



# 伪结核棒状杆菌感染影响巨噬细胞 IL-1 $\alpha$ 表达、成熟及分泌的机制研究

王晓涵<sup>1#</sup>, 田尚全<sup>1#</sup>, 邹安龙<sup>1</sup>, 谭静梅<sup>1</sup>, 易文毅<sup>1</sup>, 王芝英<sup>1,2,3</sup>, 周作勇<sup>1,2,3\*</sup>

- 1 西南大学动物医学院, 重庆 402460
- 2 重庆市兽医科学工程研究中心, 重庆 402460
- 3 西南大学医学院免疫研究中心, 重庆 402460

王晓涵, 田尚全, 邹安龙, 谭静梅, 易文毅, 王芝英, 周作勇. 伪结核棒状杆菌感染影响巨噬细胞 IL-1 $\alpha$  表达、成熟及分泌的机制研究. 微生物学报, 2022, 62(10): 3947–3956.

Wang Xiaohan, Tian Shangquan, Zou Anlong, Tan Jingmei, Yi Wenyi, Wang Zhiying, Zhou Zuoyong. Mechanism of IL-1 $\alpha$  expression, maturation and secretion in macrophages infected with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(10): 3947–3956.

**摘要:**【目的】伪结核棒状杆菌(*Corynebacterium pseudotuberculosis*, Cp)感染动物常引起内脏和体表淋巴结脓肿, 以被感染部位炎性细胞因子大量增加为特征。研究 Cp 感染小鼠巨噬细胞对 IL-1 $\alpha$  成熟分泌的影响及机制。【方法】采用荧光定量 PCR、ELISA 和 Western blotting 等方法, 首先检测 Cp(ATCC19410、XH02)及其磷脂酶 D 基因(*pld*)缺失株(ATCC19410 $\Delta$ *pld*、XH02 $\Delta$ *pld*)感染巨噬细胞对 IL-1 $\alpha$  表达及成熟分泌的影响, 进而以 Ca<sup>2+</sup>螯合剂(EDTA、EGTA+Mg<sup>2+</sup>和 BAPTA-AM)、calpain 抑制剂(calpain inhibitor III、calpain inhibitor IV 和 EST)处理巨噬细胞, 观察对 Cp 感染介导 IL-1 $\alpha$  成熟分泌的影响。【结果】Cp 感染巨噬细胞后, IL-1 $\alpha$  mRNA 表达及分泌显著增加, 与 ATCC19410、XH02 感染巨噬细胞相比, ATCC19410 $\Delta$ *pld*、XH02 $\Delta$ *pld* 感染细胞 IL-1 $\alpha$  表达及分泌显著下降。Cp 感染引起巨噬细胞内 Ca<sup>2+</sup>浓度显著增加, calpain 活性增强, 而缺失 *pld* 的 Cp 感染巨噬细胞内 Ca<sup>2+</sup>浓度显著下降, calpain 活性降低。EDTA、EGTA+Mg<sup>2+</sup>、BAPTA-AM、calpain inhibitor III、calpain inhibitor IV 处理 Cp 感染的巨噬细胞, 巨噬细胞的 IL-1 $\alpha$  表达及分泌显著下降。【结论】

**基金项目:** 重庆市自然科学基金(cstc2021jcyj-msxmX0884); 中央高校基本科研业务费专项基金(XDJK2020B016); 重庆市技术创新与应用示范项目(cstc2018jsx-msybX0216)

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2021jcyj-msxmX0884), by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (XDJK2020B016) and by the Chongqing Technology Innovation and Application Demonstration Project (cstc2018jsx-msybX0216)

<sup>#</sup>These authors contributed equally to the work.

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-23-46751547; E-mail: zzyxny@163.com

Received: 22 February 2022; Revised: 14 April 2022; Published online: 27 May 2022

Cp 感染可激活巨噬细胞 IL-1 $\alpha$  表达和成熟分泌, 磷脂酶 D 参与 Cp 感染巨噬细胞介导的 IL-1 $\alpha$  成熟分泌。Cp 感染巨噬细胞介导 IL-1 $\alpha$  成熟与分泌与胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度增加、激活钙蛋白酶有关。

**关键词:** 伪结核棒状杆菌; 巨噬细胞; IL-1 $\alpha$ ; 磷脂酶 D; 钙蛋白酶

## Mechanism of IL-1 $\alpha$ expression, maturation and secretion in macrophages infected with *Corynebacterium pseudotuberculosis*

WANG Xiaohan<sup>1#</sup>, TIAN Shangquan<sup>1#</sup>, ZOU Anlong<sup>1</sup>, TAN Jingmei<sup>1</sup>, YI Wenyi<sup>1</sup>, WANG Zhiying<sup>1,2,3</sup>, ZHOU Zuoyong<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> College of Veterinary Medicine, Southwest University, Chongqing 402460, China

<sup>2</sup> Veterinary Science Engineering Research Center of Chongqing, Chongqing 402460, China

<sup>3</sup> Immunology Research Center, Medical Research Institute, Southwest University, Chongqing 402460, China

**Abstract:** [Objective] *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Cp) infection of animals often causes visceral and superficial lymph node abscesses, which is characterized by a large increase in inflammatory cytokines at the infected site. This study aimed to investigate the effect of *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Cp) infection on IL-1 $\alpha$  maturation and secretion in macrophages and the underlying mechanism. [Methods] The IL-1 $\alpha$  expression, maturation and secretion in macrophages infected with Cp (ATCC19410, XH02) and phospholipase D gene (*pld*) deficient strains (ATCC19410 $\Delta$ *pld*, XH02 $\Delta$ *pld*) were evaluated by real-time quantitative PCR, ELISA and Western blotting. Further, the effects of Ca<sup>2+</sup> chelates (EDTA, EGTA+Mg<sup>2+</sup> and BAPTA-AM) and calpain inhibitors (calpain inhibitor III, calpain inhibitor IV and EST) on IL-1 $\alpha$  maturation and secretion in macrophages infected with Cp were tested. [Results] Cp infection induced increasing of IL-1 $\alpha$  mRNA expression and secretion in macrophages, and the IL-1 $\alpha$  mRNA expression and secretion in ATCC19410 $\Delta$ *pld*-infected and XH02 $\Delta$ *pld*-infected macrophages were significantly decreased compared with those of ATCC19410-infected and XH02-infected macrophages. The intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration and calpain activity were elevated in macrophages after Cp infection, while they were lowered in those infected with *pld* deficient Cp. Treatment of EDTA, EGTA+Mg<sup>2+</sup>, BAPTA-AM, calpain inhibitor III and calpain inhibitor IV resulted in remarkable decrease of IL-1 $\alpha$  expression and secretion in Cp infected macrophages. [Conclusion] Cp infection induced the IL-1 $\alpha$  expression, maturation and secretion in macrophages, and phospholipase D was involved in this process. The IL-1 $\alpha$  maturation and secretion in macrophages mediated by Cp were related to the increase of intracellular Ca<sup>2+</sup> and the activation of calpain.

**Keywords:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*; macrophages; IL-1 $\alpha$ ; phospholipase D; calpain

伪结核棒状杆菌 (*Corynebacterium pseudotuberculosis*, Cp) 是一种重要的兼性胞内寄生菌, 可感染牛、羊、马和骆驼等多种动物和人, 以浅表淋巴结和内脏器官形成脓肿和肉

芽肿为主要特征。在兽医临床上, Cp 以感染山羊和绵羊等小反刍动物最为常见, 给该领域造成了巨大的经济损失。Cp 感染主要引起炎症综合反应, 以被感染部位炎性细胞因子大量增加为特征<sup>[1]</sup>。白介素 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) 是一种引发和促进炎症反应的主要警报因子<sup>[2]</sup>。IL-1 $\alpha$  缺少分泌蛋白信号肽, 在胞内以 31 kDa 的前体(pro-IL-1 $\alpha$ ) 形式存在, 当受到钙蛋白酶(calpain)、颗粒酶 B (granzyme B) 等蛋白酶的切割后, 则形成成熟形式的 IL-1 $\alpha$  (17 kDa) 分泌到胞外, 表现出包括致炎作用等更强的生物学活性<sup>[2-3]</sup>。本文旨在探讨 Cp 感染巨噬细胞对 IL-1 $\alpha$  成熟分泌的影响及其机理, 为理解该病原的致病机制及防控研究提供资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验小鼠及主要试剂

C57BL/6 小鼠购自重庆市中药研究院, 所有小鼠均为 8-10 周龄; 蛋白预染 Marker、RIPA 裂解液, IL-1 $\alpha$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-6 ELISA 检测试剂盒购自 Thermo Fisher Scientific 公司; IL-1 $\alpha$  抗体购自 R&D Systems 公司;  $\alpha$ -fodrin 单克隆抗体购自 Abcam 公司;  $\beta$ -actin 抗体购自 Proteintech 公司; HRP 标记山羊抗鼠 IgG 和 HRP 标记兔抗山羊 IgG 购自三鹰生物技术有限公司; 特超敏 ECL 化学发光试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5 $\times$ )、EDTA、EGTA 均购自上海碧云天生物技术有限公司; 胎牛血清和 RPMI 1640 购自 BI (Biological Industries) 公司; Opti-MEM 培养基购自 Gibco 公司。RNAiso Plus, PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent kit 和 TB Green Premix Ex Taq I 购自 TaKaRa 公司; 巯基乙酸盐购自 Eiken 公司; Gentamicin 购自北京索莱宝科技有限公司。A23187、BAPTA-AM 购自 Sigma-Aldrich 公司;

Calpain inhibitor IV、Calpain inhibitor III、EST (E-64d 蛋白酶抑制剂) 购自 Calbio chem 公司; Fluo-4 NW Calcium Kit (F36206) 购自 Invitrogen 公司。

### 1.2 试验菌株及培养

伪结核棒状杆菌 ATCC19410 购自广东微生物菌种保藏中心, XH02 株由实验室前期分离保存, Cp 磷脂酶 D 基因缺失株(ATCC19410 $\Delta$ p $ld$ 、XH02 $\Delta$ p $ld$ ) 由实验室前期构建保存。将 Cp 在鲜血琼脂平板划线培养, 挑取单个菌落在含 10% 胎牛血清的 LB 肉汤中培养 24 h, 以细菌浊度仪测定并调整细菌浓度备用。

### 1.3 小鼠腹腔巨噬细胞提取及细菌感染

参考文献[4]报道方法, 对小鼠注射 4% 的无菌巯基乙酸盐肉汤, 4 d 后以乙醚麻醉小鼠, 用 RPMI 1640 培养液收集腹腔巨噬细胞, 计数后接种于细胞板(12 孔板,  $1 \times 10^6$  细胞/孔, 用于 Western blotting 和 qRT-PCR; 48 孔板,  $2.5 \times 10^5$  个细胞/孔, 用于酶联免疫吸附测定), 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养 2 h。洗去未贴壁细胞, 以感染复数(multiplicity of infection, MOI) 为 10 的 Cp 感染细胞, 1 h 后加入含庆大霉素(终浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 或同时含有庆大霉素(终浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 和 calpains 抑制剂 (30  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )/ $\text{Ca}^{2+}$  螯合剂(10  $\text{mmol}/\text{L}$ ) 的培养液, 继续培养 3 h (qRT-PCR) 或 23 h (ELISA 和 Western blotting), 收集细胞培养上清或细胞样本检测。

### 1.4 qRT-PCR 检测细胞因子 mRNA 表达

按照说明书, 提取巨噬细胞总 RNA, 反转录为 cDNA。通过 qRT-PCR 检测 IL-1 $\alpha$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  mRNA 表达水平。qRT-PCR 引物为: IL-1 $\alpha$  (SF: GCACCTTACACCTACCAGAGT; SR: AAAGTTCTGCCTGACGAGCTT)、IL-6 (SF: TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC; SR: GTGTAAT TAAGCCTCCGACTTG)、TNF- $\alpha$

(SF: CTCCAG CTGGAAGACTCCTCCCAG; SR: CCCGACTA CGTGCTCCTCACC)和  $\beta$ -actin (SF: CTAAGGC CAACCGTGAAAAG; SR: ACCAGAGGCATAC AGGGACA)。以  $\beta$ -actin 为内参基因, 以  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法分析目的基因表达水平。

### 1.5 ELISA 检测细胞因子分泌

按照 IL-1 $\alpha$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-6 ELISA 检测试剂盒说明书, 分别检测细胞培养上清液中相应细胞因子水平。

### 1.6 Western blotting 检测目的蛋白

以 RIPA 裂解液裂解巨噬细胞, 用 TCA 浓缩法浓缩上清。对处理后的细胞裂解物和细胞培养上清进行 SDS-PAGE, 将蛋白通过电转方法转移至 PVDF 膜上并进行封闭。加入一抗 (IL-1 $\alpha$  抗体或  $\alpha$ -fodrin 单克隆抗体, 均为 1:1 000 稀释), 4 °C 冰箱孵育过夜。洗涤后, 以二抗 (HRP 标记山羊抗鼠 IgG 或 HRP 标记山羊抗兔 IgG, 1:5 000 稀释) 室温孵育 1 h, ECL 染色曝光照相。

### 1.7 胞内钙离子浓度测定

将巨噬细胞接种于 96 孔板 ( $1.25 \times 10^5$  个细胞/孔), 分别以 XH02、XH02 $\Delta pld$  按 MOI=10 感染细胞。按照 Fluo-4 NW calcium kit 检测试剂盒说明书, 每隔 4 h 测定胞内钙离子浓度。

### 1.8 数据分析

试验结果用平均数 $\pm$ 标准误 ( $\bar{x} \pm SE$ ) 表示。采用 GraphPad Prism 8.0.1 作图, 并以双尾非配对  $t$  检验进行统计分析。\* $P < 0.05$ , 表示差异显著; \*\* $P < 0.01$ 、\*\*\* $P < 0.001$ , 表示差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 磷脂酶 D 参与伪结核棒状杆菌感染诱导巨噬细胞 IL-1 $\alpha$ 的表达、成熟及分泌

为明确 Cp 感染巨噬细胞是否引起 IL-1 $\alpha$  表达和分泌, 以及磷脂酶 D (phospholipase D, PLD) 在该过程中的作用, 本文检测了 Cp 野生株和

*pld* 缺失株感染巨噬细胞 IL-1 $\alpha$  的表达和分泌情况。结果显示, Cp 感染巨噬细胞后 IL-1 $\alpha$  表达和分泌极显著增加 (图 1A, 1D)。与 ATCC19410 和 XH02 感染小鼠腹腔巨噬细胞相比, ATCC19410 $\Delta pld$  和 XH02 $\Delta pld$  感染的巨噬细胞 IL-1 $\alpha$  的 mRNA 表达水平显著下降 (图 1A); ELISA 结果也证实 ATCC19410 $\Delta pld$ 、XH02 $\Delta pld$  感染巨噬细胞 IL-1 $\alpha$  的分泌水平极显著低于 ATCC19410 和 XH02 感染巨噬细胞 (图 1D)。Western blotting 检测发现 ATCC19410 $\Delta pld$ 、XH02- $\Delta pld$  感染巨噬细胞上清中 IL-1 $\alpha$  成熟体含量分别较 ATCC19410、XH02 感染细胞明显下降, 而在 Cp 野生株或 *pld* 缺失株的巨噬细胞中 pro-IL-1 $\alpha$  蛋白的含量没有显著差异 (图 1G)。除 XH02- $\Delta pld$  感染巨噬细胞 TNF- $\alpha$  分泌下降较 XH02 感染细胞相比未达到显著水平外, ATCC19410 $\Delta pld$ 、XH02- $\Delta pld$  感染巨噬细胞 TNF- $\alpha$  和 IL-6 mRNA 的表达和分泌水平均极显著低于 ATCC19410 和 XH02 感染细胞 (图 1B–1C, 1E–1F)。

### 2.2 钙离子 (Ca<sup>2+</sup>) 浓度升高促进伪结核棒状杆菌感染巨噬细胞 IL-1 $\alpha$ 的分泌

为评估 *pld* 缺失对 Cp 感染巨噬细胞内 Ca<sup>2+</sup> 水平的影响, 我们检测了 XH02 和 XH02- $\Delta pld$  感染巨噬细胞的胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度。结果显示, 在 Cp 感染 4–20 h 内, 细胞内 Ca<sup>2+</sup> 逐渐上升。在 8–24 h 内, 与 XH02 感染细胞相比, XH02 $\Delta pld$  感染细胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度极显著下降 (图 2A)。此外我们检测了 Ca<sup>2+</sup> 在 Cp 感染巨噬细胞引起 IL-1 $\alpha$  分泌过程中的作用。结果发现, 加入 Ca<sup>2+</sup> 螯合剂 EDTA 和 EGTA+Mg<sup>2+</sup> 后, 被感染细胞 IL-1 $\alpha$  分泌水平极显著降低, 而 TNF- $\alpha$  分泌水平无显著变化 (图 2B–2C)。同样地, 加入 Ca<sup>2+</sup> 或 Ca<sup>2+</sup> 载体 A23187 后 Cp 感染巨噬细胞 IL-1 $\alpha$  与 TNF- $\alpha$  分泌水平均极显著增加 (图 2D–2G)。

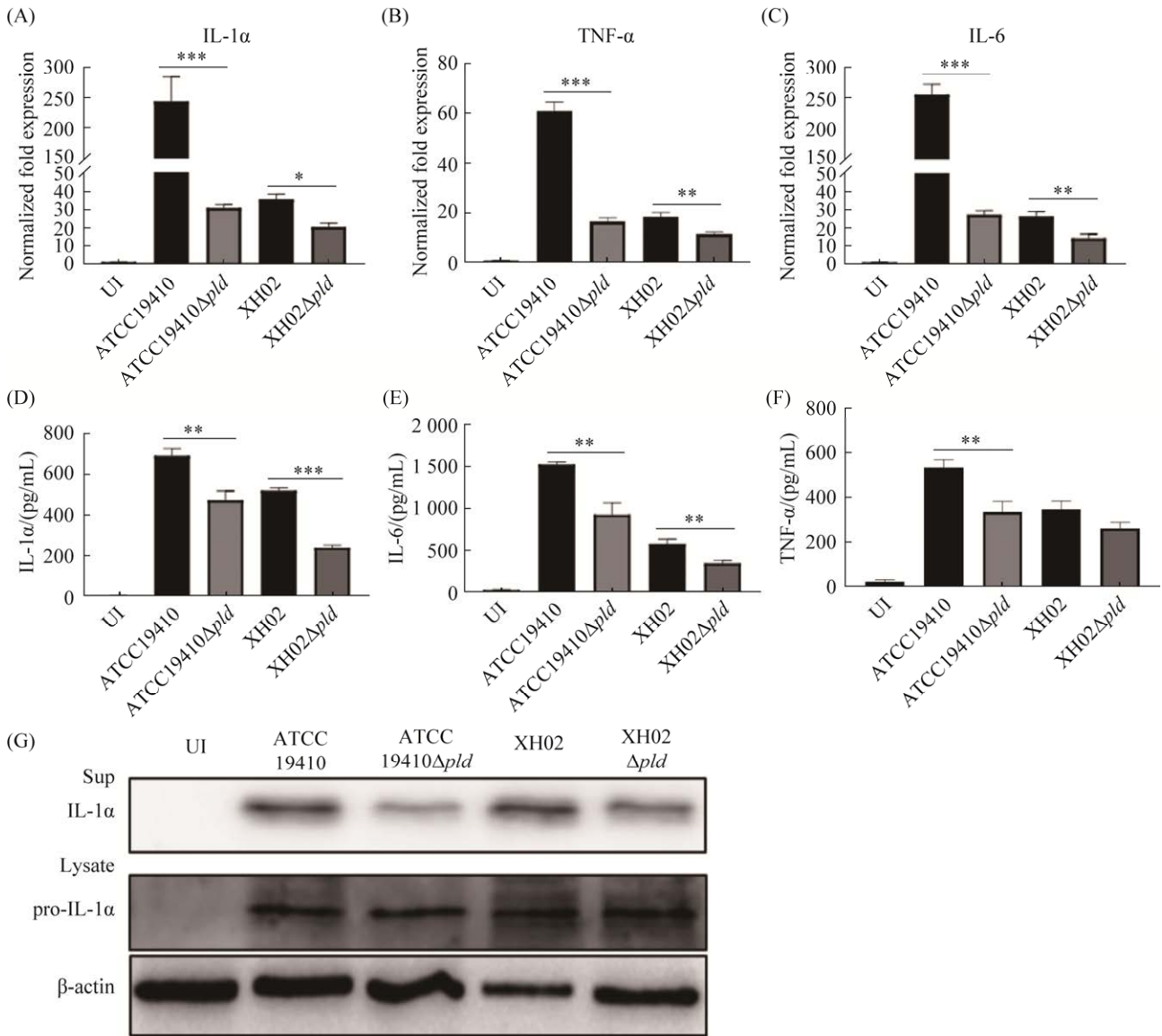


图 1 磷脂酶 D 基因(*pld*)缺失对伪结核棒状杆菌感染巨噬细胞 IL-1α 表达、成熟分泌的影响

Figure 1 The effect of *pld* mutant on IL-1α expression, maturation and secretion in macrophages induced by Cp infection. A–C: *pld* mutant of Cp decreases the expression of IL-1α, TNF-α and IL-6 mRNA in the infected macrophages; D–F: *pld* mutant of Cp decreases the secretion of IL-1α, IL-6 and TNF-α in the infected macrophages; G: *pld* mutant of Cp decreases IL-1α expression in the infected macrophages. UI: uninfected. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

### 2.3 Calpain 激活参与伪结核棒状杆菌感染巨噬细胞 IL-1α 的成熟及分泌

为评估 Cp 感染对巨噬细胞钙蛋白酶 (calpain) 的激活情况, 以及 *pld* 缺失对 Cp 激活 calpain 的影响, 我们检测了 Cp 及 *pld* 缺失株感染巨噬细胞对 α 胞衬蛋白(α-fodrin)的切割情

况。α 胞衬蛋白为 calpain 的底物, 是一个 240 kDa 的细胞骨架蛋白, 其裂解片段(145 kDa)含量可指示 calpain 的激活水平<sup>[5-6]</sup>。结果显示, 未受 Cp 感染细胞培养上清中没有检测到 α-fodrin 裂解片段, 而 ATCC19410、XH02 感染细胞培养上清中可检测到大量的 α-fodrin 裂解片段(图 3A)。与

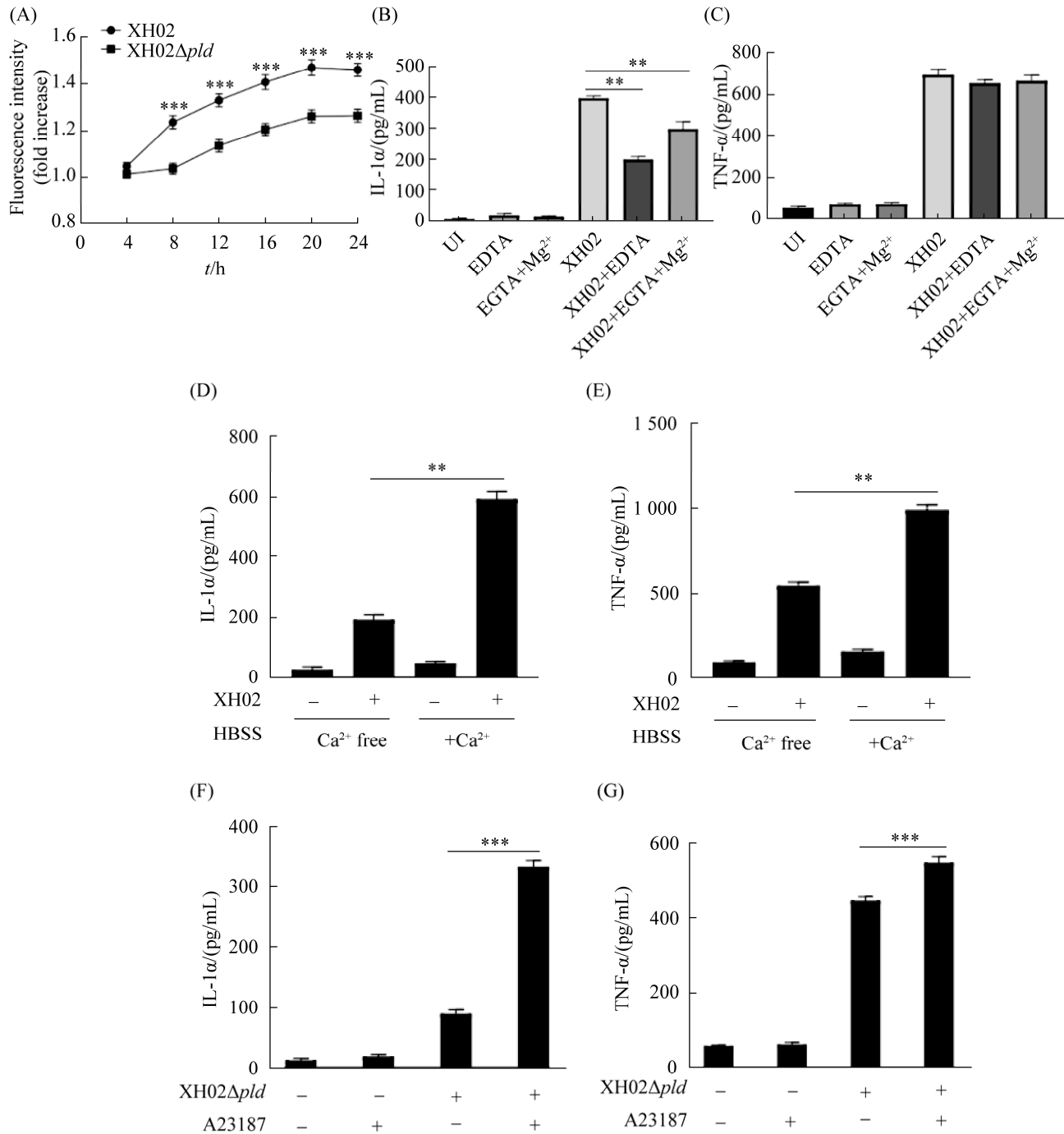


图 2 钙离子( $\text{Ca}^{2+}$ )浓度升高促进伪结核棒状杆菌感染巨噬细胞诱导的 IL-1 $\alpha$  分泌

Figure 2 Elevate of intracellular calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) promotes IL-1 $\alpha$  secretion in Cp infected macrophages. A: *pld* mutant of Cp decreases the increasing of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ ; B-C: EDTA and EGTA+Mg $^{2+}$  decrease IL-1 $\alpha$  secretion in Cp infected macrophages, while have no significant effect on TNF- $\alpha$  secretion; D-G: presence of  $\text{Ca}^{2+}$  and A23187 elevate IL-1 $\alpha$  and TNF- $\alpha$  secretion in Cp infected macrophages. UI: uninfected. \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

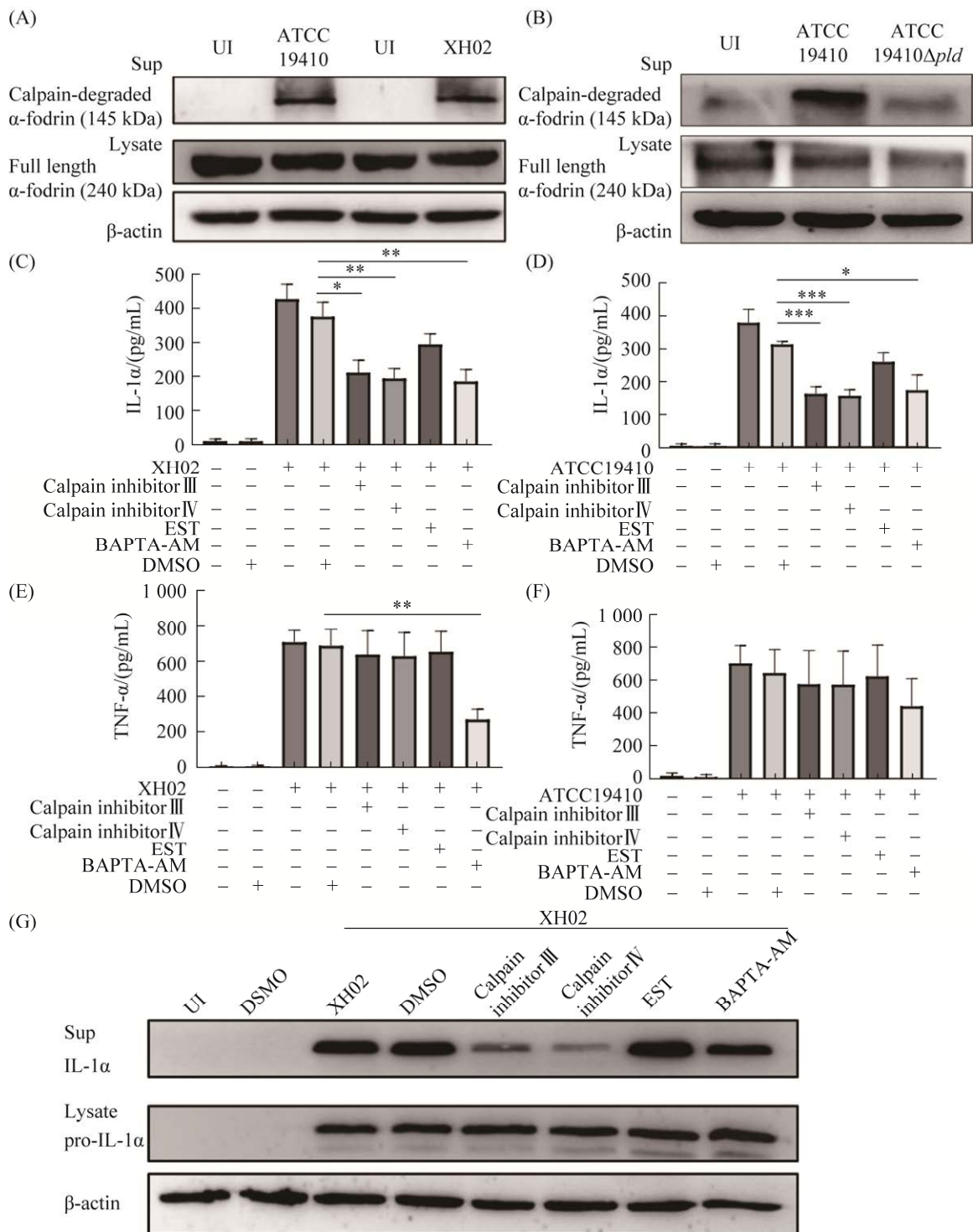


图 3 钙蛋白酶激活参与伪结核棒状杆菌感染巨噬细胞诱导 IL-1α 成熟分泌

Figure 3 Calpain activation involved in IL-1α maturation and secretion in macrophages induced by Cp infection. A: Cp infection promotes the cleavage of full length α-fodrin; B: *pld* mutant decreases the cleavage of full length α-fodrin; C–D: calpain inhibitor III, calpain inhibitor IV and BAPTA-AM treatment decrease IL-1α secretion in Cp infected macrophages; E–F: calpain inhibitor III and calpain inhibitor IV have no significant effect on TNF-α secretion in Cp infected macrophages; G: calpain inhibitor III and calpain inhibitor IV significant decrease IL-1α maturation and secretion in Cp infected macrophages. UI: uninfected. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

ATCC19410 感染细胞相比, ATCC19410 $\Delta$ *pld* 感染巨噬细胞上清中  $\alpha$ -fodrin 裂解片段(145 kDa) 水平明显减少(图 3B)。同时发现, 在 ATCC19410、XH02 感染细胞中加入 calpain 抑制剂 calpain inhibitor III、calpain inhibitor IV 及  $\text{Ca}^{2+}$  螯合剂 BAPTA-AM 后, IL-1 $\alpha$  的分泌水平显著降低(图 3C–3D)。除了 BAPTA-AM 作用细胞受到 XH02 感染后 TNF- $\alpha$  分泌显著降低外, 其他 calpain 抑制剂处理对 Cp 感染巨噬细胞分泌 TNF- $\alpha$  无显著性影响(图 3E–3F)。Western blotting 检测同样显示, calpain inhibitor III, calpain inhibitor IV 和 BAPTA-AM 处理 Cp 感染细胞培养上清 IL-1 $\alpha$  成熟体含量下降, 而对细胞裂解物中 pro-IL-1 $\alpha$  表达无明显影响(图 3G)。

### 3 讨论

Cp 感染主要引起炎性的脓肿或干酪样淋巴结炎, 以被感染部位炎性细胞因子大量增加为特征<sup>[1]</sup>, 本研究发现 Cp 感染可诱导巨噬细胞分泌促炎细胞因子 IL-1 $\alpha$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$ , 而缺失 *pld* 的 Cp 感染巨噬细胞后上述细胞因子分泌极显著降低(除 XH02 $\Delta$ *pld* 感染巨噬细胞的 TNF- $\alpha$  分泌下降较 XH02 感染细胞相比未达到显著水平), 且缺失了 *pld* 的 Cp 感染巨噬细胞后, IL-1 $\alpha$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的 mRNA 水平也显著低于 Cp 同源野生菌。表明 PLD 在 Cp 感染巨噬细胞介导上述细胞因子分泌致炎中起重要作用。然而, 尽管 *pld* 缺失会降低 Cp 感染巨噬细胞 IL-1 $\alpha$  的 mRNA 水平, 但在蛋白表达水平上, Cp 野生株或 *pld* 缺失株感染巨噬细胞的 pro-IL-1 $\alpha$  表达水平无显著变化。基因表达是一个复杂的过程, 在许多水平上受到调控, 其表达的蛋白水平取决于转录速率、mRNA 半衰期、翻译速率常数和蛋白质半衰期这 4 个因素, 且从 mRNA 翻译成蛋白质的过程中在起始、延伸

和定位上均受到广泛调控, 此外, 蛋白质降解也受到泛素-蛋白酶体系统和自噬等作用<sup>[7]</sup>, 因此, mRNA 水平不一定与蛋白表达水平完全一致。本研究中 *pld* 缺失 Cp 感染巨噬细胞影响 IL-1 $\alpha$  的 mRNA 表达水平, 但没有影响其前体蛋白 pro-IL-1 $\alpha$  水平的具体原因有待进一步研究。

IL-1 $\alpha$  是一种引发和促进炎症反应的主要警报因子<sup>[2]</sup>, 为进一步分析 Cp 感染巨噬细胞介导 IL-1 $\alpha$  成熟和分泌的机理, 本文评价了  $\text{Ca}^{2+}$  水平及钙蛋白酶(calpain)在该病原感染巨噬细胞介导 IL-1 $\alpha$  成熟分泌中的作用。 $\text{Ca}^{2+}$  是一种通用的信号离子, 该离子调控包括从细胞分裂到凋亡以及发病机理等多种细胞过程<sup>[8]</sup>。静息状态下, 细胞内的  $\text{Ca}^{2+}$  主要贮存在内质网中, 细胞质中游离的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度远低于细胞外, 当细胞被激活时, 细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度会迅速升高<sup>[9]</sup>; 已有研究表明, 受肺炎链球菌、单增李斯特菌以及结核分枝杆菌感染细胞的胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度和/或 IL-1 $\alpha$  分泌水平显著升高<sup>[5,10-13]</sup>。本研究也得出相似的结果, 即 Cp 感染导致巨噬细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  显著增加和 IL-1 $\alpha$  分泌显著升高。此外, 加入胞外  $\text{Ca}^{2+}$  螯合剂 EDTA 和 EGTA+ $\text{Mg}^{2+}$ , 或胞内  $\text{Ca}^{2+}$  螯合剂 BAPTA-AM 会显著抑制 Cp 感染巨噬细胞 IL-1 $\alpha$  的成熟和分泌, 而加入  $\text{Ca}^{2+}$  载体 A23187 或有  $\text{Ca}^{2+}$  存在均可促进 Cp 感染诱导巨噬细胞 IL-1 $\alpha$  的分泌。有趣的是, 加入  $\text{Ca}^{2+}$  或  $\text{Ca}^{2+}$  载体 A23187 后 Cp 感染诱导巨噬细胞 TNF- $\alpha$  分泌水平显著增加, 但是加入胞外  $\text{Ca}^{2+}$  螯合剂 EDTA 和 EGTA+ $\text{Mg}^{2+}$  却对被感染细胞的 TNF- $\alpha$  分泌无显著影响, 其结果与 Fang 等报道 EDTA 和 EGTA+ $\text{Mg}^{2+}$  不影响肺炎链球菌感染小鼠巨噬细胞 TNF- $\alpha$  分泌水平相似<sup>[5]</sup>。由于 TNF- $\alpha$  存在 2 种形式, 即分泌型 TNF- $\alpha$  (secretory TNF- $\alpha$ , S-TNF- $\alpha$ ) 和跨膜型 TNF- $\alpha$  (transmembrane



TNF- $\alpha$ , TM-TNF- $\alpha$ )<sup>[14]</sup>, 而本研究中检测的是 S-TNF- $\alpha$ 。据报道, S-TNF- $\alpha$  和 TM-TNF- $\alpha$  在发挥细胞毒性效应时, 可引起靶细胞内钙离子的重分布, 导致靶细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的升高, 认为 S-TNF- $\alpha$  可能促使细胞膜钙通道开放, 进而引起细胞外  $\text{Ca}^{2+}$  内流<sup>[15]</sup>。本研究中 EDTA 和 EGTA+ $\text{Mg}^{2+}$  螯合胞外  $\text{Ca}^{2+}$  对 Cp 感染引发 TNF- $\alpha$  分泌无显著影响, 其原因可能是螯合剂对胞外  $\text{Ca}^{2+}$  的螯合与 TNF- $\alpha$  促进胞外  $\text{Ca}^{2+}$  的内流达到了平衡, 因而上述螯合剂作用并未引起胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度出现过大的变化。而单独加入  $\text{Ca}^{2+}$  或  $\text{Ca}^{2+}$  载体 A23187 后 TNF- $\alpha$  分泌水平显著增加, 提示  $\text{Ca}^{2+}$  可促进 Cp 感染巨噬细胞诱发的 TNF- $\alpha$  分泌过程。这些结果表明, 细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  升高是 Cp 感染巨噬细胞介导 IL-1 $\alpha$  和 TNF- $\alpha$  分泌的重要因素。钙蛋白酶是一种钙依赖的半胱氨酸蛋白酶, 可参与多种细胞功能, 包括细胞因子的分泌<sup>[16]</sup>。许多细菌性病原体可通过过度激活或抑制先天免疫细胞的钙蛋白酶系统来逃避钙蛋白酶介导的先天免疫反应<sup>[13]</sup>。本研究发现, Cp 感染巨噬细胞可激活钙蛋白酶而抑制钙蛋白酶的活性会显著降低 Cp 感染巨噬细胞中 IL-1 $\alpha$  的分泌, 其结果与肺炎链球菌<sup>[5]</sup>、单增李斯特菌<sup>[11]</sup>和结核分枝杆菌<sup>[13]</sup>感染细胞后通过激活钙蛋白酶诱导 IL-1 $\alpha$  分泌相一致, 表明钙蛋白酶的激活是 Cp 感染巨噬细胞介导 IL-1 $\alpha$  成熟和分泌的机制之一。

在许多情况下, 细菌病原体可通过分泌毒素, 如肺炎链球菌的溶血素 PLY<sup>[5]</sup>、单增李斯特菌的溶血素 O<sup>[11]</sup>, 引起胞内  $\text{Ca}^{2+}$  水平增加、钙蛋白酶的激活, 进而介导 IL-1 $\alpha$  分泌。本研究发现, 与 Cp 野生株感染的巨噬细胞相比, Cp 的 *pld* 缺失株感染的巨噬细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  水平、钙蛋白酶的激活以及 IL-1 $\alpha$  的成熟和分泌降低或显著降低, 表明 PLD 在 Cp 感染巨噬细胞

IL-1 $\alpha$  的成熟和分泌过程中发挥关键作用。然而, 与单增李斯特菌溶血素 O 基因缺失<sup>[11]</sup>和肺炎链球菌溶血素基因缺失<sup>[5]</sup>几乎完全阻断被感染细胞的 IL-1 $\alpha$  成熟分泌有一定差异, Cp 的 *pld* 缺失株感染巨噬细胞后 IL-1 $\alpha$  成熟分泌未完全阻断, 提示除了 PLD 还有其他毒力因子或蛋白参与该病原感染介导的 IL-1 $\alpha$  成熟分泌过程。

综上所述, 本研究表明胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度增加及钙蛋白酶激活是 Cp 感染巨噬细胞介导 IL-1 $\alpha$  成熟分泌的重要途径, 而 PLD 是 Cp 感染引发该过程的重要毒力因子, 在该病原感染过程中, PLD 引起  $\text{Ca}^{2+}$  浓度增加及钙蛋白酶激活的详细机制尚待进一步研究。

## 参考文献

- [1] Pépin M, Seow HF, Corner L, Rothel JS, Hodgson AL, Wood PR. Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. *Veterinary Research*, 1997, 28(2): 149–163.
- [2] Chiu JW, Binte Hanafi Z, Chew LCY, Mei Y, Liu HY. IL-1 $\alpha$  processing, signaling and its role in cancer progression. *Cells*, 2021, 10(1): 92.
- [3] Jiang LL, Shao YJ, Tian Y, Ouyang CS, Wang XH. Nuclear alarmin cytokines in inflammation. *Journal of Immunology Research*, 2020, 2020: 7206451.
- [4] Shi JG, Wang ZY, Wu B, Li X, Li XX, Tian SQ, Wu JJ, Zhou ZY. Cofilin-1, peroxiredoxin-1, and galectin-3: major proteins released by macrophages infected with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Veterinary Microbiology*, 2019, 239: 108461.
- [5] Fang RD, Wu R, Du HH, Jin ML, Liu YJ, Lei GH, Jiang B, Lei ZH, Peng YY, Nie K, Tsuchiya K. Pneumolysin-dependent calpain activation and interleukin-1 $\alpha$  secretion in macrophages infected with *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 2017, 85(9): e00201–e00217.
- [6] Goll DE, Thompson VF, Li HQ, Wei W, Cong JY. The calpain system. *Physiological Reviews*, 2003, 83(3): 731–801.
- [7] Buccitelli C, Selbach M. mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. *Nature*

- Reviews Genetics*, 2020, 21(10): 630–644.
- [8] King MM, Kayastha BB, Franklin MJ, Patrauchan MA. Calcium Regulation of Bacterial Virulence. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Cham: Springer International Publishing, 2019: 827–855.
- [9] 卫潇茗, 王晨光, 张睿, 吕梦泽, 蒋争凡. 金属免疫学研究进展. *现代免疫学*, 2021, 41(1): 1–7.
- [10] Asmat TM, Agarwal V, R ath S, Hildebrandt JP, Hammerschmidt S. *Streptococcus pneumoniae* infection of host epithelial cells via polymeric immunoglobulin receptor transiently induces calcium release from intracellular stores. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(20): 17861–17869.
- [11] Dewamitta SR, Nomura T, Kawamura I, Hara H, Tsuchiya K, Kurenuma T, Shen YN, Daim S, Yamamoto T, Qu HX, Sakai S, Xu YT, Mitsuyama M. Listeriolysin O-dependent bacterial entry into the cytoplasm is required for calpain activation and interleukin-1 alpha secretion in macrophages infected with *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 2010, 78(5): 1884–1894.
- [12] Gekara NO, Westphal K, Ma B, Rohde M, Groebe L, Weiss S. The multiple mechanisms of  $Ca^{2+}$  signalling by listeriolysin O, the cholesterol-dependent cytolysin of *Listeria monocytogenes*. *Cellular Microbiology*, 2007, 9(8): 2008–2021.
- [13] Yang RL, Xi C, Sita DR, Sakai S, Tsuchiya K, Hara H, Shen YN, Qu HX, Fang RD, Mitsuyama M, Kawamura I. The RD1 locus in the *Mycobacterium tuberculosis* genome contributes to the maturation and secretion of IL-1 $\alpha$  from infected macrophages through the elevation of cytoplasmic calcium levels and calpain activation. *Pathogens and Disease*, 2014, 70(1): 51–60.
- [14] Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell*, 1988, 53(1): 45–53.
- [15] 石文芳, 尹丙姣, 熊平, 龚非力, 李卓娅. 两型 TNF- $\alpha$  的细胞毒效应与靶细胞内  $Ca^{2+}$  浓度变化的关系. *细胞与分子免疫学杂志*, 2004, 20(5): 537–539. Shi WF, Yin BJ, Xiong P, Gong FL, Li ZY. Relationship between cytotoxicity of two types of TNF- $\alpha$  and intracellular free calcium concentration in target cells. *Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2004, 20(5): 537–539. (in Chinese)
- [16] Kumar V, Ahmad A. Targeting calpains: a novel immunomodulatory approach for microbial infections. *European Journal of Pharmacology*, 2017, 814: 28–44.