

## 分枝杆菌脂聚糖的分离、纯化及其结构和功能分析

玄松花<sup>1</sup> 赵俊伟<sup>2</sup> 孙战强<sup>2</sup> 周业成<sup>3</sup> 张朝宝<sup>4</sup> 余晓丽<sup>4</sup> 郭晓奎<sup>2</sup> 刘文第<sup>1\*</sup> 张舒林<sup>2\*</sup>

(1. 河南中医学院 医学免疫学重点实验室 河南 郑州 450008)

(2. 上海交通大学 基础医学院 病原生物学教研室 上海 200025)

(3. 四川大学 生命科学学院 四川 成都 610065)

(4. 武汉工业学院 生物与制药工程学院 湖北 武汉 430023)

**摘要:**【目的】建立分离、纯化分枝杆菌脂聚糖的方法,初步比较分析不同菌株来源的脂阿拉伯甘露聚糖(Lipoarabinomannan, LAM)和脂甘露聚糖(Lipomannan, LM)的结构差异及研究脂聚糖刺激对巨噬细胞环氧合酶-2 (Cyclooxygenase-2, COX-2)蛋白表达的影响。【方法】应用 Triton X-114 液相法提取脂聚糖,电洗脱法分离纯化,基质辅助激光解析电离串联飞行时间质谱(MALDI-TOF/TOF-MS)进行分子量鉴定;基于特异性识别非还原性末端  $\alpha$ -D-甘露糖基的刀豆球蛋白(Concanavalin A, Con A)分析新诺分枝杆菌 JDM601、结核分枝杆菌 H<sub>37</sub>Rv 标准株和耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155 脂聚糖的结构差异;进一步用 Western blot 检测脂聚糖刺激的 RAW 264.7 巨噬细胞 COX-2 蛋白的表达。【结果】通过电洗脱法成功纯化出 3 种菌株脂聚糖;MALDI-TOF/TOF-MS 鉴定发现,分子量从小到大依次为新诺分枝杆菌 JDM601、耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155 和结核分枝杆菌 H<sub>37</sub>Rv 来源的脂聚糖。Western blot 显示,Con A 能与结核分枝杆菌 H<sub>37</sub>Rv 标准株来源的 LAM 相互作用,而不能与新诺分枝杆菌 JDM601 和耻垢分枝杆菌来源的 LAM 相互作用;并且发现 Con A 与新诺分枝杆菌 JDM601 来源的 LM 有很强的反应,然而与其余两种来源的 LM 反应很弱。3 种菌株来源的脂聚糖均能刺激 RAW 264.7 巨噬细胞 COX-2 蛋白的表达。【结论】首次成功对来源于中国临床分枝杆菌分离株的脂聚糖进行了分离纯化,初步探讨了不同菌株来源分枝杆菌脂聚糖的结构差异,并表明 LAM 和 LM 均能刺激巨噬细胞诱导 COX-2 蛋白的表达,为进一步研究其对宿主的毒力和免疫机制奠定了基础。

**关键词:**分枝杆菌,脂阿拉伯甘露聚糖,脂甘露聚糖,基质辅助激光解析电离串联飞行时间质谱

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 81271794);上海市科委科技支撑项目(No. 12441903300)

\*通讯作者:✉: 刘文第: wendiliu@163.com; 张舒林: shulinzhang@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2013-02-28; 接受日期: 2013-04-24; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-25

## Isolation, purification and characterization of lipoglycans from mycobacteria

XUAN Song-Hua<sup>1</sup> ZHAO Jun-Wei<sup>2</sup> SUN Zhan-Qiang<sup>2</sup> ZHOU Ye-Cheng<sup>3</sup>  
ZHANG Chao-Bao<sup>4</sup> YU Xiao-Li<sup>4</sup> GUO Xiao-Kui<sup>2</sup> LIU Wen-Di<sup>1\*</sup> ZHANG Shu-Lin<sup>2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Medical Immunology, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan 450008, China)

(2. Department of Microbiology and Parasitology, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China)

(3. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610065, China)

(4. School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan, Hubei 430023, China)

**Abstract: [Objective]** Lipoglycans were purified and characterized from mycobacteria, and the structure of lipoarabinomannan (LAM), lipomannan (LM) from diverse mycobacterial strains were compared, the effects of lipoglycan triggered cyclooxygenase-2 (COX-2) protein expression in murine macrophages were studied. **[Methods]** Lipoglycans were extracted using the Triton X-114 phase partition, and then purified by electroelution. MALDI-TOF/TOF-MS was used to analyze the molecular weight of lipoglycans. We analyzed the structure of lipoglycans from different strains by concanavalin A (ConA), which specifically reacted with the  $\alpha$ -D-mannosyl domain at the non-reducing end of the molecule. Western blot was used to determine the expression of COX-2 in RAW 264.7 macrophages. **[Results]** Lipoglycans were successfully obtained from *M. sinov* JDM601, *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv and *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 by using electroelution. Furthermore, using MALDI-TOF/TOF-MS, we found the ranking of molecular mass from small to large are *M. sinov* JDM601, *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, respectively. Con A interacted with LAM from *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv but not with those of *M. sinov* JDM601 and *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155; LM from *M. sinov* JDM601 reacted strongly with Con A compared to LM from the other strains. In addition, all of the lipoglycans enhanced COX-2 expression in RAW 264.7 macrophages. **[Conclusion]** This is the first study to purify the lipoglycans from Chinese clinical mycobacterial isolate, and the result showed that the lipoglycans have different structures in comparison with the standard stains and indicated that LAM and LM can enhance COX-2 expression in macrophages. The study also laid the foundation for further researches on their virulence and immune mechanism on hosts.

**Keywords:** Mycobacterium, Lipoarabinomannan, Lipomannan, MALDI-TOF/TOF-MS

结核病是结核分枝杆菌引起的慢性传染病,目前结核病仍然是单一病原体所致死亡的主要原因。WHO 的数据表明 2010 年世界结核病患病人数为 880 万,死亡 110 万,而中国 2010 年结核病患病人数达 90 万-120 万,仍是世界第二大结核病高负担国家<sup>[1]</sup>。与此同时,非结核分枝杆菌(Nontuberculous mycobacterium, NTM)所引起分枝杆菌感染的患病率无论是世界范围还是在中国范围也都具有逐步增加的趋势<sup>[2-3]</sup>。

结核分枝杆菌与其他病原菌相比具有独特且复杂的细胞壁结构,其可以通过细胞壁外部的糖复

合物破坏宿主天然免疫反应,从而在巨噬细胞中生存。具有种类特异性的脂阿拉伯甘露聚糖(Lipoarabinomannan, LAM)及其合成的前体物质脂甘露聚糖(Lipomannan, LM)是分枝杆菌细胞壁主要的毒力因子和免疫调节因子,并且两者被普遍认为是结核分枝杆菌致病的一个重要因素<sup>[4]</sup>。目前研究表明<sup>[5-7]</sup>,主要发现于结核分枝杆菌、麻风分枝杆菌、牛分枝杆菌 BCG 等致病性分枝杆菌的低聚甘露糖为帽子结构的 ManLAM 被认为具有抗炎作用,能够抑制 TNF- $\alpha$  和 IL-12 的产生,并且抑制吞噬体成熟和细胞凋亡。而主要发现于耻垢分枝杆菌

和偶发分枝杆菌等非致病性分枝杆菌中的带有磷酸肌醇(Phosphoinositol, PI)帽子结构的PILAM被认为具有促炎症作用,能与TLR2共同作用促使细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-8和IL-12的产生。因此,通过分析分枝杆菌细胞壁脂聚糖的结构差异和免疫功能,有利于提高我们对分枝杆菌的毒力和人体免疫保护机制的认识。

此前,我们从临床肺结核样疾病的患者痰液中分离到一株分枝杆菌,经细菌学和基因组学研究,鉴定其为一种对9种抗结核药物耐药,且具有较高致病力的新的分枝杆菌,并在国际上首次定名为新诺分枝杆菌JDM601(*Mycobacterium sinov* JDM601)。之后基于全基因组序列分析对其毒力和致病机制进行了初步探讨<sup>[8-9]</sup>。本实验从条件致病性新诺分枝杆菌JDM601(*M. sinov* JDM601)、致病性结核分枝杆菌H<sub>37</sub>Rv标准株(*M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv)和非致病性耻垢分枝杆菌(*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155)3种不同菌株来源的分枝杆菌中提取脂聚糖,电洗脱法进行纯化,并比较分析其结构差异及研究脂聚糖刺激对巨噬细胞COX-2蛋白表达的影响。这些研究将对于揭示不同来源分枝杆菌的毒力和免疫机制具有重要意义。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:** *M. sinov* JDM601由上海交通大学医学院病原生物学教研室保存,*M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv和*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155由中国药品生物制品检定所提供。

**1.1.2 RAW小鼠巨噬细胞系:** RAW 264.7小鼠巨噬细胞系由上海交通大学医学院病原生物学教研室用含DMEM完全培养基于37℃,5%二氧化碳条件下传代培养。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** DNase I酶、RNase酶和Concanavalin A (ConA)-HRP购自Sigma公司;抗鼠 $\beta$ -Actin抗体,抗鼠CYCLOOXYGENASE-2抗

体,羊抗兔IgG-HRP购自Epitomics公司;DMEM完全培养基购自Hyclone公司;Triton X-114购自Amresco公司;改良罗氏培养基购自博慧斯生物医药科技有限公司;氯仿、甲醇、乙醇均为国产分析纯;超速冷冻离心机为Beckman公司产品;MALDI-TOF/TOF-MS质谱仪为Bruker公司产品。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 菌体的制备:** (1) *M. sinov* JDM601和*M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv菌体的制备:将*M. sinov* JDM601和*M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv分别接种在改良罗氏培养基上,37℃培养3-4周,收取菌落,分别称取约3g菌体用于提取脂聚糖粗品。

(2) *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155菌体的制备:将新鲜生长的单一mc<sup>2</sup>155菌落接种到4mL LBG液体培养基中,37℃振荡培养2d。将4mL饱和菌液接种于500mL相同的培养基中,37℃振荡培养2d。4℃、27000 $\times$ g离心20min收集菌体,称取3g菌体用于提取脂聚糖。

**1.2.2 脂聚糖粗品的提取<sup>[10-11]</sup>:**将收集得到的3种分枝杆菌菌体分别于100℃水浴2h灭活细菌。用氯仿:甲醇:水(10:10:3,体积比)溶剂摇动2h去除细胞壁多余脂质,重复去除脂质步骤3次后,于真空干燥箱中干燥。干燥后的菌体用玻璃棒捣碎,加入破碎缓冲液后进行超声破碎(500W,7s $\times$ 6s,150次)。再用含DNase I酶、RNase酶和Triton X-114的破碎缓冲液重复提取有机相3次,加入10倍体积95%乙醇过夜,收集沉淀。加入1/10体积的链霉蛋白酶,37℃孵育24h,蒸馏水透析24h,-20℃保存备用。

**1.2.3 LAM和LM的电洗脱纯化:**配制两块12% SDS-PAGE电泳胶,一块用于银染,一块用于电洗脱。电泳完毕后,用ddH<sub>2</sub>O洗涤,与已经银染的图片相比较,切下胶块中相应的条带,将其捣碎成1mm<sup>3</sup>碎片,放入3.5kD透析袋中,注入Tris-甘氨酸(电泳缓冲液)。将透析袋放入装有电泳缓冲

液电泳槽中,有胶块的一端靠近负极,100 V 电泳 1 h,然后倒转电极电泳 5 min。电泳回收后的液体移入超滤管,4 °C、3 040×g 浓缩离心 40 min,加入 2 mL 左右 ddH<sub>2</sub>O,4 °C、3 040×g 离心 40 min 置换缓冲液。最后 4 °C、9 600×g 离心 10 min,除去沉淀的 SDS,收集上清液,再经 12% SDS-PAGE 电泳后用硝酸银染色检验纯化结果。

**1.2.4 蒽酮-硫酸法测定样品糖含量:**取样品 50 μL,0.2%蒽酮硫酸试剂 200 μL,以无水葡萄糖为多糖标准,制作浓度范围 0–100 mg/L 的标准曲线,沸水浴中煮沸 15 min,取出后在自来水中冷却 10 min 后检测 620 nm 的吸光度值,直线回归计算检测样品中的多糖含量。

**1.2.5 MALDI-TOF/TOF-MS 分析脂聚糖<sup>[12]</sup>:**用蒸馏水配置 10 g/L 浓度的 2,5-二羟苯甲酸(2,5-Dihydroxybenzoic acid, DHB)基质溶液。取 1.0 μL 的 1 g/L 脂聚糖样品与 1.0 μL 基质溶液混合。将样品混合液 1.0 μL 点至样品板上,使之在常温下结晶。在仪器参数为波长 337 nm,加速电压 25 kV,设定质量范围 1–25 kD,负离子模式下分析样品。

**1.2.6 Con A 初步分析分枝杆菌脂聚糖结构:**经 12% SDS-PAGE 分离后的脂聚糖转移至硝酸纤维素膜,后用含 2% (体积比) Tween-20 的磷酸盐缓冲液,20 °C 条件下孵育 2 min,以封闭多余的结合位点。磷酸盐缓冲液振荡洗涤 2 次后,用含 0.05% (体积比) Tween-20、1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>、1 mmol/L MnCl<sub>2</sub>、1 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 的磷酸盐缓冲液稀释的 3.0 mg/L Con A-HRP,20 °C 条件下反应 16 h。磷酸盐缓冲液冲洗,除去多余的外源凝集素,后加入新配制的 DAB 显色剂进行显色,直至条带清晰为止,最后磷酸盐缓冲液振荡洗涤终止反应。

**1.2.7 蛋白免疫印迹法测定巨噬细胞 COX-2 蛋白表达:**将培养于 DMEM 完全培养基中的小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 按细胞浓度为 6.25×10<sup>5</sup> 个/mL 接种于 24 孔细胞培养板中,设 DMEM 培养基对照

组、终浓度为 5 mg/L 的 LAM 处理组、终浓度为 1 mg/L 的 LAM 处理组、终浓度为 5 mg/L 的 LM 处理组和终浓度为 1 mg/L 的 LM 处理组,混匀,置于 37 °C 二氧化碳培养箱中培养过夜。分别加入脂聚糖刺激 5 h (DMEM 培养基对照组不加脂聚糖),收集细胞。细胞裂解液裂解细胞后,于 10% SDS-PAGE 分离,分离的蛋白质电转移至 PVDF 膜上,封闭液室温下作用 2 h,分别加入抗鼠 β-Actin 抗体和抗鼠 COX-2 抗体孵育 1 h, TBST 缓冲液(pH 7.6)洗 5 min×3 次,加入羊抗鼠 IgG-HRP 二抗反应 1 h, TBST 缓冲液(pH 7.6)洗 5 min,洗 3 次,化学发光显色法进行显色。

## 2 结果与分析

### 2.1 LAM 和 LM 的电洗脱纯化

为了从分枝杆菌脂聚糖粗提物中分别得到较纯的 LAM 和 LM,按 1.2.3 的方法对 *M. sinov* JDM601、*M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv 和 *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 来源的脂聚糖粗提物分别进行纯化,回收结果见图 1。经电洗脱法回收的 3 种分枝杆菌来源的 LAM 和 LM 纯品,在 12% SDS-PAGE 电泳胶上为较单一条带,条带位置与脂聚糖粗提物中的大小相符。由 12% SDS-PAGE 分析显示 *M. sinov* JDM601 和 *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 的 LAM 电泳迁移率相近,但与 *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv 的 LAM 相比具有更大的电泳迁移率。此外,从这 3 种菌株中提取的 LM,依据电泳迁移率由小到大依次为 *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv、*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155、*M. sinov* JDM601 (图 1)。

### 2.2 蒽酮-硫酸法测定样品糖含量

蒽酮-硫酸法测定样品 *M. sinov* JDM601、*M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv 和 *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 菌株 LAM 浓度分别为 1.1、1.3 和 1.3 g/L; *M. sinov* JDM601、*M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv 和 *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 菌株 LM 浓度分别为 0.9、1.2 和 1.1 g/L,样品的主要组分为糖类化合物。

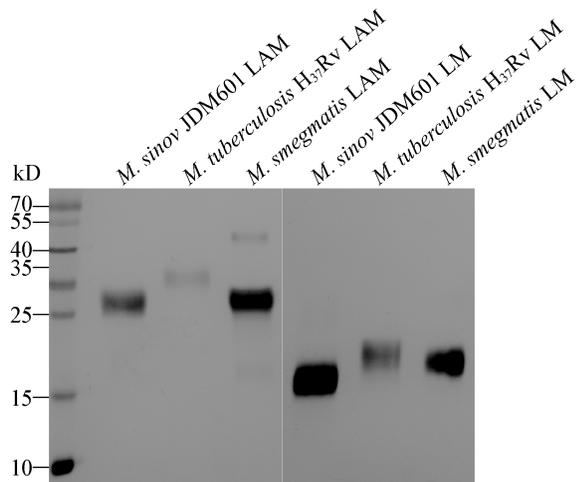


图1 LAM/LM 纯品经 12% SDS-PAGE 电泳后结合高碘酸-硝酸银染色分析

Figure 1 Purified LAM/LM were subjected to 12% SDS-PAGE prior to treatment with periodic acid and staining with silver nitrate

### 2.3 MALDI-TOF/TOF-MS 鉴定 3 种分枝杆菌菌株脂聚糖

MALDI-TOF/TOF-MS 分别分析 *M. sinov* JDM601、*M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv 和 *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 来源的 LAM 和 LM。结果显示, *M. tuberculosis*

H<sub>37</sub>Rv 和 *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 来源的 LAM 分别在 *m/z* 18 660.71 和 14 854.19 处具有高峰, 与文献报道的 *M. tuberculosis* 的 ManLAM 的分子量在 17 kD 左右, *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 的 PILAM 的分子量大约为 13±3 kD 相符<sup>[13]</sup>。*M. sinov* JDM601 的 LAM 在 *m/z* 14 039.62 处也存在一个相似的高峰, 其分子量约为 14.0 kD, 比其他两种菌株的 LAM 均小, 与 *M. tuberculosis* 来源的 LAM 差异更大。*M. sinov* JDM601、*M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv 和 *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 来源的 LM 分别在 *m/z* 7 014.76、10 930.61 和 9 939.20 处具有高峰, 分子量分别约为 7、11 和 10 kD(图 2)。

### 2.4 Con A 初步分析分枝杆菌脂聚糖结构

豆科植物来源的刀豆球蛋白(Con A)的主要性质之一是能够特异性识别 α-D-甘露糖。本研究结果显示, Con A 能与 *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv 来源的 LAM 相互作用, 而不能与 *M. sinov* JDM601 和 *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 来源的 LAM 相互作用; 并且发现, Con A 与 *M. sinov* JDM601 来源的 LM 有很强的反应, 但与 *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv 和 *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 来源的 LM 反应很弱(图 3)。

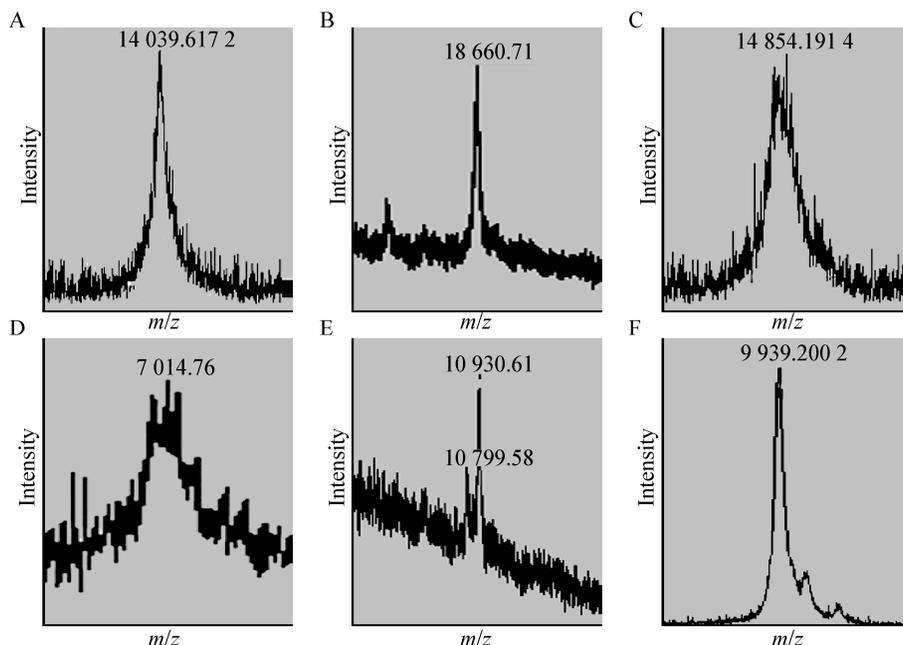


图2 MALDI-TOF/TOF-MS 分析 3 种分枝杆菌的 LAM/LM

Figure 2 MALDI-TOF/TOF-MS analysis of LAM/LM from three mycobacterial strains

Note: A: *M. sinov* JDM601 LAM; B: *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv LAM; C: *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 LAM; D: *M. sinov* JDM601 LM; E: *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv LM; F: *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 LM.

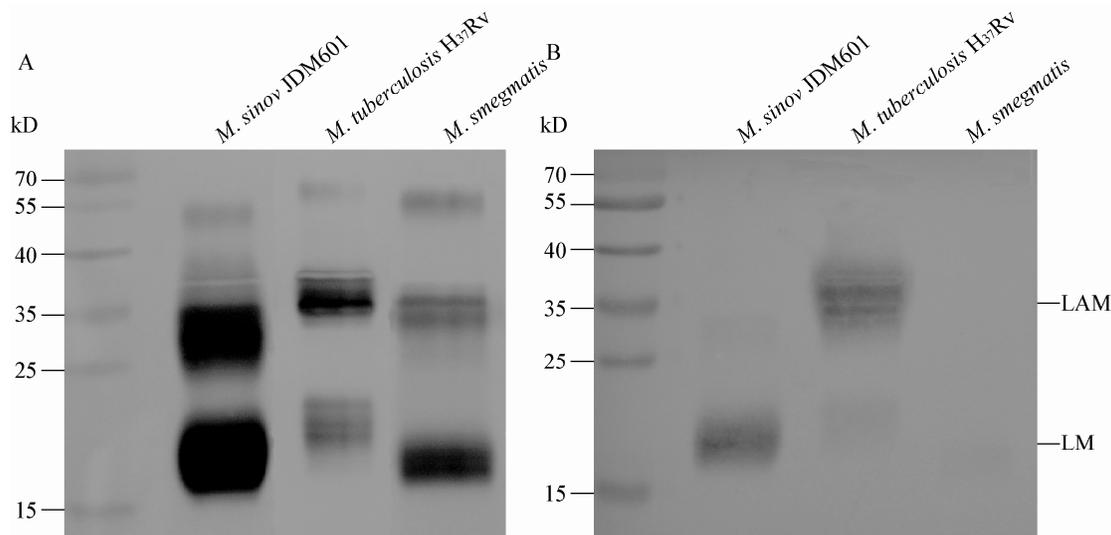


图3 SDS-PAGE 和 Western blot 分析 3 种分枝杆菌来源的脂聚糖

Figure 3 SDS-PAGE and Western blot analysis of lipoglycans from three mycobacterial strains

注: A: 凝胶结合硝酸银染色; B: Western blot 分析 3.0 mg/L Con A-HRP 与脂聚糖的反应。

Note: A: Gel stained with silver nitrate; B: Western blot analysis of lipoglycans was blotted with 3.0 mg/L Con A-HRP.

### 2.5 蛋白免疫印迹法测定 RAW 264.7 巨噬细胞 COX-2 蛋白表达

Western blot 结果显示, DMEM 培养基对照组 COX-2 蛋白无表达, 分别用 5 mg/L 和 1 mg/L 的 3 种不同分枝杆菌来源 LAM 和 LM 刺激 RAW 264.7 巨噬细胞 5 h 后, 均能检测到小鼠巨噬细胞 COX-2 蛋白的表达(图 4)。

### 3 讨论

LAM 和 LM 是分枝杆菌细胞壁主要的毒力因子和免疫调节因子, 并且具有广泛的免疫生物学功能, 普遍认为两者是结核分枝杆菌发病的一个重要因素, 因此近年来逐渐受到国内外学者的重视。研究发现<sup>[14]</sup>, 分枝杆菌属中 LAM 和 LM 的免疫生物学功能依据种、菌株的不同也不尽相同, 这种差异可能源于不同分枝杆菌菌株间 LAM 或 LM 结构方面的不同, 而不是总含量的变化。然而, 目前的研究主要还是集中于实验室常用菌株, 对临床分离株, 特别是对来源于中国临床分枝杆菌分离株的糖结构研究鲜有报道。

有关 LAM 的纯化已经有相关研究<sup>[15]</sup>, 主要采

用的是 Sephacryl S-200 或 Bio-Gel P-100 凝胶柱层析, 对层析柱的要求比较高并且价格昂贵, 但是采用电洗脱的方法进行纯化却未见报道。电洗脱法主要用于分子克隆实验, 如 DNA 的琼脂糖电泳分离、回收及纯化。而本研究中纯化脂聚糖的方法是在 SDS-PAGE 基础上进一步对目的脂聚糖进行回收和纯化, 且所需设备成本低、易操作、耗时少、纯度高, 但收率低, 适用于少量分析研究。本方法不仅可以纯化分枝杆菌 LAM 和 LM, 而且也为其他脂聚糖或糖蛋白的分离纯化提供较可靠的依据。

*M. sinov* JDM601 是我们首次从一例肺结核病患者痰液中分离到的一株致病性分枝杆菌, 经研究鉴定属于广泛耐药的土分枝杆菌复合群的新种。我们从条件致病性 *M. sinov* JDM601、致病性 *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv 和非致病性 *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 三种菌株的细胞壁中成功提取出 LAM 和 LM。MALDI-TOF/TOF-MS 鉴定发现, LAM 在 *M. sinov* JDM601、*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155、*M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv 中的分子量依次由小增大; 从 3 种菌株中分别提取的 LM 也可以观察到这种分子

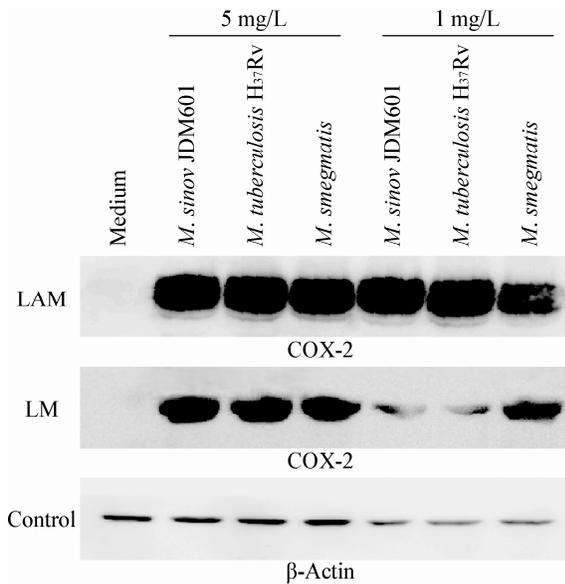


图4 脂聚糖刺激 RAW 264.7 巨噬细胞提高 COX-2 蛋白的表达

Figure 4 Lipoglycans stimulation enhances COX-2 expression in RAW 264.7 macrophages

注: Western blot 分析分别用 *M. sinov* JDM601、*M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv 和 *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 来源 LAM/LM (5 mg/L 和 1 mg/L) 刺激的 RAW 264.7 巨噬细胞 COX-2 表达;  $\beta$ -Actin 免疫染色作为质控。

Note: The cell culture media and cell lysates of macrophages stimulated with LAM/LM (5 mg/L and 1 mg/L) from *M. sinov* JDM601, *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv and *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 were analyzed for COX-2 expression by Western blot, respectively; Immunostaining for  $\beta$ -Actin was used as a loading control.

量大小的差异。这表明 LM 的甘露糖区域分子量大小在不同的分枝杆菌中具有差异性。总的来说, *M. sinov* JDM601 与 *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 来源的脂聚糖相比分子量差异较小, 与 *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv 来源的脂聚糖分子量差异较大。这表明, *M. sinov* JDM601 来源的 LAM 和 LM 与 *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 等非结核分枝杆菌来源相比结构差异较小, 但与 *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv 来源的 LAM 和 LM 相比结构差异较大。此外, 我们发现只能特异性识别  $\alpha$ -D-甘露糖结构的 Con A 能与甘露糖戴帽结构的 *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv 来源的 LAM 相互作用, 而不能与 *M. sinov* JDM601 和 PI 戴帽结构的 *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 来源的 LAM 相互作用, 推测这

种差异的产生可能是由 *M. sinov* JDM601 和 *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 来源 LAM 的阿拉伯糖链对甘露糖链造成空间阻碍, 使得 Con A 无法识别特异性甘露糖链<sup>[16]</sup>。这个结果也间接地表明 *M. sinov* JDM601 来源的 LAM 不同于 *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, 其全长更小, 暴露程度更小, 且不是甘露糖戴帽结构。同时发现, Con A 与分子量最小的 *M. sinov* JDM601 来源的 LM 有很强的反应, 但与 *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv 和 *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 来源的 LM 反应很弱。研究结果表明 *M. sinov* JDM601 来源的 LM 结构较短且简单, 并且在末端甘露糖链结构域具有显著异质性, 值得我们进一步研究。

在抗结核分枝杆菌免疫应答中, 细胞介导的免疫反应是主要的免疫保护机制, 其中巨噬细胞是抗结核免疫应答的主要效应细胞。COX-2 是一个关键的代谢酶, 其可以通过影响前列腺素-2 (Prostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>) 的合成, 调节巨噬细胞的功能。COX-2 属于诱导性表达, 在各种刺激因子的作用下会在单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和内皮细胞中高表达, 导致 PGE<sub>2</sub> 分泌增多, 并诱发炎症反应<sup>[17]</sup>。我们的研究结果显示 3 种分枝杆菌来源的 LAM 和 LM 刺激小鼠巨噬细胞后, COX-2 蛋白表达量均明显增加。此结果提示分枝杆菌来源的脂聚糖抗原可以通过影响 COX-2 蛋白的表达, 调节巨噬细胞的炎症反应, 从而在宿主抗结核免疫机制中发挥重要作用。

总之, 我们首次成功对来源于中国临床分枝杆菌分离株来源的脂聚糖进行了分离纯化, 并初步探讨了条件致病性、致病性、非致病性 3 种不同菌株来源的分枝杆菌脂聚糖的结构差异及其调节巨噬细胞的功能, 为研究其对宿主的毒力和免疫机制, 并进一步进行新型抗结核药物和疫苗筛选开发奠定了基础。

## 参 考 文 献

- [1] WHO. Global Tuberculosis Control: WHO report 2011[R]. Geneva, World Health Organization, 2011.

- [2] Wang HX, Yue J, Han M, et al. Nontuberculous mycobacteria: susceptibility pattern and prevalence rate in Shanghai from 2005 to 2008[J]. Chinese Medical Journal, 2010, 123(2): 184-187.
- [3] Albayrak N, Simsek H, Sezen F, et al. Evaluation of the distribution of non-tuberculous mycobacteria strains isolated in national tuberculosis reference laboratory in 2009-2010, Turkey[J]. Mikrobiyol Bülteni, 2012, 46(4): 560-567.
- [4] Jankute M, Grover S, Rana AK, et al. Arabinogalactan and lipoarabinomannan biosynthesis: structure, biogenesis and their potential as drug targets[J]. Future Microbiology, 2012, 7(1): 129-147.
- [5] Nigou J, Gilleron M, Puzo G. Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis[J]. Biochimie, 2003, 85(1/2): 153-166.
- [6] Kaur D, Guerin ME, Skovierova H, et al. Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Advances in Applied Microbiology, 2009, 69: 23-78.
- [7] Mishra AK, Driessen NN, Appelmelk BJ, et al. Lipoarabinomannan and related glycoconjugates: structure, biogenesis and role in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and host-pathogen interaction[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2011, 35(6): 1126-1157.
- [8] Zhang ZY, Sun ZQ, Wang ZL, et al. Complete genome sequence of a novel clinical isolate, the nontuberculous mycobacterium strain JDM601[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(16): 4300-4301.
- [9] Zhang ZY, Sun ZQ, Wang ZL, et al. Identification and pathogenicity analysis of a novel non-tuberculous mycobacterium clinical isolate with nine-antibiotic resistance[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2013, 19(1): 91-96.
- [10] Shi L, Torrelles JB, Chatterjee D. Lipoglycans of *Mycobacterium tuberculosis*: isolation, purification, and characterization[J]. Methods in Molecular Biology, 2009, 465: 23-45.
- [11] Torrelles JB, Khoo KH, Sieling PA, et al. Truncated structural variants of lipoarabinomannan in *Mycobacterium leprae* and an ethambutol-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(39): 41227-41239.
- [12] Torrelles JB, Knaup R, Kolareth A, et al. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates with altered phagocytosis by human macrophages due to a truncated lipoarabinomannan[J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(46): 31417-31428.
- [13] Chatterjee D, Khoo KH. Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects[J]. Glycobiology, 1998, 8(2): 113-120.
- [14] Rajaram MVS, Ni B, Morris JD, et al. *Mycobacterium tuberculosis* lipomannan blocks TNF biosynthesis by regulating macrophage MAPK-activated protein kinase 2 (MK2) and microRNA miR-125b[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(42): 17408-17413.
- [15] Chatterjee D, Khoo KH, McNeil MR, et al. Structural definition of the non-reducing termini of mannose-capped LAM from *Mycobacterium tuberculosis* through selective enzymatic degradation and fast atom bombardment-mass spectrometry[J]. Glycobiology, 1993, 3(5): 497-506.
- [16] Guerardel Y, Maes E, Ellass E, et al. Structural study of lipomannan and lipoarabinomannan from *Mycobacterium chelonae*-Presence of unusual components with alpha 1,3-mannopyranose side chains[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(34): 30635-30648.
- [17] A SK, Bansal K, Holla S, et al. ESAT-6 induced COX-2 expression involves coordinated interplay between PI3K and MAPK signaling[J]. Molecular Immunology, 2012, 49(4): 655-663.