

PPE25 蛋白在分枝杆菌感染中性粒细胞中的作用*

米友军¹, 梁丽娟², 慈彩虹¹, 王月颖¹

1. 西北民族大学医学院(兰州 730000); 2. 甘肃中医药大学临床医学院(兰州 730000)

【摘要】 目的 研究 PPE25 蛋白在耻垢分枝杆菌(*M. smegmatis*, MS)感染中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophil, PMN)时所起的作用。方法 利用异源表达结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*, Mtb)PPE25 蛋白的重组 MS (MS-ppe25 组)感染人 PMN,以空载体 MS(MS-vec 组)为对照菌,观察 2 种 MS 的菌落形成、单菌落大小、生长曲线,以了解 PPE25 蛋白对 MS 生长的影响;PMN 感染 MS 后,以菌落形成单位(colony forming unit, CFU)计数了解细菌活力的变化;检测乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)释放百分比,以观察重组 MS 对 PMN 死亡的影响,流式细胞仪检测活性氧(reactive oxygen species, ROS),硝酸还原酶法检测一氧化氮(nitric oxide, NO)水平,ELISA 检测细胞因子白细胞介素(IL)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的变化,分析 PPE25 蛋白在 MS 感染 PMN 中的作用。结果 PPE25 蛋白对 MS 生长、菌落形成及单菌落大小无影响;MS 感染 PMN 2、6、12 h,MS-ppe25 组 CFU、LDH 释放百分比均高于 MS-vec 组,两组 LDH 释放百分比差异有统计学意义($P < 0.05$);MS 感染 PMN 细胞后 2 h,MS-vec 组 ROS、NO 水平较 MS-ppe25 组高($P < 0.01$);MS-ppe25 组 PMN 细胞表达的 TNF- α 各时点均高于对照组($P < 0.01$),IL-1 β 在 MS 感染 6 h 后均高于对照组($P < 0.01$)。结论 PPE25 蛋白能增加 MS 在 PMN 内的生存、诱导细胞坏死、抑制 ROS 和 NO 的表达,改变细胞因子的分泌,有利于病原体的播散及逃避宿主免疫。

【关键词】 PPE25 结核分枝杆菌 中性粒细胞

The Role of PPE25 in Mycobacterial Infections of Polymorphonuclear Neutrophils MI You-jun¹, LIANG Li-juan², CI Cai-hong¹, WANG Yue-ying¹. 1. Medical College of Northwest Minzu University, Lanzhou 730000, China; 2. College of Clinical Medicine, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

【Abstract】 **Objective** To determine the role of PPE25 in the infection of *M. smegmatis* (MS) in polymorphonuclear neutrophils (PMNs). **Methods** In MS-ppe25 group, PPE25 was expressed in non-pathogenic fast-growing *M. tuberculosis* (Mtb) that infected PMNs. The empty vector MS (MS-vec group) was served as control. Their colony formation was observed, including the size and growth curves of single colonies. The colony forming unit (CFU) indicated bacterial vitality. The percentage of lactate dehydrogenase (LDH) release measured PMN death. The role of PPE25 protein in MS infections was analyzed by reactive oxygen species (ROS) detected by flow cytometry, nitric oxide (NO) level detected by nitrate reductase, cytokine interleukin (IL) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) detected by ELISA. **Results** PPE25 protein had no effect on MS growth, colony formation and the size of single colonies. MS-infected PMN had higher percentages of CFU and LDH release 2, 6, and 12 h after infections compared with the MS-vec group ($P < 0.05$). MS-infected PMN also had lower levels of ROS and NO levels 2 h after infections ($P < 0.01$), consistently higher levels of TNF- α ($P < 0.01$), and higher levels of IL-1 β infusion 6 h after MS infections ($P < 0.01$). **Conclusion** PPE25 protein increases the survival of MS in PMN, induces cell necrosis, inhibits the expressions of ROS and NO, and changes the secretion of cytokines, which helps spread of the pathogen by evading host immunity.

【Key words】 PPE25 *Mycobacterium tuberculosis* Polymorphonuclear neutrophils

全球每年大约有 900 万人发展为结核病^[1],多药耐药菌株的出现、与人类免疫缺陷病毒的共感染及卡介苗免疫效果的变化,使结核病患者家庭、社会负担不断加重^[2],迫切需要研究新的诊断治疗方法。

中性粒细胞(PMN)是抗微生物入侵一线的专业

吞噬细胞。PMN 是肺部抵御结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*, Mtb)感染的主要细胞之一^[3]。细菌通过多种机制逃避 PMN 的杀灭^[4]。因此,进一步了解 PMN 在结核病发生时与 Mtb 之间的相互作用,对于研究新的免疫调节措施和治疗结核病具有重要意义。

Mtb 中 PE/PPE 家族蛋白由 PE 和 PPE 亚家

* 甘肃省科技计划课题(No. 1606RJYA219)资助

族构成, PPE25 是 ESX-5 家族编码的 PPE 蛋白, 研究显示 ESX-5 家族编码的 PPE 蛋白在 Mtb 毒力方面发挥重要的作用^[3,5]。删除 ESX-5 相关 PE、PPE 基因的突变株 Mtb Δ PPE25-PE19, 在小鼠实验中毒力明显减弱^[5]。删除鸟分枝杆菌 PPE25 同源基因后, 在体内和体外研究感染巨噬细胞时显著减毒^[3]。目前国内外对于 ESX-5 家族编码的 PPE 蛋白家族研究较少^[3-4], 相关研究主要集中在非 Mtb 及与巨噬细胞之间的相互作用^[6]。ESX-5 家族编码的蛋白在细菌与 PMN 相互作用时所起作用未见报道。

本研究利用异源表达 Mtb PPE25 蛋白的重组耻垢分枝杆菌(*M. smegmatis*, MS)感染 PMN, 通过观察重组 MS 菌的胞内生存、PMN 细胞坏死、活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平、一氧化氮(nitric oxide, NO)水平等研究 PPE25 蛋白在 MS 感染 PMN 过程中发挥的毒力作用, 探索结核的发病机制。

1 材料和方法

1.1 菌株和主要试剂

异源表达 Mtb PPE25 的重组 MS(MS-ppe25) 和空载体对照菌(MS-vec)来自于本课题组前期研究^[7]。培养基: Middlebrook 7H9 broth (MB 7H9, Difco, USA)、Middlebrook 7H10 agar (MB 7H10, Difco, USA); 主要试剂: 改良型 RPMI-1640 培养基、二氢罗丹明 123 (Thermo, USA); Human neutrophils separation medium kit (Sangon, China); 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-10 (IL-10)、白细胞介素-12p40 (IL-12p40) ELISA 试剂盒 (Ebioscience, USA); Non-radioactive Cytotoxicity Assay Kit (Promega, USA); Nitric Oxide Assay Kit (Beyotime, China)。

1.2 方法

1.2.1 重组 MS 培养及 PMN 分离 MS-ppe25 和 MS-vec 培养于含 5 g/L 甘油、5 g/L 牛血清白蛋白 V、2 g/L 葡萄糖、0.05% Tween 80 的 MB7H9 液体培养基或 MB7H10 琼脂平板, 根据要求添加 25 μ g/mL 卡那霉素。

PMN 的分离: 采取志愿者外周静脉血 5 mL, 将血液样本加于分离液之液面上, 600 \times g 离心 30 min。离心后管中出现两层乳白色细胞层, 上层细胞为单核细胞层, 下层细胞为 PMN。吸取 PMN 层

细胞, 转移至 15 mL 离心管中, 加入 10 mL 清洗液重悬, 250 \times g 离心 10 min。弃上清, 以 5 mL 清洗液重悬细胞, 250 \times g 离心 10 min。重复洗涤一次后用 RPMI-1640 细胞完全培养液制成 4 \times 10⁵ mL⁻¹ 细胞悬液。

1.2.2 PPE25 对重组 MS 生长状态的影响 取对数生长期的 MS-vec、MS-ppe25, 用含 Tween-80 的 PBS 洗 2 次, 重悬于 PBS 后反复通过 27G 注射器针头 5 次, 以制备单细菌悬液。分别吸取 1 mL 单细菌悬液, 取 100 μ L 后用 PBS 倍比稀释。分别取稀释液 100 μ L 铺板, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养, 3~5 d 后观察菌落生长情况, 并测定单菌落大小。取单细菌悬液, 测定吸光度 A₅₈₀ 值。分别接种于含卡那霉素 25 μ g/mL 的 M7H9 液体培养基中, 调整菌液初始 A₅₈₀ 值至 0~0.02, 放入灭菌的玻璃珠, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养, 每隔 6 h 取 100 μ L 培养物测定 A₅₈₀ 值, 至 60 h, 绘制生长曲线, 从而观察 MS 表达 PPE25 后, 其生长状态是否发生变化。

1.2.3 PMN 感染 MS PMN 感染 MS 按照文献^[8]方法: 取 MS-vec、MS-ppe25 细菌单细菌悬液, 测定 A₅₈₀ 值。收集 PMN 细胞后培养于不含抗生素的 RPMI-1640 培养基中, 按照 4.0 \times 10⁵/孔铺板, 每孔 1 mL。按照感染复数(MOI)=10:1(细菌:细胞)感染 PMN, 置于 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。然后进行下列实验。

1.2.4 PPE25 对 MS 活力的影响 PMN 具有杀菌能力, 为分析 PPE25 对细菌活力的影响, 用 MS-vec、MS-ppe25 分别感染 PMN, 以感染 PMN 细胞的菌落形成单位(colony-forming units, CFU)计数确定感染率, 以了解细菌活力的变化。PMN 感染后 0、6、12、24 h 收集细胞, 1 mL PMN 培养液添加 10 μ L 裂解液(Triton X 终浓度为 0.1%), 吹打均匀。将裂解物按 1:10、1:100、1:1 000、1:10 000 梯度稀释。不同稀释后的溶液各取 100 μ L 铺于含抗生素的 Middlebrook 7H10 琼脂平板。37 $^{\circ}$ C 孵育 3~5 d 后计数菌落形成单位。预试验结果显示, 裂解物按 1:10 稀释后涂板效果最佳, 因此取裂解物稀释 1:10。

1.2.5 PPE25 对 PMN 死亡的影响 通过检测 PMN 裂解后释放的细胞内酶——乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活性的变化, 间接判断 PMN 细胞死亡。用 MS-vec、MS-ppe25 分别感染 PMN, 在感染后 0.5、2、6、12 h, 按照试剂盒说明书分别测定上清液中 LDH、自发 LDH、最大 LDH

释放量,计算 LDH 释放百分比。LDH 释放百分比=100×(实验组 LDH 释放量-自发 LDH 释放量)/(最大 LDH 释放量-自发 LDH 释放量)。

1.2.6 PPE25 对 PMN 中 ROS 和 NO 水平的影响 重组 MS 感染 PMN 细胞 2 h 后,485×g 离心 5 min,收集细胞,PBS 洗 1 次,细胞重悬于 PBS,并添加 30 μL 二氢罗丹明 123,于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 孵育 5 min。485×g 离心 5 min,PBS 洗 1 次,用含体积分数为 4% 多聚甲醛的 PBS 200 μL 重悬。通过流式细胞仪分析 ROS。采用硝酸还原酶法检测 NO 水平。感染 PMN 2 h 后收集培养上清液,用酶标仪检测 A₅₅₀ 值,具体方法参照试剂说明书的步骤进行。

1.2.7 PPE25 对 PMN 表达细胞因子的影响 感染 PMN 后,分别于 2、6、12、24 h 收集细胞至 1.5 mL EP 管,4 °C、485×g 离心 5 min 收集上清。上清转移至 Spin-X 离心过滤管中,4 °C、3 500×g 离心 2 min,收集流穿液至 1.5 mL EP 管。按照 ELISA 试剂盒说明书检测细胞因子(包括 TNF-α、IL-1β、IL-10、IL-12p40)的表达。

1.2.8 统计学方法 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PPE25 对 MS 生长状态的影响

MS-vec、MS-ppe25 生长曲线显示,MS 培养 12 h 进入对数生长期,约 48 h 达平台期,尽管 2 种 MS 在对数生长期的生长曲线略有不同,但两组间差异并无统计学意义(图 1)。单菌悬液铺板培养 5 d 后,MS-vec、MS-ppe25 菌落生长 A₅₈₀ 值、单菌落大小[分别为(4.18±0.34) mm、(4.25±0.29) mm] 两组间差异也无统计学意义,表明 MS 表达 PPE25 蛋白后,MS 生长并未受到影响。

2.2 PPE25 对 MS 活力的影响

由图 2 可见,PMN 感染 MS 6~24 h,MS-ppe25 组 PMN 裂解物在琼脂平板孵育 5 d 后的 CFU 均高于 MS-vec 组,但两组间差异无统计学意义。

2.3 PPE25 对 PMN 死亡的影响

在 MS 感染 PMN 0.5 h,两组 LDH 释放百分比比较低,随着感染时间延长,LDH 释放百分比逐渐增加,在感染后所有时间点,MS-ppe25 组 LDH 释放百分比均比 MS-vec 组高(图 3),在感染 2、6、12 h 时,两组差异有统计学意义(*P*<0.01)。该结果表

明 MS 表达 PPE25 后能够增加 PMN 死亡。

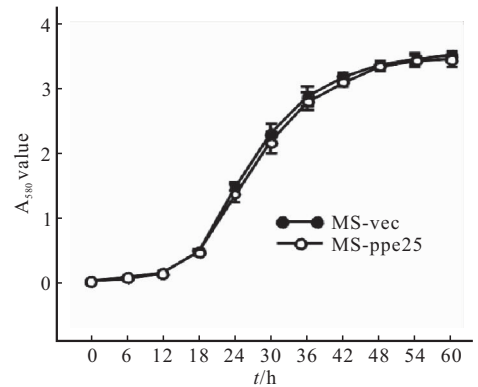


图 1 重组 MS 生长曲线

Fig 1 Growth curves of recombinant MS strains

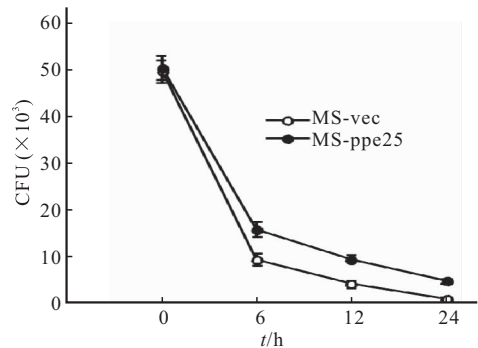


图 2 5 d 后测量培养 0~24 h 的重组 MS 在 PMN 内存存能力

Fig 2 Intracellular survival of recombinant MS strains in PMN cultured 0-24 h and detected at 5 d

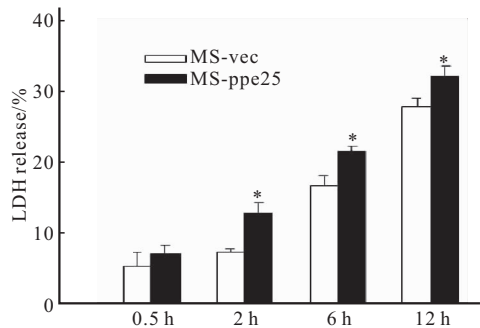


图 3 重组 MS 对 PMN 死亡的影响

Fig 3 Effect of recombinant MS strains on PMN death

* *P*<0.01, vs. MS-vec group

2.4 PPE25 对 PMN 细胞 ROS 和 NO 水平的影响

结果显示,MS-vec 组 ROS 水平为(14.23±2.13)%,NO 水平为(22.32±2.51) μmol/L;MS-ppe25 组 ROS 水平为(6.89±1.97)%,NO 水平为(15.21±2.87) μmol/L,两组 PMN 细胞 ROS、NO

的表达差异有统计学意义($P < 0.01$)。说明 MS 表达 PPE25 蛋白后,抑制了 PMN 细胞 ROS 和 NO 的表达。

2.5 PPE25 对 PMN 表达细胞因子的影响

如图 4 所示,MS-ppe25 组 PMN 的 TNF- α 表

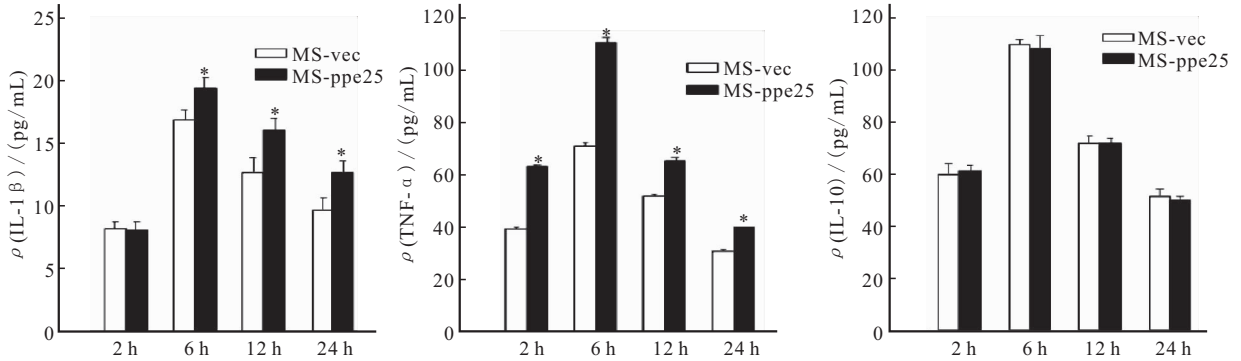


图 4 重组 MS 感染 PMN 后细胞因子的表达

Fig 4 Expressions of cytokines in PMN infected recombinant MS strains

* $P < 0.01$, vs. MS-vec group

3 讨论

最近研究表明,PE/PPE 蛋白参与了分枝杆菌的致病机制^[9]。但目前大部分的研究集中于 PE/PPE 蛋白在巨噬细胞的作用^[10-11]。因此,本研究首次利用表达 PPE25 蛋白的 MS 感染 PMN,研究 PPE25 蛋白在感染分枝杆菌中发挥的作用。SINGH 等^[11]研究结果表明,MS 表达 PE/PPE 蛋白之后能够影响细菌形态及生长。本研究发现,PPE25 蛋白对 MS 生长状态(菌落生长、大小、生长曲线)并没有影响,但能够提高 MS 在 PMN 内的生存能力(MS-ppe25 组 PMN 裂解物在琼脂平板孵育 5 d 后的 CFU 均高于 MS-vec 组,虽然两组差异无统计学意义,导致 MS-ppe25 组 CFU 轻微增高的可能原因是 MS 表达 PPE25 后,提高了 MS 在 PMN 内的生存能力),提示 PPE25 蛋白可能赋予非致病性 MS 以致病特性。

Mtb 可诱导已感染细胞的坏死,从而逃避细胞的杀伤,同时有利于病原体的播散^[12]。本研究结果显示,在 MS 感染后 2~12 h,MS-ppe25 组感染 PMN 释放的 LDH 均比 MS-vec 组高,表明 MS 表达 PPE25 蛋白后能够诱导 PMN 裂解、死亡,从而有利于细菌播散,同时逃避宿主免疫的杀伤。

ROS 和 NO 在宿主防御胞内病原体感染方面起重要作用^[13]。抑制 ROS 和 NO 是 Mtb 逃避宿主细胞杀伤的手段之一。本研究证实 PPE25 蛋白能

达水平在所有时间点均高于 MS-vec 组($P < 0.01$)。MS-ppe25 组 PMN 的 IL-1 β 的表达从 6 h 后均高于 MS-vec 组($P < 0.01$)。两组 PMN 的 IL-10 表达水平在所有时间点差异均无统计学意义。此外,两组均未检测到 IL-12p40 的表达。

够抑制 ROS 和 NO 的表达。

有效的抗 Mtb 固有免疫反应不仅依赖于细胞调节的杀伤,同时也依赖于细胞因子对固有免疫细胞的有效调节^[14]。如 PMN 分泌的 TNF- α 可刺激巨噬细胞和树突状细胞分化及活化。同时,TNF- α 通过辅助吞噬作用、激活 T 细胞、肉芽肿形成发挥抗结核作用^[15]。PMN 通过产生 IL-12 能够促进 T 细胞成熟。但也可能产生 IL-10,在一定环境下可限制保护性的获得性免疫。此外,研究还表明,Mtb 的毒力与 PMN 分泌细胞因子及化学因子的能力成反比^[16]。本研究结果显示,PPE25 蛋白能够增加 TNF- α 、IL-1 β 的表达,对 IL-10 和 IL-12 p40 没有影响。说明 PPE25 蛋白在 Mtb 感染时能够调节细胞因子的表达,从而有利于细菌在体内存活。

综上所述,PPE25 蛋白赋予了非致病的 MS 一些致病特性,包括增加在 PMN 胞内的滞留、增加细胞坏死、改变 ROS 及 NO 的分泌、改变细胞因子的表达。本研究证实 PPE25 蛋白在 Mtb 与 PMN 相互作用过程中起重要的作用,进一步拓展了 PE/PPE 蛋白在结核发病机制中的认识。本研究主要为体外研究,缺乏相关的体内实验,本课题组计划将开展重组菌感染动物相关实验。

参 考 文 献

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report, 2016. Geneva: World Health Organization, 2016; 1-81 [2017-08-21]. <http://aidsdatahub.org/global-tuberculosis-report>

- 2016-who-2016.
- [2] LÜTHI B, DIACON AH. Tuberculosis and HIV-features of the co-infection. *Ther Umsch*,2011,68(7):389-394.
- [3] SAYES F, SUN L, DI LUCA M, *et al.* Strong immunogenicity and cross-reactivity of *Mycobacterium tuberculosis* ESX-5 type VII secretion: encoded PE-PPE proteins predicts vaccine potential. *Cell Host Microbe*,2012, 11(4):352-363.
- [4] MCNAMARA M, DANELISHVILI L, BERMUDEZ LE. The *Mycobacterium avium* ESX-5 PPE protein, PPE25-MAV, interacts with an ESAT-6 family Protein, MAV_2921, and localizes to the bacterial surface. *Microb Pathog*, 2012,52(4):227-238.
- [5] BOTTAI D, DI LUCA M, MAJLESSI L, *et al.* Disruption of the ESX-5 system of *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of PPE protein secretion, reduction of cell wall integrity and strong attenuation. *Mol Microbiol*,2012, 83(6):1195-1209.
- [6] ABDALLAH AM, SAVAGE ND, VAN ZON M, *et al.* The ESX-5 secretion system of *Mycobacterium marinum* modulates the macrophage response. *J Immunol*,2008,181(10):7166-7175.
- [7] MI Y, BAO L, GU D, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* PPE25 and PPE26 proteins expressed in *Mycobacterium smegmatis* modulate cytokine secretion in mouse macrophages and enhance mycobacterial survival. *Res Microbiol*,2016,168(3):234-243.
- [8] PARISH T, ROBERTS DM. *Mycobacteria* Protocols. 3 ed. New York: Humana Press Inc. ,2015:343-355.
- [9] AHMED A, DAS A, MUKHOPADHYAY S. Immunoregulatory functions and expression patterns of PE/PPE family members: roles in pathogenicity and impact on anti-tuberculosis vaccine and drug design. *IUBMB Life*, 2015,67(6):414-427.
- [10] FISHBEIN S, VAN WYK N, WARREN RM, *et al.* Phylogeny to function:PE/PPE protein evolution and impact on *Mycobacterium tuberculosis* pathogenicity. *Mol Microbiol*, 2015,96(5):901-916.
- [11] SINGH P, RAO RN, REDDY JR, *et al.* PE11, a PE/PPE family protein of *Mycobacterium tuberculosis* is involved in cell wall remodeling and virulence. *Sci Rep*,2016,6:21624 [2017-08-21]. <https://www.nature.com/articles/srep21624>. doi:10.1038/srep21624.
- [12] SCHOREY JS, SCHLESINGER LS. Innate immune responses to tuberculosis. *Microbiol Spectr*, 2016, 4(6) [2017-08-21]. <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555819569.chap1>. doi:10.1128/microbiolspec.TB2-0010-2016.
- [13] FANG FC. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J Clin Invest*,1997,99(12):2818-2825.
- [14] WARREN E, TESKEY G, VENKETARAMAN V. Effector mechanisms of neutrophils within the innate immune system in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Clin Med*,2017,6(2):pii:E15 [2017-08-21]. <http://www.mdpi.com/2077-0383/6/2/15>. doi:10.3390/jcm6020015.
- [15] BENNOUNA S, BLISS SK, CURIEL TJ, *et al.* Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J Immunol*,2003,171(11):6052-6058.
- [16] LOWE DM, REDFORD PS, WILKINSON RJ, *et al.* Neutrophils in tuberculosis: friend or foe? *Trends Immunol*, 2012,33(1):14-25.

(2018-05-30 收稿,2018-09-10 修回)

编辑 沈进

(上接第 870 页)

- [26] CHENG HS, SIVACHANDRAN N, LAU A, *et al.* MicroRNA-146 represses endothelial activation by inhibiting pro-inflammatory pathways. *EMBO Mol Med*,2013,5(7):1017-1034.
- [27] LI K, CHING D, LUK FS, *et al.* Apolipoprotein E enhances microRNA-146a in monocytes and macrophages to suppress nuclear factor-kappaB-driven inflammation and atherosclerosis. *Circ Res*, 2015, 117(1):e1-e11 [2018-01-30]. <http://circres.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.305844/-/DC1>.
- [28] HOESEL B, SCHMID JA. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer*,2013,12:86 [2018-01-16]. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-86>.
- [29] LI CH, CHEN Y. Targeting long non-coding RNAs in cancers: progress and prospects. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013,45(8):1895-1910.
- [30] WU H, LIU J, LI W, *et al.* LncRNA-HOTAIR promotes TNF-alpha production in cardiomyocytes of LPS-induced sepsis mice by activating NF-kappaB pathway. *Biochem Biophys Res Commun*,2016,471(1):240-246.
- [31] XIAO H, TANG K, LIU P, *et al.* LncRNA MALAT1 functions as a competing endogenous RNA to regulate ZEB2 expression by sponging miR-200s in clear cell kidney carcinoma. *Oncotarget*,2015,6(35):38005-38015.

(2018-06-10 收稿,2018-09-20 修回)

编辑 汤洁