

HIF-1 α /BNIP3 信号通路对 BCG 诱导巨噬细胞自噬的影响

牛莎莎^{1,2}, 于志瑞^{1,2}, 邓光存^{1,2}, 吴晓玲^{*1,2}

1 西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室, 宁夏 银川 750021

2 宁夏大学生命科学学院, 宁夏 银川 750021

牛莎莎, 于志瑞, 邓光存, 吴晓玲. HIF-1 α /BNIP3 信号通路对 BCG 诱导巨噬细胞自噬的影响[J]. 微生物学通报, 2022, 49(9): 3837-3848

Niu Shasha, Yu Zhirui, Deng Guangcun, Wu Xiaoling. Role of HIF-1 α /BNIP3 signaling pathway in regulating macrophage autophagy induced by BCG infection[J]. Microbiology China, 2022, 49(9): 3837-3848

摘要:【背景】缺氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor 1-alpha, HIF-1 α)是响应细胞低氧反应的关键因子, 在红细胞生成、血管形成、能量代谢及调节宿主免疫代谢中发挥着重要作用。

【目的】探讨 HIF-1 α /Bcl-2-腺病毒 E1B 相互作用蛋白 3 (Bcl-2-adenovirus E1B 19-kDa interacting protein 3, BNIP3)信号通路对牛分枝杆菌卡介苗(*Bacillus Calmette-Guérin*, BCG)诱导小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 自噬的影响。【方法】构建 HIF-1 α 的小干扰 RNA (siHIF-1 α), 转染 RAW 264.7 细胞后, 结合 BCG 感染, 采用流式细胞仪检测细胞自噬率, 用 Western blotting 或免疫荧光技术检测 HIF-1 α 、BNIP3、LC3、Beclin 1、Rheb 和 mTOR 的表达水平。【结果】BCG 感染显著上调巨噬细胞中 LC3 和 HIF-1 α 的表达, 用 siHIF-1 α 结合 BCG 感染后显著下调巨噬细胞中 HIF-1 α 、BNIP3、LC3、Beclin 1 和细胞自噬率水平, 并促进 Rheb 和 p-mTOR 的表达。【结论】在 BCG 感染 RAW 264.7 细胞过程中, 干扰 HIF-1 α 表达抑制了 HIF-1 α /BNIP3 信号通路, 进而激活了 mTOR 途径, 抑制 BCG 感染诱导的细胞自噬。

关键词: 缺氧诱导因子 1 α ; Bcl-2-腺病毒 E1B 相互作用蛋白 3; 牛分枝杆菌卡介苗; 巨噬细胞 RAW 264.7; 自噬

基金项目: 国家自然科学基金(32060160, 32160162); 宁夏回族自治区重点研发计划(2018BFH03017)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (32060160, 32160162); Key Research and Development Program of Ningxia Hui Autonomous Region (2018BFH03017)

*Corresponding author: E-mail: wuxiaol@nxu.edu.cn

Received: 2022-01-11; Accepted: 2022-02-11; Published online: 2022-04-02

Role of HIF-1 α /BNIP3 signaling pathway in regulating macrophage autophagy induced by BCG infection

NIU Shasha^{1,2}, YU Zhirui^{1,2}, DENG Guangcun^{1,2}, WU Xiaoling^{*1,2}

1 Key Laboratory of Ministry of Education for Conservation and Utilization of Special Biological Resources in the Western China, Yinchuan 750021, Ningxia, China

2 School of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, Ningxia, China

Abstract: [Background] Hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1 α) is a key factor in response to cellular hypoxia and plays an important role in erythropoiesis, angiogenesis, energy metabolism and regulation of host immune metabolism. [Objective] To investigate the effects of HIF-1 α /Bcl-2-adenovirus E1B 19-kDa interacting protein 3 (BNIP3) signaling pathway on the BCG infection-induced autophagy of macrophage RAW 264.7 cells. [Methods] Small interfering RNA of HIF-1 α , siHIF-1 α , was constructed, and after the transfection of siHIF-1 α and/or *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) infection of RAW 264.7 cells, the autophagy rate of the cells was detected by flow cytometer. Western blotting or immunofluorescence technique was employed to determine the protein levels of HIF-1 α , BNIP3, LC3, Beclin 1, Rheb and mTOR. [Results] BCG infection up-regulated the expression of LC3 and HIF-1 α in RAW 264.7 cells. The transfection of siHIF-1 α down-regulated the levels of HIF-1 α , BNIP3, LC3, and Beclin 1 and decreased the autophagy rate of the macrophages after BCG infection. Moreover, siHIF-1 α promoted the expression of Rheb and p-mTOR. [Conclusion] Our results indicated that the knockdown of HIF-1 α inhibited the HIF-1 α /BNIP3 signaling pathway, thereby activating the mTOR pathway and inhibiting autophagy in RAW 264.7 cells after BCG infection.

Keywords: HIF-1 α ; BNIP3; BCG; macrophage RAW 264.7; autophagy

结核病(tuberculosis, TB)是由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)感染引起的一种慢性传染病, 该病具有高发病率和死亡率, 目前全世界约有 1/4 的人口感染了 Mtb^[1]。同时, 近 2 年 COVID-19 大流行对全球现有公共卫生和人类健康造成了巨大影响, 使结核病控制计划变得紧张, 导致结核病护理质量下降和结果恶化^[2]。

巨噬细胞既是对抗病原体感染的第一道防线, 又是 Mtb 的主要宿主细胞。当 Mtb 入侵时, 巨噬细胞启动一系列受体相关的信号级联反应引发免疫防御功能, 并通过吞噬作用、细胞凋亡和细胞自噬等发挥抗感染作用^[3]。细胞自噬

参与 Mtb 感染的多个环节, 包括形成自噬溶酶体、调节炎症细胞因子分泌、增加抗原递呈功能、产生抗菌肽和增强抗生素作用等^[4-5]。自噬是清除病原体的重要手段之一, 有研究证实刺激自噬可以增加宿主细胞的杀菌能力, 而抑制自噬会增加胞内 Mtb 的存活率^[6-7]。因此, 探讨自噬的发生机制对结核病靶向药物研制及新型疫苗开发至关重要^[8]。

众所周知, 细胞因子 IFN- γ 对控制包括 Mtb 在内的病原体感染至关重要, 但是当缺乏缺氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor 1-alpha, HIF-1 α) 时, 依赖 IFN- γ 的抗感染作用出现缺陷, 巨噬细胞抗菌能力明显下降^[9]。HIF-1 α 是 HIF-1

的一个功能性亚基, 主要调节细胞低氧反应, 其表达在蛋白水平上受氧调节^[10]。HIF-1 α 除了调节细胞免疫代谢外, 可能还参与调控细胞自噬。Neubert 等^[11]研究细胞高浓度 Na⁺对大肠杆菌的抗菌作用时发现, 在 HIF-1 α 缺陷的细胞中, Bcl-2-腺病毒 E1B 相互作用蛋白 3 (Bcl-2-adenovirus E1B 19-kDa interacting protein 3, BNIP3)和 LC3-II 的表达被抑制, 自噬体和自噬溶酶体数量减少, 细胞高 Na⁺的抗菌防御作用被完全消除, 提示细胞高 Na⁺的抗菌功能主要取决于 HIF-1 α 依赖性增加的自噬作用。最近, Li 等^[12]研究发现结核病患者肺组织中 LC3 表达增加, 但 P62 的表达无变化, 但随着 HIF-1 α 被激活, LC3 的表达显著增加且 p62 的表达量下降, 说明 HIF-1 α 的激活促进了 P62 的降解, 使自噬流未被阻断, 这对杀死细胞内 Mtb 具有重要意义。HIF-1 α 的靶分子 BNIP3 是一种 Bcl-2 家族成员的促凋亡蛋白, 也是线粒体自噬受体, 其通过与 mTOR 的关键上游激活剂 Rheb 结合而抑制 TORC1, 促进自噬发生^[13]。以上研究表明, HIF-1 α /BNIP3 信号通路在细胞自噬过程中可能发挥重要作用。然而在结核病中, HIF-1 α /BNIP3 信号通路对 Mtb 感染后细胞自噬的作用机制仍不确定。

本研究用 BCG 感染 RAW 264.7 细胞后, 发现 LC3 和 HIF-1 α 表达上调, 因此, 我们构建了 HIF-1 α 的小干扰 RNA 敲减细胞内 HIF-1 α 的表达, 并结合 BCG 感染细胞, 通过研究干扰 HIF-1 α 对 BCG 感染后巨噬细胞内 HIF-1 α /BNIP3 信号通路、自噬率、自噬相关蛋白和 mTOR 通路的作用, 揭示 HIF-1 α /BNIP3 信号通路对 BCG 诱导巨噬细胞自噬的影响, 以期进一步揭示 Mtb 感染期间巨噬细胞自噬的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞系与菌株

实验所用小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 购自中国科学院上海细胞研究所, 保存于宁夏大学西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室; BCG 购自上海生物制品研究所有限公司。

1.2 主要试剂和仪器

TransStart One Stept cDNA Sythesis SuperMix, 北京全式金生物技术有限公司; DMEM 培养基和荧光二抗, 赛默飞世尔科技(中国)公司; 全蛋白提取试剂盒, 南京凯基生物科技发展有限公司; HIF-1 α 的小干扰 RNA, 上海吉玛制药技术有限公司; Western Lightning ECL, PerkinElmer 公司; 自噬检测试剂盒, Enzo Life Sciences 公司; HIF-1 α 、BNIP3、 β -actin、LC3、Beclin 1 和辣根过氧化物标记二抗一抗, Proteintech 公司; p-mTOR 和 p-p70S6K, Abmart 公司。CO₂ 培养箱, Thermo Fisher 公司; GE 化学发光检测仪, Promega 公司; 倒置荧光显微镜, Olympus 公司; 流式细胞仪, Sysmex Partec 公司。

1.3 菌株培养

用 Middlebrook 7H10 固体培养基复苏 BCG, 37 °C 培养大约 3-4 周后, 用接种环挑取单菌落加入 Middlebrook 7H9 液体培养基中, 静置于 37 °C 的 5% CO₂ 培养箱中培养约 4 周后收集菌株。

1.4 细胞培养

提前配制好体积比为 9:1 的 DMEM:FBS 完全培养液, 从液氮罐中取出 RAW 264.7 细胞冻存管, 置于 37 °C 水中快速摇晃解冻, 将细胞悬液转移至含有 1 mL 完全培养液的 15 mL 离心管中, 1 000 r/min 离心 5 min 后弃去上清, 加入 1 mL 完全培养液重悬细胞, 将细胞悬液均匀接种到培养皿中, 将其放置在 37 °C 的 5% CO₂ 培养箱中培养, 待融合度达到 80%左右时

可进行细胞传代。

1.5 小干扰 RNA 转染

将生长良好的 RAW 264.7 细胞按 1×10^6 个/mL 接种至 6 孔板中, 在 37°C 的 5% CO_2 细胞培养箱中培养过夜, 取一支 1.5 mL EP 管, 先加入 5 μL ZETA LIFE Advanced 转染试剂, 再加入 5 μL NC 或 HIF-1 α 小干扰 RNA 混匀, 室温静置 5 min, 将混合后的试剂逐滴加入对应的 6 孔板里培养 24–48 h, 进行后续实验。

1.6 Western blotting

配制蛋白裂解液, 提取细胞全蛋白, 用蛋白质定量试剂盒(bicinchoninic acid, BCA 法)测定细胞全蛋白浓度, 通过 SDS-PAGE 凝胶电泳后将蛋白样品转移至 PVDF 膜上, 脱脂牛奶封闭 2 h, 加入一抗稀释液, 4°C 孵育过夜, 次日用含 0.3% Tween-20 的 TBS 即 TBST 缓冲液洗涤残余的一抗, 加入相应的二抗, 室温孵育 1 h, 用 TBST 缓冲液洗涤残余的二抗, 滴加 ECL 发光试剂, 放入全自动化学发光成像仪内成像, 保存数据并处理分析数据。

1.7 RT-qPCR 检测相关因子的 mRNA 表达

根据 Real-Time qPCR 引物设计原则设计所需引物, HIF-1 α 引物为 F (5'-ACTGCACGGG CCATATTCAT-3')和 R (3'-AAATCAGCACCA AGCACGTC-5')。利用 Trizol 法提取各处理组中的总 RNA, 利用超微量分光光度计(NanoDrop 8000)检测 RNA 浓度和纯度。然后以所得的 RNA 为模板, 根据 TransStart One Stept cDNA Synthesis SuperMix 说明书配制反应体系(20 μL)进行反转录合成 cDNA, 根据 TransStart Tip Green qPCR Super Mix 说明书配制荧光定量反应体系, 反应完成后, 通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法处理数据计算基因的相对表达量。

1.8 流式细胞仪检测细胞自噬率

细胞自噬率的检测使用自噬检测试剂盒,

具体步骤为: 将生长良好的 RAW 264.7 细胞按 1×10^6 个/mL 接种至 6 孔板中, 在 37°C 的 5% CO_2 细胞培养箱中培养过夜, 使用 siHIF-1 α 或/和 BCG 处理细胞后, 用 PBS 洗涤细胞 3 次; 用胰酶消化细胞 2 min 后, 加入完全培养液终止消化, 800 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入染料, 在 37°C 的 5% CO_2 细胞培养箱中孵育 30 min, 800 r/min 离心 5 min 后弃上清, 用 PBS 洗涤 3 次, 用 1 mL PBS 重悬, 30 min 内通过流式细胞仪检测细胞自噬率。

1.9 免疫荧光

12 孔板中放入无菌爬片, 将生长状态良好的 RAW 264.7 以 1×10^4 个接种到 12 孔板中, 置于 37°C 的 5% CO_2 细胞培养箱中, 待细胞贴壁且生长状态良好时进行 BCG 感染实验; 将细胞上清弃掉, PBS 清洗细胞 3 次, 每次 5 min; 加入 4%多聚甲醛固定约 20 min; 弃掉多聚甲醛, 加入 0.5% Triton X-100 室温通透 20 min 后, PBS 清洗细胞 3 次; 使用 3%牛血清白蛋白室温静置封闭 1 h。弃掉封闭液, 加入一抗(1:200)稀释液, 室温孵育 2 h 后弃掉一抗, PBS 清洗残留的一抗; 加入相应的荧光二抗, 避光孵育 2 h 后, 弃掉二抗, PBS 清洗残余的二抗; 滴加封片剂封片后保存于 4°C 。

1.10 数据分析

所有实验数据均经过 3 次独立实验的验证, 实验数据采用 GraphPad Prism 9.0 软件中的 one way ANOVA 进行统计学分析, 数据均使用均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示。

2 结果与分析

2.1 BCG 感染上调 RAW 264.7 细胞内 LC3 和 HIF-1 α 的表达

BCG 通过操纵宿主细胞吞噬体和信号通路而影响宿主细胞抗原呈递、细胞凋亡和自噬等,

被广泛用于结核病治疗^[14], 但其影响巨噬细胞自噬的机制仍然知之甚少。本实验用 $MOI=10$ 的 BCG 感染 RAW 264.7 细胞不同时间后, 通过 Western blotting 检测细胞内 LC3 和 HIF-1 α 蛋白的表达水平, 结果显示(图 1), LC3 和 HIF-1 α 的表达量均在 12 h 时已极显著高于对照组 ($P<0.001$), 之后 LC3 的表达量缓慢上升, HIF-1 α 的表达量呈下降的趋势, 表明 BCG 感染 RAW 264.7 细胞 12 h 时, 细胞发生自噬并显著上调 HIF-1 α 的表达。

2.2 siHIF-1 α 的干扰验证

因为 BCG 感染 RAW 264.7 细胞后显著上调 HIF-1 α 的表达, 因此构建合成了 HIF-1 α 的小干扰 RNA (siHIF-1 α), 将其转染 RAW 264.7 细胞, 通过 Western blotting 和 qPCR 检测细胞内 HIF-1 α 的表达水平。结果如图 2 所示, siHIF-1 α -1213 干扰效果最好, 可显著降低细胞内 HIF-1 α 蛋白和 mRNA 表达水平 ($P<0.01$), 后续的相关实验均采用 siHIF-1 α -1213 来进行。

2.3 siHIF-1 α 抑制 BCG 感染后 RAW 264.7 细胞内 HIF-1 α /BNIP3 信号通路

为探究 HIF-1 α /BNIP3 信号通路对细胞自噬的影响, 通过 siHIF-1 α 联合 BCG 感染巨噬细胞后, 利用 Western blotting 检测细胞内 HIF-1 α 和 BNIP3 的表达水平。如图 3 结果显示, BCG 感染显著上调细胞内 HIF-1 α 和 BNIP3 的表达水平 ($P<0.01$), 而 siHIF-1 α 显著抑制 BCG 感染后细胞内 HIF-1 α 和 BNIP3 的表达 ($P<0.01$)。这表明 siHIF-1 α 抑制 BCG 感染后 RAW 264.7 细胞内的 HIF-1 α /BNIP3 信号通路。

2.4 siHIF-1 α 抑制 BCG 感染后 RAW 264.7 细胞的自噬率

自噬发生过程受到严格的监管, 涉及 30 多种自噬相关蛋白 (autophagy-related protein), 许多核心自噬相关蛋白在哺乳动物中都是保守的,

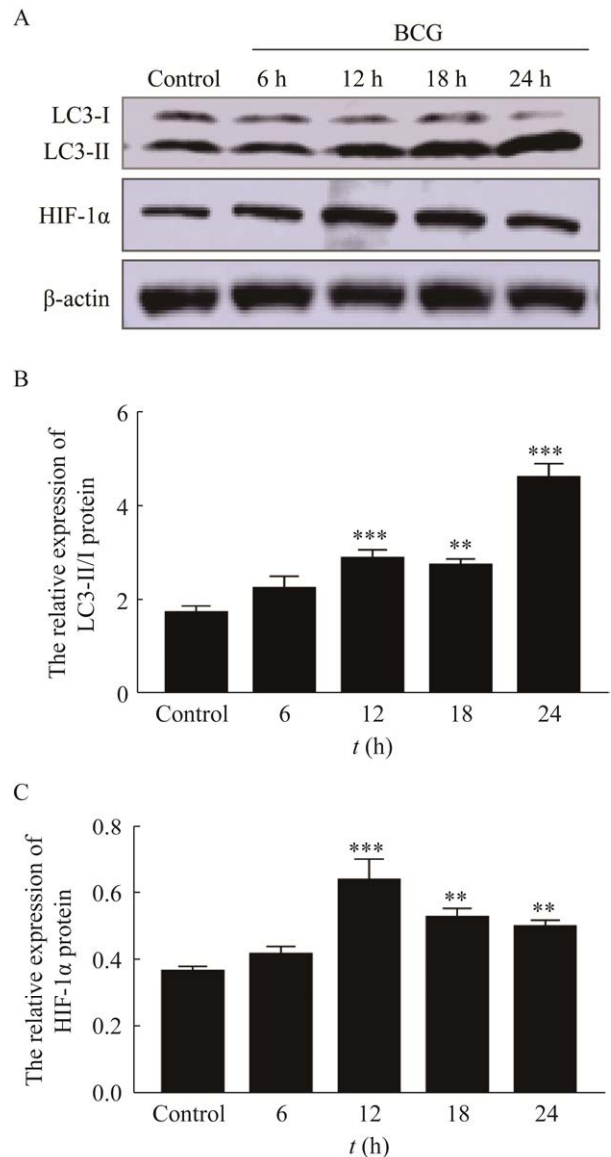


图 1 BCG 感染不同时间后 RAW 264.7 细胞内 LC3 和 HIF-1 α 蛋白的表达水平 A: Western blotting 检测细胞内 LC3 和 HIF-1 α 蛋白表达水平; B-C: LC3 和 HIF-1 α 蛋白表达结果灰度分析结果。*: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

Figure 1 Expression of LC3 and HIF-1 α protein in BCG-infected RAW 264.7 cells at different time. A: Western blotting results of LC3 and HIF-1 α in RAW 264.7 cells; B, C: The grayscale analysis results of LC3 and HIF-1 α protein expression. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

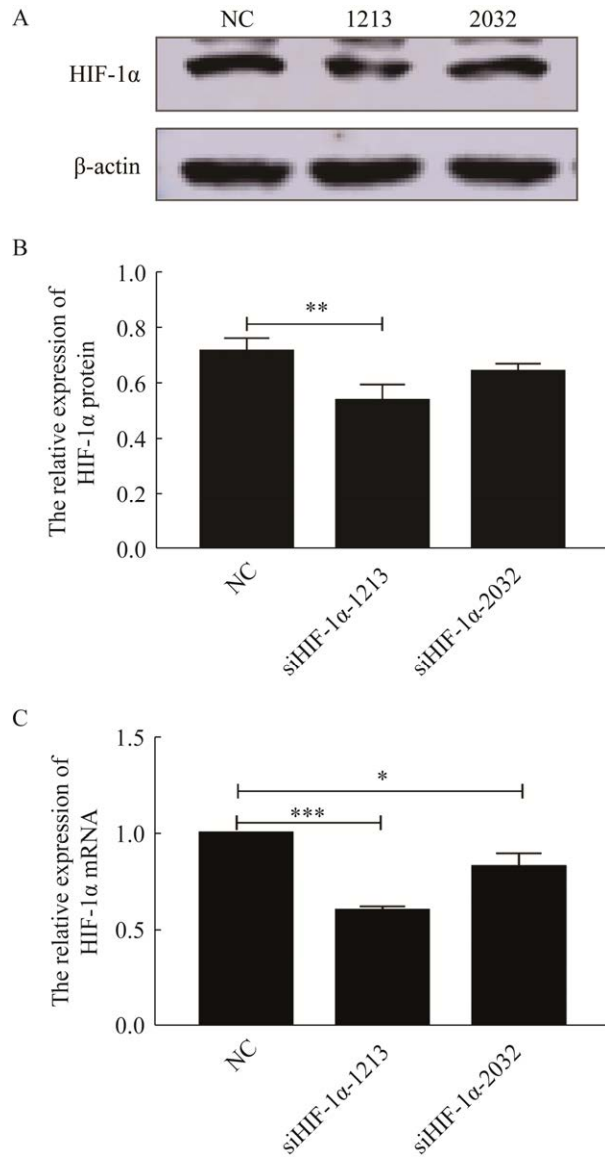


图2 siHIF-1 α 的干扰验证 A: Western blotting 检测细胞内 HIF-1 α 蛋白表达水平; B: HIF-1 α 蛋白表达结果灰度分析结果; C: qPCR 检测细胞内 HIF-1 α mRNA 表达水平; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$

Figure 2 The validation of siHIF-1 α interference efficiency. A: Western blotting results of HIF-1 α in RAW 264.7 cells; B: The grayscale analysis results of HIF-1 α protein expression; C: The expression of HIF-1 α mRNA was detected by qPCR. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

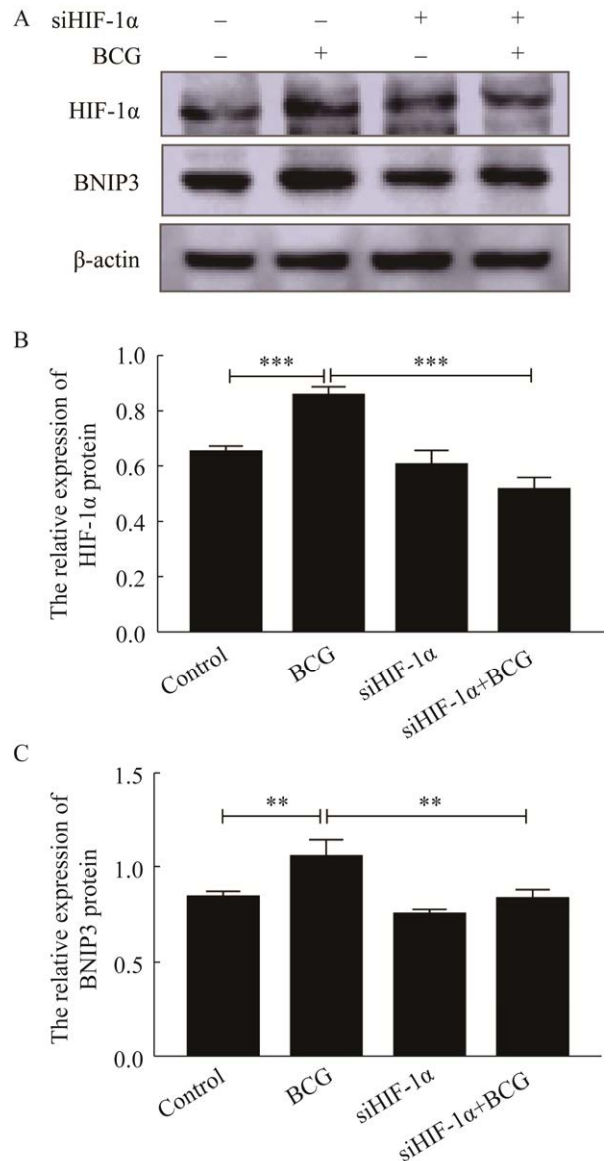


图3 siHIF-1 α 对BCG感染后RAW 264.7细胞内HIF-1 α 和BNIP3表达的影响 A: Western blotting 检测细胞内 HIF-1 α 和 BNIP3 蛋白表达水平; B、C: HIF-1 α 和 BNIP3 蛋白表达结果灰度分析结果。*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$

Figure 3 Effect of siHIF-1 α on the expression of HIF-1 α and BNIP3 in RAW 264.7 cells after BCG infection. A: Western blotting results of HIF-1 α and BNIP3 in RAW 264.7 cells; B, C: The grayscale analysis results of HIF-1 α and BNIP3 protein expression. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

其相应基因的鉴定为评估自噬活性和研究自噬作用提供了有效手段。此外,透射电镜观察自噬体和自噬溶酶体及流式细胞术检测自噬率也被广泛用于检测自噬过程。本研究用 siHIF-1 α 联合 BCG 感染 RAW 264.7 细胞后,通过流式细胞仪检测各组细胞自噬率,结果如图 4 所示,与对照组相比,BCG 组细胞自噬率显著较高 ($P<0.01$),而 siHIF-1 α +BCG 组与 BCG 组相比自噬率降低 ($P<0.05$),说明 HIF-1 α 促进 BCG 感染后巨噬细胞的自噬率。

2.5 siHIF-1 α 抑制 BCG 感染后 RAW 264.7 细胞内 LC3 和 Beclin 1 的表达

为进一步评价 HIF-1 α 对 BCG 感染后 RAW 264.7 细胞自噬的影响,利用 Western blotting 检测自噬相关因子 LC3 和 Beclin 1 的表达水平,结果显示,与对照组相比,用 BCG 感染后细胞内 LC3 和 Beclin 1 ($P<0.01$) 的表达量增加(图 5A);与 BCG 组相比,siHIF-1 α +BCG 组细胞内 LC3 和 Beclin 1 的表达量显著降低 ($P<0.05$)。同时,LC3 的免疫荧光也得到了是一致的结果(图 5B),

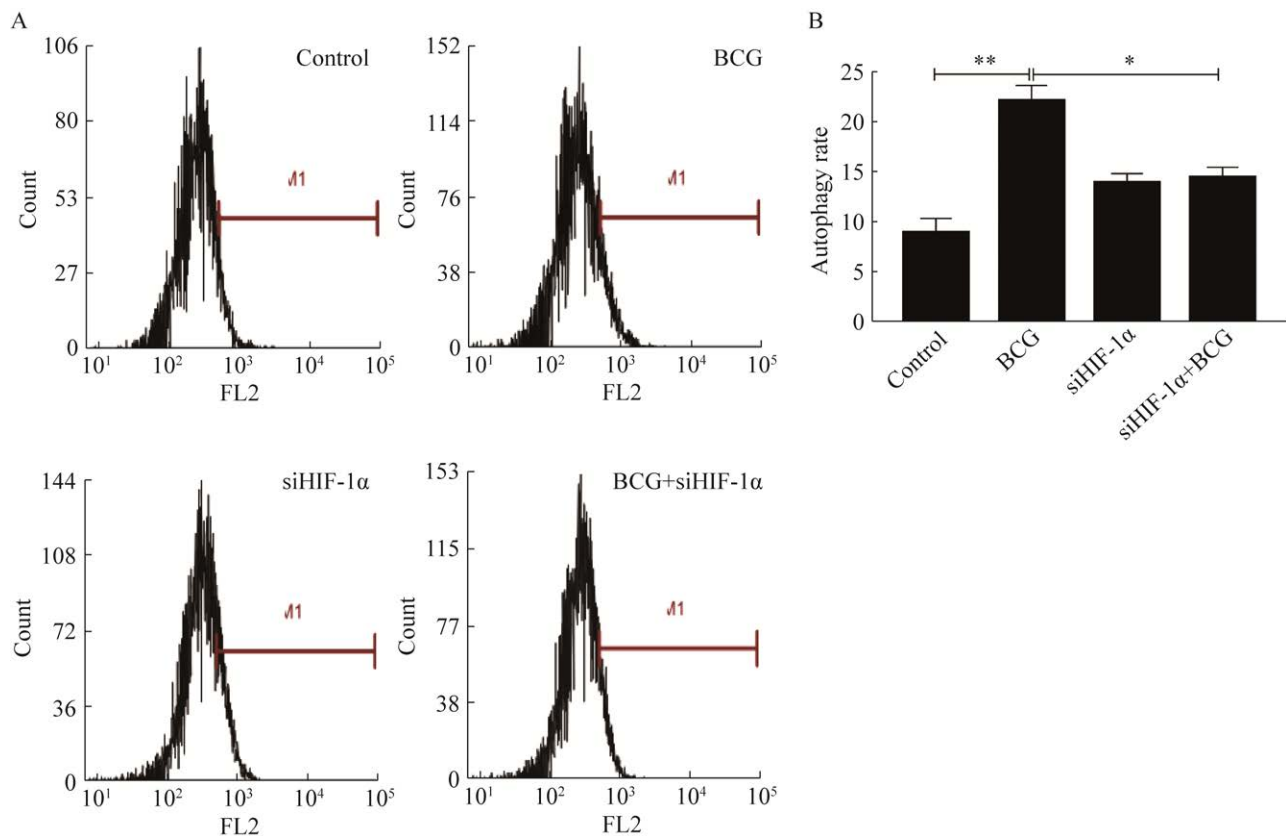


图 4 siHIF-1 α 对 BCG 感染后 RAW 264.7 细胞自噬率的影响 A: 流式细胞仪检测各组细胞自噬率; B: 细胞自噬率灰度分析结果。*: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

Figure 4 Effect of siHIF-1 α on the autophagy rate in RAW 264.7 cells after BCG infection. A: Autophagy rate detected by flow cytometer; B: The grayscale analysis result of autophagy rate. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

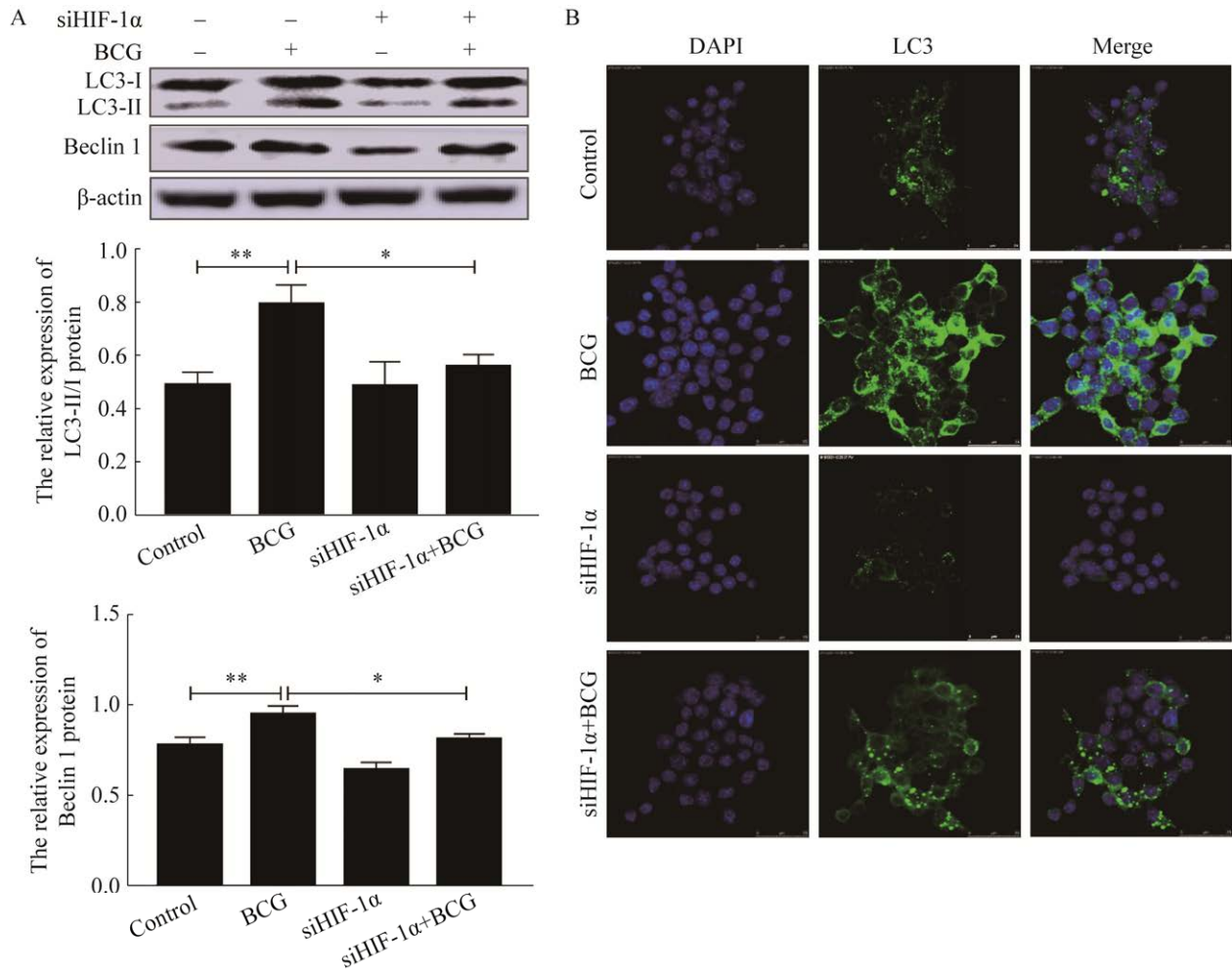


图 5 siHIF-1 α 对 BCG 感染后 RAW 264.7 细胞内 LC3 和 Beclin 1 表达的影响 A: Western blotting 检测细胞内 LC3 和 Beclin 1 蛋白表达水平; B: 免疫荧光检测细胞内 LC3 的表达(400 \times); 绿色荧光代表 LC3, 蓝色荧光为细胞核。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$

Figure 5 Effect of siHIF-1 α on the expression of LC3 and Beclin 1 in RAW 264.7 cells after BCG infection. A: Western blotting results of LC3 and Beclin 1 in RAW 264.7 Cells; B: Expression of LC3 was detected by immunofluorescence (400 \times); Green dots represent LC3 and blue dots represent nucleus. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

综合上述结果, 进一步确定 HIF-1 α 通过促进 BCG 感染后 RAW 264.7 细胞内 LC3 和 Beclin 1 的表达而促进细胞自噬。

2.6 siHIF-1 α 促进 BCG 感染后 RAW 264.7 细胞内 mTOR 的激活

mTOR 是调节自噬的核心枢纽, 受到不同

信号通路的调控。HIF-1 α 的下游因子 BNIP3 可以结合并降低 Rheb 的 GTP 水平, 从而抑制 mTOR 通路^[13]。因此, 用 Western blotting 检测细胞内 mTOR 通路相关蛋白的表达水平。结果如图 6 所示, 与对照组相比, BCG 感染均显著下调细胞内 Rheb 和 p-mTOR 的表达水平($P < 0.05$);

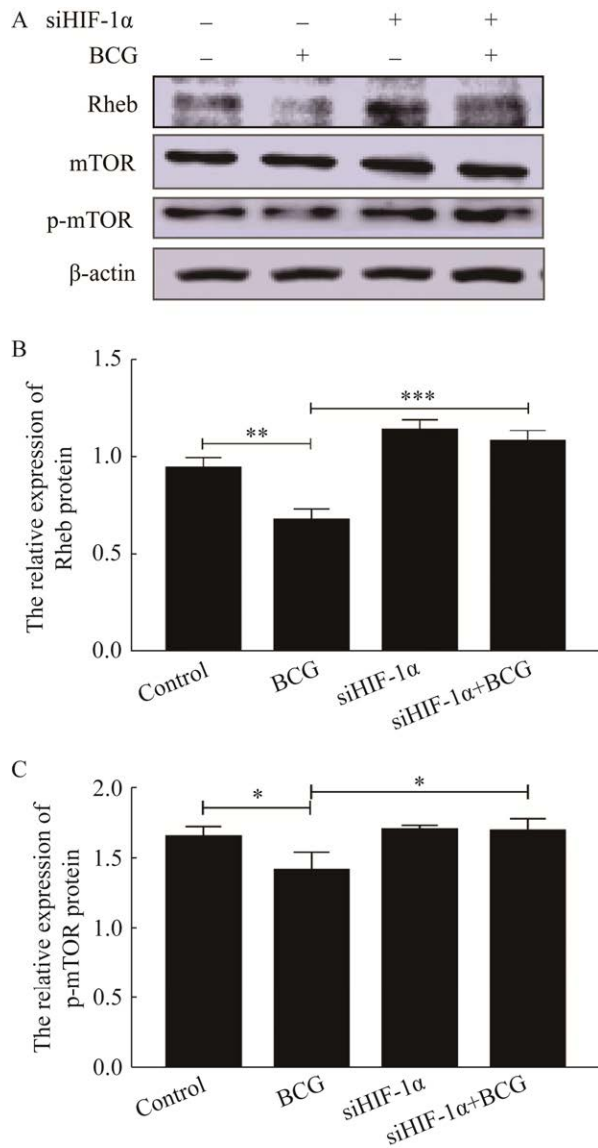


图 6 siHIF-1 α 对 BCG 感染后 RAW 264.7 细胞内 Rheb 和 mTOR 表达的影响 A: Western blotting 检测细胞内 Rheb、mTOR 和 p-mTOR 蛋白表达水平; B、C: Rheb、mTOR 和 p-mTOR 蛋白表达结果灰度分析结果; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$

Figure 6 Effect of siHIF-1 α on the expression of Rheb and mTOR in RAW 264.7 cells after BCG infection. A: Western blotting results of Rheb, mTOR and p-mTOR protein in RAW 264.7 cells; B, C: The gray scale analysis results of Rheb, mTOR and p-mTOR protein expression. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

与 BCG 组相比, siHIF-1 α +BCG 组细胞内 Rheb 和 p-mTOR 的表达水平显著上调($P < 0.05$), 这些结果表明 siHIF-1 α 通过激活 mTOR 而抑制 BCG 诱导 RAW 264.7 细胞自噬。

3 讨论与结论

Mtb 是一种经典的胞内病原体, 在侵入宿主后主要由巨噬细胞吞噬, 并激活淋巴细胞或其他免疫细胞, 从而清除病原体。然而, Mtb 已发展出许多策略来阻止吞噬体成熟, 逃避宿主免疫系统攻击, 并以休眠和/或半复制状态长期存在于肉芽肿内^[15]。此外, 巨噬细胞通常会发生细胞凋亡、自噬和坏死来控制 Mtb 感染, 从而影响结核病的发生发展。自噬是限制 Mtb 增殖和靶向胞内病原体的主要细胞免疫保护过程, 但在 Mtb 感染期间, 很多有关调控自噬的作用机制仍然尚未明晰。

Mtb 感染宿主细胞后, 如何促进巨噬细胞的抗菌功能, 是研究领域亟待解决的重大问题。尽管 H37Rv、H37Ra、BCG 和耻垢分枝杆菌等菌株在诱导细胞自噬潜力方面存在差异, 但是均能不同程度地诱导细胞自噬以限制 Mtb 增殖^[16-17]。本研究结果也证实 BCG 可以诱导巨噬细胞发生自噬, 并且 BCG 感染显著上调 HIF-1 α 的表达。有研究表明, 用 Mtb 感染的小鼠, 因肺部炎症反应引起肉芽肿微环境中氧分压降低和三羧酸循环中间产物堆积, 可稳定 HIF-1 α 的 mRNA 和蛋白水平^[18], 而选择性敲除 HIF-1 α 的小鼠不能限制和清除 Mtb, 且肉芽肿在感染早期即出现坏死, Mtb 扩散传播^[19]。基于以上研究结果, 我们构建了 HIF-1 α 的小干扰 RNA, 可以靶向干扰蛋白质表达前的 mRNA, 进而调控 HIF-1 α 蛋白表达量, 以便继续探究 HIF-1 α /BNIP3 信号通路对 Mtb 感染后巨噬细胞自噬的影响。

BNIP3 是 HIF-1 α 的靶分子,对维持自噬至关重要。HIF-1 α 可以激活 BNIP3 来诱导自噬以维持细胞存活^[20-21]。有关 HIF-1 α 对抗利什曼原虫感染的研究指出, HIF-1 α 水平与利什曼原虫感染呈负相关,而且 HIF-1 α 的缺失抑制 BNIP3 表达,有利于寄生虫繁殖^[22]。我们的结果显示, siHIF-1 α 显著抑制 BCG 感染后巨噬细胞内 HIF-1 α 和 BNIP3 的表达,表明 Mtb 感染可以激活巨噬细胞内的 HIF-1 α /BNIP3 信号通路,也说明该信号通路与 BCG 诱导的自噬有关。此外, HIF-1 α /BNIP3 信号通路不仅调控自噬,还调控细胞凋亡和坏死。例如黄芪多糖通过下调 miR-206 靶向 HIF-1 α /BNIP3,促进细胞自噬并抑制细胞凋亡来改善股骨头坏死症状^[23]。然而矛盾的是,在睾酮诱导肾小管上皮细胞死亡的研究中,激活的 HIF-1 α /BNIP3 通路诱导细胞凋亡和坏死^[24]。这可能与研究对象不同有关,本研究主要关注 HIF-1 α /BNIP3 信号通路对细胞自噬的影响作用。

细胞发生自噬是一个动态变化的过程, LC3 是参与自噬体成膜过程的重要蛋白,被广泛用于监测自噬。LC3-II 由胞质 LC3-I 与新生自噬体表面的磷脂酰乙醇胺结合产生, LC3-II 的数量与自噬体的数量明显相关^[25]。最初由 Gutierrez 等^[26]研究发现,通过 IFN- γ 或雷帕霉素刺激 Mtb 感染的巨噬细胞可以增加 LC3 及 Beclin 1 与吞噬溶酶体共定位促进自噬发生,从而显著降低胞内 Mtb 存活。本研究通过检测 siHIF-1 α 联合 BCG 感染后巨噬细胞的自噬率,初步证实 HIF-1 α 参与调控 Mtb 感染后巨噬细胞的自噬过程,而且 siHIF-1 α 抑制 BCG 感染后细胞内 LC3II/I 和 Beclin 1 的表达,这些结果表明 BCG 感染激活的 HIF-1 α /BNIP3 信号通路促进巨噬细胞自噬。

雷帕霉素的机制靶点(mTOR)是自噬的负调节因子,作为调节自噬的核心枢纽,受到不同信号通路的调控。Li 等^[13]研究发现 HIF-1 α 激活的 BNIP3 可以结合 Rheb 并降低其 GTP 水平,抑制 mTOR 活性而激活自噬。这与我们的研究结果相一致,即 siHIF-1 α 促进 BCG 感染后细胞内 mTOR 的激活,表明 HIF-1 α /BNIP3 信号通路抑制 mTOR,从而促进 BCG 诱导细胞自噬。此外, Bellot 等^[27]研究指出 HIF-1 α /BNIP3 可以不依赖 mTOR 途径而独立起作用激活自噬,揭示了 HIF-1 α 可能通过多种途径影响细胞自噬。如 Li 等^[28]研究发现 HIF-1 α 通过诱导 6-甲基腺苷及其读取蛋白 YTHDF1 表达,促进自噬相关蛋白 ATG2A 和 ATG14 表达,从而导致细胞自噬。

本研究表明, BCG 感染可以诱导 RAW 264.7 细胞自噬,并显著上调 HIF-1 α 表达,而干扰 HIF-1 α 抑制 BCG 感染后细胞内 HIF-1 α /BNIP3 信号通路,进而激活 mTOR 途径,下调细胞自噬率水平、Beclin 1 和 LC3 表达,抑制细胞自噬发生。由于 HIF-1 α 可能通过多种途径影响 BCG 诱导的细胞自噬,并且对 BCG 诱导细胞自噬的作用机制尚不明确,因此,本实验还有待进一步深入研究,从而为揭示结核病的发病机制和预防治疗提供理论基础和新思路。

REFERENCES

- [1] Furin J, Cox H, Pai M. Tuberculosis[J]. Lancet: London, England, 2019, 393(10181): 1642-1656
- [2] Health TLP. Renewing the fight to end tuberculosis[J]. The Lancet Public Health, 2021, 6(5): e260
- [3] Galli G, Saleh M. Immunometabolism of macrophages in bacterial infections[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2020, 10: 607650
- [4] Harris J, Hope JC, Lavelle EC. Autophagy and the

- immune response to TB[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2009, 56(6/7): 248-254
- [5] Deretic V. Autophagy in tuberculosis[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2014, 4(11): a018481
- [6] Sivangala Thandi R, Radhakrishnan RK, Tripathi D, Paidipally P, Azad AK, Schlesinger LS, Samten B, Mulik S, Vankayalapati R. Ornithine-A urea cycle metabolite enhances autophagy and controls *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 3535
- [7] Liu F, Chen J, Wang P, Li H, Zhou Y, Liu H, Liu Z, Zheng R, Wang L, Yang H, et al. MicroRNA-27a controls the intracellular survival of *Mycobacterium tuberculosis* by regulating calcium-associated autophagy[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 4295
- [8] Bradfute SB, Castillo EF, Arko-Mensah J, Chauhan S, Jiang SY, Mandell M, Deretic V. Autophagy as an immune effector against tuberculosis[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2013, 16(3): 355-365
- [9] Braverman J, Sogi KM, Benjamin D, Nomura DK, Stanley SA. HIF-1 α is an essential mediator of IFN- γ -dependent immunity to *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Journal of Immunology: Baltimore, Md: 1950*, 2016, 197(4): 1287-1297
- [10] Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension[J]. *PNAS*, 1995, 92(12): 5510-5514
- [11] Neubert P, Weichselbaum A, Reitingger C, Schatz V, Schröder A, Ferdinand JR, Simon M, Bär AL, Brochhausen C, Gerlach RG, et al. HIF1A and NFAT5 coordinate Na⁺-boosted antibacterial defense via enhanced autophagy and autolysosomal targeting[J]. *Autophagy*, 2019, 15(11): 1899-1916
- [12] Li Q, Xie YY, Cui ZB, Huang H, Yang CQ, Yuan BD, Shen P, Shi CW. Activation of hypoxia-inducible factor 1 (Hif-1) enhanced bactericidal effects of macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Tuberculosis*, 2021, 126: 102044
- [13] Li Y, Wang YA, Kim E, Beemiller P, Wang CY, Swanson J, You M, Guan KL. Bnip3 mediates the hypoxia-induced inhibition on mammalian target of rapamycin by interacting with rheb[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(49): 35803-35813
- [14] Gengenbacher M, Nieuwenhuizen N, Kaufmann S. BCG: old workhorse, new skills[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2017, 47: 8-16
- [15] Ramakrishnan L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2012, 12(5): 352-366
- [16] Zullo AJ, Lee S. Mycobacterial induction of autophagy varies by species and occurs independently of mammalian target of rapamycin inhibition[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(16): 12668-12678
- [17] 芮阳, 周洁, 赖小宝, 叶舒慧, 黄自坤, 罗清, 李俊明. 不同毒力的分枝杆菌感染促进小鼠 RAW_{264.7} 巨噬细胞自噬及 mTOR 和 AKT 磷酸化[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2020, 36(12): 1057-1062
- Guo Y, Zhou J, Lai XB, Ye SH, Huang ZK, Luo Q, Li JM. Different virulence *Mycobacterium* promotes RAW_{264.7} macrophage autophagy and phosphorylation of mTOR and AKT[J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2020, 36(12): 1057-1062 (in Chinese)
- [18] Shi L, Salamon H, Eugenin EA, Pine R, Cooper A, Gennaro ML. Infection with *Mycobacterium tuberculosis* induces the Warburg effect in mouse lungs[J]. *Scientific Reports*, 2016, 5: 18176
- [19] Cardoso MS, Silva TM, Resende M, Appelberg R, Borges M. Lack of the transcription factor hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) in macrophages accelerates the necrosis of *Mycobacterium avium*-induced granulomas[J]. *Infection and Immunity*, 2015, 83(9): 3534-3544
- [20] Zhang YN, Liu DW, Hu HJ, Zhang PQ, Xie RQ, Cui W. HIF-1 α /BNIP₃ signaling pathway-induced-autophagy plays protective role during myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy=Biomedecine & Pharmacotherapie*, 2019, 120: 109464
- [21] 刘洁. Hif-1 靶基因 Bnip3 在肝星状细胞活化中调控自噬机制的研究[D]. 武汉: 华中科技大学硕士学位论文, 2019
- Liu J. Mechanism of hif-1 target gene Bnip3 regulating autophagy and activation of hepatic stellate cells[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong University of Science and Technology, 2019 (in Chinese)
- [22] Mesquita I, Ferreira C, Moreira D, Kluck GEG, Barbosa AM, Torrado E, Dinis-Oliveira RJ, Gonçalves LG, Beauparlant CJ, Droit A, et al. The absence of HIF-1 α increases susceptibility to *Leishmania donovani* infection via activation of BNIP₃/mTOR/SREBP-1c axis[J]. *Cell Reports*, 2020, 30(12): 4052-4064.e7
- [23] Zhang SY, Wang F, Zeng XJ, Huang Z, Dong KF.

- Astragalus* polysaccharide ameliorates steroid-induced osteonecrosis of femoral head through miR-206/HIF-1 α /BNIP₃ axis[J]. The Kaohsiung Journal of Medical Sciences, 2021, 37(12): 1089-1100
- [24] Peng YH, Fang ZY, Liu M, Wang ZY, Li L, Ming SX, Lu CY, Dong H, Zhang WH, Wang Q, et al. Testosterone induces renal tubular epithelial cell death through the HIF-1 α /BNIP₃ pathway[J]. Journal of Translational Medicine, 2019, 17(1): 62
- [25] Runwal G, Stamatakou E, Siddiqi FH, Puri C, Zhu Y, Rubinsztein DC. LC3-positive structures are prominent in autophagy-deficient cells[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 10147
- [26] Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages[J]. Cell, 2004, 119(6): 753-766
- [27] Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouyssegur J, Mazure NM. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP₃ and BNIP3L via their BH₃ domains[J]. Molecular and Cellular Biology, 2009, 29(10): 2570-2581
- [28] Li Q, Ni Y, Zhang L, Jiang R, Xu J, Yang H, Hu Y, Qiu J, Pu L, Tang J, et al. HIF-1 α -induced expression of m6A reader YTHDF₁ drives hypoxia-induced autophagy and malignancy of hepatocellular carcinoma by promoting ATG2A and ATG14 translation[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2021, 6: 76