

DOI:10.13350/j.cjpb.220116

• 论著 •

鸟分枝杆菌 MAV-2921 基因编码蛋白的生物信息学分析 及其对巨噬细胞凋亡的影响*

何会姣, 田爽, 宁雪萍, 龙倩, 凌敏**

(广西医科大学, 长寿与老年相关疾病教育部重点实验室, 广西高校生物分子医学研究重点实验室,
广西医科大学生物技术教研室, 广西南宁 530021)

【摘要】 目的 应用生物信息学软件分析鸟分枝杆菌 MAV-2921 蛋白的结构和功能, 观察其对人源 THP-1 巨噬细胞凋亡的影响。方法 在 NCBI 数据库中获取鸟分枝杆菌 MAV-2921 蛋白编码基因及其氨基酸序列信息, 运用 ProtParam、ProtScale、TMPred、SignalP、SOPMA、SWISS-MODEL 等在线工具对鸟分枝杆菌 MAV-2921 蛋白进行生物信息学分析。提取全基因组 DNA, 进行 PCR 扩增、载体构建得到鸟分枝杆菌 MAV-2921 基因的重组表达质粒, 经诱导表达和分离纯化后获得重组 MAV-2921 蛋白。将重组蛋白 MAV-2921 作用于人源 THP-1 巨噬细胞, ELISA 法检测细胞上清液 TNF- α 表达量的变化, 流式细胞术检测巨噬细胞凋亡率。结果 鸟分枝杆菌 MAV-2921 基因全长 285 bp, 为编码 94 个氨基酸的蛋白质。该 MAV-2921 蛋白是稳定的亲水性蛋白, 有 1 个跨膜区段, 无信号肽; 二级结构以 α -螺旋为主, 三级结构模型构建显示该蛋白为单体蛋白, 不形成二聚体。利用大肠埃希菌表达系统制备了重组鸟分枝杆菌 MAV-2921 蛋白, 将重组 MAV-2921 蛋白作用于人源 THP-1 巨噬细胞, 与对照组相比细胞上清液 TNF- α 含量升高 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$)。结论 鸟分枝杆菌 MAV-2921 蛋白为稳定的、亲水性跨膜蛋白, 对人源 THP-1 巨噬细胞具有促凋亡作用。

【关键词】 鸟分枝杆菌; MAV-2921 蛋白; 生物信息学分析; THP-1 巨噬细胞; 细胞凋亡

【中图分类号】 R378.91

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)01-0075-06

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Jan; 17(1):75-80.]

Bioinformatic analysis of the *Mycobacterium avium* MAV-2921 protein and its effect on apoptosis of macrophages

HE Hui-jiao, TIAN Shuang, NING Xue-ping, LONG Qian, LING Min (Key Laboratory of Biological Molecular Medicine Research of Guangxi University, Department of Biotechnology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)***

【Abstract】 **Objective** To bioinformatically analyze the structure and function of the MAV-2921 protein of *Mycobacterium avium* and to investigate the effect of the MAV-2921 protein of *M. avium* on the apoptosis of human THP-1 macrophages. **Methods** Genetic information and the amino acid sequence of the MAV-2921 protein of *M. avium* were retrieved from the NCBI database. ProtParam, ProtScale, TMPred, SignalP, SOPMA, and SWISS-MODEL were used to bioinformatically analyze the characteristics of the MAV-2921 protein of *M. avium*. After genomic DNA was extracted, a recombinant expression plasmid to express the *M. avium* MAV-2921 gene was constructed via amplification with PCR and vector construction. Expression of the protein was induced, and the protein was separated and purified to prepare recombinant MAV-2921 protein. After human THP-1 macrophages were treated with the recombinant MAV-2921 protein, ELISA was utilized to determine the level of TNF- α in culture supernatant, and flow cytometry was used to determine the rate of macrophage apoptosis. **Results** The MAV-2921 gene is 285 bp in length, and the MAV-2921 protein of *M. avium* contains 94 amino acids. The MAV-2921 protein is a stable hydrophilic protein with a transmembrane domain (from intracellular to extracellular) located at amino acids 35-57, and it is a transmembrane protein with no signal peptides. The protein's secondary structure mainly consists of alpha-helices. A model of its tertiary structure indicated that MAV-2921 was a monomer protein that does not form a dimer. The recombinant MAV-2921 protein of *M. avium* was successfully prepared using an *E. coli* expression system. After human THP-1 macrophages were treated with the recombinant MAV-2921 protein, the level of TNF- α in culture supernatant increased ($P < 0.05$), and the rate of macro-

* **【基金项目】** 广西自然科学基金项目(No. 2018GXNSFAA281023)。

** **【通讯作者】** 凌敏, E-mail: lingmin70@163.com

【作者简介】 何会姣(1995-), 女, 广西人, 在读硕士研究生。研究方向: 细菌感染与免疫。E-mail: 1142352909@qq.com

phage apoptosis increased ($P < 0.05$). **Conclusion** The MAV-2921 protein of *M. avium* is a stable and hydrophilic transmembrane protein that can enhance the apoptosis of human THP-1 macrophages.

【Key words】 *Mycobacterium avium*; MAV-2921 protein; bioinformatic analysis; THP-1 macrophage; apoptosis

鸟分枝杆菌(*Mycobacterium avium*)广泛存在于水源和土壤中,也可由尘埃、食物和动植物中分离得到。鸟分枝杆菌是非结核分枝杆菌肺病的主要病原体,是一种胞内寄生的机会性致病菌,其靶向入侵巨噬细胞和血液单核细胞,可在免疫功能缺陷的患者中引发人兽共患性传染病。

研究表明,ESAT-6蛋白是结核分枝杆菌的一个重要毒力因子,在结核分枝杆菌调控宿主细胞的免疫反应中起重要作用^[1-2]。鸟分枝杆菌 MAV-2921 蛋白编码基因与结核分枝杆菌 ESAT-6 蛋白编码基因高度同源,为探索鸟分枝杆菌 MAV-2921 蛋白在干预和调控巨噬细胞过程中的作用,本研究应用生物信息学方法对鸟分枝杆菌 MAV-2921 蛋白的结构和功能进行分析预测,并用诱导表达的鸟分枝杆菌 MAV-2921 蛋白作用于人源 THP-1 巨噬细胞,探讨其对 THP-1 巨噬细胞凋亡的影响。

材料与方 法

1 材 料

1.1 菌株、载体和细胞 鸟分枝杆菌 104 菌株和表达载体 pGEX-4T-3 均为本实验室保存;大肠埃希菌 BL21(DE3)感受态细胞购买于全式金生物技术有限公司;人源 THP-1 巨噬细胞细胞株由广西医科大学艾滋病研究中心提供。

1.2 主要试剂和仪器 质粒小量抽提试剂盒和 DNA 胶回收试剂盒购于上海生工公司;限制性内切酶和 Taq DNA 聚合酶等购于日本 TaKaRa 公司;Pierce Glutathione Agarose 购自美国 ThermoFisher 公司;胎牛血清、DMEM 高糖培养基、1640 培养基和青霉素链霉素溶液购于美国 Gibco 公司;细胞 6 孔培养板购于美国 Corning 公司;TNF- α 检测试剂盒和 AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购于德国 BOSTER 公司。

生物安全柜 Thermo Fisher1300 购于美国 ThermoFisher 公司;高速冷冻离心机 Eppendorf 5810R 购于德国 Eppendorf 公司;蛋白电泳仪、电泳槽、转膜仪购于美国 Bio-Rad 公司;PCR 仪 Biometra Tpersonal 购于德国 Biometra 公司;凝胶成像系统 UVIL-7600Z 购于英国 UVI 公司;超声波细胞粉碎机购于宁波新芝生物科技股份有限公司;CO₂ 细胞培养箱购于美国 Thmorgan 公司。

2 方 法

2.1 鸟分枝杆菌 MAV-2921 蛋白的生物信息学分析

2.1.1 MAV-2921 蛋白基因信息及理化性质分析

登录在线 NCBI gene 数据库获取鸟分枝杆菌 104 菌株 MAV-2921 基因的核酸序列信息,在 NCBI 蛋白数据库中获取鸟分枝杆菌 104 菌株 MAV-2921 蛋白的氨基酸序列信息。运用 ExPASy 资源数据库(<https://www.expasy.org>)中的 ProtParam 在线工具对鸟分枝杆菌 104 菌株 MAV-2921 蛋白的氨基酸序列信息进行理化性质分析。

2.1.2 MAV-2921 蛋白疏水性、跨膜区及信号肽预测 运用 ProtScale 软件对鸟分枝杆菌 104 菌株 MAV-2921 蛋白进行疏水性分析。分别运用 TMPred 和 SignalIP-5.0 在线蛋白分析工具对 MAV-2921 蛋白的跨膜区和信号肽进行分析预测。

2.1.3 MAV-2921 蛋白二、三级结构预测 登录在线工具 SOPMA,在线分析鸟分枝杆菌 MAV-2921 蛋白的二级结构;采用 SWISS-MODEL 预测分析 MAV-2921 蛋白的三级结构。

2.2 观察鸟分枝杆菌 MAV-2921 蛋白对巨噬细胞凋亡的影响

2.2.1 MAV-2921 基因扩增与原核表达质粒的构建

将从 GenBank 中获得的鸟分枝杆菌 104 菌株 MAV-2921 基因序列作为目的基因设计引物,上游和下游引物分别引入 BamH I 和 EcoR I 酶切位点。引物 F: 5'-AAAGGATCCCGCTATGAGCATCAAC-TACC-3'; R: 5'-AAAGAATTCCGCGCCTGAAGT-GAAGGCG-3'(划线部分分别为 BamH I 和 EcoR I 酶切位点)。以鸟分枝杆菌临床分离株提取的全基因组 DNA 为模板,PCR 扩增目的基因。PCR 产物纯化后与 pGEX-4T-3 质粒连接,构建重组质粒 pGEX-ESAT-6 并转化 DH5 α 感受态细胞,用 BamH I 和 EcoR I 对转化菌落中提取的质粒进行双酶切鉴定。

2.2.2 重组蛋白的诱导表达和纯化 将重组质粒 pGEX-ESAT-6 转化至大肠埃希菌 BL21(DE3)感受态细胞中。转化菌均匀涂布于含氨苄青霉素(50 μ g/ml)的 LB 固体培养基上,37 $^{\circ}$ C 恒温培养过夜。挑取阳性菌落于 LB 液体培养基中(含 20 μ l Amp 和 200 μ l 20% 葡萄糖)37 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养,当菌液吸光度 A₆₀₀ 值为 0.5 时加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导培养 4 h,离心收集菌体。菌体经超声破碎后,离心收集沉淀和上清各 20 μ l 进行 5% 浓缩胶 12% 分离胶 SDS-PAGE 电泳检测。收集的沉淀经过变性、

透析、复性的方式处理后,按照 Thermo Scientific Pierce 谷胱甘肽琼脂糖说明书进行纯化。

2.2.3 ELISA 法检测 MAV-2921 蛋白作用 THP-1 巨噬细胞上清液中 TNF- α 的表达量 将对数生长期的 THP-1 细胞用 DMEM 培养基调整至 1×10^6 个/ml 的浓度,分入 6 孔培养板中,然后加入终浓度为 10 $\mu\text{g/ml}$ 的重组 MAV-2921 蛋白作用于 THP-1 巨噬细胞,同时设立空白组、洗脱液对照组,分别在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中孵育 24 h、48 h,收集细胞上清液,以 TNF- α ELISA KIT 检测细胞上清液中细胞因子 TNF- α 的表达量。

2.2.4 流式细胞术检测 MAV-2921 蛋白作用 THP-1 巨噬细胞的凋亡 取对数生长期的 THP-1 细胞,用 DMEM 培养基将细胞浓度调整至 1×10^6 个/ml 后加入到 6 孔培养板中,再将重组 MAV-2921 蛋白以 10 $\mu\text{g/ml}$ 的终浓度作用于 THP-1 巨噬细胞,同时设立空白组、洗脱液对照组,每组分别设置 3 个平行孔,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中分别孵育 24 h、48 h。孵育结束后将细胞悬液以 2 000 r/min(最大离心半径 18 cm)于高速冷冻离心机 Eppendorf 5810R 中离心 5 min 收集细胞,用 PBS 洗涤 2 次后加入 500 μl Binding buffer 重悬,然后加入 5 μl AnnexinV-FITC 和 5 μl PI 染色液,室温避光孵育 20 min,经流式细胞仪检测细胞凋亡情况,并分析凋亡率。

2.3 统计学分析 将数据录入 Excel 数据库,采用 SPSS 18.0 进行数据分析。定量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组内比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1 MAV-2921 蛋白基因信息及理化性质分析

鸟分枝杆菌 104 菌株 MAV-2921 蛋白的编码基因序列全长 285 bp, Gene ID: 4530537, 序列索引号为 NC_008595, 共编码 94 个氨基酸, 其序列为: MSINYQFGDVEDAHGALIRAQAASLEAEHQAIIRDVLAAGDFWGGAGSVACQEFITQLGRNFQVIYEQANAHGQKVVQTAGSNMASTDSAVGSSWA。

鸟分枝杆菌 104 菌株 MAV-2921 蛋白理论等电点为 4.76, 相对分子质量为 9.885×10^3 。其中丙氨酸(Ala)、甘氨酸(Gly)、谷氨酰胺(Gln)的含量较高,分别为 18.1%、10.6% 和 9.6%, 带负电荷的氨基酸残基数(Asp+Glu)为 9 个,带正电荷氨基酸残基数(Arg+Lys)为 4 个。该蛋白不稳定指数为 12.24, 属于稳定蛋白。脂肪系数为 78.09, 蛋白亲疏水性平均值为 -0.057, 为亲水性蛋白。

2 MAV-2921 蛋白的疏水性、跨膜区及信号肽预测

ProtScale 对鸟分枝杆菌 MAV-2921 蛋白的预测分析结果如图 1。MAV-2921 含有多个亲水性区域和疏水性区域,其中 MAV-2921 第 34 位氨基酸处亲水性得分值最高,为 1.600,第 70 位氨基酸处疏水性得分值最低,为 -1.989。

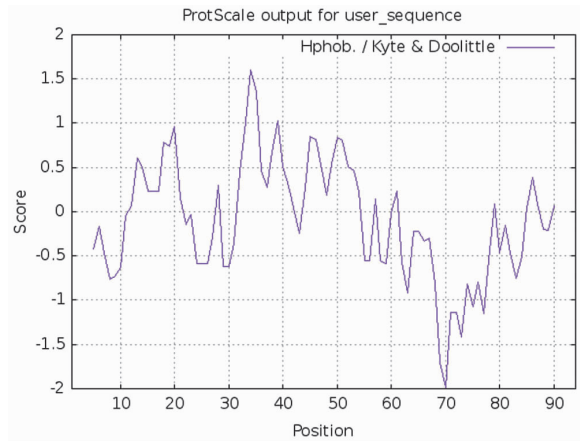


图 1 MAV-2921 蛋白的疏水性分析
Fig. 1 Hydrophilicity of MAV-2921 protein

TMpred 对 MAV-2921 蛋白的预测结果显示, MAV-2921 蛋白有 1 个由胞内向胞外的跨膜段,其 N 端位于胞内,跨膜区位于 35-57 位氨基酸,评分为 611。MAV-2921 蛋白具有跨膜结构,属于跨膜蛋白。

SignalP-5.0 信号肽预测结果见图 2。MAV-2921 蛋白的 SP(Signal peptide)值为 0.0231, TAT(TAT signal peptide)值为 0.0038, LIPO(Lipoprotein signal peptide)值为 0.0032, 低峰值提示 MAV-2921 蛋白可能无信号肽。

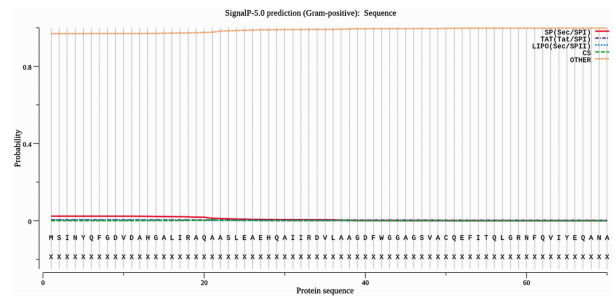
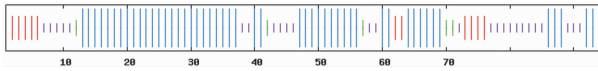


图 2 MAV-2921 蛋白的信号肽预测
Fig. 2 Prediction of signal peptide of MAV-2921 protein

3 MAV-2921 蛋白二、三级结构预测

SOPMA 在线预测的二级结构信息结果见图 3。MAV-2921 蛋白中呈 α -螺旋(Alpha helix)结构的氨基酸数为 50 个,占 53.19%;呈 β -折叠(Extended strand)结构的氨基酸数为 13 个,占 13.83%;呈 β -转角(Beta turn)结构的氨基酸数为 5 个,占 5.32%;呈无规卷曲(Random coil)结构的氨基酸数为 26 个,占 27.66%。



注:蓝色表示 α -螺旋,红色表示 β -折叠,绿色表示 β -转角,紫色表示无规卷曲。

图 3 MAV-2921 二级结构预测

Notes: Blue for alpha-helix, red for extended strand, green for beta turn, purple for random coil.

Fig. 3 Prediction of secondary structure of MAV-2921

MAV-2921 蛋白的三级结构模型构建结果见图 4。该模型的模板相似性(Seq Identity)为 91.49%, GMQE 评分为 0.46(可信度范围为 0-1, 值越大表明质量越好), QMEAN 评分为 0.00(QMEAN 评分区间为 -4~0, 越接近 0, 评估待测蛋白与模板蛋白的匹配度越好)。模型预测结果显示该蛋白是单体蛋白, 不形成二聚体, 也无与配体结合的空间位置。

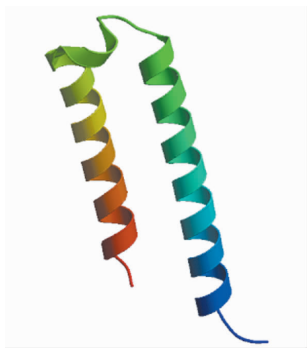
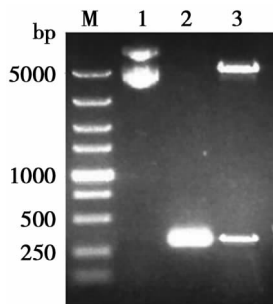


图 4 MAV-2921 三级结构预测

Fig. 4 Prediction of tertiary structure of MAV-2921

4 MAV-2921 基因扩增与原核表达质粒的构建

GenBank 中 MAV-2921 蛋白的编码基因序列全长 285 bp。经 BamH I 和 EcoR I 双酶切重组质粒 pGEX-ESAT-6, 1% 琼脂糖凝胶电泳显示目的基因片段约 285 bp(图 5)。该片段大小与预期相符, 重组质粒 pGEX-ESAT-6 构建成功。



M DNA marker(DL5000) 1 pGEX-ESAT-6 重组质粒 2 pGEX-ESAT-6 重组质粒 ESAT-6 基因 PCR 扩增产物 3 pGEX-ESAT-6 重组质粒 BamH I 和 EcoR I 双酶切产物

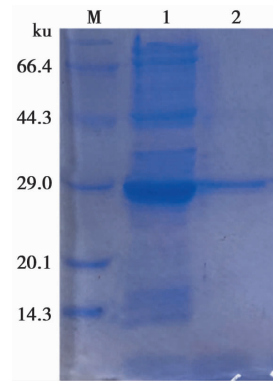
图 5 重组质粒 pGEX-ESAT-6 的双酶切鉴定

M DNA marker(DL5000) 1 pGEX-ESAT-6 recombinant plasmid 2 PCR product of ESAT-6 gene in pGEX-ESAT-6 3 pGEX-ESAT-6 digested with BamH I and EcoR I

Fig. 5 Double restriction enzyme digestion of pGEX-ESAT-6 electrophoresis

5 重组蛋白的诱导表达和纯化

将已转化重组质粒 pGEX-ESAT-6 的大肠埃希菌 BL21(DE3)用 IPTG(1 mmol/L)诱导表达 4 h, 采用 5% 浓缩胶 12% 分离胶的 SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达。结果显示, 在菌体上清液中出现分子量单位约 31.5 ku 的蛋白条带, 而菌体沉淀中无明显条带, 表明 MAV-2921 蛋白以可溶性形式表达。将收集的菌体上清进行变性、透析、复性处理后, 利用 GST 标签与谷胱甘肽通过硫键共价亲和的原理, 通过谷胱甘肽琼脂糖凝胶对重组 MAV-2921 蛋白进行亲和层析, 获得纯化的重组 MAV-2921 蛋白(图 6)。



M 蛋白 marker 1 纯化前的重组蛋白 2 纯化的重组蛋白

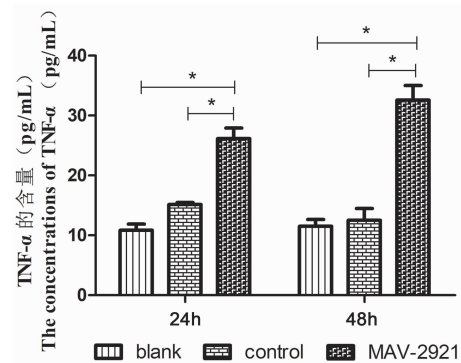
图 6 纯化的重组 MAV-2921 蛋白

M Protein marker; 1 Recombinant protein before purification; 2 Purified recombinant protein

Fig. 6 Purified recombinant MAV-2921 protein

6 ELISA 法检测 MAV-2921 蛋白作用 THP-1 巨噬细胞上清液中 TNF- α 表达量的变化

利用 ELISA 法检测 MAV-2921 蛋白作用 THP-1 巨噬细胞不同时间后细胞上清中 TNF- α 的含量, 得到各处理组 THP-1 巨噬细胞上清中 TNF- α 含量的变化情况, 结果见图 7。与空白组、洗脱液对照组对比, MAV-2921 蛋白作用 THP-1 巨噬细胞 24 h 和 48 h 后 TNF- α 含量均显著升高(24 h 组 $F=128.316, P<0.05$; 48 h 组 $F=115.568, P<0.05$)。



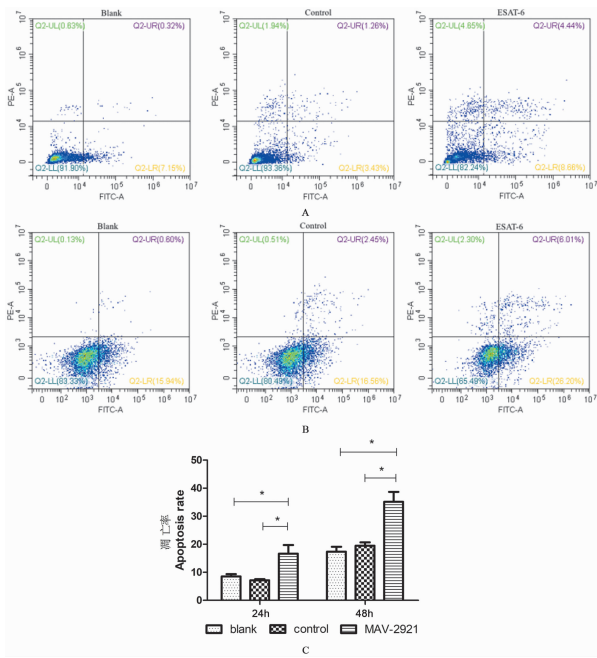
注(Note): * 组间比较(Comparison among groups), $P<0.05$ 。

图 7 各组 THP-1 细胞上清液中 TNF- α 的含量

Fig. 7 The concentrations of TNF- α in culture supernatant

7 流式细胞术检测 MAV-2921 蛋白作用 THP-1 巨噬细胞的凋亡情况

为了检测鸟分枝杆菌 MAV-2921 蛋白对 THP-1 巨噬细胞凋亡的影响,利用重组 MAV-2921 蛋白作用于 THP-1 巨噬细胞,同时设立空白组和洗脱液对照组,作用 24 h 和 48 h 后分别采用流式细胞术检测细胞凋亡情况,结果见图 8。空白组和洗脱液对照组的细胞凋亡率比较差异无统计学意义(24 h 组 $F = 22.400, P > 0.05$; 48 h 组 $F = 50.245, P > 0.05$),而重组 MAV-2921 蛋白处理组与空白组和洗脱液对照组相比,处理组细胞的凋亡率均显著升高(24 h 组 $F = 22.400, P < 0.05$; 48 h 组 $F = 50.245, P < 0.05$)。表明鸟分枝杆菌 MAV-2921 蛋白可促进巨噬细胞的凋亡。



注(Notes): * 组间比较(Comparison among groups), $P < 0.05$ 。

A 各组作用 24 h 后流式细胞术检测结果 B 各组作用 48 h 后流式细胞术检测结果 C 凋亡率统计结果

图 8 各组细胞凋亡率

A Flow cytometry detection at 24 h B Flow cytometry detection at 48 h C Apoptosis rate of each group

Fig. 8 Apoptosis rate of each group

讨论

结核分枝杆菌是一种胞内寄生菌,巨噬细胞是其寄生的主要场所。巨噬细胞是固有免疫应答中宿主防御病原菌的第一道防线,在控制病原菌感染方面发挥重要作用^[3]。巨噬细胞凋亡作为宿主清除病原菌的重要途径之一,在控制结核分枝杆菌感染中具有重要意义。研究发现,巨噬细胞与结核分枝杆菌在宿主细胞内存活和播散密切相关^[4]。结核分枝杆菌能够通过表达一些毒力因子来干扰宿主的免疫反应,抑制巨噬细胞的凋亡,以逃避宿主细胞的免疫杀伤并实现持续生

存^[5-9];另一方面,结核分枝杆菌促进巨噬细胞的凋亡和损伤^[10-13],以完成向临近细胞的扩散传播。

鸟分枝杆菌也是一种胞内寄生的病原菌,具有调节细胞内环境的能力,其对宿主细胞免疫环境的适应机制使得鸟分枝杆菌也可以在巨噬细胞内存活和繁殖^[14]。被巨噬细胞吞噬的鸟分枝杆菌可以调节吞噬体液泡膜的重塑,抑制吞噬体的酸化、干扰内小体的成熟,从而阻止吞噬体-溶酶体融合,使得巨噬细胞无法杀灭摄入胞内的病原菌^[15-17]。此外,鸟分枝杆菌还可以诱导机体产生免疫应答及促进巨噬细胞凋亡^[18-20],从而抵御病原菌感染。在这些与宿主巨噬细胞相互作用的复杂过程中,致病性分枝杆菌的多种蛋白分子发挥着极其重要的作用。多个与致病性分枝杆菌毒力相关的蛋白是由一种存在于分枝杆菌中的 VII 型分泌系统(T7SS)编码的,这些毒力相关蛋白在分枝杆菌的致病机制中起着核心作用^[21-22]。结核分枝杆菌的毒力蛋白 ESAT-6 是 VII 型分泌系统中重要的分泌蛋白,该蛋白可以通过活化 Caspase-9/Caspase-3 的表达而引起宿主细胞的凋亡^[23]。鸟分枝杆菌 MAV-2921 蛋白与结核分枝杆菌 ESAT-6 蛋白高度同源,因此推测该蛋白可能也与鸟分枝杆菌的致病机制有关。

本研究运用生物信息学工具对鸟分枝杆菌 MAV-2921 蛋白进行了分析预测,结果显示该蛋白有一个位于 35-57 位氨基酸的由胞内向胞外的跨膜段,其 N 端位于胞内。该预测结果提示,鸟分枝杆菌 MAV-2921 蛋白可能定位于细胞膜上。此外,生物信息学分析结果显示,该蛋白是一种稳定的亲水性的蛋白。本研究将诱导表达后的菌体进行超声破碎,将离心收集的上清和沉淀进行 5% 浓缩胶 12% 分离胶的 SDS-PAGE 电泳鉴定,结果也显示鸟分枝杆菌 MAV-2921 蛋白主要存在于上清液中,证实了该蛋白确是属于水溶性蛋白。

本研究构建了 pGEX-ESAT-6 原核表达质粒,成功利用大肠埃希菌表达系统诱导表达了鸟分枝杆菌 MAV-2921 蛋白。将制备的重组 MAV-2921 蛋白作用于人源 THP-1 巨噬细胞,通过 ELISA 法检测细胞上清液中细胞因子 TNF- α 表达量的变化,流式细胞术检测巨噬细胞的凋亡情况。结果显示,鸟分枝杆菌 MAV-2921 蛋白与人源 THP-1 巨噬细胞共孵育 24 h 和 48 h 之后与对照组相比,细胞上清液中细胞因子 TNF- α 的表达量均显著增高,细胞凋亡率也均呈升高趋势。TNF 具有造血、抵抗病原体感染、免疫监视等功能。TNF- α 由单核细胞生成,可以诱导某些肿瘤细胞系细胞的死亡,还具有刺激细胞增殖和诱导细胞分化的功能,是巨噬细胞在抵抗病原体、控制感染的过程中起主要作用的细胞因子之一。本研究中鸟分枝杆菌

MAV-2921 蛋白作用于 THP-1 巨噬细胞后, 细胞上清液中 TNF- α 表达量和巨噬细胞凋亡率均显著增高, 表明鸟分枝杆菌 MAV-2921 蛋白可以诱导机体产生针对鸟分枝杆菌的免疫应答, 并对巨噬细胞的凋亡具有促进作用。

【参考文献】

- [1] Welin A, Eklund D, Stendahl O, et al. Human macrophages infected with a high burden of ESAT-6-expressing *M. tuberculosis* undergo caspase-1- and cathepsin B-independent necrosis[J]. PLoS One, 2011, 6(5): e20302.
- [2] Peng X, Sun J. Mechanism of ESAT-6 membrane interaction and its roles in pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Toxicon, 2016, 116: 29-34.
- [3] Schmid D, Dengjel J, Schoor O, et al. Autophagy in innate and adaptive immunity against intracellular pathogens[J]. J Mol Med, 2006, 84(3): 194-202.
- [4] 赵润鹏, 吴静, 胡东. 结核分枝杆菌感染的巨噬细胞的死亡和自噬[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(12): 1711-1714.
- [5] 张彩勤, 杨丽, 张廷芬, 等. 结核分枝杆菌分泌蛋白调控巨噬细胞自噬诱导持续性感染[J]. 科学技术与工程, 2018, 18(32): 124-128.
- [6] Malik ZA, Iyer SS, Kusner DJ. *Mycobacterium tuberculosis* phagosomes exhibit altered calmodulin-dependent signal transduction—contribution to inhibition of phagosome-lysosome fusion and intracellular survival in human macrophages[J]. J Immunol, 2001, 166(5): 3392-3401.
- [7] Malik ZA, Denning GM, Kusner DJ. Inhibition of Ca(2+) signaling by *Mycobacterium tuberculosis* is associated with reduced phagosomelysosome fusion and increased survival within human macrophages[J]. J Exp Med, 2000, 191(2): 287-302.
- [8] Velmurugan K, Chen B, Miller JL, et al. *Mycobacterium tuberculosis* nuoG is a virulence gene that inhibits apoptosis of infected host cells[J]. PLoS Pathog, 2007, 3(7): e110.
- [9] Divangahi M, Chen M, Gan H, et al. *Mycobacterium tuberculosis* evades macrophage defenses by inhibiting plasma membrane repair[J]. Nat Immunol, 2009, 10(8): 899-906.
- [10] Danelishvili L, Yamazaki Y, Selker J, et al. Secreted *Mycobacterium tuberculosis* Rv3654c and Rv3655c proteins participate in the suppression of macrophage apoptosis[J]. PLoS One, 2010, 5(5): e10474.
- [11] Briken V, Miller JL. Living on the edge— inhibition of host cell apoptosis by *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Future Microbiol, 2008, 3(4): 415-422.
- [12] Briken V. *Mycobacterium tuberculosis* genes involved in regulation of host cell death[J]. Adv Exp Med Biol, 2013(783): 93-102.
- [13] Chen M, Gan H, Remold HG. A mechanism of virulence—virulent *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv, but not attenuated H37Ra, causes significant mitochondrial inner membrane disruption in macrophages leading to necrosis[J]. J Immunol, 2006(176): 3707-3716.
- [14] Sangari FJ, Parker A, Bermudez LE. *Mycobacterium avium* interaction with macrophages and intestinal epithelial cells[J]. Front Biosci, 1999(4): 582-588.
- [15] Jha SS, Danelishvili L, Wagner D, et al. Virulence-related *Mycobacterium avium* subsp hominissuis MAV_2928 gene is associated with vacuole remodeling in macrophages[J]. BMC Microbiol, 2010(10): 100.
- [16] Li Y, Miltner E, Wu M, et al. A *Mycobacterium avium* PPE gene is associated with the ability of the bacterium to grow in macrophages and virulence in mice[J]. Cell Microbiol, 2005, 7(4): 539-548.
- [17] Sturgill-koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, et al. Lack of acidification in *Mycobacterium phagosomes* produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase [J]. Science, 1994, 263(5147): 678-681.
- [18] Early J, Fischer K, Bermudez LE. *Mycobacterium avium* uses apoptotic macrophages as tools for spreading[J]. Microb Pathog, 2011, 50(2): 132-139.
- [19] Bermudez LE, Danelishvili L, Babrack L, et al. Evidence for genes associated with the ability of *Mycobacterium avium* subsp. hominissuis to escape apoptotic macrophages[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2015(5): 63.
- [20] Hostetter JM, Steadham EM, Haynes JS, et al. Cytokine effects on maturation of the phagosomes containing *Mycobacteria avium* subspecies paratuberculosis in J774 cells[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2002(34): 127-134.
- [21] Abdallah AM, Gey van Pittius NC, Champion PAD, et al. Type VII secretion—mycobacteria show the way[J]. Nat Rev Microbiol, 2007, 5(11): 883-891.
- [22] Vaziri F, Brosch R. ESX/Type VII secretion systems—An important way out for mycobacterial proteins[J]. Microbiol Spectr, 2019, 7(4): 1-10.
- [23] Lin J, Chang Q, Dai X, et al. Early secreted antigenic target of 6-kDa of *Mycobacterium tuberculosis* promotes caspase-9/caspase-3-mediated apoptosis in macrophages[J]. Mol Cell Biochem, 2019, 457(1-2): 179-189.

【收稿日期】 2021-08-16 【修回日期】 2021-11-06