

基于卡介苗感染过程中MAPK-Mcl-1信号通路和巨噬细胞极化调控机制的生物信息学分析及其实验验证

葛睿涵^{1,2}, 李晨^{1,2}, 王生鹏^{1,3,4}, 卢洋^{1,2}, 谭彩霞^{1,2}, 崔皓天^{1,3,4}, 王新敏^{3,4}, 章乐^{1,2,4}

(1. 石河子大学医学院病理生理学教研室, 新疆 石河子 832008; 2. 新疆地方与民族高发病教育部重点实验室, 新疆 石河子 832008; 3. 石河子大学第一附属医院泌尿外科, 新疆 石河子 832008; 4. 国家卫健委中亚高发病防治重点实验室, 新疆 石河子 832008)

[摘要] **目的:** 探讨丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)-髓系细胞白血病序列1(Mcl-1)信号轴在卡介苗(BCG)感染巨噬细胞极化进程中的作用, 并阐明其可能的分子机制。**方法:** 从高通量基因表达(GEO)数据库下载GSE89391和GSE51029转录组测序数据, 从分子特征数据库(MSigDB)下载MAPK信号通路相关基因集。采用基因集变异分析(GSVA)包对GEO数据库中巨噬细胞数据进行单样本基因集富集分析(ssGSEA), 计算MAPK信号通路活性评分。根据Mcl-1表达水平中位数将感染样本分为Mcl-1高表达组和Mcl-1低表达组, 并进行基因集富集分析(GSEA)。采用Spearman相关分析法评估GEO数据库中巨噬细胞中Mcl-1表达水平与MAPK通路活性的相关性。配制细胞外信号调节激酶(ERK)通路阻断剂PD98059 ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、c-Jun氨基末端激酶(JNK)通路阻断剂SP600125 ($30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和p38通路阻断剂SB203580 ($60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。将Raw264.7细胞分为对照组、各阻断剂处理组、BCG组及BCG感染后各阻断剂处理组, 制备BCG菌液并感染相应组细胞, 各组加入相应阻断剂。0、12和24 h后收集各组细胞上清及细胞样本。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测各组巨噬细胞上清中Mcl-1、白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素10(IL-10)及转化生长因子 β (TGF- β)水平, 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法检测各组巨噬细胞中M1型标志物诱导型一氧化氮合酶(iNOS) mRNA和M2型标志物炎症区域分子1(Fizz1) mRNA表达水平。**结果:** GEO数据库, 与未被结核分枝杆菌(MTB)感染的对照巨噬细胞比较, MTB感染的巨噬细胞中Mcl-1基因表达水平明显升高($P < 0.05$)。ssGSEA分析, 与未被MTB感染的对照巨噬细胞比较, MTB感染的巨噬细胞中MAPK信号通路活性评分明显升高($P < 0.05$)。GSEA分析, Mcl-1高表达组差异表达基因显著富集于MAPK通路($P < 0.05$)。Spearman相关性分析, Mcl-1基因表达水平与MAPK信号通路活性评分呈正相关关系($P < 0.05$)。干预12和24 h后, 与BCG组比较, 阻断剂处理的各组巨噬细胞上清液中Mcl-1水平明显降低($P < 0.05$)。干预12 h后, 与对照组比较, BCG组巨噬细胞上清液中IL-6和TNF- α 水平均明显升高($P < 0.05$); 与BCG组比较, BCG+SP组和BCG+PD+SP组巨噬细胞上清液中IL-6及TNF- α 水平均明显降低($P < 0.05$)。干预24 h后, 与对照组比较, BCG组巨噬细胞上清液中TNF- α 水平明显升高($P < 0.05$); 与BCG组比较, BCG+PD组、BCG+SP组、BCG+SB组和BCG+PD+SP组巨噬细胞上清液中IL-6水平均明显降低($P < 0.05$), 加入阻断剂的各组巨噬细胞上清液中TNF- α 水平均明显降低($P < 0.05$)。干预12 h后, 与对照组比较,

[收稿日期] 2025-05-05

[录用日期] 2025-06-16

[基金项目] 新疆生产建设兵团科技局指导性科技计划项目(2022ZD045, 2022ZD073); 新疆生产建设兵团教育局研究生创新项目(BTYJXM-2024-K63); 新疆生产建设兵团第八师指导性计划项目(2025ZDSF01)

[作者简介] 葛睿涵(1998—), 女, 山东省潍坊市人, 在读硕士研究生, 主要从事感染性疾病病理生理学方面的研究。

[通信作者] 王新敏, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师(E-mail: 1977602697@qq.com);

章乐, 教授, 博士研究生导师(E-mail: 1257067540@qq.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

BCG组巨噬细胞上清液中TGF- β 水平明显升高 ($P<0.05$);与BCG组比较,BCG+SP组、BCG+PD+SP组、BCG+PD+SB组、BCG+SP+SB组和BCG+PD+SP+SB组巨噬细胞上清液中TGF- β 水平均明显升高 ($P<0.05$)。干预24 h后,与对照组比较,BCG组巨噬细胞上清液中IL-10水平明显升高 ($P<0.05$);与BCG组比较,BCG+PD组、BCG+SP组、BCG+PD+SP组、BCG+PD+SB组和BCG+SP+SB组巨噬细胞上清液中IL-10及TGF- β 水平均明显降低 ($P<0.05$)。感染后0 h,与对照组比较,BCG组巨噬细胞中*iNOS*和*Fizz1* mRNA表达水平均明显升高 ($P<0.05$)。干预12 h后,与对照组比较,BCG组巨噬细胞中*iNOS* mRNA表达水平明显降低 ($P<0.01$),*Fizz1* mRNA表达水平明显升高 ($P<0.01$);与BCG组比较,加入阻断剂后各组巨噬细胞中*iNOS* mRNA表达水平均明显升高 ($P<0.01$),BCG+PD组、BCG+PD+SP组、BCG+PD+SB组、BCG+SP+SB组和BCG+PD+SP+SB组巨噬细胞中*Fizz1* mRNA表达水平明显升高 ($P<0.01$)。干预24 h后,与对照组比较,BCG组巨噬细胞中*iNOS*和*Fizz1* mRNA表达水平均明显升高 ($P<0.05$);与BCG组比较,加入阻断剂的各组巨噬细胞中*iNOS* mRNA表达水平均无明显变化,差异无统计学意义 ($P>0.05$);BCG+PD+SP组巨噬细胞中*Fizz1* mRNA表达水平明显降低 ($P<0.01$)。**结论:** MAPK信号通路可能通过调控Mcl-1活性介导BCG感染巨噬细胞的极化进程,其中JNK通路发挥核心调控作用,p38与ERK通路协同参与调控。

[关键词] 生物信息学;卡介苗;巨噬细胞极化;髓系细胞白血病序列1;丝裂原活化蛋白激酶信号通路;c-Jun氨基末端激酶

[中图分类号] R363.2 **[文献标志码]** A

Bioinformatic analysis on regulatory mechanism of MAPK-Mcl-1 signaling pathway and macrophage polarization during *Bacillus Calmette-Guérin* infection and its experimental validation

GE Ruihan^{1,2}, LI Chen^{1,2}, WANG Shengpeng^{1,3,4}, LU Yang^{1,2}, TAN Caixia^{1,2}, CUI Haotian^{1,3,4},
WANG Xinmin^{3,4}, ZHANG Le^{1,2,4}

- (1. Department of Pathophysiology, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832008, China;
2. Xinjiang Provincial and Ethnic High Incidence Key Laboratory, Ministry of Education, Shihezi 832008, China; 3. Department of Urology, First Affiliated Hospital, Shihezi University, Shihezi 832008, China;
4. Key Laboratory for Prevention and Treatment of High-Incidence Diseases in Central Asia, National Health Commission, Shihezi 832008, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the role of mitogen-activated protein kinase (MAPK)-myeloid cell leukemia sequence 1 (Mcl-1) signaling axis in the polarization process of macrophages infected with *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG), and to clarify its possible molecular mechanism. **Methods:** The transcriptome sequencing data of GSE89391 and GSE51029 were downloaded from Gene Expression Omnibus (GEO) database, and the MAPK signaling pathway-related gene sets were downloaded from Molecular Signatures Database (MSigDB). The gene set variation analysis (GSVA) package was used to perform single-sample gene set enrichment analysis (ssGSEA) on the macrophage data in GEO database, and the activity scores of MAPK signaling pathway were calculated. The infected samples were divided into *Mcl-1* high expression group and *Mcl-1* low expression group according to the median of *Mcl-1* expression level, and gene set enrichment analysis (GSEA) was performed. Spearman correlation analysis was used to assess the correlation between *Mcl-1* expression level and MAPK pathway activity in macrophages in GEO database. The extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway blocker PD98059 ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway blocker SP600125 ($30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), and p38 pathway blocker

SB203580 ($60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) were prepared. The Raw264.7 cells were divided into control group, various blocker-treated groups, BCG group, and various blocker-treated groups after BCG infection. BCG bacterial solution was prepared and used to infect the cells in corresponding groups, and the corresponding blockers were added to the cells in various groups. The cell supernatants and cell samples in various groups were collected at 0, 12, and 24 h after treatment. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to detect the levels of *Mcl-1*, interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-10 (IL-10), and transforming growth factor- β (TGF- β) in supernatant of the macrophages in various groups; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of M1 marker inducible nitric oxide synthase (*iNOS*) mRNA and M2 marker found in inflammatory zone 1 (*Fizz1*) mRNA in the macrophages in various groups. **Results:** Based on GEO databases, compared with uninfected control macrophages, the level of *Mcl-1* gene in the macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) was significantly increased ($P<0.05$). The ssGSEA analysis results showed that compared with uninfected control macrophages, the MAPK signaling pathway activity score in MTB-infected macrophages was significantly increased ($P<0.05$). The GSEA analysis results revealed that differentially expressed genes in *Mcl-1* high expression groups were significantly enriched in the MAPK pathway ($P<0.05$). The Spearman correlation analysis results indicated there was a positive correlation between the expression level of *Mcl-1* gene and MAPK signaling pathway activity score ($P<0.05$). At 12 and 24 h after treatment, compared with BCG group, the levels of *Mcl-1* in supernatant of the macrophages in various blocker-treated groups were significantly decreased ($P<0.05$). At 12 h after treatment, compared with control group, the levels of IL-6 and TNF- α in supernatant of the macrophages in BCG group were significantly increased ($P<0.05$). Compared with BCG group, the levels of IL-6 and TNF- α in supernatants of the macrophages in BCG+SP and BCG+PD+SP groups were significantly decreased ($P<0.05$). At 24 h after treatment, compared with control group, the level of TNF- α in supernatant of the macrophages in BCG group was significantly increased ($P<0.05$). Compared with BCG group, the levels of IL-6 in supernatants of the macrophages in BCG+PD, BCG+SP, BCG+SB, and BCG+PD+SP groups were significantly decreased ($P<0.05$), and the levels of TNF- α in supernatants of the macrophages in all blocker-treated groups were significantly decreased ($P<0.05$). At 12 h after treatment, compared with control group, the level of TGF- β in supernatant of the macrophages in BCG group was significantly increased ($P<0.05$). Compared with BCG group, the levels of TGF- β in supernatants of the macrophages in BCG+SP, BCG+PD+SP, BCG+PD+SB, BCG+SP+SB, and BCG+PD+SP+SB groups were significantly increased ($P<0.05$). At 24 h after treatment, compared with control group, the level of IL-10 in supernatant of the macrophages in BCG group was significantly increased ($P<0.05$). Compared with BCG group, the levels of IL-10 and TGF- β in supernatants of the macrophages in BCG+PD, BCG+SP, BCG+PD+SP, BCG+PD+SB, and BCG+SP+SB groups were significantly decreased ($P<0.05$). At 0 h after infection, compared with control group, the expression levels of *iNOS* and *Fizz1* mRNA in the macrophages in BCG group were significantly increased ($P<0.05$). At 12 h after treatment, compared with control group, the expression level of *iNOS* mRNA in the macrophages in BCG group was significantly decreased ($P<0.01$), while the expression level of *Fizz1* mRNA was significantly increased ($P<0.01$). Compared with BCG group, the expression levels of *iNOS* mRNA in the macrophages in all blocker-treated groups were significantly increased ($P<0.01$), and the expression levels of *Fizz1* mRNA in the macrophages in BCG+PD, BCG+PD+SP, BCG+PD+SB, BCG+SP+SB, and BCG+PD+SP+SB groups were significantly increased ($P<0.01$). At 24 h after treatment, compared with control group, the expression levels of *iNOS* and *Fizz1* mRNA in the macrophages in BCG group were significantly increased ($P<0.05$). The expression levels of *iNOS* mRNA in the macrophages between BCG group and all blocker-treated groups showed no statistically significant difference ($P>0.05$). Compared with BCG

group, the expression level of *Fizz1* mRNA in the macrophages in BCG+PD+SP group was significantly decreased ($P<0.01$). **Conclusion:** MAPK signaling pathway may mediate the polarization process of macrophages infected with BCG by regulating Mcl-1 activity, in which the JNK pathway plays a core regulatory role, and the p38 and ERK pathways are synergistically involved in the regulation.

KEYWORDS Bioinformatics; Bacillus Calmette-Guérin; Macrophage polarization; Myeloid cell leukemia sequence 1; Mitogen-activated protein kinase signaling pathway; c-Jun N-terminal kinase

结核病 (tuberculosis, TB) 是由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 引起的一种慢性传染病。卡介苗 (Bacillus Calmette-Guérin, BCG) 是目前唯一获准用于预防结核病的疫苗^[1-2]。BCG 是一种牛型减毒活疫苗, 可激活巨噬细胞等免疫反应^[3-6]。髓样细胞白血病序列 1 (myeloid cell leukemia sequence 1, *Mcl-1*) 基因作为 B 细胞淋巴瘤因子 2 (B-cell lymphoma 2, *Bcl-2*) 家族抗凋亡蛋白, 通过调控细胞凋亡参与免疫应答^[7-8]。研究^[9-10]表明: 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路在细胞应激、存活和功能调控中发挥核心作用, 并可通过多途径调节 *Mcl-1* 的表达。本课题组前期研究^[11]发现: MAPK 信号通路是影响 MTB 标准株 H37Rv 感染的巨噬细胞凋亡及其极化状态的主要通路。然而, MAPK 信号通路对 *Mcl-1* 表达的调控以及该调控对巨噬细胞极化状态的后续影响尚不明确。本研究采用生物信息学分析与实验验证相结合的策略, 探讨 BCG 感染巨噬细胞过程中 MAPK 信号通路对 *Mcl-1* 表达及巨噬细胞极化的调控机制, 以期为结核病的免疫治疗策略提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 生物信息学分析 在高通量基因表达 (Gene Expression Omnibus, GEO) 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 中, 以 “*Mycobacterium tuberculosis*” 和 “THP-1” 为关键词检索, 物种设置为 “智人 (*Homo sapiens*)”, 经筛选, 纳入 GSE89391 和 GSE51029 数据集进行后续分析。GSE89391 数据集包括 14 个对照样本和 15 个 MTB 感染巨噬细胞样本, GSE51029 数据集包括 15 个对照样本和 15 个 MTB 感染巨噬细胞样本。使用 R 软件 (v 4.4.3) 进行数据处理。从分子特征数据库 (Molecular Signatures Database, MSigDB) (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp>) 下载 MAPK 信号通路相关基因集。使用基因集变异分析 (gene set variation analysis, GSVA) 软件包 (v 4.4.3)

对每个样本进行单样本基因集富集分析 (single-sample Gene Set Enrichment Analysis, ssGSEA), 计算 MAPK 信号通路的活性评分。根据 *Mcl-1* 基因表达水平的中位数, 将 GEO 数据集中 MTB 感染巨噬细胞样本分为 *Mcl-1* 高表达组和 *Mcl-1* 低表达组, 经差异分析获得差异基因列表, 并利用 GSVA 包 (v 4.4.3) 对该基因列表开展基因集富集分析 (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA)。

1.2 细胞、主要试剂和仪器 小鼠单核巨噬细胞系 Raw264.7 购自中国科学院细胞库, 由实验室常规传代培养。BCG 菌株由中国食品药品检定研究院提供并保存。胎牛血清和 DMEM 培养基购自美国 Hyclone 公司, 白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 10 (interleukin-10, IL-10)、转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 和 *Mcl-1* 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, QuantiFast SYBR Green PCR Kit 试剂盒购自德国 QIAGEN 公司, 细胞总 RNA 提取试剂盒购自中国北京天根生化科技有限公司, TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司, 细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 通路阻断剂 PD98059、c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 通路阻断剂 SP600125 和 p38 MAPK 通路阻断剂 SB203580 均购自美国 Sigma 公司。所有引物设计和合成由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。NanoDrop 2000 紫外分光光度计和酶标仪购自美国 Thermo 公司, 逆转录仪购自美国 Bio-RAD 公司, LightCycler 96 荧光定量 PCR 仪购自瑞士 Roche 公司。

1.3 实验菌株和菌悬液制备 取生物安全柜内改良罗氏培养基上培养 3~4 周且状态良好的 BCG 菌落, 置于磨菌管中, 加入适量磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS), 充分研磨至形成均匀浑浊的菌悬液。采用麦氏比浊法调节细菌浓

度至约 1.0 麦氏浊度单位 (McFarland turbidity unit, MCF), 相当于 3.0×10^8 CFU·mL⁻¹。

1.4 细胞培养和分组 Raw264.7 巨噬细胞使用含 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素的完全培养基, 于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养。待细胞融合度达到 90% 时, 按比例进行细胞传代。将生长良好的细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 并随机分为对照组、BCG 组 (加入 BCG 菌液感染巨噬细胞)、BCG+PD 组 (BCG 感染后加入阻断剂 PD98059)、BCG+SP 组 (BCG 感染后加入阻断剂 SP600125)、BCG+SB 组 (BCG 感染后加入阻断剂 SB203580)、BCG+PD+SP 组 (BCG 感染后同时加入阻断剂 PD98059 和 SP600125)、BCG+PD+SB 组 (BCG 感染后同时加入阻断剂 PD98059 和 SB203580)、BCG+SP+SB 组 (BCG 感染后同时加入阻断剂 SP600125 和 SB203580) 及 BCG+PD+SP+SB 组 (BCG 感染后同时加入 3 种阻断剂)。

1.5 细胞感染和分组处理 按照细菌:细胞为 10:1 的比例, 使用已制备的 BCG 菌悬液感染 Raw264.7 细胞。感染 4 h 后, 使用 PBS 缓冲液清洗 3 次, 更换新鲜的完全培养基。配制溶解于二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 的 PD98059 ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、SP600125 ($30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 SB203580 ($60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。按“1.4”步骤分组, 在各组 BCG 感染后的巨噬细胞中分别加入对应阻断剂, 于处理后 0、12 和 24 h 后收集细胞及培养上清液。另取未经感染的巨噬细胞, 分为 PD 组、SP 组、SB 组、PD+SP 组、PD+SB 组、SP+SB 组和 PD+SP+SB 组, 于各组细胞中分别加入对应阻断剂, 于 0、12 和 24 h 后收集细胞及培养上清液。

1.6 ELISA 法检测各组细胞上清液中 Mcl-1、IL-6、TNF-α、IL-10 和 TGF-β 水平 于处理后 0、12 和 24 h 后收集各组培养细胞上清液, 1 100 g 离心 5 min。取 100 μL 细胞培养上清液, 加入抗体预包被的 96 孔细胞培养板中, 严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作, 检测各组细胞上清液中 Mcl-1、IL-6、TNF-α、IL-10 和 TGF-β 水平。

1.7 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 法检测各组巨噬细胞中 iNOS 和炎症区域分子 1 (found in inflammatory zone 1, Fizz1) mRNA 表达水平 收集各组巨噬细胞, 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清。加入 2 mL PBS 缓冲液重悬细胞, 离心并洗涤 2 次。吸取

1 mL TRIzol 试剂反复吹打, 裂解细胞。将细胞悬液转移至 1.5 mL EP 管中, 提取细胞总 RNA。使用 NanoDrop 2000 紫外分光光度计测量 RNA 吸光度并计算 RNA 浓度, 通过电泳检测 RNA 质量。按照逆转录试剂盒说明书, 将 RNA 逆转录为 cDNA 后置于 PCR 仪。反应条件: 95℃、5 min, 95℃、10 s, 57℃、30 s, 共 40 个循环。引物序列见表 1。样本按照 QuantiFast SYBR Green PCR 试剂盒步骤进行扩增, 并通过熔解曲线确定 PCR 扩增产物的特异性。以 β-actin 为内参, 采用 2^{-ΔΔCt} 法计算各组细胞中 iNOS 和 Fizz1 mRNA 表达水平。

表 1 RT-qPCR 引物序列
Tab. 1 Primer sequences of RT-qPCR

Gene	Sequence (5'-3')	Length (bp)
iNOS	F: TGATGTGCTGCCTCTGGTCT	20
	R: GAGCTCCTGGAACCACTCGT	20
Fizz1	F: GAGATCCAGAGTGGAGATACTTGC	24
	R: TCTTAGGACAGTTGGCAGCAG	21
β-actin	F: GTGACGTTGACATCCGTAAAGA	22
	R: GCCGACTCATCGTACTCC	19

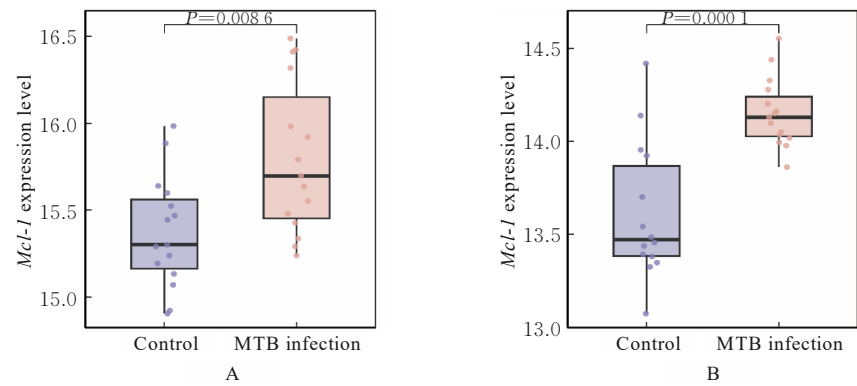
1.8 统计学分析 采用 SPSS 23.0 和 GraphPad 8.0 软件进行统计学分析。各组巨噬细胞上清液中 Mcl-1、IL-6、TNF-α、IL-10 和 TGF-β 水平及细胞中 iNOS 和 Fizz1 mRNA 表达水平均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GEO 数据库中巨噬细胞 Mcl-1 基因表达水平 在 GSE51029 和 GSE89391 数据集中, 与未被 MTB 感染的对照巨噬细胞比较, MTB 感染的巨噬细胞中 Mcl-1 基因表达水平均明显升高 ($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 GEO 数据库中巨噬细胞 MAPK 信号通路活性 对数据集 GSE51029 和 GSE89391 进行 ssGSEA 分析, 结果显示: 与未被 MTB 感染的对照巨噬细胞比较, MTB 感染的巨噬细胞中 MAPK 信号通路活性评分均明显升高 ($P < 0.05$)。见图 2。

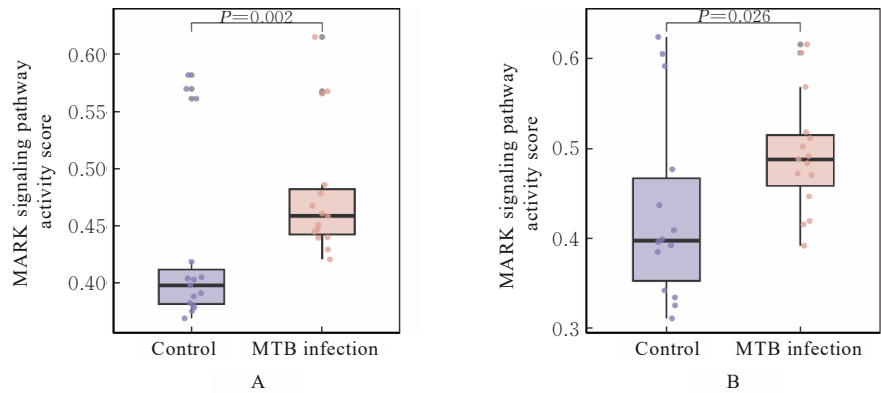
2.3 GEO 数据库中 MAPK 信号通路 GSEA 分析 对 GSE51029 和 GSE89391 数据集进行 GSEA 分析, 结果显示: Mcl-1 高表达组的基因显著富集于



A: GSE51029; B:GSE89391.

图 1 GEO 数据库中巨噬细胞中 *Mcl-1* 基因表达水平

Fig. 1 Expression levels of *Mcl-1* gene in macrophages in GEO database



A: GSE51029; B:GSE89391.

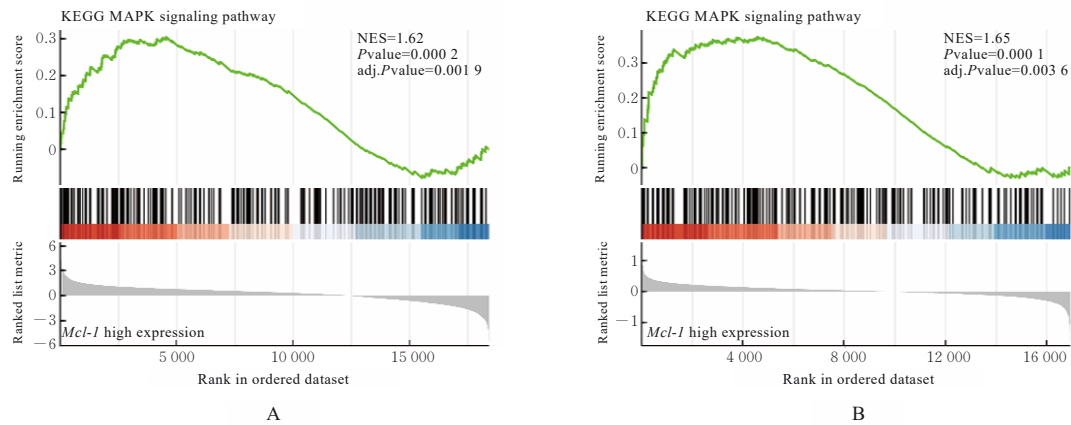
图 2 GEO 数据库中巨噬细胞中 MAPK 信号通路活性评分

Fig. 2 Activity scores of MAPK signaling pathway in macrophages in GEO database

MAPK 通路 ($\text{Adj } P < 0.01$), 提示该基因与 MAPK 通路有关联。见图 3。

2.4 GEO 数据库中 MAPK 信号通路与 *Mcl-1* 基因表达水平的相关性 Spearman 相关性分析结果显

示: 在 GSE89391 数据集中, *Mcl-1* 表达水平与 MAPK 信号通路活性评分呈正相关关系 ($r = 0.542$, $P = 0.036$); 在 GSE51029 数据集中, 二者不存在关联性 ($P > 0.05$)。见图 4。



A: GSE51029; B:GSE89391.

图 3 GEO 数据库中 *Mcl-1* 高表达组 MAPK 信号通路 GSEA 富集分析

Fig. 3 GSEA enrichment analysis on MAPK signaling pathway in *Mcl-1* high expression groups in GEO database

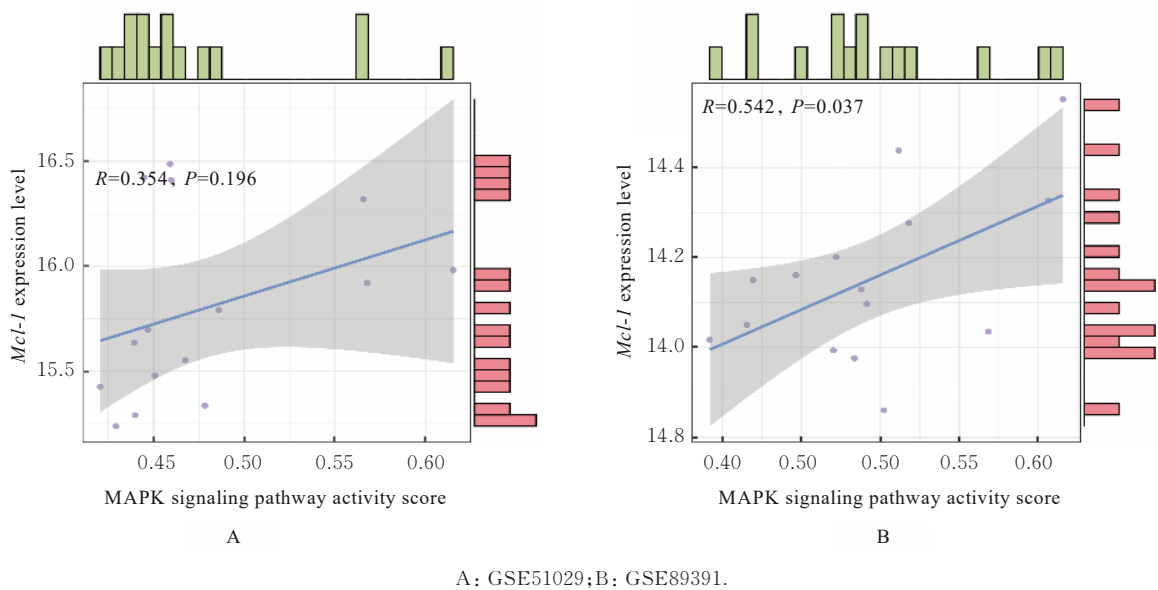


图 4 *Mcl-1* 表达水平与 MAPK 信号通路活性评分的相关性分析

Fig. 4 Correlation analysis between *Mcl-1* expression level and activity score of MAPK signaling pathway

2.5 各组巨噬细胞上清液中 Mcl-1 水平 分组干预 12 和 24 h 后，与对照组比较，BCG 组巨噬细胞上清液中 Mcl-1 水平明显降低 ($P<0.05$)；与 BCG 组比较，加入阻断剂后各组巨噬细胞上清液中 Mcl-1 水平均明显降低 ($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组巨噬细胞上清液中 Mcl-1 水平
Tab. 2 Levels of Mcl-1 in supernatant of macrophages in various groups
[$n=3, \bar{x}\pm s, \rho_B/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$]

Group	Mcl-1 level		
	(t/h) 0	12	24
Control	0.48±0.02	1.04±0.03	1.51±0.14
BCG	0.46±0.06	0.76±0.01*	1.06±0.04*
BCG+PD	—	0.57±0.04 [△]	0.57±0.02 [△]
BCG+SP	—	0.42±0.05 [△]	0.47±0.06 [△]
BCG+SB	—	0.36±0.12 [△]	0.52±0.08 [△]
BCG+PD+SP	—	0.41±0.06 [△]	0.57±0.02 [△]
BCG+PD+SB	—	0.39±0.03 [△]	0.47±0.01 [△]
BCG+SP+SB	—	0.34±0.07 [△]	0.43±0.02 [△]
BCG+PD+SP+SB	—	0.39±0.08 [△]	0.45±0.02 [△]

“—”: No data. * $P<0.05$ compared with control group; [△] $P<0.05$ compared with BCG group.

2.6 各组巨噬细胞上清液中 M1 型极化相关因子 IL-6 和 TNF- α 水平 干预 12 h 后，与对照组比较，BCG 组巨噬细胞上清液中 IL-6 和 TNF- α 水平均明显升高 ($P<0.05$)；与 BCG 组比较，BCG+SP 组

和 BCG+PD+SP 组巨噬细胞上清液中 IL-6 及 TNF- α 水平均明显降低 ($P<0.05$)，BCG+PD 组、BCG+SB 组和 BCG+PD+SB 组巨噬细胞上清液中 TNF- α 水平均明显降低 ($P<0.05$)。干预 24 h 后，与对照组比较，BCG 组巨噬细胞上清液中 TNF- α 水平明显升高 ($P<0.05$)；与 BCG 组比较，BCG+PD 组、BCG+SP 组、BCG+SB 组和 BCG+PD+SP 组巨噬细胞上清液中 IL-6 水平均明显降低 ($P<0.05$)，BCG+PD+SP+SB 组巨噬细胞上清液中 IL-6 水平明显升高 ($P<0.05$)，加入阻断剂的各组巨噬细胞上清液中 TNF- α 水平均明显降低 ($P<0.05$)。见表 3。

2.7 各组巨噬细胞上清液中 M2 型极化相关因子 IL-10 和 TGF- β 水平 干预 12 h 后，与对照组比较，BCG 组巨噬细胞上清液中 TGF- β 水平明显升高 ($P<0.05$)，IL-10 水平比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)；与 BCG 组比较，BCG+SP 组、BCG+PD+SP 组、BCG+PD+SB 组、BCG+SP+SB 组和 BCG+PD+SP+SB 组巨噬细胞上清液中 TGF- β 水平明显升高 ($P<0.05$)。干预 24 h 后，与对照组比较，BCG 组巨噬细胞上清液中 IL-10 水平明显升高 ($P<0.05$)，TGF- β 水平比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)；与 BCG 组比较，BCG+PD 组、BCG+SP 组、BCG+PD+SP 组、BCG+PD+SB 组和 BCG+SP+SB 组巨噬细胞上清液中 IL-10 及 TGF- β 水平均明显降低 ($P<0.05$)，

表3 各组巨噬细胞上清液中 IL-6 和 TNF-α 水平

Tab. 3 Levels of IL-6 and TNF-α in supernatant of macrophages in various groups [$n=3, \bar{x} \pm s, \rho_B/(\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$]

Group	IL-6			TNF-α		
	(t/h) 0	12	24	0	12	24
Control	84.14±20.02	166.27±7.46	51.77±1.22	68.08±2.52	161.55±13.85	158.81±4.73
BCG	81.64±7.21	290.38±9.21*	59.89±3.17	74.82±1.88	194.20±5.66*	177.32±2.87*
BCG+PD	—	190.40±15.20	44.75±2.94 [△]	—	160.45±41.96 [△]	97.91±1.93 [△]
BCG+SP	—	145.61±13.49 [△]	42.28±2.45 [△]	—	161.56±20.18 [△]	81.86±2.72 [△]
BCG+SB	—	205.32±10.09	47.47±2.44 [△]	—	165.15±5.54 [△]	86.03±2.07 [△]
BCG+PD+SP	—	183.54±16.04 [△]	43.15±1.22 [△]	—	165.91±19.06 [△]	64.18±3.37 [△]
BCG+PD+SB	—	170.24±18.08	56.92±1.21	—	163.68±18.87 [△]	50.81±2.95 [△]
BCG+SP+SB	—	254.15±16.04	53.49±3.64	—	195.58±12.93	58.43±7.20 [△]
BCG+PD+SP+SB	—	224.85±17.00	82.50±1.20 [△]	—	200.75±7.20	69.23±2.32 [△]

“—”:No data. * $P<0.05$ compared with control group; [△] $P<0.05$ compared with BCG group.

BCG+PD+SP+SB 组巨噬细胞上清液中 IL-10 水平明显降低 ($P<0.05$)。见表4。

2.8 各组巨噬细胞中 iNOS 和 *Fizz1* mRNA 表达水平 感染后 0 h, 与对照组比较, BCG 组巨噬细胞中 iNOS 和 *Fizz1* mRNA 表达水平均明显升高($P<0.05$)。干预后 12 h, 与对照组比较, SB 组、PD+SP 组和 PD+SB 组巨噬细胞中 iNOS mRNA 表达水平均明显升高 ($P<0.01$), SB 组、PD+SP 组、PD+SB 组、SP+SB 组和 PD+SP+SB 组巨噬细胞中 *Fizz1* mRNA 表达水平明显升高 ($P<0.05$), BCG 组巨噬细胞中 iNOS mRNA 表达水平明显降低 ($P<0.01$), *Fizz1* mRNA 表达水平明显升高 ($P<0.01$); 与 BCG 组比较, 感染并加入阻断剂后各组巨噬细胞中 iNOS mRNA 表达水平均明显升高 ($P<0.01$), BCG+PD 组、BCG+PD+SP 组、

BCG+PD+SB 组、BCG+SP+SB 组和 BCG+PD+SP+SB 组巨噬细胞中 *Fizz1* mRNA 表达水平明显升高 ($P<0.01$)。干预后 24 h, 与对照组比较, PD 组、SP 组、SB 组、PD+SB 组和 SP+SB 组巨噬细胞中 iNOS mRNA 表达水平均明显降低($P<0.05$), PD 组、SP 组、SB 组、PD+SP 组、PD+SB 组、SP+SB 组和 PD+SP+SB 组巨噬细胞中 *Fizz1* mRNA 表达水平均明显降低 ($P<0.05$), BCG 组巨噬细胞中 iNOS 和 *Fizz1* mRNA 表达水平均明显升高 ($P<0.05$); 与 BCG 组比较, 感染并加入阻断剂后各组巨噬细胞中 iNOS mRNA 均无明显变化, 差异无统计学意义 ($P>0.05$); BCG+PD+SP 组巨噬细胞中 *Fizz1* mRNA 表达水平明显降低 ($P<0.01$)。见表5。

表4 各组巨噬细胞上清液中 IL-10 和 TGF-β 水平

Tab. 4 Levels of IL-10 and TGF-β in supernatant of macrophages in various groups [$n=3, \bar{x} \pm s, \rho_B/(\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$]

Group	IL-10			TGF-β		
	(t/h) 0	12	24	0	12	24
Control	34.69±11.47	27.89±3.42	53.58±5.07	72.74±4.73	314.72±9.84	424.23±7.36
BCG	43.57±10.66	31.47±5.47	71.77±2.68*	79.52±5.69	379.25±17.08*	464.49±3.65
BCG+PD	—	38.65±1.85	52.26±5.95 [△]	—	396.45±18.38	289.72±7.69 [△]
BCG+SP	—	32.45±5.77	56.22±2.03 [△]	—	424.21±16.88 [△]	368.48±9.90 [△]
BCG+SB	—	35.38±2.26	66.16±7.03	—	394.31±9.83	477.11±18.24
BCG+PD+SP	—	33.42±1.07	63.54±4.16 [△]	—	411.40±23.13 [△]	320.59±11.41 [△]
BCG+PD+SB	—	38.66±6.24	65.09±2.80 [△]	—	426.28±31.43 [△]	348.98±7.53 [△]
BCG+SP+SB	—	37.01±3.60	64.42±3.24 [△]	—	436.96±16.86 [△]	348.98±3.76 [△]
BCG+PD+SP+SB	—	37.34±1.07	56.35±1.65 [△]	—	493.91±16.65 [△]	469.92±14.51

“—”:No data. * $P<0.05$ compared with control group; [△] $P<0.05$ compared with BCG group.

表 5 各组巨噬细胞中*iNOS*和*Fizz1* mRNA 表达水平
Tab. 5 Expression levels of *iNOS* and *Fizz1* mRNA in macrophages in various groups (n=3, $\bar{x} \pm s$)

Group	<i>iNOS</i>			<i>Fizz1</i>		
	(t/h) 0	12	24	0	12	24
Control	1.00±0.10	1.00±0.10	1.00±0.10	1.00±0.10	1.00±0.10	1.00±0.10
PD	—	1.33±0.13	0.54±0.05*	—	1.24±0.66	0.31±0.04*
SP	—	1.60±0.13	0.84±0.11*	—	1.49±0.64	0.26±0.10*
SB	—	2.31±0.17**	0.48±0.08*	—	4.43±2.13*	0.41±0.11*
PD+SP	—	2.02±0.88**	1.00±0.14	—	8.27±0.64*	0.77±0.12*
PD+SB	—	2.15±0.04**	0.74±0.09*	—	2.69±0.89*	0.22±0.01*
SP+SB	—	1.35±0.09	0.61±0.04*	—	6.59±0.27*	0.18±0.08*
PD+SP+SB	—	0.76±0.23	0.61±0.06	—	2.44±0.90*	0.83±0.20*
BCG	1.34±0.07*	0.50±0.03**	1.86±0.10*	1.43±0.21*	2.42±0.48**	32.32±1.12*
BCG+PD	—	1.57±0.14 $\Delta\Delta$	0.64±0.09	—	3.48±0.36 Δ	24.24±3.66
BCG+SP	—	1.59±0.15 $\Delta\Delta$	0.87±0.03	—	1.45±0.63	29.51±0.41
BCG+SB	—	1.94±0.13 $\Delta\Delta$	0.52±0.06	—	1.49±0.40	24.65±2.17
BCG+PD+SP	—	2.19±0.06 $\Delta\Delta$	1.19±0.18	—	15.98±0.91 $\Delta\Delta$	2.87±0.32 $\Delta\Delta$
BCG+PD+SB	—	2.56±0.12 $\Delta\Delta$	0.91±0.02	—	8.16±0.76 $\Delta\Delta$	32.88±1.76
BCG+SP+SB	—	1.35±0.22 $\Delta\Delta$	0.37±0.03	—	3.52±0.32 Δ	14.74±2.40
BCG+PD+SP+SB	—	1.17±0.15 $\Delta\Delta$	0.94±0.08	—	7.60±0.79 $\Delta\Delta$	22.78±1.76

“—”:No data. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control group; $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ compared with BCG group.

3 讨 论

BCG是由牛分枝杆菌衍生的减毒疫苗株，近百年来其在全球结核病防控中发挥了关键作用^[12]。接种后，BCG可激活人体免疫系统，触发应答，其中巨噬细胞作为首道防线参与抗感染过程^[13]。作为关键的免疫效应细胞，巨噬细胞通过吞噬清除病原体和分泌细胞因子等方式调控免疫网络^[14-15]。在BCG感染过程中，巨噬细胞通过极化形成不同表型以应对病原体：M1型巨噬细胞由微生物或炎症信号诱导，分泌TNF- α 和IL-6等巨噬细胞促炎因子及*iNOS*，介导抗感染作用；M2型巨噬细胞则在感染后期通过分泌TGF- β 和IL-10等抗炎因子，并表达糖皮质激素受体和*Fizz1*等分子，参与组织修复和炎症消退。巨噬细胞这2类极化状态动态调控免疫防御与组织稳态平衡^[16-20]。

课题组前期研究^[21-22]发现：Mcl-1可通过调控MTB感染巨噬细胞的存活和极化，影响宿主免疫反应。在感染早期，巨噬细胞向促炎M1型极化，后期则转为抗炎M2型，该过程受到MAPK信号通路的关键调控。此外，Mcl-1表达亦可被MAPK信号通路所影响。本研究采用生物信息学方法系统解析MTB感染巨噬细胞的分子调控机制，基于

MSigDB数据库筛选出267个MAPK信号通路核心基因，通过GSEA分析评估感染组和对照组巨噬细胞中Mcl-1表达水平及MAPK信号通路活化评分的差异，并揭示Mcl-1与MAPK信号通路活性的关联特征。本研究结果显示：MTB感染可明显激活MAPK信号通路，其活化程度与Mcl-1表达水平呈正相关关系，验证了MAPK-Mcl-1轴在宿主免疫应答中的核心调控作用。BCG作为MTB的减毒疫苗株，两者在基因组和毒力因子及免疫激活机制等方面高度相同^[23]。基于此，本文作者推测BCG感染过程中，MAPK信号通路可能同样通过影响Mcl-1活性，间接调控巨噬细胞极化，并后续通过细胞实验进行验证。结果显示：与BCG组比较，BCG+SP组巨噬细胞上清液中M1型标志物IL-6和TNF- α 水平明显降低，巨噬细胞中*iNOS* mRNA表达水平明显升高，上清液中M2型标志物IL-10和TGF- β 水平及Mcl-1水平明显降低；BCG+PD+SP组巨噬细胞中*Fizz1* mRNA表达水平明显降低，提示上述标志物可能受JNK通路主要调控，其中M1极化因子*iNOS*同时受JNK和P38通路影响，M2极化因子*Fizz1*则受JNK和ERK通路共同调控，而ERK通路还参与调控IL-10和TGF- β 的表达。上述结果提示：JNK为核心调控通路，p38

和ERK通路在不同极化阶段起协同作用, MAPK家族信号通路之间存在复杂的交互调控网络。

综上所述, MAPK信号通路在BCG感染所致的巨噬细胞极化过程中起关键作用, 其中JNK通路可能在调节巨噬细胞功能和极化方面具有主导作用。本研究为理解MTB感染后免疫反应的复杂性及巨噬细胞的潜在作用提供新见解, 也为结核病治疗提供新策略和靶点。然而, 目前公开数据库中缺乏BCG感染的人类巨噬细胞转录组数据, 未来仍需建立BCG特异性感染的多组学数据库。此外, 本研究仅在体外细胞模型中进行, 未来研究应在动物模型中验证并扩展上述发现。ERK5通路也是MAPK家族的重要成员, 并在巨噬细胞功能中具有潜在作用, 本研究未对其进行直接检测。未来研究可纳入对ERK5通路的特异性抑制或激活实验, 以更全面地阐明MAPK信号网络在BCG感染巨噬细胞过程中对Mcl-1和极化的调控机制。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

葛睿涵参与实验设计、实验操作和论文撰写, 李晨、王生鹏和卢洋参与数据收集及分析, 谭彩霞和崔皓天参与实验操作, 王新敏和章乐参与实验指导、论文审阅及修改。

[参考文献]

- [1] LANGE C, AABY P, BEHR M A, et al. 100 years of *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin [J]. Lancet Infect Dis, 2022, 22(1): e2-e12.
- [2] CHEN J J, GAO L, WU X Y, et al. BCG-induced trained immunity: history, mechanisms and potential applications[J]. J Transl Med, 2023, 21(1): 106.
- [3] BICKETT T E, MCLEAN J, CREISSEN E, et al. Characterizing the BCG induced macrophage and neutrophil mechanisms for defense against *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Front Immunol, 2020, 11: 1202.
- [4] LIU L M, SHI W J, XIAO X, et al. BCG immunotherapy inhibits cancer progression by promoting the M1 macrophage differentiation of THP-1 cells via the Rb/E2F1 pathway in cervical carcinoma [J]. Oncol Rep, 2021, 46(5): 245.
- [5] CHOI Y Y, HAN M S, LEE H J, et al. *Mycobacterium bovis* osteitis following immunization with Bacille Calmette-Guérin (BCG) in Korea [J]. J Korean Med Sci, 2018, 34(1): e3.
- [6] 殷立晗, 李 昕, 徐正中, 等. 结核分枝杆菌亚单位疫苗研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2023, 39(5): 492-499.
- [7] KURSCHAT C, METZ A, KIRSCHNEK S, et al. Importance of Bcl-2-family proteins in murine hematopoietic progenitor and early B cells [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(8): 784.
- [8] TANTAWY S I, TIMOFEEVA N, SARKAR A, et al. Targeting MCL-1 protein to treat cancer: opportunities and challenges [J]. Front Oncol, 2023, 13: 1226289.
- [9] 冒 婷, 徐铭益, 王佳轶. 非酒精性脂肪性肝炎小鼠模型肝组织T淋巴细胞的特征分析[J]. 临床肝胆病杂志, 2025, 41(3): 461-468.
- [10] OPYDO M, MLYCZYŃSKA A, MLYCZYŃSKA E, et al. Synergistic action of MCL-1 inhibitor with BCL-2/BCL-XL or MAPK pathway inhibitors enhances acute myeloid leukemia cell apoptosis and differentiation [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(8): 7180.
- [11] HAN L, LU Y, WANG X F, et al. Regulatory role and mechanism of the inhibition of the Mcl-1 pathway during apoptosis and polarization of H37Rv-infected macrophages [J]. Medicine, 2020, 99(42): e22438.
- [12] LI J L, LU J B, WANG G Z, et al. Past, present and future of Bacille Calmette-Guérin vaccine use in China [J]. Vaccines, 2022, 10(7): 1157.
- [13] 郑 伟. H37Rv与BCG感染BoMac源外泌体对巨噬细胞极化作用的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2023.
- [14] CHO H, KWON H Y, SHARMA A, et al. Visualizing inflammation with an M1 macrophage selective probe via GLUT1 as the gating target [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 5974.
- [15] 周筱雨, 胡良皞, 李兆申. 慢性胰腺炎干细胞治疗研究进展[J]. 中国实用内科杂志, 2024, 44(7): 547-552.
- [16] 邢国静, 王丽菲, 罗龙龙, 等. 巨噬细胞极化在药物性肝损伤中的作用研究进展[J]. 解放军医学杂志, 2025, 50(11): 1478-1484.
- [17] LUO M, ZHAO F K, CHENG H, et al. Macrophage polarization: an important role in inflammatory diseases [J]. Front Immunol, 2024, 15: 1352946.
- [18] MOLINA-OLVERA G, RIVAS-ORTIZ C I, SCHCOLNIK-CABRERA A, et al. RNA microarray-based comparison of innate immune phenotypes between human THP-1 macrophages stimulated with two BCG strains [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(9): 4525.
- [19] 唐 怡, 王国泰, 蒋雨涵, 等. 中药调控肿瘤相关巨噬

细胞对肝细胞癌的治疗作用与机制[J]. 临床肝胆病杂志, 2025, 41(6): 1199-1206.

[20] BO H T, MOURE U A E, YANG Y M, et al. *Mycobacterium tuberculosis*-macrophage interaction: Molecular updates [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2023, 13: 1062963.

[21] 王飞雨, 王新敏, 王 婵, 等. 靶向沉默*Mcl-1*基因对感染不同毒力结核杆菌小鼠腹腔巨噬细胞凋亡的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(12): 2195-2201.

[22] 卢 洋, 王新敏, 王小芳, 等. 下调Bcl-2家族蛋白促进MTB感染的小鼠巨噬细胞系凋亡[J]. 基础医学与临床, 2018, 38(10): 1383-1388.

[23] LI P, LI Y, WANG C C, et al. Comparative transcriptomics reveals common and strain-specific responses of human macrophages to infection with *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG[J]. Microb Pathog, 2024, 189: 106593.