

AEC II 细胞不同毒力结核分枝杆菌感染后炎症因子及 TLRs 信号通路的表达变化

刘卫国, 崔俊伟, 张静, 王永亮, 李振云

新乡医学院第一附属医院结核内科, 河南 卫辉 453100

摘要: 目的 研究肺泡 II 型(AEC II)细胞不同毒力结核分枝杆菌感染后炎症因子及 Toll 样受体(TLRs)信号通路的表达变化,为结核分枝杆菌的免疫治疗提供参考。方法 建立结核分枝杆菌强毒力株 H37Rv 与弱毒力株 BCG 菌株感染的 AEC II 细胞模型,在感染 12 h 后采用荧光定量 PCR、Western blot 技术等分析 TLRs 信号通路及炎症因子的表达。结果 强毒力 H37Rv 株感染 12 h 时细胞 TLR2 mRNA、TLR4 mRNA 相对表达量分别为(1.73±0.35)、(1.87±0.52),弱毒力 BCG 株感染分别为(1.18±0.34)、(1.33±0.28),比较差异有统计学意义($P<0.05$);强毒力 H37Rv 株感染 12 h 时 IL-6、IL-8 及 TNF- α 蛋白表达水平(ODI 值)分别为(2.74±0.57)、(2.95±0.43)、(5.12±0.71),弱毒力 BCG 株感染分别为(0.73±0.21)、(0.87±0.22)、(1.85±0.30),比较差异有统计学意义($P<0.05$);两种毒力结核分枝杆菌菌株感染 12 h 后细胞 TLR2 mRNA、TLR4mRNA 表达量与 IL-6、IL-8 及 TNF- α 蛋白表达量之间均存在正相关性($P<0.05$)。结论 强毒力较弱毒力结核分枝杆菌感染更能活化 AEC II 细胞 TLRs 信号通路,促进炎症细胞因子分泌,介导机体炎症反应及影响机体免疫功能。

关键词: 肺泡 II 型细胞; 毒力; 结核分枝杆菌; 感染; 细胞因子; Toll 样受体; 信号通路

中图分类号:R378.91⁺1 文献标识码:B 文章编号:1006-3110(2017)08-0992-04 DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2017.08.030

Changes of expression of inflammatory cytokine and Toil-like receptor signaling pathway in alveolar epithelial type II cells infected with different virulence of *Mycobacterium tuberculosis*

LIU Wei-guo, CUI Jun-wei, ZHANG Jing, WANG Yong-liang, LI Zhen-yun

Department of Tuberculosis Internal Medicine, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Weihui, Henan 453100, China

Abstract: **Objective** To study the changes of expression of inflammatory cytokine and Toil-like receptors (TLRs) signaling

作者简介:刘卫国(1968-),男,河南延津人,本科学历,副主任医师,研究方向:结核病的诊治。

理想,这需要不断探究新的检测方法或者对目前方法进行改良,只有尽早且准确地诊断侵袭性真菌感染才能及时挽救更多患者的生命。

参考文献

- [1] 黎新桂. 侵袭性真菌感染实验室诊断研究进展[J]. 实验与检验医学, 2011, 29(4):395-396.
- [2] 徐承杰, 吕兰凤, 李术惠, 等. G 实验的临床意义[J]. 现代医药卫生, 2011, 27(4):493-494.
- [3] 蒋燕萍, 余进, 李若瑜, 等. 血浆(1,3)- β -D-葡聚糖检测方法对诊断侵袭性真菌感染的作用[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(10):1171-1172.
- [4] 匡红, 周琳瑶, 刘书荣, 等. G 实验与真菌培养在临床深部真菌感染辅助诊断的价值[J]. 检验医学与临床, 2014, 11(23):3308-3309.
- [5] Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F, et al. β -D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis[J]. Clin Infect Dis, 2011, 52(6):750-770.
- [6] Badiie P, Alborzi A, Karimi M, et al. Diagnostic potential of nested PCR, galactomannan EIA, and beta-D-glucan for invasive aspergillo-

sis in pediatric patients[J]. J Infect Dev Countr, 2012, 6(4):352-357.

- [7] Alexander BD, Smith PB, Davis RD, et al. The (1,3) β -D-glucan test as an aid to early diagnosis of invasive fungal infections following lung transplantation[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(11):4083-4088.
- [8] 于凯江, 方强, 刘大为. 重症患者侵袭性真菌感染诊断与治疗指南(2007)[J]. 中华内科杂志, 2007, 46(11):960-966.
- [9] 蒋伟, 周峥, 李少增, 等. (1,3)- β -D-葡聚糖检测对深部真菌感染的诊断意义[J]. 实用预防医学, 2014, 21(1):89-91.
- [10] 李丽华, 李明友, 林茂锐, 等. 血浆 1-3- β -D 葡聚糖检测联合真菌培养对深部真菌感染诊断的价值[J]. 现代医院, 2014, 14(1):25-27.
- [11] 黄晓军. 血液病/恶性肿瘤患者侵袭性真菌病的诊断标准与治疗原则(第四次修订版)[J]. 中华内科杂志, 2013, 52(8):704-709.
- [12] Ellis M, Al-Ramadi B, Finkelman M, et al. Assessment of the clinical utility of serial β -D glucan concentrations inpatients with persistent neutropenic fever[J]. J Med Microbiol, 2008.

收稿日期:2017-04-06

pathway during alveolar epithelial type II cells (AEC II) infected with different virulence of *Mycobacterium tuberculosis*, and to provide a basis for the immunotherapy of *Mycobacterium tuberculosis*. **Methods** We established the model of AEC II infected with *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strains and Bacillus Calmette-Guérin (BCG) strains. 12 hours after infection, real-time fluorescence quantitative PCR and Western-blot were used to detect the expression of TLRs signaling pathway and inflammatory cytokine. **Results** The relative expression of TLR2 and TLR4 mRNA in the AEC II cells infected by H37Rv at 12 hour time point was (1.73 ± 0.35) and (1.87 ± 0.52) respectively, while that of TLR2 and TLR4 mRNA in the AEC II cells infected by BCG was (1.18 ± 0.34) and (1.33 ± 0.28) respectively, showing statistically significant differences (both $P < 0.05$). The protein expression levels of IL-6, IL-8 and TNF- α in the AEC II cells infected by H37Rv at 12 hour time point were (2.74 ± 0.57) , (2.95 ± 0.43) and (5.12 ± 0.71) respectively, while those of IL-6, IL-8 and TNF- α in the AEC II cells infected by BCG were (0.73 ± 0.21) , (0.87 ± 0.22) and (1.85 ± 0.30) respectively, with statistically significant differences (all $P < 0.05$). There was a positive correlation between the expression of TLR2 and TLR4 mRNA and the protein expression levels of IL-6, IL-8 and TNF- α in the AEC II cells infected by H37Rv and BCG at 12 hour time point ($P < 0.05$). **Conclusions** As compared with weak virulence *Mycobacterium tuberculosis* BCG infection, strong virulence *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv infection can activate the TLRs signaling pathway of the AECII cells, and then the activated TLRs signaling pathway can promote the secretion of inflammatory cytokines, mediate the inflammation of the body and affect the immune function.

Key words: alveolar epithelial type II cell; virulence; *Mycobacterium tuberculosis*; infection; cytokine; toll-like receptor; signaling pathway

结核分枝杆菌可引起结核病的发生,其中肺结核具有极强的传染性,在全球范围内每年结核病发病及患病人数仍然呈现上升趋势^[1-2],尤其是在经济落后地区,结核病是严重威胁人类健康的疾病之一。肺泡 II 型细胞(alveolar epithelial type II cells, AEC II)是结核分枝杆菌进入呼吸道后最先侵犯的细胞之一,可在细胞内复制,同时影响到细胞因子及炎症介质的表达,因此抗结核分枝杆菌感染的免疫调控在近年来逐渐受到临床重视。Toll 样受体(toll-like receptors, TLRs)是先天免疫模式识别受体,是免疫识别及免疫监视过程中最重要的受体,在机体感染结核分枝杆菌后 AEC II 被侵犯,TLRs 可对结核分枝杆菌识别^[3-5],开启免疫应答。H37Rv 与 BCG 均为结核分枝杆菌毒菌株,但是毒性强力明显不同,其中 BCG 是牛分枝杆菌在体外传代 230 代后取得的弱毒株,是用于儿童免疫接种的疫苗,在接种后可促使机体产生免疫保护效应,有研究显示 H37Rv 毒株可影响到 TLRs 信号通路的表达^[6],本研究对 AEC II 细胞不同毒力结核分枝杆菌感染后细胞因子及 TLRs 信号通路的表达进行了研究,为结核分枝杆菌的免疫治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 2016 年 1 月于成都生物制品研究所采购结核分枝杆菌 H37Rv 与 BCG 菌株, AEC II-A459 细胞购自中国科学院细胞库。

1.2 仪器与试剂 美国 Sigma 公司生产的吐温 80 及考马斯 G250、TEMAD、过硫酸铵,美国 Amersco 公司生

产的 Na_2EDTA 及 Typsin,美国 BD 公司生产的 Middlebeok 7H9 及 OADC Enrichment,美国 Thermo 公司生产的胎牛血清、RPMI-1640,美国 Millipore 公司生产的聚偏二氟乙烯基焦炭酸二乙酯,美国 Advanta 公司生产的反转录试剂盒,德国 Qiagen 公司生产的 PCR 试剂盒,美国 Cell signaling Technology 公司生产的 TLR2 与 TLR6 一抗,武汉博士德生物公司生产的羊抗兔 IgG-HRP 二抗,深圳欣博盛生物公司生产的人 IL-6、IL-8 及 TNF- α 免疫吸附法检测试剂盒。

1.3 方法

1.3.1 菌株的培养 结核分枝杆菌 H37Rv 与 BCG 菌株用 PBS 液进行缓冲,在罗氏培养基上进行划线,在饱和湿度、5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 下进行培养 4~6 周,在出血黄色菜花样菌落后挑取菌落接种在增菌液及吐温 80 的 7H9 液体培养基中进行再次培养 3~4 周。

1.3.2 AEC II 细胞不同毒力结核分枝杆菌感染模型的建立 AEC II-A459 细胞采用 EDTA 消化、FBS 与 RPMI-1640 培养液进行稀释,浓度稀释至 $2 \times 10^5/\text{ml}$,接种在 6 孔板,每孔 2.5 ml,在饱和湿度、5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 下进行培养过夜;将 H37Rv 与 BCG 菌株培养液在 3 000 r/min 离心处理 10 min,取得细胞菌液加入含有 AEC II-A459 细胞 6 孔板中,每孔 300 μl ,饱和湿度、5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 下进行培养,在 12 h 后提取感染的 AEC II-A459 细胞 TLR2 mRNA、TLR4 mRNA 及 IL-6、IL-8 及 TNF- α 蛋白质,收集细胞液。

1.3.3 实时荧光定量反转录 PCR 将提取的 RNA 按照反转录试剂盒操作说明进行进行反转录取得 cDNA,严格按照试剂盒操作说明操作,反应参数:95 $^{\circ}\text{C}$

下预变性 30 s,60 ℃ 下退火 5 s、72 ℃ 下延伸 15 s,共进行 40 个循环,95 ℃ 下变性 30 s,55 ℃ 下退火 30 s、55 ℃ 下延伸 15 s,共进行 81 个循环,对 PCR 进行定量分析。mRNA 相对表达量=目的基因/内参基因。

1.3.4 Western blotting 法测定细胞 IL-6、IL-8 及 TNF-α 蛋白质 取 AEC II-A459 细胞放入匀浆器中,加入 40 μl 蛋白酶抑制剂及 1 ml RIPA 冰上裂解 15 min,离心处理 20 min,留取上清液,取定量蛋白 25 μg 于 5% 积层胶、10% 分离胶进行 SDS-PAGE 电泳,先 120 V 电泳 15 min,再 150 V 电泳 40 min,溴酚蓝至胶底部则停止电泳。剪一块与胶大小一致的湿法电转膜(PVDF 膜),甲醇浸泡 10 min,转移至 buffer 溶液中浸泡 10 min,打开并平放转移,阳极朝上,放入转膜槽中,加入冰盒,倒入转移 buffer 溶液。转膜结束后应用丽春红染色液染 PVDF 膜并观察蛋白条带确保蛋白成功转移至膜上,常温下应用 0.5% 脱脂牛奶封闭 PVDF 膜 1 h,加入 IL-6 一抗、IL-8 一抗及 TNF-α 一抗,37 ℃ 恒温孵育 1 h 后 4 ℃ 过夜,应用 PBS 冲洗 4 次,加入二抗(1:100),7 ℃ 恒温孵育 1 h,PBS 冲洗 4 次,显色后应用图像扫描分析软件对灰度进行分析,并应用分光光度仪测定 IL-6、IL-8 及 TNF-α 分光光度值(ODI 值)。ODI 值与物质表达水平呈正相关,ODI 值越大表示物质含量越高。

1.4 统计学方法 数据采用 SPSS19.0 统计学软件进行统计分析,计量资料采用 *t* 检验,相关性分析采用 Pearson 相关分析,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AEC II 细胞不同毒力结核分枝杆菌感染后细胞中 TLRs 信号通路 mRNA 的表达 强毒力 H37Rv 株感染 12 h 时细胞 TLR2 mRNA、TLR4 mRNA 分别为 (1.73±0.35)、(1.87±0.52),弱毒力 BCG 株感染 12 h 时细胞 TLR2 mRNA、TLR4 mRNA 分别为 (1.18±0.34)、(1.33±0.28),比较差异有统计学意义 (*P*<0.05),见表 1。

表 1 AEC II 细胞不同毒力结核分枝杆菌感染后细胞中 TLRs 信号通路 mRNA 的相对表达量比较 (*n*=6, $\bar{x}\pm s$)

信号通路	H37Rv 株感染	BCG 株感染	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
TLR2 mRNA 表达量	1.73±0.35	1.18±0.34	2.76	<0.05
TLR4 mRNA 表达量	1.87±0.52	1.33±0.28	2.24	<0.05

2.2 AEC II 细胞不同毒力结核分枝杆菌感染后相关炎症因子 ODI 值比较 强毒力 H37Rv 株感染 12 h 时 IL-6、IL-8 及 TNF-α ODI 值高于弱毒力 BCG 株感染 12 h 时 IL-6、IL-8 及 TNF-α ODI 值,比较差异有统计

学意义 (*P*<0.05),见表 2。

表 2 AEC II 细胞不同毒力结核分枝杆菌感染后相关炎症因子 ODI 值比较 (*n*=6, $\bar{x}\pm s$)

细胞因子	H37Rv 株感染	BCG 株感染	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
IL-6	75.28±5.26	35.26±4.22	32.225	<0.05
IL-8	82.02±7.58	28.12±3.96	29.363	<0.05
TNF-α	76.33±6.33	30.33±4.99	25.663	<0.05

2.3 感染的 AEC II 细胞 TLRs 信号通路相关分子 mRNA 与炎症细胞因子表达的相关性 两种毒力结核分枝杆菌菌株感染 12 h 后细胞 TLR2 mRNA、TLR4 mRNA 相对表达量与 IL-6、IL-8 及 TNF-α 的 ODI 值之间均存在正相关性 (*P*<0.05),见表 3。

表 3 感染的 AEC II 细胞 TLRs 信号通路相关分子 mRNA 与炎症细胞因子表达的相关性 (*r*)

细胞因子	H37Rv 株感染		BCG 株感染	
	TLR2 mRNA	TLR4 mRNA	TLR2 mRNA	TLR4 mRNA
IL-6	0.54	0.56	0.51	0.55
IL-8	0.65	0.60	0.56	0.61
TNF-α	0.77	0.82	0.54	0.73

3 讨论

结核病是严重危害人体健康的传染病之一,其发病机制非常复杂。既往研究指出,人体感染肺结核分枝杆菌后可刺激巨噬细胞分泌,并引起机体炎症反应^[7]。董伟杰等^[8]研究指出,肺结核分枝杆菌主要侵袭肺脏 II 型上皮细胞,并可诱导肺脏发生炎症反应及破坏机体免疫功能。TLRs 信号通路是连接机体先天性免疫及固有免疫的桥梁,在抵抗病原菌侵入,激活机体免疫反应及刺激机体产生炎症因子过程中起到重要的作用。

本研究通过采用结核分枝杆菌强毒菌株(H37Rv)及结核分枝杆菌弱毒菌株(BCG)分别感染肺脏上 II 型细胞 A549,通过对 Toll 样受体信号分子及细胞因子检测发现,毒力不同时 TLRs 信号通路的表达存在不同,主要表现为强毒力感染的 AEC II 细胞引起的 TLR2 和 TLR4 mRNA 表达量存在不同,其机制可能是结核分枝杆菌感染后 TLR2 与 TLR4 介导的免疫应答被启动,强毒力 H37Rv 株感染 12 h 时细胞 TLR2 mRNA、TLR4 mRNA 表达量高于弱毒力 BCG 株感染 12 h 时细胞 TLR2 mRNA、TLR4 mRNA,说明强毒力 H37Rv 株相对于弱毒力 BCG 株对机体免疫应答更为强烈,这也是结核分枝杆菌感染会引起机体发病而 BCG 主动免疫则不会引起结核感染。

有报道显示随着感染时间的推移 TLR2 和 TLR4

mRNA 表达量、TRAF3 mRNA 表达量也有所不同^[9],在强毒力感染时可随着感染时间推移表达量有先下降再升高的趋势,本研究中仅做了 12 h 感染研究,未能进一步研究,但是发现强毒力感染早期即可 TLR2 和 TLR4 mRNA 表达量明显升高,但具体作用机制在日后研究中还需进一步研究。上述学者研究认为 TLR2/TLR4 在 ACE II 细胞识别结核分枝杆菌过程中具有协同作用^[10],同时研究认为可能除 TLRs 信号通路之外还存在其他的途径来刺激机体产生抗体,但是本研究未进一步对其他途径进行研究,因此是否支持其他途径的存在,尚需要其他研究来证实。

结核分枝杆菌感染机体后侵犯 AEC II 细胞及巨噬细胞,肺泡的巨噬细胞具有免疫调控作用,同时 TLRs 信号通路由于参与了细胞免疫应答及炎症反应过程,在此过程中 TNF- α 等均是较为关键的基因,TLRs 可刺激下游重要的转录因子 NF- κ B 引起活性活化^[11-13],介导 TNF- α 在多个基因中的表达,从而导致炎症反应的发生,发生炎症级联反应,导致其他炎症因子的分泌及合成。IL-6 主要刺激 T 细胞成熟,表达下调可引起 T 细胞成熟下降,T 细胞对结核分枝杆菌的免疫杀伤能力下降^[14-15],这也是结核病反复感染的原因。IL-8 是趋化因子,可对 T 细胞及巨噬细胞形成趋化作用,结核分枝杆菌可寄生在巨噬细胞及 ACE II 细胞内,IL-8 的表达上调会影响到免疫应答能力下降,防止机体对结核分枝杆菌起到杀伤作用^[16-18]。本研究对 AEC II 细胞不同毒力结核分枝杆菌感染后 TNF- α 、IL-6、IL-8 的表达进行了研究,结果显示强毒力 H37Rv 株感染 12 h 时 IL-6、IL-8 及 TNF- α 表达量高于弱毒力 BCG 株感染,说明弱毒力的 BCG 不能引起炎症反应或炎症反应较为微弱。

综上所述,AEC II 细胞不同毒力结核分枝杆菌感染 TLRs 信号通路表达存在差异,强毒力结核分枝杆菌可上调炎症相关细胞因子的表达,弱毒力结核分枝杆菌对炎症相关细胞因子的影响较为微弱。

参考文献

- [1] 马小军. 国内外非结核分枝杆菌诊治指南比较及临床适用性思考[J]. 中华内科杂志, 2016, 55(4):264-266.
- [2] 赵文娟, 徐力红, 张翠英, 等. 驻京某部 2008-2012 年结核病疫情调查分析[J]. 实用预防医学, 2014, 21(9):1068-1070.
- [3] Neagos J, Standiford TJ, Newstead MW, et al. Epigenetic regulation of tolerance to Toll-like receptor ligands in alveolar epithelial cells[J]. Am J Resp Cell Mol Biol, 2015, 53(6):872-881.
- [4] Kuhn H, Petzold K, Hammerschmidt S, et al. Interaction of cyclic me-

- chanical stretch and Toll-like receptor 4-mediated innate immunity in rat alveolar type II cells[J]. Respirology, 2014, 19(1):67-73.
- [5] Sequeira PC, Senaratne RH, Riley LW. Inhibition of toll-like receptor 2 (TLR-2)-mediated response in human alveolar epithelial cells by mycolic acids and *Mycobacterium tuberculosis* mce1 operon mutant [J]. Pathog Dis, 2014, 70(2):132-140.
- [6] Richardson ET, Shukla S, Sweet DR, et al. Toll-like receptor 2-dependent extracellular signal-regulated kinase signaling in *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages drives anti-inflammatory responses and inhibits Th1 polarization of responding T cells[J]. Infect Immun, 2015, 83(6):2242-2254.
- [7] 刘丹霞, 董伟杰, 唐清章, 等. 不同毒力结核分枝杆菌对感染宿主巨噬细胞应激的调控作用研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2013, 8(3):2177-2179.
- [8] 董伟杰, 李微, 刘丹霞, 等. 检测不同毒力结核分枝杆菌感染对巨噬细胞凋亡的影响及其 Caspase-3 和 Bcl-2 的表达[J]. 中国细胞生物学学报, 2013, 35(2):188-195.
- [9] Marino S, Cilfone NA, Mattila JT, et al. Macrophage polarization drives granuloma outcome during *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. Infect Immun, 2015, 83(1):324-338.
- [10] Podinovskaia M, Lee W, Caldwell S, et al. Infection of macrophages with *Mycobacterium tuberculosis* induces global modifications to phagosomal function[J]. Cell Microbiol, 2013, 15(6):843-859.
- [11] 刘东晓, 程龙, 王晓平, 等. 结核分枝杆菌(H37Rv 和 BCG)在感染 AEC II 细胞系 A549 中对 TLRs 信号通路和促炎因子表达的影响[J]. 农业生物技术学报, 2015, 24(2):252-260.
- [12] 刘超, 郑金旭, 许蛟, 等. IL-33/TLR4 信号通路在 A549 细胞上皮-间质转化中的作用[J]. 江苏大学学报(医学版), 2014, 24(4):283-286.
- [13] Chen L, Yi L, Ren Y, et al. Enhancement of natural killer cell interferon-gamma production by the derivatives of the natural product phyllanthusmins via TLR-mediated NF-Kb and STAT3 signaling pathways [J]. Blood, 2015, 126(23):1031-1034.
- [14] 蔺晓源, 刘杰民. TLR4/MyD88/NF-kB 信号通路与溃疡性结肠炎[J]. 胃肠病学, 2013, 18(4):244-246.
- [15] Yuan J, Hu L, Song XG, et al. Influence of moxibustion on TLR 4-MyD 88-NF-KB signal transduction pathway of synovial tissue in rheumatoid arthritis rats[J]. Acupuncture Res, 2015, 40(3):199-204.
- [16] Fan Q, Lu M, Xia ZY, et al. *Mycobacterium tuberculosis* MPT64 stimulates the activation of murine macrophage modulated by IFN- γ [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2013, 17(24):3296-3305.
- [17] Singh Y, Kaul V, Mehra A, et al. *Mycobacterium tuberculosis* controls microRNA-99b (miR-99b) expression in infected murine dendritic cells to modulate host immunity[J]. J Biol Chem, 2013, 288(7):5056-5061.
- [18] Andersson H, Andersson B, Eklund D, et al. Apoptotic neutrophils augment the inflammatory response to *Mycobacterium tuberculosis* infection in human macrophages[J]. PLoS One, 2014, 9(7):e101514.

收稿日期:2017-01-15