



结核分枝杆菌 sRNA Mpr5 的功能验证

刘含梅¹, 钱心怡¹, 唐雨婷¹, 黄炜莉^{1,2}, 张鹭^{1,2*}

1 复旦大学生命科学学院, 遗传工程国家重点实验室, 上海 200438

2 复旦大学生命科学学院, 微生物系, 上海 200438

刘含梅, 钱心怡, 唐雨婷, 黄炜莉, 张鹭. 结核分枝杆菌 sRNA Mpr5 的功能验证. 微生物学报, 2022, 62(7): 2850–2858.

Liu Hanmei, Qian Xinyi, Tang Yuting, Huang Weili, Zhang Lu. Functional verification of sRNA Mpr5 in *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(7): 2850–2858.

摘要: 【目的】探究结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, *M. tb*)中 sRNA Mpr5 对分枝杆菌的抗逆性及宿主细胞生理的影响。【方法】构建结核分枝杆菌 sRNA Mpr5 过表达的重组耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*, *M. smeg*) M3-Atc, 以转入空载质粒(pSI)的野生型耻垢分枝杆菌 T1-Atc 作为对照, 观察细菌体外生长能力和菌落形态变化。通过非生物胁迫处理(低氧、饥饿、0.02%十二烷基硫酸钠)探究重组菌株的抗逆能力。用重组耻垢分枝杆菌感染人非小细胞肺癌上皮细胞系 A549, 活菌涂板计算细菌的胞内增殖能力, 利用免疫荧光染色观察感染后细胞的生理结构变化。【结果】sRNA Mpr5 过表达菌株的体外生长与菌落形态均与野生型相似。抗逆性实验表明 Mpr5 过表达菌株(M3-Atc)的抗表面活性剂能力在 4 h 时显著提高($P < 0.05$); 在饥饿模型中 M3-Atc 早期(2–12 h)就表现出生长劣势($P < 0.05$); 低氧模型中 M3-Atc 菌株 0–3 d 均处于生长优势状态, 增长均高于对照组($P < 0.05$), 3 d 后增长幅度低于对照组。Mpr5 过表达不影响菌株对上皮细胞感染能力及细胞毒力, 但降低了细菌早期胞内存活及增殖能力。【结论】sRNA Mpr5 的过表达影响细菌对低氧、饥饿的环境应激, 改变其对上皮细胞的感染能力, 可能影响分枝杆菌的致病能力。

关键词: 耻垢分枝杆菌; sRNA Mpr5; A549

基金项目: 国家重点研发计划(2021YFC2301500)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2301500)

*Corresponding author. Tel: +86-21-31246571; E-mail: zhanglu407@fudan.edu.cn

Received: 11 February 2022; Revised: 12 March 2022; Published online: 2 June 2022

Functional verification of sRNA Mpr5 in *Mycobacterium tuberculosis*

LIU Hanmei¹, QIAN Xinyi¹, TANG Yuting¹, HUANG Weili^{1,2}, ZHANG Lu^{1,2*}

1 State Key Laboratory of Genetic Engineering, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China

2 Department of Microbiology, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China

Abstract: [Objective] To explore the effect of sRNA Mpr5 of *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*) on stress resistance of *Mycobacterium* and host cell physiology. [Methods] The recombinant *Mycobacterium smegmatis* (*M. smeg*) strain (M3-Atc) overexpressing the sRNA Mpr5 from *M. tb* was developed. The wild-type *M. smeg* (T1-Atc) which was transformed with an empty plasmid (pSI) was used as control. The *in vitro* growth status and colony morphology of these two strains were observed. The resistance of the recombinant strain to hypoxia, starvation, and 0.02% sodium dodecyl sulfate was investigated. M3-Atc was used to infect the human non-small-cell lung cancer A549 cell line and the proliferation in the cells was detected with the spread plate method. Meanwhile, the physiological structure changes of the cells were observed based on immunofluorescence staining. [Results] The *in vitro* growth and colony morphology of M3-Atc were similar to those of the wild type. The anti-surfactant ability of M3-Atc was significantly improved at 4 h ($P < 0.05$). In the case of starvation, colony number of M3-Atc was smaller than that of the wild type at the early stage (2–12 h) ($P < 0.05$). In the instance of hypoxia, colony number of M3-Atc was larger than that of the wild type in 0–3 days ($P < 0.05$), and the growth rate was lower than that of the wild type after 3 days. Mpr5 overexpression failed to affect the infection to epithelial cells and the cytotoxicity, but reduced the early intracellular survival rate and proliferation. [Conclusion] Overexpressing Mpr5 influences the response of *Mycobacterium* to hypoxia and starvation and changes its ability to infect epithelial cells, which may finally affect the pathogenicity.

Keywords: *Mycobacterium smegmatis*; sRNA Mpr5; A549

2020年,在全球范围内约有990万人患结核病,死亡人数130万。结核病是仅次于新冠肺炎的单一感染源引起的第二大死因^[1]。结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, *M. tb*)与其人类宿主的长期共同进化使得病原体能够发展出有效对抗宿主防御系统的策略^[2]。调控蛋白、非编码RNA及其靶标构成复杂的适应性遗传网络,允许病原体在感染的不同阶段抵抗宿主的清除^[3]。调节性RNA通过调节细菌的转录、翻译、mRNA稳定性或维持DNA活性与沉默发挥作用。其作用机制包括RNA构象的变化、

与蛋白质结合、与其他RNA碱基配对以及与DNA的相互作用^[4]。sRNA是数量最多的一组调节性RNA,在*M. tb*适应寄生生活方式的过程中发挥着最重要的作用^[5]。大多数情况下,sRNA是响应外界因素而表达的,帮助细菌对不断变化的环境条件做出适应性反应,调控发病的关键阶段^[3]。

迄今为止,已有超过9个sRNA在*M. tb*中被实验验证^[6],但只有小部分的生理功能和调节机制得到阐释。同时,一些sRNA在不同*M. tb*菌株间也有不同的功能,例如Mcr7在

H37Rv 株中为非编码 sRNA, 在 CDC1551 株中则编码 2 个小蛋白^[7]。sRNA 可与 mRNA 碱基互补配对发挥其功能, 如 6C sRNA 其富 C 环就是 mRNA 靶标的直接结合位点, 借此调控基因参与各种细胞过程, 包括 DNA 复制和蛋白质分泌, 起着多向性作用^[8]。除了与 mRNA 相互作用外, 分枝杆菌 sRNA 也可与蛋白质相互作用。例如耻垢分枝杆菌生长平台期高表达的 Ms1 可以直接与 RNA 聚合酶相互作用^[9]。

DiChiara 等^[10]通过比较基因组学首次在 BCG 中预测出 sRNA Mpr5, 并通过 Northern 印迹杂交验证出 BCG 和 *M. tb* 中均存在的 sRNA, 其在 *M. tb* 中位于 *Rv1051c* 和 *Rv1052* 的基因间区, 约 91 个核苷酸(nucleotide, nt), 关于其功能和作用机制目前均未有研究报道。耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*, *M. smeg*)与 *M. tb* 同属于分枝杆菌属, 具有生长快速, 无致病性, 与 *M. tb* 同源的基因超过 2 000 个, 是一种理想的模式菌株。呼吸道的上皮细胞是抵抗呼吸道微生物入侵的第一道防线^[11], 多年来的研究已经证明了呼吸道上皮在 *M. tb* 感染中的突出作用。耻垢分枝杆菌感染巨噬细胞的过程中, 可以通过感染进入上皮细胞转化为致病性表型^[12]。因此, 本研究选择肺上皮细胞作为模式细胞株, 探索 Mpr5 对细菌-宿主相互作用的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株和载体

大肠埃希菌(*Escherichia coli*) Trans 5 α 感受态菌株(深圳康体生命科技有限公司购入); 耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*, *M. Smeg*) 野生型 MC² 155 菌株(本课题组保存); pSI 重组质粒(本实验室保存); 人非小细胞肺癌细胞系 A549 (本实验室保存); 人单核细胞 THP-1 (本实验室保存)。

1.2 仪器与试剂

ABI Pro FlexTM PCR 仪(ABI 公司); Power Pac basic 电泳仪(伯乐公司); UVP 凝胶成像系统(Bio Doc-It 220); 紫外交联仪(UVP, CL-1000) 聚合酶链反应(PCR)所需的引物合成和测序都由北京擎科生物科技公司完成; 细菌基因组抽提试剂盒、质粒抽提试剂盒、PCR Clean-up 试剂盒、胶回收试剂盒(Axygen); 逆转录试剂盒、体外转录试剂(TaKaRa); D3308 化学发光法生物素标记核酸检测试剂盒(碧云天); 7H9 液体培养、7H10 固体培养基。

1.3 *Mpr5* 的过表达菌株构建及验证

过表达策略参照 Mai 等和 Arnvig 等的方法^[8,13], 采用需要在无水四环素(Atc)的诱导下才能过表达的重组质粒 pSI: pMV261 的 *EcoR* I 位点插入从 pLJR962 扩增 *tetR* 基因序列, *Hind* III 位点处插入了转录终止子, *Xba* I 位点和 *Bam*H I 位点间用 *Prrnb-TetO* 启动子序列替换而得到的诱导型重组质粒。以结核分枝杆菌的基因组为模板 PCR 扩增得到 Mpr5 sRNA 序列后克隆到 pSI 的 *Bam*H I 和 *Hind* III 位点间。测序挑取插入序列正确的质粒后电转入耻垢野生型 MC² 155 菌株中, 得到 Mpr5 过表达重组耻垢菌株(*M. Smeg*::Mpr5, M3-Atc), 同时电转 pSI 空载进入耻垢野生型中作为对照菌株(T1-Atc)。

1.4 Northern 印迹验证重组菌株

在 10%变性丙烯酰胺凝胶上分离各组的总 RNA (~20 μ g), 并通过“三明治”制法电印迹(同 Western blotting)转移到带正电的尼龙膜上。将膜进行紫外交联(1 200, 正面 2 次, 背面 1 次), 然后在预杂交溶液(50%甲酰胺、0.1% SDS、5 \times 柠檬酸钠盐、2 \times Denhardt 溶液、0.1 mg/mL 鲑鱼精 DNA)中, 42 $^{\circ}$ C 杂交仪上预杂交 2 h。单链 RNA 探针需为目的 RNA 的互补链, 设计含 T7 promoter 的引物(表 1), 分别以结核分枝杆

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

Primer name	Primer sequence (5'→3')
5S-F	GTTACGGCGGTCCATAGCGG
5S-R(T7)	<u>TAATACGACTCACTATAGGGGTGTTTCGGCGGTGTCCTACT</u>
Mpr5-F	CGACCAGCGGGGGATGGC
Mpr5-R(T7)	<u>TAATACGACTCACTATAGGGCGCTACGATCTGCCTGGCCTC</u>

T7 promoter sequence is underlined.

菌和耻垢分枝杆菌基因组为模板, PCR 克隆得到体外转录模板 Mpr5 sRNA 和内参 5S rRNA 基因序列, 再通过体外转录得到含生物素标记的 RNA (使用含 Biotin-16-UTP 的 NTP mix 对 RNA 进行 Biotin 标记)。将生物素标记 RNA 探针(约 10 ng/mL)添加到杂交溶液(50%甲酰胺、0.1% SDS、5×柠檬酸钠盐溶液、0.1 mg/mL 鲑鱼精子 DNA)中, 再将预杂交好的尼龙膜转移至杂交液中, 42 °C 杂交仪上轮转孵育过夜(16–24 h)。杂交后, 在室温下将膜转至用 1×柠檬酸钠盐水和 0.1% SDS 配置的洗膜液中洗涤 30 min。然后将膜转至含 0.2×柠檬酸钠和 0.1% SDS 的洗膜液中, 60 °C 洗涤 20 min, 洗 2 次。最后根据碧云天 D3308 化学发光发生物素标记核酸检测试剂盒说明书显色拍照。

1.5 细菌体外生长及菌落形态观察

将复苏的含空载的 MC² 155 野生型菌株 T1 以及 Mpr5 过表达的耻垢菌株 M3 在 7H9 (含有 0.05% Tween80 和 10% ADC)中 37 °C 培养至对数中期(OD_{600} 为 1.0–1.5)。将菌液 OD_{600} 调至 1, 以 1:100 转接入含有 100 mL 7H9 培养基的锥形瓶中, 一组加入无水四环素(500 ng/mL), 一组不加, 37 °C 振荡培养; 每隔 4 h 取样测 OD_{600} 变化。取对数中期菌液(OD_{600} 为 1.0–1.5)稀释点样于 7H10 固体培养基上, 37 °C 倒置培养 2–3 d 后, 宏观变倍体显微镜观察菌落形态并拍照。

1.6 细菌抗逆实验

将复苏的菌株 T1 和 M3 分别以 1:100 转接入含有 10 mL 7H9 培养基的玻璃管中, 同时加入

500 ng/mL 无水四环素长至对数中期(OD_{600} 为 1.0–1.5), 低速收菌, PBS 洗 3 遍后用 PBS 调至 OD_{600} 为 1.0, 以 1:50 转接入含有 PBS (含有 0.05% Tween80, 500 ng/mL Atc)的 50 mL 锥形瓶中, 37 °C 摇床培养, 各组按 3、18、30、42、52 h 取 500 μ L 菌液 10 倍梯度稀释, 涂布于 7H10 固体培养基上, 37 °C 倒置培养 2–3 d 后, 计 CFU, 测饥饿条件下细菌的生长情况。

同上操作将菌株按 1:50 比例接入含 0.02% SDS 的 7H9 (含有 0.05% Tween80、10% ADC 和 500 ng/mL Atc)的 50 mL 锥形瓶中, 37 °C 摇床培养, 各组按 0.5、2、4 h 取 500 μ L 菌液 10 倍梯度稀释, 涂布于 7H10 固体培养基上, 37 °C 倒置培养 2–3 d 后, 计 CFU, 测表面活性剂造成的细胞壁损伤压力下细菌的生长情况。

同上操作将菌液按 1:50 比例接入 7H9 (含有 0.05% Tween80、10% ADC 和 500 ng/mL Atc)中, 混匀后以每管 600 μ L 分装到 600 μ L 的无菌 EP 管中, 缠上封口膜, 37 °C 摇床培养, 各组按 1、3、5、7 d 取 1 管菌液 10 倍梯度稀释, 涂布于 7H10 固体培养基上, 37 °C 倒置培养 2–3 d 后, 计 CFU, 测厌氧压力下细菌的生长情况。

1.7 上皮细胞侵染

人非小细胞肺癌细胞 A549 培养在 DMEM 培养基(含 10% FBS 及 0.1 mg/mL penicillin 和 streptomycin)中, 传代 2 次后, 稀释铺板于 24 孔板内, 每孔 2×10^5 个; 96 孔板内每孔 10^5 个, 37 °C、5% CO₂ 培养 24 h 至完全贴壁。T1 及 M3 按 MOI 为 25 的菌量, 每组细菌每个时间点侵染 3 个重

复孔细胞,用细胞培养基(含 500 ng/mL Atc)稀释制备好侵染上清。侵染 2 h 后去上清,等体积 PBS 沿孔板壁小心加入,洗 2 遍后用庆大霉素(工作浓度 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)杀菌 2 h 后,去上清,PBS 洗涤 2 遍,取一组 24 孔板在细胞孔中加入 500 μL 0.1% TritonX-100 裂细胞 10 min 后,吹打混匀使细胞裂解充分后,转移至 1.5 mL EP 管中,用 PBS 按 10 倍梯度稀释涂板计数,评估细菌入胞效率。其余孔板细胞孔补加等体积新鲜培养液培养,按不同感染时间点裂解细胞涂板,计算胞内细菌增殖能力。感染后 12 h 和 24 h 各取 1 个 96 孔板按 CCK-8 (东仁试剂盒)说明书操作,检测细胞活力。

1.8 细胞免疫荧光检测

细胞侵染 12 h 后,用 1 mL 4%多聚甲醛固定液固定 15 min,等体积 PBS 洗 3 次,用 1 mL 0.1% TritonX-100 破膜 10 min,等体积 PBS 洗 3 次后用 5% BSA 封闭 1 h。等体积 PBS 洗 3 次后用相应荧光抗体对细胞进行染色,整个染色过程注意避光。F-actin (1:200)染色细胞骨架微丝蛋白,处于细胞溶胶中,呈绿色荧光;ZO-1 (1:200)染色细胞紧密连接蛋白,处于细胞与细胞的连接处,呈紫色荧光;最后用含 DAPI 的

封片剂封片,DAPI 染色细胞核,呈蓝色荧光。染色结束后在激光共聚焦显微镜(Olympus FV 3 000)下观察拍照。

1.9 统计学方法

采用 GraphPad prism 8.0.2 软件进行数据处理画图及统计学分析。2 组之间的显著性差异比较采用 *T* 检验(*t*-test),多组数据之间的显著性差异比较采用双因素方差分析(two-way ANOVA)。当分析结果 $P>0.05$ 表示无统计学差异,而 $P<0.05$ 时表示有统计学差异, $P<0.001$ 时有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 Mpr5 过表达耻垢重组菌株的验证

由于 Mpr5 序列片段过短,用常规的 RT-PCR 验证其表达量可能存在较大误差,本研究做了 Northern 印迹(Northern blotting),验证无水四环素诱导过表达 Mpr5 的 *M. Smeg::Mpr5*(M3) 和空载野生型对照(T1),结果如图 1 所示,显示 Mpr5 过表达成功,而我们构建的无水四环素诱导表达的质粒可能存在泄漏表达,可见 Mpr5 显影图的 M3 处有极浅的 Northern 杂交印迹。

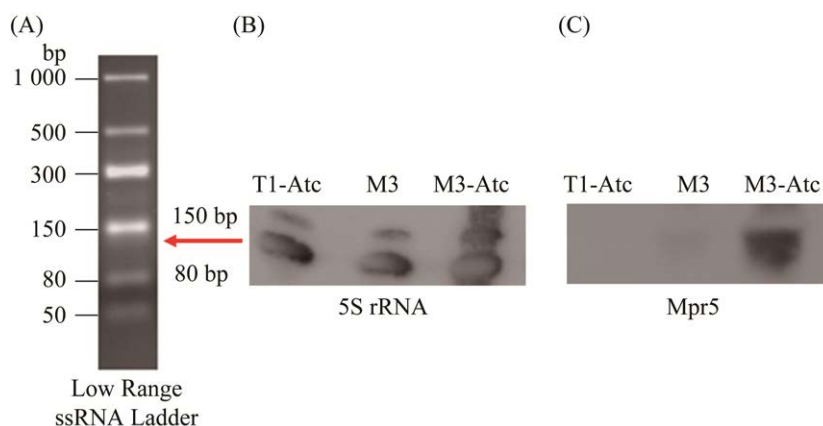


图 1 *M. Smeg::Mpr5* 过表达验证

Figure 1 Validation of *M. Smeg::Mpr5* overexpression. A: Low range ssRNA Ladder, 1 $\mu\text{g}/\text{lane}$, 2.0% TBE agarose gel; B: 5S rRNA's Northern blotting result, 5S is the internal reference rRNA in *M. smeg*; C: The result of the Mpr5's Northern blotting.

2.2 Mpr5 过表达不影响耻垢分枝杆菌的体外生长及菌落形态

菌株分别用不同工作浓度的 Atc 诱导, 观察体外生长情况, 结果显示过表达菌株及空载野生型在各诱导浓度下细菌的生长均无差异 (图 2A), 故后续实验我们只采用 500 ng/mL 的 Atc 诱导菌株进行实验, 其中空载野生型耻垢分枝杆菌诱导组命名为 T1-Atc, 过表达组菌株命名为 M3-Atc。同时体外生长结果也显示 2 组菌株的体外生长全程也无显著差异。M3-Atc 在 7H10 固体培养基上 37 °C 倒置培养 2–3 d 后, 在宏观变倍体式显微镜下观察菌落形态。结果如图 2B 显示, M3-Atc 和 T1-Atc 诱导组的菌落形态无明显变化, 整体比较扁平, 褶皱细密均匀。

2.3 抗逆性结果

模拟宿主免疫细胞的内环境, 在低氧、饥饿培养及 0.02% SDS 这几种逆境条件下培养 T1-Atc 和 M3-Atc, 比较 2 种菌株的增殖能力, 分析 Mpr5 与分枝杆菌抵抗逆境的关系。图 3A 显示, 2 种菌的抗表面活性剂能力在 0.5–2.0 h 均无显著差异, 4 h 时出现显著性差异, M3-Atc 组的相对变化倍数比 T1-Atc 组高约 0.5 倍, 表明此时 Mpr5 的过表达使其抗表面活性剂能力增强, 细菌更易存活并增殖。

在 PBS 饥饿模型中, 结果如图 3B 显示 T1-Atc 组各时间段的增殖能力均高于 M3-Atc 组, 其中 3、18、42、52 h 均有显著性差异, 3 h 时 T1-Atc 组的相对变化倍数比 M3-Atc 组高约 1.0 倍, 18 h 高约 0.5 倍, 42/52 h 高约 0.25 倍。根据各组的生长比值可以看出 T1-Atc 组在本研究的实验期间均可以存活并增殖, 而 M3-Atc 组在 3 h 时生长受到抑制, 18 h 有短暂的生长, 30–52 h 间基本就维持存活, 推测可能 Mpr5 的过表达不利于菌株对营养物质的储存, 所以在营养缺陷一开始就呈现出生长下降的趋势, 而 18 h 的短暂增殖可能是由于组内其他菌的死亡提供了短期的营养。

在低氧模型中, 结果如图 3C 显示, M3-Atc 组 0–3 d 都处于增殖状态, 3–5 d 处于生长抑制状态, 后 5–7 d 基本不增长。而 T1-Atc 组 0–3 d 处于生长抑制状态, 3–7 d 出现缓慢增殖。其中 1–3 d 两组均有极显著差异, 第 1 天 M3-Atc 组的变化倍数比 T1-Atc 组高约 1.0 倍, 3 d 时高约 2.2 倍, M3-Atc 组菌株生长优势远高于对照组, 而这种生长优势在 3 d 后消除。表明 Mpr5 的过表达使耻垢分枝杆菌在低氧环境压力下生长更具优势, 而这种优势可能会根据氧气的彻底耗尽而消除。

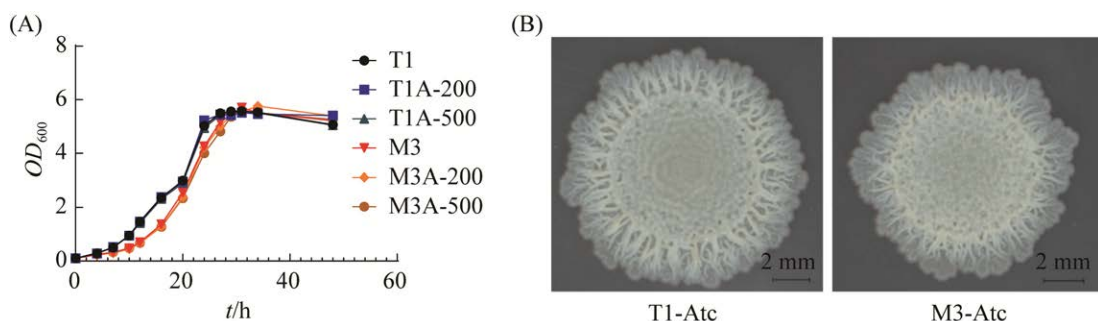


图 2 *M. Smeg::Mpr5* 的体外生长及菌落形态

Figure 2 *In vitro* growth and colony morphology of *M. Smeg::Mpr5*. A: *In vitro* growth curves (OD_{600}) of T1 and M3 in 7H9 without anhydrotetracycline (Atc) and with 200 ng/mL and 500 ng/mL Atc; B: Colony morphology of T1 and M3 on 7H10 containing 500 ng/mL Atc, taken with a macroscopic zoom microscope.

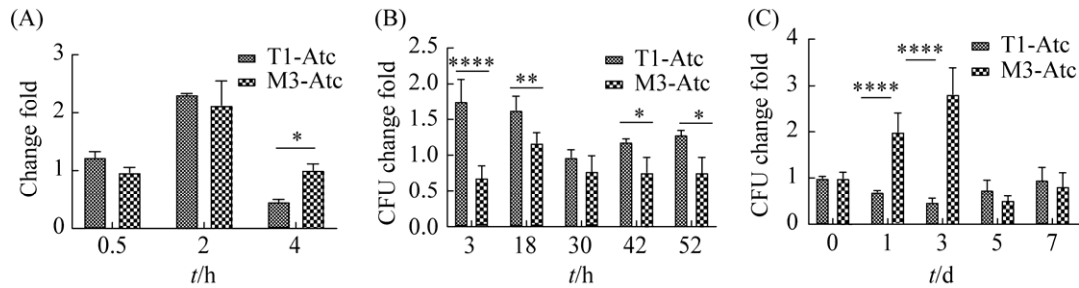


图3 *M. Smeg::Mpr5* 在 0.02% SDS、饥饿及低氧压力下的生长情况

Figure 3 Growth of *M. Smeg::Mpr5* under 0.02% SDS, starvation and hypoxic stress. A: CFU of each strain was calculated after 0.02% SDS treatment; B: CFU of each strain was calculated after PBS starvation treatment; C: CFU of each strain was calculated after hypoxia treatment. The ordinate in the figure represents the fold change of CFU relative to 0 h at each time point. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$, two-way ANOVA. Each plant was performed with three parallel groups under each stress model, and the error bar is shown as the standard deviation of the three parallels. Each experiment was repeated three times.

2.4 Mpr5 通过表达抑制细菌在上皮细胞内的增殖能力

相对于巨噬细胞，上皮细胞 A549 缺乏自主吞噬细菌的能力，细菌进入细胞的数量完全取决于其自身的侵染能力。A549 细胞感染实验结果显示，T1-Atc 组与 M3-Atc 组的入胞率无统计学差异(图 4A)，表明在耻垢分杆菌中 Mpr5 的过表达并不影响其主动入侵进入上皮细胞的能力。比较 2 组间的胞内生长趋势表明，侵染后 12 和 48 h 时 T1-Atc 菌株在胞内存活能力高于 M3-Atc 组，其他时间点均无显著性差异(图

4B)，2 组间的 CFU 相对变化值相差约 0.2–0.4 倍。说明在细菌进入细胞后的早期，Mpr5 的过表达更利于上皮细胞对其的清除作用。比较各菌株不同时间点的变化趋势可以发现 T1-Atc 组在 4–48 h 才出现显著差异，其在胞内缓慢增殖，约增长 0.3 倍；而 M3-Atc 组在 4–12 h 就显著减少约 0.3 倍，但这种差异在 48 h 被消除，暗示 Mpr5 的过表达对细菌胞内存活的影响可能随着感染时间的延长而被逆转。CCK-8 结果显示 Mpr5 过表达不会影响细菌对细胞的毒力，细胞活力均良好(图 4C)。

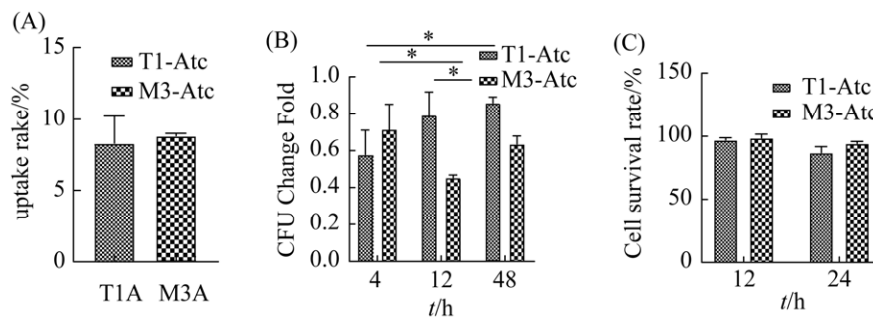


图4 *M. Smeg::Mpr5* 侵染 A549 的入胞率及细胞活力检测

Figure 4 Detection of cell infiltration rate and cell viability of A549 infected by *M. Smeg::Mpr5*. A: Detection of cell uptake rate; B: Comparison of bacterial intracellular proliferation ability, the ordinate in the figure represents the change fold of CFU relative to 0 h at each time point; C: CCK-8 detects cell viability. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$, two-way ANOVA. At least three biological replicates were conducted for each strain, and the error bar is shown as the standard deviation of the three replicates. Each experiment was repeated three times.

2.5 Mpr5 过表达不改变细菌对上皮细胞骨架及连接度的影响

侵染细胞 12 h 后, 利用荧光抗体染色细胞结构观察实验菌株对宿主细胞生理状态的影响。DAPI、F-actin 及 Zo-1 染色结果菌无统计学差异(图 5), 此结果也和 CCK-8 结果相印证, Mpr5 的过表达不会影响其对细胞的毒力。

3 讨论

细菌的 sRNA 是微生物细胞响应环境变化, 参与应激反应通路的调控因子之一。致病性 *M. tb* 的 sRNA 在宿主-病原体相互作用过程中也发挥重要作用, 可以在某些条件下直接调节毒力因子的表达, 或者是调节代谢途径以

促进受感染生物体中细菌细胞的存活^[7-8,14]。阐明这些过程将有助于开发针对调节 sRNA 的有效诊断、治疗和预防感染的方法。

迄今为止, 对 *M. tb* 中 sRNA 的生理功能和调控机制的研究报道较少。已经证明 *M. tb* 中过表达 6C 和 G2 sRNA 会导致细菌死亡, F6 sRNA 的过表达也会强烈抑制 *M. tb* 的生长^[8,13]。MTS2823 和 MTS0997 (*mcr11*) 在 *M. tb* 中过表达则会造成其在指数期的生长缺陷^[15]。本研究在耻垢分枝杆菌中过表达 *M. tb* 的 Mpr5 sRNA, 导致耻垢分枝杆菌在 PBS 饥饿模型中生长能力下降, 说明 Mpr5 的过表达影响分枝杆菌体外生长, 推测可能也会影响其在胞内相对营养贫瘠状态下的生长, 因此, 本研究进一步开展细菌

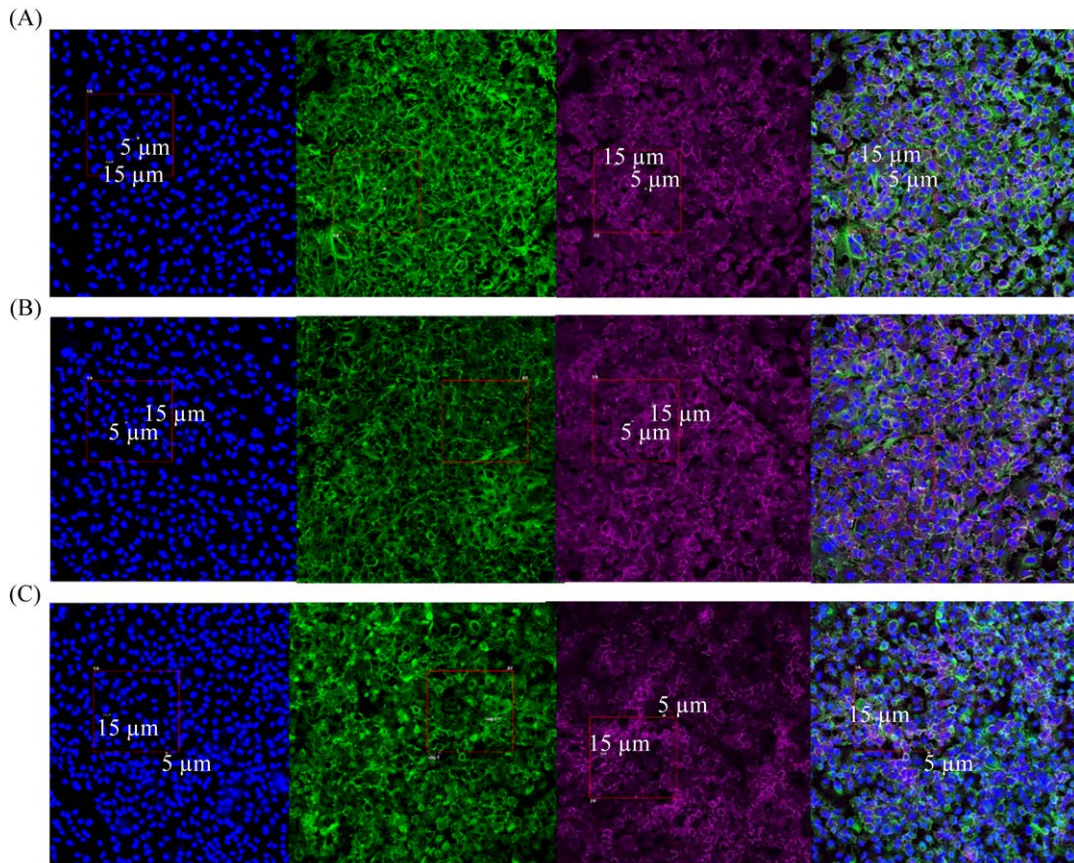


图 5 *M. Smeg::Mpr5* 侵染细胞 12 h 后免疫荧光染色结果

Figure 5 Immunofluorescence staining results of *M. Smeg::Mpr5* infecting cells for 12 h. A: PBS-treated group; B: T1-Atc treated group; C: M3-Atc treatment group, from left to right, DAPI, F-actin, ZO-1 and combined imaging, where DAPI stains the nucleus, F-actin stains (1:200) cytoskeleton, ZO-1 (1:200) stain for claudin.

的上皮细胞侵染实验。结果证明, Mpr5 的过表达不影响其对上皮细胞的入侵能力, 且感染早期 (12 h) 细胞的免疫荧光染色结果显示其对细胞结构无影响, 但 M3-Atc 更容易被 A549 细胞清除, 显示 Mpr5 的过表达可以一定程度上降低细菌的胞内增殖能力。有趣的是, 随着感染时间的延长 (48 h), 胞内细菌数会恢复到野生型水平, 这可能与其体外低氧压力条件下的生长优势相呼应。

DiChiara 等^[10]通过 Northern 印迹验证出 BCG 和 *M. tb* 中均存在 Mpr5, 报道同时指出耻垢分枝杆菌中也存在 Mpr5, 但未提供实验结果图。本文研究者用 *M. tb* 的 Mpr5 sRNA 序列到 NCBI 与耻垢分枝杆菌基因组 BLASTn, 比对并未发现同源序列; 且在正常培养条件下提取野生型耻垢分枝杆菌总 RNA, 以 5S rRNA 为阳参的 Northern 印迹杂交实验也并未发现其存在, 故而推论逆境下细菌的生理特征与 sRNA Mpr5 过表达密切相关。尽管耻垢分枝杆菌是研究 *M. tb* 的模式菌株, 但 *M. tb* 的基因组大小约 4.4 Mb 而耻垢分枝杆菌有 6.8 Mb^[16], 二者依旧存在巨大差异。因此在未来的研究中将在临床致病菌株中通过敲除 Mpr5 sRNA 验证本研究结果, 同时利用多种免疫细胞系及动物模型来更深入的研究其功能及作用相关机制。本研究结果为深入挖掘结核病这一古老传染病的致病机制及治疗手段提供了新的数据基础。

参考文献

- [1] WHO. *Global Tuberculosis Report 2021*. 2021.
- [2] Rohde KH, Veiga DFT, Caldwell S, Balázsi G, Russell DG. Linking the transcriptional profiles and the physiological states of *Mycobacterium tuberculosis* during an extended intracellular infection. *PLoS Pathogens*, 2012, 8(6): e1002769.
- [3] Salina EG, Grigorov A, Skvortsova Y, Majorov K, Bychenko O, Ostriker A, Logunova N, Ignatov D, Kaprelyants A, Apt A, Azhikina T. MTS1338, a small *Mycobacterium tuberculosis* RNA, regulates transcriptional shifts consistent with bacterial adaptation for entering into dormancy and survival within host macrophages. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2019, 9: 405.
- [4] Waters LS, Storz G. Regulatory RNAs in bacteria. *Cell*, 2009, 136(4): 615–628.
- [5] Schwenk S, Arnvig KB. Regulatory RNA in *Mycobacterium tuberculosis*, back to basics. *Pathogens and Disease*, 2018, 76(4): e29796669.
- [6] Taneja S, Dutta T. On a stake-out: mycobacterial small RNA identification and regulation. *Non-coding RNA Research*, 2019, 4(3): 86–95.
- [7] Solans L, Gonzalo-Asensio J, Sala C, Benjak A, Uplekar S, Rougemont J, Guilhot C, Malaga W, Martín C, Cole ST. The PhoP-dependent ncRNA Mcr7 modulates the TAT secretion system in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathogens*, 2014, 10(5): e1004183.
- [8] Mai JT, Rao CT, Watt J, Sun X, Lin C, Zhang L, Liu J. *Mycobacterium tuberculosis* 6C sRNA binds multiple mRNA targets via C-rich loops independent of RNA chaperones. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(8): 4292–4307.
- [9] Šiková M, Janoušková M, Ramaniuk O, Páleníková P, Pospíšil J, Bartl P, Suder A, Pajer P, Kubičková P, Pavliš O, Hradilová M, Vítovská D, Šanderová H, Převorovský M, Hnilicová J, Krásný L. Ms1 RNA increases the amount of RNA polymerase in *Mycobacterium smegmatis*. *Molecular Microbiology*, 2019, 111(2): 354–372.
- [10] DiChiara JM, Contreras-Martinez LM, Livny J, Smith D, McDonough KA, Belfort M. Multiple small RNAs identified in *Mycobacterium bovis* BCG are also expressed in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis*. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(12): 4067–4078.
- [11] Dias AA, Silva C, da Silva CO, Linhares NRC, Santos JPS, Vivarini AC, Marques M, Rosa PS, Lopes UG, Berrêdo-Pinho M, Pessolani MCV. TLR-9 plays a role in *Mycobacterium leprae*-induced innate immune activation of A549 alveolar epithelial cells. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 657449.
- [12] Kim SY, Sohn H, Choi GE, Cho SN, Oh T, Kim HJ, Whang J, Kim JS, Byun EH, Kim WS, Min KN, Kim JM, Shin SJ. Conversion of *Mycobacterium smegmatis* to a pathogenic phenotype via passage of epithelial cells during macrophage infection. *Medical Microbiology and Immunology*, 2011, 200(3): 177–191.
- [13] Arnvig KB, Young DB. Identification of small RNAs in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*, 2009, 73(3): 397–408.
- [14] Ostriker AA, Azhikina TL, Salina EG. Small noncoding RNAs and their role in the pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Biochemistry Biokhimiia*, 2021, 86(Suppl 1): S109–S119.
- [15] Ignatov DV, Salina EG, Fursov MV, Skvortsov TA, Azhikina TL, Kaprelyants AS. Dormant non-culturable *Mycobacterium tuberculosis* retains stable low-abundant mRNA. *BMC Genomics*, 2015, 16: 954.
- [16] Mohan A, Padiadpu J, Baloni P, Chandra N. Complete genome sequences of a *Mycobacterium smegmatis* laboratory strain (MC2 155) and isoniazid-resistant (4XR1/R2) mutant strains. *Genome Announcements*, 2015, 3(1): e01520–e01514.

(本文责编 李磊)