

DOI:10.13350/j.cjpb.230807

• 论著 •

结核分枝杆菌 Ag85B 蛋白真核表达质粒构建及其 对小鼠肺免疫功能影响*

张炜¹, 李慧¹, 杨雨欣², 姚思¹, 王天松¹, 万巧凤^{1**}

(1. 宁夏医科大学基础医学院病原生物学与免疫学系, 宁夏银川 750004; 2. 宁夏医科大学临床医学院)

【摘要】 **目的** 构建结核分枝杆菌 Ag85B 的真核表达质粒 pcD-Ag85B, 经肌肉免疫小鼠, 观察其对小鼠肺免疫功能及下呼吸道菌群的影响。 **方法** 将信号肽基因及编码 Ag85B 的基因共 963 bp 核苷酸序列与 pcDNA3.1+ 连接, 构建真核表达质粒 pcD-Ag85B, 经双酶切及测序鉴定后体外转染中国仓鼠卵巢细胞 (CHO), 并验证其表达; 用该质粒经肌肉注射免疫 C57BL/6J 小鼠, 42 d 时收集小鼠呼吸道灌洗液, 采用间接 ELISA 法测定 SIgA 及 IgG 特异性抗体效价。取小鼠右肺, 分离淋巴细胞, 采用流式术检测分泌 IFN- γ 的 CD4⁺T 及 CD8⁺T 细胞比例; 取小鼠左肺, 提取核酸进行 16S RNA 高通量测序及菌群结构分析。 **结果** 成功构建真核表达质粒 pcD-Ag85B 并检测到 Ag85B 蛋白的表达。ELISA 检测 pcD-Ag85B 免疫 C57BL/6J 小鼠呼吸道灌洗液 SIgA 及特异性 IgG 抗体效价分别为 1 : 640 和 1 : 400; 流式细胞术检测 Ag85B 能诱导分泌 IFN- γ 的 CD4⁺T 及 CD8⁺T 细胞增殖, 所占百分比分别为 0.72% 和 0.57%; 16S RNA 高通量测序分析显示免疫鼠呼吸道菌群多样性增加, 厚壁菌门-乳杆菌属丰富度增高 ($P < 0.05$)。 **结论** 成功构建重组表达载体 pcD-Ag85B, 该重组载体表达的 Ag85B 蛋白能诱导小鼠呼吸道粘膜产生适应性免疫效应, 增加下呼吸道菌群的多样性并改善益生菌群, 为开展 Ag85B DNA 疫苗抗结核分枝杆菌感染的保护性实验奠定了基础。

【关键词】 结核分枝杆菌; Ag85B; 真核表达载体; 适应性免疫; 益生菌

【中图分类号】 R378.91

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)08-0905-06

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Aug;18(8):905-910.]

Construction of eukaryotic expression plasmid of *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B and its effects on lung immune function and on lower respiratory tract microflora in mice

ZHONG Wei¹, LI Hui¹, YANG Yuxin², YAO Si¹, WANG Tiansong¹, WAN Qiaofeng¹ (1. Department of Pathogenic Biology and Immunology, School of Basic Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. School of Clinical Medicine, Ningxia Medical University) **

【Abstract】 **Objective** To explore the effects of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) Ag85B eukaryotic expression plasmid pcD-Ag85B on pulmonary immune function and lower respiratory tract microflora in mice after muscular immunization. **Methods** A total of 963 bp nucleotide sequences of the signal peptide gene and the gene encoding Ag85B were connected to pcDNA3.1+ to construct the eukaryotic expression plasmid pcD-Ag85B. After double enzyme digestion and sequencing, the pcD-Ag85B recombinant plasmid was transfected into Chinese hamster ovarian cells (CHO) in vitro, and the correct expression was verified. C57BL/6J mice were immunized by intramuscular injection of pcD-Ag85B. The respiratory tract lavage solution was collected 42 days after immunization. The specific SIgA and IgG antibody titers were determined by indirect ELISA. The lungs were collected, the right lung was used for detect CD4⁺T and CD8⁺T cells secreting IFN- γ by Flow cytometry, and the left lung was subjected to 16S RNA high-throughput sequencing and microflora structure analysis. **Results** The eukaryotic expression plasmid pcD-Ag85B was constructed successfully and the specific expression of Ag85B protein was detected in vitro. Compared with the control group, the titers of SIgA and IgG in the immune group were 1 : 640, 1 : 400, respectively. Ag85B could induce CD4⁺T and CD8⁺T cells secreting IFN- γ , and the percentages of the two T cells were 0.72% and 0.57% respectively. The diversity of respiratory tract microflora was increased, and the abundance of Firmicutes - Lactobacillus was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** The Ag85B protein induced the adaptive immune effect of mouse respiratory mucosa, increased the diversity of lower respiratory tract microflora and improved the probiotics. This study laid the foundation for the protective experiment of Ag85B DNA vaccine against MTB infection.

* **【基金项目】** 宁夏高等学校科学研究项目 (No. NYG2022035); 宁夏常见传染病防治重点实验室开放课题 (No. XZ2021011)。

** **【通讯作者】** 万巧凤, E-mail: wqiaofeng@126.com

【作者简介】 张 炜 (1976-), 女, 宁夏银川人, 讲师, 博士。专业方向: 病原生物学。E-mail: nyzw921@163.com

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Ag85B; eukaryotic expression vector; adaptive immunity; probiotics

结核病 (tuberculosis, TB) 是由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 感染引起的一种慢性传染病, 2021 年全球新发 TB 患者 1 060 万, 发病率上升了 3.6%^[1]。卡介苗 (BCG) 是目前临床上唯一用于预防 TB 的疫苗, 也是预防 TB 最有效的疫苗^[2]。由于不断传代, BCG 中一些与免疫记忆和保护相关的基因丢失, 导致其保护期缩短、保护性免疫应答减弱^[3-4]。所以, 卡介苗对于新生儿有较好的免疫保护性, 而对成人的保护作用有限^[5]。目前, 化疗为治疗 TB 的主要方式, 但其副作用大且费用高昂^[6]。另外, MTB 极易产生耐药菌株, 2021 年新增 TB 患者中利福平耐药患者为 45 万例^[1,7]。因此, 研制安全有效的新型抗 TB 疫苗刻不容缓。

DNA 疫苗是将一种抗原基因重组至真核表达载体, 注入体内表达出相应蛋白, 该蛋白能刺激机体产生特异性体液免疫和细胞免疫应答, 发挥对机体的免疫保护作用^[8]。DNA 疫苗拥有制备简便, 成本低廉, 稳定性及安全性好的优势^[9]。

近年来, 基于抗 MTB 感染的保护性抗原基因所构建的 DNA 疫苗是研究较多的新型疫苗^[10], 主要选择 MTB 生长早期高表达的抗原^[11]。Ag85B 作为 MTB 早期高表达的分泌性蛋白, 能刺激机体产生较强的体液免疫和细胞免疫效应^[12]。本研究采用分子生物学方法将信号肽基因和 MTB 编码 Ag85B 的基因共 963p 核苷酸序列连接到 pcDNA3.1+, 构建真核表达质粒 pcD-Ag85B, 经肌肉免疫 C57BL/6J 小鼠, 观察其对小鼠肺脏免疫功能及下呼吸道菌群的影响, 旨在为 Ag85B DNA 疫苗抗 MTB 感染的保护性实验奠定基础。

材料与方 法

1 材料

1.1 细胞, 菌株及质粒 中国仓鼠卵巢细胞 (CHO-K1) 购自中国医学科学院; *E. coli* DH5 α 由宁夏医科大学马国荣提供; 真核表达质粒 pcD-Ag85B 由上海生物工程有限公司构建。

1.2 主要试剂 核酸内切酶 Hind III 和 XbaI 购自英国 NEB 公司; IPTG 购自宁夏科博生物科技有限公司; 质粒小量抽提试剂盒和胶回收试剂盒购自天根科技有限公司; 无内毒素质粒大量提取试剂盒购自美国 Omega Bio-Tek 公司; 鼠抗 Ag85B 单抗购自北京博奥森生物技术有限公司; 蛋白分子质量标准购自美国 Thermo Fisher 公司; HRP 标记羊抗小鼠 SIgA 和 HRP 标记羊抗小鼠 IgG 购自美国 Merck 公司; Lipofectamine 3000 转染剂, 胞内固定破膜液, Protein Transport Inhibitor Cocktail (500 \times), PE Anti-Mouse CD8a, FITC Anti-Mouse CD4, eFluor 450 Anti-Mouse CD3e 及 APC Anti-Mouse IFN- γ 均购自美国 Thermo Fisher 公司。

1.3 实验动物 6~7 周龄 SPF 级 C57BL/6J 雌性小鼠 10 只, 购自宁夏医科大学实验动物中心 (合格证书编号为: SCXK(宁)2020-0001)。

2 方法

2.1 pcD-Ag85B 的鉴定 将 pcD-Ag85B 转化 DH5 α 感受态细胞, 涂布于含卡那霉素抗性 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取单个菌落, 接种至含卡那霉素的 LB 液体培养基中培养过夜, 采用小量质粒提取试剂盒提取质粒, 经 Hind III 和 XbaI 双酶切鉴定后委托北京睿博兴科生物技术有限公司测序。

2.2 pcD-Ag85B 的大量提取及转染 使用无内毒素质粒提取试剂盒提取真核表达质粒 pcD-Rv85B 和空载体质粒 pcDNA3.1+, 并测定其浓度及纯度。将 CHO 细胞以 1.5×10^5 个/孔接种于 12 孔细胞培养板, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 营养液培养细胞长至 80%~90% 密度, 弃上清, PBS 缓冲液清洗细胞 2 次。根据脂质体转染试剂说明书, 将重组质粒 pcD-Rv85B 及 pcDNA3.1+ 分别转染 CHO 细胞。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 5 h, 更换含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液继续培养 48 h。

2.3 Western blot 检测 pcD-Ag85B 表达蛋白 pcD-Ag85B 转染 CHO 细胞 48 h 后收集培养液, 浓缩后取 40 μ L, 按 1:4 体积比加入 5 \times 上样品缓冲液, 沸水浴 5 min, 经 12% SDS-PAGE 分离后采用半干电转膜仪转移至 PVDF 膜上, 以 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, TBST 洗膜 3 次; 加入鼠抗 Ag85B 单克隆抗体 (1:1 000 稀释), 37 $^{\circ}$ C 振荡 120 min, 用 TBST 洗涤 3 次; 加入 HRP 标记的兔抗鼠 IgG (1:2 000), 37 $^{\circ}$ C 振荡 60 min, 洗涤; 加入 ECL 发光液, 经显影、定影后进行分析。

2.4 动物免疫及标本采集 小鼠适应性饲养 1 周, 随机分为空白对照组 (PBS 组) 和 pcD-Rv85B 免疫组, 每组 5 只。免疫组通过大腿肌肉微针注射法注射 pcD-Rv85B (50 μ g/只), PBS 组注射等量生理盐水。初次免疫后 2 周进行第 2 次免疫, 共免疫 2 次。初免后 42 d, 所有小鼠禁食不禁水 12 h, 颈椎脱臼法处死, 低温无菌收集呼吸道灌洗液; 摘取全肺, 右肺用于分离淋巴细胞, 采用流式术检测分泌 IFN- γ 的 CD4⁺T 及 CD8⁺T 细胞, 左肺用于 16S RNA 高通量测序及菌群结构分

析。

2.5 间接 ELISA 测定免疫鼠呼吸道灌洗液 SIgA 和 IgG 抗体滴度 将前期制备的 Ag85B 蛋白配制成 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 包被酶标板, 0.1 mL/孔, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 加入 2% BSA 封闭液, 0.1 mL/孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 2 h, TBST 洗板 4 次; 加入稀释的免疫小鼠呼吸道灌洗液(终稀释度依次为 1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800), 另设空白对照和 PBS 阴性对照, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 洗涤; 分别加入 1:1000 稀释的 HRP 标记羊抗小鼠 SIgA 和 1:2000 稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgG, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 40 min, PBST 洗板; 加入底物, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min 后加入 2 mol/L H_2SO_4 终止反应, 用酶标仪测定 A_{450} 值。以试验孔 A_{450} 值/阴性对照 A_{450} 值 > 2.1 倍的样品最高稀释度为抗体滴度^[13]。

2.6 流式细胞术检测分泌 IFN- γ 的肺 T 淋巴细胞 将免疫鼠右肺于低温、无菌条件下快速剪碎, 放入含 1 mg/mL 的胶原酶 I 和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 脱氧核糖核酸酶 I 的 RPMI-1640 培养基中消化 60 min; 将消化后的肺组织块转移到 200 目筛网的滤器上, 用 5 mL 注射器活塞轻轻研磨并用预冷的 RPMI-1640 冲洗, 制备单细胞悬液, 按照淋巴细胞分离液说明书方法分离淋巴细胞, 用预冷的 PBS 调整淋巴细胞浓度为 2×10^6 个/mL; 取 100 μL 细胞悬液于 1 mL DMEM 完全培养液中, 加入 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Ag85B 蛋白于 37 $^{\circ}\text{C}$ 刺激培养 24 h, 室温、500 g 离心 5 min, 弃上清; 用 100 μL 流式细胞染色液重悬细胞, 加入 4 μL eFluor450-CD3、0.5 μL FITC-CD4 和 1.25 μL PE-CD8, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min; 加入 400 μL 流式细胞染色液, 室温、400 g 离心 5 min, 弃上清; 加入 500 μL 破膜剂重悬细胞, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h, 室温、400 g 离心 5 min, 300 g 离心 5 min, 弃上清; 用 100 μL 流式细胞染色液重悬细胞, 加入 2.5 μL APC-IFN- γ 抗体, 室温避光孵育 30 min; 加入 400 μL 破膜洗涤液, 室温、300 g 离心 5 min, 弃上清; 加入 300 μL 流式细胞染色液重悬细胞, 采用 FACSCelesta 流式仪进行检测。

2.7 免疫鼠肺脏 16S RNA 高通量测序及菌群结构分析 采用 MagPure Soil DNA LQ Kit 提取免疫鼠肺组织基因组 DNA 并作适当稀释, 以此为模板, 使用带 Barcode 的特异引物, 采用 Takara Ex Taq 高保真酶进行 PCR。多样性鉴定对应区域为 16S V3-V4 区(引物 F: 5'-TACGGRAGGCAGCAG-3'; R: 5'-AGGGTATCTAATCCT-3')。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后使用磁珠纯化, 纯化的 PCR 产物进行 Qubit 定量。根据 PCR 产物浓度作等量混样并上机测序。利用 Uparse 算法对所有样品的全部 Effec-

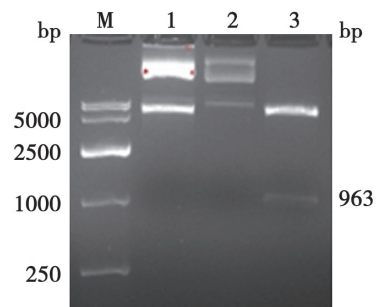
tive Tags 进行聚类, 以一致性 97% 的序列聚类成 OTUs (Operational Taxonomic Units), 选取 OTUs 中出现频数最高的序列作为 OTUs 的代表序列。使用 R 软件对 Alpha 多样性及 Beta 多样性进行差异分析。建库测序及数据分析均由上海欧易生物科技有限公司完成。

2.8 统计学分析 采用 GraphPad-Prism 5 软件进行作图及数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。服从正态分布且方差齐的计量资料的两组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 pcD-Ag85B 的酶切鉴定

用 Hind III-XbaI 双酶切 pcD-Ag85B, 1% 琼脂糖凝胶电泳显示得到约 963 bp 的目的基因片段和 5428 bp 的载体片段, 结果如图 1, 与预期相符。对重组质粒测序, 结果与信号肽基因及 Rv1886c 基因序列完全一致, 真核表达质粒构建正确。



M DNA 标志物 1 载体 pcDNA3.1(+) 2 真核重组表达质粒 pcD-Ag85B 3 pcD-Ag85B Hind III/XbaI 双酶切

图 1 真核表达质粒 pcD-Ag85B 双酶切鉴定

M DNA marker 1 pcDNA3.1+ 2 pcD-Ag85B 3 pcD-Ag85B digested products by Hind III/XbaI

Fig. 1 Identification of the vectors by restriction enzyme

2 Ag85B 蛋白的表达检测

质粒 pcD-Ag85B 转染 CHO 细胞后 48 h 收集细胞培养基, 浓缩后进行 Western blot, 结果如图 2, 反应条带位于 35 ku 处, 与预期一致。pcDNA3.1+ 空载体无相应反应条带。表明 pcD-Ag85B 在 CHO 细胞中表达的 Ag85B 蛋白能分泌到细胞外。

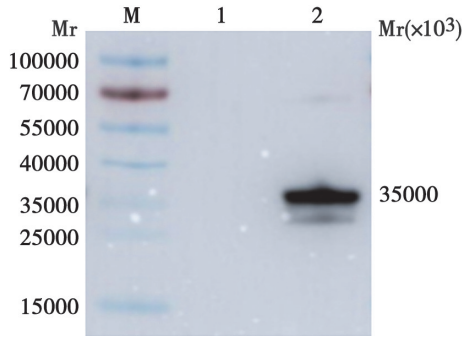
3 pcD-Ag85B 免疫鼠呼吸道粘膜 SIgA、IgG 特异性抗体效价

于重组质粒首次免疫后第 42 d 收集小鼠呼吸道灌洗液, ELISA 检测特异性 SIgA/IgG 抗体平均效价分别为 1:640 和 1:400。

4 pcD-Ag85B 免疫鼠肺脏分泌 IFN- γ 的 CD4⁺T 及 CD8⁺T 细胞比例变化

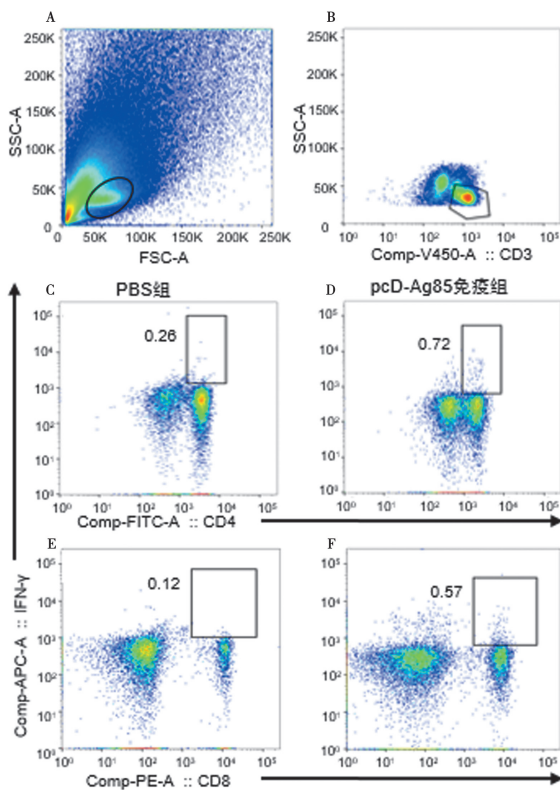
流式检测结果如图 3, pcD-Ag85B 免疫组和 PBS 组的 CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺ 细胞比例分别为 (0.72% \pm

0.05%)和(0.26%±0.03%),差异有统计学意义($t=8.39, P<0.01$); $CD3^+CD8^+IFN-\gamma^+$ 细胞比例分别为(0.57%±0.04%)和(0.12%±0.01%),差异有统计学意义($t=8.43, P<0.01$)。



M 蛋白质分子质量标准 1 pcDNA3.1+转染细胞培养上清对照 2 pcD-Ag85B转染细胞培养上清与相应抗体反应条带
图2 Western blot 检测 pcD-Ag85B 转染细胞培养上清中的 Ag85B
M Protein marker 1 CHO transfected with empty plasmid-pcDNA3.1+ 2 CHO transfected with pcD-Ag85B

Fig. 2 The expression of Ag85B in supernatant of CHO cells was detected by Western blot



A 圈内部分为分泌 IFN- γ 淋巴细胞群 B 圈内部分为 $CD3^+$ T 细胞群 C PBS组分泌 IFN- γ 的 $CD4^+$ T 细胞 D 免疫组分泌 IFN- γ 的 $CD4^+$ T 细胞 E PBS组分泌 IFN- γ 的 $CD8^+$ T 细胞 F 免疫组分泌 IFN- γ 的 $CD8^+$ T 细胞

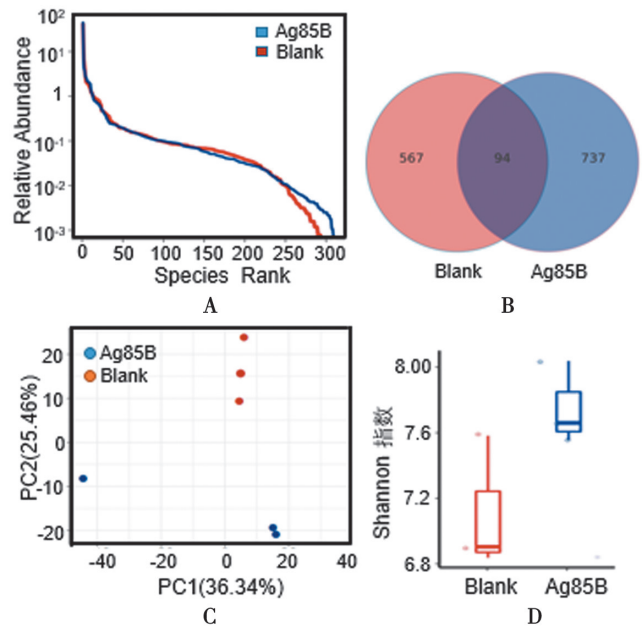
图3 pcD-Ag85B 免疫对小鼠肺脏分泌 IFN- γ 的 $CD4^+$ T 及 $CD8^+$ T 细胞增殖的影响

A Group of lymphocytes secreting IFN- γ B Group of $CD3^+$ T cells C $CD4^+$ T cells secreting IFN- γ in PBS group D $CD4^+$ T cells secreting IFN- γ in the immune group E $CD8^+$ T cells secreting IFN- γ in the PBS group F $CD8^+$ T cells secreting IFN- γ in the immune group

Fig. 3 Effects of Ag85B on $CD4^+$ T and $CD8^+$ T cells secreting IFN- γ in lung

5 pcD-Ag85B 免疫对小鼠下呼吸道菌群的影响

5.1 菌群多样性变化 等级聚类曲线(Rank Abundance)可直观反映样品中物种的丰富度和均匀度。由图4A看出,PBS组曲线的宽度小于 pcD-Ag85B 免疫组,说明 pcD-Ag85B 免疫鼠下呼吸道菌群的物种丰富度较 PBS 组高。采用 OTU Venn 图分析菌群 OTU 数量及其种类交叉情况,PBS 组和 pcD-Ag85B 免疫组总 OTU 分别为 661 及 831 个,进一步说明 pcD-Ag85B 免疫组下呼吸道菌群丰度增高,结果如图 4B。



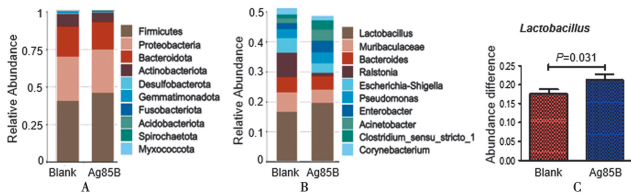
A 等级聚类曲线 B Venn 图 C 主成分分析 D Shannon 图
图4 pcD-Ag85B 免疫小鼠下呼吸道菌群多样性分析

A Rank abundance curve B Venn graph C PCA D Shannon graph
Fig. 4 Species classification and abundance analysis of intestinal flora samples of mice

β 多样性分析可用于研究不同样本中菌群结构的相似性及差异性,主成分分析(Principal Component Analysis,PCA)可通过不同样本群落组成成分反映样本间的差异和距离。图4C显示,PBS组和 pcD-Ag85B 免疫组分开聚集,差异明显,其中主成分1(PC1)贡献度为36.34%,主成分2(PC2)贡献度为25.46%,二者贡献度之和大于60%。Shannon 指数如图4D,pcD-Ag85B 免疫组的微生物 α 多样性显著高于 PBS 组($t=3.69, P<0.05$),表明 Ag85B 蛋白的免疫效应调节了小鼠的下呼吸道菌群的组成。

5.2 菌群物种组成及差异性分析 在门水平上,pcD-Ag85B 免疫鼠下呼吸道细菌组成主要是 Firmicutes (厚壁菌门),Proteobacteria(变形菌门),Bacteroidota(拟杆菌门)及 Actinobacteriota(放线菌门)。与 PBS 组相比,pcD-Ag85B 免疫组厚壁菌门相对丰度增加而拟杆菌门和放线菌门相对丰度减少,如图5A。在属水平上,两组鼠的下呼吸道优势菌群组成主要是 *Lacto-*

bacillus (乳杆菌属)、*Muribaculaceae*、*Bacteroides* (类杆菌属)、*Ralstonia* (罗尔斯通菌属)、*Escherichia-Shigella* (大肠埃希菌志贺菌属)、*Pseudomonas* (假单胞菌属)、*Enterobacter* (肠杆菌属)、*Acinetobacter* (不动杆菌属)、*Clostridium_sensu_stricto_1* (严格梭菌属) 及 *Corynebacterium* (棒状杆菌属), 如图 5B。与 PBS 组相比, pcD-Ag85B 免疫组乳杆菌属、肠杆菌属、不动杆菌属及棒状杆菌属的相对丰度增加, 而 *Muribaculaceae* 属、罗尔斯通菌属、大肠埃希菌志贺菌属及棒状杆菌属相对丰度减少, 表明 pcD-Ag85B 免疫影响小鼠下呼吸道菌群属水平上的变化。对在两组间属水平上 10 个优势菌群作统计学分析, 只有 *Lactobacillus* (乳杆菌属) 丰度差异有统计学意义 ($t = 3.25, P < 0.05$), 如图 5C。



A 门水平优势菌群丰度 B 属水平优势菌群丰度 C 属水平优势菌群丰度差异分析

图 5 pcD-Ag85B 免疫小鼠下呼吸道道菌群物种组成及差异性分析

A Relative abundance distribution at the phylum level B Relative abundance distribution at the genus level C Difference analysis of respiratory tract microflora at genus level

Fig. 5 Species composition and difference analysis of respiratory tract microflora in each group

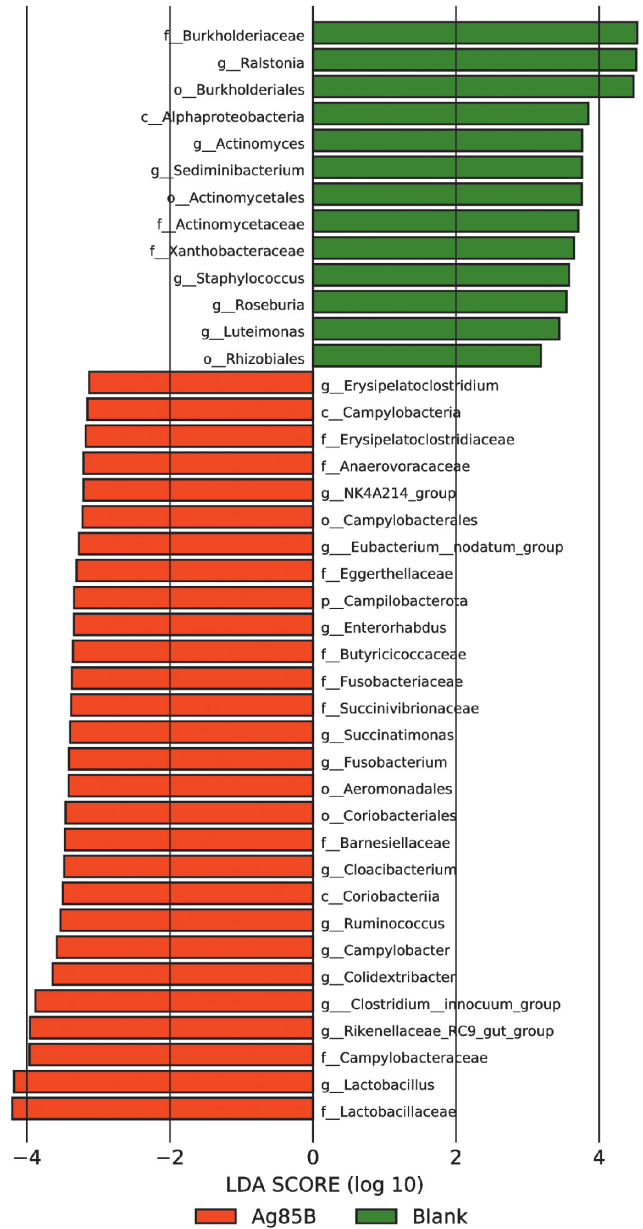
6 LEfSe 多级物种差异分析

LEfSe 多级物种差异分析可找出在门、纲、目、科、属各个水平中产生显著性差异影响的群落或物种。如图 6, Ag85B 组的变形杆菌门的 *o__Burkholderiales* (伯克氏菌目)、*f_Burkholderiaceae* (伯克氏菌科)、及其 *g__Ralstonia* 罗尔斯通菌属, *c__Alphaproteobacteria* (α -变形菌目) 等有害菌的丰度与 PBS 对照组相比显著下调, 而 *f__Lactobacillaceae* (乳杆菌科)、*g__Lactobacillus* (乳杆菌属) 等有益菌丰度显著上调。不同分类水平表明重组质粒免疫降低了部分有害菌的丰度, 增加了部分有益菌的丰度。

讨论

MTB 感染所致传染病中以肺结核尤为常见。由于 MTB 属于胞内寄生菌, T 细胞介导的免疫是消除 MTB 的主要途径, 所以在预防结核病的疫苗研发中选择能引起机体 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞的应答的抗原非常重要, 活化的 T 细胞产生 $IFN-\gamma$ 、 $IL-2$ 等细胞因子^[14]。 $IFN-\gamma$ 是肺结核患者肺组织分泌量较高的细胞因子, 其不仅能上调 NK 细胞和 $CD8^+$ T 细胞的

活性, 还抑制细菌向肺外扩散^[15]。MTB 菌体蛋白分为分泌蛋白、细胞质蛋白和细胞壁表面的膜蛋白, 其中分泌性蛋白是保护性最好的 MTB 蛋白。Ag85 复合物是 MTB 的早期分泌蛋白, 占 MTB 分泌蛋白总量的 45%, 该复合物包括 Ag85A、Ag85B 和 Ag85C 等 3 种组分, 其中 Ag85B 占 22%^[13]。有研究表明 Ag85B 能够诱导机体产生良好的 T 细胞和 B 细胞免疫反应^[16]。



注: p-门水平物种; c-纲水平物种; o-目水平物种; f-科水平物种; g-属水平物种。

图 6 pcD-Ag85B 免疫小鼠下呼吸道菌群 LEfSe 多级物种差异分析 (LDA > +/- 2 示有差异性)

Notes: p-phylum level species; c-class level species; o-order level species; f-family level species; g-genus level species.

Fig. 6 LEfSe multilevel species discriminant analysis of respiratory tract microbiota (LDA > +/- 2 means significant difference)

黏膜免疫系统 (Mucosal immune system, MIS) 是由黏膜相关淋巴组织所组成的免疫系统, 其拥有人体

80%的免疫细胞,构成机体抗感染的第一道防线^[17]。因特殊的位置及重要的作用使MIS拥有与外周免疫系统迥然不同的解剖学结构、淋巴细胞和免疫反应分子机制,其主要通过产生分泌型IgA(SIgA)和IgG发挥作用^[18]。呼吸道黏膜表面定居着一定数量和种类的细菌,构成呼吸道的正常菌群,这些菌群有助于维持黏膜免疫稳态以及抵抗和清除外源病原体,在局部免疫功能方面发挥重要的作用^[19]。呼吸道正常菌群在微生物门水平上主要为厚壁菌门、放线菌门和拟杆菌门,科水平的主要优势菌群为乳酸杆菌科、芽孢杆菌科、肠球菌科、葡萄球菌科、链球菌科和肠杆菌科等^[20]。益生菌可增加抗原特异性的IgG、IgA抗体水平,减少肺部病原菌负荷并阻止扩散,从而预防呼吸道感染^[21]。

本研究结果表明,pcD-Ag85B免疫小鼠呼吸道灌洗液中特异性SIgA及IgG抗体的平均抗体效价分别为1:640及1:400,表明其表达的Ag85B蛋白诱导了小鼠呼吸道黏膜的适应性体液免疫效应。免疫鼠肺组织的CD3+CD4⁺IFN- γ ⁺细胞比例和CD3+CD8⁺IFN- γ ⁺细胞比例均显著增高,说明pcD-Ag85B免疫诱导增强了适应性细胞免疫应答。OTUs以及菌群多样性分析显示,pcD-Ag85B免疫增加了小鼠下呼吸道菌群的多样性,并对下呼吸道菌群的组成产生了影响,增加了厚壁菌门的相对丰富度,降低了拟杆菌门和放线菌门的相对丰富度。属水平差异性分析显示,pcD-Ag85B免疫鼠部分潜在有害菌如*Ralstonia*(罗尔斯通菌属)、*Escherichia-Shigella*(大肠埃希菌志贺菌属)丰度降低,而有益菌如*Lactobacillus*(乳杆菌属)丰度升高。LEfSe多级物种差异分析表明pcD-Ag85B免疫降低了部分有害菌的丰度,增加了部分有益菌属的丰度。

本研究对真核表达质粒pcD-Ag85B进行了鉴定并检测到Ag85B蛋白的表达。该质粒表达的Ag85B蛋白刺激小鼠产生了适应性体液免疫和细胞免疫效应,改善了下呼吸道益生菌丰度,为开展Ag85B DNA疫苗抗MTB感染的保护性实验奠定了基础。

【参考文献】

[1] Global tuberculosis report 2022. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240061729>.

[2] Pepin J, Fox A, LeBlanc L, et al. In the footsteps of Albert Calmette: an ecological study of TB, leprosy and potential exposure to wild-type *Mycobacterium bovis* [J]. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2022, 116(12): 1112-1122.

[3] Fine PE. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity [J]. *Lancet*, 1995, 346(8986): 1339-1345.

[4] Brewer TF, Colditz GA. Bacille Calmette-Guerin vaccination for

the prevention of tuberculosis in health care workers [J]. *Clin Infect Dis*, 1995, 20(1): 136-142.

[5] Fol M, Wodarczyk M, Kowalewicz-Kulbat M, et al. *Mycobacterium bovis* wild-type BCG or recombinant BCG secreting murine IL-18 (rBCG/IL-18) strains in driving immune responses in immunocompetent or immunosuppressed mice [J]. *Vaccines (Basel)*, 2022, 10(4): 615.

[6] de Araujo RV, Santos SS, Sanches LM, et al. Malaria and tuberculosis as diseases of neglected populations: state of the art in chemotherapy and advances in the search for new drugs [J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2020, 115: e200229.

[7] Mirzayev F, Viney K, Linh NN, et al. World Health Organization recommendations on the treatment of drug-resistant tuberculosis, 2020 update [J]. *Eur Respir J*, 2021, 57(6): 2003300.

[8] Langellotti CA, Gammella M, Soria I, et al. An Improved DNA Vaccine Against Bovine Herpesvirus-1 Using CD40L and a Chemical Adjuvant Induces Specific Cytotoxicity in Mice. *Viral Immunol*. 2021, 34(2): 68-78.

[9] Rezaei T, Davoudian E, Khalili S, et al. Strategies in DNA vaccine for melanoma cancer [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2021, 34(5): 869-891.

[10] Chu JS, Villarreal DO, Weiner DB. DNA Vaccines: A strategy for developing novel multivalent TB vaccines [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1403: 355-361.

[11] 张真, 赵玲娜, 申梦. 结核分枝杆菌 Hsp65-Ag85B、Hsp65-ES-AT6 融合基因 DNA 疫苗株的构建及免疫原性研究 [J]. *免疫学杂志*, 2020, 36(2): 109-115.

[12] Kadir NA, Sarmiento ME, Acosta A, et al. Cellular and humoral immunogenicity of recombinant *Mycobacterium smegmatis* expressing Ag85B epitopes in mice [J]. *Int J Mycobacteriol*. 2016, 5(1): 7-13.

[13] 刘琼, 李慧, 罗鹏征, 等. 结核分枝杆菌 Rv1886c 蛋白的表达、纯化及其多克隆抗体的制备 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2022, 35(1): 63-67.

[14] Palma Albornoz SP, Fraga-Silva TFC, Gembre AF, et al. Obesity-induced dysbiosis exacerbates IFN- γ production and pulmonary inflammation in the *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. *Cells*, 2021, 10(7): 1732.

[15] Sakai S, Kauffman KD, Schenkel JM, et al. Cutting edge: control of *Mycobacterium tuberculosis* infection by a subset of lung parenchyma-homing CD4 T cells [J]. *J Immunol*, 2014, 192(7): 2965-2969.

[16] Blanchett S, Tsai CJ, Sandford S, et al. Intranasal immunization with Ag85B peptide 25 displayed on *Lactococcus lactis* using the PflVax platform induces antigen-specific B- and T-cell responses [J]. *Immunol Cell Biol*, 2021, 99(7): 767-781.

[17] Shao F, Yu D, Xia P, et al. Dynamic regulation of innate lymphoid cells in the mucosal immune system [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(6): 1387-1394.

[18] Zhou B, Yuan Y, Zhang S, et al. Intestinal flora and disease mutually shape the regional immune system in the intestinal tract [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 575.

[19] Maldonado GC, Cazorla SI, Lemme DJM, et al. Beneficial effects of probiotic consumption on the immune system [J]. *Ann Nutr Metab*. 2019, 74(2): 115-124.

[20] Guo MY, Chen HK, Ying HZ, et al. The role of respiratory flora in the pathogenesis of chronic respiratory diseases [J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 6431862.

[21] Koenen MH, de Steenhuijsen P, WAA, Bogaert D, et al. The microbiota in respiratory tract infections: from association to intervention [J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2022, 35(3): 215-222.

【收稿日期】 2023-01-30 【修回日期】 2023-04-20