

• 论 著 •

鸟分枝杆菌脂类诱导的人肺泡巨噬细胞抗结核免疫反应性的改变及机制的初步研究^{*}

彭宏虎¹, 石丽萍², 周康仕¹, 阳大庆^{1,3△}

(1. 湖南医药学院第一附属医院检验科, 湖南怀化 418000; 2. 湖南医药学院药学院, 湖南怀化 418000; 3. 湖南医药学院检验医学院, 湖南怀化 418000)

摘要:目的 研究鸟分枝杆菌脂类(MALs)对人肺泡巨噬细胞抗结核免疫反应性的影响。方法 平板计数法评价 MALs 对人肺泡巨噬细胞杀结核菌效应的影响; ELISA 检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平; Greiss 法检测一氧化氮(NO)水平。结果 MALs 减弱了人肺泡巨噬细胞对牛结核分枝杆菌(BCG)的杀灭。MALs 刺激后, 结核分枝杆菌纯蛋白衍生物(PPD)和干扰素 γ (IFN- γ)诱导的人肺泡巨噬细胞 TNF- α 和 NO 的分泌均有所下降。结论 MALs 减弱了人肺泡巨噬细胞对结核分枝杆菌的免疫反应性。

关键词: 鸟分枝杆菌脂类; 人肺泡巨噬细胞; 免疫功能

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.09.006

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)09-1172-03

Mycobacterium avium-derived lipids attenuate immune response against Mycobacterium in human alveolar macrophages^{*}

Peng Honghu¹, Shi Liping², Zhou Kangshi¹, Yang Daqing^{1,3△}

(1. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Hunan Medical College, Huaihua, Hunan 418000, China; 2. College of Pharmacy, Hunan Medical College, Huaihua, Hunan 418000, China; 3. Laboratory Medicine College, Hunan Medical College, Huaihua, Hunan 418000, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the effects of exposure to MALs on immunity against Mycobacterium tuberculosis in human alveolar macrophages. **Methods** Plate counting were used to evaluate the effect of resisting Mycobacterium tuberculosis in human alveolar macrophages. Culture supernatants were harvested and human TNF- α was measured by ELISA kit. Total nitrite levels in the media were measured using the Griess reagent. **Results** MALs stimulation attenuated the control of intracellular mycobacterial growth in human alveolar macrophages. The production of proinflammatory cytokines TNF- α and Nitric oxide in human alveolar macrophages induced by Mycobacterium tuberculosis purified protein derivatives tuberculin (Mt-PPD) and human interferon γ were attenuated by pretreatment in vitro with MALs. **Conclusion** MALs attenuated the responses of human alveolar macrophages against Mycobacterium tuberculosis, which may provide the new evidence to explain the phenomena in which some component of Mycobacteria in environment impacts the immunity against Mycobacterium tuberculosis infection.

Key words: Mycobacterium avium-derived lipids; human alveolar macrophages; immunity function

牛结核分枝杆菌(BCG)疫苗的接种是预防结核分枝杆菌感染的一种有效手段,然而在全世界大多数国家普及接种的现状下,结核的发病率依然居高不下。造成这种现象的原因涉及多个因素,一方面与 BCG 疫苗中的一些关键基因的丢失有关。另一方面,也与环境中普遍存在的非结核分枝杆菌的诱导有关。尽管人们对这些已有所研究,但是这些非结核分枝杆菌究竟通过什么样的机制来影响机体的抗结核免疫,仍然有待进一步的研究。鸟分枝杆菌是一种在环境中存在的主要机会致病菌,其细胞壁构成的特点是具有大量的脂类。目前,对鸟分枝杆菌及其脂类的研究主要集中在其急性感染的致病机制方面,而对它与抗结核免疫之间的关系研究很少。研究者前期对小鼠的研究表明,鸟分枝杆菌脂类(MALs)可以影响巨噬细胞抗结核免疫反应性的改变^[1-2],但其对人类细胞是否也具有类似的效应尚不清楚。本研究以人肺泡巨噬细胞为研究对象,以期阐明 MALs 对人肺泡巨噬细胞抗结核免疫反应性的影响,从

而为防治结核感染提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株及培养 鸟分枝杆菌 93008,大肠杆菌 ATCC25922 购自中国医学细菌保存中心,牛结核分枝杆菌(BCG)购自成都生物制品研究所,其培养方法参照文献[1]进行。

1.2 MALs 的提取及鉴定 参照文献[3-4],采用弗尔彻(Folch)法提取 MALs。将鸟分枝杆菌接种至 MiddleBrook 7H9 液体培养基(BD 公司)中,培养 5 d,然后 10 000 r/min 无菌离心收集培养物,将培养物用两倍体积左右的无菌水重悬后转移至 10 mL 血清瓶中,121 °C,15 min 灭活裂解。将上述裂解物移入无菌塑料离心管(同时记录离心管质量)中,−70 °C 冻存 24 h。冻存物在低压冷冻干燥机中干燥 48 h,获得干粉。在干粉中加入 20 倍体积的氯仿:甲醇(2:1)溶液,混匀后,在室温下将整个混合物置于定轨摇床中振摇 120 min。离心分离出液相后,用 0.2 倍体积的 0.9% NaCl 溶液洗涤。漩涡振荡,

^{*} 基金项目:湖南省教育厅科学研究项目(2015-30)。 作者简介:彭宏虎,男,主管技师,主要从事微生物检验及抗感染免疫研究。

[△] 通讯作者, E-mail:1050499790@qq.com。

2 000 r/min, 5 min 低速离心分离出两相, 弃去上层相, 用氮气流吹干底层相, 确定质量后, 加入适量 DMSO 溶解, 置于 -20 ℃ 保存备用。

1.3 鲎试剂检测 MALs 中内毒素水平 鲎试剂购自厦门鲎试剂公司, 操作按试剂盒说明书进行。具体做法为在无热原管中分别加入 100 μL 细菌内毒素检查用水、内毒素标准液或待测样品。然后每管中均加入 100 μL 鲎试剂溶液, 摇匀, 37 ℃ 孵育。温育 8 min 后, 加入 100 μL 显色基质溶液, 混匀, 37 ℃ 温育。温育 6 min 后, 依次加入偶氮化试剂 1 溶液、偶氮化试剂 2 溶液和偶氮化试剂 3 溶液各 500 μL, 混匀, 室温静置 5 min, 读取 545 nm 波长处吸光度值, 根据标准曲线计算内毒素水平。

1.4 人肺泡巨噬细胞的分离培养和诱导 人肺泡巨噬细胞的分离与培养参考有关文献[5], 行支气管肺泡灌洗术。收集支气管肺泡灌洗液, 2 000 r/min 离心 5 min 后, 弃去上清, 加入 RPMI 1640 培养液(含 5% 小牛血清)重悬细胞。将分离后的人肺泡巨噬细胞按 2×10^5 /孔铺 24 孔板。分别加入终浓度为 1 μg/mL MALs, 1 μg/mL 大肠杆菌脂类(ELs), SC(溶剂对照, 含 0.05% DMSO)诱导 48 h, 48 h 后加入新鲜的无抗菌药物的 IMDM 培养基(含 10% 小牛血清)恢复 4 h。然后分别加入 10 μg/mL PPD(丹麦血清研究所)和 100 ng/mL 人重组 IFN-γ(Biolegend 公司)刺激 24 h, 离心收集上清液, -20 ℃ 冻存备用。

1.5 人肺泡巨噬细胞胞内 BCG 清除试验 将分离得到的人肺泡巨噬细胞按 2×10^5 /孔铺 24 孔板。按实验分组, 分别加入终浓度为 1 μg/mL MALs, 1 μg/mL ELs, SC(含 0.05% DMSO 的培养基), 37 ℃, 5% CO₂ 孵育 48 h 后弃去原有培养基, 加入新鲜无抗菌药物的 IMDM 培养基(含 10% 小牛血清)孵育 4 h。然后在各实验组中按细胞: 细菌 = 1: 1 的比例加入 BCG, 37 ℃ 孵育 2 h 后用无菌 PBS 洗涤 5 次, 去除胞外 BCG, 然后置于 37 ℃, 5% CO₂ 分别培养 0、24、48、72 h, 于不同时间点加入 0.1% Triton X100 裂解细胞, 将裂解液转移至无菌 EP 管, 10 000 r/min 离心 2 min, 弃去上清后加入 500 μL Middlebrook 7H9 培养液重悬, 混匀, 10 倍倍比稀释后, 接种 Middlebrook 7H11(含 10% OADC)平板, 37 ℃ 培养 14~21 d, 计数菌落数。

1.6 肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的检测 试剂盒购自 Biolegend 公司。采用双抗体夹心 ELISA, 按试剂盒说明书进行。

1.7 一氧化氮(NO)的测定 试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。采用 Griess 法, 按试剂盒操作说明书进行。

1.8 统计学处理 实验数据均采用 SPSS13.0 分析, 多组间方差分析用 One Way ANOVA 检验, 各组间两两比较用 LSD 检验。菌落计数用析因设计的方差分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MALs 中内毒素水平和蛋白成分的检测 提取的 MALs 中的内毒素水平经计算为小于 0.05 EU/100 μg。SDS-PAGE 结果表明 20 μg MALs 中未检出可见的蛋白成分。见图 1、2。

2.2 MALs 预处理减弱人肺泡巨噬细胞对胞内 BCG 的清除 见图 3 所示, 结果表明, MALs 诱导组的人肺泡巨噬细胞胞内 BCG 的数量明显高于 ELs 组和 SC 组。提示 MALs 处理后, 人肺泡巨噬细胞对胞内 BCG 生长的控制能力有所降低。

2.3 MALs 减弱了结核分枝杆菌抗原 PPD 诱导的人肺泡巨噬细胞产生 TNF-α 和 NO 的能力 见表 1 所示, 与 ELs 诱导组和 SC 组比较, MALs 预处理减弱了结核分枝杆菌抗原 PPD 诱导的人肺泡巨噬细胞产生 TNF-α 和 NO 的能力。

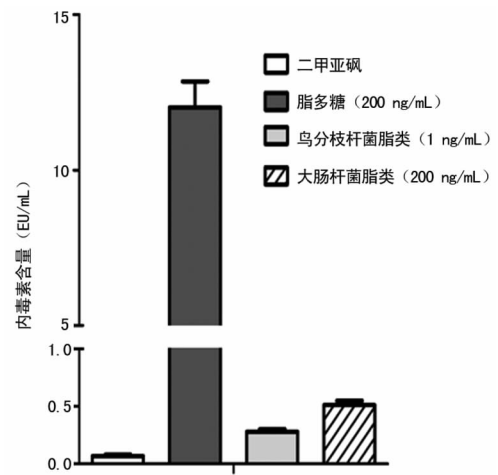


图 1 MALs 中的内毒素水平

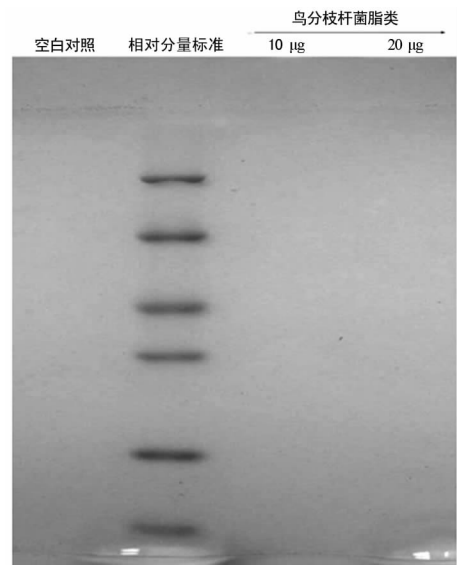


图 2 蛋白成分的鉴定

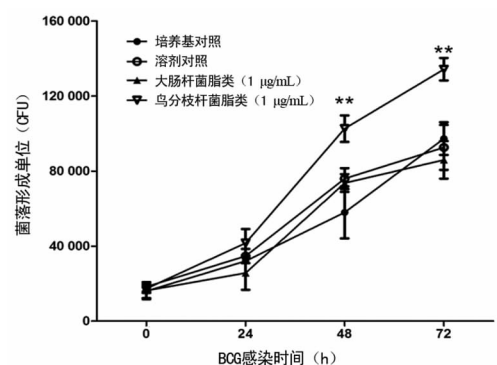


图 3 MALs 诱导的巨噬细胞对 BCG 清除

2.4 MALs 诱导减弱干扰素-γ(IFN-γ)激活人肺泡巨噬细胞的 TNF-α 和 NO 产生 见表 2 所示, 与 ELs 组和 SC 组相比, MALs 诱导组 IFN-γ 刺激的巨噬细胞 TNF-α 和 NO 的产生明显降低。结果提示 MALs 的诱导减弱了人肺泡巨噬细胞对

IFN-γ 的反应性。

表 1MALs 预处理后 PPD 诱导的人肺泡巨噬细胞TNF-α 和 NO 的分泌 ($\bar{x}\pm s$)

组别	TNF-α(pg/mL)	NO(μmol/L)
SC 诱导组	823.83±96.62	6.36±0.70
Medium 诱导组	817.07±98.45	6.06±0.41
ELs 诱导组	745.74±84.34	6.01±0.21
MALs 诱导组	477.15±41.52	4.93±0.65
F	42.63	31.85
P	0.000	0.000

表 2MALs 预处理后 IFN-γ 诱导的人肺泡巨噬细胞TNF-α 和 NO 的分泌 ($\bar{x}\pm s$)

组别	TNF-α(pg/mL)	NO(μmol/L)
SC 诱导组	263.45±49.08	6.46±0.68
Medium 诱导组	251.77±14.56	6.64±0.75
ELs 诱导组	254.51±56.37	6.47±0.52
MALs 诱导组	111.39±12.90	2.72±0.21
F	10.652	32.411
P	0.004	0.000

3 讨 论

研究者前期对小鼠的研究提示,MALs 可以影响巨噬细胞抗结核免疫的反应性。本研究在此基础上,发现用 MALs 预处理人肺泡巨噬细胞后,巨噬细胞控制胞内结核分枝杆菌生长的能力有所减弱。这个结果提示,当人们处于低剂量暴露于鸟分枝杆菌时,尽管不会表现出明显的临床表现,但却可能增加机体对结核分枝杆菌的易感性。此外,MALs 预处理后,人肺泡巨噬细胞对结核分枝杆菌抗原 PPD 及 IFN-γ 的反应性均有所降低,其主要表现在 TNF-α、NO 的分泌能力下降。目前,大家普遍认为 TNF-α 和 NO 在抗结核分枝杆菌感染中发挥着重要的作用,用 TNF-α 阻断剂处理后以及 TNF-α 受体的缺失均可导致机体对结核分枝杆菌繁殖的控制减弱,从而使机体更为易感^[6-7]。因此,MALs 诱导的人肺泡巨噬细胞产生 TNF-α 和 NO 的能力降低可能是降低人肺泡巨噬细胞对结核分枝杆菌控制力的重要原因。

分析产生种现象的原因,研究者推测其可能与细菌产物引起的免疫细胞耐受有关。近年来,对细胞壁成分诱导耐受的研 究主要体现在对炎症反应和细菌清除的影响。目前大部分研 究主要集中在 Toll 样受体 (TLRs) 激动剂,如 LPS、PGN、Pam3CSK4 和 Nod 样受体 (NLRs) 激动剂,如 MDP 等^[8-9],而 来源于鸟分枝杆菌的脂类能否诱导巨噬细胞的耐受而改变机 体反应性,尤其是针对结核分枝杆菌的反应性尚不明确。本研 究在这方面初步证实了鸟分枝杆菌的细胞壁成分——脂类也 可以诱导人肺泡巨噬细胞对结核分枝杆菌抗原及 IFN-γ 的免 疫耐受。但有意思的是,与本研究不同,肽聚糖 (PGN) 与 LPS 诱导的耐受主要表现为降低炎症反应和增强细菌清除 率^[10-11]。因此,PGN 和 LPS 诱导的耐受对机体抗感染是有利 的,而 MALs 诱导的人肺泡巨噬细胞的低反应性却减弱了对 结核分枝杆菌的清除,这有可能增强对人体对结核感染的易感 性。研究者推测存在这种差异的原因可能在于结核分枝杆菌 和其他细菌的生长和清除机制不同有关。结核杆菌等分枝杆

菌是一种典型的胞内寄生菌,其生长方式是持久地寄生于巨噬 细胞。机体控制和清除结核分枝杆菌有赖于 TNF-α、IFN-γ、 ROS 和 NO 等多种生物活性物质。通过这些活性介质激活巨 噬细胞,从而达到控制感染的目的;而对于葡萄球菌等其他感 染的控制,机体更多地依赖中性粒细胞的功能以及抗体的 产生。

本研究中,研究者仅证实了 MALs 可以导致人肺泡巨噬 细胞对结核分枝杆菌的反应性降低,并初步研究了出现这种现 象的机制,然而这种现象所涉及的分子和细胞学基础仍然有待 后续工作进一步阐明。

参考文献

[1] Yang D,Liu B,Hou X,et al. Pre-treatment with Mycobacterium avium-derived lipids reduces the macrophage response to interferon γ in BCG-vaccinated mice[J]. J Med Microbiol,2013,62(7): 980-987.

[2] Yang D,Liu Y,Chen Y,et al. Pretreatment with Mycobacterium avium-derived lipids attenuates the response of murine macrophages to components of Mycobacterium tuberculosis[J]. Int J Mol Med,2012,29(6):1072-1082.

[3] Folch J,Lees M,Sloane GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues[J]. J Biol Chem,1957,226(1):497-509.

[4] Koets AP. Low cross-reactivity of t-cell responses against lipids from Mycobacterium bovis and M. avium paratuberculosis during natural infection[J]. Eur J Immunol,2009,39(11):3031-3041.

[5] Juarez E,Nunez C,Sada E,et al. Differential expression of Toll-like receptors on human alveolar macrophages and autologous peripheral monocytes[J]. Respir Res,2010,20(11):2-6.

[6] Rietschel S. NOS2-derived nitric oxide regulates the size,quantity and quality of granuloma formation in Mycobacterium avium-infected mice without affecting bacterial loads[J]. Immunology,1999,98(3):313-323.

[7] Flynn MM,Goldstein J,Chan KJ,et al. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice[J]. Immunity,1995,30(2):561-572.

[8] Abraham C. Chronic stimulation of Nod2 mediates tolerance to bacterial products[J]. PNAS,2007,104(49):19440-19445.

[9] Dillon S,Agrawal S,Banerjee K,et al. Yeast zymosan,a stimulus for TLR2 and dectin-1,induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance[J]. J Clin Invest,2006,116(4):916-928.

[10] Murphey ED,Sherwood ER. Pretreatment with the Gram-positive bacterial cell wall molecule peptidoglycan improves bacterial clearance and decreases inflammation and mortality in mice challenged with Pseudomonas aeruginosa[J]. Microbes Infect,2008,10(12/13):1244-1250.

[11] Sherwood ER. pretreatment with the gram-positive bacterial cell wall molecule peptidoglycan improves bacterial clearance and decreases inflammation and mortality in mice challenged with staphylococcus aureus[J]. Crit Care Med,2008,36(11):3067-3073.