

DOI:10.13350/j.cjpb.240206

• 论著 •

# MTB Hsp60 重组蛋白对巨噬细胞趋化功能的影响\*

卫麟娜<sup>1</sup>, 高雪涵<sup>1</sup>, 董品志<sup>1</sup>, 吴炎浓<sup>1</sup>, 王海燕<sup>2</sup>, 罗军敏<sup>1</sup>, 覃明<sup>1\*\*</sup>

(1. 遵义医科大学基础医学院免疫学教研室, 贵州遵义, 563000; 2. 遵义医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学教研室)

**【摘要】** 目的 研究结核分枝杆菌 H37Rv 重组热休克蛋白 60 (Heat shock protein 60 of *Mycobacterium tuberculosis*, MTB Hsp60) 对巨噬细胞 (RAW264.7) 趋化功能的影响。方法 MTB Hsp60 重组蛋白 (100 ng/mL) 刺激巨噬细胞 24 h 后, 采用实时荧光定量 PCR 检测下列趋化因子如单核细胞趋化蛋白 1 (Monocyte chemotactic protein-1, MCP-1, CCL2)、巨噬细胞炎症蛋白 1 $\alpha$  (Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ , CCL3)、巨噬细胞炎症蛋白 1 $\beta$  (Macrophage inflammatory protein-1 $\beta$ , MIP-1 $\beta$ , CCL4)、调节活化正常 T 细胞表达与分泌的趋化因子 (Regulation of Activation, Expression and Secretion by Normal T Cells, RANTES, CCL5) 和单核细胞趋化蛋白 5 (Monocyte chemotactic protein-5, MCP-5, CCL12) 的 mRNA 表达; ELISA 法检测细胞培养上清液中趋化因子 CCL2、CCL3、CCL4、CCL5 和 CCL12 的分泌水平; Western blot 检测巨噬细胞表面趋化因子受体 C-C 基序趋化因子受体 1 (C-C motif chemokine receptor 1, CCR1)、CCR2 和 CCR5 的蛋白表达; 流式细胞术检测表达趋化因子受体 CCR1、CCR2、CCR5 的巨噬细胞; Transwell 实验检测巨噬细胞的趋化功能。结果 100 ng/mL MTB Hsp60 重组蛋白刺激巨噬细胞 24 h 后, 其趋化因子 CCL2、CCL3、CCL4 及 CCL12 的 mRNA 表达水平无明显差异, 但 CCL5 的 mRNA 水平显著上调 ( $P < 0.05$ ); 巨噬细胞表面主要的趋化因子受体 CCR1、CCR2 蛋白表达水平显著增高 ( $P < 0.05$ ), 而其表面 CCR5 蛋白的变化不明显; 流式细胞术检测结果显示, 与未处理组相比, 处理组中 CCR1<sup>+</sup>、CCR2<sup>+</sup> 巨噬细胞数量明显增加 ( $P < 0.05$ ), 而 CCR5<sup>+</sup> 巨噬细胞数量无明显差异; Transwell 实验表明, 经过 MTB Hsp60 重组蛋白处理后的巨噬细胞有更明显的被募集的趋势 ( $P < 0.05$ ); 而上清液中趋化因子 CCL2、CCL3、CCL4、CCL5 及 CCL12 的释放水平无明显变化。结论 MTB Hsp60 重组蛋白能上调巨噬细胞中趋化因子 CCL5 的 mRNA 表达水平, 能增加巨噬细胞表面趋化因子受体 CCR1 和 CCR2 的表达, 并且能增强巨噬细胞的趋化功能。

**【关键词】** MTB Hsp60 重组蛋白; 巨噬细胞; 趋化因子; 趋化因子受体

**【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-5234(2024)02-0157-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2024 Feb;19(2):157-161,171.]

## Effect of MTB Hsp60 recombinant protein on chemotactic function to macrophages

WEI Linna<sup>1</sup>, GAO Xuehan<sup>1</sup>, DONG Pinzhi<sup>1</sup>, WU Yingnong<sup>1</sup>, WANG Haiyan<sup>2</sup>, LUO Junmin<sup>1</sup>, QIN Ming<sup>1</sup> (1. Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou, China; 2. Department of epidemiology and health statistics, School of public health, Zunyi Medical University) \*\*\*

**【Abstract】** **Objective** To study the effect of recombinant heat shock protein 60 (MTB Hsp60) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv on the chemotactic function of macrophages (RAW264.7). **Methods** After MTB Hsp60 recombinant protein (100 ng/mL) stimulated macrophages for 24 h, real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the mRNA expression of the following chemokines such as Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1, CCL2), Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ , CCL3), Macrophage inflammatory protein-1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ , CCL4), Regulation of Activation, Expression and Secretion by Normal T Cells (RANTES, CCL5), and Monocyte chemotactic protein-5 (MCP-5, CCL12). The secretion levels of chemokines CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 and CCL12 in cell culture supernatant were detected by ELISA; Western blot assay was used to detect the expression of C-C motif chemokine receptor 1 (CCR1), CCR2 and CCR5 on the surface of macrophages; Flow cytometry was performed to detect macrophages expressing chemokine receptors CCR1, CCR2, and CCR5; and Transwell assay was performed to detect the chemotactic function of macrophages. **Results** After MTB Hsp60 recombinant protein (100 ng/mL) stimulated macrophages for 24 h, the mRNA level of CCL5, not other chemokine (CCL2, CCL3, CCL4 or CCL12), was up-regulated significantly ( $P < 0.05$ ). However, the expressions of CCR1 and CCR2 proteins, not CCR5 protein, increased significantly

\* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目 (No. 81860291), 2023 年贵州省教学内容和课程体系改革项目 (No. SJJG2023185)。

\*\* **【通讯作者】** 覃明, E-mail: 158277563@qq.com

**【作者简介】** 卫麟娜 (1996-), 女, 陕西西安人, 在读研究生, 主要研究方向: 感染免疫研究。E-mail: weilinna2021@163.com

( $P < 0.05$ ). In addition, flow cytometry results showed that the number of CCR1<sup>+</sup> and CCR2<sup>+</sup> macrophages, not that of CCR5<sup>+</sup> macrophages, in the stimulated groups increased significantly compared with that in the control groups ( $P < 0.05$ ), and Transwell assay results showed that macrophages treated with MTB Hsp60 recombinant protein had a more significant tendency to be recruited ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** MTB Hsp60 recombinant protein upregulates the mRNA expression of chemokine CCL5 in macrophages, increases the levels of chemokine receptors CCR1 and CCR2 on the macrophage surface, and enhances the chemotactic function of macrophages.

**【Key words】** MTB Hsp60 recombinant protein; macrophage; chemokine; chemokine receptor

结核病是由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 引起的慢性传染性疾病。根据世界卫生组织 2023 年全球结核病报告统计, 2022 年约有 1 060 万人罹患结核病, 其中约有 130 万人因此而死亡<sup>[1]</sup>。结核病严重威胁着人类健康乃至生命, 其致病菌 MTB 与固有免疫细胞的早期相互作用在很大程度上影响感染结局。因此, 阐明 MTB 侵入机体后对固有免疫细胞的调控机制至关重要。MTB 主要以气溶胶的形式通过呼吸道侵入机体肺部, 激活抗结核感染中的第一道防线肺泡巨噬细胞, 发挥吞噬作用<sup>[2]</sup>。众所周知, 巨噬细胞通过其表面模式识别受体, 识别 MTB 表面的病原相关分子模式, 对 MTB 产生免疫应答, 借助释放的各种细胞因子杀伤、清除 MTB。另外, 释放的趋化因子可募集免疫细胞到达感染部位, 进一步加强机体对 MTB 的免疫清除<sup>[3]</sup>。

MTB Hsp60 是由 GroEL1 基因编码的热休克蛋白, 参与分枝菌酸的合成, 在逃避机体免疫清除过程中发挥了重要作用<sup>[4-5]</sup>。相关文献报道, Hsp60 能被巨噬细胞表面 Toll 样受体识别, 进而释放 IL-10 或 TNF- $\alpha$  等细胞因子<sup>[6]</sup>。而在机体对 MTB 的应答中, 不仅涉及炎症因子的释放, 也与病原菌抗原提呈、炎症细胞趋化至病原菌部位相关。本课题组前期采用不同浓度 MTB Hsp60 重组蛋白在不同时间点刺激小鼠骨髓来源巨噬细胞, 发现该重组蛋白可抑制巨噬细胞抗原提呈功能从而逃避巨噬细胞的免疫清除, 导致 MTB 感染<sup>[7]</sup>。然而, MTB Hsp60 对巨噬细胞趋化功能的影响尚未见报道。基于此, 本实验进一步采用 100 ng/mL MTB Hsp60 重组蛋白刺激巨噬细胞 (RAW264.7), 检测其趋化因子的释放、趋化因子受体的表达及趋化功能, 以探究其对巨噬细胞趋化功能的影响。

## 材料与amp;方法

### 1 材料

**1.1 细胞与重组蛋白** MTB Hsp60 重组蛋白构建于爱必信(上海)生物科技有限公司; RAW264.7 巨噬细胞 (CL0190) 购于武汉普诺赛生命科技有限公司。

**1.2 主要试剂** 培养基高糖 DMEM (# 11965092)、胎牛血清 (# 10100147C) 购于 Gibco 公司(美国); 青霉素-链霉素溶液 (# C0222) 购于碧云天生物技术有限

公司; 结晶紫染色液 (# G1063) 购于北京索莱宝科技有限公司; PBS 缓冲液 (# G4202-500 ML) 购于武汉赛维尔生物科技有限公司; RNAiso Plus (# 9109) 购于 TAKARA 生物技术有限公司; RT Master mix for qPCR II (gDNA digester plus) (# HY-K0511A) 和 SYBR Green qPCR Master mix (universal) (# HY-K0501A) 购于 MedChemExpress; ELISA 试剂盒: CCL2 (# 70-EK287/2-96)、CCL5 (# 70-EK2129/2-96) 购于杭州联科生物技术有限公司; CCL3 (# E-EL-M0007c)、CCL4 (# E-EL-M0008c) 和 CCL12 (# E-EL-M3003) 购于武汉伊莱瑞特生物科技有限公司; 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成; 流式抗体: 抗 CCR1 (# FAB5986A, APC)、抗 CCR2 (# FAB5986A, PE) 和抗 CCR5 (# FAB5986A, APC) 购于 R&D 公司; 蛋白抗体: CCR1 抗体 (# A18341, 1:1000) 购于武汉爱博泰克生物科技有限公司; CCR2 抗体 (# AF6387, 1:2000)、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (H+L) (# A0208, 1:1000)、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) (# A0216, 1:1000) 购于碧云天生物技术有限公司; GAPDH 抗体 (# T0004, 1:10000)、CCR5 抗体 (# AF6339, 1:2000) 购于 Affinity Biosciences。

### 2 方法

**2.1 RAW264.7 巨噬细胞培养** 用含有 10% 的胎牛血清及 1% 双抗的高糖 DMEM 培养细胞, 根据细胞状态和密度对其进行传代、铺板和处理。

**2.2 Real-time qPCR** 采用 100 ng/mL MTB Hsp60 刺激巨噬细胞 24 h 后, 提取细胞 RNA 检测各趋化因子 mRNA 水平的表达。将 TRIzol 法抽提出的 RNA 逆转录为 cDNA, 随后以 cDNA 为模板进行 Real-time qPCR 实验。Real-time qPCR 实验数据用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析目的基因的表达水平, 引物序列见表 1。

**2.3 ELISA 检测培养上清中的细胞因子** 收集细胞上清, 按照 ELISA 说明书检测趋化因子的表达水平。

**2.4 Western blot 检测** 巨噬细胞表面趋化因子受体的表达 MTB Hsp60 处理巨噬细胞后提取细胞蛋白并定量。通过电泳、转膜及封闭等步骤后, 加入 CCR1、CCR2 或 CCR5 一抗, GAPDH 作为内参抗体,

4 °C 孵育过夜,洗膜后加入 HRP 标记的山羊抗兔、鼠二抗室温孵育 2 h,最后加入发光液于 Bio-Rad 凝胶成像系统进行曝光,采用 Image Pro Plus 软件和 Graph pad Prism 进行图像分析。

表 1 引物序列  
Table 1 Primer sequence

基因 Gene	上游引物序列 Upstream (5'-3')	下游引物序列 Downstream (5'-3')
GAPDH	GAGCCAAACGGGTCATCATCT	GAGGGGCCATCCACAGTCTT
CCL2	GACCCCAAGAAGGAATGGGT	ACCTTAGGGCAGATGCAGTT
CCL3	CCATATGGAGCTGACACCCC	CCATATGGAGCTGACACCCC
CCL4	CCATATGGAGCTGACACCCC	CCATATGGAGCTGACACCCC
CCL5	ATATGGCTCGGACACCACTC	ACTTGGCGGTTCTTCTCGAG
CCL12	TAGCTACCACCATCAGTCTCTC	ACACTGGCTGCTTGTGATTCC

**2.5 流式细胞术检测** 巨噬细胞表面趋化因子受体的表达在 MTB Hsp60 处理巨噬细胞后,收集细胞,分别用 CCR1、CCR2、CCR5 抗体标记未处理组和处理组 40 min 后用 PBS 洗涤,并上机检测。

**2.6 Transwell 实验检测** 巨噬细胞趋化功能在 MTB Hsp60 处理巨噬细胞后,收集未处理组和 MTB Hsp60(100 ng/mL)处理组细胞的培养上清置于 transwell 板的下室,收集未处理组和处理组细胞,以每孔  $1 \times 10^4$  的细胞密度铺在 transwell 板的上室培养 24 h,结晶紫染色后观察巨噬细胞的趋化结果。

### 3 统计学分析

采用 SPSS 18.0 和 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计学分析,实验所得数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )的形式表示。采用单因素方差分析(one-way ANOVA)对各组间的差异进行统计分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结果

### 1 MTB Hsp60 重组蛋白对巨噬细胞趋化因子 mRNA 水平的影响

为了检测 MTB Hsp60 重组蛋白对巨噬细胞趋化因子 mRNA 水平的影响,提取细胞 RNA。如图 1 所示,在 100 ng/mL MTB Hsp60 刺激巨噬细胞 24 h 后,其趋化因子 CCL2、CCL3、CCL4 及 CCL12 的 mRNA 水平无明显变化,CCL5 的 mRNA 水平显著增高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 2 MTB Hsp60 重组蛋白对巨噬细胞趋化因子受体表达的影响

为了检测 MTB Hsp60 重组蛋白对巨噬细胞表面趋化因子受体的影响,采用 100 ng/mL MTB Hsp60 重组蛋白刺激巨噬细胞 24 h 后,提取细胞蛋白质,检测细胞表面趋化因子受体的蛋白表达。Western blot 结果显示(图 2A),巨噬细胞表面主要的趋化因子受体

CCR1、CCR2 蛋白表达明显增高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。而其表面 CCR5 的变化不明显。在 MTB Hsp60 刺激巨噬细胞 24 h 后,收集细胞做流式检测,流式检测结果显示经重组蛋白刺激后,CCR1<sup>+</sup>、CCR2<sup>+</sup>巨噬细胞数量增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。而 CCR5<sup>+</sup>细胞数量增加不明显(图 2B),与 Western blot 结果趋势一致。

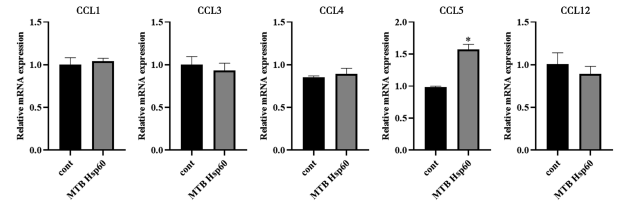
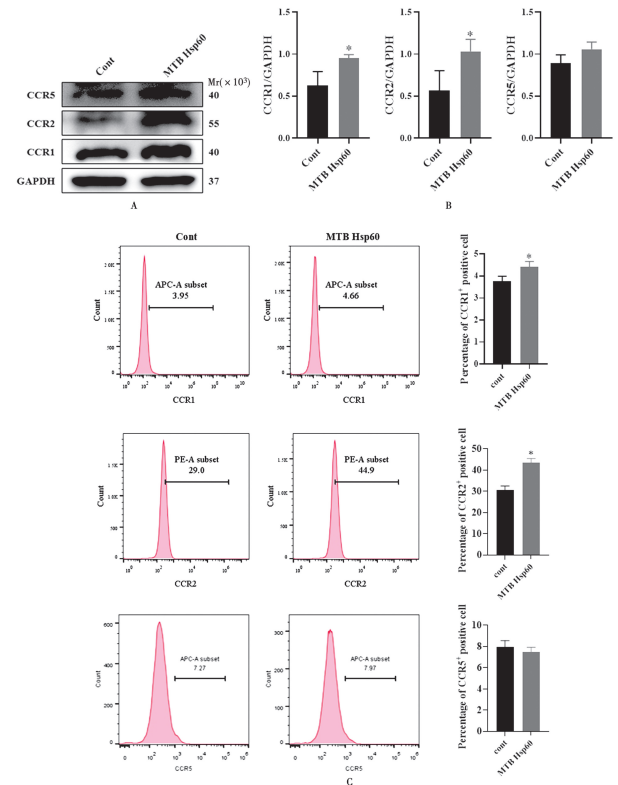


图 1 MTB Hsp60 重组蛋白对巨噬细胞趋化因子 mRNA 水平的影响 (\*  $P < 0.05$ )

Fig. 1 Effect of MTB Hsp60 recombinant protein on chemokine mRNA levels in macrophage



A 采用 Western blot 检测巨噬细胞表面趋化因子受体的表达 B 采用流式细胞术检测巨噬细胞表面趋化因子受体的表达, \*  $P < 0.05$

图 2 MTB Hsp60 重组蛋白对巨噬细胞趋化因子受体表达的影响

A The expression of chemokine receptor on the surface of the macrophage was detected by Western blot B The expression of chemokine receptor on the surface of the macrophage was detected by Flow cytometry, \*  $P < 0.05$

Fig. 2 Effect of MTB Hsp60 recombinant protein on chemokine receptor expression in macrophages

### 3 MTB Hsp60 重组蛋白对巨噬细胞趋化功能的影响

为了验证 MTB Hsp60 对巨噬细胞趋化功能的影响,我们进一步采用处理组与未处理组的上清和细胞

做 transwell 实验。如图 3 所示,与未处理组相比, MTB Hsp60 处理后,更多的巨噬细胞被募集到 transwell 的下室,提示 MTB Hsp60 可能诱导巨噬细胞中某些趋化因子的产生,进而增强其趋化能力。而经过 MTB Hsp60 重组蛋白处理后的巨噬细胞表面趋化因子受体也显著增加,有更明显的被募集趋势( $P < 0.05$ )。

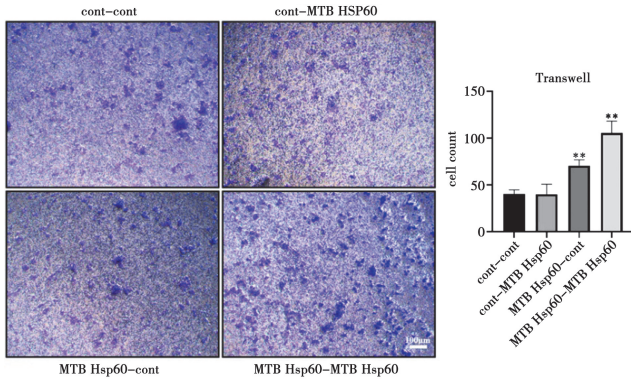


图 3 MTB Hsp60 重组蛋白对巨噬细胞趋化能力的影响 (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ )

Fig. 3 Effect of MTB Hsp60 recombinant protein on chemotactic ability of macrophage

为了进一步探究是何种趋化因子增强了巨噬细胞的趋化能力,我们检测了上清液中趋化因子 CCL2、CCL3、CCL4、CCL5 及 CCL12 的释放水平。然而, ELLSA 结果均未见明显差异(图 4)。

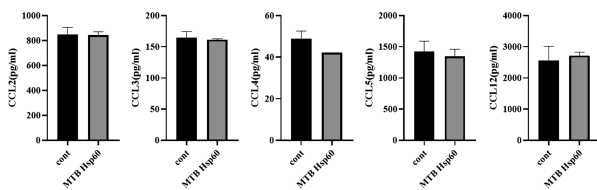


图 4 MTB Hsp60 重组蛋白对巨噬细胞趋化因子的释放的影响  
Fig. 4 Effect of MTB Hsp60 recombinant protein on chemokine release in macrophages

### 讨论

致病菌 MTB 通常从呼吸道侵入机体被肺泡巨噬细胞识别后产生免疫应答<sup>[8]</sup>。当体内 MTB 负荷过多、毒力增大,会导致巨噬细胞无法有效清除 MTB。同时, MTB 在被巨噬细胞吞噬时面临着氧化爆发、低氧、低 PH 和低营养的严峻形势,就会通过产生“热休克蛋白”来响应这些变化<sup>[9]</sup>。

MTB Hsp60 是由 GroEL1 基因编码的热休克蛋白,在热休克、氧化应激反应、巨噬细胞感染时上调表达<sup>[10]</sup>。它既是调控 MTB 生物膜成熟参与分支菌酸合成的毒力蛋白,也是调节 MTB 感染中细胞因子依赖性肉芽肿反应的重要因子<sup>[11]</sup>。而肉芽肿作为 MTB 感染的诊断标志,在形成过程中受到趋化因子和趋化因

子受体的调控,且趋化因子可通过分泌 IFN- $\gamma$  的 Th1 细胞触发细胞介导的免疫应答减轻 MTB 感染。在前期实验的基础上,选择 100 ng/mL MTB Hsp60 重组蛋白刺激巨噬细胞 24 h 后,检测巨噬细胞趋化功能的变化。Transwell 实验结果提示, Hsp60 能促进巨噬细胞的趋化功能。

趋化因子是一大类能与 G 蛋白偶联受体结合的分泌蛋白,负责调节炎症反应和宿主防御。其由五十多种配体和受体组成,主要在免疫细胞上表达<sup>[12]</sup>。趋化因子受体及其配体形成的信号网络对其他免疫细胞“定位”病原菌感染部位至关重要,可调节细胞分裂、存活、迁移和侵袭<sup>[13]</sup>。CC 趋化因子及其受体的表达水平可能与结核病的易感性相关,有助于判断结核病病情严重程度<sup>[14]</sup>。CC 基序趋化因子受体 1 (CCR1) 在巨噬细胞上高度表达<sup>[15]</sup>,与白细胞迁移、病原体清除以及 I / II 型细胞因子平衡密切相关。MTB 感染早期,巨噬细胞聚集气道表达 CCR2;若此过程中缺乏 CCR2,则巨噬细胞对 MTB 的易感性增加<sup>[16]</sup>。在我们的实验中, MTB Hsp60 能增加巨噬细胞表面 CCR1、CCR2 的表达(图 2),可影响单核细胞和 T 细胞向肺部的早期迁移,让 MTB 受到更多免疫细胞的“围攻”。其中 CCR1 是对 MTB 应答的恶化因子,可将应答转变为更剧烈的炎症反应,从而加重结核病症状。而 CCR2 促进 Th1 细胞进入感染小鼠的肺部<sup>[17]</sup>,是必不可少的保护性因子。CCR2/CCR1 的平衡可作为结核病严重程度的诊断因子和潜伏性结核病向活动性结核病转化的标志物<sup>[18]</sup>。相关研究报道,结核患者淋巴细胞中 CCR2 低表达导致肉芽肿形成延迟和缺陷,结核感染坏死性病变增加<sup>[19]</sup>。同样, Hsp60 敲除菌株也会抑制小鼠体内肉芽肿的形成。这表明, Hsp60 调控肉芽肿生成可能也与其诱导 CCR2 的表达相关。同时, CCR5 及其配体也是 MTB 感染中将巨噬细胞、T 细胞等募集到肺部的关键因素,其启动子多态性与结核病易感性相关<sup>[20-22]</sup>。临床研究中,结核病患者外周血中 CCR5 的升高,可导致血小板-单核细胞发生聚集,这是血小板进入肺部的载体,可能参与肉芽肿的形成<sup>[23]</sup>。但在我们的结果中, MTB Hsp60 对 CCR5 的表达影响不明显。这表明, MTB Hsp60 对机体炎症反应、炎性肉芽肿的调控与 CCR5 相关性不高,这可能是菌体中单一蛋白成分致病性不如完整菌株致病性高,也可能是致病菌对人与小鼠的宿主差异所致。

为了明确 MTB Hsp60 是否通过 CCR1、CCR2 和 CCR5 受体信号途径影响趋化作用,进一步检测了趋化因子受体相关配体 CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL12 mRNA 水平的变化。CCR1 的主要配体是 CCL3 和 CCL5<sup>[24]</sup>。CCR2 的配体 CCL2 的多态性与

肺结核相关,可保护宿主免受过度炎症和由此产生的组织损伤,也被证明是 MTB 感染的易感因素。同时,CCR2 与 CCL5 和 CCL12 的激活可以诱导上皮、间皮和炎症细胞的趋化性,但 CCR5 配体 CCL3、CCL4 和 CCL5 的产生与 MTB 的毒力以及肉芽肿的形成没有明确相关性<sup>[25]</sup>。上述受体发挥作用都与 CCL5 密切相关,CCL5 是这些受体发挥功能的“中心”蛋白。CCR1 和 CCL5 相互作用可改变体内外炎症水平,且 CCL5 以依赖 CCR1 的方式上调表达 IFN- $\gamma$  等细胞因子,对宿主造成损害<sup>[26]</sup>。此外,CCL5 可募集 Th1 型免疫细胞到炎症位点,也能在 IFN- $\gamma$  的帮助下,诱导 NK 细胞增殖和活化,形成 CC 趋化因子活化的杀伤细胞清除病原体,而低水平的 CCL5 使各种免疫细胞的功能障碍,导致 MTB 耐药性增加<sup>[27]</sup>,也能使肉芽肿形成缓慢,表现为 IFN- $\gamma$  反应延迟和对 MTB 生长控制不佳<sup>[28]</sup>。本研究结果显示,CCL5 的 mRNA 水平明显升高,但 ELISA 实验检测 CCL5 释放没有明显差异。CCL5 基因表达与蛋白表达不一致,其作用机制有待进一步探索。这也提示,MTB Hsp60 可能通过其他趋化因子途径发挥募集巨噬细胞的作用。

综上,本研究结果提示 MTB Hsp60 重组蛋白能上调巨噬细胞中趋化因子 CCL5 的 mRNA 表达水平,能增加巨噬细胞表面趋化因子受体 CCR1 和 CCR2 的表达,并且能增强巨噬细胞的趋化功能。这可为深入探索 MTB Hsp60 在结核感染中对巨噬细胞等免疫细胞的功能影响提供研究基础。但本研究仅在体外细胞水平初步探讨了 MTB Hsp60 重组蛋白对 RAW264.7 巨噬细胞趋化功能的影响及可能机制,对在结核感染中 MTB Hsp60 影响巨噬细胞趋化功能的深入调控机制,尚需进一步研究。

#### 【参考文献】

[1] WHO. Global Tuberculosis Report 2023. World Health Organization, 2023. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240083851> (accessed November 7, 2023).

[2] Bo H, Moure U, Yang Y, et al. *Mycobacterium tuberculosis*-macrophage interaction: Molecular updates [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13:1062963.

[3] Wagner AR, Weindel CG, West KO, et al. SRSF6 balances mitochondrial-driven innate immune outcomes through alternative splicing of BAX[J]. *Elife*. 2022, 11:e82244.

[4] 安芳芳,郑永标,吴宇圳,等. 分枝菌酸在分枝杆菌感染过程中的作用及相关抗结核药物靶点的研究进展[J]. *抗感染药学*, 2022, 19(8):1089-1095.

[5] Ojha A, Anand M, Bhatt A, et al. GroEL1: a dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in mycobacteria[J]. *Cell*, 2005, 123(5):861-873.

[6] Parveen N, Varman R, Nair S, et al. Endocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 60 is required

to induce interleukin-10 production in macrophages[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(34):24956-24971.

[7] 李茂,张焱皓,黄波,等. 结核分枝杆菌 Hsp60 影响小鼠巨噬细胞抗原提呈相关分子表达的研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(14):1669-1675.

[8] Novita BD, Tjahjono Y, Wijaya S, et al. Characterization of chemokine and cytokine expression pattern in tuberculous lymphadenitis patient[J]. *Front Immunol*, 2022, 13:983269.

[9] Sharma A, Rustad T, Mahajan G, et al. Towards understanding the biological function of the unusual chaperonin Cpn60. 1 (GroEL1) of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2016, 97:137-146.

[10] 何磊,张鹭,彭超,等. 结核分枝杆菌热休克蛋白 GroEL1 的研究进展[J]. *微生物与感染*, 2010, 5(3):186-191.

[11] Hu Y, Henderson B, Lund PA, et al. A *Mycobacterium tuberculosis* mutant lacking the groEL homologue cpn60. 1 is viable but fails to induce an inflammatory response in animal models of infection[J]. *Infect Immun*, 2008, 76(4):1535-1546.

[12] Hughes CE, Nibbs R. A guide to chemokines and their receptors [J]. *FEBS J*, 2018, 285(16):2944-2971.

[13] Aparecida RRN, Rodney DADR, Alexandre OA, et al. Potent anti-Toxoplasma gondii activity of 4-chlorophenylthioacetone-derived thiosemicarbazones; Involvement of CCR2 and CCR5 receptors and 5-lipoxygenase in the mode of action[J]. *Medicine in Drug Discovery*, 2023, 18,100157.

[14] 乔敏,李姗姗,刘荣梅,等. CC 趋化因子和 CXC 趋化因子及其受体在结核分枝杆菌感染免疫应答中作用的研究进展[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2021, 37(4):373-377.

[15] Le K, Sun J, Ghaemmaghami J, et al. Blockade of CCR1 induces a phenotypic shift in macrophages and triggers a favorable antilymphoma activity[J]. *Blood Adv*. 2023, 7(15):3952-3967.

[16] Liu S, Liu N, Wang H, et al. CCR5 promoter polymorphisms associated with pulmonary tuberculosis in a Chinese han population[J]. *Front Immunol*. 2021, 11:544548.

[17] Hoft SG, Sallin MA, Kauffman KD, et al. The rate of CD4 T cell entry into the lungs during *Mycobacterium tuberculosis* infection is determined by partial and opposing effects of multiple chemokine receptors[J]. *Infect Immun*, 2019, 87(6):e00841-18.

[18] Abbasnia S, Hajimiri S, Jafari RM, et al. Gene expression study of host and *Mycobacterium tuberculosis* interactions in the manifestation of acute tuberculosis [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2023, 195(6):3641-3652.

[19] Zeren N, Afzal Z, Morgan S, et al. The chemokine receptor CCR1 mediates microglia stimulated glioma invasion[J]. *Int J Mol Sci*. 2023, 24(6):5136.

[20] Chavez-Galan L, Vesin D, Segueni N, et al. Tumor necrosis factor and its receptors are crucial to control *Mycobacterium bovis* bacillus calmette-guerin pleural infection in a murine model [J]. *Am J Pathol*, 2016, 186(9):2364-2377.

[21] 赵凤,周钰琪,徐铭晗,等. 结核分枝杆菌毒力因子 ESAT-6 与巨噬细胞相互作用的研究进展[J]. *中国病原生物学杂志*, 2023, 18(6):742-744, 封三.

[22] 何会姣,田爽,宁雪萍,等. 鸟分枝杆菌 MAV-2921 基因编码蛋白的生物信息学分析及其对巨噬细胞凋亡的影响[J]. *中国病原生物学杂志*, 2022, 17(1):75-80.

- papillomavirus positive cervical cancer cell lines: Evidence from RNA Seq transcriptome analysis[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(17): 13646-13656.
- [6] Liu S, Li Y, Li Z. Salidroside suppresses the activation of nasopharyngeal carcinoma cells via targeting miR-4262/GRP78 axis[J]. Cell Cycle, 2022, 21(7): 720-729.
- [7] 黄进, 刘福蓉, 温婷, 等. 红景天苷通过 JAK2/STAT3 通路影响宫颈鳞癌 C33A 细胞的增殖、侵袭和凋亡[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2020, 27(5): 522-527.
- [8] Jang HJ, Bak Y, Pham TH, et al. STK899704 inhibits stemness of cancer stem cells and migration via the FAK-MEK-ERK pathway in HT29 cells[J]. BMB Rep, 2018, 51(11): 596-601.
- [9] Qi Z, Tang T, Sheng L, et al. Salidroside inhibits the proliferation and migration of gastric cancer cells via suppression of Src-associated signaling pathway activation and heat shock protein 70 expression[J]. Mol Med Rep, 2018, 18(1): 147-156.
- [10] 张珊珊, 刘嗣同, 石洪爽, 等. 刺芒柄花素通过 FAK/AKT/Bcl-2 通路促进外阴鳞癌 SW962 细胞凋亡[J]. 解剖科学进展, 2021, 27(6): 653-656.
- [11] Burmeister CA, Khan SF, Schafer G, et al. Cervical cancer therapies: Current challenges and future perspectives [J]. Tumour Virus Res, 2022, 13(1): 200238-200251.
- [12] Singh G, Sharma SK, Singh SK. miR-34a negatively regulates cell cycle factor Cdt2/DTL in HPV infected cervical cancer cells [J]. BMC Cancer, 2022, 22(1): 777-787.
- [13] Kubiczak M, Szustka A, Rogalinska M. Molecular targets of natural compounds with anti-cancer properties [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(24): 13659-13685.
- [14] Yang P, Chai Y, Wei M, et al. Mechanism of salidroside in the treatment of endometrial cancer based on network pharmacology and molecular docking [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 14114-14123.
- [15] 张洋, 董天睿, 倪锦红. 红景天苷对宫颈癌 HeLa 细胞增殖抑制作用的研究 [J]. 国际妇产科学杂志, 2017, 44(4): 396-398, 481.
- [16] 袁肇方, 时小凤, 张向博, 等. 红景天苷抑制卵巢癌细胞 SKOV3 增殖的基因水平研究 [J]. 西北民族大学学报(自然科学版), 2022, 43(1): 32-39.
- [17] Mogi K, Koya Y, Yoshihara M, et al. 9-oxo-ODAs suppresses the proliferation of human cervical cancer cells through the inhibition of CDKs and HPV oncoproteins [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 19208-19220.
- [18] Morale MG, Tamura RE, Cintra R, et al. TLR4 and SARM1 modulate survival and chemoresistance in an HPV-positive cervical cancer cell line [J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 6714-6725.
- [19] Wang YL, Wu WR, Lin PL, et al. The Functions of PCNA in Tumor Stemness and Invasion [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(10): 5679-5690.
- [20] Xu J, Qu Q, Liu B, et al. The circular RNA circ\_0030018/miR-136/migration and invasion enhancer 1 (MIEN1) axis promotes the progression of polycystic ovary syndrome [J]. Bioengineered, 2022, 13(3): 5999-6011.
- [21] Li Z, Wei J, Chen B, et al. The role of MMP-9 and MMP-9 inhibition in different types of thyroid carcinoma [J]. Molecules, 2023, 28(9): 3705-3732.
- [22] Niu X, Han Q, Li X, et al. EDIL3 influenced the  $\alpha$ v $\beta$ -FAK/MEK/ERK axis of endothelial cells in psoriasis [J]. J Cell Mol Med, 2022, 26(20): 5202-5212.
- [23] Yang K, Gao K, Hu G, et al. CTGF enhances resistance to 5-FU-mediated cell apoptosis through FAK/MEK/ERK signal pathway in colorectal cancer [J]. Onco Targets Ther, 2016, 9(1): 7285-7295.
- 【收稿日期】 2023-10-11 【修回日期】 2024-01-20
- ~~~~~
- (上接 161 页)
- [23] Kullaya V, van der Ven A, Mpagama S, et al. Platelet-monocyte interaction in *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. Tuberculosis (Edinb), 2018, 111: 86-93.
- [24] Biswas SK M M S E. Exploring the role of C-C motif chemokine ligand-2 single nucleotide polymorphism in pulmonary tuberculosis: a genetic association study from north india [J]. J Immunol Res, 2020, 2020: 1019639.
- [25] Badewa AP, Quinton LJ, Shellito JE, et al. Chemokine receptor 5 and its ligands in the immune response to murine tuberculosis [J]. Tuberculosis (Edinb), 2005, 85(3): 185-195.
- [26] Ness TL, Carpenter KJ, Ewing JL, et al. CCR1 and CC chemokine ligand 5 interactions exacerbate innate immune responses during sepsis [J]. J Immunol, 2004, 173(11): 6938-6948.
- [27] Pydi SS, Ghousunnissa S, Devalraju KP, et al. Down regulation of RANTES in pleural site is associated with inhibition of antigen specific response in tuberculosis [J]. Tuberculosis (Edinb), 2019, 116S: S123-S130.
- [28] Vesosky B, Rottinghaus EK, Stromberg P, et al. CCL5 participates in early protection against *Mycobacterium tuberculosis* [J]. J Leukoc Biol, 2010, 87(6): 1153-1165.
- ~~~~~
- (上接 165 页)
- [9] Azzouz N, Kamena F, Laurino P, et al. *Toxoplasma gondii* secretory proteins bind to sulfated heparin structures [J]. Glycobiology, 2013, 23(1): 106-120.
- [10] Lourenco EV, Pereira SR, Faca VM, et al. *Toxoplasma gondii* micronemal protein MIC1 is a lactose-binding lectin [J]. Glycobiology, 2001, 11(7): 541-547.
- [11] Zhang Y, Lai BS, Juhás M, et al. *Toxoplasma gondii* secretory proteins and their role in invasion and pathogenesis [J]. Microbiol Res, 2019, 227: 126293.
- [12] Boothroyd JC, Dubremetz JF. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries [J]. Nat Rev Microbiol, 2008, 6(1): 79-88.
- [13] Sinai AP, Joiner KA. The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane [J]. J Cell Biol, 2001, 154(1): 95-108.
- [14] Rezaei F, Sharif M, Sarvi S, et al. A systematic review on the role of GRA proteins of *Toxoplasma gondii* in host immunization [J]. J Microbiol, 2019, 165: 105696.
- [15] 胡玲英, 张念章, 王金磊, 等. 弓形虫致密颗粒蛋白的生物学功能及免疫原性研究的新进展 [J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(7): 663-668.
- [16] 柳方远, 李双星, 印春生, 等. 弓形虫主要分泌蛋白及其功能的研究进展 [J]. 中国动物传染病学报, 2020, 28(5): 94-102.
- ~~~~~
- 【收稿日期】 2023-09-14 【修回日期】 2023-12-10