

卡介苗感染人 B 细胞诱导细胞凋亡

朱 旗 冯国栋 杨毅宁 赵 青 王文菁 张 敏 刘 扬 赵 钢

摘 要 **目的** 探究卡介苗 (BCG) 是否能感染人 B 细胞及观察感染后对细胞的影响。**方法** 人 B 细胞系 Raji 细胞与 BCG 共培养, 4、12 和 24h 后分别用共聚焦及透射电镜观察 Raji 细胞对 BCG 的结合和摄取情况, 用 CCK-8 法检测细胞毒性, 流式 Annexin V-PI 双标法检测细胞凋亡和坏死情况。**结果** 培养 4、12 和 24h 后, 感染了 BCG 的细胞比例分别为 $12.4\% \pm 2.0\%$, $23.8\% \pm 5.1\%$, $25.2\% \pm 4.8\%$ 。BCG 感染可引起细胞毒性, 4h 后 Raji 细胞存活率为 $75.5\% \pm 8.8\%$, 12h 后细胞存活率降至 $51.0\% \pm 5.3\%$, 24h 后细胞存活率仅为 $21.6\% \pm 4.2\%$, 而感染灭活 BCG 的细胞存活率均在 95% 以上。进一步用流式检测凋亡坏死发现, 与未感染细胞相比, Raji 细胞感染 BCG 后凋亡, 坏死均有所增加, 以凋亡增加为主。**结论** BCG 可以感染人 B 细胞并诱导细胞凋亡。

关键词 卡介苗 B 细胞 Raji 细胞 感染 凋亡

中图分类号 R392.32

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.05.010

BCG Infection to Human B Cells Induce Cell Apoptosis. Zhu Qi, Feng Guodong, Yang Yining, et al. Department of Neurology, Xijing Hospital, Shaanxi 710032, China

Abstract Objective To explore whether Bacillus Calmette - Guérin (BCG) can infect human B cells and observe the effects of the infection on B cells. **Methods** Human B cell line Raji cells were incubated with BCG. After incubation for 4h, 12h and 24h, the direct interaction of Raji cells with BCG was observed under confocal microscopy and transmission electronic microscopy. Cytotoxicity was detected by cell counting kit (CCK-8). Cell apoptosis and necrosis were assayed by flow cytometry. **Results** After 4h, 12h and 24h of incubation, the percentage of Raji cells that were infected by BCG was $12.4\% \pm 2.0\%$, $23.8\% \pm 5.1\%$, $25.2\% \pm 4.8\%$, respectively. Live BCG infection induced cytotoxicity. The cell survival rates at 4h, 12h, 24h were $75.5\% \pm 8.8\%$, $51.0\% \pm 5.3\%$, $21.6\% \pm 4.2\%$ respectively, while the cells infected with inactivated BCG showed a high survival rate of 95% at any time. Further analysis by flow cytometry showed that cell apoptosis and necrosis, predominantly cell apoptosis of Raji cells were increased by BCG infection. **Conclusion** BCG can infect human B cells and induce cell apoptosis.

Key words Bacillus Calmette - Guérin (BCG); B cells; Raji cells; Infection; Apoptosis

结核分枝杆菌是引起结核病的病原体。全球约有 1/3 人口感染结核分枝杆菌^[1]。由于结核分枝杆菌的胞内寄生特性, 针对结核分枝杆菌感染的免疫反应主要是固有免疫和适应性免疫中的细胞免疫。B 细胞及体液免疫在结核分枝杆菌感染中的作用一直被忽视。但是近年来越来越多的研究表明 B 细胞在结核感染中发挥不可或缺的作用。Maglione 等^[2]报道 B 细胞敲除小鼠感染结核分枝杆菌后肺部细菌载量增多, 免疫病理反应加重。抗体在结核感染中的保护性免疫也得到越来越多的证据支持^[3-7]。除了产生抗体之外, 作为专职抗原递呈细胞, B 细胞还能通过抗原递呈影响 T 细胞激活从而参与免疫反应^[8, 9]。

B 细胞产生的细胞因子及抗体在结核感染中发挥多种免疫调节作用。例如, B 细胞可以产生重要抗结核细胞因子 IFN- γ 影响 Th 细胞的极化^[10]。而 Th1/Th2 免疫失衡, Th1 细胞功能低下与活动性结核病发生密切相关^[11]。B 细胞产生的抗体选择性作用于兴奋性或抑制性 Fc γ 受体, 影响抗原递呈细胞的成熟过程, 进而影响 T 细胞激活可能是 B 细胞参与结核免疫反应的一条重要通路^[12, 13]。

近年来, B 细胞的固有免疫功能逐渐受到重视。B 细胞可以产生多克隆的 IgM 自然抗体, B 细胞还表达多种固有免疫相关的膜受体, 例如 TLR6、7、9 和 10^[14]。但是病原体直接感染 B 细胞较少见于报道。目前观察到可以感染 B 细胞或 B 细胞系的病原体有伤寒沙门菌, 李斯特假单胞菌和土拉弗朗西斯菌^[15-17]。最近有文献报道, 结核分枝杆菌可以通过诱导巨噬细胞的方式被人 B 细胞系 Raji 细胞摄取^[18]。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81371334)

作者单位: 710032 第四军医大学西京医院神经内科

通讯作者: 赵钢, 教授, 主任医师, 电子信箱: zhaogang@fmmu.edu.cn

卡介苗(BCG)是结核分枝杆菌的减毒活疫苗,为了探究 BCG 是否能感染 B 细胞及感染后对细胞的影响,笔者将 Raji 细胞与卡介苗共培养,共聚焦及透射电镜下观察卡介苗是否可以感染 Raji 细胞,并计数感染效率随孵育时间的变化,CCK-8 法检测卡介苗感染的细胞毒性,流式 Annexin V-PI 双标法检测细胞凋亡和坏死率,结果显示卡介苗可以感染 Raji 细胞并诱导细胞凋亡。

材料与方法

1. 材料:Raji 细胞系由第四军医大学生物技术中心惠赠,以含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素的 RPMI-1640 培养基(HyClone 公司),于 37℃,含 5% CO₂ 的孵箱中培养。卡介苗为临床皮内注射用卡介苗冻干粉,由陕西省结核病防治研究所惠赠。卡介苗溶于无菌 PBS 中,用麦氏比浊法调整菌悬液浊度至麦氏 1 号标准管(相当于细菌浓度 3×10^8 /ml)。卡介苗灭活方式为 56℃ 水浴 30min。罗丹明-鬼笔环肽购自美国 Life Technologies 公司,金胺 O 购自上海亿欣生物科技有限公司,Hoechst33342 为 Sigma 公司产品,CCK-8 试剂盒为上海七海生物复泰生物科技有限公司产品,FITC Annexin V 凋亡检测试剂盒为 BD Pharmingen 公司产品。

2. 方法:(1)Raji 细胞与卡介苗共培养:Raji 细胞离心后用 RPMI-1640 培养基(不含血清)重悬,调整细胞浓度为 10^6 /ml,接种细胞至 24 孔板,每孔 500μl。对照细胞组加入 50μl 无菌 PBS,感染细胞组加入 50μl 卡介苗或灭活卡介苗,置于 37℃,含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。培养 4、12、24h 后收集孔板中细胞,进行后续染色或检测。(2)荧光染色与共聚焦显微镜观察:离心沉淀法浓集与 BCG 共培养 12h 的 Raji 细胞并进行涂片,细胞片用 4% 多聚甲醛室温固定 15min,PBS 洗 3 次。荧光染色步骤如下:1% 牛血清白蛋白室温封闭 20min,倾去固定液,细胞骨架肌动蛋白染色剂罗丹明-鬼笔环肽室温染色 20min,PBS 洗 3 次,金胺 O 染色液染色 15min,盐酸酒精脱色 3min,PBS 洗 3 次,最后用 Hoechst 衬染细胞核 15min。在奥林巴斯 FV100 共聚焦显微镜下阅片并采图,分别对含表面细菌的细胞及含胞内细菌的细胞进行计数。每组计数 3 张细胞片,每张细胞片随机计数 200 个细胞。(3)透射电镜制样与观察:与 BCG 共培养 12h 的 Raji 细胞悬液 2ml(细胞总数约 2×10^6)收集于 15ml 离心管中,700r/min,5min 离心,吸弃上清,用 1ml PBS 重悬细胞并转移至 1.5ml 离心管,1500r/min,10min,吸弃上清,加入 2.5% 戊二醛固定细胞团块。固定 2h 后的样本送第四军医大学电镜中心进行后固定,脱水,包埋,染色及切片处理,在 JEM-1230 透射电子显微镜下观察。(4)CCK-8 法细胞毒性检测:100μl 以 RPMI-1640 重悬的 Raji 细胞悬液(10^6 /ml)接种至 96 孔板,加入 10μl PBS 或 BCG 菌悬液或灭活的 BCG 菌悬液,每组设置 3 个复孔及不加细胞的空白对照孔,共培养 4、12 及 24h 后加入 10μl CCK-8 溶液,37℃ 培养箱中反应 4h,ELx 808 Biotek 酶标仪下检测

吸光度值。(5)Annexin V-PI 双标法检测细胞凋亡、坏死:Raji 细胞中加入 PBS 或 BCG 或灭活 BCG,共培养 4、12、24h 后,用冷却的 PBS 洗两次,100μl $1 \times$ 结合缓冲液重悬,向细胞悬液中加入 5μl FITC Annexin V 和 5μl PI,避光室温孵育 15min,然后每管加入 400μl $1 \times$ 结合缓冲液,BD Aria 流式细胞仪上机检测。

3. 统计学方法:使用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析,所有实验数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间样本比较采用独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 共聚焦显微镜观察卡介苗感染 Raji 细胞:共聚焦显微镜下观察,部分 Raji 细胞表面结合有金胺 O 染色阳性的卡介苗,部分细胞胞内含有卡介苗(图 1 中 A、B)。感染 4h 后,结合细菌的细胞与内含细菌的细胞占有计数细胞的比例分别为 $6.3\% \pm 1.1\%$ 和 $12.4\% \pm 2.0\%$,12h 后这两种细胞比例分别为 $5.2\% \pm 1.0\%$ 和 $23.8\% \pm 5.1\%$,24h 后比例分别为 $3.1\% \pm 0.8\%$ 和 $25.2\% \pm 4.8\%$ (图 1C)。

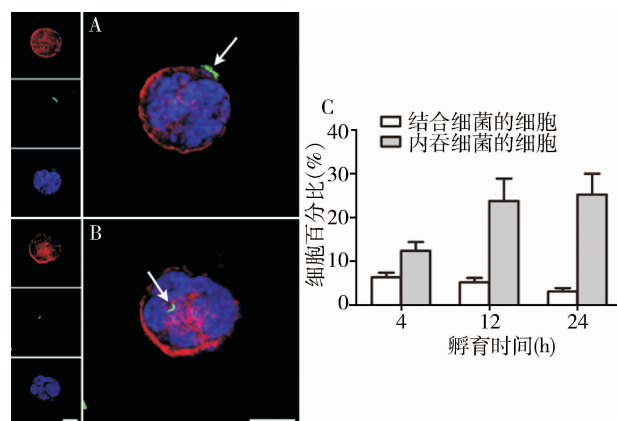


图 1 卡介苗感染 Raji 细胞及感染效率与孵育时间的关系

A. 结合卡介苗的 Raji 细胞,箭头所指为细胞表面细菌;B. 内含卡介苗的 Raji 细胞,箭头所指为胞内细菌;标尺 = 10μm;C. 共聚焦显微镜下计数结合细菌或内含细菌的细胞百分比

2. 透射电镜观察卡介苗感染 Raji 细胞:透射电镜下观察感染卡介苗的 Raji 细胞的超微结构。如图所见,卡介苗结合于细胞表面或部分被细胞包绕(图 2A),胞内卡介苗位于胞质囊泡内形成吞噬体(图 2B)。部分细胞围绕细菌伸出长伪足(图 2B),细胞内可见多量线粒体和溶酶体,细胞结构大致正常。

3. 卡介苗感染对 Raji 细胞的存活率的影响:为了观察卡介苗感染 Raji 细胞引起的细胞毒性,笔者将卡介苗或灭活的卡介苗与 Raji 细胞共培养 4、12、24h 后,用 CCK-8 法检测细胞存活率。以未感染的细胞作为对照(即视其存活率为 100%),感染卡介苗

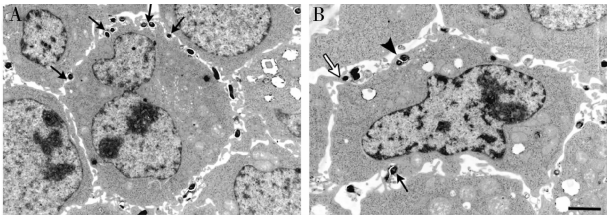


图 2 感染卡介苗的 Raji 细胞的超微结构
A. Raji 细胞表面围绕多个细菌,部分细菌被内陷的细胞膜包绕,箭头所指为细胞表面细菌;B. Raji 细胞内吞细菌,黑色不带尾箭头为胞内细菌,黑色带尾箭头为正在被摄入的细菌,白色箭头显示细胞伪足包绕细菌;标尺 = 2 μ m

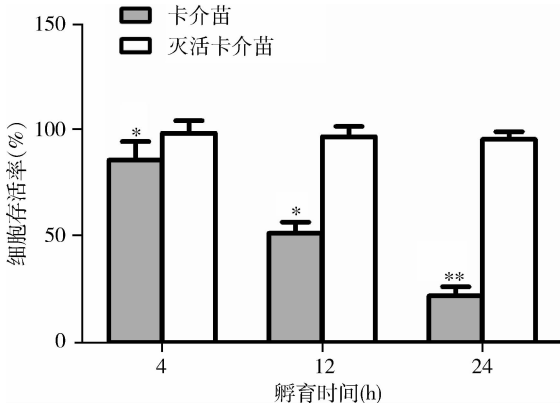


图 3 卡介苗感染对 Raji 细胞存活率的影响
与灭活卡介苗比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

4h 后 Raji 细胞存活率降至 $75.5\% \pm 8.8\%$, 12h 降至 $51.0\% \pm 5.3\%$, 24h 进一步降至 $21.6\% \pm 4.2\%$, 而感染灭活的卡介苗组与未感染细胞组相比的相对存活率均在 95% 以上,提示活卡介苗感染 Raji 细胞可引起细胞毒性(图 3)。

4. 卡介苗感染对 Raji 细胞凋亡和坏死的影响:
细胞坏死和凋亡是最常见的两种细胞死亡方式,为了进一步明确 BCG 感染引起细胞死亡的机制,本研究对与 BCG 共培养不同时间的 Raji 细胞进行 Annexin V - PI 双标染色,流式分别检测凋亡细胞 (FITC - Annexin⁺PI⁻) 和坏死细胞 (FITC - Annexin⁺PI⁺) 比例。结果显示,卡介苗感染 Raji 细胞 4、12、24h 后细胞凋亡率分别为 $15.1\% \pm 3.3\%$ 、 $40.0\% \pm 5.8\%$ 和

$70.8\% \pm 9.0\%$,而未感染细胞在这 3 个时间点凋亡率分别为 $2.5\% \pm 0.6\%$ 、 $3.7\% \pm 0.8\%$ 和 $5.5\% \pm 0.8\%$ 。感染灭活卡介苗组凋亡率与未感染细胞相似。卡介苗感染 Raji 细胞 4、12、24h 后细胞坏死率分别为 $5.8\% \pm 1.5\%$ 、 $6.9\% \pm 1.8\%$ 和 $9.3\% \pm 2.1\%$,未感染细胞坏死率分别为 $2.3\% \pm 0.7\%$ 、 $3.3\% \pm 1.0\%$ 和 $4.8\% \pm 1.1\%$,感染灭活卡介苗组细胞坏死率分别为 $2.5\% \pm 0.8\%$ 、 $4.5\% \pm 1.2\%$ 和 $6.2\% \pm 1.5\%$ 。以上结果提示,卡介苗感染 Raji 细胞引起的细胞毒性主要与细胞凋亡增加有关。

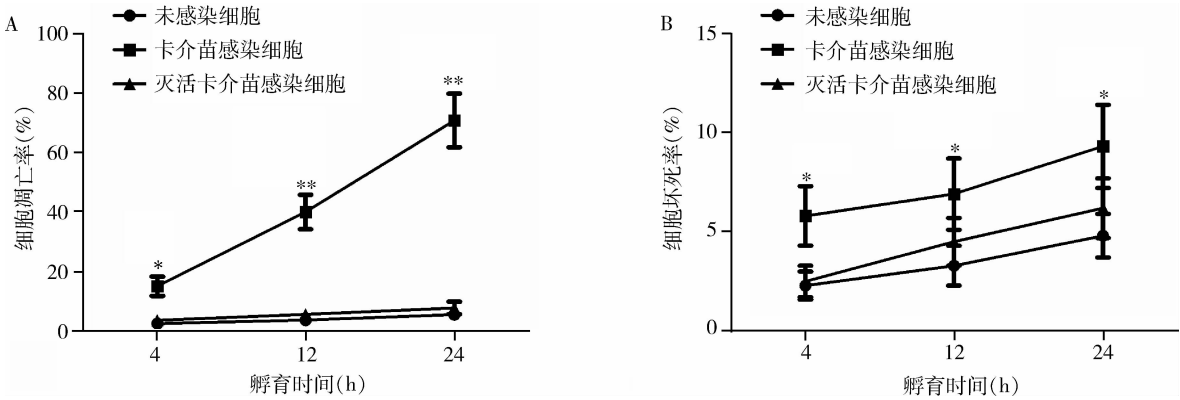


图 4 感染卡介苗对 Raji 细胞凋亡和坏死率的影响
A. 卡介苗感染对 Raji 细胞凋亡率的影响;B. 卡介苗感染对细胞坏死率的影响;与未感染细胞比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

讨 论

结核分枝杆菌是兼性胞内菌,容易感染巨噬细胞,上皮细胞或成纤维细胞并寄生于细胞内。巨噬细胞是结核分枝杆菌的主要宿主细胞,但结核分枝杆菌可以通过抑制吞噬体与溶酶体的融合等机制抵抗巨噬细胞的杀伤作用而寄生于巨噬细胞内^[19, 20]。这使

得机体的免疫机制难以奏效。B 细胞一直被认为是非吞噬细胞,因此 B 细胞与胞内寄生菌的直接作用较少被研究。现有的研究表明,李斯特假单胞菌可以感染 B 细胞并导致细胞死亡,这可能作为细菌成功启动感染的策略之一^[16]。土拉弗朗西斯菌可以侵入 B 细胞并引起 caspase - 3 介导的细胞凋亡^[17]。B 细

胞与结核分枝杆菌的直接作用一直未见报道,但最近有研究者证实结核分枝杆菌可以通过诱导巨胞饮的方式进入人 B 细胞系 Raji 细胞并在细胞内扩增^[18]。笔者用卡介苗感染人 Raji 细胞系以观察卡介苗是否同样可以进入 Raji 细胞及其对 Raji 细胞的影响。结果表明,卡介苗可以结合并进入 Raji 细胞,Raji 细胞感染活卡介苗后细胞死亡增加,以凋亡增加为主。

透射电镜下可观察到部分被内吞的卡介苗位于巨胞饮体内,即卡介苗被富含液体的囊泡包裹,表明卡介苗可能像结核分枝杆菌一样以诱导细胞巨胞饮的方式进入 Raji 细胞。但是,本研究同时观察到灭活的卡介苗同样可以进入 Raji 细胞,而灭活的细菌并不能通过分泌活性因子的方式诱导细胞巨胞饮,因此 Raji 细胞可能具有不依赖于细菌毒力的主动吞噬的功能。事实上某些 B 细胞系的吞噬功能已见于报道。

细胞凋亡是细胞在特殊环境下启动的一种程序性细胞死亡。感染细胞的细胞凋亡可能是机体针对病原体的免疫保护的机制之一。结核分枝杆菌感染巨噬细胞和肺泡上皮细胞可以诱导细胞不同程度的凋亡和坏死,其中巨噬细胞以凋亡为主,上皮细胞以坏死为主。用不同毒力的结核菌株感染巨噬细胞发现,毒力越低的菌株越容易诱导细胞凋亡。结核分枝杆菌标准株 H37Rv 感染巨噬细胞后可诱导巨噬细胞表达抗凋亡因子 Bcl-2 家族的成员 Mcl-1 蛋白,这种抗凋亡效应促进了胞内 H37Rv 的存活。因此推测 BCG 感染 Raji 细胞后诱导的细胞凋亡可能为有助于病原体清除的一种免疫保护效应。

本研究发现卡介苗可以感染人 B 细胞系 Raji 细胞并诱导细胞凋亡,尽管细胞系并不能完全代表原代 B 细胞,B 细胞内吞卡介苗的机制和意义也有待于进一步研究,这项研究为 B 细胞在结核感染中的作用开启了新的思路。

参考文献

- 1 Yew WW, Leung CC. Update in tuberculosis 2007 [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 177(5): 479-485
- 2 Maglione PJ, Xu J, Chan J. B cells moderate inflammatory progression and enhance bacterial containment upon pulmonary challenge with *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Immunol*, 2007, 178(11): 7222-7234
- 3 Glatman - Freedman A. The role of antibody - mediated immunity in defense against *mycobacterium tuberculosis*: advances toward a novel vaccine strategy [J]. *Tuberculosis*, 2006, 86(3-4): 191-197
- 4 Hamasur B, Haile M, Pawlowski A, *et al.* A mycobacterial lipoarabinomannan specific monoclonal antibody and its F(ab') fragment pro-
- long survival of mice infected with *mycobacterium tuberculosis* [J]. *Clin Exp Immunol*, 2004, 138(1): 30-38
- 5 Roy E, Stavropoulos E, Brennan J, *et al.* Therapeutic efficacy of high - dose intravenous immunoglobulin in *mycobacterium tuberculosis* infection in mice [J]. *Infect Immun*, 2005, 73(9): 6101-6109
- 6 Teitelbaum R, Glatman - Freedman A, Chen B, *et al.* A mAb recognizing a surface antigen of *mycobacterium tuberculosis* enhances host survival [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(26): 15688-15693
- 7 Williams A, Reljic R, Naylor I, *et al.* Passive protection with immunoglobulin A antibodies against tuberculous early infection of the lungs [J]. *Immunology*, 2004, 111(3): 328-333
- 8 Shen H, Whitmire JK, Fan X, *et al.* A specific role for B cells in the generation of CD8 T cell memory by recombinant *Listeria monocytogenes* [J]. *J Immunol*, 2003, 170(3): 1443-1451
- 9 Sugimoto K, Ogawa A, Shimomura Y, *et al.* Inducible IL-12 - producing B cells regulate Th2 - mediated intestinal inflammation [J]. *Gastroenterology*, 2007, 133(1): 124-136
- 10 Harris DP, Haynes L, Sayles PC, *et al.* Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells [J]. *Nat Immunol*, 2000, 1(6): 475-482
- 11 He XY, Xiao L, Chen HB, *et al.* T regulatory cells and Th1/Th2 cytokines in peripheral blood from tuberculosis patients [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2010, 29(6): 643-650
- 12 Maglione PJ, Xu J, Casadevall A, *et al.* Fc gamma receptors regulate immune activation and susceptibility during *mycobacterium tuberculosis* infection [J]. *J Immunol*, 2008, 180(5): 3329-3338
- 13 Moore T, Ekworomadu CO, Eko FO, *et al.* Fc receptor - mediated antibody regulation of T cell immunity against intracellular pathogens [J]. *J Infect Dis*, 2003, 188(4): 617-624
- 14 Chiron D, Bekeredian - Ding I, Pellat - Deceunynck C, *et al.* Toll - like receptors: lessons to learn from normal and malignant human B cells [J]. *Blood*, 2008, 112(6): 2205-2213
- 15 Castro - Eguiluz D, Pelayo R, Rosales - Garcia V, *et al.* B cell precursors are targets for *Salmonella* infection [J]. *Microb Pathog*, 2009, 47(1): 52-56
- 16 Menon A, Shroyer ML, Wampler JL, *et al.* In vitro study of *Listeria monocytogenes* infection to murine primary and human transformed B cells [J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2003, 26(3): 157-174
- 17 Krocova Z, Hartlova A, Souckova D, *et al.* Interaction of B cells with intracellular pathogen *Francisella tularensis* [J]. *Microb Pathog*, 2008, 45(2): 79-85
- 18 Garcia - Perez BE, De la Cruz - Lopez JJ, Castaneda - Sanchez JI, *et al.* Macropinocytosis is responsible for the uptake of pathogenic and non - pathogenic mycobacteria by B lymphocytes (Raji cells) [J]. *BMC microbiol*, 2012, 12: 246
- 19 Pieters J. *Mycobacterium tuberculosis* and the macrophage: maintaining a balance [J]. *Cell Host Microbe*, 2008, 3(6): 399-407
- 20 Sundaramurthy V, Pieters J. Interactions of pathogenic mycobacteria with host macrophages [J]. *Microbes Infect*, 2007, 9(14-15): 1671-1679

(收稿日期:2014-12-25)

(修回日期:2015-01-04)