

# 龟分枝杆菌脂葡聚糖对人角膜上皮细胞 IL-8 和 IL-6 表达的影响及其信号转导通路

唐春舟<sup>1</sup>, 管怀进<sup>2</sup>

作者单位:<sup>1</sup>(221400) 中国江苏省江阴市人民医院眼科;  
<sup>2</sup>(226001) 中国江苏省南通市, 南通大学附属医院眼科

作者简介:唐春舟, 毕业于南通大学, 硕士, 主治医师, 研究方向: 角膜病、青光眼、白内障。

通讯作者:管怀进, 男, 硕士, 南通大学附属医院眼科中心主任, 教授, 博士研究生导师, 现任中华医学会眼科学分会防盲学组副组长, 江苏省眼科学会副主任委员、眼科医疗质量控制中心副主任, 南通市医学会眼科学会主任委员, 研究方向: 角膜病、青光眼、白内障、防盲治盲. guanhjeye@126.com

收稿日期: 2015-03-08 修回日期: 2015-05-25

## Effect of Lipoglycans from *Mycobacterium Chelonae* on the expression of inflammatory factors IL-8 and IL-6 in human corneal epithelial cells and its possible signal transduction pathway

Chun-Zhou Tang<sup>1</sup>, Huai-Jin Guan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Jiangyin People's Hospital, Jiangyin 221400, Jiangsu Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Huai - Jin Guan. Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. guanhjeye@126.com

Received: 2015-03-08 Accepted: 2015-05-25

### Abstract

• AIM: To study the influence of Lipoglycans from *Mycobacterium Chelonae* (Che) on the expression of IL-6 and IL-8 in human corneal epithelia cells and its possible signal transduction pathway.

• METHODS: Lipoglycans was extracted by the Triton X-114 phase partitioning. Lipoglycans from Che were purified, by successive detergent and phenol extractions. Lipoglycans were separated by gel filtration on a Sephacryl 200 column and Sephacryl 100 column in series, followed by extensive dialysis. Purified Lipoglycans (50 μg/mL) were added into culture medium to stimulate primary human corneal epithelial (HCE) cells. Cells and supernatant were collected at 0, 6, 12, 24h after the stimulation. The IL-6 and IL-8 expression at mRNA level was assayed by using real time RT-PCR and the secreted IL-6 and IL-8 in the supernatants was measured by ELISA. Immunochemistry was used to detect the expression and location of NF-κB in HCE cells.

• RESULTS: After the treatment of Lipoglycans, the expression of IL-8 and IL-6 at mRNA level obviously increased within 12h, and reached peak level at 6h (IL-8 was 36.8 times that of the blank control, and IL-6 was 32.7 times). Compared with the blank control group, the expression of IL-8 at protein level in the supernatant increased 2.8 folds at 6h ( $P > 0.05$ ), 13.4 folds at 12h ( $P < 0.05$ ), and 200.7 folds at 24h ( $P < 0.05$ ), and the expression of IL-6 also increased 3.6 folds at 6h ( $P < 0.05$ ), 6.1 folds at 12h ( $P < 0.05$ ), and 7.0 folds at 24h ( $P < 0.05$ ), which was similar to changes in the positive control group (stimulated by LPS). In the blank control group, NF-κB was localized in the cytoplasm, while in lipoglycans treated group, NF-κB was activated and translocated to the nucleus in HCE.

• CONCLUSION: Lipoglycans from Che can induce HCE cells to produce inflammatory factors (IL-6 and IL-8), and its signal transduction pathway probably is mediated by NF-κB.

• KEYWORDS: *Mycobacterium Chelonae*; human corneal epithelial; inflammatory factors; Lipomannans; Lipoarabinomannans; NF-κB

**Citation:** Tang CZ, Guan HJ. Effect of Lipoglycans from *Mycobacterium Chelonae* on the expression of inflammatory factors IL-8 and IL-6 in human corneal epithelial cells and its possible signal transduction pathway. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015; 15(6):963-967

### 摘要

目的: 研究龟分枝杆菌细菌壁内脂葡聚糖对人角膜上皮细胞 IL-6 和 IL-8 表达的影响及其可能信号转导通路。

方法: 提取龟分枝杆菌细菌壁内脂葡聚糖作用于原代培养人角膜上皮细胞 (human corneal epithelia, HCE)。实验分为实验组 (脂葡聚糖样品处理组)、阳性对照组 (LPS 处理组) 和空白组。脂葡聚糖处理后的 0, 6, 12h 各时间点采用 RT-PCR 法在 mRNA 水平检测实验组中 IL-6 和 IL-8 的表达水平; 脂葡聚糖处理后的 0, 6, 12, 24h 各时间点采用 ELISA 法在蛋白水平检测实验组、阳性对照组和空白组中 IL-6 和 IL-8 的表达。免疫细胞化学法检测空白组与实验组 (时间点 24h) HCE 细胞内 NF-κB 的表达与定位。

结果: 实验组中, 12h 内 IL-6 和 IL-8 在 mRNA 水平明显增加, 6h 时即达到峰值 (IL-6 是空白组的 32.7 倍, IL-8 是对照组的 36.8 倍); 在蛋白质水平, 培养上清内 IL-6 和 IL-8 含量在 24h 内呈现时间依赖性上升 (6, 12, 24h 各时间点与对照组之间均有统计学差异,  $P < 0.05$ ), 与阳性对照组变化一致。空白组 NF-κB 定位于细胞浆内, 实验

组 NF- $\kappa$ B 被激活,移位至细胞核内。

**结论:**龟分枝杆菌来源的脂葡聚糖可以促使人角膜上皮细胞过表达 IL-6 和 IL-8,其信号转导通路可能是通过核转录因子 NF- $\kappa$ B 进行的。

**关键词:**龟分枝杆菌龟亚种;人角膜上皮细胞;炎性细胞因子;脂阿拉伯甘露聚糖;脂甘露聚糖;核转录因子- $\kappa$ B

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.6.06

**引用:**唐春舟,管怀进.龟分枝杆菌脂葡聚糖对人角膜上皮细胞 IL-8 和 IL-6 表达的影响及其信号转导通路.国际眼科杂志 2015;15(6):963-967

## 0 引言

非结核分枝杆菌性角膜炎在眼科不是常见病,但是近年来随着微生物检测水平提高、糖皮质激素的广泛使用、角膜手术(尤其是 LASIK 手术)的广泛开展,非结核分枝杆菌性角膜炎(non-tuberculous mycobacteria keratitis, NTMK)有快速增加趋势,可是它的发病机制我们依然知之甚少。分枝杆菌细菌壁以脂阿拉伯甘露聚糖(lipoarabinomannan, LAM)和脂甘露聚糖(lipomannan, LM)为代表的脂葡聚糖吸引了越来越多的关注。因此,我们选择非结核分枝杆菌性角膜炎的主要致病菌龟分枝杆菌龟亚种(简称龟分枝杆菌)作为研究对象,研究其细菌壁上的脂葡聚糖对于人角膜上皮细胞炎性因子表达的影响,探索龟分枝杆菌的主要致病物质及其信号转导通路。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 龟分枝杆菌龟亚种为标准菌,购于美国 ATCC;IL-6 ELISA kit 和 IL-8 ELISA kit(武汉博士德生物工程有限责任公司);Middlebrook ADC, Middlebrook OADC, Middlebrook 7H 和 Middlebrook 7H10(美国 BD 公司);Triton X-100(上海生工生物工程技术服务公司);MWCO 3500KD(上海生工生物工程技术服务公司);Proteinase K(上海生工生物工程技术服务公司);鼠抗人角蛋白抗体、兔抗鼠二抗(美国 Santa Cruz 公司);抗酸染色试剂盒(上海生工生物工程技术服务公司);Trizol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司);定量 PCR 试剂盒(澳大利亚 Quantace 公司);鼠抗人 p65 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);羊抗兔 Trite 标记 IgG(北京中杉金桥公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞鉴定** 人角膜上皮细胞(human corneal epithelia, HCE)采用组织块培养法培养(由美国国立眼科研究所庾旌生教授赠送);角膜上皮细胞的鉴定采用形态学、角蛋白与波蛋白的免疫荧光标记的方法进行。

**1.2.2 细菌培养** 龟分枝杆菌龟亚种的培养采取的是半固体培养法(Middlebrook 7H10 培养基)和液体培养法(Middlebrook 7H9 培养基);通过液体培养法获取大量细菌,收集沉淀采用乙醇回流的方法获需要脂葡聚糖<sup>[1]</sup>。

**1.2.3 Real Time PCR 和 ELISA 法检测人角膜上皮细胞内 IL-6 和 IL-8 的表达** 取生长状态良好的 HCE 细胞,接种于培养板中,密度为  $3 \times 10^5$ /mL。待细胞生长达到 80%~90% 的融合度时,将培养基换成 DMEM 基础培养基,将细胞板分成空白对照组、阳性对照组(LPS 组)、实验组,细胞置于培养箱继续培养 24h。次日,处理细胞:脂葡聚糖组,使用含脂葡聚糖(50 $\mu$ g/mL)的 DMEM 基础

表 1 PCR 扩增引物序列

引物名称	引物序列	引物长度	产物长度
IL-6	5'-CCAGAAACCGTTGAATCC-3'	18bp	125bp
	5'-ACTGCTTCTCTGCTGCTC-3'	19bp	
IL-8	5'-CAGGACCAATTAAGCGACT-3'	19bp	139bp
	5'-GCTCAATCTGGCTTCAC-3'	18bp	
GAPDH	5'-GAAGGTGAAGTCTGGAGTC-3'	19bp	20bp
	5'-GAAGATGGTGATGGGATTC-3'	20bp	

培养基;阳性对照组使用含 LPS(100ng/mL) DMEM 基础培养基;空白组,继续使用 DMEM 基础培养基,所有细胞置于培养箱内继续培养。分别在刺激 0,6,12,24h 时,收集各组上清液和细胞。分别采用 RT-PCR 和 ELISA 法检测细胞内 IL-6 和 IL-8 mRNA 水平和上清液内 IL-6 和 IL-8 蛋白质水平。PCR 应用 SYBR Green 荧光染料能够结合于 DNA 双链小沟的原理进行实时荧光半定量 PCR,采取一步法进行。使用 Trizol 试剂盒提取 HCE 细胞总 RNA,RT-PCR 反应体系:25 $\mu$ L 反应体系中,模版 RNA 4 $\mu$ L,IL-6 和 IL-8 和内参 GAPDH 上下游引物分别 0.5 $\mu$ L(10pmol/ $\mu$ L),2 $\times$ Mix 12.5 $\mu$ L,50 $\times$ SYBR 0.5 $\mu$ L,补足 DEPC-H<sub>2</sub>O 至 25 $\mu$ L。具体如下:RT-PCR 反应条件:反转录条件 42 $^{\circ}$ C 30min,95 $^{\circ}$ C 15min;PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 30s $\rightarrow$ 58 $^{\circ}$ C 30s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 30s,共 45 个循环(引物序列见表 1)。

**1.2.4 免疫荧光法检测人角膜上皮细胞内 NF- $\kappa$ B 的分布** NF- $\kappa$ B 分布采用免疫荧光法进行,具体步骤:取生长状态良好 HCE 细胞,接种于 24 孔板,密度为  $3 \times 10^5$  个/mL。待细胞生长达到 80%~90% 的融合度时,将培养基换成不含血清的 DMEM 基础培养基,将细胞板分成空白组、实验组,细胞置于培养箱内饥饿 24h,次日,去除细胞上清,实验组使用含有 50 $\mu$ g/mL 脂葡聚糖的 DMEM 基础培养基,细胞板置于培养箱内继续培养,24h 后从培养箱内取出 24 孔板,使用在 4 $^{\circ}$ C 冰箱内预冷的 PBS 溶液洗涤细胞,10min $\times$ 3 次,每次均放于摇床上缓慢摇晃;固定:加入 4% 多聚甲醛 200 $\mu$ L/孔,室温下放置 1h,然后 PBS 溶液洗涤细胞,10min $\times$ 3 次;通透:加入 BSA 和 Triton X-100 混合物,200 $\mu$ L/孔,混合物配置方法如下:2mL 3% BSA + 400 $\mu$ L 0.2% Triton X-100。将 24 孔板置于摇床上缓慢摇 2h,然后弃去混合物;一抗结合:加入兔抗人 NF- $\kappa$ B 抗体工作液(即抗体 1:200 稀释液,使用 PBS 进行稀释),室温孵育 1h 后,置于 4 $^{\circ}$ C 过夜,次日 PBS 漂洗 5min $\times$ 6 次;二抗结合:暗室内加入 1:100 稀释的羊抗兔抗体工作液,200 $\mu$ L/孔,室温避光孵育 1h, PBS 漂洗 10min $\times$ 3 次;Hochest 染色:滴加 Hochest 1:2000 稀释液,200 $\mu$ L/孔,室温下放置 15min, PBS 漂洗 6min $\times$ 5 次;封片:取出备用载玻片,每片滴加 5 $\mu$ L 缓冲甘油,取出盖玻片,细胞面朝下,置于甘油上;荧光显微镜下观察、照相。

统计学分析:采用统计学软件 SPSS 17.0 进行统计分析。各组上清内 IL-6 和 IL-8 浓度均采用  $\bar{x} \pm s$  表示,各组上清内 IL-6 和 IL-8 浓度比较使用单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 细胞鉴定结果** 培养出的细胞角蛋白染色阳性,可见细胞轮廓;而波蛋白染色阴性,未见细胞轮廓(图 1),据此鉴定培养出的细胞为人角膜上皮细胞。

表2 脂葡聚糖对 HCE 细胞 IL-8 分泌的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL)

组别	0h	6h	12h	24h
空白对照组	6.35±3.21	6.62±3.02	4.53±1.92	3.89±1.18
LPS 组	6.35±3.21	656.63±32.92	986.13±14.90	1025.85±14.90
脂葡聚糖组	6.35±3.21	18.30±7.57	60.57±7.02	780.71±33.11

表3 脂葡聚糖对 HCE 细胞 IL-6 分泌的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL)

组别	0h	6h	12h	24h
空白组	65.95±3.29	63.06±5.86	55.52±6.62	65.68±3.48
LPS 组	65.95±3.29	268.69±7.05	342.25±9.42	540.50±29.36
脂葡聚糖组	65.95±3.29	228.25±19.88	340.38±18.08	460.69±9.73

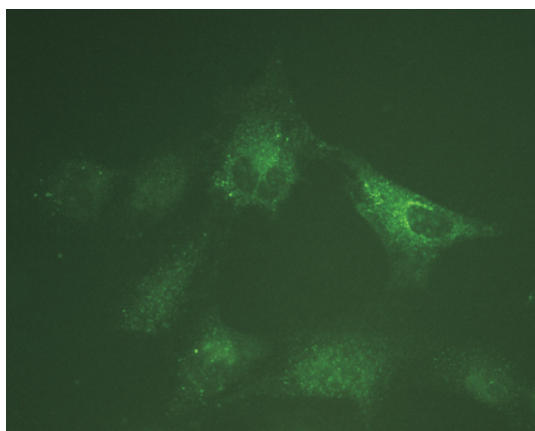


图1 人角膜上皮细胞角蛋白免疫荧光染色( $\times 400$ ) 荧光显微镜下 HCE 细胞胞浆角蛋白染色阳性,呈绿色,可见细胞轮廓。

2.2 细菌培养结果 Middlebrook 7H10 培养基上可见圆形、无色、边缘完整的菌落,抗酸染色后光镜下可见抗酸阳性的细杆状细菌,未见杂菌生长。

2.3 人角膜上皮细胞内 IL-6 和 IL-8 的表达 龟分枝杆菌脂葡聚糖处理 HCE 细胞后,12h 内 IL-6 和 IL-8 在 mRNA 水平明显增加,6h 时即达到峰值(IL-6 是空白组的 32.7 倍,IL-8 是对照组的 36.8 倍;图 2,3)。各组 IL-6 和 IL-8 蛋白浓度见表 2 和表 3,空白对照组:HCE 细胞 IL-6 和 IL-8 表达水平低,24h 内变化没有统计学差异;在脂葡聚糖( $50\mu\text{g}/\text{mL}$ )或是 LPS( $100\text{ng}/\text{mL}$ )作用下,IL-6 和 IL-8 表达水平均显著上升,短时间(24h 内)呈现出时间依赖性关系,实验组 IL-8 在 6h 时与空白组之间无统计学意义( $P>0.05$ ),其余各时间点与空白对照组之间变化均有统计学差异( $P<0.05$ )。

2.4 人角膜上皮细胞内 NF- $\kappa$ B 的分布 HCE 细胞正常状态下,NF- $\kappa$ B 定位于细胞胞浆内,在荧光显微镜下可见红染的 NF- $\kappa$ B 存在于细胞浆内,勾勒出细胞轮廓,而细胞核内无红色染料存在,呈现出镂空的细胞核形态(图 4);HCE 细胞经过脂葡聚糖处理 24h 后,红染的 NF- $\kappa$ B 发生移位,出现在细胞核的位置,与 Hoechst 染色的细胞核相重叠,表明此时 NF- $\kappa$ B 已经移位至细胞核内(图 5)。

### 3 讨论

我们之前的研究发现,非结核分枝杆菌角膜炎早期的组织病理学改变以中性白细胞浸润为主,并有角膜上皮和基质的坏死,溃疡形成,呈急性化脓性炎症改变;慢性期病变角膜中可见中性粒细胞和淋巴细胞浸润,并见新生血管

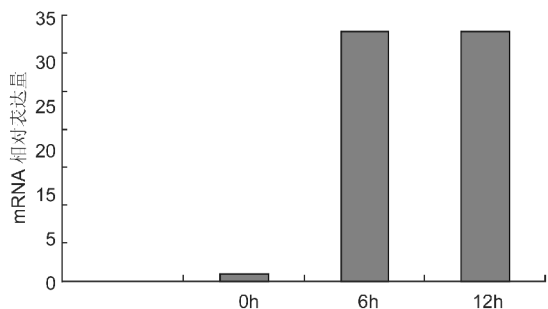


图2 龟分枝杆菌脂葡聚糖在 mRNA 水平对 HCE 细胞炎症因子 IL-6 表达的影响。

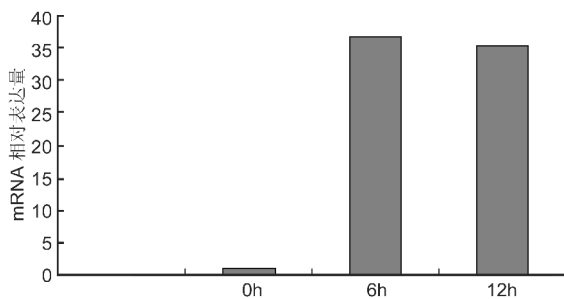


图3 龟分枝杆菌脂葡聚糖在 mRNA 水平对 HCE 细胞炎症因子 IL-8 表达的影响。

形成及纤维瘢痕组织增生,以及非典型肉芽肿形成,呈非特异性慢性炎症改变,表明其符合一般感染性化脓性角膜炎的基本病理改变。动物实验提示  $\text{CD4}^+$  细胞介导的细胞免疫反应在感染中起重要作用<sup>[2,3]</sup>。

龟分枝杆菌等 RGM 没有真正的外毒素,无侵袭性酶,毒性很低,却可刺激组织反应,导致细胞免疫反应和组织坏死,其具体机制至今未明确。研究发现,分枝杆菌细胞壁内含有大量的脂类物质,以脂阿拉伯甘露聚糖(LAM)和脂甘露聚糖(LM)为代表的脂葡聚糖是分枝杆菌细菌壁的主要组成成分。LAM 核心骨架为甘露聚糖,侧链为甘露糖、阿拉伯糖单位,以磷脂酰肌醇(MIP)的形式锚在胞质膜上,LAM 抗原表位存在于阿拉伯甘露聚糖单位上。小同种间、株间 LAM 存在差异,主要体现在其非还原端阿拉伯糖单位构成形式即花色上,LM 被认为是 LAM 的前体。LAM 被认为是结核分枝杆菌的毒力因子之一,通过与巨噬细胞上的甘露糖受体作用而调节宿主的免疫反应,它以复杂的脂多糖形式限制性地分布在分枝杆菌类群的细胞膜上,纯化后的 LAM 参与了结核杆菌体内感染时抑



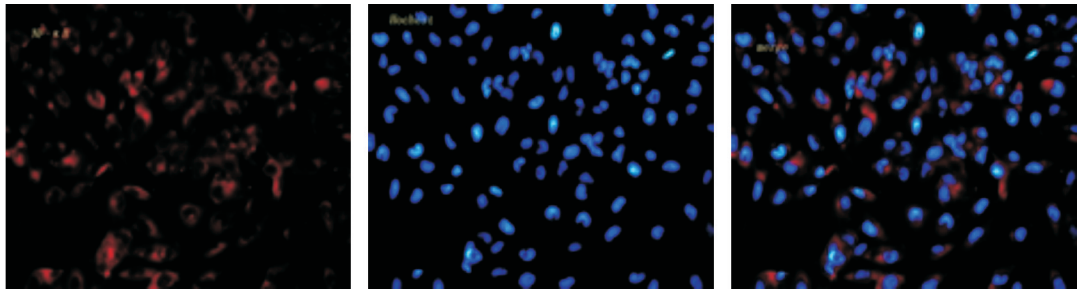


图4 空白组 HCE 细胞 NF- $\kappa$ B 分布 A: NF- $\kappa$ B 染色,呈红色,位于胞浆内,可见细胞轮廓;B: Hoechst 染色,可见蓝色细胞核;C:融合图片,红色和蓝色重合,显示 NF- $\kappa$ B 主要位于胞浆内。

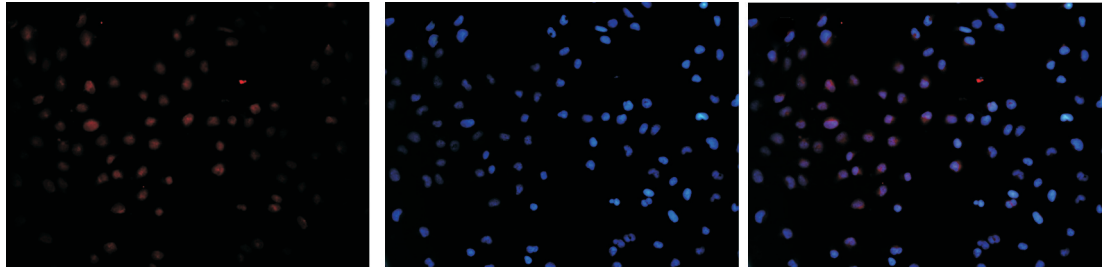


图5 脂葡聚糖处理组 HCE 细胞 NF- $\kappa$ B 分布 A: NF- $\kappa$ B 染色,呈红色,可见细胞轮廓;B: Hoechst 染色,可见蓝色细胞核;C:融合图片,红色与蓝色重合,显示 NF- $\kappa$ B 主要位于细胞核内。

制某些细胞因子分泌的作用如 IL-12, INF- $\alpha$  和 IL-8, 使诱发的巨噬细胞凋亡减少并调节树突状细胞的抗原呈递过程,对结核杆菌的毒力和免疫逃避作用可能有大的影响。这些因子与多种细胞之间相互作用,从而在人类免疫系统发挥着关键性的作用。事实上, LAM 和 LM 具有广泛的生物学活性,一方面强化机体抗分枝杆菌的免疫屏障作用,另一方面抑制免疫反应从而有利于分枝杆菌的存活。这些作用包括:调节促炎因子与抗炎因子产生和分泌<sup>[4-8]</sup>,抑制巨噬细胞杀灭微生物的活性作用<sup>[9]</sup>,抑制 T 淋巴细胞增殖<sup>[10]</sup>。

我们在此实验中选择非结核分枝杆菌性角膜炎的主要致病菌龟分枝杆菌标准菌株进行试验,通获得脂葡聚糖样品,本样品为混合物,其主要成分为 LAM 和 LM。使用 LPS(100ng/mL)刺激时,IL-6 和 IL-8 表达水平在 6h 时显著上升。龟分枝杆菌脂葡聚糖(50 $\mu$ g/mL)刺激 HCE 细胞后,IL-6 和 IL-8 mRNA 表达水平是空白组的 30 倍以上,上清内 IL-8 蛋白水平逐渐上升,6h 和 12h 与空白组相比无统计学差异,24h 差异有统计学差异;IL-6 蛋白水平同样逐渐上升,在 24h 内表达水平呈现时间依赖性上升,各时间点差异均有统计学差异。

本实验证实,龟分枝杆菌来源脂葡聚糖对人角膜上皮细胞具有明显诱导炎性因子 IL-6 和 IL-8 分泌的作用。表明龟分枝杆菌来源脂葡聚糖对人角膜上皮细胞具有明显促进炎性因子分泌的作用,推测其在非结核分枝杆菌性角膜炎发病早期中扮演重要角色。但是,脂葡聚糖究竟是通过何种途径影响炎性因子表达?我们对其可能的信号转导通路进行了进一步探索研究。

核转录因子(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)是一个广泛存在于哺乳动物细胞中的转录因子,参与机体的炎症反应、免疫反应、细胞分化与凋亡及其它应激反应。NF- $\kappa$ B 是由 Rel 蛋白家族(p50, p52, p65, RelA, RelB, c2Rel)任意两种蛋白所组成的同源或异源二聚体。p50-p65 在细胞中占很大的比例,是 NF- $\kappa$ B 家族参与基因转录的主要成分。

NF- $\kappa$ B 通常定位于细胞浆内,以 p65/p50 异源二聚体的形式存在,结合抑制分子 I $\kappa$ B 形成 p65-p50-I $\kappa$ B 三聚体,以非活化的形式存在于细胞浆内,与本实验发现相一致。当受到外部刺激的作用时,NF- $\kappa$ B 被激活,迁移至细胞核内<sup>[11]</sup>,之后激活的 NF- $\kappa$ B 结合靶基因,调节细胞炎性细胞因子基因表达(TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6)。激活的 NF- $\kappa$ B 通过原位免疫组织化学定位 LPS 诱导角膜炎的 DNA 结合亚单位 p65<sup>[12]</sup>。我们实验中发现,红染 NF- $\kappa$ B 勾勒出 HCE 细胞轮廓,并且可见清晰的细胞核阴影,表明此时 NF- $\kappa$ B 位于胞浆内;脂葡聚糖刺激 24h,可见红染的 NF- $\kappa$ B 与 Hoechst 染色的细胞核基本重叠,此时 NF- $\kappa$ B 转入细胞核内,表明此时 NF- $\kappa$ B 已经被活化。但是外界脂葡聚糖是如何影响胞浆内 NF- $\kappa$ B 的呢?他们之间还需要一个桥梁,这极可能与 Toll 样受体(TLR)相关。

TLR 家族是人们在研究 Toll 蛋白时发现的<sup>[13]</sup>。Toll 蛋白表达于昆虫,参与昆虫胚胎发育时背腹极性的建立。研究发现,Toll 蛋白在昆虫抵抗真菌的天然免疫中发挥着重要作用。随后发现与 Toll 蛋白同源的 TLR 家族,至今在哺乳动物体内共发现 11 个成员<sup>[14]</sup>。

从结构上来看,TLR 属于 I 类跨膜蛋白质,可分为胞外区、胞浆区和跨膜区三个部分。胞外区由 550~980 个氨基酸残基组成,其中有 18~31 个富含亮氨酸的重复序列,参与对病原微生物的识别;胞浆区由 200 多个氨基酸残基组成,与白介素-1 受体(IL-1R)家族的胞浆区高度同源,该区称 Toll/IL-1R 同源区(TIR),介导细胞内的信号转导<sup>[15]</sup>。

角膜宿主细胞包括角膜上皮细胞、基质成纤维细胞和内皮细胞以及炎症细胞,如单核细胞、中性粒细胞和淋巴细胞等,均表达多种 TLR。Toll 样受体(TLR)在角膜抵御外来病原微生物方面发挥着重要作用。表达于角膜的 TLR 识别多种细菌来源的模式分子结构,通过髓样分化因子 88(MyD88)依赖或非依赖信号转导通路激活转录因子 kappa B(NF- $\kappa$ B),介导目的基因表达,引起角膜炎。

文献报道<sup>[16,17]</sup>,分枝杆菌来源的 LAM 或 LM 可以通

过 Toll 样受体 (TLR), 通过骨髓样分化因子 88 (MyD88) 依赖途径, 活化 NF- $\kappa$ B, 激活的 NF- $\kappa$ B 结合靶基因, 调节细胞炎性细胞因子基因表达 (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6), 我们实验结果与此试验结果吻合。

因此, 我们认为龟分枝杆菌来源的脂葡聚糖具有诱导人角膜上皮细胞合成与分泌炎性细胞因子的作用, 其可能的信号转导通路是通过 TLR (可能是一种 TLR, 也可能是多种 TLR 共同作用)-MyD88 依赖途径或者非依赖途径, 至于究竟是何种糖脂起作用或者是起主要作用, 还需要进一步研究; 分枝杆菌可以作为结膜囊内的正常菌群存在, 而非结核分枝杆菌性角膜炎却只有在特殊的情况下才会导致角膜炎的发生, 主要是角膜异物剔除术或者 LASIK 术后, 及配戴角膜接触镜的患者。因此, 机体内必定存在着特殊的保护机制, 抑制不必要的炎症反应发生, 具体机制仍需要进一步研究。

综上所述, 龟分枝杆菌细胞壁内含有的脂葡聚糖具有促进人角膜上皮细胞合成与分泌炎性因子 IL-6 和 IL-8 的作用, 其信号转导通路可能是通过核转录因子 NF- $\kappa$ B 进行的。

#### 参考文献

- 1 史丽滨. 耻垢分枝杆菌 EmnC 蛋白 C 端的功能探索. 大连医科大学 2005
- 2 殷丽, 姚勇, 管怀进, 等. 非结核分枝杆菌性角膜炎治疗的实验研究. 中华眼科杂志 2013;49(9):829-834
- 3 殷丽, 姚勇, 杨国仪, 等. 非结核分枝杆菌性角膜炎的病理学研究. 中国实用眼科杂志 2013;31(10):1349-1356
- 4 Chatterjee D, Roberts AD, Lowell K, et al. Structural basis of capacity of lipoarabinomannan to induce secretion of tumor necrosis factor. *Infect Immun* 1992;60(3):1249-1253
- 5 Zhang Y, Doerfler M, Lee TC, et al. Mechanisms of stimulation of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha by Mycobacterium tuberculosis components. *J Clin Invest* 1993;91(5):2076-2083
- 6 Zhang Y, Broser M, Cohen HM, et al. Enhanced interleukin-8 release and gene expression in macrophages after exposure to Mycobacterium tuberculosis and its components. *J Clin Invest* 1995;95(2):586-592

- 7 Yoshida A, Koide Y. Arabinofuranosyl-terminated and mannosylated lipoarabinomannans from Mycobacterium tuberculosis induce different levels of interleukin-12 expression in murine macrophages. *Infect Immun* 1997;65(5):1953-1955
- 8 Nigou J, Zelle - Rieser C, Gilleron M, et al. Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cell: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J Immunol* 2001;166(12):7477-7485
- 9 Sibley LD, Hunter SW, Brennan PJ, et al. Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma interferon - mediated activation of macrophages. *Infect Immun* 1988;56(5):1232-1236
- 10 Moreno C, Mehlert A, Lamb J. The inhibitory effects of mycobacterial lipoarabinomannan and polysaccharides upon polyclonal and monoclonal human T cell proliferation. *Clin Exp Immunol* 1988;74(2):206-210
- 11 Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu Rev Immunol* 2000;18:621-663
- 12 Tsao PW, Suzuki T, Totsuka R, et al. The effect of dexamethasone on the expression of activated NF - kappa B in adjuvant arthritis. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;83(2):173-178
- 13 Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, et al. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/ Toll/ cactus control the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell* 1996;86(6):973-983
- 14 Vives - Pi M, Somoza N, Fernandez - Alvarez J, et al. Evidence of expression of endotoxin receptors CD14, Toll-like receptors TLR4 and TLR2 and associated molecule MD - 2 and of sensitivity to endotoxin (LPS) in islet beta cells. *Clin Exp Immunol* 2003;133(2):208-218
- 15 Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003;21:335-376
- 16 Vignal C, Guerardel Y, Kremer L, et al. Lipomannans, but not lipoarabinomannans, purified from Mycobacterium chelonae and Mycobacterium kansasii induce TNF-alpha and IL-8 secretion by a CD14-toll-like receptor 2-dependent mechanism. *J Immunol* 2003;171(4):2014-2023
- 17 Quesniaux VJ, Nicolle DM, Torres D, et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) - dependent - positive and TLR2 - independent - negative regulation of proinflammatory cytokines by mycobacterial lipomannans. *J Immunol* 2004;172(7):4425-4434