结核病疫苗和耻垢分枝杆菌引起树突状细胞差异免疫反应的蛋白质组学分析

霍祎¹, 宗兆运¹, 米凯霞^{2*}, 邓海腾^{1*}

1. 清华大学生命科学学院, 教育部生物信息学重点实验室, 北京 100084;

2. 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

* 联系人, E-mail: mik@im.ac.cn; dht@mail.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2017-08-17; 接受日期: 2017-09-26; 网络版发表日期: 2018-01-11

教育部自主科研基金(批准号: 2012Z02293)资助

摘要 研究结核分枝杆菌和免疫细胞的相互作用对发展新的结核病防治策略至关重要。由于结核分枝杆菌生长缓慢, 且需要在高等级生物安全实验室中进行操作, 快速生长非致病的耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)经常用来作为结核分枝杆菌的模式菌开展相关研究。为了探讨耻垢分枝杆菌和结核分枝杆菌对免疫系统产生的不同影响, 本课题组利用缓慢生长的结核菌的减毒活疫苗卡介苗(BCG)和耻垢分枝杆菌mc²155分别感染小鼠(*Mus musculus*)树突状细胞DC2.4细胞, 通过蛋白质组学分析, 阐述宿主细胞对BCG和耻垢分枝杆菌不同的免疫反应。结果表明, BCG在DC2.4中生存时间比耻垢分枝杆菌长。定量蛋白质组学发现耻垢分枝杆菌激活了I型干扰素信号通路, 上调了AIM2, IFI204, IFIT1和ISG15蛋白的表达。相反, BCG的感染对宿主细胞的蛋白组影响不大。分泌组学的结果显示, 耻垢分枝杆菌的感染诱导树突状细胞分泌更多的细胞趋化因子以及ISG15, TNF和IL-6等细胞因子, 说明耻垢分枝杆菌的感染促进了宿主细胞的细胞因子和趋化因子的释放, 从而迅速地清除感染的细菌。与此一致的是, 耻垢分枝杆菌感染的小鼠原代免疫细胞比BCG感染产生更多的IFN- γ 。进一步的研究发现, ISG15过表达阻止分枝杆菌进入宿主细胞。综上所述, 本研究证明与缓慢生长的BCG相比, 耻垢分枝杆菌引起宿主细胞更强烈的免疫反应, 致使耻垢分枝杆菌在宿主细胞中被迅速清除。同时, 本课题组发现耻垢分枝杆菌感染引起的ISG15上调阻止了分枝杆菌进入宿主细胞。

关键词 BCG, 耻垢分枝杆菌, 树突状细胞, 蛋白质组学

结核分枝杆菌感染引起的肺结核对人类的健康和生命具有重大的威胁。结核分枝杆菌可以在人体中长期潜伏, 当前结核病控制面临的挑战是耐药结核病的流行, 以及结核和艾滋病的伴随发生^[1]。理解结核分枝杆菌和宿主的相互作用对发展有效控制结核病传播的策略至关重要。结核分枝杆菌是胞内病原菌,

通过活化TLR等模式受体(pattern recognition receptor, PRR)促进免疫细胞对结核分枝杆菌的内吞^[2,3]。同时, 结核分枝杆菌还通过与宿主细胞蛋白的相互作用逃逸宿主细胞的免疫监控, 从而在宿主细胞内长期存活。结核分枝杆菌分泌蛋白ESAT-6阻止巨噬细胞的活化^[4,5], 而PknG蛋白阻止了宿主细胞中吞噬体和溶酶

引用格式: 霍祎, 宗兆运, 米凯霞, 等. 结核病疫苗和耻垢分枝杆菌引起树突状细胞差异免疫反应的蛋白质组学分析. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 240-248
Huo Y, Zong Z Y, Mi K X, et al. Quantitative proteomics analysis of *M. smegmatis*- and BCG-infected dendritic cells (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2018, 48: 240-248, doi: 10.1360/N052017-00151

体的融合^[6], 结核分枝杆菌的Eis蛋白通过抑制宿主细胞的自噬和炎症反应, 从而抑制宿主的免疫反应^[7,8]. 由于结核分枝杆菌具有强致病性和感染性, 因此结核杆菌的减毒活疫苗卡介苗(Bacille Calmette-Guérin, BCG)和非致病菌耻垢分枝杆菌常被用作结核分枝杆菌的模式菌进行相关研究. BCG是牛的结核分枝杆菌在马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)上经过长期传代培养而获得的减毒菌株, 是目前唯一用于预防肺结核的疫苗^[9]; BCG可以在一定程度上激活人体抗结核杆菌的免疫反应^[10]. 而耻垢分枝杆菌是无致病性并且生长迅速的分枝杆菌, 在人体内能够被快速清除. 耻垢分枝杆菌和结核分枝杆菌有2000多个同源基因, 而且具有类似的细胞壁组成, 因此耻垢分枝杆菌具有成为预防肺结核传染重组疫苗的潜力^[11,12].

树突状细胞(dendritic cells, DC)是连接先天免疫和适应性免疫的桥梁^[13]. 作为目前最有效的抗原递呈细胞, DC是控制结核分枝杆菌感染免疫系统的重要组成部分. 研究表明, 肺组织的树突状细胞吞噬结核分枝杆菌后被活化并迁移到淋巴结, 通过抗原递呈激活T细胞来抵抗结核分枝杆菌的侵袭^[14,15]. 而反复感染结核分枝杆菌的树突状细胞虽然高表达MHC-II复合物和其他共激活分子, 却不再具备激活CD4⁺ T细胞免疫反应的能力^[16]. 在淋巴结中, IL-10和调节性T细胞通过树突状细胞阻止初始T细胞分化成分泌IFN- γ 的Th1细胞, 使得结核分枝杆菌免受免疫系统的攻击^[17]. 这些研究结果表明, 树突状细胞在激活结核分枝杆菌适应性免疫中发挥重要作用, 然而树突状细胞控制结核分枝杆菌感染的分子机制依然不明确, 有待进一步研究^[18]. 本研究以结核分枝杆菌的模式菌BCG和耻垢分枝杆菌侵染宿主细胞为研究对象, 应用生物化学、蛋白质组学和分泌组学的方法系统分析分枝杆菌与宿主细胞的相互作用, 发现BCG和耻垢分枝杆菌引起宿主细胞不同的免疫反应. 这项研究提高了对结核分枝杆菌介导的宿主细胞免疫反应的认识, 加深了对结核分枝杆菌的感染和致病分子机制的理解, 并为疫苗的设计和发展提供新的靶点和策略.

1 材料与方法

1.1 试剂

RPMI 1640培养基, PBS缓冲液, 胎牛血清(fetal

bovine serum, FBS), 青霉素/链霉素, 胰酶购自Wisent公司(加拿大). 二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、碘代乙酰胺(iodoacetamide, IAA)购自Sigma公司(美国). TMT试剂, 色谱级甲醇和色谱级乙腈来自Thermo公司(美国). 质谱级胰蛋白酶来自Promega公司(美国). CCK8试剂盒购买自Dojindo公司(日本). BCA蛋白浓度测定试剂盒购自北京索莱宝公司.

1.2 细胞培养

DC2.4细胞系来源于中国科学院微生物所米凯霞课题组. DC2.4细胞培养在加有10% FBS, 青霉素(50 U/mL), 链霉素(50 mg/mL)的RPMI 1640培养基中, 培养条件为37℃, 5% CO₂.

1.3 细菌培养

耻垢分枝杆菌菌株mc²155和BCG由本实验室保存, 培养在7H9培养基(2%葡萄糖、8.1% NaCl、5%牛血清白蛋白、0.5%甘油和0.05% Tween 80)中. 表达GFP的菌株GFP-mc²155和GFP-BCG来自于中国科学院微生物所米凯霞课题组, 培养于含有40 mg/L卡那霉素的7H9培养基中.

1.4 胞内细菌含量测定

DC2.4细胞按照 1×10^6 个细胞每孔接种到6孔板中, 待细胞贴壁后更换为无抗生素的RPMI 1640培养基, 并且按照MOI为10:1分别向3个平行孔内加入GFP-mc²155和GFP-BCG. 4 h后, 去除培养基上清并用PBS缓冲液清洗细胞3次以除去细胞外多余的细菌, 然后将细胞培养在含有双倍青霉素和链霉素的RPMI 1640培养基中. 通过FACS测定胞内荧光强度, 即为胞内细菌的相对含量.

1.5 分枝杆菌侵染DC2.4细胞的蛋白质组学分析

按照上述方法分别用mc²155和BCG刺激DC2.4细胞, 对照组不加任何细菌, 4 h后, 细胞在无酚红, 有双倍青霉素和链霉素的RPMI 1640培养基中继续培养20 h. 收集未被感染、耻垢分枝杆菌感染和BCG感染的DC2.4细胞以及上清. 细胞中加入适量的含8 mol/L尿素的PBS缓冲液, 并用BCA试剂盒测定蛋白浓度. 上清过0.22 μ m的滤膜除去杂质. 各取100 μ g蛋白以及4 mL上清液, 按照实验室的操作方案进行LC-MS/MS

分析^[19].

1.6 ELISA, Western blot和RT-PCR分析

ELISA试剂盒购买自上海森雄公司,取未被感染、mc²155刺激感染和BCG感染的DC2.4培养上清按照说明书进行检测.取未被感染、mc²155感染和BCG感染的DC2.4细胞蛋白进行SDS-PAGE胶电泳分离,将胶上的蛋白转到硝酸纤维素膜上.在TBST-牛奶中室温封闭1 h后,将膜放入相应的抗体溶液中,4℃孵育过夜.TBST缓冲液洗3次,将膜放入相应的二抗中室温孵育1 h.TBST缓冲液洗3次后,加入ECL发光液进行显影,并用化学发光成像系统成像.取未被感染、mc²155感染和BCG感染的DC2.4细胞用TRIzol[®]提取RNA,并逆转录为cDNA,并以cDNA为模板,利用qPCR方法检测目的基因mRNA的相对表达水平,所用引物如网络版附表1所示.

1.7 小鼠原代细胞分离

小鼠(*Mus musculus*)颈椎脱臼处死,无菌条件下取出小鼠脾脏放入细胞滤网中.将滤网放入50 mL离心管,用注射器底部碾碎脾脏,用PBS冲洗使获得的细胞进入离心管中.100×g离心10 min收集细胞,并加入红细胞裂解液去除红细胞.最后将细胞培养在加有10% FBS、青霉素(50 U/mL)、链霉素(50 mg/mL)的RPMI 1640培养基中,培养条件为37℃,5% CO₂.

1.8 构建2×Flag-ISG15过表达DC2.4细胞系

提取DC2.4细胞mRNA,进行逆转录获得cDNA,以cDNA为模板,将N端带有2个Flag标签的目的基因ISG15构建进入pcDNA3.1质粒,正向引物的序列为5'-CGGAATTCCGGCAATGGATTACAAG-GATGACGACGATAAGGATTACAAGGATGACGAC-GATAAGGCCTGGGACCTAAAGGTGAAGATGC-3',反向引物的序列为5'-CCGCTCGAGCGGGCCTTAG-GCACACTGGTCCCCTCCCCACCCCT-3'.然后,将30 μg 2×Flag-ISG15 pcDNA3.1质粒与含有5×10⁷ DC2.4细胞的RPMI 1640溶液混合后,放入4 mm电转杯中,冰上静置10 min.290 V电压的电击25 ms后,将细胞冰上放置10 min.随后将细胞接种到正常RPMI 1640培养基中,48 h后向培养基中加入0.5 mg/mL G418,进行2周的筛选.用FACS分离出单细胞,通过Western blot

验证得到2×Flag-ISG15过表达DC2.4细胞系.转入空载体pcDNA3.1质粒的DC2.4细胞为对照细胞.

2 结果与分析

2.1 耻垢分枝杆菌比BCG更易被宿主树突状细胞清除

耻垢分枝杆菌是非致病菌,可以被宿主免疫系统清除,而BCG作为结核分枝杆菌的疫苗,能引起抗结核杆菌的免疫反应.树突状细胞通过分解胞内的分枝杆菌和递呈相应的抗原来激活后续的获得性免疫体系.为了鉴定耻垢分枝杆菌和BCG感染树突状细胞引起的免疫反应差异,分别用带有荧光标记的GFP-mc²155和GFP-BCG感染DC2.4细胞.在感染4 h后去除掉培养液中的分枝杆菌,并在4, 8和24 h后分别测定不同菌株感染的DC2.4细胞的胞内荧光强度.结果显示,分枝杆菌感染DC2.4细胞24 h后,80%的耻垢分枝杆菌已被DC2.4细胞降解,而BCG感染的树突状细胞中仅有约25%的BCG被清除(图1A).这些结果说明,耻垢分枝杆菌感染宿主后被快速清除,而BCG则表现出与结核分枝杆菌相似的潜伏性,能在树突状细胞中长期存活.

2.2 定量蛋白质组学分析耻垢分枝杆菌和BCG对DC2.4细胞蛋白组的影响

为了研究耻垢分枝杆菌和BCG与树突状细胞的相互作用,利用定量蛋白质组学分析耻垢分枝杆菌和BCG感染引起的DC2.4细胞蛋白质组和分泌组的变化.将未被感染、mc²155和BCG感染的树突状细胞裂解并提取蛋白,分别取100 μg蛋白进行酶解和TMT标记,将标记过的肽段用pH=10的碱性色谱柱进行分离并收集分离出来的肽段组分,将组分合并至12份,然后再对每一个组分进行nano-LC-MS/MS分析.肽段的定量分析是通过TMT比值来实现的.TMT比值大于1.5的蛋白为上调蛋白,而小于0.6为下调蛋白.本课题组发现,相对于未被感染的DC2.4细胞,mc²155感染比BCG感染在树突状细胞中引起更为显著的蛋白质组的变化.经过3次独立重复实验,一共在mc²155感染的树突状细胞中鉴定到了5484个可信度高的蛋白,其中有112个上调和145个下调的蛋白质(蛋白质组学结果见网络版附表2).对上调和下调的蛋白进行了生物学功能分类发现,大部分表达有变化的蛋白都与细胞增殖和代

图1 相对荧光强度及差异表达蛋白的功能分类图(网络版彩图)

A: 胞内mc²155和BCG的存活曲线, 相对荧光强度与细菌含量成正比。结果通过3次平行重复结果的 $\bar{x} \pm \text{SD}$ 来显示, 并采用 student's *t* 方法计算 *P* 值, ***: *P* < 0.001; B: mc²155感染DC2.4细胞引起的差异表达蛋白的功能分类图(www.panther.com)

谢过程相关, 分别占变化蛋白总数的34%和20% (图1B), 这可能与这两类蛋白在细胞中的高丰度有关。与生物合成和应激反应相关的蛋白数目也在变化蛋白总数中占有较高的比例。

鉴于细菌感染与免疫反应有高度的相关性, 着重分析了mc²155感染引起的免疫相关蛋白的变化。本课题组发现, I 型干扰素诱导表达的蛋白(图2A), NF-kappa-B, ERK 和 STAT 通路相关的蛋白(图2B), TNF 通路的蛋白(图2C)以及其他免疫通路相关的蛋白(图2D)在mc²155感染的DC2.4细胞中明显上调, 而BCG感染对这些蛋白的表达影响较小。进一步利用Western blot验证了 I 型干扰素诱导表达的蛋白ISG15和IFIT3在未被感染、mc²155感染和BCG感染的DC2.4细胞中的差异(图2E), 发现mc²155感染引起ISG15和IFIT3显著上调, 而BCG感染并不引起这两个蛋白表达水平的变化。本课题组还利用qPCR技术分析了未被感染、mc²155感染和BCG感染的DC2.4细胞中*GBP7*, *NOS2*, *IFI205b*, *IFIT3*, *ISG15*, *B2M*, *LGALS9*, *IRGM2*和*USP18*在mRNA表达水平上的差异(图2F), 结果表明, mc²155感染引起这些基因的mRNA表达显著上调, 其变化趋势与定量蛋白质组学结果一致, 从而验证了定量蛋白质组学数据的准确性。以上结果表明, 耻垢分枝杆菌刺激显著地激活DC2.4细胞的免疫体系, 包括 I 型干扰素通路, 相反, BCG的刺激并不引起DC细胞蛋白质组明显的变化, 导致DC2.4细胞快速清除胞内的耻垢分枝杆菌, 而BCG则可在胞内存活较长的时间。

2.3 定量蛋白质组学分析mc²155和BCG感染对DC2.4细胞分泌蛋白组的影响

为了进一步探究结核分枝杆菌感染对树突状细胞的影响, 利用定量蛋白质组学分析mc²155和BCG感染的DC2.4细胞分泌组的差异。本课题组发现, 相对于未被感染的DC2.4细胞, mc²155感染比BCG感染引起细胞分泌组发生更明显的变化。利用上述同样的TMT比值, 在mc²155感染的树突状细胞分泌组中, 鉴定到57个上调蛋白和83个下调蛋白(分泌组学分析结果见网络版附表3)。特别值得注意的是mc²155感染诱导DC2.4细胞分泌大量的细胞因子和趋化因子, 而BCG感染并不引起这些因子的分泌(图3A)。本课题组用Western blot验证了分泌蛋白ISG15在未被感染、mc²155感染和BCG感染的DC2.4细胞培养基中的差异(图3B), 证明mc²155感染引起ISG15的分泌; 而ELISA分析发现mc²155感染诱导DC2.4细胞分泌IL6 (图3C), 与分泌组学分析获得的结果一致。这些结果证明mc²155感染诱导DC2.4细胞大量地分泌细胞因子和趋化因子, 这些因子通过激活免疫系统, 导致耻垢分枝杆菌迅速地被宿主清除; 相反, BCG的感染并不引起明显的细胞因子和趋化因子的分泌, 使得BCG在宿主中长期存活。

2.4 耻垢分枝杆菌感染诱导原代免疫细胞分泌IFN- γ

结核分枝杆菌感染宿主后, 激活宿主的免疫体系, 导致T淋巴细胞分泌杀伤细菌的细胞因子IFN- γ 。为了

图 2 mc²155感染引起宿主细胞的免疫相关蛋白及通路的上调

A: 蛋白质组学分析揭示 I 型干扰素诱导表达蛋白的上调; B: 蛋白质组学分析表明部分NF-kappa-B, ERK 和STAT通路相关蛋白的变化; C: 蛋白质组学分析发现TNF通路相关蛋白的上调; D: 蛋白质组学分析其他免疫相关通路蛋白的变化。以上结果通过3次平行重复结果的 $\bar{x} \pm SD$ 来显示, 并采用student's *t*方法计算*P*值, ***: *P*<0.01; **: *P*<0.05; *: *P*<0.1; E: Western blot验证IFIT3和ISG15在无感染、耻垢分枝杆菌mc²155感染和BCG感染的DC2.4细胞中的表达; F: qPCR分析验证蛋白质组学中鉴定的蛋白在mRNA水平上的变化。结果通过3次平行重复结果的 $\bar{x} \pm SD$ 来显示, 并采用 student's *t*方法计算*P*值, ***: *P*<0.001; **: *P*<0.01

证实在复杂的免疫系统中, mc²155感染比BCG感染诱导更强的免疫反应, 从小鼠脾脏中提取包含树突状细

胞、单核细胞、巨噬细胞、T淋巴细胞等的原代免疫细胞, 并分别用PHA, mc²155和BCG处理, 然后利用

图 3 mc²155 感染诱导宿主细胞分泌细胞因子和趋化因子

A: 分泌组学揭示 mc²155 感染比 BCG 感染诱导宿主细胞分泌更多的细胞因子和趋化因子。以上结果通过 3 次平行重复结果的 $\bar{x} \pm SD$ 来显示, 并采用 student's *t* 方法计算 *P* 值, ***: *P* < 0.01; **: *P* < 0.05; *: *P* < 0.1; B: Western blot 验证 ISG15 在未被感染、耻垢分枝杆菌感染和 BCG 感染的 DC2.4 细胞培养基中的蛋白水平; C: ELISA 验证 IL6 在未被感染、耻垢分枝杆菌 mc²155 感染和 BCG 感染的 DC2.4 细胞培养基中的表达水平。结果通过 3 次平行重复结果的 $\bar{x} \pm SD$ 来显示, 并采用 student's *t* 方法计算 *P* 值, **: *P* < 0.01; *: *P* < 0.05

ELISA 试剂盒检测细胞培养基中 IFN- γ 的含量。结果显示, 相对于未被感染的细胞群, mc²155 感染诱导原代免疫细胞分泌大量的 IFN- γ , 而 BCG 感染的原代免疫细胞仅分泌少量的 IFN- γ (图 4A)。本研究显示, 耻垢分枝杆菌和作为阳性对照的 PHA 一样可以诱导 IFN- γ 的大量分泌。

2.5 ISG15 阻止分枝杆菌进入树突状细胞

蛋白组学和分泌组学数据都证实耻垢分枝杆菌感染引起 ISG15 蛋白的高表达和分泌, 而 BCG 则无法引起类似的变化。为了研究 ISG15 在细菌感染树突状细胞过程中的功能, 将带有 *ISG15* 目的基因的 pcDNA3.1 质粒转入 DC2.4 细胞中从而建立了过表达 N 端带有 2 个 Flag 标签 ISG15 的树突状细胞系。Western blot 分析证实在此细胞系中 ISG15 高表达 (图 4B)。用可表达 GFP 的耻垢分枝杆菌和 BCG 分别处理 DC2.4 和过表达 ISG15 的 DC2.4 细胞, 4 h 后去除培养液中的细菌并测定细胞内 GFP 的荧光强度, 发现进入过表达 ISG15 的 DC2.4 细胞的 mc²155 或者 BCG 数目显著少于进入对照细胞的数目 (图 4C), 表明 ISG15 的高表达阻碍分枝杆菌进入树突状细胞。

3 讨论

生长迅速的非致病耻垢分枝杆菌和生长缓慢的

BCG 都常被用作研究结核分枝杆菌的模式细菌, 然而耻垢分枝杆菌和 BCG 引起的宿主免疫反应存在显著差异。为了确定耻垢分枝杆菌和 BCG 对宿主细胞的影响, 分别用耻垢分枝杆菌和 BCG 感染小鼠树突状细胞 DC2.4, 结果发现耻垢分枝杆菌在 DC2.4 细胞中被迅速清除, 而 BCG 则可以在 DC2.4 中存活较长的时间。

通过蛋白质组学的分析, 发现耻垢分枝杆菌感染激活 DC2.4 细胞的多个免疫反应通路, 包括 I 型干扰素通路, NF- κ B, ERK, STAT 通路和 TNF 通路。这些免疫相关通路的激活导致耻垢分枝杆菌在树突状细胞中被迅速清除。分泌组学分析发现, 耻垢分枝杆菌的感染促使树突状细胞分泌大量的细胞因子和趋化因子。这些因子的释放可以招募并激活其他免疫细胞行使其相应的功能。大量的研究表明, 细菌进入树突状细胞后, 在溶酶体的作用下, 细菌发生分解, 树突状细胞将相应的抗原递呈到细胞表面, 以激活 T 淋巴细胞分泌 IFN- γ 。与此一致的是, 本课题组发现, mc²155 的感染诱导小鼠脾脏原代免疫细胞分泌大量的 IFN- γ , 而 BCG 感染并不引起类似 IFN- γ 的释放, 说明耻垢分枝杆菌的感染能激活小鼠的抗细菌免疫体系, 从而使耻垢分枝杆菌被宿主快速清除, 导致耻垢分枝杆菌无法产生致病性。而 BCG 在树突状细胞难以激活抗细菌的免疫反应, 类似于结核分枝杆菌, BCG 在树突状细胞

内可以长期存活。

I 型干扰素诱导表达的蛋白 ISG15 在 mc^2155 感染的细胞中高表达并大量分泌到胞外, 说明 ISG15 在抗分枝杆菌的免疫反应中起着重要作用。已有的研究证明, 分泌的 ISG15 可诱导淋巴细胞释放大量的 $IFN-\gamma$ ^[20]。本研究发现, ISG15 过表达导致进入树突状细胞 mc^2155 和 BCG 数量的减少, 意味着 ISG15 阻止了分枝杆菌进入宿主细胞。已有的研究表明, 大量结核分枝杆菌的

感染可以使得树突状细胞丧失激活 $CD4^+$ T 细胞免疫反应的能力^[16]。本研究表明, 耻垢分枝杆菌引起的 ISG15 高表达阻止了耻垢分枝杆菌的进一步感染, 从而可以保持树突状细胞进行免疫递呈的能力, 进而激活机体的适应性免疫体系来清除耻垢分枝杆菌。图 5 简略展示了耻垢分枝杆菌和 BCG 感染树突状细胞引起的变化以及 ISG15 在分枝杆菌-宿主细胞相互作用中的功能。

图 4 耻垢分枝杆菌感染引起小鼠脾脏免疫细胞群分泌 $IFN-\gamma$

A: ELISA 分析无处理、PHA 刺激、 mc^2155 感染和 BCG 感染的小鼠脾脏免疫细胞群分泌 $IFN-\gamma$ 的含量。结果通过 3 次平行重复结果的 $\bar{x} \pm SD$ 来显示, 并采用 student's t 方法计算 P 值, ***: $P < 0.001$, **: $P < 0.01$; B: Western blot 验证 ISG15-DC2.4 细胞中 ISG15 的过表达; C: 细菌刺激 4 h 后, ISG15-DC2.4 和 Ctrl-DC2.4 细胞内 mc^2155 和 BCG 相对数量, 相对荧光强度与细菌含量成正比。结果通过 3 次平行重复结果的 $\bar{x} \pm SD$ 来显示, 并采用 student's t 方法计算 P 值, ***: $P < 0.001$

图 5 耻垢分枝杆菌和 BCG 感染树突状细胞引起变化的示意图以及 ISG15 在分枝杆菌-宿主细胞相互作用中的功能

4 结论

本研究利用定量蛋白质组学和分泌组学分析, 鉴定了耻垢分枝杆菌感染激活的树突状细胞免疫相关通路以及诱导分泌的细胞因子和趋化因子, 并证明耻垢分枝杆菌促使小鼠原代淋巴细胞释放IFN- γ , 使得胞内或胞外的耻垢分枝杆菌能被迅速清除; 而BCG则不能引起类似的免疫反应, 从而在树突状细胞内可以长期

存活. 耻垢分枝杆菌的感染引起ISG15的高表达和分泌, 胞内ISG15的高表达阻止分枝杆菌的侵袭, 从而维持树突状细胞的功能, 而分泌的ISG15可以通过激活T细胞释放IFN- γ . 本研究阐明了耻垢分枝杆菌和BCG对宿主细胞免疫通路不同的激活作用, 并揭示了在耻垢分枝杆菌感染宿主细胞过程中ISG15的功能, 加深了对结核分枝杆菌-宿主细胞相互作用的理

致谢 感谢清华大学生物医学分析测试中心蛋白质化学平台提供的质谱和蛋白质组学分析.

参考文献

- Bloom B R, Murray C J L. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science*, 1992, 257: 1055–1064
- Divangahi M, Mostowy S, Coulombe F, et al. *NOD2*-deficient mice have impaired resistance to mycobacterium tuberculosis infection through defective innate and adaptive immunity. *J Immunol*, 2008, 181: 7157–7165
- Tanne A, Ma B, Boudou F, et al. A murine DC-SIGN homologue contributes to early host defense against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med*, 2009, 206: 2205–2220
- Smith J, Manoranjan J, Pan M, et al. Evidence for pore formation in host cell membranes by ESX-1-secreted ESAT-6 and its role in *Mycobacterium marinum* escape from the vacuole. *Infect Immun*, 2008, 76: 5478–5487
- Pathak S K, Basu S, Basu K K, et al. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. *Nat Immunol*, 2007, 8: 610–618
- Walburger A, Koul A, Ferrari G, et al. Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science*, 2004, 304: 1800–1804
- Shin D M, Jeon B Y, Lee H M, et al. *Mycobacterium tuberculosis* eis regulates autophagy, inflammation, and cell death through redox-dependent signaling. *PLoS Pathog*, 2010, 6: e1001230
- Kim K H, An D R, Song J, et al. *Mycobacterium tuberculosis* eis protein initiates suppression of host immune responses by acetylation of DUSP16/MKP-7. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 7729–7734
- Organization W H. BCG vaccine. WHO position paper. Relevé épidémiologique hebdomadaire/Section d'hygiène du Secrétariat de la Société des Nations=Weekly epidemiological record/Health Section of the Secretariat of the League of Nations, 2004, 79: 27
- Venkataswamy M M, Goldberg M F, Baena A, et al. *In vitro* culture medium influences the vaccine efficacy of *Mycobacterium bovis* BCG. *Vaccine*, 2012, 30: 1038–1049
- 李文桂, 陈蕊, 陈雅棠. 结核分枝杆菌重组耻垢分枝杆菌疫苗的研究进展. 中国病原生物学杂志, 2006, 1: 148–149
- King G M. Uptake of carbon monoxide and hydrogen at environmentally relevant concentrations by *Mycobacteria*. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 7266–7272
- Steinman R M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol*, 2012, 30: 1–22
- Divangahi M, Desjardins D, Nunes-Alves C, et al. Eicosanoid pathways regulate adaptive immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Immunol*, 2010, 11: 751–758
- Blomgran R, Desvignes L, Briken V, et al. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits neutrophil apoptosis, leading to delayed activation of naive CD4 T cells. *Cell Host Microbe*, 2012, 11: 81–90
- Wolf A J, Linas B, Trevejo-Nunez G J, et al. *Mycobacterium tuberculosis* infects dendritic cells with high frequency and impairs their function *in vivo*. *J Immunol*, 2007, 179: 2509–2519
- Demangel C, Bertolino P, Britton W. Autocrine IL-10 impairs dendritic cell (DC)-derived immune responses to mycobacterial infection by suppressing DC trafficking to draining lymph nodes and local IL-12 production. *Eur J Immunol*, 2002, 32: 994–1002
- Tian T, Woodworth J, Skold M, et al. *In vivo* depletion of CD11c⁺ cells delays the CD4⁺ T cell response to *Mycobacterium tuberculosis* and exacerbates the outcome of infection. *J Immunol*, 2005, 175: 3268–3272
- 陈宇凌, 江晓勇, 杨帆, 等. 定量蛋白质组学分析PknG在分枝杆菌中的功能. 中国科学: 生命科学, 2014, 44: 1051–1060

- 20 Bogunovic D, Byun M, Durfee L A, et al. Mycobacterial disease and impaired IFN- γ immunity in humans with inherited ISG15 deficiency. *Science*, 2012, 337: 1684–1688

Quantitative proteomics analysis of *M. smegmatis*- and BCG-infected dendritic cells

HUO Yi¹, ZONG ZhaoYun¹, MI KaiXia² & DENG HaiTeng¹

¹ MOE Key Laboratory of Bioinformatics, School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

² Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Understanding the interactions between mycobacterium and host cells is important for developing new therapeutic strategies for tuberculosis prevention and treatment. Due to the fast-growing and nonpathogenic nature, *Mycobacterium smegmatis* has been widely used as the model system for studying *Mycobacterium tuberculosis*. In the present study, the slow growing Bacillus Calmette-Guérin vaccine strain of *Mycobacterium bovis* (BCG) and the fast growing *M. smegmatis* mc²155 were used to infect murine dendritic cells (DC2.4). Our results showed that BCG survived a longer period of time than *M. smegmatis* in host cells. Quantitative proteomics was carried out to identify differentially expressed proteins between BCG- and *M. smegmatis*-infected DCs. The results showed that mc²155-infection activated the type I interferon (IFN) signaling pathway, leading to upregulation of AIM2, IFI204, IFIT1 and ISG15, whereas BCG-infection had little effects on the proteome of host cells. Secretome analysis indicated that expression levels of C-C motif chemokines, ISG15, TNF, and IL-6 were increased in the medium of *M. smegmatis*-infected cells while they were less changed in the medium of BCG-infected DCs, suggesting that infection by the fast growing mycobacterium promoted cytokine and chemokine release to enhance clearance of infected cells. This was confirmed by ELISA analysis showing that a higher amount of INF- γ was produced when mouse spleen-derived immune cells were infected with *M. smegmatis* than that produced by BCG infection. Furthermore, we showed that ISG15 overexpression blocked the entry of mycobacteria into host cells. Taken together, our results demonstrated that the fast growing *M. smegmatis* elicits stronger innate immune responses than the slow growing mycobacterium, resulting in quick clearance of mc²155 in host cells. Upregulation of ISG15 in mc²155 infected cells inhibited endocytosis of mycobacteria.

BCG, *Mycobacterium smegmatis*, dendritic cells, proteomics

doi: [10.1360/N052017-00151](https://doi.org/10.1360/N052017-00151)