

结核分枝杆菌 EsxV 亚单位疫苗黏膜免疫诱导的免疫应答

白 鹭^{1,2}, 宁唤唤², 康 健², 梁璇³, 谢燕玲^{1,2}, 彭钰君², 张婧瑶², 路延之², 柏银兰²

摘要:目的 研究结核分枝杆菌抗原 Rv3619c(EsxV)黏膜免疫小鼠诱导的免疫应答水平。方法 PCR 法扩增 *esxV* 基因克隆入原核表达载体 pET28a(+), 获得的重组 *E.coli* 诱导表达目的蛋白, SDS-PAGE 电泳和 Western Blot 鉴定蛋白的表达, 亲和层析法纯化 EsxV 蛋白。以 EsxV 和/或联合环二腺苷酸(c-di-AMP)经鼻黏膜免疫 BALB/c 小鼠, ELISA 法检测小鼠特异性抗体水平及亚类, MTS 法检测脾细胞增殖, qRT-PCR 检测脾和肺脏细胞因子表达水平, ELISA 法检测脾细胞因子分泌水平。结果 成功构建 EsxV 的原核表达载体 pET28a(+)-*esxV* 并诱导表达目的蛋白, 亲和层析法获得了纯化的重组 EsxV 蛋白。EsxV 经黏膜免疫可诱导显著的体液免疫应答, 但诱导的细胞免疫应答水平不高。EsxV 与 c-di-AMP 经黏膜接种可诱导特异性 IgG 水平增加, EsxV 蛋白特异的脾细胞增殖, 脾和肺细胞的 IFN-γ 转录增加。c-di-AMP 显著提高 EsxV 特异的 IFN-γ、IL-2、IL-10 和 IL-17 细胞因子分泌, 而不诱导炎症因子 TNF-α 和 IL-6 表达。结论 EsxV 与 c-di-AMP 佐剂构建的亚单位疫苗可诱导特异性体液和细胞免疫应答, 可进一步用于新型结核病亚单位疫苗的研制。

关键词:结核分枝杆菌; 6kDa 早期分泌靶抗原分泌系统蛋白 V(EsxV); 亚单位疫苗; 黏膜免疫; 环二腺苷酸

中图分类号:R378.91 文献标识码:A 文章编号:1002-2694(2022)05-0379-08

Immune responses induced by mucosal immunization with *Mycobacterium tuberculosis* EsxV subunit vaccine

BAI Lu^{1,2}, NING Huan-huan², KANG Jian², LIANG Xuan³, XIE Yan-ling^{1,2},
PENG Yu-jun², ZHANG Jing-yao², LU Yan-zhi², BAI Yin-lan²

(1. School of Life Sciences, Yan'an University, Yan'an 716000, China;
2. Department of Microbiology and Pathogen Biology, Basic Medical School,
Air Force Medical University, Xi'an 710032, China;
3. College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: This study investigated the immune responses induced by mucosal immunization with *Mycobacterium tuberculosis* antigen Rv3619c (EsxV) in mice. The *esxV* gene was amplified by PCR and cloned into the prokaryotic expression vector pET28a(+). Recombinant *E. coli* were induced to express the EsxV protein. Protein expression was identified by SDS-PAGE electrophoresis and western blotting. The recombinant EsxV protein was purified by affinity chromatography. BALB/c mice were immunized with EsxV and/or cyclic diadenosine monophosphate (c-di-AMP) adjuvant via the nasal mucosa. Specific antibody levels and subclasses were detected with ELISA. Splenocyte proliferation was detected with MTS assays. Cytokine expression levels in the spleen and lung were detected by qRT-PCR. Cytokines secreted by splenocytes were detected by ELISA. The prokaryotic expression vector pET28a (+)-*esxV* was successfully constructed. The recombinant EsxV protein was induced and expressed, then purified by affinity chromatography. EsxV induced significant humoral immune responses, but modest cellular immune responses, through mucosal immunization. Mucosal inoculation of EsxV with c-di-AMP induced an increase in specific IgG levels, EsxV protein-specific

国家“十三五”重大传染病专项课题(No.2018ZX10302302002004)、国家自然科学基金面上项目(No.81971560, No.81671638)和陕西省重点项目(No.2019ZDLSF02-04)联合资助
通讯作者:柏银兰, Email:yinlanbai@fmmuedu.cn;

ORCID:0000-0001-5867-5308

宁唤唤, Email:ninghuanhuan2014@163.com;

ORCID:0000-0002-8179-4716

作者单位:1.延安大学生命科学学院,延安 716000;

2.空军军医大学基础医学院微生物与病原生物学教研室,
西安 710032;

3.西北大学生命科学学院,西安 710069

splenocyte proliferation, and spleen and lung IFN- γ transcription. c-di-AMP significantly enhanced EsxV-specific secretion of the IFN- γ , IL-2, IL-10 and IL-17 cytokines, but did not induce the expression of the inflammatory factors TNF- α and IL-6. The subunit vaccine constructed by EsxV and c-di-AMP induced specific humoral and cellular immune responses, which should be further used in the development of novel TB subunit vaccines.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; 6 kDa early secretory antigenic target secretion system protein V (EsxV); subunit vaccine; mucosal immune; cyclic dimeric adenosine monophosphate(c-di-AMP)

Supported by the National Science Project of Major Infectious Diseases during the 13th Five-Year Plan (No. 2018ZX10302302002004), the National Natural Science Foundation of China (No.81971560, No.81671638), the and Key Research and Development Program of Shaanxi Province (No.2019ZDLSF02-04)

Corresponding authors: Bai Yin-lan, Email: yinlanbai@fmmuedu.cn; Ning Huan-huan, Email: ninghuanhuan2014@163.com

结核病(Tuberculosis, TB)是由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)经呼吸道感染引起的危害严重的慢性传染病。据WHO最新报道,2020年全球新发TB病例为1 000万,引起约140万人死亡^[1]。卡介苗(*Bacillus Calmette-Guerin*, BCG)是牛分枝杆菌连续传代后获得的减毒活疫苗,是惟一获得批准的TB预防性疫苗。但是接种BCG对成人TB的保护作用不完善^[2]。此外,BCG是减毒活疫苗,在免疫低下人群接种可能造成播散性感染。因此,研发安全、有效的疫苗是TB防治领域的重要内容。

BCG在基因传代中发生一些基因丢失,丢失的基因片段称为差异区域(Region of difference, RD)^[3]。RD区编码的免疫优势抗原丢失被认为是BCG保护作用不完善的主要原因之一^[4]。如RD1区Rv3875编码的6 kDa早期分泌靶抗原(6 kDa early secretory antigen target, ESAT-6)具有多个T、B细胞以及迟发型超敏反应的抗原表位,可诱导特异性体液免疫,刺激T细胞产生IFN- γ ^[5]。ESAT-6是WXG100蛋白家族中第一个发现的蛋白^[6],WXG100蛋白家族一般由约100个氨基酸组成,区域中心含有保守的Trp-X-Gly(WXG)基序,共有23个成员(EsxA-EsxW)。WXG100家族蛋白的编码基因大多位于ESAT-6分泌系统(ESAT-6 secretion system, ESX)的基因座上,是Mtb特有的VII型分泌系统(type VII secretion system, T7SS)典型的分泌底物。WXG100蛋白家族不仅参与Mtb致病机制,而且大多数是可诱导T细胞免疫应答的抗原^[7]。

Rv3619c基因编码的WXG100蛋白家族EsxV是一种分泌蛋白,位于RD9区^[8],也是Mtb和BCG之间的差异蛋白。研究表明,EsxV重组蛋白经肌肉免疫兔,可诱导机体产生抗体^[9]。EsxV经皮下接种可诱导小鼠Th1型细胞免疫应答^[8]。由脂质

体包裹EsxV制备的纳米疫苗经皮下接种小鼠,可刺激产生Th1型细胞免疫应答,且能够诱导长效的免疫记忆,接种后可降低Mtb感染小鼠脏器的荷菌数^[10]。EsxV皮下免疫豚鼠,Mtb感染后可引发迟发型超敏反应,表明其可用于诊断试剂的研制^[11]。因此,EsxV免疫可诱导宿主抗Mtb感染的免疫力,可用于TB新疫苗的研制。

Mtb主要经呼吸道传播,所以黏膜免疫在抵抗Mtb感染中发挥重要作用^[12]。细菌第二信号分子环二腺苷酸(Cyclic dimeric adenosine monophosphate, c-di-AMP)能够激活I型IFN^[13]、自噬、炎症小体^[14-15]等多种固有免疫调控机制。同时,c-di-AMP可作为黏膜佐剂,增强抗原诱导的细胞免疫应答^[16]。课题组前期研究发现,c-di-AMP作为黏膜佐剂,可显著提高ESAT-6诱导的免疫应答水平^[17]。表明c-di-AMP可作为黏膜佐剂用于亚单位疫苗的研制。本研究在原核表达系统中诱导表达并纯化EsxV重组蛋白,以EsxV和/或以c-di-AMP为佐剂构建亚单位疫苗,对EsxV为基础的亚单位疫苗黏膜免疫小鼠诱导的体液和细胞免疫应答进行了研究。本研究将为EsxV用于TB疫苗的研制提供一定的理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂 分子生物学试剂:DNA聚合酶、限制性内切酶均购自Takara公司,PCR回收试剂盒、质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒购自Axygen公司。Ni Sepharose购自GE公司;BCA蛋白定量试剂盒购自Thermo公司;PVDF膜购自Millipore公司;异丙基β-D-硫代半乳糖苷(Isopropyl beta-D-thiogalactoside, IPTG)购自Sigma公司;Total RNA Kit I试剂盒购自OMEGA公司;HiScript II Q RT SuperMix for qPCR试剂盒购自Vazyme公司。

免疫学试剂:6×His单克隆抗体购自Abcam

公司;Mtb H37Rv 小鼠感染血清为本室制备保存;HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG、IgG 1、IgG 2a、IgG 2b 和 IgG 3 购自北京中杉金桥生物技术有限公司;ECL 发光液购自 Selleck 公司;c-di-AMP 购自 InvivoGen 公司;细胞增殖 MTS 检测试剂盒购自 Promega 公司;小鼠细胞因子检测试剂盒购自 Invitrogen 公司。

1.2 菌株与实验动物 大肠杆菌(*Escherichia coli*,*E.coli*)DH5α、BL21 菌株为本室保存。6~8 周龄雌性无特定病原体(Specific pathogen free, SPF)BALB/c 小鼠, 购自空军军医大学实验动物中心。实验动物使用 3R 原则给予人道关怀。实验操作根据《实验动物饲养管理与使用指南》的建议进行。

1.3 方法

1.3.1 引物设计及目的基因获取 从 NCBI GenBank 数据库获取 Mtb H37Rv 株的 *esxV* 编码序列, 设计一步克隆法引物序列, 由擎科生物科技有限公司合成引物(表 1)。以 Mtb H37Rv 株 DNA 为模板, PCR 扩增目的基因 *esxV*。1% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物, 回收目的基因片段。

表 1 PCR 引物序列

Tab.1 Primer sequences for PCR

| 目的基因 | 引物序列(5'-3') |
|--------------|--|
| <i>esxV</i> | F: GTGCCGCGCGCAGCC <u>ATAT</u> GATGACCA- TCAACTATCAATT <u>CGG</u> ① R: CTCGAGTGCGGCCG <u>CAAG</u> CTTTAGGCC- CAGCTGGAGCC② |
| <i>gapdh</i> | F: ACAACTTGGCATTGTGGAA R: GATGCAGGGATGATGTTCTG |
| <i>ifn-γ</i> | F: GCTCTGAGACAATGAACGCTAC R: TGCAGGATTTCATGTCACC |
| <i>il-2</i> | F: CTTGTGCTCCTGTCAACAG R: TCCAAGTTCATCTTAGGC |
| <i>il-10</i> | F: TGCTCTTACTGACTGGCAT R: CTGGATCATTCCGATAAGGC |

注:①:下划线为 *Nde* I 酶切位点;②:下划线为 *Hind* III 酶切位点。

1.3.2 原核表达载体的构建 pET 28a(+)质粒以 *Nde* I/*Hind* III 酶切, 37 °C 反应 3 h。1% 核酸电泳后回收线性化载体。线性化 pET 28a(+)和纯化的 PCR 产物进行重组反应, 37 °C 30 min。重组产物转化 DH5α 感受态细胞, 用含 25 μg/mL 卡那霉素(Kan)的抗性 LB 平板筛选转化子。挑取阳性克隆

接种于液体培养基扩大培养, 提取重组质粒。*Nde*I/*Hind* III 酶切鉴定阳性质粒进一步序列测定(擎科生物)。

1.3.3 EsxV 的诱导表达及鉴定 将测序正确的重组质粒转化 *E.coli* BL21 菌株, 挑取阳性克隆于含 25 mg/mL 卡那霉素的 LB 培养基培养 16 h, 按照 1:1 000 的比例将细菌培养物转接至 5 mL 新鲜培养基中, 37 °C、220 r/min 震荡培养至 OD₆₀₀ = 0.6, 加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 37 °C 继续培养 4 h。制备诱导菌蛋白样品, 15% SDS-PAGE 电泳观察目的蛋白的表达情况。

菌体蛋白样品 SDS-PAGE 电泳后, 100 V 电压转印 PVDF 膜; PBST 洗膜后, 加入 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 分别加入 6×His 单克隆抗体(1:500)和 Mtb H37Rv 小鼠感染血清(1:500)4 °C 孵育过夜; PBST 洗膜后, 加入 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG(1:5 000)37 °C 孵育 45 min; PBST 洗膜后, ECL 化学发光法显色, 观察蛋白表达。

1.3.4 EsxV 的大量纯化 重组菌大量诱导表达, 采用 Ni-NTA agarose 亲和层析法纯化目的蛋白。用 50 mL 的 Lysis buffer(40 mmol/L NaPO₄, 0.5 mol/L NaCl, 0.5% Triton-X 100, 0.5 mg/mL Lysozyme, 1 mmol/L PMSF, pH 8.0)重悬菌体沉淀, 室温摇床孵育 1 h, 冰浴下超声 10 min, 5 s ON, 10 s OFF。12 000 r/min 4 °C 离心 30 min, 将上清移入 Binding buffer(40 mmol/L NaPO₄, 0.5 mol/L NaCl, 10 mmol/L imidazole, pH 8.0)平衡后的纯化 Ni-NTA agarose 柱中, 4 °C 旋转仪上结合 2 h, 分别以 50 mL Binding buffer 和 Wash buffer(40 mmol/L NaPO₄, 0.5 mol/L NaCl, 50 mmol/L imidazole, pH 8.0)洗涤。Elution buffer(40 mmol/L NaPO₄, 0.5 mol/L NaCl, 250 mmol/L imidazole, pH 8.0)分段洗脱, 分别流出液于 1.5 mL EP 管。收集包含目的蛋白的洗脱液以尿素梯度 PBS 透析, 最后在 10% 甘油 + PBS 缓冲液透析 30 min, 分装后 -80 °C 保存。

1.3.5 动物免疫 6~8 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠 20 只, 随机分成 4 组, 即正常对照组(Naïve)、佐剂组(c-di-AMP)、蛋白组(EsxV)、联合免疫组(EsxV:c-di-AMP)。各组小鼠分别滴鼻给予 50 μL/只的 PBS、c-di-AMP 5 μg、EsxV 30 μg、EsxV 30 μg+c-di-AMP 5 μg, 间隔 2 周, 免疫 4 次。第 3 和第 4 次免疫 EsxV 蛋白剂量减半, 佐剂剂量不变。

1.3.6 小鼠血清抗体及亚类检测 免疫完成 6 周后, 取小鼠眼静脉血, 分离血清。用 10 μg/mL 的

EsxV 抗原包被 96 孔 ELISA 酶标板, 分别加入经倍比稀释的小鼠血清, 37 °C 孵育 1 h; PBST 洗涤, 分别加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG、IgA、IgG 1、IgG 2a、IgG 2b、IgG 3、IgM 二抗 (1 : 5 000) 100 μL/孔, 37 °C 孵育 1 h; TMB 显色, 酶标仪检测 OD₄₅₀ 值。

1.3.7 小鼠脾细胞增殖检测 处死小鼠, 无菌取脾脏, 制备脾细胞悬液, 调整浓度至 1 × 10⁷ 个/mL, 接种 96 孔板 100 μL/孔; 刺激组加入去除内毒素的 EsxV 蛋白或者 ConA 终浓度分别为 5 μg/mL 和 2.5 μg/mL, 阴性对照孔加入 100 μL 完全培养基, 并设置空白对照孔。置细胞于 37 °C、5% CO₂ 培养 68 h 后, 加入 MTS 20 μL/孔, 继续培养 4 h, 检测 OD₄₉₀ 值, 计算脾细胞刺激指数 (Stimulated Index, SI) = OD₄₉₀ (刺激组 OD₄₉₀ - 空白对照 OD₄₉₀) / (阴性对照 OD₄₉₀ - 空白对照 OD₄₉₀)。

1.3.8 组织 RNA 的提取及实时定量 PCR 取小鼠肺脏和脾脏部分组织, Total RNA Kit I 试剂盒提取组织 RNA。使用 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR 试剂进行逆转录, 实时定量 PCR 检测 IFN-γ、IL-2、IL-10 转录水平, 以 GAPDH 作为内参。检测基因引物序列见表 1。

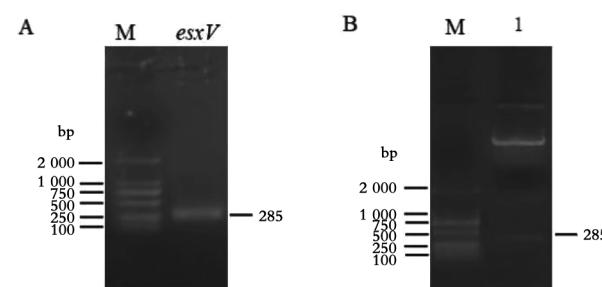
1.3.9 脾细胞分泌细胞因子检测 取 1.3.7 中的脾细胞悬液, 接种 96 孔板为 1 × 10⁶ 个/100 μL/孔, 刺激组加入去除内毒素的 EsxV 蛋白至终浓度 5 μg/mL, 阴性对照孔加入 100 μL 完全培养基, 并设置空白对照孔。培养 72 h, 收集细胞培养上清。按照 ELISA 试剂盒说明书, 检测小鼠脾细胞上清中细胞因子 IFN-γ、IL-2、IL-10、IL-17 的含量。

1.3.10 统计学分析 使用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计分析, 实验数据均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组比较采用 *t* 检验, 多组比较采用单因素方差分析, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 载体构建 *esxV* 基因大小为 285 bp, PCR 扩增出与目的片段大小一致的特异条带 (图 1A)。将目的基因亚克隆入 pET28a (+) 载体, 重组质粒 *Nde* I/*Hind* III 酶切鉴定结果显示, 可切出 *esxV* 片段大小一致条带 (图 1B)。测序结果表明, 插入序列与 *Mtb* H37Rv 株 *esxV* 公布序列完全一致。表明 pET28a (+)-*esxV* 原核表达载体建成功。

2.2 EsxV 的诱导表达及鉴定 含 pET-28a (+)-*esxV* 质粒的 *E.coli* BL21 在 IPTG 作用下, 诱导蛋白表达。EsxV 的理论分子量约为 10 kDa, 重组菌



A: *esxV* 的 PCR 扩增; B: 重组载体酶切鉴定; M: marker; 1: pET28a(+)-*esxV*

图 1 原核表达载体构建

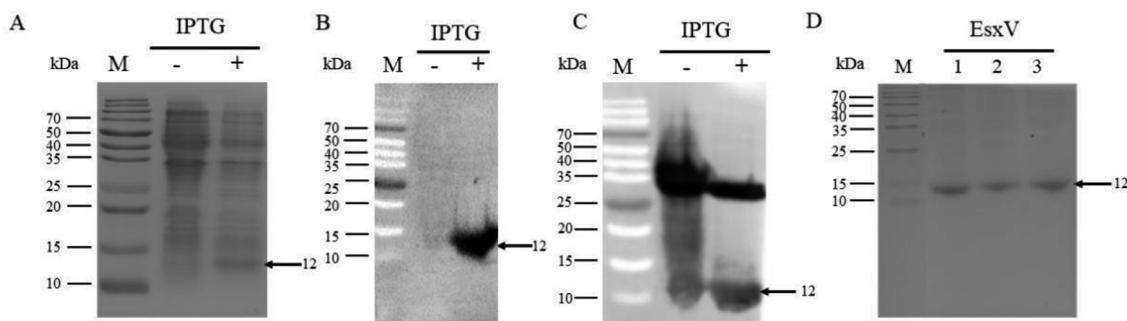
Fig.1 Construction of the prokaryotic expression vector

表达带有 6 × His 标签的目的蛋白, 重组蛋白分子量约为 12 kDa。15% SDS-PAGE 结果显示, 诱导菌体蛋白相对分子量 12 kDa 处有表达条带 (图 2A)。Western Blot 结果显示分子量约 12 kDa 处有抗 6 × His 特异反应条带 (图 2B) 和抗 *Mtb* H37Rv 小鼠血清特异反应条带 (图 2C)。采用亲和层析法获得了纯化的重组 EsxV 蛋白 (图 2D), 纯化的蛋白经 BCA 定量, 浓度为 1 μg/μL。

2.3 小鼠血清抗体检测 ELISA 检测血清中特异性抗体水平, 结果显示 EsxV 免疫小鼠血清中抗原特异性 IgG 的滴度为 1.6 × 10³ (稀释度为 1 : 1 600), EsxV:c-di-AMP 免疫组特异性 IgG 滴度为 3.2 × 10³ (稀释度为 1 : 3 200) (图 3A)。表明 EsxV 抗原经黏膜免疫可诱导特异性抗体的产生, c-di-AMP 作为佐剂可一定程度上提高抗原免疫诱导的体液免疫应答。小鼠血清抗体以 IgG 为主 (图 3B), 同时抗体亚类检测结果表明, 在 1 : 200 稀释度下, EsxV 诱导产生的抗体以 IgG 1 为主 (图 3C), EsxV 一定程度上抑制 IgM 水平。

2.4 小鼠脾细胞增殖检测 免疫小鼠脾细胞以 ConA、EsxV 体外刺激后, MTS 法检测细胞增殖情况, 结果表明, 非特异性抗原 ConA 可刺激所有组免疫小鼠脾细胞增殖, 各组间差异无统计学意义 (图 4A)。与对照组比较, EsxV 免疫小鼠后脾细胞增殖呈增加趋势, 但差异无统计学意义 (*t* = 2.243, *P* > 0.05); EsxV:c-di-AMP 免疫小鼠脾细胞增殖显著 (*t* = 6.743, *P* < 0.001) (图 4B)。表明 c-di-AMP 可增强 EsxV 经黏膜免疫诱导抗原特异性的脾细胞增殖能力。

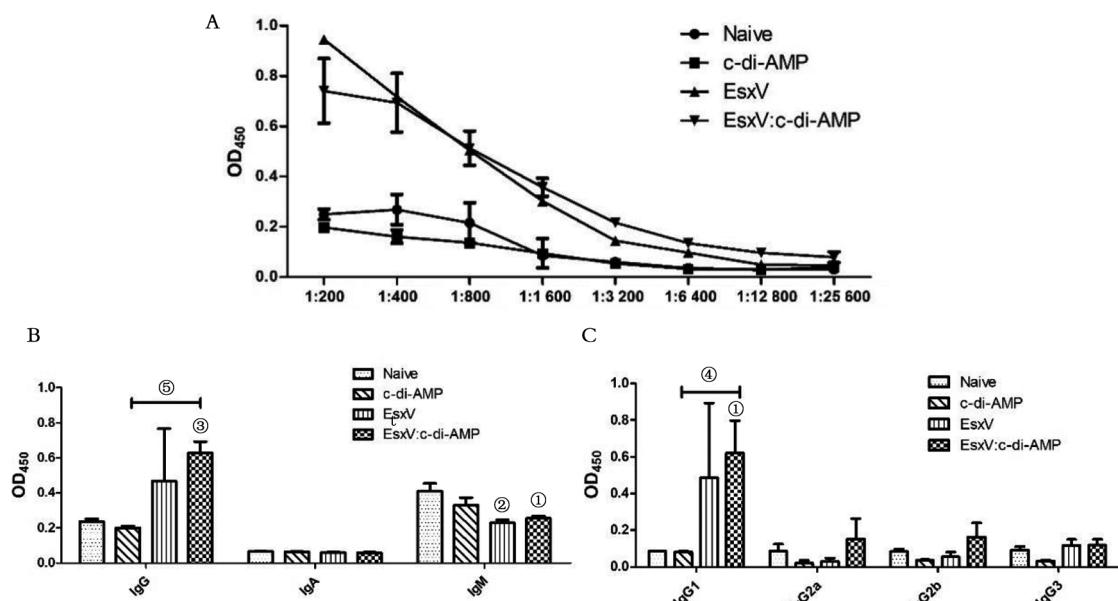
2.5 免疫小鼠脾和肺细胞因子转录水平检测 qRT-PCR 检测细胞因子转录水平结果显示, 在脾脏, 与对照组比较, EsxV 免疫组 IL-10 转录水平下降 (*t* = 6.422, *P* < 0.01)。EsxV:c-di-AMP 免疫组



A: EsxV 蛋白诱导表达; B: Western Blot 鉴定 EsxV 蛋白(一抗为 6xHis 单克隆抗体); C: Western Blot 鉴定 EsxV 蛋白(一抗为 H37Rv 感染小鼠血清); D: EsxV 蛋白亲和层析纯化

图 2 EsxV 蛋白的表达与纯化

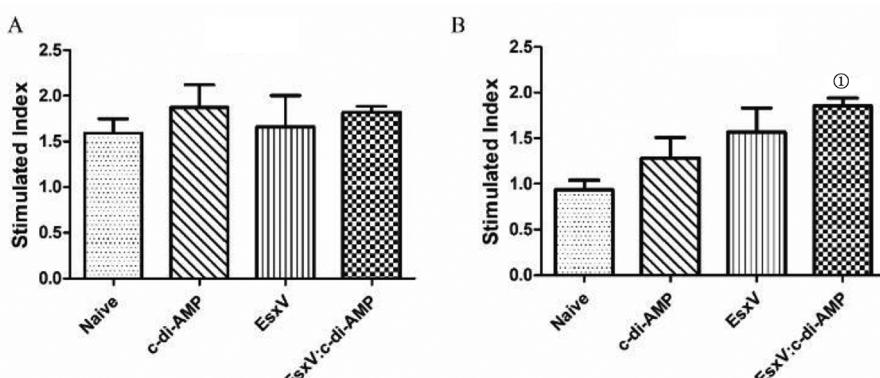
Fig.2 Expression and purification of EsxV



A: 抗体效价检测; B: 抗体亚类检测(小鼠血清 1:200 稀释); C: IgG 亚类检测(小鼠血清 1:200 稀释); 与对照组比较, ①为 $P < 0.05$, ②为 $P < 0.01$, ③为 $P < 0.001$; ④为 $P < 0.05$, ⑤为 $P < 0.01$

图 3 体液免疫应答水平和抗体亚类检测

Fig.3 Humoral immune response level and antibody subclass detection



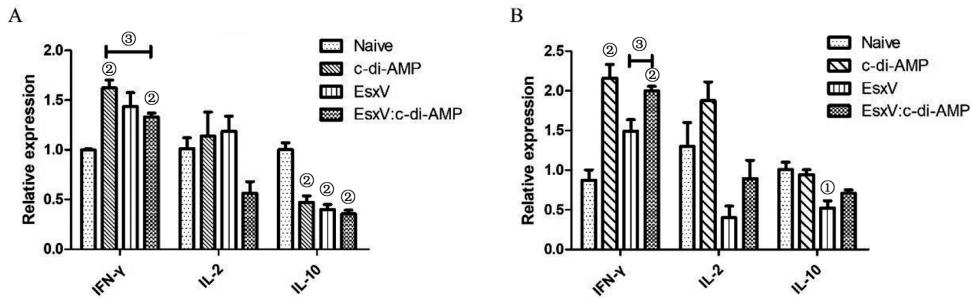
A: ConA 蛋白刺激脾细胞; B: EsxV 蛋白刺激脾细胞; 与对照组比较, ①为 $P < 0.001$

图 4 免疫小鼠脾细胞增殖

Fig.4 Splenocyte proliferation in immunized mice

IFN- γ 转录水平较对照组升高($t = 6.359, P < 0.01$)(图 5A);在肺部,与对照组比较,EsxV 免疫组 IFN- γ ($t = 2.605, P > 0.05$)、IL-2($t = 2.504, P > 0.05$)转录水平差异无统计学意义;IL-10 转录水平下降($t = 3.292, P < 0.05$)。EsxV:c-di-AMP 免疫组 IFN- γ 转录水平较对照组升高($t = 7.829, P <$

0.01),且高于 EsxV 免疫组($t = 5.627, P < 0.05$);IL-2 和 IL-10 转录水平与对照组和 EsxV 免疫组差异无统计学意义(图 5B)。上述结果表明,EsxV 免疫诱导脾和肺细胞因子表达水平不高,而 c-di-AMP 可增强 EsxV 经黏膜免疫诱导的 IFN- γ 表达,但对 EsxV 诱导的 IL-2 和 IL-10 水平影响不大。



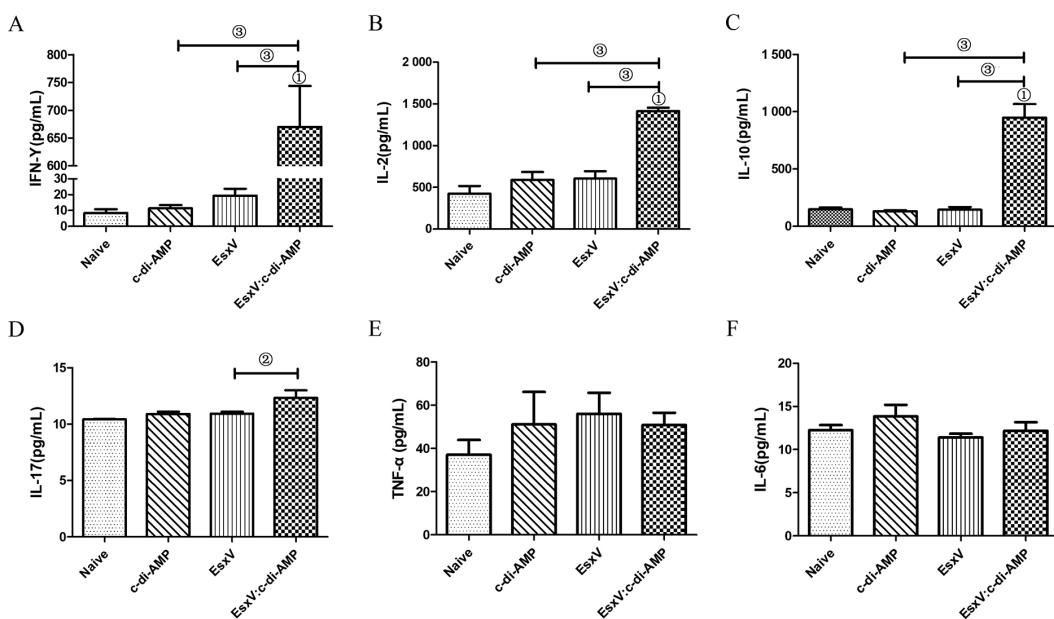
A: 小鼠脾组织 IFN- γ 、IL-2 和 IL-10 转录水平检测;B: 小鼠肺组织 IFN- γ 、IL-2 和 IL-10 转录水平检测;与对照组比较,①为 $P < 0.05$, ②为 $P < 0.01$, ③为 $P < 0.001$

图 5 小鼠脾和肺细胞因子转录水平

Fig.5 Cytokine transcription levels in mouse lung and spleen

2.6 脾细胞分泌细胞因子检测 脾细胞体外抗原刺激后,ELISA 法检测细胞因子的分泌水平。结果显示,EsxV 免疫组各细胞因子的分泌水平与对照组相当。相比于 EsxV 免疫组,EsxV:c-di-AMP 免疫组脾细胞的 IFN- γ ($t = 8.818, P < 0.001$)、IL-2($t = 8.061, P < 0.001$)、IL-10($t = 6.588, P < 0.001$)和 IL-17($t = 2.632, P < 0.05$)分泌水平都增

加(图 6A-D)。结果表明,EsxV 经鼻免疫诱导细胞免疫应答的能力不强,而 c-di-AMP 能够增强 EsxV 诱导的脾 Th1(IFN- γ 、IL-2)、Th2(IL-10) 和 Th17(IL-17)型细胞免疫应答。炎症因子分泌水平检测结果显示,各组间的 TNF- α ($F = 0.667, P > 0.05$)、IL-6($F = 1.270, P > 0.05$)分泌水平差异无统计学意义(图 6E-F)。



注:特异蛋白 EsxV 刺激小鼠脾细胞后 IFN- γ (A)、IL-2(B)、IL-10(C)、IL-17(D)、TNF- α (E)、IL-6(F) 的分泌水平。与对照组比较,①为 $P < 0.001$;②为 $P < 0.05$,③为 $P < 0.001$ 。

图 6 小鼠脾细胞的细胞因子分泌水平

Fig.6 Cytokine secretion by splenic lymphocytes in immunized mice

3 讨 论

亚单位疫苗具有成份明确、安全性良好和诱导高水平的免疫应答等优点,是疫苗的重要种类之一。亚单位疫苗可将多个抗原有机组合起来,在适宜的佐剂辅助下诱导高水平抗 Mtb 感染的免疫应答,且安全性好。增加抗原谱可有效提高亚单位疫苗的保护效率,筛选新的特异性 Mtb 抗原也是目前 TB 疫苗研制的重要方向之一。

WXG100 蛋白大多具有免疫原性。ESAT-6 是目前 WXG100 蛋白家族中研究最深入的蛋白,多项研究已证实其作为 TB 疫苗候选抗原的潜能^[5]。EsxW、Rv2608 以及 Mtb 潜伏感染蛋白 Rv1813 的融合蛋白组成的 ID83 亚单位疫苗与 Toll 样受体激动剂联合免疫小鼠,可诱导 Th1 型细胞免疫应答,并对低剂量 Mtb 呼吸道感染具有保护力^[18]。表达 EsxH(Rv0288)与 Ag85B 的重组 BCG 免疫小鼠,可诱导 Th1 CD4⁺ 细胞的增殖并且产生显著的抗 Mtb 感染保护力^[19]。EsxV 经肌肉免疫兔,可诱导特异性的抗体产生^[9]。此外,有研究报道,EsxV 经黏膜接种能够预防小鼠哮喘^[20]。本研究成功构建并原核表达 WXG100 家族蛋白 Esx,重组 EsxV 蛋白经鼻黏膜免疫小鼠,血清 IgG 效价可达到 1:1600,以 IgG 1 亚类为主(图 3)。表明重组 EsxV 蛋白经黏膜免疫,可诱导特异性的体液免疫应答。EsxV 蛋白经鼻免疫小鼠,对脾和肺组织的 Th1(IFN-γ、IL-2)型细胞因子的转录影响不大,但能抑制脾细胞 Th2(IL-10)型细胞因子转录(图 5)。EsxV 蛋白体外刺激免疫小鼠脾细胞,脾细胞增殖并不显著,而且脾细胞分泌细胞因子水平也无变化。表明 EsxV 蛋白经鼻黏膜免疫诱导的细胞免疫应答水平并不高。课题组前期研究发现,ESAT-6 单独免疫诱导的体液免疫和细胞免疫应答水平均不高,需要加入佐剂提高 ESAT-6 的免疫原性^[21]。因此,采用合适的佐剂可提高 EsxV 诱导的免疫应答水平。

目前,用于临床的疫苗佐剂有铝佐剂,主要介导体液免疫,对细胞免疫的诱导效果不佳^[22]。研究表明,加强小鼠黏膜免疫水平可提高抗 Mtb 感染能力^[23]。c-di-AMP 作为细菌的信号分子,可作为黏膜佐剂,与半乳糖苷联合经鼻黏膜接种,能够诱导小鼠黏膜免疫及 Th1/Th2/Th17 型细胞免疫应答^[16]。c-di-AMP 可增强流感抗原诱导的 Th1/Th2/Th17 和炎症因子应答^[24]。课题组前期研究发现,c-di-AMP 作为内源性佐剂能够增强重组 BCG 诱导的免疫应答水平^[25]。c-di-AMP 作为黏膜佐剂与 ESAT-6 联合免疫时,可诱导较高水平的固

有和适应性免疫应答,并且具有抗 Mtb 的保护作用^[17]。因此,c-di-AMP 可增强 Mtb 抗原的免疫原性,并可用于黏膜免疫,可用于 TB 黏膜疫苗佐剂。课题组前期研究发现,ESAT-6:c-di-AMP 免疫组的抗体效价为 1:1600,高于 ESAT-6 单独免疫组的 1:800,同时发现较 ESAT-6 免疫组,ESAT-6:c-di-AMP 免疫小鼠后可显著提高肺泡灌洗液中的 sIgA 水平^[17]。本研究中,EsxV:c-di-AMP 免疫组特异性 IgG 抗体效价为 1:3200,高于 EsxV 单独免疫组的 1:1600。本研究虽未检测 sIgA 的水平,但血清 IgG 水平检测获得了与前期结果相似的结论^[17]。

在小鼠脏器脾和肺中,c-di-AMP 免疫后可诱导 IFN-γ、IL-2 以及 IL-10 的转录水平增加,表明 c-di-AMP 可增强机体 Th1/Th2 的免疫反应。EsxV 单独免疫诱导的脾和肺 Th1/Th2 细胞因子转录水平不高,而 EsxV:c-di-AMP 经鼻黏膜接种后诱导的细胞因子转录水平均低于 c-di-AMP 免疫组(图 5)。研究表明,c-di-AMP 能够激活干扰素基因刺激分子(stimulator of interferon genes, STING)介导的 I 型干扰素应答,同时 c-di-AMP 的持续刺激能够引发钙蛋白酶对 STING 的降解^[26]。因此,推测 c-di-AMP 在胞浆内自限性、不连续的免疫调控机制,限制了其与 EsxV 抗原联合免疫诱导的细胞因子表达水平,这与前期研究 ESAT-6:c-di-AMP 免疫后小鼠肺组织细胞因子转录水平比 c-di-AMP 单独免疫组有所降低的结果相似^[17]。EsxV:c-di-AMP 诱导小鼠脾细胞显著的 Th1/Th2/Th17 型细胞免疫应答,但并不能增强炎症因子(TNF-α、IL-6)的转录水平(图 6),且 IL-1β 分泌水平均低于检测下限。表明 c-di-AMP 不仅可增强 EsxV 诱导的免疫应答,而且不引起可能的炎症病理损伤,因此,c-di-AMP 作为黏膜免疫佐剂也具有安全性。

综上,本研究获得的 EsxV:c-di-AMP 亚单位疫苗组合免疫小鼠,可诱导体液和细胞免疫应答,可用作 TB 亚单位新疫苗的研制。本课题组将进一步建立呼吸道感染动物模型,评价 EsxV:c-di-AMP 亚单位疫苗诱导的黏膜免疫应答,并评价该疫苗对 Mtb 感染的免疫保护效率。

利益冲突:无

引用本文格式:白鹭,宁唤唤,康健,等.结核分枝杆菌 EsxV 亚单位疫苗黏膜免疫诱导的免疫应答[J].中国人兽共患病学报,2022,38(5):379-386. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2022.00.051

参 考 文 献 :

- [1] WHO. Global tuberculosis report 2020 [R]. Geneva: WHO, 2021.
- [2] Abdallah AM, Behr MA. Evolution and strain variation in BCG [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1019 (8): 155-169. DOI: 10.1007/978-3-319-64371-7_8
- [3] Nieuwenhuizen NE, Kaufmann S. Next-generation vaccines based on Bacille Calmette-Guérin[J]. *Front Immunol*, 2018, 9 (3): 121. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00121
- [4] Zhang W, Zhang Y, Zheng H, et al. Genome sequencing and analysis of BCG vaccine strains[J]. *PLoS One*, 2013, 8 (8): e71243. DOI: 10.1371/journal.pone.0071243
- [5] Ruhwald M, de Thurah L, Kuchaka D, et al. Introducing the ESAT-6 free IGRA, a companion diagnostic for TB vaccines based on ESAT-6[J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 45969. DOI: 10.1038/srep45969
- [6] Ates LS, Brosch R. Discovery of the type VII ESX-1 secretion needle[J]. *Mol Microbiol*, 2017, 103 (1): 7-12. DOI: 10.1111/mmi.13579
- [7] Bitter W, Houben EN, Bottai D, et al. Systematic genetic nomenclature for type VII secretion systems[J]. *PLoS Pathog*, 2009, 5 (10): e1000507. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000507
- [8] Safar HA, Mustafa AS, Amoudy HA, et al. The effect of adjuvants and delivery systems on Th1, Th2, Th17 and Treg cytokine responses in mice immunized with *Mycobacterium tuberculosis*-specific proteins [J]. *PLoS One*, 2020, 15 (2): e0228381. DOI: 10.1371/journal.pone.0228381
- [9] Hanif SN, Al-Attiyah R, Mustafa AS. Molecular cloning, expression, purification and immunological characterization of three low-molecular weight proteins encoded by genes in genomic regions of difference of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Scand J Immunol*, 2010, 71 (5): 353-361. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2010.02388.x
- [10] Ansari MA, Zubair S, Mahmood A, et al. RD antigen based nanovaccine imparts long term protection by inducing memory response against experimental murine tuberculosis[J]. *PLoS One*, 2011, 6 (8): e22889. DOI: 10.1371/journal.pone.0022889
- [11] Hanif SN, Al-Attiyah R, Mustafa AS. Species-specific antigenic *Mycobacterium tuberculosis* proteins tested by delayed-type hypersensitivity response[J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2010, 14 (4): 489-494.
- [12] Chai Q, Lu Z, Liu CH. Host defense mechanisms against *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77 (10): 1859-1878. DOI: 10.1007/s00018-019-03353-5
- [13] Vasiyani H, Shinde A, Roy M, et al. The analog of cGAMP, c-di-AMP, activates STING mediated cell death pathway in estrogen-receptor negative breast cancer cells[J]. *Apoptosis*, 2021, 26 (5/6): 293-306. DOI: 10.1007/s10495-021-01669-x
- [14] Abdul-Sater AA, Tattoli I, Jin L, et al. Cyclic-di-GMP and cyclic-di-AMP activate the NLRP3 inflammasome[J]. *EMBO Rep*, 2013, 14 (10): 900-906. DOI: 10.1038/embor.2013.132
- [15] 宁唤唤, 徐志凯, 柏银兰. c-di-AMP 在细菌感染与免疫中的作用[J]. *微生物学通报*, 2019, 46 (9): 2362-2369. DOI: 10.13344/j.microbiol.china.180785
- [16] Ebensen T, Libanova R, Schulze K, et al. Bis-(3',5')-cyclic dimeric adenosine monophosphate: strong Th1/Th2/Th17 promoting mucosal adjuvant[J]. *Vaccine*, 2011, 29 (9): 5210-5220. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.05.026
- [17] Ning H, Zhang W, Kang J, et al. Subunit vaccine ESAT-6:c-di-AMP delivered by intranasal route elicits immune responses and protects against *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11 (1): 647220. DOI: 10.3389/fcimb.2021.647220
- [18] Baldwin SL, Bertholet S, Kahn M, et al. Intradermal immunization improves protective efficacy of a novel TB vaccine candidate[J]. *Vaccine*, 2009, 27 (23): 3063-3071. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.03.018
- [19] Hart BE, Lee S. Overexpression of a *Mycobacterium ulcerans* Ag85B-EsxH fusion protein in recombinant BCG improves experimental buruli ulcer vaccine efficacy[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2016, 10 (12): e0005229. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005229
- [20] Safar HA, El-Hashim AZ, Amoudy H, et al. *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigen Rv3619c effectively alleviates allergic asthma in mice[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11 (3): 532199. DOI: 10.3389/fphar.2020.532199
- [21] Lu Y, Kang J, Ning H, et al. Immunological characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* subunit vaccines immunized through different routes[J]. *Microb Pathog*, 2018, 125 (10): 84-92. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.09.009
- [22] Pulendran B, Arunachalam PS, O'Hagan DT, et al. Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20 (6): 454-475. DOI: 10.1038/s41573-021-00163-y
- [23] Ashhurst AS, McDonald DM, Hanna CC, et al. Mucosal vaccination with a self-adjuvanted lipopeptide is immunogenic and protective against *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Med Chem*, 2019, 62 (17): 8080-8089. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b00832
- [24] Sanchez MV, Ebensen T, Schulze K, et al. Intranasal delivery of influenza rNP adjuvanted with c-di-AMP induces strong humoral and cellular immune responses and provides protection against virus challenge[J]. *PLoS One*, 2014, 9 (8): e104824. DOI: 10.1371/journal.pone.0104824
- [25] Ning H, Wang L, Zhou J, et al. Recombinant BCG with bacterial signaling molecule cyclic di-AMP as endogenous adjuvant induces elevated immune responses after *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. *Front Immunol*, 2019, 10 (8): 1519. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01519
- [26] Devaux L, Kaminski PA, Trieu-Cuot P, et al. Cyclic di-AMP in host-pathogen interactions[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2018, 41 (11): 21-28. DOI: 10.1016/j.mib.2017.11.007