

结核分枝杆菌感染对小鼠树突状细胞功能的影响

金齐力^{1,2}, 孙 慄¹, 吕小艳¹, 韦 莉^{2,3}

[摘要] **目的:**探讨结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)感染对小鼠骨髓来源的树突状细胞(DC)功能的影响。**方法:**将 DC 分为 4 组,即脂多糖(LPS)感染组、Mtb 感染组、灭活 Mtb 感染组和正常细胞对照组。以 LPS、Mtb 及灭活的 Mtb 与小鼠骨髓来源的 DC 建立小鼠体外感染模型,用酶联免疫吸附法测定白细胞介素(IL)-6、IL-12 及肿瘤坏死因子- α 的表达;流式细胞术检测 DC 表面主要组织相容性复合体 II 类分子、CD40、CD80 和 CD86 的表达。**结果:**每只小鼠的股骨骨髓可扩增获得 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个具有典型细胞形态的 DC,纯度达 85% 以上;与对照组比较,流式细胞术结果显示 LPS、Mtb 和灭活 Mtb 感染组均能促进 DC 表面分子的表达($P < 0.01$)。Mtb 感染组 DC 表面分子上调显著低于 LPS 感染组与灭活 Mtb 感染组($P < 0.01$);LPS、Mtb 或灭活 Mtb 作用后,DC 的 IL-6、IL-12 和肿瘤坏死因子- α 分泌量显著增加($P < 0.01$),Mtb 感染组 DC 的细胞因子分泌量显著低于 LPS 感染组与灭活 Mtb 感染组($P < 0.01$)。**结论:**Mtb 活菌可干扰 DC 的细胞因子分泌,抑制 DC 成熟,从而削弱其抗原递呈的功能,影响抗原特异性细胞的免疫活化。

[关键词] 结核分枝杆菌;树突状细胞;免疫应答;小鼠

[中图分类号] R 378.911

[文献标志码] A

DOI:10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2015.09.001

Effects of *Mycobacterium tuberculosis* on dendritic cells function

JIN Qi-li^{1,2}, SUN Li¹, LV Xiao-yan¹, WEI Li^{2,3}

(1. Department of Clinical Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233040; 2. Anhui Key Laboratory of Infection and Immunity,

3. Department of Microbiology and Parasitology, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) on the function of mouse bone marrow derived dendritic cells (DC). **Methods:** DC were divided into 4 groups, lipopolysaccharide (LPS)-treated group, Mtb-treated group, inactivated Mtb-treated group and control group. Cytokines including interleukin (IL)-6, IL-12 and tumor necrosis factor α secretion of infected cells were examined by ELISA method. And the expression of surface molecules of infected DC including major histocompatibility complex class II, CD40, CD80 and CD86 were detected by flow cytometry. **Results:** About 5×10^6 to 1×10^7 DC were obtained from bone marrow of one mouse, and the purity of DC was more than 85%. The cells had the typical morphology of DC. The expressions of major histocompatibility complex class II, CD40, CD80 and CD86 on stimulated DC increased in LPS-treated group, Mtb-treated group, inactivated Mtb-treated group in contrast to control group; while the percentage of the upregulation of surface molecules in Mtb-treated DC was significantly lower than that of LPS or inactivated Mtb-treated DC. The cytokine levels in all groups significantly increased, and IL-6, IL-12 and tumor necrosis factor α secretions of DC infected by Mtb were significantly lower than those of LPS or inactivated Mtb-treated DC. **Conclusions:** Mtb can decrease the antigen presenting function through interfering the secretion of cytokines and inhibiting maturation of DC, and consequently suppress DC and T cell activation and result in the more serious damage of host.

[Key words] *mycobacterium tuberculosis*; dendritic cells; immune response; mouse

结核病作为全球性的健康问题,其发病率和死亡率逐年上升,结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)是结核病的病原菌,每年导致 800 万人发病,超过 200 万人死亡,其中死亡人口主要集中在发展中

国家,Mtb 成为世界范围内的头号杀手^[1]。尽管在全世界约有 20 亿人口感染,但超过 90% 的感染人群体内有病原体的长期存在却并不发病,因此对 Mtb 与宿主免疫系统相互作用的充分研究,无论是在结核病的防治以及疫苗的开发方面都有举足轻重的作用。树突状细胞(DC)作为体内最重要的专职抗原递呈细胞,是特异性和非特异性免疫应答的关键连接,在宿主抵抗 Mtb 感染的过程中,发挥着十分重要的作用,能有效引起细胞免疫反应对抗 Mtb^[2]。本研究建立 Mtb 与小鼠骨髓来源的 DC (BMDC) 体外感染模型,观察 DC 与 Mtb 的相互作用以及 Mtb

[收稿日期] 2014-09-02

[基金项目] 安徽省自然科学基金项目(1508085QH175);安徽省高校省级自然科学基金项目(KJ2013B142)

[作者单位] 1. 蚌埠医学院第二附属医院 检验科,安徽 蚌埠 233040; 蚌埠医学院 2. 感染与免疫安徽省重点实验室,3. 病原生物学教研室,安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 金齐力(1979-),男,硕士,主管检验师,讲师。

[通信作者] 韦 莉,副教授。E-mail: weili060903@126.com

对 DC 功能的影响,从而为结核病的致病机制研究提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和实验动物 结核杆菌 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。6~8 周年龄健康清洁级雌性 C57BL/6J 小鼠购于扬州大学动物实验中心。

1.1.2 主要试剂和仪器 RPMI 1640 培养基为 Hyclone 公司产品;FITC 标记抗小鼠 CD11c 单克隆抗体,PerCP-Cy5.5 标记抗小鼠主要组织相容性复合体(MHC) II 类分子单克隆抗体,PE 标记抗小鼠 CD40 单克隆抗体,PE 标记抗小鼠 CD80 单克隆抗体,PE 标记抗小鼠 CD86 单克隆抗体,均购自美国 eBioscience 公司;其他试剂均为进口或国产分析纯;光学显微镜:日本 Nikon 公司;超净工作台:上海浦东物理光学仪器厂;Multiskan MK 3 酶标仪:芬兰 Labsystems 公司;流式细胞仪:FACS Calibur,美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 Mtb 悬液的制备^[3-4] 将 Mtb H37Ra 接种至苏通液体培养基,37 °C 培养至对数生长期(约 1 个月),获取细菌用含 0.05% 吐温-80 的无菌 0.9% 氯化钠注射液研磨均匀,无菌 PBS 洗 2 次,取部分细菌经 56 °C 1 h 灭活,分别用不含抗生素的 RPMI 1640(含 10% 胎牛血清)培养液将灭活和未经灭活细菌调整为 3×10^8 CFU/ml,待用。

1.2.2 小鼠 BMDC 的诱导 颈椎脱臼法处死小鼠,自来水冲洗后浸泡在 75% 乙醇中 5 min,无菌状态下取股骨和胫骨,浸泡在 RPMI 1640 培养液中;小心剪掉骨两端,用 RPMI 1640 培养液反复冲洗直至骨变白,收集培养皿中的骨髓细胞悬液,1 500 r/min 离心 10 min,弃上清液;加 3 ml 红细胞裂解液,静置 2 min,加 RPMI 1640 培养液 5 ml,混匀后,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液;RPMI 1640 培养液洗涤 1 次,将细胞分至 6 孔培养板中,再加入终浓度为 20 ng/ml 的重组鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子及白细胞介素(IL)-4 10 ng/ml,培养 48 h;轻轻吹打细胞后,保留贴壁细胞,加入新鲜的完全培养液及相同终浓度的重组鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子和 IL-4,继续培养至第 5 天,半量换液;第 7 天,轻轻吹打收集悬浮细胞,即为富集的 BMDC,以 CD11c 检测纯度。

1.2.3 细胞分组和培养 将 DC 分为 4 组,即脂多糖(LPS)终浓度 1 μ g/ml 感染组、Mtb 感染组、灭活 Mtb 感染组和正常细胞对照组。各组细胞按实验要求调整至相应浓度,培养并加入相应作用的因素。表型检测时细胞浓度调至每毫升 5×10^5 个,按每孔 1 ml 加入 24 孔细胞培养板;测定细胞因子时细胞浓度调至每毫升 10^6 个,按每孔 100 μ l 加入 96 孔细胞培养板。

1.2.4 细胞感染模型的制备 按感染复数为 10:1 加入菌悬液,5% CO₂ 37 °C 条件下孵育 2 h。用预冷的 PBS 洗 3 次,1 500 r/min 离心 5 min,轻轻吸弃上清液以洗脱未结合的细菌,继续培养相应时间后收集细胞进行检测。

1.2.5 流式细胞术检测 DC 表达的相关表面分子 收集感染 24 h 后的 DC,用预冷的 PBS 洗涤 1 次,1 500 r/min 离心 5 min,轻轻吸弃上清液。分别用抗 MHC II-PerCP-Cy5.5 单抗、抗 CD40-PE 单抗、抗 CD80-PE 单抗或抗 CD86-PE 单抗标记,另设同型对照管。4 °C 避光染色 30 min,用 FCM 检测细胞表面 MHC II 类分子、CD40、CD80 和 CD86 的表达。

1.2.6 细胞因子的检测 刺激 24 h 后收集细胞培养上清液,保存于 -80 °C 冰箱待测。按照酶联免疫吸附测定试剂盒说明书操作:每孔分别加入 100 μ l 标准品或待测标本,各设 3 个复孔,另设空白孔对照,盖板后室温孵育 2 h,弃液体,洗涤液洗板 4 次;每孔加入 100 μ l 生物素标记的抗 IL-6、IL-12 和肿瘤坏死因子(TNF)- α 混匀,盖板,室温孵育 1 h,弃液体,洗涤液洗板 4 次;每孔加入 100 μ l 辣根过氧化物酶标记的链酶亲和素,盖板,室温孵育 1 h,弃液体,洗涤液洗板 4 次;每孔加入 100 μ l 四甲基联苯胺底物溶液,液体变蓝,盖板,室温避光孵育 10 min;反应终止后酶标仪上读取 450 nm 处吸光度值。

1.3 统计学方法 采用方差分析和 *q* 检验。

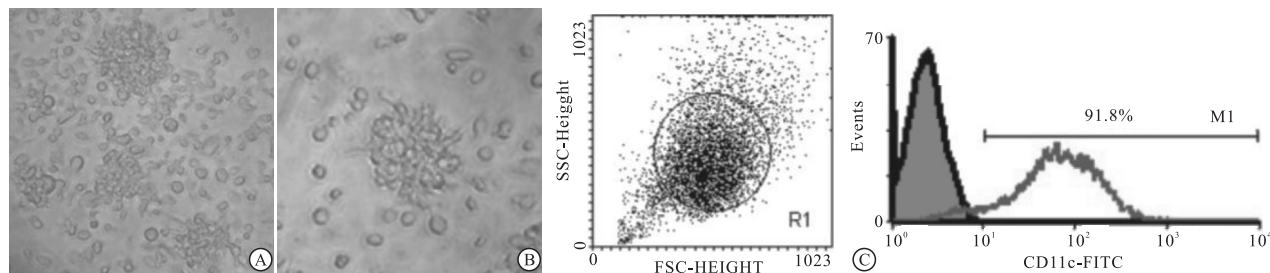
2 结果

2.1 体外培养 DC 的光镜观察 每只小鼠的股骨骨髓可扩增获得 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个 DC。光镜检查显示,大量细胞呈簇状生长,细胞表面突起似树枝,细胞形态呈梭形及不规则形状(见图 1A、B)。经流式细胞仪分析,扩增到的细胞中 DC 细胞占总细胞比例大于 85%(见图 1C)。

2.2 DC 共刺激分子和 MHC 分子的表达情况 流式细胞术结果显示,与对照组比较,LPS、Mtb 和灭活 Mtb 感染组 3 种作用因素均能促进 DC 表面 MHC II

类分子、CD40、CD80 和 CD86 分子的表达 ($P < 0.01$)。Mtb 感染组 DC 表面分子的表达量均显著

低于 LPS 感染组与灭活 Mtb 感染组 ($P < 0.01$) (见表 1)。



A: 大量细胞聚集簇; B: 具有树枝样突起的细胞; C: 小鼠 DC 纯度流式分析

图 1 DC 形态及纯度分析

表 1 DC 表型比较 [$n_i = 5; \bar{x} \pm s; \text{百分率}(\%)$]

分组	MHC II 类分子	CD40	CD80	CD86
对照组	6.8 ± 1.3	4.8 ± 1.0	4.4 ± 0.8	1.9 ± 0.4
LPS 感染组	69.1 ± 12.9 ^{**}	86.1 ± 12.4 ^{**}	75.5 ± 10.4 ^{**}	83.2 ± 14.5 ^{**}
Mtb 感染组	28.6 ± 9.1 [*]	35.0 ± 4.8 ^{**}	28.5 ± 5.1 [*]	24.6 ± 6.3 ^{**}
灭活 Mtb 感染组	50.9 ± 10.8 ^{**}	69.6 ± 9.8 ^{**}	47.7 ± 7.4 ^{**}	54.3 ± 8.3 ^{**}
F	39.54	96.17	95.49	78.49
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
MS _{组内}	92.430	68.460	47.393	79.748

q 检验:与对照组比较 ** $P < 0.01$;与 Mtb 感染组比较 ## $P < 0.01$

2.3 各组细胞因子 IL-6、IL-12 和 TNF- α 的分泌情况比较 LPS、Mtb 或灭活 Mtb 作用后,DC 的 IL-6、IL-12 和 TNF- α 的分泌量均显著高于对照组 ($P < 0.01$);Mtb 感染组 DC 的 IL-6、IL-12 和 TNF- α 的分泌量均显著低于 LPS 感染组 ($P < 0.01$),而 IL-12 和 TNF- α 亦明显低于灭活 Mtb 感染组 ($P < 0.01$) (见表 2)。

表 2 酶联免疫吸附法测定 DC 细胞因子水平的变化比较 ($n_i = 5; \bar{x} \pm s; \text{pg/ml}$)

分组	IL-6	IL-12	TNF- α
对照组	35.1 ± 2.8	89.6 ± 3.0	58.1 ± 4.2
LPS 感染组	190.5 ± 34.9 ^{**}	451.7 ± 25.7 ^{**}	199.7 ± 16.8 ^{**}
Mtb 感染组	122.0 ± 11.5 ^{**}	174.3 ± 14.4 ^{**}	81.2 ± 8.0 ^{**}
灭活 Mtb 感染组	134.9 ± 12.7 ^{**}	396.0 ± 21.8 ^{**}	131.1 ± 11.7 ^{**}
F	54.42	445.45	156.93
P	<0.01	<0.01	<0.01
MS _{组内}	379.848	338.023	125.193

q 检验:与对照组比较 ** $P < 0.01$;与 Mtb 感染组比较 ## $P < 0.01$

3 讨论

近年来,DC 在抗感染免疫过程中所扮演的角色越来越受到人们的重视。在免疫稳定状态下,分布于外周非淋巴组织的 DC 处于未成熟状态。感染发

生时,未成熟 DC 就会向炎症部位迁移,摄取加工抗原,同时释放大量的炎性因子,激发天然免疫应答,避免感染的扩散。同时,未成熟 DC 发生一系列变化,获得成熟表型及功能,有效激活初始 T 细胞启动免疫应答。在 Mtb 感染宿主机体的过程中,与宿主抗原递呈细胞 DC 的相互作用决定了机体免疫应答的起始^[5]。因此研究 DC 在抗 Mtb 感染中的作用,能为阐明 Mtb 免疫逃避机制及设计免疫治疗方案提供重要的信息。

本研究发现 LPS、Mtb 和灭活 Mtb 3 种作用因素均可促进 DC 成熟,表现在细胞表面抗原递呈分子、协同刺激因子表达增加。成熟 DC 表面高效表达免疫相关分子和趋化因子受体,在趋化因子梯度影响下细胞向淋巴结迁移,随后同 T 细胞相互作用,从而有效地提呈抗原并刺激产生 T 细胞免疫反应。本实验结果也发现,Mtb 感染组 DC 表面抗原递呈分子、T 细胞共刺激因子上调不如 LPS 感染组和灭活 Mtb 感染组明显,表明 Mtb 活菌可抑制 DC 成熟,从而削弱其抗原递呈的功能。

感染组织内先天免疫细胞的局部炎症反应影响抗原递呈和 T 细胞的活化。在结核杆菌感染中,IL-6 不仅为分泌 γ 干扰素 T 细胞的激活所必需,而且是一种主要的诱导保护性 T 细胞分子,加强 γ 干扰素的作用^[6]。IL-12 是 IL 家族中比较新的成员,是促进辅助性 T 细胞分化的关键细胞因子。对于许多感染性疾病而言,IL-12 是由 DC 和吞噬细胞在免疫应答初期与病原体接触后产生^[7-8]。TNF- α 也是 DC 与 T 细胞作用能力增强的重要因素,DC 分泌的 TNF- α 会以自分泌和旁分泌的方式调控 DC 在体内的成熟和迁移。通过这种方式,分泌 TNF- α 的 DC 可将天然免疫和获得性免疫联结起来。本研究结果发现,Mtb 感染组 DC IL-6、IL-12 和 TNF- α 的分泌量

(下转第 1151 页)

挥的作用还有待进一步阐明。

[参 考 文 献]

- [1] Haas W, Pereira P, Tonegawa S. γ/δ cells [J]. *Annu Rev Immunol*, 1993, 11: 637 - 685.
- [2] Carding SR, Egan PJ. $\gamma\delta$ T cells: functional plasticity and heterogeneity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(5): 336 - 345.
- [3] 赵温利, 李柏青, 田志刚. $\gamma\delta$ T 细胞与肿瘤免疫 [J]. *国外医学: 肿瘤学分册*, 1997, 24(3): 149 - 152.
- [4] Wilhelin M, Kunamana V, Eckstein S, et al. $\gamma\delta$ T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies [J]. *Blood*, 2003, 102(1): 200 - 206.
- [5] Svensson L, Lilliehook B, Larsson R, et al. $\gamma\delta$ T cells contribute to the systemic immunoglobulin E response and local B-cell reactivity in allergic eosinophilic airway inflammation [J]. *Immunology*, 2003, 108(1): 98 - 108.
- [6] Hamzaoui A, Kahan A, Aayed K, et al. T cells expressing the $\gamma\delta$ receptor are essential for Th2-mediated inflammation in patients with acute exacerbation of asthma [J]. *Mediators Inflamm*, 2002, 11(2): 113 - 119.
- [7] Wesch D, Glatzel A, Kabelitz D. Differentiation of resting human peripheral blood $\gamma\delta$ T cells toward Th1- or Th2- phenotype [J]. *Cell Immunol*, 2001, 12(2): 110 - 117.
- [8] Dobmeyer TS, Dobmeyer R, Wesch D, et al. Reciprocal alterations of Th1/Th2 function in $\gamma\delta$ T-cell subsets of human immunodeficiency virus-1-infected patients [J]. *Br J Haematol*, 2002, 118(1): 282-288.
- [9] Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, et al. Interleukin-1 and IL-23

induce innate IL-17 production from $\gamma\delta$ T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity [J]. *Immunity*, 2009, 31(2): 331 - 341.

- [10] Huang XK, Yang QT, Chen YL, et al. Expression of peripheral blood $\gamma\delta$ T cells, treg cells and cytokines IL-17 and TGF- β 1 in patients with allergic rhinitis [J]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 2013, 48(7): 544 - 548.
- [11] Peng MY, Wang ZH, Yao CY, et al. Interleukin 17-Producing $\gamma\delta$ T cells increased in patients with active pulmonary tuberculosis [J]. *Cell Mol Immunol*, 2008, 5(3): 203 - 208.
- [12] Yokobori N, Schierloh P, Geffner L, et al. CD3 expression distinguishes two $\gamma\delta$ T cell receptor subsets with different phenotype and effector function in tuberculous pleurisy [J]. *Clin Exp Immunol*, 2009, 157(3): 385 - 394.
- [13] Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease [J]. *Altern Med Rev*, 2003, 8(3): 223 - 246.
- [14] Umemura M, Yahagi A, Hamada S, et al. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin infection [J]. *J Immunol*, 2007, 178(6): 3786 - 3796.
- [15] Beetz S, Wesch D, Marischen L, et al. Innate immune functions of human $\gamma\delta$ T cells [J]. *Immunobiology*, 2008, 213(3/4): 173 - 182.
- [16] 李柏青, 宋秀宇, 王安潮, 等. 不同 T 细胞亚群在抗结核杆菌感染中的作用 [J]. *蚌埠医学院学报*, 1999, 24(6): 377 - 379.

(本文编辑 姚仁斌)

(上接第 1147 页)

均显著低于 LPS 感染组 ($P < 0.01$), 而 IL-12 和 TNF- α 亦明显低于灭活 Mtb 感染组 ($P < 0.01$)。提示 Mtb 活菌干扰 DC 的细胞因子分泌, 导致感染的 DC 具有较低的激活辅助性 T 细胞能力, 从而影响抗原特异性细胞免疫活化。

Mtb 与免疫系统的动态关系直接影响 Mtb 感染转归。Mtb 感染后抑制 DC 成熟及炎症反应可能是细菌逃避机体免疫反应的一种机制。本研究结果为 Mtb 感染与免疫机制的研究提供了参考, 对控制 Mtb 感染具有重要的参考价值。

[参 考 文 献]

- [1] Raviglione MC. The global plan to stop TB [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2006, 10(3): 238 - 239.
- [2] Adane M. The role of dendritic cells in *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. *Virulence*, 2012, 3(7): 654 - 659.
- [3] Zhang J, Jiang R, Takayama H, et al. Survival of virulent *Mycobacterium tuberculosis* involves preventing apoptosis induced by Bcl-2 upregulation and release resulting from necrosis in J774

macrophages [J]. *Microbiol Immunol*, 2005, 49(9): 845 - 852.

- [4] Day RB, Wang Y, Knox KS, et al. Alveolar macrophages from HIV-infected subjects are resistant to *Mycobacterium tuberculosis* *in vitro* [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, 30(3): 403 - 410.
- [5] Tzelepis F, Verway M, Daoud J, et al. Annexin1 regulates DC efferocytosis and cross-presentation during *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(2): 752 - 768.
- [6] Leal IS, Florido M, Andersen P, et al. Interleukin-6 regulates the phenotype of the immune response to a tuberculosis subunit vaccine [J]. *Immunology*, 2001, 103(3): 375 - 381.
- [7] Yue SC, Nowak M, Shaulov-Kask A, et al. Direct CD1d-mediated stimulation of APC IL-12 production and protective immune response to virus infection *in vivo* [J]. *J Immunol*, 2010, 184(1): 268 - 276.
- [8] Yoon WS, Choi HJ, Park YK. Salmonella typhimurium harboring plasmid expressing interleukin-12 induced attenuation of infection and protective immune responses [J]. *J Gen Appl Microbiol*, 2011, 57(2): 115 - 122.

(本文编辑 马启)