

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

董伟杰 李 微 刘丹霞 刘云霞 庾清章 吴 芳 章 乐 张万江*

(石河子大学医学院病原生物学免疫学教研室, 石河子大学新疆地方与民族高发病教育部重点实验室, 石河子 832002)

摘要 该文为探讨不同毒力的结核分枝杆菌感染对巨噬细胞凋亡的调控作用及其机制。实验用结核分枝杆菌国际标准强毒株H37Rv株和卡介苗BCG分别感染巨噬细胞RAW264.7株, 同时设空白对照组, 在感染后1, 6, 12, 24 h, 用流式细胞技术检测各组巨噬细胞的凋亡率, 应用Western blot检测细胞Caspase-3和Bcl-2蛋白表达。结果发现, 结核分枝杆菌感染组的凋亡率显著高于对照组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); BCG感染组凋亡率高于H37Rv感染组, 在感染后1, 12, 24 h凋亡率显著升高, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。巨噬细胞感染结核分枝杆菌后其Caspase-3蛋白表达增高, 结核分枝杆菌感染组的Caspase-3蛋白表达高于对照组: 对照组 < H37Rv感染组 < BCG感染组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); BCG感染组Caspase-3蛋白表达高于H37Rv感染组, 在感染后1, 12, 24 h蛋白表达增高显著, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结核分枝杆菌感染组的Bcl-2蛋白表达低于对照组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); H37Rv感染组在1, 6, 24 h的Bcl-2蛋白表达高于BCG感染组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。由此可见, 结核分枝杆菌感染导致巨噬细胞凋亡, 细胞凋亡与结核分枝杆菌的毒力强弱有关; 结核分枝杆菌感染对巨噬细胞的凋亡与Caspase-3及Bcl-2的表达有关。

关键词 结核分枝杆菌; 巨噬细胞; 凋亡; Caspase-3; Bcl-2

The Influence of the Apoptosis Rate and the Expression of Apoptosis Proteins in the Macrophages Infected by *Mycobacterium tuberculosis*

Dong Weijie, Li Wei, Liu Danxia, Liu Yunxia, Tuo Qingzhang, Wu Fang, Zhang Le, Zhang Wanjiang*

(Department of Microbiology Immunology, Medical School, Shihezi University; Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases, Shihezi University, Shihezi 832002, China)

Abstract To explore the regulation and mechanism of apoptosis of the macrophage infected by *Mycobacterium tuberculosis*. Infected the macrophage RAW264.7 cell line with international standards with *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and BCG, at the same time, set the blank control group, after the infection at the 1, 6, 12, 24 h, flow cytometry were employed to detect the rate of the apoptosis of macrophages of each group. Then detect the Caspase-3 protein and expression levels of the gene with Western blot. The results showed that the rate of the apoptosis of macrophage RAW264.7 cell line infected by *Mycobacterium tuberculosis* is significantly higher than that

收稿日期: 2012-10-06 接受日期: 2012-11-15

国家自然科学基金(批准号: 81260261、81160192、30960355)、新疆生产建设兵团医药专项资金(批准号: 2012BA022)和石河子大学科学技术研究发展计划“自然科学与计划创新”重点项目(批准号: ZRXX2010ZD01)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0993-2057551, E-mail: zwj1117@sina.com

Received: October 6, 2012 Accepted: November 15, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81260261, 81160192, 30960355), Xinjiang Production and Construction Corps Pharmaceutical Special Funds (Grant No.2012BA022), and the Key Projects of Science and Technology Research and Development Program “Natural Science and Plan Innovation” in Shihezi University (Grant No.ZRXX2010ZD01)

*Corresponding author. Tel: +86-993-2057551, E-mail: zwj1117@sina.com

of the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$), and the rate of apoptosis of macrophage RAW264.7 cell line infected by the BCG was higher than that of the H37Rv, after infection, at 1, 12, 24 h, the rate of the apoptosis increased significantly, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). After being infected by *Mycobacterium tuberculosis*, the expression of the Caspase-3 protein in macrophages increased, and the expression of the Caspase-3 protein of the *Mycobacterium tuberculosis* group is higher than the control group, the control group<H37Rv infection group<BCG infection group. The difference was statistically significant ($P<0.05$). The expression of Caspase3 protein in BCG infection group is higher than that in H37Rv infection group, at 1, 12, 24 h, the expression of protein was significantly increased after being infected, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The expression level of Caspase-3 gene in the *Mycobacterium tuberculosis* infection group was relatively higher than that in the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The expression of the Bcl-2 protein of the *Mycobacterium tuberculosis* infection group was significantly lower than that of the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). At 1, 6, 24 h, the expression of Bcl-2 protein in the H37Rv infection group was higher than that in the BCG infection group after being infected, the difference was statistically significant ($P<0.05$). This shows the infection with *Mycobacterium tuberculosis* leads to the apoptosis of macrophages, the intensity of virulence of *Mycobacterium tuberculosis* was related to the apoptosis of cells. And the apoptosis of macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis* was related to the expression of Caspase-3 and Bcl-2.

Key words *Mycobacterium tuberculosis*; macrophage; apoptosis; Caspase-3; Bcl-2

结核病 (tuberculosis, TB) 是由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 感染引起的一种世界性传染病, 是单一致病菌感染导致死亡率最高的感染性疾病。目前, 全球结核病的发病率、病死率逐年递增, 国内外对结核分枝杆菌越来越重视, 已成严重威胁人类健康的疾病之一。结核分枝杆菌存在于被感染宿主巨噬细胞内, 并可以通过多种机制对巨噬细胞凋亡进行调控, 而这种调控与其在宿主细胞内的命运密切相关, 对结核病的发生、发展及预后都具有重要影响^[1]。本研究应用细胞流式技术动态监测结核分枝杆菌国际标准强毒株 H37Rv 株和卡介苗菌株 (BCG) 感染的巨噬细胞的凋亡率, 同时应用 Western blot 检测 Caspase-3 和 Bcl-2 蛋白表达水平, 探讨结核分枝杆菌对感染巨噬细胞凋亡的调控作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 结核分枝杆菌国际标准强毒株 H37Rv 株和卡介苗菌株 BCG 购自中国药物生物制品检定所。

1.1.2 细胞 RAW264.7 巨噬细胞株购自中国科学

院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.1.3 主要试剂 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自美国 Bio Vision 公司; 兔多克隆抗体 Caspase-3 购自美国 Abcam 公司; 兔多克隆抗体 Bcl-2、 β -actin 单克隆抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体及山羊抗兔 IgG 抗体购自北京中衫金桥生物技术有限公司; ECL 发光试剂盒购自美国 Thermo 公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株培养及菌悬液制备 结核分枝杆菌国际标准强毒株 H37Rv 菌种用 0.5 mL 的生理盐水和苏通培养液混合液 (体积比为 1:3) 稀释, BCG 疫苗每支用专用稀释液 0.5 mL 稀释, 接种在罗氏培养基斜面上; 培养 20 天后分别取罗氏培养基上生长状况良好的 H37Rv 和 BCG, 加含 0.05% Tween-80 的生理盐水研磨均匀, 用 DMEM 培养液 (含 10% 胎牛血清) 稀释成细菌悬液, 将细菌浓度调整为 $1.0 \times 10^7/\text{mL}$ 。

1.2.2 RAW264.7 细胞的培养 将 RAW264.7 细胞置于 DMEM 培养液中培养, 0.25% 的胰蛋白酶消化并收集细胞, 使用台盼兰染色做活细胞检测; 显微镜下计数并调整细胞浓度为 $1.0 \times 10^6/\text{mL}$ 。

1.2.3 构建结核分枝杆菌感染 RAW264.7 巨噬细胞

模型 将计数后的细胞种在6孔细胞培养板, 并每孔加DMEM培养液(含10%胎牛血清)2 mL, 置于37 °C 5% CO₂细胞培养箱中培养24 h后, 倒掉细胞培养液, 用PBS洗涤细胞培养板2次, 去除细胞碎片及非贴壁细胞, 每孔再加2 mL细菌悬液, 细菌与巨噬细胞比例为10:1^[2]。细胞置于37 °C、5% CO₂细胞培养箱中孵育4 h。

1.2.4 实验分组和感染细胞检测时间选取 将实验复制感染细胞模型随机分为H37Rv株感染组、BCG感染组及空白对照组, 分别在感染后1, 6, 12, 24 h收集细胞, 进行实验检测。

1.2.5 Annexin V-FITC/PI检测细胞凋亡率 应用流式细胞技术检测各组、各时间点巨噬细胞凋亡率。按照Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒说明书操作, 将细菌感染4 h后的巨噬细胞去除细菌培养液, 用PBS洗涤2次, 用DMEM培养液(含10%胎牛血清)继续培养, 并将此时作为细胞感染零时, 分别于感染后1, 6, 12, 24 h收集细胞, 离心去上清液, 加入500 μL 1×binding buffer重悬细胞, 轻轻混匀后, 2~8 °C避光孵育10 min, 再加入5 μL Annexin V-FITC和5 μL PI, 避光孵育5 min, 最后加入1.5 mL的PBS, 染色完成后1 h内用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.2.6 Western blot检测蛋白表达 细胞总蛋白样品提取: 收集各组各时间点的细胞, 加入细胞裂解液(已加入蛋白抑制剂)作用1 min, 之后13 000 r/min离心15 min, 吸取上清即细胞总蛋白, 置于-80 °C冻存备用。用BCA法测定蛋白浓度, 记录D₅₆₂值, 根据标准曲线计算蛋白浓度, 调整蛋白浓度后, 加入上样缓冲液, 煮沸8 min后上样。各组以β-actin为内参, 取50 μg细胞总蛋白进行SDS-PAGE电泳分离(12%分离胶和4%浓缩胶), 通过半干转印法转移至0.22 μm的PVDF膜上, 恒压23 V转膜45 min; PVDF膜经封闭

液封闭2 h后, 加入一抗: 兔多克隆抗体Caspase-3以1:1 000稀释、兔多克隆抗体Bcl-2以1:300稀释、单克隆抗体β-actin以1:1 000稀释, 4 °C孵育过夜, TBST洗膜4次, 每次10 min; 加入HRP标记的相应二抗作用液(1:30 000稀释), 室温摇动孵育1 h, TBST洗膜3次, 每次10 min; ECL化学发光, 显影, 定影, 拍照; Western blot检测条带用凝胶成像仪分析系统Quantity One软件扫描灰度值。计算目的基因蛋白与β-actin灰度值的比值, 进行统计学分析。

1.2.7 统计学分析 应用SPSS13.0软件处理, 结果以均数±标准差(mean±S.D.)表示, 选择单因素方差分析进行均数差异性比较, 多样本两两比较选择最小显著差值法; P<0.05表示有统计学显著性差异。

2 结果

2.1 检测巨噬细胞凋亡率结果

流式细胞术结合Annexin V-FITC/PI检测结核分枝杆菌感染的巨噬细胞, 检测各组1, 6, 12, 24 h时间的凋亡率。巨噬细胞感染结核分枝杆菌后凋亡率显著增高, H37Rv株感染组、BCG感染组与空白对照组相比, 差异具有统计学意义(P<0.05); H37Rv株感染组和BCG感染组比较, BCG感染组凋亡率高于H37Rv株感染组, 在感染后1, 12, 24 h凋亡率升高显著, 差异具有统计学意义(P<0.05)。检测结果见表1和图1。

2.2 Western blot检测Caspase-3蛋白表达的结果

计算Caspase-3与β-actin灰度值的比值(Caspase-3/β-actin), 进行统计学分析。Western blot检测结果见表2和图2。结果显示, 巨噬细胞感染结核分枝杆菌后, 细胞Caspase-3蛋白相对表达增高, 各组感染后1, 6, 12, 24 h蛋白表达比较: 对照组<H37Rv株感染组<BCG感染组, 差异具有统计学意义(P<0.05);

表1 H37Rv组、BCG组和对照组被感染巨噬细胞的凋亡率

Table 1 The apoptosis rate of macrophages at different time points, in group H37Rv BCG and control

时间(h)	H37Rv感染组细胞凋亡率($\bar{x}\pm s$, %)	BCG感染组细胞凋亡率($\bar{x}\pm s$, %)	对照组细胞凋亡率($\bar{x}\pm s$, %)
Time(h)	Apoptosis rate of H37Rv group($\bar{x}\pm s$, %)	Apoptosis rate of BCG group($\bar{x}\pm s$, %)	Apoptosis rate of control group($\bar{x}\pm s$, %)
1	8.64±0.38 ^{ab}	17.04±0.94 ^a	3.13±0.67
6	8.43±0.93 ^a	8.42±1.55 ^a	1.39±0.11
12	10.62±0.87 ^{ab}	14.38±1.14 ^a	2.27±0.02
24	8.24±0.33 ^{ab}	16.56±2.24 ^a	0.85±0.03

n=5。^aP<0.05, 与对照组比较; ^bP<0.05, H37Rv组与BCG组比较。

n=5。^aP<0.05, compared with the control; ^bP<0.05, H37Rv group compared with the BCG group.

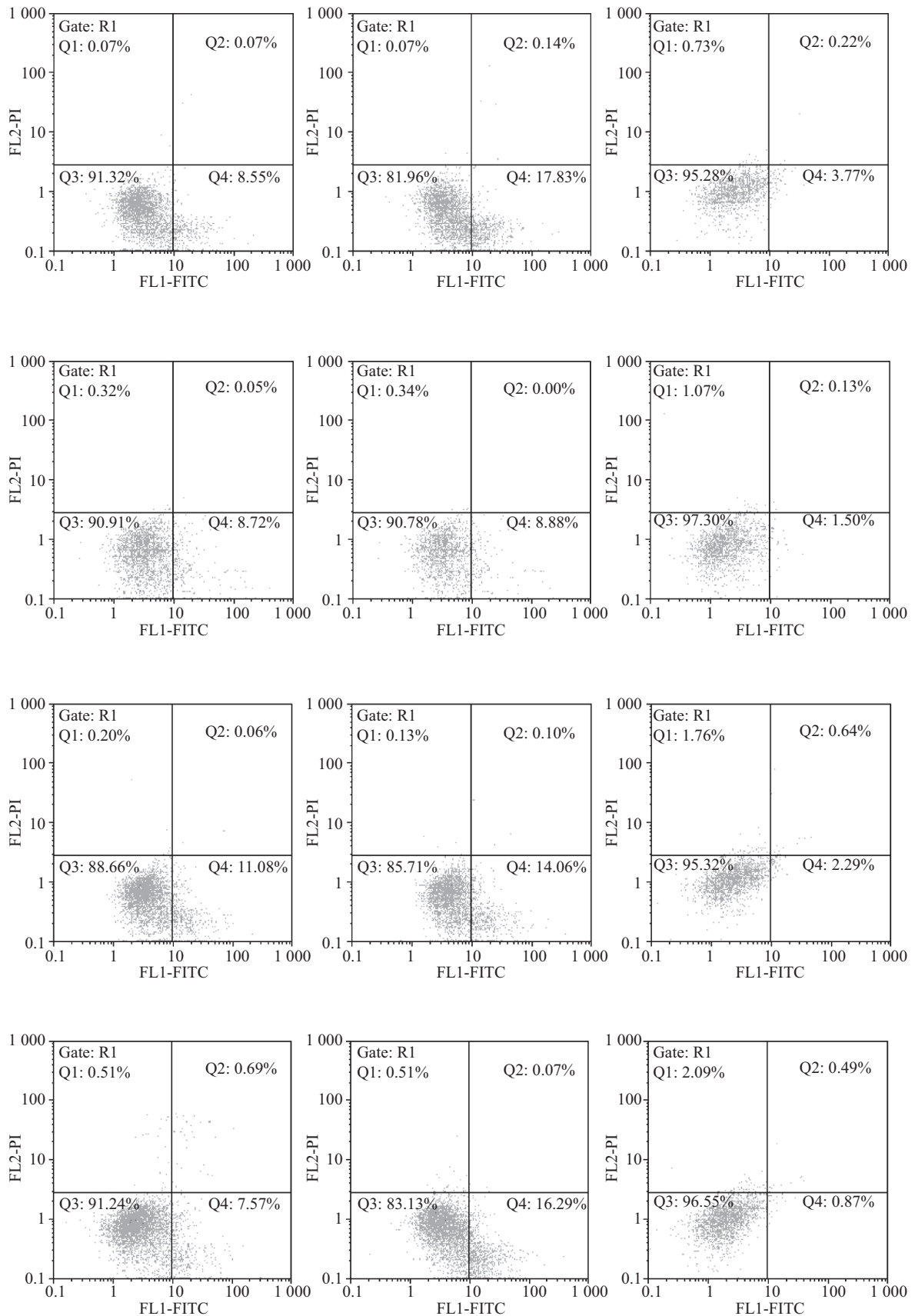


图1 流式细胞技术检测感染结核分枝杆菌巨噬细胞的凋亡率

Fig.1 Detect MTB infected macrophage's apoptosis rate by flow cytometry

表2 巨噬细胞凋亡过程Caspase-3蛋白的表达

Table 2 Role of Caspase-3 protein in apoptosis of macrophages

时间(h)	H37Rv感染组($\bar{x}\pm s$, IOD)	BCG感染组($\bar{x}\pm s$, IOD)	对照组($\bar{x}\pm s$, IOD)
Time(h)	H37Rv group($\bar{x}\pm s$, IOD)	BCG group($\bar{x}\pm s$, IOD)	Control group($\bar{x}\pm s$, IOD)
1	0.52±0.13 ^{ab}	1.45±0.61 ^a	0.31±0.11
6	0.94±0.48 ^a	1.17±0.66 ^a	0.34±0.12
12	1.43±0.37 ^{ab}	2.08±0.58 ^a	0.45±0.21
24	1.04±0.38 ^{ab}	1.32±0.70 ^a	0.41±0.16

$n=5$ 。^a $P<0.05$,与对照组比较; ^b $P<0.05$, H37Rv组与BCG组比较。

$n=5$ 。^a $P<0.05$, compared with the control; ^b $P<0.05$, H37Rv group compared with the BCG group.

表3 巨噬细胞凋亡过程Bcl-2蛋白的表达

Table 3 Role of bcl-2 protein in apoptosis of macrophages

时间(h)	H37Rv感染组($\bar{x}\pm s$, IOD)	BCG感染组($\bar{x}\pm s$, IOD)	对照组($\bar{x}\pm s$, IOD)
Time(h)	H37Rv group($\bar{x}\pm s$, IOD)	BCG group($\bar{x}\pm s$, IOD)	Control group($\bar{x}\pm s$, IOD)
1	1.75±0.06 ^b	0.40±0.01 ^a	1.83±0.01
6	1.47±0.03 ^{ab}	1.09±0.04 ^a	1.68±0.02
12	1.25±0.03 ^{ab}	1.68±0.02 ^a	1.78±0.03
24	1.51±0.05 ^{ab}	1.22±0.01 ^a	2.01±0.6

$n=5$ 。^a $P<0.05$,与对照组比较; ^b $P<0.05$, H37Rv组与BCG组比较。

$n=5$ 。^a $P<0.05$, compared with the control. ^b $P<0.05$, H37Rv group compared with the BCG group.

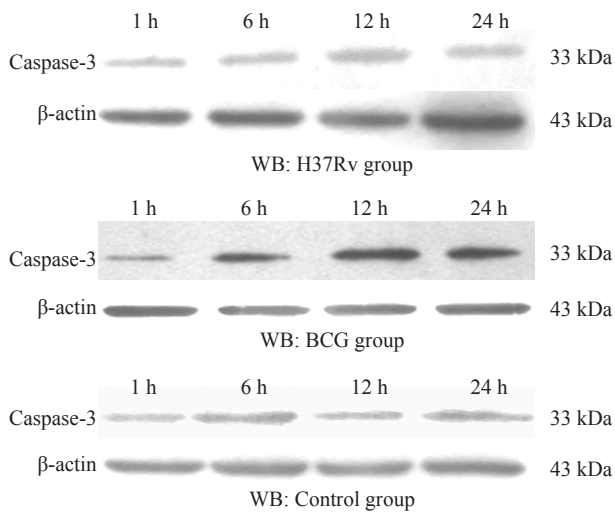


图2 Western blot检测巨噬细胞Caspase-3蛋白表达情况

Fig.2 Western blot analysis of Caspase-3 expression in infected macrophages

H37Rv株感染组和BCG感染组比较, BCG感染组Caspase-3蛋白表达高于H37Rv株感染组, 在感染后1, 12, 24 h的Caspase-3蛋白表达升高显著, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 Western blot检测Bcl-2蛋白表达的结果

计算Bcl-2与 β -actin灰度值的比值(Bcl-2/ β -actin), 进行统计学分析。Western blot检测结果见表3和图

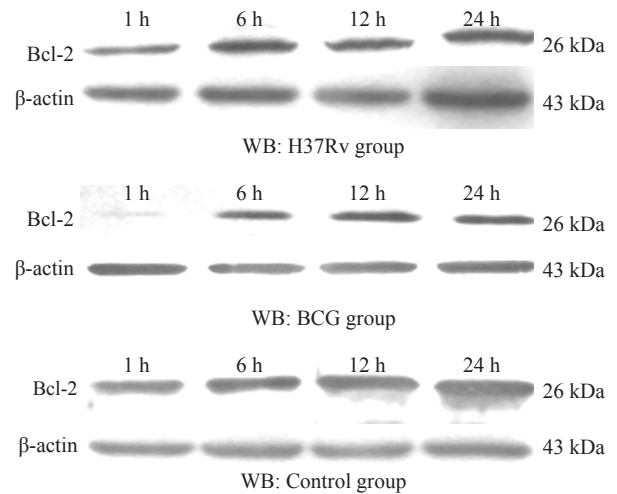


图3 Western blot检测巨噬细胞Bcl-2蛋白表达情况

Fig.3 Western blot analysis of Bcl-2 expression in infected macrophages

3。结果显示, 巨噬细胞感染结核分枝杆菌后, 细胞Bcl-2蛋白表达明显降低, 空白对照组蛋白表达高于H37Rv株感染组和BCG感染组; 各组感染后1, 6, 12, 24 h蛋白表达比较, 差异具有统计学意义($P<0.05$); H37Rv株感染组和BCG感染组比较, H37Rv株感染组在1, 6, 12, 24 h的Bcl-2蛋白表达高于BCG感染组, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

结核分枝杆菌是典型的胞内致病菌, 侵入机体感染宿主巨噬细胞, 诱导细胞凋亡, 激活巨噬细胞抗结核免疫机制, 抑制结核分枝杆菌在体内的扩散, 增强机体的免疫杀伤能力^[3-4]。结核分枝杆菌通过对宿主巨噬细胞的凋亡进行干预和调控^[5]。巨噬细胞诱导自身凋亡是杀伤结核分枝杆菌限制其在体内播散的重要机制之一。但结核分枝杆菌能通过某些机制逃避免疫杀伤, 抑制巨噬细胞的凋亡, 以便其在巨噬细胞内的存活和繁殖^[6]。

不同毒力结核分枝杆菌感染巨噬细胞后, 其在宿主胞内会有不同的命运。毒力结核分枝杆菌能逃避巨噬细胞凋亡杀伤机制, 从而在宿主机体内繁殖和扩散, 引发炎症反应。研究发现, 不同毒力的结核分枝杆菌感染巨噬细胞后, 诱导巨噬细胞凋亡水平不同^[7]。用不同毒力的结核分枝杆菌感染巨噬细胞, 研究发现毒力的结核分枝杆菌H37Rv株诱导细胞凋亡数最少, 其在胞内的生长繁殖与扩散速度最快; 结核分枝杆菌H37Ra、BCG等减毒株也能不同程度的诱导巨噬细胞凋亡, 但凋亡数高于毒力的结核分枝杆菌H37Rv株^[8]。Daelishvili等^[9]用感染复数(MOI)为10的结核分枝杆菌H37Rv株和H37Ra株感染人U937巨噬细胞及II型肺上皮细胞(A549), 结果发现感染后都能不同程度的诱导细胞凋亡, 但结核分枝杆菌H37Ra株引起细胞凋亡率更高。Riendeau等^[10]用不同毒力结核分枝杆菌模拟人感染PMA分化的THP-1细胞, 发现结核分枝杆菌H37Rv株感染未明显引起THP-1细胞凋亡, 而结核分枝杆菌H37Ra株、BCG感染明显引起细胞的凋亡, 这可能是毒力株结核分枝杆菌感染细胞后阻断TNF信号传导, 干扰TNF死亡信号传导可能为致病机制之一。Bal-cewicz-Sablinska等^[11]在研究中分别用结核分枝杆菌强毒力株H37Rv和结核分枝杆菌减毒株H37Ra感染人肺泡巨噬细胞, 结果显示巨噬细胞的凋亡率均有显著升高, H37Ra株感染组细胞凋亡显著, 而H37Rv株感染组凋亡明显受到抑制。本研究采用流式技术检测结核分枝杆菌感染对巨噬细胞早期凋亡率及其时相性变化。研究结果与上述一致, 巨噬细胞感染结核分枝杆菌后凋亡率显著增高, 不同毒力结核分枝杆菌感染其凋亡率存在差异; 本研究选取时间点至24 h, 因为实验所用巨噬细胞增殖能力较强, 繁殖周期时间较短, 因此24 h内实验结果更具有真实性。另有研究表明, 毒力结核分

枝杆菌H37Rv株感染的巨噬细胞凋亡率在10~60 min内逐渐升高, 而90 min后又逐渐降低^[12]。本实验结果趋势与上述一致, H37Rv株感染组凋亡率在1~12 h内逐渐升高, 12 h达到高峰, 24 h凋亡率降低; BCG感染组凋亡率高于H37Rv株感染组, 尤其在感染后1, 12, 24 h凋亡率增高显著。由此可见, 结核分枝杆菌感染巨噬细胞后, 诱导巨噬细胞凋亡, 并且巨噬细胞早期凋亡与结核分枝杆菌的毒力强弱有关。

结核分枝杆菌影响巨噬细胞凋亡途径很多, 主要通过调控肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、NO、IL-10等的凋亡诱导效应和促进Bcl-2家族等凋亡抑制因子的表达等途径影响细胞凋亡。结核分枝杆菌感染巨噬细胞后诱导凋亡, 同时抑制细胞凋亡, 其凋亡水平与TNF- α 的表达密切相关, TNF- α 的表达激活Caspase酶系级联反应, 诱导巨噬细胞凋亡。Bcl-2基因家族在调控巨噬细胞凋亡的过程中起到非常重要的作用。Bcl-2和Bax能通过调节Caspase活性来调控细胞凋亡, 但调控机制尚不清楚。

Caspase家族与细胞凋亡的发生及调控密切相关, 是细胞凋亡信号转导的共同通路。Caspase酶系在细胞凋亡过程中起重要作用, 凋亡过程中均可检测到不同程度的Caspase增高^[13]。Caspase的表达改变决定了细胞凋亡的进展方向^[10]。Caspase-3是执行性Caspase酶, 所以被称为死亡蛋白酶。凋亡过程是蛋白酶级联切割过程, Caspase-3处于凋亡核心位置, 不同的蛋白酶切割Caspase-3 酶原, 活化的Caspase-3又进一步切割不同的底物, 致使蛋白酶切割级联放大, 从而激活核酸酶裂解核小体间的DNA, 导致染色质浓缩和细胞皱缩, 形成凋亡小体, 引起细胞凋亡^[14]。Caspase-3在调节及执行凋亡过程中发挥核心的作用。

本研究采用Western blot技术检测结核分枝杆菌感染巨噬细胞的Caspase-3蛋白表达水平。研究结果表明, 巨噬细胞感染结核分枝杆菌后Caspase-3表达水平显著增高, 与对照组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$); BCG感染组的Caspase-3表达高于H37Rv株感染组。由此可见, 细胞凋亡的各个阶段都可以检测到不同程度的Caspase增高, 并且不同毒力结核分枝杆菌感染巨噬细胞Caspase-3的表达存在差异。Derrick等^[15]发现, MTB的ESAT6成分通过激活Caspase表达, 并形成膜孔而诱导THP-1细胞的凋亡。Koziel等^[16]发现, 结核分枝杆菌能抑制巨噬细胞内的

细胞色素C释放, 诱导Caspase-3表达和活化, 从而上调Bcl-2和Mcl-1等抗凋亡蛋白的表达, 从而抑制或下调巨噬细胞的凋亡。

Bcl-2家族位于线粒体外膜上, 包括抗凋亡蛋白(Bcl-2、Bcl-xL)和促凋亡蛋白(Bax、Bad)。凋亡蛋白Bcl-2家族可以启动凋亡信号, 其表达和调控是影响细胞凋亡关键因素之一, 在细胞凋亡信号转导通路中起到重要作用^[17]。随着研究不断深入发现, Bcl-2是细胞凋亡重要的凋亡抑制蛋白, 具有保护细胞的功能作用。但Bcl-2并不是抑制细胞死亡程序的某个环节, 只能改变细胞凋亡的阈值。结核分枝杆菌感染巨噬细胞后, 大量表达Bcl-2与Bax, Bcl-2为抗凋亡信号, 而Bax为促凋亡信号, 二者的比例影响凋亡阈值, 阈值决定凋亡结果。Bcl-2的过表达会促进细胞存活, 而Bax的过表达能促进细胞凋亡。已有研究证明, 小鼠感染结核分枝杆菌后, 在巨噬细胞可检测到Bcl-2和Bax的表达, 二者表达呈负相关。Bcl-2的表达升高, Bax的表达降低, Bcl-2可以阻止Caspase的激活, 调控Caspase活化放大水平, 抑制细胞凋亡^[18]。Bcl-2的过度表达可导致核内氧化还原平衡改变, 从而降低Caspase-3活性, 阻止凋亡诱导因子和细胞色素C在线粒体的释放, 抑制细胞凋亡^[19]。

已有研究表明, 毒力的结核分枝杆菌感染巨噬细胞后, 能诱导Bcl-2家族(凋亡抑制因子Bcl-2、Mcl-1)的表达上调; 巨噬细胞吞噬结核分枝杆菌H37Rv后, Bcl-2和Mcl-1的表达水平明显升高, 细胞凋亡受到抑制, 促进毒力的结核分枝杆菌在巨噬细胞中存活^[5]。Zhang等^[20]发现, 结核分枝杆菌强毒株H37Rv诱导的细胞凋亡数量明显低于减毒株H37Ra, 结核分枝杆菌强毒株H37Rv可通过上调巨噬细胞抗凋亡蛋白Bcl-2的表达抑制细胞凋亡, 而Bcl-2在H37Ra感染的巨噬细胞中表达下调。Han等^[21]研究发现, Bcl-2家族与Mcl-1具有高度亲和性, 并认为Mcl-2家族与Mcl-1的结合能抑制Bcl-2家族成员的活性, 从而抑制细胞凋亡。本研究采用Western blot检测结核分枝杆菌感染巨噬细胞的Bcl-2蛋白表达水平。研究结果表明, 巨噬细胞感染结核分枝杆菌后Bcl-2蛋白表达明显降低, 空白对照组蛋白表达显著高于H37Rv株感染组和BCG感染组, 各组感染后1, 6, 12, 24 h蛋白表达比较, 表达水平存在差异; H37Rv株感染组与BCG感染组比较, H37Rv株感染组的Bcl-2表达高于BCG感染组。研究结果显示, 不同毒力的结

核杆菌感染巨噬细胞Bcl-2的表达水平存在差异, 说明Bcl-2家族的表达与细胞早期凋亡有关。

影响结核分枝杆菌感染对巨噬细胞的凋亡率及Caspase-3表达的变化的可能原因: (1)巨噬细胞通过诱导细胞凋亡杀死寄生于其内的结核分枝杆菌, 阻止结核分枝杆菌在体内的生殖和播散, 增强抗结核分枝杆菌感染的保护性免疫机制; 因此, 巨噬细胞凋亡对结核分枝杆菌的命运至关重要。巨噬细胞感染结核分枝杆菌后, 可能通过活化酪氨酸蛋白激酶(PTK), AK2/STAT- α 磷酸化, STAT1- α 发生转移, 诱导生成大量TNF- α 、NO, 增强Caspase酶系的活性, 从而启动凋亡。(2)结核分支杆菌毒力株的某些特殊菌体成分或其分泌的某些物质则可抑制巨噬细胞的凋亡, 借以逃避巨噬细胞的免疫杀伤^[7]。结核分枝杆菌感染巨噬细胞后可能抑制细胞Fas的表达, 从而抑制FasL对巨噬细胞凋亡的诱导, 以利于其在巨噬细胞内的存活; 还可能抑制巨噬细胞NO合酶的表达, 降低NO的生成, 进而抑制巨噬细胞凋亡。结核杆菌可刺激IL-10生成, 调控IL-10诱导巨噬细胞分泌活化的sTNFR2, 从而抑制TNF的活性, 以此降低巨噬细胞凋亡。(3)毒力的结核分枝杆菌可能抑制或下调巨噬细胞凋亡来逃避细胞的杀伤。Caspase家族与细胞凋亡的发生和调控密切相关, 是多数细胞凋亡信号转导的共同通路。毒力的结核分枝杆菌通过某种机制直接抑制Caspase家族的活性, 或是由于TNF- α 作用受到抑制后间接影响Caspase家族成员的活化, 抑制巨噬细胞凋亡。由此可见, 结核分支杆菌诱导巨噬细胞凋亡与其诱导产生的TNF- α 密切相关。(4)Caspase家族与细胞凋亡的发生和调控密切相关, 是多数细胞凋亡信号转导的共同通路。Bcl-2与激活Caspase所需的蛋白质组成无活性的异二聚体, 可阻止蛋白激活Caspase家族, 调控Caspase家族成员活化放大水平, 抑制细胞凋亡; 细胞线粒体可能释放Caspase-3参与凋亡, 但这一机制能被Bcl-2家族阻断。Bcl-2家族能够通过调控Caspase活性来调控细胞凋亡, 因此, Bcl-2家族的表达和调控是影响细胞凋亡的关键因素之一, 在细胞凋亡信号转导通路中发生重要作用。

结核分枝杆菌存在于被感染宿主的巨噬细胞内, 并可以通过多种机制对巨噬细胞的凋亡进行调控, 而这种调控作用与其在宿主细胞内的命运密切相关。巨噬细胞的凋亡在一定程度上决定了结核分

支杆菌的命运, 对结核病的发生、发展及预后都具有重要的影响。本研究通过不同毒力的结核分枝杆菌感染巨噬细胞, 检测其凋亡率及其Caspase-3和Bcl-2蛋白表达水平的影响, 证实了结核分枝杆菌毒力的强弱、巨噬细胞Caspase-3和Bcl-2的表达与细胞早期凋亡有关。

参考文献 (References)

- 刘云霞, 张万江. 结核分枝杆菌与巨噬细胞相互作用的研究进展. 中国细胞生物学学报(Liu Yunxia, Zhang Wanjiang. Progress of interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and macrophages. Chinese Journal of Cell Biology) 2012; 34(6): 617-22.
- 吴绍强, 蒋金书, 刘群, 朱引洁. 柔嫩艾美耳球虫BJ株核酸疫苗的构建及其免疫保护效果研究. 中国兽医杂志(Wu Shaoqiang, Jiang Jinshu, Liu Qun, Zhu Yinjie. The nucleic acid vaccine of *Eimeria tenella* BJ strain and the effect of its immune protection. Chinese Journal of Veterinary Medicine) 2004; 40(9): 3-6.
- Johnson EE, Srikanth CV, Sandgren A, Harrington L, Trebicka E, Wang L, et al. Siderocalin inhibits the intracellular replication of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages. FEMS Immunol Med Microbiol 2009; 7(10): 679-83.
- de Lourdes Bastos M, Osterbauer B, Mesquita DL, Carrera CA, Albuquerque MJ, Silva L, et al. Prevalence of human T-cell lymphotropic virus type 1 infection in hospitalized patients with tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis 2009; 13(12): 1519-23.
- Sly LM, Hingley-Wilson SM, Reiner NE. Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in host macrophages involves resistance to apoptosis dependent upon induction of antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1. J Immunol 2003; 170(1): 430-7.
- Sanchez D, Rojas M, Hernandez I, Radzioch D, Garcia LF, Barrera LF. Role of TLR2- and TLR4-mediated signaling in *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage death. Cell Immunol 2009; 19(10): 6932-9.
- 姚楠, 董江涛, 徐芳, 田玺泽, 吴芳, 章乐, 等. 流式细胞术检测不同毒力结核分枝杆菌感染巨噬细胞的凋亡率及其时相性变化. 中国病原生物学杂志(Yao Nan, Dong Jiangtao, Xu Fang, Tian Xize, Wu Fang, Zhang Le, et al. Apoptosis rate of and changes over time in macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis* with different of virulence tested with flow cytometry. Journal of Pathogen Biology) 2012; 7(2): 81-4.
- Keane J, Remold HG, Kornfeld H. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. Immunol 2000; 164(4): 2016-20.
- Danelishvili L, McGarvey J, Li YJ. *Mycobacterium tuberculosis* infection causes different levels of apoptosis and necrosis in human macrophages and alveolar epithelial cells. Cell Microbiol 2003; 5(9): 649-60.
- Riendeau CJ, Kornfeld H. THP-1 cell apoptosis in response to mycobacterial infection. Infect Immun 2003; 71(1): 254-9.
- Balcewicz-Sablinska MK, Keane J, Kornfeld H, Heinz G. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF R2, resulting in inactivation of TNF-alpha. J Immunol 1998; 161(5): 2636-41.
- 田碧文, 孙蕾, 庞雪云, 马骥. 人型结核分枝杆菌H37Rv菌株诱导小鼠巨噬细胞凋亡的实验研究. 实用医学杂志(Tian Biwen, Sun Lei, Pang Xueyun, Ma Ji. Experiment of macrophage apoptosis induced people type *M. tuberculosis* H37Rv strain in mice. The Journal of Peactical Medicine) 2007; 23: 475-6.
- Siegel RM. Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. Nat Rev Immunol 2006; 6: 308-17.
- Contreras JL, Vilatoba M, Eckstein C, Bilbao G, Thompson JA, Devin E. Caspase-8 and Caspase-3 small interfering RNA decreases ischemia/reperfusion injury to the liver in mice. Surgery 2004; 136(2): 390-400.
- Derrick SC, Morris SL. The ESAT6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression. Cell Microbiol 2007; 9(6): 1547-55.
- Koziel J, Maciag-Gudowska A, Mikolajczyk T, Bzowska M, Sturdevant DE, Whitney AR, et al. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by macrophages exerts cytoprotective effects manifested by the upregulation of antiapoptotic factors. PLoS One 2009; 4(4): e5210.
- 杨连君, 曹雪涛, 于益芝. Bcl-2, Bax与肿瘤细胞凋亡. 中国肿瘤生物治疗杂志(Yang Lianjun, Cao Xuetao, Yu Yizhi. Bcl-2, Bax and tumor cell apoptosis. Chinese Journal of Cancer Biotherapy) 2003; 10(3): 232-4.
- 陈思静, 卢贤瑜. 结核分枝杆菌调控细胞凋亡机理的研究进展. 国外医学临床生物化学与检验学分册(Chen Sijing, Lu Xianyu. The development of mechanism of apoptosis regulated by *Mycobacterium tuberculosis*. International Journal of Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine) 2005; 26(5): 276-8.
- Girisx M, Sc M, Erbil Y, Depboylu B, Mete O, Turkoglu U, et al. Heme oxygenase-1 prevents hyperthyroidism induced hepatic damage via an antioxidant and antiapoptotic pathway. J Surgical Res 2009; 4(13): 1-10.
- Zhang J, Jiang R, Takayama H, Tanaka Y. Survival of virulent *Mycobacterium tuberculosis* involves preventing apoptosis induced by Bcl-2 upregulation and release resulting from necrosis in J774 macrophages. Microbiol Immunol 2005; 49(9): 845-52.
- Flourie F, Parant F, Penes MC, Alcaraz-Galvain D. Falsely increased thyroid stimulating hormone concentrations attributable to interference from human antimouse antibodies. Clin Chem 2002; 48(12): 2289.