

巨噬细胞冠蛋白-1 siRNA对小鼠 巨噬细胞吞噬功能的影响

吴蕊鑫 陈 全* 贺静荣 刘革力 张路渝

(重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心, 基础医学院免疫学教研室, 重庆 400016)

摘要 巨噬细胞冠蛋白-1(Coronin-1)与结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)逃逸免疫杀伤有关。该研究探讨了pS-EGFP-SP-Coronin-1siRNA重组质粒靶向抑制巨噬细胞Coronin-1表达后对小鼠巨噬细胞吞噬功能的影响。用该质粒转染小鼠巨噬细胞系RAW264.7, 采用RT-PCR法和Western blot检测质粒转染前后细胞Coronin-1的表达水平。以耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)分别感染转染质粒组细胞和对照组细胞, 通过细胞内细菌菌落计数和细胞爬片抗酸染色法评估巨噬细胞转染质粒前后对细菌的吞噬能力; 利用流式细胞术检测转染质粒组细胞及对照组细胞吞噬耻垢分枝杆菌后不同时间段的细胞凋亡水平。结果显示, 该质粒能显著抑制RAW264.7细胞Coronin-1的mRNA水平及蛋白表达水平; 感染耻垢分枝杆菌6 h后, 转染质粒组细胞内细菌数显著高于对照组细胞($P<0.05$); 感染耻垢分枝杆菌48 h后, 转染质粒组细胞凋亡水平显著高于对照组细胞($P<0.05$)。以上结果表明, pS-EGFP-SP-Coronin-1siRNA重组质粒能显著抑制巨噬细胞Coronin-1的表达, 并可显著促进巨噬细胞吞噬细菌和凋亡杀菌, 为开发靶向巨噬细胞Coronin-1的抗结核基因治疗措施奠定基础。

关键词 巨噬细胞; 冠蛋白-1; 小干扰RNA; 结核分枝杆菌; 耻垢分枝杆菌

Effect of Coronin-1 siRNA on Phagocytosis of Mouse Macrophages

Wu Ruixin, Chen Quan*, He Jingrong, Liu Geli, Zhang Luyu

(Molecular Medicine and Cancer Research Centre, Department of Immunology,
College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract Coronin-1 of macrophage is associated with the escaping immune killing of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). This study was aimed to investigate the effect of pS-EGFP-SP-Coronin-1siRNA plasmid on phagocytosis of mouse macrophages. The RAW264.7 cells were transfected with the plasmid, and the expression level of Coronin-1 in macrophages before and after plasmid transfection was detected by RT-PCR and Western blot. After the plasmid transfection group cells and the control group cells were infected with *Mycobacterium smegmatis* respectively, the ability of phagocytosis of macrophages was evaluated by colony count of intracellular bacteria and acid fast staining of cells on cover slips, and the apoptosis level of the plasmid transfection group cells and the control group cells after phagocytosis of *Mycobacterium smegmatis* was detected by the flow cytometry. The results showed that the plasmid can significantly inhibit the mRNA level and protein expression of Coronin-1 in RAW264.7 cells. The number of intracellular bacteria in the plasmid transfection group cells was significantly higher than that of the control group cells after infection with *Mycobacterium smegmatis* for 6 h ($P<0.05$). The

收稿日期: 2017-10-24 接受日期: 2018-01-09

重庆市科委自然科学基金(批准号: cstc2012jjA10033)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485248, E-mail: chenquan@cqmu.edu.cn

Received: October 24, 2017

Accepted: January 9, 2018

This work was supported by Chongqing Natural Science Foundation General Project (Grant No.cstc2012jjA10033)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485248, E-mail: chenquan@cqmu.edu.cn

网络出版时间: 2018-05-31 16:58:52

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.q.20180531.1658.016.html>

apoptosis level in the plasmid transfection group cells were significantly higher than that of the control group cells after infection with *Mycobacterium smegmatis* for 48 h ($P < 0.05$). These results indicated that the pS-EGFP-SP-Coronin-1siRNA plasmid can significantly inhibit the expression of Coronin-1 in macrophages, and significantly promote phagocytosis of bacteria and the bactericidal function through apoptosis of macrophages, which lay a foundation for the development of anti-tuberculosis gene therapy targeting macrophage Coronin-1.

Keywords macrophage; Coronin-1; siRNA; *Mycobacterium tuberculosis*; *Mycobacterium smegmatis*

结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)是一种胞内寄生菌, 感染人体后可逃逸巨噬细胞的杀伤而在细胞中长期存活^[1-2]。Mtb诱导巨噬细胞高表达Coronin-1蛋白, 该蛋白聚集在吞噬体膜上, 激活钙调磷酸酶信号通路, 抑制吞噬体和溶酶体融合, 是Mtb逃逸巨噬细胞杀伤的重要机制之一^[3-4]。特异性抑制巨噬细胞Coronin-1蛋白的表达可促进巨噬细胞吞噬体与溶酶体融合, 从而促进巨噬细胞杀伤Mtb, 因此, Coronin-1蛋白可能是针对宿主巨噬细胞抗结核治疗的一个潜在靶点。但是, 抑制Coronin-1蛋白表达对巨噬细胞固有的吞噬功能有无影响, 尚未见报道。本研究拟用pS-EGFP-SP-Coronin-1siRNA重组质粒靶向抑制巨噬细胞Coronin-1的表达后, 在细胞水平研究小鼠巨噬细胞系RAW264.7对耻垢分枝杆菌的吞噬能力以及感染细胞的凋亡水平, 以进一步阐明Coronin-1的效应以及其作为抗结核治疗靶点的可能性。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

耻垢分枝杆菌、小鼠巨噬细胞系RAW264.7(简称RAW264.7)由重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心保存。pS-EGFP-SP-Coronin-1siRNA重组质粒由课题组前期构建。DMEM高糖培养基、胰蛋白酶购于Hyclone公司。胎牛血清购于Natocor-Industria Biologica公司。Lipofectamine™ 3000购于Invitrogen公司。RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒、RT-PCR试剂盒、蛋白分子量标准、蛋白上样缓冲液购于TaKaRa公司。RIPA裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、青霉素-链霉素、PVDF膜均购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。SDS-PAGE凝胶速配试剂盒购于金斯瑞生物科技有限公司。小鼠Coronin-1单克隆抗体购于Abcam公司。 β -actin多克隆内参抗体购于Cell Signaling公司。羊抗鼠IgG二抗购于Proteintech公司。

1.2 RAW264.7细胞培养、转染及感染

将RAW264.7细胞接种于含150 mL/L胎牛血清和1%青霉素-链霉素混合液的DMEM高糖培养基中, 置于37 °C、含50 mL/L CO₂的培养箱中培养。待细胞生长至对数期, 用PBS清洗3次后, 调整细胞密度至 6×10^5 /孔接种于6孔板中、 2×10^5 /孔接种于24孔板中。将细胞分为两组: 第1组为转染质粒组, 即用Lipofectamine™ 3000将pS-EGFP-SP-Coronin-1siRNA重组质粒瞬时转染RAW264.7; 第2组为对照组, 即为未转染质粒的空白RAW264.7。质粒转染24 h后, 分别用PBS清洗3次, 再用耻垢分枝杆菌感染细胞。用7H10固体平板培养耻垢分枝杆菌72 h, 挑取适量细菌于无菌0.9%生理盐水中, 配制成5 mL 0.5麦氏浓度菌液, 按细菌:细胞为10:1的比例对两组细胞分别进行感染。

1.3 RT-PCR法检测细胞Coronin-1 mRNA水平

分别收集转染24 h后的转染质粒组细胞和同等条件培养的对照组细胞, 用RNA提取试剂盒分别提取2组细胞的总RNA。按照逆转录试剂盒说明书将其逆转录成cDNA, 再以cDNA为模板用SYBR嵌合荧光法进行PCR扩增。引物序列如下, Coronin-1上游引物: 5'-CAC CCG GAC ACA ATC TAC AGC-3', Coronin-1下游引物: 5'-CTC GAT GAC ACG AAC TCG CTT-3'; 内参GAPDH上游引物: 5'-AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG-3', GAPDH下游引物: 5'-GGG GTC GTT GAT GGC AAC A-3'。PCR反应条件为: 95 °C预变性2 min; 95 °C变性5 s, 60 °C退火30 s, 共39个循环; 熔解曲线为95 °C 5 s, 65 °C 5 s, 95 °C 5 s。每个反应做3个复孔。扩增完毕后, 对结果用2^{- $\Delta\Delta Ct$} 法进行相对定量分析, $\Delta\Delta Ct$ =对照组 ΔCt (目的基因Ct-管家基因Ct)-各组 ΔCt (目的基因Ct-管家基因Ct)。

1.4 Western blot法检测细胞Coronin-1蛋白的表达

分别收集转染24 h后的转染质粒组细胞和同等条件培养的对照组细胞, 用含有终浓度为1 mmol/L PMSF的RIPA蛋白裂解液分别提取两组细胞的总蛋

白, BCA法检测各组蛋白浓度。将两组细胞总蛋白样品浓度调整一致, 用10% SDS-PAGE的分离胶和5%的浓缩胶进行电泳分离, 根据蛋白分子量标准切下相应蛋白条带, 将分离胶上蛋白条带用250 mA恒流电转移至PVDF膜上。用50 g/L脱脂牛奶封闭2 h; 分别加入一抗(小鼠单克隆Coronin-1抗体, 1:1 000稀释)和 β -actin内参抗体(1:1 000稀释), 4 °C摇床孵育过夜。取出PVDF膜洗去多余一抗和内参抗体, 加入HRP标记的羊抗鼠IgG(1:2 000稀释), 室温条件下孵育2 h。经ECL发光显色后, 在Bio-Rod曝光仪上显影, 使用Image Lab分析条带灰度值。

1.5 感染细胞内耻垢分枝杆菌菌落总数(colony-forming units, CFU)计数

按1.2所述, 将两组细胞分别接种于6孔板中, 用耻垢分枝杆菌对两组细胞分别进行感染, 于感染后3、6、12、24、48、72 h分别收集细胞, 分别用PBS清洗3次后, 再用无菌2 g/L SDS溶液裂解细胞10 min。收集裂解液, 将裂解液按 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 稀释后, 涂布于7H10固体平板上, 37 °C培养72 h后进行菌落总数(CFU)计数。

1.6 显微镜下观察抗酸染色后的感染细胞

预先将无菌爬片放入24孔板中, 然后按1.2所述方法对细胞进行分组培养、质粒转染和细菌感染, 取2组细胞感染细菌后3、6、12、24、48、72 h的细胞爬片, 分别用PBS清洗3次后, 用40 g/L多聚甲醛固定24 h。对爬片进行抗酸染色, 然后置于油镜下观察, 随机计数100个巨噬细胞中耻垢分枝杆菌

的数量。

1.7 流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测感染细胞的凋亡率

分别收集转染24 h后的转染质粒组细胞和同等条件培养的对照组细胞, 以细菌:细胞为10:1的比例感染耻垢分枝杆菌, 分别收集两组细胞感染后3、6、12、24、48、72 h的细胞培养液及细胞于离心管中, 800 r/min离心5 min, 弃上清。再用1 mL完全DMEM高糖培养基重悬于无菌EP管中, 送重庆医科大学生命科学院用FCM检测细胞凋亡率。

1.8 统计学分析

所有实验独立重复3次, 数据均采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 使用SPSS 19.0软件进行数据分析, 各组间比较用单因素方差分析法。两组数据的比较采用独立样本的 t 检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

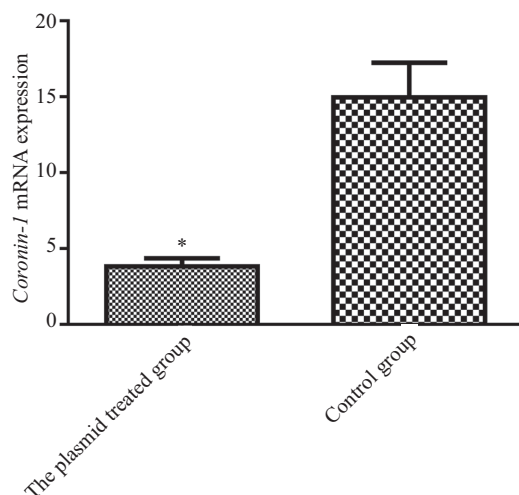
2 结果

2.1 两组RAW264.7细胞的Coronin-1 mRNA水平

RT-PCR结果显示, 转染质粒组(3.82 ± 0.54)的Coronin-1 mRNA水平明显低于对照组(14.95 ± 3.31) (图1), 两组数据进行 t 检验, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。结果说明, RAW264.7细胞转染质粒后的Coronin-1 mRNA水平显著降低。

2.2 两组RAW264.7细胞的Coronin-1蛋白表达水平

Western blot结果显示, 转染质粒组(0.84 ± 0.02) Coronin-1蛋白表达水平低于对照组(4.22 ± 0.05) (图2), 两组数据进行 t 检验, 差异具有统计学意义

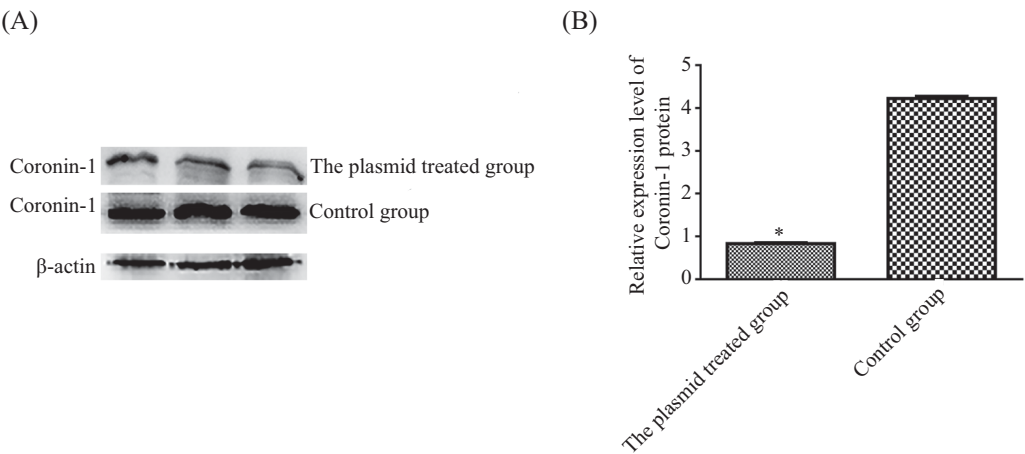


* $P<0.05$, 与对照比较。

* $P<0.05$ compare with the control group.

图1 RT-PCR法检测巨噬细胞Coronin-1 mRNA水平

Fig.1 mRNA level of Coronin-1 of macrophage detected by RT-PCR



A: 转染质粒组和对照组细胞的Coronin-1的Western blot检测结果; B: 转染质粒组和对照组细胞的Coronin-1蛋白表达的水平。* $P<0.05$, 与对照组比较。
A: Western blot detection results of protein levels of the plasmid transfection group and the control group; B: the relative protein level of the plasmid transfection group and the control group. * $P<0.05$ compare with control group.

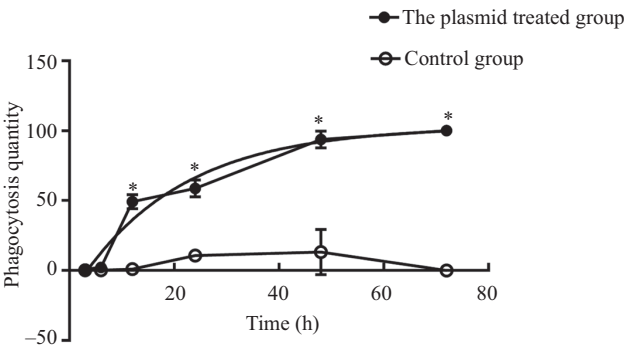
图2 Western blot法检测巨噬细胞Coronin-1蛋白质表达水平
Fig.2 Protein levels of Coronin-1 of macrophages detected by Western blot

表1 巨噬细胞内耻垢分枝杆菌菌落计数(10^{-3} /CFU)($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Colony counting of *Mycobacterium smegmatis* in macrophages (10^{-3} /CFU) ($\bar{x}\pm s$)

感染时间	3小时	6小时	12小时	24小时	48小时	72小时
Times of infection	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
pS-EGFP-SP-Coronin-1siRNA	1.00 $\pm$ 1.00	2.33 $\pm$ 2.31	49.33 $\pm$ 5.31*	58.67 $\pm$ 6.11*	93.67 $\pm$ 6.03*	100.00 $\pm$ 0*
Control group	0.33 $\pm$ 0.58	0.33 $\pm$ 0.58	1.00 $\pm$ 1.73	10.67 $\pm$ 3.06	13.33 $\pm$ 16.7	0

* $P<0.05$, 与对照组比较。
* $P<0.05$ compare with control group.



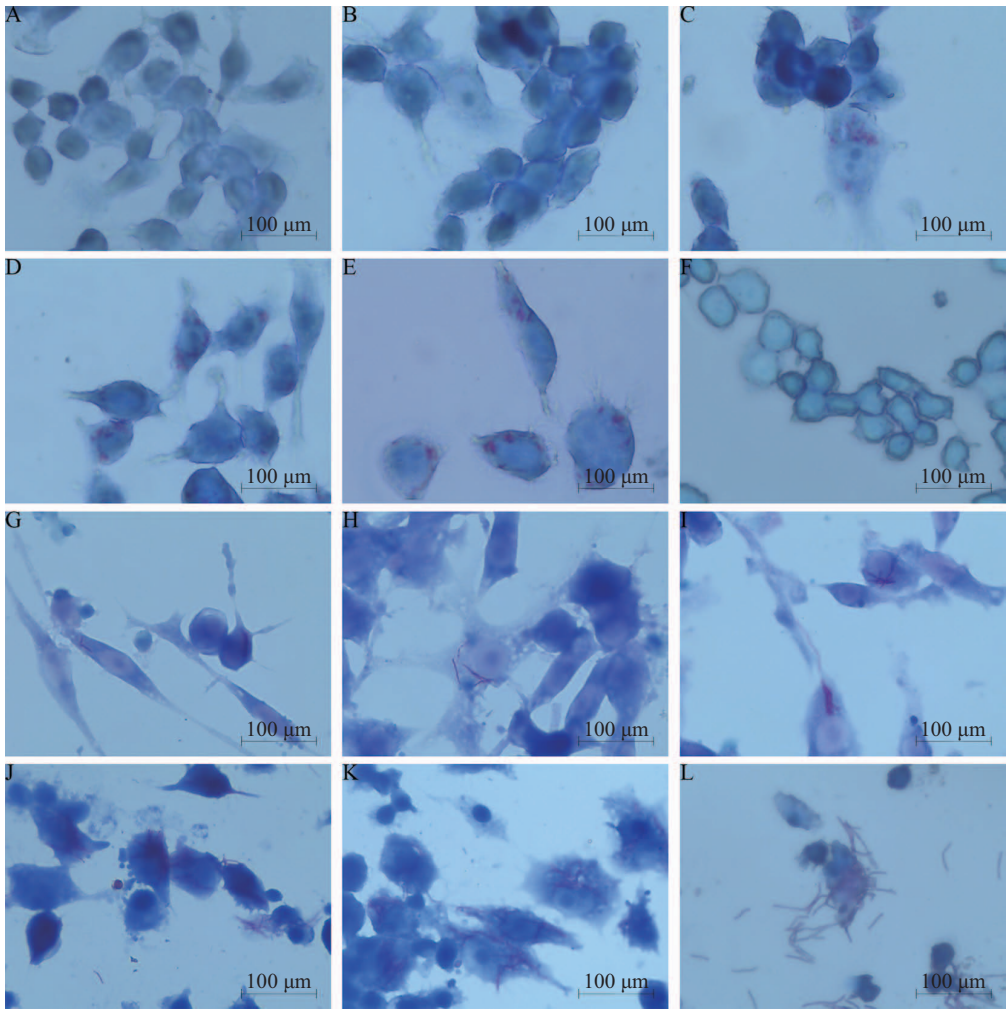
* $P<0.05$, 与对照组比较。
* $P<0.05$ compare with control group.

图3 巨噬细胞内耻垢分枝杆菌菌落计数
Fig.3 Colony counting of *Mycobacterium smegmatis* in macrophages

($P<0.05$)。结果说明, 转染质粒组的Coronin-1蛋白表达水平显著低于对照组。

2.3 巨噬细胞内耻垢分枝杆菌菌落总数(CFU)计数
用耻垢分枝杆菌分别感染转染质粒组细胞和同等条件培养的对照组细胞, 取感染后不同时间段的

1 000倍稀释的细胞裂解液进行涂板培养和菌落计数, 计数结果(表1)显示, 感染耻垢分枝杆菌6 h后, 转染质粒组胞内细菌数明显高于对照组(图3), 差异具有统计学意义($P<0.05$)。结果说明, 抑制巨噬细胞Coronin-1的表达可增强小鼠巨噬细胞对细菌的吞噬能力。



A、B、C、D、E、F: 对照组细胞感染耻垢分枝杆菌3、6、12、24、48、72 h抗酸染色; G、H、I、J、K、L: 转染质粒组细胞感染耻垢分枝杆菌3、6、12、24、48、72 h抗酸染色。
A,B,C,D,E,F: acid fast staining of the control group infected with *Mycobacterium smegmatis* for 3, 6, 12, 24, 48, 72 h; G,H,I,J,K,L: acid fast staining of the plasmid transfection group infected with *Mycobacterium smegmatis* for 3, 6, 12, 24, 48, 72 h.

图4 油镜下观察抗酸染色的感染耻垢分枝杆菌不同时间段各组细胞爬片

Fig.4 Microscope observed cells infected of *Mycobacterium smegmatis* in diffrent time periods by acid fast staining

表2 耻垢分枝杆感染巨噬细胞的凋亡率(%)($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Apoptosis rate of macrophages infected with *Mycobacterium smegmatis* (%) ($\bar{x}\pm s$)

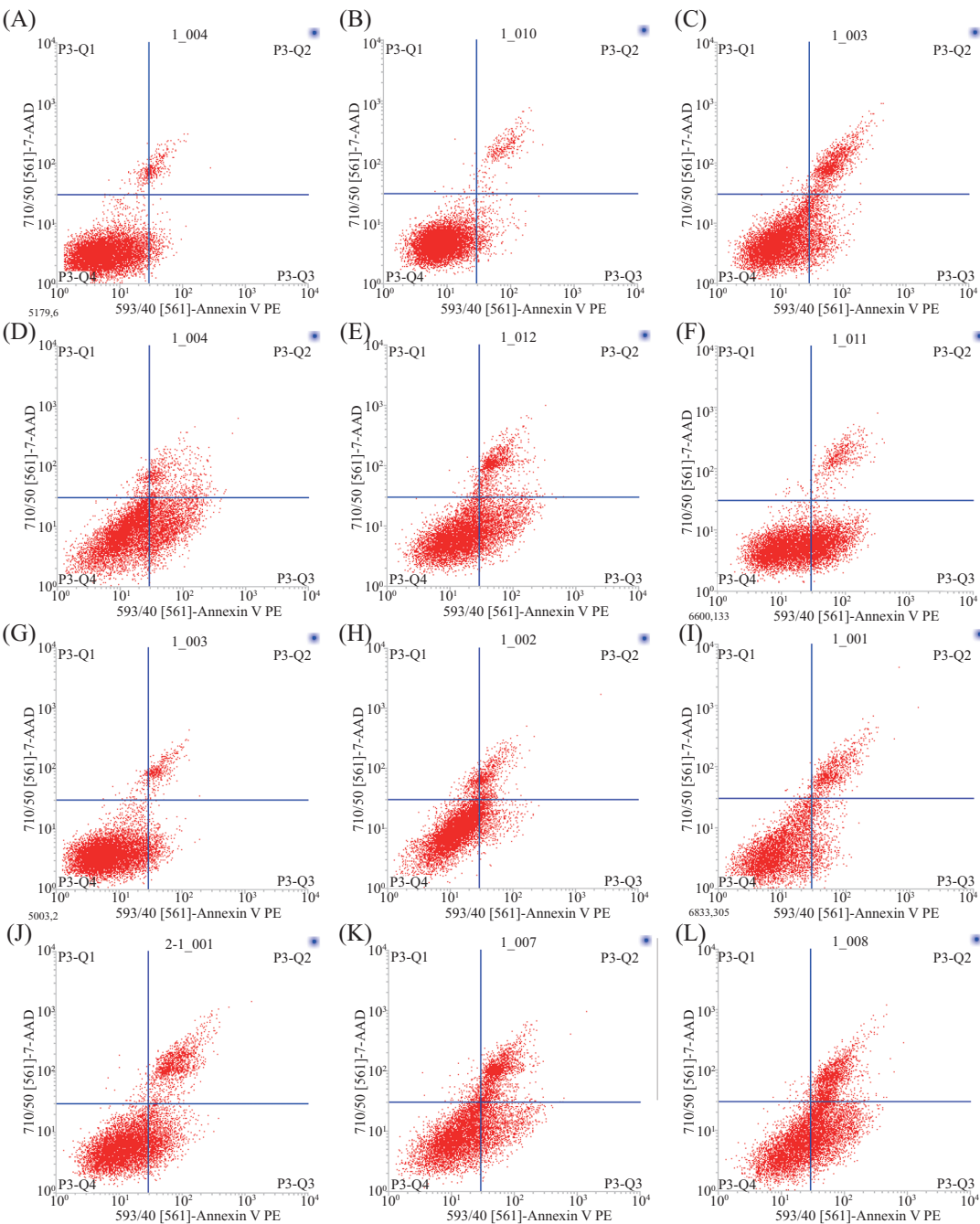
感染时间 Time of insection	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
pS-EGFP-SP-Coronin-1siRNA	9.07±0.81	16.26±1.97*	24.78±1.63	31.62±5.31	40.25±3.62*	55.98±0.42*
Control group	5.58±1.32	6.95±0.20	25.18±1.18	33.94±1.59	35.18±0.82	37.81±2.19

* $P<0.05$, 与对照组比较。
* $P<0.05$ compare with control group.

2.4 油镜下观察抗酸染色的感染耻垢分枝杆菌不同时间段各组细胞爬片

取耻垢分枝杆菌感染后不同时间段的转染质粒组和对照组的细胞爬片, 抗酸染色后于油镜下观察, 随机计数视野下100个细胞, 观察两组细胞吞噬

耻垢分枝杆菌的情况(图4)。结果表明, 每100个细胞中, 转染质粒组胞内的红色的抗酸性细菌数明显多于对照组, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。结果进一步说明, 抑制Coronin-1蛋白表达的巨噬细胞对细菌的吞噬能力更强。



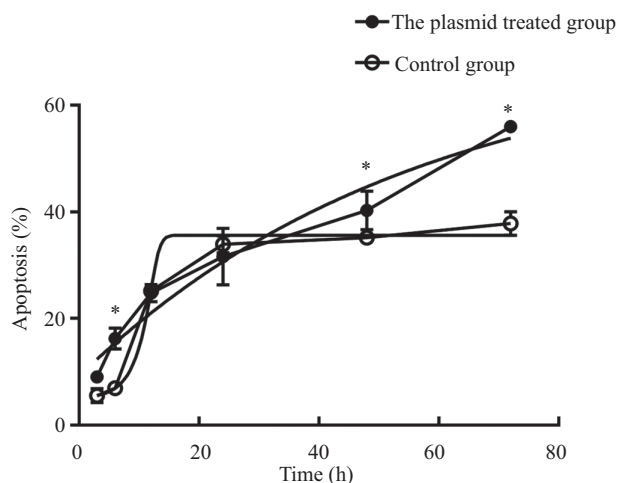
A、B、C、D、E、F: 对照组细胞感染耻垢分枝杆菌3、6、12、24、48、72 h细胞凋亡水平; G、H、I、J、K、L: 转染质粒组细胞感染耻垢分枝杆菌3、6、12、24、48、72 h细胞凋亡水平。
A,B,C,D,E,F: apoptosis level of the control group infected with *Mycobacterium tumefaciens* for 3, 6, 12, 24, 48, 72 h; G,H,I,J,K,L: apoptosis level of the plasmid transfection group infected with *Mycobacterium tumefaciens* for 3, 6, 12, 24, 48, 72 h.

图5 耻垢分枝杆菌感染巨噬细胞的凋亡情况
Fig.5 Apoptosis of macrophages infected with *Mycobacterium smegmatis*

2.5 pS-EGFP-SP-Coronin-1siRNA质粒对耻垢分枝杆菌感染细胞凋亡率的影响

用FCM检测转染质粒组和对照组的细胞在耻垢分枝杆菌感染后不同时间段的细胞凋亡率。结果(表2)显示, 3、12、24 h两组细胞凋亡水平无显

著性差异, 但是6、48、72 h转染质粒组显著高于对照组(图5和图6), 差异具有统计学意义($P<0.05$)。结果说明, pS-EGFP-SP-Coronin-1siRNA重组质粒在巨噬细胞吞噬细菌后的一定时间段可诱导巨噬细胞凋亡。



* $P < 0.05$, 与对照组比较。

* $P < 0.05$ compare with control group.

图6 耻垢分枝杆菌感染巨噬细胞的凋亡率

Fig.6 Apoptosis rate of macrophages infected with *Mycobacterium smegmatis*

3 讨论

近年来,随着多重耐药(multiple resistant bacteria MDR) Mtb菌株的出现以及人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)和Mtb共同感染患者的增多,防控Mtb感染所致结核病疫情日趋严峻。Mtb属于胞内寄生菌,在感染者体内,巨噬细胞既是抗Mtb的主要效应细胞,又是Mtb潜伏和寄居场所。巨噬细胞主要通过固有免疫和启动适应性免疫两种方式抗结核。一方面,巨噬细胞吞噬Mtb后形成吞噬体,膜性结构的吞噬体再与巨噬细胞内的溶酶体融合,溶酶体内的酶系统则进一步处理降解吞噬体内容物,发挥固有免疫功能。另一方面,巨噬细胞作为抗原提呈细胞,将Mtb抗原提呈为特异性抗原肽从而激活 $CD4^+$ Th1细胞,激活的 $CD4^+$ Th1细胞产生的 $IFN-\gamma$ (interferon- γ)等细胞因子又能反过来激活更多巨噬细胞并增强巨噬细胞对结核分子杆菌的杀伤能力^[5-6]。尽管巨噬细胞可通过固有免疫和特异性免疫机制发挥抗结核效应,但是仍有部分Mtb能逃逸巨噬细胞杀伤,其机制之一便是诱导巨噬细胞高表达Coronin-1蛋白^[4]。巨噬细胞吞噬Mtb后, Mtb诱导Coronin-1蛋白高表达且大量聚集在巨噬细胞吞噬体膜上,引起短时间内大量钙离子涌入胞内激活钙调磷酸酶,钙调磷酸酶抑制了吞噬体和溶酶体的融合,导致胞内Mtb无法被降解而长期滞留于巨噬细胞中^[4]。已有研究表明,抑制Mtb感染巨噬细胞表达Coronin-1蛋白,可使巨噬细胞有效杀伤Mtb,说明

Mtb被巨噬细胞吞噬后长期滞留于胞内, Coronin-1蛋白起到至关重要的作用, Coronin-1蛋白可能为针对宿主细胞抗结核(尤其是MDR所致的结核病)的潜在靶点^[7]。

本研究所用的pS-EGFP-SP-Coronin-1siRNA真核表达质粒,由课题组前期构建。该重组质粒以siRNA真核表达载体pSilencer-CMV为基础、以巨噬细胞特异性SP107启动子替换其原有CMV启动子并插入Coronin-1 siRNA模板DNA序列改造而成^[8]。以上结果证实,该重组质粒可以在RAW264.7细胞内特异性抑制Coronin-1的表达,但在A549、HEK293、Cos7等非巨噬细胞系的细胞内,不能抑制Coronin-1的表达。在本研究中,用pS-EGFP-SP-Coronin-1siRNA重组质粒瞬时转染鼠源性RAW264.7巨噬细胞,发现其Coronin-1蛋白表达显著抑制,在此基础上研究外源基因抑制细胞Coronin-1蛋白的表达对小鼠巨噬细胞吞噬功能的影响。鉴于Mtb具有高度的致病性、传染性和较长的生长周期,本研究选用耻垢分枝杆菌作为被巨噬细胞吞噬的对象菌。耻垢分枝杆菌也是一种抗酸性分枝杆菌,具有与Mtb高度类似的独特的细胞壁结构,但其生长快速、无致病性,是研究Mtb感染与免疫的较理想的替代模型^[9]。实验结果表明,转染pS-EGFP-SP-Coronin-1siRNA表达质粒的RAW264.7细胞感染耻垢分枝杆菌6 h后,细胞的吞噬能力明显高于正常表达Coronin-1蛋白的细胞,说明pS-EGFP-SP-Coronin-1siRNA重组质粒不但可特异性抑制巨

噬细胞Coronin-1蛋白的表达, 而且该重组质粒介导的效应还可促进巨噬细胞吞噬外源性细菌。在检测各组细胞的凋亡率后发现, 重组质粒对耻垢分枝杆菌感染细胞凋亡率的影响与感染时间段有关, 在3、12、24 h时, 重组质粒对耻垢分枝杆菌感染细胞凋亡率不产生显著影响, 但是在耻垢分枝杆菌感染6、48、72 h时, 重组质粒抑制细胞Coronin-1蛋白的表达且使巨噬细胞凋亡水平大幅增高。在感染早期, 即感染3 h时, 质粒转染巨噬细胞虽然摄入了耻垢分枝杆菌, 但此时细胞可能并未充分启动凋亡杀菌途径, 故此时重组质粒对细胞凋亡率未产生显著影响。吞噬6 h时, 凋亡杀菌途径启动后, 重组质粒通过某种机制促进了细胞的凋亡水平。在吞噬12 h及24 h时, 吞噬细胞的凋亡杀菌效应接近平台期, 重组质粒对细胞凋亡率也未显示出显著影响。吞噬48 h及72 h时, 除了细菌诱导的细胞凋亡外, 较多的已转染质粒但并未感染细菌的细胞的凋亡也可能在不断发生, 其占总凋亡水平的比例不断升高, 因此吞噬48 h后重组质粒对细胞凋亡率就再次显示出了显著的影响, 说明重组质粒在一定时间段可以诱导被细菌感染的巨噬细胞发生凋亡, 这与课题组前期研究结果相一致。前期研究表明, Coronin-1过表达能够下调iNOS、TLR2、TLR4、TLR9的水平, 且抑制细胞凋亡, 从而减弱巨噬细胞的固有免疫能力^[10]。短暂抑制巨噬细胞Coronin-1的表达, 可能通过促进TLRs等的表达, 促进对细菌的吞噬效应; 短暂抑制巨噬细胞Coronin-1的表达, 也可能激活被感染细胞某种促凋亡信号通路, 诱导被感染细胞凋亡, 从而促进被细菌感染的巨噬细胞通过形成凋亡小体的方式清除病原体。本研究结果提示, 用siRNA真核表达质粒介导小鼠巨噬细胞抑制

Coronin-1蛋白的表达, 不但可促进其吞噬功能, 而且也可提高感染细胞的凋亡杀菌能力, 但是其具体效应途径或信号通路, 有待进一步研究。

参考文献 (References)

- 1 Ferrari G, Langen H, Naito M, Pieters J. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell* 1999; 97(4): 435-47.
- 2 Gatfield J, Albrecht I, Zanolari B, Steinmetz MO, Pieters J. Association of the leukocyte plasma membrane with the actin cytoskeleton through coiled coil-mediated trimeric coronin 1 molecules. *Mol Biol Cell* 2005; 16(6): 2786-98.
- 3 Uetrecht AC, Bear JE. Coronins: the return of the crown. *Trends Cell Biol* 2006; 16(8): 421-6.
- 4 Jayachandran R, Sundaramurthy V, Combaluzier B, Mueller P, Korf H, Huygen K, *et al.* Survival of mycobacteria in macrophages is mediated by coronin 1-dependent activation of calcineurin. *Cell* 2007; 130(1): 37-50.
- 5 Raja A. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res* 2004; 120(4): 213-32.
- 6 Salgame P. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Curr Opin Immunol* 2005; 17(4): 374-80.
- 7 Jayachandran R, BoseDasgupta S, Pieters J. Surviving the macrophage: tools and tricks employed by *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013; 374: 189-209.
- 8 Kang WS, Kwon JS, Kim HB, Jeong HY, Kang HJ, Jeong MH, *et al.* A macrophage-specific synthetic promoter for therapeutic application of adiponectin. *Gene Ther* 2014; 21(4): 353-62.
- 9 Deng G, Zhang F, Yang S, Kang J, Sha S, Ma Y. *Mycobacterium tuberculosis* Rv0431 expressed in *Mycobacterium smegmatis*, a potentially mannosylated protein, mediated the immune evasion of RAW 264.7 macrophages. *Microb Pathog* 2016; 100: 285-92.
- 10 周静瑶, 陈全, 周芳妮, 刘革力, 张路渝. 冠蛋白-1不同表达水平对巨噬细胞iNOS、TLRs表达以及凋亡的影响. *中国细胞生物学报*(Zhou Jingyao, Chen Quan, Zhou Fangni, Liu Geli, Zhang Luyu. The effects of Coronin-1 with different expression levels on iNOS and TLRs expression and apoptosis in RAW264.7 cells. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2017; 39(2): 148-56.