

结核分枝杆菌对宿主细胞凋亡效应的调控研究

黄新华, 何思为, 李晨潇, 王德成

复旦大学上海医学院; 医学分子病毒学教育部/卫生部重点实验室, 上海 200032

摘要 由结核分枝杆菌 (MTB) 引起的结核病是严重危害人类健康的重大传染病, 全世界约有 1/3 的人口潜伏感染 MTB。近几年随着耐多药 MTB 和 HIV 混合感染的流行, 使结核病控制形势更加严峻。细胞凋亡是生物有机体一种古老的免疫防御反应, 在帮助机体清除胞内菌过程中发挥关键作用。已有研究结果表明, 结核分枝杆菌对宿主细胞凋亡的调控过程非常复杂, 即表现为有双重性: 有些基因能促进凋亡, 而有些则表现为抑制效应, 且本研究组初步的研究结果表明细菌的毒力与凋亡有一定的内在联系, 但是相关的分子机制还很不清楚。因此, 鉴定 MTB 基因组中与凋亡相关的基因可以为研究细菌和宿主细胞之间的相互作用奠定基础, 并且有助于研发新的药物靶标和候选疫苗。

关键词 巨噬细胞; 凋亡; 结核分枝杆菌; 毒力

中图分类号 Q342

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2009)23-0111-05

Modulation of Apoptotic Effects in Host Cells During Mycobacterial Tuberculosis Infection

HUANG Xinhua, HE Siwei, LI Chenxiao,
WANG Decheng

Key Laboratory of Medical Molecular Virology Ministry of Education and Health; Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China

Abstract Tuberculosis, one of the major infectious diseases worldwide, is caused by *Mycobacterium Tuberculosis* (MTB) infection. There are around one-third of the world's population is latently infected. In recent years, the tuberculosis control situation is even grimmer along with the multi-drug resistant MTB and HIV epidemic. MTB is a highly adapted human pathogen that has evolved with multiple strategies in its attempt to avoid an efficient host immune response. Apoptosis is an ancient immune defense response to intracellular pathogens in both plant and animal kingdoms. This paper reviews the current progresses in the field of interaction between mycobacteria and host cells regarding the induction of host cell death by apoptosis. It is believed that MTB

can modulate macrophage apoptosis through a variety of ways, by either inducing or inhibiting apoptosis after infection. However, the molecular mechanisms of host cell apoptosis induction or inhibition are still not well understood. Therefore, the identification of apoptosis-related genes in the genome of MTB is necessary to investigate the details of this host-pathogen interaction and may be useful for the development of new drug targets and/or vaccine candidates.

Keywords macrophage; apoptosis; mycobacterium tuberculosis; virulence

结核分枝杆菌 (*Mycobacterium Tuberculosis*, MTB) 是兼性胞内寄生菌, 感染人体后主要被巨噬细胞吞噬, 未被机体免疫系统清除而潜伏下来的 MTB 也主要寄生于巨噬细胞内。巨噬细胞的生存状况直接影响到寄生在其内部的分枝杆菌的命运。目前已有结果表明^[1], 结核分枝杆菌对巨噬细胞凋亡存在两个方面的影响。一方面, 结核分枝杆菌的某些菌体成分或其在巨噬细胞内的代谢活动可诱导巨噬细胞发生凋亡, 促使巨噬细胞产生抗结核分枝杆菌感染的保护性免疫反应; 另一方面, 结核分枝杆菌毒力株的某些特殊菌体成分或其分泌物则可抑制巨噬细胞的凋亡, 借以逃避巨噬细胞的杀伤。研究者对此得出不同的观点可能与实验系统的复杂性有关, 比如实验所用的 MTB 菌株、感染的方法、感染的菌量以及宿

收稿日期: 2009-10-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30872259); 上海市科委基金项目 (07DZ19503)

作者简介: 黄新华, 博士研究生, 研究方向为结核分枝杆菌的分子生物学与致病机制, 电子信箱: xinyunxiangzhu@126.com; 王德成 (通信作者), 讲师, 研究方向为结核分枝杆菌的致病机制, 电子信箱: wdc268@yahoo.com.cn

主细胞本身等方面的差异,即 MTB 是促进还是抑制细胞凋亡取决于活细菌与宿主细胞之间复杂的相互作用。

1 MTB 的毒力与宿主细胞凋亡

作为 MTB 主要的生存场所,巨噬细胞生活状态的改变都将影响到 MTB 的命运,因此,MTB 在感染过程中会通过各种机制来调控巨噬细胞的状态,使其有利于自己的生存;同时,作为对抗细菌感染的防御策略,凋亡在巨噬细胞抵御胞内菌感染过程中发挥关键作用,见图 1^[2]。因此,MTB 对宿主细胞凋亡的调控呈现出复杂性和多面性。

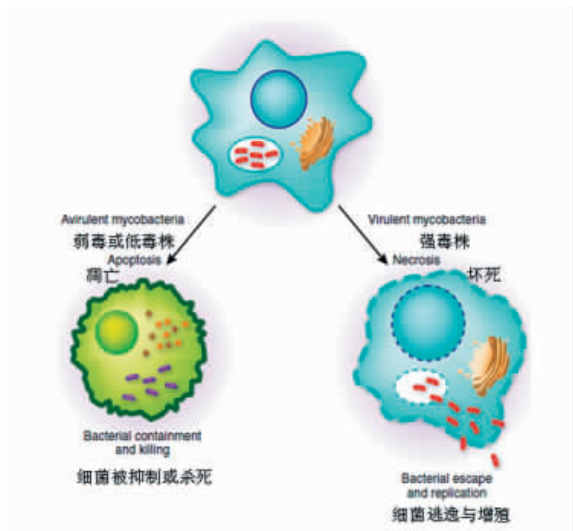


图 1 不同毒力 MTB 感染后对巨噬细胞的死亡方式影响
Fig. 1 Alternative forms of cell death are stimulated by the infection of macrophages by avirulent and virulent mycobacteria

1.1 MTB 感染促进细胞凋亡

巨噬细胞是 MTB 在体内的主要宿主细胞。研究发现,不同毒力的 MTB 感染可诱导巨噬细胞产生不同水平的凋亡。巨噬细胞凋亡水平的提高随其感染的 MTB 毒力的不同而存在差异。有研究发现有毒的 MTB 能促进宿主细胞凋亡。Derrick 等^[1]发现 MTB 的 ESAT6 成分通过激活参与细胞凋亡的半胱天冬酶(caspase)表达,并形成膜孔而诱导 THP-1 细胞的凋亡。Klingler 等^[3]用卡介苗(Bacillus Calmette-Guerin, BCG)及热灭活的结核分枝杆菌 H37Ra 分别感染外周血单核细胞, Tunel 法检测发现单核细胞的凋亡明显增加,并且这种诱导凋亡效应是通过调节 Bcl-2 的表达来实现。同样,Keane 等^[4-5]发现 TNF- α 在 MTB 感染后介导细胞凋亡过程中扮演重要角色,特别是活动性肺结核患者肉芽肿中的细胞凋亡率高达 50%~70%。Placido 等^[6]检测到从活动性肺结核患者的支气管肺泡灌洗液中分离到的细胞的凋亡率要高出正常组的 3 倍,而体外实验用 H37Rv 感染单核细胞来源的巨噬细胞(MDM)也观察到了此现象。Danelishvili 等^[7]用感染复数(Multiplicity of Infection, MOI)为 10 的 H37Rv 和 H37Ra 感染人 U937 巨噬

细胞和 II 型肺上皮细胞(A549),发现感染后都会引起细胞凋亡,但 H37Ra 引起细胞凋亡要多一些,分别为 58%和 35%, MTB 引起巨噬细胞和肺上皮细胞凋亡的程度不一样,说明 MTB 在不同细胞内存活策略也不一样。Arcila 等^[8]用 H37Rv 感染人的单核细胞、MDM、U937 及经 PMA 分化到的 U937 (U937D),结果发现与正常人的单核细胞、MDM、U937D 相比(主要引起凋亡),来源于 TB 病人的单核细胞和 U937 细胞倾向于坏死,这说明巨噬细胞比单核细胞更易于凋亡。Rojas 等^[9]用 H37Rv 分别感染 *Nramp* 基因易感和抗性的鼠巨噬细胞,以探讨对 MTB 基因易感性不同的巨噬细胞是否影响细胞的凋亡,结果发现对 *Nramp* 基因抗性的巨噬细胞被 MTB 感染后,更容易凋亡,且呈现出剂量依赖性,MOI 越高凋亡细胞越多,并且凋亡是产生的 NO 对细胞毒性的结果。此外,还发现结核分枝杆菌的 19 kD 与 38 kD 蛋白能诱导宿主细胞的凋亡^[10-11]。

1.2 毒力 MTB 抑制或下调宿主细胞的凋亡

毒力 MTB 也可以通过抑制或降低巨噬细胞的凋亡逃避巨噬细胞的杀伤,以便在细胞内增殖。已有文献报导毒力 MTB 抑制宿主细胞的凋亡^[12]。Keane 等^[13]用不同毒力的 MTB 及弱毒的 *kansasii* 菌株感染肺巨噬细胞(AM ϕ),结果无毒或减毒株比毒力株引起细胞凋亡明显增多,这说明毒力株的某种成分抑制了 AM ϕ 的凋亡反应。Riendeau 等^[14]用 PMA 分化的 THP-1 细胞模拟人初级肺巨噬细胞对 MTB 的反应,发现 H37Ra 和 BCG 显著引起 THP-1 细胞凋亡,而 H37Rv 和 *M. Bovis* 并没有增加 THP-1 细胞的凋亡,这可能是毒力株 MTB 感染细胞后阻止了 TNF 信号,因此干扰 TNF 死亡信号可能是致病机制之一。Dhiman 等^[15]用 H37Rv 和 H37Ra 感染 THP-1 细胞, H37Rv 感染组比 H37Ra 感染组引起的凋亡低,是因为 H37Rv 激活了 NF- κ B,导致 Bcl-2 家族的 Bfl-1/A1 表达上调。Zhang 等^[16]用 H37Rv 和 H37Ra 感染 J774 细胞, H37Rv 引起的凋亡比 H37Ra 要小,是由于其上调了 Bcl-2 的表达。

另外,已有文献报导 MTB 中存在一些与毒力有关的抗凋亡基因或成分,如 *nuoG*、*PknE*、*SecA2* 基因,以及 MPT64 抗原等^[17-18]。*nuoG* 被证实是 MTB 的一个毒力基因,其突变株会促进宿主细胞凋亡,但相关的机制还不清楚^[19]。同时,还发现两个能抑制宿主细胞凋亡的基因:*PknE* 和 *SecA2*, *PknE* 基因编码的蛋白是 MTB 的一个真核样的跨膜丝氨酸/苏氨酸激酶,参与将细菌的外部信号传导至胞浆,它的一个启动子能感受 NO 压力,通过阻止宿主细胞的信号通路而抑制细胞凋亡^[20]。*SecA2* 基因编码 MTB 的一个毒力相关蛋白的分泌系统中的一个成分,因为超(过)氧化物歧化酶(SodA)缺少经典的输出信号序列,需要靠 *SecA2* 才能被输出到细胞外,研究发现 *SecA2* 突变株通过减少 SodA 的分泌而增加了宿主巨噬细胞的凋亡,并且显著提高了抗原特异性 CD8+T 的启动,免疫效果强于 BCG^[21-22]。

综上,MTB 对宿主细胞凋亡的调控呈现出复杂性,MTB 的某些毒力基因或编码产物能通过调控感染细胞的凋亡效应进而发挥自己的致病作用(表 1)。

为包含有细菌的凋亡小体被新的巨噬细胞吞噬后而直接将细菌杀死^[32-33],也可能是树突状细胞(DC)吞噬含菌的凋亡小体后启动了T细胞的获得性免疫反应^[34],而毒力MTB能避免外周抗原交叉呈递启动毒性T细胞^[35-37]。

3.2 从宿主角度看

MTB感染细胞后,一般被巨噬细胞吞噬,之后形成吞噬溶酶体将细菌杀死,但如果机体的免疫能力不强的话,一般的免疫功能就不能成功地将细菌清除,机体便通过启动细胞凋亡的方式来清除外来细菌,以牺牲部分细胞来达到防御病原体感染的目的。然而,如果MTB感染引起巨噬细胞过度凋亡,超过巨噬细胞的吞噬能力,则没有足够的未感染巨噬细胞来吞噬含菌的凋亡小体,这样凋亡细胞不能将细菌杀死(特别是毒力MTB),等凋亡的细胞发展到坏死状态后,细菌便会从细胞中逃离出来,在胞外增殖或感染新的细胞,从而加速了感染过程。另外,如果是具有免疫功能的巨噬细胞凋亡过度,则免疫细胞的数量会很少,不能有效地启动获得性免疫反应,而在感染的后期阶段,机体的获得性免疫反应对控制感染具有非常重要的作用。因此,只有合适的细胞凋亡才能对MTB感染起到防御保护作用。

4 意义

研究MTB与宿主细胞之间的相互作用具有临床意义,特别是MTB基因组中的凋亡相关基因,如研究已经发现的凋亡相关基因 $nuoG$ 基因、 $PknE$ 、 $SecA2$ 和 $ESAT6$ 蛋白都可以用来研究潜在的药物靶标以及改善现有疫苗的免疫效果和研制新的疫苗^[38]。因为 $nuoG$ 基因编码NDH-1酶的一个亚单位,影响该酶的活性,而该酶与细胞凋亡相关,如果针对该基因设计一种药物能特异抑制该酶的活性就可以作为化疗药物。同样, $SecA2$ 编码的蛋白能够影响超氧化物歧化酶(SodA)的分泌,而SodA已被证实能抑制宿主细胞凋亡,因此也可以作为药物靶标。

5 结论

通过上面的分析可以总结出MTB感染巨噬细胞后引起细胞凋亡的大致过程:在感染的起始阶段,细胞的载菌量还很低,主要引起细胞凋亡,等到感染的后期阶段,细菌在胞内已大量增殖,此时细菌就显示其毒性而引起细胞坏死,胞内的细菌被释放出去,而大量被释放出的毒性细菌会引起周围细胞的坏死。虽然,MTB能影响宿主细胞的凋亡,但是研究凋亡细胞和吞噬细胞之间的相互作用对探索细胞凋亡机制也有很重要的作用,因为吞噬细胞可能启动和调节了细胞的凋亡。研究发现吞噬细胞不仅决定凋亡细胞的命运,即将死亡的凋亡细胞也会影响吞噬细胞的存活,凋亡细胞由吞噬细胞清除,而吞噬来源于血细胞,血细胞分化成巨噬细胞依赖于凋亡细胞的存在^[39]。但是,凋亡细胞和巨噬细胞之间的关系还没确切得到阐明,凋亡细胞发出“吞噬我”的信号以及吞噬细胞的吞噬机制还不清楚。

参考文献 (References)

- [1] Derrick S C, Morris S L. The ESAT6 protein of mycobacterium tuberculosis induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression[J]. *Cell Microbiol*, 2007, 9(6): 1547-1555.
- [2] Porcelli S A, Jacobs W R. Tuberculosis: Unsealing the apoptotic envelope [J]. *Nature Immunol*, 2008, 9(10): 1101-1102.
- [3] Klingler K, Tchou-Wong K M, Brandli O. Effects of mycobacteria on regulation of apoptosis in mononuclear phagocytes [J]. *Infect Immun*, 1997, 65(12): 5272-5278.
- [4] Keane J, Balcewicz-Sablinska M K, Remold H G. Infection by mycobacterium tuberculosis promotes human alveolar macrophage apoptosis[J]. *Infect Immun*, 1997, 65(1): 298-304.
- [5] Clay H, Volkman H E, Ramakrishnan L. Tumor necrosis factor signaling mediates resistance to mycobacteria by inhibiting bacterial growth and macrophage death[J]. *Immunity*, 2008, 29(2): 283-294.
- [6] Placido R, Mancino G, Amendola A, et al. Apoptosis of human monocytes/macrophages in Mycobacterium tuberculosis infection [J]. *J Pathol*, 1997, 181(1): 31-38.
- [7] Danelishvili L, McGarvey J, Li Y J. Mycobacterium tuberculosis infection causes different levels of apoptosis and necrosis in human macrophages and alveolar epithelial cells[J]. *Cell Microbiol*, 2003, 5(9): 649-660.
- [8] Arcila M L, Sanchez M D, Ortiz B. Activation of apoptosis, but not necrosis, during mycobacterium tuberculosis infection correlated with decreased bacterial growth: Role of TNF- α , IL-10, caspases and phospholipase A2[J]. *Cell Immunol*, 2007, 249(2): 80-93.
- [9] Rojas M, Barrera L F, Puzo G. Differential induction of apoptosis by virulent mycobacterium tuberculosis in resistant and susceptible murine macrophages: Role of nitric oxide and mycobacterial products [J]. *J Immunol*, 1997, 159(3): 1352-1361.
- [10] López M, Sly L M, Luu Y, et al. The 19-kDa mycobacterium tuberculosis protein induces macrophage apoptosis through Toll-like receptor-2 [J]. *J Immunol*, 2003, 170(5): 2409-2416.
- [11] Sanchez A, Espinosa P, Esparza M A, et al. Mycobacterium tuberculosis 38-kDa lipoprotein is apoptogenic for human monocyte-derived macrophages[J]. *Scand J Immunol*, 2009, 69(1): 20-28.
- [12] Gan H, Lee J, Ren F, et al. Mycobacterium tuberculosis blocks crosslinking of annexin-1 and apoptotic envelope formation on infected macrophages to maintain virulence[J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(10): 899-906.
- [13] Keane J, Remold H G, Kornfeld H. Virulent mycobacterium tuberculosis strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages [J]. *J Immunol*, 2000, 164(4): 2016-2020.
- [14] Riendeau C J, Kornfeld H. THP-1 cell apoptosis in response to Mycobacterial infection[J]. *Infect Immun*, 2003, 71(1): 254-259.
- [15] Dhiman R, Raje M, Majumdar S. Differential expression of NF- κ B in mycobacteria infected THP-1 affects apoptosis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1770(4): 649-658.
- [16] Zhang J, Jiang R, Takayama H. Survival of virulent mycobacterium tuberculosis involves preventing apoptosis induced by Bcl-2 upregulation and release resulting from necrosis in J774 macrophage [J]. *Microbiol Immunol*, 2005, 49(9): 845-852.
- [17] Mustafa T, Wiker H G, Morkve O, et al. Differential expression of

- mycobacterial antigen MPT64, apoptosis and inflammatory markers in multinucleated giant cells and epithelioid cells in granulomas caused by *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Virchows Archiv*, 2008, 452(4): 449-456.
- [18] Mustafa T, Wiker H G, Morkve O, *et al.* Reduced apoptosis and increased inflammatory cytokines in granulomas caused by tuberculous compared to non-tuberculous mycobacteria: Role of MPT64 antigen in apoptosis and immune response [J]. *Clin Exp Immunol*, 2007, 150(1): 105-113.
- [19] Velmurugan K, Chen B, Miller J L. *Mycobacterium tuberculosis* nuoG is a virulence gene that inhibits apoptosis of infected host cells [J]. *PLoS Pathogens*, 2007, 3(7): e110.
- [20] Jayakumar D, Jacobs W R, Jr, Narayanan S. Protein kinase E of *Mycobacterium tuberculosis* has a role in the nitric oxide stress response and apoptosis in a human macrophage model of infection[J]. *Cell Microbiol*, 2008, 10(2): 365-374.
- [21] Braunstein M, Espinosa B J, Chan J. SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Mol Microbiol*, 2003, 48(2): 453-464.
- [22] Hinchey J, Lee S. Enhanced priming of adaptive immunity by a proapoptotic mutant of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(8): 2279.
- [23] Siegel R M. Caspases at the crossroads of immune-cell life and death [J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6: 308-317.
- [24] Balcewicz-Sablinska M K, Keane J, Kornfeld H. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF- α [J]. *J Immunol*, 1998, 161(5): 2636-2641.
- [25] Oddo M, Renno T, Attinger A. Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *J Immunol*, 1998, 160(11): 5448-5454.
- [26] Sly L M, Hingley-Wilson S M, Reiner N E. Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in host macrophages involves resistance to apoptosis dependent upon induction of antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1 [J]. *J Immunol*, 2003, 170(1): 430-437.
- [27] Lee J, Remold H G, Jeong M H. Macrophage apoptosis in response to high intracellular burden of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by a novel caspase-independent pathway [J]. *J Immunol*, 2006, 176(7): 4267-4274.
- [28] Rojas M, Barrera L F, García L F. Induction of apoptosis in murine macrophages by *Mycobacterium tuberculosis* is reactive oxygen intermediates-independent[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 247: 436-442.
- [29] Rojas M, Olivier M, Gros P. TNF- α and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages[J]. *J Immunol*, 1999(162): 6122-6131.
- [30] McKinney J D, zu Bentrop K H. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase[J]. *Nature*, 2000, 406: 735-738.
- [31] Stewart G R, Robertson B D, Young D B. Tuberculosis: A problem with persistence[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2003, 1: 97-105.
- [32] Fratazzi C, Arbeit R D, Carini C. Programmed cell death of *Mycobacterium avium* serovar 4-infected human macrophages prevents the mycobacteria from spreading and induces mycobacterial growth inhibition by freshly added, uninfected macrophages [J]. *J Immunol*, 1997, 158(9): 4320-4327.
- [33] Molloy A, Laochumroonvorapong P, Kaplan G. Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guerin[J]. *Exp Med*, 1994, 180(4): 1499-1509.
- [34] Schaible U E, Winau F, Sieling P A. Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis [J]. *Nat Med*, 2003, 9(8): 1039-1046.
- [35] Kaufmann S H. Tuberculosis: Back on the immunologists'agenda[J]. *Immunity*, 2006, 24(4): 351-357.
- [36] Winau F, Hegasy G, Kaufmann S H. No life without death-apoptosis as prerequisite for T cell activation[J]. *Apoptosis*, 2005, 10(4): 707-715.
- [37] Winau F, Kaufmann S H, Schaible U E. Apoptosis paves the detour path for CD8 T cell activation against intracellular bacteria[J]. *Cell Microbiol*, 2004, 6(7): 599-607.
- [38] Grode L, Seiler P, Baumann S. Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin mutants that secrete listeriolysin[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(9): 2472-2479.
- [39] Tepass U, Fessler L I, Aziz A. Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila* [J]. *Development*, 1994, 120(7): 1829-1837.

(责任编辑 王芷)

·学术动态·



“第十二次全国临床药理学学术会议”征文

中国药理学会将于2010年10月22-25日在湖北省武汉市召开第十二次全国临床药理学学术会议。会议现面向相关科研院所、医疗机构、制药企业同仁征稿,会议举办期间还将对35岁以下青年进行优秀论文评选活动。此外,本次大会将授予国家级医学继续教育(I类)学分10分。

会议主题为:新药临床评价与上市后药物再评价、上市中药的临床评价、药物临床研究中的政策法规及临床试验机构的规范化管理、国家新药创制重大科技专项的建设、药物警戒与临床合理用药进展、遗传药理学与个体化用药及其相关领域、临床药物代谢动力学研究以及临床药理学研究的共性问题。

征文截稿日期为2010年7月30日。

联系方式:武汉市航空路13号华中科技大学同济医学院临床药理研究所(430030),徐戎;电话:027-83692628;传真:027-83692628;电子信箱:lcyldh12@163.com。