

结核杆菌 CRISPR-associated *Csm4* (*Rv2820c*) 诱导 *iNOS* 表达对耻垢杆菌胞内存活的影响^{*}

翟小倩, 鲍朗[△], 罗涛, 彭璇, 孙长峰, 杨国平

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 研究 *Csm4* 蛋白在重组耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*, MS)中的表达及其影响胞内存活的机制。方法 PCR 扩增 *Csm4* 基因,构建重组 pMV261-*Csm4* 穿梭表达质粒,将重组质粒和空白质粒电穿孔进 MS 生成重组菌 MS-*Csm4* 和对照重组菌 MS_V,采用 Western blot 对重组菌 *Csm4* 蛋白表达进行检测。体外培养观察 MS-*Csm4* 和 MS_V 生长曲线,并检测活性氮、活性氧环境下的集落形成单位(CFU)变化。MS-*Csm4* 和 MS_V 重组菌感染人源巨噬细胞 THP-1,计数 CFU 反映胞内存活,实时荧光定量 PCR 检测诱导性一氧化氮合酶基因(inducible nitric oxide synthase, *iNOS*)表达。硝酸还原酶法检测一氧化氮(nitric oxide, NO)释放指标。结果 *Csm4* 蛋白在 MS-*Csm4* 中成功表达,且其表达不影响 MS-*Csm4* 的生长情况;MS-*Csm4* 在体外活性氮、氧环境中 CFU 下降,与 MS_V 相比,差异有统计学意义($P<0.05$);重组菌 MS-*Csm4* 作用于 THP-1 细胞后诱导 *iNOS* 表达上调,促进 NO 的释放以及减少胞内存活,与 MS_V 相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 重组菌 MS-*Csm4* 不能耐受体外活性氮、氧压力环境,可诱导宿主细胞 *iNOS* 表达上调,促进 NO 释放,从而影响其胞内存活能力。

【关键词】 结核 *Csm4* 基因 重组耻垢分枝杆菌 活性氮、氧环境 胞内存活

Effect of the Expression of *iNOS* Induced by *Mycobacterium tuberculosis* CRISPR-associated *Csm4* (*Rv2820c*) on Intracellular Viability of *Mycobacterium smegmatis* ZHAI Xiao-qian, BAO Lang[△], LUO Tao, PENG Xuan, SUN Chang-feng, YANG Guo-ping. Laboratory of Infection and Immunity, West China School of Basic Medical Sciences and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China

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

【Abstract】 Objective To determine how *Csm4* protein expression affects intracellular survival of *Mycobacterium smegmatis* (MS). Methods *Csm4* gene was amplified by PCR to construct pMV261-*Csm4* shuttle expression plasmid. The *Csm4* protein expression in MS-*Csm4* was detected by Western blot after electroporation of the recombinant plasmid into MS. The growth kinetics of MS-*Csm4* *in vitro* and the influence of reactive N, O species on the growth of MS-*Csm4* were observed. The intracellular survival of MS-*Csm4* and expressions of inducible nitric oxide synthase gene (*iNOS*) and nitric oxide production (NO) were detected after infection with THP-1 macrophages. Results *Csm4* protein was successfully expressed in MS-*Csm4*, which did not affect the growth of the recombinant MS. Reactive N, O species decreased MS-*Csm4* colony forming unit (CFU) *in vitro*. THP-1 increased the expression of *iNOS* and NO production and decreased intracellular survival of MS-*Csm4*. Conclusion Recombinant MS-*Csm4* is susceptible to reactive N, O species *in vitro*. THP-1 promotes NO release and thus discourages intracellular survival of MS.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis* *Csm4* gene Recombinant *Mycobacterium smegmatis* Reactive N, O environment Intracellular survival

结核病是世界性公共卫生疾病,长期严重危害人类的健康。2016 年世界卫生组织(WHO)全球结核病报告指出:2015 年,全球范围内估计有 1 040 万新发传染病病例,其中有 140 万人死于结核病^[1]。

随着结核杆菌和人类免疫缺陷病毒(HIV)病毒共同感染患者数量增加以及结核多重耐药菌株流行,结核病的防治面临严峻挑战。研究结核杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)致病机制以及与宿主的相互作用,有利于寻找更加全面的防治方法。结核杆菌 CRISPR-Cas 系统(clustered regularly interspaced short palindromic repeats-Cas

^{*} 国家传染病重大专项(No. 2012ZX10003008)资助

[△] 通信作者, E-mail: baolang@scu.edu.cn

associated proteins)是一种类似于 RNA 干扰的细菌适应性免疫系统,主要用于抵御外源噬菌体和质粒的入侵^[2]。WESTRA 等^[3]研究证实,CRISPR 基因位点的转录以及表达的 Cas 蛋白分别都能通过基因调节控制细菌的毒力。Mtb H37Rv 基因组有两个连续的 CRISPR 基因位点以及跟随 9 个 Cas 蛋白,其中就包括 *Rv2820c* 编码的 Csm4 蛋白^[4]。Mtb 的毒力与其在细胞内的存活有很大的关系,结核杆菌 Csm4 基因在耻垢分枝杆菌(MS)中的表达不能提高重组菌在巨噬细胞内的存活^[5]。因此本研究通过构建 MS_Csm4 重组菌,着力研究重组菌对体外活性氮、氧环境下的耐受性以及对外巨噬细胞功能的影响,以探究重组菌 MS_Csm4 作用于 THP-1 巨噬细胞后影响胞内生存的机制,为研究细菌胞内生存机制提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 Mtb H37Rv 基因组 Mtb H37Rv(国际标准株)基因组由本实验室保存,作为模板扩增 Csm4 基因。

1.1.2 质粒和菌株 pMV261 穿梭表达质粒由本实验室保存。pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司;大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自成都赛尔博科斯生物公司;耻垢分枝杆菌 MSMC²155 国际标准株由本实验室传代培养和保存。人源巨噬细胞株 THP-1 由本研究室常规保存。

1.1.3 主要试剂 Csm4 基因引物、诱导型一氧化氮合酶基因(*iNOS*)以及 β -actin 定量 PCR 引物由成都擎科公司合成。2 $\times$ Taq PCR Master Mix。限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III、T4 DNA Ligase 购自天根公司。常规质粒提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒及胶回收试剂盒均为 Omega 公司产品。7H9 液体培养基、7H10 固体培养基购自美国 BDdifo 公司。NaNO₂、H₂O₂、卡那霉素、Simply P Total RNA Extraction kit、购自成都赛尔博科斯生物公司;佛波醇(PMA)为 Sigma 公司产品;一氧化氮(NO)检测试剂盒为南京建成公司产品;TRIzol[®]试剂为 Invitrogen 公司产品;RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 购自赛默飞公司。

1.2 Csm4 基因的 PCR 扩增与纯化

取 Mtb H37Rv 基因组扩增 Csm4 基因。用 Prime prime5.0 引物设计软件设计特异的 Csm4 基因 PCR 引物,上游引物(PF) 5'-CGGAATTCA

TGAACTCGCGGCT-3' 包含 *EcoR* I 酶切位点(下划线);第一条下游引物(PR1): 5'-ATGATGATGATGATGGTGTGCGGCGGACTCC-3' 包含 6 $\times$ His tag 的前五个 His 的编码序列。第一轮 PCR 的产物连接到 pMD18-T 载体上,再以重组的 T 载体为模板继续扩增,原来的上游引物不变,第二条下游引物(PR2): 5'-CCCAAGCTTTCAATGATGATGATGATGGTG-3' 加上剩余的 1 个编码 His 蛋白的基因序列,终止密码子和一个 *Hind* III 酶切位点。最终获得在 Csm4 基因末端带上 6 $\times$ His tag 的 PCR 产物,以便后续 Western blot 实验用于检测 Csm4 蛋白在重组 MS 中是否成功表达。PCR 扩增体系:20 μ L 体系,即上游引物 1 μ L,每次扩增时 R1 或者 R2 下游引物 1 μ L,ddH₂O(双蒸水) 7 μ L,2 $\times$ Taq PCR Master Mix 10 μ L, DNA 模板 1 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s;63~50 $^{\circ}$ C,每一循环下降 0.5 $^{\circ}$ C,每次退火 30 s,共计 26 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 50 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,共计 10 个循环;72 $^{\circ}$ C 保温 5 min。扩增后的 PCR 产物 Csm4 用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测并纯化回收扩增产物。

1.3 重组质粒 pMV261-Csm4 的构建及鉴定

Csm4 基因扩增产物和穿梭表达载体 pMV261 用内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切,并以 Cycle Pure Kit 纯化回收酶切产物。T4 DNA 连接酶连接双酶切之后的基因与质粒并转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 。感受态细胞经含卡那霉素(25 μ g/mL)的 LB 平板筛选培养然后扩菌,用 Plasmid Mini Kit I 试剂盒提取质粒。重组质粒 pMV261-Csm4 送成都擎柯生物技术公司测序,测序结果用 Geneious R10 软件进行分析、比对。

1.4 重组菌 MS_Csm4 的构建

首先制备 MSMC²155 感受态细胞:将野生 MS 饱和菌液转至冰上冰浴 30 min,4 $^{\circ}$ C。8 000 r/min 离心 10 min 后全部收集菌体,并用 4 $^{\circ}$ C 预冷灭菌的 10%甘油重复洗涤 4 次,按照菌液培养体积的 1/20 重悬于 10%预冷的甘油。然后进行重组质粒的电穿孔:将测序正确的 pMV261-Csm4 穿梭表达质粒以及作为对照的空质粒 pMV261 分别与感受态细胞混合放入电穿孔杯中,在 2.5 kV、50 μ F、700 Ω 条件下进行电转化,形成重组 MS_Csm4 和 MS_V。电转结束之后分别在含 25 μ g/mL 卡那霉素的 7H10 固体培养平板上筛选重组菌的阳性克隆(即有卡那霉素抗性)进行菌液 PCR 鉴定 Csm4 表达,

方法同 1.2。挑选有卡那霉素抗性的 MS_ *Csm4* 阳性克隆用于后续实验。

1.5 重组菌 MS_ *Csm4* 中 *Csm4* 蛋白的表达检测

菌液 PCR 鉴定成功的阳性菌株扩菌后,置于 45 °C 水浴热诱导 30 min,45 °C 继续振荡培养 1 h,离心收菌,超声波破碎重组 MS 菌体获得蛋白。由于我们在构建重组质粒的时候在目标基因 *Csm4* 中引入了 6×His tag,与 *Csm4* 形成融合蛋白,所以采用鼠 Anti-His Tag (6×His tag)单克隆抗体作为一抗,羊抗鼠 IgG 作为二抗对目标蛋白进行 Western blot 定性分析鉴定,检测 *Csm4* 蛋白在重组 MS 中是否成功表达。

1.6 重组菌 MS_ *Csm4* 体外生长情况的检测

在 7H9 液体培养基中分别培养重组 MS_ *Csm4* 菌和 MS_ V 菌(对照)共 42 h,每隔 3 h 测一次光密度(OD_{600})值,记录重组菌生长情况,绘制生长曲线。

1.7 对体外活性氮、活性氧环境的耐受性测定

为研究 MS_ *Csm4* 在体外对活性氮中间体(RNI)和氧化应激反应(ROS)的耐受能力,将 MS_ *Csm4* 暴露在亚硝酸钠($NaNO_2$)和 H_2O_2 环境压力下。重组菌培养至对数生长期($OD_{600}=0.6\sim0.8$),收集细菌制备单细胞悬液调整 $OD_{600}=0.5$,培养基中分别加入终浓度为 5 mmol/L $NaNO_2$ 、10 mmol/L $NaNO_2$ 培养 0 h、3 h、6 h 后,或 10 mmol/L H_2O_2 培养 1 h 后,每个时间点取 100 μ L 细菌培养液进行倍比稀释,然后涂布在 7H10 固体培养基上培养。3~5 d 之后,观察并计数固体培养基上重组菌在处理了不同时间段之后存活的集落形成单位(CFU),以 lg CFU 值反映重组菌在 $NaNO_2$ 、 H_2O_2 体外压力条件的存活耐受情况。

1.8 重组菌 MS_ *Csm4* 在巨噬细胞 THP-1 内的存活情况检测

将冻存的细胞 THP-1 从液氮中取出,然后放入 37 °C 恒温水浴锅中复苏。用适量 RPMI-1640 完全培养基重悬浮细胞并接种于细胞培养瓶中,置于 37 °C、体积分数 5% CO_2 的恒温培养箱中培养。次日更换培养液继续培养。当细胞长满瓶底 70%~80%时,收集、洗涤以及用 RPMI-1640 完全培养基重悬细胞以进行传代。利用台盼蓝染色检测细胞活力,将细胞活力较好的传代 THP-1 细胞按照 1×10^6 细胞/孔铺于 12 孔板中并加入 100 ng/mL PMA 诱导 48 h 使其成为贴壁细胞。MS_ *Csm4* 和 MS_ V 菌分别以感染倍数 $MOI=10:1$ 感染 THP-1 细胞,然后置于 37 °C、体积分数 5% CO_2 细胞培养箱

中感染 4 h,加入 100 μ g/mL 的庆大霉素杀除胞外重组菌 2 h;分别收集感染后 6 h、24 h、48 h 的细胞加入终浓度为 0.08% 的 Trxion-100 裂解细胞;将细胞裂解液涂于含 25 μ g/mL 卡拉霉素的 7H10 固体培养基培养,观察菌落并计数 CFU,计算 lg CFU 值以反映胞内存活率。

1.9 重组 MS_ *Csm4* 对 THP-1 细胞诱导 *iNOS* 表达、释放 NO 的检测

选择经 PMA 诱导 48 h 的 THP-1 细胞,分别用 MS_ *Csm4* 和 MS_ V 重组菌感染,收集感染 6 h、24 h、48 h 的细胞上清,应用硝酸还原酶法的 NO 检测试剂盒检测细胞释放 NO 量。收集感染 24 h 的 THP-1 细胞,利用试剂盒提取总 RNA,按照试剂盒操作合成 cDNA,通过实时荧光定量 PCR(real-time PCR)检测 *iNOS* 的表达情况。*iNOS* 的上游引物:5'-GGCAGTTCTAGACAGTCCCG-3',下游引物:5'-TTCTTCACTGTGGGGCTTGC-3';内参 β -actin 上游引物:5'-GAGCAAGAGAGGCATCCTCAC-3',下游引物:5'-CTCAAACATGATCTGGGTCATC-3'。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *iNOS* 基因的相对表达量。

1.10 统计学方法

组间比较采用独立样本 *t* 检验,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCR 扩增后的 *Csm4* 基因表达

使用 Mtb H37Rv 基因组模板,PCR 扩增 *Csm4* 基因后,经琼脂糖凝胶电泳检测。电泳结果显示,目的基因大小约 909 bp,未见非特异性扩增带,与 NCBI 上 *Csm4* 基因的大小一致(图 1)。

2.2 pMV261-*Csm4* 质粒构建和转化成功后序列测定

见图 2。将经酶切和连接得到的 pMV261-*Csm4* 重组质粒转化进 DH5 α 后进行菌液 PCR,结果显示 pMV261-*Csm4* 质粒电转成功。同时将菌液 PCR 结果阳性的质粒提取出来送测序,测序结果表明,所测质粒中的 *Csm4* 基因序列和已知序列(NC_000962.3)一致,可用于后续实验。

2.3 重组菌 MS_ *Csm4* 构建及 *Csm4* 蛋白的表达

将测序成功的 pMV261-*Csm4* 和 pMV261 空白质粒电转进 MS 后,将有卡那霉素抗性的重组菌阳性克隆进行菌液 PCR 鉴定,见图 3。1~2 泳道可见 909 bp 与插入片段大小一致的条带,有 *Csm4* 表达,

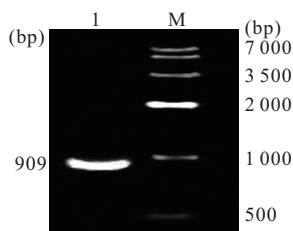


图 1 Mtb H37Rv *Csm4* 基因 PCR 扩增产物

Fig 1 *Csm4* gene PCR product of Mtb H37Rv

M: DNA marker; 1: PCR product of *Csm4* gene in Mtb H37Rv

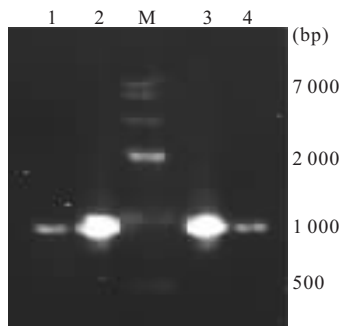


图 2 pMV261-*Csm4* 转化进 DH5α 感受态细胞后的菌液 PCR 产物

Fig 2 Bacterial fluid PCR after pMV261-*Csm4* being transformed into DH5α

M: DNA marker; 1-4: *Csm4* PCR products (+)

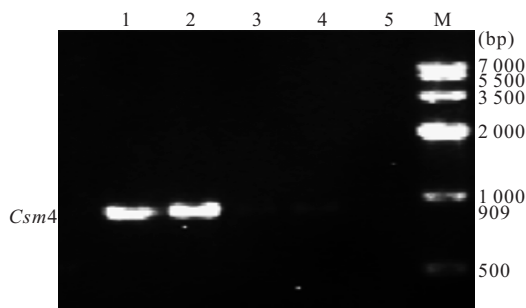


图 3 pMV261-*Csm4* 电转进 MS 后的菌液 PCR 产物

Fig 3 Bacterial fluid PCR after electroporation of pMV261-*Csm4* into *Mycobacterium smegmatis*

M: DNA marker; 1,2: *Csm4* PCR products (+); 3,4: *Csm4* PCR products (-); 5: MS_V (pMV261 plasmid)

可用于后续实验;3~4 泳道的重组菌 *Csm4* 的 PCR 产物为阴性,无预期结果;5 泳道的空白质粒 pMV261 未出现相应条带,与预期结果一致。结果显示,重组 pMV261-*Csm4* 和空白质粒成功电转入 MS。热诱导重组菌 MS_*Csm4* 进行目的蛋白的表达鉴定,Western blot 分析结果显示(图 4):MS_*Csm4* 在相对分子质量约为 33×10^3 处有明显的特异性条带,MS_V 在相应位置无蛋白条带。

2.4 重组菌 MS_*Csm4* 的体外生长情况

由图 5 可见重组菌 MS_*Csm4* 的生长情况与对照组 MS_V 生长情况,差异无统计学意义,说明 *Csm4* 基因电转进 MS 中对其自身生长没有影响 ($P > 0.05$)。

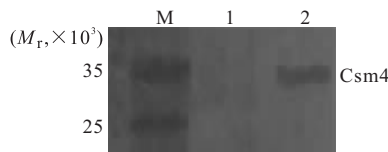


图 4 *Csm4* 蛋白在重组菌 MS_*Csm4* 中的表达鉴定

Fig 4 Western blot analysis of products of the recombinant MS_*Csm4*

M: Marker; 1: MS_V; 2: MS_*Csm4*

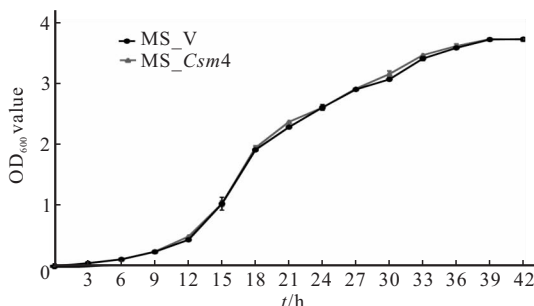


图 5 MS_*Csm4* 和 MS_V 的生长曲线

Fig 5 Growth curves of MS_*Csm4* and MS_V

2.5 MS_*Csm4* 在体外对 RNI 的耐受能力

见图 6。与对照组 MS_V 比较,在 5 mmol/L NaNO_2 环境压力下,作用 6 h 重组菌 MS_*Csm4* 的 CFU 明显下降,且差异有统计学意义 ($P < 0.05$);用 10 mmol/L NaNO_2 处理 3 h 和 6 h 后,MS_*Csm4* 组和 MS_V 组 CFU 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。说明重组菌 MS_*Csm4* 对 RNI 体外压力易感。

2.6 重组菌 MS_*Csm4* 在体外对 ROS 的耐受能力

见图 7。与对照组 MS_V 比较,在 10 mmol/L H_2O_2 压力下作用 1 h 后,MS_*Csm4* 的 CFU 下降,且差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。说明重组菌 MS_*Csm4* 对体外 ROS 易感。

2.7 重组菌 MS_*Csm4* 在 THP-1 细胞中的存活率变化

见图 8。重组菌 MS_*Csm4* 感染 THP-1 巨噬细胞后 6 h、24 h、48 h,与 MS_V 组比较,胞内生存率无显著改变,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.8 重组菌 MS_*Csm4* 对 NO 释放以及诱导 iNOS 表达的影响

重组菌 MS_*Csm4* 感染 THP-1 巨噬细胞 48 h 后,NO 的释放量上升(图 9),与对照组比较差异有统

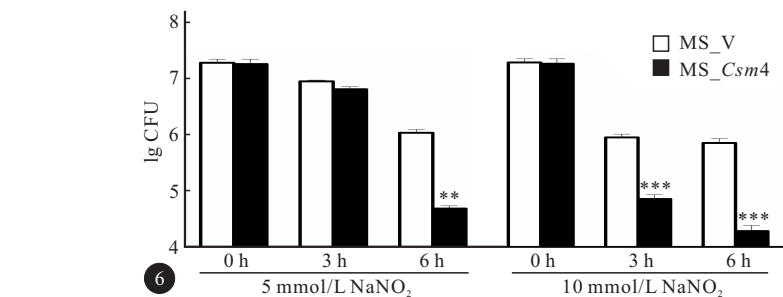


图 6 检测 MS_Csm4 对 5 mmol/L 和 10 mmol/L 亚硝酸钠压力的耐受性

Fig 6 Plate assay showing tolerance of MS_Csm4 to 5 mmol/L and 10 mmol/L acid sodium nitrite

MS_Csm4 to 10 mmol/L H₂O₂

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, vs. MS_V

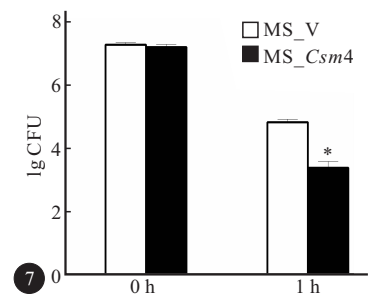


图 7 检测 MS_Csm4 在 10 mmol/L H₂O₂ 压力条件下对氧化

Fig 7 Plate assay showing tolerance of

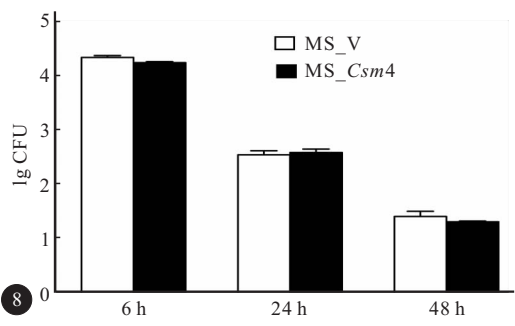


图 8 MS_Csm4 感染 THP-1 巨噬细胞的胞内存活

Fig 8 Intracellular survival of MS_Csm4 in THP-1 macrophages

* $P<0.001$, vs. MS_V

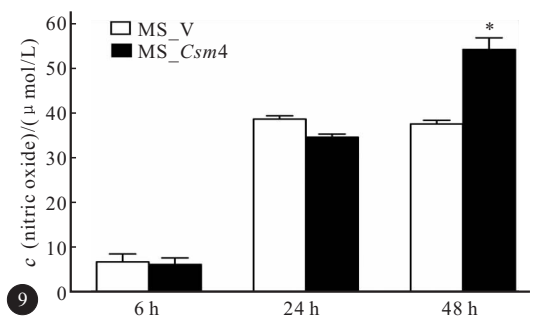


图 9 检测 MS_Csm4 感染 THP-1 巨噬细胞后 NO 的产生量

Fig 9 Detection of NO release in THP-1 macrophages infected with MS_

计学意义($P<0.001$),说明重组菌 MS_Csm4 可以促进宿主细胞 NO 的释放。同时,real-time PCR 检测重组菌 MS_Csm4 感染 THP-1 巨噬细胞 24 h 后 *iNOS* 的转录表达水平是 MS_V 组的 2 倍(以 MS_V 组水平为 1),差异有统计学意义($P<0.001$)。

3 讨论

Mtb 的胞内存活能力与其自身的毒力密切相关^[6]。*Csm4* 基因在 Mtb H37Rv 的 CRISPR-Cas 系统中编码 *Csm4* 蛋白,形成 Csm 复合体,抵制外源基因入侵,发挥适应性免疫作用^[7]。有研究发现,*Csm4* 蛋白在 MS 中表达不能促进胞内存活,从而影响了重组菌 MS_Csm4 的毒力。因此本研究着力研究影响 MS_Csm4 重组菌胞内存活改变的机制,从而探究影响细菌毒力的调节机制。首先,我们扩增出 *Csm4* 基因,并利用 pMV261 作为穿梭表达载体成功构建重组菌 MS_Csm4,使 *Csm4* 蛋白在 MS 中表达。进而观察外源基因引入 MS 后是否对其生长曲线有影响,结果表明 *Csm4* 基因并不影响 MS

的生存。

Mtb 是一种胞内存活菌,感染宿主细胞后,能够通过与宿主细胞相互作用从而抵抗宿主的杀伤作用。巨噬细胞吞噬 Mtb 后,Mtb 暴露于 ROS 和 RIN 等不利于自身生存的胞内环境中^[8]。Mtb 面对胞内环境压力时,通过各种作用机制,例如:增加一些功能蛋白的表达从而抵抗不利的环境压力。为了研究 *Csm4* 蛋白表达是否有助于重组 MS 抵抗宿主环境压力,我们用 NaNO₂ 和 H₂O₂ 在体外处理重组菌,模拟胞内活性氮、氧的环境压力。结果表明,与 MS_V 相比,MS_Csm4 重组菌生存率明显下降,不能耐受活性氮、氧的压力环境,因此 *Csm4* 蛋白表达不利于 MS 在宿主细胞内存活。

我们进一步用 MS_Csm4 感染 THP-1 巨噬细胞,胞内存活实验证实了 *Csm4* 蛋白在 MS 中表达不能增加细菌胞内存活率。人巨噬细胞感染病原菌之后释放的 NO 能够限制 Mtb 在宿主细胞内存活^[9]。很多研究已经证实 *iNOS* 的转录表达促进 NO 的产生,从而介导巨噬细胞的杀菌活动^[10]。本

研究发现,MS_ *Csm4* 感染 THP-1 细胞后释放的 NO 较重组菌 MS_ V 明显上升。同时,我们通过 real-time PCR 发现,MS_ *Csm4* 作用于 THP-1 细胞后 *i*NOS 基因的表达水也明显上升。说明 MS_ *Csm4* 不能增强胞内存活与巨噬细胞 THP-1 释放较多的 NO 有关。另外,最近有研究表明,当抑制剂 NM(N-monomethyl-L-arginine)抑制 *i*NOS 的转录表达时,会下调自噬标签 LC3 的表达,证明了 *i*NOS 的转录表达上调与自噬的发生密切相关^[11]。巨噬细胞的自噬不利于细菌的生存,这一点对于抑制 Mtb 胞内存活有重要的意义^[12]。结合本研究结果可以推测,MS_ *Csm4* 重组菌不能耐受活性氮、氧物质等环境,诱导 *i*NOS 表达上调,促进 NO 的释放和自噬的发生,最终限制 MS_ *Csm4* 的胞内存活,因而也影响了 MS_ *Csm4* 重组菌的毒力。这将为进一步研究影响 Mtb 胞内存活的机制提供重要基础。

我们在介绍部分提到, *Csm4* 基因属于 Mtb H37Rv 菌株 CRISPR-Cas 系统中 Cas(CRISPR-Cas associated)基因的一种。但是,Mtb 被分成 7 个系谱,其中在一种具有高毒力的 Mtb 北京家族菌株中, *Csm4* 基因发生突变导致 60% 基因长度的缺失^[13]。因此,结合我们的研究结果以及从结核基因组进化的角度来推测,Mtb H37Rv 中未突变的 *Csm4* 基因不能增强细菌的胞内存活,但在毒力更强的 Mtb 北京家族菌株中 *Csm4* 基因发生突变可能有助于菌株的毒力。而且已经有研究发现突变的 *Csm4* 可以促进 MS 的胞内存活^[5]。目前,我们实验室也正在着力于研究 Mtb 北京家族菌株中缺失了 60% 基因长度的 *Csm4* 基因如何增强细菌毒力。

参 考 文 献

- [1] WHO. Global tuberculosis report 2016 [2017-05-10]. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. 2016.
- [2] MAKAROVA KS, KOONIN EV. Annotation and classification of CRISPR-Cas systems. *Methods Mol Biol*, 2015, 1311: 47-75 [2017-05-10]. https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-4939-2687-9_4. doi: 10.1007/978-1-4939-2687-9_4.
- [3] WESTRA ER, BUCKLING A, FINERAN PC. CRISPR-Cas systems: beyond adaptive immunity. *Nat Rev Microbio*, 2014, 12(5): 317-326.
- [4] HE L, FAN X, XIE J. Comparative genomic structures of mycobacterium CRISPR-Cas. *J Cellular Biochem*, 2012, 113(7): 2464-2473.
- [5] LAM JT, YUEN KY, HO PL, *et al*. Truncated Rv2820c enhances mycobacterial virulence *ex vivo* and *in vivo*. *Microb Pathog*, 2011, 50(6): 331-335.
- [6] PIETERS J. Mycobacterium tuberculosis and the macrophage: maintaining a balance. *Cell Host Microbe*, 2008, 3(6): 399-407.
- [7] NUMATA T, INANAGA H, SATO C, *et al*. Crystal structure of the Csm3-Csm4 subcomplex in the type III-A CRISPR-Cas interference complex. *J Mol Biol*, 2015, 427(2): 259-273.
- [8] RENGARAJAN J, BLOOM BR, RUBIN EJ. Genome-wide requirements for mycobacterium tuberculosis adaptation and survival in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(23): 8327-8332.
- [9] CHAN ED, CHAN J, SCHLUGER NW. What is the role of nitric oxide in murine and human host defense against tuberculosis? Current knowledge. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, 25(5): 606-612.
- [10] NATHAN CF, HIBBS JR JB. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol*, 1991, 3(1): 65-70.
- [11] PAHARIS S, KHAN N, AQDAS M, *et al*. Infergen stimulated macrophages restrict mycobacterium tuberculosis growth by autophagy and release of nitric oxide. *Sci Rep*, 2016, 6: 39492 [2017-05-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5175149/>. doi: 10.38/srep39492.
- [12] YUK JM, SHIN DM, LEE HM, *et al*. Vitamin D3 induces autophagy in human monocytes/macrophages via cathelicidin. *Cell Host Microbe*, 2009, 6(3): 231-243.
- [13] TSOLAKI AG, GAGNEUX S, PYM AS, *et al*. Genomic deletions classify the Beijing/W strains as a distinct genetic lineage of mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(7): 3185-3191.

(2017-11-13 收稿, 2018-03-12 修回)

编辑 吕 熙