

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.001967

携带 Lipocalin 2 基因重组减毒沙门菌的构建
及其对分枝杆菌生长影响的研究唐 弘¹, 王瑜伟², 何永林¹, 卢 楠¹, 徐 蕾¹, 庄稀尧¹, 李智颖¹, 杨 婕¹, 陈俊伊¹, 熊雨涵¹, 杨 春¹

(1. 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;

2. 重庆市中医院检验科, 重庆 400021)

【摘要】目的:探讨携带脂质运载蛋白 2(lipocalin 2, Lcn2)的减毒沙门菌对分枝杆菌生长的影响。**方法:**以巨噬细胞 RAW264.7 提取 RNA 逆转录为 cDNA 为模版, 采用 PCR 法扩增 Lcn2 基因, 定向克隆到质粒 pBudCE4.1-orim 的多克隆位点中, 构建重组质粒 pBudCE4.1-orim-Lcn2; 将重组质粒转染 RAW264.7 细胞, 用 RT-qPCR 法检测 Lcn2 的 mRNA 相对表达量, 并以空白载体为对照组; 将重组质粒转入减毒沙门菌 SL7207 得到重组菌株 SL7207-pBudCE4.1-orim-Lcn2; 重组菌感染 RAW264.7 细胞, Western blot 检测 Lcn2 的蛋白表达, RT-qPCR 法检测 Lcn2 的 mRNA 的相对表达量, 并以空载菌组为对照; 7H10 平板上通过菌落计数观察重组菌对感染 RAW264.7 细胞的卡介苗(Bacille calmette-guerin, BCG)生存的影响, 以空载菌组为对照。用重组菌灌胃小鼠, 检测脾组织 Lcn2 和血清 IFN- γ 水平, 以空载菌和生理盐水为对照组。**结果:**PCR 扩增出 Lcn2 基因; 重组质粒经双酶切及基因测序鉴定正确。重组菌感染 RAW264.7 细胞 Lcn2 的蛋白表达量较对照组增加($P=0.000$)。RT-qPCR 法检测重组菌、重组质粒 Lcn2 mRNA 表达较对照组明显升高 ($P=0.000$, $F=5.281$; $P=0.000$, $F=22570$)。7H10 平板上重组菌组 BCG 数量与空载菌组相比明显减少($P=0.000$, $F=11.41$)。重组菌组与空载对照菌组相比小鼠脾组织 Lcn2 表达升高($P=0.000$, $F=4.449$), 重组菌组与生理盐水组血清 IFN- γ 升高($P=0.004$, $F=15.27$)。**结论:**成功构建了携带 Lcn2 基因的重组减毒沙门菌。重组菌感染 RAW264.7 细胞后 Lcn2 的表达增加, 对感染 RAW264.7 的 BCG 存活起到一定的抑制作用。重组菌灌胃后小鼠脾组织 Lcn2 表达增加, 血清 IFN- γ 含量增加, 小鼠免疫状态有利于结核病转归。该研究为进一步研究脂质运载蛋白和结核分枝杆菌感染的关系及分子机制打下基础。

【关键词】减毒沙门菌; Lcn2 基因; 分枝杆菌; RAW264.7 细胞**【中图分类号】**R378.9**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-07-10Construction of recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* carrying the lipocalin 2 gene and its effect on the growth of mycobacteriaTang Hong¹, Wang Yuwei², He Yonglin¹, Lu Nan¹, Xu Lei¹, Zhuang Xiyao¹, Li Zhiying¹,Yang Jie¹, Chen Junyi¹, Xiong Yuhuan¹, Yang Chun¹

(1. Center for Molecular Medicine and Tumor Research, Department of Pathogen Biology, School of Basic Medicine, Chongqing Medical University; 2. Department of Laboratory Medicine, Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine)

【Abstract】Objective: To construct attenuated *Salmonella typhimurium* carrying the lipoprotein 2(Lcn2) gene and to investigate its effect on the growth of mycobacteria. **Methods:** RNA was extracted from macrophage RAW264.7 cells and reverse transcribed into cDNA. The Lcn2 gene was amplified by PCR using the cDNA as a template and inserted into the multiple cloning sites of the plasmid

作者介绍: 唐 弘, Email: zfc88@126.com,

研究方向: 结核分枝杆菌感染与免疫。

通信作者: 杨 春, Email: yangchunim@163.com。

基金项目: 重庆市委资助项目(编号: cstc2016jcyjA0277, cstc2017jcyj-AX0409, cstc2016jcyjA0196); 重庆市教委科学技术研究资助项目(编号: KJ1500203)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20190118.1311.006.html>
(2019-01-21)pBudCE4.1-orim to construct the recombinant plasmid pBudCE4.1-orim-Lcn2. The recombinant plasmid was transfected into RAW264.7 cells. The mRNA expression of Lcn2 was measured by RT-qPCR, with the empty plasmid for a control group. Then the recombinant plasmid was transfected into the attenuated *Salmonella typhimurium* SL7207 to obtain the recombinant strain SL7207-pBudCE4.1-orim-Lcn2. RAW264.7 cells were infected with the recombinant strain. The protein expres-

sion of the *Lcn2* gene was measured by Western blot, and its mRNA expression was measured by RT-qPCR, with the empty strain for a control group. Bacterial colonies were counted on the 7H10 plate to observe the effect of the recombinant strain on the survival of bacille Calmette-Guérin (BCG) in RAW264.7 cells, with the empty strain for a control group. Mice were intragastrically given the recombinant strain to measure the *Lcn2* expression in the spleen and the interferon gamma (IFN- γ) level in serum, with the empty strain and normal saline for control groups. **Results:** The *Lcn2* gene was amplified by PCR, and the recombinant plasmid was identified by double-enzyme digestion and DNA sequencing. The protein expression of *Lcn2* in RAW264.7 cells infected with the recombinant strain was significantly increased compared with the control group ($P=0.000$). The RT-qPCR showed that the mRNA expression of *Lcn2* in the recombinant strain group and the recombinant plasmid group was significantly higher than that in the control groups ($F=5.281, P=0.000; F=22.570, P=0.000$). The colony number of BCG on the 7H10 plate in the recombinant strain group was significantly reduced compared with the control group ($F=11.41, P=0.000$). The expression of *Lcn2* in mouse spleen tissues and the level of IFN- γ in serum were significantly higher in the recombinant strain group than in the control groups ($F=4.449, P=0.000; F=15.27, P=0.004$). **Conclusion:** Recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* carrying the *Lcn2* gene was successfully constructed. The expression of *Lcn2* increased in RAW264.7 cells infected with the recombinant strain, which inhibited the survival of BCG in the cells. The expression of *Lcn2* in mouse spleen tissues and the IFN- γ level in serum were elevated after the mice were intragastrically given the recombinant strain, so that the immune state of mice was beneficial to anti-tuberculosis outcome. This study lays a foundation for further study of the relationship between lipid carrier proteins and *Mycobacterium tuberculosis* infection and its molecular mechanism.

[Key words] attenuated *Salmonella typhimurium*; *Lcn2* gene; mycobacteria; RAW264.7 cell

结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb) 是一种古老的细菌, 能引起结核病。据 2017 年最新 WHO 报道, 2016 年全球范围内有 1 040 万新发结核病病例, 有 170 万人死于结核病。Mtb 感染后被巨噬细胞 (macrophage, M Φ) 和肺中的其他细胞摄取, 并且可以在细胞内长时间存活^[1]。铁对 Mtb 在细胞内存活和生长以及逃避宿主免疫防御至关重要^[2-4]。Mtb 能分泌转铁体到吞噬体外摄取铁, 以维持其生存^[5]。*Lcn2* 是载脂蛋白家族一员, 又称 NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin)。Holmes 等^[6]、Hoette 等^[7]通过化学结构分析发现, *Lcn2* 能与 Mtb 分泌的可溶性转铁体结合, 抑制铁的摄取, 发挥抗结核杆菌感染^[8]。因此, 利用外源 *Lcn2* 基因转染巨噬细胞观察抑制 Mtb 的生长能力, 为结核分枝杆菌感染的治疗提供新的思路。

沙门菌可以诱发机体产生免疫应答, 采用基因工程手段敲除野生型沙门菌致病菌, 可使它们变得更加安全, 故沙门菌经改造后可作为外源基因表达或递送良好的载体。本研究以减毒沙门菌 SL7207 为载体递送基因 *Lcn2*, 阻断 Mtb 生长必需物质——铁的摄取, 从源头上“饿死”Mtb。以期为 Mtb 感染的治疗研究提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株 质粒 pBudCE4.1-orim, *E. coli*, DH5 α , BCG, SL7207, RAW264.7 株均由本室保存。

1.1.2 实验动物 SPF 级 BALB/c 小鼠, 雌性, 6~8 周龄, 重庆医科大学实验动物中心购买。

1.1.3 主要试剂 Primer Star DNA 聚合酶、限制性内切酶和 DNA 连接试剂盒, RNA 提取试剂盒, RNA 逆转录试剂盒, real-time PCR 试剂盒购自大连 Takara 公司; 质粒纯化试剂盒、胶回收试剂盒和 PCR 产物回收试剂盒购自 AlingXYGEN 公司。胎牛血清 (FBS)、培养基、四环素、庆大霉素、博来霉素均购自 Hyclone 公司; RIPA 裂解液、ECL 化学发光液、SDS-PAGE 凝胶试剂盒购自碧云天生物技术研究所。*Lcn2* 单克隆抗体购自 EMD Millipore 公司; 抗 β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体和 HRP 标记羊抗兔 IgG 购于北京中衫金桥生物技术有限公司。

1.1.4 引物设计 本实验涉及的引物合成和测序由武汉擎科创新生物科技有限公司完成。

1.2 实验方法

1.2.1 pBudCE4.1-orim-*Lcn2* 重组质粒构建及鉴定 RAW 264.7 以 DMEM (10% FBS) 培养基于 5% CO₂ 培养箱中培养, 通过 Trizol 法提取其 RNA, 使用 Takara 逆转录试剂盒得到 cDNA。以此 cDNA 为模版, 设计上下游引物 (5'-CAAGTC-

GACGCCACCATGGCCCTGAGTGTTCATGTG-3', 5'-CCAGG-AT-CCGTTGTCAATGCATTGGTC-3'), 内含 *SalI*、*BamH I* 酶切位点。利用 PCR 扩增 *Lcn2* 基因全长序列, PCR 反应条件: 95 °C 10 min; 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 60 s, 共 34 个循环; 72 °C 10 min。经 *Sal I* 和 *BamH I* 双酶切, 定向克隆入 pBudCE4.1-orim, 构建 pBudCE4.1-orim-*Lcn2* 重组质粒, 经双酶切和测序鉴定。

1.2.2 pBudCE4.1-orim-*Lcn2* 重组质粒在 RAW264.7 细胞中表达 RAW264.7 以 DMEM(10% FBS) 培养基于 5% CO₂ 培养箱中培养。实验分为重组质粒、空载体质粒、空白对照 3 组, 按照转染试剂 Lipofectamine™ 2000 Reagent 操作说明和步骤分别转染 RAW264.7 细胞。转染 24 h 后, 通过 Trizol 法提 RNA, 使用 Takara 逆转录试剂盒得到 cDNA。通过 RT-qPCR 分析检测细胞中 *Lcn2* 的 mRNA 水平。引物如下: *Lcn2* 的上游引物为: 5'-AGACCTAGTAGCTGTGGAAACCATG-3', 下游引物为 5'-GCCTTCTGTTTTTCTGGACCGC-3'; GAPDH 的上游引物为: 5'-AGGCCGGTGCTGAGTATGTC-3', 下游引物为 5'-TGCCTGCTTCACCACCTTCT-3'。使用 2^{-ΔΔCt} 法计算相对 mRNA 的含量, 以 GAPDH 为内参。

1.2.3 SL7207-pBudCE4.1-orim-*Lcn2* 构建及鉴定 将 pBudCE4.1-orim-*Lcn2* 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 50 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 (50 mg/L Zeocin) 液体培养基中 37 °C, 220 r/min 摇菌。该重组菌用 PCR 进行验证, 上下游引物为 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-AGAC-3', 5'-CCAGGATCCGTTGTCAATGCATTGGTC-3')。

1.2.4 SL7207-pBudCE4.1-orim-*Lcn2* 感染 RAW264.7 细胞培养 RAW264.7 细胞, 细菌感染实验分 3 组: 重组菌组 ($n=3$)、空载菌组 ($n=3$)、空白对照组 ($n=3$) 以 1×10^7 形成单位加入 RAW264.7 细胞, 细菌与细胞比为 20:1。37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 1 h 后, 用含 50 mg/L 庆大霉素和四环素的磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗 3 次, 以 10 mg/L 四环素 DMEM (2% FBS) 培养。

1.2.5 Western blot 检测 *Lcn2* 蛋白表达 上述感染细胞培养 48 h 后收集细胞对其提蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。将用 PBS 调定的蛋白 80 μL 加入 20 μL 5 × 上样缓冲液, 100 °C 变性 10 min 后, 用 15% SDS-PAGE 电泳, 然后转移至 PVDF 膜上, 用封闭液 4 °C 封闭过夜, PBST 缓冲液漂洗后, PVDF 膜在室温下分别用小鼠来源的抗 β-actin 抗体和兔来源的 *Lcn2* 单克隆一抗 1:6 000 稀释孵育 1 h, 经 PBST 缓冲液漂洗 3 次, 再与 HRP 偶合的羊抗小鼠和羊抗兔 IgG 二抗 (1:8 000) 室温下孵育 1 h, PBST 缓冲液漂洗 3 次。按 1:1 配制化学显色液, 避光把其置于凝胶成像系统中进行成像分析。以 β-actin 作为内参照, 以 SL7207 减毒沙门菌感染的 RAW264.7 为对照。

1.2.6 RT-qPCR 检测 *Lcn2* mRNA 水平的表达 上述感染重

组菌、空载菌、空白对照的 RAW264.7 细胞培养 48 h 后用 Trizol 法提取细胞 RNA, 使用 Takara 逆转录试剂盒得到 cDNA, 通过 RT-qPCR 分析检测细胞中 *Lcn2* 的 mRNA 水平。引物如下: *Lcn2* 的上游引物为: 5'-AGACCTAGTAGCTGTG-GAAACCATG-3', 下游引物为 5'-GCCTTCTGTTTTTCTG-GACCGC-3'; GAPDH 的上游引物为: 5'-AGGCCGGTGCT-GAGTATGTC-3', 下游引物为 5'-TGCCTGCTTCACCACCTTCT-3'。使用 2^{-ΔΔCt} 法计算相对 mRNA 的含量, 以 GAPDH 为内参。

1.2.7 重组菌对感染 RAW264.7 细胞的 BCG 生存的影响 将 BCG 以 1×10^6 形成单位加入 RAW264.7 细胞, 细菌与细胞比为 5:1^[8]。37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 23 h 后, 用含 50 mg/L 庆大霉素和四环素的 PBS 洗 3 次后将重组菌和空载菌以 1×10^6 形成单位加入 RAW264.7 细胞, 细菌与细胞比为 50:1 (3 个复孔)。37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 1 h 后, 用含 50 mg/L 庆大霉素和四环素的 PBS 洗 3 次, 以 10 mg/L 四环素 DMEM (2% FBS) 培养 48 h 后吸去培养基后用 PBS 洗 3 次。在无菌条件下每孔内加入用 PBS 稀释的 1% Triton 100 μL, 裂解 10 min 后用枪头吹打细胞。每孔吸取 10 μL 裂解液加入 990 μL PBS 液混匀后, 10 倍梯度稀释至 10³ 倍, 取每个浓度的菌液 10 μL 滴到米氏 7H10 固体培养板上 (3 次重复)。放于 37 °C 恒温培养箱中, 培养 10~15 d, 观察结果。

1.2.8 重组菌灌胃 BALB/c 小鼠 BALB/c 小鼠分为 3 组: 重组菌组 ($n=5$)、空载菌组 ($n=5$)、生理盐水组 ($n=5$)。各实验组小鼠用 3% 碳酸氢钠中和胃酸 2 h 后, 分别以 1×10^6 CFU/100 μL 重组菌 SL7207-pBudCE4.1-orim-*Lcn2*、 1×10^6 CFU/100 μL 空载 SL7207-pBudCE4.1-orim, 100 μL 生理盐水分 3 组灌胃。每 2 周 1 次, 共 2 次。第 2 次灌胃 7 d 后处死小鼠, 无菌采取器官、血清备用。

1.2.9 小鼠脾组织 *Lcn2* 的表达量 取小鼠脾组织研磨后提 RNA, 逆转录为 cDNA 后做 RT-qPCR 分析重组菌组 ($n=3$)、空载菌组 ($n=3$)、生理盐水组 ($n=3$) *Lcn2* 的表达量。

1.2.10 小鼠血清 IFN-γ 的测定 小鼠摘除眼球后取血, 分离血清后用定量 ELISA 法检测小鼠血清中 IFN-γ, 按试剂盒说明书操作。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行分析, 统计结果以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 携带 *Lcn2* 基因的重组质粒鉴定

以 RAW264.7 细胞提取 RNA 逆转录为 cDNA 为模版, 经 PCR 扩增出 603 bp 的特异性条带, 与预期大小一致 (图 1A)。重组质粒经 *Sal I* 和 *BamH I* 双酶切后得到大小约

5 600 bp 和 600 bp 的片段,该片段大小与预期片段大小相符(图 1B)。

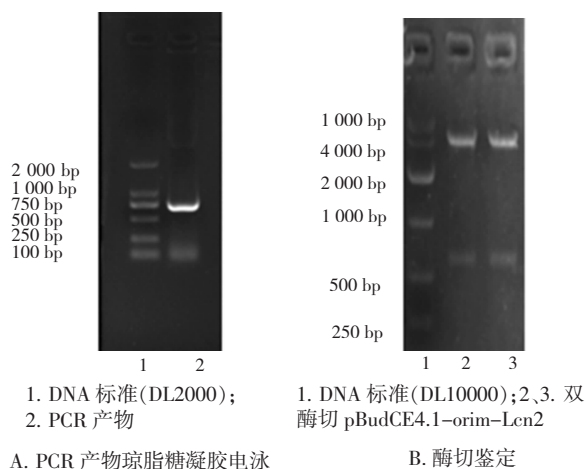


图 1 pBudCE4.1-orim-Lcn2 质粒鉴定

2.2 Lcn2 在 RAW264.7 细胞中的表达水平分析

以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 比较 Lcn2 mRNA 相对表达水平,以空载体质粒 Lcn2 的 mRNA 水平为对照,结果显示重组质粒、空载体质粒、空白对照的组织表达量分别为 210.000 ± 11.180 、 1.005 ± 0.074 、 0.690 ± 0.026 ($P=0.000$, $F=22.570$)。实验组表达量明显高于对照组(图 2)。

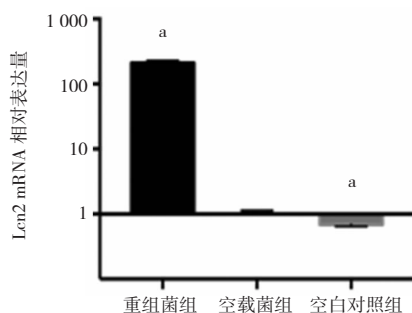
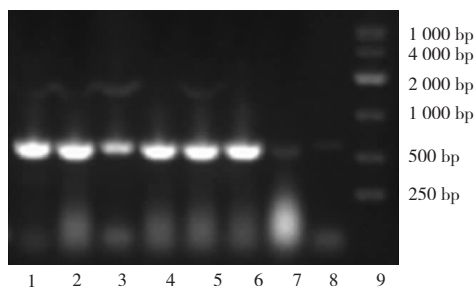


图 2 RT-q PCR Raw264.7 细胞 Lcn2 mRNA 相对表达水平

2.3 重组 SL7207- pBudCE4.1-orim-Lcn2 鉴定

用 pBudCE4.1-orim-Lcn2 质粒作为阳性对照,重组沙门菌进行 PCR,扩增出 624 bp 特异性条带,与预期结果相符合(图 3)。

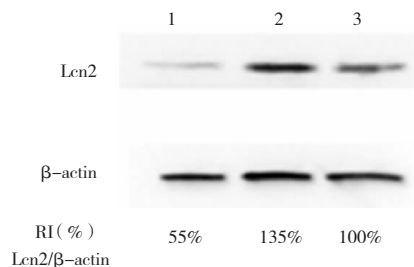


注:1、2 为阳性对照 PCR 扩增结果;3、4、5、6、7、8 为重组 SL7207 PCR 扩增结果;9 为 DNA 标准(DL10000)

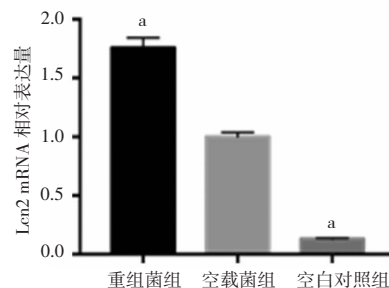
图 3 携带 Lcn2 基因的重组 SL7207 PCR 鉴定结果

2.4 Western blot、RT-q PCR 检测重组菌感染 RAW264.7 细胞后 Lcn2 表达水平

以重组菌感染 RAW264.7 细胞后经 Western blot 检测,结果显示重组菌组 Lcn2 蛋白表达较空载菌组明显增高(图 4A)。以 β -actin 作为内参照。以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 比较 Lcn2 mRNA 水平,以空载菌组 Lcn2 的 mRNA 表达水平为对照,结果显示重组菌组、空载菌组、空白对照组的表达量分别为 1.757 ± 0.284 、 1.001 ± 0.012 、 0.130 ± 0.002 ($P=0.000$, $F=5.281$)。Lcn2 在重组菌组表达量高于空白菌组(图 4B)。



A. Lcn2 蛋白表达水平



B. Lcn2 mRNA 表达水平

图 4 Raw264.7 细胞 Lcn2 表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.5 重组菌对感染 RAW264.7 细胞的 BCG 的生存影响

重组菌组、空载菌组、空白对照组感染 RAW264.7 细胞后分别加入 BCG 感染 RAW264.7 细胞,计数 7H10 平板上 BCG 的菌落数(图 5)。各组平板拍照后的计数结果显示,重组菌组、空载菌组、空白对照组的 BCG 数量分别为 $91\ 851 \pm 3\ 197$ 、 $240\ 740 \pm 11\ 261$ 、 $1\ 137\ 037 \pm 30\ 654$ ($P=0.000$, $F=11.41$)。与空载菌组相比,重组菌组 BCG 的数量明显减少。

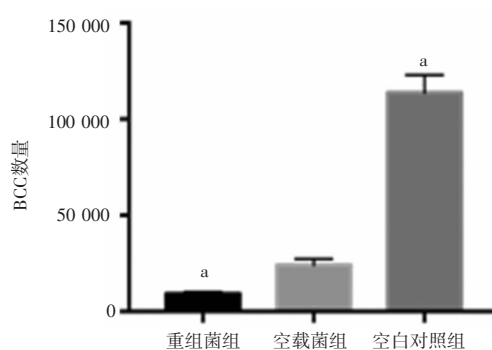
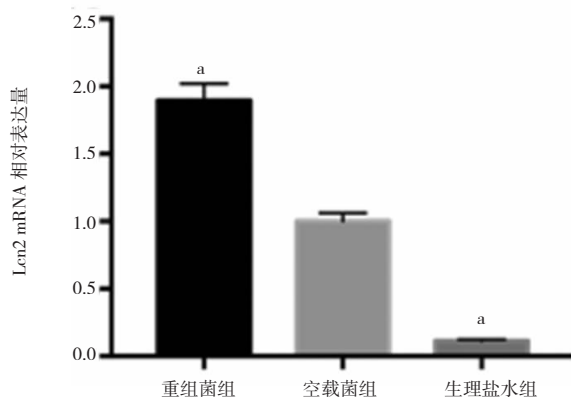


图 5 BCG 数量

2.6 小鼠脾组织 Lcn2 mRNA 表达量

分别以重组菌、空载菌、生理盐水灌胃小鼠后,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 比较各组脾组织 Lcn2 mRNA 相对表达量,以空载菌组 Lcn2 的 mRNA 表达水平为对照,结果显示重组菌组、空载菌组、生理盐水组表达量分别为 1.896 ± 0.042 、 1.001 ± 0.020 、 0.113 ± 0.000 ($P=0.000$, $F=4.449$)。重组菌组 Lcn2 的 mRNA 相对表达量最高(图 6)。



注:a,与空载菌组相比, $P<0.05$

图 6 脾 Lcn2 mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.7 血清 IFN- γ 水平

重组菌组和空载菌组的血清 IFN- γ 相比,差异无统计学意义 ($P>0.05$);重组菌组明显高于生理盐水组 ($P=0.000$, $F=15.27$),见表 1。

表 1 各组小鼠血清 IFN- γ 水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

分组	IFN- γ (pg/mL)	P 值 ^a	F 值 ^a
重组菌	58.11 ± 1.76	0.000	15.27
空载菌	55.04 ± 1.51	0.000	15.27
生理盐水	31.12 ± 6.26	0.283	20.42

注:a,重组菌、生理盐水组与空载菌组用 LSD-t 的两两比较法

3 讨论

WHO 最新全球结核病控制报告数据表明,我国的结核病患者人数居世界第二位。目前结核病防治工作中存在几大难题:①Mtb 为细胞内寄生菌,感染主要寄生于 M Φ 内,并通过逃逸机制逃避免疫杀伤,在 M Φ 内长期存活而造成滞留^[9]。②多耐药株 (multiple drug resistant, MDR) 流行。③免疫低下人群的合并感染。M Φ 是 Mtb 寄生和潜伏的场所,也是抗 Mtb 感染的主要效应细胞。铁能维持细菌呼吸作用及 DNA 复制中所需酶的活性,对所有微生物都是必不可少的营养元素。研究表明,铁是 Mtb 的至少 40 种酶的专性辅助因子,可见铁元素对

Mtb 在 M Φ 内生存的重要作用^[10]。大多数细菌在人类宿主体内生长所需的铁浓度远高于游离铁浓度^[11]。因此细菌通过分泌铁结合蛋白,即转铁体来获取宿主更多铁结合蛋白、乳铁蛋白和转铁蛋白等中的铁^[12]。实验证实,敲除转铁体基因后的 Mtb 不能在 M Φ 内生长^[13]。因此,限制转铁体对铁的摄取就能起到抗 Mtb 的作用^[14]。Lcn2 是 lipocalin 家族的成员之一,可以结合小的疏水分子,如铁、脂肪酸、前列腺素、类固醇等^[15]。同时 Lcn2 又是一种抑铁蛋白,主要存在于嗜中性粒细胞和其他一些组织中,主要通过竞争性的结合转铁体来抑制细菌铁的摄取,从而抑制细菌的生长^[16]。研究表明,Lcn2 基因敲除的小鼠,由于缺乏 Lcn2,细菌因对铁的摄取正常而更易在体内存活^[17]。

本研究选用的载体 SL7207 为减毒沙门菌。鼠伤寒沙门菌是革兰阴性肠道病原菌,属侵袭性胞内寄生菌,主要通过 M 细胞进入肠上皮,可将质粒 DNA 直接呈递给抗原提呈细胞 (antigen presenting, APC),使载体携带的基因在细胞内表达。通过基因工程方法改造的减毒沙门菌,不但失去对动物的致病性,而且其在体内仍具有良好的侵袭能力^[18]。本研究使用敲除了 *aroA* 基因的减毒沙门菌 SL7207,不能产生芳香族氨基酸,哺乳动物不能自生成芳香族氨基酸,所以 *aroA* 基因缺陷的沙门菌仅能在哺乳动物细胞内有限增殖^[19]。近年研究证实,沙门菌可诱导 CD8⁺ CTL 反应并诱导干扰素产生,扩大了减毒疫苗株的潜在应用范围。减毒沙门菌口服免疫后不但有较持久的细胞免疫,而且这种免疫细胞在机体内移行和分化后,能重新回到黏膜免疫系统,对侵入的致病原发挥作用。减毒沙门菌和分枝杆菌同为胞内寄生菌,感染机体后,首先被巨噬细胞吞噬,然后进入肝、脾等网状内皮系统,选用沙门菌为载体理论上是可以的“结核分枝杆菌”部位富集,有利于将目的基因 Lcn2 带入感染附近发挥作用。由灌胃的方式给予小鼠减毒沙门菌可诱发其黏膜、细胞、体液免疫,对结核分枝杆菌的感染可以起到一定的抑制作用^[20]。故此,沙门菌经基因工程改造后可作为外源基因的表达或递送的良好载体。

BCG 是由 Calmette 和 Guérin 将有毒的牛型结核分枝杆菌在含甘油、胆汁、马铃薯的培养基中经 13 年 230 次传代而获得的毒力下降、免疫原性保留的减毒株。比较基因组学研究发现,BCG 相对 H37Rv

毒株存在 11 个缺失区,导致其毒力下降。本研究想要探讨携带 Lcn2 的重组 SL7207 菌对结核分枝杆菌生长的影响,最好选用 H37Rv,但本课题组所在实验室不具备相应实验条件(生物安全三级实验室),故利用 BCG 这一减毒菌代替 H37Rv 初步探讨 Lcn2 功能。

本研究所用 pBudCE4.1-orim-Lcn2 质粒为本实验室构建的同时含有大肠杆菌复制子和分枝杆菌复制子的穿梭质粒,因而可以在大肠杆菌和分枝杆菌中穿梭和复制。用重组 SL7207 感染 RAW264.7 细胞后,用 Western blot 和 RT-q PCR 方法检查,结果均显示 Lcn2 的表达量明显增加,差异具有统计学意义。BCG 感染 RAW264.7 细胞后加入重组 SL7207 观察其对细胞内 BCG 的生长情况,实验结果显示含有 Lcn2 的重组 SL7207 菌株在细胞水平上对 BCG 的生长有抑制作用。重组 SL7207 感染 RAW264.7 细胞后脂质运载蛋白 2 升高影响 BCG 对铁的摄取从而对其生长产生抑制作用。结核分枝杆菌是典型胞内寄生菌,细菌进入体内首先被巨噬细胞吞噬,进入肝、脾网状内皮系统,结核病的免疫以细胞免疫为主,机体的细胞免疫水平在结核分枝杆菌感染,转归中有着重要作用。本研究检查细胞免疫的主要指标 IFN- γ ,显示含有 Lcn2 的重组菌的 IFN- γ 明显高于对照,提示机体偏向细胞免疫,有利于结核病恢复。同时小鼠脾组织 Lcn2 表达升高,表明重组菌进入小鼠体内成功表达 Lcn2 蛋白,间接提示携带 Lcn2 重组菌感染的小鼠,动物体内 Lcn2 表达和免疫状态有利于结核病转归。

综上所述,本研究成功构建了携带 Lcn2 的重组菌,并在细胞水平和动物水平验证 Lcn2 蛋白表达。后续研究拟构建结核病感染动物模型,进一步探讨 Lcn2 重组 SL7207 菌对结核分枝杆菌生长的影响及其机制,为结核病的防治提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] Kaufmann SH. Recent findings in immunology give tuberculosis vaccines a new boost[J]. Trends Immunol, 2005, 26(12): 660-667.
- [2] Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengelov H, et al. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase[J]. J Biol Chem, 1993, 268(14): 10425-10432.
- [3] Kelley VA, Schorey JS. Mycobacterium's arrest of phagosome maturation in macrophages requires Rab5 activity and accessibility to iron

- [J]. Mol Biol Cell, 2003, 14(8): 3366-3377.
- [4] Schaible UE, Kaufmann SH. Iron and microbial infection[J]. Nat Rev Microbiol, 2004, 2(12): 946-953.
- [5] Ratledge C, Dover LG. Iron metabolism in pathogenic bacteria[J]. Annu Rev Microbiol, 2000, 54: 881-941.
- [6] Holmes MA, Paulsen W, Jide X, et al. Siderocalin (Lcn 2) also binds carboxymycobactins, potentially defending against mycobacterial infections through iron sequestration[J]. Structure, 2005, 13(1): 29-41.
- [7] Hoette TM, Clifton MC, Zawadzka AM, et al. Immune interference in *Mycobacterium tuberculosis* intracellular iron acquisition through siderocalin recognition of carboxymycobactins[J]. ACS Chem Biol, 2011, 6(12): 1327-1331.
- [8] Johnson EE, Srikanth CV, Sandgren A, et al. Siderocalin inhibits the intracellular replication of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2010, 58(1): 138-145.
- [9] Vergne I, Chua J, Singh SB, et al. Cell biology of *Mycobacterium tuberculosis* phagosome [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004, 20: 367-394.
- [10] Ratledge C. Iron, mycobacteria and tuberculosis[J]. Tuberculosis (Edinb), 2004, 84(1-2): 110-130.
- [11] Andrews SC, Robinson AK, Rodriguez-Quinones F. Bacterial iron homeostasis[J]. FEMS Microbiol Rev, 2003, 27(2-3): 215-237.
- [12] Parrow NL, Fleming RE, Minnick MF. Sequestration and scavenging of iron in infection[J]. Infect Immun, 2013, 81(10): 3503-3514.
- [13] De Voss JJ, Rutter K, Schroeder BG, et al. The salicylate-derived mycobactin siderophores of *Mycobacterium tuberculosis* are essential for growth in macrophages[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(3): 1252-1257.
- [14] Somu RV, Boshoff H, Qiao C, et al. Rationally designed nucleoside antibiotics that inhibit siderophore biosynthesis of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. J Med Chem, 2006, 49(1): 31-34.
- [15] Akerstrom B, Flower DR, Salier JP. Lipocalins: unity in diversity [J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1482(1-2): 1-8.
- [16] Nasioudis D, Witkin SS. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and innate immune responses to bacterial infections[J]. Med Microbiol Immunol, 2015, 204(4): 471-479.
- [17] Berger T, Togawa A, Duncan GS, et al. Lipocalin 2-deficient mice exhibit increased sensitivity to *Escherichia coli* infection but not to ischemia-reperfusion injury[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(6): 1834-1839.
- [18] Brown A, Hormaeche CE, Demarco De Hormaeche R, et al. An attenuated aroA *Salmonella typhimurium* vaccine elicits humoral and cellular immunity to cloned beta-galactosidase in mice[J]. J Infect Dis, 1987, 155(1): 86-92.
- [19] Darji A, Guzman CA, Gerstel B, et al. Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*[J]. Cell, 1997, 91(6): 765-775.
- [20] Feng Y, Wang S, Luo F, et al. A novel recombinant bacterial vaccine strain expressing dual viral antigens induces multiple immune responses to the Gag and gp120 proteins of HIV-1 in immunized mice [J]. Antiviral Res, 2008, 80(3): 272-279.

(责任编辑:张辉洁)