

结核分枝杆菌 *Rv0757* 基因的原核表达及其编码蛋白对巨噬细胞功能的影响^{*}

杨玉涛, 鲍朗[△], 谷冬晴, 陈卫

四川大学华西基础医学与法医学院 感染免疫研究室(成都 610041)

【摘要】 目的 构建结核杆菌 *Rv0757* 基因原核表达重组质粒 pET28a-*Rv0757*, 并研究表达的目标蛋白对小鼠骨髓巨噬细胞株 ANA-1 细胞的作用。**方法** 将扩增出的 *Rv0757* 基因重组到原核表达质粒 pET28a(+), 并通过 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定诱导表达的目的蛋白。纯化目标蛋白后将目标蛋白 PhoP 作用于小鼠 ANA-1 细胞, 检测活细胞数、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、一氧化氮(NO)和细胞凋亡指标。**结果** 成功构建出 pET28a-*Rv0757* 原核表达质粒, 诱导表达的目标蛋白经 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定分析, 其相对分子质量约为 32×10^3 。目的蛋白作用于小鼠 ANA-1 细胞后对活细胞数和细胞上清 LDH 活力无明显影响, 但可以明显抑制细胞释放 NO 和细胞凋亡。**结论** 本研究成功构建了原核表达载体 pET28a-*Rv0757*, 并成功表达出目标蛋白, 该蛋白对小鼠 ANA-1 细胞没有毒性损伤, 但可以抑制细胞释放 NO 和细胞的凋亡。

【关键词】 结核分枝杆菌 *Rv0757* 基因 PhoP 蛋白 巨噬细胞功能

Prokaryotic Expression of *Rv0757* Gene in *Mycobacterium tuberculosis* and the Effect of Its Coding Protein on the Function of Macrophage YANG Yu-tao, BAO Lang[△], GU Dong-qing, CHEN Wei. *Research Unit of Infection and Immunity, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China*

△ Corresponding author, E-mail: baolang@scu.edu.cn

【Abstract】 Objective To construct recombinant plasmid pET28a-*Rv0757* with *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) *Rv0757* gene, and to determine the effect of the protein of *Rv0757* gene on ANA-1 cells. **Methods** We recombined the amplified *Rv0757* gene into the prokaryotic plasmid pET28a(+). The expressed product was identified by SDS-PAGE and Western blot. Murine macrophages were treated with purified protein PhoP. Survived cells, lactic dehydrogenase (LDH), nitric oxide (NO), and cell apoptosis were detected after the treatment. **Results** We successfully constructed the recombinant plasmid pET28a-*Rv0757*. The target protein was confirmed by SDS-PAGE and Western blot. The protein had no significant effect on cell numbers and LDH activities in the culture supernatant, but it inhibited the release of NO and apoptosis of ANA-1 cells. **Conclusion** pET28a-*Rv0757* plasmid with prokaryotic expression was successfully constructed. The target protein has no toxicity on macrophages, but it can inhibit NO release and cell apoptosis of ANA-1.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis* *Rv0757* gene PhoP protein Macrophage function

结核杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, *Mtb*)是结核病的病原菌,由结核杆菌引起的结核病是一种以呼吸道为主要传播途径,严重危害人类健康的传染病。WHO 估计,2011 年有 870 万新发结核病病例,因结核病而死亡的有 140 万人^[1]。结核病的发病率、病死率因为近年耐药、多重耐药结核菌株的不断出现,加之艾滋病的流行而一直处于上升的趋势^[2-4]。因此从结核病的致病菌入手,研究其内在的免疫机制、毒力相关因子以及其基因、蛋白的相互

作用,对了解结核病的发生、发展和转归有重要的意义。

细菌的致病性主要与它分泌毒力相关因子能力的大小有关,分泌相关毒力因子的能力越大,细菌的致病性就越强。双组份系统(two-component systems, 2CS)由组氨酸激酶(histidine kinase, HK)和反应调节器(response regulator, RR)两个基本组分构成。PhoP/R 双组份系统对结核杆菌的毒力具有重要作用,是结核杆菌 11 个双组份系统中重要的毒力调控基因^[5]。PhoP/R 由感受器 PhoR 和效应器 PhoP 组成。而在 PhoP/R 双组份系统中 PhoP 占有主导地位,PhoP 基因(*Rv0757*)对结核分枝杆菌 RD1 区毒力有关蛋白的分泌和结核杆菌毒

^{*} 国家重大传染病科技专项(No. 2012X10003008-004)和博士点基金(No. 20110981110046)资助

△ 通讯作者, E-mail: baolang@scu.edu.cn

力相关脂类的代谢等方面起到了重要的调控作用^[6]。本研究以原核表达质粒 pET28a(+)为载体,构建了 pET28a-Rv0757 原核表达质粒,并成功表达出了 PhoP 蛋白。PhoP 蛋白经过鉴定和纯化后作用于小鼠骨髓巨噬细胞株 ANA-1,探寻其对小鼠巨噬细胞的毒力作用和凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 大肠杆菌原核表达质粒 pET28a(+),结核分枝杆菌 H37Rv 国际标准株基因组及小鼠骨髓巨噬细胞株 ANA-1 均由本研究室常规保存;感受态细胞 *E. coli* BL21(DE3) pLysS 购自 Tiangen 公司。

1.1.2 主要试剂 Rv0757 基因引物:上海百力格公司产品;Taq Platinum DNA 聚合酶及 PCR 试剂盒、限制性内切酶 *Bam*H I 及 *Hind* III:Tiangen 公司产品;常规质粒提取试剂盒及 PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒:Omega 公司产品;蛋白纯化柱:GE 公司产品;细胞培养上清液乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒及细胞培养上清液一氧化氮(NO)检测试剂盒:南京建成公司产品;细胞毒性检测试剂盒(CCK-8):博士德公司产品;staurosporine 十字胞碱:Merck 公司产品。

1.2 目的基因的 PCR 扩增与纯化

Rv0757 基因上游引物(Ps)5'-CGgatccATGCGGAAAGGGGTTGATCT-3';下游引物(Pa)5'-CCCaagcttTCATCGAGGCTCCCGCAGTAC-3';Ps 与 Pa 5' 端分别引入 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点(小写部分)。扩增体系:ddH₂O:41 μ L,10 $\times$ Buffer I 5 μ L,dNTP Mixture (10 mmol/L) 1 μ L,Ps、Pa 各 1 μ L,H37Rv 株基因组 DNA 0.5 μ L,Taq Platinum DNA 聚合酶 0.5 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,52 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min 共 30 个循环,72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 扩增产物 Rv0757 用琼脂糖凝胶(10 g/L)电泳检测并纯化回收扩增产物。

1.3 重组质粒的构建及鉴定

目的基因 Rv0757 和表达载体 pET28a(+)用内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切并以 Cycle Pure Kit 纯化回收酶切产物。DNA 连接酶连接基因与质粒酶切产物并转化感受态细胞 *E. coli* BL21(DE3) pLysS。感受态细胞经 LB 平板培养及扩菌后菌液用 Plasmid Mini Kit I 试剂盒提取质粒。进行双酶切及 PCR 鉴定,同时进行基因测序。

1.4 蛋白的表达、纯化与鉴定

将测序结果完全正确的重组质粒菌液进行扩菌。吸取菌液接种于 LB 液体培养基(加入卡纳霉素至终浓度为 100 μ g/mL)于 37 $^{\circ}$ C 摇菌至菌液光密度(OD)值为 0.6 到 0.8 后加入异丙基硫代半乳糖苷(IPTG,终浓度为 50 μ mol/L)诱导 3 h。菌液用超声波破碎菌体以释放蛋白并离心菌液以收集上清和沉淀。采用带 His 标签的蛋白纯化柱纯化目的蛋白并将纯化后的蛋白进行 Western blot 分析鉴定。

1.5 PhoP 蛋白对 ANA-1 活细胞数、LDH 活力和释放 NO 的影响

将培养的小鼠巨噬细胞 ANA-1 经细胞计数调整为 1×10^6 /mL 后以 1 mL/孔加入 6 孔板中(测活细胞数为细胞计数调整为 1×10^5 /mL 并加至 96 孔板),并在细胞培养箱中培养 24 h。加入 PhoP 蛋白至终浓度为 0(对照)、10、50、100、150 μ g/mL,每个浓度蛋白各 5 孔。于 37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂ 培养 12 h [测活细胞数为滴加 CCK-8 溶液并继续在培养箱中孵育 1 h 后测定 450 nm 波长吸光度值(A₄₅₀)来代表活细胞的数目]后用检测试剂盒测定并计算 LDH 活力和细胞释放 NO 量。

1.6 PhoP 蛋白在 ANA-1 细胞凋亡中的作用

将培养的小鼠巨噬细胞 ANA-1 经过细胞计数调整为 1×10^6 /mL 后,以 1 mL/孔加入到 6 孔板中,并加入终浓度为 0(对照)、10、50、100、150 μ g/mL 的 PhoP 蛋白(每个浓度蛋白各 6 孔)。培养 24 h,加入凋亡促进剂(Staurosporine,终浓度为 1 μ mol/L,每个浓度蛋白各 3 孔)培养 12 h 后以流式细胞术检测凋亡。

1.7 统计学方法

实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 *t* 检验(方差齐)、*t'* 检验(方差不齐), $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Rv0757 基因 PCR 扩增后的检测

电泳结果显示目的基因大小约为 744 bp(与 NCBI 上 Rv0757 大小相同)。见图 1。

2.2 pET28a-Rv0757 质粒鉴定

酶切及 PCR 鉴定结果见图 2。测序结果表明重组入质粒 pET28a(+)的基因序列 Rv0757 与 NCBI 对比完全一致,并无突变。

2.3 PhoP 蛋白鉴定

见图 3、图 4。结果显示菌体上清液在相对分

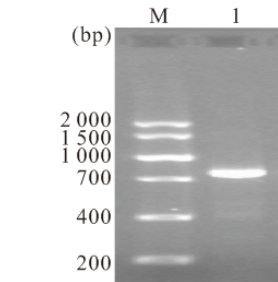


图 1 *Rv0757* 基因的 PCR 扩增

Fig 1 The *Rv0757* gene was amplified by PCR

M: Marker; 1: The PCR amplified products of *Rv0757*

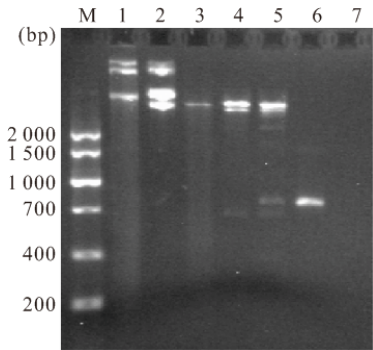


图 2 阳性重组质粒 pET28a-*Rv0757* 的酶切鉴定和 PCR 鉴定
Fig 2 The positive recombinant plasmid pET28a-*Rv0757* was identified by digestion of the incision enzyme and PCR

M: Marker; 1: pET28a(+); 2: pET28a-*Rv0757*; 3: pET28a(+) digested by *Bam*H I; 4: pET28a-*Rv0757* digested by *Bam*H I; 5: pET28a-*Rv0757* digested by *Bam*H I and *Hind* III; 6: PCR amplification from pET28a-*Rv0757*; 7: PCR amplification from pET28a(+)

子质量约为 32×10^3 处有明显的特异性条带。

2.4 PhoP 蛋白对 ANA-1 活细胞数、LDH 含量的影响

由表 1 可见,ANA-1 活细胞数及 LDH 含量并不随着 PhoP 蛋白浓度的变化而发生变化,与对照组比较差异均无统计学意义。

2.5 PhoP 蛋白对 ANA-1 细胞释放 NO 的影响

见表 1。不同浓度的 PhoP 蛋白作用于 ANA-1 细胞 12 h 后,NO 的含量呈现出下降趋势,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.6 PhoP 蛋白在 ANA-1 细胞凋亡中的作用

见表 2,图 5。不同浓度的 PhoP 蛋白作用于 ANA-1 细胞 24 h 后,ANA-1 细胞的凋亡并不随着

PhoP 蛋白浓度的变化而发生变化,与对照组相比差异均无统计学意义,再加 staurosporine 作用 12 h,发现 ANA-1 细胞的凋亡和仅加 staurosporine 的阳性对照组相比,呈下降趋势($P<0.05$),结果表明

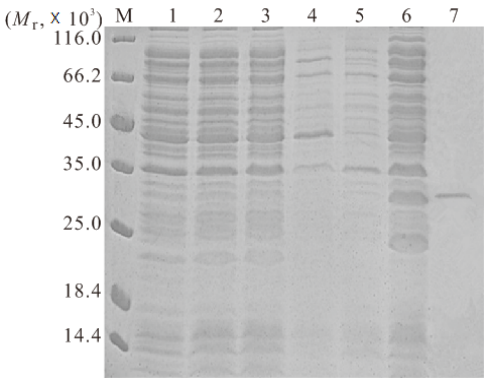


图 3 *Rv0757*(PhoP)蛋白的 SDS-PAGE

Fig 3 SDS-PAGE of the protein *Rv0757*(PhoP)

1: The supernatant of pET28a(+) with induced; 2: The precipitation of pET28a(+) with induced; 3: The supernatant of pET28a-*Rv0757* without induced; 4: The supernatant of pET28a(+) without induced; 5: The precipitation of pET28a(+) without induced; 6: The supernatant of pET28a-*Rv0757* with induced; 7: The *Rv0757* (PhoP) protein after purified

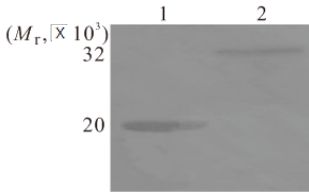


图 4 纯化后 *Rv0757*(PhoP)蛋白的 Western blot 分析

Fig 4 Western blot of the protein *Rv0757* (PhoP)

1: The supernatant of pET32a(+) with induced; 2: The *Rv0757* (PhoP) protein after purified

表 1 PhoP 蛋白对 ANA-1 活细胞数及释放一氧化氮量的影响

Table 1 Effect of PhoP protein on ANA-1 cell numbers and the release of nitric oxide

PhoP ($\mu\text{g/mL}$)	<i>n</i>	CCK-8 (A_{450})	LDH (mU/mL)	NO ($\mu\text{mol/L}$)
0	5	0.942 ± 0.029	$1\ 009.00\pm49.22$	96.33 ± 3.38
10	5	0.949 ± 0.040	$1\ 005.00\pm41.88$	$89.31\pm4.55^*$
50	5	0.951 ± 0.029	988.00 ± 57.75	$75.46\pm2.44^*$
100	5	0.989 ± 0.065	999.00 ± 49.36	$63.37\pm1.68^*$
150	5	0.936 ± 0.028	$1\ 007.00\pm32.69$	$59.48\pm1.98^*$

* $P<0.05$, vs. control group (PhoP 0 $\mu\text{g/mL}$)

表 2 PhoP 蛋白对 ANA-1 细胞凋亡的影响(%)

Table 2 The effect of PhoP protein on cell apoptosis of ANA-1 cells (%)

Staurosporine	PhoP protein				
	0 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	150 $\mu\text{g/mL}$
—	3.70 ± 1.13	4.45 ± 0.78	2.85 ± 0.78	2.75 ± 0.07	2.65 ± 0.07
+	31.25 ± 0.49	25.55 ± 7.71	22.35 ± 2.33	$16.95\pm0.64^*$	$11.75\pm0.35^*$

* $P<0.05$, vs. positive control group (0 $\mu\text{g/L}$ PhoP protein with staterosporine)

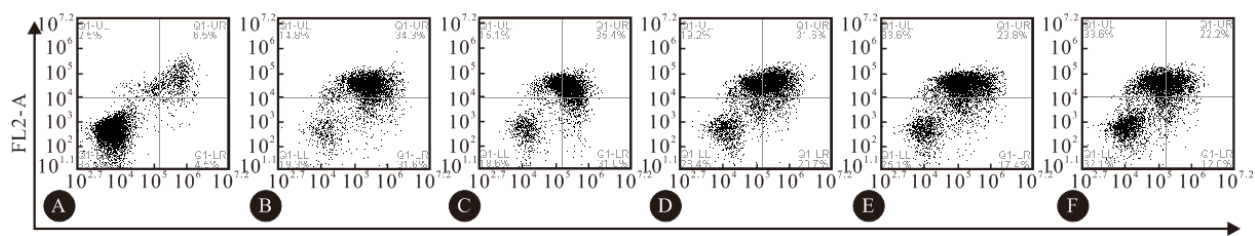


图 5 流式细胞术检测 PhoP 蛋白在 ANA-1 细胞凋亡中的作用

Fig 5 The role of phop protein in cell apoptosis of ANA-1 detected by flow cytometry

A: Blank control; B: Positive control; C, D, E, F: 10, 50, 100, 150 $\mu\text{g/mL}$ PhoP protein with staurosporine

该蛋白能抑制 staurosporine 所引起的凋亡。

3 讨论

结核杆菌主要在细胞内发挥其致病作用,目前认为其主要宿主细胞为巨噬细胞^[7]。由于巨噬细胞既有抗原提呈功能,又有吞噬杀菌的能力,因此当某些因素导致巨噬细胞的功能被抑制,失去其杀菌能力时,巨噬细胞即成为结核杆菌的藏身之处,从而能够逃避机体的防御过程;而躲过机体免疫监视和防御系统的结核分枝杆菌就会在适当的时机迅速繁殖进而破坏机体的健康。结核分枝杆菌 PhoP 蛋白是 OmpR/PhoB 亚家族的反应调控子,其蛋白结构由一个 N 端接受区域和一个 C 端 DNA 结合区域组成^[8],对结核杆菌的毒力至关重要,是结核杆菌重要的毒力调控因子。为研究 PhoP 蛋白对巨噬细胞的生物学作用,我们扩增出编码 PhoP 蛋白的 *Rv0757* 基因,并利用 pET28a(+) 作为载体表达出 *Rv0757* 基因所编码的 PhoP 蛋白。进而将 PhoP 蛋白作用于小鼠巨噬细胞 ANA-1,利用 CCK-8 试剂盒和 LDH 试剂盒分别检测 ANA-1 细胞活细胞数目和细胞培养上清液 LDH 的活性,以检测 PhoP 蛋白对细胞的毒性影响。结果发现 ANA-1 细胞中活细胞数和细胞培养上清液中 LDH 的活性无显著变化,说明 PhoP 蛋白对小鼠巨噬细胞并没有毒性损伤作用。

人巨噬细胞释放的 NO 具有杀伤结核分枝杆菌的作用。在本研究中我们发现,随着 PhoP 蛋白浓度的升高,巨噬细胞 ANA-1 释放 NO 的量呈现递减趋势,说明 PhoP 蛋白对巨噬细胞 ANA-1 释放 NO 具有一定的抑制作用。提示 PhoP 蛋白可能通过抑制 ANA-1 释放 NO,而对结核分枝杆菌起到一定的保护作用。

在感染病原体后诱导巨噬细胞凋亡是机体的一种先天性免疫反应^[9]。被感染的巨噬细胞在凋亡过程中会杀死其中的结核杆菌,并激活其附近正常的巨噬细胞进一步吞噬体内的结核杆菌,因而有效的防治了结核杆菌对机体的感染^[10]。近年来有报道

显示结核分枝杆菌可以通过 *nuoG* 等基因抑制巨噬细胞的凋亡^[11,12]。在本研究中,我们以不同浓度的 PhoP 蛋白作用于 ANA-1,利用流式细胞术检测巨噬细胞的凋亡情况。结果显示 PhoP 蛋白不仅不会造成巨噬细胞的凋亡,还能够明显抑制由凋亡促进剂(Staurosporine)造成的巨噬细胞凋亡,且随着蛋白浓度的增高,抑制作用显著增强,从而提示 PhoP 蛋白可能有利于结核杆菌的体内存活和潜伏。

参 考 文 献

- Scardigli A, Caminero JA. Management of drug-resistant tuberculosis. *Current Respiratory Care Reports*, 2013; 2(4): 208-217.
- World Health Organization. Global tuberculosis control: a short update to the 2009 report. 2009.
- World Health Organization. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. 2010.
- Pereira M, Tripathy S, Inamdar V, *et al.* Drug resistance pattern of *Mycobacterium tuberculosis* in seropositive and seronegative HIV-TB patients in Pune, India. *Indian J Med Res*, 2005; 121(4): 235-239.
- Walters SB, Dubnau E, Kolesnikova I, *et al.* The *Mycobacterium tuberculosis* PhoPR two-component system regulates genes essential for virulence and complex lipid biosynthesis. *Mol Microbiol*, 2006; 60(2): 312-330.
- Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, *et al.* Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*, 2013; 4(1): 3-66.
- 刘云霞, 张万江. 结核分枝杆菌与巨噬细胞相互作用的研究进展. *中国细胞生物学学报*, 2012; 34(6): 617-622.
- Menon S, Wang S. Structure of the response regulator PhoP from *Mycobacterium tuberculosis* reveals a dimer through the receiver domain. *Biochemistry*, 2011; 50(26): 5948-5957.
- Iriti M, Faoro F. Review of innate and specific immunity in plants and animals. *Mycopathologia*, 2007; 164(2): 57-64.
- Riendeau CJ, Kornfeld H. THP-1 cell apoptosis in response to mycobacterial infection. *Infect Immun*, 2003; 71(1): 254-259.
- Velmurugan K, Chen B, Miller JL, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* *nuoG* is a virulence gene that inhibits apoptosis of infected host cells. *PLoS Pathog*, 2007; 3(7): e110.
- Hinchey J, Lee S, Jeon BY, *et al.* Enhanced priming of adaptive immunity by a proapoptotic mutant of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest*, 2007; 117(8): 2279-2288.

(2014-08-31 收稿, 2014-11-29 修回)

编辑 沈 进