

牛结核分枝杆菌 Mce4E 蛋白对牛肺泡巨噬细胞 iNOs、TNF- α 、IL-6 和 IL-12 表达的影响

徐广贤 赵德明 周向梅 尹晓敏 杨建民

(中国农业大学 动物医学院/国家动物海绵状脑病实验室,北京 100094)

摘要 探讨 Mce4E 蛋白在牛结核分枝杆菌致病机理中的作用。以 Mce4E 蛋白刺激肺泡巨噬细胞 24 和 48 h 后, MTT 检测分析表明, Mce4E 蛋白对巨噬细胞的活性有显著的抑制作用 ($P < 0.05$); 用重组表达的 Mce4E 蛋白、人分枝杆菌纯化蛋白衍生物 (Purified Protein Derivative of *M. tuberculosis*, MtbPPD)、牛结核分枝杆菌纯化蛋白衍生物 (Purified Protein Derivative of *M. bovis*, MbPPD)、卡介苗 (Bacille Calmette Guerin, BCG) 和刀豆蛋白 A (concanavalin A, ConA) 分别刺激肺泡巨噬细胞 48 h 后, real-time PCR 方法检测显示, Mce4E 蛋白能够促使牛肺泡巨噬细胞 TNF- α 和 IL-6 mRNA 的表达上调 ($P < 0.05$)、抑制肺泡巨噬细胞 iNO 的 mRNA 表达 ($P < 0.05$) 而对 IL-12 表达没有影响 ($P > 0.05$)。Mce4 蛋白能够促使肺泡巨噬细胞分泌炎症细胞因子, 并对肺泡巨噬细胞有抑制作用, 证实 Mce4 蛋白在分枝杆菌中具有重要的作用。

关键词 牛结核分枝杆菌; Mce4E 蛋白; 牛肺泡巨噬细胞; real-time PCR

中图分类号 Q 2-33; S 851.618

文章编号 1007-4333(2007)01-0001-06

文献标识码 A

Expression of TNF- α , iNO, IL-6, and IL-12 in alveolar macrophage contribution by Mce4E protein of *Mycobacterium bovis*

Xu Guangxian, Zhao Deming, Zhou Xiangmei, Yin Xiaomin, Yang Jianmin

(College of Veterinary Medicine/National Animal TSE Laboratory, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract A large body of research has confirmed that mammalian cell entry proteins (Mce) are related to the virulent *Mycobacterium bovis*. MTT (3, (4, 5 dimethylthiazol-2yl)-2, 5 diphenyl-tetrazolium bromide) analysis showed that Mce4E protein could inhibit macrophage activity. In real-time RT-PCR assay, Mce4E protein stimulated alveolar macrophage for 48 hours, which significantly ($P < 0.05$) induced the expression of TNF- α and enhanced IL-6 mRNA but the expression of iNO was reduced ($P < 0.05$). There was no effect on the IL-12 expression in the macrophage. We conclude that Mce4E proteins can induce an inflammatory response on exposure to *M. bovis* and therefore play an important role in the immune response.

Key words *Mycobacterium bovis*; Mce4E protein; bovine alveolar macrophage; real-time RT-PCR

牛结核病 (bovine tuberculosis) 是由牛结核分枝杆菌 (*Mycobacterium bovis*) 引起的一种慢性、消耗性人兽共患传染病。牛结核分枝杆菌是典型的胞内致病菌, 它在体内的主要宿主细胞是巨噬细胞^[1], 能够在巨噬细胞内存活并繁殖, 并以这种方式逃避宿主防御机制^[1-2]。此外, 牛结核分枝杆菌与宿主细胞的免疫应答反应是典型的细胞免疫, 细

胞因子在分枝杆菌的免疫应答中具有很重要的作用, 如 肿瘤坏死因子 (TNF- α), 主要由激活的巨噬细胞和 T 细胞产生, 它能引起机体产生有效的肉芽肿应答, 与结核的肉芽肿和结节形成有关^[3-5], 一氧化氮合酶 (iNOs) 能够促使巨噬细胞分泌活性 NO, 从而促使巨噬细胞杀灭细菌^[6-8]。白细胞介素 6 (IL-6) 是一种炎症细胞因子, 主要与机体的炎症反

收稿日期: 2006-06-22

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目 (2005CB523000)

作者简介: 徐广贤, 兽医师, 博士研究生, E-mail: guangxianxu2004@yahoo.com.cn; 赵德明, 教授, 博士生导师, 通讯作者, 主要从事动物传染性海绵状脑病研究, E-mail: zhaodm@cau.edu.cn.

应有关^[9-11]。白细胞介素 12 (IL-12) 能够促使宿主细胞抵抗人分枝杆菌等^[12-14]。

越来越多的研究表明哺乳动物细胞侵袭蛋白 (mammalian cell-entry proteins, Mce) 家族与分枝杆菌毒力有关^[15-17], Mce 蛋白主要与分枝杆菌侵入宿主细胞和在宿主细胞中的存活有关^[18], 分枝杆菌有 4 个 Mce 操纵子 (Mce1、Mce2、Mce3 和 Mce4), 每个操纵子编码 6 个蛋白, 在牛结核分枝杆菌中没有 Mce3 操纵子^[19]。Andrea 等用缺失 Mce1、Mce2 和 Mce3 人分枝杆菌突变株感染 Balb/c 小鼠发现, 突变株的毒力明显降低^[16], 并且用 Mce2、Mce3 突变株和 BCG 免疫 Balb/c 小鼠, 结果表明, Mce2、Mce3 的保护率比 BCG 组小鼠要高^[17]。Mce4E 蛋白是一个假定的脂蛋白, 有关 Mce4E 蛋白的研究国内外尚未见报道, 本研究旨在探讨 Mce4E 蛋白在牛结核分枝杆菌侵入肺泡巨噬细胞和在其内部存活的作用, 用重组表达的 Mce4E 蛋白、MtbPPD、MbPPD、BCG 和 ConA 刺激肺泡巨噬细胞, 检测牛肺泡巨噬细胞 TNF- α 、iNOS、IL-6、IL-12 细胞因子 mRNA 的表达量的变化和 Mce4E 蛋白对肺泡巨噬细胞的活性的影响, 以期从细胞水平上阐释 Mce4E 蛋白的具体功能。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

EcoR I 酶、T₄DNA 连接酶 (大连 TAKARA 生物公司), DNA 凝胶回收试剂盒 (Omega Bio-tek, Doraville, GA, USA) 质粒快速提取试剂盒 (博大泰克, 北京), Ni-NTA 琼脂糖纯化柱 Ni-NTA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)。低分子质量蛋白质标准 Mark (上海生物化学研究所), PVDF 转印膜 (Gelman), 5 ku 超滤浓缩管 (MILLIPORE 公司), Quant SYBRGreen PCR 试剂盒 (TIANGEN BIOTECH(BEIJING) CO., LTD)。

1.2 菌株

牛结核分枝杆菌菌株 (C68-2) 和 BCG (北京株) 由中国兽医药品监察所提供。

1.3 重组蛋白的纯化与复性

将本实验构建并鉴定的含有表达质粒 pET30 (a)-Mce4E 的宿主菌接种到 LB 液体培养基, 待菌生长到 A_{600} 约 0.8 时, 加终浓度为 0.2 mmol/L IPTG, 26 $^{\circ}$ C 诱导 6 h 后, 取出菌液离心, 菌体用裂解缓冲液 (50 mmol/L Tris HCl, 0.5 mmol/L EDTA,

50 mmol/L NaCl, 5% (体积分数) 甘油, pH8.0) 重悬, 在冰浴条件下超声破碎, 离心, 上清和沉淀用 SDS-PAGE 电泳检测。将获得的包涵体蛋白依次用洗涤液 (含 10 mmol/L Tris HCl, 0.2 mol/L 尿素, 0.5% (体积分数, 下同) Triton X-100, 10 mmol/L EDTA, pH = 8.0) 和洗涤液 (10 mmol/L Tris HCl, 0.5% Triton X-100, 10 mmol/L EDTA, pH8.0) 洗涤。然后用变性缓冲液 (8 mol/L 尿素, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris HCl, pH7.8) 溶解, 离心, 取上清, 将上清加入经 pH7.8 的 8 mol/L 变性缓冲液平衡的 Ni-NTA 琼脂糖柱, 4 $^{\circ}$ C 条件下, 结合 30 min, 然后依次用 10~20 倍柱床体积的 pH7.8、6.0 和 5.3 缓冲液洗涤 Ni-NTA 柱, 洗去杂蛋白, 最后用 pH4.0 洗脱缓冲液洗脱含有 His 标签的重组蛋白, 分管收集, 洗脱流速控制在 5~7 mL/h。将洗脱的蛋白放入透析带依次在加有 8、6、4、2 和 0 mol/L 尿素的基础缓冲液 (50 mmol/L Tris HCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L GSSG, 5 mmol/L GSH, 10% (体积分数) 甘油, 10 mmol/L PMSF) 中进行透析复性, 每个浓度在 4 $^{\circ}$ C 透析 4~8 h, 最后在 pH7.4 的 PBS 缓冲液中透析过夜。蛋白质质量浓度 = $1.45 \times A_{280} - 0.74 \times A_{260}$, A_{260} 和 A_{280} 采用分光光度计测定。

1.4 牛肺泡巨噬细胞的分离与纯化培养

取健康新鲜宰杀的西门塔尔牛肺脏, 表面用生理盐水冲洗干净, 将 2 000~4 000 mL DMEM 培养液经气管灌入, 轻轻按摩肺脏 5~10 min, 再经气管倒出, 用灭菌的纱布将洗液过滤, 除去胶原纤维和黏液。2 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清, 将细胞再用 DMEM 培养液轻轻悬浮, 离心, 洗涤 3 次, 最后用含有 10% (体积分数, 下同) 牛血清 DMEM 培养液悬浮沉淀。将细胞调整到 2×10^5 个/mL, 然后加入 6 孔培养板, 每孔加 3 mL, 置 37 $^{\circ}$ C、5% (体积分数, 下同) CO₂ 培养 2~3 h 后, 弃去上清, 用 DMEM 培养液洗去悬浮没有贴壁的细胞, 再换入含有 10% 牛血清 DMEM 培养液, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 继续培养。

1.5 Mce4E 蛋白对肺泡巨噬细胞活性的影响

将巨噬细胞调整到 10^5 个/mL, 96 孔培养板每孔加入 100 μ L 细胞悬液含 10 000 个巨噬细胞, 将 Mce4E 蛋白、MbPPD 分别按照 50、100、200 和 400 μ g/mL 加入培养孔, 各质量浓度设 6 个孔, 分别刺激 24 和 48 h 后, 每孔加入 20 μ L MTT 溶液, 继续在细胞培养箱内孵育 4 h, 每孔加入 200 μ L 二甲基亚砜 (DMSO) 溶解液, 在 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱内再继续孵

育 10 min,直至普通光学显微镜下观察,formazan 全部溶解,在 490 nm 测定 OD 值。细胞的活性 = (样品 OD 值/空白对照组 OD 值) × 100 %。

1.6 Mce4E 蛋白、MtbPPD、MbPPD、ConA 和 BCG 对巨噬细胞的刺激

将分离与纯化好的巨噬细胞调整到 2×10^5 个/mL,然后加入 6 孔培养板,每孔加 3 mL,置 37 ℃、5 %CO₂ 培养 2 ~ 3 h 后,弃去上清,用 DMEM 培养液洗去悬浮没有贴壁的细胞,再换入含有 10 %牛血清 DMEM 培养液,置 37 ℃、5 %CO₂ 继续培养 24 h 后,换入新鲜的培养液后将 Mce4E 蛋白、MtbPPD、MbPPD、ConA 蛋白分别按照 400 pg/mL 加入培养孔;BCG 按照 1×10^6 cfu/mL 加入,每个蛋白设 3 个重复,继续在 37 ℃、5 %CO₂ 条件下培养 48 h。

1.7 巨噬细胞总 RNA 的提取与 cDNA 的合成

将经过各个蛋白刺激的巨噬细胞培养上清弃去,直接加入 RNA-Solv 试剂(Omega Bio-Tek, Lilburn, GA),按照试剂盒的操作说明,提取巨噬细胞

的总 RNA,进行 cDNA 合成,合成的总体积为 20 μL,模板总 RNA 添加量为 2 μL (2.5 μg/μL),加入 10 mmol/L dNTP 2 μL,100 pmol/L Oligo T18 1 μL,5 ×buffer 4 μL,AMV 反转录酶 1 μL (50 U/μL),RNA 酶抑制剂 1 μL (40 U/μL),DEPC 处理水 9 μL,反转录条件是 42 ℃、1 h,72 ℃、5 min。

1.8 TNF⁻、iNOS、-actin、IL-6 和 IL-12 质粒与标准曲线的构建

1) 引物设计。TNF⁻、-actin、iNOS、IL-6 和 IL-12 的引物设计参照 GeneBank 上已公开发表的 mRNA 序列进行,引物序列、各基因登录号、扩增片段的长度及其 PCR 条件见表 1。

2) 目的基因的克隆与质粒的构建。参照 TaKaRa Ex Taq PCR 试剂盒对各细胞因子的基因进行 PCR 扩增。PCR 反应总体积为 50 μL,模板 cDNA 添加量为 0.5 μL,上、下游引物各 1 μL,10 × PCR buffer 5 μL,dNTP 4 μL Ex. Taq 酶 0.5 μL,H₂O 38 μL,PCR 反应条件参照表 1 进行,PCR 产物

表 1 引物序列

Table 1 Sequence of primers

引物名称	引物序列(5'-3')	PCR 条件	扩增长度/bp	基因登录号
-actin	上游引物: catcggcaatgagcgggtcc 下游引物: ccgtggtgagcgtagaggtcc	94 30 s	145	NM. 173979
		61 20 s		
		72 20 s		
IL-6	上游引物: gagggaaatcaggaaaatgt 下游引物: ttctccagcaggtcagtggt	94 30 s	121	NM. 173923
		55 20 s		
		72 20 s		
IL-12 p40	上游引物: catcaggacatcatcaaac 下游引物: aacgtcaggagaagtagga	94 30 s	135	BTU11815
		56 20 s		
		72 20 s		
iNOs	上游引物: cagcccccgtccagtcagtgga 下游引物: gactcattcccgtgcttgcccg	94 30 s	71	AJ699400
		62 20 s		
		72 20 s		
TNF	上游引物: cctgctgacgggtttacct 下游引物: atggcagacaggatggtgacc	94 30 s	142	AF348421
		58 20 s		
		72 20 s		

经 1.5 % (体积分数) 琼脂糖电泳,用 EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction 试剂盒回收目的 DNA 片段后,与 PGEM-T easy 载体连接,转化到 DH5 感受态细胞,再经兰白斑筛选,挑取阳性克隆;再用 Plasmid Rapid Isolation 试剂盒纯化重组质粒,用 EcoR I 酶切鉴定和测序。

3) TNF⁻、iNOS、-actin、IL-6 和 IL-12 标准曲线的构建及其在不同处理巨噬细胞中表达水平的检

测。用将经过酶切和测序鉴定的 TNF⁻、iNOs、-actin、IL-6 和 IL-12 阳性质粒分别按照 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} (体积分数) 稀释作为模板,参照 Quant SYBR Green PCR 试剂盒进行 real-time PCR,real-time PCR 反应总体积为 20 μL,加入 2 ×Quant SYBR Green PCR Master mix 10 μL,1 μL 的模板,上下游引物各 0.5 μL (20 pmol/μL),ddH₂O 8 μL,PCR 反应条件见表 1 进行,互应 PCR

结束后, DNA Engine OpticonTM 2 荧光连续检测系统进行荧光检测, 反应结束后, 计算机自动测得标准曲线; 同时, 以不同处理巨噬细胞 cDNA 作模板, 用荧光定量 PCR 对各细胞因子表达进行检测, 通过标准曲线计算得到各细胞因子的表达水平。细胞因子的表达量按以下公式计算: 细胞因子相对表达量 = 同模板细胞因子拷贝数 / 同模板 β -actin 的拷贝数。

1.9 统计分析

每个样品重复 3 次, 由 Opticon analysis software (version 2.01) 荧光分析软件自动进行定量。不同处理巨噬细胞的细胞因子表达水平, 用 SPSS13.0 医学分析软件进行 t 值检验, $P < 0.05$, 为差异显著。

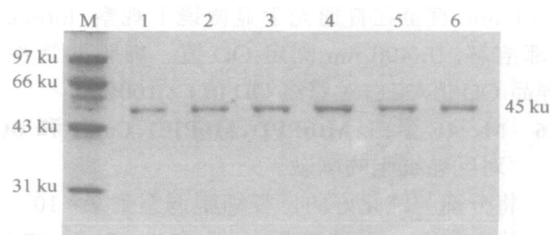
2 结果

2.1 重组蛋白的纯化与复性

含有表达质粒 pET30(a)-Mce4E 的宿主菌, 经过 0.2 mmol/L IPTG 诱导表达 6 h, 再经 Ni-NTA 柱纯化, 纯化的蛋白在 45 ku 处出现单一条带, 用 AlphaImager 2200 软件进行薄层扫描分析, 蛋白质纯化率在 95% 左右 (图 1)。

2.1 Mce4E 蛋白对肺泡巨噬细胞活性的影响

以 50、100、200 和 400 pg/mL 剂量的 Mce4E 蛋白刺激牛肺泡巨噬细胞后, 用 MTT 法检测肺泡巨噬细胞的存活率, 结果表明, Mce4E 蛋白刺激巨噬



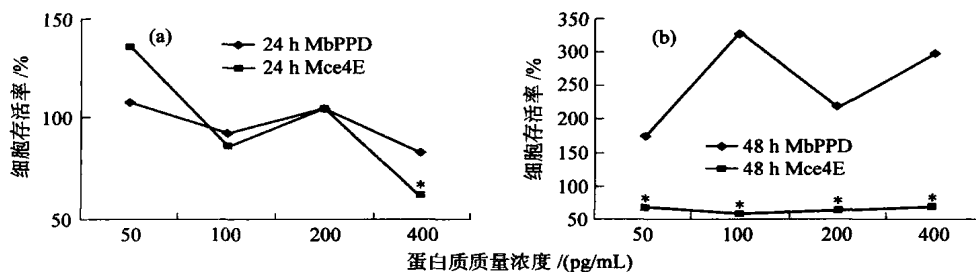
M 为低分子质量蛋白 marker;

1~6 为 pH4.0 洗脱缓冲液洗涤的蛋白

图 1 纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of purified protein

细胞 24 h 后, 细胞的存活率分别为 136.7%、85.2%、106.8% 和 60%, 与空白组比较, 400 pg/mL 的 Mce4E 蛋白对巨噬细胞的活性有显著的抑制作用 ($P < 0.05$) (图 2(a)), 不同剂量的 Mce4E 蛋白刺激巨噬细胞 48 h 后, 细胞的存活率分别为 69.3%、59.0%、63.5% 和 68.5%, 与空白对照组比较, 各剂量的 Mce4E 蛋白对巨噬细胞的活性都有显著的抑制作用 ($P < 0.05$) (图 2(b)), 说明 Mce4E 蛋白对巨噬细胞的活性有显著的抑制作用。用 MbPPD 刺激巨噬细胞 24 h 后, 与空白对照组比较, MbPPD 对肺泡巨噬细胞的活性没有明显的改变, 不同剂量的 MbPPD 刺激巨噬细胞 48 h 后, 细胞的活性明显高于空白对照组 ($P < 0.05$), 说明 MbPPD 对肺泡巨噬细胞的活性有显著的促进作用。



注: * 为差异显著 ($P < 0.05$)

图 2 不同质量浓度 Mce4E 蛋白对牛肺泡巨噬细胞活性的影响

Fig. 2 Macrophage viability analysis after stimulation by Mce4E proteins at different concentrations

2.2 TNF α 、iNOs、 β -actin、IL-6 和 IL-12 荧光定量 PCR 标准曲线与回归曲线的构建

对 TNF α 、iNOs、IL-6 和 IL-12 重组质粒按照 10^{-1} 倍比稀释后, 进行 PCR 扩增, 系统自动生成标准曲线 (图 3)。结果显示各细胞因子的相关系数 r^2 在 0.991 ~ 1.00 之间, T_m 值稳定, 说明扩增效率一致, 且产物的特异性良好。

2.3 Mce4E 蛋白对牛肺泡巨噬细胞 iNOs、TNF α 、IL-6 和 IL-12 mRNA 表达的影响

用 Mce4E、MtbPPD、MbPPD、ConA 和 BCG 刺激肺泡巨噬细胞 48 h 后, 用 Real-time PCR 检测肺泡巨噬细胞 iNOs、TNF α 、IL-6 和 IL-12 mRNA 的表达水平 (表 2)。Mce4E、MtbPPD、MbPPD、ConA 和 BCG 刺激肺泡巨噬细胞 48 h 后, Mce4E、MtbPPD、MbPPD、BCG、ConA 能够使巨噬细胞的 TNF α

mRNA 表达上调 ($P < 0.05$); Mce4E 蛋白抑制巨噬细胞 iNOs 的 mRNA 表达 ($P < 0.05$); MtbPPD 和 ConA 对巨噬细胞 iNOs 的 mRNA 表达没有影响, MbPPD 和 BCG 促使巨噬细胞 iNOs 的 mRNA 表达上调 ($P < 0.05$); Mce4E、MtbPPD、MbPPD、

BCG、ConA 能够使 IL-6 的 mRNA 表达上调 ($P < 0.05$); Mce4E 蛋白和 ConA 对巨噬细胞的 IL-12 表达没有影响, MtbPPD、MbPPD 和 BCG 能够促使巨噬细胞 IL-12 mRNA 表达上调 ($P < 0.05$)。

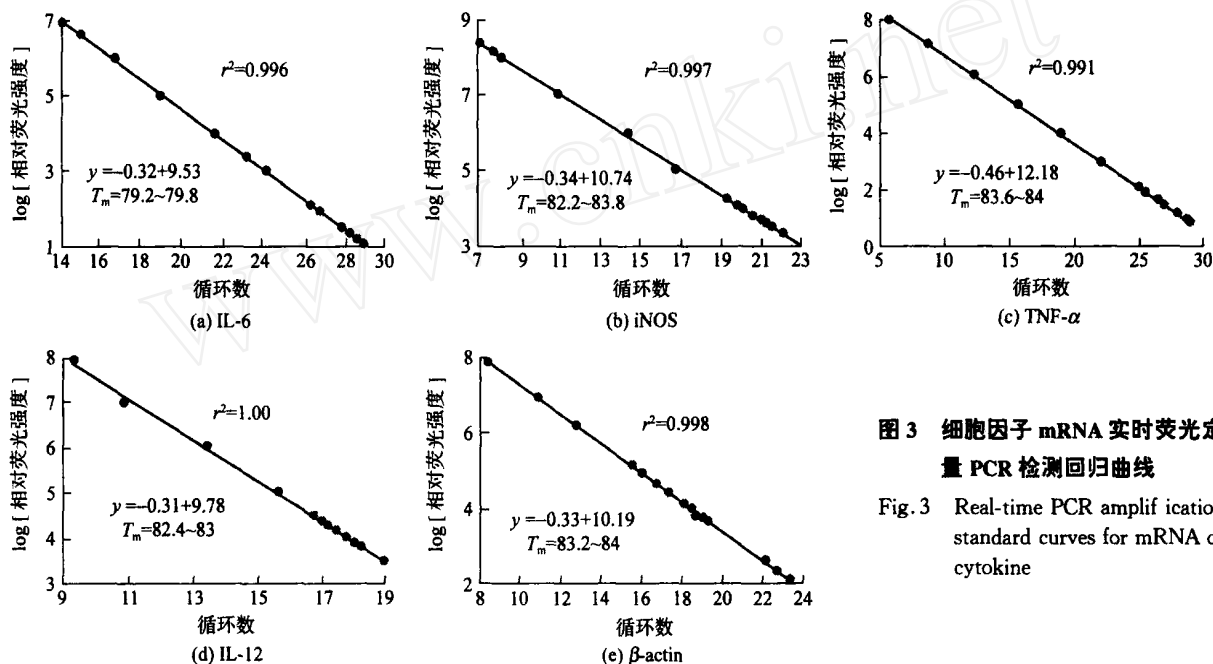


图 3 细胞因子 mRNA 实时荧光定量 PCR 检测回归曲线

Fig. 3 Real-time PCR amplification standard curves for mRNA of cytokine

表 2 不同处理巨噬细胞细胞因子 mRNA 的表达水平

Table 2 mRNA assay of expression cytokine after stimulation by Mce4E protein, MtbPPD, MbPPD, ConA, and BCG

指标	空白对照组	Mce4E 蛋白	Mtb PPD	MbPPD	BCG	ConA
iNOS	0.39 ± 0.008	0.10 ± 0.004 *	0.38 ± 0.014	0.70 ± 0.031 *	0.78 ± 0.017 *	0.31 ± 0.012
TNF- α	0.11 ± 0.010	0.88 ± 0.123 *	1.68 ± 0.194 *	2.02 ± 0.144 *	3.54 ± 0.397 *	1.75 ± 0.270 *
IL-12	0.08 ± 0.004	0.10 ± 0.024	0.20 ± 0.004 *	0.27 ± 0.007 *	0.11 ± 0.007	0.06 ± 0.002
IL-6	0.08 ± 0.001	0.25 ± 0.001 *	0.16 ± 0.001 *	0.39 ± 0.005 *	0.28 ± 0.008 *	0.12 ± 0.001

注: *差异显著 ($P < 0.05$)。

3 讨论

肺泡巨噬细胞通过吞噬作用, 杀灭和清除病原体及异物, 并介导炎症反应, 而牛结核分枝杆菌主要侵害宿主的肺泡巨噬细胞。Mce4E 蛋白刺激巨噬细胞 48 h 后, 经 MTT 法检测表明, Mce4E 蛋白对肺泡巨噬细胞的活性有显著的抑制作用 ($P < 0.05$), 而 MbPPD 组肺泡巨噬细胞的活性明显高于空白对照组和 Mce4E 蛋白组 ($P < 0.05$), Mce4E 蛋白通过抑制巨噬细胞的活性使得肺泡细胞杀菌活性和吞噬能力下降, 以此来达到在巨噬细胞中存活的目的, 同时, 巨噬细胞的死亡又可以诱导其他巨噬细胞来吞噬, 从而促使结核结节的形成^[21]。

TNF- α 是一种多功能的细胞因子, 主要由激活

的巨噬细胞和 T 细胞产生, 它能引起机体产生有效的肉芽肿应答, 在结核感染中, TNF- α 是肉芽肿形成必不可少的细胞因子。研究表明, 缺失 Mce 基因的人分枝杆菌突变株感染小鼠能够使小鼠肺脏的结节减少^[15-17], 与对照组相比, Mce4E 蛋白能够促使肺泡巨噬细胞的 TNF- α mRNA 表达上调 ($P < 0.05$), 从而间接证实了这种现象。新近的研究结果表明, Mce1 操纵子与结核的肉芽肿形成有关, 因此, 推测 Mce4E 可能也与分枝杆菌的结节形成有关, 有待进一步研究证实。Nobuyuki Shimono 等将 Mce 1 操纵子断裂, 所产生的突变体能够使机体的 TNF- α 和 IL-6 表达减少^[15], 本试验结果与 Nobuyuki Shimono 等结果一致。IL-6 是一个炎症细胞因子, 主要与机体的炎症反应有关, 试验结果显示 Mce4E 蛋白

能够促使巨噬细胞 IL-6 表达上调,说明 Mce4E 蛋白能够引起机体的炎性反应。

活化的小鼠巨噬细胞产生的 NO 能有效杀死致病的分枝杆菌^[6],而 iNOs 能够促使巨噬细胞产生活性 NO,从而促使巨噬细胞杀灭分枝杆菌。研究结果证实,Mce4E 蛋白能够抑制肺泡巨噬细胞 iNOs mRNA 的表达,表明 Mce4E 蛋白可以通过抑制巨噬细胞 iNOs mRNA 的表达来抵抗巨噬细胞对牛结核分枝杆菌的杀灭;而 MbPPD 和 BCG 却能够促使巨噬细胞 iNOs 的 mRNA 表达上调($P < 0.05$),这与以前的研究相符合,但值得注意的是,MtbPPD 对牛肺泡巨噬细胞 iNO 的 mRNA 表达没有影响,这可能与牛分枝杆菌对牛的肺泡巨噬细胞敏感性有关。

本试验主要对 Mce4E 蛋白与牛肺泡巨噬细胞的相互作用进行了研究,结果表明,Mce4E 蛋白能够抑制巨噬细胞的活性,同时促使炎性细胞因子 TNF- α 和 IL-6 mRNA 表达上调,但是抑制 iNOs mRNA 的表达,Mce4 蛋白可能与结核结节的形成有关,并且可能通过抑制 iNOs 表达来影响巨噬细胞对分枝杆菌的杀灭,以此达到其在巨噬细胞中存活的目的;同时,Mce4E 蛋白能够促使巨噬细胞分泌炎性细胞因子,而这些细胞因子在宿主防御反应中具有重要的作用,进一步证实 Mce4E 蛋白在牛结核分枝杆菌中具有重要的功能。

参 考 文 献

- [1] Aderem A, Underhill D M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages[J]. *Annu Rev Immunol*, 1999, 17:593-623
- [2] Tiruvilumala R L. Tuberculosis[J]. *Annu Rev Public Health*, 2002, 23:403-426
- [3] Kaneko H, Yamada H, Mizuno S, et al. Role of tumor necrosis factor- α in *Mycobacterium* induced granuloma formation in tumor necrosis factor- α deficient mice [J]. *Lab Invest*, 1999, 79:379-386
- [4] Roach D R, Briscoe H, Baumgart K, et al. Tumor necrosis factor (TNF) and a TNF-mimetic peptide modulate the granulomatous response to *Mycobacterium bovis* BCG infection in vivo [J]. *Infect Immun*, 1999, 67:5473-5476
- [5] Sedgwick J D, Riminton D S, Cyster J G, et al. Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement [J]. *Immunol Today*, 2000, 21:110-113
- [6] Chan J, Tanaka K, Carroll D, et al. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Infect and Immun*, 1995, 63:736-740
- [7] Liew F Y, Cox F E. Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide [J]. *Immunol Today*, 1991, 12: A17-21
- [8] Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells [J]. *Faseb J*, 1992, 6:3051-3064
- [9] Leal I S, Smedegard B, Andersen P, et al. Interleukin-6 and interleukin-12 participate in induction of a type 1 protective T-cell response during vaccination with a tuberculosis subunit vaccine [J]. *Infect Immun*, 1999, 67:5747-5754
- [10] Weissenbach J, Chernajovsky Y, Zeevi M, et al. Two interferon mRNAs in human fibroblasts: *in vitro* translation and *Escherichia coli* cloning studies [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1980, 77:7152-7156
- [11] Corbel C, Melchers F. The synergism of accessory cells and of soluble alpha-factors derived from them in the activation of B cells to proliferation [J]. *Immunol Rev*, 1984, 78:51-74
- [12] Cooper A M, Magram J, Ferrante J, et al. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Exp Med*, 1997, 186:39-45
- [13] Nolt D, Flynn J L. Interleukin-12 therapy reduces the number of immune cells and pathology in lungs of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Infect and Immun*, 2004, 72:2976-2988
- [14] Greinert U, Ernst M, Schlaak M, et al. Interleukin-12 as successful adjuvant in tuberculosis treatment [J]. *Eur Respir J*, 2001, 17:1049-1051
- [15] Shimono N, Morici L, Casali N, et al. Hypervirulent mutant of *Mycobacterium tuberculosis* resulting from disruption of the Mce1 operon [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2003, 100:15918-15923
- [16] Goffre A, Infante E, Aguilar D, et al. Mutation in Mce operons attenuates *Mycobacterium tuberculosis* virulence [J]. *Microbes Infect*, 2005(7):325-334
- [17] Aguilar L D, Infante E, Bianco M V, et al. Immunogenicity and protection induced by *Mycobacterium tuberculosis* Mce-2 and Mce-3 mutants in a Balb/c mouse model of progressive pulmonary tuberculosis [J]. *Vaccine*, 2005(6):268-376
- [18] Arruda S, Bomfim G, Knights R, et al. Cloning of an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells [J]. *Science*, 1993, 261:1454-1457
- [19] Haile Y, Caugant D A, Bjune G, et al. Wiker *Mycobacterium tuberculosis* mammalian cell entry operon (Mce) homologs in *Mycobacterium* other than *tuberculosis* (MOTT) [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2002, 33:125-132
- [20] Ahmad S, El-Shazly S, Mustafa A S, et al. Mammalian cell entry proteins encoded by the Mce3 operon of *Mycobacterium tuberculosis* are expressed during natural infection in humans [J]. *Scand J Immunol*, 2004, 60:382-391
- [21] Gammack D, Doering C R, Kirschner D E. Macrophage response to *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. *J Math Biol*, 2004, 48:218-242