

DOI:10.13350/j.cjpb.221208

• 论著 •

结核分枝杆菌 Ag85B DNA 疫苗免疫对小鼠结肠 SIgA 及菌群的影响

李慧¹, 杨雨欣², 姚思¹, 张炜¹, 马国荣¹, 万巧凤^{1*}

(1. 宁夏医科大学基础医学院病原生物学与免疫学系, 宁夏银川 750004; 2. 宁夏医科大学临床医学院)

【摘要】 **目的** 探究结核分枝杆菌 Ag85B 的真核表达质粒 pcD-Ag85B 经肌肉免疫后对小鼠结肠黏膜 SIgA 及菌群的影响。 **方法** 以 pcDNA3.1+ 为真核表达载体, 将信号肽基因和编码 Ag85B 的 Rv1886c 基因共 963 bp 核苷酸序列连接到 pcDNA3.1+, 构建真核表达质粒 pcD-Ag85B。通过双酶切和测序鉴定无误后, 将 pcD-Ag85B 重组质粒转染中国仓鼠卵巢癌细胞(CHO)并验证其表达。采用微针注射法将 pcD-Ag85B 重组质粒经大腿肌肉免疫 C57BL/6J 小鼠; 初免后 42 d 收集小鼠粪便及结肠黏液进行 16S RNA 高通量测序和菌群结构分析, 并测定 SIgA 特异性抗体效价。 **结果** 成功构建真核表达质粒 pcD-Ag85B 并检测到 Ag85B 蛋白的特异性表达, 蛋白相对分子质量约为 35×10^3 , 与预期相符。一免疫后 42 d, Ag85B 组小鼠结肠厚壁菌门-乳杆菌属的罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)和约氏乳杆菌(*Lactobacillus johnsonii*)丰度与对照组相比显著增高(均 $P < 0.05$); 肠黏膜 SIgA 效价为 1 : 4500。 **结论** 成功获得表达 Ag85B 蛋白的真核表达质粒, 用该质粒免疫能诱导小鼠结肠粘膜产生体液免疫效应, 改善结肠益生菌-乳酸杆菌群丰度。

【关键词】 结核分枝杆菌; Ag85B; 真核表达质粒; 抗体效价; 益生菌

【中图分类号】 R378.911

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)12-1404-06

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Dec;17(12):1404-1409.]

Effect of DNA vaccine immunization of *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B on colon SIgA and microflora in mice

LI Hui¹, YANG Yu-xin², YAO Si¹, ZHANG Wei¹, MA Guo-rong¹, WAN Qiao-feng¹ (1. School of Clinical Medicine, Department of Pathogen Biology and Immunology, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. School of Clinical Medicine, Ningxia Medical University)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B eukaryotic expression plasmid PCD-Ag85bB on SIgA and bacterial community of colonic mucosa in mice after muscular immunization. **Methods** Using pcDNA3.1+ as the eukaryotic expression vector, the signal peptide gene and the Rv1886c gene encoding Ag85B were connected to pcDNA3.1+ with a total of 963 bp nucleotide sequence to construct the eukaryotic expression plasmid PGD-Ag85B. After double enzyme digestion and sequencing, the recombinant plasmid pcD-Ag85B was transfected into Chinese hamster ovarian cancer cells (CHO) and its expression was verified. C57BL/6J mice were immunized with pcD-Ag85B recombinant plasmid via thigh muscle by micronal injection. Mice feces and colonic mucus were collected 42 days after primary immunization for high-throughput sequencing of 16S RNA and bacterial structure analysis, and SIgA specific antibody titer was determined. **Results** The eukaryotic expression plasmid pcD-Ag85B was successfully constructed and the specific expression of Ag85B protein was detected. The molecular weight of the protein was about 35×10^3 , which was consistent with the expectation. At 42 days after immunization, the abundance of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus johnsonii* in the colon of Ag85B group was significantly higher than that of the control group (all $P < 0.05$); The SIgA titer of intestinal mucosa was 1 : 45000. **Conclusion** The Ag85B protein expression plasmid was successfully obtained, which can effectively induce the humoral immune effect of colonic mucosa in mice, and improve the colonic probiotic-lactobacillus community.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Ag85B; eukaryotic expression plasmid; antibody titer; probiotics. ***

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 82160027); 2022年宁夏高等学校科学研究项目(NYG2022035); 宁夏常见传染病防治重点实验室开放课题(No. XZ2021011)。

** **【通讯作者】** 万巧凤, E-mail: wqiaofeng@126.com

【作者简介】 李慧(1996-), 女, 山西吕梁人, 在读硕士研究生, 主要从事免疫学研究。E-mail: lihui23@126.com

结核病 (tuberculosis, TB) 是由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb) 感染所致的一种慢性传染病, 是世界三大传染性疾 病之一。《2021 年全球结核病报告》数据显示, 我国 2020 年结核病新发患者数为 84.2 万, 发病率约为 59/10 万, 在 30 个结核病高负担国家中发病数排第 2 位, 低于印度 (259 万), 其中约 90% 的 TB 患者是成年人^[1]。卡介苗 (BCG) 是目前临床上唯一用于预防结核病的疫苗, 也是预防结核病最有效的疫苗^[2]。由于不断传代, BCG 的免疫保护效果逐渐削弱。同时, 在 BCG 的制备过程中, 一些与免疫记忆和保护相关的基因丢失, 导致其保护期缩短、保护性免疫应答减弱^[3]。所以, 卡介苗对于新生儿有较好的免疫保护作用, 对预防成人肺结核的作用却非常有限^[5]。因此加快研制更加安全、有效的新型疫苗刻不容缓。

DNA 疫苗能诱导有效、持久的细胞免疫^[6]。近年来, 基于结核杆菌免疫保护性抗原基因构建的 DNA 疫苗是研究较多的新型疫苗^[7]。抗结核病 DNA 疫苗抗原大部分是结核分枝杆菌生长早期、即感染期高表达的抗原^[8]。Ag85B 作为 *M. tb* 早期高表达的分泌性蛋白, 能激起机体较强的体液免疫和细胞免疫^[9]。本研究运用分子生物学技术将信号肽基因和 *M. tb* 编码 Ag85B 的 Rv1886c 基因共 963p 核苷酸序列连接到 pcDNA3.1+, 构建真核表达质粒 pcD-Ag85B, 肌肉注射免疫小鼠后观察其诱导的肠粘膜免疫效应对结肠益生菌的影响, 评价 Ag85B DNA 疫苗对结肠粘膜的免疫效果及可能的作用机制。

材料与方 法

1 材 料

1.1 主要试剂 DL15000 DNA Marker, 日本 Takara Bio 公司产品; 限制性内切酶 Hind III 和 XbaI, 美国 NEB 公司产品; 硫酸卡那霉素、IPTG、琼脂糖、胰化蛋白胨及酵母提取物购于宁夏科博生物科技有限公司; 质粒小量抽提试剂盒和胶回收试剂盒购自天根生化科技有限公司; 无内毒素质粒大量提取试剂盒购自美国 Omega Bio-Tek 公司; 鼠抗 Ag85B 单抗购自北京博奥森生物技术有限公司; LipofectamineTM 3000 转染剂购自美国 Thermo Fisher 公司; 蛋白 marker 购自北京全式金生物技术有限公司; 1.25% 阿佛丁麻醉剂自南京爱贝生物科技有限公司, HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 二抗购自美国 Merck 公司。

1.2 细胞、菌株及质粒 中国仓鼠卵巢细胞 (CHO-K1) 购买于中国医学科学院。信号肽基因和 Rv1886c 基因共 963 bp 核苷酸序列由上海生工生物有限公司合成并连接于 pcDNA3.1+。

1.3 实验动物 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 10 只, 雌性, 6-7 周龄, 体重 (18±1)g, 购自宁夏医科大学实验动物中心。合格证书编号: SCXK(宁)2020-0001。本实验对 C57BL/6J 小鼠的所有处理均以科研为目的进行养殖和使用, 且按照宁夏医科大学动物伦理相关规定进行 (2021-N019)。

2 方 法

2.1 真核表达质粒的鉴定 将质粒转化入 DH5 α 感受态细胞, 转化细胞涂布于含卡那霉素抗性 LB 平板, 37 °C 培养过夜。从转化的卡那霉素 LB 平板上挑选单个菌落, 接种至含卡那霉素的 LB 液体培养基中培养过夜。采用质粒小量提取试剂盒提取质粒后进行双酶切鉴定, 并交由北京睿博兴科生物技术有限公司测序。表达质粒命名为 pcD-Ag85B。

2.2 pcD-Ag85B 质粒表达蛋白的鉴定

2.2.1 pcD-Ag85B 质粒大量提取 使用无内毒素质粒提取试剂盒提取无内毒素质粒。抽提鉴定正确的真核表达质粒 pcD-Rv85B 和空载体质粒 pcDNA3.1+, 测定浓度及纯度, 保存于 -20 °C 备用。

2.2.2 质粒转染 CHO 细胞 将 CHO 细胞接种于 12 孔细胞培养板中, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 营养液培养细胞长至 80%~90% 单层时, 弃掉上清, PBS 缓冲液清洗 2~3 次, 按脂质体转染试剂说明书将重组质粒 pcD-Rv85B 转染 CHO 细胞, 转染细胞置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 5 h, 更换新的含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液继续培养至 48 h。

2.2.3 Western blot 检测 Ag85B 的表达 收集转染后 48 h 的 CHO 细胞培养液 40 μ l, 按 1:4 体积比加入 5 \times 上样品缓冲液, 沸水浴 5 min, 上样, 经 12% SDS-PAGE 分离后, 半干电转膜仪转移至 PVDF 膜上, 以 5% 脱脂奶粉封闭 1h, TBST 洗膜 10 min, 共 3 次; 加入鼠抗 Ag85B 单克隆抗体 (1:1000 稀释), 4 °C 过夜, 洗膜; 加入 HRP 标记的兔抗鼠 IgG (1:2000), 37 °C 振荡 60 min, 洗膜; 加入 ECL 发光液, 经显影、定影后分析结果。

2.3 动物免疫 小鼠适应性饲养 1 周后随机分为 PBS 组 (Blank 组) 和 pcD-Rv85B 重组质粒免疫组 (Ag85B 组, 50 μ g/只), 每组 5 只。采用大腿肌肉注射法免疫小鼠, 首次免疫后进行加强免疫, 共 2 次。

2.4 粪便及结肠粘膜的采集 初免后 42d, 所有小鼠禁食不禁水 12 h, 颈椎脱臼法处死小鼠, 挤压下腹部, 无菌收集粪便 3 粒/只; 剖腹截取结肠, 用 1 mL 预冷的 PBS 从前端缓缓注入, 从后端收集, 反复冲洗 3 次, 离心收集上清, 存于 -80 °C 冰箱中备用。

2.5 肠粘膜抗体滴度检测 采用间接 ELISA 法。将制备的 Ag85B 蛋白配制成 2 μ g/mL 的溶液包被 96

孔酶标板,0.1 mL/孔,4 °C 过夜;加入 2% BSA 封闭液,0.1 mL/孔,37 °C 静置 2 h, TBST 洗板 4 次;加入离心后的肠道粘膜稀释液(终浓度为 1 : 1000、1 : 2000、1 : 4000、1 : 8000、1 : 16000、1 : 32000、1 : 64000),另外设空白对照和 PBS 阴性对照,37 °C 孵育 1 h,洗板;加入 HRP 标记的羊抗鼠 SIgA(1 : 1000 稀释),0.1 mL/孔,37 °C 温育 40 min, PBST 洗板;加入底物,0.1 mL/孔,37 °C 避光孵育 15 min;每孔加入 50 μL 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应,酶标仪测定 A₄₅₀ 值。以试验孔 A 值/阴性对照 A 值 > 2.1 的最高样品稀释度定义为抗体滴度^[10]。

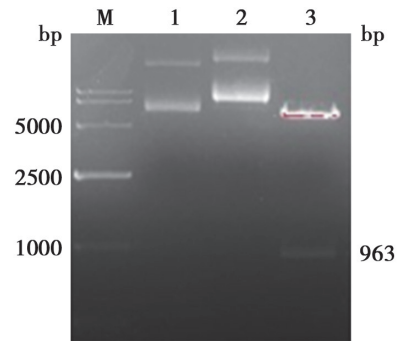
2.6 粪便 16S RNA 高通量测序及菌群结构分析
采用 CTAB 法提取小鼠粪便基因组 DNA,并经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和浓度。使用带 Barcode 的特异引物,New England Biolabs 公司的 Phusion[®] High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer 和高效高保真酶进行 PCR,2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,检测合格后采用磁珠纯化,并用 Qiagen 公司的胶回收试剂盒进行胶回收。使用 TruSeq[®] DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 建库试剂盒构建文库,构建的文库经 Qubit 和 Q-PCR 定量合格后采用 NovaSeq6000 上机测序,由北京诺禾致源科技股份有限公司完成。利用 Uparse 算法对所有样品的全部 Effective Tags 进行聚类,以一致性 97% 的序列聚类成 OTUs(Operational Taxonomic Units)。同时选取 OTUs 中出现频数最高的序列作为 OTUs 的代表序列。使用 R 软件进行 Alpha 多样性指数组间差异分析及 Beta 多样性指数组间差异分析。经 Kruskal-Wallis 检验和 Wilcoxon 秩和检验,使用 LDA Effect Size 分析法对肠道菌群进行差异分析,LDA 值 > ± 2 表示两组间差异显著。

2.7 统计学分析 采用 GraphPad-Prism 5 统计作图软件和 SPSS 20.0 统计分析软件对实验数据进行分析整理。计量资料以均数 ± 标准差表示。对于服从正态分布且方差齐的计量资料,两组间比较采用两样本 *t* 检验。对于对数正态分布资料-抗体效价的检测,经对数变换后进行 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 质粒 pcD-Ag85B 的酶切鉴定

如图 1 所示,真核重组表达质粒 pcD-Ag85B Hind III 和 XbaI 双酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,酶切目的基因片段大小约 1 000 bp,与预期(963 bp)相符(图 1)。对目的基因测序,结果与信号肽基因及 Rv1886c 基因序列完全一致,重组质粒构建正确。



M 15 kb DNA 标志物 1 pcDNA3.1+ 2 pcD-Ag85B 3 pcD-Ag85B Hind III 和 XbaI 双酶切

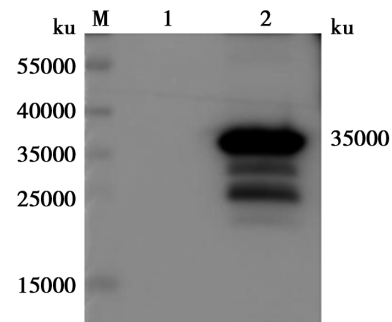
图 1 重组表达质粒 pcD-Ag85B 的酶切鉴定

M 15 kb DNA marker 1 pcDNA3.1+ 2 pcD-Ag85B 3 pcD-Ag85B digested products by Hind III/XbaI

Fig. 1 Identification of the vectors by restriction enzyme

2 Ag85B 融合蛋白的表达检测

质粒 pcD-Ag85B 转染 CHO 细胞后 48 h,收集细胞上清进行 Western blot,结果如图 2,反应条带位于 35 ku 处,结果与预期一致,而空载体无该反应条带。表明真核表达质粒 pcD-Ag85B 在 CHO 细胞中表达的 Ag85B 蛋白能分泌到细胞外。



M 蛋白分子质量标准 1 空质粒 pcDNA3.1+ 转染 CHO 对照 2 pcD-Ag85B 转染 CHO 细胞上清

图 2 Western blot 检测质粒转染 CHO 细胞上清中的 Ag85B

M Protein marker 1 CHO transfected with empty plasmid pcDNA3.1+ 2 CHO transfected with pcD-Ag85B

Fig. 2 After transfection of CHO cells with plasmid, the expression of Ag85B in supernatant of CHO cells was detected by Western blot

3 Ag85B 蛋白对小鼠肠粘膜 SIgA 抗体效价的影响

间接 ELISA 结果如图 3 所示,重组质粒一次免疫后第 42 d,小鼠肠粘膜中检测到特异性 SIgA 抗体,平均抗体效价为 1 : 4500,表明 Ag85B 蛋白诱导了小鼠结肠粘膜的体液免疫效应。

4 Ag85B 蛋白对小鼠肠道菌群的影响

4.1 对小鼠肠道菌群多样性的影响 稀释曲线(Rarefaction Curve)和等级聚类曲线(Rank Abundance)是常见的描述组内样本多样性的曲线。稀释曲线(图 4A)可直接反映测序数据量的合理性,并间接反映样本中物种的丰富程度。等级聚类曲线(图 4B)可直观反映样本中物种的丰富度和均匀度。在水平方向上,

物种的丰富度由曲线的宽度来反映,物种的丰富度越高,曲线在横轴上的跨度越大;在垂直方向上,曲线的平滑程度反映了样本中物种的均匀程度,曲线越平缓,物种分布越均匀。由图 4B 可以看出,Blank 组曲线的宽度小于 Ag85B 组,说明 Ag85B 组物种的丰富度较 Blank 组高。采用 OTU Venn 图分析菌群 OTU 数量及其种类交叉情况,Blank 组和 Ag85B 组总 OTU 分别为 1 071 及 1 209 个,特异性 OTU 分别为 227 及 365 个,共有 844 个 OUT,进一步说明 Ag85B 组肠道菌群物种丰度增高(图 4C)。

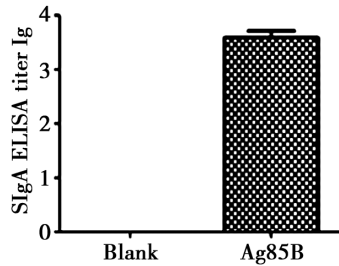
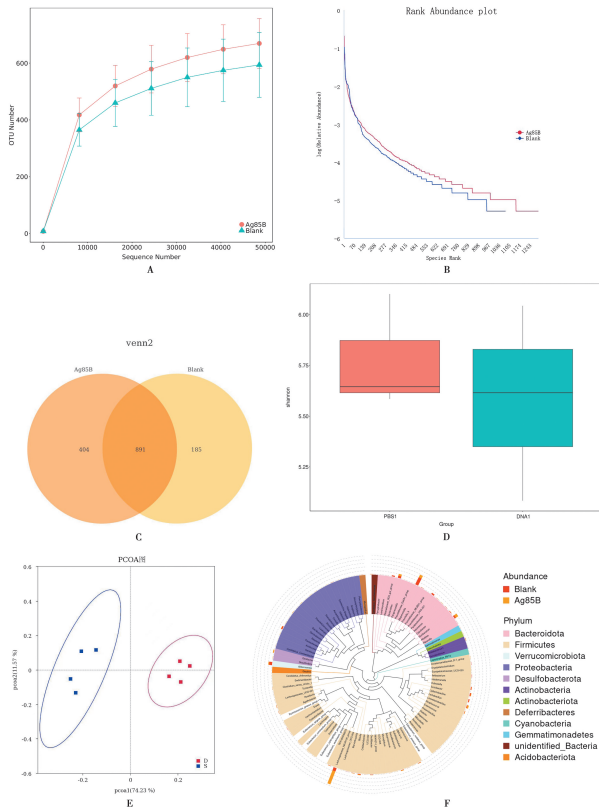


图 3 Ag85B 蛋白对肠粘膜 SIgA

Fig. 3 Effects of Ag85B protein on intestinal mucosal SIgA



A 稀释曲线 B 等级聚类曲线 C Venn 图 D Shannon 指数 E PCoA F 属水平物种进化树

图 4 小鼠肠道菌群多样性分析

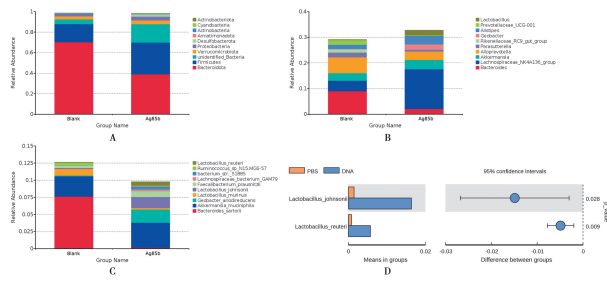
A Rarefaction Curve B Rank abundance curve C Venn graph D Shannon graph E PCA F Evolutionary tree on genus level

Fig. 4 Species classification and abundance analysis of intestinal flora samples of mice in each group

Shannon 指数(图 4D)表明,Ag85B 组微生物的 α 多样性低于 Blank 组。 β 多样性分析可用于研究不同样本中菌群结构的相似性及差异性,常用的分析方法有样本层级聚类分析、主坐标分析及多维尺度分析。本实验对所有样本采用 weighted_unifrac 距离算法进行主坐标分析(PCoA)。如图 4E 所示,Blank 和 Ag85B 组分开聚集,差异显著,说明 pcD-Ag85B 疫苗免疫小鼠肠道菌群结构与正常小鼠相比一定差异,表明 Ag85B 蛋白的免疫效应调节了小鼠的肠道菌群的组成。图 4F 是属水平物种进化树,通过多序列对比得到 top100 属的代表序列,分支和扇形表示其对应的门,扇形外侧的堆积柱形图表示该菌属在不同样本中的丰度分布信息。与 Blank 组比较,Ag85B 组 Lactobacillus(乳杆菌属)、Alistipes(另枝菌属)及 Lachnospiraceae_NK4A136_group(毛螺菌属)菌群丰度显著增加,且均为益生菌。

4.2 小鼠结肠菌群物种组成及差异性分析 在门水平上,各组肠道微生物组成主要是 Bacteroidota(拟杆菌门)、Firmicutes(厚壁菌门)、unidentified_Bacteria、Verrucomicrobiota(疣微菌门)Proteobacteria(变形菌门)等(图 5A)。与 Blank 组相比,Ag85B 组的 Bacteroidetes 相对丰度减少而 Firmicutes 的相对丰度增加。在属水平上,如图 5B 所示,两组肠道微生物组成主要是 Bacteroides(拟杆菌属)、Lachnospiraceae_NK4A136_group(毛螺菌属)、Akkermansia(阿克曼氏菌属)、Alloprevotella(拟普雷沃菌属)、Alistipes(另枝菌属)、Rikenellaceae-RC9-gut-group(理研菌科_RC9 菌属)、Geobacter(地杆菌属)、Turicibacter(苏黎世杆菌属)、Prevotellaceae_UCG_001(普雷沃氏菌属)及 Lactobacillus(乳杆菌属)(图 5B)。与 Blank 组相比,Ag85 组的 Lachnospiraceae_NK4A136_group、Alistipes、Geobacter 及 Lactobacillus 的相对丰度增加,而 Alloprevotella、Akkermansia、Prevotellaceae_UCG_001、Rikenellaceae-RC9-gut-group 菌群的相对丰度减少,表明 Ag85B 的免疫效应影响了肠道菌群属水平上的菌群变化。在种水平上,如图 5C 所示,两组肠道微生物组成主要是 Akkermansia muciniphila(嗜黏蛋白阿克曼菌)、Geobacte anodireducens、Bacteroides_sartorii、Lactobacillus_murinus(鼠乳杆菌)、Lactobacillus_johnsonii(约氏乳酸杆菌)、Lachnospiraceae_bacterium_GAM79(毛螺旋菌)、Faecalibacterium_prausnitzii(普拉梭菌)、bacterium_str._51885、Lactobacillus_reuteri(罗伊氏乳杆菌)和 Bacteroides_vulgatus(普通拟杆菌)(图 5C)。对 Blank 组和 Ag85B 组的 10 个主要种群进行统计学分析,只有 Lactobacillus_johnsonii(约氏乳酸杆菌)和 Lacto-

bacillus_reuteri (罗伊氏乳杆菌)丰度两组间比较差异有统计学意义 ($p < 0.05$), (图 5D)。



A 门水平物种相对丰度柱状图 B 属水平物种相对丰度柱状图 C 种水平物种相对丰度柱状图 D 差异菌群分析 (T-test, * $P < 0.05$)。

图 5 小鼠肠道菌群物种组成及差异性分析

A Relative abundance distribution at the level of intestinal microflora B Relative abundance distribution of intestinal flora at the genus level C Relative abundance distribution of intestinal flora at species level D Difference analysis of intestinal flora at species level (T-test, * $P < 0.05$).

Fig. 5 Species composition and difference analysis of intestinal microflora in each group

讨论

DNA 疫苗 (DNA vaccine) 是近年来基因治疗研究中所衍生并发展起来的一个新的研究领域^[11]。是将一种抗原基因重组到真核表达载体,直接或经包装注入体内表达出相应抗原蛋白,此蛋白能刺激机体产生特异性体液免疫和细胞免疫应答,从而起到免疫保护作用^[12]。与现用其他疫苗相比,DNA 疫苗具有制备简便,成本低廉,稳定性及安全性好的优势,越来越受到重视^[13]。

Ag85 复合物是 *M. tb* 的分泌蛋白,占 *M. tb* 分泌蛋白总量的 45%,该复合物包括 Ag85A、Ag85B 和 Ag85C 3 种组分,其中 Ag85B 占 22%^[14]。有研究表明 Ag85B 能够诱导机体产生良好的 T 细胞和 B 细胞免疫反应^[15]。本研究中的表达质粒 pcD-Ag85B 是以 pcDNA3.1+ 为真核表达载体,将信号肽基因和编码 85B 蛋白的 Rv1886c 基因连接到 pcDNA3.1+。该质粒拥有 2 个优点:一是具有启动真核基因表达的 CMV 启动子;二是信号肽可使胞浆内合成的 Ag85B 蛋白不断地分泌到胞外,刺激机体产生持久的免疫反应。

粘膜免疫系统是机体免疫网络的重要组成部分,构成机体抗感染的第一道防线。粘膜免疫系统主要通过产生分泌型 IgA (SIgA) 发挥作用,SIgA 可中和粘膜上皮内的病原体、毒素等有害物质,捕捉粘膜内层病原体^[17]。特殊的位置及重要的作用使粘膜免疫系统拥有与外周免疫系统迥然不同的解剖学结构、淋巴细胞和免疫反应分子机制^[18]。肠道黏膜免疫系统是脊椎动物最大的免疫器官。在进化过程中,哺乳动物和肠道共生微生物已适应了彼此共存,这种稳态共存依赖

于耐受性和炎症反应之间的复杂平衡^[19]。肠道内微生物与肠道环境之间的相互作用决定了黏膜免疫力和全身免疫力水平^[20]。有研究表明,SIgA 的平行通用和独特的表位特异性效应调节肠道菌群的组成和功能^[21]。

肠道微生物,尤其是益生菌的多样性和丰富度对肠道功能也起着重要的作用^[22],益生菌调节和维持肠道菌群平衡及可刺激增强肠道的免疫机能^[23]。本研究中注射 pcD-Ag85B 42d 后 OTUs 以及 beta 多样性分析显示,Ag85B 免疫后增加了小鼠肠道群的多样性,并对肠道微生物的组成产生了影响,增加了厚壁菌门的相对丰富度,降低了拟杆菌门的相对丰富度。种水平差异性分析发现,部分有益菌的丰度显著增加,如罗伊氏乳杆菌 (*Lactobacillus_reuteri*) 和约氏乳杆菌 (*Lactobacillus_johnsonii*)。有研究表明,罗伊氏乳杆菌对肠道黏膜具有强的粘附能力,能够拮抗有害细菌的定殖,提高宿主的免疫功能^[24],是当前用于保健食品及婴幼儿食品的益生菌种^[25]。约氏乳杆菌可减轻经消化道感染的病原体引起的病理损伤^[26-27],病提高免疫反应,改善肠道的屏障功能^[28]。

本研究成功构建了真核表达质粒 pcD-Ag85B 并检测到 Ag85B 蛋白的体外表达。初免小鼠后 42d,在结肠灌洗液中检测到了较高效价的 Ag85B 蛋白特异性 SIgA,说明 Ag85B 刺激机体产生了体液免疫效应。本研究初步评价了免疫剂量为 50 μg /只的 pcD-Ag85B 重组质粒经肌肉免疫后产生的结肠粘膜免疫效应以及该效应对肠道菌群的影响,可在此基础上尝试多部位联合免疫,进行免疫剂量及免疫途径的优化选择,深入探究 Ag85B 的免疫后改善罗伊氏乳杆菌和约氏乳杆菌丰度的机制,为 pcD-Ag85B 的开发应用奠定基础。

【参考文献】

[1] Organization WH. Global Tuberculosis Report2021 [EB/OL]. <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2021>.

[2] Pepin J, Fox A, LeBlanc L, De Wals P, et al. In the footsteps of Albert Calmette: an ecological study of TB, leprosy and potential exposure to wild-type *Mycobacterium bovis* [J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2022, trac032.

[3] Fine PE. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity [J]. Lancet, 1995, 346(8986): 1339-1345.

[4] Brewer TF, Colditz GA. Bacille Calmette-Guerin vaccination for the prevention of tuberculosis in health care workers [J]. Clin Infect Dis, 1995, 20(1): 136-142.

[5] Fol M, Włodarczyk M, Kowalewicz-Kulbat M, et al. *Mycobacterium bovis* wild type BCG or recombinant BCG secreting murine IL-18 (rBCG/IL-18) strains in driving immune responses in immunocompetent or immunosuppressed mice [J]. Vaccines (Ba-

- sel), 2022, 10(4): 615.
- [6] Tregoning JS, Kinnear E. Using plasmids as DNA vaccines for infectious diseases[J]. Microbiol Spectr, 2014, 2(6): PLAS-0028-2014.
- [7] Chu JS, Villarreal DO, Weiner DB. DNA vaccines: A strategy for developing novel multivalent TB vaccines[J]. Methods Mol Biol, 2016(1403): 355-361.
- [8] 张真, 赵玲娜, 申梦. 结核分枝杆菌 Hsp65-Ag85B、Hsp65-ESAT6 融合基因 DNA 疫苗株的构建及免疫原性研究[J]. 免疫学杂志, 2020, 36(2): 109-115.
- [9] Kadir NA, Sarmiento ME, Acosta A, et al. Cellular and humoral immunogenicity of recombinant *Mycobacterium smegmatis* expressing Ag85B epitopes in mice[J]. Int J Mycobacteriol, 2016, 5(1): 7-13.
- [10] 杨延辉, 董利军, 梁忠喆, 等. 结核分枝杆菌 Rv0674 蛋白的表达及其多克隆抗体的制备[J]. 中国生物制品学杂志, 2019, 32(12): 1370-1375.
- [11] Tsounis EP, Mouzaki A, Triantos C. Nucleic acid vaccines: A taboo broken and prospect for a hepatitis B virus cure[J]. World J Gastroenterol, 2021, 27(41): 7005-7013.
- [12] Yan Q, Cheng Z, Liu H, et al. Enhancement of Ag85B DNA vaccine immunogenicity against tuberculosis by dissolving microneedles in mice[J]. Vaccine, 2018, 36(30): 4471-4476.
- [13] 刘琼, 李慧, 罗鹏征, 等. 结核分枝杆菌 Rv1886c 蛋白的表达、纯化及其多克隆抗体的制备[J]. 中国生物制品学杂志, 2022, 35(1): 63-67.
- [14] Blanchett S, Tsai CJ, Sandford S, et al. Intranasal immunization with Ag85B peptide 25 displayed on *Lactococcus lactis* using the PilVax platform induces antigen-specific B- and T-cell responses[J]. Immunol Cell Biol, 2021, 99(7): 767-781.
- [15] Owji H, Nezafat N, Negahdaripour M, et al. A comprehensive review of signal peptides: Structure, roles, and applications[J]. Eur J Cell Biol, 2018, 97(6): 422-441.
- [16] Ding M, Yang B, Ross RP, et al. Crosstalk between sIgA-coated bacteria in infant gut and early-life health[J]. Trends Microbiol, 2021, 29(8): 725-735.
- [17] Zhou B, Yuan Y, Zhang S, et al. Intestinal flora and disease mutually shape the regional immune system in the intestinal tract[J]. Front Immunol, 2020(11): 575.
- [18] Allaire JM, Crowley SM, Law HT, et al. The intestinal epithelium: central coordinator of mucosal immunity[J]. Trends Immunol, 2018, 39(9): 677-696.
- [19] Chen Y, Chang SKC, Zhang Y, et al. Gut microbiota and short chain fatty acid composition as affected by legume type and processing methods as assessed by simulated in vitro digestion assays[J]. Food Chem, 2020(312): 126040.
- [20] Pabst O, Izcue A. Secretory IgA: controlling the gut microbiota[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 19(3): 149-150.
- [21] Guarner F. Symbiosis in the human gastrointestinal tract[J]. Nutr Hosp, 2021, 37(2): 34-37.
- [22] Maldonado GC, Cazorla SI, Lemme Dumit JM, et al. Beneficial effects of probiotic consumption on the immune system[J]. Ann Nutr Metab, 2019, 74(2): 115-124.
- [23] Hai D, Huang X. Protective effect of *Lactobacillus reuteri* Lb11 from chicken intestinal tract against *Salmonella enteritidis* SE05 *in vitro* [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2021, 114(11): 1745-1757.
- [24] Yang KM, Kim JS, Kim HS, et al. *Lactobacillus reuteri* AN417 cell-free culture supernatant as a novel antibacterial agent targeting oral pathogenic bacteria[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 1631.
- [25] Chen S, Li Y, Chu B, et al. *Lactobacillus johnsonii* L531 alleviates the damage caused by *Salmonella* Typhimurium via inhibiting TLR4, NF- κ B, and NLRP3 inflammasome signaling pathways[J]. Microorganisms, 2021, 9(9): 1983.
- [26] Zhang Y, Mu T, Yang Y, et al. *Lactobacillus johnsonii* attenuates citrobacter rodentium-induced colitis by regulating inflammatory responses and endoplasmic reticulum stress in mice[J]. J Nutr, 2021, 151(11): 3391-3399.
- [27] Ashraf R, Shah NP. Immune system stimulation by probiotic microorganisms[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2014, 54(7): 938-956.

【收稿日期】 2022-07-19 【修回日期】 2022-10-15