

• 动物及兽医生物技术 •

结核分枝杆菌 Rv2626c 诱导的细胞免疫应答特性

李果[#], 付红[#], 高云飞, 冯有为, 李靖, 陈超, 钟丹, 陈祥, 殷月兰, 焦新安^{*}

扬州大学 教育部农业和农产品国际合作联合实验室 农业农村部农产品质量安全生物性危害因子(动物源)控制重点实验室 江苏省动物重要疫病和人兽共患病防控协同创新中心 江苏省人兽共患病重点实验室, 江苏 扬州 225009

李果, 付红, 高云飞, 冯有为, 李靖, 陈超, 钟丹, 陈祥, 殷月兰, 焦新安. 结核分枝杆菌 Rv2626c 诱导的细胞免疫应答特性[J]. 生物工程学报, 2023, 39(7): 2644-2655.

LI Guo, FU Hong, GAO Yunfei, FENG Youwei, LI Jing, CHEN Chao, ZHONG Dan, CHEN Xiang, YIN Yuelan, JIAO Xin'an. Characterization of the cellular immune response induced by *Mycobacterium tuberculosis* Rv2626c[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(7): 2644-2655.

摘 要: 全球有近 1/4 的人感染结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, *M.tb*)并长期处于潜伏感染状态。Rv2626c 是结核分枝杆菌受 DosR 调控的重要潜伏感染相关蛋白。本研究对 Rv2626c 蛋白进行了原核表达和纯化, 并以 RAW264.7 细胞和小鼠为感染模型, 对其免疫生物学特性进行了分析。SDS-PAGE 及 Western blotting 鉴定结果表明, Rv2626c-His 融合蛋白主要以可溶形式表达, 能与兔抗 H37Rv 多抗血清发生特异性免疫反应。此外, 本研究发现 Rv2626c 蛋白能结合到巨噬细胞 RAW 264.7 表面并上调细胞 NO 的生成; 显著诱导促炎细胞因子 IFN- γ 、TNF- α 、IL-6 和 MCP-1 的产生; 并能诱导小鼠产生更强的 Th1 免疫应答。上述研究有利于揭示结核分枝杆菌的致病机制, 为新型结核病疫苗的研制奠定了理论基础。

关键词: 结核分枝杆菌; Rv2626c; 巨噬细胞; 细胞因子; Th1 型应答

资助项目: 江苏省农业科技自主创新资金(CX(21)1004); 江苏省重点研发计划(BE2021331); 高等学校学科创新引智计划(D18007); 江苏省高等教育优势学科建设工程项目

This work was supported by the Jiangsu Agricultural Science and Technology Independent Innovation Funds (CX(21)1004), the Key Research and Development Program of Jiangsu Province (BE2021331), the Funded by the Discipline Innovation and Intelligence Introduction Program for Colleges and Universities (D18007), and the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions.

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. Tel: +86-514-87971136, Fax: +86-514-87311374, E-mail: jiao@yzu.edu.cn

Received: 2023-01-08; Accepted: 2023-04-04

Characterization of the cellular immune response induced by *Mycobacterium tuberculosis* Rv2626c

LI Guo[#], FU Hong[#], GAO Yunfei, FENG Youwei, LI Jing, CHEN Chao, ZHONG Dan, CHEN Xiang, YIN Yuelan, JIAO Xin'an^{*}

Jiangsu Key Laboratory of Zoonoses, Jiangsu Co-Innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Key Laboratory of Prevention and Control of Biological Hazard Factors (Animal Origin) for Agri-fod Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Joint International Research Laboratory of Agriculture and Agri-product Safety of Ministry of Education, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

Abstract: Nearly a quarter of the world's population is infected with *Mycobacterium tuberculosis* and remains long-term asymptomatic infection. Rv2626c is a latent infection-related protein regulated by DosR of *M. tuberculosis*. In this study, the Rv2626c protein was prokaryotically expressed and purified, and its immunobiological characteristics were analyzed using RAW264.7 cells and mice as infection models. SDS-PAGE and Western blotting analysis showed that the Rv2626c-His fusion protein was mainly expressed in soluble form and specifically reacted with the rabbit anti-H37RV polyclonal serum. In addition, we found that the Rv2626c protein bound to the surface of RAW264.7 macrophages and up-regulated the production of NO. Moreover, the Rv2626c protein significantly induced the production of pro-inflammatory cytokines IFN- γ , TNF- α , IL-6 and MCP-1, and induced strong Th1-tendency immune response. These results may help to reveal the pathogenic mechanism of *M. tuberculosis* and facilitate the development of new tuberculosis vaccine.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; Rv2626c; macrophage cell; cytokines; Th1 type immunity

结核病(tuberculosis, TB)由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, *M.tb*)引起,是伴随人类历史最长、造成人类死亡最多的慢性呼吸道传染病,也是仅次于新型冠状病毒感染的高死亡率疾病,以肺结核最为多见。《2021 年全球结核病报告》指出 2020 年全球结核潜伏感染人群接近 20 亿,且受新型冠状病毒感染流行、耐药菌株不断出现等多方面的影响,目前结核病的流行呈现反弹趋势,给结核病的预防和控制带来巨大挑战^[1]。

在潜伏感染者体内, *M.tb* 处于休眠状态长期存活在宿主细胞内。Rv2626c 是进入休眠期

时受 DosRS 休眠调节子启动的表达量最高的蛋白之一,是重要的潜伏感染相关蛋白^[2-4]。有研究表明 Rv2626c 是分泌蛋白,在菌体的培养滤液及裂解液中均能检测到^[5-6]。Rv2626c 蛋白已被证实在结核病患者体内能诱导很强的血清抗体反应,可以在卡介苗接种人群中区分活动性结核病患者、潜伏性结核感染(latent tuberculosis infection, LTBI)患者和未感染的健康受试者^[7]。总之, Rv2626c 能诱导宿主产生较强的体液免疫应答能力,在区分 TB 和 LTBI 诊断方面发挥了重要作用^[8-9]。其他的研究也多局限于把 Rv2626c 用于诊断 TB,而其在介导天然免疫和获得性免

疫过程中发挥的作用还有待深入研究并阐明。

传统的结核病治疗方案主要针对活动性结核分枝杆菌,很少有 LTBI 的药物治疗方案^[10]。全球普遍接种的卡介苗(*Bacillus Calmette-Guérin*, BCG)尚不足以阻止成年人 LTBI 和 TB 的复发^[11]。因此,迫切需要开发一种新的结核病疫苗,以提供针对结核分枝杆菌潜伏抗原的免疫保护。处于休眠期的 *M.tb* 产生的 Rv2626c 蛋白能显著刺激机体产生大量 CD4⁺/IFN- γ ⁺ 和 CD8⁺/IFN- γ ⁺ T 细胞,并释放较多的 IFN- γ 和 IL-2,激发较强的 Th1 型应答^[12-13]。Rv2626c 作为结核分枝杆菌休眠期的标志蛋白,能激发宿主产生强烈的体液免疫和细胞免疫,是结核分枝杆菌疫苗研发的靶蛋白抗原。本研究将 Rv2626c 进行原核表达和纯化,并对其与细胞的相互作用展开研究,以期对结核疫苗的研制提供重要线索。

1 材料与方法

1.1 菌株和细胞系

大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)、原核表达载体 *E. coli* BL21(DE3)-pET-30a(+)及巨噬细胞系 RAW264.7 均由扬州大学江苏省人兽共患病学重点实验室保存;卡介苗 BCG 购自扬州市疾病预防控制中心。

1.2 实验动物

无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级雌性 6 周龄 BALB/c 小鼠,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。动物实验过程均经扬州大学实验动物伦理委员会批准(编号: S2018001),遵循小鼠福利和伦理道德守则。

1.3 主要试剂

结核分枝杆菌 H37Rv 基因组 DNA 和兔抗 H37Rv 的多抗血清由中国疾病预防控制中心的万康林研究员馈赠;鼠抗 Rv2626c 蛋白的多抗血清由本室制备和保存;聚氧基丙烯酸正丁酯

(bicinchoninic acid assay, BCA)蛋白检测试剂盒和一氧化氮(NO)检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;Anti-His antibody 购自 Roche 公司;去内毒素试剂盒购自 NORGEN 公司;CBA 小鼠炎症试剂盒、链亲和素-辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)均购自 BD 公司;Rv2626c₇₁₋₉₀ 多肽由北京中科亚光生物科技有限公司合成;Bovine PPD 购自 PrionicsAG 公司;BCIP/NBT、羊抗鼠 IgG-FITC 购自 abcam;其余常规试剂均购自国药集团。

1.4 重组表达质粒的构建

以 H37Rv 基因组 DNA 为模板,根据 Rv2626c 的基因序列(GenBank 登录号: 888576),设计引物 P1 (5'-TTAATCGGTACCATGACCACGCACGCGA-3',下划线为 *Kpn* I 酶切位点)和 P2 (5'-ATAACCAAGCTTGATCCGCGCTAG-3',下划线为 *Hind* III 酶切位点),引物由南京金斯瑞生物技术有限公司合成。将纯化 DNA 片段与 pET-30a(+)克隆载体连接后转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。通过 PCR 与双酶切对单菌落进行鉴定,并送南京金斯瑞生物技术有限公司进行测序。将测序正确的阳性重组质粒 pET-30a(+)-Rv2626c 转化至宿主菌 BL21(DE3)感受态细胞中,鉴定正确后将重组菌命名为 BL21(DE3)-pET-30a(+)-Rv2626c。

1.5 融合蛋白的诱导表达与纯化鉴定

诱导表达 BL21(DE3)-pET-30a(+)-Rv2626c 及空载体对照菌 BL21(DE3)-pET-30a(+), 37 °C 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6-0.8 时,加入终浓度为 0.4 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, IPTG), 30 °C、150 r/min 诱导 6 h。诱导产物经 12%的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium lauryl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析。

参照 Ni-NTA His Bind purification kit 说明书进行变性条件下的亲和层析纯化,收集洗脱

样品进行 SDS-PAGE 检测目的融合蛋白的纯化情况。随后将纯化的蛋白进行脱盐和去内毒素处理,具体步骤参照去内毒素试剂盒的说明书。取纯化的 Rv2626c-His 融合蛋白进行 SDS-PAGE,使用蛋白转印系统电转印至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜,以免抗 H37Rv 多抗血清为一抗(1:3 000),兔抗为二抗(1:5 000),通过二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色,进行目的蛋白的检测与分析。

1.6 融合蛋白与细胞表面结合测定

在小鼠巨噬细胞 RAW264.7 悬液中,分别加入 6 μg 纯化的融合蛋白 Rv2626c、pET-30a(+)空载体蛋白,冰上孵育 15 min 后,1 000 r/min 离心 10 min 并去除上清。含 1% BSA 的 PBS 洗涤 2 次后按照 1:200 加入 Rv2626c 多抗血清和空载体蛋白免疫的血清,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。含 1% BSA 的 PBS 洗涤 2 次后每组样品加入 1 μL 羊抗鼠 IgG-FITC,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 40 min。含 1% BSA 的 PBS 洗涤 2 次后重悬,通过流式细胞仪检测融合蛋白与细胞表面的结合。

1.7 一氧化氮测定

根据一氧化氮检测试剂盒的说明书操作,在 96 孔培养板中加入 1×10^5 的 RAW264.7 巨噬细胞培养液。用纯化的融合蛋白 Rv2626c (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 刺激细胞,并培养 36 h。设置 pET-30a(+)空载体蛋白组 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和改良培养基 (dulbecco's modified eagle medium, DMEM) 空白对照组。通过酶标仪测定 540 nm 处吸光度并计算出各组细胞一氧化氮的生成量。

1.8 细胞因子分泌测定

将大约 1.5×10^5 个 RAW264.7 小鼠巨噬细胞悬液接种在 96 孔培养板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养 24 h 后,分别加入以下刺激剂:Rv2626c (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、阴性对照 pET-30a(+)空载体蛋白 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、阳性对照脂多糖[lipopolysaccharide,

LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)]以及 DMEM 用作非特异性细胞因子产生的空白对照,刺激 24 h 后,收集上清液。根据微量样本多指标流式蛋白定量技术(cytometric bead array, CBA)小鼠炎症试剂盒的说明,利用流式细胞仪(fluorescence-activated cell sorting, FACS)测定培养上清液中 IL-6、IL-10、IL-12p70、TNF- α 、IFN- γ 和 MCP-1 的含量。

1.9 Rv2626c 蛋白诱导小鼠免疫应答特性分析

1.9.1 小鼠的免疫方法

本实验共分为 5 组:BCG 阳性对照组、不同浓度蛋白免疫组以及 PBS 阴性对照组,每组均为 5 只,免疫方式为皮下注射。BCG 按 100 $\mu\text{L}/\text{只}$ (1×10^6 CFU); Rv2626c 蛋白免疫组采用不同浓度 Rv2626c 融合蛋白(5 $\mu\text{g}/\text{只}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{只}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{只}$)与二甲基双十八烷基溴化铵(dimethyl dioctadecyl ammonium bromide, DDA)佐剂(250 $\mu\text{g}/\text{只}$)和单磷脂脂质体 A (monophosphoryl lipid A, MPL)佐剂(25 $\mu\text{g}/\text{只}$)充分混合乳化后,终体积为 200 $\mu\text{L}/\text{只}$;阴性对照组以 PBS-DDA/MPL 按 200 $\mu\text{L}/\text{只}$ 。一免后 14 d,各组以同样的剂量与方式进行加强免疫。

1.9.2 夹心酶联免疫吸附实验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测特异性 IFN- γ 和 IL-4 分泌

加强免疫后第 8 天制备各组小鼠脾脏淋巴细胞,每孔中分别加入 50 μL 终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Rv2626c₇₁₋₉₀ 多肽。同时,设置阴性对照组(无刺激)、阳性对照组(bovine PPD, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和空白对照组(培养基),置于含 5% CO_2 培养箱中培养 48 h。将样品及 2 种细胞因子的标准品加入预先包被抗小鼠 IFN- γ 、IL-4 单抗的包被孔中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h;洗涤后加入生物素化抗小鼠 IFN- γ 、IL-4 单抗,作用 1 h。向孔中加入链亲和素-HRP,作用 30 min 后加入四甲基联苯胺

(tetramethylbenzidine, TMB)底物显色,以 2 mol/L H_2SO_4 终止反应,酶标仪读取 450 nm 处吸光值。根据标准曲线计算 IFN- γ 和 IL-4 的产生水平。

1.9.3 诱导的 Rv2626c 特异的免疫应答分析

将各组小鼠的脾脏淋巴细胞(50 μ L)加入到包被有抗鼠 IFN- γ /IL-4 单抗的 ELISPOT 板中(2 μ g/mL, 100 μ L/孔),并向孔中分别加入 50 μ L 终浓度为 10 μ g/mL 的 Rv2626c₇₁₋₉₀作为刺激原,37 $^{\circ}C$ 、5% CO_2 培养 48 h,如前所述设置阴性对照组(无刺激)、阳性对照组(牛 PPD, 10 μ g/mL)和空白对照组(培养基)。PBST 洗涤后加入生物素化抗小鼠 IFN- γ 、IL-4 单抗,室温孵育 3 h。洗涤后按 1:1 000 加入链亲和素-AKP,孵育 2 h 后,加入 BCIP/NBT 底物液显色,终止反应并自然干燥,使用 Bioreader 5000-V β ELISOPT 读卡仪对每个孔中形成蓝色斑点的数量进行计数。

2 结果与分析

2.1 重组 Rv2626c 质粒的构建鉴定

以 H37Rv 基因组为模板扩增 Rv2626c 基因,电泳结果显示产物大小约为 432 bp,与预期结果一致(图 1A)。将回收片段与表达载体连接后获得的重组质粒 pET-30a(+)-Rv2626c,经双酶切鉴定,显示 5 422 bp 和 432 bp 的条带(图 1B)。

2.2 Rv2626c 蛋白的诱导表达及纯化鉴定

重组菌 BL21(DE3)-pET-30a(+)-Rv2626c 经 IPTG 诱导后,SDS-PAGE 电泳显示在 24 kDa 处出现浓染带,而空载体对照无此条带。表达的蛋白主要以可溶形式存在,其大小与预期相符(图 2A)。将所得蛋白以 His 标签蛋白纯化试剂盒获得纯化的重组蛋白,经 SDS-PAGE 鉴定,在 24 kDa 处有清晰的条带,无其他杂带,说明纯化效果较好(图 2B),纯化蛋白经 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定其浓度为 4 mg/mL。将所得蛋白去内毒素后检测结果表明蛋白中内毒素含

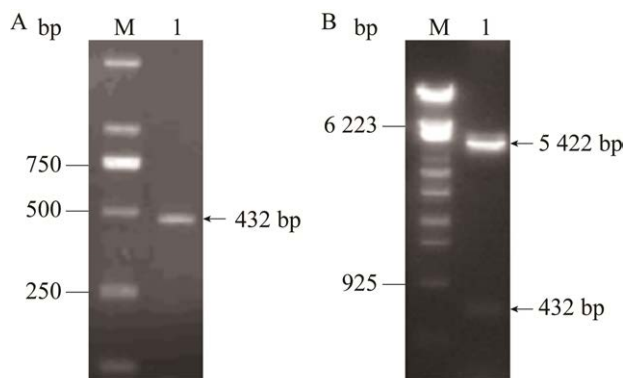


图 1 Rv2626c 基因的 PCR 扩增(A)及 pET-30a(+)-Rv2626c 的双酶切鉴定(B)结果

Figure 1 PCR amplification of the Rv2626c gene (A) and identification of the recombinant pET-30a(+)-Rv2626c by *Kpn* I/*Hind* III (B). M: DL2000 DNA marker; 1: PCR product of Rv2626c gene. M2: λ -EcoT14 DNA marker; 2: pET-30a(+)-Rv2626c digested with *Kpn* I/*Hind* III.

量<10 EU/mL,符合实验要求。纯化的空载体蛋白则未见明显条带,而融合蛋白 Rv2626c 经 Western blotting 鉴定,在 24 kDa 处有一条清晰、特异性条带(图 2C),说明原核表达的 Rv2626c 蛋白具有较好的免疫反应性。

2.3 Rv2626c 融合蛋白与 RAW264.7 细胞表面的结合

通过间接免疫荧光的方法,分析 Rv2626c 与 RAW264.7 巨噬细胞的结合能力。结果表明,Rv2626c 蛋白+Rv2626c 多抗组的结合率明显高于 Rv2626c 蛋白+无关抗体组、pET-30a(+)-空载体蛋白+Rv2626c 多抗组(**: $P<0.01$)以及 DMEM+Rv2626c 多抗组(*: $P<0.05$) (图 3)。这些结果表明 Rv2626c 蛋白可与 RAW264.7 巨噬细胞表面特异性结合。

2.4 Rv2626c 诱导 RAW 264.7 巨噬细胞产生 NO

活化的巨噬细胞产生 NO,这是宿主抵抗结核分枝杆菌感染的重要自我保护机制,也是杀死结核分枝杆菌的重要途径^[14-15]。Rv2626c 诱导巨

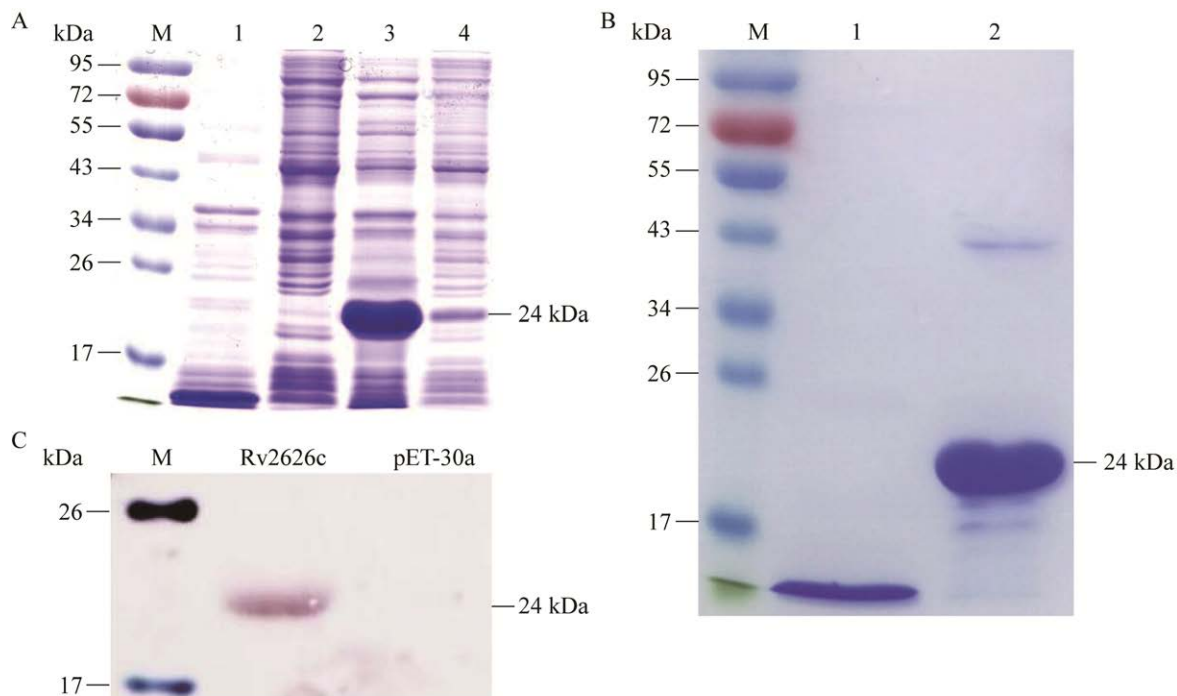


图2 Rv2626c 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Figure 2 SDS-PAGE analysis of the Rv2626c protein. A: Supernatants and sediments of lysate of recombinant *E. coli*. M: Prestained protein ladder; 1: Supernatant of BL21(DE3)-pET-30a(+) induced by IPTG; 2: Sediments of BL21(DE3)-pET-30a(+) induced by IPTG; 3: Supernatant of BL21(DE3)-pET-30a(+)-Rv2626c induced by IPTG; 4: Sediments of BL21(DE3)-pET-30a(+)-Rv2626c induced by IPTG. B: Rv2628-His after purification. 1: Purified pET-30a(+) protein; 2: Purified Rv2626c protein. C: Western blotting analysis of Rv2626c protein. 1: Fusion protein of Rv2626c; 2: BL21(DE3)-pET30a(+) induced by IPTG.

噬细胞 NO 产生的结果如图 4 所示, Rv2626c 蛋白刺激组的 NO 生成量显著高于 pET-30a(+) 蛋白刺激组和 DMEM 组 (*: $P < 0.05$), 表明 Rv2626c 蛋白可有效诱导 RAW264.7 巨噬细胞产生 NO。

2.5 Rv2626c 诱导 RAW 264.7 巨噬细胞产生细胞因子

结核分枝杆菌分泌蛋白是宿主免疫应答的主要免疫调节剂。先前的研究表明,用 rRv2626c 刺激来自活动性结核病患者的外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)后,可明显诱导促炎细胞因子 IL-12 和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF- α)的产生^[16]。为了研究 Rv2626c 对所感染巨噬细胞免疫反应的潜在影响,在 Rv2626c 刺激 RAW 264.7 细胞 24 h

后,通过流式细胞仪定量测定 6 种细胞因子的表达水平。结果显示, Rv2626c 的存在使 TNF- α (****: $P < 0.0001$)、IFN- γ (**: $P < 0.01$)、MCP-1 (****: $P < 0.0001$)、IL-6 (****: $P < 0.0001$) 和 IL-10 (***: $P < 0.001$) 的表达量显著增加(图 5)。Rv2626c/LPS 诱导的 TNF- α 和 MCP-1 浓度超过了检测上限。这些结果表明 Rv2626c 能诱导巨噬细胞产生显著的促炎应答,在免疫调节中发挥着重要作用。

2.6 Rv2626c 诱导小鼠脾细胞产生 Th1 型细胞免疫应答

T 细胞在抗结核分枝杆菌的免疫反应中起着重要作用,CD4⁺ T 细胞包含多种亚型,其中 Th1 细胞以分泌 IFN- γ 、TNF- α 为特征, Th2 型

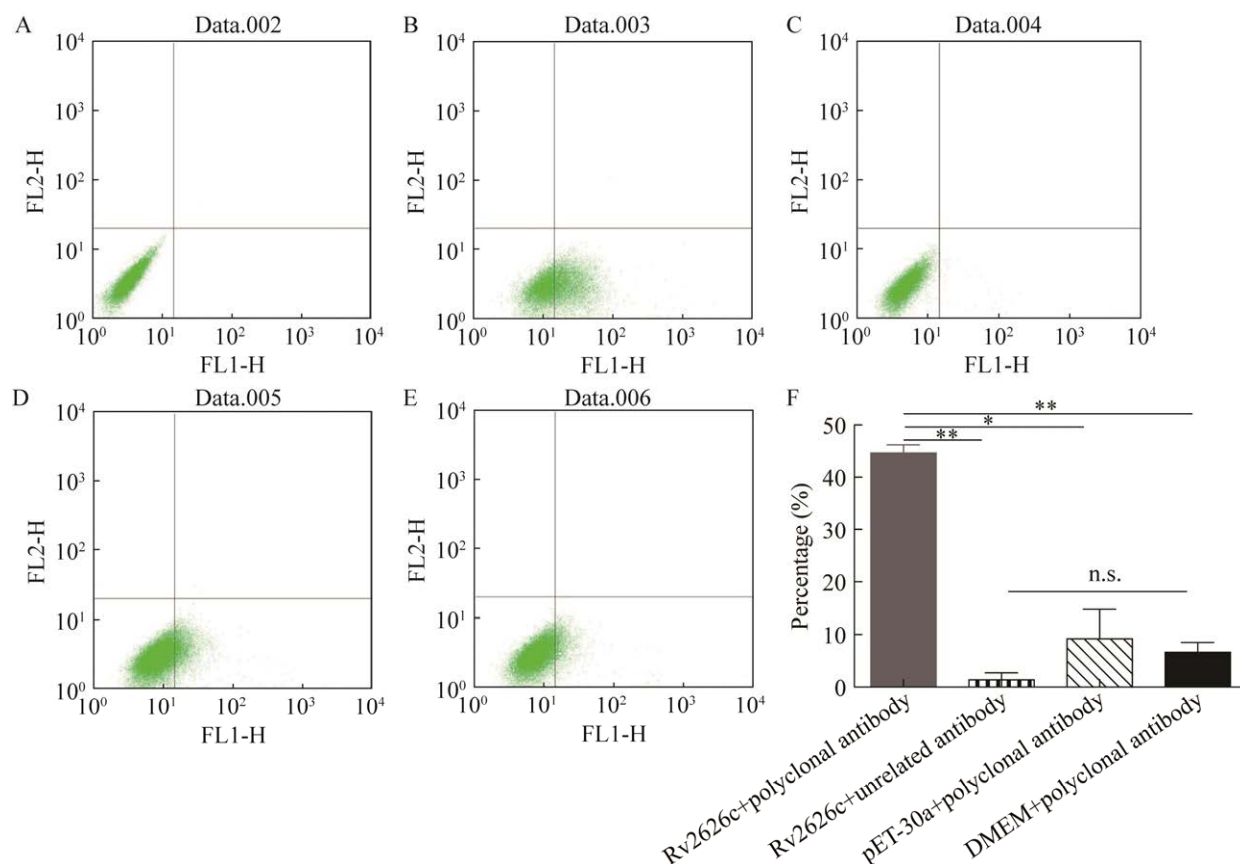


图3 FACS 检测 Rv2626c 蛋白与巨噬细胞的结合活性

Figure 3 FACS analysis of Rv2626c protein binding activity with RAW264.7. The labeled positive cells detected by FACS. A: Unstained. B: Rv2626c+anti-Rv2626c antibody. C: Rv2626c+unrelated antibody. D: pET-30a(+)+anti-Rv2626c antibody. E: DMEM+anti-Rv2626c antibody. F: Percentage of positive cells. Polyclonal antibody against Rv2626c. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$ and n.s.: No significance.

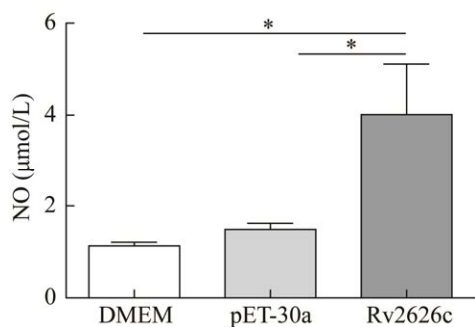


图4 Rv2626c 诱导巨噬细胞产生 NO

Figure 4 Rv2626c induced NO in RAW264.7 macrophages. Approximately 1×10^5 RAW264.7 were incubated with Rv2626c (5 μg/mL) at 37 °C, 5% CO₂ for 36 h, and pET-30a(+) empty vector protein (5 μg/mL) and DMEM were used as controls. *: $P<0.05$.

细胞主要合成分泌 IL-4、IL-10^[17]。通过夹心 ELISA 检测脾细胞分泌 IFN-γ 和 IL-4, 结果显示, 不同浓度的 Rv2626c 免疫剂量均可有效地诱导小鼠产生针对 Rv2626c₇₁₋₉₀ 多肽的 IFN-γ, 其中 5 μg 免疫剂量组能够使小鼠产生最高水平的 IFN-γ, 且各免疫剂量下 IFN-γ 的产生浓度均显著高于 IL-4 (图 6A), 综合表明 Rv2626c 蛋白可有效诱导小鼠产生 Th1 型免疫应答。图 6B 所示的 ELISPOT 结果与夹心 ELISA 一致。免疫剂量在 5 μg 组的实验中, 当使用 DDA/MPL-A 作为佐剂时, 多肽 Rv2626c₇₁₋₉₀ 刺激小鼠脾细胞能产生更多的特异性 IFN-γ 分泌细胞(*: $P<0.05$), 表

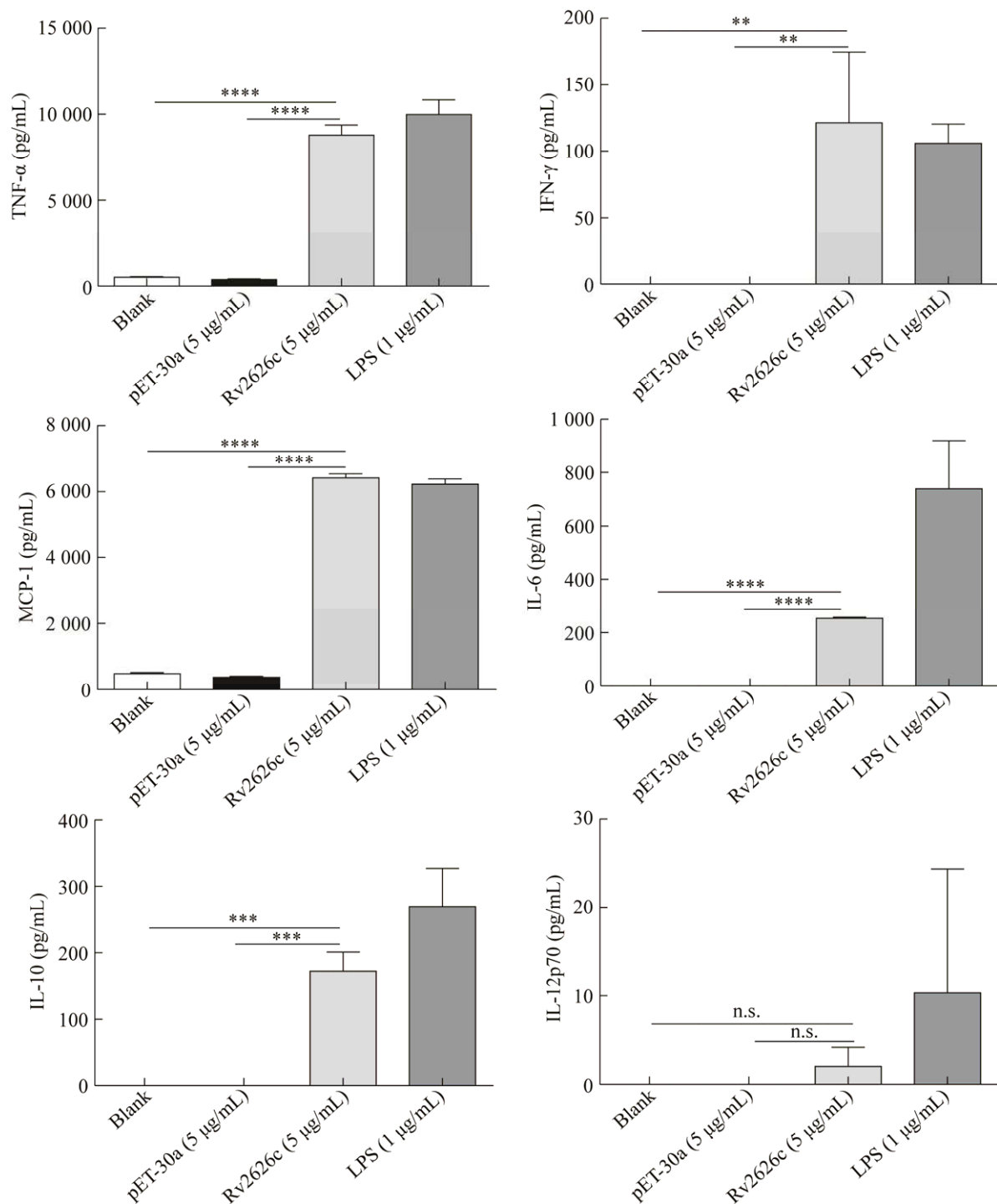


图 5 Rv2626c 诱导 RAW264.7 巨噬细胞产生细胞因子

Figure 5 Rv2626c induced cytokines in RAW264.7 macrophages. RAW264.7 (1.5×10^5) macrophages, which were stimulated with Rv2626c at a concentration of 5 μg/mL for 24 h. Culture supernatants were collected and the expression of cytokines was quantified by cytometric bead array. The negative control group received pET-30a vector protein (5 μg/mL) and LPS (1 μg/mL) was used as a positive control. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$ and n.s.: No significance.

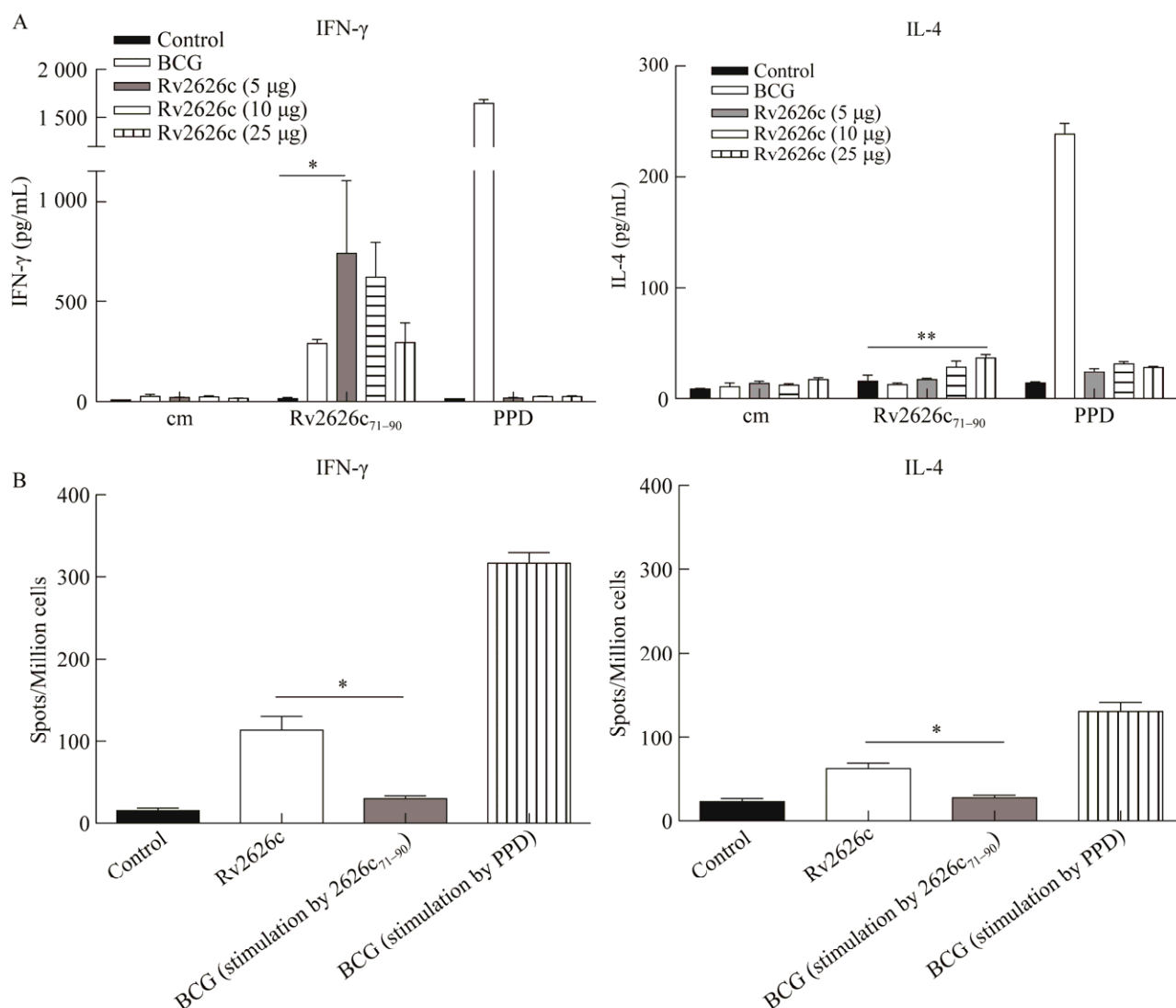


图6 Rv2626c 在小鼠脾细胞中诱导的 Th1 型细胞免疫应答

Figure 6 Rv2626c induced Th1 type cellular immune response in mice splenocytes. The levels of secreting cytokines from splenocytes in different groups were quantified by sandwich ELISA (A) and ELISPOT (B). *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

明其更倾向于 Th1 型细胞免疫应答。且蛋白 Rv2626c 免疫组诱导产生特异性分泌 IFN- γ 细胞数较 BCG 组的数量更多(*: $P < 0.05$)。

3 讨论与结论

结核病是威胁人类健康的全球性疾病，2020 年全球结核病死亡人数大约为 150 万^[1]。

据估计全球有 1/4 的人口感染了结核分枝杆菌，细菌通常在宿主体内形成长期无症状持续感染，有 5%–10% 的感染者可转化成活动性结核病^[18-19]。然而，目前唯一被批准用于人预防结核病的 BCG 疫苗不能有效清除休眠状态的 *M.tb*，无法刺激宿主产生相应的免疫应答^[20]。因此，从 TB 的特异性诊断、有效预防和治疗

等多角度考虑,新型结核疫苗的研发刻不容缓,而这项工作的完成离不开对 *M.tb* 关键基因功能的深入解析。研究表明, *M.tb* 通过双组分调节系统 DosRS (DevRS)调整自身代谢进入休眠期,隐匿于肺部的肉芽肿组织^[21]。Rv2626c 是 DosRS 调节子中上调最强烈的基因,具有非复制、持久性的转录特征^[22]。Rv2626c 作为 *M.tb* 的潜伏抗原,具有很强的免疫原性,是研制结核病新型疫苗的候选抗原,Rv2626c 诱导的免疫应答可能会填补 BCG 诱导的保护性免疫的部分缺陷。

M.tb 表达的一些蛋白会被特异性免疫细胞所识别,对其产生免疫应答,控制 *M.tb* 的进一步感染。其中,诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)的活化,能够促使细胞释放 NO,从而杀灭胞内的 *M.tb*^[23]。研究表明, *M.tb* 表达的 YrbE3A 蛋白能通过激活胞内 NF- κ B、MAPK (ERK1/2、p38)信号通路活化巨噬细胞,促进其分泌 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等促炎因子及 NO,进而增强机体抗 *M.tb* 感染的炎症反应。本研究通过对巨噬细胞 NO 的测定,发现 Rv2626c 蛋白能够诱导细胞 NO 水平显著升高^[24]。推断 *M.tb* 在 DosR 调控蛋白的作用下,下调代谢水平,进入潜伏感染状态,而这些蛋白的表达又会被宿主免疫细胞所识别,进而诱导 NO 的产生,抑制巨噬细胞内 *M.tb* 的生存。

前炎性细胞因子在机体应对 *M.tb* 的感染过程中起到了重要作用。*M.tb* 的相关蛋白与细胞的结合,能激活相关信号通路,诱导前炎性细胞因子的表达。有研究表明 Rv2626c 蛋白 C 末端 123–131 位氨基酸能与 TRAF6 相互作用并抑制 E3 泛素连接酶活性,从而抑制巨噬细胞中的 TLR4 炎症信号传导^[25]。TLR4 通过髓样分化蛋白 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88)

依赖性途径和 MyD88 非依赖性途径,进一步激活核转录因子- κ B (nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B)通路及丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activates protein kinases, MAPK)通路,从而诱导细胞因子的合成与释放,参与天然免疫应答^[26]。本研究发现, Rv2626c 可以有效结合到 RAW 264.7 巨噬细胞的表面,并显著上调促炎因子 TNF- α 、IFN- γ 、MCP-1 和 IL-6 的表达。由此推断 Rv2626c 可能和巨噬细胞表面的特异性受体相互作用,激活下游相应信号通路,促进炎症反应的发生,在先天性免疫应答中发挥作用。

M.tb 属于胞内寄生菌,以 CD4⁺ T 细胞产生 IFN- γ 为特征的 Th1 型免疫反应在控制 *M.tb* 感染中起着重要作用^[27]。诱导 Th1 型免疫应答的结核分枝杆菌蛋白已被用作亚单位疫苗的靶标。例如, *M.tb* 的分泌蛋白 Ag85B 通过诱导 Th1 型免疫反应来保护动物免受其感染,过表达 Ag85B 的重组 BCG 疫苗对结核病的保护作用也优于 BCG 亲本株^[28]。但有关 Rv2626c 的亚单位疫苗却少有研究。Roupie 等^[29]通过设计 DosR 调控的 8 个基因的 DNA 疫苗,发现 Rv2626c 的 DNA 疫苗能够诱导宿主产生 Th1 型免疫应答,且能够刺激感染者的 T 细胞增殖,释放 Th1 型细胞因子 IFN- γ 和 IL-2,为其成为新型结核病疫苗候选抗原提供了可能。Liu 等^[30]报道,包含潜伏抗原 Rv2626c 的亚单位疫苗 LT70 产生了强抗原特异性体液免疫和细胞介导免疫,比传统的 BCG 具有更高的保护效力。在本研究中,以 DDA/MPL-A 为佐剂初步研究了 Rv2626c 诱导的免疫应答特性。通过双夹心 ELISA 及 ELISPOT 试验的结果发现,在以 DDA/MPL-A 为佐剂时, Rv2626c 诱导倾向于 Th1 型免疫应答,且蛋白 Rv2626c 免疫组诱导产生特异性分泌 IFN- γ 细胞数较 BCG 组的数目

更多。上述结果表明, Rv2626c 有望成为抗结核分枝杆菌感染的候选亚单位疫苗。

综上所述, 本研究通过原核表达 *M.tb* Rv2626c 蛋白, 发现该蛋白能与巨噬细胞 RAW 264.7 表面结合、显著上调细胞 NO 生成并诱导促炎细胞因子的产生。此外, Rv2626c 能诱导小鼠产生 Th1 倾向性免疫应答。以上结果为阐明 Rv2626c 蛋白的功能以及 *M.tb* 与宿主之间的相互作用奠定了一定的理论基础, 并为以 Rv2626c 为抗原的新型结核病疫苗研制提供了参考。

REFERENCES

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2021[R]. Geneva: World Health Organization, 2021.
- [2] CAÑO-MUÑOZ S, ANTHONY R, NIEMANN S, ALFFENAR JW C. New approaches and therapeutic options for *Mycobacterium tuberculosis* in a dormant state[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2018, 31(1): e00060-17.
- [3] BI J, GOU ZC, ZHOU FZ, CHEN YQ, GAN JH, LIU J, WANG HH, ZHANG XL. Acetylation of lysine 182 inhibits the ability of *Mycobacterium tuberculosis* DosR to bind DNA and regulate gene expression during hypoxia[J]. Emerging Microbes & Infections, 2018, 7(1): 108.
- [4] KAUR K, KUMARI P, SHARMA S, SEHGAL S, TYAGI JS. DevS/DosS sensor is bifunctional and its phosphatase activity precludes aerobic DevR/DosR regulon expression in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. The FEBS Journal, 2016, 283(15): 2949-2962.
- [5] ROSENKRANDS I, SLAYDEN RA, CRAWFORD J, AAGAARD C, BARRY CE 3rd, ANDERSEN P. Hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis* studied by metabolic labeling and proteome analysis of cellular and extracellular proteins[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(13): 3485-3491.
- [6] JIANG H, LUO TL, KANG J, XU ZK, WANG LM. Expression of Rv2031c-Rv2626c fusion protein in *Mycobacterium smegmatis* enhances bacillary survival and modulates innate immunity in macrophages[J]. Molecular Medicine Reports, 2018, 17(5): 7307-7312.
- [7] PEÑA D, ROVETTA AI, HERNÁNDEZ del PINO RE, AMIANO NO, PASQUINELLI V, PELLEGRINI JM, TATEOSIAN NL, ROLANDELLI A, GUTIERREZ M, MUSELLA RM, PALMERO DJ, GHERARDI MM, IOVANNA J, CHULUYAN HE, GARCÍA VE. A *Mycobacterium tuberculosis* dormancy antigen differentiates latently infected *Bacillus calmette-guérin*-vaccinated individuals[J]. EBioMedicine, 2015, 2(8): 884-890.
- [8] ZHU ZY, ZHANG D, WANG HB, XIAO JZ, QIU YF, YAN L, CHEN D, LIU AG, YANG X. Expression and serological diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* CFP-10 and Rv2626c proteins[J]. Genetics and Molecular Research, 2014, 13(3): 7398-7406.
- [9] AMIANO NO, MORELLI MP, PELLEGRINI JM, TATEOSIAN NL, ROLANDELLI A, SEERY V, CASTELLO FA, GALLEGGO C, ARMITANO R, STUPKA J, ERSCHEN MA, CIALLELLA LM, de CASADO GC, CUSMANO L, PALMERO DJ, IOVANNA JL, GARCÍA VE. IFN- γ and IgG responses to *Mycobacterium tuberculosis* latency antigen Rv2626c differentiate remote from recent tuberculosis infection[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 7472.
- [10] CACCAMO N, MERAVIGLIA S, la MENDOLA C, GUGGINO G, DIELI F, SALERNO A. Phenotypical and functional analysis of memory and effector human CD8 T cells specific for mycobacterial antigens[J]. The Journal of Immunology, 2006, 177(3): 1780-1785.
- [11] MOLIVA JI, TURNER J, TORRELLES JB. Prospects in *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette et Guérin (BCG) vaccine diversity and delivery: why does BCG fail to protect against tuberculosis?[J]. Vaccine, 2015, 33(39): 5035-5041.
- [12] SINGH S, SHARMA M, CHAUDHRY A, SHARMA S. Rv2626c and Rv2032 activate TH1 response and downregulate regulatory T cells in peripheral blood mononuclear cells of tuberculosis patients[J]. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2019, 62: 46-53.
- [13] 张薇, 王丽梅, 柏银兰, 康健, 何俊杰, 徐志凯. 结核分枝杆菌 Rv2626c 基因的表达、纯化和鉴定[J]. 科学技术与工程, 2009, 9(8): 2051-2055.
ZHANG W, WANG LM, BAI YL, KANG J, HE JJ, XU ZK. Expression, purification and identification of Rv2626c protein from *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Science Technology and Engineering, 2009, 9(8): 2051-2055 (in Chinese).
- [14] BOON C, DICK T. How *Mycobacterium tuberculosis* goes to sleep: the dormancy survival regulator DosR a

- decade later[J]. *Future Microbiology*, 2012, 7(4): 513-518.
- [15] HE HJ, HOVEY R, KANE J, SINGH V, ZAHRT TC. MprAB is a stress-responsive two-component system that directly regulates expression of sigma factors SigB and SigE in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(6): 2134-2143.
- [16] BASHIR N, KOUNSAR F, MUKHOPADHYAY S, HASNAIN SE. *Mycobacterium tuberculosis* conserved hypothetical protein rRv2626c modulates macrophage effector functions[J]. *Immunology*, 2010, 130(1): 34-45.
- [17] FLYNN JL, ERNST JD. Immune responses in tuberculosis[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2000, 12(4): 432-436.
- [18] SEKI M, CHOI H, KIM K, WHANG J, SUNG J, MITARAI S. Tuberculosis: a persistent unpleasant neighbour of humans[J]. *Journal of Infection and Public Health*, 2021, 14(4): 508-513.
- [19] 杜莹. 结核潜伏感染发病以及预防性治疗反应相关的 DNA 甲基化及外泌体蛋白分子标识研究[D]. 北京: 北京协和医学院博士学位论文, 2022.
- DU Y. DNA methylation and exosomes protein biomarkers of active tuberculosis onset from latent tuberculosis and response of preventive treatment[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Peking Union Medical College, 2022 (in Chinese).
- [20] LIN MY, GELUK A, SMITH SG, STEWART AL, FRIGGEN AH, FRANKEN KLMC, VERDUYN MJC, van MEIJGAARDEN KE, VOSKUIL MI, DOCKRELL HM, HUYGEN K, OTTENHOFF TH, KLEIN MR. Lack of immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* DosR regulon proteins following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination[J]. *Infection and Immunity*, 2007, 75(7): 3523-3530.
- [21] SIVARAMAKRISHNAN S, de MONTELLANO PR. The DosS-DosT/DosR mycobacterial sensor system[J]. *Biosensors*, 2013, 3(3): 259-282.
- [22] SHI LB, JUNG YJ, TYAGI S, GENNARO ML, NORTH RJ. Expression of Th1-mediated immunity in mouse lungs induces a *Mycobacterium tuberculosis* transcription pattern characteristic of nonreplicating persistence[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(1): 241-246.
- [23] 唐佩军, 吴妹英. 结核分枝杆菌感染免疫应答与免疫逃逸机制的研究进展[J]. *结核病与肺部健康杂志*, 2017(2): 181-186.
- TANG PJ, WU MY. Research progress of immune response and immune escape mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. *Journal of Tuberculosis and Lung Health*, 2017(2): 181-186 (in Chinese).
- [24] WANG JR, ZHU XJ, PENG YC, ZHU TT, LIU H, ZHU YF, XIONG XK, CHEN X, HU CM, CHEN HC, CHEN YY, GUO AZ. *Mycobacterium tuberculosis* YrbE3A promotes host innate immune response by targeting NF- κ B/JNK signaling[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(4): 584.
- [25] KIM SY, KIM D, KIM S, LEE D, MUN SJ, CHO E, SON W, JANG K, YANG CS. *Mycobacterium tuberculosis* Rv2626c-derived peptide as a therapeutic agent for sepsis[J]. *EMBO Molecular Medicine*, 2020, 12(12): e12497.
- [26] BHATT P, SHARMA M, PRAKASH SHARMA P, RATHI B, SHARMA S. *Mycobacterium tuberculosis* dormancy regulon proteins Rv2627c and Rv2628 as Toll like receptor agonist and as potential adjuvant[J]. *International Immunopharmacology*, 2022, 112: 109238.
- [27] ORME IM, ROBERTS AD, GRIFFIN JP, ABRAMS JS. Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. *The Journal of Immunology*, 1993, 151(1): 518-525.
- [28] RIZZI C, BIANCO MV, BLANCO FC, SORIA M, GRAVISACO MJ, MONTENEGRO V, VAGNONI L, BUDDLE B, GARBACCIO S, DELGADO F, LEAL KS, CATALDI AA, DELLAGOSTIN OA, BIGI F. Vaccination with a BCG strain overexpressing Ag85B protects cattle against *Mycobacterium bovis* challenge[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51396.
- [29] ROUPIE V, ROMANO M, ZHANG L, KORF H, LIN MY, FRANKEN KLMC, OTTENHOFF THM, KLEIN MR, HUYGEN K. Immunogenicity of eight dormancy regulon-encoded proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated and tuberculosis-infected mice[J]. *Infection and Immunity*, 2007, 75(2): 941-949.
- [30] LIU X, PENG JX, HU LN, LUO YP, NIU HX, BAI CX, WANG Q, LI F, YU HJ, WANG BX, CHEN HY, GUO M, ZHU BD. A multistage *Mycobacterium tuberculosis* subunit vaccine LT70 including latency antigen Rv2626c induces long-term protection against tuberculosis[J]. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2016; 12(7): 1670-1677.

(本文责编 郝丽芳)