

· 论 著 ·

NOD2 信号对人肺泡巨噬细胞抗结核分枝杆菌活性的影响及机制研究*

阳大庆¹, 石丽萍^{2△}, 张普山³

(1. 湖南医药学院医学检验系, 湖南怀化 418000; 2. 湖南医药学院药理学系, 湖南怀化 418000;

3. 广东省人民医院, 广东广州 510030)

摘要:目的 研究核苷酸结合寡聚化结构域 2(NOD2)信号在天然抗结核免疫中的作用。方法 平板计数法评价 NOD2 信号对人肺泡巨噬细胞杀结核分枝杆菌效应的影响; 流式细胞术和聚合酶链反应(PCR)检测 NOD2 的表达; 实时荧光定量 PCR 检测一氧化氮合成酶(iNOS)和 DEF4B mRNA 的表达水平; 还原型二氯荧光素(DFCH)探针法测定活性氧(ROS)水平。结果 NOD2 信号增强了人肺泡巨噬细胞对结核分枝杆菌 H37RV 的杀灭。NOD2 信号刺激后, 人肺泡巨噬细胞中一氧化氮(NO)的分泌和 DEF4B 的表达均有所增加, 但 ROS 水平变化不明显。结论 NOD2 可能通过诱导 NO 和抗菌肽 DEF4B 的产生参与了早期的抗结核感染免疫。

关键词:核苷酸结合寡聚化结构域 2; 结核分枝杆菌; 巨噬细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.10.008

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)10-1338-03

NOD2 stimulation enhances the innate immunity against *Mycobacterium tuberculosis* in human alveolar macrophages^{*}Yang Daqing¹, Shi Liping^{2△}, Zhang Pushan³

(1. Department of Laboratory Medicine, Hunan University of Medicine, Huaihua, Hunan 418000, China;

2. Department of pharmacy, Hunan University of Medicine, Huaihua, Hunan 418000, China;

3. Guangdong General Hospital, Guangzhou, Guangdong 510030, China)

Abstract: Objective To evaluate the role of nucleotide-binding oligomerization domain 2(NOD2) stimulation in innate immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. **Methods** Plate counting as used to evaluate the effect of resisting *Mycobacterium tuberculosis* in human alveolar macrophages. Intracellular NOD2 expression were detected by flow cytometry. Quantitative real-time PCR was performed to determine the NOD2, inducible nitric oxide synthase(iNOS), and DEF4B mRNA expression levels using the comparative threshold cycle method of relative quantitation. Reactive oxygen species(ROS) were detected by the DFCH probe. **Results** NOD2 stimulation enhanced the control of intracellular mycobacterial growth in human alveolar macrophages. Although ROS concentration did not changed, the secretion of Nitro Oxygen and the expression of cathelicidin DEF4B were significantly increased following NOD2 stimulation in human alveolar macrophages. **Conclusion** NOD2 stimulation may be involved in the early innate control of *Mycobacterium tuberculosis* primary infections inducing the generation of Nitro Oxygen and the peptides cathelicidin DEF4B.

Key words: nucleotide-binding oligomerization domain 2; *Mycobacterium tuberculosis*; macrophage

结核病是由结核分枝杆菌所致的以呼吸系统感染为主的慢性传染病。结核病是严重威胁着人类健康,同时也给社会带来沉重负担的疾病。目前,全世界现有结核病患者 2 000 万,每年新发病例约 900 万,每年死亡人数高达 300 万,结核病防治的形势非常严峻。我国是结核防治负担最重的国家之一,结核病患者人数位居世界第 2,仅次于印度,被世界卫生组织列为全球 22 个结核病高负担国家之一,每年新发肺结核病患者 145 万。尤其是耐药性结核分枝杆菌的出现更使结核病的防治面临巨大的挑战,因此寻找新的抗结核杆菌感染的方法有着重要的意义。核苷酸结合寡聚化结构域 2(NOD2)是一种胞内模式识别受体,属于 NOD 样受体(NLR)家族。现已证实, NOD2 在炎性因子产生和抗铜绿假单胞菌、肺炎链球菌等呼吸道感染中发挥着重要作用^[1-2]。有研究表明, NOD2 缺陷的小鼠对胞内结核分枝杆菌的控制能力大大下降^[3],这提示 NOD2 可能在天然抗结核免疫中同样起着至关重要的作用。然而, NOD2 究竟通过何种机制来调控和影响抗结核免疫仍不清楚。笔者利用人肺泡巨噬细胞为研究对象,揭示了 NOD2 信号对

其抗结核分枝杆菌活性的影响,并对产生这种影响的机制作了初步的探讨。

1 材料与方法

1.1 巨噬细胞来源 巨噬细胞分离自 15 例志愿者的支气管肺泡灌洗液,15 例志愿者均来自广东省人民医院呼吸病中心,均为抗人类免疫缺陷病毒 1、2 型(HIV-1、2)阴性,胸片正常,无结核暴露史。

1.2 人肺泡巨噬细胞的分离和培养 参考有关文献[4],行支气管肺泡灌洗术。收集灌洗液,2 000 r/min 离心后,弃上清,用 RPMI1640 培养液(含 5%小牛血清)重悬细胞。

1.3 结核分枝杆菌的培养、感染与计数 将人肺泡巨噬细胞按每孔 2×10^5 接种于 24 孔板,按细胞比细菌 5 : 1 的比例加入结核分枝杆菌 H37Rv(ATCC 25618),37 °C 孵育 1 h,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 5 次,洗去胞外的细菌,加入终浓度为 10 μg/mL 的镁依赖性磷酸酶(MDP, InvivoGen 公司,37 °C 分别培养 0、24、48、72 h 后,加入 0.1% Triton X100 裂解细胞,将裂解液移入无菌环氧树脂(EP)管中,10 000 r/min 离心 2 min,

* 基金项目:湖南省怀化市科技计划项目(2013-30)。 作者简介:阳大庆,男,副教授,主要从事抗感染免疫研究。 △ 通讯作者,E-mail: slpoydq@126.com。

去上清,用 500 μ L Middlebrook 7H9 培养液重悬,作 10 倍倍比稀释后,涂 Middlebrook 7H11(含 10% OADC)平板,37 $^{\circ}$ C,保持湿度培养 14~21 d,计数菌落数。

1.4 胞内 NOD2 蛋白的流式检测 离心收集人肺泡巨噬细胞,加入破膜缓冲液(Biolegend 公司)、羊抗人 NOD2 和相应同型对照(Biolegend 公司),4 $^{\circ}$ C 作用 20 min,洗涤细胞 1 次,加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记的驴抗羊 IgG(Santa Cruz 公司),4 $^{\circ}$ C 避光作用 20 min,洗涤后用 1% 多聚甲醛固定后,于流式细胞仪上机检测。

1.5 一氧化氮(NO)的检测 将人肺泡巨噬细胞按每孔 2×10^5 铺 24 孔板,在每孔中加入 PBS 或终浓度为 10 μ g/mL 的 MDP 和 1 μ g/mL 脂多糖(LPS, InvivoGen 公司),37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养 24 h,收集上清,按试剂盒(碧云天公司)操作说明书检测 NO 水平。

1.6 NOD2、一氧化氮合成酶(iNOS)与 DEF4B 基因表达的检测 采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)法,引物设计见表 1。收集经过不同处理的人肺泡巨噬细胞,按照 Catrimox-14TM RNA 提取纯化试剂盒(TaKaRa 公司)的说明提取

总 RNA,取 2 μ g RNA 提取物按照 RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司)操作说明书进行 RT-PCR。RT-PCR 反应:2 μ L 单链 DNA 模板,2 \times SYBR Premix EXtaq 10 μ L,0.05 mmol/L dNTP,10 μ mol/L 引物 0.4 μ L,50 \times Rox reference dye,灭菌去离子水补足至 20 μ L,95 $^{\circ}$ C 预变性 10 s,95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,共 40 个循环。以 GAPDH 为内参照,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 相对定量法进行计算,PCR 定量以相对于对照组的变化倍数形式表示。

1.7 活性氧类(ROS)检测 将人肺泡巨噬细胞按每孔 2×10^5 铺 24 孔板,用对 ROS 敏感的还原型二氯荧光素(DCFH)荧光探针(碧云天公司)标记细胞,在每孔中加入 PBS 或终浓度为 10 μ g/mL 的 MDP 和 1 μ g/mL LPS,用 EnVision 多标记分析系统在激发光 485 nm,发射光 535 nm 测定细胞内产生的荧光量的变化,反映细胞内 ROS 的产生量。

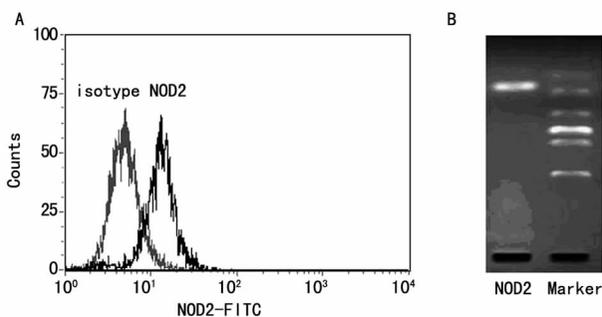
1.8 统计学处理 各组实验独立重复 3 次,用 SPSS13.0 软件分析结果,各样本处理前后 NO 水平、iNOS 与 DEF4B 相对表达量和 DCFH-DA 荧光强度均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 各基因 Realtime PCR 引物的设计

基因名称	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
GAPDH	ATT GTC CGT CGC TAG TCC GT	CAG CTG TTT TGG TCG CAC GAA
iNOS	GGA CAT TAA CAA CAA CGG AA	AGT GTC ATG CAA AAT CTC TCC
NOD2	AAT AGA GCT GAG ACG CCT T	GTC TGG TAA GGA TTA TGC AT
DEF4B	AGT TTG TGC TAT TCG ACG	GG ACC AGT GCT ATT CGT

2 结 果

2.1 NOD2 在人肺泡巨噬细胞中的表达 流式细胞术结果显示,人肺泡巨噬细胞胞浆中存在 NOD2 蛋白的表达,同时,PCR 结果表明 NOD2 基因在该细胞中也有表达,见图 1。



A:流式细胞术检测人肺泡巨噬细胞中的 NOD2;B:PCR 检测人肺泡巨噬细胞 NOD2 的表达;Marker:蛋白质标记物。

图 1 NOD2 在人肺泡巨噬细胞中的表达

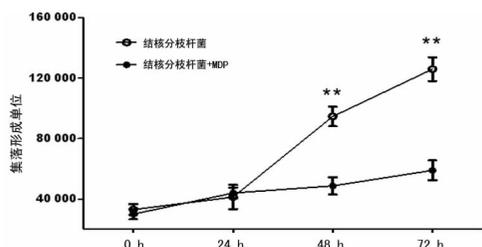
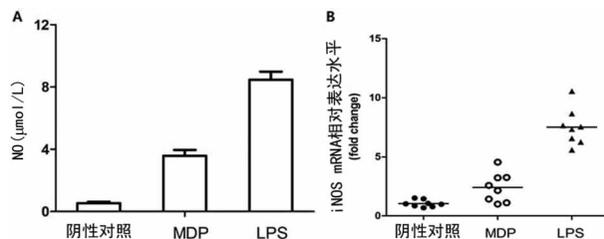


图 2 NOD2 信号对人肺泡巨噬细胞抗结核分枝杆菌活性的影响

2.2 NOD2 信号对人肺泡巨噬细胞抗结核分枝杆菌活性的影响 MDP 刺激后,人肺泡巨噬细胞对结核分枝杆菌 H37Rv 在

胞内生长的控制能力明显增强。从 48 h 以后,加入 MDP 组和未加入 MDP 组开始出现差异,72 h 时未加入 MDP 组的胞内细菌数为 MDP 处理组的 2.14 倍,见图 2。

2.3 NOD2 信号对人肺泡巨噬细胞 NO 分泌及 iNOS 表达的影响 MDP 刺激后,人肺泡巨噬细胞 NO 的分泌和 iNOS 的表达均有不同程度的增强,见图 3,但较阳性对照 LPS 的作用弱。



A:NO 的分泌水平;B:iNOS 的表达水平。

图 3 NOD2 信号对人肺泡巨噬细胞 NO 分泌及 iNOS 表达的影响

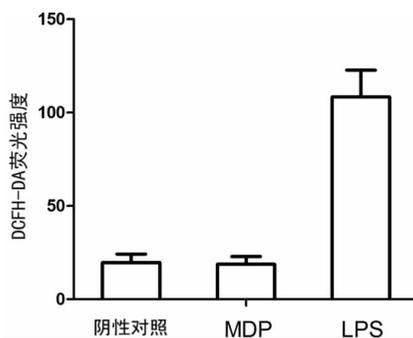


图 4 NOD2 信号对人肺泡巨噬细胞 ROS 分泌的影响

2.4 NOD2 信号对人肺泡巨噬细胞 ROS 分泌的影响 MDP

刺激后,人肺泡巨噬细胞 ROS 的分泌变化并不明显,见图 4。而作为阳性对照的 LPS 却诱导了明显的 ROS 产生。

2.5 NOD2 信号对人肺泡巨噬细胞 DEF4B 表达的影响

MDP 刺激后,人肺泡巨噬细胞中抗菌肽 DEF4B 基因的表达明显上调,见图 5。

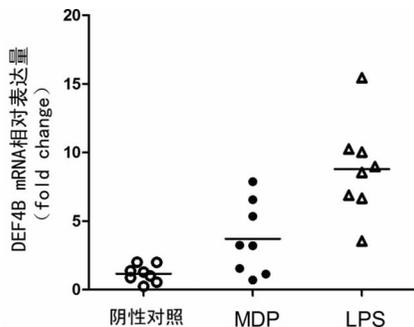


图 5 NOD2 信号对人肺泡巨噬细胞 DEF4B 表达的影响

3 讨论

NOD2 是一种胞内模式识别受体,其与配体结合后,可以诱发一系列炎性因子的产生^[5-7],从而在抗感染免疫中发挥重要作用。近年来,关于 NOD2 对抗胞内菌感染的贡献日益受到人们的关注,这其中就包括了结核分枝杆菌的感染^[8]。有研究表明,NOD2 缺陷的小鼠控制结核分枝杆菌的能力明显减弱^[3],说明 NOD2 在天然抗结核免疫中具有重要作用。

巨噬细胞既是结核分枝杆菌寄生的场所,同时又是抗结核免疫的主要效应细胞。最近,人们发现 NOD2 可以在人肺泡巨噬细胞中表达^[9],但其在结核天然免疫中的作用及机制并不清楚。笔者利用流式细胞术和 PCR 的方法分别在蛋白和基因水平证实了 NOD2 在人肺泡细胞中的表达。在天然抗结核免疫中,巨噬细胞主要通过 NO 和 ROS 的分泌、自噬作用及抗菌肽的释放来杀灭胞内结核分枝杆菌^[10-11]。有研究证实,NOD2 信号刺激能诱导自噬酶 IRGM 的高表达和抗菌肽 LL37 的分泌,从而增强巨噬细胞杀灭结核分枝杆菌的效应^[12]。本研究结果也表明,NOD2 信号刺激能增强人肺泡巨噬细胞对胞内结核分枝杆菌的控制。为了进一步阐明这种效应的作用机制,笔者评价了 NOD2 信号刺激对人肺泡巨噬细胞 NO、ROS 及另外一种重要的抗菌肽——DEF4B 的分泌或表达的影响。研究结果显示,MDP 刺激后,人肺泡巨噬细胞中 NO 的分泌和 DEF4B 的表达水平明显增加,这提示 NOD2 可能通过这两者在抗结核天然免疫中发挥作用。令人意外的是,MDP 刺激后,ROS 水平变化并不明显,这可能与 NOD2 信号激发的基因表达谱有关。

总而言之,本研究结果提示 NOD2 可能参与了早期的抗结核感染免疫,从而阻止疾病的进展。这种效应与其诱导的

NO 和抗菌肽 DEF4B 的产生有关,而与 ROS 关系并不明显,其具体机制仍待进一步研究证实。

参考文献

- [1] Hippenstiel S, Opitz B, Schmeck B, et al. Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia—molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction[J]. *Respir Res*, 2006, 7(1):97.
- [2] Kanneganti TD, Lamkanfi M, Núez G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease[J]. *Immunity*, 2007, 27(4): 549-559.
- [3] Divangahi M, Mostowy S, Coulombe F, et al. NOD2-deficient mice have impaired resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection through defective innate and adaptive immunity[J]. *J Immunol*, 2008, 181(10):7157-7165.
- [4] Juárez E, Nuez C, Sada E, et al. Differential expression of Toll-like receptors on human alveolar macrophages and autologous peripheral monocytes[M]. *Respir Res*, 2010, 11(1):2.
- [5] Park JH, Kim YG, Núez G. RICK promotes inflammation and lethality after gram-negative bacterial infection in mice stimulated with lipopolysaccharide[J]. *Infect Immun*, 2009, 77(4): 1569-1578.
- [6] Werts C, le Bourhis L, Liu J, et al. Nod1 and nod2 induce CCL5/RANTES through the NF-kappaB pathway[J]. *Eur J Immunol*, 2007, 37(9):2499-2508.
- [7] Ekman AK, Cardell LO. The expression and function of Nod-like receptors in neutrophils[J]. *Immunology*, 2010, 130(1):55-63.
- [8] Jo EK. Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs, C-type lectins, and NLRs[J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2008, 21(3):279-286.
- [9] Brooks MN, Rajaram MV, Azad AK, et al. NOD2 controls the nature of the inflammatory response and subsequent fate of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. bovis* BCG in human macrophages[J]. *Cell Microbiol*, 2011, 13(3):402-418.
- [10] Amer AO, Swanson MS. Autophagy is an immediate macrophage response to *Legionella pneumophila*[J]. *Cell Microbiol*, 2005, 7(6):765-778.
- [11] Amer AO, Byrne BG, Swanson MS. Macrophages rapidly transfer pathogens from lipid raft vacuoles to autophagosomes[J]. *Autophagy*, 2005, 1(1):53-58.
- [12] Juárez E, Carranza C, Hernández-Sánchez F, et al. NOD2 enhances the innate response of alveolar macrophages to *Mycobacterium tuberculosis* in humans[J]. *Eur J Immunol*, 2012, 42(4): 880-889.

(收稿日期:2015-02-28)

(上接第 1337 页)

the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities[J]. *J Med Genet*, 2006, 43(6):478-489.

- [7] Linardopoulou EV, Williams EM, Fan Y, et al. Human subtelomeres are hot spots of interchromosomal recombination and segmental duplication[J]. *Nature*, 2005, 437(7055):94-100.
- [8] 张菁菁, 胡平, 罗春玉, 等. 应用多重连接依赖探针扩增技术快速检测胎儿染色体非整倍体与结构异常[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2014, 31(1):11-15.

- [9] Gignac J, Danis K, Tihy F, et al. Prenatal detection of subtelomeric rearrangements by multi-subtelomere FISH in a cohort of fetuses with major malformations[J]. *Am J Med Genet A*, 2006, 140(24):2768-2775.
- [10] Bruno DL, Burgess T, Ren H, et al. High-throughput analysis of chromosome abnormality in spontaneous miscarriage using an MLPA subtelomere assay with an ancillary FISH test for polyploidy[J]. *Am J Med Genet A*, 2006, 140(24):2786-2793.

(收稿日期:2015-03-10)