

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.001807

锌离子依赖的金属蛋白酶-1 体内抑制分枝杆菌的抗原处理

吴宣艳,李 鹏,卢 楠,方陈城,杨 春,何永林

(重庆医科大学基础医学院分子医学与肿瘤研究中心、病原生物学教研室,重庆 400016)

【摘要】目的:在小鼠体内观察卡介苗的锌离子依赖的金属蛋白酶-1(Zinc metalloprotease-1,Zmp1)对结核分枝杆菌抗原 PPE68 处理的影响。**方法:**6~8 周龄 BALB/c 小鼠随机分为 5 组,分别为 pBudCE4.1 空质粒对照组($n=7$)、表达 PPE68 抗原肽的 pBudCE4.1-PPE68p 质粒组($n=9$)、表达 PPE68 抗原的 pBudCE4.1-PPE68 质粒组($n=9$)、PPE68 抗原和 Zmp1 共表达的 pBudCE4.1-PPE68-Zmp1 质粒组($n=10$)及 PPE68 抗原肽和 Zmp1 共表达的 pBudCE4.1-PPE68p-Zmp1 质粒组($n=8$)。各组质粒电转化减毒沙门菌株 SL7207 构建相应的重组沙门菌。以灌胃方式将各组沙门菌免疫小鼠 3 周。收集小鼠血液和肺肠灌洗液,采用 ELISA 法测定血清中 IFN- γ 、IL-12 含量及肺与肠道 sIgA 的含量;分离培养脾细胞,用 CCK-8 法检测脾淋巴细胞增殖情况。**结果:**与 PPE68 抗原组相比,PPE68 和 Zmp1 共表达组的 IFN- γ (117.29 ± 16.86 , $P=0.034$)、IL-12(40.46 ± 7.11 , $P=0.0037$)、淋巴细胞刺激指数 SI(3.30 ± 0.49 , $P=0.004$)均降低;与 PPE68 抗原肽组相比,PPE68 抗原肽和 Zmp1 共表达组相应因子含量下降不明显,IFN- γ (132.75 ± 28.40 , $P=0.070$)、IL-12(55.43 ± 11.78 , $P=0.198$)、SI(4.70 ± 1.57 , $P=0.124$)。**结论:**卡介苗的 Zmp1 影响结核分枝杆菌抗原 PPE68 的处理过程,这可能是影响 BCG 免疫效果的重要原因。

【关键词】卡介苗;PPE68;锌离子依赖的金属蛋白酶-1;抗原处理**【中图分类号】**R378.91*1;R392-33;R521**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-03-20**作者介绍:**吴宣艳,Email:wxy565143@foxmail.com,

研究方向:微生物的感染与免疫。

通信作者:何永林,Email:heyonglinhly@163.com。**基金项目:**重庆市自然科学基金资助项目(编号: cstc2016jcyjA0196, cstc2012jjA10023);重庆市教委资助项目(编号: KJ1500203)。**优先出版:** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180704.1015.010.html>
(2018-07-05)

- [23] Gangemi S, Merendino RA, Guarneri F, et al. Serum levels of interleukin-18 and s-ICAM-1 in patients affected by psoriasis: preliminary considerations[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2003, 17(1): 42-46.
- [24] Rasmy H, Mikhael N, Ismail S. Interleukin-18 expression and the response to treatment in patients with psoriasis[J]. Arch Med Sci, 2011, 7(4): 713-719.
- [25] Yawalkar N, Karlen S, Hunger R, et al. Expression of interleukin-12 is increased in psoriatic skin[J]. J Invest Dermatol, 1998, 111(6): 1053-1057.
- [26] Novick D, Schwartsburd B, Pinkus R, et al. A novel IL-18BP ELISA shows elevated serum IL-18BP in sepsis and extensive decrease of free IL-18[J]. Cytokine, 2001, 14(6): 334-342.
- [27] Veenstra KG, Jonak ZL, Trulli S, et al. IL-12 induces monocyte IL-18 binding protein expression via IFN- γ [J]. J Immunol, 2002, 168(5): 2282-2287.
- [28] Carbotti G, Barisione G, Orengo AM, et al. The IL-18 antagonist IL-18-binding protein is produced in the human ovarian cancer microenvironment[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(17): 4611-4620.
- [29] Corbaz A, ten Hove T, Herren S, et al. IL-18-binding protein expression by endothelial cells and macrophages is up-regulated dur-

ing active Crohn's disease[J]. J Immunol, 2002, 168(7): 3608-3616.

[30] Nowarski R, Jackson R, Gagliani N, et al. Epithelial IL-18 equilibrium controls barrier function in colitis[J]. Cell, 2015, 163(6): 1444-1456.

[31] Kim SH, Eisenstein M, Reznikov L, et al. Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(3): 1190-1195.

[32] Wang J, Zhang H, Zheng W, et al. Correlation of IL-18 with Tryptase in Atopic Asthma and Induction of Mast Cell Accumulation by IL-18[J]. Mediators Inflamm, 2016, 2016: 4743176.

[33] Marotte H, Tsou PS, Rabquer BJ, et al. Blocking of interferon regulatory factor 1 reduces tumor necrosis factor α -induced interleukin-18 bioactivity in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by induction of interleukin-18 binding protein a; role of the nuclear interferon regulatory factor 1-NF- κ B-c-jun complex[J]. Arthritis Rheum, 2011, 63(11): 3253-3262.

[34] Mallat Z, Heymes C, Cogeat D, et al. Evidence for altered interleukin 18(IL)-18 pathway in human heart failure[J]. FASEB J, 2004, 18(14): 1752-1754.

(责任编辑:张辉洁)

Zinc metalloprotease-1 from *Bacillus Calmette-Guerin* inhibits the processing of mycobacterial antigen *in vivo*

Wu Xuanyan, Li Peng, Lu Nan, Fang Chencheng, Yang Chun, He Yonglin

(Center for Molecular and Tumor Research, Teaching and Research Section of Pathogenic Biology, School of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Zinc metalloprotease-1 (Zmp1) from *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) on processing *Mycobacterium tuberculosis* antigen PPE68 in mouse *in vivo*. **Methods:** BALB/c mice of 6 to 8 weeks were randomly divided into five groups: plasmid pBudCE4.1 control group ($n=7$), plasmid pBudCE4.1-PPE68p group expressing PPE68 peptide ($n=9$), plasmid pBudCE4.1-PPE68 group expressing PPE68 antigen ($n=9$), plasmid pBudCE4.1-PPE68-Zmp1 group co-expressing PPE68 antigen and Zmp1 ($n=10$), and plasmid pBudCE4.1-PPE68p-Zmp1 group co-expressing PPE68 antigen and Zmp1 ($n=8$). Recombinant *Salmonella* was constructed through the electrotransformation of these plasmids to attenuated *Salmonella* strain SL7207. All mice were immunized with corresponding recombinant *Salmonella* for three weeks via gavage. Mice blood and douche fluid of lung and small intestine were collected and ELISA was used to analyze the level of IL-12, IFN- γ and secretory IgA (sIgA). Mice splenocytes were separately cultivated and CCK8 was used to analyze the proliferation of splenic lymphocytes. **Results:** Compared with those of the PPE68 antigen group, levels of IFN- γ (117.29 ± 16.86 , $P=0.034$), IL-12 (40.46 ± 7.11 , $P=0.004$), and lymphocyte stimulation index (SI) (3.30 ± 0.49 , $P=0.004$) were decreased in co-expressing group of PPE68 and Zmp1. Compared with those of the PPE68 peptide group, levels of IFN- γ (132.75 ± 28.40 , $P=0.070$), IL-12 (55.43 ± 11.78 , $P=0.198$), and SI (4.70 ± 1.57 , $P=0.124$) were not significantly decreased in co-expressing group of PPE68 peptide and Zmp1. **Conclusion:** Zmp1 from BCG may have effects on the processing of *Mycobacterium tuberculosis* antigen PPE68 in mouse *in vivo*, which may be an important factor influencing BCG immune.

[Key words] *Bacillus Calmette-Guerin*; PPE68; Zinc metalloprotease-1; antigen processing

当前,结核病疫情尚未得到有效控制,每年均有较高的发病率与死亡率^[1]。结核病疫情尚未得到有效控制的一个重要原因是卡介苗疫苗(*Bacillus Calmette-Guerin*, BCG)的免疫效果并不十分理想^[2],其具体影响机制仍不完全清楚。部分研究者认为抗原缺失是 BCG 效果欠佳的重要原因^[3],然而将缺失基因导入 BCG,并不能完全改善 BCG 的免疫效果,说明尚有其他不明机制影响 BCG 的免疫效果^[4]。锌离子依赖的金属蛋白酶-1(Zinc metalloprotease-1, Zmp1)是结核分枝杆菌重要的毒力因子^[5-7]。它不但影响所寄居的巨噬细胞增殖与凋亡,而且影响结核分枝杆菌的细胞内生存与扩散^[8-10]。删除 Zmp1 编码基因,不但使结核分枝杆菌的毒力减弱,而且明显改善卡介苗的免疫保护效果^[11],这提示 Zmp1 是影响卡介苗免疫效果的一个重要分子。Master 等^[12]研究表明, Zmp1 的作用机制与炎性体活化、吞噬溶酶体的形成密切相关。Johansen 等^[13]的研究提示 Zmp1 可辅助分枝杆菌进行免疫逃逸,其机制可能与分枝杆菌抗原的处理和 MHC 递呈密切相关。但 Zmp1 对分枝杆菌抗原分子的消化降解处理,抗原肽形成具

体影响机制尚不清楚。本研究中,以沙门菌作为载体口服免疫,将共表达结核分枝杆菌抗原 PPE68 和 ZMP1 的质粒导入小鼠体内,观察 ZMP1 对 PPE68 抗原诱发的免疫功能的影响,旨在明确 ZMP1 是否通过干扰抗原在吞噬细胞内的消化处理来影响 BCG 免疫效果的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株、细胞株及实验动物 pBudCE4.1 质粒、pBudCE4.1-PPE68 质粒、Top10 菌株、减毒沙门菌 SL7207、RAW264.7 细胞均由本实验室保存。6~8 周龄、18~22 g SPF 级雄性 BALB/c 小鼠购自重庆医科大学实验动物中心。

1.1.2 主要试剂 高保真酶 Primer star、DL10000 DNA Marker、限制性内切酶 *Hind* III、*Bam* H I、*Bgl* II、*Kpn* I 及质粒小提试剂盒和胶回收试剂盒均购自 Takara 公司;RPMI1640 培养基和胎牛血清购自 Hyclone 公司;Cell Counting Kit-8 (CCK8 试剂盒)购自 DoJinDo 公司;转染试剂 Lipofectamine™ 2000 Reagent 购自 Invitrogen 公司;淋巴细胞分离液购自达科为公司;IFN- γ 、IL-12、sIgA ELISA 试剂盒购自 Cloud-clone 公司。

本实验使用的 DNA 序列及引物序列见表 1。

表 1 DNA 序列与引物序列

编号	序列
S1	5'-AGCTGCCACCATGGaccaactcttcggtatcaacagatcccgatcggtgaccgagTAA-3'
S2	5'-GATCAATctcgtcaacgcatcggtggtgataccgaagaattggCATGGTGGC-3'
P1	5'-TATGTTACC GTGACACTTGCCATCCCCCTC-3'
P2	5'-TAAAGATCT GTTCCAGATCCGACCCCTG-3'
P3	5'-CCACCATGACCAACTTCTTC-3'
P4	5'-CTCACCGCGCGACGTCGC-3'
P5	5'-GGGATGGCAGACGCTTTCGG-3'
P6	5'-GGTTCGTCGTCTCTGGCTC-3'
P7	5'-ACGGGGGCGAGAGCCGTGAC-3'
P8	5'-CCAGTCTTCAACGTTAACGC-3'
P9	5'-AACTCCATCATGAAGTGTGAC-3'
P10	5'-TAACGCAACTAAGTCATAGTC-3'

1.2 方法

1.2.1 PPE68 抗原及 PPE68 抗原肽真核表达质粒的构建 从结核分枝杆菌中 PCR 扩增的 PPE68 基因片段,经 *Hind* III 和 *Sal* I 双酶切定向克隆入质粒 pBudCE4.1 的巨细胞病毒启动子(Pcmv)下游的多克隆位点,构建表达 PPE68 抗原的真核表达质粒 pBudCE4.1-PPE68,该质粒由实验室构建保存,在真核细胞内的表达已鉴定^[14]。根据 Christy^[15]提供的 PPE68 抗原肽的编码序列(表 1 序列 S1 小写字母)添加 KOZAK 序列,起始密码及终止密码,序列两端插入 *Hind* III 和 *Bam* H I 的黏末端,序列交由武汉擎科公司合成。合成的序列 S1、S2 经 95 °C、30 s,72 °C、2 min,37 °C、3 min,25 °C、2 min 退火形成双链后,定向克隆入质粒 pBudCE4.1 的巨细胞病毒

启动子(Pcmv)下游的多克隆位点构建表达 PPE68 抗原肽的真核表达质粒 pBudCE4.1-PPE68p。

1.2.2 共表达质粒的构建 BCG 全基因组为模板,P1、P2 为引物(斜体为 *Kpn* I 和 *Bgl* II 酶切位点)PCR 法扩增 *zmp* 1 基因片段,1%琼脂糖凝胶电泳回收纯化 PCR 产物,根据胶回收试剂盒说明书进行回收、纯化大小约 1 992 bp 的特异性 PCR 产物。将 pBudCE4.1-PPE68p 质粒、pBudCE4.1-PPE68 质粒和 *zmp* 1 片段分别经 *Bgl* II 和 *Kpn* I 双酶切,将 *zmp* 1 基因插入 pBudCE4.1-PPE68 肽和 pBudCE4.1-PPE68 质粒上另一多克隆位点,构建 pBudCE4.1-PPE68p-Zmp1 和 pBudCE4.1-PPE68-Zmp1 质粒。采用氯化钙转化法将重组质粒转化至大肠杆菌 Top10 株,在含 40 μg/mL Zeocin 抗生素的低盐 LB 培养基上筛选。阳性菌落经菌落 PCR、质粒双酶切初步鉴定正确后,再将重组质粒送武汉擎科创新生物科技有限公司进行核酸 DNA 测序最终鉴定。pBudCE4.1-PPE68p-Zmp1 和 pBudCE4.1-PPE68-Zmp1 质粒的构建流程如图 1 所示。

1.2.3 含 *zmp* 1 基因的重组质粒在 RAW264.7 细胞中表达 在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液中 37 °C、5%CO₂ 常规培养小鼠巨噬细胞 RAW264.7。按照细胞转染试剂 Lipofectamine™ 2000 Reagent 操作说明和步骤,将重组质粒转染 RAW264.7 细胞。转染 24 h 后,按照 RNeasy pure Cell/Bacteria Kit 说明书提取 RAW264.7 细胞总 RNA;按照 TaKaRa PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 说明书逆转录合成 cDNA。q-PCR 扩增 *zmp* 1 基因上、下游引物(P7、P8)和 β-Actin 上、下游引物(P9、P10)。

1.2.4 含重组质粒的减毒沙门菌的构建及鉴定 将 pBudCE4.1、pBudCE4.1-PPE68p、pBudCE4.1-PPE68、pBudCE4.1-

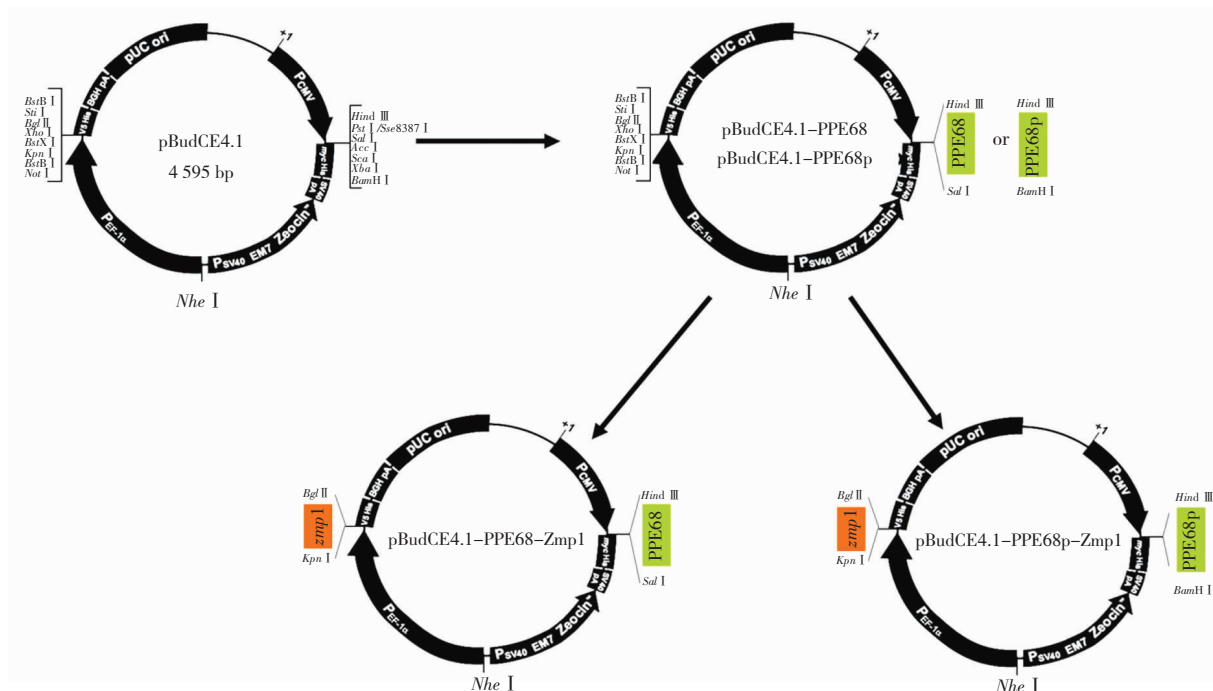


图 1 重组质粒的构建示意图

PPE68p-Zmp1、pBudCE4.1-PPE68-Zmp1 分别电转入减毒沙门菌 SL7207 中,电转条件(2.5 kV、2 ms 电击 1 次),在含 40 mg/L Zeocin 的 LB 固体培养基筛选,37 °C 培养;挑取阳性菌落,接种到 LB(40 mg/L Zeocin)液体培养基中 37 °C、180 r/min 增菌。根据 PPE68、PPE68 抗原肽和 pBudCE4.1 质粒框架上的基因序列设计引物(PPE68 肽编码序列的验证引物 P3P4,扩增片段 750 bp;ppe68 的验证引物 P5P6,扩增片段 475 bp),zmp1 以 P1、P2 为引物,全部经菌落 PCR 鉴定。

1.2.5 携带重组质粒的减毒沙门菌 SL7207 免疫动物 将 50 只小鼠随机分为 5 组,每组 10 只:含 pBudCE4.1 质粒的 SL7207 组、含 pBudCE4.1-PPE68p 质粒的 SL7207 组、含 pBudCE4.1-PPE68 质粒的 SL7207 组、含 pBudCE4.1-PPE68-Zmp1 质粒组 SL7207 组、含 pBudCE4.1-PPE68p-Zmp1 质粒的 SL7207 组。将对数期细菌用 PBS 调整至浓度为 1×10^{10} CFU/mL。小鼠禁水禁食 4 h 后,5%的 NaHCO₃ 0.2 mL 中和胃酸后用相应的重组沙门菌灌胃,每只小鼠灌胃 0.2 mL 制备好的细菌悬液。每周免疫 1 次,共 3 次。末次免疫后 1 周后麻醉采血、处死动物。

1.2.6 IL-12 和 IFN- γ 检测 麻醉小鼠,摘眼球取血,分离血清,采用 ELISA 法检测血清中 IL-12 和 IFN- γ 含量。

1.2.7 特异性脾淋巴细胞增殖实验 取出小鼠脾脏,置 200 目尼龙网上轻柔研磨分散淋巴细胞。 5×10^5 个细胞/mL 的脾淋巴细胞按 200 μ L 每孔加入 96 孔细胞培养板,将培养板在培养箱预培养 24 h(在 37 °C、5%CO₂ 的条件下),每孔加入 TB-PPD 蛋白衍生物 20 μ L,培养箱中培养 48 h 后,每孔加入 20 μ L CCK-8 溶液,继续培养 4 h,立即用酶标仪测定 450 nm 处吸光度(absorbance, A)值。计算刺激指数(SI=实验组 A_{450 nm}/对照组 A_{450 nm})。

1.2.8 小肠黏膜、肺及气管黏膜 sIgA 检测 剪取小肠 4 cm,剪碎后加入 400 μ L PBS 悬浮,冰上 80 r/min 振荡洗涤 15 min,4 °C 4 500 r/min 离心收集上清,ELISA 法检测上清中的 sIgA 水平。剪开小鼠胸腔取肺脏及气管,剪碎后加入 500 μ L PBS 悬浮,冰上 80 r/min 振荡洗涤 15 min,4 °C 4 500 r/min 离心收集上清,ELISA 检测上清中的 sIgA 水平。

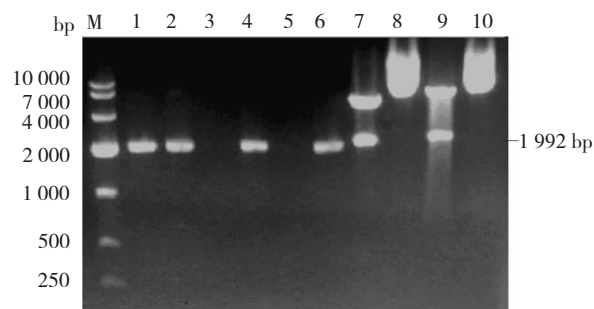
1.3 统计学分析

所有实验数据用 SPSS 11.0 软件进行统计分析,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析及 SNK- q 检验,如方差不齐,采用非参数秩和检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 PCR 扩增产物鉴定

分别以 BCG 菌全基因组 DNA、重组质粒 pBudCE4.1-PPE68p-Zmp1 和 pBudCE4.1-PPE68-Zmp1 为模板,PCR 扩增获得的 zmp1 基因片段,大小为 1 992 bp,经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离,在相应位置可见特异性条带(图 2)。



M:DL10000 DNA Marker;1 和 2:BCG 基因组扩增 zmp1 基因;3:阴性对照;4:pBudCE4.1-PPE68p-Zmp1 模板扩增 zmp1 基因;5:阴性对照;6:pBudCE4.1-PPE68-Zmp1 为模板扩增 zmp1 基因;7:pBudCE4.1-PPE68p-Zmp1 经 Bgl II 和 Kpn I 双酶切;8:pBudCE4.1-PPE68p-Zmp1 质粒;9:pBudCE4.1-PPE68-Zmp1 经 Bgl II 和 Kpn I 双酶切;10:pBudCE4.1-PPE68p-Zmp1 质粒

图 2 zmp1 基因 PCR 扩增及重组表达载体的酶切结果

2.2 重组质粒酶切鉴定

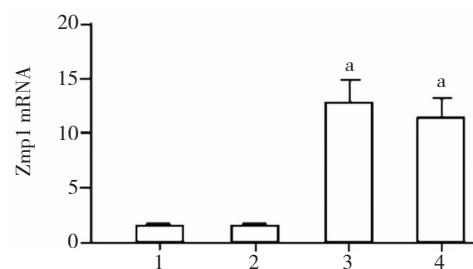
ppe68 基因大小为 1 107 bp,编码 PPE68 肽的序列大小为 45 bp,pBudCE4.1 质粒大小为 4 595 bp。重组质粒 pBudCE4.1-PPE68p-Zmp1 和 pBudCE4.1-PPE68-Zmp1 经 Bgl II 和 Kpn I 双酶切,可以获得大小约 4 700 bp 和 1 992 bp 片段以及 5 700 bp 和 1 992 bp 的小片段,该小片段大小与预期片段大小相符(图 2)。

2.3 重组质粒测序鉴定结果

重组 pBudCE4.1-PPE68 质粒为实验室构建保存,已经测序鉴定。本实验新构建的 3 个质粒 pBudCE4.1-PPE68p、pBudCE4.1-PPE68p-Zmp1 和 pBudCE4.1-PPE68-Zmp1 经核酸 DNA 测序结果显示与 GenBank 中的 ppe68(NC_000962.3)和 zmp1(CYST01000003.1)基因序列完全一致,无突变,证明重组表达质粒构建成功。

2.4 Zmp1 在 RAW264.7 细胞中的表达水平分析

转染 48 h 后,提取细胞总 RNA 并通过逆转录反应合成 cDNA,采用以 cDNA 作为模板和 β -actin 作为内参检测 Zmp1 的 mRNA 表达。结果显示,仅 pBudCE4.1-PPE68p-Zmp1 和 pBudCE4.1-PPE68-Zmp1 转染组检测到 Zmp1 表达的 mRNA($F=72.822, P=0.000$),pBudCE4.1 转染组和空白对照组(未转染)均未检测到 Zmp1 表达(图 3)。



a:与空白对照组与 pBudCE4.1 转染组比较, $P=0.000$;1:未转染的空白对照组;2:pBudCE4.1 转染组;3:pBudCE4.1-PPE68p-Zmp1 转染组;4:pBudCE4.1-PPE68-Zmp1 转染组

图 3 各组 RAW264.7 细胞中 zmp1 基因 mRNA 水平

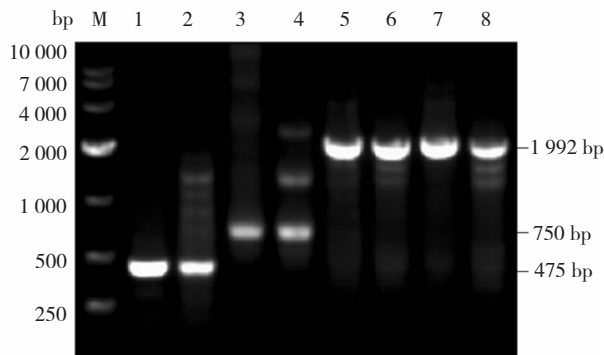
表 2 小鼠血清中 IL-12 和 IFN- γ 含量

组别	样本量	IL-12 (ng/mL)	IFN- γ (ng/mL)
pBudCE4.1	7	12.031 7 $\pm$ 3.199 5	72.481 5 $\pm$ 29.605 2
pBudCE4.1-PPE68p	9	62.500 8 $\pm$ 12.958 3	155.688 7 $\pm$ 26.533 7
pBudCE4.1-PPE68	9	51.459 3 $\pm$ 15.250 5	142.910 3 $\pm$ 25.517 2
pBudCE4.1-PPE68-Zmp1	10	40.445 0 $\pm$ 7.113 4 ^a	117.289 6 $\pm$ 16.864 1 ^b
pBudCE4.1-PPE68p-Zmp1	8	55.430 4 $\pm$ 11.779 1	132.749 1 $\pm$ 28.400 5
<i>F</i> 值		23.904	12.381
<i>P</i> 值		0.000	0.000

注:与 pBudCE4.1-PPE68 组比较,a: $P=0.004$,b: $P=0.034$

2.5 含有重组质粒的减毒沙门菌的 PCR 鉴定

分别用 pBudCE4.1-PPE68p、pBudCE4.1-PPE68、pBudCE4.1-PPE68p-Zmp1 和 pBudCE4.1-PPE68-Zmp1 质粒作为阳性对照模板,电转入质粒的沙门菌作为模板,进行菌落PCR验证。pBudCE4.1-PPE68 重组沙门菌扩增出 475 bp 特异性条带,pBudCE4.1-PPE68p 重组沙门菌扩增出 750 bp 特异性条带,pBudCE4.1-PPE68-Zmp1 和 pBudCE4.1-PPE68p-Zmp1 扩增出 1 992 bp 特异性条带,与预期结果相符合(图 4)。



M:DL10000 DNA Marker; 1:pBudCE4.1-PPE68 质粒对照; 2:pBudCE4.1-PPE68 质粒重组沙门菌; 3:pBudCE4.1-PPE68p 质粒对照; 4:pBudCE4.1-PPE68p 重组沙门菌; 5:pBudCE4.1-PPE68-Zmp1 质粒对照; 6:pBudCE4.1-PPE68-Zmp1 质粒重组沙门菌; 7:pBudCE4.1-PPE68p-Zmp1 质粒对照; 8:pBudCE4.1-PPE68p-Zmp1 质粒重组沙门菌

图 4 重组质粒转入沙门菌的菌落 PCR 验证结果

2.6 小鼠血清中 IL-12 和 IFN- γ 的水平

定量 ELISA 检测结果经单因素方差分析,细胞因子各组间有差异(表 2)。与 pBudCE4.1 空质粒对照组相比,各实验组均能有效刺激细胞因子 IL-12 和 IFN- γ 的产生($P=0.000$),这表明 PPE68 和 PPE68 抗原肽均能有效诱导免疫。与 PPE68 相比,PPE68 抗原肽诱导产生的 IL-12 水平更高($P=0.042$)。在 PPE68 和 Zmp1 共表达组,IL-12 水平($P=0.004$)和 IFN- γ 水平($P=0.034$)产生比单独的 PPE68 组要低;对比 PPE68 抗原肽组,PPE68p 和 Zmp1 共表达组的 IL-12 和 IFN- γ 水平尽管也有降低,但无统计学意义($P=0.198$, $P=0.070$)。这说明 Zmp1 对 PPE68 的免疫诱导有一定抑制作用,但对 PPE68 抗原肽的影响作用不明显。

2.7 特异性脾淋巴细胞增殖实验

经 CCK8 法检测,经非参数秩和检验,组间刺激指数 SI 有差异(表 3)。含有 PPE68 或抗原肽 PPE68p 的各组均能有效刺激脾淋巴细胞增殖,与空质粒对照组相比均有意义($Z=-3.182$, $P=0.001$; $Z=-3.182$, $P=0.001$)。同时表达 PPE68 抗原和 Zmp1 分子的实验组刺激指数较单独表达 PPE68 组要低,有统计学意义($Z=-2.858$, $P=0.004$),表明 Zmp1 对 PPE68 抗原分子有一定的抑制效应;而同时表达 PPE68 抗原肽和 Zmp1 分子的实验组刺激指数尽管低于单独表达 PPE68 抗原肽的实验组,但差异无统计学意义($Z=-1.540$, $P=0.124$)。

表 3 脾淋巴细胞增殖试验

组别	样本量	刺激指数 (SI)
pBudCE4.1	6	0.999 4 $\pm$ 0.626 3
pBudCE4.1-PPE68p	9	5.298 6 $\pm$ 1.081 9
pBudCE4.1-PPE68	9	4.441 2 $\pm$ 0.779 8
pBudCE4.1-PPE68-Zmp1	10	3.297 4 $\pm$ 0.491 1 ^a
pBudCE4.1-PPE68p-Zmp1	8	4.698 6 $\pm$ 1.572 0
<i>H</i> 值		27.517
<i>P</i> 值		0.000

注:a,与 pBudCE4.1-PPE68 组比较, $P=0.004$

2.8 小肠灌洗液和肺灌洗液特异性 sIgA 的水平

小肠黏膜 sIgA 的 ELISA 结果非参数秩和检验,各组间有差异(表 4)。携带 PPE68 或 PPE68 抗原肽的各组沙门菌口服免疫小鼠,均能有效刺激肠道黏膜表面的 sIgA 产生(与对照组相比, $P=0.007$, $P=0.005$, $P=0.001$, $P=0.001$)。PPE68 或 PPE68 抗原肽两组无差别($P=0.200$);未观察到 Zmp1 对 PPE68 的抑制作用,反而在含 Zmp1 的各组观察到抗体水平增高,而 PPE68p 和 Zmp1 共表达组的肠黏膜抗体比单纯的 PPE68p 组明显升高($P=0.012$)。同样,在肺黏膜表面的抗体水平也观察到类似现象。肺黏膜 sIgA 经非参数秩和检验,各组间有差异。组间 Mann-Whitney U 检验分析和 Bonferroni 检验校正显示 PPE68 和 Zmp1 共表达组较 PPE68 单独组具有较强的黏膜抗体刺激能力($Z=-2.858$, $P=0.004$)。其结果表明 Zmp1 对黏膜抗体产生有促进作用。

表 4 小肠灌洗液和肺灌洗液特异性 sIgA 的水平

组别	样本量	小肠灌洗液 sIgA (ng/mL)	肺脏灌洗液 SIgA (ng/mL)
pBudCE4.1	7	0.432 0 ± 0.288 2	0.298 3 ± 0.030 4
pBudCE4.1-PPE68p	9	1.007 2 ± 0.428 3	0.545 8 ± 0.351 9
pBudCE4.1-PPE68	9	1.300 9 ± 0.539 8	0.195 4 ± 0.113 0
pBudCE4.1-PPE68-Zmp1	10	1.498 9 ± 0.520 4	0.651 9 ± 0.402 3
pBudCE4.1-PPE68p-Zmp1	8	1.732 3 ± 0.523 8 ^a	1.011 4 ± 0.625 9
<i>F</i> 值		20.138	15.809
<i>P</i> 值		0.000	0.003

注:a,与 pBudCE4.1-PPE68p 组比较, $P=0.012$

3 讨 论

Zmp1 是分枝杆菌的一个多功能分子,明确它影响 BCG 免疫的具体机制有利于更好地改造、利用 BCG。本实验中,为了明确 Zmp1 是否影响完整分枝杆菌抗原分子的降解处理过程来影响抗原分子的免疫原性,从而影响 BCG 免疫效果,本课题组构建了 Zmp1 和 PPE68 抗原共表达质粒、Zmp1 和 PPE68 抗原肽共表达质粒,经沙门菌载体携带,口服肠道免疫小鼠,观察了免疫效应的差异。

选用的 PPE68 抗原是良好的结核分枝杆菌膜抗原,它在抗结核免疫形成、结核分枝杆菌的毒力调节中发挥重要作用,有利于免疫效应的观察^[16-17]。本实验的结果也显示,不管是完整的 PPE68 抗原分子或 PPE68 抗原肽分子均可有效刺激脾淋巴细胞增殖,血中 IL-12 和 IFN- γ 增加,均能明显诱导抗结核免疫的形成,结果与本实验室前期 PPE68 重组 BCG 免疫的结果^[18]及 Christy 的研究结果一致^[15]。

构建 PPE68 抗原肽的共表达质粒作为参照,是主要观察 Zmp1 是否作用在 PPE68 抗原分子的消化降解环节。因为不管是外源性的抗原还是内源性抗原,都要在抗原提呈细胞(如巨噬细胞)内依靠溶酶体途径或蛋白酶体途径对抗原分子的消化、降解处理,最终形成抗原肽分子与 MHC 分子结合诱导抗结核特异性免疫形成^[19]。胞内直接表达的抗原肽分子无需再经溶酶体或蛋白酶体的消化降解即可与 MHC 分子结合诱发免疫。实验室前期已验证了 PPE68 抗原分子的真核表达^[14],本实验验证了 pBudCE4.1-PPE68-Zmp1、pBudCE4.1-PPE68p-Zmp1 两共表达质粒的 Zmp1 的真核内表达。设计的 PPE68 抗原肽分子由于编码基因仅 45 bp、分子量

小、无特异性抗体、不宜添加检测标签等原因,未能在体外细胞内验证其表达,但在动物体内观察到了该抗原肽分子产生的免疫效应。比较 pBudCE4.1-PPE68 组与 pBudCE4.1-PPE68-Zmp1 组的结果发现,在 Zmp1 参与下,PPE68 引起的脾淋巴细胞增殖作用减弱,血清 IL-12 和 IFN- γ 的滴度下降;而在 pBudCE4.1-PPE68p 组与 pBudCE4.1-PPE68p-Zmp1 组脾淋巴细胞增殖作用,血清 IL-12 和 IFN- γ 水平变化并不明显,说明 Zmp1 主要作用于抗原提呈细胞内的 PPE68 抗原转变成 PPE68 抗原肽的降解处理过程。

实验中,采用重组沙门菌是基于两方面的原因。一是利用减毒沙门菌的疫苗载体功能^[20]。沙门菌是一种胞内菌,通过口服方式胃肠道免疫能够主动进入吞噬细胞。实验使用的 Aro 基因突变的营养缺陷型减毒沙门菌 SL7207,在吞噬细胞内缺乏芳香族氨基酸合成而无法生存,从而释放质粒释放的真核表达质粒可在吞噬细胞内表达抗原^[21]。真核表达的 PPE68 抗原及 PPE68 抗原肽可诱发免疫效应,这与一些 DNA 疫苗免疫诱导 Th1 应答产生 IL-12、IFN- γ 原理类似。二是黏膜免疫功能。结核分枝杆菌可经黏膜进入人体引起感染,黏膜免疫是预防结核的第一道防线。经沙门菌携带的 PPE68 抗原或抗原肽能够有效诱导肠道黏膜抗体 sIgA 的产生,但在远离刺激部位的肺部抗体滴度偏低。与预期相反,Zmp1 参与组黏膜抗体的产生不但未减少,反而在肺和肠道均观察到相应地增加,其机制有待进一步探索。近来 Vemula 等^[22]研究发现 Zmp1 可激发特异性的抗结核体液免疫,本研究结果可能与此有关。

综上所述,本研究发现经沙门菌携带的 PPE68 或 PPE68 肽均可诱导机体免疫,Zmp1 可在吞噬细胞的抗原消化处理环节影响结核分枝杆菌抗原分

子 PPE68 的免疫功能,这可能是影响 BCG 免疫功能的主要因素。BCG 疫苗仍是预防结核病的“金标准”^[23-24]。本研究为后续开发适宜的 Zmp1 抑制剂或者修饰 BCG 的 *zmp1* 基因来增强 BCG 免疫效果奠定基础。

参 考 文 献

- [1] 10 facts on tuberculosis. World Health Organization. 2016[EB/OL]. <http://www.who.int/features/factfiles/tuberculosis/en/>.
- [2] Pai M, Behr MA, Dowdy D, et al. Tuberculosis[J]. Nat Rev Dis Primers, 2016, 2: 16076.
- [3] Krysztupa-Grzybowska K, Lutyńska A. Microevolution of BCG sub-strains[J]. Postepy Hig Med Dosw(Online), 2016, 70: 1259-1266.
- [4] Singh VK, Srivastava R, Srivastava BS. Manipulation of BCG vaccine: a double-edged sword[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2016, 35(4): 535-543.
- [5] Muttucumaru DG, Smith DA, McMinn EJ, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Rv0198c, a putative matrix metalloprotease is involved in pathogenicity[J]. Tuberculosis (Edinb), 2011, 91(2): 111-116.
- [6] Correa AF, Bailão AM, Bastos IM, et al. The endothelin system has a significant role in the pathogenesis and progression of *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. Infect Immun, 2014, 2(12): 5154-5165.
- [7] Ferraris DM, Sbardella D, Petrera A, et al. Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* zinc-dependent metalloprotease-1 (Zmp1), a metalloprotease involved in pathogenicity[J]. J Biol Chem, 2011, 286(37): 32475-32482.
- [8] Vemula MH, Mediseti R, Ganji R, et al. *Mycobacterium tuberculosis* zinc metalloprotease-1 assists mycobacterial dissemination in Zebrafish[J]. Front Microbiol, 2016, 7: 1347.
- [9] 方陈城, 张继明, 卢楠, 等. 锌离子依赖金属蛋白酶 1 (Zmp1) 抑制小鼠 RAW264.7 细胞增殖以及吞噬体-溶酶体的融合[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(10): 1317-1320, 1326.
- [10] 李鹏, 何永林, 张继明, 等. 锌依赖的金属蛋白酶 1 促进巨噬细胞凋亡[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2015, 31(12): 1585-1587, 1592.
- [11] Sander P, Clark S, Petrera A, et al. Deletion of *zmp1* improves *Mycobacterium bovis* BCG-mediated protection in a guinea pig model of tuberculosis[J]. Vaccine, 2015, 33(11): 1353-1359.
- [12] Master SS, Rampini SK, Davis AS, et al. *Mycobacterium tuberculosis* prevents inflammasome activation[J]. Cell Host Microbe, 2008, 3(4): 224-232.
- [13] Johansen P, Fettelschoss A, Amstutz B, et al. Relief from Zmp1-mediated arrest of phagosome maturation is associated with facilitated presentation and enhanced immunogenicity of mycobacterial antigens[J]. Clin Vaccine Immunol, 2011, 18(6): 907-913.
- [14] 靳志栋, 何永林, 徐蕾, 等. 结核分枝杆菌 PPE68 基因真核表达质粒的构建及鉴定[J]. 重庆医科大学学报, 2011, 36(8): 907-910.
- [15] Christy AJ, Dharman K, Dhandapaani G, et al. Epitope based recombinant BCG vaccine elicits specific Th1 polarized immune responses in BALB/c mice[J]. Vaccine, 2012, 30(7): 1364-1370.
- [16] Demangel C, Brodin P, Cockle PJ, et al. Cell envelope protein PPE68 contributes to *Mycobacterium tuberculosis* RD1 immunogenicity independently of a 10-kilodalton culture filtrate protein and ESAT-6[J]. Infect Immun, 2004, 72(4): 2170-2176.
- [17] Ahmed A, Das A, Mukhopadhyay S. Immunoregulatory functions and expression patterns of PE/PPE family members: roles in pathogenicity and impact on anti-tuberculosis vaccine and drug design[J]. IUBMB Life, 2015, 67(6): 414-427.
- [18] Dong Z, Xu L, Yang J, et al. Primary application of PPE68 of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Hum Immunol, 2014, 75(5): 428-432.
- [19] Hmama Z, Peña-Díaz S, Joseph S, et al. Immuno-evasion and immunosuppression of the macrophage by *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Immunol Rev, 2015, 264(1): 220-232.
- [20] Wang QL, Pan Q, Ma Y, et al. An attenuated *Salmonella*-vectored vaccine elicits protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Vaccine, 2009, 27(48): 6712-6722.
- [21] Curtiss R 3rd, Kelly SM, Tinge SA, et al. Recombinant *Salmonella* vectors in vaccine development[J]. Dev Biol Stand, 1994, 82: 23-33.
- [22] Vemula MH, Ganji R, Sivangala R, et al. *Mycobacterium tuberculosis* zinc metalloprotease-1 elicits tuberculosis-specific humoral immune response independent of mycobacterial load in pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis patients[J]. Front Microbiol, 2016, 7: 418.
- [23] Hatherill M, Tait D, McShane H. Clinical testing of tuberculosis vaccine candidates[J]. Microbiol Spectr, 2016, 4(5).
- [24] Lahey T, von Reyn CF. *Mycobacterium bovis* BCG and new vaccines for the prevention of tuberculosis[J]. Microbiol Spectr, 2016 Oct; 4(5). doi: 10.1128/microbispec.TNMI 7-0003-2016.

(责任编辑: 冉明会)