

分类号: S852.6

密 级: 秘密★一年

学 号: 20212013032

单位代码: 10759

## 硕士学位论文

# 布鲁氏菌分泌蛋白 BspJ 对巨噬细胞炎症 反应调控机制的研究

学 位 申 请 人

承潇潇

指 导 教 师

王勇 教授

马忠臣 副教授

申请学位门类级别

农学硕士

学 科、专 业 名 称

兽医学

研 究 方 向

基础兽医学

所 在 学 院

动物科技学院

中国·新疆·石河子

2024年10月

分类号: S852.6

密 级: 秘密★一年

学 号: 20212013032

单位代码: 10759

## 硕士学位论文

# 布鲁氏菌分泌蛋白 BspJ 对巨噬细胞炎症 反应调控机制的研究

学 位 申 请 人

承潇潇

指 导 教 师

王勇 教授

马忠臣 副教授

申请学位门类级别

农学硕士

学 科、专 业 名 称

兽医学

研 究 方 向

基础兽医学

所 在 学 院

动物科技学院

中国·新疆·石河子

2024年10月

Study on the mechanism of Brucella secreted protein BspJ regulate  
macrophage cell inflammatory response

A Dissertation Submitted to  
**Shihezi University**  
Fulfillment of the Requirements for the Degree of  
Master of Agriculture

By

**Cheng xiaoxiao**  
**(Veterinary Science)**

Dissertation Supervisor: Prof. Wang Yong

Assoc. Prof. Ma Zhong-Chen

Oct., 2024

# 石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明


## 学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：  时间：2024年10月25日

## 使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：  时间：2024年10月25日

导师签名：  时间：2024年10月25日

## 摘要

布鲁氏菌感染可引起布鲁氏菌病，在全球范围内严重危害公共卫生安全与畜牧业发展。布鲁氏菌的胞内循环过程和毒力主要取决于其IV型分泌系统，BspJ蛋白为布鲁氏菌IV型分泌系统效应蛋白，可进入巨噬细胞的细胞核、提高布鲁氏菌在小鼠脾脏中的定殖能力、加重小鼠脾脏的炎症浸润，因而在布鲁氏菌的致病机制中极可能有重要作用。本研究以布鲁氏菌IV型分泌系统效应蛋白 BspJ 为研究对象，通过 BspJ 蛋白过表达试验与 *RB51*（布鲁氏菌粗糙型疫苗株）、*ΔBspJ*（*RB51* 的 BspJ 基因缺失株）、*pBspJ*（*ΔBspJ* 的 BspJ 基因缺失回补株）侵染试验，探究 BspJ 蛋白对巨噬细胞炎症反应的影响；通过建立 BspJ 蛋白的 ChIP-seq 文库、EMSA 试验、过表达试验、菌株侵染试验，筛选并验证 BspJ 蛋白调控巨噬细胞炎症反应所互作的核酸靶序列与炎症相关信号通路；通过 siRNA 干扰试验、菌株侵染试验、胞内生存能力检测试验，探究靶序列对 BspJ 蛋白调控巨噬细胞炎症反应和布鲁氏菌胞内生存能力的影响。以期揭示布鲁氏菌分泌蛋白 BspJ 对巨噬细胞炎症反应的调控机制，为布鲁氏菌病的防治提供理论依据。

研究发现（1）过表达 BspJ 均使 RAW264.7 内 IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-8、TNF- $\alpha$  表达量极显著下降（ $P < 0.01$ ）而 TGF- $\beta$  表达量极显著升高（ $P < 0.01$ ）；相比于 *RB51* 侵染组，*ΔBspJ* 侵染组的 RAW264.7 内 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  表达量显著升高（ $P < 0.05$ ）而 TGF- $\beta$  表达量显著下降（ $P < 0.05$ ）。表明布鲁氏菌分泌蛋白 BspJ 抑制巨噬细胞炎症反应。（2）分析 ChIP-seq 文库，筛选到 BspJ 与转录调控因子 Zfp740、Gnl3l、Fam120c 启动子序列互作，BspJ 互作核酸分子富集于 NF- $\kappa$ B 通路；过表达 BspJ 使 Zfp740、Gnl3l 表达量显著升高（ $P < 0.05$ ）；经 EMSA 验证，BspJ 与 Zfp740、Gnl3l 直接结合；过表达 BspJ 均使 RAW264.7 内 P65 表达量显著下降（ $P < 0.05$ ）而 p-P65 表达量显著升高（ $P < 0.05$ ）；相比于 *RB51* 侵染组，*ΔBspJ* 侵染组的 RAW264.7 内 P65 表达量极显著升高（ $P < 0.01$ ）而 p-P65 表达量极显著下降（ $P < 0.01$ ）；相比于 *RB51* 侵染组，*ΔBspJ* 侵染组的炎症调控因子 TRAF3IP2 和 P62 的表达量极显著升高（ $P < 0.01$ ）、mTOR 表达量显著升高（ $P < 0.05$ ），促凋亡因子 Bax、CASP3、CASP8 表达量极显著升高（ $P < 0.01$ ），抑凋亡因子 BCL-2 表达量极显著下降（ $P < 0.01$ ）。表明 BspJ 蛋白与 Zfp740、Gnl3l 直接结合，抑制巨噬细胞 NF- $\kappa$ B 通路，并通过抑制 NF- $\kappa$ B 通路相关因子的表达而抑制巨噬细胞凋亡与炎症反应。（3）干扰 Zfp740 的表达使 RAW264.7 内 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、P65 表达量极显著升高（ $P < 0.01$ ），*RB51* 组与 *ΔBspJ* 组间 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、P65 表达量差异极显著减小（ $P < 0.01$ ）；干扰 Zfp740 的表达使 *RB51* 组与 *ΔBspJ* 组的 P65 蛋白、p-P65 蛋白表达量无显著差异（ $P > 0.05$ ）；干扰 Zfp740 的表达使 *RB51*、*ΔBspJ*、*pBspJ* 胞内生存能力均极显著下降（ $P < 0.01$ ）；*RB51* 与 *ΔBspJ* 胞内生存率下降倍数差异极显著（ $P < 0.01$ ）。表明 BspJ 蛋白通过上调转录调控因子 Zfp740、Gnl3l 的表达而抑制巨噬细胞内细胞炎性因子表达与 NF- $\kappa$ B 通路，促进布鲁氏菌胞内生存。

综上所述，布鲁氏菌分泌蛋白 BspJ 与巨噬细胞内转录调控因子 Zfp740、Gnl31 的启动子序列直接结合，通过上调 Zfp740 的表达抑制巨噬细胞 NF- $\kappa$ B 通路，从而抑制巨噬细胞炎症反应、促进布鲁氏菌胞内增殖。本研究部分阐明了布鲁氏菌分泌蛋白 BspJ 对巨噬细胞炎症反应的调控机制，为布鲁氏菌胞内生存机制的完善与布鲁氏菌病的科学防治提供了理论依据。

**关键词：**布鲁氏菌；炎症反应；BspJ 蛋白；Zfp740；NF- $\kappa$ B

## Abstract

Brucella infections can cause brucellosis, which seriously jeopardizes public health safety and livestock development worldwide. The intracellular circulation process and virulence of Brucella depends mainly on its type IV secretion system, and BspJ protein is a Brucella type IV secretion system effector protein, which can enter the nucleus of macrophage, increase the colonization ability of Brucella in mouse spleen, and aggravate the inflammatory infiltration of mouse spleen, and is very likely to have an important role in the pathogenic mechanism of Brucella. In this study, the effect of BspJ protein on the inflammatory response of macrophages was investigated by using the BspJ protein overexpression assay in conjunction with the infiltration assay of *RB51* (Brucella abortus vaccine strain),  $\Delta$ *BspJ* (BspJ gene deletion strain of *RB51*), and *pBspJ* (BspJ gene deletion back-complement strain of  $\Delta$ *BspJ*). The ChIP-seq library, EMSA experiment, overexpression experiment, and strain infiltration experiment were used to screen and validate the target nucleic acid sequences and inflammation-related signaling pathways interacting with BspJ protein to regulate macrophage inflammatory response; the target sequences were also tested by siRNA interference, strain infiltration, and intracellular viability experiment to investigate the effects of target sequences on the regulation of macrophage inflammatory response and Brucella abortus. Macrophage inflammatory response and Brucella intracellular viability were investigated by siRNA interference assay and intracellular viability assay. In order to reveal the regulation mechanism of Brucella secretory protein BspJ on macrophage inflammatory response and provide theoretical basis for the prevention and treatment of brucellosis.

It was found that (1) Overexpression of BspJ all resulted in a highly significant decrease ( $P < 0.01$ ) in IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8, and TNF- $\alpha$  expression and a highly significant increase ( $P < 0.01$ ) in TGF- $\beta$  expression within RAW264.7; Compared to the *RB51* infested group, the  $\Delta$ *BspJ* infested group showed a significant increase ( $P < 0.05$ ) in IL-6, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$  expression within RAW264.7 and a significant decrease ( $P < 0.05$ ) in TGF- $\beta$  expression. Expression was significantly higher ( $P < 0.05$ ) while TGF- $\beta$  expression was significantly lower ( $P < 0.05$ ). It indicated that Brucella secretory protein BspJ inhibited macrophage inflammatory response. (2) Analyzing the ChIP-seq library, BspJ was screened to interact with the promoter sequences of transcriptional regulators Zfp740, Gnl3l, and Fam120c, and the BspJ interacting nucleic acid molecules were enriched in the NF- $\kappa$ B pathway; Overexpression of BspJ resulted in a significant increase in the expression of Zfp740 and Gnl3l ( $P < 0.05$ ); And it was verified by EMSA that the expression of BspJ and Zfp740 and Gnl3l; Overexpression of BspJ significantly decreased ( $P < 0.05$ ) and increased ( $P < 0.05$ ) the expression of P65 in RAW264.7; Compared to the *RB51* infected group, the  $\Delta$ *BspJ* infected group showed a highly significant increase ( $P < 0.01$ ) in the expression of P65 and a highly significant decrease ( $P < 0.01$ ) in

the expression of p-P65 in RAW264.7. Expression was highly significantly decreased ( $P < 0.01$ ); compared with the *RB51* infested group, the  $\Delta$ *BspJ* infested group showed highly significantly higher expression of the inflammation regulators TRAF3IP2 and P62 ( $P < 0.01$ ), significantly higher expression of mTOR ( $P < 0.05$ ), and highly significantly higher expression of the pro-apoptotic factors Bax, CASP3, and CASP8 ( $P < 0.01$ ), the The expression of the apoptosis inhibiting factor BCL-2 was highly significantly decreased ( $P < 0.01$ ). It indicates that BspJ protein directly binds to Zfp740 and Gnl3l, inhibits macrophage NF- $\kappa$ B pathway, and suppresses macrophage apoptosis and inflammatory response by inhibiting the expression of NF- $\kappa$ B pathway-related factors. (3) Interfering with the expression of Zfp740 resulted in a highly significant increase in the expression of IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and P65 within RAW264.7 ( $P < 0.01$ ), and the difference in the expression of IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and P65 was highly significantly reduced between the *RB51* group and the  $\Delta$ *BspJ* group ( $P < 0.01$ ); Interfering with the expression of Zfp740 resulted in a highly significant decrease in the expression of IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and P65 between the *RB51* group and  $\Delta$ *BspJ* group ( $P > 0.05$ ); Interference with Zfp740 expression resulted in a highly significant decrease in the intracellular viability of *RB51*,  $\Delta$ *BspJ*, and *pBspJ* ( $P < 0.01$ ); And the difference in the fold decrease in intracellular viability between *RB51* and  $\Delta$ *BspJ* was highly significant ( $P < 0.01$ ). It suggests that BspJ protein inhibits intracellular inflammatory factor expression and NF- $\kappa$ B pathway in macrophages by up-regulating the expression of transcriptional regulators Zfp740 and Gnl3l, and promotes Brucella intracellular survival.

In summary, Brucella secretory protein BspJ directly binds to the promoter sequences of macrophage intracellular transcriptional regulators Zfp740 and Gnl3l, and inhibits the macrophage NF- $\kappa$ B pathway by up-regulating the expression of Zfp740, which inhibits macrophage inflammatory response and promotes intracellular proliferation of Brucella. This partially elucidated the regulation mechanism of Brucella secretory protein BspJ on macrophage inflammatory response, and provided a theoretical basis for the improvement of Brucella intracellular survival mechanism and scientific prevention and treatment of brucellosis.

**Key words:** Brucella; Inflammatory; BspJ protein; Zfp740; NF- $\kappa$ B

# 目录

摘要 .....	I
Abstract .....	III
英文缩略词表 .....	VII
第 1 章 绪论 .....	1
1.1 研究目的与意义 .....	1
1.2 国内外研究进展 .....	1
1.2.1 布鲁氏菌病研究进展 .....	1
1.2.2 布鲁氏菌毒力因子研究进展 .....	3
1.2.3 布鲁氏菌胞内存活机制研究进展 .....	6
1.2.4 布鲁氏菌分泌蛋白 BspJ 研究进展 .....	7
1.2.5 Zfp740 与 Gnl3l 研究进展 .....	8
1.3 研究内容与技术路线 .....	9
1.3.1 研究内容 .....	9
1.3.2 技术路线 .....	9
第 2 章 探究布鲁氏菌分泌蛋白 BspJ 对巨噬细胞炎症反应的影响 .....	10
2.1 材料与方法 .....	11
2.1.1 试验材料 .....	11
2.1.2 试验方法 .....	13
2.2 结果 .....	17
2.2.1 pcDNA3.1- BspJ 真核表达载体的构建 .....	17
2.2.2 过表达 BspJ 对巨噬细胞内细胞炎性因子表达的影响 .....	18
2.2.3 $\Delta$ BspJ 对巨噬细胞炎性因子表达的影响 .....	20
2.3 讨论 .....	21
2.4 小结 .....	23
第 3 章 筛选并验证布鲁氏菌分泌蛋白 BspJ 互作的靶序列与信号通路 .....	24
3.1 材料与方法 .....	25
3.1.1 试验材料 .....	25
3.1.2 试验方法 .....	26
3.2 结果 .....	31

3.2.1 布鲁氏菌分泌蛋白 BspJ 互作的核酸靶序列与通路 .....	31
3.2.2 过表达布鲁氏菌分泌蛋白 BspJ 对靶序列表达的影响 .....	32
3.2.3 布鲁氏菌分泌蛋白 BspJ 与靶序列 Zfp740 及 Gnl31 的结合关系 .....	33
3.2.4 过表达 BspJ 对巨噬细胞 NF- $\kappa$ B 通路的影响 .....	34
3.2.5 $\Delta$ BspJ 对巨噬细胞 NF- $\kappa$ B 通路的影响 .....	36
3.2.6 $\Delta$ BspJ 对 NF- $\kappa$ B 通路相关因子表达的影响 .....	37
3.3 讨论 .....	38
3.4 小结 .....	39
第 4 章 探究靶序列对 BspJ 蛋白调控炎症反应与胞内生存的影响 .....	40
4.1 材料与方法 .....	41
4.1.1 试验材料 .....	41
4.1.2 试验方法 .....	42
4.2 结果 .....	45
4.2.1 Zfp740 及 Gnl31 干扰模型的建立 .....	45
4.2.2 Zfp740 对 BspJ 调控巨噬细胞内细胞炎性因子表达的影响 .....	46
4.2.3 Zfp740 对 BspJ 调控巨噬细胞 NF- $\kappa$ B 通路的影响 .....	47
4.2.4 Zfp740 对布鲁氏菌胞内生存能力的影响 .....	49
4.2.5 Gnl31 对 BspJ 调控巨噬细胞炎症因子表达的影响 .....	50
4.2.6 Gnl31 对 BspJ 蛋白调控巨噬细胞 NF- $\kappa$ B 通路的影响 .....	51
4.2.7 Gnl31 对布鲁氏菌胞内生存能力的影响 .....	53
4.3 讨论 .....	53
4.4 小结 .....	54
第 5 章 全文总结 .....	55
第 6 章 论文创新点 .....	56
参考文献 .....	57
致谢 .....	67

## 英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文名称
WB	Western Blot	蛋白免疫印迹
qRT-PCR	Quantitative Real-time PCR	实时荧光定量 PCR
CFU	Colony-forming unit	菌落形成单位
BCV	Brucella Containing Vacuole	布氏小体
T4SS	Type IV Secretion System	IV 型分泌系统
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
Kan	Kanamycin	卡那青霉素
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa-B	核转录调控因子 $\kappa$ B
P65	Transcription factor P65	蛋白 65
p-P65	Phospho Transcription factor P65	磷酸化蛋白 65
IKB $\alpha$	NF- $\kappa$ B inhibitory protein alpha	NF- $\kappa$ B 抑制蛋白 $\alpha$
P62/SQSTM1	Sequestosome 1	螯合体 1
IL-1 $\beta$	Interleukin1 $\beta$	白细胞介素 1 $\beta$
IL-6	Interleukin 6	白细胞介素 6
IL-8	Interleukin 8	白细胞介素 8
TNF- $\alpha$	TNF- $\alpha$ tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子 $\alpha$
RAW264.7	Mouse Monocyte Macrophages	小鼠单核巨噬细胞
CASP	Cysteine Aspartate Protease	半胱氨酸蛋白酶
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta	转化生长因子 $\beta$
GAPDH	Glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase	甘油醛-3-磷酸脱氢酶
mTOR	Mammalian target of rapamycin	哺乳动物雷帕霉素靶蛋白
BCL-2	B-cell lymphoma-2	B 淋巴细胞瘤-2 基因
BAX	BCL2-Associated X	BCL2 相关 X 基因
Zfp740	Zinc finger protein 740	锌指蛋白 740
Gnl3l	Guanine nucleotide-Binding Protein-Like 3-Like Protein	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白样-3-样蛋白
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay	凝胶迁移实验

## 第1章 绪论

### 1.1 研究目的与意义

布鲁氏菌感染可引起二类动物疫病布鲁氏菌病 (Brucellosis)<sup>[1,2]</sup>, 在全球范围内广泛严重危害公共卫生安全与畜牧业发展, 布鲁氏菌病相关医药与疫苗的研发需要致病机制的阐明, 因而对布鲁氏菌感染巨噬细胞时炎症调控机制的研究具有重要意义。布鲁氏菌的细胞内循环过程和毒力主要取决于其IV型分泌系统 (T4SS), 通过对蛋白结构与功能的预测, 筛选出了 BspG、BspJ 等 11 种布鲁氏菌 T4SS 分泌蛋白<sup>[2]</sup>。现有研究表明, 布鲁氏菌分泌蛋白 BspJ 具有核定位信号 (NLS) 以及核输出信号 (NES)<sup>[3]</sup>, 在体内实验中 *BspJ* 基因的缺失减少小鼠器官的炎症浸润、显著降低布鲁氏菌在小鼠脾脏中的定殖能力<sup>[4,5]</sup>。作为可以进入巨噬细胞核的 T4SS 效应蛋白, BspJ 在布鲁氏菌的致病机制中极可能有重要作用。本研究旨在探究布鲁氏菌分泌蛋白 BspJ 对巨噬细胞炎症反应的影响, 筛选出 BspJ 调控巨噬细胞炎症所互作的核酸靶序列与调控的炎症通路, 探究靶序列对 BspJ 调控巨噬细胞炎症与布鲁氏菌胞内生存能力的影响, 以期部分阐明布鲁氏菌 BspJ 蛋白对巨噬细胞炎症通路的调控机制, 为布鲁氏菌胞内生存机制的完善与布鲁氏菌病的科学防治提供理论依据。

### 1.2 国内外研究进展

#### 1.2.1 布鲁氏菌病研究进展

##### 1.2.1.1 布鲁氏菌病的地区流行病学

布鲁氏菌病是由多种布鲁氏菌引起的人畜共患传染病, 可感染人和动物, 包括牛、犬、绵羊和山羊<sup>[1]</sup>。最近的研究表明, 布鲁氏菌病的全球发病率高于先前的估计, 每年有 160-210 万新的人类病例<sup>[6]</sup>。资源有限的地区, 如地中海、中东、中亚和非洲部分地区, 布病发病率升高。伊朗、吉尔吉斯斯坦、塔吉克斯坦、哈萨克斯坦、阿塞拜疆、土库曼斯坦、亚美尼亚和乌兹别克斯坦是布病报告发病率最高的国家之一。在拉丁美洲, 墨西哥和秘鲁均有病例报道<sup>[7,8]</sup>。布鲁氏菌病在年龄较大的拉丁裔男性中尤为流行, 并且

在病例中检测到的最常见的菌种是羊种布鲁氏菌。在巴基斯坦，Nawaz 等人的一项关于布鲁氏菌病流行病学的研究显示血清阳性率为 13.13%，在 25-40 岁的男性中阳性率较高，风险因素包括缺乏教育、参与养殖、家中饲养动物、动物屠宰和生鲜乳的消费<sup>[9,10]</sup>。在伊朗，羊种布鲁氏菌生物 1 型仍然是主要的致病因素，风险因素包括食用未经消毒的乳制品和生活在农村地区，控制和管理伊朗的布鲁氏菌病需要采取多方面的方法来解决区域差异和职业暴露<sup>[11,12]</sup>。在约旦，布鲁氏菌病在农村地区的青壮年和从事与牲畜有关的职业的人中流行，特别是在春季和夏季<sup>[13]</sup>。

在中国的一项研究检查了人布鲁氏菌病的流行病学特征、发病率和地方病的性质，并观察到人口显著增加<sup>[14]</sup>。四年的研究显示，我国布鲁氏菌病的发病率呈发散趋势，全国平均年发病率为 3/10 万人，而新疆的发病率大幅下降，内蒙古地区的发病率增加了一倍多，导致我国北方的发病率较高。值得注意的是，该地区 45-64 岁的男性受女性影响的可能性是女性的两倍以上<sup>[15]</sup>。2012 年至 2016 年，一项研究发现内蒙古地区人间布鲁氏菌病的发病率呈下降趋势，但血清阳性率呈上升趋势，遗传数据显示散发病例和交叉感染可能因长期的牲畜贸易而加剧<sup>[16]</sup>。根据 2010-2019 年间发表的文献，家畜中布鲁氏菌病的患病率在牛中为 0.2%-43.8%，在山羊中为 0%-20.0%，在绵羊中为 0%-13.8%。在人类中，撒哈拉以南非洲地区布鲁氏菌病的患病率在 0%-55.8%之间，凸显了该地区布鲁氏菌病感染的显著存在<sup>[17]</sup>。

### 1.2.1.2 布鲁氏菌病的传播

布鲁氏菌病的防控对畜牧业生产及生物安全具有至关重要的意义，而深入了解其传播方式对实现防控布鲁氏菌病不可或缺。布鲁氏菌病可通过多种途径传播给人类，主要途径为直接接触感染动物或其体液。农民、兽医以及家畜饲养员由于与动物频繁互动，感染布鲁氏菌病的风险增加。布鲁氏菌病也可以通过食用受感染动物未经消毒的乳制品传播，因此严格的食品安全规章对防止疾病传播十分重要。布鲁氏菌还可通过空气传播导致感染，这突出了实施有效的工作场所安全措施和使用适当的防护设备的必要性。与感染动物或其产品有直接接触的屠夫、实验室工作人员等<sup>[18]</sup>，应当严格执行职业健康预防措施。布鲁氏菌病被认为是一种潜在的 B 型生物武器<sup>[19]</sup>。牛奶、奶制品和肉类的不卫生加工助长了人间布鲁氏菌病的传播，凸显了其作为人畜共患病的危害<sup>[20]</sup>。总之，职业暴露是布鲁氏菌病传播的重要因素。特定领域的专业人员需要保持警惕，采取适当的预防措施以降低感染风险。良好的的卫生环境和卫生习惯对降低间接传播风险至关重要。布鲁氏菌病可以从受感染的母亲传给未出生的孩子，这突出了对患有布鲁氏菌病的怀孕个体进行产前护理和监测的重要性。从季节趋势来看，3 月至 6 月布鲁氏菌病发病率最高<sup>[21]</sup>。

### 1.2.1.3 布鲁氏菌病的临床症状

布鲁氏菌病症状从流感样疾病到更严重的并发症，涉及多个器官，症状的非特异性和实验室检测样本的难以获得导致诊断具有难度。出血性贫血是儿童布鲁氏菌病的重要临床表现。布鲁氏菌感染可导致儿童微血管病性溶血性贫血和严重的血小板减少症，布鲁氏菌从非溶血表型转变为溶血表型的能力可能影响其致病性，并有助于急性布鲁氏菌病与人类溶血性贫血的相关性。布鲁氏菌溶血素基因的表达在生长过程中可能发生累积突变，导致默认基因的修复和溶血素的表达能力，从而影响致病性。然而，对于布鲁氏菌感染过程中溶血性贫血的发展仍然缺乏结论性的解释。溶血素基因和溶血性贫血在人类中的存在已经被报道<sup>[22]</sup>。人的布鲁氏菌病是一种多层面的疾病，影响到各个器官，症状从轻微到严重不等，这种复杂性往往导致误诊，如果不治疗，可能会过渡到慢性期，增加致残的风险，潜伏期从 5 天到 6 个月不等<sup>[23]</sup>。布鲁氏菌被摄入后，由巨噬细胞携带到淋巴组织，通过淋巴系统传播，并可能在多个器官中繁殖，引起局部和全身感染<sup>[24]</sup>。

在慢性病例中，症状可持续数月或数年<sup>[24]</sup>，因此，全面的医疗和饮食史对于准确诊断至关重要，特别是在非流行地区，食用进口污染的食品会导致感染<sup>[25]</sup>。布鲁氏菌病表现为头痛、反复发热、游走性关节炎、肌肉疼痛、无力、食欲不振、疲劳、全身不适、出汗、呕吐、腹泻、腹痛甚至流产等症状，可出现骶髂关节炎、骨髓炎、脊柱椎间盘炎、化脓性关节炎和硬膜外脓肿等并发症。罕见的是，布鲁氏菌病与肝脓肿等病症有关<sup>[26]</sup>。

## 1.2.2 布鲁氏菌毒力因子研究进展

### 1.2.2.1 IV型分泌系统

布鲁氏菌在宿主中主要以胞内生存形式存活，其颠覆宿主免疫反应的能力以及在巨噬细胞和胎盘滋养细胞中存活和复制的能力是其成功免疫逃逸的基础。布鲁氏菌从一个具有环境生态位的祖先  $\alpha$  变形菌进化而来，并分化成为高度宿主适应性和宿主特异性的病原体。研究最广泛的布鲁氏菌毒力因子是 IV 型分泌系统 (T4SS)<sup>[27]</sup>。布鲁氏菌 T4SS 由 11 个蛋白组成，其中 8 个组成转运蛋白 (VirB2、VirB3 和 VirB5 通过 VirB10 发挥作用) 的核心，2 个提供能量驱动效应物分泌的 ATP 酶 (VirB4 和 VirB11)，以及一个在 T4SS 组装过程中重塑细菌细胞肽聚糖层的溶菌糖基转移酶 (VirB1)<sup>[28-30]</sup>。编码 T4SS 的基因位于一个操纵子中，该操纵子在布鲁氏菌菌株之间是保守的，牛种布鲁氏菌、羊种布鲁氏菌、猪种布鲁氏菌、犬种布鲁氏菌、绵羊种布鲁氏菌、田鼠种布鲁氏菌和新瘤胃种布鲁氏菌 VirB 突变体在培养的哺乳动物细胞和实验和自然宿主中高度衰减<sup>[27,31]</sup>。布鲁氏菌主要在其哺乳动物宿主中维持胞内定居<sup>[32]</sup>，T4SS 的主要功能之一是控制宿主

巨噬细胞中含布鲁氏菌空泡的胞内运输,使这些细菌避免在吞噬溶酶体中被杀死和降解<sup>[33-36]</sup>。

多种 T4SS 效应分子的鉴定使 T4SS 如何控制布鲁氏菌的胞内运输更为清晰<sup>[37-42]</sup>。例如, BspB 直接与宿主细胞中保守的寡聚高尔基复合体相互作用<sup>[43]</sup>。在哺乳动物细胞中, T4SS 效应物 RicA 直接与小 GTP 酶 Rab2 相互作用, Rab2 也调节内质网-高尔基体的相互作用<sup>[44]</sup>。RicA 促进 rBCV 发育的确切机制尚不清楚,但最近的研究表明 BspB 的 BCV 转运功能完全依赖于 RicA 的活性<sup>[45]</sup>。SepA 在 eBCVs 转化为 rBCVs 的过程中起到排除溶酶体标记物 LAMP-1 的作用<sup>[42]</sup>。布鲁氏菌 T4SS 发挥毒力的另一条途径是通过调节宿主免疫反应<sup>[46-50]</sup>。例如, T4SS 效应子 VceC 与宿主细胞 BiP 相互作用<sup>[51]</sup>。这种相互作用在布鲁氏菌感染的细胞中引起内质网应激并诱导未折叠蛋白反应,从而刺激炎症细胞因子白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  的产生。VceC 诱导巨噬细胞产生这些细胞因子诱导肉芽肿形成,从而促进慢性感染。在妊娠小鼠模型中, VceC 介导的胎盘滋养细胞产生的炎症因子也会导致宿主细胞死亡和胎儿病理,这促使研究者推测这种 T4SS 效应因子可能在天然宿主中发挥重要的传播作用<sup>[52,53]</sup>。T4SS 效应子的这种刺激和抑制宿主免疫反应的能力已经被提出,以使布鲁氏菌能够刺激足够的反应,以利于它们在宿主体内的长期持续存在和充分的免疫病理,以促进它们传播到其他宿主,但不能在宿主体内引起足够强的免疫反应,从而导致杀菌免疫和感染的解决<sup>[54]</sup>。

### 1.2.2.2 抗氧化剂

布鲁氏菌菌株在宿主组织复制过程中利用  $O_2$  作为终端电子受体<sup>[55-58]</sup>。这使这些细菌处于不稳定的地位,因为它使它们容易受到来自外部和内部来源的氧化损伤。例如,在与中性粒细胞和巨噬细胞相互作用的过程中,布鲁氏菌暴露于这些吞噬细胞呼吸爆发产生的活性氧 (ROS) 中<sup>[59,60]</sup>。此外,它们还必须对自身有氧代谢副产物产生的超氧化物和过氧化氢进行解毒<sup>[61,62]</sup>。

超氧阴离子 ( $O_2^-$ ) 由于其带负电荷,通常不会穿过细胞质膜,而两种不同细胞位置的超氧化物歧化酶 (SOD) 在与宿主吞噬细胞和内源性  $O_2^-$  的相互作用过程中对外源性  $O_2^-$  发挥不同的解毒作用它们通过其有氧代谢产生<sup>[63]</sup>。周质铜/锌超氧化物歧化酶 SodC 负责解毒外源性  $O_2^-$ , 该酶在保护布鲁氏菌免受宿主巨噬细胞呼吸爆发中发挥重要作用<sup>[64]</sup>。另一方面,细胞质 Mn-SOD-SodA 保护这些细菌免受其有氧代谢产生的  $O_2^-$ <sup>[62]</sup>。两种酶都是布鲁氏菌菌株对小鼠的野生型毒力所必需的<sup>[65]</sup>。

与  $O_2^-$  相反,  $H_2O_2$  在细胞膜上自由移动,周质过氧化氢酶 Kat 和胞质过氧化物酶 AhpC 协同作用,确保布鲁氏菌菌株有氧代谢产生的  $H_2O_2$  的细胞水平维持在毒性水平以下<sup>[66]</sup>。然而,值得注意的是,这两种酶在保护布鲁氏菌免受宿主巨噬细胞呼吸爆发中都不起主要作用。缺失 KatE 的布鲁氏菌菌株在小鼠和妊娠山羊中表现为野生型毒力<sup>[67,68]</sup>,

布鲁氏菌 AhpC 突变体在小鼠中也表现为全毒力。且在小鼠中观察到的牛是传染的动物贮主, 这些结果表明布鲁氏菌必须能够保护自己免受外源性和内源性 ROS 的影响, 从而在其哺乳动物宿主中产生感染。

转录激活因子 OxyR 直接调节布鲁氏菌中 KatE 的表达以应对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的暴露<sup>[69,70]</sup>。但是 AhpC、SodC 和 SodA 的调控机制尚未阐明。氧化还原响应型双组分调控因子 RegAB 和严格响应型调控因子 Rsh 已被报道调控 SodC 表达<sup>[71]</sup>, Hfq 参与 AhpC 和 SodC 调控, VjbR 与 SodA 调控相连<sup>[72,73]</sup>。然而, 这些监管环节是直接的还是间接的, 需要进一步研究。

金属获取与解毒清除病原物铁 (Fe)、锰 (Mn) 和锌 (Zn) 是宿主抵抗微生物感染的一种策略。例如, 哺乳动物组织中绝大多数的 Fe 被整合到细胞蛋白或血红素中, 不能被细菌病原体直接利用。中性粒细胞在炎症反应过程中也会将金属结合蛋白钙卫蛋白和乳铁蛋白释放到细胞外环境中<sup>[74-76]</sup>, 活化的巨噬细胞利用二价阳离子转运体 Nramp1 将 Fe<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>和 Zn<sup>2+</sup>泵出含有胞内病原体的吞噬体中<sup>[77]</sup>。此外, 在炎症反应过程中, 肝脏产生激素铁调素 (hepcidin), 抑制 Fe 从肝脏和脾脏释放入血<sup>[78]</sup>。

布鲁氏菌依靠铁载体 brucebactin<sup>[79]</sup>、Fe<sup>2+</sup>转运蛋白 FtrABCD<sup>[80]</sup>、血红素转运蛋白 BhuA、Mn 转运蛋白 MntH<sup>[134]</sup>和 Zn 转运蛋白 ZnuA<sup>[81,82]</sup>克服其在哺乳动物宿主中遇到的 Fe、Mn 和 Zn 缺乏。有趣的是, 对 Brucebactin 的需求似乎是宿主依赖性的。该铁载体对流产杆菌 2308 在小鼠中的毒力不是必需的, 但对该菌株在妊娠山羊和牛中的毒力是必需的<sup>[83,84]</sup>。这些宿主对 Brucebactin 的这种差异需求的基础尚不清楚, 但实验证据表明它可能与赤藓糖醇分解代谢有关。

由于 Fe、Mn 或 Zn 的过量积累会对细菌细胞产生毒性, 因此布鲁氏菌利用金属响应的转录调节因子、储存蛋白和输出蛋白来防止金属毒性。转录调控因子 Irr、RirA、Mur 和 Zur 确保编码高亲和力金属导入子的基因只有在特定金属的细菌水平低于一定阈值时才被选择性表达<sup>[85-89]</sup>。Mn 输出蛋白 EmfA 和 Zn 输出蛋白 ZntA 也将过量的 Mn 和 Zn 转运出布鲁氏菌细胞, Zn 特异性转录调控因子 ZntR 紧密调控 ZntA 介导的 Zn 输出<sup>[90]</sup>。布鲁氏菌 Irr、RirA、EmfA 和 ZntR 突变株在小鼠体内的致弱现象有力地说明了布鲁氏菌克服在宿主内的金属剥夺与金属毒性, 才能成为有效的病原体。

镍 (Ni) 和镁 (Mg) 转运在布鲁氏菌毒力中也起着重要作用。Ni 是脲酶活性所必需的, Mg 是细菌细胞中含量最丰富的金属元素, 也是布鲁氏菌必需的微量营养元素<sup>[91,92]</sup>。两个高亲和力的镍转运蛋白在为布鲁氏菌提供支持其脲酶活性所需的镍时发挥功能冗余作用。尽管布鲁氏菌中的镁转运蛋白还没有得到很好的鉴定, 但在对培养的哺乳动物细胞和小鼠中表现出衰减的羊种布鲁氏菌突变体的遗传筛选中发现了一个预测参与镁转运的基因<sup>[93]</sup>。在培养的哺乳动物细胞中, 缺失了一个参与维持细胞 Mg/ATP 平衡 (MgtC) 的沙门氏菌毒力决定因子同源物的猪种布鲁氏菌突变株也被削弱<sup>[94,95]</sup>。