

研究报告

## 布鲁氏菌对 RAW264.7 细胞内质网应激与细胞因子分泌的影响

尹彦龙 李杨 白芙蓉 相彩霞 雷兰杰 支飞杰 王爱华\*

(西北农林科技大学动物医学院 农业部动物生物技术重点实验室 陕西 杨凌 712100)

**摘要:**【目的】布鲁氏菌与宿主相互作用的分子机制是目前的研究热点之一,布鲁氏菌通过形成来自于内质网的布氏小体而在巨噬细胞内生存和增殖,其机制目前尚不清楚,宿主细胞内质网应激反应对病原感染和炎症的调控密切相关。揭示内质网应激反应在布鲁氏菌感染巨噬细胞中的作用以及布鲁氏菌感染对巨噬细胞分泌免疫因子的影响。【方法】构建布鲁氏菌感染 RAW264.7 模型,在感染后不同时间收集细胞,通过实时荧光定量 PCR 检测细胞内质网应激反应标志分子 GRP78 和 CHOP,以及 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 在 mRNA 水平的变化;通过 Western blot 和 ELISA 分别检测其蛋白水平的变化。【结果】布鲁氏菌感染 RAW264.7 细胞的最佳感染复数 MOI 为 100:1;证明在布鲁氏菌感染 4–6 h,巨噬细胞可杀伤侵入的布鲁氏菌,之后存活的细菌可在细胞内增殖;感染后 24 h 出现细胞凋亡,48 h 出现大量细胞坏死。布鲁氏菌感染可激活 RAW264.7 细胞的内质网应激反应,促进 GRP78 的表达,同时,抑制免疫因子的分泌。【结论】内质网应激反应参与了 RAW264.7 对布鲁氏菌感染的调节。

**关键词:** 布鲁氏菌 S2 株, RAW264.7 细胞, 内质网应激, GRP78, CHOP, 细胞因子

### Effect of *Brucella suis* S2 on endoplasmic reticulum stress and cytokines in RAW264.7 cells

YIN Yan-Long LI Yang BAI Fu-Rong XIANG Cai-Xia LEI Lan-Jie  
ZHI Fei-Jie WANG Ai-Hua\*

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Key Laboratory of Animal Biotechnology of the Ministry of Agriculture, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** [Objective] It is important to study the pathogenesis and molecular mechanism how *Brucella* interacts with host cells. Many researches focus on the regulation of endoplasmic reticulum (ER) stress on the infection and inflammation. *Brucella* species replicate within host cells in the form of ER-derived vacuoles. The mechanisms by which the bacteria are sequestered into such vacuoles

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31672584); The Sci-tech Innovation Project of Shaanxi Province (No. 2016TZC-N-13-5)

\*Corresponding author: E-mail: aihuawang1966@163.com

**Received:** June 12, 2017; **Accepted:** October 27, 2017; **Published online** (www.cnki.net): October 27, 2017

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(No. 31672584); 陕西省科技统筹创新工程计划项目(No. 2016TZC-N-13-5)

\*通讯作者: E-mail: aihuawang1966@163.com

**收稿日期:** 2017-06-12; **接受日期:** 2017-10-27; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-10-27

and obtain a continuous membrane supply for their replication remain unclear. To reveal the effect of *B. suis* S2 on ER stress and the excretion of cytokines in RAW264.7 cells. **[Methods]** We built an infection model of *B. suis* S2 using RAW264.7 cells, and detected the expression of GRP78 and CHOP, the makers of endoplasmic reticulum (ER) stress, through real time quantitative PCR (qPCR) and Western blot. We measured cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 via qPCR and ELISA at different intervals after infection. **[Results]** The optimal MOI used in the infection model was 100:1. Most *B. suis* S2 were killed during the first 4 to 6 h after they invaded into RAW264.7 cells, then the survived bacteria could reproductive, inducing the apoptosis at 24 h, and necrosis at 48 h. The invasion and reproduction of *B. suis* S2 increased the expression of GRP78 significantly, causing ER stress of RAW264.7 cells, and decreased the expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6. **[Conclusion]** ER stress was involved in the control of *B. suis* S2 infection in RAW264.7 cells.

**Keywords:** *B. suis* S2, RAW264.7 cells, ER stress, GRP78, CHOP, Cytokine

布鲁氏菌(*Brucella*)等胞内感染菌引起的人兽共患病,至今依然是世界范围内对人类健康和动物健康养殖威胁最为严重的疾病,极大地影响动物产品的对外贸易。充分了解布鲁氏菌的病原特点和致病机理的分子机制是探寻布鲁氏菌病防控靶点和新技术的关键之一<sup>[1]</sup>。内质网是细胞内各种蛋白质合成、运输和分泌的主要场所,对于维持细胞稳态具有重要作用。内质网的相关功能在机体抵抗胞内感染中具有重要作用,同时,内质网又是多种胞内感染菌逃避宿主免疫杀伤的理想靶位点<sup>[2]</sup>。研究证实,内质网应激激发的非折叠蛋白反应参与了多种病原感染的调控<sup>[3-4]</sup>。布鲁氏菌在宿主细胞内的感染、转移和增殖过程中同样与内质网有着紧密的联系。布鲁氏菌感染宿主细胞后能够表现出明显的免疫逃避和宿主细胞凋亡抑制的作用,并且这种作用不限于被侵染的细胞<sup>[5]</sup>。为验证布鲁氏菌是否通过激活宿主细胞内质网应激反应,调节其功能,进而维持其自身的存活和增殖,本试验利用 RAW264.7 细胞建立体外感染模型,检测内质网应激反应的标志性因子 GRP78 和 CHOP 的表达及细胞上清液中免疫因子的变化,为深入研究宿主细胞与布鲁氏菌感染互作关系提供试验数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 培养基:**DMEM 培养基购自 Invitrogen 公司;胎牛血清(FBS)购自 Hyclone 公司,大豆胰蛋白胨琼脂(TSA)、胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)液体培养基等均

参照《畜牧微生物学实验指导》<sup>[6]</sup>配制。

**1.1.2 菌株与细胞系:**猪布鲁氏菌 S2 活疫苗株(新疆天康畜牧生物技术公司):用无菌生理盐水溶解,在大豆胰蛋白胨琼脂(TSA)平板上划线接种,37 °C 培养 48 h。挑取生长良好的菌落,做革兰氏染色鉴定,然后转入胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)液体培养基中,37 °C 培养 72 h。倾注平皿法进行细菌菌落计数,4 °C 保存,待用。小鼠 RAW264.7 巨噬细胞系:由农业部动物生物技术重点实验室保存。取出冻存的 RAW264.7 细胞并进行复苏,用含有 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养液于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,当细胞铺满培养皿的 70%–80% 时进行传代培养,培养 2 代之后用于后续试验。

**1.1.3 引物:**引物设计使用 Primer Premier 5.0 软件。引物于生工生物工程(上海)股份有限公司合成。本研究中所用的引物及其序列见表 1。

**1.1.4 工具酶和主要生化试剂:**SYBR<sup>®</sup> Premix ExTaq<sup>™</sup> II 试剂盒、cDNA 合成试剂盒、ELISA 检测试剂盒、TRIZOL 等购自大连 TaKaRa 公司;全蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白测定试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司;HRP 化学发光试剂盒购自北京原业伯乐生物发展科技有限公司;HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体等购自中杉金桥生物技术有限公司;GRP78 和 CHOP 抗体购自 SANTA 公司;0.25% 胰蛋白酶购自 Hyclone 公司;限制性内切酶和抗生素等购自生工生物工程(上海)股份有限公司;其他试剂为国产分析纯。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列  
Table 1 The sequences for the specific primers used in real time PCR

靶基因 Target gene	GenBank 序列号 Accession number	引物序列 Primer sequence (5'→3')	产物大小 Product size (bp)
GAPDH	XM-011241212	AF: GGTGTCTCCTGCGACTTCAACAGC AR: CGAGTTGGGATAGGGCCTCTTTGC	230
GRP78	NM-001163434.1	AF: AGAAACTCCGGCGTGAGGTAGA AR: TTCCTGGACAGGCTTCATGGTAG	176
CHOP	NM-007837.3	AF: CTCGCTCTCCAGATTCCAGTC AR: CTTCATGCGTTGCTTCCCA	134
IL-1 $\beta$	NM_008361	AF: GAAATGCCACCTTTTGACAGTG AR: TGGATGCTCTCATCAGGACAG	116
IL-6	NM_031168	AF: CTGCAAGAGACTTCCATCCAG AR: AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG	131
TNF- $\alpha$	NM_031693	AF: CAGCGGTGCCTATGTCTC AR: CGATCACCCGAAGTTCAGTAG	89

## 1.2 布鲁氏菌感染复数(MOI)的筛选

取 RAW264.7 细胞,按每孔  $1.0 \times 10^6$  个接种于 6 孔板中,加入含有 10%胎牛血清的 DMEM 2 mL,培养 12 h;将布鲁氏菌分别以感染复数(MOI)为 5:1、10:1、50:1、100:1 感染细胞,分别在感染后 0、6、12、24 和 48 h 收集细胞,参照细胞凋亡与坏死检测试剂盒(Apoptosis and Necrosis Assay Kit)检测细胞的凋亡与细胞坏死情况,选择适宜的 MOI。

## 1.3 RAW264.7 细胞内布鲁氏菌的检测

取 RAW264.7 细胞按照  $1.0 \times 10^6$ /孔接种于 6 孔板中,并加入含 10%胎牛血清的 DMEM 2 mL,培养 12 h,按照 MOI 为 100:1 感染 RAW264.7 细胞,作用 4 h 后弃上清,用预热的 PBS 清洗 2-3 次,加入含有 1%庆大霉素的 DMEM 作用 1 h, PBS 清洗 2-3 次,加入 DMEM 并以此时为 0 h,在 0、6、12、24 和 48 h 用胰酶消化,收集细胞,用含 0.25% TrizolX-100 裂解细胞,梯度稀释,涂板(TSA),每组实验重复 3 次,计算布鲁菌的 CFU。

## 1.4 荧光定量 PCR 检测

**1.4.1 RNA 提取:** 布鲁氏菌 S2 株感染巨噬细胞 RAW264.7,在 MOI 为 100:1 时,分别在 0、6、12、24 和 48 h 时收集细胞,提取 RNA,参照 TaKaRa RNAiso Reagent 试剂盒说明书提取细胞中的 RNA。取 2  $\mu$ L 样品进行 RNA 浓度和纯度测定,并确定总

RNA 的质量。

**1.4.2 cDNA 的合成:** 以提取的 RNA 为模板,采用 TaKaRa cDNA Synthesis Kit 试剂盒进行 cDNA 的合成,反应体系如下: 5 $\times$ Prime Script Buffer 4.0  $\mu$ L, Prime Script RT Enzyme Mix 1.0  $\mu$ L, 总 RNA 样品 1.0  $\mu$ L, Oligo dT Primer (50  $\mu$ mol/L) 1.0  $\mu$ L, Random 6 mers 1.0  $\mu$ L, 无 RNAase 的双蒸去离子水 12.0  $\mu$ L。反应程序为: 37  $^{\circ}$ C 30 min, 85  $^{\circ}$ C 5 s, 13  $^{\circ}$ C 50 min, 反应结束后将反转录产物于 -20  $^{\circ}$ C 保存或 -80  $^{\circ}$ C 长期保持。

**1.4.3 荧光定量 PCR 反应:** 根据 TaKaRa SYBR<sup>®</sup> Premix ExTaq<sup>™</sup> II Kit 说明书,配制 20  $\mu$ L 荧光定量 PCR 反应体系: SYBR Premix ExTaq<sup>™</sup> II 10.0  $\mu$ L, PCR forward primer 0.8  $\mu$ L, PCR reverse primer 0.8  $\mu$ L, DNA 模板 2.0  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 6.4  $\mu$ L。混合均匀后,上机反应,其程序为: 95  $^{\circ}$ C 30 s; 95  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环。

## 1.5 Western blot 检测

布鲁氏菌 S2 株以 100:1 的感染复数感染 RAW264.7 细胞,分别在感染的 0、6、12、24 和 48 h 收集细胞。按照凯基全蛋白提取试剂盒说明书提取总蛋白。按照凯基 BCA 蛋白含量检测试剂盒进行浓度的测定,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜后,常规进行 Western blot 检测。

## 1.6 ELISA 检测布鲁氏菌 S2 株感染 RAW264.7 细胞后相关免疫因子的表达变化

在上述试验中, 收集感染后 0 h 和 24 h 细胞上清液, 按照 ELISA 试剂盒操作说明测定 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6。

## 1.7 数据统计分析

结果采用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法分析。所有数据采用平均数 $\pm$ 标准差进行表示, 用 SPSS 17.0 统计学软件进行数据的差异显著性分析( $P < 0.05$  差异显著,  $P < 0.01$  差异极显著)。

## 2 结果与分析

### 2.1 布鲁氏菌胞内 CFU 计数

布鲁氏菌 S2 株感染巨噬细胞 RAW264.7 后, 其细胞内的增殖情况见图 1。在感染的 4 h 内布鲁氏菌侵入细胞, 但在侵入的前 6 h 其数量逐步下降, 之后又随时间增加而增加, 提示布鲁氏菌在巨噬细胞内存活并增殖, CFU 数量逐渐增多, 并呈指数增长。

### 2.2 布鲁氏菌感染复数(MOI)的选择

布鲁氏菌感染 RAW264.7 细胞的 MOI 分别为 5:1、10:1、50:1、100:1 时, 培养 24 h 进行 Hoechst33342/PI 染色, 检测结果见图 2。从图 2 中可以看到蓝色荧光亮点逐渐增多, 在 MOI 为 100:1 时出现强蓝色荧光点, 表明细胞开始出现凋亡(图 2 箭头所示); 进行 AO/EB 染色时发现: 在感染后 12、24、48 h, 细胞凋亡逐渐增加, 在 24 h 时最明显, 48 h 出现坏死, 说明随着布鲁氏菌感染巨噬细胞时间的延长, 细胞凋亡在增加(图 3)。

### 2.3 内质网应激标志分子 GRP78 和 CHOP 在 mRNA 水平的表达

布鲁氏菌感染 RAW264.7 细胞后, GRP78 和 CHOP 在 mRNA 水平的变化见图 4。由图 4 可见, 在 *B. suis* S2 感染的 6 h 到 12 h GRP78 和 CHOP mRNA 均显著升高( $P < 0.01$ )。随后 GRP78 mRNA 表达逐渐降低; 与对照组相比, GRP78 mRNA 在 24 h 差异显著( $P < 0.05$ )。CHOP mRNA 表达量在

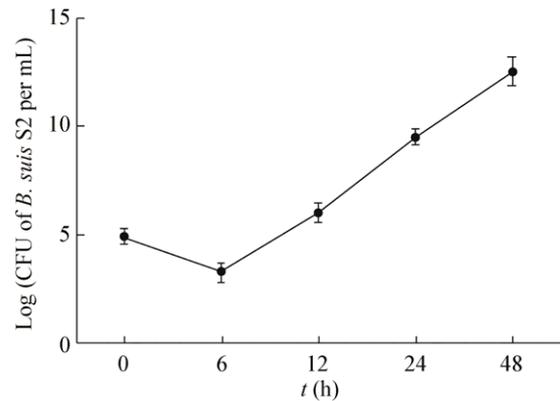


图 1 布鲁氏菌 S2 株在 RAW264.7 细胞内的增殖

Figure 1 The proliferation of *B. suis* S2 in RAW264.7 cells

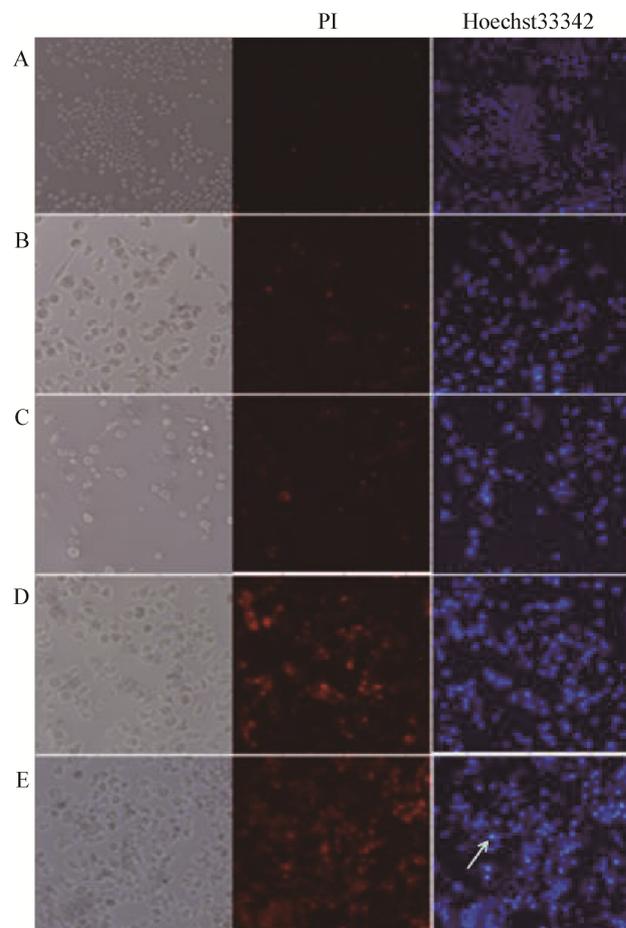


图 2 RAW264.7 细胞凋亡的检测(100 $\times$ )

Figure 2 Apoptosis detection of *B. suis* S2 infected RAW264.7 cells (100 $\times$ )

注: A: 空白对照; B: 5:1; C: 10:1; D: 50:1; E: 100:1.

Note: A: Control; B: 5:1; C: 10:1; D: 50:1; E: 100:1.

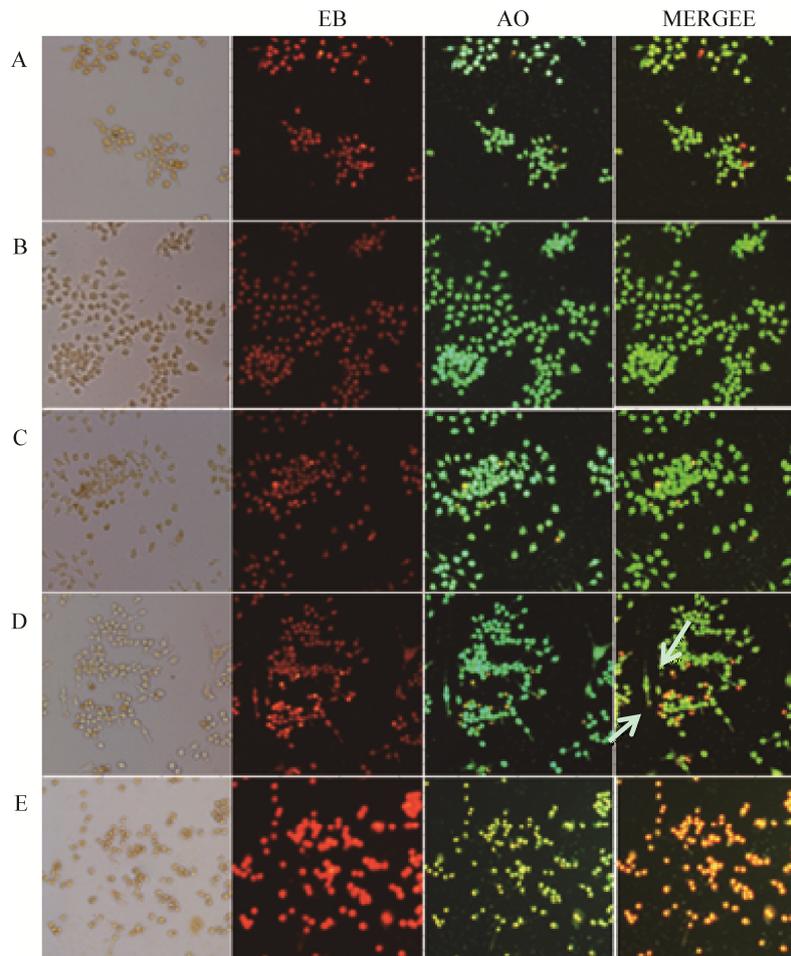


图3 RAW264.7 细胞坏死的检测(100×)

Figure 3 Necrosis of *B. suis* S2 infected RAW264.7 cells (100×)

Note: A: 0 h; B: 6 h; C: 12 h; D: 24 h; E: 48 h.

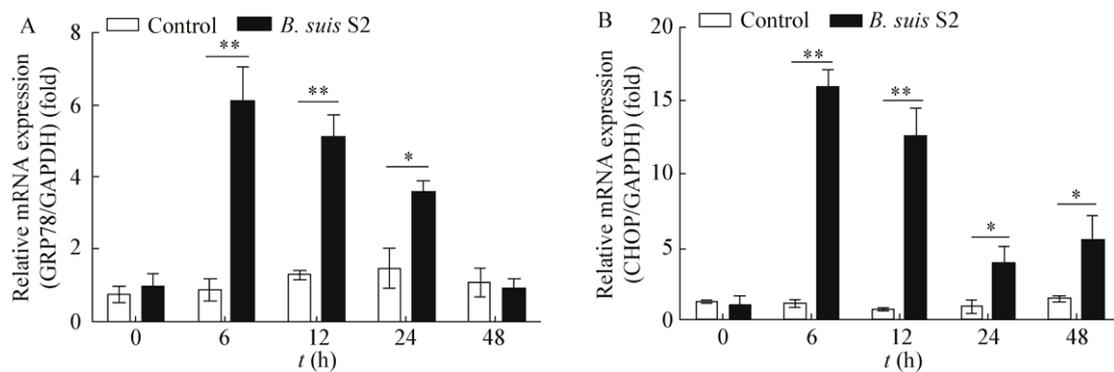


图4 GRP78 和 CHOP 在不同时间的 mRNA 表达量

Figure 4 Expression of GRP78 gene in different time by real-time PCR

注: A: GRP78 mRNA 表达量; B: CHOP mRNA 表达量。\*:  $P < 0.05$ , 差异显著; \*\*:  $P < 0.01$ , 差异极显著。

Note: A: Expression of GRP78 gene; B: Expression of CHOP gene. \*:  $P < 0.05$  mean significant difference; \*\*:  $P < 0.01$  mean very significant difference.

24 h 和 48 h 仍然显著高于未感染组( $P<0.05$ )。说明布鲁氏菌的感染激活了宿主细胞 RAW264.7 的内质网应激反应。

#### 2.4 GRP78 和 CHOP 在蛋白水平的表达变化

Western blot 检测证明, GRP78 蛋白的表达随 *B. suis* S2 感染时间的增加逐渐增加(图 5), 从 12 h 开始显著高于未感染组( $P<0.05$ )。CHOP 蛋白的表达在感染后 6 h 显著增高( $P<0.05$ ), 之后, 则没有显著变化( $P>0.05$ )。

#### 2.5 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 mRNA 的表达变化

TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 在 mRNA 水平的检测结果显示(图 6), 布鲁氏菌可以显著刺激 RAW264.7 细胞三种细胞因子 mRNA 的表达, 但随着感染时间的延长, 其表达逐渐降低。与对照组相比, TNF- $\alpha$  mRNA 表达量在 0–6 h 差异极显著( $P<0.01$ ), 24–48 h 差异显著( $P<0.05$ )。与此类似, IL-1 $\beta$  和 IL-6 在 *B. suis* S2 感染的过程中 mRNA 表达逐渐降低。

#### 2.6 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 的 ELISA 检测结果

细胞上清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 的变化见图

7。可见 *B. suis* S2 的感染可引起三种细胞因子的分泌。TNF- $\alpha$  的分泌量在 6–12 h 显著升高( $P<0.05$ )。IL-1 $\beta$  在感染的 12 h 分泌量达到最高( $P<0.01$ ); IL-6 的分泌只在感染 12 h 时比对照组高( $P<0.05$ ), 其余差异不显著( $P>0.05$ )。

### 3 讨论

布鲁氏菌病(Brucellosis)是由布鲁氏菌(*Brucella*)引起的一种人畜共患病, 可造成人畜的长期感染, 引发生殖器官的损伤。巨噬细胞是布鲁氏菌感染的主要靶细胞。有研究认为, 布鲁氏菌进入巨噬细胞后在最初的 4 h 内大部分被消灭(约 90%), 只剩下不到 10% 的布鲁氏菌可以生存下来<sup>[5]</sup>。本研究通过 *B. suis* S2 在 RAW264.7 细胞中的增殖试验得到一致的结果, 并进一步证明, 在感染的 4 h 内布鲁氏菌可进入巨噬细胞, 但之后其数量逐步减少, 至 10 h 即可降到最低点, 提示在布鲁氏菌侵入巨噬细胞的初期, 巨噬细胞发挥了其杀灭布鲁氏菌的作用, 但这种杀灭并不完全, 存活的细菌开始增殖(图 1), 说明布鲁氏菌感染后的前 10 h 可能是

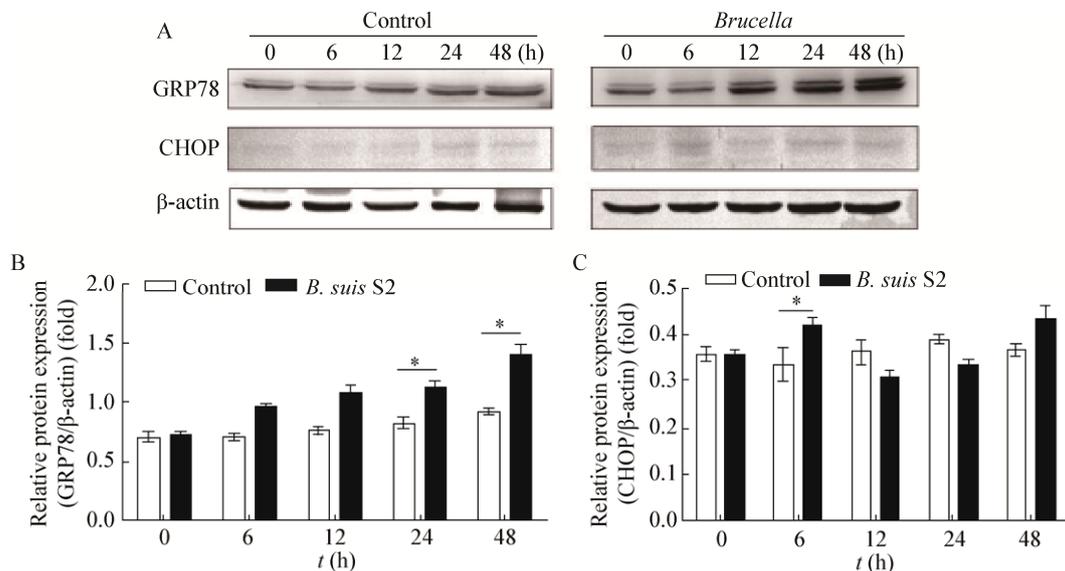


图 5 Western blot 检测 GRP78 和 CHOP 蛋白的表达

Figure 5 Expression of GRP78 and CHOP protein in RAW264.7 by Western blot

注: \*:  $P<0.05$ , 差异显著。

Note: \*:  $P<0.05$  mean significant difference.

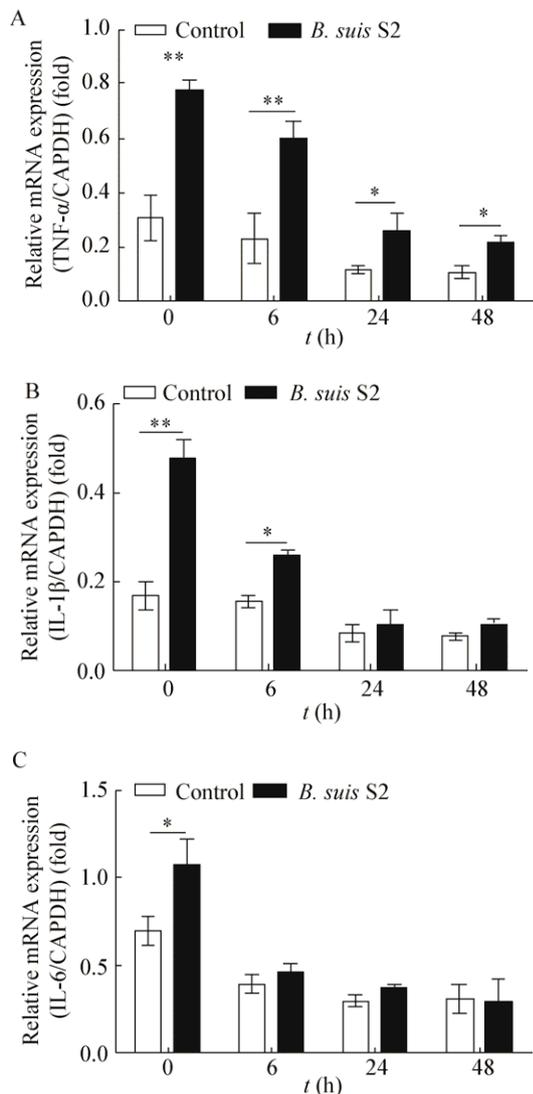


图6 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6的mRNA表达变化  
Figure 6 Expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 gene in different time by real-time PCR

注: A: TNF- $\alpha$  mRNA 表达; B: IL-1 $\beta$  mRNA 表达; C: IL-6 mRNA 表达. \*表示差异显著( $P < 0.05$ ); \*\*表示差异极显著( $P < 0.01$ ).

Note: A: Expression of TNF- $\alpha$  gene; B: Expression of IL-1 $\beta$  gene; C: Expression of IL-6 gene. \* $P < 0.05$  mean significant difference; \*\* $P < 0.01$  mean very significant difference.

其确立感染的关键。同时,通过凋亡和坏死检测得到了 *B. suis* S2 感染 RAW264.7 细胞的最佳感染复数为 100:1,感染时间为 24 h。为后续的研究奠定了基础。

研究认为,布鲁氏菌在感染早期通过改变巨噬

细胞内的酸性环境,进一步与内质网膜结合,形成布氏小体,从而逃避机体的杀伤,通过抑制细胞的凋亡完成其在细胞内的存活与增殖<sup>[4]</sup>。本试验证明,在布鲁氏菌感染的 12 h 内,RAW264.7 细胞凋亡并不明显,直到 24 h 才出现明显的凋亡,48 h 则出现

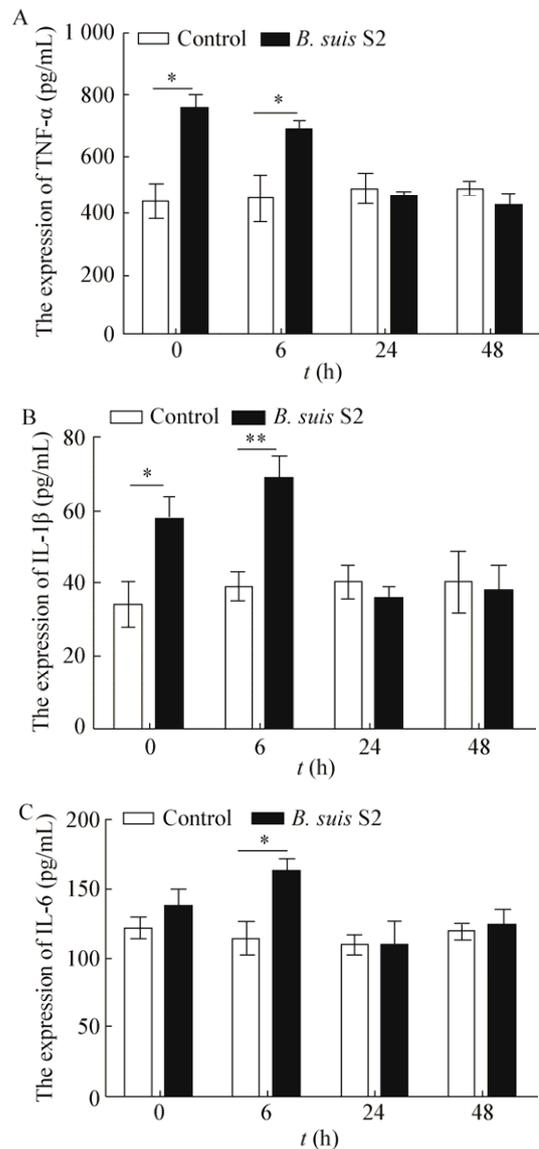


图7 ELISA 检测 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6 的表达变化  
Figure 7 Expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 protein in different time by ELISA

注: A: TNF- $\alpha$  的表达; B: IL-1 $\beta$  的表达; C: IL-6 的表达. \*: 差异显著( $P < 0.05$ ); \*\*: 差异极显著( $P < 0.01$ ).

Note: A: Expression of TNF- $\alpha$  protein; B: Expression of IL-1 $\beta$  protein; C: Expression of IL-6 protein. \* $P < 0.05$  means significant difference; \*\* $P < 0.01$  means very significant difference.

细胞的坏死(图 3),这与前期的研究一致。但到目前,布鲁氏菌抑制细胞凋亡的机制依然没有被完全阐明。

内质网是细胞内重要的细胞器,它参与细胞内蛋白质、碳水化合物和脂质的合成,同时也是蛋白质折叠、组装的场所。当蛋白质的合成增加、错误折叠蛋白的聚集时可以扰乱蛋白质的合成,导致内质网内积累大量的未折叠蛋白,最终引发内质网应激,启动非折叠蛋白反应<sup>[7]</sup>。GRP78 和 CHOP 是非折叠蛋白反应启动的标志性因子<sup>[8]</sup>。GRP78 (又称 Bip)属于热休克蛋白 HSP70 家族的成员,是一种  $Ca^{2+}$  结合蛋白,在应激反应调节时其基因的转录活性可以提高 10–25 倍,表达量明显增加,从而维持内质网中  $Ca^{2+}$  的稳定和内环境的稳态<sup>[9]</sup>,进而促使细胞恢复稳态,抑制细胞凋亡。CHOP 是内质网应激中的重要凋亡转录因子,正常情况下 CHOP 几乎不表达,当内质网应激持续存在并超过自身的应答能力时才会引起 CHOP 的大量表达,这时 CHOP 作为主要的促凋亡转录因子,诱导细胞最终走向凋亡<sup>[10–11]</sup>。有研究显示,病毒等病原可以提高被感染宿主细胞内 GRP78 的表达进而抑制被感染细胞的凋亡,促进病毒的增殖<sup>[12]</sup>。本试验发现当 *B. suis* S2 感染 RAW264.7 细胞后,GRP78 的表达量显著增加,这可能是巨噬细胞的一种重要防御机制,从而延长自身在不利因素下的存活时间。CHOP 的表达在 *B. suis* S2 感染的前期 6 h 内表达量相对于未感染组显著增高( $P < 0.05$ ),之后,随着 *B. suis* S2 在 RAW264.7 细胞内的增殖,并没有引起 CHOP 蛋白的显著变化( $P > 0.05$ )。这与我们之前在山羊滋养层细胞内的结果一致<sup>[13]</sup>。提示内质网应激相关的凋亡调节在布鲁氏菌感染过程中可能起重要作用。

有研究称,布鲁氏菌在巨噬细胞内的增殖与其抑制机体免疫应答有关。研究证实布鲁氏菌感染巨噬细胞后可以抑制促炎性因子 TNF- $\alpha$  的分泌<sup>[14]</sup>。本试验证明 *B. suis* S2 感染 RAW264.7 细胞后 TNF- $\alpha$  的分泌减少,与大部分研究结果一致。IL-1 $\beta$  被认为是一种典型的促炎性细胞因子,在由细菌引起的

炎症反应中,IL-1 $\beta$  使 T 和 B 淋巴细胞分裂、增殖引起局部和全身炎症反应<sup>[15]</sup>。IL-6 是一种具有多种效能的细胞因子,可诱导 T 细胞合成分泌 IL-2 和诱导 B 细胞分化为浆细胞并促进抗体的分泌<sup>[16]</sup>。本试验发现:在感染初期(0 h、6 h),TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 表达量显著升高,之后随着 *B. suis* S2 在 RAW264.7 细胞内的增殖并没有显著地增加 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的分泌,即 *B. suis* S2 在 RAW264.7 细胞内的增殖没有显著地增加炎症因子的释放,进而可以保证布鲁氏菌在 RAW264.7 细胞内的存活和增殖。有研究认为<sup>[17–18]</sup>,内质网应激激活的非折叠蛋白反应参与了细胞因子分泌的调节,但其机制尚不十分清楚。布鲁氏菌是否通过内质网应激反应调控相关免疫因子的调节及其机制有待进一步研究。

总之,本研究证明,在布鲁氏菌感染的初期,巨噬细胞可发挥其杀伤功能,杀灭绝大部分侵入的细菌,少量存活的细菌可激活细胞的内质网应激反应,抑制细胞的凋亡进而有利于其胞内增殖;另外,布鲁氏菌可抑制 TNF- $\alpha$  等免疫因子的分泌,该抑制作用与非折叠蛋白反应的相关性有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Qin QM, Pei JW, Ancona V, et al. RNAi screen of endoplasmic reticulum-associated host factors reveals a role for IRE1 $\alpha$  in supporting *Brucella* replication[J]. PLoS Pathogens, 2008, 4(7): e1000110
- [2] Roy CR, Salcedo SP, Gorvel JP. Pathogen-endoplasmic-reticulum interactions: in through the out door[J]. Nature Reviews Immunology, 2006, 6(2): 136-147
- [3] Roop II RM, Gaines JM, Anderson ES, et al. Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host[J]. Medical Microbiology and Immunology, 2009, 198(4): 221-238
- [4] Martirosyan A, Moreno E, Gorvel JP. An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen[J]. Immunological Reviews, 2011, 240(1): 211-234
- [5] Celli J, de Chastellier C, Franchini DM, et al. *Brucella* evades macrophage killing via *VirB*-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum[J]. The Journal of Experimental Medicine, 2003, 198(4): 545-556
- [6] Wang AH. Guide in Experimental Procedure of Husbandry Microbiology[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2012 (in

- Chinese)  
王爱华. 畜牧微生物学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2012
- [7] Rowling PJ, Freedman RB. Folding, assembly, and post translational modification of proteins within the lumen of the endoplasmic reticulum[A]//Borgese N, Harris JR. Endoplasmic Reticulum[M]. Boston, MA: Springer, 1993: 41-80
- [8] Lin PF, Jin YP, Lan XL, et al. GRP78 expression and regulation in the mouse uterus during embryo implantation[J]. Journal of Molecular Histology, 2014, 45(3): 259-268
- [9] Zhu GY, Lee AS. Role of the unfolded protein response, GRP78 and GRP94 in organ homeostasis[J]. Journal of Cellular Physiology, 2015, 230(7): 1413-1420
- [10] Verfaillie T, Garg AD, Agostinis P. Targeting ER stress induced apoptosis and inflammation in cancer[J]. Cancer Letters, 2013, 332(2): 249-264
- [11] Liao Y, Fung TS, Huang M, et al. Upregulation of CHOP/GADD153 during coronavirus infectious bronchitis virus infection modulates apoptosis by restricting activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway[J]. Journal of Virology, 2013, 87(14): 8124-8134
- [12] Jiang X, Kanda T, Wu S, et al. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A inhibits thapsigargin-induced apoptosis[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e113499
- [13] Wang XG, Lin PF, Li Y, et al. *Brucella suis* vaccine strain 2 induces endoplasmic reticulum stress that affects intracellular replication in goat trophoblast cells *in vitro*[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2016, 6: 19, DOI: 10.3389/fcimb.2016.00019
- [14] Cui GM, Wei P, Zhao YX, et al. *Brucella* infection inhibits macrophages apoptosis via Nedd4-dependent degradation of calpain2[J]. Veterinary Microbiology, 2014, 174(1/2): 195-205
- [15] Grilló MJ, Blasco JM, Gorvel JP, et al. What have we learned from brucellosis in the mouse model?[J]. Veterinary Research, 2012, 43: 29
- [16] Rothaug M, Becker-Pauly C, Rose-John S. The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2016, 1863(6): 1218-1227
- [17] Grootjans J, Kaser A, Kaufman RJ, et al. The unfolded protein response in immunity and inflammation[J]. Nature Reviews Immunology, 2016, 16(8): 469-484
- [18] Janssens S, Pulendran B, Lambrecht BN. Emerging functions of the unfolded protein response in immunity[J]. Nature Immunology, 2014, 15(10): 910-919

## 编辑部公告

### 邀请您关注《微生物学通报》公众微信号

为了更好地与读者、作者、审稿专家和编委朋友们及时沟通、方便服务,《微生物学通报》已开通公众微信服务号。作者通过微信能及时收到稿件各流程通知,第一时间了解稿件进程并及时处理;审稿专家和编委可通过微信及时收到审稿邀请,还可通过手机审稿;读者通过微信可了解《微生物学通报》文章目录,查找阅读感兴趣的文章。

#### 关注办法:

- 1、在微信公众号搜索“微生物学通报”或“wswxtb”;
- 2、用微信扫右边二维码:

