



## 研究报告

## 结核分枝杆菌 CFP10 和 ESAT6 对巨噬细胞 RAW264.7 凋亡及 AIM2/ASC/Caspase-8 通路的影响

王健宏 徐兆坤 李武\*

宁夏大学生命科学学院 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

**摘要:**【背景】10 kD 培养滤液蛋白(culture filtrate protein 10, CFP10)和 6 kD 早期分泌性抗原靶蛋白(early secretory antigenic target-6 kD, ESAT6)是结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)重要的毒力因子,能引起巨噬细胞的凋亡。【目的】探讨 CFP10 和 ESAT6 对巨噬细胞 RAW264.7 凋亡及 AIM2/ASC/Caspase-8 信号通路的影响。【方法】利用大肠杆菌表达并纯化获得了 CFP10 和 ESAT6 蛋白,重组蛋白处理巨噬细胞 RAW264.7 后,利用 CCK8 试剂盒检测细胞存活率,确定重组蛋白处理细胞浓度,利用 Western blotting 技术检测细胞凋亡相关蛋白及 AIM2 和 ASC 炎性小体的变化,利用流式细胞术检测细胞凋亡率。【结果】SDS-PAGE 和 Western blotting 结果表明重组蛋白 CFP10 和 ESAT6 表达正确,不同浓度的 CFP10 和 ESAT6 处理 RAW264.7 后,对细胞的增殖能力具有明显的抑制作用,当 CFP10 和 ESAT6 单独处理且浓度为 5  $\mu\text{g/mL}$  时,细胞存活率较对照组有显著下降( $P<0.001$ ),且随着蛋白浓度的增加细胞存活率显著下降( $P<0.001$ )。Western blotting 结果表明,CFP10 和 ESAT6 蛋白单独处理巨噬细胞 24 h 后均能引起巨噬细胞发生凋亡。当终浓度为 5  $\mu\text{g/mL}$  的 CFP10 和 ESAT6 共处理巨噬细胞时,共处理组凋亡相关蛋白 BAD、CHOP、Caspase-8 和 Caspase-3 较 ESAT6 单独处理组有极显著差异( $P<0.001$ ),说明 CFP10 和 ESAT6 共处理显著降低了 ESAT6 单独处理引起的巨噬细胞的凋亡,进一步研究发现 ESAT6 能激活 AIM2、ASC 炎性小体。【结论】结核分枝杆菌 CFP10 和 ESAT6 处理 RAW264.7 后均能引起巨噬细胞发生凋亡,当二者共处理时,CFP10 会显著降低 ESAT6 单独处理引起的细胞的凋亡,进一步的研究表明,ESAT6 可能通过激活 AIM2/ASC/Caspase-8 信号通路从而引起巨噬细胞发生凋亡。研究结果为进一步探究 Mtb 感染过程中 CFP10 和 ESAT6 蛋白对巨噬细胞凋亡的调控作用及其分子机制奠定了基础。

**关键词:** 结核分枝杆菌, 结核病, CFP10, ESAT6, 细胞凋亡

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31760724, 32060799); Key Research and Development Program of Ningxia Hui Autonomous Region (2019BBF02005); Natural Science Foundation of Ningxia Hui Autonomous Region (2020AAC03110)

\*Corresponding author: Tel: 86-951-2062427; E-mail: li\_w@nxu.edu.cn

Received: 17-01-2020; Accepted: 20-04-2020; Published online: 03-06-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31760724, 32060799); 宁夏回族自治区重点研发计划(2019BBF02005); 宁夏回族自治区自然科学基金(2020AAC03110)

\*通信作者: Tel: 0951-2062427; E-mail: li\_w@nxu.edu.cn

收稿日期: 2020-01-17; 接受日期: 2020-04-20; 网络首发日期: 2020-06-03

## Effects of CFP10 and ESAT6 on cell apoptosis and AIM2/ASC/Caspase-8 pathway in RAW264.7 macrophages

WANG Jian-Hong XU Zhao-Kun LI Wu\*

Key Laboratory of Ministry of Education for Conservation and Utilization of Special Biological Resources in the Western China, College of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China

**Abstract:** [Background] CFP10 and ESAT6 are important virulence factors of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), and can cause the apoptosis of macrophages. [Objective] To investigate the effects of CFP10 and ESAT6 on cell apoptosis and AIM2/ASC/Caspase-8 pathway in RAW264.7 macrophages. [Methods] *E. coli* expression system was used to express and purify recombinant CFP10 and ESAT6 proteins of Mtb. Then, the RAW264.7 cells were treated with the recombinant proteins with different concentrations. The cell viability of RAW264.7 cells after incubation with CFP10 and ESAT6 at different concentrations for 24 h was measured by CCK-8 assay, expression of apoptosis related proteins as well as AIM2 and ASC inflammasomes were determined by Western blotting analysis, and the cell apoptosis was detected by flow cytometry. [Results] The results of SDS-PAGE and Western blotting showed that we have successfully purified the recombinant proteins of CFP10 and ESAT6 from *E. coli*. After treatment of RAW264.7 cells with different concentrations of CFP10 and ESAT6, the cells proliferation was significantly inhibited. When CFP10 and ESAT6 were treated separately at the concentration of 5 µg/mL, the cell viability rate decreased significantly as compared with the control group ( $P < 0.001$ ), and the cell viability rate decreased significantly in a dose dependent manner ( $P < 0.001$ ). Western blotting results further showed that both of CFP10 and ESAT6 with the concentration of 5 µg/mL could lead to RAW264.7 cells apoptosis after 24 h treatment. When RAW264.7 cells were treated with CFP10 and ESAT6 together at a final concentration of 5 µg/mL respectively, the expression of apoptosis-related proteins of BAD, CHOP, Caspase-8 and Caspase-3 decreased significantly as compared to ESAT6 treatment group ( $P < 0.001$ ), an indication that the co-treatment of RAW264.7 cells with CFP10 and ESAT6 significantly reduced the apoptosis of macrophages caused by ESAT6 treatment alone. Furthermore, the results of Western blotting showed that ESAT6 treatment could activate the expression of AIM2 and ASC inflammasomes. [Conclusion] CFP10 and ESAT6 of Mtb alone at the concentration of 5 µg/mL could cause apoptosis of RAW264.7. The co-treatment of RAW264.7 cells with CFP10 and ESAT6 could reduce the apoptosis of macrophages caused by ESAT6 treatment alone. Further studies show that ESAT6 may cause RAW264.7 cell apoptosis by activating AIM2/ASC/Caspase-8 signaling pathway. The results of this study will lay a foundation for fully understanding the immunoregulatory roles of CFP10 and ESAT6 on cell apoptosis and its molecular mechanisms in macrophage defense against Mtb infection.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, Tuberculosis, CFP10, ESAT6, Apoptosis

结核病(tuberculosis, TB)是一种严重危害人畜健康的传染病, 该病主要由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)感染引起<sup>[1]</sup>。据2020年世界卫生组织公布的《全球结核病报告》显示, 2019年全球范围内TB新发病例达到1 000万, 死亡人数约140万<sup>[2]</sup>。而近年来由于多重耐药菌株的不断出现以及一线抗TB新药的匮乏, 使得TB的预防和治疗变得越来越棘手。许多

细菌性病原体能通过激活凋亡途径的特定成分来诱导宿主细胞凋亡<sup>[3]</sup>, 吞噬细胞的凋亡被认为是防止细胞内病原微生物进一步感染宿主的一种策略<sup>[4-5]</sup>。Mtb是胞内寄生菌, 感染机体后会寄生于巨噬细胞内, 因此, 巨噬细胞作为Mtb的主要生存场所, 其状态关系到Mtb在宿主内的命运<sup>[6]</sup>, 当巨噬细胞感染Mtb后, 会通过各种细胞程序性死亡方式来清除Mtb, 包括细胞凋亡、自噬或者坏死,

其中细胞凋亡是清除 Mtb 的重要方式<sup>[7]</sup>。巨噬细胞凋亡不仅会对细胞内的 Mtb 进行杀伤,而且还刺激了适应性免疫反应<sup>[8]</sup>。因此,巨噬细胞与 Mtb 的相互作用对 TB 的发展具有重要影响,抑制巨噬细胞凋亡是 Mtb 逃逸宿主免疫的重要途径<sup>[9]</sup>。

Mtb 分泌的细胞外蛋白是保护性抗原的重要来源<sup>[10]</sup>。已知 Mtb 分泌的几种毒力因子可调节宿主细胞的信号传导。其中,CFP10 和 ESAT6 由结核分枝杆菌 RD1 区编码,是 Mtb 重要的毒力因子,也被认为是现有的抗 TB 疫苗卡介苗(Bacillus Calmette-Guerin, BCG)减毒的重要原因<sup>[11]</sup>。已知 ESAT6 单独或与 CFP10 结合均能对巨噬细胞的免疫反应起调节作用,但详细的机制到目前为止仍未被揭示。已有研究报道 ESAT6 能够诱导巨噬细胞发生凋亡,且 ESAT6-CFP10 融合蛋白对巨噬细胞内的 Mtb 生存也会产生显著影响<sup>[12]</sup>。研究还发现,CFP10-ESAT6 复合物能够抑制 RAW264.7 细胞中活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生,并且下调脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的 NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白的表达,从而抑制巨噬细胞的免疫应答<sup>[13]</sup>。以往研究只是用 ESAT6 或 CFP10 单独处理细胞或用 CFP10-ESAT6 融合蛋白处理细胞来研究二者对宿主的免疫调节作用,而我们从 Tiwari 等<sup>[14]</sup>用 Mtb PE35 和 PPE68 蛋白组合处理细胞的研究中获得启发,研究 CFP10、ESAT6 组合处理对巨噬细胞 RAW264.7 凋亡的影响,这有助于加深对 Mtb 致病机理及机体抗 Mtb 感染免疫机制的了解。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞系与菌株

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 购自中国科学院上海细胞研究所,保存于西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室。表达 CFP10 和 ESAT6 的原核表达质粒 pCzn1-CFP10 和 pCzn1-ESAT6 由本课题组保存。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

高糖培养基 DMEM 和胎牛血清(FBS), Gibco 公司;胰蛋白胨、酵母提取物, Oxoid 公司;内毒素去除试剂盒, 南京金斯瑞生物科技有限公司; anti-CFP10、anti-ESAT6 抗体, Abcam 公司; AnnexinV-FITC/PI 双染试剂盒, BD 公司;其他一抗及辣根过氧化物酶标记的二抗, Proteintech 公司;化学发光试剂盒, Abclonal 公司;全蛋白提取试剂盒, 江苏凯基生物技术股份有限公司; TBST, 上海百赛生物技术有限公司;蛋白纯化磁珠, 苏州海狸生物医学工程有限公司; CCK 试剂盒, 上海李记生物科技有限公司。GE 化学发光仪, Amersham Bioscience 有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 重组蛋白的诱导表达及鉴定

分别将原核表达质粒 pCzn1-CFP10 和 pCzn1-ESAT6 转化至大肠杆菌感受态细胞 BL21(DE3) PLYSs 中,菌种涂布于含有终浓度为 50  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上,置于 37  $^{\circ}$ C 恒温培养箱中,静置培养过夜。挑取单菌落接种在含有终浓度为 50  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37  $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养,待菌液培养至  $OD_{600}$  值达到 0.4–0.6 时,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,诱导培养 4 h,诱导结束后 10 000 $\times$ g 离心 5 min 收集菌体。

#### 1.2.2 目的蛋白的纯化、鉴定及内毒素的去除

将收集的菌体在冰浴中超声(功率 150 W,工作 5 s、间歇 10 s)破碎 10 min,4  $^{\circ}$ C、12 000 $\times$ g 离心 10 min 收集上清后,采用蛋白纯化磁珠进行目的蛋白的纯化,相关操作按照试剂盒说明书进行。将纯化得到的目的蛋白先进行 SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色验证,有目的条带后,再进行 Western blotting 验证。将纯化得到的目的蛋白通过内毒素去除试剂盒进行内毒素的去除。之后将所得到的目的蛋白透析去盐,并对蛋白浓度进行定量。

#### 1.2.3 Cell counting kit (CCK)检测 RAW264.7 细胞存活率

将 RAW264.7 细胞以  $1 \times 10^4$  个/孔接种于 96 孔

板培养皿中,待细胞贴壁后,设置浓度梯度(2.5、5、10、25、50  $\mu\text{g/mL}$ ),每个处理组设置4个复孔,待处理24 h后,每孔加入10  $\mu\text{L}$  CCK 试剂盒中溶液,放置1.5 h后使用酶标仪测  $A_{490}$  值,并计算细胞存活率。细胞存活率=[(处理组  $A_{490}$  值-空白组  $A_{490}$  值)/(对照组  $A_{490}$  值-空白组  $A_{490}$  值)] $\times 100\%$ 。

### 1.2.4 Western blotting 检测

将 RAW264.7 细胞以  $1 \times 10^6$  个/孔接种于6孔板培养皿中,待细胞贴壁后加入5  $\mu\text{g/mL}$  处理24 h后,用全蛋白提取试剂盒提取细胞全蛋白,对蛋白浓度进行定量后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳1.5 h,300 mA 转膜2 h,脱脂乳室温封闭2 h后,CFP10、ESAT6 及凋亡相关蛋白等特异性一抗低温孵育过夜后使用 TBST 缓冲液洗涤30 min,加入稀释好的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG (H+L)酶标二抗,室温孵育2 h, TBST 缓冲液再次洗涤,加入 ECL 显色液,利用 GE 化学发光检测仪成像。

### 1.2.5 流式细胞检测

将 RAW264.7 细胞以  $1 \times 10^6$  个/孔接种于6孔板培养皿中,待细胞贴壁后加入所需的蛋白浓度处理24 h后收集细胞,经胰蛋白酶消化以及 Binding buffer 洗涤后1000 r/min 离心5 min,再次用500  $\mu\text{L}$  Binding buffer 重悬,并加3  $\mu\text{L}$  Propidium iodide (PI) 染色液和3  $\mu\text{L}$  FITC AnnexinV (AV),避光孵育30 min,另设置 AV 单染、PI 单染(53  $^{\circ}\text{C}$  水浴3 min)和对照组。之后采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况,并计算凋亡率。

### 1.2.6 数据分析

所有数据均采用 Graphpad Prism7.0 软件中的 One Way ANOVA 进行统计学分析,数据用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{X} \pm \text{SD}$ )表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 Mtb CFP10 和 ESAT6 蛋白的表达与纯化

将表达 Mtb CFP10 和 ESAT6 蛋白的 *E. coli* 接种到含有50  $\mu\text{g/mL}$  苄青霉素的 LB 液体培养基中扩大培养,当菌液  $OD_{600}$  值达到0.4–0.6时加入终浓度为1 mmol/L 的 IPTG 诱导4 h,诱导结束后离

心收集菌体,对目的蛋白的表达进行验证,发现重组蛋白 CFP10、ESAT6 均发生表达,且分子大小(CFP10: 约12 kD; ESAT6: 约8 kD)与预期大小相符(图1A、B)。Western blotting 检测结果(图1C、D)表明,在约12 kD 和10 kD 位置处分别出现了 CFP10 和 ESAT6 特异性抗体识别条带。之后冰浴超声破碎,离心取上清经过镍磁珠亲和纯化蛋白试剂盒进行蛋白纯化。SDS-PAGE 结果显示成功纯化出了 CFP10、ESAT6 两种蛋白(图1A、B)。

### 2.2 Mtb CFP10 和 ESAT6 对巨噬细胞 RAW264.7 细胞活力的影响

用不同浓度的 CFP10 和 ESAT6 蛋白处理小鼠巨噬细胞 RAW264.7,通过 CCK 法测定细胞存活率,检测不同浓度重组蛋白刺激小鼠巨噬细胞 RAW264.7 后对巨噬细胞存活率的影响。按照不同浓度梯度 CFP10 处理细胞24 h后,处理组与对照组相比,当 CFP10 浓度为5  $\mu\text{g/mL}$  时细胞存活率显

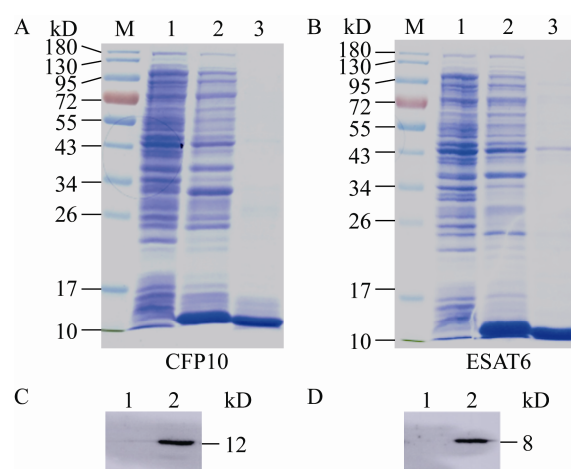


图1 Mtb CFP10、ESAT6 蛋白的表达与纯化及 Western blotting 鉴定

Figure 1 SDS-PAGE and Western blotting analysis of the purified CFP10 and ESAT6 proteins of Mtb

注: A: CFP10 蛋白表达及纯化; B: ESAT6 蛋白表达及纯化; C: CFP10 Western blotting 鉴定; D: ESAT6 Western blotting 鉴定. M: Marker; 1: 诱导前; 2: 诱导后; 3: 目的蛋白.

Note: A: Expression and purification of CFP10 protein; B: Expression and purification of ESAT6 protein; C: Western blotting analysis of CFP10; D: Western blotting analysis of ESAT6. M: Protein marker; 1: Before protein induction; 2: After protein induction; 3: Target protein.

著降低( $P<0.001$ ), 当浓度达到 25  $\mu\text{g/mL}$  后细胞存活率不再降低, 当浓度达到 50  $\mu\text{g/mL}$  时其效果与 25  $\mu\text{g/mL}$  一样(图 2A)。同样使用相同浓度梯度的 ESAT6 处理细胞, 与对照组相比, 当 ESAT6 浓度达到 5  $\mu\text{g/mL}$  时细胞存活率与对照组相比差异极显著( $P<0.001$ ), 且随着 ESAT6 浓度升高细胞存活率降低, 在浓度升高至 50  $\mu\text{g/mL}$  时细胞存活率最低(图 2B)。

### 2.3 CFP10 和 ESAT6 蛋白对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 凋亡的影响

为了探究 CFP10 和 ESAT6 是否会引起小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的凋亡, 重组蛋白按照不同浓度梯度处理细胞, 然后在蛋白水平上检测细胞凋亡的

执行者 Caspase-3 的表达量。实验结果表明, 与对照组相比, CFP10 处理浓度为 5  $\mu\text{g/mL}$  时 Caspase-3 的表达量显著高于对照组( $P<0.001$ ), 随着 CFP10 浓度的升高, Caspase-3 的表达量均未再发生显著变化, 即细胞凋亡在处理浓度为 5  $\mu\text{g/mL}$  后不会随着浓度的升高而增加(图 3A、B)。ESAT6 处理组与对照组相比, 同样在 5  $\mu\text{g/mL}$  时 Caspase-3 的表达量显著高于对照组( $P<0.001$ ), 且随着 CFP10 处理组浓度的增加 Caspase-3 的表达量也随之升高, 即细胞凋亡随着 ESAT6 处理浓度的升高而增加(图 3C、D)。本实验结果表明, CFP10 和 ESAT6 蛋白均能诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 发生凋亡。考虑到 CFP10

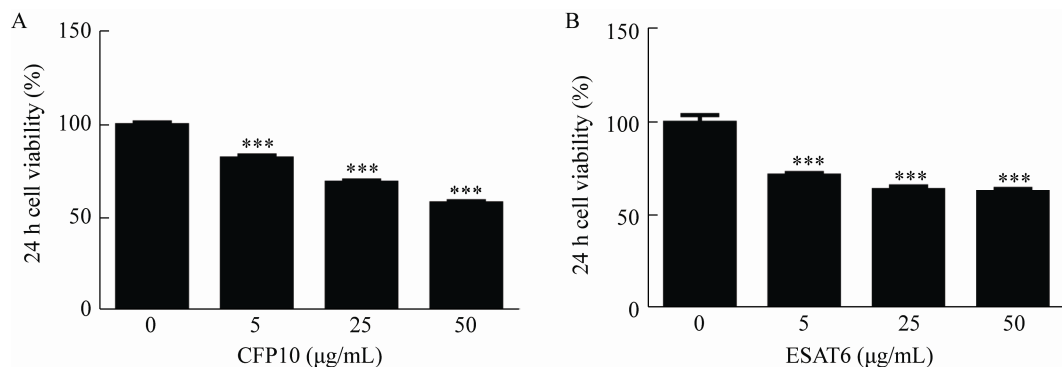


图 2 Mtb CFP10、ESAT6 对巨噬细胞 RAW264.7 细胞活力的影响

Figure 2 The effects of CFP10 and ESAT6 on the cell viability rate of RAW264.7 cells

注: A: CFP10 对细胞活力的影响; B: ESAT6 对细胞活力的影响. \*\*\*: 差异极显著,  $P<0.001$ .

Note: A: Effects of CFP10 on cell viability; B: Effects of ESAT6 on cell viability. \*\*\*: Extremely significant difference,  $P<0.001$ .

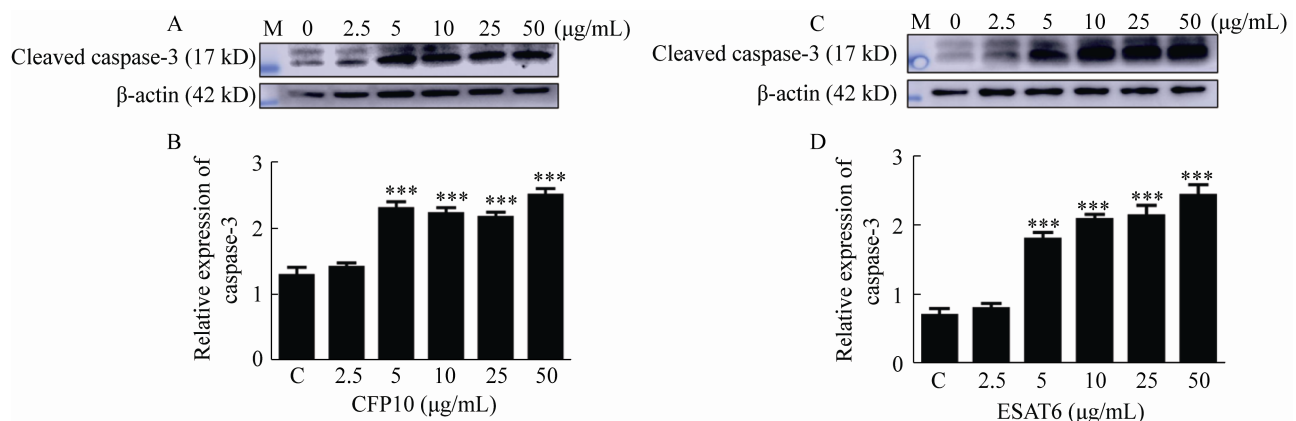


图 3 CFP10 和 ESAT6 蛋白对巨噬细胞 RAW264.7 凋亡的影响

Figure 3 The effects of CFP10 and ESAT6 on the apoptosis of RAW264.7 cells

注: A、B: CFP10 浓度梯度; C、D: ESAT6 浓度梯度. \*\*\*: 差异极显著,  $P<0.001$ .

Note: A, B: CFP10 concentration gradient; C, D: ESAT6 concentration gradient. \*\*\*: Extremely significant difference,  $P<0.001$ .

和 ESAT6 蛋白在结核分枝杆菌毒株中通常以 1:1 摩尔质量比的复合物形式存在, 因此后续实验中二者均选用 5  $\mu\text{g/mL}$  共处理巨噬细胞 RAW264.7。

## 2.4 CFP10 和 ESAT6 按 1:1 共处理后对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 凋亡的影响

为了探究 CFP10 和 ESAT6 共处理对巨噬细胞 RAW264.7 的影响, 分 4 个处理组, 即对照组、CFP10 组、ESAT6 组、CFP10+ESAT6 共处理组,

在蛋白水平上对 Caspase-3、Caspase-8、CHOP、BAD 等凋亡通路蛋白进行检测, 结果发现与对照组相比, CFP10 组、ESAT6 组上述蛋白表达量均显著高于对照组 ( $P<0.001$ )。然而, CFP10 和 ESAT6 共处理后, 细胞凋亡率较 ESAT6 单独处理组显著降低 ( $P<0.001$ ) (图 4)。为了进一步验证这一结果, 又通过流式细胞术对 4 个处理组凋亡率进行检测, 发现其结果与 Western blotting 结果一致(图 5)。

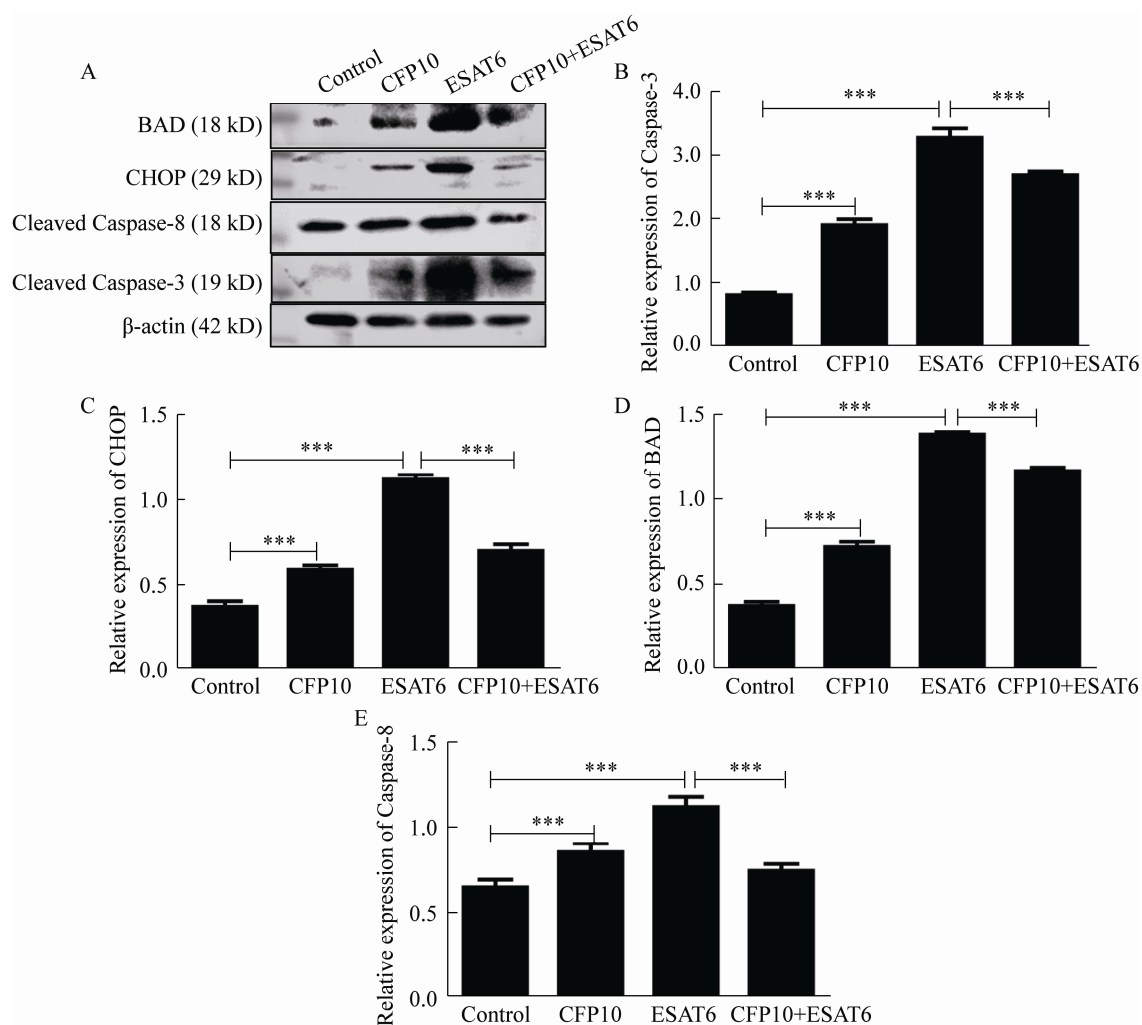


图 4 CFP10 和 ESAT6 蛋白共处理对细胞 RAW264.7 凋亡相关蛋白的影响

Figure 4 The effects of CFP10 and ESAT6 co-treatment on apoptosis-related proteins in RAW264.7 cells

注: A: Western blotting 图; B: 凋亡相关 Caspase-3 表达量分析; C: 凋亡相关 CHOP 表达量分析; D: 凋亡相关 BAD 表达量分析; E: 凋亡相关 Caspase-8 表达量分析. \*\*\*: 差异极显著,  $P<0.001$ ; \*\*: 差异显著,  $P<0.01$ .

Note: A: Western blotting analysis of apoptosis-related proteins; B: Relative expression of Caspase-3; C: Relative expression of CHOP; D: Relative expression of BAD; E: Relative expression of Caspase-8. \*\*\*: Extremely significant difference,  $P<0.001$ ; \*\*: Significant difference,  $P<0.01$ .



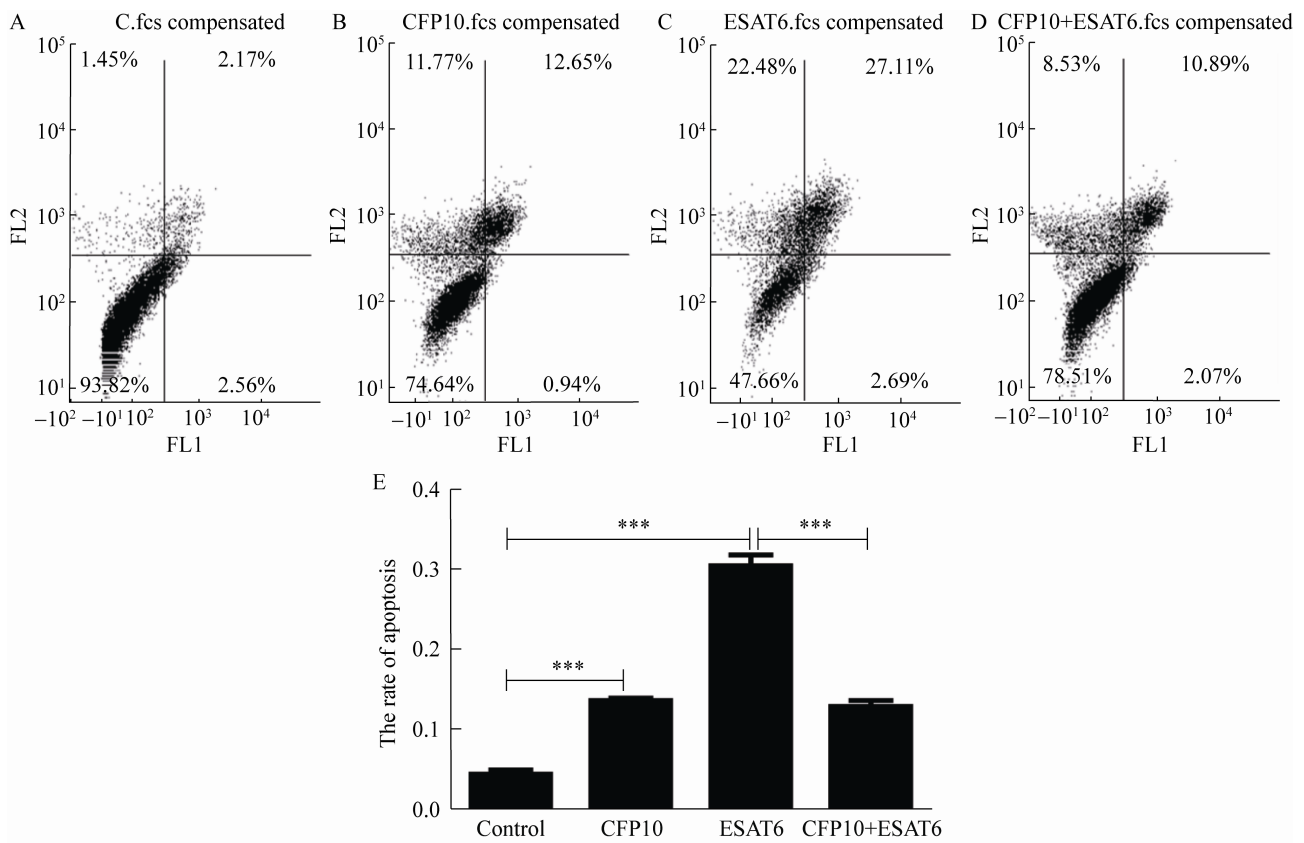


图5 流式细胞术检测细胞凋亡率

Figure 5 The apoptosis rate was detected by flow cytometry

注: A-D: 散点图; A: Control; B: CFP10; C: ESAT6; D: CFP10+ESAT6; E: 细胞凋亡率分析图. \*\*\*: 差异极显著,  $P<0.001$ ; \*\*: 差异显著,  $P<0.01$ .

Note: A-D: Flow cytometric scatter plots; A: Control; B: CFP10; C: ESAT6; D: CFP10+ESAT6; E: The rate of apoptosis. \*\*\*: Extremely significant difference,  $P<0.001$ ; \*\*: Significant difference,  $P<0.01$ .

## 2.5 ESAT6 蛋白激活 AIM2、ASC

有研究表明细胞凋亡能够激活 AIM2/ASC/Caspase-8 通路, 为了验证 CFP10、ESAT6 能否激活 AIM2/ASC 信号通路, 从而对巨噬细胞的凋亡产生影响。通过 Western blotting 对 AIM2 和 ASC 进行检测。结果显示(图 6), ESAT6 处理组与对照组相比 AIM2 和 ASC 的表达水平显著上调 ( $P<0.001$ ), 说明 ESAT6 能够激活 AIM 与 ASC, 从而可能引发凋亡的产生, 但 CFP10 处理组与对照组相比 AIM 与 ASC 均未有显著变化。然而 CFP10 和 ESAT6 共处理组与 ESAT6 组相比, AIM2 和 ASC 表达水平却发生了显著的下调( $P<0.01$ )。

## 3 讨论与结论

已有研究表明 ESAT6 诱导巨噬细胞的凋亡依赖于 Caspase 通路, 即 ESAT6 可以激活 Caspase-1、Caspase-3、Caspase-5、Caspase-7、Caspase-8 从而使得细胞膜孔形成, 导致细胞发生凋亡<sup>[15]</sup>。还有文献表明 ESAT6 可以通过内质网应激引起巨噬细胞凋亡<sup>[16]</sup>。也有研究利用 CFP10、ESAT6 构建重组真核表达载体发现二者均可引起巨噬细胞 RAW264.7 发生凋亡, 但 CFP10-ESAT6 融合蛋白引起巨噬细胞的凋亡率明显低于 ESAT6 重组载体组<sup>[17]</sup>。在 Mtb 中, 编码 CFP10 和 ESAT6 的基因同属于一个操纵子, 两者以 1:1 摩尔质量比的异源二

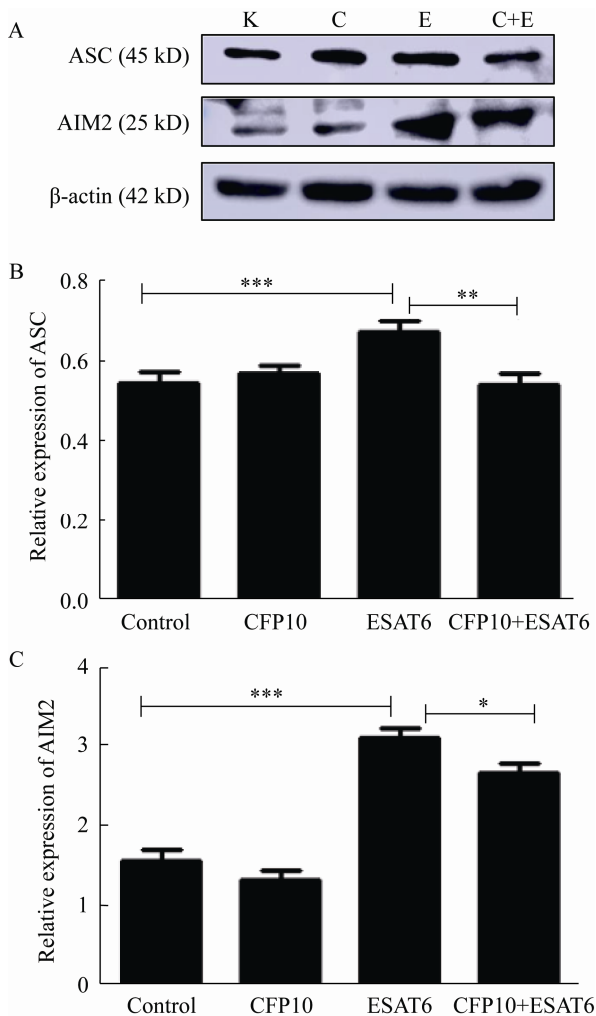


图 6 CFP10、ESAT6 对炎性小体 AIM2 和 ASC 的影响

Figure 6 The effects of CFP10 and ESAT6 on the expression of AIM2 and ASC inflammasomes

注: \*\*\*: 差异极显著,  $P < 0.001$ ; \*\*: 差异显著,  $P < 0.01$ ; \*: 差异不显著,  $P < 0.05$ .

Note: A: Western blotting analysis; B: Relative expression of ASC; C: Relative expression of AIM2. \*\*\*: Extremely significant difference,  $P < 0.001$ ; \*\*: Significant difference;  $P < 0.01$ ; \*: No significant difference,  $P < 0.05$ .

聚体复合物形式存在, 与 Mtb 的毒力有关<sup>[18]</sup>。我们的研究表明, 当 CFP10 和 ESAT6 蛋白 1:1 共处理细胞时, 细胞凋亡率显著低于 ESAT6 单独处理组。因此, CFP10 和 ESAT6 共处理细胞时有可能在细胞内形成了异源二聚体, 这种二聚体对细胞凋亡的影响与 ESAT6 单独处理对细胞凋亡的影响

强度有所不同, 当然, 这种处理也更接近 CFP10 和 ESAT6 在 Mtb 中真实的存在状态。

Fisch 等曾报道弓形虫作为胞内菌可以通过激活 AIM2/ASC/Caspase-8 通路而引起巨噬细胞发生凋亡<sup>[19]</sup>。Mtb 在感染巨噬细胞后不仅能够激活 NLRP3、AIM2、ASC 等炎性小体, 同样能够引起巨噬细胞发生凋亡。CFP10、ESAT6 作为 Mtb 重要的毒力因子, 为了探究二者是否能够激活炎性小体并引起巨噬细胞发生凋亡, 我们分析了 CFP10 和 ESAT6 对 AIM2/ASC/Caspase-8 通路的影响, 结果显示, CFP10 和 ESAT6 单独处理细胞时, 只有 ESAT6 能够激活 AIM2/ASC/Caspase-8 通路, CFP10 虽然能引起细胞的凋亡, 但可能并非通过 AIM2/ASC/Caspase-8 通路来实现。

本研究成功纯化获得了 Mtb CFP10 和 ESAT6 两个毒力蛋白, 并对二者诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的凋亡进行了研究, 结果表明 CFP10 和 ESAT6 均能引起 RAW264.7 细胞凋亡, 且 ESAT6 引起的巨噬细胞凋亡可能是通过激活 AIM2/ASC/Caspase-8 信号通路引起的。另外我们还发现, 当 CFP10 和 ESAT6 二者共处理时, CFP10 能够减弱 ESAT6 引起的细胞凋亡, 这可能与 CFP10 和 ESAT6 共处理细胞时形成异源二聚体有关, 但相关机制仍需深入研究。

## REFERENCES

- [1] Vilchère C, Jacobs Jr J. The isoniazid paradigm of killing, resistance, and persistence in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Journal of Molecular Biology, 2019, 431(18): 3450-3461
- [2] World Health Organization. Global tuberculosis report 2020[R]. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- [3] Kim LH, Sung JS. Apoptotic effect of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Journal of Bacteriology and Virology, 2016, 46(4): 312-318
- [4] Chávez-Galán L, Vesin D, Martinvalet D, et al. Low dose BCG infection as a model for macrophage activation maintaining cell viability[J]. Journal of Immunology Research, 2016, 2016: 4048235
- [5] Danelishvili L, McGarvey J, Li YJ, et al. *Mycobacterium tuberculosis* infection causes different levels of apoptosis



- and necrosis in human macrophages and alveolar epithelial cells[J]. *Cellular Microbiology*, 2003, 5(9): 649-660
- [6] VanderVen BC, Huang L, Rohde KH, et al. The minimal unit of infection: *Mycobacterium tuberculosis* in the macrophage[J]. *Microbiology Spectrum*, 2016, 4(6): TBTB2-0025-2016
- [7] Amaral EP, Lasunskaja EB, D'Império-Lima MR. Innate immunity in tuberculosis: how the sensing of mycobacteria and tissue damage modulates macrophage death[J]. *Microbes and Infection*, 2016, 18(1): 11-20
- [8] Riendeau CJ, Kornfeld H. THP-1 cell apoptosis in response to *Mycobacterial infection*[J]. *Infection and Immunity*, 2003, 71(1): 254-259
- [9] Wang XD, Wu LX. Advances in study of the interaction of *Mycobacterium tuberculosis* and macrophages[J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2015, 10(6): 571-573 (in Chinese)  
王旭东, 吴利先. 结核分枝杆菌与巨噬细胞相互作用的研究进展[J]. *中国病原生物学杂志*, 2015, 10(6): 571-573
- [10] Gröschel MI, Sayes F, Simeone R, et al. ESX secretion systems: mycobacterial evolution to counter host immunity[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(11): 677-691
- [11] Munk ME, Arend SM, Brock I, et al. Use of ESAT-6 and CFP-10 antigens for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2001, 183(1): 175-176
- [12] Zhang L, Zhang H, Zhao Y, et al. Effects of *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6/CFP-10 fusion protein on the autophagy function of mouse macrophages[J]. *DNA and Cell Biology*, 2011, 31(2): 171-179
- [13] Ganguly N, Giang PH, Gupta C, et al. *Mycobacterium tuberculosis* secretory proteins CFP-10, ESAT-6 and the CFP10: ESAT6 complex inhibit lipopolysaccharide-induced NF- $\kappa$ B transactivation by downregulation of reactive oxidative species (ROS) production[J]. *Immunology and Cell Biology*, 2008, 86(1): 98-106
- [14] Tiwari B, Soory A, Raghunand TR. An immunomodulatory role for the *Mycobacterium tuberculosis* region of difference 1 locus proteins PE35 (Rv3872) and PPE68 (Rv3873)[J]. *The FEBS Journal*, 2014, 281(6): 1556-1570
- [15] Derrick SC, Morris SL. The ESAT6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression[J]. *Cellular Microbiology*, 2007, 9(6): 1547-1555
- [16] Choi HH, Shin DM, Kang G, et al. Endoplasmic reticulum stress response is involved in *Mycobacterium tuberculosis* protein ESAT-6-mediated apoptosis[J]. *FEBS Letters*, 2010, 584(11): 2445-2454
- [17] Li SS. Effect of *Mycobacterium tuberculosis* CFP-10 and ESAT-6 and CFP-10-ESAT-6 on apoptosis and related mechanisms of RAW264.7 cells[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin Agricultural University, 2017 (in Chinese)  
李双双. 结核分枝杆菌 CFP-10、ESAT-6 及 CFP-10-ESAT-6 对 RAW264.7 细胞凋亡及相关机制的研究[D]. 长春: 吉林农业大学硕士学位论文, 2017
- [18] Lightbody KL, Renshaw PS, Collins ML, et al. Characterisation of complex formation between members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex CFP-10/ESAT-6 protein family: towards an understanding of the rules governing complex formation and thereby functional flexibility[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 238(1): 255-262
- [19] Fisch D, Bando H, Clough B, et al. Human GBP1 is a microbe-specific gatekeeper of macrophage apoptosis and pyroptosis[J]. *The EMBO Journal*, 2019, 38(13): e100926