

网络出版时间:2019-01-24 16:29

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2019.08.002

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20190124.1627.004.html>

p53 信号通路在 MTB 感染肺泡 II 型上皮细胞系 A549 中的免疫调控作用

王媛^{a,b}, 白贵斌^{a,b}, 王娟^b, 曾瑾^{a,b}, 刘晓明^{a,b}, 李勇^{a,b}

(宁夏大学 a 西部生物资源保护与利用教育部重点实验室, b 生命科学学院, 宁夏 银川 750021)

【摘要】 **【目的】** 探讨 *p53* 通路在结核分枝杆菌(MTB)感染肺泡 II 型上皮细胞(AEC II)中的免疫调控作用。**【方法】** 将供试的 *p53* 基因过表达和干扰载体转染 293T 细胞, 对其作用效果进行验证。利用脂质体分别转染 *p53* 基因过表达和干扰载体到 AEC II 细胞系 A549 中, 建立 *p53* 基因过表达和干扰 A549 系模型细胞。用牛结核分枝杆菌减毒株(BCG)分别感染未经任何处理的 A549 细胞(感染对照组)及模型细胞, 以未感染 BCG 的各类 A549 细胞为参照。以 β -actin 为内参基因, 通过实时荧光定量 PCR 和 Western blot 来分析信号分子 *p53*、*p300*、NF- κ B、TLR-4、TRAF6 在 mRNA 和蛋白水平的表达, 以及炎症细胞因子 *TNF- α* 、*IFN- γ* 、*IL-6* 和 *IL-8* 的 mRNA 表达情况。**【结果】** 过表达载体 pIRES2-EGFP-*p53* WT 和干扰载体 TP53-RNAi(2648) 作用效果明显, 成功建立了 *p53* 基因过表达和干扰的 A549 细胞模型。BCG 感染的对照组、*p53* 基因过表达组和干扰组的 A549 细胞中, *p53*、*p300*、NF- κ B、TLR-4、TRAF6 在 mRNA 和蛋白水平的表达显著或极显著高于相应的 BCG 未感染组, 其中 *p300* 表达与 *p53* 基因表达量呈正相关, NF- κ B、TLR-4、TRAF6 表达与 *p53* 基因表达量呈负相关; BCG 感染可引起 *TNF- α* 、*IFN- γ* 、*IL-6* 和 *IL-8* 的显著表达, 且与 *p53* 基因表达量呈负相关。**【结论】** BCG 感染 A549 细胞时, *p53* 信号通路中的 *p53* 协同 *p300* 来抑制 NF- κ B、TLR-4 和 TRAF6 的活化及负调控 *TNF- α* 、*IFN- γ* 、*IL-6* 和 *IL-8* 的分泌, 从而抵抗 MTB 的侵袭。

【关键词】 结核分枝杆菌; 肺泡 II 型上皮细胞; *p53*; 免疫调控

【中图分类号】 S852.61⁺8

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2019)08-0008-09

Effect of *p53* signaling pathway on AEC II line A549 infected with *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)

WANG Yuan^{a,b}, BAI Guibin^{a,b}, WANG Juan^b, ZENG Jin^{a,b},

LIU Xiaoming^{a,b}, LI Yong^{a,b}

(a Key Laboratory of Ministry of Education for Conservation and Utilization of Spectial Biological Resources in the Western China,

b School of Life Science, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

Abstract: **【Objective】** This study aimed to investigate the immunity regulation of *p53* signaling pathway in type II alveolar epithelial cells (AEC II) infected with *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). **【Method】** The overexpression and interference vectors of *p53* gene were transfected into 293T cells and confirmed. The *p53* gene overexpression and interference vectors were transfected into the AEC II cell line A549 separately to establish the AEC II cell models by liposome. The normol (as control group of infected with BCG) and model A549 cells were infected with the attenuated strain of *Mycobacterium tuberculosis* (BCG). Using the BCG un-infected A549 cells as blank cells and β -actin as internal reference gene, the mR-

【收稿日期】 2018-06-28

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31560694); 宁夏高校科学研究项目(NGY2015052, NXY2016008)

【作者简介】 王媛(1991—), 女, 内蒙古阿拉善人, 硕士, 主要从事人兽共患病发病机制研究。E-mail: 1085816471@qq.com

【通信作者】 李勇(1977—), 男, 陕西西安人, 教授, 博士, 主要从事人兽共患病发病机制研究。E-mail: liyong7732@nxu.edu.cn

NA and protein expressions of p53, p300, NF- κ B, TLR-4 and TRAF6 were analyzed by real-time quantitative PCR and Western blot, and the mRNA levels of inflammatory cytokines including *TNF- α* , *IFN- γ* , *IL-6* and *IL-8* were investigated. 【Result】 The overexpression vector pIRES2-EGFP-p53 WT and the interference vector TP53-RNAi (2648) were functional, and the AEC II cell models of p53 gene overexpression and interference were successfully established. The expressions of p53, p300, NF- κ B, TLR-4, and TRAF6 in the BCG-infected A549 cell control group, p53 gene overexpressed group and interfered group were significantly or extremely significantly higher than those of blank group. The expressions of p53 and p300 were positively correlated to the over or interfering expressions of p53 gene. The expressions of NF- κ B, TLR-4 and TRAF6 were negatively correlated to the expressions of p53 gene. The BCG infection could increase the expressions of *TNF- α* , *IFN- γ* , *IL-6* and *IL-8* in A549 cells, and the expressions of these inflammatory cytokine were negatively correlated to the expressions of p53. 【Conclusion】 When A549 cells are infected with BCG, p53 would cooperate with p300 in the p53 signaling pathway to inhibit the activation of NF- κ B, TLR-4 and TRAF6, and negatively regulate the secretion of *TNF- α* , *IFN- γ* , *IL-6* and *IL-8* against MTB infection.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; type II alveolar epithelial cells; p53; immune regulation

结核病(tuberculosis, TB)是由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)引起的一种以呼吸系统感染为主的人、畜共患的慢性消耗性传染病^[1-3],是一种跨人、家畜和野生动物传播的复杂性疾病,受多种因素的影响^[4-5]。虽然从 MTB 发现至今已有 130 多年的历史,但是结核病的发病机制仍未阐明。

肺泡 II 型上皮细胞(type II alveolar epithelial cells, AEC II)和肺泡巨噬细胞(alveolar macrophage, AMs)一样,都是肺脏中结核分枝杆菌复制与储存的靶细胞,在机体抗 MTB 感染过程中发挥着重要的免疫调控作用。AEC II 通过分泌细胞因子和趋化因子来调控宿主先天免疫应答,从而建立肺泡内细胞因子调控网络^[6]。在长期的进化选择下,MTB 可以侵入 AEC II 中定殖和复制。MTB 在 AEC II 内的复制活性比在巨噬细胞内更高,可通过刺激 AEC II 分泌细胞因子来产生细胞毒性,从而避免宿主免疫系统的感知与清除^[7-9]。AEC II 也可以通过分泌细胞因子,募集巨噬细胞到肺泡区域参与机体的抗结核调控。因此,AEC II 在抗 MTB 感染免疫调控中的作用越来越受到重视。

p53 是一种肿瘤抑制因子,可调控细胞凋亡、细胞周期阻滞,维持基因组的稳定性^[10-12]。p53 信号通路参与调控人类许多常见癌症的发生。p53 可被肿瘤坏死因子 *TNF- α* 诱导激活,协同 Sonic Hedgehog(SHH)信号通路来调节细胞的内稳态^[6]。研究发现病原菌(如 MTB)感染机体的免疫调控过程中也有 p53 信号通路的参与。在牛结核分枝杆菌减毒株(*Bacillus Calmette-Guérin*, BCG)感染 AEC II 的

过程中,p53 信号通路可抑制 *TNF- α* 介导的细胞死亡^[6]。但 p53 信号通路如何在抗结核免疫调控中发挥作用,尚未见详细报道。核转录因子 NF- κ B 是调控病原微生物感染宿主免疫应答和炎性反应的重要因子^[13-14],其在 AMs 和 AEC II 中的表达水平随细胞表面识别受体 TLR-4 的激活而增加^[15]。p53 在炎症反应和免疫调节中,也可促进 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)依赖性炎症细胞因子的产生^[15-16];同时,研究发现 TLR-4 和下游信号 TRAF6 在 BCG 感染 AMs 时需要 p53 信号通路参与调控^[15,17]。由此可见,AEC II 在抗 MTB 感染时的免疫调控机制是比较复杂的。那么,MTB 感染 AEC II 是如何通过 p53 信号通路调控细胞的免疫应答和炎症反应的,仍未见报道^[16]。为此,本试验建立了 p53 基因过表达和干扰的 AEC II 细胞系 A549 模型,研究 BCG 感染模型细胞时,p53 信号通路相关信号因子(p53、p300、NF- κ B、TLR-4、TRAF6)及炎症细胞因子(*TNF- α* 、*IFN- γ* 、*IL-6*、*IL-8*)mRNA 表达水平的变化情况,以期揭示 p53 信号通路在 MTB 感染 AEC II 中的免疫调控机制。

1 材料与方法

1.1 菌株与细胞株

牛结核分枝杆菌减毒株,购于成都生物制品研究所;AEC II 细胞系 A549 和人肾上皮细胞系 293T,购于中国科学院北京协和细胞库。

1.2 主要试剂

具有卡那霉素(Kana)抗性的 p53 基因过表达载体 pIRES2-EGFP-p53 WT,购于 Addgene;具有

氨苄青霉素(Amp)抗性的 *p53* 基因干扰载体 TP53-RNAi (2645)、TP53-RNAi (2646)、TP53-RNAi (2647)、TP53-RNAi(2648)和空载体 con048,购于上海吉凯基因化学技术有限公司。DMEM 高糖培养液、青霉素-链霉素溶液(100×)、2.5 g/L 胰酶、胎牛血清(FBS)、Lipofectamine™ 3000 Reagent、蛋白彩色预染 Marker,购于 Thermo Fisher scientific;胰化蛋白胨、酵母浸出物、琼脂、氯化钠(NaCl)、Opti-MEM™ Medium、Tween-80、二甲基亚砜(DMSO),购于 Sigma;兔源一抗 *p53*、*p300*、NF- κ B-*p65*、TLR-4、鼠源一抗 TRAF6 和 β -actin,购自 Cell signaling Technology;二抗 IRDye 800CW goat anti-mouse IgG(H+L)、IRDye 800CW goat anti-rabbit IgG(H+L),购于 Licor 公司;Middlebrook 7H9 培养基、Middlebrook OADC Enrichment,购于 BD 公司;TIANGEN 无内毒素质粒小提中量试剂盒、TIANGEN 培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒、无核酶水(DNase/RNase-Free),购于北京天根生化科技有限公司;TransScript Frist-Strand cDNA Synthesis 试剂盒、TransScript® Top/Tip Green qPCR SuperMix、6 Protein Loading Buffer,购于北京全式金生物技术有限公司;凯基全蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒,购于南京凯基生物科技发展有限公司。

1.3 *p53* 基因过表达和干扰载体的验证

将 *p53* 基因干扰载体和过表达载体菌液在含对应抗性的 LB 培养基中扩增后,用 TIANGEN 无内毒素质粒小提中量试剂盒提取质粒,−20 ℃ 保存备用。将 293T 细胞(密度为 1×10^6 个/mL)接种于 6 孔板,次日待细胞融合度达 70% 时,利用 Lipofectamine™ 3000 Reagent 转染 *p53* 基因干扰及过表达载体,每组重复 3 次。将转染后的 293T 细胞于 37 ℃、体积分数 5% CO_2 和饱和湿度条件下培养 48 h 后,观察其绿色荧光蛋白(GFP)表达情况,并收集细胞样品,以 β -actin 为内参蛋白进行 Western bolt 筛选验证。利用 Image J 软件对 Western bolt 试验结果进行图片灰度值分析,以目的蛋白及内参 β -actin 灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达水平。以转染空载体 con048 的 293T 细胞为对照组(CK)。

1.4 *p53* 基因过表达和干扰 A549 细胞模型的建立

将筛选得到的 *p53* 基因过表达和干扰载体在含相应抗性的 LB 培养基上扩增后,用 TIANGEN 无内毒素质粒大提试剂盒提取质粒,用超微量分光光

度计(nanodrop 8000)测定质粒浓度及纯度后分装,−20 ℃ 保存备用。将 A549 细胞(密度为 5×10^5 个/mL)接种于 6 孔板,次日待细胞融合度达 60% 时,利用 Lipofectamine™ 3000 Reagent 将筛选得到的 *p53* 基因过表达和干扰载体转染其中,每组重复 3 次,37 ℃、体积分数 5% CO_2 和饱和湿度条件下培养 48 h 后,观察 A549 细胞中 GFP 的表达情况,同时收集细胞样品,以 β -actin 为内参蛋白,进行 Western bolt 试验,检测 *p53* 和 NF- κ B 蛋白的相对表达水平。利用 Image J 软件对 Western bolt 试验结果进行图片灰度值分析,以 β -actin 为内参,获得目的蛋白的相对表达水平。以未经任何处理的 A549 细胞为空白对照组(CK)。

1.5 BCG 感染对模型 A549 细胞 *p53* 信号通路相关因子表达的影响

以感染复数(MOI)为 10 的 BCG 感染未经任何处理的 A549 细胞及 *p53* 基因过表达和干扰的 A549 细胞(BCG⁺ 处理),并以未感染的各类 A549 细胞为参照(BCG[−] 处理),继续培养 24 h 后收集细胞样品备用,每组细胞处理重复 3 次。选用 β -actin 基因为内参基因,采用实时荧光定量 PCR(Real-time-PCR)法检测上述 A549 细胞样品中 *p53* 信号通路相关信号因子(*p53*、*p300*、NF- κ B、TLR-4、TRAF6)及炎症细胞因子(TNF- α 、IFN- γ 、IL-6、IL-8)mRNA 的表达情况,并采用 Western blot 试验分析 *p53* 信号通路相关信号因子的表达情况。

1.5.1 实时荧光定量 PCR 参考 GenBank 中各基因的序列,根据 Realtime-PCR 引物设计原则,采用 Primer 5.0 软件设计试验所需的引物,并交由生工生物工程(上海)有限公司合成。各引物信息详见表 1。

利用 TIANGEN 培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒提取上述 A549 细胞总 RNA,用超微量分光光度计(nanodrop 8000)测定样品总 RNA 浓度及纯度。以样品最小 RNA 浓度为准,调整所有待测样品达到同一浓度。利用 TransScript Frist-Strand cDNA Synthesis 试剂盒反转录 5 μ g 总 RNA,反应体系为 20 μ L。将反转录所得 cDNA 按 5 倍稀释后进行 RT-PCR,反应体系为:2×TransScript® Top/Tip Green qPCR SuperMix 10 μ L,ddH₂O 7 μ L,上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L,模板 cDNA(50 ng/ μ L)1 μ L。使用 Qtower 2.0 荧光定量 PCR 仪检测:94 ℃ 30 s;94 ℃ 5 s,56 ℃ 15 s,72 ℃ 10 s,循环 40 次。采用 2^{− $\Delta\Delta C_t$} 法分析各基因 mRNA 的相对

表达水平。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物
Table 1 Real-time fluorescent quantitative PCR primers

GenBank 参考序列 GenBank reference sequence	基因 Gene	引物名称 Oligo name	序列(5'→3') Sequence(5'→3')	产物长度/bp Product length
AB_082923.1	<i>p53</i>	<i>p53</i> _F <i>p53</i> _R	CCTCCTGGCCCCTGTCATCTT GGCGGGGGTGTGGAATCAA	193
NM_001429.3	<i>p300</i>	<i>p300</i> _F <i>p300</i> _R	CAAACGCCGAGTCTTCTTTC GTTGAGCTGCTGTTGGCATA	118
NM_002502.5	<i>NF-κB</i>	<i>NF-κB</i> _F <i>NF-κB</i> _R	AGGAGAGGATGAAGGAGTTGTG CCAGAGTAGCCCAGTTTTTGTC	218
NM_003266	<i>TLR-4</i>	<i>TLR-4</i> _F <i>TLR-4</i> _R	CCGCTTCCTGGTCTTATCAT TCTGCTGCAACTCATTTTCAT	141
NM_145803.2	<i>TRAF6</i>	<i>TRAF6</i> _F <i>TRAF6</i> _R	TAGCCCTGGATTCTACACTGG CTTCGTGGTTTTGCCTTACAG	215
NM_000600.3	<i>IL-6</i>	<i>IL-6</i> _F <i>IL-6</i> _R	GACAGCCACTCACCTCTTCAG CATCCATCTTTTTTCAGCCATC	172
NM_000584.3	<i>IL-8</i>	<i>IL-8</i> _F <i>IL-8</i> _R	TTTGCCAAGGAGTGCTAAAGA GCCCTCTTCAAAAACCTCTCC	216
NM_000619	<i>IFN-γ</i>	<i>IFN-γ</i> _F <i>IFN-γ</i> _R	TCATCCAAGTGATGGCTGAA ATATTGCAGGCAGGACAACC	223
NM_000594.2	<i>TNF-α</i>	<i>TNF-α</i> _F <i>TNF-α</i> _R	TAGCCCATGTTGTAGCAAACC ATGAGGTACAGGCCCTCTGAT	136
BC_002409	<i>β-actin</i>	<i>β-actin</i> _F <i>β-actin</i> _R	AGCGAGCATCCCCAAAAGTT GGGCACGAAGGCTCATCATT	285

1.5.2 Western blot 分析 利用凯基全蛋白提取试剂盒提取 A549 细胞样品总蛋白,用凯基 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量,计算各组样品的质量浓度(μg/μL)。

进行 Westernblot 分析时, p53、NF-κB、TRAF6、β-actin 蛋白配制 10%分离胶, p300、TLR-4 配制 8%分离胶;各样品均采用 5%浓缩胶。各组样品上样量均为 50 μg。点样后,恒压 80 V 电泳 2 h,恒流 300 mA 湿转 3 h。转膜完毕后,用 TBS 配制的体积分数 5%牛奶于室温下封闭 2 h。用经封闭液稀释的一抗于 4 ℃过夜孵育;次日室温平衡 30 min 后,用体积分数 0.3% TBS-Tween-20 快速洗膜 3 次,5 min/次。洗膜后加入荧光二抗,室温避光振荡孵育 1 h;洗膜同上。

利用双色红外激光成像系统(Odyssey Sa)进行曝光,利用 Image J 软件对曝光图片进行灰度值分析,以目的蛋白及内参 β-actin 灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达水平。

1.6 数据分析

试验数据均采用 SPSS 20 软件、GraphPad Prism 5 软件和 Image J 软件进行分析,各组数据采用单因素方差分析,LSD 检验。

2 结果与分析

2.1 *p53* 基因过表达和干扰载体作用效果的验证

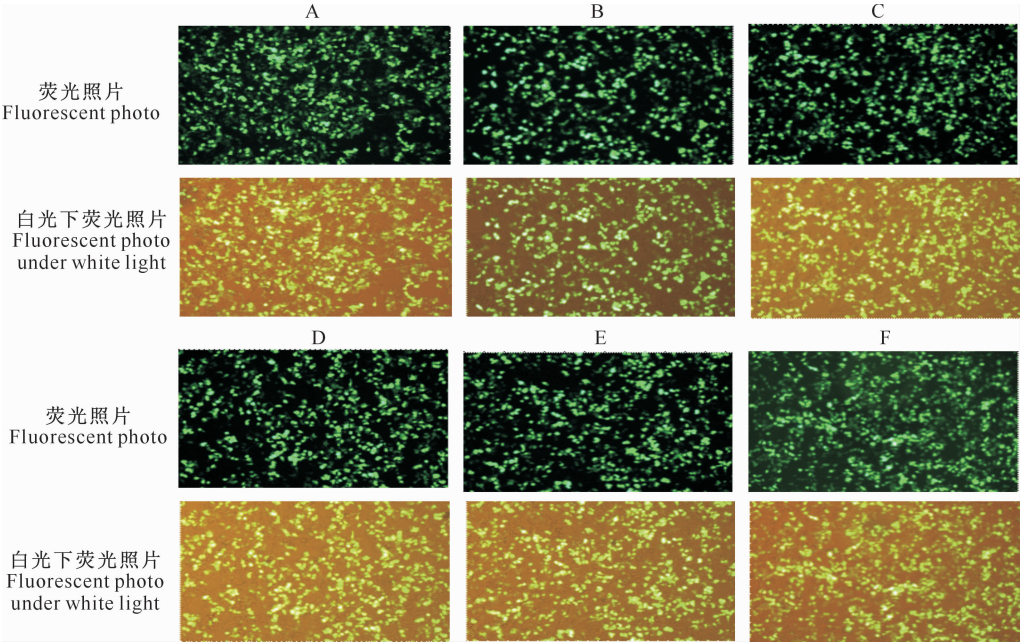
将 *p53* 基因干扰和过表达载体分别瞬时转染到 293T 中,培养 48 h 后,在荧光显微镜下观察发现, *p53* 基因过表达和干扰载体转染的 293T 中,GFP 阳性细胞率约为 70%,较空载体 con048 转染的 293T 对照细胞(阳性细胞率为 80%)低(图 1),表明目的载体已经成功转入 293T 细胞中。

由图 2 可知, pIRES2-EGFP-p53 WT 载体对 293T 中的 p53 蛋白的过表达效果非常明显;在 4 个干扰载体中, TP53-RNAi (2648)载体对 293T 中 p53 蛋白的干扰效果最明显,故后续试验选择 TP53-RNAi(2648)载体作为干扰载体。

2.2 *p53* 基因过表达和干扰 A549 细胞模型的建立

荧光显微镜观察结果显示,未经任何处理的空白对照组 A549 细胞无 GFP 表达(图 3-A); *p53* 基因干扰载体 TP53-RNAi (2648)转染组 A549 细胞中,GFP 阳性细胞比例约为 30%(图 3-B); *p53* 基因过表达载体 pIRES2-EGFP-p53 WT 转染组 A549 细胞中,GFP 阳性细胞的比例约为 40%(图 3-C)。表明 TP53-RNAi(2648)和 pIRES2-EGFP-p53 WT

已经成功转入 A549 细胞中。



A. 转染空载体 con048 的 293T 细胞;B. 转染过表达载体 pIRES2-EGFP-p53 WT 的 293T 细胞;C~F. 分别为转染干扰载体 TP53-RNAi(2645)、TP53-RNAi(2646)、TP53-RNAi(2647)和 TP53-RNAi(2648)的 293T 细胞
A. 293T cells transfected with empty vector con048;B. 293T cells transfected with expression vector pIRES2-EGFP-p53 WT;
C—F. 293T cells transfected with interference vectors TP53-RNAi (2645),TP53-RNAi (2646),
TP53-RNAi (2647) and TP53-RNAi (2648), respectively

图 1 $p53$ 基因过表达和干扰载体转染 293T 细胞 48 h 后的 GFP 表达情况(100×)
Fig. 1 GFP expression of cells transfected with $p53$ gene and interfered with
vector transfected 293T cells for 48 h (100×)

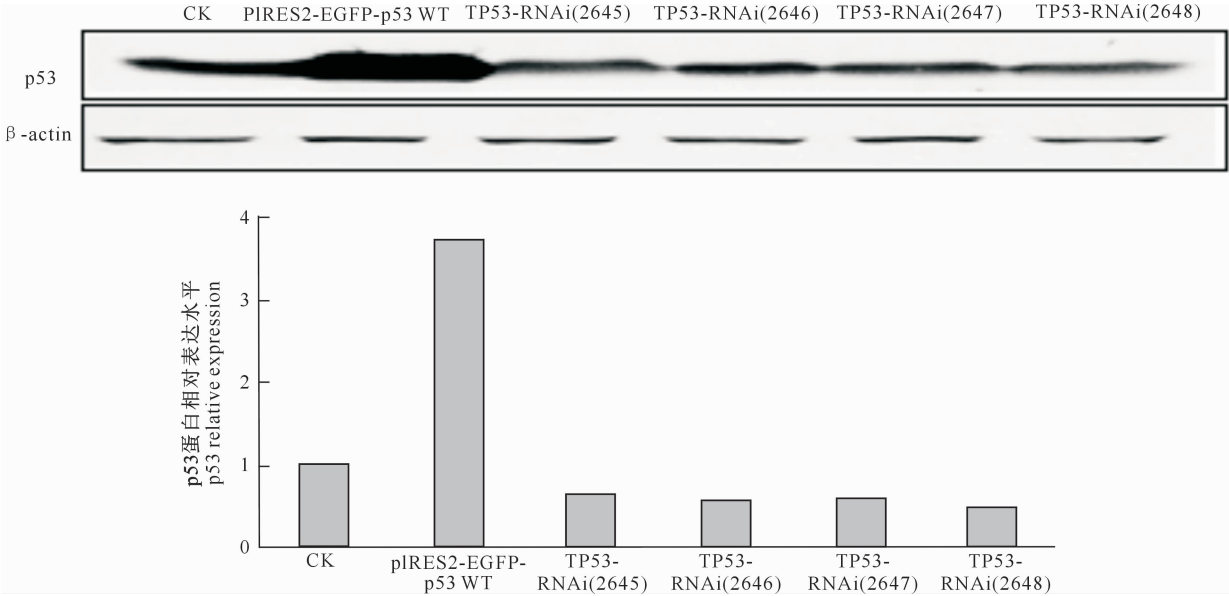
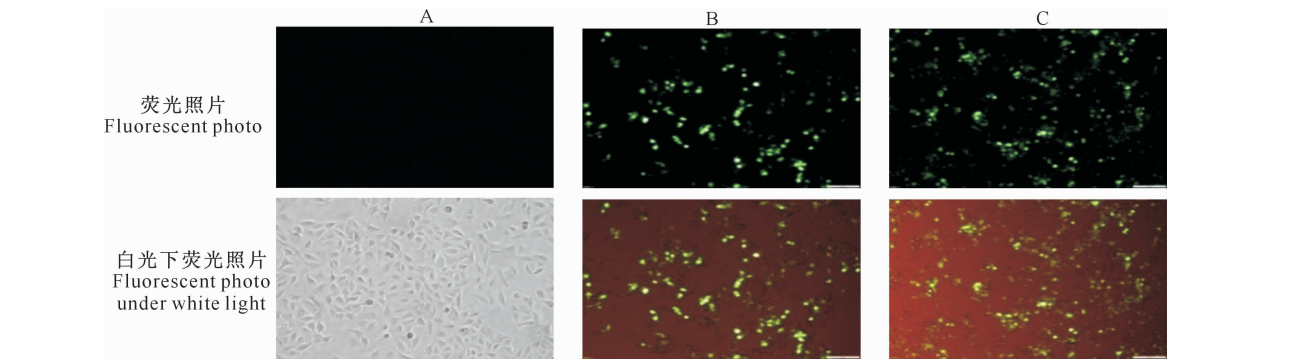


图 2 $p53$ 基因过表达和干扰载体转染 293T 细胞后 p53 蛋白的相对表达水平
Fig. 2 Relative expression level of p53 protein after $p53$ gene overexpression and
interference vector transfection into 293T cells



A. 空白对照;B. 转染 TP53-RNAi(2648)的 A549 细胞;C. 转染 pIRES2-EGFP-p53 WT 的 A549 细胞
A. CK;B. A549 cells transfected with TP53-RNAi (2648);C. A549 cells transfected with pIRES2-EGFP-p53 WT
图 3 *p53* 基因过表达和干扰载体转染 A549 细胞 48 h 后的 GFP 表达情况(100×)

Fig. 3 GFP expression of cells transfected with *p53* gene and interfered with vector transfected A549 cells for 48 h (100×)

由表 2 可知,*p53* 基因干扰载体组 A549 细胞 *p53* 蛋白表达水平较对照组极显著下降,NF-κB 蛋白表达水平较对照组极显著升高;*p53* 基因过表达组 A549 细胞 *p53* 蛋白表达水平较对照组极显著升高,NF-κB 蛋白表达水平较对照组极显著下降。

表 2 *p53* 基因过表达和干扰的 A549 细胞中
p53 和 NF-κB 蛋白的相对表达水平

Table 2 Relative expression levels of *p53* and NF-κB protein in A549 cells overexpressing and interfered with *p53* gene

组别 Group	<i>p53</i> 蛋白 <i>p53</i> protein	NF-κB 蛋白 NF-κB protein
对照组 CK	1.00±0.000 bB	1.00±0.000 bB
<i>p53</i> 干扰组 <i>p53</i> interference group	0.92±0.002 aA	1.52±0.004 cC
<i>p53</i> 过表达组 <i>p53</i> overexpression group	2.81±0.023 cC	0.61±0.010 aA

注:同列数据后标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),标不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)。
Note: Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$), and different uppercase letters indicate extremely significant difference ($P<0.01$).

2.3 BCG 感染模型 A549 细胞 *p53* 信号通路相关因子 mRNA 和蛋白水平的表达分析

2.3.1 mRNA 水平表达分析 由表 3 可知,3 组 A549 细胞中,BCG⁺ 处理的 *p53*、*p300*、*TLR-4*、*NF-κB* 和 *TRAF6* 基因 mRNA 表达水平显著或极显著高于 BCG⁻ 组,这表明 BCG 感染可引起 *p53* 信号通路和 *NF-κB* 信号通路的活化。

p53 干扰组 BCG⁻ 处理的 *p53* 和 *p300* 基因 mRNA 表达水平较 CK 组 BCG⁻ 处理极显著降低,而 *TLR-4*、*NF-κB* 和 *TRAF6* 基因 mRNA 的表达水平极显著升高;*p53* 过表达组 BCG⁻ 处理的 *p53* 和 *p300* 基因 mRNA 表达水平较 CK 组 BCG⁻ 处理

极显著升高,而 *TLR-4*、*NF-κB* 和 *TRAF6* 基因 mRNA 的表达水平显著或极显著降低。这表明 *p53* 基因的表达可能与 *p300* 基因存在正调控作用,而与 *NF-κB* 信号通路相关基因存在负调控关系。

p53 干扰组 BCG⁺ 处理的 *p53* 基因 mRNA 表达水平相对于 CK 组 BCG⁻ 处理极显著升高,*p300* 基因 mRNA 表达水平差异不显著,而 *TLR-4*、*TRAF6* 和 *NF-κB* 基因的 mRNA 表达水平极显著升高;*p53* 过表达组 BCG⁺ 处理的 *p53*、*p300*、*TLR-4*、*TRAF6* 和 *NF-κB* 基因 mRNA 表达水平较 CK 组 BCG⁻ 处理极显著升高。BCG⁺ 处理后,*p53* 和 *p300* 基因的 mRNA 表达水平与 *p53* 基因表达量呈正相关,*TLR-4* 和 *NF-κB* 基因的 mRNA 表达水平与 *p53* 基因表达量呈负相关。NF-κB 信号通路中,*TRAF6* 基因的 mRNA 表达水平本应与 *p53* 表达量负相关,但本研究呈正相关,这一现象有待进一步分析。总之,在 BCG⁺ 处理下,*p53* 基因协同 *p300* 基因的表达来负调控 NF-κB 信号通路相关基因的表达。

2.3.2 蛋白水平表达分析 由表 4 可知,3 组 A549 细胞中,BCG⁺ 处理的 *p53*、*p300*、*TLR-4*、*NF-κB* 和 *TRAF6* 蛋白表达水平显著或极显著高于 BCG⁻ 组,与其 mRNA 的表现一致,这进一步证明了 BCG 的感染活化了 A549 细胞中 *p53* 信号通路和 *NF-κB* 信号通路。

p53 干扰组和过表达组经 BCG⁻ 处理,*p53*、*p300*、*TLR-4*、*NF-κB* 和 *TRAF6* 蛋白相对于 CK 组的表达变化规律与其 mRNA 水平表现一致,这在蛋白水平上表明 *p53* 蛋白的表达可协同 *p300* 来负调控 *NF-κB* 信号通路。

表 3 BCG 感染 *p53* 基因过表达和干扰 A549 细胞后 *p53* 信号通路相关因子 mRNA 的表达分析

Table 3 Relative expression of *p53* gene overexpression and interfered with mRNA expression of *p53* signaling pathway in A549 cells

基因 Gene	对照组 CK		<i>p53</i> 干扰组 <i>p53</i> interference group		<i>p53</i> 过表达组 <i>p53</i> overexpression group	
	BCG ⁻	BCG ⁺	BCG ⁻	BCG ⁺	BCG ⁻	BCG ⁺
<i>p53</i>	1.00±0.000	1.35±0.188**	0.67±0.122 aA	1.84±0.302 bB**	3.70±0.205 bB	6.39±0.138 cC**
<i>p300</i>	1.00±0.000	1.18±0.056*	0.53±0.085 aA	1.08±0.117**	1.64±0.225 bB	2.89±0.198 bA**
<i>TLR-4</i>	1.00±0.000	5.78±0.335**	2.39±0.304 aA	4.41±0.174 bB**	0.73±0.121 bB	2.92±0.256 cC**
<i>NF-κB</i>	1.00±0.000	1.95±0.074**	1.31±0.071 aA	2.56±0.118 bB**	0.93±0.082 b	1.59±0.107 cC**
<i>TRAF6</i>	1.00±0.000	2.43±0.17**	2.57±0.066 aA	1.95±0.177 bB**	0.45±0.010 bB	2.74±0.100 cC**

注:BCG⁻, BCG 未感染处理;BCG⁺, BCG 感染处理。同一基因,数据后标不同小写字母表示与对照组 BCG⁻ 处理差异显著($P<0.05$),标不同大写字母表示与对照组 BCG⁻ 处理差异极显著($P<0.01$);数据后标“*”和“**”分别表示与相应组的 BCG⁻ 处理差异显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)。下表同。

Note:BCG⁻, BCG uninfected treatment;BCG⁺, BCG infected treatment. Different lowercase and uppercase letters indicate that the same gene is significantly ($P<0.05$) and extremely significantly ($P<0.01$) different from the BCG uninfected control group. “*” and “**” indicate significant ($P<0.05$) and extremely significant difference ($P<0.01$) between BCG infection treatment and BCG uninfected treatment for same gene, respectively. The same below.

表 4 BCG 感染 *p53* 基因过表达和干扰 A549 细胞后 *p53* 信号通路相关基因蛋白的相对表达分析

Table 4 Relative expression of *p53* gene overexpression and interference with *p53* signaling pathway-related gene proteins in A549 cells

蛋白 Protein	对照组 CK		<i>p53</i> 干扰组 <i>p53</i> interference group		<i>p53</i> 过表达组 <i>p53</i> overexpression group	
	BCG ⁻	BCG ⁺	BCG ⁻	BCG ⁺	BCG ⁻	BCG ⁺
<i>p53</i>	1.00±0.000	1.11±0.005*	0.76±0.020 aA	1.70±0.011 bA**	1.55±0.082 bB	2.46±0.001 cB**
<i>p300</i>	1.00±0.000	6.28±0.163**	0.46±0.078 aA	1.29±0.005 bB**	1.62±0.028 bB	1.89±0.032 cC*
<i>TLR-4</i>	1.00±0.000	1.49±0.041**	1.34±0.027 aA	1.57±0.059 bB**	0.80±0.027 bB	1.31±0.032 cC**
<i>NF-κB</i>	1.00±0.000	1.36±0.039**	1.14±0.021 a	1.47±0.059 bB**	0.95±0.035	1.29±0.003 cC**
<i>TRAF6</i>	1.00±0.000	5.88±0.056**	1.76±0.020 aA	6.18±0.005 bB**	0.32±0.043 bB	0.54±0.042 cC**

p53 干扰组经 BCG⁺ 处理, *p53*、*p300*、*TLR-4*、*NF-κB* 和 *TRAF6* 蛋白相对于 CK 组 BCG⁻ 处理的表达变化规律与其 mRNA 水平表现一致。*p53* 过表达组 BCG⁺ 处理, *p53*、*TLR-4* 和 *NF-κB* 蛋白的表达相对于 CK 组 BCG⁻ 均与其 mRNA 表达变化规律一致; *p300* 蛋白的表达变化规律与其 *p53* 基因过表达组 mRNA 一致, 即感染后发生上调, 但表达水平显著低于 CK 组 BCG⁺ 处理; *TRAF6* 蛋白表达水平与其 mRNA 水平相反, 但却证实了其与 *p53* 基因的过表达成负相关, 这符合 *NF-κB* 信号通路其他相关信号的调控规律。经 BCG⁺ 处理后, *p53* 蛋白表

达量与 *p53* 和 *p300* 蛋白水平呈正相关, 与 *NF-κB* 信号通路的 *TLR-4*、*NF-κB*-*p65* 和 *TRAF6* 蛋白表达量呈负相关。这些试验结果在蛋白水平上进一步证明了在 BCG⁺ 下, *p53* 可协同 *p300* 的表达来负调控 *NF-κB* 信号通路参与 A549 细胞的抗结核分枝杆菌的感染。

2.4 BCG 感染模型 A549 细胞炎症细胞因子 mRNA 的表达分析

炎症细胞因子的表达分泌是 AEC II 抗 BCG 感染的一个重要方面。BCG 感染模型 A549 细胞后, 炎症细胞因子 mRNA 的表达结果见表 5。

表 5 BCG 感染 *p53* 基因过表达和干扰 A549 细胞后炎症细胞因子 mRNA 的相对表达分析

Table 5 Relative expression of inflammatory cytokine mRNA in BCG-infected *p53* gene overexpressing and interfered with A549 cells

基因 Gene	对照组 CK		<i>p53</i> 干扰组 <i>p53</i> interference group		<i>p53</i> 过表达组 <i>p53</i> overexpression group	
	BCG ⁻	BCG ⁺	BCG ⁻	BCG ⁺	BCG ⁻	BCG ⁺
<i>TNF-α</i>	1.00±0.000	2.52±0.197**	2.68±0.062 A	5.36±0.178 B**	0.80±0.116 a	4.08±0.142 C**
<i>IFN-γ</i>	1.00±0.000	4.32±0.124**	4.57±0.189 A	6.39±0.204 B**	0.69±0.082 B	4.42±0.078 C**
<i>IL-6</i>	1.00±0.000	5.34±0.238**	3.97±0.124 A	6.16±0.239 B**	0.97±0.094	8.92±0.354 C**
<i>IL-8</i>	1.00±0.000	1.74±0.206**	2.50±0.103 A	4.41±0.205 B**	1.29±0.179 B	5.65±0.104 C**

由表 5 可知, 3 组 A549 细胞中, *p53* 干扰组 BCG⁻ 处理的 *TNF-α*、*IFN-γ*、*IL-6* 和 *IL-8* 基因

mRNA 表达水平与其对照组相比极显著上调;*p53* 过表达组 mRNA 表达水平与其对照组相比依次表现为 *TNF- α* 基因显著下调,*IFN- γ* 基因极显著下调,*IL-6* 基因无显著差异,*IL-8* 基因极显著上调。BCG⁺ 处理的 *TNF- α* 、*IFN- γ* 、*IL-6* 和 *IL-8* 基因 mRNA 表达水平极显著高于 BCG⁻ 组,这表明 *p53* 基因通过负调控 *TNF- α* 、*IFN- γ* 、*IL-6* 和 *IL-8* 的表达来参与 A549 细胞抗 BCG 感染的免疫调控。

3 讨 论

AEC II 可以通过分泌细胞因子和趋化因子来募集其他免疫细胞(如单核细胞、淋巴细胞和多形核细胞等),进而清除宿主体内侵染的结核分枝杆菌^[18]。当 BCG 感染宿主时,会引起机体不同的信号通路(如 *p53*)被活化,进而激活不同的核内转录因子来调节特异基因的表达,从而引发机体抗结核免疫调控作用^[10,19]。随着研究的不断深入,人们发现在机体免疫调控中,*p53* 信号通路与 *NF- κ B* 基因之间存在某种“cross-talk”^[20],但是它们如何在肺泡上皮细胞抗结核分枝杆菌感染的免疫机制中发挥作用尚不清楚。

p53 基因通过结合到靶基因特定的序列而激活许多下游基因的转录来发挥其生物学功能;*p300* 基因通过调节 *p53* 蛋白的泛素化作用和降解而控制 *p53* 蛋白的稳定性。*p53* 基因也可被包含 *p53*、*MDM2* 和 *p300/CBP* 的三元络合物降解^[6,21-22]。*p53* 介导的靶基因转录亦需 *p300* 辅助和局部组蛋白乙酰化来影响基因的转录与凋亡^[22-23]。*NF- κ B* 基因是一类参与许多炎症和感染有关细胞过程中普遍存在的转录因子^[24],其中 *NF- κ B-p65* 基因通过诱导炎症反应中涉及的多个基因的表达而对机体的免疫发挥至关重要的作用^[25]。抑制 *NF- κ B* 能够增强巨噬细胞对 MTB 的清除作用^[13,26]。*TLR-4* 基因可通过识别 *NF- κ B* 信号调节许多基因(如炎症细胞因子和黏附分子)的表达来诱发机体免疫反应^[27-28]; *TRAF6* 基因是 *TLR-4* 基因的上游信号,其被 *TLR-4* 基因激活后,启动细胞内信号转导来进一步促进 *NF- κ B* 基因活化,诱导靶基因转录表达多种细胞因子,参与机体天然免疫应答^[28-30]。本试验结果表明,BCG⁺ 处理后的 3 组 A549 细胞均能引起 *p53* 信号通路相关因子 *p53* 和 *p300*,以及 *NF- κ B* 信号通路的 *NF- κ B*、*TLR-4*、*TRAF6* 在 mRNA 和蛋白水平的表达变化。结果发现,在 A549 细胞抗 BCG 感染中,*p53* 基因协同 *p300* 基因来负调控 *NF- κ B* 的

表达,这一规律与前人的研究结论^[24,31]相符;*TLR-4* 和 *TRAF6* 基因也与 *p53* 基因存在负调控,这也与前人的研究结果^[32]一致。由此可见,AEC II 细胞识别结核分枝杆菌时依赖 *p53* 信号通路中的 *p53* 协同 *p300* 基因,负调控 *NF- κ B*、*TLR-4* 与 *TRAF6* 基因来共同协调控制。

BCG 感染 AEC II 诱导多种炎症因子的分泌(如 *TNF- α* ^[6]、*IFN- γ* 、*IL-6* 和 *IL-8*^[8,33]等),激活先天免疫细胞杀伤病原微生物,从而在抗结核感染免疫中起重要作用^[23,32-35]。在 BCG⁺ 处理的 3 组 A549 细胞中,*p53* 基因的表达量变化能促进或抑制炎症细胞因子 *TNF- α* 、*IFN- γ* 、*IL-6* 和 *IL-8* 的表达,它们之间主要表现为负调控作用,以介导 AEC II 的抗结核免疫调控。

[参考文献]

- [1] Liu S, Li A, Feng X, et al. A dynamic model of human and live-stock tuberculosis spread and control in Urumqi, Xinjiang, China [J]. Computational and Mathematical Methods in Medicine, 2016(11): 1-10.
- [2] Huang H L, Su H T, Wu C H, et al. A molecular biological and biochemical investigation on mycobacterium tuberculosis MutT protein [J]. Jundishapur Journal of Microbiology, 2014, 7(3): e9367.
- [3] Guirado E, Schlesinger L S. Modeling the mycobacterium tuberculosis granuloma-the critical battlefield in host immunity and disease [J]. Frontiers in Immunology, 2013, 4(98): 98.
- [4] Kaneene J B, Miller R, Steele J H, et al. Preventing and controlling zoonotic tuberculosis: a health approach [J]. Veterinaria Italiana, 2014, 50(1): 7-22.
- [5] Sydney M, Bwalya M J, Jacques G. A review of tuberculosis at the wildlife-livestock-human interface in Zambia [J]. Infectious Diseases of Poverty, 2013, 2(1): 13-18.
- [6] Holla S, Ghorpade D S, Singh V, et al. *Mycobacterium bovis* BCG promotes tumor cell survival from tumor necrosis factor- α -induced apoptosis [J]. Molecular Cancer, 2014, 13(1): 210.
- [7] Bermudez L E, Goodman J. *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within type II alveolar cells [J]. Infection & Immunity, 1996, 64(4): 1400-1406.
- [8] Bermudez L E, Sangari F J, Kolonoski P, et al. The efficiency of the translocation of *Mycobacterium tuberculosis* across a bilayer of epithelial and endothelial cells as a model of the alveolar wall is a consequence of transport within mononuclear phagocytes and invasion of alveolar epithelial cells [J]. Infection & Immunity, 2002, 70(1): 140-146.
- [9] Lemos M P, McKinney J, Rhee K Y. Dispensability of surfactant proteins A and D in immune control of *Mycobacterium tuberculosis* infection following aerosol challenge of mice [J]. Infection & Immunity, 2011, 79(3): 1077-1085.

- [10] Gudkov A V, Komarova E A. p53 and the carcinogenicity of chronic inflammation [J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2016, 6(11): 1-24.
- [11] Won-Hyung Choi, Jong-Phil Chu, Mei-Hua Jiang, et al. Effects of fraction obtained from Korean Corni Fructus extracts causing anti-proliferation and p53-dependent apoptosis in A549 lung cancer cells [J]. Nutrition and Cancer, 2011, 63(1): 121-129.
- [12] Wang H, Li W Y, Lai B T, et al. A better experimental method to detect the sensitivity of cancer cells to anticancer drugs after adenovirus-mediated introduction of two kinds of p53 *in vivo* [J]. Anti-cancer Drugs, 2015, 26(8): 852-859.
- [13] Bai X, Feldman N E, Chmura K, et al. Inhibition of nuclear factor-kappa B activation decreases survival of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61925.
- [14] Zhang H, Ouyang H, Wang D, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Rv2185c contributes to nuclear factor-kappaB activation [J]. Molecular Immunology, 2015, 66(2): 147-153.
- [15] 陈华群, 张锡然, Kim Orth. TRAF6 在 NF- κ B 信号通路中的修饰与降解 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2004, 24(1): 59-62.
Chen H Q, Zhang X R, Kim O. Modification and degradation of TRAF6 in NF- κ B signaling pathway [J]. Journal of Nanjing Medical University (Natural Science), 2004, 24(1): 59-62.
- [16] 任奇杰, 程 龙, 丁向真, 等. Hedgehog, p53 和 NF- κ B 信号通路在病原微生物入侵机体时的免疫应答机制 [J]. 中国兽医学报, 2016, 36(7): 1266-1272.
Ren Q J, Cheng L, Ding X Z, et al. The immune response mechanism of Hedgehog, p53 and NF- κ B signaling pathways in the invasion of pathogenic microorganisms [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2016, 36(7): 1266-1272.
- [17] Liu S, Jia H, Hou S, et al. Recombinant Mtb9. 8 of *Mycobacterium bovis* stimulates TNF- α and IL-1 β secretion by RAW264. 7 macrophages through activation of NF- κ B pathway via TLR2 [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 1928.
- [18] Maas M, Michel A L, Rutten V P. Facts and dilemmas in diagnosis of tuberculosis in wildlife [J]. Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases, 2013, 36(3): 269-285.
- [19] Meek D W. Regulation of the p53 response and its relationship to cancer [J]. Biochemical Journal, 2015, 469(3): 325-346.
- [20] Scian M J, Stagliano K E R, Anderson M A E, et al. Tumor-derived p53 mutants induce NF- κ B2 gene expression [J]. Molecular and Cellular Biology, 2005, 25(22): 10097-10110.
- [21] Fávoro W J, Nunes O S, Seiva F R, et al. Effects of P-MAPA immunomodulatory on toll-like receptors and p53: potential therapeutic strategies for infectious diseases and cancer [J]. Infectious Agents and Cancer, 2012, 7(1): 14.
- [22] 王恩旺, 杨小龙. p300/CBP 与肺癌 [J]. 中国肺癌杂志, 2009, 12(8): 926-930.
Wang E W, Yang X L. p300/CBP and lung cancer [J]. Chinese Journal of Lung Cancer, 2009, 12(8): 926-930.
- [23] Il'In D A, Arkhipov S A, Shkurupy V A. *In vitro* study of cytophysiological characteristics of multinuclear macrophages from intact and BCG-infected mice [J]. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2016, 160(5): 668-671.
- [24] Weisz L, Damalas A, Liontos M, et al. Mutant p53 enhances nuclear factor kappaB activation by tumor necrosis factor alpha in cancer cells [J]. Cancer Research, 2007, 67(6): 2396-2401.
- [25] Deng W, Li W, Zeng J, et al. *Mycobacterium tuberculosis* PPE family protein Rv1808 manipulates cytokines profile via co-activation of MAPK and NF- κ B signaling pathways [J]. Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology, 2014, 33(2): 273-288.
- [26] Li W, Zhao Q, Deng W, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Rv3402c enhances mycobacterial survival within macrophages and modulates the host pro-inflammatory cytokines production via NF-Kappa B/ERK/p38 signaling [J]. PLoS One, 2014, 9(11): e94418.
- [27] Yamamoto M, Takeda K. Current views of toll-like receptor signaling pathways [J]. Gastroenterol Res Pract, 2010, 2010(1): 240365.
- [28] Seki E, Schnabl B. Role of innate immunity and the microbiota in liver fibrosis: crosstalk between the liver and gut [J]. Journal of Physiology, 2012, 590(3): 447-458.
- [29] Ma H, Wang X, Ha T, et al. MicroRNA-125b prevents cardiac dysfunction in polymicrobial sepsis by targeting TRAF6 mediated NF κ B activation and p53 mediated apoptotic signaling [J]. Journal of Infectious Diseases, 2016, 214(11): 1773-1783.
- [30] Wang X, Ha T, Zou J, et al. MicroRNA-125b protects against myocardial ischaemia/reperfusion injury via targeting p53-mediated apoptotic signalling and TRAF6 [J]. Cardiovascular Research, 2014, 102(3): 385-395.
- [31] Liu G, Park Y J, Tsuruta Y, et al. p53 attenuates lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation and acute lung injury [J]. Journal of Immunology, 2009, 182(8): 5063-5071.
- [32] Lien E, Means T K, Heine H, et al. Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide [J]. Journal of Clinical Investigation, 2000, 105(4): 497-504.
- [33] Huang K H, Wang C H, Lin C H, et al. NF- κ B repressing factor downregulates basal expression and *Mycobacterium tuberculosis* induced IP-10 and IL-8 synthesis via interference with NF- κ B in monocytes [J]. Journal of Biomedical Science, 2014, 21(1): 71-83.
- [34] Alaridah N, Lutay N, Tenland E, et al. Mycobacteria manipulate G-protein-coupled receptors to increase mucosal Rac1 expression in the lungs [J]. Journal of Innate Immunity, 2017, 9(3): 318-329.
- [35] Romero-Adrian T B, Leal-Montiel J, Fernández G, et al. Role of cytokines and other factors involved in the *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. World Journal of Immunology, 2015, 5(1): 16-50.