。

[2] 马佳,沈继龙,黄桦,等. 三氧化二砷对恶性黑色素瘤 B₁₆ 细胞凋亡的影响[J]. 蚌埠医学院学报, 2006, 31(3): 233-234.

[3] Jing Y, Dai J, Chalmers-Redman RM, et al. Arsenic trioxide selectively induces acute promyelocytic leukemia cell apoptosis via a hydrogen peroxide-dependent pathway[J]. *Blood*, 1999, 94(6): 2 102-2 111.

[4] 曹娟, 郑杰. As₂O₃ 诱导肿瘤细胞凋亡依赖 H₂O₂ 途径[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(6): 1 185-1 190.

[5] Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation[J]. *Free Radic Biol Med*, 2000, 28(3): 463-499.

[6] Akao Y, Yamada H, Nakagawa Y. Arsenic-induced apoptosis in malignant cells *in vitro* [J]. *Leuk Lymphoma*, 2000, 37(1-2):

53-63.

[7] Perkins C, Kim CN, Fang G, et al. Arsenic induces apoptosis of Multidrug-resistant human myeloid leukemia cells that express Bcr-Abl or overexpress MDR, MRP, Bcl-2, or Bcl-x(L) [J]. *Blood*, 2000, 95(3): 1 014-1 022.

[8] Miller WH Jr. Molecular targets of arsenic trioxide in malignant cells [J]. *Oncologist*, 2002, 7(Suppl 1): 14-19.

[9] Park MJ, Lee JY, Kwak HJ, et al. Arsenic trioxide (As₂O₃) inhibits invasion of HT1080 human fibrosarcoma cells: role of nuclear factor-kappaB and reactive oxygen species [J]. *J Cell Biochem*, 2005, 95(5): 955-969.

基化的脂蛋白^[3],在 Mtb 生长过程中也可分泌释放到细胞外,被认为是毒力因子之一。Aliprantis 等^[4]发现合成的细菌脂蛋白可以诱导细胞凋亡,提示我们 P19 可能是 Mtb 致巨噬细胞凋亡的诱导因子。本研究以 Mtb P19 刺激人源性巨噬细胞(PMA 分化的 THP-1 细胞),观察其对巨噬细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株与细胞株 结核分枝杆菌 H37Ra 株购于中国生物制品检定所北京菌种保藏中心,批号 93020-5;人单核细胞系 THP-1 细胞购自 American Type Culture Collection 公司,用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基传代培养。

1.2 试剂和仪器 RPMI-1640 细胞培养液干粉(美国 Hyclone 公司);Annexin V-FITC 凋亡试剂盒(深圳晶美生物工程有限公司);小牛血清(杭州四季青公司),其它试剂均为进口或国产分析纯;超声细胞粉碎机 JY-II 型(宁波新芝生物科技有限公司);ALPHA 1-2 冷冻干燥机(德国 Martin Christ);CO₂ 孵育箱(日本 SANYO);超净工作台(上海浦东物理光学仪器厂);流式细胞仪 FACS Calibur(美国 BD 公司);低温离心机(Sigma 公司);SPX-150B-Z 型生化培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);光学显微镜(日本 Nikon)。

1.3 Mtb P19 的制备 将结核杆菌 H37Ra 株接种于苏通液体培养基中,37 °C 培养 4 周,4 500 r/min,离心 30 min,收集菌体,依次用生理盐水洗涤 3 次和蒸馏水洗涤 1 次,按沉淀菌体体积加入 2 倍蒸馏水混匀,冰浴超声裂解细菌,获取 Mtb 溶菌产物,用等体积的酚:氯仿抽提 3 次,离心后在水相和有机相交界处有一层白色的膜状物,即为蛋白层。用平口吸管小心吸取蛋白层,加入 PBS(pH 7.4)溶解,4 °C 10 000 r/min 离心 1 h,收集上清,即为菌体蛋白。蛋白样品经 0.45 μm 硝酸纤维素膜过滤,AKTA explorer 100 蛋白分离纯化系统回收。使用的柱为 superdexTM-100,柱子先用 2 倍体积的缓冲液(pH 7.2,10 mmol/L 磷酸盐缓冲液,含有 100 mmol/L 硫酸铵)平衡,洗脱液的流速控制在 1 ml/min,记录蛋白分离情况,根据分子量标准的洗脱体积回收蛋白,所有凝胶过滤实验均在 25 °C 室温下进行。目的蛋白于透析袋中对 ddH₂O 透析过夜。ALPHA 1-2 冻干机浓缩,调节蛋白浓度 0.5 mg/ml,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,-70 °C 保存备用。

1.4 细胞准备 复苏冻存的 THP-1 细胞,置 37 °C 5% CO₂ 孵育箱中培养,收获指数生长期细胞,以 5 × 10⁵/ml 浓度接种于 6 孔细胞培养板,每孔 2 ml 细胞悬液,加入 2 μl PMA(20 ng/μl)以促使细胞分化,

24 h 后用预温的培养液轻轻吹去未贴壁及贴壁不紧的细胞,弃上清,然后加入不含小牛血清的 1640 培养液 1 ml,分别按 5 μg/ml、10 μg/ml、20 μg/ml 梯度加入 Mtb P19,同时设空白对照,37 °C 5% CO₂ 孵育箱中培养 4 h。若是制作细胞爬片,在加入细胞悬液之前,将无菌的约 1 cm² 大小的玻片放入 6 孔板。

1.5 Wright-Giemsa 染色观察细胞形态 取出细胞爬片,PBS 洗涤 2 次,染色观察凋亡细胞形态,计数 200 个细胞,细胞凋亡率用凋亡细胞数占细胞总数的百分比表示。

1.6 Annexin V-FITC 染色 4 h 后弃去培养液,PBS 轻轻吹打使细胞悬浮,离心收集细胞,冰浴的 PBS 洗涤 2 次(1 000 r/min × 5 min),收集作用后的 THP-1 细胞。200 μl 结合缓冲液洗涤细胞 1 次(1 000 r/min × 5 min),弃上清,管底留 20 μl 结合缓冲液,混匀,加入 2 μl Annexin V-FITC,稍加振荡,室温下避光孵育 15 min,1 h 内进行流式细胞仪检测,Cellquest 软件分析细胞凋亡率。

1.7 统计学方法 采用方差分析、*q* 检验和 *t* 检验。

2 结果

2.1 Mtb P19 诱导 THP-1 细胞凋亡的形态学改变 用 Wright-Giemsa 染色后,油镜观察,分化后 THP-1 细胞贴壁生长,成椭圆形或多角形,胞质饱满,形态舒展。Mtb P19 作用后出现细胞膜突起、染色质浓缩、细胞核断裂及凋亡小体形成等典型的形态学改变。且随着作用浓度的增加,凋亡及坏死细胞数量均逐渐增多($P < 0.01$)(见表 1)。

2.2 Annexin V-FITC 染色流式细胞仪检测结果 THP-1 细胞与不同浓度 Mtb P19 作用 4 h 后,流式细胞仪检测各浓度细胞凋亡率(见图 1)。可见 Mtb P19 浓度在 5 μg/ml 时即出现凋亡率增加,随着蛋白浓度的升高,凋亡率也逐渐增高($P < 0.01$)。两种方法检测结果相一致($P > 0.05$)(见表 1)。

表 1 Mtb P19 诱导的 THP-1 细胞凋亡率(%)比较($n_i = 6; \bar{x} \pm s$)

分组	细胞凋亡率(%)		<i>t</i>	<i>P</i>
	Annexin V-FITC 染色	Giemsa 染色		
空白对照组	8.10 ± 0.80	7.87 ± 1.00	0.44	> 0.05
Mtb P19 5 μg/ml 组	13.12 ± 1.84**	11.20 ± 1.75**	1.85	> 0.05
Mtb P19 10 μg/ml 组	23.94 ± 2.24 ^{△△}	22.61 ± 2.47 ^{△△}	0.98	> 0.05
Mtb P19 20 μg/ml 组	43.29 ± 3.20 ^{△△△} **	42.51 ± 2.41 ^{△△△} **	0.48	> 0.05
<i>F</i>	302.46	367.50	—	—
<i>P</i>	< 0.01	< 0.01	—	—
MS _{组内}	4.821	3.993	—	—

q 检验:与空白对照组比较 * $P < 0.01$;与 Mtb P19 5 μg/ml 组比较 $\Delta \Delta P < 0.01$;与 Mtb P19 10 μg/ml 组比较 $\Delta \Delta \Delta P < 0.01$

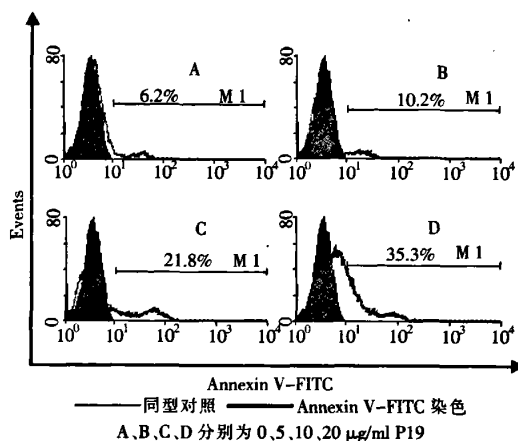


图 1 Mtb P19 诱导 THP-1 细胞凋亡的 AnnexinV-FITC 流式分析

3 讨论

巨噬细胞在抗结核感染中起重要作用,它作为一种重要的抗原提呈细胞,参与抗原的摄取、加工、处理,并提呈给 Th 细胞,同时激发细胞和体液免疫反应,在抗感染免疫中具有重要作用。结核杆菌侵袭人单核巨噬细胞后,巨噬细胞通过凋亡、分泌炎症因子、吞噬溶酶体融合等机制杀灭寄生其中的结核杆菌。临床试验研究显示,肺结核患者病灶中所形成的保护性肉芽肿组织中存在大量的凋亡细胞,凋亡细胞内残存的结核杆菌的活力大大降低,大部分细菌已经死亡,这说明宿主单核巨噬细胞受到结核杆菌感染后发生凋亡对机体来说是一种抗感染的主动防御机制。尽管已有研究表明 Mtb 能诱导巨噬细胞凋亡,巨噬细胞的凋亡在感染早期能很好地控制 Mtb 的生存、繁殖及扩散,从一定程度上决定了 Mtb 的命运^[5],但是仍有一些未能解决的问题,如 Mtb 感染过程中有那些真正起作用的细菌因子及其诱导凋亡的机制等。

结核杆菌表面成分十分复杂,侵入机体后它们可以作为配体被巨噬细胞表面不同的特异受体所识别,为二者复杂的相互作用提供了物质基础。随着现代技术的发展和研究的深入,结核杆菌蛋白抗原不断被发现和应用。Mtb 细胞壁上 P19 是 Mtb 糖基化的脂蛋白^[3],被认为是细菌的毒力因子之一,我们利用 Mtb P19 作为刺激信号,与 THP-1 细胞共同培养 4 h 后,以 AnnexinV-FITC 流式细胞仪分析及观察细胞形态学改变为指标,研究了 Mtb P19 对人源性巨噬细胞(PMA 分化的 THP-1 细胞)凋亡的诱导

作用,结果发现,Mtb P19 能诱导人类 THP-1 细胞凋亡,细胞凋亡于较低感染浓度即开始出现,随感染蛋白浓度的升高,凋亡细胞所占比例不断增高,凋亡严重程度不断增强。凋亡细胞在细胞形态上的改变也很明显和典型。Wright-Giemsa 染色结果显示随着 P19 浓度的增加,各实验组凋亡细胞逐渐增多,对照组则不受影响。提示 Mtb P19 以剂量依赖方式诱导 THP-1 细胞凋亡。通过对 P19 与巨噬细胞凋亡关系的研究,可以帮助我们进一步明确细菌的致病因子,但受体途径及凋亡机制有待于进一步研究。

由于 Mtb 不产生内、外毒素,其致病的策略不同于其他胞内致病菌,菌体的成分在致病中具有重要的作用。近年来,尽管许多研究者纷纷从基因角度对结核杆菌进行相关研究,并取得了显著成绩,但正如许多研究者所言,无论是解决结核病的特异、快速诊断方法、研究结核杆菌的致病机制,还是在开发研制结核新疫苗上获得突破,都需要对结核杆菌进行基础性和探索性的蛋白抗原研究^[3,6]。蛋白抗原的研究从根本上说,是结核研究的重要组成部分^[7]。

总之,对致病相关性菌体成分的多学科研究将为认识巨噬细胞新的防御机制、开发新的药物和疫苗奠定基础。通过对蛋白抗原研究的不断深入,我们必将更清楚的了解结核杆菌在人体的免疫机制,进而找出更为有效的保护方法,为彻底控制和消灭结核病提供相应的技术支持。

【参考文献】

- [1] 谢建平,王洪海,陈永青. 结核分枝杆菌的后基因组研究和新型疫苗[J]. 微生物学报,2001,41(2):252-257.
- [2] Luzzi VI, Scott MC, Gronowski AM. Negative thyrotropin assay interference associated with an IgGkappa paraprotein [J]. Clin Chem,2003,49(4):709-710.
- [3] Alito A, McNair J, Girvin RM, et al. Identification of *Mycobacterium bovis* antigens by analysis of bovine T-cell responses after infection with a virulent strain [J]. Braz J Med Biol Res,2003,36(11):1523-1531.
- [4] Aliprantis AO, Yang RB, Weiss DS, et al. The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2 [J]. EMBO J,2000,19(13):3325-3336.
- [5] Nuzzo I, Galdiero M, Bentivoglio C, et al. Apoptosis modulation by mycolic acid, tuberculostearic acid and trehalose 6,6'-dimycolate [J]. J Infect,2002,44(4):229-235.
- [6] Delogu G, Brennan MJ. Comparative immune response to PE and PE-PGRS antigens of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Infect Immun,2001,69(9):5606-5611.
- [7] 王洪海. 结核病防治基础研究进展[J]. 微生物与感染,2007,2(3):164-169.