结核分枝杆菌入侵诱导的人巨噬细胞全局性基因表达变化*

谢建平[①④†] 李 瑶[①②†] 乐 军[①③] 徐永忠[①] 黄达蔷[②] 梁 莉[③]
陈永青[①] 于善谦[①] 王洪海[①**]

(①复旦大学生命科学学院遗传学研究所遗传工程国家重点实验室, 上海 200433; ②联合基因科技集团, 上海 200092;
③上海市肺科医院, 上海 200433; ④西南师范大学生命科学学院, 重庆 400715)

摘要 利用含有 12800 个基因全长或部分序列的基因芯片研究结核分枝杆菌无毒株入侵导致的人巨噬细胞 U937 全基因组在转录水平的表达谱变化. 结果表明其中 473 个基因(3.7%)差异表达, 表达上调的基因 25 个(5.3%), 上调超过 3 倍的包括丝氨酸/苏氨酸蛋白质激酶, 可溶性结合半乳糖苷的凝集素, 蛋白质酪氨酸磷酸酶 delta, DDR 受体酪氨酸激酶等的编码基因, 其余基因(94.7%)表达下调. 表达下调的基因中, 表达仅为原来 1/3 以下的 25 个, 其中 syndecan 结合蛋白的表达下调 12.5 倍. 芯片研究结果与结核分枝杆菌一般抑制宿主细胞免疫应答的趋势相符. 这 473 个基因中的 376 个基因在 GenBank 中有记录, 另外 97 个是新基因. 生物信息学分析提示差异表达基因编码产物与细胞内信号传导、细胞因子反应、细胞骨架重建、细胞凋亡、铁代谢、电子传递、线粒体功能和离子通道等有关. 这些差异表达基因中, 有 17 个是文献报道过的, 而且都印证了本文的结果. RT-PCR 和 Northern 杂交实验确证了表达谱芯片研究结果. 通过 DNA 芯片研究全局表达谱变化, 揭示了细菌入侵早期导致的巨噬细胞表达变化, 为深入研究结核分枝杆菌-宿主相互作用提供了基础数据和探索方向.

关键词 巨噬细胞 U937 全局基因表达变化谱 结核分枝杆菌 cDNA 芯片

结核病仍是威胁我国人民健康的严重传染病[1]. 其致病菌——结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, 简称 MTB)是典型的胞内致病菌, 主要在人巨噬细胞等宿主免疫系统的细胞内存活和繁殖, MTB 感染的后果和巨噬细胞初期的应答反应有密切关系. MTB-宿主相互作用的研究是该领域的重点和难点[2], 研究 MTB 和巨噬细胞间初期的相互作用可能发现 MTB-宿主相互作用的重要机理, 找到控制和根除结核病的关键. 以前主要利用 PCR 技术对个别基因进行研究[3,4], 未见全局基因表达研究的报道. 本文利用含有 12800 个基因全长或部分序列的表达谱芯片研究 MTB 入侵诱导的人巨噬细胞全局性基因表达变化.

1 材料和方法

1.1 菌株和培养[4]

实验所用感染细胞的菌株为 *Mycobacterium tuberculosis* $H_{37}Ra$ (ATCC 25177), 由上海市肺

2002-01-29 收稿, 2002-05-08 收修改稿
* 国家重大基础研究(批准号: G199054104)、国家自然科学基金(批准号: 3010007)和复旦大学遗传学研究所扶植基金资助项目
** 联系人, E-mail: hhwang@fudan.edu.cn
† 同等贡献

科医院检验科 MTB 检验室提供. 细菌在 Middlebrook7H10 (Difco) 添加 OADC(0.5%BSA, 0.2% glucose, 0.06% oleic acid, 140 mmol/L NaCl)和 0.05% Tween80 (Sigma)的液体培养基中 37℃培养, 在 7H10 固体培养基上连续稀释后观察 CFU, 测定细菌存活力. 培养达到要求的密度后, 5000 r/min 离心 15 min 收集细菌, PBS 洗涤后悬浮于加 FBS 的 RPMI-1640 细胞培养基内, 超声处理 2 min, 重复 3 次, 离心去除菌块. 血球计数板计数细菌数, 确保实验中每次感染的细菌数量相同.

1.2 细胞株和培养

人巨噬细胞株 U937(ATCC: CRL1593)由复旦大学医学院闻玉梅教授赠送. 细胞培养在含有 2%FBS 无支原体感染的 RPMI-1640 培养基中. 感染实验时, 按照细胞∶细菌数量 = 10^7∶10^8 的比例混合, 37℃温和振荡, 大约 4 h 后, 90%以上的细胞都吞噬了细菌(金胺 O 染色, 检测固定的细胞内有无 MTB), 每个细胞内含有细菌数 1~5 个. 培养基洗涤 3 次感染 4 h 后的细胞, 去除没有被吞噬的细菌, 加入新鲜培养基 37℃, 5%CO_2 孵箱中培养 36 h, 5000 r/min 离心 15 min 收集细胞. 对照分别为不加细菌及加入经 80℃ 30 min 杀死的细菌, 其余处理均相同.

1.3 DNA 芯片的构建[5]

含有 12800 个全长及部分 DNA 的分别代表已知基因、新基因和对照基因的芯片序列由联合基因科技集团提供. 通用引物 PCR 扩增所需片段, 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物的质量, 将 PCR 扩增产物溶于含有 3×SSC 溶液内(0.45 mol/L NaCl, 0.045 mol/L 柠檬酸钠), 利用 Cartesian PixSys 7500 机械手(Cartesian Technologies, Irvine, CA)和 ChipMaker Microspotting Technology (TeleChem International, Sunnylale, CA)将含有 PCR 扩增产物的溶液点到硅化玻片上(CEL Associates, Houston TX), 点样后的玻片在 70%湿度的环境下水化 2 h, 室温干燥 0.5 h, UV 交联(65 mj/cm), 然后玻片依次经 0.2% SDS 10 min, dH_2O 10 min, 0.2% $NaBH_4$ 10 min 处理, 室温干燥, 备用. 每张芯片共包括 12848 点, 代表 6200 个已知的人类基因序列、6500 个新的人基因序列以及 48 个非人来源的对照序列, 对照序列包括水和 U2RNA 基因(8 个点)、丙型肝炎病毒包被蛋白基因(8 点)、无 RNA 的点样液(32 个点). 人 RNA 制备的探针不能与阴性对照杂交(数据未显示).

1.4 探针制备

按照文献[6,7]的方法, 略有改动. 抽提细胞总 RNA, 利用 Oligotex-dT mRNA MidiKit (Qiagen, InC, Carlsbad, CA)纯化 mRNA. 逆转录制备荧光 DNA 探针, 纯化. 对照细胞的 RNA 样品用 Cy3-dUTP 标记, 被细菌感染的细胞用 Cy5-dUTP 标记. 混合两种颜色的探针, 乙醇沉淀后将沉淀溶于 20 μL 杂交液 5×SSC (0.75 mol/L NaCl, 0.075 mol/L 柠檬酸钠, 0.4% SDS, 50% 甲醛, 5×Denhardt).

1.5 杂交及洗涤

芯片用含有 0.5 mg/mL 变性鲑精 DNA 的杂交液在 42℃, 预杂交 6 h. 经过 95℃, 5 min 变性的荧光探针混合物与预杂交过的芯片杂交(42℃, 15~17 h), 60℃, 10 min 洗涤杂交过的芯片, 依次经 2 × SSC, 0.2% SDS, 0.1 × SSC, 0.2% SDS, 0.1 × SSC 洗涤, 然后室温干燥.

1.6 检测及分析

芯片双波长扫描用 ScanArray 3000(GSI Lumonics, Bellerica, MA), 图像分析采用 ImaGene 3.0 软件(BioDiscovery, InC, Los Angeles, CA). 每个点双波长的密度分别代表杂交上的

Cy3-dUTP 和 Cy5-dUTP 量, 计算芯片上每点的 Cy3/ Cy5 比率, 芯片整体密度用 40 个管家基因的 Cy3/Cy5 比率为标准校正. 选择 Cy3 和 Cy5 的密度均大于 800 的点进行差异分析, Cy3/Cy5 比率的绝对值的自然对数值大于 0.69 的基因视为差异表达.

1.7 Northern 分析

探针用随机引物标记法标记, 扫描用 Cyclone(Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA), 数据分析采用 Parkard 3.0(Packard Instrument, Meriden, CT), A_{260} 计数等量(3 μg)的 mRNA 加入胶内, 利用管家基因 uracil DNA 糖苷酶(GenBank accession number x53778)校正. 我们分析了 18 个基因在转录水平的变化, 这些基因分别来自对照细胞、被细菌感染的细胞. 其中包括 bcl-2, p0071 蛋白, VCP, p65 syndecan 结合蛋白, 蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶等基因. 尽管作更多基因的 Northern 分析可能会发现一些差异, 但是现有实验已确证了基因芯片 mRNA 水平数据的准确性.

2 结果

2.1 巨噬细胞应对 MTB 入侵产生的表达谱差异

与对照(同步培养的未被 MTB 感染的细胞和吞噬被热灭活的 MTB 死菌的细胞)比较, 在分析的 12800 个基因中, 被活 MTB 感染的巨噬细胞有 473(3.7%)个基因差异表达, 比例小, 这也和其他实验揭示的 MTB 入侵使宿主细胞的反应能力下降比较一致. 25 个基因被上调表达(5.3%), 其他 94.7%被下调. 473 个基因中 376 个在 GenBank 有记录, 97 个是新基因. 蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶(m84489)被上调 6.29 倍. 下调幅度最大达 12.5 倍的是 syndecan 结合蛋白. 生物信息学分析提示其他基因可能与免疫反应和信号传导途径有关, 尤其是巨噬细胞的离子通道与泛肽-蛋白酶体途径的基因参与了细菌-宿主相互作用. 有 17 个基因分别在文献中报道过被 MTB 的入侵所改变表达, 其 456 个基因报道与 MTB 入侵有关, 结果见图版Ⅰ(附本刊后), 图 1 和表 1.

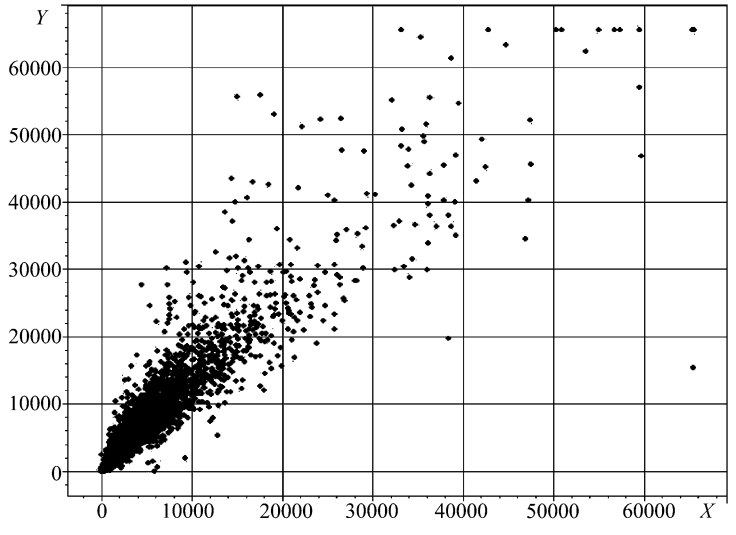


图 1　结核分枝杆菌入侵前后巨噬细胞差异表达基因的分布图

X, *Y* 轴分别以 Cy3 荧光强度值(= 前景值 − 背景值)和 Cy5 荧光强度值为坐标

表 1 *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra 入侵后巨噬细胞在转录水平差异表达的部分基因

基因编号	基因描述	Cy3/Cy5
NM_005625	syndecan 结合蛋白 (syntenin) (SDCBP)	0.08
M60626	人 N-甲基肽受体(fMLP-R98)	0.49
	离子通道	
M94055	人电压控制钠通道	0.50
AF033382	人钾通道	0.42
M55514	人钾通道(HPCN2)	0.29
D00099	Na, K-ATPase α亚基	0.47
	蛋白酶体-泛肽系统	
D29011	蛋白酶体亚基 X	0.45
AB003177	蛋白酶体亚基 p27	0.42
Z14982	主要组织相容性复合体编码的蛋白酶体亚基 LMP7	0.39
AB009398	26S 蛋白酶体亚基 p40.5	0.35
D78151	26S 蛋白酶体亚基 p97	0.32
NM_004651	泛肽特异性蛋白酶 11(USP11)	0.50
U20657	泛肽蛋白酶(Unph)原癌基因	0.50
NM_003900	泛肽结合蛋白 P62; Lck SH2 功能域非磷酪氨酸依赖性配体	0.48
D78514	泛肽结合酶	0.39
U60207	胁迫反应性丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Krs-2	0.46
X85753	CDK8 蛋白激酶	0.41
	翻译相关因子	
X54326	谷氨酰-tRNA 合成酶	0.50
U04953	isoleucyl-tRNA 合成酶	0.49
Z11518	组氨酰-tRNA 合成酶	0.45
NM_006295	缬氨酰-tRNA 合成酶 2 (VARS2)	0.34
U07424	可能为 tRNA 合成酶样蛋白	0.26
	肌动蛋白/微管蛋白/肌球蛋白	
NM_003069	SWI/SNF 相关, 基质相关, 依赖肌动蛋白的染色质调控因子, a 亚类, 成员 1 (SMARCA1)	2.56
AL080243	新 RPS9 (40S 核糖体 S9) 样蛋白, ACTB (β-肌动蛋白(细胞质肌动蛋白 1)) 假基因, E1A 结合蛋白 p300 编码基因 5′	0.45
J00068	骨骼肌α-肌动蛋白	0.41
NM_001101	β肌动蛋白(ACTB)	0.41
D44497	肌动蛋白结合蛋白 p57	0.34
M31211	肌球蛋白轻链 1 (MLC1sa)	0.37
S67247	平滑肌肌球蛋白重链异构体 SMemb	2.15
AF044323	细胞色素 c 氧化酶组织蛋白(COX15)	0.42
AB006202	复合体Ⅱ的细胞色素 b 小亚基	0.43
X01703	α-微管蛋白 (b alpha 1)	0.47
U47634	β-微管蛋白Ⅲ同型 (beta-3)	0.43
AF070600	β-微管蛋白	0.38
M63959	α-2-巨球蛋白受体结合蛋白	0.38
	细胞因子	
U72882	干扰素诱导的亮氨酸拉链蛋白 (IFP35)	0.45
M32315	肿瘤坏死因子受体	0.47
U32324	白介素-11 受体α链	0.45

续表 1

基因编号	基因描述	Cy3/Cy5
	热休克诱导的蛋白	
M11717	热休克蛋白(hsp 70)	0.43
NM_007034	DnaJ-样热休克蛋白 40 (HLJ1)	2.17
NM_005346	热休克 70 kD 蛋白 1 (HSPA1B)	0.47
	信号传导	
L38929	δ 蛋白酪氨酸磷酸酶	3.85
U48705	受体酪氨酸激酶 DDR 基因	3.47
NM_002833	非受体型蛋白酪氨酸磷酸酶 9 (PTPN9)	0.49
X54131	β蛋白酪氨酸磷酸酶	0.46
NM_001401	内皮分化, 溶血磷脂酰 G-蛋白偶联受体 2 (EDG2)	0.45
X04828	G(i) 蛋白α亚基 (腺苷酸环化酶抑制型 GTP 结合蛋白)	0.46
AF033861	Ⅲ型腺苷酸环化酶 (AC-Ⅲ)	0.43
m36429	信号传导鸟苷结合调控型 G 蛋白β亚基	0.41
X04526	信号传导蛋白 Gs/Gi β-亚基(β-G)	0.38
NM_001960	真核翻译延伸因子 1 delta (鸟苷交换蛋白) (EEF1D)	0.41
u02082	鸟苷调控蛋白 (tim1)	0.29
NM_004127	G 蛋白途径的阻遏蛋白 1 (GPS1)	0.40
	转录因子	
M27878	DNA 结合蛋白(HPF2)	2.08
NM_001270	chromodomain 螺旋酶 DNA 结合蛋白 1 (CHD1)	0.50
	高尔基体相关蛋白	
AF073926	cis-Golgi SNARE p28 (GS28)	0.50
AF073926	高尔基体自身抗原, golgin a 亚类 4 (GOLGA4)	0.47
Z11559	铁调控因子	0.47
	线粒体相关蛋白	
M63967	线粒体乙醛脱氢酶基因 x	0.47
X69433	线粒体异柠檬酸脱氢酶(NADP+)	0.45
NM_001607	乙酰辅酶 A 酰基转移酶 1 (过氧化物媒体 3-草酰辅酶 A 硫解酶) (ACAA1)	0.44
al049703	线粒体凋亡诱导因子异构体	0.42
AF053070	NADH: 泛醌脱氢酶 51 kD 亚基(NDUFV1)	0.41
NM_005834	线粒体内膜转位酶 17 (酵母) 类似物 B (TIM17B)	0.36
NM_004563	磷酸烯醇丙酮酸羧激酶 2 (线粒体) (PCK2)	0.31
AL022313	线粒体硫氧还蛋白 TXN2 基因, 真核翻译起始因子 3 亚基 7 基因 EIF3S7 zeta, 66/67 kD (EIF3-P66)	0.50
AF228704	线粒体谷胱甘肽还原酶 (GRD1)	0.50
U23143	线粒体丝氨酸羟甲基转移酶	0.47
	溶酶体蛋白	
U51240	溶酶体结合多次跨膜蛋白 (LAPTm5)	0.28
NM_001375	溶酶体中的脱氧核糖核酸酶Ⅱ(DNASE2)	0.49
NM_005908	溶酶体中甘露糖苷酶 beta A (MANBA)	0.48
AF040958	溶酶体神经氨(糖)酸苷酶前体	0.31
NM_006411	1-甘油酯-3-磷酸-O-酰基转移酶 1 (溶血磷脂酰酰基转移酶 alpha) (AGPAT1)	0.43
NM_007283	溶血磷脂酶样蛋白(HU-K5)	0.36
AF071596	凋亡抑制蛋白基因(IEX-1L)	0.25

续表 1

基因编号	基因描述	Cy3/Cy5
NM_001607	乙酰辅酶 A 酰基转移酶 1 (过氧化物酶体 3-草酰辅酶 A 硫解酶) (ACAA1)	0.44
U91521	peroxin 12 (PEX12)	0.39
Y00483	谷胱甘肽过氧化物酶	0.46
	核糖体蛋白	
U14970	核糖体蛋白 S5	0.46
AL022326	60S 核糖体蛋白 L3 基因 RPL3，Synaptogyrin 1A, 1B 和 1C 的三重剪切基因 (SYNGR1A, SYBGRIB, SYNGR1C	0.46
AL080243	新基因, RPS9 (40S 核糖体蛋白 S9)样蛋白	0.45
AF016369	U4/U6 小核蛋白 hPrp4	0.44
Y00281	ribophorin I	0.40
AL049650	含有 KRAB box 和 C2H2 锌指功能域的假基因, snRNP (小核核蛋白颗粒)蛋白 B 和 B′, 一个新的转糖苷酶基因	0.39
AL035587	CTG4A, 前 T 细胞受体 alpha, 与 RPL7A (60S 核糖体 L7A) 类似的新蛋白	0.38
AJ243797	脱氧核糖核酸酶Ⅲ(drn3 基因)	0.37
NM_004587	核糖体结合蛋白 1 (狗 180 kD 类似物) (RRBP1)	0.34
M57567	ADP-核糖基化因子(hARF5)	0.33
Z97029	核糖核酸酶 H I 大亚基	0.49
M13934	核糖体蛋白 S14	0.49
S62907	γ-氨基丁酸 A 受体 alpha 2 亚基	0.41
	受体	
AJ012008	免疫球蛋白受体	0.35
j03258	维生素 D 受体	0.30
U48705	受体酪氨酸激酶 DDR	3.47
U41804	T1/ST2 受体结合蛋白前体	0.50
M60626	N-甲基肽受体(fMLP-R98)	0.49
M32315	肿瘤坏死因子受体	0.47
U09937	尿激酶型血纤维蛋白溶酶原受体	0.47
AL133415	波形蛋白, DNA 甲基转移酶 2 基因 DNMT2, 5'内部因子-B12 受体前体, 2 个可能的 CpG 岛	0.46
NM_001401	内皮分化相关溶血磷脂酰 G 蛋白偶联受体 2 (EDG2)	
U32324	白介素-11 受体α链	0.45
U28811	富含半胱胺酸的纤维原细胞生长因子受体(CFR-1)	0.48
	其他	
X04011	X 染色体上与慢性肉芽肿疾病有关的 X-CGD 基因	0.41
M32578	MHC-Ⅱ HLA-DR beta-1 (DR2.3)	0.41
AL049589	磷酸甘油酸激酶 1 PGK1 基因, TAF2G 类似蛋白 (TATA box 结合蛋白 (TBP)-相关因子, RNA 聚合酶 II, G, 32 kD) (TAFII31)	0.46
M31994	细胞浆乙醛脱氢酶 (ALDH1)	0.48
AK001361	骨髓分化初级反应蛋白 MYD116	0.35
M55593	IV 型胶原酶 (CLG4)	0.45
AF231023	原钙粘蛋白 Flamingo 1 (FMI1)	0.44
M94362	纤层蛋白 B2 (LAMB2)	0.39
AF056322	SP100-HMG 核自身抗原 (SP100)	0.45

2.2　Northern 确证分析

代表性 Northern 分析确证了 DNA 芯片数据在 mRNA 水平的变化. 被细菌感染的 U937 细胞在 36 h 后抽提 mRNA, 进行 Northern 杂交. 全部 18 个代表性基因的结果(图 2)与 DNA 芯片的结果一致, 提示芯片结果的准确性.

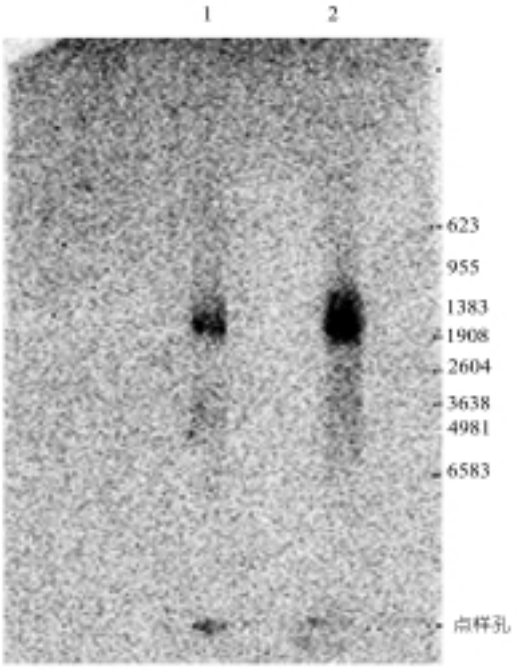


图 2　确证 DNA 芯片 mRNA 水平表达变化的代表性 Northern 分析

分别用活 *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra 和热灭活的死 *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra 感染细胞, 感染 36 h 后抽提细胞总 mRNA, 进行 Northern. 图中代表性的基因为 syndecan 结合蛋白的编码基因. 巨噬细胞吞噬活细菌后, 该基因的表达下调 12.5 倍. 1 示感染后的基因表达; 2 示感染前的基因表达

3　讨论

研究 MTB-宿主细胞相互作用是认识 MTB 致病机理的关键之一. 本文利用 DNA 芯片研究 MTB 入侵诱导的人巨噬细胞全局基因表达, 结果显示, 总体上, 细菌入侵抑制巨噬细胞的基因表达, 差异表达的基因有 473 个, 分别属于不同功能组(表 1). 大部分基因以前未报道, 现部分分析如下.

差异表达幅度最大的是 syntenin(syndecan binding protein (syntenin)-SDCBP NM_005625), 下调达 12.5 倍. syntenin 是含有 PDZ 模块的跨膜接头蛋白质, 能够与 syndecan(syndecan 属于跨膜硫酸肝素蛋白聚糖家族, 为激活配体依赖性细胞表面信号传导受体的关键分子, 在细胞-细胞和细胞-细胞外基质相互作用中具有重要的介导功能)的胞浆区域、离子通道、肿瘤抑制因子、GTP 酶激活蛋白和其他跨膜受体结合, 形成蛋白质多聚体, 介导受体成簇或蛋白质与细胞骨架结合, 或蛋白质与其下游的信号传导元件偶联, 且调控与其结合的膜受体或炎症介导因子在细胞的正确定位[8], syntenin 能被 TNF 诱导[8], 尽管基因表达的变化幅度大未必意味着该基因的功能也重要, 但本文报道了 syntenin 参与 MTB-宿主相互作用. 今后需研究抑制 syntenin 表达是否调控免疫细胞功能.

(1) 离子通道: 离子在细菌与宿主巨噬细胞的相互作用中具有重要作用. 巨噬细胞杀死其中有毒 MTB 需要与溶酶体融合[3], MTB 抑制巨噬细胞吞噬体与溶酶体融合[4], 这种融合依赖钙离子[9], 钙离子诱导 MTB 的多个基因, 但未见报道离子通道的功能. 我们发现细菌入侵导致巨噬细胞的钾离子通道和钠离子通道的表达在转录水平被抑制近 3 倍, 这是否影响离子通道的功能, 从而改变胞内离子浓度, 使之更有利于细菌逃避宿主细胞的免疫监视和在巨噬细胞内生存、繁殖, 仍有待进一步研究. 我们利用膜片钳技术研究离子通道在功能水平上的改变也确证了 DNA 芯片研究数据的正确性(结果未显示).

(2) 信号传导: 细菌入侵激发宿主细胞内一系列的信号传导事件[10]. 已经报道酪氨酸激酶参与了吞噬体与溶酶体的融合. 我们的数据也显示酪氨酸激酶的表达在转录水平被抑制, 同时显示细菌入侵涉及复杂的信号传导, 包括 G 蛋白偶联的信号传导途径、钙离子诱导的信号

传导途径和磷酸肌醇途径等.

(3) 泛肽-蛋白酶体系统: 蛋白酶体是真核细胞除溶酶体外主要的蛋白酶复合体[11], 包括 26S 蛋白酶体和辅助因子泛肽等, 其中的酶具肽酶活性, 可以降解羧基端酸性、中性和碱性氨基酸, 在细胞内具多种重要功能, 如降解蛋白质, 产生长度适宜的肽类抗原表位或表位前体, 由 MHC-Ⅰ分子递呈给 CD8+T 细胞. 如果抑制该系统, 宿主的免疫监视功能将大大削弱[11]. 本实验显示该系统的诸多因子在转录水平被抑制, 其中包括重要因子 26S 亚基. 这提示 MTB 除了抑制吞噬体与溶酶体融合外, 可能还通过抑制该系统得以逃脱免疫监视和免疫攻击.

(4) 受体: 受体对于 MTB 有多种重要意义. (ⅰ) MTB 主要利用宿主细胞表面的多个受体, 包括甘露糖受体、补体受体和 Fc 受体等进入细胞[4]. (ⅱ) 受体是宿主抗感染免疫的必要元件之一. D3 受体增强宿主细胞的抗 MTB 感染免疫功能. 类固醇类激素 VD3 能够活化巨噬细胞, 提高后者杀灭其中细菌的能力. D3 的作用机制之一是通过与 D3 受体结合, 然后转位至核仁, 直接结合其中的 D3 活化基因的上游一致序列, 调控该基因的转录. 为了生存, 入侵细菌抑制 D3 受体的表达[12]. 本实验中 D3 受体被抑制了 3 倍多. 抑制 D3 受体还可以减少激活磷脂酰肌醇激酶 3 和 NADPH 氧化酶, 减少活性氮中间物的产生. 入侵细菌也抑制抗体受体的表达达 3 倍, 提示抗体在抗结核免疫中具有重要作用. MTB 的 N-甲基化肽段比较多, 识别和递呈这些肽段对于抗结核免疫具有重要意义. 入侵细菌抑制 N-甲基化肽段受体的表达(fMLP-R98). 细胞因子及其受体在抗结核免疫中的作用已经得到广泛的实验支持[10,13,14]. 入侵的细菌抑制多种细胞因子受体的表达, 如白介素 11 受体α链, 肿瘤坏死因子受体. (ⅲ) 受体在抗结核免疫信号传导中具有关键作用. 入侵的细菌也调控一系列与信号传导有关的受体的表达, 如受体酪氨酸激酶 DDR. (ⅳ) 其他功能不明物质的受体表达也被抑制, 如γ氨基丁酸 A 受体α-2 亚基.

一般认为形成肉芽肿有助于控制细菌感染. 本文数据显示, 入侵的细菌抑制了与肉芽肿形成有关的基因(X 染色体上慢性肉芽肿疾病相关的 X-CGD 基因)的表达, 提示可能存在有助于细菌在巨噬细胞内生存和繁殖的新机制.

其他编码诸如细胞骨架有关因子, 与溶酶体成分有关的蛋白, 核糖体、高尔基体的元件, 转录因子和翻译因子的基因在转录水平的表达被抑制.

尽管有关技术和研究还处于初期, 存在诸如假阳性高、不同平台间可比性差、设备昂贵和成本高, 未必能检测到基因表达的细微变化, 数据分析的生物信息学工具有限和不易数据管理等缺陷, 但是全局基因表达谱为研究宿主细胞对微生物整体及组分的反应、致病菌的毒力机理和宿主的免疫反应机理提供了新机遇[15]. 我们在实验设计和实验过程中充分考虑了这些固有缺陷, 尽可能将实验误差降到最小, 而且, 通过与 NIH 芯片的对照研究也提示了 95%的一致性(数据未显示).

由于实验设施限制, 本实验仅进行了无毒株攻击, 但为今后进一步利用有毒株和临床分离的药物敏感菌株和耐药性菌株攻击提供了技术平台, 所得到的数据为深入揭示了 MTB-巨噬细胞相互作用机理提供了基础.

致谢 感谢复旦大学医学院闻玉梅教授提供 U937 细胞株和对实验设计、文章写作给予的指导. 上海市肺科医院的周伯年、肖和平、靳安佳、粟波和本课题组的淳于利娟为实验提供帮助, 特此致谢.

参　考　文　献

1 谢建平, 陈永青, 王洪海. 结核分枝杆菌的后基因组研究与新型疫苗. 微生物学报, 2001, 41(2): 252~257

2 Aderen A, Underhill D M. Mechanisms of phagocytosis in macrophage. Ann Rev Immunol, 1999, 17: 593~623

3 Sturgill-Koszycki S, Schlesinger P H, Chaklaborty P, et al. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. Science, 1994, 263(5147): 678~681

4 Ragno S, Estrada I, Butler R, et al. Regulation of macrophage gene expression following invasion by *Mycobacterium tuberculosis.* Immunlo Lett, 1997, 57(1-3): 143~146

5 陈少全, 陈菊祥, 施靖华, 等. 基因表达谱芯片在筛选胃腺癌相关基因中的应用. 第二军医大学学报, 2001, 22(7): 523~526

6 Khan J, Saal L H, Chen Y D, et al. Expression profiling in cancer using cDNA microarray. Electrophoresis, 1999, 20(2): 223~229

7 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem, 1987, 162(1): 156~159

8 Stier S, Totzke G, Grunewald E, et al. Identification of syntenin and other TNF-inducible genes in human umbilical arterial endothelial cells by suppression subtractive hybridization. FEBS Lett, 2000, 467(2-3): 299~304

9 Malik Z A, Lyer S S, Kusner D J. Phagosomes exhibit altered calmodulin-dependent signal transduction: contribution to inhibition of phagosome-lysosome fusion and intracellular survival in human macrophage. J Immunol, 2001, 166(5): 3392~3401

10 Underhill D N,Ozinsky A, Smith K D, et al. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophage. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(25): 14459~14463

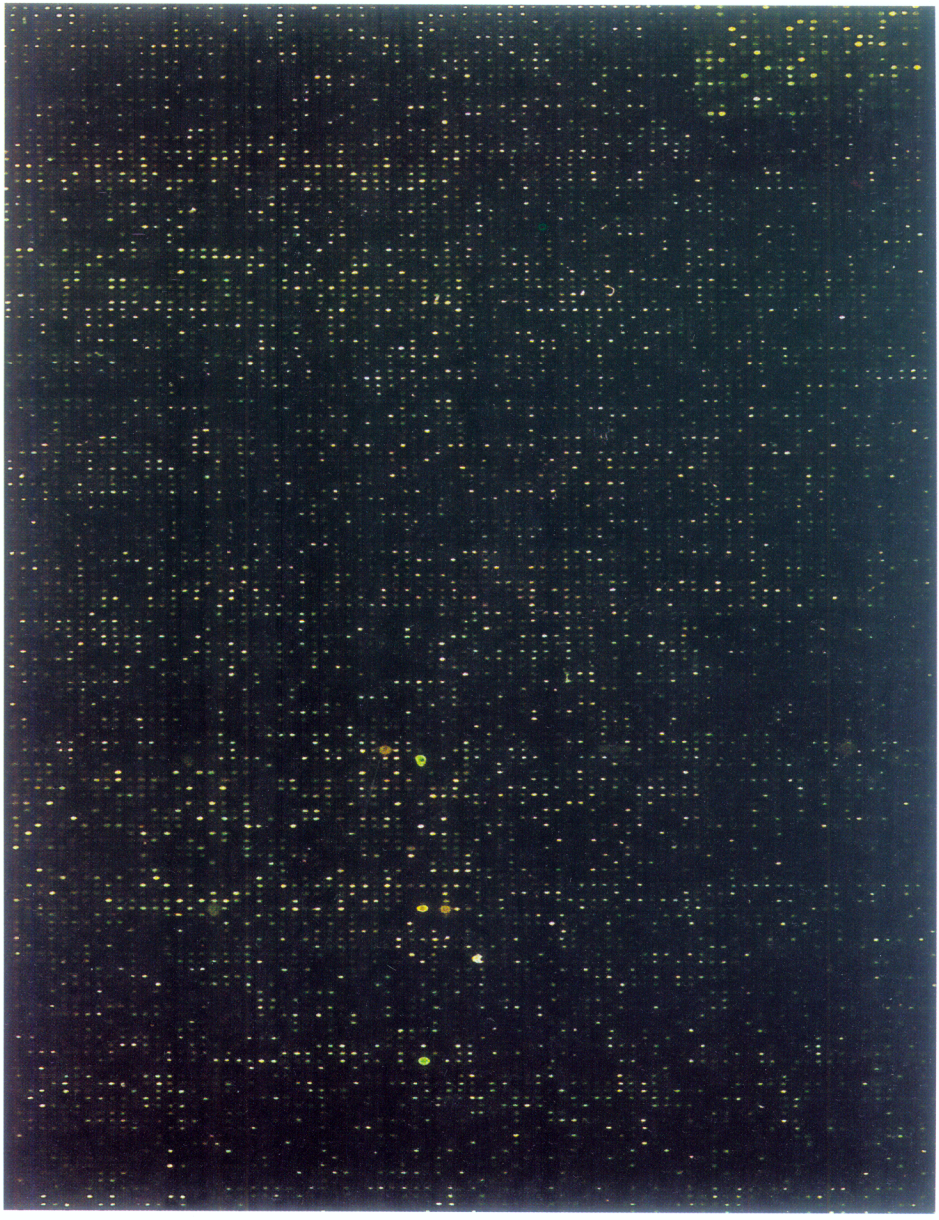
11 Frank G W, Masters E I, Kramer L, et al. Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. Nature, 2000, 408(6808): 115~120

12 Laura M S, Martin L, William M N, et al. 1-alpha,25-dihydroxyvitamin D3-induced monocyte antimycobacterial activity is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase and mediated by the NADPH-dependent phagocyte oxidae. J Biol Chem, 2001, 276(38): 35482~35493

13 Balcewicz-Sablinska M K, Keane J, Kornfield H, et al. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophage by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-alpha. J Immunol, 1998, 161(5): 2636~2641

14 Rojas M, Olivier M, Gras P, et al. TNF-alpha and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophage. J immunol, 1999, 162(10): 6122~6131

15 Kagnoff M F, Eckmann L. Analysis of host responses to microbial infection using gene expression profiling. Curr Opion Microbiol, 2001, 4(3): 246~250



结核分枝杆菌入侵前后巨噬细胞基因表达谱芯片杂交信号扫描结果

每个数据点示芯片上一个基因点的杂交信号；对于某一点的两种叠加荧光信号，如果 Cy3 信号较强，该点多显绿色(下调趋势)；如果 Cy5 信号较强，该点多显红色(上调趋势)；如果强度相似，即显黄色