文章编号:1000-5404(2010)20-2181-04

论著

Toll样受体介导H37Rv诱导的单核细胞趋化蛋白-1表达

李敏超,杜先智,周向东 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院呼吸内科)

【摘要】 **目的** 探讨Toll样受体2(TLR2)、TLR4介导的免疫调节信号通路在结核分枝杆菌感染诱导的单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemo attractant protein-1,MCP-1)产生中所起的作用。**方法** 建立人型结核分枝杆菌H37Rv感染小鼠模型,获取模型组及对照组小鼠支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)及肺泡巨噬细胞(alveolar macrophage, AM),对BALF中AM进行计数,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法测定BALF中MCP-1水平,Western免疫蛋白印迹(Western blot)方法检测肺组织中MCP-1蛋白含量,逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)测定模型组及对照组AM中TLR2、TLR4 mRNA的表达;抗体干预组的AM用TLR2、TLR4抗体预处理并与H37Rv菌株共培养,并设未予以抗体预处理的PBS组及未作任何处理的对照组,分别用ELISA、Western blot法检测AM培养液中及AM中的MCP-1水平,以观察TLR2、TLR4在H37Rv诱导MCP-1生成所起的作用。**结果** 模型组BALF中AM计数及MCP-1蛋白含量显著高于对照组($P<0.05$);模型组小鼠肺组织中MCP-1蛋白含量显著高于对照组($P<0.05$);模型组AM内TLR2、TLR4 mRNA表达显著高于对照组($P<0.05$);模型组BALF中MCP-1水平与AM数目呈正相关($r=0.92$, $P<0.05$),并分别与TLR2、TLR4 mRNA表达呈正相关($r=0.88$, $P<0.05$; $r=0.82$, $P<0.05$)。PBS组AM及其培养上清液中MCP-1蛋白水平显著高于对照组($P<0.05$);TLR2、TLR4抗体干预组AM及其培养上清液中MCP-1蛋白水平均显著低于PBS组($P<0.05$)。**结论** 在结核宿主免疫中,MCP-1参与诱导单核细胞聚集到感染部位这一过程,AM膜上的TLR2、TLR4受体通道介导了人型结核分枝杆菌H37Rv所诱导的MCP-1表达。

【关键词】 结核;肺泡巨噬细胞;Toll样受体;MCP-1
【中图法分类号】 R392.32;R394.2;R520.2 【文献标志码】 A

Toll-like receptor mediates MCP-1 expression induced by mycobacterium tuberculosis H37Rv

Li Minchao, Du Xianzhi, Zhou Xiangdong (Department of Respiratory Medicine, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

【**Abstract**】 **Objective** To explore the role of Toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated immune regulating signal pathway on the production of monocyte chemo attractant protein-1 (MCP-1) induced by infection of mycobacterium tuberculosis. **Methods** Mouse model of H37Rv infection was made by injecting H37Rv through tail vein. Alveolar macrophage (AMs) and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were obtained from H37Rv group and control group. The numbers of AM in BALF were counted. MCP-1 protein levels in BALF and lung tissue were determined by sandwich ELISA and Western blotting respectively. The expression of TLR2 and TLR4 mRNA in AMs were examined by RT-PCR. To investigate the role of TLR2 and TLR4 on the expression of MCP-1 induced by H37Rv, the AMs of antibody intervention group were pretreated with TLR2-antibody/TLR4-antibody and then co-incubated with H37Rv. AMs were pretreated with PBS instead of TLR2-antibody/TLR4-antibody and untreated AMs were regarded as PBS group and control group. MCP-1 protein levels in AM culture supernatants and AM were determined by sandwich ELISA and Western blotting respectively. **Results** Compared with those of control group, MCP-1 level and AM count in BALF of H37Rv group were increased significantly ($P<0.05$), and MCP-1 protein level in lung tissue of H37Rv group was increased significantly ($P<0.05$). Expression of TLR2 and TLR4 mRNA in AMs of H37Rv group were higher than those of control group ($P<0.05$). Positive correlation was observed between MCP-1 level and AM count in BALF ($r=0.92$, $P<0.05$). Same correlation was found between MCP-1 level in BALF and expressions of TLR2 and TLR4 mRNA

【基金项目】 国家自然科学基金(30872261);重庆市卫生局资助项目(2007)
【通信作者】 周向东,电话:(023)63693093,E-mail:zxd999@263.net

in AMs of H37Rv group ($r=0.88$, $P<0.05$; $r=0.82$, $P<0.05$). MCP-1 protein level in AM and AM culture supernatants of PBS group was higher than that of control group and TLR2/ TLR4-antibody intervened group ($P<0.05$). **Conclusion** MCP-1 is involved in the process of monocytes gathering together to the infection site during host immune to tuberculosis. TLR2/TLR4 receptor channel on AM membrane mediates the expression of MCP-1 induced by H37Rv.

[Key words] tuberculosis; alveolar macrophage; Toll like receptors; monocyte chemo attractant protein-1

Supported by the National Science Foundation of China (30872261) and the Foundation of Chongqing Municipal Health Bureau (2007). Corresponding author: Zhou Xiangdong, Tel: 86-23-63693093, E-mail: zxd999@263.net

耐多药结核病流行、人类免疫缺陷病毒感染、免疫抑制剂的使用以及高龄人口机体免疫力低下等,使结核分枝杆菌感染发展成为难治性倾向。因此针对提高机体的免疫力,人们一直在探索使用生物免疫制剂来辅助治疗结核。肺是最易被结核分枝杆菌侵犯的器官,肺泡巨噬细胞(alveolar macrophage, AM)作为非特异性防御的第一道防线,起着重要的作用。近来,随着TLRs的发现及深入研究,其在结核先天性免疫反应中的作用备受关注[1]。本实验通过建立结核分枝杆菌强毒力株H37Rv感染小鼠模型来检测H37Rv结核分枝杆菌对小鼠肺组织内表达MCP-1蛋白以及AM合成、分泌MCP-1蛋白的影响,同时进一步明确TLR2、TLR4免疫调节信号通路在介导MCP-1产生中所起的作用。本实验旨在深入剖析结核病的天然免疫机制,为结核病的免疫治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

8周龄SPF级(无特定病原体动物)昆明小鼠,雌雄各半,体质量18~20 g,购于重庆医科大学实验动物中心。实验动物分为H37Rv菌株感染模型组10只、对照组10只(仅注入灭菌生理盐水),另20只小鼠不作任何处理,获取其BALF中的AM后用作抗体干预研究(其中TLR2、TLR4抗体干预组各5只,PBS组5只,对照组5只)。

1.2 主要试剂及材料

结核分枝杆菌H37Rv(中国药品生物制品检定所),RPMI-1640(Gibco公司),山羊抗小鼠TLR2、TLR4、MCP-1多克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology公司),辣根过氧化酶标记兔抗山羊IgG抗体(Pierce Biotechnology公司),RNA抽提试剂盒(FASTAGEN-RNAFAST200,上海飞捷生物技术有限公司),逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒[TaKaRaRNA PCR Kit (AVM) Ver. 3.0,大连宝生物工程有限公司],TLR2、TLR4、GAPDH引物由大连宝生物工程有限公司合成,ELISA试剂盒(深圳晶美生物工程有限公司)。其余试剂均为国产分析纯。

1.3 结核分枝杆菌培养[2]及结核病小鼠模型的建立

将人型结核分枝杆菌H37Rv菌株接种于7H9液体培养基,取培养2~3周的结核分枝杆菌,置含0.05% Tween 80的灭菌生理盐水溶液,用生物梅里埃细菌浓度比浊仪测定其浊度,配制成含活菌量为3×10^6 CFU/ml的菌悬液,于每只小鼠尾静脉内注射0.3 ml(相当于湿菌0.3 mg/只)。对照组仅注射灭菌生理盐水溶液。

1.4 AM的分离、培养

模型组及生理盐水对照组小鼠(模型组小鼠于感染后第15天)经眼球放血,脱颈处死。小鼠经毛细玻璃管插管用预热至37 ℃的PBS液行支气管肺泡灌洗,0.8 ml×10次,收集BALF,取1 ml BALF于4 ℃离心,沉淀涂片,Wright-Giemsa染色后计算AM的绝对数量。将剩余BALF过滤,离心,上清液置-20 ℃冰箱待测。D-Hanks液漂洗离心沉淀的细胞成分3次。用含20% BS的RPMI1640培养液悬浮细胞,放入37 ℃、5% CO_2及饱和湿度的培养箱中,孵化2 h。用RPMI1640培养液洗涤细胞,去除未贴壁细胞后用作Western blot及RT-PCR检测。将20只用作抗体干预研究的小鼠按上述方法获取AM,加入胰酶使其脱落,离心、漂洗3次,用RPMI1640培养液悬浮细胞,调整细胞浓度至1×10^5/ml,置培养皿中分组培养:抗体干预组分别加入TLR2、TLR4抗体(终浓度为10 μg/ml)(PBS组即加入等量的0.01 mol/L PBS)预处理细胞1 h,将AM与H37Rv菌株按1∶1比例共同培养,对照组则不予任何处理。24 h后将培养上清液置-20 ℃冰箱待测,同时收集培养24 h后的AM用作Western blot检测。

1.5 Western blot检测肺组织及AM中MCP-1蛋白表达

将模型组及生理盐水对照组小鼠右肺叶切除行组织匀浆。肺组织及AM用RIPA裂解液(加入终浓度为1 mmol/L的PMSF)提取蛋白后,用Bradford法测定蛋白浓度。使用SDS蛋白上样缓冲液稀释成相同浓度后煮沸变性。取蛋白提取物20 μg上样,15%十二烷基硫酸钠-聚丙稀酰胺凝胶电泳后转移至硝酸纤维素膜上4 ℃,200 mA转膜2 h,脱脂奶粉封闭后加入山羊MCP-1多克隆抗体(1∶800),4 ℃杂交过夜,洗膜后加辣根过氧化酶标记的兔抗山羊IgG(1∶2 000)孵育,充分洗涤后以ECL化学发光底物系统放射自显影。以相同方法测定内参照β-actin的表达。MCP-1相对分子质量13×10^3,β-actin相对分子质量42×10^3。MCP-1蛋白的表达水平以MCP-1灰度值与β-actin灰度值的相对值表示。

1.6 RT-PCR检测TLR2、TLR4 mRNA的表达

分别提取H37Rv模型组、对照组AM内的总RNA,经1%琼脂糖凝胶电泳鉴定,并测定样品$D(260)/D(280)$比值和浓度,确保比值介于1.8~2.0。以两步法行RT-PCR,逆转录反应条件30 ℃→10 min→47 ℃→30 min→94 ℃→2 min→5 ℃→5 min,-20 ℃保存。引物由上海生工合成,TLR2上游5′-GC-

CAAAGTCTTGATTGATTGG-3′，下游：5′-TTGAAGTTCTCCAGC-TCCTG-3′，扩增产物大小318 bp；TLR4上游：5′-TGGATACGT-TTCCTTATAAG-3′，下游：5′-GAAATGGAGGCACCCCTTC-3′，扩增产物大小469 bp；内参照GAPDH：上游：5′-GCCAAAAGGGT-CATCATCTC-3′，下游：5′-GTAGAGGCAGGGATGATGTT-3′，扩增产物大小287 bp。TLR2、TLR4扩增条件：预变性94 ℃ 2 min后，变性94 ℃ 20 s，退火54 ℃ 45 s，延伸72 ℃ 1 min，30个循环；GAPDH扩增条件：预变性94 ℃ 2 min，变性94 ℃ 30 s，退火60 ℃ 30 s，延伸72 ℃ 45 s，17个循环。PCR产物经2%琼脂糖电泳鉴定，图像采集。用Bandleader软件进行图像分析，结果以目的基因与管家基因光密度面积积分比值表示。每组实验重复3次。

1.7 ELISA测定BALF上清液及培养上清液中MCP-1蛋白含量

按试剂盒说明书操作：分别将标本或不同浓度标准品(100 μl/孔)加入相应孔中，37 ℃孵箱孵育90 min。洗板4次后加入生物素化抗体工作液(100 μl/孔)，37 ℃孵箱孵育60 min。洗板4次，加入酶结合物工作液(100 μl/孔)，37 ℃孵箱孵育30 min。洗板4次，加入显色剂100 μl/孔，避光37 ℃孵箱孵育15～20 min。加入终止液100 μl/孔，混匀后即刻测量D(450)值，参照标准曲线获得浓度值。

1.8 统计学处理

数据以$\bar{x} \pm s$表示，应用SPSS 12.0统计软件进行统计分析。若组间方差不齐，两两比较采用Wilcoxon秩和检验并校正检验水准；若组间方差齐，两样本均数间比较采用t检验。不同指标的相互关系采用直线相关分析。

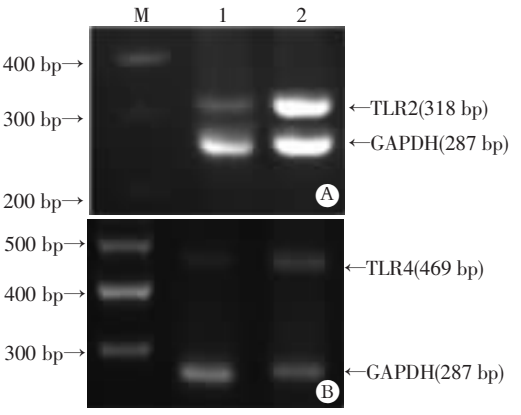
2 结果

2.1 各组BALF中AM计数及MCP-1蛋白含量、AM内TLR2、TLR4 mRNA表达

收集H37Rv菌株感染模型组及生理盐水对照组BALF，对BALF中AM进行计数，用ELISA法检测BALF中MCP-1蛋白含量。获取BALF中的AM，用RT-PCR检测AM中TLR2、TLR4 mRNA水平。模型组AM计数及MCP-1蛋白含量均显著高于对照组[$(4.34 \pm 0.60) \times 10^8$/L vs $(1.35 \pm 0.39) \times 10^8$/L，$P<0.05$；(99.78 ± 9.99) vs (26.55 ± 4.61) pg/ml，$P<0.05$)]。各组TLR2、TLR4 mRNA表达电泳条带分析结果显示，模型组AM内TLR2、TLR4 mRNA表达显著高于对照组[$(0.86 \pm 0.11) \times 10^8$/L vs $(0.47 \pm 0.08) \times 10^8$/L，$P<0.05$；(0.73 ± 0.09) vs (0.32 ± 0.04) pg/ml，$P<0.05$)]。见图1。

2.2 对照组、PBS组及抗体干预组AM培养上清液中MCP-1水平

收集AM培养24 h的培养上清液，用ELISA方法检测MCP-1蛋白水平。与H37Rv菌株共培养24 h但未予抗体干预的PBS组AM培养上清液中MCP-1水平显著高于未作任何处理的对照组[(59.24 ± 10.92) vs (10.42 ± 1.49) pg/ml，$P<0.05$]，经抗TLR2抗体及抗TLR4抗体预处理后再与H37Rv菌株共培养的干预组其AM培养上清液中MCP-1水平分别为(29.71 ± 5.57)、(18.35 ± 5.65) pg/ml，均显著低于PBS组($P<0.05$)。

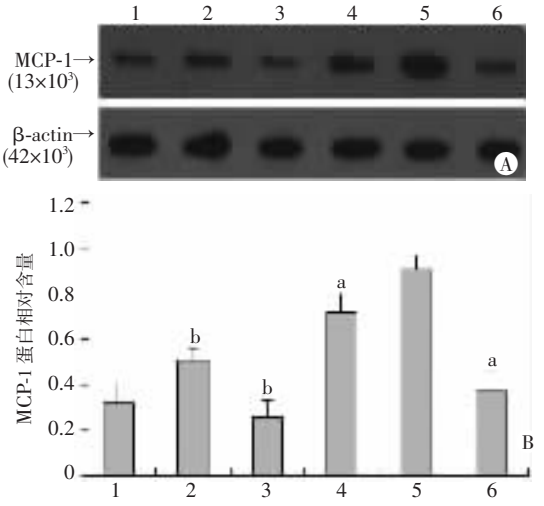


M：DNA标准；1：对照组；2：模型组
A：TLR2；B：TLR4

图1 RT-PCR检测对照组及模型组TLR2、TLR4 mRNA水平

2.3 H37Rv菌株感染对肺组织、AM中MCP-1蛋白的表达影响及TLR2、TLR4抗体的干预作用

获取H37Rv菌株感染模型组、生理盐水对照组小鼠右肺叶，收集抗体干预组、PBS组及对照组BALF中的AM。分别提取肺组织及AM中的总蛋白，用Western blot法检测肺组织及AM中MCP-1蛋白水平。H37Rv菌株感染可显著升高模型组小鼠肺组织中MCP-1蛋白水平($P<0.05$)，与H37Rv菌株共培养后的PBS组AM表达MCP-1蛋白水平较对照组显著升高($P<0.05$)，而经TLR2、TLR4抗体预处理的AM表达MCP-1蛋白水平较PBS组显著下降($P<0.05$)。见图2。



1：对照组AM；2：TLR2干预组AM；3：TLR4干预组AM；4：PBS组AM；5：对照组肺组织；6：模型组肺组织
A：Western blot检测结果；B：半定量分析结果结果　a：$P<0.05$，与对应对照组比较；b：$P<0.05$，与PBS组比较

图2 各实验组AM及肺组织中MCP-1蛋白的表达

2.4 MCP-1水平与AM计数、TLR2、TLR4 mRNA表达水平的相关性

模型组BALF中MCP-1水平与AM数目呈正相关($r=0.92$，$P<0.05$)，并分别与AM内LR2、TLR4 mRNA表达呈正相关($r=0.88$，$P<0.05$；$r=0.82$，$P<0.05$)。

3 讨论

机体受结核分枝杆菌感染后,巨噬细胞首先作出反应并分泌多种细胞因子使淋巴细胞及单核细胞聚集到结核分枝杆菌入侵部位,逐渐形成肉芽肿,限制结核分枝杆菌扩散并杀灭结核分枝杆菌。MCP-1 是趋化因子 CC 亚家族的典型代表,MCP-1 可直接或间接的向感染部位募集单核细胞和淋巴细胞,因此,MCP-1 可能在结核的发病机制中起重要作用。本研究在体实验发现:H37Rv 菌株感染小鼠 BALF 及肺组织中 MCP-1 水平均呈高水平表达。离体实验亦显示:与 H37Rv 菌株共培养后的 AM 培养上清液中 MCP-1 蛋白水平同样呈高水平表达。以上结果说明 H37Rv 菌株感染对于体内及体外的 AM 均有相同的诱导 MCP-1 蛋白升高的作用,这可能与 H37Rv 菌株增强 AM 合成及分泌 MCP-1 的能力有关。所以,H37Rv 菌株感染可致使整个肺组织及气道内均处于 MCP-1 高水平的环境中。国外亦报道 H37Rv 感染 guinea 猪肺泡巨噬细胞MCP-1 mRNA 的表达显著升高[3]。本研究发现:模型组 BALF 中 MCP-1 水平与 AM 数量呈显著正相关,说明在结核宿主免疫中,MCP-1 参与诱导单核细胞聚集到感染部位形成结核结节这一过程。除此趋化作用外,MCP-1 还具有促进单核/巨噬细胞合成和分泌 TNF-α 的特性,同时 TNF-α 可反过来刺激 MCP-1 在肺内的表达[4-6]。提示 MCP-1 与 TNF-α 不仅本身直接参与结核结节的形成,而且两者在细胞因子网络中相互促进,这可能是结核结节持续并最终形成的机制之一。

TLRs 识别仅表达在病原微生物上的高度保守的结构基序-病原相关的分子位点。结核分枝杆菌相关的分子位点包括海藻糖霉菌酸酯、脂质肽、阿拉伯甘露聚糖脂等,它们可被 Toll 样受体识别[7],并激活 TLR2 信号通路[8]。Sweet 等[9]研究发现鸟型分枝杆菌表面高表达的糖肽脂可以作为 TLR2 的激活剂,经 TLR2-MyD88 途径活化巨噬细胞。但至今 TLR4 在结核方面的免疫作用尚无定论。有学者用结核分枝杆菌感染 TLR4 突变小鼠(C3H/HeJ)及野生型小鼠(C3H/HeJ),发现 TLR4 突变的小鼠对肺结核更易感,其肺浸润更显著[10]。有实验证实 TLR4 受体在 γ-干扰素诱导巨噬细胞活化过程中并未起抑制作用[11]。本实验结果显示:H37Rv 菌株感染小鼠的 AM 中 TLR2、TLR4 mRNA 表达均明显升高,所以我们推测 TLR4 在结核分枝杆菌诱导的 AM 激活中起同等重要的作用。近期国外研究表明脂多糖可诱导雪旺氏细胞生成 MCP-1 显著增加,TLR4 作为脂多糖发挥作用必不可少的受体介导了神经损伤过程中 MCP-1 的产生[12]。在结核先天性免疫中,MCP-1 的产生是否与 TLRs 介导的免疫调节信号通路有关?本研究利用 TLR2、TLR4 抗体封闭巨噬细胞表面相应的受体后,发现 MCP-1 的表达均被部分阻断,同时模型组 BALF 中的 MCP-1 蛋白水平与 AM 中 TLR2、TLR4mRNA 表达呈显著正相关,说明被激活的 AM 合成并分泌 MCP-1 可能与 AM 膜上的 TLR2、TLR4 受体通道活性有关。

上述结果表明,结核分枝杆菌相关的分子位点与宿主细胞(尤其是免疫细胞)位点识别受体相结合,激活 TLR 信号系统,刺激天然免疫反应,促进巨噬细胞的聚集及细胞因子的分泌,建立获得性免疫反应。TLR 信号系统的研究将有助于进一步明确机体对结核分枝杆菌免疫反应的具体调节机制,也将为结核病的免疫预防和治疗提供新的理论依据。

参考文献:

[1] Tsolaki A G. Innate immune recognition in tuberculosis infection [J]. Adv Exp Med Biol, 2009, 653:185-197.

[2] 刘平,郭述良,罗永艾. IL-4 调控 DC-SIGN 表达对树突状细胞免疫学功能的影响及与结核病发生的关系[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(13):1295-1298.

[3] Lyons M J, Yoshimura T, McMurray D N. Mycobacterium bovis BCG vaccination augments interleukin-8 mRNA expression and protein production in guinea pig alveolar macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis[J]. Infect Immun, 2002, 70(10):5471-5478.

[4] Robinson S C, Scott K A, Balkwill F R. Chemokine stimulation of monocyte matrix metalloproteinase-9 requires endogenous TNF-alpha [J]. Eur J Immunol, 2002, 32(2):404-412.

[5] Hasan Z, Zaidi I, Jamil B, *et al*. Elevated *ex vivo* monocyte chemotactic protein-1 (CCL2) in pulmonary as compared with extra-pulmonary tuberculosis[J]. BMC Immunol, 2005, 6:14.

[6] Hu C J, Lee Y L, Shih N Y, *et al*. Reduction of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 levels by ticlopidine in TNF-alpha stimulated human umbilical vein endothelial cells[J]. J Biomed Biotechnol, 2009, 2009:917837.

[7] Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors as adjuvant receptors[J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1589(1):1-13.

[8] Bowdish D M, Sakamoto K, Kim M J, *et al*. MARCO, TLR2, and CD14 are required for macrophage cytokine responses to mycobacterial trehalose dimycolate and Mycobacterium tuberculosis [J]. PLoS Pathog, 2009, 5(6):e1000474.

[9] Sweet L, Schorey J S. Glycopeptidolipids from Mycobacterium avium promote macrophage activation in a TLR2- and MyD88-dependent manner [J]. J Leukoc Biol, 2006, 80(2):415-423.

[10] Branger J, Leemans J C, Florquin S, *et al*. Toll-like receptor 4 plays a protective role in pulmonary tuberculosis in mice[J]. Int Immunol, 2004, 16(3):509-516.

[11] Arko-Mensah J, Julian E, Singh M, *et al*. TLR2 but not TLR4 signalling is critically involved in the inhibition of IFN-gamma-induced killing of mycobacteria by murine macrophages[J]. Scand J Immunol, 2007, 65(2):148-157.

[12] Karanth S, Yang G, Yeh J, *et al*. Nature of signals that initiate the immune response during Wallerian degeneration of peripheral nerves [J]. Exp Neurol, 2006, 202(1):161-166.

(收稿:2010-04-23 修回:2010-07-30)

(编辑 汪勤俭)