

DOI:10.13350/j.cjpb.231013

• 论著 •

# 布鲁氏菌 WbpL 蛋白的生物信息学分析及其促细胞凋亡作用研究\*

印双红<sup>1</sup>, 张俊波<sup>2,3,\*</sup>, 易彩霞<sup>1</sup>, 李寅翠<sup>1</sup>, 毛宏<sup>1</sup>, 孙馨<sup>1</sup>, 王书利<sup>4</sup>, 蔡春连<sup>1</sup>

(1. 铜仁学院大健康学院, 贵州铜仁 554300; 2. 铜仁学院农林工程与规划学院;

3. 铜仁学院贵州省梵净山地区生物多样性保护与利用重点实验室; 4. 商丘师范学院生物与食品学院)

**【摘要】** 目的 本研究旨在对布鲁氏菌 WbpL 蛋白进行生物信息学分析; 分析 WbpL 蛋白对细胞凋亡的影响。 方法

从 NCBI 数据库中获取羊布鲁氏菌 WbpL 蛋白的氨基酸序列, 利用在线软件分析 WbpL 蛋白的理化性质, 二、三级结构, 亲、疏水性, 信号肽, 跨膜区及亚细胞定位, 抗原决定簇及结构域。构建 wbpL 基因的重组表达质粒 pMAL-c5x-wbpL, 表达 WbpL 的融合蛋白并进行纯化, 采用流式细胞术检测 WbpL 融合蛋白对 RAW264.7 细胞凋亡的影响。 结果

WbpL 蛋白由 335 个氨基酸组成, 不稳定系数为 28.70, 为稳定蛋白; 二级结构以  $\alpha$ -螺旋为主, 占 64.18%。WbpL 蛋白具有 11 个抗原决定簇, 存在 11 个跨膜区域但无信号肽。WbpL 蛋白位于细胞质膜, 其相互作用蛋白包括 MurC、MurD、MurE、MurF、MurG 和 FtsW。成功构建 pMAL-c5x-wbpL 重组质粒, 并表达、纯化获得 60 ku 的 WbpL 融合蛋白。流式细胞术检测显示, 随着 WbpL 蛋白浓度的增加以及作用时间的延长, WbpL 对细胞凋亡的促进作用也随之增强。 结论

WbpL 蛋白具有较好的反应原性, 重组表达的 WbpL 对 RAW264.7 细胞的凋亡有促进作用。以上结果为进一步研究 WbpL 蛋白的功能提供科学依据。

**【关键词】** 布鲁氏菌; WbpL 蛋白; 生物信息学分析; 原核表达; 细胞凋亡

**【中图分类号】** R378.5

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2023)10-1179-06

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Oct;18(10):1179-1184, 1189.]

## Bioinformatics and functional analysis of *Brucella* WbpL protein

YIN Shuanghong<sup>1</sup>, ZHANG Junbo<sup>2,3,\*</sup>, YI Caixia<sup>1</sup>, LI Yancui<sup>1</sup>, MAO Hong<sup>1</sup>, SUN Xin<sup>1</sup>, WANG Shuli<sup>4</sup>, CAI Chunlian<sup>1</sup> (1. College of One Health, Tongren University, Tongren, Guizhou 554300, China; 2. College of Agroforestry Engineering and Planning, Tongren University; 3. Guizhou Provincial Key Laboratory for Biodiversity Conservation and Utilization in the Fanjing Mountain Region, Tongren University; 4. College of biology and food, Shangqiu NORMAL university)\*\*\*

**【Abstract】** **Objective** The aim of this study was to analyze the WbpL protein of *Brucella*. The effect of WbpL protein on apoptosis was analyzed. **Methods** The amino acid sequence of WbpL protein of *Brucella* was obtained from NCBI database. The physical and chemical properties, secondary and tertiary structure, hydrophilic, hydrophobic, signal peptide, transmembrane region and subcellular location, antigenic determinate and domain of WbpL protein were analyzed by online software. The recombinant expression plasmid pMAL-c5x-wbpL was constructed to express the fusion protein of WbpL and purified. The effect of WbpL fusion protein on apoptosis of RAW264.7 cells was detected by flow cytometry. **Results** WbpL protein consisted of 335 amino acids and was stable with an instability coefficient of 28.70. The secondary structure is mainly  $\alpha$ -helix, accounting for 64.18%. WbpL protein had 11 antigen clusters, 11 transmembrane regions but no signal peptide. The WbpL protein was located in the cytoplasmic membrane and its interacting proteins include MurC, MurD, MurE, MurF, MurG, and FtsW. The pMAL-c5x-wbpL recombinant plasmid was successfully constructed, and 60 ku of WbpL fusion protein was expressed and purified. Flow cytometry showed that WbpL protein promoting effect on apoptosis was also enhanced with the increase of WbpL protein concentration and the extension of action time. **Conclusion** WbpL protein had good reactivity, and the recombinant expression of WbpL could promote the apoptosis of RAW264.7 cells. These results provide scientific basis for further study on the function of WbpL protein.

\* **【基金项目】** 贵州省省级科技计划项目(黔科合基础-ZK[2021]一般 078); 国家自然科学基金项目(No. 82160391, 31502067); 铜仁市科技局项目(铜市科研[2022]67号, 铜市科研[2023]39号); 贵州省高层次创新人才培养项目(2018-(2016)-022); 贵州省重点实验室项目(黔科合平台人才[2020]2003)

\*\* **【通讯作者】** 张俊波, E-mail: zhangjunbo666@126.com

**【作者简介】** 印双红(1986-), 女, 贵州松桃人, 硕士, 教授, 主要从事微生物学研究。E-mail: ysh\_hong2006@163.com

【Key words】 Brucella; WbpL protein; bioinformatics analysis; prokaryotic expression; apoptosis

布鲁氏菌病是由布鲁氏菌感染所致的世界范围内广泛流行的一种人畜共患病<sup>[1]</sup>。布鲁氏菌可在细胞内寄生<sup>[2]</sup>,可导致动物的流产、睾丸炎、关节炎等症状<sup>[3-4]</sup>,人感染后可出现波浪热、多汗、肌肉疼痛、全身不适等症状。布鲁氏菌根据感染宿主不同分为羊种、猪种、牛种、犬种、沙林鼠种、绵羊种 6 个经典属种<sup>[5]</sup>,人感染以羊种布鲁氏菌多见<sup>[6]</sup>。疫苗接种是布鲁氏菌病防控的主要措施,但是如何区分自然感染和疫苗接种是布鲁氏菌病防控的主要难题<sup>[7]</sup>。目前布鲁氏菌病预防使用的弱毒疫苗保护率较低,且存在导致怀孕母畜流产的风险。亚单位疫苗具有高安全性、高效性、免疫持久等优点,在布鲁氏菌病的防控中具有广泛的应用前景<sup>[8]</sup>。

布鲁氏菌最外层是由蛋白质、脂多糖、磷脂复合构成的外膜通过脂蛋白与聚肽层连接组成的细胞壁。脂多糖是布鲁氏菌病最重要的抗原,由核心多糖、类脂 A 和侧链多糖组成<sup>[9]</sup>,含有的外露多糖链阻碍菌体外膜蛋白的暴露,而外露多糖在刺激机体产生抗体方面至关重要,从而成为机体保护性免疫反应的重要组分。因此脂多糖是布鲁氏菌重要的抗原成分,也是布鲁氏菌感染诊断的重要依据<sup>[10]</sup>。布鲁氏菌脂多糖是菌体表面的内毒素成分,是暴露于菌体表面的一种抗原结构,也是重要毒力因子<sup>[11]</sup>。本研究利用生物信息学方法对 WbpL 蛋白进行分析;构建 pMAL-c5x-wbpL 重组质粒,原核表达重组 WbpL 蛋白并分析其对 RAW264.7 细胞凋亡的影响,为布鲁氏菌的感染诊断和疫苗研发奠定基础。

## 材料与amp;方法

### 1 材料

DNA 凝胶回收试剂盒, DNA ladder, IPTG, 限制性核酸内切酶和质粒 DNA 小量抽提试剂盒均自安诺伦(北京)生物科技有限公司;质粒 pMAL-c5x、Tris 缓冲液,大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  和 BL21 感受态均自艾柏森生物科技有限公司。

### 2 方法

**2.1 WbpL 蛋白的生物信息学分析** 使用在线 ExPASy 蛋白分析软件 ProtParam 程序(<https://web.expasy.org/protparam/>)预测 M5-90 WbpL 蛋白(GenBank 登录号:WP\_004686563.1)的基本组成、等电点、脂肪族系数、摩尔吸光系数、亲水系数等;采用 SOPMA 程序预测蛋白的二级结构([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html));采用 SWISS MODEL 预

测 WbpL 蛋白的三级结构(<https://swissmodel.expasy.org/interactive>);采用 ProtScale 软件中 HydroPath/Kyte & Doolittle 分析方法预测 WbpL 蛋白的亲疏水性(<https://web.expasy.org/protscale/>);采用 Predicting Antigenic Peptides 预测 WbpL 蛋白的抗原决定簇(<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>);采用 SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>)预测蛋白序列中是否存在信号肽序列;采用在线软件 DeepTMHMM(<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>)预测 WbpL 蛋白的跨膜区;使用 PROSITE SCAN([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_proscan.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_proscan.html))对 WbpL 蛋白的结构进行分析;利用 PSORTb 在线软件对 WbpL 蛋白进行细胞亚定位预测(<https://www.psort.org/psortb/>)。利用 STRING 数据库预测分析 WbpL 蛋白的互作情况(<https://cn.string-db.org/>)(confidence 设为 0.7,其它参数设为默认)。

### 2.2 重组表达质粒 pMAL-c5x-wbpL 的构建及重组蛋白的表达

**2.2.1 wbpL 基因的合成及 pMAL-c5x-wbpL 的构建** 在布鲁氏菌 M5-90 的 wbpL 基因序列(GenBank 登录号:NC\_017246.1)加入 SacI/BamHI 酶切位点,委托生物系统(安徽)有限公司合成质粒 pMAL-c5x-wbpL(图 1),对 pMAL-c5x 表达载体进行 SacI/BamHI 双酶切鉴定。酶切体系(20  $\mu$ L):SacI 内切酶 1.0  $\mu$ L, BamHI 内切酶 1.0  $\mu$ L, 质粒 pMAL-c5x-wbpL 5.0  $\mu$ L, 10  $\times$  Ligation buffer 2.0  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 11.0  $\mu$ L。质粒交由深圳华大基因科技有限公司测序。

**2.2.2 WbpL 蛋白的表达及纯化** 将 pMAL-c5x-wbpL 质粒转化至 DE3 感受态细胞中,37  $^{\circ}$ C、220 r/min 振荡至菌体 A<sub>600</sub> 值为 0.6~0.8;向细菌培养物中加入诱导剂 IPTG(0.5 mmol/L),在 18  $^{\circ}$ C、220 r/min 条件下培养 16 h,低温离心收集菌体,用裂解 buffer 重悬后进行超声破碎,超声后的样品低温离心,分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳分析。另取超声破碎上清液用 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤,通过 His 亲和层析柱进行蛋白纯化。步骤如下:用 5 倍柱体积的去离子水洗涤以去除空气和 20% 乙醇;用 5~10 倍柱体积的 Buffer A 平衡层析柱(Buffer A:50 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, pH 8.0);将样品以 0.25 mL/min 的速度流穿 His 柱,用 Buffer A 平衡层析柱,用 100 mmol/L 和 250 mmol/L 咪唑洗脱并收集洗脱液,SDS-PAGE 电泳检测 WbpL 蛋白的纯化效果。

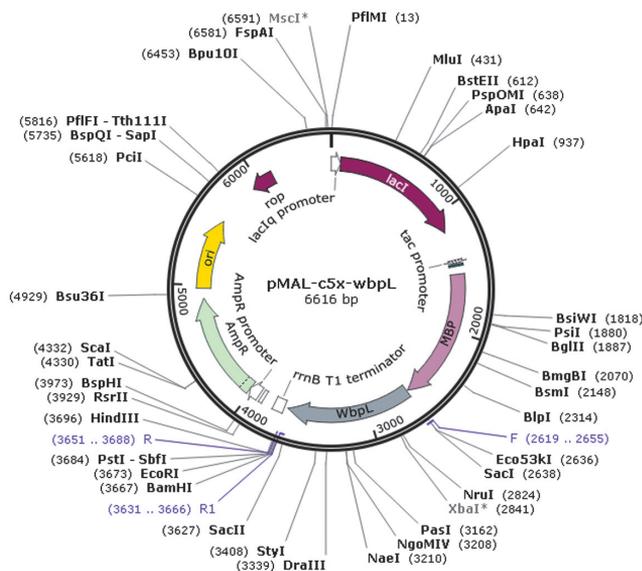


图1 pMAL-c5x-wbpL 载体图谱  
Fig.1 pMAL-c5x-wbpL vector map

表1 WbpL 蛋白的氨基酸组成

氨基酸	数目	百分比(%)	氨基酸	数目	百分比(%)
Amino acid	Number	Percent	Amino acid	Number	Percent
Ala(A)	42	12.5	Lys(K)	5	1.5
Arg(R)	15	4.5	Met(M)	6	1.8
Asn(N)	9	2.7	Phe(F)	16	4.8
Asp(D)	10	3.0	Pro(P)	14	4.2
Cys(C)	3	0.9	Ser(S)	19	5.7
Gln(Q)	6	1.8	Thr(T)	14	4.2
Glu(E)	6	1.8	Trp(W)	3	0.9
Gly(G)	30	9.0	Tyr(Y)	6	1.8
His(H)	7	2.1	Val(V)	26	7.8
Ile(I)	25	7.5	Pyl(O)	0	0.0
Leu(L)	73	21.8	Sec(U)	0	0.0



图2 WbpL 蛋白的二级结构预测  
Fig.2 Prediction of secondary structure of WbpL protein

**2.3 流式细胞术检测 WbpL 蛋白促 RAW264.7 细胞凋亡作用** 将 RAW264.7 细胞接种于 6 孔板,  $4 \times 10^5$  个/孔, 培养过夜; 分别加入 0、0.1、10、1 000 nmol/L 的 WbpL 蛋白, 继续孵育 24 h, 按照 Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒说明书进行处理后用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

## 结果

### 1 WbpL 蛋白的生物信息学分析

**1.1 理化性质** 根据 ProtParam 分析 *wbpL* 基因编码的蛋白分子式为  $C_{1655}H_{2685}N_{417}O_{422}S_9$ , 包含 335 个氨基酸, 分子质量为 35.465 60 ku, 总原子数为 5 188, 理论等电点为 9.12。WbpL 蛋白的氨基酸组成中丙氨酸(Ala)含量最高(12.5%); 带负电荷的氨基酸残基(Asp+Glu)为 16 个, 带正电荷的氨基酸残基(Arg+Lys)为 20 个; 不稳定系数为 28.70( $\leq 40$ ), 为稳定蛋白; 280 nm 处的吸光系数( $A_{280}$ )为 25 565 L/(mol·cm); 脂肪系数平均为 149.13, 总平均亲水性为 1.047 (表 1)。

**1.2 二级结构** 使用 SOPMA 软件对 WbpL 蛋白的二级结构进行预测。WbpL 蛋白中有 215 个氨基酸参与形成  $\alpha$ -螺旋, 占总氨基酸的 64.18%; 26 个氨基酸参与延伸链的形成, 占总氨基酸的 7.76%; 18 个氨基酸参与  $\beta$ -折叠的形成, 占总氨基酸的 5.37%; 76 个氨基酸参与无规卷曲结构的形成, 占总氨基酸的 22.69% (图 2)。

**1.3 三级结构** 利用 Swiss-Model 对 WbpL 蛋白三级结构进行预测, 预测模型均以  $\alpha$ -螺旋为主, 与二级结构预测结果相吻合(图 3)。

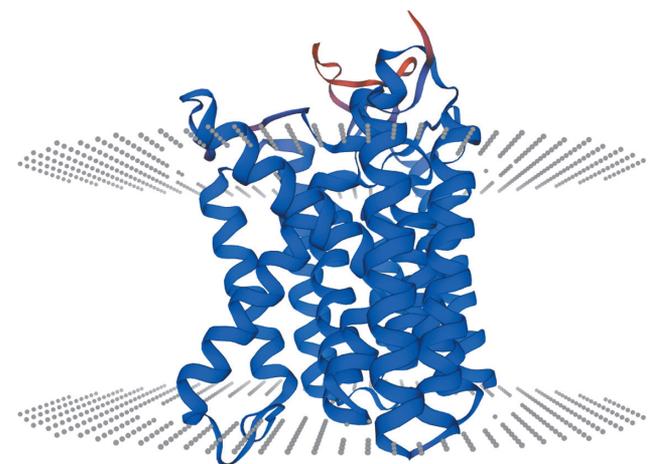


图3 WbpL 蛋白的三级结构预测  
Fig.3 Prediction of tertiary structure of WbpL protein

**1.4 亲、疏水性** 采用 ProtScale 软件中 Hydro-path./Kyte & Doolittle 分析方法预测 WbpL 蛋白具有两亲性, 其中疏水性区域主要位于 5-34, 45-68, 71-89, 103-117, 130-198, 215-255, 280-308, 310-328 位氨基酸, 亲水性区域主要位于 35-44, 256-279, 90-98 位氨基酸(图 4)。

**1.5 抗原决定簇** 根据 Predicting Antigenic Peptides 分析, WbpL 蛋白的抗原决定簇有 11 个, 分别位于 4-30、47-68、70-89、96-117、119-146、155-179、184-

200、202-208、212-249、261-272、277-327 氨基酸处(表2)(图5)。

表 2 WbpL 蛋白的抗原决定簇预测  
Table 2 Prediction of WbpL protein antigen clusters

序号 No.	开始位置 Start position	结束位置 End position	序列 Sequence
1	4	30	LLVSFFVSALLCGIGLFLLSHLLPANF
2	47	68	QIGGLALIPAILVTLAIFAPDL
3	70	89	VNMQLFLCLSGASLLLWVVG
4	96	117	ELSEIIRLGSQLLAAITVLYGL
5	119	146	PDFRLLPNLLPYWLEATLIVFALIIAN
6	155	179	DLMTVAGLVPLVGIALLGALGLTG
7	184	200	GIGAVAAGGLLGFALFN
8	202	208	PPASIFL
9	212	249	GSPPLGLIVGTALLLARET HIVVALVLPYYILDAGT
10	261	272	ILKAHSHAYQI
11	277	327	GWSVPKVVAHVALLNTILIACVVALL ALDHPLAQLTFLLVAAVATLILLLD

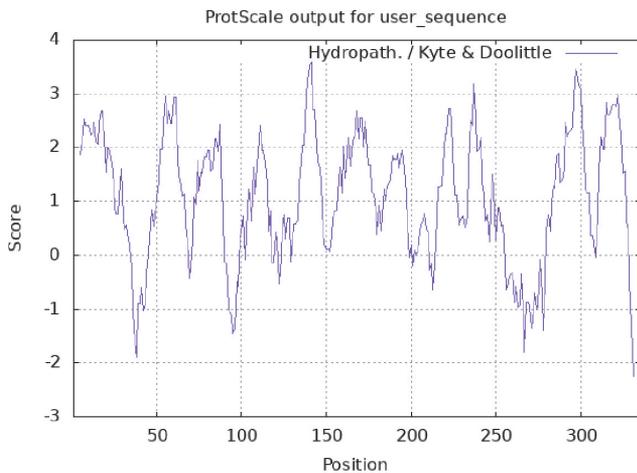


图 4 WbpL 蛋白的亲、疏水性分析  
Fig. 4 Hydrophilic and hydrophobic analysis of WbpL protein

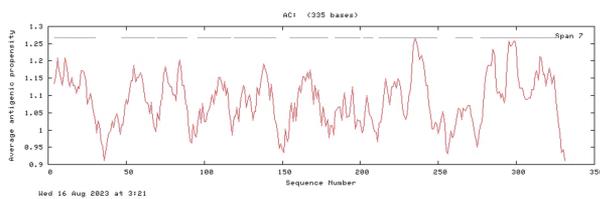


图 5 WbpL 蛋白的抗原决定簇预测  
Fig. 5 Prediction of antigenic determinant of WbpL protein

1.6 信号肽分析 通过 SignalP 5.0 对 WbpL 蛋白进行转运途径信号肽的分析预测,结果如图 6。其中 Signal peptide(Sec/SPI)分泌蛋白转运途径的信号肽预测的可能性是 0.0055, TAT signal peptide(Tat/SPD)双一精氨酸转运途径的信号肽的可能性是 0.001, Lipoprotein signal peptide(Sec/SPII)脂蛋白信

号肽的可能性是 0.0285。因此确定 WbpL 蛋白不存在信号肽。

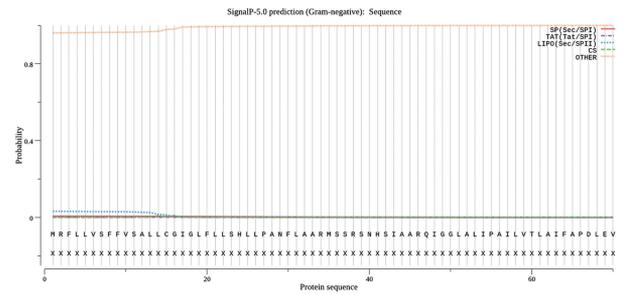


图 6 WbpL 蛋白的信号肽预测  
Fig. 6 Signal peptide prediction of WbpL protein

1.7 跨膜区 使用 DeepTMHMM 预测 WbpL 蛋白存在 11 个跨膜区域,分别位于 6-26、48-65、72-92、100-117、131-148、156-175、180-200、207-227、233-252、283-303、308-328 氨基酸(图 7)。

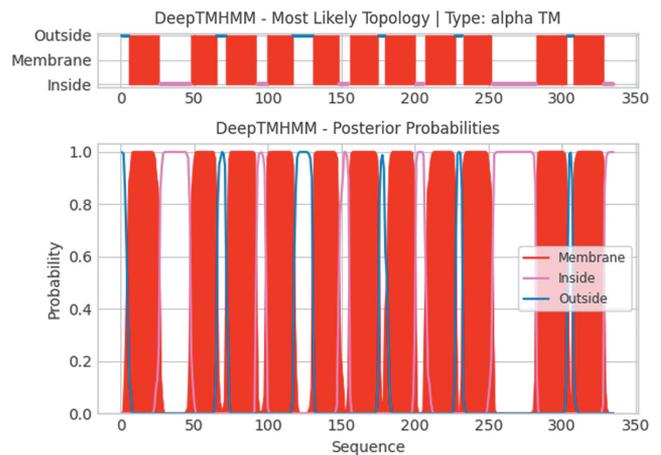


图 7 WbpL 蛋白的跨膜区预测  
Fig. 7 Prediction of the transmembrane region of WbpL protein

1.8 结构域 Prosite Scan 分析 WbpL 蛋白包含 2 个 N-糖基化位点(58-61 NLSV, 240-243NVSV), 1 个蛋白激酶 C 磷酸化作用位点(36-38 SSR), 4 个 N-豆蔻酰基化位点(179-184 GLTSSG, 186-191 GA-VAAG, 191-196 GLLGF, 217-222 GLIVGT), 以及 2 个亮氨酸拉链结构(294-315 LIACVVALLALDH-PLAQLTFL, 301-322 LLALDHPLAQLTFLLVAAVATL)。

1.9 细胞亚定位 使用 PSORTb 对 WbpL 蛋白的亚细胞定位进行预测,结果发现, WbpL 蛋白位于细胞质膜(Cytoplasmic Membrane)的得分为 10.00 分,其余位置得分为零,表明 WbpL 蛋白定位在细胞质膜上。

1.10 互作蛋白 利用 STRING 数据库预测分析 WbpL(BAB1\_0535)的互作蛋白,结果如图 8 所示,与 WbpL 蛋白发生相互作用的蛋白包括 MurC、MurD、MurE、MurF、MurG 和 FtsW。

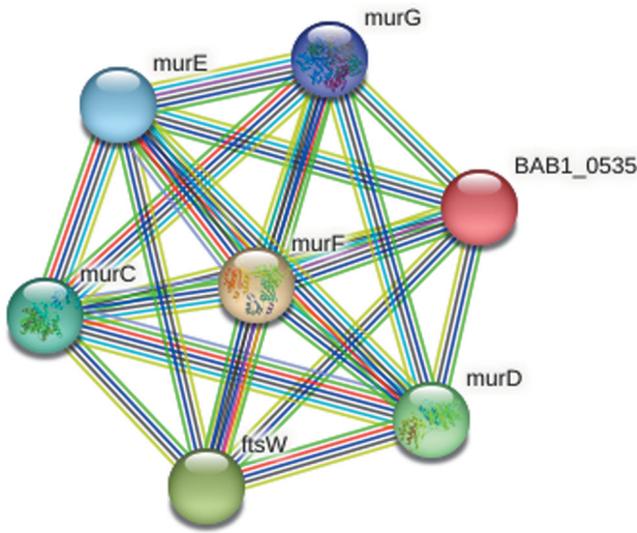


图 8 WbpL 蛋白的互作蛋白分析  
Fig. 8 Interaction protein analysis of WbpL protein

## 2 重组表达质粒 pMAL-c5x-wbpL 的构建及鉴定

对重组载体 pMAL-c5x-wbpL 进行 SacI/BamHI 双酶切,得到 1 000 bp 左右的目的片段(图 9),与理论值相符;对重组质粒测序,测序结果与 GenBank 中序列一致。表明重组质粒 pMAL-c5x-wbpL 构建正确。

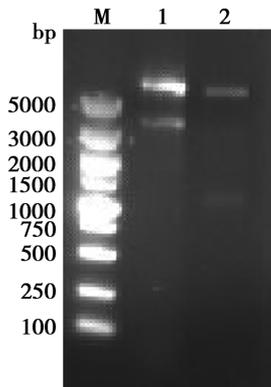


图 9 重组表达质粒 pMAL-c5x-wbpL 的构建及鉴定  
M DNA 标志物 (DL5000) 1 pMAL-c5x 质粒对照 2 pMAL-c5x-wbpL 质粒 SacI/BamHI 双酶切

## 3 融合蛋白 WbpL 的表达鉴定及纯化

pMAL-c5x-wbpL 质粒转化入 DE3 后经 IPTG 诱导 16 h,超声破碎后进行 SDS-PAGE 电泳,结果显示在上清和沉淀中均检测到 WbpL 蛋白,其分子量约为 60 ku(图 10),小于理论值 76 ku。

图 10 融合蛋白 WbpL 的表达鉴定及纯化  
M Protein molecular quality standards 1 pMAL-c5x-wbpL was not induced 2 DE3 empty bacteria control 3 pMAL-c5x empty vector control 4 Total protein of pMAL-c5x-wbpL was induced by IPTG at 18 °C for 16 h 5 Supernatant of pMAL-c5x-wbpL was induced by IPTG at 18 °C for 16 h 6 Ultrasonic precipitation of pMAL-c5x-wbpL was induced by IPTG at 18 °C for 16 h B SDS-PAGE analysis of purified recombinant protein M Protein molecular quality standards 1 Purified recombinant protein

## 4 WbpL 蛋白的促细胞凋亡作用

将 WbpL 蛋白按不同浓度梯度处理 RAW264.7 细胞 24 h 后进行细胞凋亡检测。结果如图 11。0、0.1、10、1 000 nmol/L WbpL 蛋白组的细胞凋亡率分

别为 (2.93 ± 0.85)%、(2.01 ± 0.47)%、(9.92 ± 0.71)% 和 (18.05 ± 0.92)% ,即随着 WbpL 蛋白浓度的增加以及作用时间的延长,对细胞凋亡的促进作用也随之增强。其中,10 nmol/L 和 1 000 nmol/L 组细胞凋亡率与其它组比较差异均有统计学意义 (均  $P < 0.01$ );1 000 nmol/L 组与 10 nmol/L 组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ );0.1 nmol/L 组与 0 nmol/L 组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

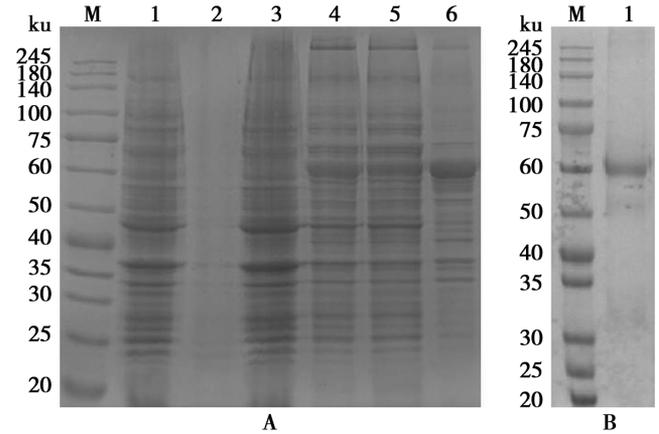


图 11 流式检测 WbpL 蛋白的促细胞凋亡作用  
A 融合蛋白 WbpL 的表达鉴定 M 蛋白分子质量标准 1 pMAL-c5x-wbpL 未诱导 2 DE3 空菌对照 3 pMAL-c5x 空载对照 4 18 °C、IPTG 诱导 pMAL-c5x-wbpL 16 h 总蛋白 5 18 °C、IPTG 诱导 pMAL-c5x-wbpL 16 h 上清 6 18 °C、IPTG 诱导 pMAL-c5x-wbpL 16 h 超声破碎沉淀 B 纯化重组蛋白的 SDS-PAGE 分析 M 蛋白分子质量标准 1 纯化的重组蛋白。

## 讨论

本研究利用表达载体 pMAL-c5x 对 wbpL 基因进行原核表达,重组表达菌株 pMAL-c5x-wbpL/DE3 在不同的温度下经 IPTG 诱导后表达约 60 ku 的目的蛋白,比理论值偏小,推测是由于 WbpL 蛋白中含有

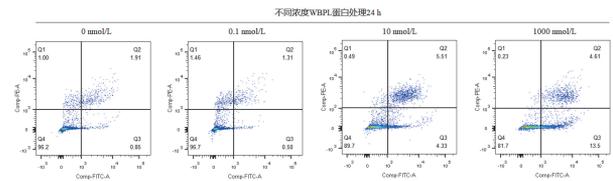


图 11 流式检测 WbpL 蛋白的促细胞凋亡作用  
Fig. 11 Flow cytometric analysis of WbpL protein in promoting apoptosis

的疏水氨基酸残基较多,疏水氨基酸残基与带负电的 SDS 结合,负电荷增多使蛋白质在电场中移动加快导致蛋白分子质量比理论值偏小。

疫苗免疫是布鲁氏菌防控的关键手段,我国使用较多的疫苗 S2 和 A19 株免疫效果良好<sup>[12]</sup>,可显著降低母畜流产率,减少经济损失<sup>[13]</sup>。但这两株疫苗均为光滑型疫苗株,可诱导机体产生高水平的抗体,干扰血清学检测,为布鲁氏菌防控带来困扰<sup>[14]</sup>。将牛种强毒株 2308 在抗生素培养基中连续传代致弱成粗糙型菌株 RB51 作为疫苗,不会诱导机体产生抗 O-侧链的抗体,不干扰血清学诊断<sup>[15]</sup>。基因组分析发现 RB51 的糖基转移酶基因 *wboA* 发生突变,导致细菌脂多糖合成受阻,细菌从光滑型突变成粗糙型。此外,*wbk-*、*manA-*、*manB-*等多种基因簇参与合成运输布鲁氏菌脂多糖<sup>[16-18]</sup>。本实验利用在线软件对 WbpL 蛋白的生物信息进行预测分析,结果发现,WbpL 蛋白二级结构以  $\alpha$ -螺旋为主,占 64.18%。具有 11 个抗原决定簇,存在 11 个跨膜区域但无信号肽,表明该蛋白作为抗原可以引起宿主良好的免疫反应。

布鲁氏菌的毒力作用和慢性感染被认为是能逃避宿主细胞的杀伤机制并能在宿主细胞中存活导致的<sup>[19]</sup>,并通过布氏小体营造独特的胞内存活酸性环境,从而调控布鲁氏菌逃避细胞内溶酶体的降解<sup>[20-21]</sup>。脂多糖的 O 抗原多糖在布鲁氏菌侵入细胞时与脂筏相互作用促进布氏小体逃避溶酶体的融合,而含有不表达 O 抗原多糖的粗糙突变体的吞噬小体能迅速与溶酶体融合。因此,脂多糖的 O 抗原多糖链可能是控制细菌在细胞内早期活动的主要因素<sup>[22]</sup>。脂多糖的 O 抗原多糖可抑制细胞吞噬、溶酶体溶解及宿主细胞凋亡<sup>[23]</sup>。布鲁氏菌 O 抗原多糖缺失会导致光滑型转变为粗糙型,从而降低对宿主的毒力作用,更易于被宿主细胞杀死<sup>[24-25]</sup>。

细胞凋亡是基因控制的细胞程序性死亡<sup>[26]</sup>。内质网应激能增强非折叠蛋白反应,是诱导细胞凋亡的主要通路,在蛋白糖基化作用和专有伴侣分子的辅助下维持细胞内环境稳定。但强烈或持续的内质网应激会使细胞无法维持内环境稳定,引起 C/EBP 同源蛋白和半胱氨酸蛋白酶-3 的表达,诱导内质网应激介导的细胞凋亡<sup>[27-28]</sup>。布鲁氏菌在内质网能够激活适度的应激,抑制 CHOP 诱导的细胞凋亡,以利细菌在细胞内的增殖<sup>[6-7]</sup>。效应蛋白 BspJ 作为核调节蛋白抑制巨噬细胞的凋亡<sup>[31]</sup>。在小鼠模型中,VceC 诱导胎盘滋养层细胞产生炎症因子,并导致宿主细胞发生凋亡<sup>[32]</sup>。外膜蛋白 OMP31 能抑制 TNF- $\alpha$  诱导的巨噬细胞凋亡<sup>[33]</sup>。关于布鲁氏菌脂多糖与细胞凋亡的关系尚不十分清楚,本研究显示低浓度的 WbpL 蛋白对 RAW264.7 细胞凋亡无显著影响,而高浓度的 WbpL

蛋白促进细胞凋亡。推测高浓度的 WbpL 蛋白通过激活内质网通路而促进细胞凋亡,即 WbpL 蛋白诱导的细胞凋亡与其浓度相关。

#### 【参考文献】

- [1] Tuon FF, Gondolfo RB, Cerchiarri N. Human-to-human transmission of *Brucella* - a systematic review[J]. Trop Med Int Health, 2017, 22(5): 539-546.
- [2] Roop RM, Bellaire BH, Valderas MW, et al. Adaptation of the *Brucellae* to their intracellular niche[J]. Mol Microbiol, 2004, 52(3): 621-630.
- [3] Delpino MV, Barrionuevo P, Scian R, et al. *Brucella*-infected hepatocytes mediate potentially tissue-damaging immune responses [J]. J Hepatol, 2010, 53(1): 145-154.
- [4] de Figueiredo P, Ficht TA, Rice-Ficht A, et al. Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of *Brucella*-host interactions [J]. Am J Pathol. 2015, 185(6): 1505-1517.
- [5] Liang L, Tan X, Juarez S, et al. Systems biology approach predicts antibody signature associated with *Brucella melitensis* infection in humans [J]. J Proteome Res, 2011, 10(10): 4813-4824.
- [6] Mohamed Zahidi J, Bee Yong T, Hashim R, et al. Identification of *Brucella spp.* isolated from human brucellosis in Malaysia using high-resolution melt (HRM) analysis [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2015, 81(4): 227-233.
- [7] Nicoletti P. Brucellosis: past, present and future [J]. Prilozi, 2010, 31(1): 21-32.
- [8] 王真, HAN G, 吴清民. 动物布鲁氏菌病疫苗的来历及亚单位疫苗的研究概况 [J]. 中国农业大学学报, 2014, 19(3): 169-174.
- [9] Piao D, Wang H, Di D, et al. MLVA and LPS Characteristics of *Brucella canis* Isolated from Humans and Dogs in Zhejiang, China [J]. Front Vet Sci, 2017, 4: 223.
- [10] Koyuncu I, Kocyigit A, Ozer A, et al. Diagnostic potential of *Brucella melitensis* Rev1 native Omp28 precursor in human brucellosis [J]. Cent Eur J Immunol, 2018, 43(1): 81-89.
- [11] Lalsiamthara J, Won G, Lee JH. Effect of immunization routes and protective efficacy of *Brucella* antigens delivered via *Salmonella* vector vaccine [J]. J Vet Sci. 2018, 19(3): 416-425.
- [12] Zhu L, Feng Y, Zhang G, et al. *Brucella suis* strain 2 vaccine is safe and protective against heterologous *Brucella spp.* infections [J]. Vaccine, 2016, 34(3): 395-400.
- [13] 刘志国, 王妙, 崔步云, 等. 布鲁氏菌胞内存活及疫苗研究进展 [J]. 中国人兽共患病学报. 2019, 35(5): 430-439.
- [14] 丁家波, 冯忠武. 动物布鲁氏菌病疫苗应用现状及研究进展 [J]. 生命科学. 2013(1): 91-99.
- [15] Dabral N, Jain-Gupta N, Seleem MN, et al. Overexpression of *Brucella* putative glycosyltransferase WbkA in *B. abortus* RB51 leads to production of exopolysaccharide [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2015, 5: 54.
- [16] Fontana C, Conde-Alvarez R, Stahle J, et al. Structural studies of lipopolysaccharide-defective mutants from *Brucella melitensis* identify a core oligosaccharide critical in virulence [J]. J Biol Chem, 2016, 291(14): 7727-7741.

(下转 1189 页)

- 杂志,2021,16(1):90-93.
- [12] 查俊,李艳,王鑫怡,等. 基于 EIT 的整体不均匀性指数对颅脑创伤患者术后肺部感染的预测价值[J]. 中华急诊医学杂志,2022,31(12):1642-1647.
- [13] 杨智晖,赵宇博,许倩,等. 经鼻高流量湿化氧疗治疗对支气管扩张合并感染患者肺功能指标及血清 IL-6、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  的影响[J]. 分子诊断与治疗杂志,2023,15(3):477-480,488.
- [14] 白培钿,裴婷,孔佳美,等. 复合微生态制剂对小鼠肠道免疫功能的影响[J]. 中国实验动物学报,2022,30(2):245-252.
- [15] 肖朗,胡清亮,冯秀莉,等. 肺结核合并肺部细菌感染 S100A9 与 IL-34 和 IFN- $\gamma$  水平及其诊断价值[J]. 中华医院感染学杂志,2023,33(4):494-497.
- [16] 刘燕,宋映星,王丹阳,等. 外周血 CD8<sup>+</sup> CD28-T 细胞 Foxp3 mRNA 表达与老年肺部感染的关系[J]. 中华医院感染学杂志,2022,32(7):971-975.
- [17] 胡灿芳,罗国君,唐春雷,等. 老年脑卒中后认知功能障碍合并肺部感染患者病原菌分布、炎症因子水平变化及危险因素分析[J]. 临床军医杂志,2021,49(1):81-82.
- [18] Zheng F. Pathogenic characteristics of pulmonary infection in hospitalized patients with chronic heart failure and diagnostic value of sTREM-1, sCD163, and sTWEAK[J]. Pak J Med Sci, 2022,38(3Part-D):536-541.
- [19] 吴小伟,严加高,李陶,等. 肺癌术后肺部感染患者血浆 sTREM-1、sCD163 与 PCT 水平与疗效的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志,2021,13(8):1209-1213.
- [20] 赵鲁新,全冰云,姜宁. 肺炎患儿血清 sTREM-1、sCD163、SP-A、LP(a)的变化及其意义[J]. 四川医学,2019,40(1):75-78.
- 【收稿日期】 2023-05-04 【修回日期】 2023-07-26

(上接 1184 页)

- [17] Salvador-Bescos M, Gil-Ramirez Y, Zuniga-Ripa A, et al. WadD, a New *Brucella* lipopolysaccharide core glycosyltransferase identified by genomic search and phenotypic characterization[J]. Front Microbiol, 2018, 9:2293.
- [18] Zygmunt MS, Blasco JM, Letesson JJ, et al. DNA polymorphism analysis of *Brucella* lipopolysaccharide genes reveals marked differences in O-polysaccharide biosynthetic genes between smooth and rough *Brucella* species and novel species-specific markers[J]. BMC Microbiol, 2009, 9:92.
- [19] Terwagne M, Ferooz J, Rolan HG, et al. Innate immune recognition of flagellin limits systemic persistence of *Brucella* [J]. Cell Microbiol, 2013, 15(6):942-960.
- [20] Ke Y, Wang Y, Li W, et al. Type IV secretion system of *Brucella* spp. and its effectors[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2015, 5:72.
- [21] 王浩,陈创夫,车召堂,等. AIR 在羊种布鲁氏菌 16M 诱导的非典型自噬中的研究[J]. 中国病原生物学杂志,2015,10(2):118-123,187.
- [22] Cardoso PG, Macedo GC, Azevedo V, et al. *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system[J]. Microbial Cell Fact, 2006, 5:13.
- [23] Fernandez-prada CM, Zelazowska EB, Nikolich M, et al. Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: bacterial surface O-polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis[J]. Infect Immun, 2003, 71:2110-2119.
- [24] Haag AF, Myka KK, Arnold MF, et al. Importance of Lipopolysaccharide and Cyclic  $\beta$ -1,2-glucans in *Brucella*-mammalian infections[J]. Int J Microbiol, 2010, 2010:124509.
- [25] Lapaque N, Forquet F, De chastellier C, et al. Characterization of *Brucella abortus* lipopolysaccharide macrodomains as megarafts [J]. Cell Microbiol, 2010, 8(2):197-206.
- [26] Griffioen AW, Nowak-Sliwinska P. A quarter century of Apoptosis[J]. Apoptosis, 2021, 26(5-6):233-234.
- [27] Lu X, Li C, Li C, et al. Heat-labile enterotoxin-induced PERK-CHOP pathway activation causes intestinal epithelial cell apoptosis[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 7:244.
- [28] Gupta MK, Tahir FG, Knezevic T, et al. GRP78 interacting partner Bag5 responds to ER stress and protects cardiomyocytes from ER stress-induced apoptosis[J]. J Cell Biochem, 2016, 117(8):1813-1821.
- [29] Zhi F, Zhou D, Bai F, et al. VceC mediated IRE1 pathway and inhibited CHOP-induced apoptosis to support *Brucella* replication in goat trophoblast cells[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(17):4104.
- [30] 杨琴,邓肖玉,谢珊珊,等. 牛种布鲁氏菌 IV 型分泌系统对巨噬细胞内质网应激和细胞凋亡的影响[J]. 畜牧兽医学报. 2022, 53(4):1192-1200.
- [31] Ma Z, Li R, Hu R, et al. *Brucella abortus* BspJ is a nucleomodulin that inhibits macrophage apoptosis and promotes intracellular survival of *Brucella* [J]. Front Microbiol, 2020, 11:599205.
- [32] Liu X, Yang M, Song S, et al. *Brucella melitensis* in Asian Badgers, Northwestern China[J]. Emerg Infect Dis, 2020, 26(4):804-806.
- [33] Zhang K, Wang H, Guo F, et al. OMP31 of *Brucella melitensis* 16M impairs the apoptosis of macrophages triggered by TNF- $\alpha$  [J]. Exp Ther Med, 2016, 12(4):2783-2789.
- 【收稿日期】 2023-05-08 【修回日期】 2023-08-03