



sigH-rshA 过表达对卡介苗菌株致病性的影响

肖文轩¹, 项智灏¹, 林晨¹, 刘军^{3*}, 张鹭^{1,2*}

1 复旦大学生命科学学院微生物学系, 上海 200438

2 上海工业微生物工程研究中心, 上海 201512

3 University of Toronto, Department of Molecular Genetics, Toronto, Canada, M5S 2E8

肖文轩, 项智灏, 林晨, 刘军, 张鹭. *sigH-rshA* 过表达对卡介苗菌株致病性的影响[J]. 微生物学报, 2023, 63(1): 346-356.
XIAO Wenxuan, XIANG Zhihao, LIN Chen, LIU Jun, ZHANG Lu. Effect of *sigH-rshA* overexpression on the pathogenicity of BCG strains[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(1): 346-356.

摘要: 卡介苗(*Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin, BCG)是目前唯一许可的结核病预防用疫苗, 但菌株间基因组水平的改变导致疫苗在保护效果、安全性等方面存在诸多差异。【目的】验证 DU2 III和IV遗传型中 *sigH-rshA* 过表达与 BCG 菌株毒力变化的相关性。【方法】利用分子克隆技术构建了过表达 *sigH-rshA* 的重组 BCG China 和 BCG Japan 菌株, 通过 RT-PCR 和 Western blotting 验证基因表达。利用巨噬细胞和重症联合免疫缺陷(server combined immune-deficiency, SCID)小鼠感染模型评价重组 BCG 的毒力变化; 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试验评估肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)分泌。【结果】SigH-RshA 蛋白过表达能够显著促进 BCG 的胞内增殖, 同时刺激巨噬细胞产生更高水平的 TNF- α 分泌; SCID 小鼠试验结果显示 *sigH-rshA* 过表达能提高重组 BCG 对免疫缺陷小鼠的毒力。【结论】*sigH-rshA* 过表达能够增强 BCG 菌株对小鼠巨噬细胞和实验小鼠的致病性。

关键词: BCG; *sigH*; *rshA*; 致病性; SCID 小鼠

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2301500)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2301500).

*Corresponding authors. E-mail: LIU Jun, jun.liu@utoronto.ca; ZHANG Lu, zhanglu407@fudan.edu.cn

Received: 2022-05-04; Accepted: 2022-06-17; Published online: 2022-06-24

Effect of *sigH-rshA* overexpression on the pathogenicity of BCG strains

XIAO Wenxuan¹, XIANG Zhihao¹, LIN Chen¹, LIU Jun^{3*}, ZHANG Lu^{1,2*}

1 Department of Microbiology, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China

2 Shanghai Industrial Microbial Engineering Research Center, Shanghai 201512, China

3 Department of Molecular Genetics, University of Toronto, Toronto M5S 2E8, Canada

Abstract: *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin (BCG) is the only licensed vaccine for prevention of tuberculosis, whereas the genomic changes lead to differences in the protective effect and safety among strains. **[Objective]** To study the correlation between *sigH-rshA* overexpression and pathogenicity of BCG strains in DU2 groups III and IV. **[Methods]** The recombinant BCG China and BCG Japan strains overexpressing *sigH-rshA* were established by molecular cloning, and the gene expression was verified by RT-PCR and Western blotting. We used macrophages of mouse origin and severe combined immune-deficiency (SCID) mouse infection model to assess the pathogenicity of the recombinant BCG. We employed enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to assess the secretion of tumor necrosis factor- α (TNF- α). **[Results]** The overexpression of SigH-RshA protein significantly promoted the intracellular proliferation of BCG and stimulated macrophages to produce more TNF- α . The results of the experiment with SCID mice showed that overexpression of *sigH-rshA* increased the virulence of recombinant BCG strains to immunodeficient mice. **[Conclusion]** The overexpression of *sigH-rshA* can enhance the pathogenicity of BCG strains to macrophages and mice.

Keywords: BCG; *sigH*; *rshA*; pathogenicity; SCID mice

结核病(tuberculosis, TB)是一种人畜共患的慢性消耗性传染病,其病原菌属于基因型和生态型密切相关的结核分枝杆菌复合群(*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTC),其中高度致病性的结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, *M.tb*)引起人结核病。据统计,2020年全球约有990万的新增结核病例,我国结核病患者的人数占全球第2^[1],结核病的控制形势仍显严峻。BCG是全球唯一许可的结核病疫苗,但卡介苗的保护能力和安全性呈现明显的异质性,尤其在免疫功能受损的人群中常引发散发播性卡介苗病^[2-3]。

开发新型安全高效的新型结核病疫苗,是实现在2050年对结核病有效控制的必要条件。

据世界卫生组织统计,截至2021年8月,全球已有25款新型抗结核疫苗进入临床试验阶段^[4],但仍未有新的重组疫苗产品上市,意味着重组卡介苗的构建需要新的思路和策略。其中,如何选取BCG菌株作为母体来构建新型重组卡介苗,构建何种抗原靶标的重组疫苗,都是需要高度关注的基础应用问题。

目前世界上所使用的卡介苗,在冻干保存技术出现之前,都经过了连续体外传代过程。随之而累积的随机基因突变,导致不同国家BCG菌株间存在基因组和生化表型上的差异,对宿主的临床保护效果更是参差不齐^[5-6]。寻找决定其卡介苗菌株疫苗效果的关键性遗传因子并加以调

控,是构建新型疫苗的一个值得尝试的思路。

串联重复序列(tandem duplication, DU)是BCG菌株适应体外生长条件变化的主要遗传基础,对菌株特性产生重要影响。本课题组曾对世界范围内分属DU2的I-IV遗传型的13株BCG菌株开展疫苗学比较,发现III和IV遗传型的BCG菌株对重症联合免疫缺陷(server combined immune-deficiency, SCID)小鼠具有较高的致死率,基因组比较发现这些菌株中特异性含有15 765 bp (3 590 902-3 606 667)基因片段的串联重复, *sigH* 调控基因位于其中^[2]。作为胞外作用 sigma 因子之一, *sigH* 在多种致病分枝杆菌中普遍存在。它通过与 RNA 聚合酶作用发挥功能,被一个在基因组上紧密相连的 anti-sigma 因子 RshA 调控。有证据表明,结核杆菌中 *sigH* 参与调控 *sigE*, 并与 *sigE* 共同调控 *sigB* 的表达^[7-8], 影响细菌毒力^[9]。迄今为止,关于 *sigH* 的相关研究都是在人结核病致病菌 *M.tb* 中完成,在牛结核病致病菌 *M.bovis* 和 BCG 菌株中 *sigH* 的功能研究未见报道。DU2 III和IV遗传型 BCG 菌株中 *sigH* 的过量表达,是否影响菌株致病性,尚缺乏直接实验验证。

为了验证 *sigH* 过表达与 BCG 菌株致病性之间的相关性,本研究构建了过表达 *sigH-rshA* 的重组 BCG China 和 BCG Japan 菌株,利用巨噬细胞感染试验和 SCID 小鼠感染试验评价重组菌株致病性。通过这些研究,将为卡介苗菌株中 *sigH* 基因调控模式的解析、不同卡介苗菌株间特异性免疫机制的探索提供重要线索,也为开发

更安全更有效的新型 BCG 疫苗提供候选菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

7-8 周龄雌性无特定病原体 (specific pathogen free, SPF)级 SCID 小鼠,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,并饲养于复旦大学附属金山公卫中心动物房。本研究符合《实验动物管理条例》,获得金山公共卫生临床中心伦理委员会的批准(公卫伦审号:2021-A063-02)。所有小鼠实验均在装有空调的动物房中饲养,光/暗调控以每 12 h 循环进行,每日自由进食饮水。

1.1.2 细胞系和菌株

鼠源巨噬细胞 J774A.1, 本实验室保存。

BCG-China 菌种(DU2 III型,含有 15 765 bp 的重复序列)、BCG-Japan 菌种(DU2 I型,不含 15 765 bp 的重复序列),由本实验室保存。

BCG-Pasteur 基因组,由本实验室保存。

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 菌株,北京全式金生物技术有限公司。

pCherry 大肠杆菌-分枝杆菌穿梭表达质粒,为本实验室保存。

1.1.3 目标基因扩增引物设计

根据质粒 pCherry (pCherry 质粒含有 mCherry 红色荧光蛋白,蛋白末端添加 6 个 His-tag)的图谱及 *Mycobacterium bovis.fasta* (下载于 Uniprot)中 *sigH-rshA* 序列片段选择合适的酶切位点并设计位点特异性引物,如表 1 所示。由生工生物工程(上海)股份有限公司合成引物。

表 1 卡介苗中 *sigH-rshA* 片段特异性引物

Table 1 *sigH-rshA* fragment-specific primers in BCG

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Application
<i>sigH-rshA-NdeI-F</i>	CCGCCGCCGCATATGATGGCCGACATCGATGGGTGTA	Gene
<i>sigH-rshA-his-NheI-R</i>	TATGCTAGCCTAATGGTGATGGTGATGATGGGGCCCTCCACGGATGAT	amplification
<i>sigH-rshA-F</i>	ATGGCCGACATCGATGGGTGTA	RT-PCR
<i>sigH-rshA-R</i>	CAGGCCTTGAGATTGGTACCG	

1.1.4 主要仪器和试剂

ADC 增菌液、OADC 增菌液, BD 公司; Cell Counting Kit-8 (CCK-8)试剂盒, 同仁化学公司; Bio-Rad 电穿孔仪, Bio-Rad 公司; Applied Biosystems ProFlex PCR 仪, Thermo Fisher 公司; TransStart® FastPfu Fly DNA Polymerase, 北京全式金生物技术有限公司。

电子分析天平 BSA124S-CW, Sartorius 公司; 紫外凝胶成像仪, UVP 公司; 垂直电泳仪, Bio-Rad 公司; Purifier Logic TM Series Biological Safety Cabinets, Labconco 公司; 超低温冰箱, Thermo scientific 公司; 台式冷冻离心机 5424R/5810R, Eppendorf 公司; 温控摇床 Excella E24, New Brunswick Scientific, Eppendorf 公司; VORTEX-2 GENIE 振荡仪, Scientific Industries 公司; 隔水式 CO₂ 培养箱, Thermo Scientific 公司; 隔水式恒温培养箱 GNP-9160, 上海精宏实验设备有限公司。

1.2 BCG 菌株的培养

BCG 从 7H10 平板上挑取单菌落或者从 -80 °C 冰箱取出, 按照 2% 比例接种到含有 10% ADC 和含有 0.2% 甘油的 Middlebrook 7H9 Broth (同时添加 0.01% 的 Tween-80) 中, 在 37 °C 的恒温摇床中培养 2-4 周, 转速 180 r/min。待 OD₆₀₀ 值达到 0.5 时, 8 000 r/min 室温离心收集菌体, 同时用 PBS/0.01% Tween-80 洗涤菌体 3 次。用 10% 甘油的 PBS/0.01% Tween-80 重悬, 制备单细胞悬液, 并用冻存管进行分装和 -80 °C 冰箱冻存储用。

1.3 重组 BCG-China 和 BCG-Japan 的构建

以本课题组保存的 BCG Pasteur 基因组为模板, 用 TransStart® FastPfu Fly DNA Polymerase 扩增目标片段。PCR 产物利用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离目的条带, 并按 Axygen 胶回收试剂盒方法回收。将纯化得到的 PCR 产物以及相应的

载体用 *EcoR* I-HF 和 *Hind* III-HF 内切酶进行酶切反应, 37 °C 酶切 1 h 后进行回收纯化。用 T4 DNA ligase 连接, 转化进入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 涂布于含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板上, 37 °C 条件下倒置培养过夜。

从转化平板上挑取带红色荧光的阳性克隆, 扩增提取质粒, *Nde* I-HF 酶切验证后, 将鉴定得到的阳性重组质粒送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

用预冷的 10% 甘油 50 mL 洗涤 BCG-China、BCG-Japan 菌体制备卡介苗感受态细胞。4 °C、3 500 r/min 离心 10 min, 重复洗涤 3 次后, 用 5 mL 预冷的 10% 甘油重悬菌体, 分装至 1.5 mL 无菌的 EP 管中。取 420 μ L 感受态细胞, 分别加入测序正确阳性克隆质粒及 pCherry \geq 2 μ g, 混合均匀后转移至预冷好的电转杯内并置于冰上孵育 10 min。电转条件为: 2.5 kV, 25 μ FD, 1 000 Ω 。离心, 弃去上清后 100 μ L 7H9 完全培养基重悬后均匀涂布于含 25 μ g/mL 卡那霉素的 7H10 完全培养基上, 37 °C 培养箱倒置培养 3-4 周。

Western blotting 及 RT-PCR 验证目标基因片段表达。

1.4 目标基因转录水平鉴定

分别取培养至对数期的重组菌悬液 2 mL, 加入 1/4 体积的石英砂, 并加入 800 μ L 的 Trizol 重悬的菌体, 5 500 r/min, 20 s/次, 4 次, 每次间隔 5 min, 振荡破裂菌体。用氯仿-异丙醇法, 提取细菌总 RNA, 溶于 DEPC 水中。经去除基因组的反应混合液, 以 PrimeScript RT Enzyme Mix I 反转录得到 cDNA。利用 1.1 的特异性引物进行目的片段的扩增以检测是否回补成功。

1.5 目的蛋白表达验证

挑取电转成功的 BCG 重组菌株单克隆至 5 mL 含相应抗生素的 7H9 液体完全培养基中,

37 °C、180 r/min 振荡培养至对数期, 3 500 r/min 离心 10 min, 弃上清后, 使用 250 μ L PBS 重悬菌体, 含有对应空质粒的 BCG 菌株作为对照。冰浴超声裂解细菌。12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 使用 Bro-Rad Bradford 对上清中的总蛋白进行定量。取 20 μ g 总蛋白进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳。结束后用 Bio-Rad 转膜系统将蛋白从 PAGE 胶转移至 PVDF 膜。一抗用 His 标签抗体室温孵育 1 h。按推荐比例稀释辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP) 偶联的鼠抗作为二抗孵育, 用 PBS 洗去膜上残存的 TBST, 显色曝光。

1.6 重组 BCG 体外生长曲线测定

每株重组 BCG 挑取 3 个单克隆分别接种至 5 mL 含 25 μ g/mL 卡那霉素抗性的 7H9 液体完全培养基中置于 37 °C 摇床中培养 OD_{600} 值为 1.0。每管细菌接种扩培至 60 mL 含 25 μ g/mL 卡那霉素抗性的 7H9 液体完全培养基中, 调整每瓶菌液的初始 OD_{600} 值为 0.03。置于 37 °C 摇床中培养并记录 OD_{600} 值, 以新鲜的 7H9 完全培养基培养做对照用。连续培养细菌 20 d 后根据测得的 OD_{600} 值绘制细菌的生长曲线。

1.7 重组 BCG 在巨噬细胞内生长能力比较

在 37 °C 预热的含 10% FBS 的 DMEM 培养基中复苏小鼠来源的巨噬细胞 J774A.1, 置于 37 °C 二氧化碳细胞培养箱中培养。细胞传代 2-3 次后计数和铺板, 按照 24 孔板 1×10^5 个细胞, 1 mL DMEM+10% FBS/孔, 培养过夜进行细菌感染试验。重组 BCG 按照不同的感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 各自加入细胞中, 阴性对照加入等体积的无菌 $1 \times$ PBST (加入的体积 $\leq 100 \mu$ L), 再置于 CO_2 培养箱中共同培养 4 h。培养基换成含 10 U 链霉素-青霉素 1 mL DMEM+10% FBS。感染后 4、24、48、72、96 及 120 h, 用 0.025% 的 SDS 裂解细胞, 细胞裂

解液用无菌的 $1 \times$ PBST 梯度稀释后涂板于含有 25 μ g/mL 卡那霉素抗性的 7H10 完全固体培养基上计 CFU。

1.8 CCK-8 细胞活力检测试验

J774A.1 细胞按照 1×10^4 个细胞, 100 μ L/孔铺板于 96 孔板中, 在侵染的不同的时间点: 4、8、12、24、48、72、96、120 及 144 h 分别使用 CCK-8 试剂盒来测定细胞活力。避光孵育 2-3 h, 用酶标仪测定 A_{450} 值。每个组别每个时间点设置 4 个复孔。数据处理: 弃掉每组中较大偏差的值后, 算出对照组的平均值(公式 1)。细胞活力(%) = $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白}}) \times 100$ (1)

1.9 巨噬细胞 TNF- α 的检测

依照 1.7 中方法进行细胞侵染, 于感染后 4、8、12、24、48、72、96、120 及 144 h 分别收集细胞上清, 使用达科为公司 TNF- α cytokine Kit 测定细胞因子。重复侵染试验, 测定方法依照试剂盒说明书。

1.10 重组 BCG 毒力评价-SCID 小鼠模型

7-8 周龄的雌性 SCID 小鼠, 随机分笼, 每组 25 只小鼠(15 只用于体重测定和存活试验, 10 只用于肺脾载菌量测定)。SPF 级别鼠房适应一周后, 用新制备的重组 BCG 的单菌悬液尾静脉注射, 每只小鼠预计免疫 10^6 CFU (注射体积为 100 μ L, PBS 稀释)。在注射前, 及注射后每周时间点, 对每只小鼠进行称重记录, 空白对照组注射等体积 PBS。注射第 2 天每组取 2 只小鼠颈椎脱臼处死, 取脾和肺匀浆后进行梯度稀释涂板计算实际感染剂量。注射后第 1 周及第 4 周每组取 4 只小鼠颈椎脱臼处死, 取小鼠脾和肺匀浆, 梯度稀释涂布于含 25 μ g/mL 的 7H10 平板上, 37 °C 培养箱内倒置培养 3-4 周后记录各组小鼠的肺脾载菌量。

1.11 统计学方法

所有数据通过 GraphPad Prism8 软件进行

处理, 数据表现方式为 Mean±SD, $P < 0.05$, 表示差异有统计学意义 (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$)。

基因表达结果的灰度分析使用 *t*-test 进行组间差异结果检验; BCG 在 J774A.1 细胞内增殖以及对细胞因子分泌影响的试验结果用 two-way ANOVA with Bonferroni comparison test 进行组间差异结果检验; 小鼠体重变化以及小鼠组织载菌量试验结果用 one-way ANOVA with Bonferroni comparison test 进行组间差异结果检验; 小鼠生存曲线结果用 log-rank test 进行组间差异结果检验。

2 结果与分析

2.1 过表达 *sigH-rshA* 的重组 BCG Japan、BCG China 菌株验证

为了探索 *sigH-rshA* 基因过表达对 BCG 的

影响, 我们选择 DU2-III 的 BCG-China 与 DU2-I 的 BCG-Japan 为母体菌株。将包含空 pCherry 质粒载体的重组菌株 (pCherry-C, pCherry-J) 作为本研究的阴性野生对照菌株, 以消除外源质粒对细菌的影响。需要说明的是, pCherry-C 和 pCherry-J 与其对应的 BCG-China 和 BCG-Japan 母体菌株相比, 在细菌形态和生长特征上均无显著性差异。因此, 本研究采用分别过表达目标基因和空载体的 StR-和 pCherry-菌株探索 *sigH-rshA* 基因功能。

图 1A 通过琼脂糖凝胶电泳证明, 在重组菌株中 *sigH* 基因转录水平提高。以目标基因条带相对 16S rRNA 内参基因的灰度比值, 定量化验证这种变化, 图 1B 显示 *sigH* 基因高表达菌株构建成功, 同时证明 BCG-China 菌株中 *sigH* 基因本底表达显著高于 BCG-Japan 中。进一步利用 His 标签抗体验证外源 SigH-RshA 蛋白水平,

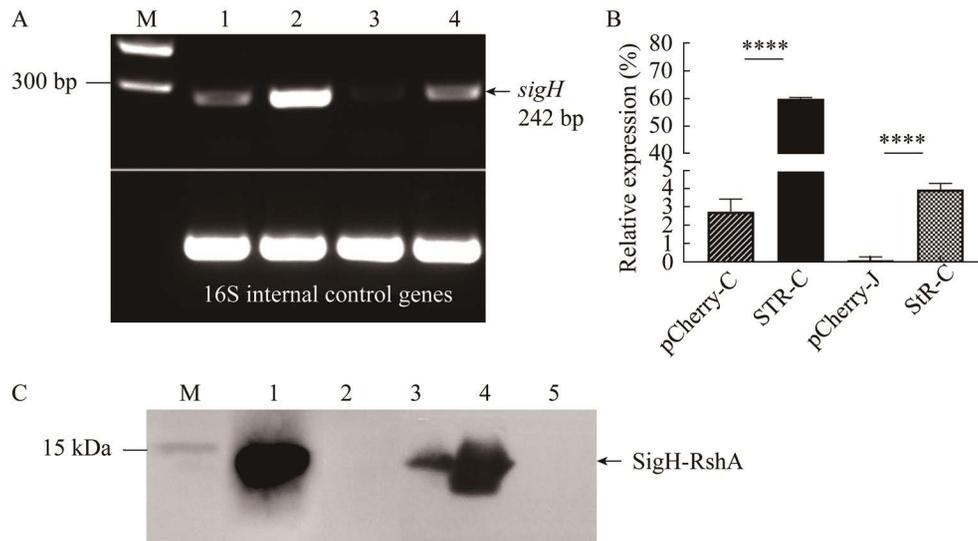


图 1 重组 BCG 中 *sigH-rshA* 基因高表达的鉴定

Figure 1 Identification of high expression of *sigH-rshA* gene in recombinant BCG. A: The results of gene expression level verification. 1, 2: The expression results of pCherry-C and StR-C, respectively; 3, 4: The expression results of pCherry-J and StR-J, respectively. B: Grayscale analysis results of gene expression levels, the ordinate value represents the relative grayscale value of the target gene expression level compared with the reference gene, data from three biological replicates, Mean±SD, *t*-test (***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$). C: The verification of the protein expression level in recombinant BCG. 1, 2: The expression results of StR-C and pCherry-C respectively; 3, 4: The expression results of StR-J respectively; 5: The expression results of pCherry-J.

图 1C 证明 StR-C 和 StR-J 中外源蛋白能够大量表达。泳道 3、4 代表 StR-J 的 2 个不同克隆, 后续相关试验选用表达量较高的泳道 4 所对应的 StR-J 克隆。由于细菌本底表达的 SigH-RshA 蛋白不含 His 标签, 泳道 2 和 5 所代表的 pCherry-C 和 pCherry-J 菌株未能显示杂交条带。总之, 过表达 *sigH-rshA* 的重组 BCG-China、BCG-Japan 菌株构建成功。

2.2 过表达 *sigH-rshA* 的重组 BCG-Japan、BCG-China 菌株体外生长比较

为了确定 *sigH-rshA* 的过表达是否影响卡介苗的体外生长, 通过测定不同培养时间点细菌培养液 OD_{600} 值, 绘制菌株生长曲线(图 2)。根据比浊法结果发现重组菌株及其对照株均经历了延迟期、对数期、稳定期等典型的微生物生长时期, 同时两组过表达菌株在稳定期的菌液 OD_{600} 值都要高于对照组。在稳定期, 由于细菌数量达到较高水平, 培养环境变得相对缺氧和贫营养, 与胞内的环境条件类似, 图 2 的结果表明, *sigH-rshA* 基因的高表达可能有利于细菌在细胞内生长。

2.3 过表达 *sigH-rshA* 的重组 BCG China 菌株感染巨噬细胞比较

为了验证上述假说, 我们制备重组 BCG 单

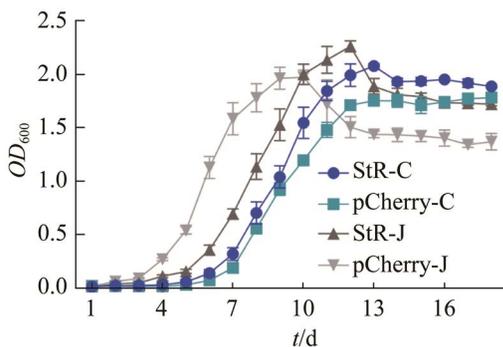


图 2 重组 BCG 的体外生长曲线

Figure 2 *In vitro* growth curve of recombinant BCG. Growth curves of StR-C, StR-J and pCherry-C, pCherry-J plotted according to turbidity, Mean \pm SD, data from three biological replicates.

细胞悬液刺激 J774A.1 细胞, 以确定 StR-C 菌株在稳定期的生长优势是否与其在巨噬细胞内增殖相一致。感染 4 h 后洗掉细胞外未被吞噬的游离细菌, 使用含 10 U 链霉素-青霉素的 1 mL DMEM+10% FBS 杀死胞外细菌, 取一部分细胞裂解后涂板计算进入胞内的细菌 CFU。在新鲜培养基中继续培养细胞至 120 h, 每 24 h 取样计数细菌数量。统计分析发现, SigH-RshA 蛋白过表达, 对巨噬细胞的吞噬能力均无影响, 但能够显著促进重组 BCG 的胞内增殖(图 3)。

我们利用 Cell Counting Kit-8 试验比较重组 BCG-China 菌株感染后巨噬细胞的增殖及活细胞数目变化, 发现感染了重组 BCG-China 组与感染对照株组在各个时间点无显著性差异, 表明 SigH-RshA 的过表达不影响巨噬细胞的增殖, 可继续开展细胞感染或动物感染试验。巨噬细胞在吞噬病原体的同时, 可通过分泌一些细胞因子来增强杀伤作用。TNF 是具有多种生物效应的细胞因子, 通过与特异性受体结合后促进细胞的生长、诱发炎症反应等发挥出生物

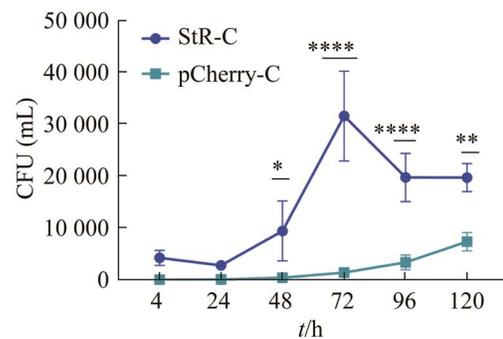


图 3 StR-C 和 pCherry-C 在 J774A.1 细胞内的增殖
Figure 3 Proliferation of StR-C and pCherry-C in J774A.1 cells. After *sigH-rshA* overexpressed BCG-China infected J774A.1 cells, their intracellular proliferation was continuously monitored. The experiment was repeated twice, the results of the two experiments were consistent, and each experiment contained at least 3 biological replicates, Mean \pm SD, two-way ANOVA with Bonferroni comparison test (*: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.0001$).

效应。图 4 表明, 在 MOI=10 时, SigH-RshA 过表达的重组 BCG 感染后会刺激巨噬细胞产生更程度的 TNF- α 分泌。

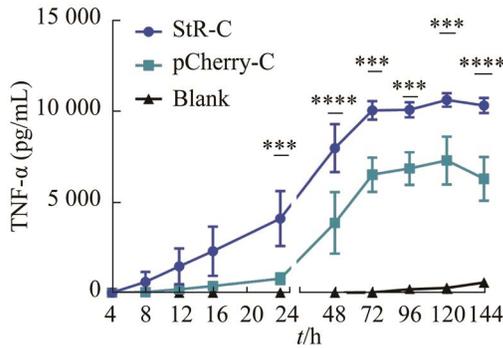


图 4 StR-C 和 pCherry-C 感染对 J774A.1 细胞 TNF- α 分泌的影响

Figure 4 Effects of StR-C and pCherry-C infection on the secretion of TNF- α in J774A.1 cells. Data from at least 3 biological replicates, Mean \pm SD, two-way ANOVA with Bonferroni comparison test (***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$).

2.4 过表达 sigH-rshA 的重组 BCG-China 菌株的安全性评价

以 T、B 细胞联合免疫缺陷的 SCID 小鼠为模型, 尾静脉注射重组 BCG-China 后观察小鼠的生理活动, 感染后每周记录小鼠的体重变化和存活情况。感染后第 2 天每组处死 2 只小鼠, 第 1 周和第 4 周每组随机处死 4 只小鼠, 分别取肺和脾脏, 统计组织中的活菌载量。菌株的安全性评估共开展了 2 次独立重复试验, 重复试验结果趋势一致。

结果显示, SigH-RshA 蛋白过表达不会影响 BCG-China 感染后 SCID 小鼠体重变化趋势, 但实验组和对照组同未感染组存在显著性差异。同时, 过表达 SigH-RshA 的重组 BCG 菌株感染 SCID 小鼠组, 大部分不到 16 周即死亡, 这组小鼠的平均存活时间为 58 d。相比之下, 含空载体的 BCG 对照株感染的 SCID 小鼠存活时间长, 一直持续到试验结束(19 周) SCID 小鼠才全部死亡, 2 组之间统计学差异显著。图 5 的

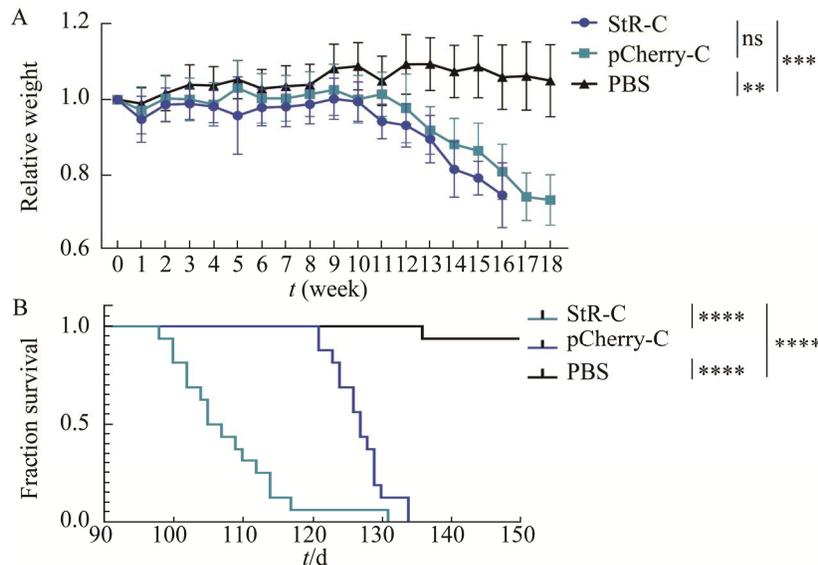


图 5 StR-C 和 pCherry-C 攻毒后 SCID 小鼠体重变化及生存曲线

Figure 5 Changes in body weight and survival curve of SCID mice after StR-C and pCherry-C challenge. A: Relative changes in body weight of SCID mice after StR-C and pCherry-C challenge, i.e., the body weight after challenge divided by the body weight before challenge. B: Survival curves of SCID mice after challenge with StR-C and pCherry-C. The weight change curve of SCID mice was analyzed by one-way ANOVA with Bonferroni comparison test, Mean \pm SD, and the survival curve of SCID mice was analyzed by log-rank test to analyze the difference between the survival curves of mice in each group (**: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$).

生存曲线表明 SigH-RshA 蛋白的过表达会增加 BCG 菌株毒力。

与此同时, 图 6 对肺和脾脏组织的活菌载量进行统计, 发现无论是感染 1 周 w 还是 4 周, 这 2 个组之间并没有显著性差异。脾组织中的活菌载量与肺组织具有相同的趋势。

3 讨论与结论

早在 2010 年, 世界卫生组织即公开强调卡介苗菌株间的不同, 针对不同 BCG 菌株间安全性、保护力变化的分子调控机制的研究获得了越来越多的关注, 发现了一些对卡介苗临床表现特征起决定作用的生物分子, 如 PDIM/PGL^[10]、*phoP*^[11]等。但现有的研究依然无法全面解析 BCG 菌株间存在的巨大临床差异。

位于 DU2 区的 *sigH* 基因与其抑制基因 *rshA* 在基因组上相连, 并共转录。在 *M.tb* 研究中发现, *sigH* 相关基因产物干预了宿主细胞的先天免疫, 通过减少趋化因子介导的免疫细胞招募, 阻止细胞凋亡, 增强了菌体在细胞内存活复制能力^[12]。敲除 *sigH* 基因的 *M.tb*Δ*sigH* 免疫恒河猴之后, 引起内间质形成的诱导型气管

相关淋巴细胞(iBALT)的招募, 同时在肺部激起强于 BCG 的中央记忆 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞反应。攻毒保护试验结果表现出良好的免疫效果^[7]。

BCG 中 *sigH* 与 *rshA* 的编码核苷酸与 *M.tb* 完全相同, 且除 RD1、RD2 区缺失外, BCG 基因组与 *M.tb* 基因组高度近似, 暗示在致病性结核分枝杆菌和卡介苗菌株中, *sigH-rshA* 分子对的生理功能值得相互借鉴。

对不同 BCG 菌株的基因组比较分析显示, BCG-China 株 DU2 重复中包含双拷贝 *sigH-rshA* 基因, 而 BCG-Japan 株中只有单拷贝, 推测在 2 株 BCG 菌株中 *sigH* 与 *rshA* 的表达量存在差异^[13]。同时, 在实验动物水平也发现 BCG-China 的毒力也远高于 BCG-Japan 株^[2]。为了探索 *sigH-rshA* 分子对的高表达与 BCG 菌株致病力的相关性, 进一步挖掘卡介苗菌株遗传异质性与其疫苗学效果之间的关键因子, 本研究以这 2 株 BCG 菌株为出发菌株, 成功构建了高表达 *sigH-rshA* 分子的重组 BCG。与对照组及 PBS 组相比, 重组 BCG-Japan 菌株感染 SCID 小鼠后, 不会改变小鼠生存曲线及体重, 推测由于 BCG-Japan 菌株的本底毒力太弱, *sigH-rshA*

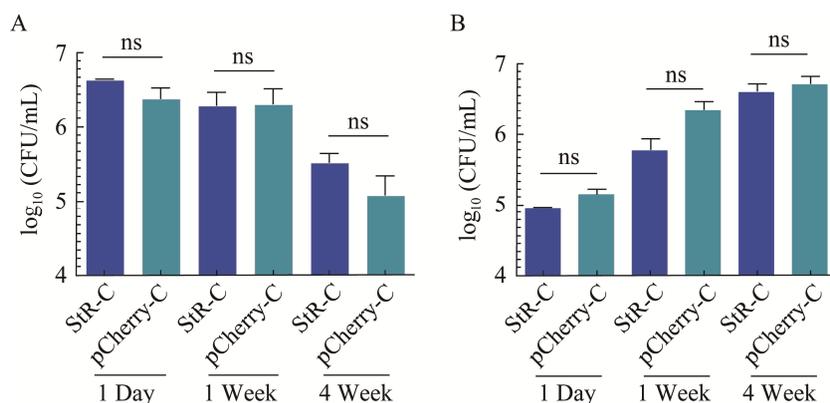


图 6 感染重组 BCG-China 菌株的 SCID 小鼠组织载菌量

Figure 6 The bacterial load of SCID mice infected with recombinant BCG-China strain. Viable bacterial load in lung tissue (A) and spleen tissue (B), data analyzed by one-way ANOVA with Bonferroni comparison test, Mean±SD ($n=4$).

过表达对 BCG 致病力提高的程度不足以在动物水平上反映出来。而 BCG-China 中 *sigH-rshA* 的高表达能显著提高巨噬细胞 TNF- α 的分泌及对免疫缺陷小鼠的致病力。这些结果与 *M.tb* 中的实验结果一致^[12], 如 Safi 等证实, SigH 高表达的 *M.tb* 突变体, 在感染的小鼠肺部毒力增加, 并被认为是与药物耐受性、治疗失败和人类结核病复发相关^[14]。*sigH* 参与的调控机制研究不多, 除去氧化和热休克相关蛋白调控之外^[15], 有证据表明 *sigH* 参与调控其余的 sigma 因子, 如 sigE、sigB^[2,6], 同时, SigH 蛋白的 Arg26、Gln19、Asp18 残基能与 *M.tb*-RNAP β 亚基的 Arg137、Gln140、Arg152、Asn133 和 Asp144 残基结合, 影响细菌 RNA 聚合酶活性^[7]。上述作用机理的研究都集中在致病性 *M.tb* 中, *sigH-rshA* 对 BCG 疫苗的毒力调控机制, 还需要进一步实验探索。

本研究将有助于深入理解卡介苗菌株遗传变化与其疫苗学差异之间的内在联系, 为新型重组卡介苗改造提供实验基础。后续实验将在 BCG 中探索 *sigH-rshA* 的遗传调控通路, 并利用小鼠或豚鼠模型, 获得更多疫苗学研究信息, 为抗结核新型疫苗的开发提供创新基础。

参考文献

- [1] TUFARIELLO JM, CHAN J, FLYNN JL. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2003, 3(9): 578-590.
- [2] ZHANG L, RU HW, CHEN FZ, JIN CY, SUNRF, FAN XY, GUO M, MAI JT, XU WX, LIN QX, LIU J. Variable virulence and efficacy of BCG vaccine strains in mice and correlation with genome polymorphisms[J]. *Molecular Therapy*, 2016, 24(2): 398-405.
- [3] BREWER TF. Preventing tuberculosis with *Bacillus calmette-guérin* vaccine: a meta-analysis of the literature[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2000, 31(Supplement_3): S64-S67.
- [4] Organization WH. Global tuberculosis report 2021. *World Health Organisation*, 2021.
- [5] WATERS WR, PALMER MV, BUDDLE BM, VORDERMEIER HM. Bovine tuberculosis vaccine research: historical perspectives and recent advances[J]. *Vaccine*, 2012, 30(16): 2611-2622.
- [6] BEHR MA, WILSON MA, GILL WP, SALAMON H, SCHOOLNIK GK, RANE S, SAMLL PM. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray[J]. *Science*, 1999, 284(5419): 1520-1523.
- [7] RAMAN S, SONG T, PUYANG X, BARDAROV S, JACOBS WR JR, HUSSON RN. The alternative *Sigma factor* SigH regulates major components of oxidative and heat stress responses in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(20): 6119-6125.
- [8] GALAGAN JE, MINCH K, PETERSON M, LYUBETSKAKY A, AZIZI E, SWEET L, GOMES A, RUSTAD T, DOLGANOV G, GLOTOVA I, ABEEL T, MAHWINNEY C, KENNEDY AD, ALLARD R, BRABANT W, KRUEGER A, JAINI S, HONDA B, YU WH, HICKEY MJ, et al. The *Mycobacterium tuberculosis* regulatory network and hypoxia[J]. *Nature*, 2013, 499(7457): 178-183.
- [9] KAUSHAL D, FOREMAN TW, GAUTAM US, ALVAREZ X, ADEKAMBI T, RANGEL-MORENO J, GOLDEN NA, JOHNSON AM F, PHILLIPS BL, AHSAN MH, RUSSELL-LODRIGUE KE, DOYLE LA, ROY CJ, DIDIER PJ, BLANCHARD JL, RENGARAJAN J, LACKNER AA, KHADER SA, MEHRA S. Mucosal vaccination with attenuated *Mycobacterium tuberculosis* induces strong central memory responses and protects against tuberculosis[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 8533.
- [10] CHEN JM, ISLAM ST, REN HP, LIU J. Differential productions of lipid virulence factors among BCG vaccine strains and implications on BCG safety[J]. *Vaccine*, 2007, 25(48): 8114-8122.
- [11] LEUNG AS, TRAN V, WU ZW, YU XP, ALEXANDER DC, GAO GF, ZHU BL, LIU J. Novel genome polymorphisms in BCG vaccine strains and impact on efficacy[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 413.
- [12] DUTTA NK, MEHRA S, MARTINEZ AN, ALVAREZ X, RENNER NA, MORICI LA, PAHAR B, MACLEAN AG, LACKNER AA, KAUSHAL D. The

stress-response factor SigH modulates the interaction between *Mycobacterium tuberculosis* and host phagocytes[J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e28958.

- [13] BROSCHE R, GORDON SV, GARNIER T, EIGLMEIER K, FRIGUI W, VALENTI P, DOS SANTOS S, DUTHOY S, LACROIX C, GARCIA-PELAYO C, INWALD JK, GOLBY P, GARCIA JN, HEWINSON RG, BEHR MA, QUAIL MA, CHURCHER C, BARRELL BG, PARKHILL J, COLE ST. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(13): 5596-5601.
- [14] SAFI H, GOPAL P, LINGARAJU S, MA SY, LEVINE C, DARTOIS V, YEE M, LI LP, BLANC L, HO LIANG HP, HUSAIN S, HOQUE M, SOTEROPOULOS P, RUSTAD T, SHERMAN DR, DICK T, ALLAND D. Phase variation in *Mycobacterium tuberculosis glpK* produces transiently heritable drug tolerance[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(39): 19665-19674.
- [15] KHAN MZ, SINGHA B, ALI MF, TAUNK K, RAPOLE S, GOURINATH S, NANDICOORI VK. Redox homeostasis in *Mycobacterium tuberculosis* is modulated by a novel actinomycete-specific transcription factor[J]. *The EMBO Journal*, 2021, 40(14): e106111.