

# Effects of Virulence-Related Factors EsxH of *Mycobacterium avium* on Macrophage Apoptosis

Yi Zhang, Shiyi He, Xueping Ning, Shuang Tian, Min Ling\*

Key Laboratory of Biological Molecular Medicine Research of Guangxi University, Department of Biotechnology, Guangxi Medical University, Nanning Guangxi  
Email: 1987495473@qq.com, \*lingmin70@163.com

Received: Feb. 14<sup>th</sup>, 2019; accepted: Feb. 28<sup>th</sup>, 2019; published: Mar. 8<sup>th</sup>, 2019

## Abstract

**Objective:** In order to study the role of EsxH in *Mycobacterium avium*, EsxH protein was expressed in prokaryotic expression system and its effects on U937 cells apoptosis were investigated. **Methods:** The EsxH coding sequences were amplified by PCR and connected with the expression vector pGEX-4T-3 to construct the recombinant vector pGEX-EsxH. The recombinant expression vector pGEX-EsxH was transformed into *E. coli* BL21(DE3), and the target proteins were induced by IPTG. The GST-EsxH fusion proteins were purified by glutathione-agarose gel column after the cells were disrupted by ultrasonic disruption. The purified EsxH proteins were applied to U937 cells and the apoptotic rates were measured by flow cytometry. **Results:** A 294bp EsxH gene was amplified and cloned into the expression vector pGEX-4T-3, after induced by IPTG, a fusion protein GST-EsxH with a molecular weight of 36.5 kd was successfully expressed. Different concentrations of EsxH protein were applied to U937 cells, and the flow cytometry results showed that the apoptotic rate of the treated group was higher than that of the control group, with statistical significance ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** EsxH protein could promote the apoptosis of U937 cells, laying the foundation for further study on the pathogenic mechanism of *Mycobacterium avium*.

## Keywords

*Mycobacterium avium*, EsxH, Cell Apoptosis

# 鸟分枝杆菌毒力相关因子EsxH对巨噬细胞凋亡的作用

张 依, 何时义, 宁雪萍, 田 爽, 凌 敏\*

\*通讯作者。

**文章引用:** 张依, 何时义, 宁雪萍, 田爽, 凌敏. 鸟分枝杆菌毒力相关因子 EsxH 对巨噬细胞凋亡的作用[J]. 微生物前沿, 2019, 8(1): 33-39. DOI: 10.12677/amb.2019.81005

广西医科大学, 广西高校生物分子医学研究重点实验室, 广西医科大学生物技术教研室, 广西 南宁  
Email: 1987495473@qq.com, \*lingmin70@163.com

收稿日期: 2019年2月14日; 录用日期: 2019年2月28日; 发布日期: 2019年3月8日

## 摘要

**目的:** 通过原核表达系统制备鸟分枝杆菌EsxH蛋白, 并将其作用于U937细胞, 初步探讨其对巨噬细胞凋亡的影响。**方法:** 利用PCR扩增出EsxH编码序列, 与表达载体pGEX-4T-3连接, 构建重组载体pGEX-EsxH, 将重组表达载体pGEX-EsxH转化入*E. coli* BL21 (DE3), 在IPTG作用下诱导表达目的蛋白。用超声破碎仪对菌体进行破碎, 取上清通过谷胱甘肽琼脂糖凝胶柱纯化GST-EsxH融合蛋白。将纯化后的蛋白作用于U937细胞, 用流式细胞仪检测细胞凋亡率。**结果:** 扩增出基因片段大小为294 bp的EsxH基因, 克隆入表达载体pGEX-4T-3, 经IPTG诱导后成功表达一个分子量大小为36.5 kDa的融合蛋白GST-EsxH。将不同浓度的EsxH蛋白作用于U937细胞, 经流式细胞术检测细胞凋亡率, 发现处理组细胞凋亡率高于对照组, 其差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论:** EsxH蛋白能够促进U937细胞的凋亡, 为进一步研究鸟分枝杆菌的致病机制奠定了基础。

## 关键词

鸟分枝杆菌, EsxH, 细胞凋亡

Copyright © 2019 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

鸟分枝杆菌(*Mycobacterium avium*, MA)是一种细长弯曲, 抗酸染色阳性的杆菌, 为非结核分枝杆菌(*Nontuberculous mycobacteria*, NTM)中主要的致病菌, 在免疫低下或缺陷的人群中常常容易伴发感染。鸟分枝杆菌作为机会致病性菌, 广泛存在于土壤、水、动物和植物表面以及尘埃中[1] [2], 可通过呼吸道或者直接摄入被污染的水源和食物而引起感染。尽管鸟分枝杆菌在自然环境中普遍存在, 但还未有证据表明它能从人与人或动物到人之间进行传播。近年来, 在 HIV 阳性或艾滋病患者中, NTM 感染所占比例不断增大, 尤其为鸟分枝杆菌, 其所占比例最大[3] [4] [5] [6]。鸟分枝杆菌感染主要引起肺部的病变, 其临床表现、影像学特点和病理检查均与肺结核病相类似, 两者容易混淆。此外, 鸟分枝杆菌还可侵犯淋巴结、骨髓和皮肤软组织等引起相应的病变, 严重情况下还可导致全身播散性感染。由于鸟分枝杆菌与结核分枝杆菌对药物的敏感性不同, 治疗鸟分枝杆菌肺病与非结核也有一定差异, 且鸟分枝杆菌比结核分枝杆菌对多种药物更容易出现耐药, 如对异烟肼和吡嗪酰胺表现为天然耐药, 鸟分枝杆菌的临床分离株对利福平等抗结核药也多表现不敏感[7] [8], 其治疗难度也较大。

Esat-6 (6 kD early secretory antigenic target)是由结核分枝杆菌 DR1 区编码并由 ESX-1 系统分泌的蛋白, 是一个重要的毒力因子。ESAT-6 可通过免疫细胞调节细胞因子的产生, 如诱导巨噬细胞分泌 IL-1 和抑制 T 细胞产生 IFN- $\gamma$ , 表明它在 MTB 感染过程中对宿主先天性免疫和适应性免疫反应有极大的影响。EsxH(Cfp-7)为 Esat-6 样蛋白, 与 EsxA(Esat-6)、EsxB(Cfp-10)同属 Esx 家族蛋白。近年来, 对 Esx 家族蛋白的研究主要集中在 EsxA(Esat-6)和 EsxB(Cfp-10)上, 而对该家族其他成员的研究较少, Esat-6 家族其它成员在与宿主细

胞相互作用过程中发挥着怎样的作用,是否也参与了诱导宿主细胞的凋亡,这些结果尚未清楚。

本文通过克隆与鸟分枝杆菌毒力密切相关的 EsxH 基因,进行原核表达,并将 EsxH 蛋白作用于 U937 细胞,初步探讨 EsxH 对细胞凋亡的作用。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 材料

#### 2.1.1. 菌株和质粒

鸟分枝杆菌(*Mycobacterium avium* 104)临床分离菌株由广西壮族自治区疾病预防控制中心结核防治所提供;表达载体 pGEX-4T-3, *E. coli* BL21 (DE3)由本课题组保存;巨噬细胞 U937 从和元生物技术(上海)有限公司购置。

#### 2.1.2. 试剂及仪器

AxyPrep 基因组 DNA 小量试剂盒(Axygen 公司);质粒小量抽提试剂盒、DNA 胶回收试剂盒(碧云天生物技术有限公司);鸟分枝杆菌培养基为 Middle brook 7H9/OADC 培养基,大肠杆菌培养基为 LB 培养基, Biological Industries (BI)胎牛血清购置于南宁乐隼科技有限公司, 1640 培养基(诺唯赞)购置于南宁阳光试剂有限公司;限制性内切酶 EcoR I、BamH I、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、DL5,000 DNA marker, DL2,000 DNA marker 均购自大连 TaKaRa 宝生物工程有限公司;Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购于思政白生物科技有限公司。PCR 仪 Biometra Tpersonal (Biometra 公司);高速冷冻离心机 Eppendorf 5810 R (Eppendorf 公司);凝胶成像系统 UVI-7600Z (UVI 公司);生物安全柜 ThermoFisher 1300 (赛默飞公司)。

### 2.2. 方法

#### 2.2.1. EsxH 基因的克隆及在大肠杆菌中的表达

根据 GenBank 中 *Mycobacterium avium* 104 菌株基因组 DNA 序列,用 Primer premier 5.0 设计 EsxH 基因全长克隆引物, EsxH-F: 5'-TAAGGATCCCGGGAGGGCTGGCTGTCGCT-3' (划线部分为 BamH I 酶切位点); EsxH-R: 5'-CGCGAATTCACGGTGGTGTGCTGGCCGTGCGG-3' (划线部分为 EcoR I 酶切位点),以 *Mycobacterium avium* 104 基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。PCR 反应程序:94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 共 30 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。将 PCR 产物与 pGEX-4T-3 表达载体连接后,构建重组表达质粒 pGEX-EsxH。

将重组表达质粒转化 *E. coli* BL21(DE3)。挑取单菌落于 37℃ 培养至 OD600 = 0.5 时,加入 20 μl 终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 30℃ 诱导培养 2~3 h, 4℃, 5000 × g 离心收集菌体。对菌体总蛋白进行 SDS-PAGE 检测。

#### 2.2.2. EsxH 蛋白表达形式的检测及纯化

菌液用超声破碎仪破碎后,用结晶紫染色观察菌体破碎情况。分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 检测,利用谷胱甘肽琼脂糖凝胶珠纯化蛋白。

#### 2.2.3. EsxH 蛋白对巨噬细胞 U937 凋亡的影响

取对数生长期细胞悬液,计数并调节终浓度为  $1 \times 10^6$  个/ml,向六孔板各加 1 ml 细胞悬液,将纯化出来的蛋白加入六孔板中,调整其终浓度分别为 0、50、100、150 μg/ml,每个浓度重复 5 个孔,放置于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h。按照 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒操作步骤将处理好的细胞进行流式检测其凋亡率。

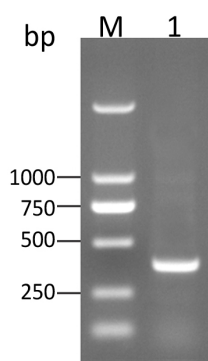
#### 2.2.4. 数据统计与分析

结果数据用均数标准差表示, 方差齐时用  $t$  检验进行比较, 方差不齐时用  $t'$  检验进行比较, 以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

### 3. 结果与分析

#### 3.1. EsxH 基因的 PCR 扩增及在大肠杆菌中的表达和纯化

利用 PCR 技术扩增 EsxH 基因, PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 得到一条大小为 294 bp 的条带(图 1), 经测序分析, 与 GenBank 上提供的序列一致。

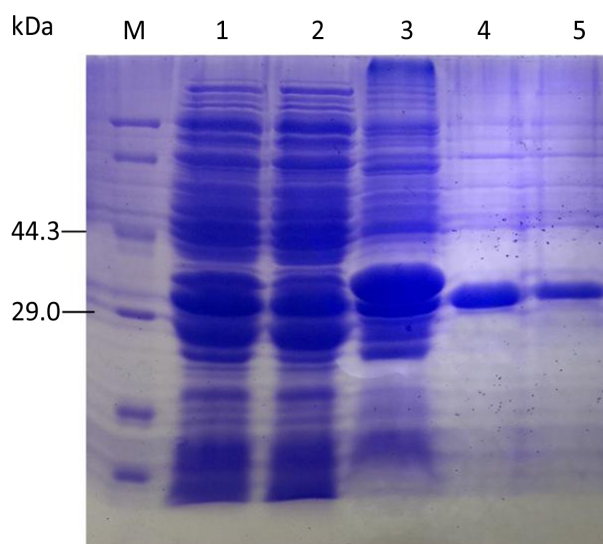


注: M: DNA Marker 2000; 1: EsxH 基因

**Figure 1.** The PCR amplification of EsxH genes

**图 1.** EsxH 基因的 PCR 扩增结果

将 EsxH 基因与 pGEX-4T-3 载体连接构建重组表达质粒 pGEX-EsxH。将重组表达质粒转化入 *E. coli* BL21 (DE3) 进行诱导表达, 收集菌体做 SDS-PAGE 出现分子量约为 36.5 kDa 的目标蛋白区带, 表明 EsxH 在大肠杆菌中得到表达。经谷胱甘肽琼脂糖凝胶珠纯化融合蛋白, 经 SDS-PAGE 电泳, 结果显示 EsxH 融合蛋白纯化成功(图 2)。



注: M: 蛋白 Marker; 1~2: EsxH 上清; 3: EsxH 沉淀; 4~5: 纯化后的 EsxH 融合蛋白

**Figure 2.** Expression and purification of the EsxH fusion protein

**图 2.** EsxH 融合蛋白的表达及纯化

### 3.2. EsxH 蛋白对巨噬细胞 U937 凋亡的影响

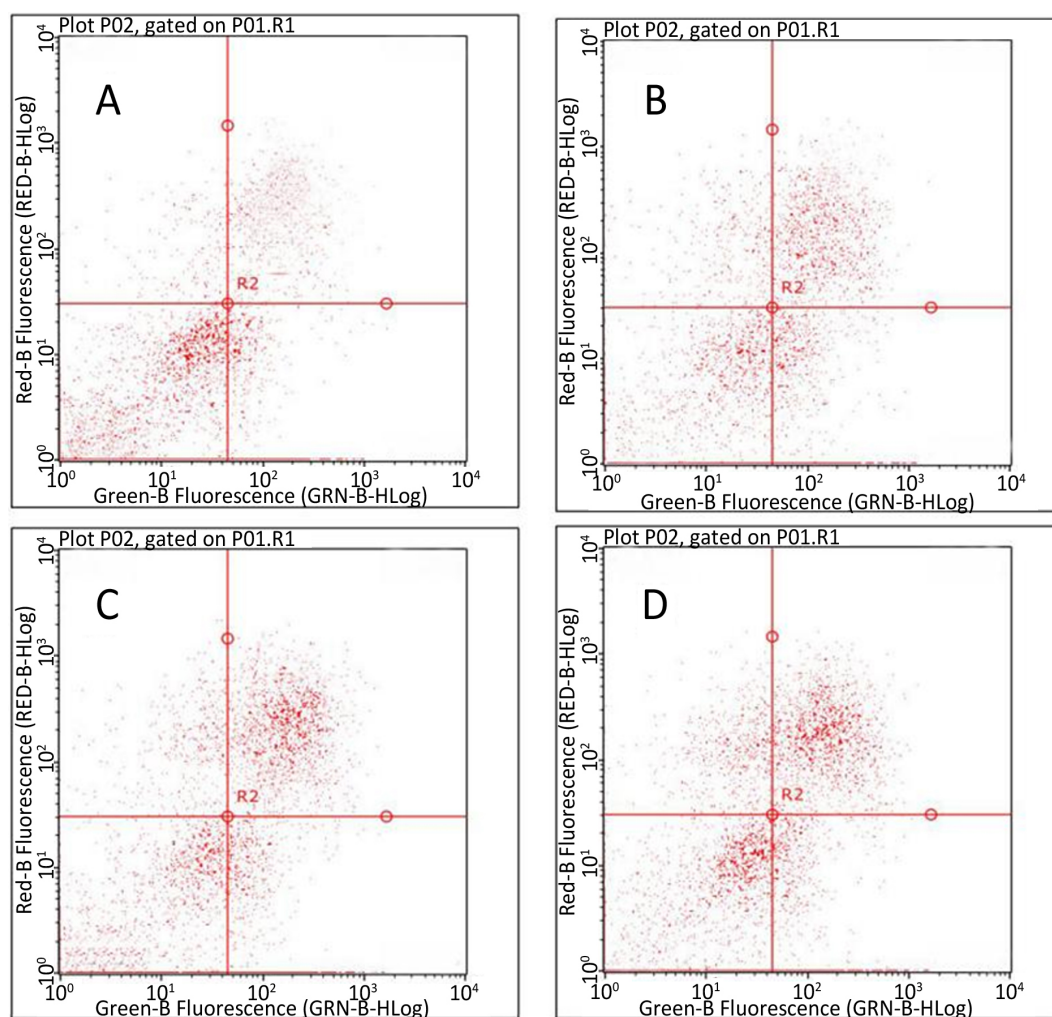
分别用 0、50、100、150  $\mu\text{g/ml}$  蛋白处理 U937 细胞 36 h 后, 流式细胞术检测其凋亡率, 结果显示对照组(0  $\mu\text{g/ml}$ )与各处理组间细胞凋亡率差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 结果见表 1, 图 3。表明 EsxH 对 U937 细胞凋亡有促进作用, 且凋亡率随着蛋白浓度的增加而增加。

**Table 1.** Effect of EsxH on U937 cell apoptosis

**表 1.** EsxH 对 U937 细胞凋亡的影响

EsxH 蛋白浓度( $\mu\text{g/ml}$ )	n	细胞凋亡率( $\bar{x} \pm s$ )
0	5	$11.22 \pm 0.84$
10	5	$20.45 \pm 1.22$
25	5	$24.12 \pm 0.50$
50	5	$29.25 \pm 1.85$

$P < 0.05$ , treatment groups (10, 25, 50  $\mu\text{g/ml}$ ) vs. control group (0  $\mu\text{g/ml}$ ).



A. Control (EsxH 0  $\mu\text{g/ml}$ ), B. EsxH 10  $\mu\text{g/ml}$ , C. EsxH 25  $\mu\text{g/ml}$ , D. EsxH 50  $\mu\text{g/ml}$

**Figure 3.** Effect of EsxH on apoptosis of U937 cells by flow cytometry

**图 3.** 流式细胞术检测 EsxH 对 U937 细胞凋亡的影响

## 4. 讨论

原核表达系统受目的基因自身结构及蛋白质构造等影响常使表达系统不能进行有效的表达,为提高外源基因表达水平,常采用温度和药物如异丙基—— $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)进行诱导。pGEX-4T-3 为一种高效的表达载体,含有强 tac 启动子,能够有效消除目的基因带来的在转录或转录后水平对表达系统的负面影响,同时载体上带有较大的 GST 标签,能够使分子量小的蛋白得到稳定表达,后续纯化步骤可通过凝血酶等将 GST-tag 切除。

鸟分枝杆菌为胞内寄生菌,其致病性与其在巨噬细胞内的生存机制有关,可通过自身的一系列调控机制以适应巨噬细胞内的生存环境,调控巨噬细胞凋亡。结核分枝杆菌对细胞凋亡的抑制作用是通过抑制细胞凋亡信号通路实现的,在结核分枝杆菌感染巨噬细胞时,使宿主细胞表面 TNF- $\alpha$  和 fas 受体减少,线粒体外膜上抗凋亡基因 mcl-1 表达水平上调,从而抑制介导细胞凋亡的死亡受体通路和线粒体通路[9][10][11]。此外,结核分枝杆菌对宿主细胞凋亡的抑制作用还可通过其自身编码的多种蛋白如 nuoG、PKE 等作用于宿主细胞来实现[12][13]。然而在结核分枝杆菌感染晚期,宿主细胞的凋亡则有利于结核分枝杆菌的释放,感染新的宿主细胞从而扩大感染的范围。Esat-6 为近年来备受研究者关注的一个毒力蛋白,其在诱导宿主巨噬细胞凋亡中发挥着关键作用。Esat-6 分泌受阻的结核分枝杆菌,其对宿主巨噬细胞凋亡的作用将减弱,限制了结核分枝杆菌在细胞间的扩散[14]。Derrick 等[15]研究发现 Esat-6 能够上调 caspase 的表达,利用野生株 H37Rv 感染 THP-1 细胞 48 小时后能使宿主细胞显著凋亡,而不能表达 Esat-6 的突变株对宿主细胞的凋亡则无明显影响。

EsxA(Esat-6)为结核分枝杆菌分泌的小分子蛋白,能够通过多种途径与宿主细胞相互作用,参与炎症反应、免疫识别和细胞凋亡。研究表明,当改变 Esat-6 蛋白的个别氨基酸时,不会抑制 Esat-6 的分泌,但会导致结核分枝杆菌毒力的减弱[16]。EsxH 作为 Esat-6 家族蛋白的成员之一,通过本研究发现,EsxH 也可促进巨噬细胞的凋亡。

## 5. 结论

EsxH 蛋白能够促进 U937 细胞的凋亡,在一定范围内其凋亡率随着蛋白浓度的增加而增加。

## 基金项目

广西自然科学基金项目(2015GXNSFAA139077)。

## 参考文献

- [1] De Groote, M.A., Pace, N.R., Fulton, K., *et al.* (2006) Relationships between *Mycobacterium* Isolates from Patients with Pulmonary Mycobacterial Infection and Potting Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 7602-7606. <https://doi.org/10.1128/AEM.00930-06>
- [2] Falkinham 3<sup>rd</sup>, J.O. (2011) Nontuberculous Mycobacteria from Household Plumbing of Patients with Nontuberculous Mycobacteria Disease. *Emerging Infectious Diseases*, **17**, 419-424. <https://doi.org/10.3201/eid1703.101510>
- [3] Griffith, D.E., Aksmit, T., Brown-Elliott, B.A., *et al.* (2007) An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **175**, 367-416. <https://doi.org/10.1164/rccm.200604-571ST>
- [4] Mirsaeidi, M., Machado, R.F., Carcia, J.G., *et al.* (2014) Nontuberculous Mycobacterial Disease Mortality in the United States, 1999-2010: A Population-Based Comparative Study. *PLoS ONE*, **9**, e91879. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091879>
- [5] Gunaydin, M., Yanik, K., Eroglu, C., *et al.* (2013) Distribution of Nontuberculous Mycobacteria Strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, **12**, 33. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-12-33>
- [6] 王洪生, 吴勤学. 非结核分枝杆菌感染与艾滋病[J]. 国外医学皮肤性病学分册, 2005, 31(3): 166-168.

- [7] Heifets, L. (1996) Susceptibility Testing of *Mycobacterium avium* Complex Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **40**, 1759-1767. <https://doi.org/10.1128/AAC.40.8.1759>
- [8] 段鸿飞, 土井教生, 李琦, 等. 鸟分枝杆菌复合群对 16 种抗感染药物药敏试验的分析[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2010, 33(5): 359-362.
- [9] Keane, J., Balcewicz-Sablinska, M.K., Remold, H.G., *et al.* (1997) Infection by *Mycobacterium tuberculosis* Promotes Human Alveolar Macrophage Apoptosis. *Infection and Immunity*, **65**, 298-304.
- [10] Oddo, M., Renno, T., Attinger, A., *et al.* (1998) Fas Ligand-Induced Apoptosis of Infected Human Macrophages Reduces the Viability of Intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Immunology*, **160**, 5448-5454.
- [11] Sly, L.M., Hingley-Wilson, S.M., Reiner, N.E., *et al.* (2003) Survival of Mycobacterium Tuberculosis in Host Macrophages Involves Resistance to Apoptosis Dependent upon Induction of Antiapoptotic Bcl-2 Family Member Mcl-1. *The Journal of Immunology*, **170**, 430-437. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.1.430>
- [12] Jayakumar, D., Jacobs Jr., W.R. and Narayanan, S. (2008) Protein Kinase E of Mycobacterium Tuberculosis Has a Role in the Nitric Oxide Stress Response and Apoptosis in a Human Macrophage Model of Infection. *Cellular Microbiology*, **10**, 365-374.
- [13] Velmurugan, K., Chen, B., Miller, J.L., *et al.* (2007) *Mycobacterium tuberculosis* nuo G Is a Virulence Gene That Inhibits Apoptosis of Infected Host Cells. *PLoS Pathogens*, **3**, e110. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030110>
- [14] Guinn, K.M., Hickey, M.J., Mathur, S.K., *et al.* (2004) Individual RD1-Region Genes Are Required for Export of ESAT-6/CFP-10 and for Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*, **51**, 359-370. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03844.x>
- [15] Derrick, S.C. and Morris, S.L. (2007) The ESAT6 Protein of *Mycobacterium tuberculosis* Induces Apoptosis of Macrophages by Activating Caspase Expression. *Cellular Microbiology*, **9**, 1547-1555. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00892.x>
- [16] Brodin, P., de Jonge, M.I., Majlessi, L., *et al.* (2005) Functional Analysis of Early Secreted Antigenic Target-6, the Dominant T-Cell Antigen of *Mycobacterium tuberculosis*, Reveals Key Residues Involved in Secretion, Complex Formation, Virulence, and Immunogenicity. *The Journal of Biological Chemistry*, **280**, 33953-33959. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503515200>

#### 知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2327-0810, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [amb@hanspub.org](mailto:amb@hanspub.org)