

血管内皮细胞生长因子在抗结核免疫中的作用及机制

黄春宇^{1,2,3}, 尹琳^{1,2,3}, 何军芳^{1,3}, 陈涛⁴, 周琳⁴, 钟球⁴, 张萍^{1,2,3}, 黄曦^{1,2,3*}
(中山大学 1.中山医学院免疫学教研室//免疫学研究所, 2.人类病毒学研究所, 3.热带病防治研究教育部重点实验室, 广东广州 510080; 4.广东省结核病控制中心, 广东广州 510630)

摘要:【目的】探讨血管内皮细胞生长因子(VEGF)对巨噬细胞抗结核免疫作用的影响。【方法】为了研究 VEGF 与结核病(TB)之间的相关性,分离健康人和肺结核病人的外周血单核细胞(PBMC),Real-time PCR 检测 VEGF 的表达水平;体外实验中,用卡介苗(BCG)感染佛波酯(PMA)诱导分化的 THP-1 细胞,PCR 检测 VEGF 的表达水平。进一步探讨 VEGF 在抗结核免疫中的作用,分别用 BCG 单独处理或 BCG 与 VEGF 共同处理 THP-1 诱导分化的细胞,Real-time PCR 检测促炎因子 TNF- α , IL-6, IFN- γ , MIP-2 的表达水平; Griess 法检测培养上清中一氧化氮(NO)的产生。【结果】肺结核病人的 PBMC 中 VEGF 表达水平相对于健康人明显升高。BCG 感染 THP-1 诱导分化的巨噬细胞后,VEGF 表达水平上调;VEGF 显著增强 BCG 感染的巨噬细胞中 TNF- α , IL-6, IFN- γ , MIP-2 的表达和 NO 的产生。【结论】肺结核病人的 PBMC 和 BCG 感染的巨噬细胞中 VEGF 表达均显著上调,并可能通过影响促炎因子和 NO 的产生调节巨噬细胞的抗菌活性,提示 VEGF 可能是治疗结核病的一个靶点。

关键词:血管内皮细胞生长因子;结核分枝杆菌;巨噬细胞;促炎因子;一氧化氮

中图分类号:R392 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2012)03-0287-06

Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Anti-tuberculosis Immunity

HUANG Chun-yu^{1,2,3}, YIN Lin^{1,2,3}, HE Jun-fang^{1,3}, CHEN Tao⁴, ZHOU Lin⁴, ZHONG Qiu⁴,
ZHANG Ping^{1,2,3}, HUANG Xi^{1,2,3*}

(1. Institute of Immunology, Department of Immunology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Institute of Human Virology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 3. Key Laboratory of Tropical Diseases Control, Sun Yat-sen University, Ministry of Education, Guangzhou 510080, China; 4. Guangdong Institute for Tuberculosis Prevention and Treatment, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) on anti-tuberculosis immune response of macrophage. 【Methods】To establish the relationship between VEGF and tuberculosis (TB), real-time PCR was used to determine the expression levels of VEGF in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolated from TB patients vs healthy individuals. In vitro, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) was applied to induce THP-1 cells to differentiate into macrophages, and then VEGF mRNA levels were examined by PCR after Bacilil Calmette Guerin (BCG) challenge. To further determine whether VEGF plays a role in TB, THP-1-differentiated macrophages were infected with BCG in the absence or presence of VEGF (100 ng/mL). Expression levels of proinflammatory cytokines including TNF- α , IL-6, IFN- γ and MIP-2 were examined by Real-time PCR, and NO production was measured by Griess Reaction System. 【Results】VEGF expression levels were significantly up-regulated in PBMC from TB patients vs healthy individuals. Expression of VEGF was also increased in THP-1-differentiated macrophages challenged by BCG. Interestingly, treatment of VEGF significantly enhanced the induction of TNF- α , IL-6, IFN- γ and MIP-2, as well as the nitric oxide (NO) production in BCG-challenged macrophages. 【Conclusion】VEGF were up-regulated in both PBMC isolated from TB patients and macrophages challenged by BCG, and promotes production of proinflammatory cytokines and NO, which are required in the antimicrobial immunity, suggesting that VEGF might be a promising therapeutic target for TB.

Key word: VEGF; Mycobacterium tuberculosis; macrophage; proinflammatory cytokine; NO

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(3): 287-292]

收稿日期: 2011-12-12

基金项目: 国家自然科学基金(U0832006, 30972763); 广东省引进创新科研团队专项基金(50000-3210006); 教育部博士启动基金(20100171110047); 广东省自然科学基金(10251008901000013); 国家重大传染病防治专项基金(2012ZX10004903)

作者简介: 黄春宇, 硕士研究生, E-mail: huangchunyu200502@163.com; * 通信作者: 黄曦, 教授, 博士生导师, 课题负责人, E-mail: huangxi6@mail.sysu.edu.cn

肺结核是一种高发病率和高致死性疾病,每年全球因结核病而死亡的人数高达 170 万^[1]。结核病是由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)引起的慢性炎症,根据 Mtb 毒力的强弱,感染菌量的多少以及机体的免疫状态,主要呈现增生、渗出和坏死三种病理变化。在结核病的病变过程中,巨噬细胞发挥了重要的调节作用。巨噬细胞是抗感染免疫的重要元件,既可作为抗原提呈细胞,识别和吞噬病原体并将其提成给 T 细胞启动适应性免疫,又可产生 TNF- α , IL-1 β , IL-6 等促炎因子以及一氧化氮(nitric oxide, NO)等重要杀菌分子,从而对入侵的病原体进行杀伤清除。已有文献报道,多种细胞因子可以影响巨噬细胞抗菌活性,如 IFN- γ 和维生素 A 酸^[3]可活化巨噬细胞的抗结核分枝杆菌活性。血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是多肽性生长因子,主要通过影响巨噬细胞的功能参与许多疾病的发生或发展:①通过影响巨噬细胞的迁移调控转移瘤的发展,例如肺癌^[4];②通过影响巨噬细胞的浸润调控肿瘤发展中的血管新生,例如肾细胞癌^[5];③通过促进巨噬细胞的炎症反应调控某些疾病的病理过程,例如类风湿性关节炎^[6];④促进巨噬细胞分泌防御素等细胞因子,控制感染性疾病的发展,例如呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)感染^[7]。但是,在结核病(tuberculosis, TB)中 VEGF 对巨噬细胞的作用机制仍然不清楚。本研究发现肺结核病人的 PBMC 中 VEGF mRNA 水平相对于健康人明显上调。VEGF 作为一种细胞因子,对巨噬细胞的抗菌活性可能也有一定的影响。所以,本研究提出以下科学假设,即 Mtb 感染后引起 VEGF 上调,VEGF 调控巨噬细胞对 Mtb 的免疫应答,提示 VEGF 可能在 TB 发展中发挥重要作用。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)和胰蛋白酶购自 Sigma(Missouri, USA)公司;人源 VEGF 重组蛋白购自 R&D(Minneapolis, USA)公司;人淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品科技有限责任公司。

1.2 细胞培养

THP-1 细胞系(ATCC),培养于含 100 mL/L FBS(Hyclone, Utah, USA)和 1% 抗生素(Hyclone, Utah, USA)的 RPMI 1640(GIBCO, Oklahoma, USA)培养基中;放置于 37 °C,体积分数 5% CO₂ 的培养箱中培养。THP-1 细胞(8 × 10⁵ 个/mL)用于诱导分化成巨噬细胞。

1.3 结核分枝杆菌培养

BCG 菌株(ATCC),培养于含有白蛋白、葡萄糖、过氧化氢酶(Bovine, Dextrose, Catalase, ADC)的 Difco™ Middle brook 7H9 Broth(BD, Becton, USA)培养基中;使其培养至生长对数期,取菌体制备匀浆菌液进行感染。

1.4 病例资料

2010 年 11 月,广东省结核病防治研究所收集 15 例肺结核病人和 12 例健康人的血样。

1.5 THP-1 细胞的诱导分化

用不同浓度 FBS(20 mL/L, 50 mL/L)和诱导剂 PMA(60 nmol/L, 80 nmol/L)培养 THP-1 单核细胞 16 ~ 18 h 后,在显微镜下观察细胞的贴壁分化情况。然后,用胰蛋白酶消化贴壁细胞,并进行细胞计数。

1.6 外周血单核细胞的分离

用磷酸盐缓冲液稀释血液,然后将血液加入淋巴细胞分离液中,离心机离心,用吸管小心吸取血浆层与分离液层之间的单个核细胞,然后用磷酸盐缓冲液洗涤 2 次,加入 Trizol(Invitrogen, California, USA),提取细胞总 RNA。

1.7 细胞的感染

吸取对数期 BCG 菌液,研磨并超声破碎获取均浆液,分装冻存于 -80 °C 冰箱。然后,复苏其中一管菌液进行涂平板计数确定其菌液密度,用该菌液进行细胞的感染,感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 2。

1.8 RT-PCR

Trizol(Invitrogen, California, USA)法提取细胞总 RNA。用 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas, Canada)进行逆转录合成 cDNA。PCR 扩增的引物序列如下: β -actin: 上游引物:5'-GCTCCTCCTGAGCGCAAG-3', 下游引物:5'-CATCTGCTGGAAGGTGGACA-3', 产物长度 75 bp; hVEGF: 上游引物:5'-TTGCTGCTCTACCTCC AC CA-3', 下游引物:5'-GCACACAGGATGGCTTGAA GA-3', 产物长度 196 bp。PCR 反应体系为 50 μ L,

扩增反应条件:95 °C 5 min,1 次;95 °C 1 min,58 °C 1 min,共 30 个循环;72 °C 延伸 10 min。

1.9 Real-time PCR

Real-time PCR 扩增的引物序列如下:hTNF- α , 上游引物:5'-GCGTGGAGCTGAGAGATAACCA-3', 下游引物:5'-GGCTCTTGATGGCAGAGAGGA-3', 产物长度 180 bp;hIL-6, 上游引物:5'-ATTCGGTACATCCTCGACGGCA-3', 下游引物:5'-CAGCCATCTTTGGAAGGTTTCAGGT-3', 产物长度 121 bp;hIFN- γ , 上游引物:5'-CAGGACAA CCATTACTGGG-3', 下游引物:5'-CCAACGCAA AGCAATACATG-3', 产物长度 145 bp;hMIP-2, 上游引物:5'-ACCGAAGTCATAGCCACACTCA-3', 下游引物:5'-AGCCACCAATAAGCTTCCTCC T-3', 产物长度 155 bp。Real-time PCR 反应体系为 10 μ L, 扩增反应条件:95 °C 3 min,1 次;95 °C 10 s,55 °C 30 s,共 40 个循环;95 °C 延伸 10 s,65 °C 5 s。以 β -actin 作为内参。

1.10 Griess 反应

取细胞培养上清,用 Griess Reagent System (promega,Wisconsin,USA)试剂盒检测 Nitrite 浓度。

1.11 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,计量数据均采用均数 \pm 标准差表示,两两比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 VEGF 在肺结核病人 PBMC 中的表达

为了研究 VEGF 与肺结核之间的相关性,分离健康人和肺结核病人的 PBMC, Real-time PCR 检测 VEGF 的表达。结果显示,肺结核病人的 PBMC 中 VEGF mRNA 水平相对于健康人明显升高($P < 0.001$,图 1)。

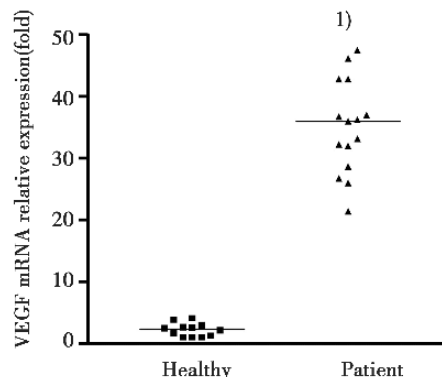


图 1 肺结核病人和健康人的 PBMC 中 VEGF 的表达
Fig. 1 The expression of VEGF in PBMC isolated from TB patients vs healthy individuals

The VEGF mRNA levels in PBMC isolated from TB patients were up-regulated than healthy individuals 1) $P < 0.001$ vs healthy control.

2.2 THP-1 单核细胞的诱导分化

由于巨噬细胞在抗结核免疫中发挥关键作用,所以本研究进一步探讨 VEGF 对人巨噬细胞抗结核作用的影响。本实验摸索了 THP-1 单核细胞分化成巨噬细胞的最佳诱导分化条件,实验结果显示,在同一浓度 PMA 处理细胞时,随着 FBS 浓度的升高,贴壁细胞数增多;在 50 mL/L FBS 处

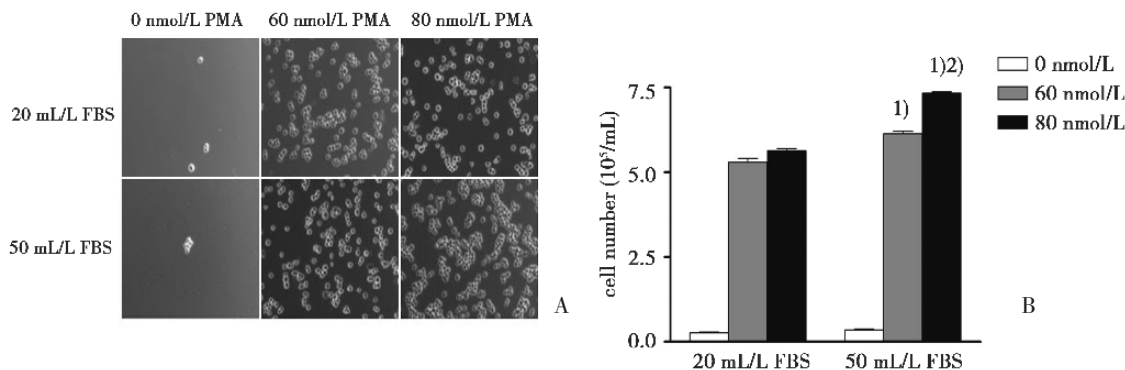


图 2 PMA 诱导 THP-1 细胞的分化

Fig.2 THP-1 differentiation was induced by PMA

THP-1 cells were cultured in RPMI 1640 containing different concentration of FBS (20 mL/L,50 mL/L)and different concentration of PMA (60 nmol, 80 nmol), and observed by microscopy (A), Magnification, 100 \times . The number of adherent cells were quantified (B). 1) $P < 0.001$ vs 20 mL/L FBS, 2) $P < 0.001$ vs 60 nmol/L PMA.

理细胞时,随着 PMA 浓度的升高,贴壁细胞数增多;并且在 50 mL/L FBS 和 80 nmol/L PMA 培养条件下,贴壁的细胞数最多(图 2)。

2.3 VEGF 在 BCG 感染的 THP-1 细胞中的表达

为了进一步确定 Mtb 感染后 VEGF 的表达情况,本实验建立了体外感染模型。用 BCG 感染 THP-1 分化的巨噬细胞后,检测 VEGF mRNA 表达水平。RT-PCR 结果显示,与未感染的对照组比较,BCG 感染 THP-1 分化的巨噬细胞后,VEGF 的表达随着感染时间逐渐上调(图 3A)。Real-time PCR 结果显示,BCG 感染 THP-1 分化的巨噬细胞 3,

6,12 h 后,VEGF 的表达分别上调 1.4 倍 ($P < 0.001$)、2.5 倍($P < 0.001$)、4.5 倍($P < 0.001$,图 3B)。

2.4 VEGF 对 BCG 感染诱导的炎症因子表达的影响

为了研究 VEGF 对巨噬细胞功能的影响,本实验用 BCG 单独处理或者 BCG 与 VEGF (100 ng/mL) 共同处理 THP-1 分化的巨噬细胞 6 h 后,检测促炎因子的变化情况。结果显示,100 ng/mL VEGF 能显著上调 BCG 诱导的 TNF- α ($P < 0.01$,图 4A),IL-6($P < 0.001$,图 4B),IFN- α ($P < 0.001$,图 4C),MIP-2($P < 0.05$,图 4D)mRNA 水平。

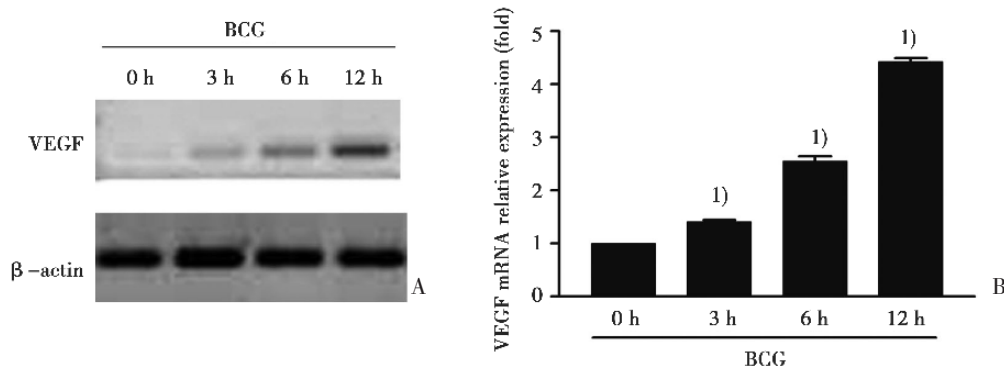


图 3 BCG 感染的 THP-1 分化的巨噬细胞中 VEGF 的表达

Fig.3 The expression of VEGF in BCG-infected THP-1 macrophages

The expression level of VEGF was up-regulated after BCG challenge in a time-dependent manner, as detected by RT-PCR (A) and Real-time PCR (B) 1) $P < 0.001$ vs 0 h.

2.5 VEGF 在 BCG 感染的情况下对 NO 产生的影响

为了研究 VEGF 对 NO 产生的影响,本实验用 BCG 单独处理或者 BCG 与 VEGF (100 ng/mL) 共同处理 THP-1 分化的巨噬细胞 24 h 后,检测 NO 的代谢产物 Nitrite 的浓度。结果显示,100 ng/mL VEGF 能显著促进 BCG 诱导的 Nitrite 的产生($P < 0.05$,图 5)。

3 讨论

为了验证我们前面提出的科学假设,我们以细胞贴壁作为 THP-1 诱导分化成功的标志,建立了 THP-1 单核细胞诱导分化成巨噬细胞的最佳条件。FBS 和 PMA 是影响分化效果的两个关键因素,当 FBS 浓度太低时,细胞不能正常地生长,导致贴壁细胞总体数量较低;当浓度太高时,细胞的

生长速度过快,拥挤的细胞没有足够的空间贴壁;与此同时,当 PMA 的浓度太低,其对细胞的刺激能力低,不能诱导其分化;当浓度过高,其对细胞的毒性增加,细胞的生长状态变差,将影响后续实验的进行。文献报道,含 20 mL/L FBS 和 16 nmol/L PMA 的培养基培养 THP-1 细胞 48 h,可以使其分化为巨噬细胞^[8],我们在此基础上改变 FBS 和 PMA 浓度,结果显示,50 mL/L FBS 和 80 nmol/L PMA 是最合适的诱导分化条件。本研究在此基础上建立 BCG 感染的体外模型,对 VEGF 的表达和功能进行研究。

实验结果显示,在 BCG 感染的巨噬细胞中,VEGF 的 mRNA 表达水平明显上调,这一结果和本研究中肺结核病人的 PBMC 中 VEGF mRNA 表达水平上调相一致,同时可以解释文献报道中肺结核病人血清中 VEGF 升高的现象^[9]。研究报道在类风湿性关节炎中,VEGF 通过与 VEGF 受体 1 结

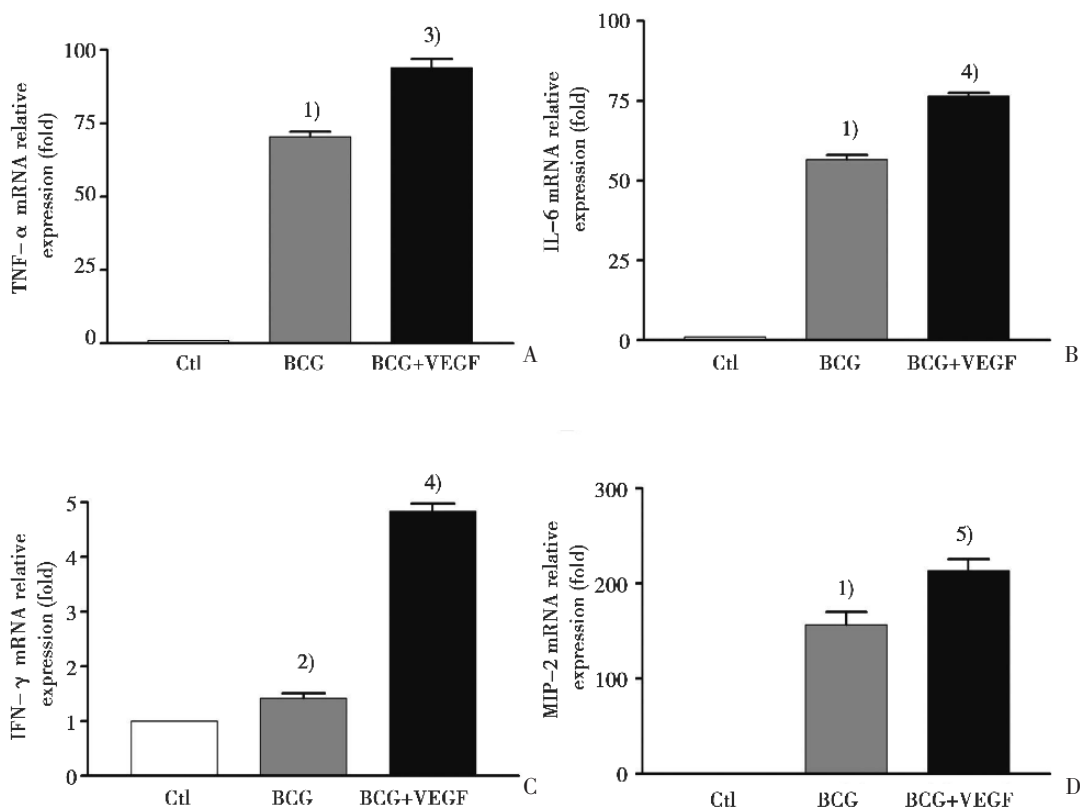


图4 VEGF对BCG感染的THP-1巨噬细胞中促炎因子表达的影响

Fig.4 Effect of VEGF on the expression of pro-inflammatory cytokines in BCG-infected THP-1 macrophages

mRNA levels of TNF- α ($P < 0.01$, A), IL-6 ($P < 0.001$, B), IFN- γ ($P < 0.001$, C) and MIP-2 ($P < 0.05$, D) were up-regulated in THP-1-differentiated macrophages challenged with BCG in the presence or absence of VEGF (100 ng/mL). 1) $P < 0.001$ vs Ctl, 2) $P < 0.01$ vs Ctl, 3) $P < 0.01$ vs BCG, 4) $P < 0.01$ vs BCG, 5) $P < 0.05$ vs BCG.

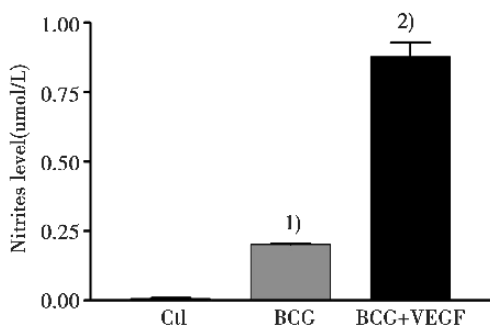


图5 VEGF在BCG感染的THP-1巨噬细胞中对NO的影响

Fig.5 The effect of VEGF on NO production in BCG-infected THP-1 macrophages

NO production was up-regulated in THP-1-differentiated macrophages challenged with BCG in the presence or absence of VEGF (100 ng/mL) 1) $P < 0.001$ vs Ctl, 2) $P < 0.05$ vs BCG.

合,促进炎症因子TNF- α 和IL-6的表达,进而影响关节炎的病理进程^[6],但是VEGF在抗结核免疫中的作用及其机制还不清楚。本研究发现,在BCG

感染时,加入VEGF重组蛋白后,TNF- α ,IL-6,IFN- γ ,MIP-2的表达上调。文献报道,TNF- α 在抗结核免疫中发挥着重要的作用^[10],动物体内TNF- α 被中和抗体中和后,其对Mtb的感染将更加敏感^[11];IFN- γ 可以通过诱导凋亡^[12]和自噬^[13-14]促进胞内结核杆菌的清除;MIP-2是一种中性粒细胞趋化因子,研究发现内源性MIP-2被中和抗体中和后,可以改变宿主对细菌感染的反应^[15-16]。这些研究成果和本实验结果共同提示VEGF促进结核分枝杆菌感染的巨噬细胞中促炎因子的产生,从而上调的促炎因子可能控制肺结核病情的发展。

文献报道在内皮细胞中VEGF可以促进NO的产生,在细胞中过表达VEGF可以上调NO的产生^[17]。本研究也发现在BCG感染时,加入VEGF刺激,NO的产生相对增多。NO是一种非常重要的生物活性分子和信号分子,它介导血管舒张,神经传递,宿主防御和病原体清除等多种生理过程^[18]。虽然,NO的抗结核作用受到一定的质疑,但是它仍然是整个抗菌机制的一个重要部分,研究报道,正

常人的肺泡巨噬细胞被结核感染后产生的 NO 可以控制菌体的生长^[19]。因此, VEGF 促进结核分枝杆菌感染的巨噬细胞中 NO 的产生, 进而 NO 可能促进巨噬细胞杀伤胞内菌, 控制肺结核的发展。

综上所述, 我们的结果表明, 分枝杆菌感染后, 巨噬细胞中 VEGF 表达上调, 并且 VEGF 可以上调巨噬细胞中 TNF- α , IL-6, IFN- γ , MIP-2 等促炎因子的表达和杀菌分子 NO 的产生, 进而调控巨噬细胞对结核分枝杆菌的免疫应答, 这为结核病的治疗提供了一个可能的新靶点。

参考文献:

- [1] Netto EM, Dye C, Raviglione MC. Progress in global tuberculosis control 1995-1996, with emphasis on 22 high-incidence countries. Global Monitoring and Surveillance Project[J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 1999, 3(4): 310-320.
- [2] Rook G A, Steele J, Fraher L, et al. Vitamin D3, gamma interferon, and control of proliferation of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytes [J]. *Immunology*, 1986, 57(1): 159-163.
- [3] Yamada H, Mizuno S, Ross AC, et al. Retinoic acid therapy attenuates the severity of tuberculosis while altering lymphocyte and macrophage numbers and cytokine expression in rats infected with *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *J Nutr*, 2007, 137(12): 2696-2700.
- [4] Fisher JC, Gander JW, Haley MJ, et al. Inhibition of cyclo-oxygenase 2 reduces tumor metastasis and inflammatory signaling during blockade of vascular endothelial growth factor[J]. *Vasc Cell*, 2011, 3: 22.
- [5] Li C, Liu B, Dai Z, et al. Knockdown of VEGF receptor-1 (VEGFR-1) impairs macrophage infiltration, angiogenesis and growth of clear cell renal cell carcinoma (CRCC)[J]. *Cancer Biol Ther*, 2011, 12(10): 872-880.
- [6] Yoo SA, Kwok SK, Kim WU. Proinflammatory role of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: prospects for therapeutic intervention [J]. *Mediators Inflamm*, 2008, 2008: 129873.
- [7] Olivier AK, Gallup JM, van Geelen A, et al. Exogenous administration of vascular endothelial growth factor prior to human respiratory syncytial virus a2 infection reduces pulmonary pathology in neonatal lambs and alters epithelial innate immune responses[J]. *Exp Lung Res*, 2011, 37(3): 131-143.
- [8] Rajora N, Ceriani G, Catania A, et al. alpha-MSH production, receptors, and influence on neopterin in a human monocyte/macrophage cell line [J]. *J Leukoc Biol*, 1996, 59(2): 248-253.
- [9] Alatas F, Alatas O, Metintas M, et al. Vascular endothelial growth factor levels in active pulmonary tuberculosis[J]. *Chest*, 2004, 125(6): 2156-2159.
- [10] Bean AG, Roach DR, Briscoe H, et al. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin [J]. *J Immunol*, 1999, 162(6): 3504-3511.
- [11] Champisi J, Young LS, Bermudez LE. Production of TNF-alpha, IL-6 and TGF-beta, and expression of receptors for TNF-alpha and IL-6, during murine *Mycobacterium avium* infection[J]. *Immunology*, 1995, 84(4): 549-554.
- [12] Herbst S, Schaible UE, Schneider BE. Interferon gamma activated macrophages kill mycobacteria by nitric oxide induced apoptosis[J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e19105.
- [13] Khalkhali-Ellis Z, Abbott DE, Bailey CM, et al. IFN-gamma regulation of vacuolar pH, cathepsin D processing and autophagy in mammary epithelial cells [J]. *J Cell Biochem*, 2008, 105(1): 208-218.
- [14] Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, et al. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages[J]. *Cell*, 2004, 119(6): 753-766.
- [15] Greenberger MJ, Strieter RM, Kunkel SL, et al. Neutralization of macrophage inflammatory protein-2 attenuates neutrophil recruitment and bacterial clearance in murine *Klebsiella pneumoniae*[J]. *J Infect Dis*, 1996, 173(1): 159-165.
- [16] Kernacki KA, Barrett RP, Hobden JA, et al. Macrophage inflammatory protein-2 is a mediator of polymorphonuclear neutrophil influx in ocular bacterial infection[J]. *J Immunol*, 2000, 164(2): 1037-1045.
- [17] Nathan C. Inducible nitric oxide synthase in the tuberculous human lung [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 166(2): 130-131.
- [18] Cobbs CS, Brenman JE, Aldape KD, et al. Expression of nitric oxide synthase in human central nervous system tumors[J]. *Cancer Res*, 1995, 55(4): 727-730.
- [19] Yang CS, Yuk JM, Jo EK. The role of nitric oxide in mycobacterial infections [J]. *Immune Netw*, 2009, 9(2): 46-52.