

DOI:10.13350/j.cjpb.220111

• 论著 •

结核分枝杆菌通过诱导宿主产生 S100A8/A9 促进 T 细胞死亡的机制研究^{*}

孙月华, 杨玉玲, 李林昊, 屈沛杰, 柳卫凰, 章晓联, 潘勤^{**}

(武汉大学基础医学院人体解剖学教研室, 湖北省过敏及免疫相关疾病重点实验室, 湖北武汉 430071)

【摘要】 目的 探讨结核分枝杆菌(Mtb)诱导宿主产生的 S100 钙结合蛋白 A8/A9 复合物(S100A8/A9)促进 T 细胞死亡的作用及机制。**方法** 灭活毒性 Mtb H37Rv(iMtb H37Rv)与野生型(WT)小鼠全脾细胞体外共同培养不同时间, 通过流式细胞术得到 S100A8 与 S100A9 的表达差异以及产生 S100A8/A9 的细胞群。Mtb H37Rv 体外诱导 WT 和 S100a9^{-/-} 小鼠全脾细胞, 通过流式细胞术检测 S100A8/A9 对 CD4⁺ T 细胞死亡的影响。采用不同浓度 S100A8/A9 与人 T 淋巴细胞系 Jurkat 细胞共同培养、S100A8/A9 与细胞共培养不同时间或是 S100A8、S100A9 单体以及 S100A8/A9 复合物与细胞共同培养, 通过流式细胞术得到 S100A8/A9 对 Jurkat 细胞死亡的影响。通过 Western blot 检测不同细胞表面 TLR4 的表达差异。封闭 Jurkat 细胞表面 TLR4 受体后与 S100A8/A9 共同培养, 通过流式细胞术得到 Jurkat 细胞死亡的变化。**结果** 与对照组相比, iMtb H37Rv 能诱导脾细胞产生更多的 S100A8 和 S100A9 蛋白。S100A8/A9 能促进小鼠 CD4⁺ T 细胞死亡。低剂量的 S100A8/A9 复合物能诱导 Jurkat 细胞死亡, 且 S100A8 和 S100A9 单体无以上作用。S100A8/A9 复合物诱导 T 细胞死亡为 TLR4 非依赖通路。**结论** Mtb 通过诱导宿主产生 S100A8/A9 并促进 T 细胞死亡。

【关键词】 S100A8/A9; CD3⁺ CD4⁺ T 细胞; Mtb H37Rv; 细胞死亡

【中图分类号】 R378.991

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)01-0049-06

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Jan;17(1):49-54.]

Mycobacterium tuberculosis promotes T lymphocyte death by S100A8/A9 produced by host cells

SUN Yue-hua, YANG Yu-ling, LI Lin-hao, QU Pei-jie, LIU Wei-huang, ZHANG Xiao-lian, PAN Qin

(Department of Anatomy, Wuhan University School of Basic Medical Sciences, Hubei Province Key Laboratory of Allergy and Immunology, Wuhan 43007, Hubei, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of S100 calcium binding protein A8/A9 heterodimer (S100A8/A9) induced by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) on T cell death. **Methods** The murine wildtype (WT) splenocytes were incubated with inactivated Mtb H37Rv (iMtbH37Rv) in vitro for various time points. The expression differences of S100A8 and S100A9 and the S100A8/A9-producing cells were obtained by flow cytometry. The WT and S100a9^{-/-} mice splenocytes were induced by iMtbH37Rv in vitro, and the effects of S100A8/A9 on the CD4⁺ T cell death was detected by flow cytometry. The effects of S100A8/A9 on the death of human T cell line Jurkat cells was assessed by incubating the cells with different concentration of S100A8/A9 or with S100A8/A9 for different time points. S100A8, S100A9 monomer and S100A8/A9 heterodimer were employed to demonstrate the heterodimer activity of induction of cell death. The expression effects of TLR4 on different cell surfaces was detected by Western blot. After blocking the TLR4 on the surface of Jurkat cells, it was incubated with S100A8/A9. The differences of cell death were obtained by flow cytometry. **Results** iMtb H37Rv induced murine splenocytes to produce more S100A8 and S100A9 proteins compared with the control group. S100A8/A9 heterodimer rather than S100A8 and S100A9 monomers promoted the death of CD4⁺ T cells. S100A8/A9 induced T cell death irrespective of TLR4 pathway. **Conclusion** Mtb-induced S100A8/A9 promotes T cell death.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; M. tb H37Rv; S100A8/A9; CD4⁺ T cell; cell death

^{***} 结核病是由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)引起的慢性传染病,也是造成全球人类死亡的主要原因之一^[1]。根据 2020 年世界卫生组织全球结核病报告,2019 年约有 1000 万新发结核病患者,近 120 万人死于结核病感染,其中我国结核病新发患者约为 83.3 万,较 2018 年(86.6 万)有所降低但仍

位列 30 个全球结核病高负担国家之内^[2]。结核病形

^{*} **【基金项目】** 国家自然科学基金面上项目(No. 81971908)。

^{**} **【通讯作者】** 潘 勤, Email: panqin@whu.edu.cn

【作者简介】 孙月华(1996-),女,河南周口人,在读硕士,研究方向:感染免疫。Email:1209678333@qq.com

势严峻,且 Mtb 重要致病环节和其与宿主免疫系统互作机制尚不清楚。

S100 钙结合蛋白 A8/A9 (S100 calcium-binding protein A8/A9, S100A8/A9) 是 S100 钙结合蛋白家族的“警报”蛋白, S100A8 蛋白, 又称 calgranulin A 蛋白, 髓样相关蛋白 8 (myeloid related protein 8, MRP8), S100A9 蛋白 (又称 calgranulin B 蛋白、MRP14 蛋白), 主要由髓系细胞, 特别是中性粒细胞和单核巨噬细胞表达和分泌^[3-6]。二者可共价形成异源二聚体, 并通过与 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)、晚期糖基化终末产物受体 (Receptor for Advanced Glycation End products, RAGE) 等结合来诱导免疫和炎症反应^[7-9]。

Scott 等^[10]报道结核患者血清中 S100A8/A9 水平显著高于健康人, S100A8/A9 有望作为结核病的诊断指标。S100A8/A9 参与的 Mtb 致病机制的研究大多集中在抗 Mtb 感染的固有免疫应答方面, S100A8/A9 抑制中性粒细胞^[3]和巨噬细胞^[11]的功能。作为抗 Mtb 感染最为有效的适应性免疫应答, S100A8/A9 对 T 细胞的作用尚不清楚。本研究旨在利用体外试验初步探究 Mtb 诱导宿主产生 S100A8/A9 以及后者诱导 T 细胞死亡的机制。

材料与方法

1 材料

1.1 实验细菌、细胞和动物 Jurkat 细胞 (ATCC TIB-152TM, 在含 10% 胎牛血清的 1640 培养基中培养), Mtb H37Rv (ATCC 菌株 93009) 均由本实验室保存^[12]; 在米氏 7H9 培养基内培养, 于对数生长期收获, 将收获的 Mtb H37Rv 置于 65 °C 水浴灭活 2 h, 制备成热灭活的 iMtb H37Rv 储存于 -80 °C 备用。SPF 级 C57BL/6 野生型小鼠购自湖北省疾病控制中心, SPF 级 S100a9^{-/-}小鼠购自赛业生物科技, 均饲养在武汉大学动物中心, 6-8 周龄时取出。实验经动物保护和伦理委员会批准, 并根据《实验动物护理和使用指南》进行实验。

1.2 主要试剂与仪器 RPMI Medium 1640 细胞培养基与胎牛血清购自美国 Gibco 公司; 链霉素和青霉素购自美国 Sigma 公司; 抗鼠 APC-CD3 抗体、抗鼠 FITC-CD4 抗体、固定剂、破膜剂、蛋白转运抑制剂、抗人 TLR4 抗体及其同型对照均购自美国 Biolegend 公司; 抗鼠 PE-S100A8 与抗鼠 PE-S100A9 均购自美国 Novus Biologicals 公司; 流式细胞仪 (FACS AriaTM III), FVS780 购自美国 BD 公司。TLR4 鼠源单克隆抗体 (一抗) 购自美国 proteintech 公司; HRP 羊抗鼠 IgG (二抗) 购自美国 Abclonal 公司。

2 方法

2.1 小鼠脾脏单个细胞悬液的制备 无菌处死小鼠后, 放入 75% 的酒精浸泡 10 min。在 60 mm 平皿中置铁砂网, 并加 1 mL 左右高压过的 PBS。取小鼠脾脏于上述 60 mm 小皿中, 用 1 mL 注射器底部平面轻柔研磨, 将研磨好的细胞悬液转移至 15 mL 离心管。4 °C 条件下 300 g 离心 5 min。弃上清后加 7 mL 左右红细胞裂解液重悬细胞沉淀以裂解红细胞, 混匀后放 37 °C 水浴锅 1 min 后加半量 PBS 终止裂解, 4 °C 条件下 300 g 离心 5 min。离心后弃上清, 加适量 PBS 重悬细胞沉淀, 混匀后 4 °C 条件下 300 g 离心 5 min。离心后弃上清, 加 5 mL 1640 培养基重悬细胞沉淀。

2.2 细胞培养 将 Jurkat 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基。培养瓶置于含 5% CO₂、湿度为 95% 的 37 °C 恒温培养箱中。在光学显微镜下观察细胞形态及密度, 细胞数维持在 (5-10) × 10⁵ / mL, 取对数生长期细胞进行试验。

2.3 流式细胞术检测 检测脾细胞 S100A8 和 S100A9 的表达。全脾细胞用 iMtb H37Rv 刺激 24 h 后 (细胞: 细菌 = 1: 10), 用 PBS 洗涤细胞, 加入抗鼠 CD3 和抗鼠 CD4 流式抗体, 混匀后冰上避光孵育 30 min 进行细胞外染色。加适量 PBS 洗去未结合的抗体后, 加入 200 μL 固定剂, 重悬细胞沉淀后避光固定 30 min。加入适量 PBS 洗去固定剂后, 加入 100 μL 破膜剂和抗鼠 S100A8、抗鼠 S100A9 抗体, 混匀后室温条件下孵育 30 min 进行细胞内染色。之后加入适量 PBS, 300 g 离心 5 min, 200 目尼龙网过滤细胞以除去团块, 在 FACS AriaTM III 细胞仪检测细胞, 并用 Flowjo 软件对结果进行分析。

检测 Jurkat 细胞死亡。取对数生长期细胞, 每孔 0.5 × 10⁵ 个接种于 24 孔板, 根据不同分组, 加入不同浓度的 S100A8/A9、培养不同时间后收集细胞。洗涤细胞, 每管加 0.5 μL FVS780 染料, 混匀后室温条件下将细胞避光染色 15 min, 在 FACS AriaTM III 细胞仪检测细胞, 并用 Flowjo 软件对结果进行分析。

2.4 Western blot 分析 分别取 10⁶ 个 Jurkat 细胞和 293T 细胞于 1.5 mL 离心管内, 各加入 100 μL SDS loading buffer 裂解细胞, 于 100 °C 干浴锅内煮 10 min。煮样完成后立即置于冰上备用。经 10% SDS-PAGE 胶进行电泳 (电压 80 V 电泳 30~40 min 之后电压调为 120 V 电泳 1.5 h 左右)。后转膜 (电流为 250 mA, 2.5 h)。经 5% BSA/TBST 溶液室温封闭 2 h 后, 4 °C 层析柜内孵育一抗 (1: 1 000 稀释) 过夜。24 h 回收一抗后, 经 TBST 洗膜 (10 min × 3 次) 后, 于 37 °C 孵育箱内孵育二抗 (1: 10 000 稀释) 1 h, TBST 再次洗膜。洗膜完成后, 将 PVDF 膜放置在显影仪

内,加入 ECL 显色剂显色,观察结果。

2.5 统计学分析 所有数据运用 SPSS 20.0 和 GraphPad Prism 8.0 统计软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间各均数比较采用 t 检验,并使用 GraphPad Prism 8.0 版软件进行分析。两组间的差异使用 t 检验进行比较。多组样本之间用 One-Way ANOVA 分析检验进行比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1 毒性 Mtb H37Rv 诱导小鼠脾细胞上调 S100A8/A9 的合成

iMtb H37Rv 与 WT 小鼠全脾细胞共同培养不同时间(4、8、12、24 和 48 h)后,流式细胞术检测全脾细胞 S100A8 和 S100A9 的合成水平。Mtb 刺激后全脾细胞中合成 S100A8 和 S100A9 细胞比例不高,但与 medium 对照组相比,Mtb 刺激显著提升了 S100A8⁺ 和 S100A9⁺ 细胞比例(Fig. 1 A-C)。在 Mtb 刺激 12 h 和 48 h 时,S100A9 和 S100A8 合成分别达到峰值(Fig. 1 A-C),说明 Mtb 能较快刺激脾细胞产生以上两种 S100 蛋白发挥生物学效应。

T 细胞(CD3⁺)群产生 S100A8 和 S100A9 少,大部分产生 S100A8 和 S100A9 的细胞集中在 CD3⁻CD4⁻ 和 CD3⁻CD4⁺ T 细胞群,占总的 S100A8⁺/A9⁺ 细胞的 80%(图 1D)。

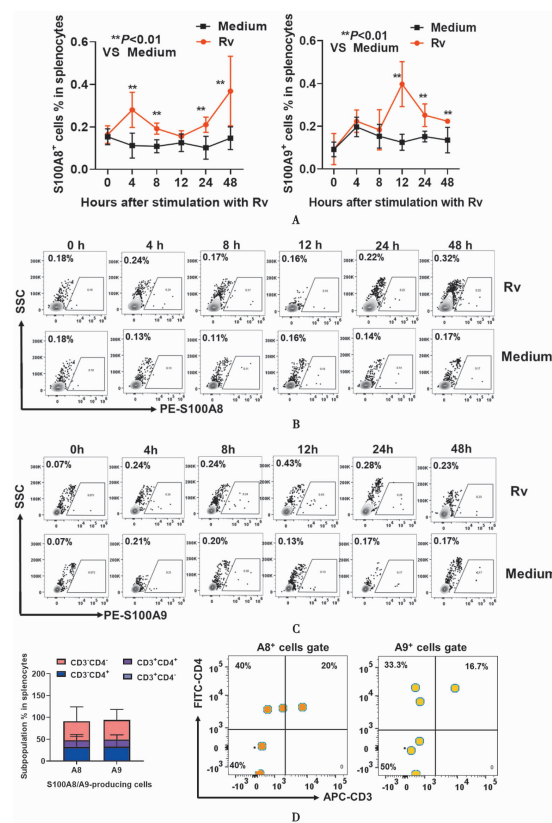
2 S100A8/A9 参与 Mtb H37Rv 诱导的小鼠 CD4⁺ T 细胞死亡过程

iMtb H37Rv 与 WT 小鼠脾细胞共同培养 24 h 后,流式细胞术检测 CD4⁺ T 细胞的死亡情况(图 2)。与对照组相比,Mtb 刺激 24 h 后能显著增加 CD4⁺ T 细胞的死亡。

iMtb H37Rv 分别与 WT 小鼠和 S100a9^{-/-} 小鼠(S100a9^{-/-} 小鼠缺乏功能性的 S100A8/A9^[10])全脾细胞共同培养 24 h,流式细胞术检测 CD4⁺ T 细胞的死亡(图 3)。与 WT 组相比,S100A9 缺失使得 Mtb 诱导的 CD4⁺ T 细胞死亡显著减少。Mtb 诱导的 S100A8/A9 促进了 CD4⁺ T 细胞的死亡,使得细胞的存活减少。

3 低浓度 S100A8/A9 促进人 T 细胞系 Jurkat 细胞死亡

不同浓度的 S100A8/A9 蛋白与 Jurkat 细胞共培养 72 h 后,流式细胞术检测 Jurkat 细胞死亡情况,与不加 S100A8/A9 对照组相比,低剂量的 S100A8/A9 (0.05 $\mu\text{g/mL}$) 导致 Jurkat 细胞死亡增加(图 4)。Mtb 诱导宿主产生的 S100A8/A9 能直接作用于 T 细胞并促进后者的死亡。

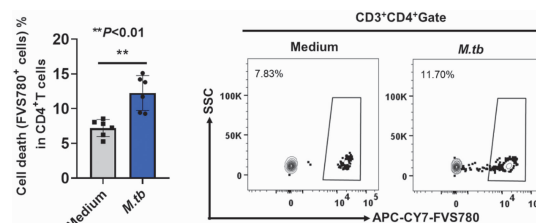


WT 小鼠脾细胞制备单个脾细胞悬液后,与灭活 Mtb H37Rv 共培养(细胞数:细菌数=1:10)不同时间(4、8、12、24 和 48 h),流式细胞术检测 S100A8 和 S100A9 的表达水平变化以及产生细胞来源。A S100A8 和 S100A9 的表达水平与时间关系曲线,统计数据图 B 和 C 图 A 代表性流式原图 D S100A8 和 S100A9 产生细胞群分析及其代表性流式原图。

图 1 毒性 Mtb H37Rv 诱导小鼠脾细胞上调 S100A8/A9 的合成

The murine splenocytes were stimulated with iMtb H37Rv(cells : bacteria=1 : 10) for indicated time points (4,8,12,24 and 48 h). The levels of S100A8 and S100A9 as well as the S100A8- and S100A9-producing cells were determined by flow cytometry. A The production of S100A8 and S100A9 at indicated time points B and C Representative flow plots for A D S100A8- and S100A9-producing cells were determined by flow cytometry. Left panel, pooled data. Right panel, Representative flow plots.

Fig. 1 WT murine splenocytes increases the production of S100A8 and S100A9 upon stimulation with iMtb H37Rv in vitro

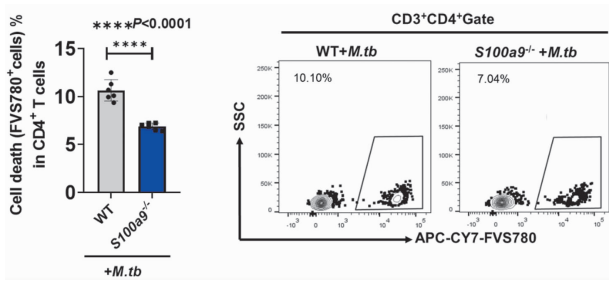


WT 小鼠脾细胞与 iMtb H37Rv(细胞数:细菌数=1:10)共培养 24 h 后,流式细胞术检测 CD3⁺CD4⁺ T 细胞的死亡。左图,死亡细胞(FVS780⁺细胞)百分率统计数据图。右图,代表性流式原图。

图 2 Mtb H37Rv 体外刺激导致 CD4⁺ T 细胞死亡增加

The murine splenocytes were stimulated with iMtb H37Rv(cells : bacteria=1 : 10) for 24 h. The cell death (FVS780⁺ cells) % in CD4⁺ T cells were determined by flow cytometry. Left panel, pooled data. Right panel, Representative flow plots.

Fig. 2 Murine splenic CD4⁺ T cells increase cell death upon stimulation with iMtb H37Rv in vitro

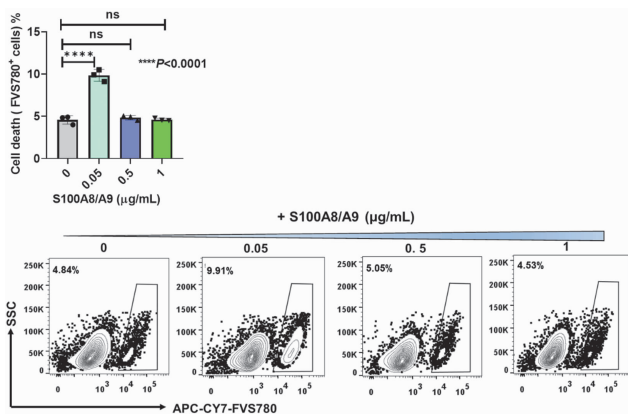


WT和S100a9^{-/-}小鼠脾细胞分别与iMtb H37Rv(细胞数:细菌数=1:10)共培养24 h后,流式细胞术检测CD3⁺CD4⁺T细胞的死亡。左图,死亡细胞(FVS780⁺细胞)百分率统计数据图。右图,代表性流式图。

图3 S100A8/A9参与Mtb H37Rv诱导的小鼠CD4⁺T细胞死亡过程

The WT or S100a9^{-/-} splenocytes were stimulated with iMtb H37Rv (cells: bacteria=1:10) for 24 h. The cell death (FVS780⁺ cells)% in CD4⁺ T cells were determined by flow cytometry. Left panel, pooled data. Right panel, Representative flow plots.

Fig. 3 S100A8/A9 was involved in iMtb H37Rv-induced cell death of splenic CD4⁺ T cells



Jurkat细胞与不同浓度的S100A8/A9蛋白(0.05、0.5或1 mg/mL)共培养72 h后,流式细胞术检测Jurkat细胞的死亡情况。上图,死亡细胞(FVS780⁺细胞)百分率统计数据图。下图,代表性流式图。

图4 低浓度S100A8/A9促进Jurkat细胞死亡

Jurkat cells were culture in the presence of various concentrations of S100A8/A9 (0.05, 0.5 or 1mg/mL) for 72 h. The cell death (FVS780⁺ cells)% were determined by flow cytometry. Upper layer, pooled data. Bottom layer, Representative flow plots.

Fig. 4 Low concentration of S100A8/A9 promotes Jurkat cell death

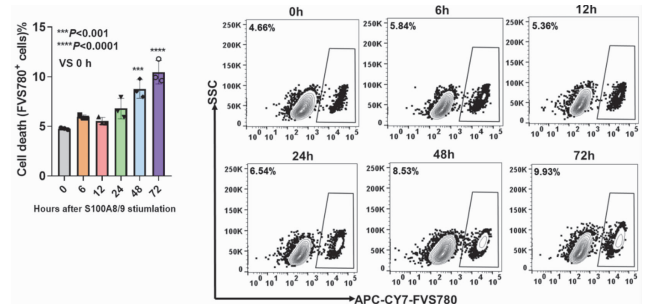
4 S100A8/A9诱导Jurkat细胞死亡具有时间依赖性

S100A8/A9蛋白与Jurkat细胞共培养6、12、24、48和72 h,流式细胞术检测Jurkat细胞的死亡。S100A8/A9刺激6 h之后,死亡细胞百分率开始出现小幅增加,随着S100A8/A9与Jurkat共培养时间的延长,死亡细胞的百分率逐步增加,到72 h之后死亡细胞的百分率较初始(0 h组)细胞相比增加了约1倍(Fig. 5)。S100A8/A9能较快作用于Jurkat细胞诱导其死亡,并且其诱导的细胞死亡效应具有时间依赖性。

5 S100A8/A9异二聚体联合作用促进细胞死亡, S100A8和S100A9分子单独作用不能产生以上效应

S100A8蛋白、S100A9蛋白或S100A8/A9二聚

体分别加入到Jurkat细胞,与之共培养72 h后,流式细胞术检测jurkat细胞的死亡。单独S100A8或S100A9与Jurkat共培养后,并不能显著增加死亡细胞的百分率,而S100A8/A9联合作用组能显著促进Jurkat细胞的死亡。S100A8或S100A9不可以单独发挥促死亡作用,只有S100A8/A9联合才能诱导T细胞的死亡(图6)。

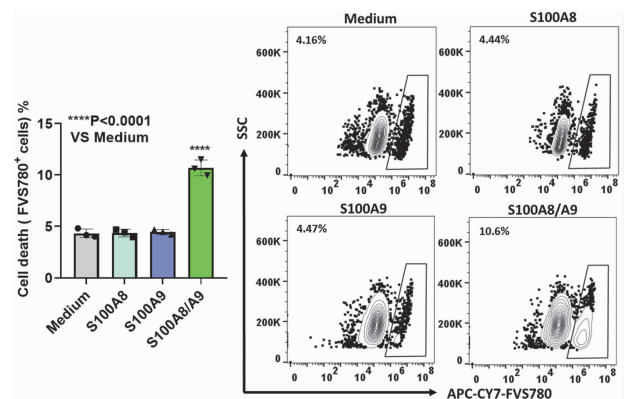


Jurkat细胞与S100A8/A9蛋白(0.05 mg/mL)共培养不同时间(6、12、24、48或72 h)后,流式细胞术检测Jurkat细胞的死亡情况。左图,死亡细胞(FVS780⁺细胞)百分率统计数据图。右图,代表性流式图。

图5 S100A8/A9促Jurkat细胞死亡具有时间依赖性

Jurkat cells were culture in the presence of S100A8/A9 (0.05mg/mL) for 6,12,24,48 or 72 h. The cell death (FVS780⁺ cells)% were determined by flow cytometry. Left panel, pooled data. Right panel, Representative flow plots.

Fig. 5 S100A8/A9 induces Jurkat cell death in a time-dependent manner



Jurkat细胞与S100A8蛋白(0.05 mg/mL)、S100A9蛋白(0.05 mg/mL)或S100A8/A9异二聚体(0.05 mg/mL)共培养72 h后,流式细胞术检测Jurkat细胞的死亡情况。左图,死亡细胞(FVS780⁺细胞)百分率统计数据图。右图,代表性流式图。

图6 S100A8/A9异二聚体联合作用促进Jurkat死亡

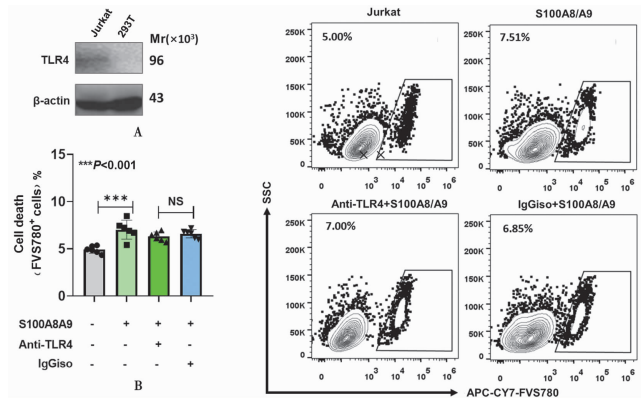
Jurkat cells were culture in the presence of S100A8 (0.05 mg/mL), S100A9 (0.05 mg/mL) as well as S100A8/A9 heterodimer (0.05 mg/mL) for 72 h. The cell death (FVS780⁺ cells)% were determined by flow cytometry. Left panel, pooled data. Right panel, Representative flow plots.

Fig. 6 S100A8/A9 heterodimer induces Jurkat cell death

6 S100A8/A9诱导细胞死亡作用不依赖T细胞表面TLR4受体

Western blot表明Jurkat细胞有低量的TLR4分子的表达(图7A)。利用TLR4的中和抗体来阻断

S100A8/A9 和 TLR4 的相互作用,进而用流式细胞术检测 Jurkat 细胞的死亡。在 Jurkat 细胞表面 TLR4 被中和抗体封闭的情况下,与同型抗体对照组相比, S100A8/A9 诱导 Jurkat 细胞的死亡无变化,说明 TLR4 通路阻断后,不影响 S100A8/A9 诱导的细胞死亡作用,表明 S100A8/A9 联合作用诱导 Jurkat 细胞死亡不依赖 TLR4(图 7B)。



Jurkat 细胞被 TLR4 封闭抗体 (10 mg/mL) 预处理 2 h, 再与 S100A8/A9 (0.05 mg/mL) 共培养 72 h 后检测 Jurkat 细胞死亡。A, Western blotting 检测 Jurkat 细胞 TLR4 的表达。B, 流式细胞术检测 Jurkat 细胞的死亡情况。左图, 死亡细胞 (FVS780+ 细胞) 百分率统计数据图。右图, 代表性流式原图。

图 7 S100A8/A9 诱导细胞死亡作用不依赖 T 细胞表面 TLR4 受体

Jurkat cells were pretreated with anti-TLR4 antibody or its isotype control (10 mg/mL) and cultured in the presence of S100A8/A9 protein for 72 h. A, the expression of TLR4 detected by Western blotting. B, The cell death (FVS780+ cells) % were determined by flow cytometry. Left panel, pooled data. Right panel, Representative flow plots.

Fig. 7 S100A8/A9 induces cell death independent of TLR4 receptor on the T cells

讨论

结核患者体内血清中 S100A8/A9 的表达水平相较于健康人是增加的, 随着 Mtb 的清除, 血清中 S100A8/A9 的表达水平随之降低并趋向于健康人水平, 提示 S100A8/A9 有可能作为结核感染的筛查、诊断和预后指标^[3,10]。Mtb H37Rv 与 WT 小鼠的脾单个细胞体外共培养的结果证明 iMtb H37Rv 能诱导 WT 小鼠产生更多的 S100A8/A9, 并且主要由 CD3⁻CD4⁻ 和 CD3⁻CD4⁺ T 细胞群产生, 与 Gopal 等^[3-6]报道 S100A8 和 S100A9 主要由中性粒细胞和巨噬细胞产生是一致的。S100A8/A9 在病理状态下是细胞死亡的诱导因子, 如 S100A8/A9 可以诱导淋巴瘤患者的白血病细胞死亡^[13], 在缺血/再灌注损伤中还可引起线粒体功能障碍和心肌细胞死亡^[14], S100A8/A9 诱导小胶质细胞活化并促进少突胶质前体细胞凋亡^[15]。因此 Mtb H37Rv 诱导小鼠脾细胞产生的 S100A8/A9 也有可能促进 T 细胞的死亡。Mtb H37Rv 分别与 WT 和 S100a9^{-/-} 小鼠脾细胞体外共培养, 结果显示, 与 WT 组相比, Mtb H37Rv 诱导的

S100a9^{-/-} 小鼠 CD4⁺ T 死亡降低。由此可见 Mtb H37Rv 诱导 WT 小鼠产生的 S100A8/A9 促进了 T 细胞死亡。但 S100A8 和 S100A9 产生的时间曲线并不一致。在 Mtb 感染时, 肺组织匀浆中的 S100A8/A9 蛋白水平与 IL-17 蛋白水平正相关^[3]。因此 Mtb H37Rv 诱导的 S100A8 和 S100A9 产生时间曲线不一致可能是由于 S100A8 和 S100A9 对 IL-17 的敏感性存在差异。

由于 S100A8/A9 在某些疾病状态下可正向调节细胞死亡^[13-15]。当较低浓度的 S100A8/A9 蛋白与 Jurkat 细胞共培养 72 h 后, 流式细胞术检测到与高浓度的 S100A8/A9 蛋白相比, 低浓度的 S100A8/A9 蛋白更容易诱导 Jurkat 细胞的死亡。S100A8/A9 蛋白在高浓度情况下并未明显诱导 Jurkat 细胞死亡^[13]。可能是 S100A8/A9 蛋白浓度较低时, 优先和敏感性更高结合力更强的受体结合发挥促死亡作用, 而当 S100A8/A9 蛋白浓度增加时, 过溢的 S100A8/A9 蛋白与另一受体或多个受体结合, 并且激活下游信号通路, 拮抗了前述的低剂量 S100A8/A9 促细胞死亡作用。

Mtb H37Rv 诱导 WT 小鼠产生 S100A8/A9 促进 T 细胞的死亡, 但 S100A8/A9 蛋白与 Jurkat 共培养后, Jurkat 死亡增加, 但 S100A8/A9 诱导的 Jurkat 的死亡率低于 Mtb H37Rv 诱导的 CD4⁺ T 细胞的死亡率。这提示 Mtb H37Rv 诱导 CD4⁺ T 细胞的死亡有 S100A8/A9 参与还有其他效应分子的参与^[16]。

S100A8 和 S100A9 蛋白是典型的 EF-手钙结合蛋白, 包含两个 EF-手型结构域, 该结构域虽然也可以形成同源二聚体, 但此种结合方式并不稳定, 大多数情况下更偏好形成强结合的异源二聚体进而发挥其生物学功能^[17-20]。本研究中 S100A8 与 S100A9 蛋白二者联合诱导 Jurkat 细胞死亡较两者单独作用较明显, 可能与这种独特的异二聚体结构有关。

S100A8/A9 通过与 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)、晚期糖基化终末产物受体 (Receptor for Advanced Glycation End products, RAGE) 等结合来诱导免疫和炎症反应^[7-9]。有文献报道 S100A8/A9 蛋白通过与 TLR4 结合诱导嗜酸性粒细胞死亡^[13], 但在封闭了 Jurkat 细胞表面的 TLR4 之后, S100A8/A9 的诱导 T 细胞死亡效应依然存在, 说明 S100A8/A9 也可能通过其他受体比如 RAGE 来介导 Jurkat 细胞的死亡, 但还需进一步探究。RAGE 是一种模式识别受体, 在众多疾病中介导细胞死亡, 在缺血再灌注损伤中介导血管内皮细胞的凋亡^[21], 在脓毒症中介导中性粒细胞胞外陷阱诱导的巨噬细胞焦亡^[22]。因此推测 S100A8/A9 可能是与

Jurkat 细胞表面的 RAGE 结合诱导其死亡。

综上所述,iMtb H37Rv 可以通过诱导宿主产生 S100A8/A9 并且促进 CD4⁺ T 细胞的死亡,这可能是 Mtb 感染早期重要的致病环节。S100A8/A9 蛋白体外刺激 Jurkat 细胞系可诱导细胞死亡增加并且不依赖于 TLR4 可为结核病的免疫发病机制研究以及治疗提供了新的思路。

【参考文献】

- [1] Fletcher HA, Schrager L. TB vaccine development and the End TB Strategy: importance and current status[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2016(110): 212-218.
- [2] WHO. Global tuberculosis report[R]. Geneva: World Health Organization, 2020.
- [3] Gopal R, Monin, Torres D, et al. S100A8/A9 proteins mediate neutrophilic inflammation and lung pathology during tuberculosis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2013, 188(9): 1137-1146.
- [4] Rammes A, Roth J, Goebeler M, et al. Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway[J]. J Biol Chem, 1997, 272(14): 9496-9502.
- [5] Voganatsi A, Panyutich A, Miyasaki KT, et al. Mechanism of extracellular release of human neutrophil calprotectin complex[J]. J Leukoc Biol, 2001, 70(1): 130-134.
- [6] Edgeworth J, Gorman M, Bennett R, et al. Identification of p8, 14 as a highly abundant heterodimeric calcium binding protein complex of myeloid cells[J]. J Biol Chem, 1991, 266(12): 7706-7713.
- [7] Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, et al. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock[J]. Nat Med, 2007, 13(9): 1042-1049.
- [8] Chen X, Eksioglu EA, Zhou J, et al. Induction of myelodysplasia by myeloid-derived suppressor cells[J]. J Clin Invest, 2013, 123(11): 4595-4611.
- [9] Hofmann MA, Drury S, Fu C, et al. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides[J]. Cell, 1999, 97(7): 889-901.
- [10] Scott NR, Swanson RV, Al-Hammadi N, et al. S100A8/A9 regulates CD11b expression and neutrophil recruitment during chronic tuberculosis[J]. J Clin Invest, 2020, 130(6): 3098-3112.
- [11] Liu S, Xie Y, Luo W, et al. PE_PGRS31-S100A9 interaction promotes mycobacterial survival in macrophages through the regulation of NF- κ B-TNF- α signaling and arachidonic acid metabolism[J]. Front Microbiol, 2020, 8(11): 845.
- [12] Pan Q, Yan J, Liu Q, et al. A single-stranded DNA aptamer against mannose-capped lipoarabinomannan enhances anti-tuberculosis activity of macrophages through downregulation of lipid-sensing nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor γ expression[J]. Microbiol Immunol, 2017, 61(2): 92-102.
- [13] Lee JS, Lee NR, Kashif A, et al. S100A8 and S100A9 promote apoptosis of chronic eosinophilic leukemia cells[J]. Front Immunol, 2020(11): 1258.
- [14] Li Y, Chen B, Yang X, et al. S100A8/A9 signaling causes mitochondrial dysfunction and cardiomyocyte death in response to ischemic/reperfusion injury[J]. Circulation, 2019, 140(9): 751-764.
- [15] Wu M, Xu L, Wang Y, et al. S100A8/A9 induces microglia activation and promotes the apoptosis of oligodendrocyte precursor cells by activating the NF- κ B signaling pathway[J]. Brain Res Bull, 2018(143): 234-245.
- [16] Sharma S, Sharma M, Bose M. Mycobacterium tuberculosis infection of human monocyte-derived macrophages leads to apoptosis of T cells[J]. Immunol Cell Biol, 2009, 87(3): 226-234.
- [17] Korndorfer IP, Brueckner F, Skerra A. The crystal structure of the human (S100A8/S100A9)2 heterotetramer, calprotectin, illustrates how conformational changes of interacting alpha-helices can determine specific association of two EF-hand proteins[J]. J Mol Biol, 2007, 370(5): 887-898.
- [18] Chazin WJ. Relating form and function of EF-hand calcium binding proteins[J]. Acc Chem Res, 2011, 44(3): 171-179.
- [19] Hunter MJ, Chazin WJ. High level expression and dimer characterization of the S100 EF-hand proteins, migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14[J]. J Biol Chem, 1998(273): 12427-1235.
- [20] Vogl T, Leukert N, Barczyk K, et al. Biophysical characterization of S100A8 and S100A9 in the absence and presence of bivalent cations[J]. Biochim Biophys Acta, 2006(1763): 1298-1306.
- [21] Mi L, Zhang Y, Xu Y, et al. HMGB1/RAGE pro-inflammatory axis promotes vascular endothelial cell apoptosis in limb ischemia/reperfusion injury[J]. Biomed Pharmacother, 2019(116): 109005.
- [22] Chen L, Zhao Y, Lai D, et al. Neutrophil extracellular traps promote macrophage pyroptosis in sepsis[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(6): 597.

【收稿日期】 2021-09-27 【修回日期】 2021-12-05