

结核杆菌耐热抗原对 A549 细胞分泌 SP-B 和凋亡的影响

孙志晓 沙 泉

摘要 目的 探讨结核杆菌耐热抗原 (Mtb-HAg) 刺激诱导人肺腺癌细胞系 (A549) 细胞后对其肺泡表面活性物质相关蛋白 B (SP-B) 的分泌和凋亡的影响。方法 用不同浓度的 Mtb-HAg 分别刺激诱导 A549 细胞, 相同条件分别培养 24、48 h, 同时设置空白对照组 (对照组 1 和对照组 2) 和阳性对照组 [脂多糖 (LPS) 组和姜黄素组]。运用 ELISA 法检测对照组 1、LPS 组和实验组 1 (2、3 $\mu\text{g/ml}$ Mtb-HAg 分别诱导 A549 细胞培养 24 h 和 48 h) 培养上清液中的 SP-B 表达量; 使用实时荧光定量 PCR 法检测对照组 1、LPS 组和实验组 1 中基因 SFTPB 的相对表达量; 采用流式细胞技术检测对照组 2、姜黄素组和实验组 2 (2、3 $\mu\text{g/ml}$ Mtb-HAg 分别诱导 A549 细胞培养 24 h) 中 A549 细胞的凋亡率。结果 刺激诱导相同时间, 实验组 1 的 SP-B 表达量低于对照组 1, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 相同浓度刺激诱导随着时间的延长, 实验组 1 中 SP-B 表达量降低的不显著。相同培养时间, 随着 Mtb-HAg 浓度的增加实验组 1 表达 SP-B 的基因 SFTPB 的相对表达量显著低于对照组 1, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而在相同有效刺激浓度下, 其相对表达量随作用时间变化不显著。姜黄素组和实验组 2 中的 A549 细胞凋亡率显著高于对照组 2 ($P < 0.05$)。结论 Mtb-HAg 对 A549 细胞表达 SP-B 的抑制作用明显, 并能诱导 A549 细胞发生凋亡。
关键词 结核杆菌耐热抗原; A549 细胞; 肺泡表面活性物质相关蛋白 B; 凋亡

中图分类号 R 329.43; R 392

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)09-1270-04
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.09.003

结核杆菌耐热抗原 (heat-resistant antigen of *Mycobacterium tuberculosis*, Mtb-HAg) 是从经过热处理培养的结核分枝杆菌中获得的可溶性的混合抗原, 有研究^[1]证实 Mtb-HAg 可以优势刺激 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞的活化增殖。迄今为止, 有关结核分枝杆菌感染人体过程中, 肺泡上皮细胞应答的研究还非常有限。肺泡上皮细胞参与固有免疫反应, 在结核分枝杆菌感染人体的过程中发挥重要作用^[2], 而肺泡上皮细胞家族中的人肺泡 II 型上皮细胞, 作为合成分泌肺泡表面活性物质的主要细胞^[3], 为结核分枝杆菌在人体内的复制提供了重要场所^[4]。肺泡表面活性物质中蛋白质主要为相关蛋白 (surfactant-associated protein, SP), 有关研究^[5]已建议将 SP 作为肺泡毛细血管损伤的标志物。人肺腺癌细胞系 (human lung adenocarcinoma cell line, A549) 与人肺泡 II 型上皮细胞有相同的表型和特征^[6], 都能够分泌 SP 中的肺泡表面活性物质相关蛋白 B (pulmonary surfactant-associated protein B, SP-B)。该研究探讨不同浓度的 Mtb-HAg 对 A549 细胞分泌 SP-B 的作用和是否能诱导其发生凋亡, 为结核病的早期诊断治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料 Mtb-HAg (批次: 20130517, 蛋白含量浓

2017-04-11 接收

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (编号: 81273245)

作者单位: 安徽医科大学基础医学院免疫学教研室及过敏与免疫研究中心, 合肥 230032

作者简介: 孙志晓, 男, 硕士研究生;

沙 泉, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: qsha2@yahoo.com

mined by flow cytometry. The expression levels of $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, $\text{p-I}\kappa\text{B}\alpha$, cleaved-Caspase3 and Caspase8 were determined by Western blot, respectively. $\text{NF-}\kappa\text{B}$ activity was assessed by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). **Results** rhTSG-6 showed proliferation inhibition effect against KFs and IC_{50} value of rhTSG-6 to KFs was nearly 300 ng/ml. After treated with rhTSG-6 at the concentration of 300 ng/ml for 48 h, the rate of apoptosis of KFs was increased ($P < 0.05$). The expression level of cleaved-caspase 3 and caspase 8 were significantly increased in rhTSG-6 treated group. In the other hand, the whole $\text{p-I}\kappa\text{B}\alpha$ level was significantly reduced upon rhTSG-6 treatment with marked increase in $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ levels. $\text{NF-}\kappa\text{B}$ activity was decreased significantly compared to the control group. **Conclusion** The data suggest that TSG-6 may induce cell apoptosis in KFs via inhibiting the activation of $\text{NF-}\kappa\text{B}$ pathway

Key words TSG-6; keloid fibroblasts; $\text{NF-}\kappa\text{B}$; apoptosis

度为 540 $\mu\text{g/ml}$ 无菌条件下用 A549 细胞培养基稀释至所需浓度使用) 由蚌埠医学院免疫学教研室李柏青教授赠送; A549 由安徽医科大学核医学教研室提供; 高糖培养基 DMEM、含 0.1% EDTA 的胰酶、胎牛血清和双抗均购自南京维森特生物技术有限公司; 人 SP-B 酶联免疫试剂盒购自武汉 CUSABIO 公司; 细胞总 RNA 微量提取试剂盒购自广州 Magen 公司; HiScript[®] II QRT SuperMix for qPCR 试剂盒、AceQ[®] qPCR SYBR[®] Green Master Mix 试剂盒和 Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit 试剂盒均购自南京诺唯赞生物技术公司; 全自动酶标仪 ELX-800 购自美国 Bio-Tek 公司; 实时荧光定量 PCR 仪 MX3000P 购自美国 Stratagene 公司; 流式细胞仪 FACSVERSE 购自美国 BD 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

使用直径为 60 mm 的细胞培养皿接种 A549 细胞, 加入含 10% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM 高糖培养液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的恒温培养箱中培养, 隔天换液 1 次, 培养 2~3 d 用 0.25% 的胰蛋白酶消化, 按 1:2 的比例进行传代。在电子显微镜下观察细胞形态呈梭形, 待培养的 A549 细胞在皿底长至 70%~90% 融合度时(对数期)进行实验, 每次实验均用同一代、同一批的细胞, 并使用不同批次的细胞做重复实验。

1.2.2 ELISA 法检测各组 A549 细胞分泌 SP-B 的表达量

取对数期的 A549 细胞接种于 6 孔板 (5×10^5 /孔), 每孔加培养液至终体积为 3 ml。设置对照组 1 (不加任何诱导剂正常培养)、脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 组 (10 $\mu\text{g/ml}$ LPS 刺激诱导 24 h) 和实验组 1 (2、3 $\mu\text{g/ml}$ 的 Mtb-HA_g 分别刺激诱导 24 h 和 48 h), 其他的培养条件均相同。分别收集各组的培养上清液于 1.5 ml 离心管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3340 r/min 离心 15 min 取上清液备用。人 SP-B ELISA 试剂盒在室温 (18~25 $^{\circ}\text{C}$) 平衡至少 30 min, 倍比稀释准备标准品, 设标准品孔、待测样品孔, 每孔分别加标准品或待测样品 100 μl , 轻晃混匀, 覆上板帖 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2 h, 弃液甩干, 每孔加 100 μl 生物素标记抗体工作液, 覆上新板帖 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h; 弃液甩干, 洗板 3 次, 每次浸泡 2 min, 200 μl /孔, 甩干; 每孔加 100 μl 辣根过氧化物酶标记亲和素工作液, 覆上新的板帖 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h, 弃液甩干, 洗板 5 次, 每次浸泡 2 min, 200 μl /孔, 甩干, 依序每孔加底物溶液 90 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色 15~30 min, 依序每孔加终止液 50 μl , 终止反应, 反应终止后 5 min 内用酶标仪在

450 nm 波长依序测量各孔的光密度 (optical density, OD) 值。测得的标准品孔 OD 值, 使用软件 Curve Expert 1.3 做出标准品的标准曲线, 并根据测得的 OD 值在标准曲线上查得相对应的培养上清液 SP-B 的浓度值。标准曲线见图 1。

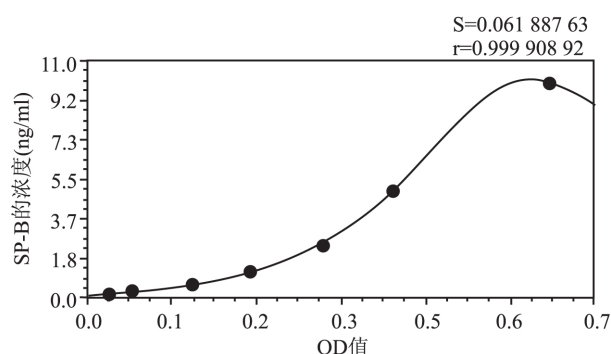


图 1 所使用 ELISA 试剂盒的标准曲线

1.2.3 实时荧光定量 PCR 法检测表达 SP-B 的基因 SFTPB 的相对表达量

使用细胞总 RNA 微量提取试剂盒提取对照组 1、LPS 组和实验组 1 的总 RNA, 检测所提取的总 RNA 的纯度及浓度, 并通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。各组分别取 100 ng 的总 RNA 作为模板, 用 HiScript[®] II QRT SuperMix for qPCR 试剂盒对提取的各组总 RNA 样本进行逆转录得到 cDNA, 逆转录的反应体系为 20 μl , 逆转录反应的条件是: 25 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 50 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。采用 SYBR Green 法做相对定量 PCR 的检测, 所用的试剂盒是 AceQ[®] qPCR SYBR[®] Green Master Mix。每个样品设 3 个重复反应, 每次选取任一样品 cDNA 作为模板按照倍比稀释 (即 1:2、1:4、1:8、1:16) 做标准曲线, 并设置无模板组检测引物的特异性。20 μl 的反应体系配制: 10 μl AceQ[®] qPCR SYBR[®] Green Master Mix, 0.4 μl 正向引物, 0.4 μl 反向引物, 2 μl 模板 DNA (无模板组用灭菌的蒸馏水), 加灭菌蒸馏水至 20 μl 。qPCR 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 40 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。使用的实时荧光定量 PCR 仪型号是 MX3000P, 上机前进行短暂的离心, 并注意避光进行。待上机结束, 使用 Mx-Pro 软件进行相关参数的设置并对数据进行分析。目的基因 SFTPB 引物由生工生物工程 (上海) 有限公司合成, 内参引物 GAPDH 购自生工生物工程 (上海) 有限公司, 序列见表 1。

1.2.4 流式细胞术检测 Mtb-HA_g 对 A549 细胞凋亡的作用

将处于对数期的 A549 细胞接种于 6 孔

表1 qRT-PCR 检测的目的基因和内参引物序列

引物名称	引物序列 (5'-3')	引物长度	产物长度
		(bp)	(bp)
SFTP B	F: CAGACCCTCTGCTGGACAAG	20	126
	R: AGAGCCAGCAATAGGGGAGA	20	
GAPDH	F: CAGGAGGCATTGCTGATGAT	20	138
	R: GAAGGCTGGGCTCATT	18	

培养板(1 × 10⁶/孔)待细胞状态稳定后,设置对照组2(不加任何诱导剂正常培养)、姜黄素组(20 μmol/L 姜黄素诱导培养 24 h)和实验组2(2 μg/ml、3 μg/ml 的 Mtb-HAg 分别诱导培养 24 h)。用不含 EDTA 的胰酶消化后在 4 °C、3 500 r/min 离心 5 min 收集细胞;用预冷的 PBS 洗涤细胞 1~2 次,每次均 4 °C、3 500 r/min 离心 5 min 收集 1 × 10⁵~5 × 10⁵ 个细胞;加入 100 μl 1 × Binding Buffer 重悬细胞,将细胞悬液移至流式检测管中;加入 5 μl Annexin V-FITC 和 2.5 μl PI Staining Solution,轻轻混匀;避光室温反应 10~15 min;待反应结束后加入 400 μl 1 × Binding Buffer,在 1 h 内使用激光八色流式细胞仪 FACSVERSE 进行检测。运用 Flow Jo 7.6 对数据进行分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行 t 检验和方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 GraphPad Prism 5.01 软件进行做图分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 A549 细胞培养上清中 SP-B 的表达 LPS 组中 SP-B 的表达较对照组 1 明显减弱,差异有统计学意义(P < 0.05);与对照组 1 相比,随着 Mtb-HAg 刺激浓度的增加,实验组 1 中培养上清液中 SP-B 表达呈现明显的减弱(P < 0.05);而培养上清液中 SP-B 的表达随作用时间的延长变化不明显。表 2 显示培养上清液中 SP-B 的浓度是根据各组所测的 OD 值在标准曲线上计算所得。

表2 相同培养条件对应的 SP-B 浓度(n = 6, $\bar{x} \pm s$)

组别	SP-B 的浓度(ng/ml)	F/t 值	P 值
对照组 1	0.254 ± 0.045	-	-
LPS 组	0.060 ± 0.005*	10.541	<0.05
实验组 1			
2 μg/ml Mtb-HAg 24 h	0.184 ± 0.047*	14.041	<0.05
3 μg/ml Mtb-HAg 24 h	0.123 ± 0.037*	14.041	<0.05
2 μg/ml Mtb-HAg 48 h	0.168 ± 0.025*	25.514	<0.05
3 μg/ml Mtb-HAg 48 h	0.108 ± 0.035*	25.514	<0.05

与对照组 1 比较: * P < 0.05

2.2 A549 细胞中 SFTP B 基因的表达 所提取的总 RNA 纯度在 1.8~2.1,完整性较好。目的基因 SFTP B 扩增的标准曲线: Y = -3.492LOG(x) + 26.47,相关系数 R² = 0.998,扩增效率为 0.934;内参基因 GAPDH 扩增的标准曲线: Y = -3.444LOG(x) + 17.65,相关系数 R² = 0.981,扩增效率为 0.951。(其中横坐标 x 表示倍比稀释样品赋予的拷贝数,纵坐标 Y 表示 Ct 值)。与对照组 1 相比,LPS 组 SFTP B 基因的相对表达量(n = 3)降低显著,差异有统计学意义(t = -18.334, P < 0.01)。相对于对照组 1,2、3 μg/ml 的 Mtb-HAg 分别诱导培养相同时间,SFTP B 基因在 48 h 的相对表达量(n = 12)均低于 24 h 的相对表达量(n = 13)(F = 106.849、67.342, P < 0.05);3 μg/ml 的 Mtb-HAg 刺激 24 h 的 SFTP B 基因相对表达量(n = 13, F = 101.550)与 48 h 的 SFTP B 基因相对表达量(n = 12)均低于对照组 1(P < 0.05),而随作用时间的延长变化不显著。见图 2~4。

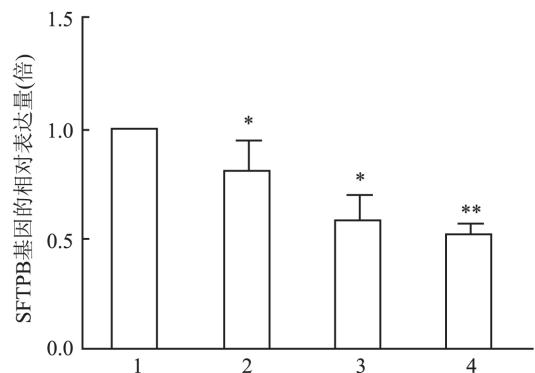


图2 A549 细胞诱导 24 h 后 SFTP B 基因的相对表达量
1:对照组 1;2:2 μg/ml 实验组 1;3:3 μg/ml 实验组 1;4:10 μg/ml LPS 组;与对照组 1 比较,* P < 0.05,** P < 0.01

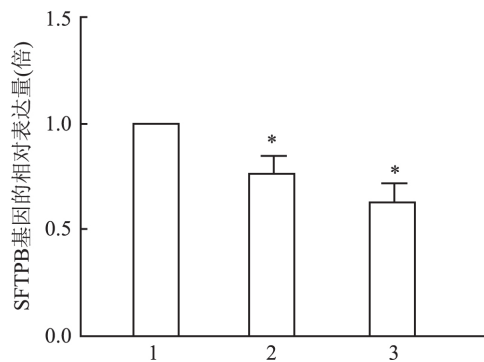


图3 A549 细胞诱导 48 h 后 SFTP B 基因的相对表达量
1:对照组 1;2:2 μg/ml 实验组 1;3:3 μg/ml 实验组 1;与对照组 1 比较:* P < 0.05

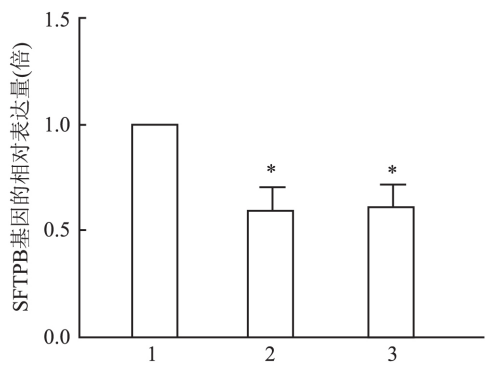


图4 A549细胞分别诱导24h和48h后SFTPB基因的相对表达量

1:对照组1;2:3 μg/ml 24 h 实验组1;3:3 μg/ml 48 h 实验组1;与对照组1比较:* P < 0.05

2.3 Mtb-HA_g对A549细胞凋亡的作用 姜黄素(20 μmol/L)作用于A549细胞24h后的凋亡率(34.66 ± 4.16)%与对照组2凋亡率(6.10 ± 3.04)%相比(n=3),发生明显的凋亡(F=0.801, P<0.05)。同一批次2、3 μg/ml的Mtb-HA_g分别作用于A549细胞相同条件培养24h后检测,凋亡率分别为(27.53 ± 11.91)%和(23.06 ± 10.16)%,均与对照组2(6.10 ± 3.04)%相比,凋亡率显著增高(n=7),差异有统计学意义(F=10.557, P<0.05),而引起A549细胞凋亡率增高随浓度的变化差异无统计学意义。见图5。

3 讨论

结核病在实验室的常见诊断方法是采用耐药实验,但其存在实验耗时长,有延误患者治疗的可能,从而错失临床的最佳治疗时期。因此,亟待提高早期检测方法和提早加强结核病的全程治疗。Scordo et al^[2]的研究证实肺泡II型上皮细胞在结核分枝杆菌感染人体过程中为结核分枝杆菌的复制提供了场

所。肺泡II型上皮细胞作为人体固有免疫系统的重要组成部分,在防御病原体入侵及免疫作用中发挥着重要的作用^[7]。因此结核分枝杆菌在肺泡II型上皮细胞中的增殖会引起机体免疫系统发生相应的变化。而SP-B是由肺泡II型上皮细胞合成并分泌,SP-B的产生或释放不足会引起肺泡表面张力的改变,导致肺的顺应性降低和肺泡塌陷萎缩^[8-9]。与肺泡II型上皮细胞类似,A549细胞具有能够产生SP和磷脂成分的板层小体^[4]。通过不同浓度的Mtb-HA_g刺激诱导A549来研究其对A549的作用,从而在结核分枝杆菌感染人体初期,可以间接检测肺泡II型上皮细胞的变化,为提高结核病的早期诊断提供潜在可能。

Mtb-HA_g是一种低分子多肽的混合性蛋白,李军等^[10]的研究表明其优势激活γδT的抗原成分是10~14 ku的蛋白成分。对于相同批次的Mtb-HA_g引起肺泡II型上皮细胞合成分泌SP-B的影响,前期预实验已初步确定其优势刺激诱导浓度为3 μg/ml。研究显示,对相同批次、有效浓度的Mtb-HA_g刺激诱导A549细胞,Mtb-HA_g浓度的增加对其分泌SP-B有较为明显的抑制作用;而相同有效浓度的Mtb-HA_g刺激随培养时间的延长,其抑制作用增强并不明显。结果还表明相同批次、有效浓度的Mtb-HA_g可以引起A549细胞发生凋亡;但A549细胞的凋亡率随刺激浓度的增加,其凋亡并不显著。由于SP-B是由A549细胞分泌到细胞外的,其收集、处理有一定的要求,时间因素是否确实存在,还有待于实验操作的精细化做进一步改进。Mtb-HA_g刺激诱导肺泡II型上皮细胞A549分泌SP-B的作用通路及相关机制还需要做进一步探讨。这些结果不仅证实了Mtb-HA_g对肺泡II型上皮细胞A549分泌SP-B有抑制作用,并且还能引起A549细胞发生凋亡,对

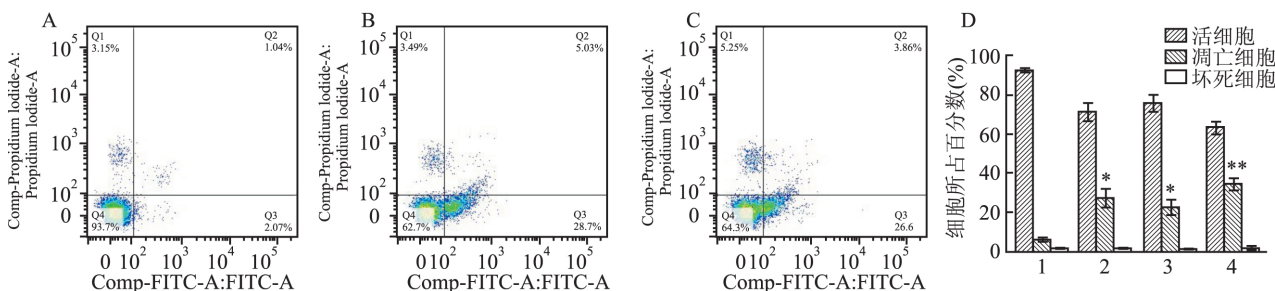


图5 各组A549细胞培养24h后的凋亡作用

A:对照组2流式图;B:2 μg/ml 实验组2流式图;C:3 μg/ml 实验组2流式图;D:不同代培养细胞重复凋亡实验,各组细胞所占的百分比统计图;1:对照组2;2:2 μg/ml 实验组2;3:3 μg/ml 实验组2;4:20 μmol/L 姜黄素组;与对照组2比较:* P < 0.05, ** P < 0.01

进一步提高结核病的临床早期诊断提供新的依据和对新型结核药物的研发具有潜在的应用价值。

参考文献

- [1] Peng M Y, Wang Z H, Yao C Y, et al. Interleukin 17-producing $\gamma\delta$ T cells increased in patients with active pulmonary tuberculosis [J]. *Cell Mol Immunol*, 2008, 5(3):203-8.
- [2] Scordo J M, Knoell D L, Torrelles J B. Alveolar epithelial cells in *Mycobacterium tuberculosis* infection: active players or innocent bystanders [J]. *J Innate Immun*, 2016, 8(1):3-14.
- [3] 杨青, 王桂芳. 肺泡 II 型上皮细胞功能的研究进展 [J]. *复旦学报(医学版)* 2012, 39(6):658-62.
- [4] Ryndak M B, Singh K K, Peng Z, et al. Transcriptional profile of *Mycobacterium tuberculosis* replicating in type II alveolar epithelial cells [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0123745.
- [5] Banfi C, Agostoni P. Surfactant protein B: From biochemistry to its potential role as diagnostic and prognostic marker in heart failure [J]. *Int J Cardiol*, 2016, 221:456-62.
- [6] Zhou D J, Chen Y, Zhang X J, et al. Effects of oleic acid on SP-B expression and release in A549 cells [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19(18):3438-43.
- [7] Fine-Coulson K, Giguère S, Quinn F D, et al. Infection of A549 human type II epithelial cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces changes in mitochondrial morphology, distribution and mass that are dependent on the early secreted antigen, ESAT-6 [J]. *Microbes Infect*, 2015, 17(10):689-97.
- [8] Chignalia A Z, Vogel S M, Reynolds A B, et al. p120-catenin expressed in alveolar type II cells is essential for the regulation of lung innate immune response [J]. *Am J Pathol*, 2015, 185(5):1251-63.
- [9] Olmeda B, García-Alvarez B, Gómez M J, et al. A model for the structure and mechanism of action of pulmonary surfactant protein B [J]. *FASEB J*, 2015, 29(10):4236-47.
- [10] 李军, 魏海明, 张瑞军, 等. 结核杆菌耐热抗原对外周血淋巴细胞 NKG2A/NKG2D 的影响 [J]. *中国免疫学杂志*, 2005, 21(8):571-4.

Effects of *Mycobacterium tuberculosis* heat-resistant antigen on secretion of SP-B and apoptosis in A549 cells

Sun Zhixiao, Sha Quan

(Dept of Medical Immunology and Allergy and Immunology Research Center, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate secreting pulmonary surfactant-associated protein B (SP-B) and apoptosis in human lung adenocarcinoma cell line (A549) cells, treated with heat-resistant antigen of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb-HAg). **Methods** Different concentrations of Mtb-HAg were used to culture A549 cells for 24 h and 48 h respectively, and the blank control groups (control group 1 and control group 2) and positive control groups [lipopolysaccharide (LPS) group and curcumin group] were set up. SP-B in the culture supernatant, was assessed by ELISA in control group 1, LPS group and experimental group 1 (A549 cells were respectively induced by 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Mtb-HAg to culture for 24 h and 48 h). For control group 1, LPS group and experimental group 1, the relative expression of SFTPB gene was quantified with quantitative real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). The apoptosis rate of control group 2, curcumin group and experimental group 2 (A549 cells were respectively induced by 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Mtb-HAg to culture for 24 h) in A549 cells were detected by flow cytometry. **Results** SP-B expression in the experimental group 1 was significantly lower than the control group 1, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The difference of SP-B expression in the experimental group 1 was not obvious with the prolongation of the same concentration. At the same incubation time, the expression of SFTPB in the experimental group 1 decreased obviously with the increasing concentration of Mtb-HAg, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The change with time was not significant. The apoptosis rate of curcumin group and experimental group 2 were significantly higher than that in control group 2 in A549 cells ($P < 0.05$). **Conclusion** Mtb-HAg inhibited the expression of SP-B in A549 cells significantly, and induced apoptosis of A549 cells. **Key words** heat-resistant antigen of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb-HAg); A549 cells; pulmonary surfactant-associated protein B (SP-B); apoptosis