

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20180528.002

宁雪萍,杨东君,张依,等. TLR2 和 TLR6 在鸟分枝杆菌诱导巨噬细胞凋亡中的作用[J]. 广西科学,2018,25(3):318-324.

NING X P, YANG D J, ZHANG Y, et al. The effect of TLR2 and TLR6 on *Mycobacterium avium* induced macrophages apoptosis [J]. Guangxi Sciences, 2018, 25(3): 318-324.

TLR2 和 TLR6 在鸟分枝杆菌诱导巨噬细胞凋亡中的作用 *

The Effect of TLR2 and TLR6 on *Mycobacterium avium* Induced Macrophages Apoptosis

宁雪萍,杨东君,张依,田爽,凌敏**

NING Xueping, YANG Dongjun, ZHANG Yi, TIAN Shuang, LING Min

(广西医科大学,广西高校生物分子医学研究重点实验室,生物化学与分子生物学教研室,广西南宁 530021)

(Key Laboratory of Biological Molecular Medicine Research of Guangxi University, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, 530021, China)

摘要:【目的】建立鸟分枝杆菌感染巨噬细胞模型,探讨 Toll 样受体 2(TLR2)和 Toll 样受体 6(TLR6)在鸟分枝杆菌诱导巨噬细胞凋亡中的作用,为阐明鸟分枝杆菌致病机制提供依据。【方法】用鸟分枝杆菌感染 U937 细胞,于感染 0 h、8 h、16 h、24 h 和 48 h 后分别提取细胞总蛋白,并通过 Western blot 方法检测 TLR2 和 TLR6 的表达;分别提取细胞培养上清液,利用 ELISA 技术检测肿瘤坏死因子(TNF- α)含量的变化情况。用鸟分枝杆菌感染阻断 TLR2 和 TLR6 后的 U937 细胞,通过 Western blot 方法分别检测其促凋亡因子 BAX 和抗凋亡因子 BCL-2 的表达量,用 ELISA 技术检测细胞培养上清液中 TNF- α 含量变化情况,用流式细胞仪检测 U937 细胞的凋亡变化。【结果】鸟分枝杆菌感染 U937 细胞可引起 TLR2、TLR6 和 TNF- α 表达上调;用鸟分枝杆菌感染阻断 TLR2 和 TLR6 后的 U937 细胞,可使 U937 细胞内促凋亡因子 BAX 和 TNF- α 表达量下降($P < 0.05$),抗凋亡因子 BCL-2 表达量升高($P < 0.05$),并可以明显降低感染鸟分枝杆菌后的细胞的凋亡率($P < 0.05$)。【结论】TLR2 和 TLR6 与巨噬细胞凋亡相关,巨噬细胞通过 TLR2 和 TLR6 来识别鸟分枝杆菌,而鸟分枝杆菌反过来通过促进 TLR2 和 TLR6 的表达来影响巨噬细胞相关凋亡通路,从而诱导巨噬细胞凋亡。

关键词:鸟分枝杆菌 巨噬细胞 TLR2 TLR6 细胞凋亡

中图分类号:Q786 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2018)03-0318-07

Abstract:【Objective】A *Mycobacterium avium*-infected macrophage model was established to investigate the role of Toll-like receptor 2 (TLR2) and Toll-like receptor 6 (TLR6) in the apoptosis of macrophages induced by *Mycobacterium avium* and to provide a basis for clarifying the pathogenesis of *Mycobacterium avium*. 【Methods】U937 cells were infected with

Mycobacterium avium at 0 h, 8 h, 16 h, 24 h, and 48 h time points, respectively, and then the total proteins of the cells were used to detect the expression of TLR2 and TLR6 by Western blot. The cell culture supernatants were extracted respectively and the changes of tumor necrosis factor (TNF- α) content were detected by ELISA. The cytokines TNF- α was measured by ELISA from U937 cells supernatant. TLR2 and TLR6

收稿日期:2018-04-21

作者简介:宁雪萍(1990—),女,硕士,主要从事病原生物学研究。

* 国家自然科学基金项目(81260245)和广西自然科学基金项目(2015GXNSFAA139077)资助。

** 通信作者:凌敏(1970—),男,教授,博士生导师,主要从事基因工程药物和基因诊断研究,E-mail:lingmin70@163.com。

monoclonal antibody were used to treat the U937 cells 1 h before *Mycobacterium avium* stimulation. The expression of BAX and BCL-2 was evaluated by Western blot. The cytokines of TNF- α was measured by ELISA from U937 cells supernatant. U937 cell apoptosis rate was detected with flow cytometry. **【Results】** *Mycobacterium avium* infection of U937 cells could cause the upregulation of TLR2, TLR6, and TNF- α expression. Blocking U937 cells after TLR2 and TLR6 infection with *Mycobacterium avium* could cause the expression of proapoptotic factors BAX and TNF- α in U937 cells. The amount was decreased ($P < 0.05$), the expression level of anti-apoptosis factor BCL-2 was increased ($P < 0.05$), and the apoptosis rate of cells infected with *Mycobacterium avium* was significantly decreased ($P < 0.05$). **【Conclusion】** TLR2 and TLR6 are associated with macrophage apoptosis, macrophages recognize *M. avium* by TLR2 and TLR6, whereas *Mycobacterium avium* in turn affects macrophage-associated apoptosis pathways by promoting the expression of TLR2 and TLR6.

Key words: *Mycobacterium avium*, macrophage, TLR2, TLR6, apoptosis

0 引言

【研究意义】结核病(Tuberculosis, TB)是全世界十大死因之一。据 WHO 报告^[1]显示,2016 年 1 040 万人患有结核病,170 万人因该病死亡(包括 40 万艾滋病毒感染者)。结核病由经常感染肺部的结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)引起。随着研究的深入,人们认识到非结核分枝杆菌(*Nontuberculous mycobacteria*, NTM)也可能对人类的生命和健康构成威胁,其中鸟分枝杆菌(*Mycobacterium avium*, MA)感染比例最大^[2]。鸟分枝杆菌主要在巨噬细胞等宿主免疫系统的细胞内存活和繁殖,经常会引起吞噬体成熟和巨噬细胞的抗凋亡反应。巨噬细胞被鸟分枝杆菌感染后可以引发一系列细胞信号通路的激活以及免疫反应的起始^[3]。先天免疫系统使宿主能够识别外来侵入的微生物,是抵御外来感染的主要防线,巨噬细胞细胞膜上 Toll 样受体(Toll-like receptor, TLRs)是这一过程的中心。Toll 样受体可识别病原体的相关分子模式(Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)并启动信号通路,导致先天性免疫反应、细胞因子和适应性免疫应答的形成^[4]。PAMPs 是保守的微生物结构,如脂多糖(LPS),脂肽和 DNA^[5]。TLRs 识别 PAMPs 发生在宿主防御反应的最早阶段,并且这些先天受体诱导细胞内炎症基因的表达,以消除入侵的病原体^[3,6]。所产生的炎症是旨在控制侵入微生物的免疫应答中的关键早期步骤^[7]。分枝杆菌表面成分复杂,既存在可以被巨噬细胞识别而诱导巨噬细胞凋亡的相应配体,部分细菌表面成分又具有抑制凋亡的作用。因此,阐明 TLRs 在鸟分枝杆菌诱导巨噬细胞凋亡中的作用显得尤为重要。**【前人研究进展】**巨噬细胞主要依赖于分枝杆菌与 Toll 样受体的相互作用来识别吞噬分枝杆菌,故近年来分枝杆菌与 Toll 样受体之间的关系倍受关注。在 Toll 样受体家

族中,关于 TLRs 研究最多的是 TLR4,其次是 TLR2^[8-9]。TLR2 并不像 TLR4 一样单独起作用,而是与 TLR1 或 TLR6 形成异源二聚体,以感应分枝杆菌的 PAMPs,并通过衔接蛋白 MyD88 和 TIRAP 激活巨噬细胞和树突状细胞^[10]。TLR2 被认为是识别分枝杆菌表面组分的主要受体,并且在控制分枝杆菌感染中具有重要作用。TLR6 与 TLR2 相关,识别二酰化脂蛋白,其是宿主炎症反应的有效诱导剂。**【本研究切入点】**研究表明,TLR2 和 TLR6 多态性与某些人群的结核病风险增加有关^[7]。然而,TLR2 和 TLR6 在鸟分枝杆菌诱导巨噬细胞凋亡中的作用及其机制尚未完全清楚。**【拟解决的关键问题】**构建鸟分枝杆菌感染人体巨噬细胞 U937 模型,分析 TLR2 和 TLR6 在细胞中的表达情况。利用单克隆抗体分别或同时阻断 TLR2 和 TLR6 在巨噬细胞内的表达,分析与细胞凋亡相关的细胞因子 TNF- α 的分泌量和细胞凋亡的关键蛋白 BCL-2、BAX 的表达量变化情况,以阐明两个细胞表面受体 TLR2 和 TLR6 在鸟分枝杆菌诱导人体巨噬细胞凋亡时所起的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞

人单核巨噬细胞系 U937,购自和元生物技术(上海)有限公司。

1.1.2 菌株

鸟分枝杆菌(*Mycobacterium avium*, MA)临床分离株由本实验室保存。

1.1.3 主要试剂及仪器

Middle brook 7H9/OADC 培养基(美国 BD 公司);RPMI 1460 培养基(诺唯赞);Toll-like receptor 2 antibody, Toll-like receptor 6 antibody, TNF- α 凋亡试剂盒(北京博士德生物有限公司)。SDS-PAGE 电泳装置(美国 Bio-Rad 公司);流式细胞仪(Merck

Millipore)。

1.2 方法

1.2.1 鸟分枝杆菌培养

将鸟分枝杆菌接种于 Middle brook 7H9/OADC 液体培养基中,于 37℃ 培养 15 d 至对数生长期,使用麦氏比浊仪,测定菌液浊度 (McFarland turbidity standard, McF)。实验前,将鸟分枝杆菌培养物离心,去上清,用 PBS 洗涤两次,用含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液重悬并稀释,调整菌液浓度为 1×10^8 CFU / mL。

1.2.2 巨噬细胞 U937 培养

U937 细胞使用含有 10% 胎牛血清, 100 μ g/mL 青霉素, 30 μ g/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养液,在 37℃、5% CO₂ 的条件下培养。每 48 h 换液传代 1 次。用无抗生素的培养液调整培养瓶里的细胞浓度达到 1×10^6 个/mL, 2 mL/孔铺于 6 孔板中。

1.2.3 鸟分枝杆菌感染巨噬细胞模型的建立

U937 细胞和鸟分枝杆菌按照上述方法培养后,按照细胞比细菌为 100 : 1 的比例将细菌加入 U937 细胞的 6 孔板中,在 37℃、5% CO₂ 的条件下培养。另外,未感染鸟分枝杆菌的 U937 细胞悬液作为对照组。

1.2.4 TLR2、TLR6 和 TNF- α 表达的检测

分别取鸟分枝杆菌感染后 4 h, 8 h, 16 h, 24 h 和 48 h 各感染组的 U937 细胞,用预冷的 PBS 洗 3 次,每 1×10^6 个细胞加入 100 μ L 的细胞裂解液,冰上裂解 10 min, 4℃、12 000 g 离心 15 min, 收集上清, BCA 法测定蛋白浓度。以 β -actin 为内参, Western blot 分别检测细胞内 TLR2 和 TLR6 表达量,取其细胞培养上清液用 ELISA 检测 TNF- α 含量的变化。

1.2.5 U937 细胞分组干预

本实验分为空白组、实验组、对照组。实验组分别用 TLR2 单克隆抗体 (10 mg/L)、TLR6 单克隆抗体 (10 mg/L)、TLR2 单克隆抗体 + TLR6 单克隆抗体 (10 mg/L) 孵育 U937 细胞 1 h 后,加入鸟分枝杆菌 (1×10^8 CFU/mL) 刺激细胞 24 h; 对照组鸟分枝杆菌 (1×10^8 CFU/mL) 感染 U937 细胞 24 h; 空白组加入等体积的 PBS。

将各组分成 3 份检测。一份离心取沉淀用 Western blot 检测细胞内关键蛋白 BAX 和 BCL-2 的含量; 一份离心取细胞培养上清液用 ELISA 检测 TNF- α 的含量; 一份用流式细胞仪检测 U937 细胞的凋亡率。

1.2.6 统计学方法

应用 SPSS 17.0 软件处理,统计资料以均数 \pm 标准差 ($x \pm s$) 表示,组间均数比较采用单因素方差分析,两组实验数据检验比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

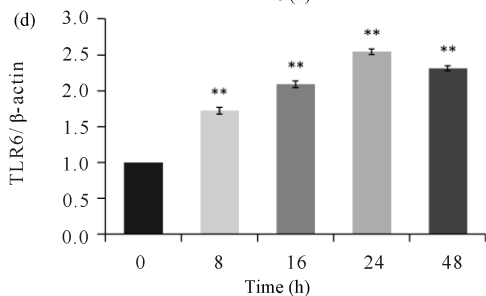
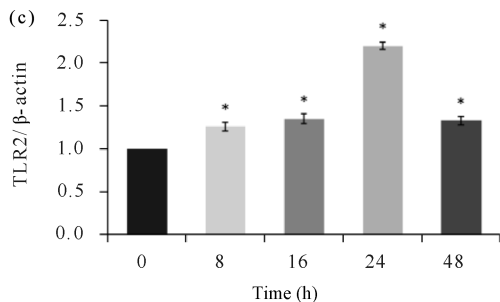
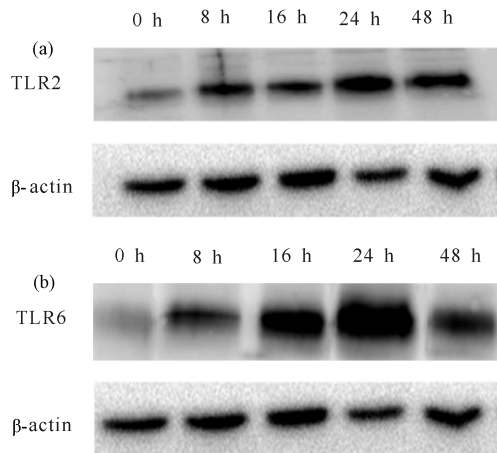
2.1 鸟分枝杆菌感染 U937 细胞对 TLR2、TLR6 和 TNF- α 表达的影响

用鸟分枝杆菌感染 U937 细胞并分别于感染 0 h、8 h、16 h、24 h 和 48 h 后检测 TLR2、TLR6 和 TNF- α 的表达水平。Western blot 检测结果显示,在相应的分子量位置上均有可见条带 (图 1a、1b),说明 TLR2 和 TLR6 在 U937 细胞正常状态下也有表达。使用 Alpha View 软件对 Western blot 结果进行分析,将 TLR2 和 TLR6 条带的灰度值与 β -actin 条带的灰度值进行相比,所得比值客观反映鸟分枝杆菌感染 U937 细胞不同的感染时间内两种受体 TLR2 和 TLR6 的表达量以及其变化。结果显示 (图 1c、1d),随着鸟分枝杆菌感染 U937 细胞的时间的增加,TLR2 和 TLR6 蛋白表达都显著上调,且在感染 24 h 后随着时间的延长,表达量逐渐下降并趋于稳定。因此,以下试验均选定感染时间为 24 h。

通过用 ELISA 方法检测不同感染时间下 U937 细胞培养物上清液中 TNF- α 的含量,由图 2 可见感染 4 h 内,实验组与对照组相比, TNF- α 的含量变化不大。4 h 后,实验组的 TNF- α 的含量开始增加,感染 24 h 后随着时间的延长,其含量逐渐下降并趋于稳定。其结果与 TLR2 和 TLR6 蛋白表达量变化一致,说明 TLR2 和 TLR6 与鸟分枝杆菌诱导巨噬细胞凋亡相关。

2.2 不同处理因素对 BAX 和 BCL-2 蛋白表达的影响

分别用 TLR2 单克隆抗体 (10 mg/L)、TLR6 单克隆抗体 (10 mg/L)、TLR2 单克隆抗体 + TLR6 单克隆抗体 (10 mg/L) 孵育 U937 细胞 1 h 后,加入鸟分枝杆菌 (1×10^8 CFU/mL) 刺激细胞 24 h,提取细胞总蛋白,检测 U937 细胞内关键蛋白的含量变化。Western blot 检测结果经 AlphaView 软件分析,结果显示促凋亡蛋白 BAX 蛋白 (图 3a、3c) 的表达与对照组相比明显下调 ($P < 0.01$),而抑制凋亡蛋白 BCL-2 蛋白 (图 3b、3d) 的表达与对照组相比显著上升 ($P < 0.01$)。

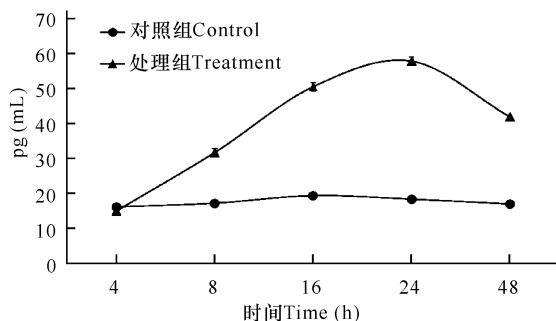


Western blot 检测 TLR2 和 TLR6 的表达情况。与对照组相比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

The protein expression of TLR2 and TLR6 was detected by Western blot. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ control

图 1 *Mycobacterium avium* 感染 U937 细胞对 TLR2 和 TLR6 蛋白表达的影响

Fig. 1 Expression of TLR2 (a, c) and TLR6 (b, d) in U937 cells infected with *Mycobacterium avium*

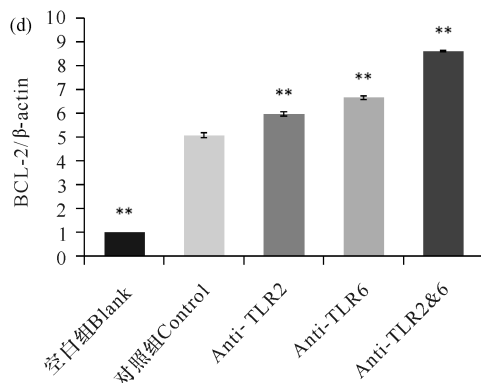
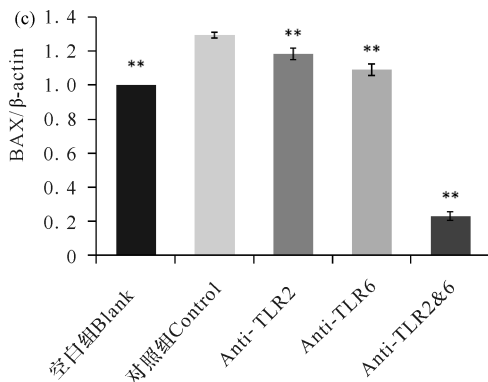
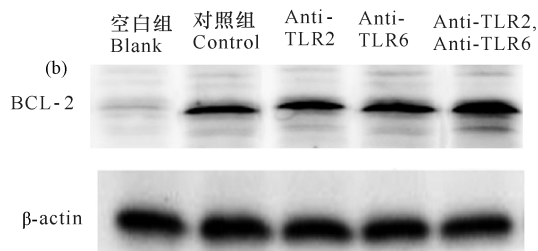
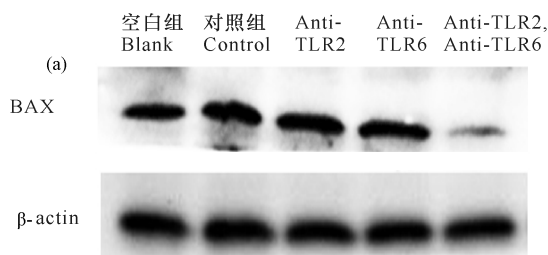


用 ELISA 技术检测 U937 细胞培养上清液中 TNF- α 含量

The cytokines of TNF- α was measured by ELISA from U937 cells supernatant

图 2 TNF- α 含量随感染时间的变化

Fig. 2 The changes in content of TNF- α with time of infection



Western blot 检测 BAX 和 BCL-2 的表达情况。与对照组相比 * $P < 0.01$

The expression of BAX and BCL-2 was detected by Western blot. ** $P < 0.01$ vs control

图 3 BAX 和 BCL-2 蛋白含量在不同处理因素中的表达情况

Fig. 3 The protein content of BAX(a, c) and BCL-2(b, d) under different treatment factors

2.3 不同处理因素 TNF- α 含量的变化

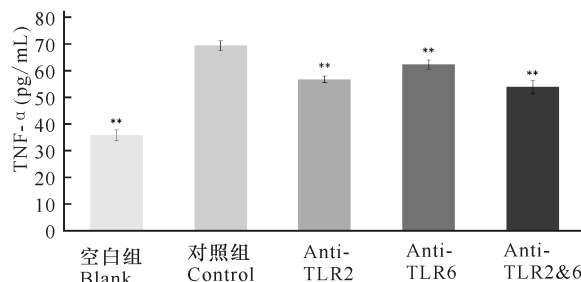
分别用 TLR2 单克隆抗体(10 mg/L)、TLR6 单克隆抗体(10 mg/L)、TLR2 单克隆抗体+TLR6 单克隆抗体(10 mg/L)孵育 U937 细胞 1 h 后,加入鸟分枝杆菌(1×10^8 CFU/mL)刺激细胞 24 h 后通过 ELISA 方法检测其培养上清液中 TNF- α 的含量,如

图 4 所示,空白组与对照组相比较,对照组中TNF- α 的含量显著增加($P < 0.01$)。U937 细胞与 TLR2 单克隆抗体或 TLR6 单克隆抗体的预孵育显著阻断了鸟分枝杆菌诱导的 TNF- α 的产生。然而,与用单独用 TLR2 单克隆抗体或 TLR6 单克隆抗体预培养的细胞相比,同时用 TLR2、TLR6 单克隆抗体处理的 U937 细胞对 TNF- α 释放具有更大的影响。结果表明 TLR2 和 TLR6 参与了 U937 细胞对鸟分枝杆菌识别,并抑制 TNF- α 的产生。

2.4 不同处理因素 U937 细胞的凋亡率的变化情况

为了进一步验证 TLR2 和 TLR6 与巨噬细胞的凋亡关系,将 TLR2 和 TLR6 单克隆抗体分别与鸟分枝杆菌共感染巨噬细胞,用流式细胞仪检测巨噬细胞的凋亡率。结果如图 5, 6 所示,阻断 TLR2、TLR6 后,U937 的凋亡率较之未阻断 TLR2、TLR6 时明显下降($P < 0.05$),且同时阻断 TLR2、TLR6 后 U937 的凋亡率为最低。其结果与 TLR2 和 TLR6 单克隆抗体分别与鸟分枝杆菌共感染巨噬细

胞后巨噬细胞内促凋亡蛋白 BAX、抑凋亡蛋白 BCL-2 以及肿瘤凋亡因子 TNF- α 的表达量变化一致。

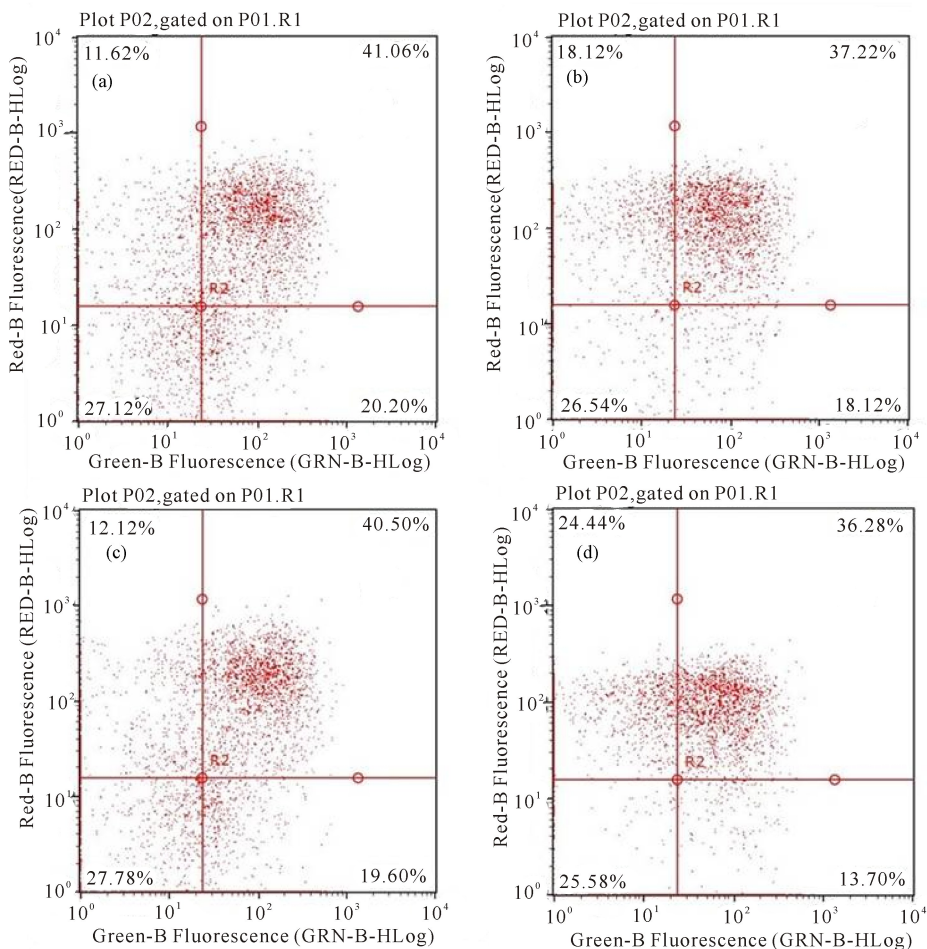


用 ELISA 技术检测 U937 细胞培养上清液中 TNF- α 含量。与对照组相比 ** $P < 0.01$

The cytokines of TNF- α was measured by ELISA from U937 cells supernatant. ** $P < 0.01$ vs control

图 4 TNF- α 含量在不同感染组中的情况

Fig. 4 The content of TNF- α in different infection groups

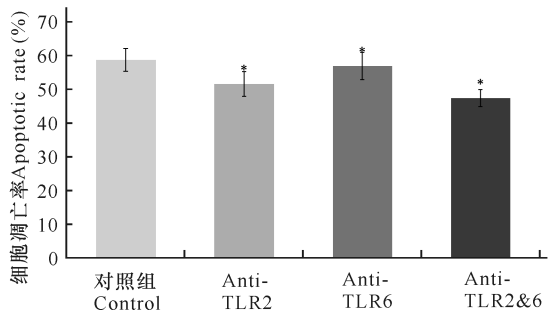


用流式细胞仪检测 U937 细胞的凋亡变化。(a)对照组;(b)TLR2 抗体;(c)TLR6 抗体;(d)TLR2 和 TLR 6 抗体

U937 cell apoptosis changes was detected with flow cytometry. (a)Control;(b)Anti-TLR2;(c)Anti-TLR6;(d)Anti-TLR2,6

图 5 各个感染组感染巨噬细胞 24 h 后流式细胞仪检测的凋亡率

Fig. 5 The apoptotic rate measured by cyto flowmetry after infected for 24 h in different infection-groups



用流式细胞仪检测 U937 细胞的凋亡变化。与对照组相比 * $P < 0.05$

U937 cell apoptosis changes was detected with flow cytometry * $P < 0.05$ vs control.

图 6 阻断 TLR2、TLR6 后,鸟分枝杆菌感染 U937 细胞的凋亡率的变化情况

Fig. 6 Apoptotic rate changes of U937 cells after *Mycobacterium avium* without TLR2-blocking or TLR6-blocking

3 讨论

鸟分枝杆菌是一种寄生于细胞内的分枝杆菌,容易在患有免疫缺陷症病人的体内被查到。感染宿主后巨噬细胞在防御方面起重要作用,巨噬细胞通过 TLRs 等表面受体来识别多种分枝杆菌的 PAMP,进而将其吞噬进巨噬细胞内部。鸟分枝杆菌在人体内被巨噬细胞吞噬之后,为了可以在巨噬细胞体内生长繁殖,演化出一系列逃脱巨噬细胞消除机制的行为,从而使自己存活下来,进而感染宿主。

TNF- α 为肿瘤凋亡因子,是一种与细胞凋亡息息相关的细胞因子,它是凋亡的主要外源调节物^[11]。细胞的凋亡会引起 TNF- α 的释放,而 TNF- α 进而会与 TNFR 结合,引起相关的细胞凋亡。TLRs 参与识别和建立保护性免疫应答^[12]。巨噬细胞通过 TLR2 和 TLR6 识别鸟分枝杆菌,而鸟分枝杆菌又能反过来调节 TLR2 和 TLR6 的表达。本实验中,我们使用鸟分枝杆菌感染 U937 细胞,研究鸟分枝杆菌感染巨噬细胞后诱导巨噬细胞凋亡的情况。实验过程中,鸟分枝杆菌感染巨噬细胞后,TNF- α 含量逐渐升高,在感染时间达到 24 h 时达到最高,之后缓慢下降趋于平缓,而两种关键受体 TLR2 和 TLR6 的表达量也随着鸟分枝杆菌的感染时间的增加而显著上调,于 24 h 后又有所下降。TNF- α 与两种关键 Tolls 受体的表达量变化一致 ($P < 0.05$),说明 TLR2 和 TLR6 与鸟分枝杆菌诱导巨噬细胞的凋亡相关。

我们还通过阻断 U937 细胞的 TLR2 和 TLR6 后感染鸟分枝杆菌,观察 U937 细胞促凋亡蛋白 BAX 和抑凋亡蛋白 BCL-2 表达量以及其凋亡水平

的变化,以进一步明确 TLR2 和 TLR6 在鸟分枝杆菌感染巨噬细胞中的作用。结果显示在分别阻断 TLR2 和 TLR6 后,鸟分枝杆菌感染的 U937 细胞促凋亡蛋白 BAX 表达量下降 ($P < 0.01$),抑凋亡蛋白 BCL-2 表达量上升 ($P < 0.01$),凋亡率下降 ($P < 0.05$),与未阻断 TLR2 和 TLR6 的 U937 细胞比较均有显著差异 ($P < 0.05$)。而同时阻断 TLR2 和 TLR6 后,鸟分枝杆菌感染的 U937 细胞这两种关键蛋白和凋亡率均表现出同样的趋势,且较分别阻断 TLR2 和 TLR6 更显著。同时其上清液中的 TNF- α 的含量也表现出了明显的下降趋势 ($P < 0.01$)。

4 结论

鸟分枝杆菌感染巨噬细胞 U937 的过程中,TLR2 和 TLR6 参与了 U937 细胞对鸟分枝杆菌识别,在鸟分枝杆菌诱导巨噬细胞的凋亡过程中有重要作用,而鸟分枝杆菌又可以通过促进 TLR2 和 TLR6 的表达来影响巨噬细胞相关的凋亡通路,从而诱导巨噬细胞的凋亡。

参考文献:

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report [EB/OL]. <http://www.who.int/zh>. 2017.
- [2] GRIFFITH D E, AKSAMIT T, BROWN-ELLIOTT B A, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 175 (4):367-416.
- [3] ZHU J, MOHAN C. Toll-like receptor signaling pathways-therapeutic opportunities[J]. *Mediators of inflammation*, 2010, (2010-08-04), 2010, 2010(8):781235.
- [4] BAFICA A, SCANGA C A, FENG C G, et al. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2005, 202(12):1715-1724.
- [5] SCHURZ H, DAYA M, MOLLER M, et al. TLR1, 2, 4, 6 and 9 variants associated with tuberculosis susceptibility: A systematic review and meta-analysis[J]. *PLOS ONE*, 2015, 10(10):e0139711.
- [6] BEUTLER B. Microbe sensing, positive feedback loops, and the pathogenesis of inflammatory diseases[J]. *Immunological Reviews*, 2009, 227(1):248-263.
- [7] SHEY M S, RANDHAWA A K, BOWMAKER M, et al. Single nucleotide polymorphisms in toll-like receptor 6 are associated with altered lipopeptide- and mycobacteria-induced interleukin-6 secretion[J]. *Genes & Immunology*

- nity, 2010, 11(7):561-572.
- [8] MIKOCA-WALUS A A, TURNBULL D A, MOULDING N T, et al. Controversies surrounding the comorbidity of depression and anxiety in inflammatory bowel disease patients: a literature review[J]. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2007, 13(2):225-34.
- [9] VICTOR F C, GOTTLIEB A B. TNF-alpha and apoptosis: Implications for the pathogenesis and treatment of psoriasis[J]. *J Drugs Dermatol*, 2002, 1(3):264-275.
- [10] ONEILL L ABOWIE A G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signaling[J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(5):353-64.
- [11] SEDLAK T W, OLTVAI Z N, YANG E, et al. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92(17):7834-7838.
- [12] SWEET L, SCHOREY J S. Glycopeptidolipids from *Mycobacterium avium* promote macrophage activation in a TLR2- and MyD88-dependent manner[J]. *J Leukoc Biol*, 2006, 80(2):415-423.

(责任编辑:陆雁符支宏)

(上接第 317 页 Continue from page 317)

- [12] TANIDA I, SOU Y S, MINEMATSU-KEGUCHI N, et al. Atg8L/Apg8L is the fourth mammalian modifier of mammalian Atg8 conjugation mediated by human Atg4B, Atg7 and Atg3 [J]. *Febs Journal*, 2006, 273(11):2553-2562.
- [13] TANIDA I. Autophagy basics. [J]. *Microbiology and Immunology*, 2011, 55:1-11.
- [14] 宗兆文, 程天民. 绿色荧光蛋白标记在干细胞移植中的应用[J]. *中国临床康复*, 2006, 10(29):141-143.
ZONG Z W, CHENG T M. Application of green fluorescent protein labeling in the study of stem cells transplantation[J]. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation*, 2006, 10(29):141-143.
- [15] 孙艺佩. 绿色荧光蛋白——结构及应用[J]. *当代化工研究*, 2017(8):124-125.
SUN Y P. Green fluorescent protein——structure and application[J]. *Chemical Intermediate*, 2017(8):124-125.
- [16] 张文亮, 张明明, 刘斌, 等. Earle's 盐平衡液饥饿诱导 DLD - 1, HCT - 116, A2780, CHO, Hep G2 和 SMMC7721 肿瘤细胞系自噬发生的时间优化[J]. *中山大学学报:自然科学版*, 2016, 55(4):108-117.
ZHANG W L, ZHANG M M, LIU B, et al. Optimal timing of autophagy occurrence induced by earle's balanced salts solution in DLD-1, HCT-116, A2780, CHO, Hep G2 and SMMC7721 cancer cell lines[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2016, 55(4):108-117.
- [17] MIN Y, XU W, LIU D, et al. Earle's balanced salts solution and rapamycin differentially regulate the *Bacillus Calmette-Guerin*-induced maturation of human dendritic cells[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2013, 45(3):162-169.

(责任编辑:陆雁)