

结核杆菌对巨噬细胞转铁蛋白受体和铁蛋白表达的影响

李 微 董伟杰 刘云霞 屠清章 刘丹霞 吴 芳 章 乐 吴江东 张万江*
(石河子大学医学院病理生理学教研室/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 为了研究结核分枝杆菌国际标准强毒株H37Rv株和卡介苗菌株(BCG)分别感染巨噬细胞RAW264.7细胞株对细胞内转铁蛋白受体和铁蛋白表达量的时相变化及意义, 分别于感染后1, 6, 12, 18, 24 h, 应用ELISA和Western blot检测各组巨噬细胞中TfR和Fn的表达量。ELISA检测结果显示, 各组感染巨噬细胞上清液中TfR表达量均高于对照组, 在感染12, 18 h差异最明显, 具有统计学意义($P<0.05$)。Western blot检测结果显示: 于模型建成后1, 6, 18 h各感染组差异有统计学意义($P<0.05$)。用ELISA和Western blot检测显示各组小鼠巨噬细胞内Fn随时间变化表达逐渐增强, 在1 h时Fn的表达为对照组高于H37Rv组和BCG组; 6 h后, 感染组表达逐渐高于对照组, 12 h时, H37Rv组>对照组, 差异具有统计学意义($P<0.05$), 在18 h和24 h时, H37Rv组>BCG组>对照组, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。结核分枝杆菌感染导致巨噬细胞内TfR和Fn表达量增高, 且与菌株毒力强弱有关, 毒力强的菌株感染巨噬细胞的TfR和Fn的表达量更高。

关键词 结核分枝杆菌; 巨噬细胞; 转铁蛋白受体; 铁蛋白

Effect on the Expression of Macrophages Transferrin Receptor and Ferritin in Macrophages by *Mycobacterium tuberculosis*

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

(Department of Pathophysiology, Medical School, Shihezi University/Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases, Shihezi University, Shihezi 832002, China)

Abstract To research the changes of expression levels of transferrin receptor and ferritin, and analyze its significance in different phases, macrophages infected with virulent *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv (hereinafter referred to as H37Rv strains) and BCG vaccine strain (hereinafter referred to as the BCG strain), respectively, the expression of TfR and Fn in the supernatants was detected at 1, 6, 12, 18, 24 h after infection with ELISA and Western blot technologies. ELISA technologies demonstrated that the TFR expression in the infected group was higher than that in the control group, the results showed that the expression reached the peak 12 h and

收稿日期: 2012-11-27 接受日期: 2013-02-17

国家自然科学基金(批准号: 81260261、81160192、30960355、81260241)、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: ZRKX2010ZD01)资助的课题

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

Received: November 27, 2012 Accepted: February 17, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81260261, 81160192, 30960355, 81260241), 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.ZRKX2010ZD01)

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

网络出版时间: 2013-04-03 13:12 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130403.1312.001.html>

18 h after infection, which showed the most obvious differences ($P<0.05$). The results of Western blot indicated that the differences between the expression levels detected 1, 6, 18 h after the models created were statistically significant ($P<0.05$). Detected by ELISA and Western blot, the expression of Fn in groups of mice macrophages increased gradually over the time. The result showed Fn expression in the control group was higher than that in the infected group at 1 h. After 6 h infection, Fn expression in the infected group was higher than that in the control group; the H37Rv group>the control group at 12 h and there was statistical significance ($P<0.05$); the H37Rv group>BCG group>control group at 18 h and 24 h and there was statistical significance ($P<0.05$). Infection of *Mycobacterium tuberculosis* induced the rise of expression of TfR and Fn in macrophages.

Key words *Mycobacterium tuberculosis*; macrophage; transferrin receptor; ferritin

铁元素对巨噬细胞内结核分枝杆菌的生存有重要作用, 但巨噬细胞、结核分枝杆菌和铁三者的相互作用机制尚不十分清楚, 本实验通过检测不同毒力的结核分枝杆菌感染宿主巨噬细胞转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)和铁蛋白(ferritin, Fn)的表达量的实相性变化, 为阐明结核分枝杆菌感染巨噬细胞对宿主细胞铁代谢调控作用机制奠定了基础, 也为防治结核病提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细菌 结核分枝杆菌国际标准强毒株H37Rv株(以下简称H37Rv菌株)和卡介苗菌株(以下简称BCG菌株)由中国药物生物制品检定所提供。

1.1.2 细胞 小鼠巨噬细胞株RAW264.7购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.1.3 主要材料及来源 DMEM培养基(美国Hyclone公司); 胎牛血清(FBS, 美国Hyclone公司); 台盼兰(美国Sigma公司); 小鼠转铁蛋白ELISA试剂盒(上海蓝基生物科技有限公司); 小鼠铁蛋白ELISA试剂盒(上海蓝基生物科技有限公司); 兔抗小鼠TfR多克隆抗体(Epitmics公司); 兔抗小鼠Fn单克隆抗体(Epitmics公司); HRP山羊抗兔二抗(北京康为生物有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 结核分枝杆菌感染巨噬细胞模型的建立 H37Rv菌株用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0.5 mL的专用稀释液稀释, 接种于罗氏培养基斜面上, 培养至对数期时, 分别取生长状态良好的H37Rv菌株和BCG菌株, 放于磨菌器中, 加少量含0.05% Tween-80的生理盐水研磨均匀, 用不含抗生素的DMEM

培养液(含10%胎牛血清)稀释成菌悬液, 调整细菌浓度为 1.0×10^7 /mL。然后用完全培养液DMEM培养RAW264.7细胞, 0.25%的胰蛋白酶消化并收获细胞, 加入台盼兰染色做活细胞测定, 观察活细胞比率>95%。显微镜下计数, 调整细胞浓度为 1.0×10^6 /mL。取6孔细胞培养板, 每孔加2 mL细胞悬液, 置37 °C、5% CO₂细胞培养箱中孵育24 h; 移去培养液, 用预温的不含血清的DMEM培养液洗涤细胞培养板2次, 去除非贴壁细胞; 每孔加2 mL细菌悬液, 使细菌与巨噬细胞的比例为10:1, 培养板置37 °C、5% CO₂培养箱中孵育。

1.2.2 实验分组 实验细胞模型随机分为H37Rv组、BCG组、空白对照组。

1.2.3 各组巨噬细胞上清的收集、制备 于模型建立后1, 6, 12, 18, 24 h分别收集各组巨噬细胞上清液, 在4 °C离心机中10 000 r/min离心10 min。

1.2.4 ELISA检测各组巨噬细胞上清液TfR的表达量 按照小鼠ELISA转铁蛋白受体试剂盒进行操作。按50, 40, 30, 20, 10, 0 ng/mL配制标准工作液, 加入到酶标测定板中, 100 μL/孔。其他孔加入相同体积的待测上清样品, 酶标板加盖, 37 °C反应40 min, 洗涤5次, 每孔加50 μL生物素抗小鼠铁蛋白工作液, 37 °C反应20 min, 洗涤3次, 加酶标抗体工作液100 μL/孔, 37 °C反应10 min, 洗涤5次, 再加TMB显色液, 90 μL/孔, 37 °C避光反应20 min, 最后加TMB终止液100 μL/孔, 酶标仪450 nm波长下读取各孔吸光度绘制标准曲线, 按标准曲线计算各样本的铁蛋白含量。

1.2.5 ELISA检测各组巨噬细胞上清液Fn的表达量 操作步骤同TfR的测定, 但标准工作液按100, 50, 25, 10, 5, 0 ng/mL进行配置。

1.2.6 Western blot动态检测各组巨噬细胞内TfR的

表达量 于模型建立后1, 6, 12, 18, 24 h分别提取各组巨噬细胞内的总蛋白。将6孔板中营养液吸干后, 每孔加100 μ L的SDS蛋白裂解液, 冰上裂解30 min, 然后用小刮子将其刮出, 水中煮沸15 min, 4 $^{\circ}$ C离心16 min, 取上清。核酸蛋白测定仪模式调至 D_{280} , 测定总蛋白的浓度, 以浓度最小的所在组蛋白为标准, 用裂解液稀释, 使得各组蛋白浓度一致。将蛋白质上样缓冲液5 μ L与蛋白液20 μ L混匀, 煮沸10 min, 冰上冷却5 min。上样液体在4 $^{\circ}$ C 13 000 r/min离心5 min, 取上清上样, 80 V恒压电泳30 min, 待溴酚蓝迁移至分离胶后改为110 V恒压电泳90 min。将PVDF膜裁剪好后, 在甲醇中浸泡3 min, 放入转膜缓冲液中, 将Walkman滤纸泡入转膜液约15 min。以Walkman滤纸、聚丙烯酰胺凝胶、PVDF膜、Walkman滤纸的顺序, 23 V恒压半干转膜83 min, 再将PVDF膜置入含50 g/L脱脂奶粉的TBS-T中, 封闭2 h。将PVDF膜放入兔源性抗TfR抗体TBS-T溶液中(1:1 000) 4 $^{\circ}$ C孵育过夜。次日, TBS-T洗涤PVDF膜, 10 min/次, 共3次。PVDF膜放入辣根酶标记山羊抗兔IgG的二抗中(1:40 000), 室温孵育1 h。TBS-T洗膜3次, 10 min/次, 用ECL发光试剂进行发光显色, 在化学发光成像系统中拍照, 用Quantity One软件进行分析。

1.2.7 Western blot动态检测各组巨噬细胞内Fn的表达量 其余操作步骤与TfR一致, 转膜的操作步骤变为: 转膜前将裁剪好的NC膜和Walkman滤纸泡入转膜液约15 min。以Walkman滤纸、聚丙烯酰胺凝胶、NC膜、Walkman滤纸的顺序, 18 V恒压半干转膜40 min后, 将NC膜置入含50 g/L脱脂奶粉的TBS-T中, 封闭2 h。

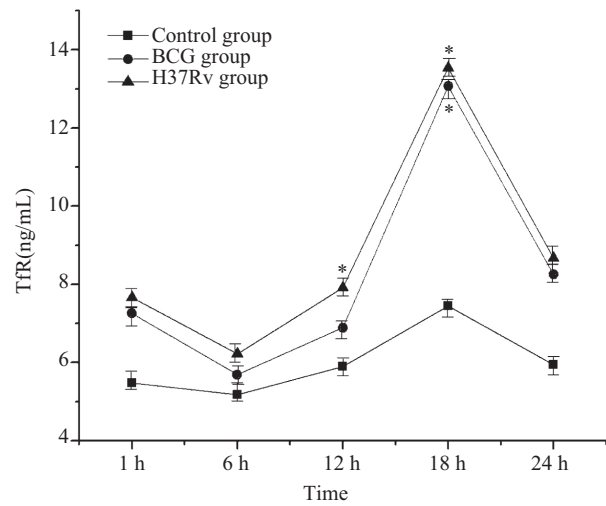
1.3 统计分析

应用SPSS16.0软件对数据进行统计处理, 所得数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 各组巨噬细胞上清液中TfR蛋白表达水平

TfR在正常对照组中有少量表达。三个组在1, 6, 12, 18 h表达逐渐增强, 24 h下降。同一时间点H37Rv组、BCG组TfR的表达均高于对照组, 在12, 18 h差异具有统计学意义($P<0.05$, 图1)。BCG组与H37Rv组比较, H37Rv株感染巨噬细胞上清液中TfR表达略高于BCG组, 但差异无统计学意义。结

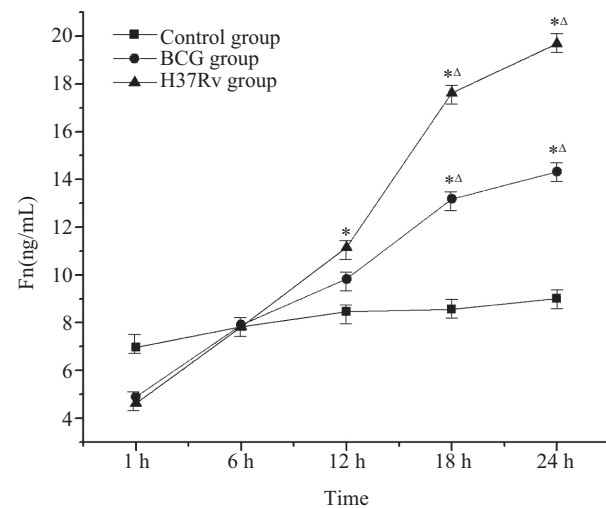


* $P<0.05$, 与对照组比较。

* $P<0.05$ vs control group.

图1 ELISA技术检测各组巨噬细胞中TfR的表达

Fig.1 Analysis of the expression of TfR in macrophages by ELISA



* $P<0.05$, 与对照组比较; $\Delta P<0.05$, 与BCG组比较。

* $P<0.05$ vs control group; $\Delta P<0.05$ vs BCG group.

图2 ELISA检测小鼠巨噬细胞中Fn的表达

Fig.2 Analysis of the expression of Fn in macrophages by ELISA

核分枝杆菌感染宿主巨噬细胞可以增强TfR的表达。

2.2 各组巨噬细胞上清液Fn蛋白表达水平

结核分枝杆菌感染巨噬细胞上清液中Fn的表达随着时间延长逐渐增强, 同一时间点比较: 在1 h检测出BCG组和H37Rv组表达低于对照组; 在12 h时H37Rv组和BCG组表达高于对照组, 且H37Rv组与对照组比较, 差异具有统计学意义($P<0.05$); 在18,

24 h时Fn的表达为H37Rv组>BCG组>对照组, 差异具有统计学意义($P<0.05$, 图2)。

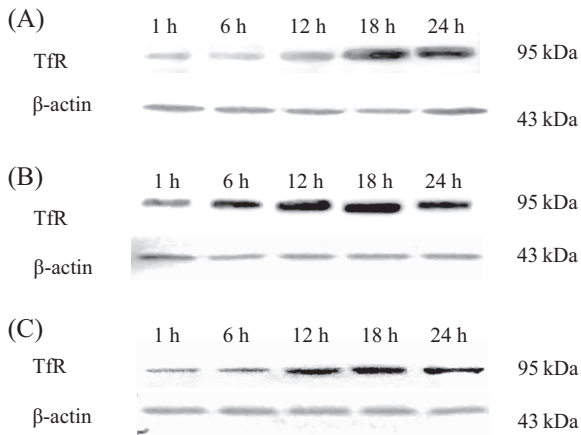
2.3 巨噬细胞TfR蛋白表达水平

用Western blot检测各组小鼠巨噬细胞内TfR在1, 6, 12, 18, 24 h的蛋白表达水平, 在分子质量约95 kDa处各有一条特异性蛋白带, 表达量结果为: H37Rv组>BCG组>对照组, 且在1, 6, 18 h有统计学

意义($P<0.05$)。结核分枝杆菌感染宿主巨噬细胞, 可诱导TfR的表达增高, 且表达量的高低与毒力的强弱相关, 毒力越强的结核分枝杆菌感染巨噬细胞, 巨噬细胞TfR的表达越高(图3和图4)。

2.4 巨噬细胞Fn蛋白表达水平

用Western blot检测发现, 各组巨噬细胞内Fn的表达随时间变化逐渐增强, 在1 h对照组Fn的表达高

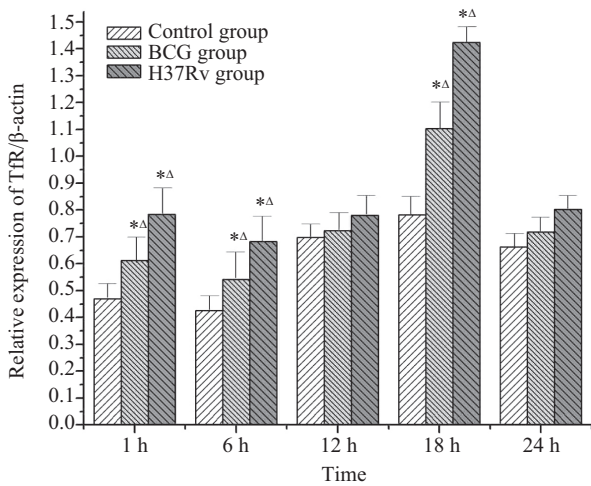


A: BCG组; B: H37Rv组; C: 对照组。

A: BCG group; B: H37Rv group; C: control group.

图3 Western blot技术检测各组巨噬细胞TfR表达

Fig.3 Analysis of the expression of TfR in macrophages by Western blot

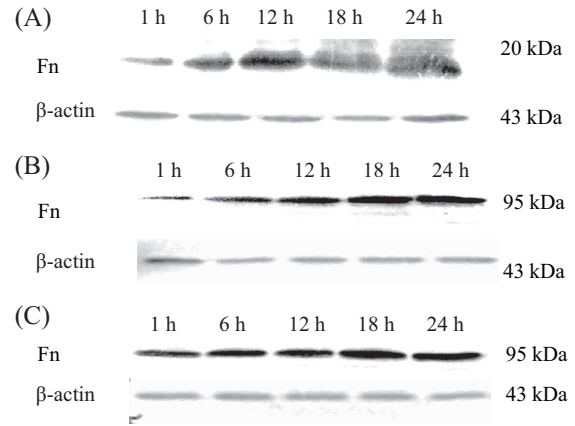


* $P<0.05$, 与对照组比较; $\Delta P<0.05$, 与BCG组比较。

* $P<0.05$ vs control group; $\Delta P<0.05$ vs BCG group.

图4 巨噬细胞中TfR在不同时间段的蛋白表达水平

Fig.4 The expression of TfR in macrophages in different phases

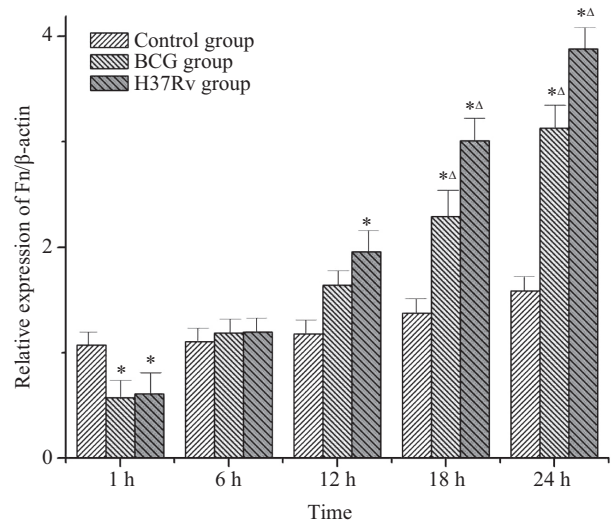


A: H37Rv组; B: BCG组; C: 对照组。

A: H37Rv group; B: BCG group; C: control group.

图5 Western blot检测小鼠巨噬细胞Fn表达

Fig.5 Analysis of the expression of Fn in macrophages by Western blot



* $P<0.05$, 与对照组比较; $\Delta P<0.05$, 与BCG组比较。

* $P<0.05$ vs control group; $\Delta P<0.05$ vs BCG group.

图6 巨噬细胞中Fn在不同时间段的蛋白表达水平

Fig.6 The expression of Fn in macrophages in different phases

于H37Rv组和BCG组($P<0.05$), 6 h后, 感染组表达逐渐高于对照组; 12 h后, H37Rv组>对照组, 差异具有统计学意义($P<0.05$), 在18 h和24 h, H37Rv组>BCG组>对照组, 差异具有统计学意义($P<0.05$, 图5和图6)。说明结核分枝杆菌感染宿主巨噬细胞, 可诱导Fn的表达, 且表达量的高低与毒力的强弱相关, 毒力越强的结核分枝杆菌感染巨噬细胞, 巨噬细胞Fn的表达越高。

3 讨论

铁蛋白(ferritin, Fn)是一种保守性较高的多功能、多亚基蛋白, 在细胞内整合铁池的稳态的维持过程中发挥着双重作用, 一是储存机体中的过剩铁, 避免产生铁中毒; 二是当外源铁不足时, 被存储的铁可以释放出来再被细胞利用。转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)是细胞内主要的摄铁蛋白。该机制是通过铁效应元件结合蛋白(iron responsive element binding protein, IRE-BP)调节Fn和TfR mRNA的功能状态, 控制Fn和TfR的表达水平, 对铁代谢进行调节。铁效应IRE-BP是存在于胞液内的蛋白质, 具有与IRE特异结合及顺乌头酸酶的双重活性。当细胞内铁含量减少时, IRE-BP与Fn和TfR mRNA的IRE特异结合, 并且影响其侧翼链结构状态, 使Fn的mRNA翻译被阻断, Fn合成量减少; 同时稳定TfR mRNA, 减少mRNA的降解, 促进TfR表达增加, 使铁向细胞内转运增多, 提高细胞内铁水平。反之, 细胞内铁含量增高时, RE-BP与IRE的亲合力消失, 表现出顺乌头酸酶的活性, Fn合成量增加。铁主要来源于TfR摄取(transferrin, Tf)结合的铁^[1-2]。巨噬细胞还可以通过膜上的TfR1介导内吞作用, 吸收转铁蛋白结合的铁(transferrin bound iron, TBI); 在一些促炎症因子刺激下, 二价金属离子转运体1(divalent metal transporter, DMT1)表达上调, 促进巨噬细胞对非转铁蛋白结合的铁(non-transferrin bound iron, NTBI)的吸收。

Cheng等^[3]研究发现, 活化的小鼠巨噬细胞产生的NO能有效杀死致病的结核分枝杆菌。在炎症应答反应中, iNOS诱导产生NO, 当NO合成增加时, 活化IRP, 使之与IRE结合, 增加了TfR的表达, 降低了Fn的合成, 通过增加铁摄取, 导致细胞内的铁浓度上升。有研究发现, 弗朗西斯菌感染巨噬细胞

RAW264.7时, 在感染早期TfR1的上调是由翻译后调节介导的, 并随着IRP1和IRP2表达的增加而增加。TfR1表达的增加通过转铁蛋白介导的铁运输扩充了细胞内动态铁池, 使弗朗西斯菌易于获取铁。TfR的下调不影响细菌与其他膜蛋白的结合而入侵, 但抑制细菌在细胞内的增殖^[4]。

本实验利用ELISA技术和Western blot技术动态检测不同毒力的结核分枝杆菌感染宿主巨噬细胞TfR的表达, 结果显示感染诱导了巨噬细胞TfR的表达, 即驱动了转铁蛋白介导的铁吸收程序。Western blot结果显示, 巨噬细胞内的TfR与毒力呈正相关, 毒力越强TfR表达越高。结核杆菌感染宿主巨噬细胞后, 需要从宿主巨噬细胞内摄取一定量的铁, 以保证自身在宿主巨噬细胞内的生存、繁殖和分化的需要, 使得巨噬细胞内的游离铁离子减少, 此时巨噬细胞通过摄铁途径: 铁-转铁蛋白-转铁蛋白受体介导的转运铁蛋白结合铁的途径来摄取足量的铁以供细胞需求。

另外, 本实验应用ELISA和Western blot研究发现, 各组小鼠巨噬细胞内Fn随时间变化, 表达逐渐增强。在1 h时, 对照组Fn的表达高于H37Rv组和BCG组; 而6 h后, 感染组表达逐渐高于对照组; 24 h时Fn表达最高。Fn的表达与结核分枝杆菌的毒力相关, 毒力强的Fn的表达量高。

这与以前发现的结果并不一致, 故而本实验室用ELISA检测了巨噬细胞分泌的膜转运蛋白(ferroportin, FPN), 它是目前发现的细胞膜上唯一的铁输出膜蛋白, 结果发现, 结核分枝杆菌感染巨噬细胞1, 6, 12, 18, 24 h时, FPN的表达量低于对照组, 且随时间变化逐渐降低, 表明炎症刺激巨噬细胞的FPN表达降低, 同时FPN的表达与毒力相关, 毒力越强的结核分枝杆菌感染巨噬细胞, 巨噬细胞FPN表达越低。可能的机制为感染抑制了巨噬细胞内铁离子的转出, 这可能是导致感染组巨噬细胞内Fn增多的机制之一。

另有研究表明, 用IFN- γ 和LPS处理RAW264.7细胞, 导致IRP2的降解加剧, Fn的合成增加^[5]。在感染的巨噬细胞内, Fn不仅受胞内游离铁的调控, 还受炎症因子调控。在巨噬细胞被感染的情况下, 巨噬细胞的炎症信号通路被激活(TLR-Myd88-NFkappaB pathway), 由此Fn被转录因子NFkappaB上调激活。

这些可能都是结核分枝杆菌感染巨噬细胞后Fn表达增高的机制。

结核分枝杆菌感染宿主巨噬细胞后, 巨噬细胞摄铁途径: 铁-转铁蛋白-转铁蛋白受体介导的转铁蛋白结合铁的途径被激活, 使得巨噬细胞内的TfR的表达量上升, 这为结核分枝杆菌的生存提供了足够的铁元素; 而研究发现感染组巨噬细胞Fn的表达随时间变化表达也逐渐增加, 虽然机制未完全阐明, 有待后续研究, 但是, 如果细胞中铁过载, 超过了铁蛋白的结合能力, 使游离铁在铁池中大幅度增加, 通过与细胞内的有机化合物结合, 产生高反应铁或高铁离子, 进而损伤溶酶体膜和线粒体膜; 最终导致细胞的应激和/或凋亡或死亡^[6], 从而杀死结核分枝杆菌。所以, 研究不同毒力的结核杆菌对感染宿主巨噬细胞铁代谢的调控作用机制, 为结核病的有效防治提供了新的理论依据, 对结核病的防治有重要的意义。

参考文献 (References)

- 1 Hentza MW, Muckenthaler MU, Andrews NC. Balancing acts: Molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 2010; 117(3): 285-97.
- 2 Furutani T, Hino K, Okuda M. Hepatic iron overload induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice expressing the hepatitis virus polyprotein. *Gastroenterology* 2010; 130(7): 2087-98.
- 3 Cheng Y, Zak O, Aisen P, Harrison SC, Walz T. Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex. *Cell* 2004; 116(4): 565-76.
- 4 Chan J, Fujiwara T, Brennan P, McNeil M, Turco SJ, Snapper M, *et al.* Microbial glycolipids: Possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86(7): 2453-7.
- 5 Li M, Saren M, Zhang S. Identification and expression of a ferritin homolog in amphioxus *Branchiostoma belcheri*: Evidence for its dual role in immune response and iron metabolism. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2008; 150(3): 263-70.
- 6 Legrand D, Mazurier J. A critical review of the roles of host lactoferrin in immunity. *Biometals* 2010; 23(3): 365-76.