

鸟苷酸结合蛋白 5 在牛分枝杆菌诱导巨噬细胞极化过程中的作用

刘梦婷¹, 于有利², 潘家良¹, 黄群涛¹, 王洪生³, 任建鸾¹, 汤芳¹, 戴建君⁴, 薛峰^{*1}

1 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095

2 宁夏农林科学院动物科学研究所, 宁夏 银川 750002

3 中国医学科学院皮肤病研究所, 江苏 南京 210042

4 中国药科大学, 江苏 南京 211198

刘梦婷, 于有利, 潘家良, 黄群涛, 王洪生, 任建鸾, 汤芳, 戴建君, 薛峰. 鸟苷酸结合蛋白 5 在牛分枝杆菌诱导巨噬细胞极化过程中的作用[J]. 微生物学通报, 2023, 50(3): 1163-1178.

LIU Mengting, YU Youli, PAN Jialiang, HUANG Quntao, WANG Hongsheng, REN Jianluan, TANG Fang, DAI Jianjun, XUE Feng. Guanylate-binding protein 5 induces macrophage polarization to inhibit *Mycobacterium bovis*[J]. Microbiology China, 2023, 50(3): 1163-1178.

摘要:【背景】牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)是重要的人畜共患病病原体, 严重危害公共卫生安全。巨噬细胞是牛分枝杆菌感染的主要效应细胞, M1 型巨噬细胞极化对于宿主免疫防御 *M. bovis* 感染至关重要。【目的】探讨鸟苷酸结合蛋白 5 (guanylate-binding protein 5, GBP5)对 *M. bovis* 感染的小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 细胞 M1、M2 型极化的影响, 以及 GBP5 在 *M. bovis* 感染中的作用。【方法】通过前期转录组学数据分析筛选出差异基因 GBP5, 通过体内、体外验证 *M. bovis* 感染后的 GBP5 的表达水平。小干扰 RNA 下调细胞内 GBP5 表达, 分别利用 RT-qPCR、Western blotting 和流式细胞术检测 M1、M2 型巨噬细胞表面标志物表达变化; 平板菌落计数法检测 GBP5 对 *M. bovis* 在巨噬细胞中复制的影响; 双荧光素酶报告基因试验检测 GBP5 对信号转导及转录激活蛋白 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)转录调控; Western blotting 检测活性氧(reactive oxygen species, ROS)抑制后 STAT3 的磷酸化情况。【结果】GBP5 在 *M. bovis* 感染的 RAW264.7 细胞和 C57BL/6 小鼠组织中表达增加; 下调 GBP5 后细胞内细菌 CFU 在感染后不同时间点均显著增加, ROS 释放减少, M1 型巨噬细胞表面标志物表达减少, 但是对 M2 型巨噬细胞无显著影响; 下调 GBP5 后抑制了 STAT3 的转录启动。ROS 的产生抑制了 STAT3 的磷酸化。【结论】GBP5 促进 ROS 的产生, 调控 ROS/STAT3 通路, 促进巨噬细胞向 M1 型极化, 从而抑制细胞内牛分枝杆菌的存活。

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFD1800503)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1800503).

*Corresponding author. E-mail: xuefeng@njau.edu.cn

Received: 2022-11-16; Accepted: 2022-12-06; Published online: 2023-01-12

关键词：鸟苷酸结合蛋白 5；巨噬细胞；极化；牛分枝杆菌

Guanylate-binding protein 5 induces macrophage polarization to inhibit *Mycobacterium bovis*

LIU Mengting¹, YU Youli², PAN Jialiang¹, HUANG Quntao¹, WANG Hongsheng³, REN Jianluan¹, TANG Fang¹, DAI Jianjun⁴, XUE Feng^{*1}

1 College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

2 Institute of Animal Sciences, Ningxia Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Yinchuan 750002, Ningxia, China

3 Institute of Dermatology, Chinese Academy of Medical Sciences, Nanjing 210042, Jiangsu, China

4 China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, Jiangsu, China

Abstract: [Background] *Mycobacterium bovis*, a major zoonotic pathogen, seriously endangers public health. Macrophages are the main effector cells of *M. bovis* infection. The polarization of macrophages into M1 type is of great significant for the host immune defense against *M. bovis* infection. [Objective] To explore the effect of guanylate-binding protein 5 (GBP5) on the M1/M2 polarization of mouse mononuclear macrophage RAW264.7 cells infected with *M. bovis*, and reveal the role of GBP5 in *M. bovis* infection. [Methods] GBP5 was screened out as differentially expressed gene by preliminary transcriptomic data analysis. The increased expression level of GBP5 after *M. bovis* infection was verified *in vivo* and *in vitro*. The expression of GBP5 was down-regulated in the cells by siRNA, and then the surface markers of M1 and M2 macrophages were detected by RT-qPCR, Western blotting, and flow cytometry. The effect of GBP5 on *M. bovis* replication in macrophages was examined via plate colony counting method. The regulation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) transcription by GBP5 was verified by dual-luciferase reporter system. Phosphorylation of STAT3 was detected by Western blotting after inhibition on the release of reactive oxygen species. [Results] The expression of GBP5 was up-regulated in RAW264.7 cells and C57BL/6 mouse tissue after *M. bovis* infection. The down-regulation of GBP5 expression significantly increased the intracellular colony forming units (CFU) of *M. bovis* at different time points, reduced the release of ROS, and inhibited the surface markers of M1 macrophages. Otherwise, it exerted no significant effect on M2 macrophages. In addition, the down-regulation of GBP5 inhibited the transcription of STAT3. ROS production inhibited the phosphorylation of STAT3. [Conclusion] GBP5 can promote ROS production and regulate ROS/STAT3 pathway to promote the polarization of macrophages into M1 type, thereby inhibiting the survival of *M. bovis* in cells.

Keywords: guanylate-binding protein 5 (GBP5); macrophages; polarization; *Mycobacterium bovis*

牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)是结核分枝杆菌复合群的成员之一，同结核分枝杆菌有 99%以上的遗传一致性^[1]。*M. bovis* 宿主广泛，可感染人类、各种家畜、非人灵长类动物

及野生动物等^[2]。人类通过采食未经消毒的乳制品或气溶胶感染 *M. bovis*，其严重威胁人类健康，也给全球养殖业造成重大的经济损失，是全球实现消灭结核病目标的障碍^[3]。

M. bovis 通过破坏宿主保护性免疫反应持续存在于宿主的单核吞噬细胞中, 特别是巨噬细胞。巨噬细胞是宿主清除 *M. bovis* 的主要效应细胞, 是高度可塑性的, 在机体先天性和获得性免疫应答中发挥重要作用^[4]。巨噬细胞极化指巨噬细胞被病原微生物、炎症反应、细胞因子或一些理化因素刺激后, 根据对各种刺激的不同反应, 主要分化为经典活化的 M1 型(classical activated macrophage, M1 型)和选择性活化的 M2 型(alternative activated macrophage, M2 型)^[5-6]。在干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)和脂多糖的刺激下, 巨噬细胞从初始状态可分化为 M1 型巨噬细胞, 促进 Th1 型免疫应答, 分泌大量的促炎因子和趋化因子, 具有很强的杀菌能力; 而白介素-4 (interleukin-4, IL-4)和白介素-13 (interleukin-13, IL-13)诱导的 M2 型巨噬细胞能够产生少量的炎症细胞因子, 如白介素-10 (interleukin-10, IL-10)和白介素-12 (interleukin-12, IL-12), 参与组织重塑和修复, 并表现出低的抗原提呈能力^[7]。近年来, 很多研究表明巨噬细胞极化在炎症、肿瘤、组织修复和代谢等病理生理过程中发挥着至关重要的作用^[8-9]。现有的关于巨噬细胞极化的研究已经确定了一些与 M1 极化相关的分子和信号通路。有研究表明, 减毒结核分枝杆菌菌株 H37Ra 感染骨髓来源巨噬细胞(bone marrow-derived macrophages, BMDMs)和 RAW264.7 细胞后, M1 相关分子的表达量升高, M1 极化巨噬细胞的内质网(endoplasmic reticulum, ER)应激显著增加, 有效去除了细胞内结核分枝杆菌^[10]。*M. bovis* 感染的急性炎症反应中, 巨噬细胞能够在分枝杆菌产生的 IFN- γ 的作用下极化为 M1 型, 发挥显著的抗菌作用^[11]。在结核分枝杆菌感染期间, 上调 KLF4 和 CREB-C/EBP β 促进巨噬细胞向 M2 型极化, 有利于巨噬细胞中结核分枝杆菌的存活^[12]。M1、

M2 型巨噬细胞的极化在 *M. bovis* 感染中的作用也受到越来越多的关注^[13]。

鸟苷酸结合蛋白(guanylate binding proteins, GBPs)是一大类干扰素诱导的 GTPase 家族^[14], 在抗病毒和细菌感染方面具有重要作用^[15-16]。鸟苷酸结合蛋白 5 (guanylate-binding protein 5, GBP5)属于 GTPase 家族, 主要由干扰素- γ 诱导, 参与炎症小体激活及多种病原微生物的细胞先天免疫应答过程^[17], 在介导细胞自主防御细胞内病原体等方面具有重要作用^[18]。有文献报道, GBP5 促进 NLRP3-ASC 组装到活细菌及其细胞壁成分以激活 caspase-1 切割和 IL-1 β /IL-18 分泌^[19]。在流产布鲁氏菌感染过程中, GBP5 介导 caspase-11 激活, 促进 Gasdermin-D (GSDMD) 依赖性细胞焦亡, 从而抑制流产布鲁氏菌感染^[20]。GBP5 通过诱导弗朗西斯菌 DNA 释放促进 AIM2 炎症小体的活化^[21]。GBP5 通过激活 calpain/caspase-12/caspase-3 和 TNF- α /caspase-8/caspase-3 信号通路诱导肝细胞凋亡并进一步诱导肝损伤和炎症反应^[22]。这些研究表明, GBP5 在细菌感染中具有重要的调节功能, 但 GBP5 在牛分枝杆菌感染过程中发挥的作用尚不清楚。

本研究通过 siRNA 干扰 GBP5 表达后探究其对 *M. bovis* 感染后巨噬细胞极化的影响, 并首次探讨 GBP5 对信号转导及转录激活蛋白 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)转录因子的调控作用, 以期对牛结核病的防治提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

牛分枝杆菌购自中国兽医药品监察所, 在含有 0.05%吐温-80 和 10%白蛋白-葡萄糖-过氧化氢酶添加剂的 Middlebrook 7H9 Broth 培养基中培养。在 37 °C 培养箱中持续生长 2-3 周至对

数生长中期。小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 RAW264.7 细胞系和乳仓鼠肾细胞 BHK21 细胞系由本实验室保存。4-6 周龄雌性 C57BL/6 小鼠购买于扬州大学实验动物中心。置于江苏省疾病预防控制中心三级实验室中饲养, 温度为 20-22 °C, 湿度为 45%-50%, 自由饮食。动物实验通过南京农业大学实验动物伦理审查委员会 (PTA2019024) 审批, 符合动物伦理和福利要求。

DMEM 培养基、胎牛血清、PBS, Gibco 公司; Middlebrook 7H9 Broth、Middlebrook 7H10 琼脂, BD 公司; GBP5、诱导型-氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)抗体, Proteintech 公司; GAPDH、 α -tubulin 抗体, 爱必信(上海)生物科技有限公司; Arg1、TNF- α 、Mrc1、STAT3、P-STAT3 抗体, Cell Signaling Technology 公司; jetPRIME, 南京福麦斯生物科技有限公司; 双荧光素酶报告基因检测试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒、RIPA 裂解液、PMSF 和 ROS 检测试剂盒、N-乙酰半胱氨酸抗氧化剂, 上海碧云天生物技术有限公司; SYBR Premix *Ex Taq*TM (Perfect Real Time), TaKaRa 公司; ECL 试剂, 上海天能科技有限公司; CD86 (B7-2) Monoclonal Antibody (GL1), PE 和 CD206 (MMR) Monoclonal Antibody (MR6F3), APC, invitrogen 公司; E.Z.N.A Total RNA Kit I, Omega 公司。实时荧光定量仪, Thermo Fisher 公司; 多功能酶标仪, Tecan 公司; 凝胶成像系统, 上海天能科技有限公司; 流式细胞仪, BD biosciences 公司。

1.2 动物模型的建立

参考文献[23]构建体内模型。将 200 CFU 的 *M. bovis* 重悬于 50 μ L PBS 中, 然后将 50 μ L PBS 或 50 μ L *M. bovis* 菌悬液分别滴加到雌性 C57BL/6 小鼠两侧鼻腔中, 分成 2 组, 每组 10 只小鼠, 待其完全吸入后, 按每笼 5 只, 置于江苏省疾病预防控制中心三级实验室饲养, 温度为 20-22 °C, 湿度为 45%-50%, 自由饮食, 持续感染 6 周后处死小鼠, 摘取脾脏和肺脏进行后续实验。

1.3 设计 siRNA

通过上海吉玛公司构建 3 条 GBP5 siRNA, 见表 1。通过 RT-qPCR 和 Western blotting 验证干扰效率, 选择干扰效率最高的 siRNA 用于后续实验。

1.4 细胞转染

按照 1×10^6 个/孔将 RAW264.7 细胞接种在 6 孔细胞板中, 待生长至 70%-80%后, 按照说明书, 利用 jetPRIME 转染试剂将 GBP5 的小干扰 RNA (siGBP5-186、siGBP5-787 和 siGBP5-1029) 和空白对照组 (siCon) 分别转染到细胞中, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 36 h。

1.5 计算细菌 CFU

取生长对数期的 RAW264.7 细胞, 以 1×10^6 个/孔接种到 6 孔细胞板中, 培养细胞至 80%时, 转染 siCon 和 siGBP5 36 h 后, 以 MOI=10 的 *M. bovis* 分别感染 6、12、24 和 48 h 后, 弃掉上清, PBS 清洗 3 次, 加入 100 μ L 无菌水, 室温放置 10 min, 充分裂解细胞并吹打混

表 1 GBP5 和阴性对照的 siRNA 序列

Table 1 siRNA sequences of GBP5 and negative control

名称 Name	正链 Sense (5'→3')	反链 Antisense (5'→3')
siGBP5-186	GGUAGCCAUUGUGGGUCUUTT	AAGACCCACAAUGGCUACCTT
siGBP5-787	GCGCUUGGAAGUAAGCUUUTT	AAAGCUUACUCCAAGCGCTT
siGBP5-1029	GGAGAACUCUGCAGCAGUUTT	AACUGCUGCAGAGUUCUCCTT
siCon	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUUCGGAGAATT

匀后, 10 000×g 离心 10 min, 取上清。将上清稀释 100 倍后, 取 50 μL 涂布在 7H10 固体培养基上, 在 37 °C 培养箱中培养 3–4 周后, 计算细菌 CFU。

1.6 RT-qPCR

取生长对数期的 RAW264.7 细胞, 以 1×10^6 个/孔接种到 6 孔细胞板中, 培养细胞至 80% 时, 将细胞分为 siCon 组、siGBP5 组、siCon+*M. bovis* 组、siGBP5+*M. bovis* 组, 转染 36 h 后, *M. bovis* (MOI=10) 感染 24 h 后弃去培养液收集细胞, PBS 清洗 3 次。根据说明书, 使用 E.Z.N.A Total RNA Kit I 提取细胞总 RNA。使用多功能酶标仪测定 RNA 的浓度和纯度。使用 Step One Plus Real-Time PCR system 和 SYBR Premix *Ex Taq*TM 进行 RT-qPCR 扩增。最后采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 GBP5、IL-1β、IL-6、TNF-α、Mrc1、Fizz1、CD86、Arg1 和 iNOS 的相对表达水平, 使用引物设计软件 Primer 7.0 设计特异性荧光定量 PCR 引物, 引物由南京擎科生物技术有限公司合成(表 2)。

1.7 Western blotting

取生长对数期的 RAW264.7 细胞, 以 1×10^6 个/孔接种到 6 孔细胞板中, 培养细胞至 80% 时, 将细胞分为 siCon 组、siGBP5 组、siCon+*M. bovis* 组和 siGBP5+*M. bovis* 组。转染细胞 36 h 后, *M. bovis* 感染 24 h, 弃去培养液

收集细胞, PBS 清洗 3 次, 将 RIPA 裂解液和 10 μmol/L 的 PMSF 按 100:1 配制后, 在冰上裂解细胞样品。提取样品后静置 10 min, 以 15 000×g 离心 10 min 取上清。使用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白质定量。加入 5×的 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 100 °C 水浴 10 min。以每个样本 40 μg 蛋白量进行 SDS-PAGE 电泳, 将电泳完毕的蛋白样本转移至 PVDF 膜上, 在 5% 脱脂奶粉中室温封闭 2 h, 在稀释好的 Mrc1 (1:500)、GBP5 (1:1 000)、iNOS (1:500)、GAPDH (1:2 000) 一抗中于 4 °C 孵育过夜。随后 TBST 洗 3 次, 在二抗(1:5 000)中室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次后使用 ECL 试剂显影并通过凝胶成像系统拍照分析, 最后采用 Image J 软件分析蛋白灰度值。

1.8 免疫组化

将感染 200 CFU 的 *M. bovis* 或 PBS 处理 6 周后的小鼠脱颈处死后, 在超净台无菌分离小鼠的脾组织, 将 1/3 脾脏固定包埋后进行免疫组化染色。所有样品均按照说明书处理, GBP5 一抗(1:2 000) 4 °C 孵育过夜, 二抗(1:1 000) 孵育 30 min, DAB 显色、脱水、封片。GBP5 蛋白阳性表现为胞质内出现棕黄色颗粒。

1.9 流式细胞术

取生长对数期的 RAW264.7 细胞, 以 1×10^6 个/孔接种到 6 孔细胞板中, 培养细胞至

表 2 实时荧光定量 RT-qPCR 引物

Table 2 Primers used for quantitative PCR

基因 Gene	上游引物 Forward primer (5'→3')	下游引物 Reverse primer (5'→3')
<i>GBP5</i>	GAACGCCAAAGAAACAGTGAG	GAATAGCCTCCAACCTCTGTG
<i>Actin</i>	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTCACGCACGAT
<i>iNOS</i>	CAAGCACCTTGGAAGAGGAG	AAGGCCAAACACAGCATAACC
<i>IL-6</i>	GAGGATACCACTCCCAACAGACC	AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA
<i>TNF-α</i>	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG
<i>Arg1</i>	AACACGGCAGTGGCTTTAACC	GGTTTTTCATCTGGCGCATTC
<i>IL-1β</i>	ATCTCGCAGCAGCACATCAA	ACGGGAAAGACACAGGTAGC
<i>CD86</i>	CAACGGAATTAGGAAGAC	CTCTGTATGCAAGTTTCC
<i>Fizz1</i>	CCAATCCAGCTAACTATCCCTCC	ACCCAGTAGCAGTCATCCCA
<i>Mrc1</i>	CTCTGTTTCAGCTATTGGACGC	CGGAATTCTGGGATTCAGCTTC

80%时,将细胞分为 siCon 组、siGBP5 组、siCon+*M. bovis* 组、siGBP5+*M. bovis* 组。转染细胞 36 h, *M. bovis* 感染 24 h 后收集各组的细胞。用 PBS 清洗 1 次后,使用 4%多聚甲醛固定 10 min,避光孵育流式抗体 APC-CD206 和 PE-CD86,使用流式细胞仪检测各组细胞 CD86 和 CD206 的表达水平,每组细胞设置 3 个复孔。

1.10 活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测

取生长对数期的 RAW264.7 细胞,以 1×10^6 个/孔接种到 6 孔细胞板中,培养细胞至 70%–80%时,将细胞分为 siCon 组、siGBP5 组、siCon+*M. bovis* 组、siGBP5+*M. bovis* 组。转染细胞 36 h, *M. bovis* 分别感染 6 h 和 24 h 后,按照 ROS 检测试剂盒的使用说明处理细胞后,多功能酶标仪激发波长为 488 nm,发射波长为 525 nm,计算 ROS 释放水平。

1.11 双荧光素酶报告基因实验

取生长对数期的 BHK21 细胞,以 1×10^6 个/孔接种在 6 孔细胞板中,生长至 70%–80%后,按以下分组:(1)空白组:mock;(2)对照组:pSTAT3-TA-luc+pRL-TK;(3)实验组:pSTAT3-TA-luc+pRL-TK+siCon 和 pSTAT3-TA-luc+pRL-TK+siGBP5 进行实验,在使用 JetPRIME 转染试剂与 siCon、siGBP5、pSTAT3-TA-luc 和 pRL-TK 共转染 36 h 后收集细胞。按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒的说明,使用双荧光素酶/海肾测定系统测定报告基因的活性,海肾荧光素酶表达质粒 pRL-TK 用作内部对照以标准化转染效率。结果表示为相对荧光素酶活性。

1.12 统计学处理

统计数据使用平均值 \pm 标准差($\bar{X} \pm SD$)表示。采用 GraphPad Prism 9.0.0 作图,以 One-way ANOVA 进行统计分析。 $P < 0.05$ 被认为具有统计学显著差异。

2 结果与分析

2.1 *M. bovis* 感染 RAW264.7 细胞后 GBP5 表达量变化

以 MOI 为 10 的 *M. bovis* 分别感染 RAW264.7 细胞不同时间点(0、6、24 和 48 h)或用不同 MOI (0、1、10 和 50)的 *M. bovis* 感染 24 h 后,通过 RT-qPCR 检测感染后 GBP5 的 mRNA 水平。结果如图 1 所示,感染 *M. bovis* 不同时间点或不同 MOI 的 *M. bovis* 后 GBP5 的表达量均明显升高,其中,MOI 为 10 感染 24 h 时表达量最高。

2.2 *M. bovis* 感染 C57BL/6 小鼠的脾脏中 GBP5 表达量变化

通过 RT-qPCR 方法检测不同处理组中脾脏组织内 GBP5 的表达水平。如图 2A 所示,相较于 PBS 组,GBP5 的 mRNA 水平在感染 *M. bovis* 6 周后的小鼠脾脏组织中显著上调($P < 0.001$)。如图 2B 和 2C 的免疫组化结果所示,与 PBS 组相比,*M. bovis* 感染的脾脏组织中 GBP5 蛋白表达上调。

2.3 GBP5 对 *M. bovis* 在巨噬细胞中复制的影响

通过 Western blotting 和 RT-qPCR 检测 GBP5 3 条 siRNA 的干扰效果。如图 3 所示,与 siCon 组相比,siGBP5-186 组 GBP5 的表达量下调最显著,因此选取 siGBP5-186 用于后续的实验。以 MOI 为 10 的 *M. bovis* 分别感染转染 siGBP5 和 siCon 的 RAW264.7 细胞 6、12、24 和 48 h 后,计算细胞内的细菌 CFU。如图 4 所示,与 siCon 组相比,下调 GBP5 后细胞内细菌 CFU 在感染后不同时间均显著增加。表明在 *M. bovis* 感染过程中 GBP5 可促进巨噬细胞抑制 *M. bovis* 增殖的作用。

2.4 GBP5 对 *M. bovis* 感染巨噬细胞极化表型的影响

由于下调 GBP5 表达后增加了胞内细菌

CFU。因此,为进一步探究 GBP5 是否通过巨噬细胞极化影响 *M. bovis* 感染后胞内存活的情况,检测了 *M. bovis* 感染后巨噬细胞极化表型的表面标志物。*M. bovis* (MOI=10)感染下调 GBP5 的 RAW264.7 细胞 24 h 后,通过 RT-qPCR 检测 M1 巨噬细胞标志物如 iNOS、白介素-1 β (interleukin-1beta, IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (tumour necrosis factor alpha, TNF- α)、IL-6 和白细胞分化抗原 86 (cluster of differentiation, CD86), 以及 M2 巨噬细胞标志物如精氨酸酶 1 (arginase 1, Arg1)、组织炎症区域分子 1 (found in inflammatory zone 1, Fizz1)和甘露糖受体 C1 (mannose receptor 1, Mrc1)的 mRNA 水平,通过 Western blotting 检测 M1 巨噬细胞标志物 iNOS、TNF- α 和 M2 巨噬细胞标志物 Mrc1、Arg1 的蛋白水平。通过流式细胞术检测 M1 巨噬细胞表面标志物 CD86 和 M2 巨噬细胞

表面标志物 CD206 的阳性细胞比例。如图 5A 所示,RT-qPCR 结果表明,下调 GBP5 表达后, iNOS、TNF- α 、IL-1 β 、CD86 和 IL-6 的 mRNA 表达水平显著下调($P<0.01$), 而 Arg1、Mrc1、fizz1 的表达量增加,无显著性差异。如图 5B 所示,Western blotting 结果表明,下调 GBP5 后, iNOS 和 TNF- α 蛋白水平显著下降($P<0.01$), 而 Mrc1、Arg1 的蛋白水平增加。通过流式细胞术检测 CD86 和 CD206 阳性细胞比例发现,与对照组相比,下调 GBP5 表达后下调了 CD86 阳性细胞比例($P<0.01$), 而对 CD206 阳性细胞无显著影响。以上结果表明下调 GBP5 后抑制了 *M. bovis* 感染后的 RAW264.7 细胞向 M1 型极化,但是对 M2 巨噬细胞极化无显著影响,GBP5 主要促进 M1 巨噬细胞极化,从而抑制 *M. bovis* 在细胞内存活。

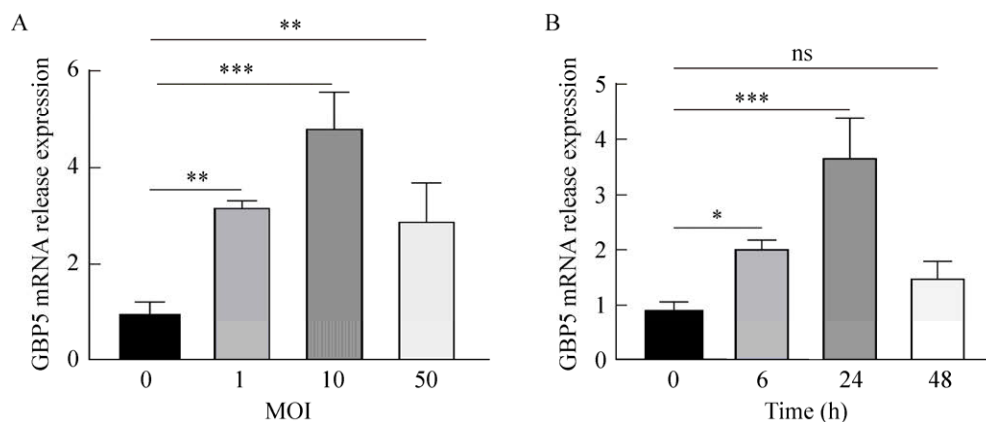


图 1 *Mycobacterium bovis* 感染 RAW264.7 细胞后 GBP5 的表达量 A: 以 0、1、10 和 50 的 MOI 感染 *M. bovis* 24 h 的 RAW264.7 细胞中 GBP5 的 RT-qPCR 分析结果. B: 在 MOI 为 10 的情况下感染 *M. bovis* 0、6、24 和 48 h RAW264.7 细胞中 GBP5 的 RT-qPCR 分析结果. 至少 3 次独立实验的平均值为 \pm 标准差. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ns: 无显著性

Figure 1 Expression of GBP5 in RAW264.7 cells infected by *Mycobacterium bovis*. A: RT-qPCR analysis of GBP5 in RAW264.7 cells infected with *M. bovis* at MOI of 0, 1, 10 and 50 respectively for 24 h. B: RT-qPCR analysis of GBP5 in RAW264.7 cells infected with *M. bovis* at MOI of 10 for 0, 6, 24 and 48 h respectively. Values are recorded as mean \pm SD for at least three independent replicates. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ns: No significance.

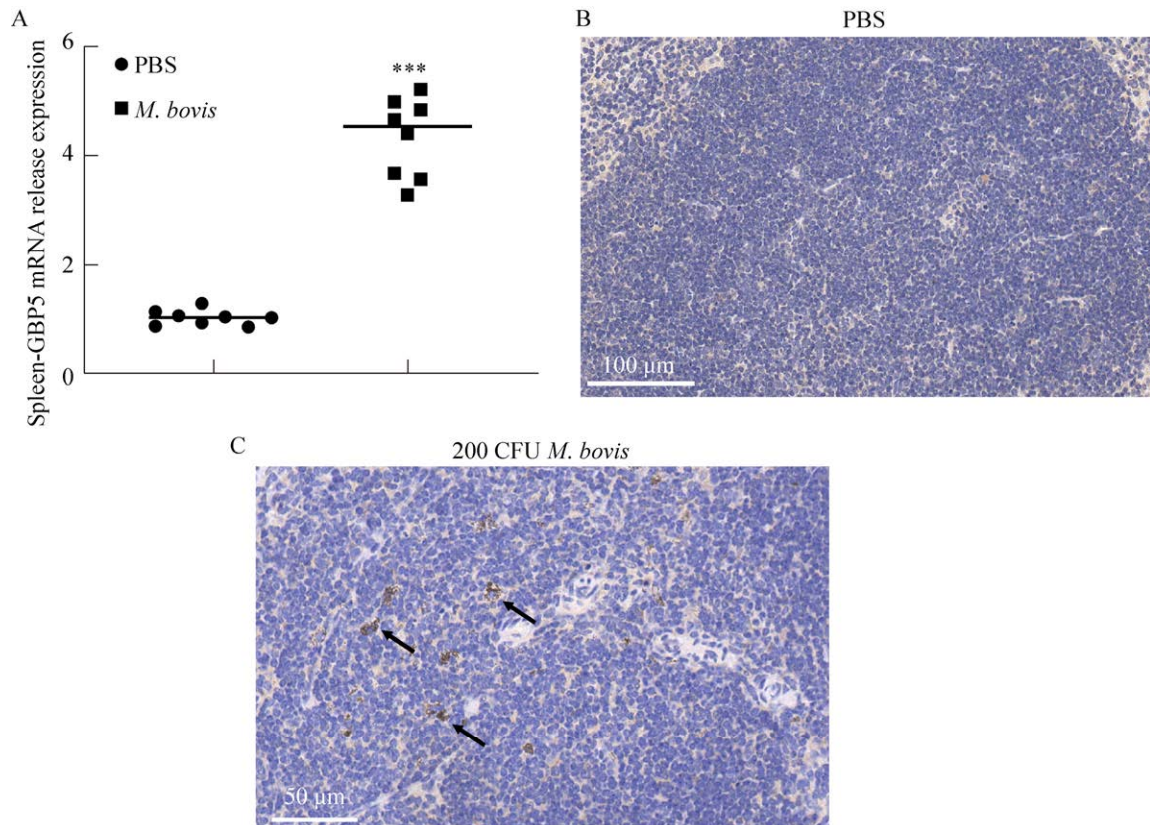


图 2 *Mycobacterium bovis* 感染小鼠后脾脏中的 GBP5 表达检测结果 用 200 CFU *M. bovis* 和等剂量 PBS 处理 6 周后的小鼠脾脏中 GBP5 的表达. A: RT-qPCR 检测小鼠脾脏中 GBP5 的 mRNA 水平. B: 免疫组织化学检测 PBS 处理后小鼠脾脏中 GBP5 表达水平. C: 免疫组织化学检测 *M. bovis* 感染小鼠脾脏中 GBP5 表达水平. 至少 3 次独立实验的平均值 \pm 标准差. ***: $P < 0.001$; ns: 无显著性

Figure 2 Detection of GBP5 expression in the spleens of *Mycobacterium bovis*-infected mice. A: The mRNA levels of GBP5 in mouse spleen by RT-qPCR. B: Immunohistochemical properties of GBP5 expression in PBS-treated mouse spleen. C: Immunohistochemical properties of GBP5 expression in *M. bovis*-infected mouse spleen. Values are recorded as mean \pm SD for at least three independent replicates. ***: $P < 0.001$; ns: No significance.

2.5 GBP5 对 *M. bovis* 感染巨噬细胞内 ROS 释放的影响

为揭示 GBP5 对 *M. bovis* 感染巨噬细胞后 ROS 释放的调控作用,以 MOI 为 10 的 *M. bovis* 分别感染转染 siGBP5 和 siCon 的 RAW264.7 细胞 24 h 后,检测 ROS 的释放水平.如图 6 所示,与 siCon+*M. bovis* 组相比, siGBP5+*M. bovis* 组 ROS 水平在感染 24 h 后显著降低($P < 0.01$),表明下调 GBP5 后能够抑制 ROS 的释放, GBP5

在 *M. bovis* 感染的过程中可促进 ROS 的释放。

2.6 GBP5 参与调控 STAT3 转录的启动子

STAT3 在巨噬细胞极化中发挥着重要作用,一些研究发现 IL-6/STAT3、TLR4/NF- κ B/STAT3 等通路影响巨噬细胞极化^[24-25]。因此,我们推测 GBP5 可能通过 STAT3 影响巨噬细胞极化。通过对 GBP5 和 STAT3 启动子结合位点预测,如表 3 所示,GBP5 可能对 STAT3 的转录启动子具有调控作用。最终通过双荧光素酶

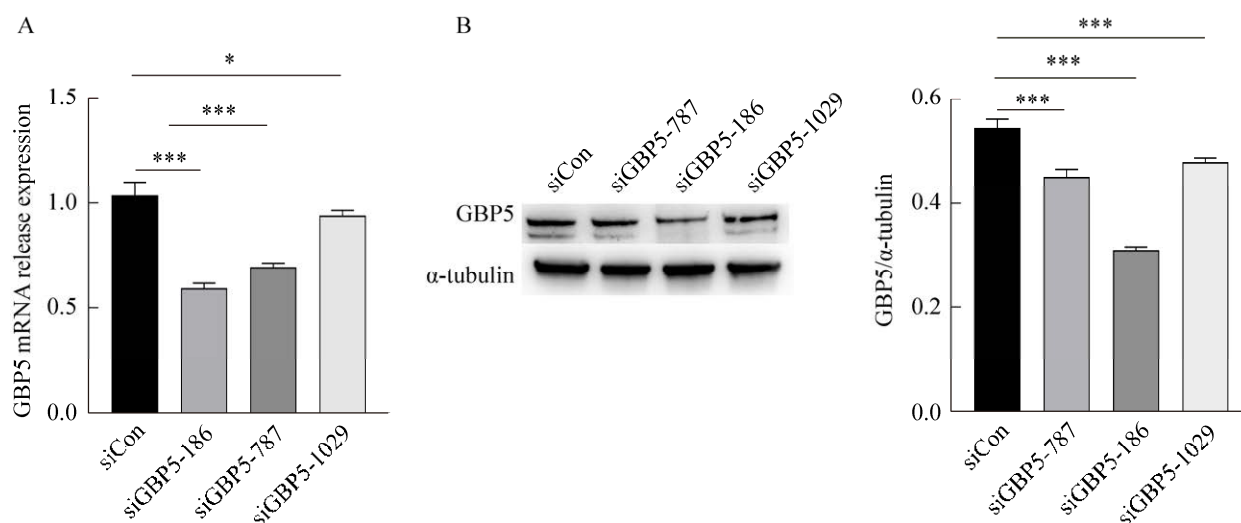


图 3 GBP5 干扰效果 A: 下调 GBP5 后, 检测 GBP5 的 mRNA 表达水平. B: Western blotting 检测 GBP5 蛋白表达水平. 至少 3 次独立实验的平均值为 \pm 标准差. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ns: 无显著性

Figure 3 The effect of knocking-down of GBP5. A: The mRNA level of GBP5 by RT-qPCR. B: The protein expression level of GBP5 by Western blotting. Values are recorded as mean \pm SD for at least three independent replicates. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ns: No significance.

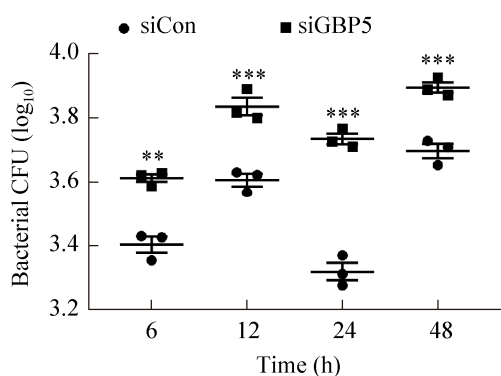


图 4 细菌 CFU 的计算结果 至少 3 次独立实验的平均值为 \pm 标准差. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ns: 无显著性

Figure 4 The calculation of the bacteria CFU. Values are recorded as mean \pm SD for at least three independent replicates. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ns: No significance.

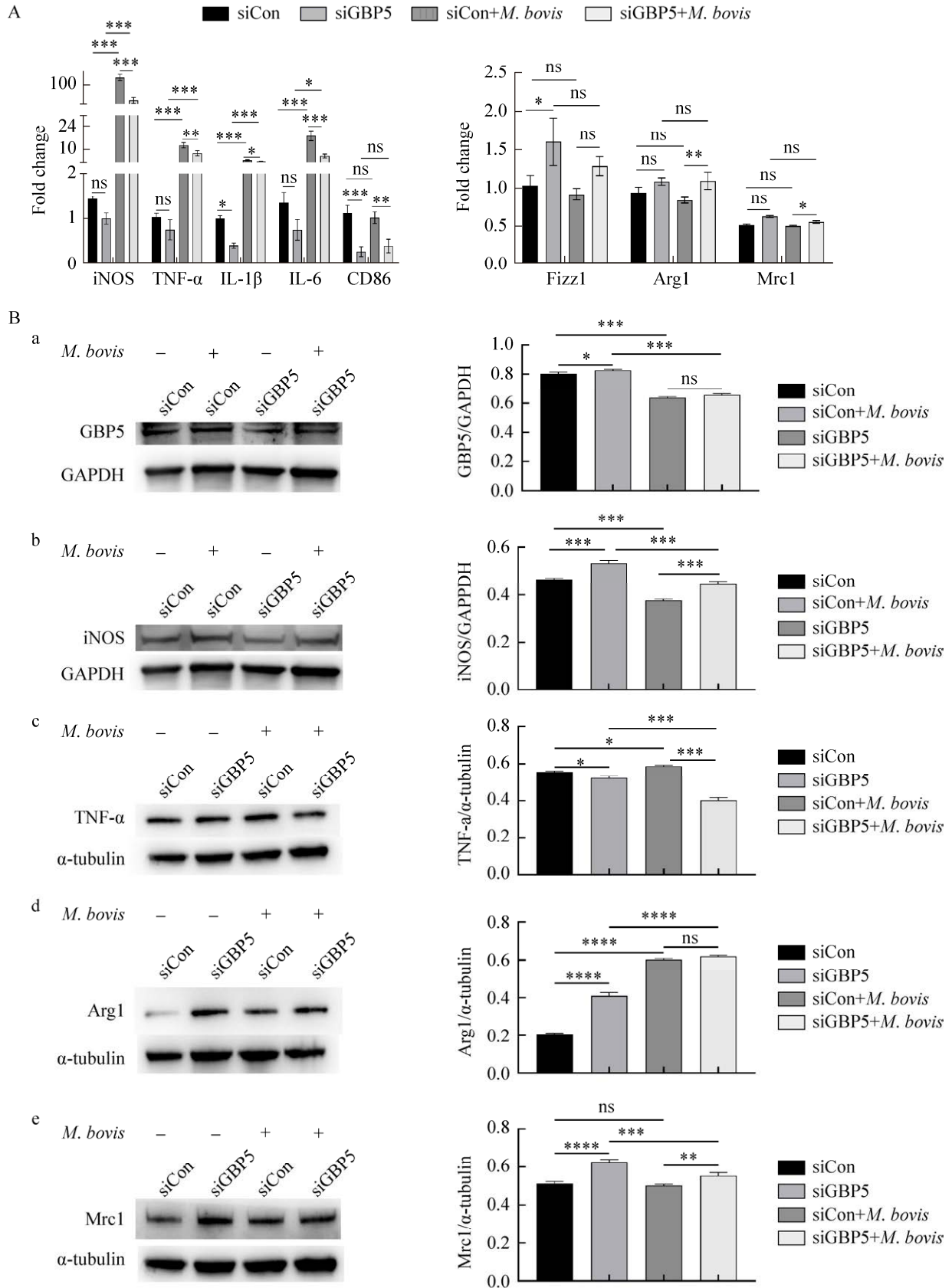
检测结果发现, 与 siCon 组相比, siGBP5 组的双荧光素酶活性相对值降低($P < 0.05$, 图 7), 表明 STAT3 启动子的转录被抑制, GBP5 对 STAT3 的转录启动存在正调控作用。

2.7 ROS 的产生影响 STAT3 磷酸化

有研究报道白屈黄碱提高细胞 ROS 水平, 导致内质网应激, 使 STAT3 失活^[26]。而且 GBP5 促进 ROS 的释放, 因此我们猜测 ROS 参与 STAT3 的磷酸化过程。用 ROS 抑制剂 NAC (浓度为 0、12.5、25、50、100 和 200 mmol/L) 处理 RAW264.7 细胞 1 h 后, 检测 ROS 的释放量, 发现 12.5 mmol/L 的 NAC 处理后 ROS 的释放量显著降低, 如图 8A 所示。Western blotting 检测结果发现, 在 NAC 的作用下 STAT3 的磷酸化(p-STAT3)被激活, 表明抑制 ROS 能够促进 STAT3 磷酸化(图 8B)。

3 讨论与结论

GBPs 以在病原体与宿主相互作用过程中参与宿主保护性免疫而闻名^[27], GBPs 家族的每个成员发挥的生物学功能并不相同。GBP5 在介导细胞自主防御细胞内病原体方面具有新型作



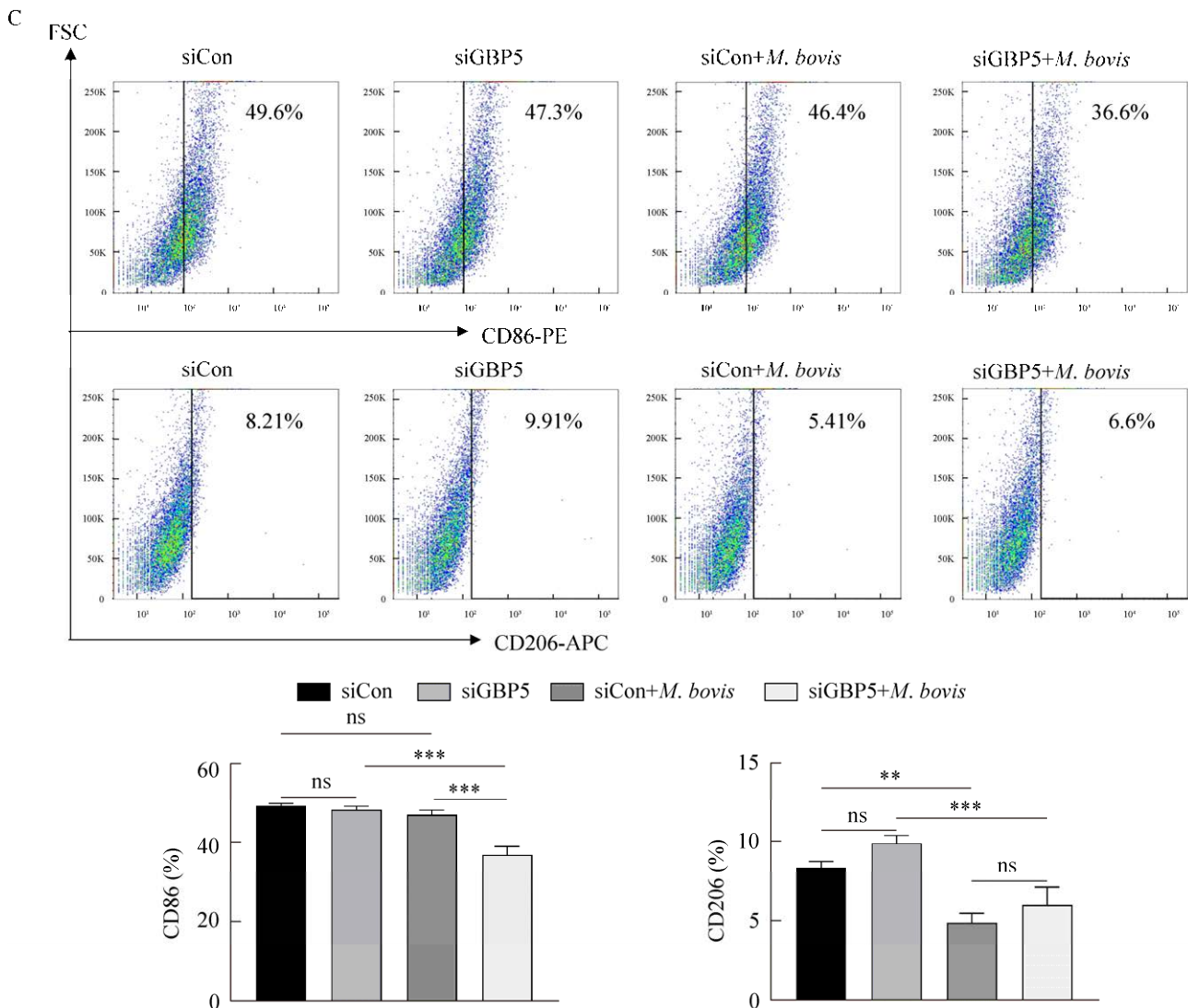


图5 *Mycobacterium bovis* 感染下调 GBP5 后 M1、M2 巨噬细胞标志物的检测结果 A: 下调 GBP5 并以 MOI=10 感染 *M. bovis* 的 RAW264.7 细胞中 GBP5、iNOS、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、CD86、Arg1、Fizz1 和 Mrc1 的 mRNA 表达情况. B: 下调 GBP5 并以 MOI=10 感染 *M. bovis* 24 h 的 RAW264.7 细胞的 GBP5 (图 a)、iNOS (图 b)、TNF- α (图 c)、Arg1 (图 d) 和 Mrc1 (图 e) 的蛋白水平表达情况. C: 流式细胞术检测下调 GBP5 并以 MOI=10 感染 *M. bovis* 的 RAW264.7 细胞中的 CD86 或 CD206 阳性细胞. 至少 3 次独立实验的平均值为 \pm 标准差. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ns: 无显著性

Figure 5 Detection of M1 and M2 markers after *Mycobacterium bovis* infection was interfered with GBP5. A: mRNA levels of GBP5, iNOS, TNF- α , IL-6, IL-1 β , CD86, Arg1, Fizz1 and Mrc1 by RT-qPCR in RAW264.7 cells interfered with GBP5 and infected with *M. bovis* of MOI=10 for 24 h. B: Protein expression levels of GBP5 (a), iNOS (b), TNF- α (c), Arg1 (d) and Mrc1 (e) by Western blotting and protein grayscale analysis in RAW264.7 cells interfering with GBP5 and infected with *M. bovis* of MOI=10 for 24 h. C: Flow cytometry of CD86 or CD206 positive cells in RAW264.7 cells interfering with GBP5 and then infected with *M. bovis* of MOI=10 for 24 h. Values are recorded as mean \pm SD for at least three independent replicates. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ns: No significance.

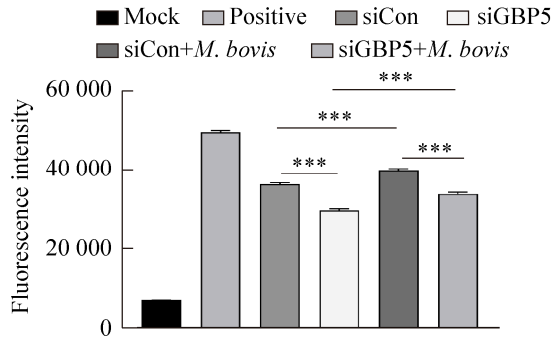


图 6 *Mycobacterium bovis* 感染下调 GBP5 的 RAW264.7 细胞后 ROS 的释放检测结果 至少 3 次独立实验的平均值为±标准差. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ns: 无显著性

Figure 6 The release of ROS by RAW264.7 cells that was interfered with GBP5 and infected *Mycobacterium bovis*. Values are recorded as mean±SD for at least three independent replicates. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ns: No significance.

用,GBP5 通过减少细胞融合抑制泰国伯克霍尔德菌(*Burkholderia thailandensis*)复制,从而有利于骨髓来源的巨噬细胞和小鼠抵抗细菌感染^[28]。同时,GBP5 促进宿主防御鼠伤寒沙门氏菌的感染^[29]。这些研究表明 GBP5 有着重要的抑菌作

用,但 GBP5 对 *M. bovis* 感染作用的研究却鲜有报道。在本研究中,我们通过转录组数据筛选出差异基因 GBP5,用 *M. bovis* 感染 C57BL/6 小鼠和 RAW264.7 细胞,验证了 GBP5 在 *M. bovis* 感染后显著增加。下调 GBP5 的表达后,细胞内 *M. bovis* 的 CFU 增加,这与已有研究^[28-29]中报道的 GBP5 抑制鼠伤寒沙门氏菌、泰国伯克霍尔德菌感染的结果一致,说明 GBP5 抑制细胞内 *M. bovis* 的存活。

在 *M. bovis* 感染过程中,M1 型巨噬细胞通常被认为是有效的效应细胞,可分泌大量促炎细胞因子,具有重要的抗菌作用和肿瘤杀伤能力^[30]。在 *M. bovis* 的急性炎症反应期间,巨噬细胞通常在 Th1 型免疫应答中产生的 PRR 和 IFN- γ 的作用下极化为 M1 型,并发挥有效的抗菌作用^[31]。我们的研究也证明了这一点,在 *M. bovis* 感染时,M1 型巨噬细胞表面标志物增加,而下调 GBP5 时,*M. bovis* 感染后 M1 型巨噬细胞表面标志物表达显著下调,这些结果表明 GBP5 通过促进巨噬细胞向 M1 型极化增强其清除胞内 *M. bovis* 能力。

表 3 GBP5 和 STAT3 启动子结合位点预测结果

Table 3 Prediction for binding sites of GBP5 and STAT3 promoters

名称	得分	序列号	开始	结束	有义链	预测序列
Name	Score	Sequence ID	Start	End	Strand	Predicted sequence (5'→3')
MA0144.1.Stat3	10.882 29	NC_000069.7:142202695-142228105	2 187	2 196	+	TGCCAGGAAT
MA0144.1.Stat3	9.758 97	NC_000069.7:142202695-142228105	332	341	-	TGCCAAGAAG
MA0144.1.Stat3	9.570 81	NC_000069.7:142202695-142228105	2 246	2 255	-	TGCCAGAAAG
MA0144.1.Stat3	9.547 31	NC_000069.7:142202695-142228105	2 568	2 577	+	TTCCAGGACA
MA0144.1.Stat3	9.313 19	NC_000069.7:142202695-142228105	473	482	+	TGTCGGGAAG
MA0144.1.Stat3	8.834 81	NC_000069.7:142202695-142228105	1 321	1 330	+	TTGTAGGAAG
MA0144.1.Stat3	7.694 63	NC_000069.7:142202695-142228105	246	255	-	TAACAGGAAA
MA0144.1.Stat3	7.246 58	NC_000069.7:142202695-142228105	2 567	2 576	-	GTCCTGGAAC
MA0144.1.Stat3	6.957 93	NC_000069.7:142202695-142228105	2 186	2 195	-	TTCTGGCAC
MA0144.1.Stat3	6.954 51	NC_000069.7:142202695-142228105	712	721	-	GCCCAGGAAA
MA0144.1.Stat3	6.758 33	NC_000069.7:142202695-142228105	2 248	2 257	+	TTCTGGCAAG
MA0144.1.Stat3	6.158 89	NC_000069.7:142202695-142228105	121	130	+	ATCCAGGATG

+: 正链; -: 反链

+: Sense; -: Antisense.

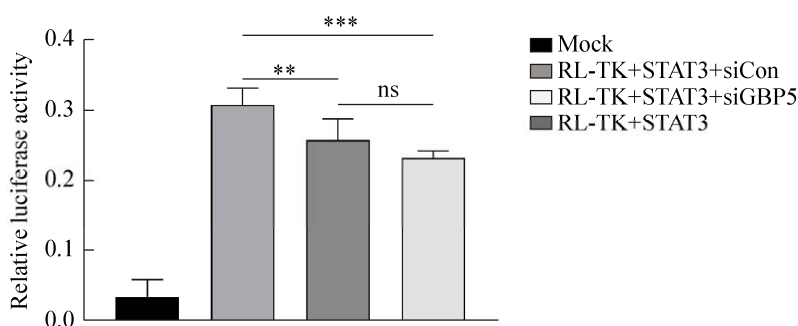


图 7 双荧光素酶活性检测 STAT3 转录情况结果 至少 3 次独立实验的平均值为 \pm 标准差. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ns: 无显著性

Figure 7 The relative luciferase activity of the transcription of STAT3. Values are recorded as mean \pm SD for at least three independent replicates. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ns: No significance.

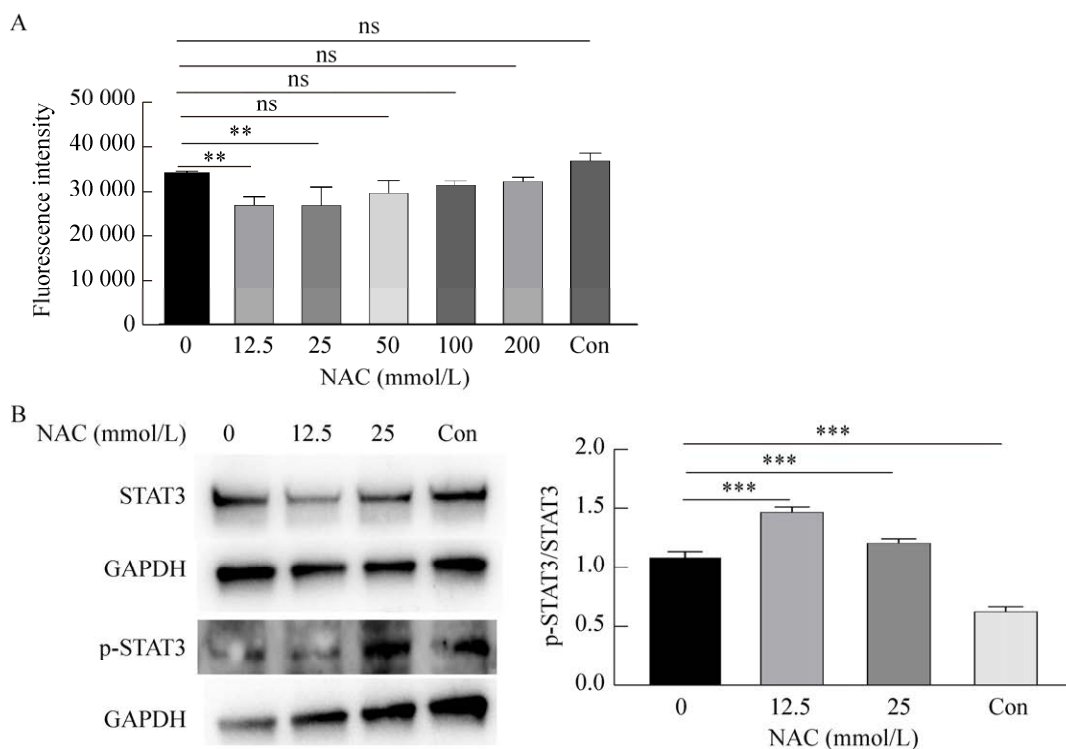


图 8 抑制 ROS 后 STAT3 磷酸化检测结果 A: 用 0、12.5、25、50、100 和 200 mmol/L 的 NAC 抑制 RAW264.7 细胞中 ROS 释放 1 h 的结果. B: 用 0、12.5 和 25 mmol/L 的 NAC 抑制 1 h 后 STAT3 磷酸化的蛋白质印迹和蛋白质灰度分析结果. 至少 3 次独立实验的平均值为 \pm 标准差. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ns: 无显著性

Figure 8 The phosphorylation of STAT3 after inhibition of ROS. A: ROS release in RAW264.7 cells inhibited with NAC at respectively 0, 12.5, 25, 50, 100 and 200 mmol/L for 1 h. B: Western blotting and protein grayscale analysis of P-STAT3/STAT3 after inhibited with NAC at respectively 0, 12.5 and 25 mmol/L for 1 h. Values are recorded as mean \pm SD for at least three independent replicates. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ns: No significance.

炎症反应是宿主先天免疫系统针对有害刺激的一种进化保守的保护反应^[32], 对于控制结核分枝杆菌感染起着至关重要的作用, 在结核分枝杆菌感染初期, 炎症环境更有利于结核分枝杆菌的控制^[33]。据报道, ROS 能够损害溶酶体并阻断巨噬细胞中的自噬通量, 促进巨噬细胞向 M1 表型极化, 从而促进炎症反应^[34]。在本研究中, 我们发现下调 GBP5 表达后可减少 ROS 的释放, 所以 GBP5 可能促进 ROS 的释放来进一步促进 M1 表型极化, 从而促进炎症反应, 控制牛分枝杆菌。目前, 巨噬细胞极化涉及的信号通路主要包括 JAK/STAT 通路、干扰素调节因子(interferon regulatory factors, IRFs) 通路、PI3K/Akt 通路、Notch 信号通路等, 还有一些调控巨噬细胞极化的关键转录因子如 NF- κ B、AP-1、PPAR- γ 等^[35-36]。STAT3 是信号转导和转录家族激活因子的成员, 通过控制细菌生长和抑制细胞凋亡参与宿主对细菌感染的免疫过程, STAT3 通路已被证明在脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、INF- γ 和其他细胞因子触发的炎症信号级联反应中起着核心作用, 在幽门螺杆菌、沙门氏菌、结核分枝杆菌等细菌感染过程中发挥重要作用^[37]。通过对 GBP5 和 STAT3 启动子的结合位点进行预测, 双荧光素酶报告基因系统检测 STAT3。结果表明, 下调 GBP5 后可抑制 STAT3 转录因子启动子的激活, 表明 GBP5 对 STAT3 转录的启动有正调控作用。有研究报道, Nox2 通过诱导线粒体活性氧的产生来抑制细胞核中的 STAT3 的磷酸化^[38]。我们通过 NAC 抑制细胞内 ROS 的释放, 证明了抑制 ROS 能够促进 STAT3 的磷酸化。因此, 猜测 GBP5 可能通过 ROS/STAT3 通路促进 *M. bovis* 感染后的巨噬细胞 M1 型极化, 增强巨噬细胞的杀菌能力。然而, GBP5 具体如何调控 ROS/STAT3 通路还有待进一步的研究。

综上所述, 本研究初步探讨 GBP5 在抵抗 *M. bovis* 感染中参与宿主巨噬细胞的细胞内免疫应答的作用, 揭示了 GBP5 在 *M. bovis* 感染过程中通过促进 ROS 释放介导 ROS/STAT3 途径, 从而促进 M1 巨噬细胞极化, 抑制 *M. bovis* 在细胞胞内的增殖。这为后续进一步深入探讨 GBP5 的抗感染机制奠定了基础, 同时也为靶向 *M. bovis* 感染的药物筛查和治疗提供了新思路。

REFERENCES

- [1] GRANGE JM, YATES MD. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection[J]. *Veterinary Microbiology*, 1994, 40(1/2): 137-151.
- [2] CHENG GY, HUSSAIN T, SABIR N, NI JM, LI MX, ZHAO DM, ZHOU XM. Comparative study of the molecular basis of pathogenicity of *M. bovis* strains in a mouse model[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 20(1): 5.
- [3] LAN ZY, BASTOS M, MENZIES D. Treatment of human disease due to *Mycobacterium bovis*: a systematic review[J]. *The European Respiratory Journal*, 2016, 48(5): 1500-1503.
- [4] XU GH, WANG J, GAO GF, LIU CH. Insights into battles between *Mycobacterium tuberculosis* and macrophages[J]. *Protein & Cell*, 2014, 5(10): 728-736.
- [5] MOSSER DM, EDWARDS JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2008, 8(12): 958-969.
- [6] ATRI C, GUERFALI FZ, LAOUINI D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(6): 1801.
- [7] TAKEUCHI O, AKIRA S. Epigenetic control of macrophage polarization[J]. *European journal of immunology*, 2011, 41(9): 2490-2493.
- [8] WANG L, ZHANG HS, SUN LY, GAO W, XIONG Y, MA AY, LIU XL, SHEN L, LI Q, YANG H. Manipulation of macrophage polarization by peptide-coated gold nanoparticles and its protective effects on acute lung injury[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2020, 18(1): 38.
- [9] ZHAO SL, MI YS, GUAN BJ, ZHENG BB, WEI P, GU YZ, ZHANG ZX, CAI SJ, XU Y, LI XX, HE XF, ZHONG XY, LI GC, CHEN ZY, LI DW. Tumor-derived

- exosomal miR-934 induces macrophage M2 polarization to promote liver metastasis of colorectal cancer[J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2020, 13(1): 156.
- [10] LIM YJ, YI MH, CHOI JA, LEE J, HAN JY, JO SH, OH SM, CHO HJ, KIM DW, KANG MW, SONG CH. Roles of endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in M1-polarized macrophages during mycobacterial infections[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 37211.
- [11] ANDRADE MR, AMARAL EP, RIBEIRO SC, ALMEIDA FM, PERES TV, LANES V, D'IMPÉRIO-LIMA MR, LASUNSKAIA EB. Pathogenic *Mycobacterium bovis* strains differ in their ability to modulate the proinflammatory activation phenotype of macrophages[J]. *BMC Microbiology*, 2012, 12: 166.
- [12] SAHU SK, KUMAR M, CHAKRABORTY S, BANERJEE SK, KUMAR R, GUPTA P, JANA K, GUPTA UD, GHOSH Z, KUNDU M, BASU J. MicroRNA 26a (miR-26a)/KLF4 and CREB-C/EBP β regulate innate immune signaling, the polarization of macrophages and the trafficking of *Mycobacterium tuberculosis* to lysosomes during infection[J]. *PLoS Pathogens*, 2017, 13(5): e1006410.
- [13] YANG JM, ZHU Y, DUAN DY, WANG PP, XIN YJ, BAI L, LIU YY, XU Y. Enhanced activity of macrophage M1/M2 phenotypes in periodontitis[J]. *Archives of Oral Biology*, 2018, 96: 234-242.
- [14] VESTAL DJ, JEYARATNAM JA. The guanylate-binding proteins: emerging insights into the biochemical properties and functions of this family of large interferon-induced guanosine triphosphatase[J]. *Journal of Interferon & Cytokine Research: the Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 2011, 31(1): 89-97.
- [15] BRAUN E, HOTTER D, KOEPKE L, ZECH F, GROB R, SPARRER KMJ, MÜLLER JA, PFALLER CK, HEUSINGER E, WOMBACHER R, SUTTER K, DITTMER U, WINKLER M, SIMMONS G, JAKOBSEN MR, CONZELMANN KK, PÖHLMANN S, MÜNCH J, FACKLER OT, KIRCHHOFF F, SAUTER D. Guanylate-binding proteins 2 and 5 exert broad antiviral activity by inhibiting furin-mediated processing of viral envelope proteins[J]. *Cell Reports*, 2019, 27(7): 2092-2104.e10.
- [16] LI P, JIANG W, YU Q, LIU W, ZHOU P, LI J, XU JJ, XU B, WANG FC, SHAO F. Ubiquitination and degradation of GBPs by a *Shigella* effector to suppress host defence[J]. *Nature*, 2017, 551(7680): 378-383.
- [17] LI ZL, QU XL, LIU X, HUAN C, WANG H, ZHAO ZL, YANG X, HUA SC, ZHANG WY. GBP5 is an interferon-induced inhibitor of respiratory syncytial virus[J]. *Journal of Virology*, 2020, 94(21): e01407-e01420.
- [18] LI YC, LIN XT, WANG WX, WANG WY, CHENG SJ, HUANG YB, ZOU YF, KE J, ZHU LX. The proinflammatory role of guanylate-binding protein 5 in inflammatory bowel diseases[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 926915.
- [19] SHENOY AR, WELLINGTON DA, KUMAR P, KASSA H, BOOTH CJ, CRESSWELL P, MacMICKING JD. GBP5 promotes NLRP3 inflammasome assembly and immunity in mammals[J]. *Science*, 2012, 336(6080): 481-485.
- [20] CERQUEIRA DM, GOMES MTR, SILVA ALN, RUNGUE M, ASSIS NRG, GUIMARÃES ES, MORAIS SB, BROZ P, ZAMBONI DS, OLIVEIRA SC. Guanylate-binding protein 5 licenses caspase-11 for Gasdermin-D mediated host resistance to *Brucella abortus* infection[J]. *PLoS Pathogens*, 2018, 14(12): e1007519.
- [21] MEUNIER E, WALLET P, DREIER RF, COSTANZO S, ANTON L, RÜHL S, DUSSURGEY S, DICK MS, KISTNER A, RIGARD M, DEGRANDI D, PFEFFER K, YAMAMOTO M, HENRY T, BROZ P. Guanylate-binding proteins promote activation of the AIM2 inflammasome during infection with *Francisella novicida*[J]. *Nature Immunology*, 2015, 16(5): 476-484.
- [22] DING KX, LI XZ, REN XM, DING N, TAO L, DONG X, CHEN Z. GBP5 promotes liver injury and inflammation by inducing hepatocyte apoptosis[J]. *The FASEB Journal*, 2022, 36(1): e22119.
- [23] CHAMBERS MA, GAVIER-WIDEN D, HEWINSON RG. Histopathogenesis of experimental *Mycobacterium bovis* infection in mice[J]. *Research in Veterinary Science*, 2006, 80(1): 62-70.
- [24] MIN L, WANG HQ, QI H. Astragaloside IV inhibits the progression of liver cancer by modulating macrophage polarization through the TLR4/NF- κ B/STAT3 signaling pathway[J]. *American Journal of Translational Research*, 2022, 14(3): 1551-1566.
- [25] YIN Z, MA TT, LIN Y, LU X, ZHANG CZ, CHEN S, JIAN ZX. IL-6/STAT3 pathway intermediates M1/M2 macrophage polarization during the development of hepatocellular carcinoma[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2018, 119(11): 9419-9432.
- [26] HE HC, ZHUO R, DAI J, WANG XJ, HUANG X, WANG HF, XU DF. Chelerythrine induces apoptosis via

- ROS-mediated endoplasmic reticulum stress and STAT3 pathways in human renal cell carcinoma[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020, 24(1): 50-60.
- [27] TRETINA K, PARK ES, MAMINSKA A, MACMICKING JD. Interferon-induced guanylate-binding proteins: guardians of host defense in health and disease[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2019, 216(3): 482-500.
- [28] PLACE DE, BRIARD B, SAMIR P, KARKI R, BHATTACHARYA A, GUY CS, PETERS JL, FRASE S, VOGEL P, NEALE G, YAMAMOTO M, KANNEGANTI TD. Interferon inducible GBPs restrict *Burkholderia thailandensis* motility induced cell-cell fusion[J]. *PLoS Pathogens*, 2020, 16(3): e1008364.
- [29] RUPPER AC, CARDELLI JA. Induction of guanylate binding protein 5 by gamma interferon increases susceptibility to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium-induced pyroptosis in RAW 264.7 cells[J]. *Infection and Immunity*, 2008, 76(6): 2304-2315.
- [30] SICA A, INVERNIZZI P, MANTOVANI A. Macrophage plasticity and polarization in liver homeostasis and pathology[J]. *Hepatology*, 2014, 59(5): 2034-2042.
- [31] MANTOVANI A, SICA A, SOZZANI S, ALLAVENA P, VECCHI A, LOCATI M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization[J]. *Trends in Immunology*, 2004, 25(12): 677-686.
- [32] KAUFMANN SH, DORHOI A. Inflammation in tuberculosis: interactions, imbalances and interventions[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2013, 25(4): 441-449.
- [33] PIERGALLINI TJ, SCORDO JM, PINO PA, SCHLESINGER LS, TORRELLES JB, TURNER J. Acute inflammation confers enhanced protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice[J]. *Microbiology Spectrum*, 2021, 9(1): e0001621.
- [34] YUAN YJ, CHEN YN, PENG TQ, LI L, ZHU WZ, LIU F, LIU SY, AN XX, LUO RX, CHENG JQ, LIU JP, LU YR. Mitochondrial ROS-induced lysosomal dysfunction impairs autophagic flux and contributes to M1 macrophage polarization in a diabetic condition[J]. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 2019, 133(15): 1759-1777.
- [35] 王永康, 李佳怡, 关飞, 雷家慧. 巨噬细胞极化机制及其在常见疾病中的作用[J]. *热带病与寄生虫学*, 2022, 20(2): 103-108, 112.
- WANG YK, LI JY, GUAN F, LEI JH. Mechanisms of macrophage polarization and its role in common diseases[J]. *Journal of Tropical Diseases and Parasitology*, 2022, 20(2): 103-108, 112 (in Chinese).
- [36] JUHAS U, RYBA-STANISŁAWOWSKA M, SZARGIEJ P, MYŚLIWSKA J. Different pathways of macrophage activation and polarization[J]. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej (Online)*, 2015, 69: 496-502.
- [37] LU R, ZHANG YG, SUN J. STAT3 activation in infection and infection-associated cancer[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2017, 451: 80-87.
- [38] HU CJ, WU ZF, HUANG ZH, HAO XY, WANG SQ, DENG JP, YIN YL, TAN CQ. Nox2 impairs VEGF-A-induced angiogenesis in placenta via mitochondrial ROS-STAT3 pathway[J]. *Redox Biology*, 2021, 45: 102051.