

DOI:10.13350/j.cjpb.230304

• 论著 •

干扰 Wnt5a 对 BCG 诱导的 TC-1 细胞炎症反应的 调控作用研究^{*}

原筱潭^{1,2}, 马亚博^{1,2}, 苗中奥^{1,2}, 陈琪^{1,2}, 聂雪伊^{1,2}, 徐金瑞^{1,2}, 杨易^{1,2,*}

(1. 宁夏大学西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室, 宁夏银川 750021; 2. 宁夏大学生命科学学院微生物与分子生物学系)

【摘要】 目的 探究干扰 Wnt5a 对卡介苗(BCG)感染的小鼠肺上皮细胞(TC-1)炎症反应的调控作用,并阐明其作用机制。**方法** 慢病毒干扰 Wnt5a 处理 TC-1 细胞系及其阴性对照细胞系后 BCG 感染 24h。设置 4 个实验组:NC 组、NC+BCG 组、Si-3 组和 Si-3+BCG 组。通过 Western blot 检测 Toll 样信号通路 TLR2、TLR4、Myd88、p-NF-κB 和 NF-κB 炎症相关蛋白表达水平,免疫荧光法检测各实验组 p-NF-κB 表达情况,qRT-PCR 检测 Toll 样信号通路 TLR2、TLR4、Myd88、p-NF-κB 和 NF-κB 等基因 mRNA 表达水平,ELISA 检测细胞培养上清促炎因子 TNF-α、IL-6 和 IL-10 含量。**结果** 与对照组比较,BCG 组炎症相关因子 TLR2、TLR4、Myd88、NF-κB、p-NF-κB 的蛋白表达水平(均 $P < 0.01$)和 mRNA 表达水平均显著上调(均 $P < 0.05$),p-NF-κB 蛋白荧光强度较对照组显著增加,促炎因子 TNF-α 和 IL-6 表达水平升高(均 $P < 0.01$),抑炎因子 IL-10 表达水平降低。与 BCG 组相比,Si-3+BCG 组上述蛋白表达水平(均 $P < 0.05$)和 mRNA 表达水平均(均 $P < 0.01$)显著下调,p-NF-κB 蛋白荧光强度较 BCG 组均显著下调,促炎因子 TNF-α 和 IL-6(均 $P < 0.05$)表达水平显著降低,抑炎因子 IL-10 表达水平显著升高($P < 0.01$)。**结论** 干扰 Wnt5a 可调控卡介苗(BCG)感染的小鼠肺上皮细胞(TC-1)的炎症反应,其调控作用机制是通过 Toll 样信号通路依赖 Myd88 途径抑制 BCG 诱导的 TC-1 炎症反应。

【关键词】 Toll 样信号通路;Wnt5a;BCG;炎症反应

【中图分类号】 R378.91

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)03-0265-06

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Mar;18(3):265-270.]

Study on the effect of interfering Wnt5a on the inflammatory response of BCG-induced TC-1 cells

YUAN Xiao-tan^{1,2}, MA Ya-bo^{1,2}, MIAO Shen-ao^{1,2}, CHEN Qi^{1,2}, NIE Xue-yi^{1,2}, XU Jin-rui^{1,2}, YANG Yi^{1,2} (1. Key Laboratory of Conservation and Utilization of Special Biological Resources in West China, Ministry of Education, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; 2. Department of Microbiology and Molecular Biology, School of Life Sciences, Ningxia University) ***

【Abstract】 Objective To explore the regulatory effect of interference Wnt5a on inflammatory response of mouse lung epithelial cells (TC-1) infected with BCG vaccine and elucidate its mechanism. **Methods** BCG infection was 24h after lentivirus interfered with TC-1 cell line and its negative control cell line treated by Wnt5a. Four experimental groups were set up: NC group, NC+BCG group, Si-3 group and Si-3+BCG group. The expression levels of Toll-like signaling pathway TLR2, TLR4, Myd88, p-NF-κB and NF-κB inflammatory related proteins were detected by western blot, and the expression levels of p-NF-κB in each experimental group were detected by immunofluorescence method. The mRNA expression levels of Toll-like signaling pathway TLR2, TLR4, Myd88, p-NF-κB and NF-κB were detected by qRT-PCR, and the contents of pro-inflammatory cytokines TNF-α, IL-6 and IL-10 in the supernatant of cell culture were detected by ELISA. **Results** Compared with the control group, the protein expression levels (all $P < 0.01$) and mRNA expression levels (all $P < 0.05$) of inflammatory factors TLR2, TLR4, Myd88, NF-κB and p-NF-κB in BCG group were significantly up-regulated, and the fluorescence intensity of p-NF-κB protein was significantly increased compared with the control group. The expression levels of pro-inflammatory cytokines TNF-α and IL-6 were increased (all $P < 0.01$), while the expression levels of anti-inflammatory cytokines IL-10 were decreased. Compared with BCG group, the above protein expression levels (all $P < 0.05$) and mRNA expression levels (all $P < 0.01$) in Si-3+BCG group were significantly down-regulated, the fluorescence intensity of p-NF-κB protein was significantly down-regulated compared with BCG group, and the expression levels of pro-inflammatory factors TNF-α and IL-6 (all $P < 0.05$) were significantly decreased. The

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 31960712, 31960710)。

** **【通讯作者】** 杨 易, E-mail: yangyi@nxu.edu.cn

【作者简介】 原筱潭(2000-),男,宁夏固原人,硕士研究生,主要从事病原微生物学研究。E-mail: 1160572724@qq.com

expression level of anti-inflammatory factor IL-10 was significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion** Interference with Wnt5a can regulate the inflammatory response of BCG infected mouse lung epithelial cells (TC-1) through Toll-like signaling pathway dependent Myd88 pathway to inhibit BCG induced TC-1 inflammatory response.

【Key words】 Toll-like signaling pathway; Wnt5a; BCG; inflammatory reaction

结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb) 是引起结核病 (tuberculosis, TB) 的病原菌, 临床主要表现为肺结核 (PTB), 其次其他身体器官也均可被感染^[1]。Mtb 通过呼吸道传播, 经由肺部扩散, 肺组织损伤可能继发气胸的发生, 病人产生严重胸痛、呼吸困难等症状, 是全球十大疾病死亡原因之一。但是针对 Mtb 药物治疗前景并不明朗, 因此更全面了解 Mtb 的致病分子机制尤为重要。肺部是 Mtb 主要的侵入部位, 当 Mtb 被人体吸入肺部区域后, 首先感染肺泡巨噬细胞和上皮细胞^[2]。当 Mtb 入侵肺泡上皮细胞时, 促使上皮细胞分泌各种细胞因子, 进而引起细胞毒性, 最终促进 Mtb 的扩散和 TB 的发生, 因此小鼠肺部的 TC-1 细胞是良好的 TB 疾病体外研究模型。

Wnt5a (Wingless-type MMTV integration site family member 5a) 作为分泌性脂质修饰糖蛋白 Wnt 家族的一员, 对于胚胎发育, 干细胞分化和受伤组织的再生至关重要。研究证实, Wnt5a 在细胞中的信号转导及表达调控与炎症应答密切相关, 同时 Wnt5a 在免疫细胞和非免疫细胞的免疫应答调节也扮演重要角色^[3]。Toll 样受体 (TLRs) 是一类具有胞外氨基酸的 I 型跨膜蛋白, 分子结构分为胞膜外区, 胞质区和跨膜区三部分, 在病原体识别和消除中起核心作用。TLRs 具有保守的细胞质信号转导 Toll/IL-1R (TLR) 结构域。除 TLR3 外, 病原体相关分子模式 (PAMP) 与 TLR 的结合通过髓样分化蛋白 88 (Myd88) 依赖性途径或含 TLR 结构域的适配器诱导干扰素- β (TRIF) 依赖性途径触发先天性免疫反应, 并启动下游信号事件, 导致促炎细胞因子和 I 型干扰素 (IFN) 的产生^[4,5]。牛结核分枝杆菌减毒株 BCG 在组织细胞内大量增殖引起的炎症, 菌内物质和代谢产物的高毒性造成免疫损伤, 并激活 Toll 受体信号通路使细胞产生免疫反应^[6]。本研究采用慢病毒干扰 TC-1 细胞中 Wnt5a 基因建立稳转体系, 并经 BCG 感染后对 Toll 受体信号通路介导的相关指标进行检测, 旨在揭示干扰 Wnt5a 对 BCG 感染的 TC-1 细胞炎症反应调控作用。

材料与方法

1 材料

1.1 菌株和细胞 牛结核分枝杆菌减毒株 (BCG) 购自上海生物制品研究所有限公司; TC-1 细胞由本实验室保存。

1.2 主要试剂及仪器 BCA 蛋白含量检测试剂及 Wnt5a-sgRNA (08332-1) 和 CON251, 南京凯基公司产品; DMEM 培养基, 胎牛血清及 TrypleTM 胰酶, 美国 Gibco 公司产品; 结核分枝杆菌培养液, 上海晶诺公司产品; 全蛋白提取试剂盒, 美国赛默飞公司产品; Western-blot 配胶试剂盒, 上海雅酶公司产品; GAPDH 兔多克隆一抗, TLR4 鼠单克隆一抗, TLR2、Myd88、p-NF- κ B、NF- κ B 兔多克隆一抗, 美国 Proteintech 公司产品; 鼠抗兔二抗和羊抗兔二抗, 北京中杉金桥公司产品; 4% 多聚甲醛, 美国 BD 公司产品; Triton X-100, 美国 Sigam 公司产品; Hoechst 抗体, 中国碧云天公司产品; 驴血清, 北京索莱宝公司产品; 荧光封片剂, 北京中山金桥公司产品; Alexa Fluor594 (red) 荧光二抗, 南京诺唯赞公司产品; TNF- α 、IL-6 和 IL-10 ELISA 试剂盒, 中国博士德公司产品; 反转录试剂盒, 中国诺维赞公司产品; qRT-PCR 检测试剂盒, 南京诺唯赞公司产品。实时荧光定量 PCR 仪 Quantity Studio5、NanoDrop-800 (赛默飞中国公司产品); GE 化学发光检测仪, 美国 Gene 公司产品; EnSpire 荧光酶标仪, 美国 PerkinElmer 公司产品; 荧光显微镜, 日本 Olympus 公司产品。

2 方法

2.1 慢病毒干扰 Wnt5a 稳定转染细胞株的建立 将 TC-1 细胞以 8×10^5 /孔铺于六孔板中, 37 °C 培养 8~12 h, 待贴壁根据病毒滴度在干扰空载对照组和干扰 Wnt5a 组分别加入 14 μ L 和 20 μ L 慢病毒。在分别加入 40 μ L 感染液 (JA), 37 °C 培养 12 h, 补加 1 mL 培养基。24 h 更换培养基, 37 °C 培养 72 h, 荧光显微镜下观察绿色荧光, 若有即为转染成功。将转染成功的细胞传代, 待贴壁, 加入 2 μ g/mL 嘌呤霉素培养 24 h, 若部分细胞贴壁部分细胞漂浮, 则转染成功。与对照组相比, 对照组全部死亡, 培养传代建立慢病毒干扰 Wnt5a 细胞稳转体系。Wnt5a 慢病毒载体信息见表 1。

表 1 Wnt5a 慢病毒载体信息
Table 1 Information of lentivirus expression vector

名称 Name	病毒名称 Virus name	插入序列 Insert sequence	滴度/浓度 (TU/mL) Titer/Concentration
Wnt5a 干扰载体	Wnt5a-sgRNA (08332-1)	GAAACTCTGCCACTTGTATC	2E+8
干扰阴性对照	CON251	CGCTTCCGCGGCCGTTC	2E+8

2.2 实验分组及细胞培养 共设置 4 个组: (1) NC

组,(2)NC+BCG组,(3)Si-3组,(4)Si-3+BCG组。细胞生长至对数期,以 8×10^5 接种于6孔板中,37℃培养8~12h,待贴壁后以感染复数为 $MOI=20$,将BCG分别加入两种细胞的处理组中,即BCG感染组,以未感染的细胞作为对照组。BCG继续感染24h。各组细胞均置于37℃、5%CO₂培养箱中培养。

2.3 Western blot检测 用全蛋白试剂盒提取各处理组细胞全蛋白,定量后进行10%SDS-PAGE凝胶电泳,电压采用80V上层胶120V下层胶。300mA转膜2h后脱脂乳室温封闭2h;加入一抗4℃孵育过夜,TBST缓冲液洗涤6次,每次5min;加入稀释的山羊抗兔或抗鼠酶标二抗,室温孵育1h,TBST缓冲液洗涤4次,每次5min,TBS缓冲液2次,每次5min;加入ECL显色液,利用GE化学发光检测仪成像。

2.4 免疫荧光检测 将细胞活率达到95%以上的对照组和干扰组细胞以 8×10^5 /孔铺于提前放置了玻璃片的6孔板中,培养基2mL贴壁8~12h,弃培养液;加入新鲜的培养基,用BCG继续感染24h,弃培养基,加PBS清洗3次,每次3min;用4%多聚甲醛室温固定20min,弃固定液,PBS清洗同上;加入0.2%TritonX-100,通透20min,弃通透液,PBS清洗同上;扣片,用脂肪笔沿片边缘画线后加入10%驴血清室温封闭1h;加入一抗,湿盒4℃孵育过夜,PBS润洗;加入荧光二抗,37℃避光静置孵育1h,荧光显微镜拍摄记录图像。

2.5 ELISA检测 分别收集不同处理组细胞培养上清,采用ELISA法测定炎症细胞因子IL-6、TNF-α和IL-10的水平,严格按照试剂盒说明书进行操作。

2.6 qRT-PCR检测 Trizol法提取各处理组细胞总RNA,反转录成cDNA。逆转录反应体系和过程:取RNA 2μL,4×gRNA wiper Mix 4μL,RNase-free ddH₂O补足至16μL,混匀,置42℃,2min,后加入5×Hiscript III qRT-PCR SuperMix 4μL,混匀,逆转录体系分别为37℃,15min和85℃,6s,合成的cDNA -80℃保存。然后采用qRT-PCR方法检测TLR2、TLR4、Myd88、NF-κB基因mRNA的表达。反应体系(20μL):2×ChamQ Universal SYBR qRT-PCR Master Mix 10μL,正向引物0.4μL(10μmol/L),反向引物0.4μL(10μmol/L),Template DNA/cDNA 1μL,RNase-free ddH₂O补足至20μL。反应条件:95℃ 30s;94℃ 10s,60℃ 30s,40个循环;95℃ 15s,60℃ 1min,95℃ 15s。引物信息见表2。

2.7 统计学分析 实验数据均经过3次独立试验验证,采用ImageJ软件分析蛋白表达量,Excel分析整理数据,采用One-Way ANOVA进行统计学分析,采用GraphPadPrim8.0软件绘图。数据用均数±标准

差($\bar{x}\pm s$)表示, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表2 qRT-PCR引物

Table 2 Gene specific primers for qRT-PCR

基因 Gene	前导链 Forward(5'-3')	后随链 Reverse(3'-5')
GAPDH	GGTTGTCTCTGCGACTTCA	TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC
TLR2	TCTAAAGTCGATCCGCGACATT	ACGGGCAGTGGTGAAGAACT
TLR4	TTCAGAGCCGTTGGTGTATC	CTCCCATTCAGGTAGGTGT
Myd88	ATCGCTGTCTTGAACCCCTC	CTCACGGTCTAACAAGGCCAG
NF-κB	ACTGCCGGGATGGCTACTATT	TCTGGATTCTGCTGGCTAATGG

结果

1 干扰 Wnt5a 稳转细胞系建立

为验证慢病毒转染效率及是否建立慢病毒稳转体系,采用Western blot检测干扰Wnt5a组和空载慢病毒对照组中Wnt5a蛋白表达水平,结果表明Wnt5a干扰组中Wnt5a蛋白的相对表达水平低于空白对照组($P<0.05$)(图1B,1C)。免疫荧光显示慢病毒成功转染,结果见图1A,图中绿色荧光即为慢病毒。上述结果表明慢病毒成功转染并干扰Wnt5a蛋白表达。

Figure 1 consists of three panels. Panel A shows two rows of images for Si-3 and Si-NC groups. Each row has a '明场图' (Bright field image) and a '荧光图' (Fluorescence image). The Si-3 fluorescence image shows more green spots than the Si-NC image. Panel B is a Western blot showing bands for Wnt5a and GAPDH in Si-NC and Si-3 groups. Molecular weight markers are indicated at 39 and 36 kDa. The Wnt5a band is significantly weaker in the Si-3 group. Panel C is a bar graph showing 'Wnt5a protein levels' for Si-NC and Si-3 groups. The Si-3 group shows a significantly lower level of Wnt5a protein compared to the Si-NC group, with a p-value indicated as <0.05.

图1 Wnt5a干扰TC-1稳定转染细胞株的建立与鉴定(100×)

A Bright field diagram of Wnt5a interference TC-1 stable transfection cells and green fluorescence diagram of successful transfection of lentivirus B Western blot results of molecules related to Wnt5a C Statistic analysis of Wnt5a protein levels($a P<0.05$)

Fig.1 Establishment and identification of stable transfected cell lines with Wnt5a interference with TC-1(100×)

2 BCG感染TC-1细胞系后Toll信号通路相关蛋白分子的表达

为了揭示Toll样信号通路对BCG诱导慢病毒转染细胞炎性的分子机制,采用Western blot检测各处理组细胞炎性相关蛋白的表达,结果如图2。与对照组相比,BCG感染组炎性通路相关蛋白TLR4、TLR2、Myd88、NF-κB、p-NF-κB上调(均 $P<0.01$),而Si-3+BCG感染组上述蛋白的表达水平低于BCG组($P<0.05$)。表明BCG感染能够刺激TC-1细胞炎性相关反应,而干扰Wnt5a对其具有抑制作用。

3 BCG感染TC-1细胞系后Toll信号通路相关因子mRNA水平的检测

为进一步验证在Toll样信号通路依赖Myd88途径相关因子TLR2、TLR4、Myd88、p-NF-κB和NF-κB

在 TC-1 细胞炎症反应的分子机制,采用 qRT-PCR 对上述分子的 mRNA 水平进行检测(图 3)。与对照组相比,BCG 感染组 TLR2、TLR4、Myd88、NF- κ B 在 mRNA 水平上调(均 $P < 0.05$)。而与 BCG 感染组相比,BCG 和慢病毒干扰 Wnt5a 共处理组 TLR2、TLR4、Myd88 和 NF- κ B 在 mRNA 的水平均下调(均 $P < 0.01$)。表明 BCG 刺激 Myd88 依赖型 TLR 信号转导通路的激活,干扰 Wnt5a 基因对 BCG 引起的炎症反应具有抑制作用。

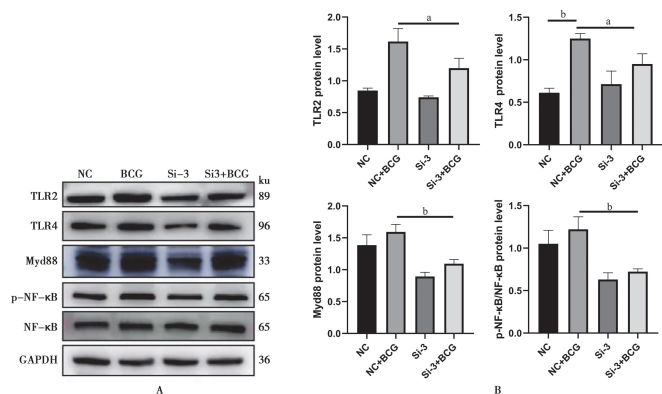
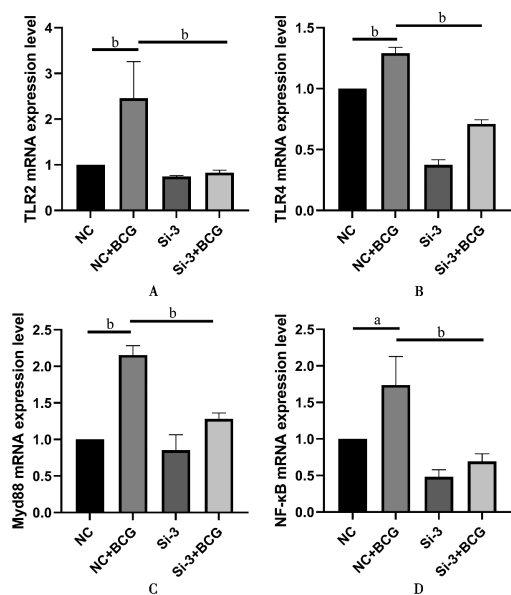


图 2 Wnt5a 干扰稳定转染 TC-1 细胞系中炎症相关蛋白的表达水平
A Toll 样信号通路 Myd88 依赖型相关因子的 Western blot 检测
B TLR2、TLR4、Myd88、NF- κ B、p-NF- κ B 表达的统计分析(组间比较, a $P < 0.05$; b $P < 0.01$)

图 2 Wnt5a 干扰稳定转染 TC-1 细胞系中炎症相关蛋白的表达水平
A Toll-like signaling pathway depended on Western blotting results of Myd88 pathway related molecules B Statistic analysis of TLR2, TLR4, Myd88, NF- κ B and p-NF- κ B expression (a $P < 0.05$; b $P < 0.01$)

Fig. 2 Expression levels of inflammation-related proteins in stably transfected TC-1 cell lines with Wnt5a interference



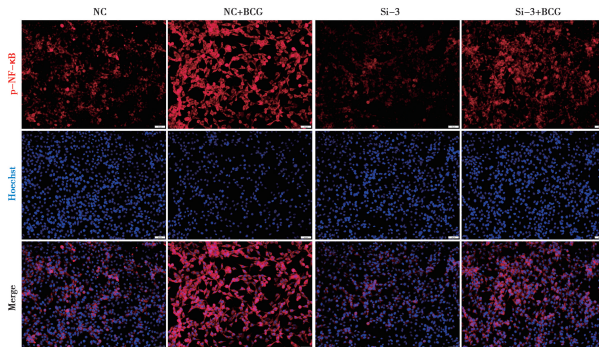
注:组间比较, a $P < 0.05$; b $P < 0.01$ 。

图 3 Wnt5a 干扰稳定转染 TC-1 细胞系中炎症相关蛋白的 mRNA 表达水平

Fig. 3 The mRNA expression of inflammation-related proteins was stabilized in TC-1 cell lines transfected with Wnt5a interference

4 免疫荧光染色检测细胞 p-NF- κ B 的表达水平

NF- κ B 主要有两种活性形态,第一种和 I κ B 结合后以非活性的形态存在于细胞胞浆中,而另一种则是接受激发后 I κ B 磷酸化产生降解,并迅速进入细胞核,再以活性的形态结合 DNA,从而促使相应基因的转录。为进一步验证 NF- κ B 磷酸化,并促进 NF- κ B 在细胞胞浆中解离易位到细胞核,从而启动促炎基因表达和炎症反应,利用 p-NF- κ B 抗鼠抗体(红色)进行免疫荧光染色,细胞核用 Hoechst(蓝色)进行复染,结果见图 4。BCG 感染后,NC+BCG 组细胞与 Si-3+BCG 组细胞较同种细胞对照组中 p-NF- κ B 斑点(红色)的荧光强度与数量均显著增加;而与 NC+BCG 感染组相比, Si-3+BCG 处理组细胞中红色荧光斑点数量和强度均显著降低。表明 BCG 感染刺激 NF- κ B 磷酸化介导炎症反应,干扰 Wnt5a 可通过 TLR/Myd88 信号通路磷酸化 NF- κ B,降低 BCG 刺激的 TC-1 细胞产生的炎症反应。



注:P-NF- κ B 为红色, Hoechst 为蓝色(100 $\times$)。

图 4 免疫荧光法检测 Wnt5a 干扰稳定转染 TC-1 细胞系中 p-NF- κ B 的表达水平

Fig. 4 Fluorescence expression of P-NF- κ B in TC-1 cell lines stably transfected with Wnt5a interference

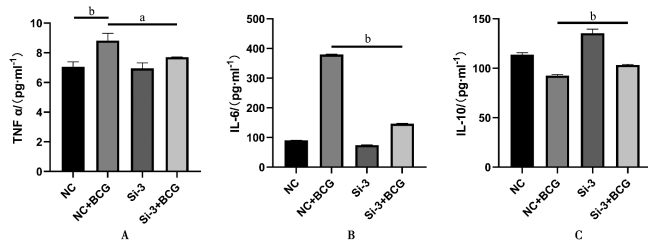
5 BCG 感染 TC-1 细胞系后炎症因子水平的检测

为了进一步说明干扰 Wnt5a 可抑制 BCG 感染造成的细胞炎症反应,采用 ELISA 方法检测各组细胞培养上清中的促炎和抗炎细胞因子 IL-6、TNF- α 、IL-10 水平,结果如图 5。BCG 感染组中促炎因子 TNF- α 和 IL-6 的浓度高于对照组(均 $P < 0.01$), Si-3+BCG 组促炎因子浓度低于 NC+BCG 组($P < 0.05$)。Si-3+BCG 组中抗炎因子 IL-10 浓度高于 NC+BCG 组($P < 0.01$)。表明 BCG 感染 TC-1 细胞引起了炎症反应的发生,而干扰 Wnt5a 能够抑制 BCG 感染引起的细胞炎症反应。

讨论

结核分枝杆菌是兼性胞内寄生菌,不产生内外毒素,其高致病性与微生物在组织细胞内大量生长所产生的炎症、代谢产物的毒害,及其机体内对细菌成分所

引起的免疫性损害密切相关^[7]。聚集的 Mtb 感染会导致促炎相关基因的早期上调,并通过 TLRs/Myd88/NF- κ B 途径增强 IL-6、TNF- α 等一系列炎症因子的信号传导^[8],从而诱发机体产生炎症反应。肺泡上皮细胞作为肺部抵抗细菌的第一道防线,在肺免疫中担负着由先天免疫到获得性免疫的桥梁作用^[9]。Das 等^[10]研究发现肺泡上皮细胞信号传导对于 Mtb 感染早期免疫细胞活化和粘膜定位至关重要,同时肺泡上皮细胞中的 NF- κ B 信号介导早期 CD4T 细胞活化和粘膜定位。Wnt 信号通路在胚胎发育、细胞分化、细胞增殖、细胞凋亡和细胞迁移等方面发挥重要作用^[11]。近年研究发现,Wnt 信号通路还与细胞功能和细胞炎症有关,包括发育和癌症^[12]。本研究通过慢病毒转染,成功建立了 Wnt5a 干扰稳定转染 TC-1 细胞系。



注:组间比较,a $P < 0.05$; b $P < 0.01$ 。

图5 BCG感染对Wnt5a干扰稳定转染TC-1细胞系炎症细胞因子水平的影响

Fig. 5 BCG infection causes Wnt5a to interfere with the release of inflammatory cytokines in stably transfected TC-1 cell lines

先天免疫系统通过 TLRs 识别 PAMP,TLRs 在先天免疫系统中发挥重要作用,调控宿主细胞产生促炎因子、细胞因子和趋化因子活化并募集吞噬细胞抵达感染部位来清除病原菌^[13]。TLRs 主要依靠两条的信号转导通路发挥作用,分别是 Myd88 依赖信号通路和 Myd88 非依赖信号通路^[14]。Myd88 依赖途径中活化的 Myd88 可激活 TNF 受体关联因子 6 (TRAF6),TRAF6 通过与 NF- κ B 抑制因子激酶抑制剂 (IKK) 结合,从而活化 NF- κ B,活化后的 NF- κ B 从胞内进入胞核,激活相关炎症基因的表达^[15-16]。有研究发现 TLR4 通过 NF- κ B 信号通路参与对炎症反应的抑制作用,TLR2 可通过增强 NF- κ B 的活化介导细菌及其产物对机体细胞的激活和损伤^[17]。Bomfim 等^[18]研究发现 TLRs 在哺乳动物中对入侵 MTB 的早期识别以及 TLRs 介导的信号通路在 MTB 感染的免疫应答中均发挥重要作用。本研究旨在探究通过 TLRs/Myd88/NF- κ B 信号通路干扰 Wnt5a 对 BCG 诱导的 TC-1 细胞炎症反应。结果表明,BCG 组细胞上清液 IL-6、TNF- α 促炎因子表达水平显著高于 NC 组,而抑炎因子 IL-10 表达水平降低,同时 BCG 组中 NF- κ B

通路相关蛋白表达均升高。经 Wnt5a 干扰后,IL-6、TNF- α 表达水平较 BCG 组降低,IL-10 表达水平有所上升。NF- κ B 通路相关蛋白表达较 BCG 组下降。表明 Wnt5a 干扰可通过 TLRs/Myd88/NF- κ B 信号通路调控 BCG 感染诱导的 TC-1 细胞炎症反应。

综上所述,Wnt5a 干扰通过抑制 TLRs/Myd88/NF- κ B 信号通路,降低下游炎症因子的表达,证实 BCG 在肺泡上皮细胞中炎症反应的作用^[19],初步阐明 BCG 感染引起的细胞炎症与 Wnt5a 之间的联系,为肺泡上皮细胞抗 MTB 感染的分子机制增添了新内容,也为治疗 MTB 感染引起的炎症反应提供了新思路。

【参考文献】

- [1] Nkwagatse T, Sturm AW. Affinity of *Mycobacterium tuberculosis* strains for M059k microglial cells after migration through A549 alveolar epithelium[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2021, 40 (9): 1881-1889.
- [2] Chen X, Cao X, Lei Y, et al. Distinct persistence fate of *Mycobacterium tuberculosis* in various types of cells [J]. mSystems, 2021, 6(4): e0078321.
- [3] 刘征, 吴洪涛, 倪亚光, 等. Wnt5a 与炎症信号在炎症性疾病中的交叉互动[J]. 生理学报, 2015, 67(4): 437-445.
- [4] Li H, Yoon JH, Won HJ, et al. Isotrifolol inhibits pro-inflammatory mediators by suppression of Tlr/Nf-Kb and Tlr/Mapk signaling in Lps-induced Raw264. 7 cells [J]. Int Immunopharmacol, 2017(45): 110-119.
- [5] Hu YH, Wang Y, Wang F, et al. Spop negatively regulates Toll-like receptor-induced inflammation by disrupting Myd88 self-association[J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18(7): 1708-1717.
- [6] 陈琪, 郑雪迪, 聂雪伊, 等. Wnt5a 调节 BCG 感染肺泡上皮细胞自噬的作用研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(8): 878-883.
- [7] 朱明利, 朱丽. 结核分枝杆菌及其 I 型耐药机制与茜草素作用的研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(1): 97-99, 108.
- [8] Rodel HE, Ferreira I, Ziegler CGK, et al. Aggregated *Mycobacterium tuberculosis* enhances the inflammatory response [J]. Front Microbiol, 2021(12): 757134.
- [9] Yamamoto K, Ahyi AN, Pepper-Cunningham ZA, et al. Roles of lung epithelium in neutrophil recruitment during pneumococcal pneumonia[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2014, 50(2): 253-62.
- [10] Das S, Marin ND, Esaulova E, et al. Lung epithelial signaling mediates early vaccine-induced Cd4(+) T cell activation and *Mycobacterium tuberculosis* control [J]. mBio, 2021, 12(4): e0146821.
- [11] Flanagan DJ, Austin CR, Vincan E, et al. Wnt signalling in gastrointestinal epithelial stem cells[J]. Genes (Basel), 2018, 9 (4): 178.
- [12] Yang W, Dong HP, Wang P, et al. Il-36 γ and Il-36 α reciprocally regulate colon inflammation and tumorigenesis by modulating the cell-matrix adhesion network and wnt signaling[J]. Adv Sci (Weinh), 2022, 9(10): e2103035.
- [13] 李丛哲, 吴利先, 王国富. Toll 样受体 4 在结核分枝杆菌感染中的作用和研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2017, 12(4): 378-

- 380.
- [14] Dutta D, Jana M, Majumder M, et al. Selective targeting of the Tlr2/Myd88/Nf-Kb pathway reduces A-synuclein spreading *in vitro* and *in vivo*[J]. Nat Commun, 2021, 12(1):5382.
- [15] Zhou M, Xu W, Wang J, et al. Boosting mtor-dependent autophagy via upstream Tlr4-Myd88-Mapk signalling and downstream Nf-Kb pathway quenches intestinal inflammation and oxidative stress injury[J]. EBioMedicine, 2018 (35): 345-360.
- [16] Qiao CX, Xu S, Wang DD, et al. Microrna-19b Alleviates lipopolysaccharide-induced inflammatory injury in human intestinal cells by up-regulation of Runx3[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(16):5284-5294.
- [17] Fischer M, Ehlers M. Toll-like receptors in autoimmunity[J]. Ann N Y Acad Sci, 2008(1143):21-34.
- [18] Bomfim CCB, Fisher L, Amaral EP, et al. *Mycobacterium Tuberculosis* Induces Irg1 in murine macrophages by a pathway involving both Tlr-2 and Sting/Ifnar signaling and requiring bacterial phagocytosis[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022 (12):862582.
- [19] 徐金瑞, 郑雪迪, 马伯利, 等. Lxr-Abca1/Abcg1 通路对 bcg 感染的巨噬细胞凋亡和炎症反应的调控作用[J]. 免疫学杂志, 2022, 38(5):401-406.

【收稿日期】 2022-08-31 【修回日期】 2022-11-19

(上接 264 页)

- [7] 伊立超, 李乐天, 郝嘉翼, 等. TGEV-RBD 基因在昆虫杆状病毒中的表达及鉴定[J]. 动物医学进展, 2021, 42(9):65-70.
- [8] Lin CM, Gao X, Oka T, et al. Antigenic relationships among porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus strains[J]. J Virol, 2015(89):3332-3342.
- [9] 郝建伟, 薛春宜, 曹永长. 猪流行性腹泻病毒全病毒灭活疫苗量效关系研究[J]. 畜牧兽医学报, 2022, 53(5):1536-1543.
- [10] 周剑, 陈秀明, 江红. HPLC 法测定 *Streptomyces sp.* 发酵液中 bafilomycin A1 的含量[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(4):730-734.
- [11] Intra B, Euanorasetr J, Nihira T, et al. Characterization of a gamma-butyrolactone synthetase gene homologue (stcA) involved in bafilomycin production and aerial mycelium formation in *Streptomyces sp.* SBI034[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2016 (100):2749-2760.
- [12] Shacka JJ, Klocke BJ, Roth KA. Autophagy, bafilomycin and cell death: the "a-B-cs" of plecomacrolide-induced neuroprotection[J]. Autophagy, 2006(2):228-230.
- [13] Xie X, Lu S, Pan X, et al. Antiviral bafilomycins from a feces-inhabiting *Streptomyces sp.*[J]. J Nat Prod, 2021(84):537-543.
- [14] Khan MM, Lee S, Couoh-Cardel S, et al. Oxidative stress protein Oxl1 promotes V-ATPase holoenzyme disassembly in catalytic activity-independent manner[J]. EMBO J, 2022(41):e109360.
- [15] Collier DA, De Marco A, Ferreira I, et al. Sensitivity of SARS-CoV-2 B. 1. 1. 7 to mRNA vaccine-elicited antibodies[J]. Nature, 2021(593):136-141.
- [16] Wang P, Nair MS, Liu L, et al. Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B. 1. 351 and B. 1. 1. 7[J]. Nature, 2021(593):130-135.
- [17] 顾望, 于世寰. 新型冠状病毒变异谱系的研究进展[J]. 临床肺科杂志, 2022, 27(6):932-935.
- [18] Ma C, Chen X, Mei F, et al. Drastic decline in sera neutralization against SARS-CoV-2 Omicron variant in Wuhan COVID-19 convalescents[J]. Emerg Microbes Infect, 2022(11):567-572.
- [19] Twohig KA, Nyberg T, Zaidi A, et al. Hospital admission and emergency care attendance risk for SARS-CoV-2 delta (B. 1. 617. 2) compared with alpha (B. 1. 1. 7) variants of concern: a cohort study[J]. Lancet Infect Dis, 2022(22):35-42.
- [20] Mauvezin C, Neufeld TP. Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion [J]. Autophagy, 2015(11):1437-1438.
- [21] Ochiai H, Sakai S, Hirabayashi T, et al. Inhibitory effect of bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type proton pump, on the growth of influenza A and B viruses in MDCK cells[J]. Antiviral Res, 1995(27):425-430.
- [22] Niimi K, Asano K, Shiraiishi Y, et al. TLR3-mediated synthesis and release of eotaxin-1/CCL11 from human bronchial smooth muscle cells stimulated with double-stranded RNA [J]. J Immunol, 2007(178):489-495.
- [23] Wang H, Yang P, Liu K, et al. SARS coronavirus entry into host cells through a novel clathrin- and caveolae-independent endocytic pathway[J]. Cell Res, 2008(18):290-301.
- [24] Sabino C, Basic M, Bender D, et al. Bafilomycin A1 and U18666A efficiently impair ZIKV infection[J]. Viruses, 2019, 11(6):524.
- [25] Girsch JH, Walters K, Jackson W, et al. Progeny varicella-zoster virus capsids exit the nucleus but never undergo secondary envelopment during autophagic flux inhibition by Bafilomycin A1 [J]. J Virol, 2019, 93(17):e00505-19.
- [26] Shang C, Zhuang X, Zhang H, et al. Inhibition of autophagy suppresses SARS-CoV-2 replication and ameliorates pneumonia in hACE2 transgenic mice and xenografted human lung tissues[J]. J Virol, 2021(95):e0153721.
- [27] 尚超. 新型冠状病毒干扰宿主细胞自噬过程及其潜在治疗靶点研究[D]. 北京: 军事科学院, 2021.

【收稿日期】 2022-08-30 【修回日期】 2022-11-15