

石亚男,唐军,李军丽,等. 利用 *Pdl1* 敲除的巨噬细胞转录谱分析结核感染中 PD-L1 作用相关的候选基因 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(5): 31-39.

Shi YN, Tang J, Li JL, et al. Screening of PD-L1 related specific candidate genes in tuberculosis by transcriptome sequencing and analysis in *mycobacterium tuberculosis* infected *Pdl1* knockout macrophages [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(5): 31-39.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.05.006

利用 *Pdl1* 敲除的巨噬细胞转录谱分析结核感染中 PD-L1 作用相关的候选基因

石亚男,唐 军,李军丽,王 杰,占玲俊*

(中国医学科学院医学实验动物研究所;卫健委人类疾病比较医学重点实验室;新发再发传染病动物模型研究北京市重点实验室;北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心;中国医学科学院结核病中心,北京 100021)

【摘要】 目的 分析结核菌(*Mtb*)感染的程序性死亡配体 1(*Pdl1*)特异性敲除的巨噬细胞(MΦ)转录谱变化,筛选 MΦ 内 PD-L1 作用相关的候选基因。方法 构建敲除小鼠(*Pdl1*^{Flox/-}),通过 Cre-loxp 技术培育出 MΦ 上 *Pdl1* 特异性敲除的纯合和杂合小鼠(*Pdl1*^{Flox/Flox}-Cre, *Pdl1*^{Flox/-}-Cre),用 PCR 和流式细胞术验证。分离上述小鼠腹腔 MΦ,利用转录组测序技术检测 *Mtb* 感染 MΦ 24 h 的表达谱,以同窝阴性小鼠(*Pdl1*^{Flox/Flox})为对照,进行生物信息学分析。结果 PCR 和流式细胞术证实小鼠敲除成功。纯合、杂合及同窝阴性小鼠感染前后相比,差异表达基因最显著富集项为参与免疫反应和免疫过程的 GO($P < 0.01$; $P < 0.01$),筛出 17 个 PD-L1 相关的候选基因。通过 KEGG 富集分析,最显著富集的通路有 Toll 样受体、NF-κB 信号通路等($P < 0.01$; $P < 0.01$),筛出 6 个候选基因。结论 通过转录谱分析,确定与免疫反应及免疫过程有关的 *Ccl2*、*Qa5*、*Il12a* 等 17 个基因,免疫及炎症相关代谢通路的 *Ptgs2*、*Cd40*、*Card11* 等 6 个基因为 *Mtb* 感染的 MΦ 内 PD-L1 相关的候选基因,除 *Il6* 外均为本研究新筛选的候选基因。

【关键词】 结核分枝杆菌;巨噬细胞;*Pdl1* 基因敲除;Cre/loxP 重组酶系统;转录组测序

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020)05-0031-09

Screening of PD-L1 related specific candidate genes in tuberculosis by transcriptome sequencing and analysis in *mycobacterium tuberculosis* infected *Pdl1* knockout macrophages

SHI Yanan, TANG Jun, LI Junli, WANG Jie, ZHAN Lingjun*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, National Health Commission of P.R.C; Beijing Key Laboratory of Animal Models of Emerging and Reemerging Infectious Diseases; Research Center of Laboratory Animal Model Engineering and Technology of Human Critical Diseases in Beijing; Tuberculosis Center, CAMS, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To analyze the transcription profile of *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*)-infected macrophages in which the *Pdl1* gene has been knocked out and screen PD-L1 related candidate genes in *Mtb*-infected macrophages (MΦ). **Methods** *Pdl1*^{Flox/-} mice were constructed, and homozygous (*Pdl1*^{Flox/Flox}-with Cre) and heterozygous (*Pdl1*^{Flox/-}-with Cre) mice with targeted inactivation of the *Pdl1* gene in MΦs were bred by the Cre/loxP technique and

[基金项目]国家自然科学基金(81701986)。

[作者简介]石亚男(1995—),女,硕士研究生,专业:动物学。E-mail:15255825425@163.com

[通信作者]占玲俊,女,副研究员,硕士生导师。E-mail:zhanlj@cnilas.org

verified by PCR and FACS. Peritoneal MΦs were isolated from different substrains of mice, and those isolated from littermate negative mice ($Pd1^{Flox/Flox}$) were used as controls. Twenty-four hours after infection, the transcript profiles in the infected and uninfected groups were sequenced by RNA-Seq, and bioinformatics analysis was performed. **Results** $Pd1$ -specific knockout mice were successfully generated and identified by PCR and FACS. The $Pd1^{Flox/Flox}$ with Cre, $Pd1^{Flox/-}$ with Cre, and $Pd1^{Flox/Flox}$ infected groups were compared with their corresponding non-infected groups. Gene Ontology (GO) functional enrichment analysis showed that the most significant enrichments were immune response ($P < 0.01$) and immune system processes ($P < 0.01$). The seventeen candidate genes identified were regarded as specific genes related to PD-L1 in *Mtb* infection. Through the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis, the most significantly enriched pathways included Toll-like receptor ($P < 0.01$) and nuclear factor kappa-B (NF-κB) ($P < 0.01$) signaling pathways, and six candidate genes related to PD-L1 were screened. **Conclusions** Through transcription analysis, seventeen genes related to the immune response, including *Ccl2*, *Qa5*, and *Il12a*, and six genes in immune – and inflammation-related metabolic pathways, including *Ptgs2*, *Cd40*, and *Card11*, were identified as specific candidate genes related to PD-L1 in macrophages infected with *Mtb*. Except for *Il6*, all candidate genes were selected for this research.

【**Keywords**】 *Mycobacterium tuberculosis*; macrophages; $Pd1$ gene knockout; Cre/loxP recombinase system; transcriptome sequencing

结核病是由结核分枝杆菌(简称结核菌, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mtb*)感染引起的慢性传染性疾病,是全球十大死因之一。2019 年世界卫生组织(WHO)报告指出,2017 年全球结核病人约为 17 亿,其中新发结核病例 1010 万人,结核病死亡人数约为 157 万^[1],WHO 呼吁 2030 年终止结核,因此结核的防控研究尤为任重而紧迫。

程序性死亡配体 1(PD-L1)高表达与活动性结核紧密相关,PD-L1 表达于多种免疫细胞,如巨噬细胞、中性粒细胞、T 细胞和 B 细胞^[2]。其中巨噬细胞是结核病肉芽肿形成的主要细胞^[3],巨噬细胞作为效应细胞和抗原提呈细胞,在感染过程中通过吞噬杀伤、抗原提呈和分泌多种细胞因子等功能来调控机体炎症反应和免疫应答^[4],是宿主控制 *Mtb* 感染扩散的重要防御屏障。体外 $Pd1$ 敲低实验表明,PD-L1 可以通过 PD-1; PD-L1/PD-L2 通路在结核感染中发挥免疫抑制作用^[5-7],而体内作用机制不明,且体外作用的具体分子机制不明。除了 PD-1; PD-L1 通路外,结核病中 PD-L1 是否存在类似其他感染或肿瘤疾病中的其它配体和通路,目前还未见报道,其分子机制需要深入研究。

我们通过 Cre-loxp 技术构建巨噬细胞特异性 $Pd1$ 敲除小鼠^[8],主要目的是在结核感染中,动物体内研究 PD-L1 对巨噬细胞的作用机制。本研究通过比较不同敲除水平 $Pd1$ 的巨噬细胞感染 *Mtb* 后转录谱变化,从生物信息学筛选到的差异表达基因角度,分析结核菌感染中 PD-L1 发挥作用的分子机制,为深入研究 PD-L1 在结核感染发病中免疫作用和机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验菌株

结核分枝杆菌标准株 H37Rv(菌号为 93009)为本室保存,使用前活化并将菌悬液浓度调整为 1.0×10^7 CFU/mL, -80°C 保存备用。

1.1.2 实验动物

3 只 4~6 周龄 SPF 级雄性 $Pd1^{Flox/-}$ 小鼠体重 12~14 g,由中国医学科学院医学实验动物研究所基因工程平台采用 CRISPR/Cas9 技术构建。4~6 周龄 SPF 级野生型 C57BL/6 小鼠购自北京维通利华[SCXK(京)2017-001],体重 12~14 g,4~6 周龄 SPF 级雄性 *Lyz2-iCre* 小鼠由南京大学模式动物中心惠赠,体重 12~14 g,均饲养于中国医学科学院医学实验动物研究所屏障环境动物房[SYXK(京)2014-0029],动物实验中涉及动物的操作程序已经得到本所实验动物使用与管理委员会(IACUC)的批准,批准号为 ZLJ19003,所有动物按 3R 原则予以关怀。

1.2 主要试剂

中性罗氏培养管(珠海贝索生物,中国);FBS、DMEM 培养基、RPMI-1640 培养基(Gibco,美国);TRIzol Reagent(Life Technologies,美国);DNA 提取试剂盒(EE101-02)购自北京全式金;PCR 引物由上海英潍捷基合成;1×RBC Lysis Buffer、Anti-mouse CD3e FITC(eBioscience,美国);PE/Cy7 anti-mouse CD19、APC anti-mouse CD4、FITC anti-mouse/human CD11b、APC anti-mouse F4/80、PE anti-mouse CD274

(B7-H1, PD-L1) (Biolegend, 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 巨噬细胞特异性 *Pdl1* 敲除小鼠制备和繁育

巨噬细胞特异性 *Pdl1* 敲除小鼠的设计利用了位点特异性重组酶系统 Cre/loxp 原理,需要在 *Pdl1* 基因序列的两端各放置一个 loxp 序列,得到 *Pdl1*^{Flox/-}小鼠。将 *Pdl1*^{Flox/-}小鼠与巨噬细胞特异的 Cre 小鼠交配繁殖,以获得在巨噬细胞内把 *Pdl1* 基因敲除掉的小鼠,即巨噬细胞特异性 *Pdl1* 敲除小鼠,具体方法如下:

Pdl1^{Flox/-}小鼠构建成功后,与 C57BL/6 小鼠进行杂交,得到的 *Pdl1*^{Flox/-}小鼠进行自交,进一步得到 *Pdl1*^{Flox/Flox}小鼠,将雌性 *Pdl1*^{Flox/Flox}小鼠和带有巨噬细胞特异性表达 Cre 酶的 *Lyz2-iCre* 雄鼠进行杂交,得到 *Pdl1*^{Flox/-}-Cre 小鼠,最后将 *Pdl1*^{Flox/Flox}小鼠和 *Pdl1*^{Flox/-}-Cre 小鼠杂交,最终得到 1/4 的 *Pdl1*^{Flox/Flox}-Cre 小鼠,即为巨噬细胞特异性 *Pdl1* 敲除小鼠,同时获得 1/4 的 *Pdl1*^{Flox/-}-Cre 小鼠及 1/2 的同窝阴性 *Pdl1*^{Flox/Flox}小鼠。

1.3.2 小鼠基因型鉴定

剪脚趾标记出生幼鼠,收集脚趾并进行全基因组 DNA 提取。每管加入 100 μ L LB2 和 20 μ L 蛋白酶 K,56℃ 金属浴孵育至完全裂解后参照 DNA 提取试剂盒说明书进行,纯化后的全基因组 DNA 储存于 -20℃ 冰箱备用。根据待鉴定样品数量配制所需的 PCR 反应体系,同时设置阴性对照和阳性对照进行 PCR 扩增。其中 *Pdl1-loxp* 上游引物序列为: 5' TGTAAGCTATTAGACTGGCTGGAATGTAG 3'; 下游引物序列为: 5' GATGCAAGCTAGATAATATATTTCCCAGTC 3', 目标片段大小为 KI 1700 bp。Cre 上游引物序列为: 5' AGTGCTGAAGTCCATAGATCGG 3'; 下游引物序列为 5' CTGATTCTCCTCATCACCAGG 3'。目标片段大小为 543 bp。待扩增完毕,分别进行 2% 和 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.3.3 PD-L1 表达水平的检测

(1) 腹腔巨噬细胞 PD-L1 表达水平检测: *Pdl1*^{Flox/Flox}-Cre、*Pdl1*^{Flox/-}-Cre、*Pdl1*^{Flox/Flox}小鼠腹腔注射 6% 可溶性淀粉肉汤 1 mL,3 d 后小鼠断颈处死,无菌分离腹腔巨噬细胞;1300 r/min、室温离心 10 min,RPMI-1640 培养基洗涤巨噬细胞两次,1 mL PBS 重悬细胞,分别加入 APC-F4/80、FITC-CD11b 和 PE-CD274 流式抗体,以同型对照 PE-IgG 为阴性对照,室温避光孵育 15 min,1500 r/min,离

心 5 min,弃上清;2 mL PBS 洗涤细胞,1 mL PBS 重悬后进行流式细胞术分析以检测巨噬细胞 PD-L1 表达水平。

(2) T 细胞与 B 细胞 PD-L1 表达水平检测:无菌解剖 *Pdl1*^{Flox/Flox}-Cre、*Pdl1*^{Flox/-}-Cre、*Pdl1*^{Flox/Flox}小鼠,脾研磨液过 70 μ m 孔径筛网,1500 r/min,离心 5 min,弃上清;每管加入 5 mL 1×RBC Lysis Buffer,涡旋 30 s,室温静置 4 min;1500 r/min,4℃,离心 5 min,弃上清,5 mL PBS 洗涤细胞 3 次,1 mL PBS 重悬细胞,分别加入 FITC-CD3e、APC-CD4、PE/Cy7-CD19 和 PE-CD274 流式抗体,以同型对照 PE-IgG 为阴性对照,室温避光孵育 15 min,同上进行流式细胞术分析以检测 T 细胞与 B 细胞 PD-L1 表达水平。

1.3.4 感染与检测

取 24 孔细胞培养板,每孔加入 500 μ L 新分离的 *Pdl1*^{Flox/Flox}-Cre、*Pdl1*^{Flox/-}-Cre、*Pdl1*^{Flox/Flox}小鼠腹腔巨噬细胞,浓度为 1×10^6 细胞/mL。37℃、5% CO₂ 贴壁培养 2 d;弃上清,每孔补加 500 μ L DMEM 完全培养基,按 MOI 10 加入 *Mtb* 进行感染,未感染对照组每孔加入等体积的 DMEM 完全培养基;感染 24 h 后,弃上清,1 mL PBS 洗涤贴壁细胞 3 次,每孔加入 1 mL TRIzol 并收集各组细胞裂解液,提取全基因组进行测序和数据分析。

1.4 统计学方法

基因组比对采用 STAR (v2.5.2b) 软件,差异表达分析采用 DESeq (v1.12.0) 软件,基因本体论 (Gene Ontology, GO) 富集分析采用 GOSec 软件 (v1.22),京都基因和 KEGG 富集分析采用 KOBAS (v2.0) 软件。

2 结果

2.1 巨噬细胞特异性 *Pdl1* 敲除小鼠基因鉴定

繁育实验所需巨噬细胞特异性 *Pdl1* 敲除小鼠,剪新生小鼠脚趾,提取鼠趾基因组,用 PCR 技术进行小鼠基因鉴定。*Pdl1*^{Flox/Flox}-Cre 小鼠(图中标号为 7、10 小鼠)及 *Pdl1*^{Flox/-}-Cre 小鼠(图中标号为 3、4、6、8、12 小鼠)用于进一步研究,同窝阴性 *Pdl1*^{Flox/Flox}小鼠(图中标号为 9 小鼠)作为对照组,图中标号 1、11 为野生型小鼠,2、5 为 *Pdl1*^{Flox/-}小鼠(图 1)。

2.2 PD-L1 表达的检测结果

流式细胞仪检测发现:*Pdl1*^{Flox/Flox}-Cre 小鼠腹腔巨噬细胞 PD-L1 的表达量是显著偏低的, $P <$

0.001 (图 2A-1); 三种亚品系 $Pd1^{Flox/Flox}$ -Cre、 $Pd1^{Flox/-}$ -Cre、 $Pd1^{Flox/Flox}$ 小鼠 T 细胞与 B 细胞 PD-L1 的表达量是大致相同的(图 2B-1 与图 2C-1)。因此巨噬细胞特异性 $Pd1$ 敲除小鼠制备成功。

2.3 数据产出质量

测序后 $Pd1^{Flox/Flox}$ -Cre 感染组、 $Pd1^{Flox/-}$ -Cre 感染组、 $Pd1^{Flox/Flox}$ 感染组及其各自对应的未感染组数据质量通过过滤后的测序数据 (Clean reads) 大小、99.00% 碱基正确识别率 (Q20) 和 99.90% 碱基正确识别率 (Q30) 来判定 (表 1)。可见, 测序质量能够满足后续分析的要求。

2.4 测序序列 (reads) 与参考基因组比对结果

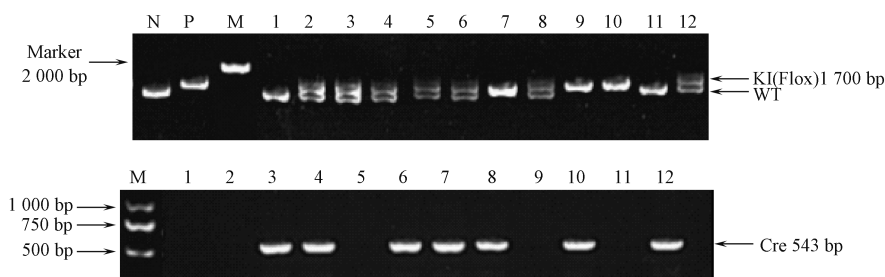
各组样品 reads 与参考基因组比对的总百分比 (Total mapped reads): $Pd1^{Flox/Flox}$ -Cre 感染组为 98.66%, $Pd1^{Flox/-}$ -Cre 感染组为 98.70%, $Pd1^{Flox/Flox}$ 感染组为 98.57%, 未感染组分别为 98.67%,

98.69% 和 98.58%, 均高于 65.00%, 表明参考基因组选择合适 (表 2)。

2.5 差异表达分析结果

差异表达结果的分析比较思路是: 将每个亚品系的小鼠的感染组与未感染组相比, 其差异基因认为是与 *Mtb* 感染相关的候选基因, 然后将每个敲除小鼠筛到的与 *Mtb* 感染相关的候选基因与同窝阴性小鼠分别比较, 其差异基因再结合 $Pd1^{Flox/Flox}$ -Cre 和 $Pd1^{Flox/-}$ -Cre 小鼠共同的 *Mtb* 感染相关基因分析, 最终得到结核感染中 PD-L1 特异性的基因。

与 $Pd1^{Flox/Flox}$ -Cre 的未感染组相比, $Pd1^{Flox/Flox}$ -Cre 感染组差异表达的基因共有 744 个 ($Q < 0.005$), 其中上调表达基因 415 个, 下调表达基因 329 个 (图 3A); 与 $Pd1^{Flox/-}$ -Cre 的未感染组比较, $Pd1^{Flox/-}$ -Cre 感染组差异表达的基因共有 811 个 ($Q < 0.005$), 其中上调表达基因 459 个, 下调表

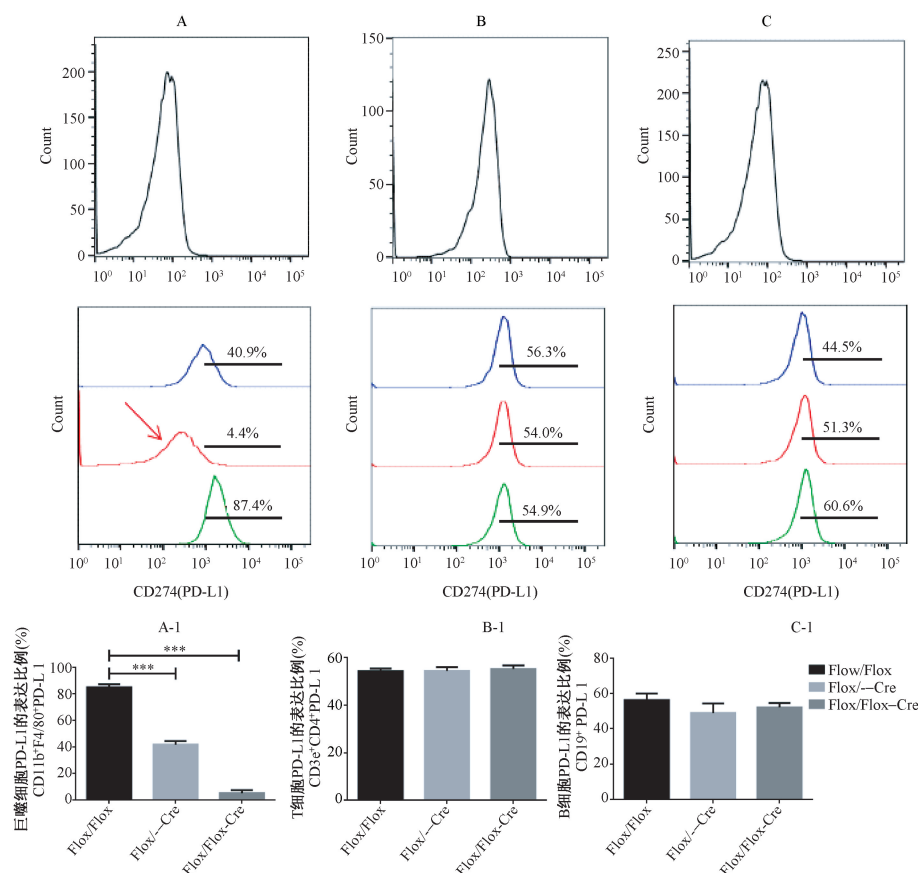


注: N: 阴性对照; P: 阳性对照; M: DNA marker。
图 1 巨噬细胞特异性 $Pd1$ 敲除小鼠基因鉴定
Note. N, Negative control. P, Positive control. M, DNA marker.

Figure 1 Genotype identification of macrophage-specific $Pd1$ conditional knockout mice

表 1 感染组和未感染组数据产出质量
Table 1 Data output quality list in infected group and uninfected group

组别 Groups	原始测序数 数据 Reads 数 Raw reads	质控完成后的 Reads 数 Clean reads	质控完成后的 碱基量 Clean bases (G)	clean reads 平均 测序错误率 Error rate (η/%)	Phred 质量 值大于 20 的 碱基数占总 碱基数比例 Q20 (η/%)	Phred 质量 值大于 30 的 碱基数占总 碱基数比例 Q30 (η/%)	GC 占 总碱基数 比例 GC content (η/%)
PD-L1 ^{Flox/Flox} -Cre 感染组 PD-L1 ^{Flox/Flox} -Cre infected group	50943650	50492772	7.58	0.02	98.42	95.26	51.41
PD-L1 ^{Flox/-} -Cre 感染组 PD-L1 ^{Flox/-} -Cre infected group	51607466	51143764	7.68	0.02	98.46	95.36	51.29
PD-L1 ^{Flox/Flox} 感染组 PD-L1 ^{Flox/Flox} infected group	49542606	49083514	7.36	0.02	98.37	95.15	50.97
PD-L1 ^{Flox/Flox} -Cre 未感染组 PD-L1 ^{Flox/Flox} -Cre uninfected group	51165462	50701324	7.60	0.02	98.41	95.20	51.31
PD-L1 ^{Flox/-} -Cre 未感染组 PD-L1 ^{Flox/-} -Cre uninfected group	49779056	49290228	7.40	0.02	98.40	95.21	51.25
PD-L1 ^{Flox/Flox} 未感染组 PD-L1 ^{Flox/Flox} uninfected group	41410370	41069906	7.16	0.02	98.39	95.16	51.40



注:A:上图为巨噬细胞阴性对照,下图为三种亚品系小鼠腹腔巨噬细胞 PD-L1 (CD274 分子) 的表达;B:上图为 T 细胞阴性对照,下图为三种亚品系小鼠 T 细胞 PD-L1 的表达;C:上图为 B 细胞阴性对照,下图为三种亚品系小鼠 B 细胞 PD-L1 的表达;蓝色峰为 $Pdl1^{Flox/-}$ -Cre 小鼠;红色峰为 $Pdl1^{Flox/Flox}$ -Cre 小鼠;绿色峰为 $Pdl1^{Flox/Flox}$ 小鼠;与 $Pdl1^{Flox/Flox}$ 组比较, *** $P < 0.001$ 。

图 2 流式细胞术检测巨噬细胞、T、B 细胞上 PD-L1 的表达

Note. A, The above stands for the negative control of macrophages, and the below is the expression of PD-L1 in peritoneal macrophages of three sub-lineage mice. B, The above stands for the negative control of B cells, and the below is the expression of PD-L1 in B cells of three sub-lineage mice. C, The above stands for the negative control of T cells, and the below is the expression of PD-L1 in T cells of three sub-lineage mice. The blue peak represents $Pdl1^{Flox/-}$ with Cre mice, the red peak indicates $Pdl1^{Flox/Flox}$ with Cre mice, and the green peak represents $Pdl1^{Flox/Flox}$ mice. Compared with the $Pdl1^{Flox/Flox}$ group, *** $P < 0.001$.

Figure 2 The expression levels of PD-L1 on macrophages, T cells, and B cells were detected by flow cytometry

达基因 352 个(图 3B);与 $Pdl1^{Flox/Flox}$ 的未感染组比较, $Pdl1^{Flox/Flox}$ 感染组差异表达的基因共有 510 个 ($Q < 0.005$),其中上调表达基因 332 个,下调表达基因 178 个(图 3C)。

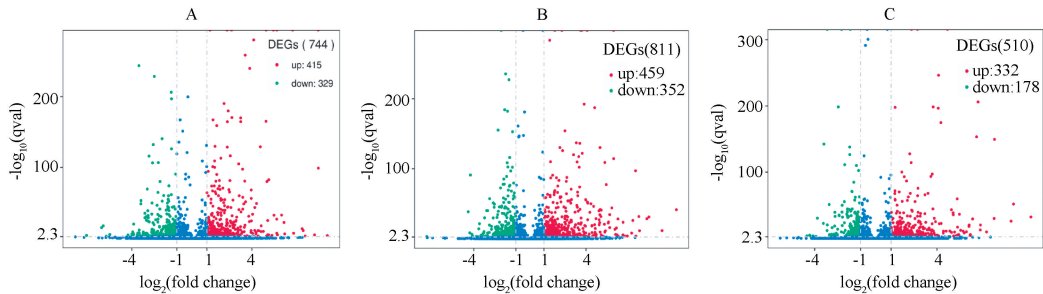
2.6 差异表达基因的 GO 富集分析结果

与未感染组相比, $Pdl1^{Flox/Flox}$ -Cre 感染组, $Pdl1^{Flox/-}$ -Cre 感染组, $Pdl1^{Flox/Flox}$ 感染组最显著富集组份均为参与免疫反应的 GO:0006955 ($P < 0.01$)与参与免疫系统过程的 GO:0002376 ($P <$

0.01),涉及差异表达的基因分别为 18 个(表 3),28 个(表 4),20 个(表 5),其中 $Pdl1^{Flox/Flox}$ -Cre 感染组与 $Pdl1^{Flox/-}$ -Cre 感染组共有 32 个差异表达基因,其中 30 个基因表达上调,2 个基因表达下调。这些共有的差异表达基因进一步与 $Pdl1^{Flox/Flox}$ 感染组进行比较,剔除相同基因,筛选出的候选基因初步定为结核感染中 PD-L1 相关的特异基因,共 17 个基因,其中 13 个基因表达上调,4 个基因表达下调。

表 2 感染组和未感染组 reads 与参考基因组比对情况
Table 2 Comparison of reads and reference genomes between infected group and uninfected group

组别	质控总 Reads 数	比对到 参考序列 Reads 总数	比对到 参考序列多个 位置 Reads 数	比对到 参考序列唯一 位置 Reads 数	比对到正链 Reads 数	比对到负链 Reads 数	Read 比对 到一个 外显子总数	Read 分段 比对到不同 外显子总数
Group	Total reads	Total mapped	Multiple mapped	Uniquely mapped	Reads map to "+"	Reads map to "-"	Non-splice reads	Splice reads
感染组 PD-L1 ^{Flox/Flox} - Cre	50943650	49816954	1645874	48171080	24085540	24085540	25118905	23052175
PD-L1 ^{Flox/Flox} - Cre infected group	(98.66%)	(3.26%)	(95.4%)	(47.7%)	(47.7%)	(49.75%)	(45.65%)	
感染组 PD-L1 ^{Flox/-} - Cre	51143764	50478632	1615700	48862932	24431466	24431466	25301114	23561818
PD-L1 ^{Flox/-} - Cre infected group	(98.70%)	(3.16%)	(95.54%)	(47.77%)	(47.77%)	(49.47%)	(46.07%)	
感染组 PD-L1 ^{Flox/Flox}	49083514	48380238	1703298	46676940	23338470	23338470	24623811	22053129
PD-L1 ^{Flox/Flox} infected group	(98.57%)	(3.47%)	(95.1%)	(47.55%)	(47.55%)	(50.17%)	(44.93%)	
未感染组 PD-L1 ^{Flox/Flox} - Cre	50701324	50028630	1636992	48391638	24195819	24195819	24798532	23593106
PD-L1 ^{Flox/Flox} - Cre uninfected group	(98.67%)	(3.23%)	(95.44%)	(47.72%)	(47.72%)	(48.91%)	(46.53%)	
未感染组 PD-L1 ^{Flox/-} - Cre	49290228	48644378	1621900	47022478	23511239	23511239	24579268	22443210
PD-L1 ^{Flox/-} - Cre uninfected group	(98.69%)	(3.29%)	(95.4%)	(47.7%)	(47.7%)	(49.87%)	(45.53%)	
未感染组 PD-L1 ^{Flox/Flox}	41069906	40488162	1405160	39083002	19541501	19541501	20304377	18778625
PD-L1 ^{Flox/Flox} uninfected group	(98.58%)	(3.42%)	(95.16%)	(47.58%)	(47.58%)	(49.44%)	(45.72%)	



注: A: $Pd1^{Flox/Flox}$ - Cre 感染组与未感染组相比; B: $Pd1^{Flox/-}$ - Cre 感染组与未感染组相比; C: $Pd1^{Flox/Flox}$ 感染组与未感染组相比。横坐标代表基因在不同样本中表达倍数变化,纵坐标代表基因表达量变化差异的统计学显著性;差异表达显著的基因用红点(上调)和绿点(下调)表示;差异表达不显著的基因用蓝点表示。

图 3 差异基因火山图

Note, A, The $Pd1^{Flox/Flox}$ with Cre infected group compared with the uninfected group. B, The $Pd1^{Flox/-}$ with Cre infected group compared with the uninfected group. C, The $Pd1^{Flox/Flox}$ infected group compared with the uninfected group. The abscissa represents the fold change in gene expression in different samples, and the ordinate represents the statistically significant differences in gene expression. The significantly differentially expressed genes are represented by red dots (upregulation) and green dots (downregulation). Genes that were not significantly differentially expressed are indicated by blue dots.

Figure 3 Differential gene volcano map

表 3 PD-L1^{Flox/Flox}-Cre 感染组与其未感染组相比差异表达基因 GO 最显著富集分析的前 2 项
Table 3 Most two enriched terms of GO enrichment analysis of differentially expressed genes in PD-L1^{Flox/Flox}-Cre infected group compared with its uninfected group

GO 数据库编号	GO 功能信息	该 GO 类别	该 GO 相关的差异表达基因数	差异表达基因中有 GO 注释的基因数目
GO_accession	Description	Term type	DEG item	DEG gene number
GO:0006955	免疫反应	生物过程		
	Immune response	Biological_process	18	380
GO:0002376	免疫系统过程	生物过程		
	Immune system process	Biological_process	18	380

表 4 PD-L1^{Flox/-}-Cre 感染组与其未感染组相比差异表达基因 GO 最显著富集分析的前 2 项
Table 4 Most two enriched terms of GO enrichment analysis of differentially expressed genes in PD-L1^{Flox/-}-Cre infected group compared with its uninfected group

GO 数据库编号	GO 功能信息	该 GO 类别	该 GO 相关的差异表达基因数	差异表达基因中有 GO 注释的基因数目
GO_accession	Description	Term type	DEG item	DEG gene number
GO:0006955	免疫反应	生物过程		
	immune response	biological_process	28	423
GO:0002376	免疫系统过程	生物过程		
	immune system process	biological_process	28	423

上调和下调表达基因名称及对应的变化倍数对数值[$|\log_2(\text{FoldChange})|$]整理如下:上调表达的基因包括促炎因子趋化因子配体 2 (*Ccl2*, 3.4677)、趋化因子配体 7 (*Ccl7*, 8.1765)、白介素 12a (*Il12a*, 6.1789)、白介素 6 (*Il6*, 9.0296)、趋化因子(C-X-C 模体)配体 1 (*Cxcl1*, 6.1104)、趋化因子(C-X-C 模体)配体 9 (*Cxcl9*, 1.9734)、组织相容性 2, Q 区基因座 5 (*Qa5*, 1.3648)、组织相容性 2, M 区基因座 2 (*Hmt*, 1.2766)、组织相容性 2, T 区基因座 23 (*Qa1*, 1.1328)、鸟苷酸结合蛋白 4 (*Gbp4*, 4.6111)、鸟苷酸结合蛋白 8 (*Gbp8*, 2.8399)、鸟苷酸结合蛋白 9 (*Gbp9*, 4.9383)、鸟苷酸结合蛋白 11 (*Gbp11*, 6.649)。下调表达的基因包括趋化因子(C-C 模体)配体 9 (*Ccl9*, 1.3723)、白介素 1 受体拮抗剂 (*Il1rn*, 1.9407)、补体成分 1q 亚成分, α 多肽 (*C1qa*, 1.392) 和组织相容性 2, K 区基因座 2 (*H2k2*, 1.2708)。上述基因表明 *Mtb* 感染 *Pd1* 敲除的巨噬细胞 24 h 后,可能通过上述免疫分子参与结核的特异性免疫反应。

2.7 差异表达基因的 KEGG 富集分析结果

通过京都基因和基因组百科全书 (Kyoto

encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 富集分析,发现与未感染组相比, *Pd1*^{Flox/Flox}-Cre 感染组最显著富集的通路为 Toll 样受体 (Toll-like receptors) 信号通路、核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 信号通路及缺氧诱导因子-1 (HIF-1) 信号通路 ($P < 0.01$, 表 6); *Pd1*^{Flox/-}-Cre 感染组最显著富集的通路为肿瘤坏死因子 (TNF) 信号通路及 NF- κ B 信号通路 ($P < 0.01$, 表 7); *Pd1*^{Flox/Flox} 感染组最显著富集的通路为 TNF 信号通路及 NF- κ B 信号通路 ($P < 0.01$, 表 8)。其中 *Pd1*^{Flox/Flox}-Cre 感染组与 *Pd1*^{Flox/-}-Cre 感染组富集的通路中共有 16 个差异表达基因,表达均上调,这些共有的差异表达基因进一步与 *Pd1*^{Flox/Flox} 感染组进行比较,剔除相同基因,筛选出 6 个基因,表达均上调,基因名称及变化倍数对数值[$|\log_2(\text{FoldChange})|$]整理如下: CD40 抗原 (*Cd40*, 3.9838)、TNF 受体相关因子 1 (*Traf1*, 2.2187)、TNF 受体相关因子 2 (*Traf2*, 1.3572)、TNF 受体相关因子 3 (*Traf3*, 1.3196)、前列腺素-内过氧化物合酶 2 (*Ptgs2*, 7.7714)、Caspase 募集结构域 11 (*Card11*, 3.3684),上述基因初步定为结核感染中 PD-L1 相关的特异基因。

表 5 PD-L1^{Flox/Flox} 感染组与其未感染组相比差异表达基因 GO 最显著富集分析的前 2 项

Table 5 Most two enriched terms of GO enrichment analysis of differentially expressed genes in PD-L1^{Flox/Flox} infected group compared with its uninfected group

GO 数据库编号 GO accession	GO 功能信息 Description	该 GO 类别 Term type	该 GO 相关的差异表达基因数 DEG item	差异表达基因中有 GO 注释的基因数目 DEG gene number
GO:0006955	免疫反应 Immune response	生物过程 Biological_process	20	258
GO:0002376	免疫系统过程 Immune system process	生物过程 Biological_process	20	258

表 6 PD-L1^{Flox/Flox}-Cre 感染组与其未感染组相比差异表达基因 KEGG 最显著富集分析

Table 6 Most enriched pathway terms of KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes in PD-L1^{Flox/Flox}-Cre infected group compared with its uninfected group

通路的描述 信息 Term	该通路差异 表达基因个数 Sample number	该通路所有 注释基因个数 Background number	统计学显著 水平 P-value	基因名称 Gene name
Toll 样受体信号通路 Toll-like receptor signaling pathway	17	101	0.00238	Il12b Map2k1 Cd40 Nfkb1a Traf3 Tnf Rela Irf7 Il6 Traf6 Il12a Tlr2 Cxcl9 Ccl5 Cd14 Spp1 Tlr8
NF- κ B 信号通路 NF- κ B signaling pathway	23	104	0.00125	Relb Cd40 Tnfaip3 Nfkb1a Traf3 Tnf Rela Nfkb2 Traf1 Traf2 Traf6 Vcam1 Birc3 Ptgs2 Malt1 Icam1 Cxcl2 Bcl2a1d Plcg2 Bcl2a1a Card11 Prkcb Cd14 Eno2 Map2k1 Hmox1 Nos2 Hif1a Tfrc Vegfa Rela
HIF-1 信号通路 HIF-1 signaling pathway	24	110	0.00099	Pfkfb3 Eif4e Slc2a1 Egl3 Serpine1 Pgk1 Ldha Il6ra Flt1 Plcg2 Prkcb Eif4ebp1 Egl1 Igf1 Il6 Eno1

表 7 PD-L1^{Flox/-}-Cre 感染组与其未感染组相比差异表达基因 KEGG 最显著富集分析

Table 7 Most enriched pathway terms of KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes in PD-L1^{Flox/-}-Cre infected group compared with its uninfected group

通路的描述 信息 Term	该通路差异 表达基因个数 Sample number	该通路所有 注释基因个数 Background number	统计学显著 水平 P-Value	基因名称 Gene name
TNF 信号通路 TNF signaling pathway	20	112	0.000455	Mmp14 Mkl1 Csf1 Mmp9 Nfkb1a Tnf Traf3 Cxcl3 Cxcl1 Birc3 Ccl2 Icam1 Atf4 Bcl3 Cebpb Cxcl2 Ptgs2 Ccl5 Traf1 Traf2
NF-κ B 信号通路 NF-κ B signaling pathway	17	104	0.007521	Relb Cd40 Nfkb1a Tnf Traf3 Birc3 Ptgs2 Icam1 Ticam2 Cxcl2 Bcl2a1d Bcl2a1a Lat Card11 Traf1 Traf2 Cd14

表 8 PD-L1^{Flox/Flox} 感染组与其未感染组相比差异表达基因 KEGG 最显著富集分析

Table 8 Most enriched pathway terms of KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes in PD-L1^{Flox/Flox} infected group compared with its uninfected group

通路的描述 信息 Term	该通路差异 表达基因个数 Sample number	该通路所有 注释基因个数 Background number	统计学显著 水平 P-Value	基因名称 Gene name
TNF 信号通路 TNF signaling pathway	12	112	0.004458	Mmp14 Mkl1 Mmp9 Nfkb1a Tnf Fas Cxcl3 Bcl3 Cxcl2 Icam1 Ccl5 Birc3
NF-κB 信号通路 NF-κB signaling pathway	14	104	0.000296	Relb Nfkb1a Tnf Nfkb2 Birc3 Icam1 Lat Cd14 Ddx58 Ticam2 Cxcl2 Bcl2a1d Bcl2a1a Gadd45b

3 讨论

巨噬细胞在宿主抗结核分枝杆菌的感染免疫中起关键作用^[9], *Mtb* 通过抑制吞噬体成熟、抑制吞噬体和溶酶体融合、抑制巨噬细胞凋亡、干扰抗原呈递、抑制自噬等, 逃逸巨噬细胞对 *Mtb* 的杀伤^[10], 但其具体机制和过程尚未阐明。研究发现在活动性结核病人中, PD-L1 在中性粒细胞 (PMN) 和单核/巨噬细胞 (Mo/MΦ) 表达升高最显著, PD-L1 表达下降与活动性结核的好转有密切关系^[11], 体外实验发现: PD-1/PD-L1 通路阻断后, 巨噬细胞对 *Mtb* 的吞噬和胞内杀伤活性明显增强^[12], 然而具体分子机制不明。此外, PD-L1 是否有其他受体配体通路, 目前尚未证实, 因此探讨 PD-L1 在 *Mtb* 感染的巨噬细胞中的作用对结核防治的基础研究有重要意义。

本研究通过 Cre-loxp 技术构建巨噬细胞特异性 *Pdl1* 敲除小鼠模型, 通过 PCR 和流式细胞术检测证实巨噬细胞特异性 *Pdl1* 敲除小鼠构建成功。分离腹腔巨噬细胞, 对 *Mtb* 感染前后的不同敲除小鼠的巨噬细胞进行 RNA-Seq 及生物信息学分析, 结果表明: *Mtb* 感染的 *Pdl1* 敲除巨噬细胞中基因表达谱发生改变, 通过 GO 和 KEGG 富集分析, 初步筛选出 23 个 PD-L1 相关的候选基因, 其中某些基因在肿瘤和病毒感染中已有相关报道, 在人卵巢癌和结肠癌

中, 阻断 PD-1/PD-L1 信号通路, 可促进 Th1 型趋化因子 CXCL9 的分泌^[13], 促进效应 T 细胞和自然杀伤 (NK) 细胞浸润, 增强抗肿瘤效应。在神经胶质瘤、黑色素瘤微环境中, CCL2、CXCL1、PTGS2 及 CD40 的表达与 PD-L1 的表达呈正相关^[14-17], 阻断 PD-1/PD-L1 信号通路, 可促进肿瘤相关巨噬细胞 (TAM) 释放促炎细胞因子 IL6, 增强 Th1 免疫应答和抗肿瘤作用^[18]。在人丙型肝炎病毒 (HCV) 感染中, 阻断 PD-1/PD-L1 信号通路, 可增强低表达 TRAF1 的特异性 CD8⁺T 细胞反应^[19]。如前所述, 在结核分枝杆菌感染中, 抑制 PD-1/PD-L1 信号通路可促进小鼠肺泡巨噬细胞释放炎症因子 IL6, 增强先天免疫反应^[12]。

通过 KEGG 富集分析, 发现与 PD-L1 有关的通路包括 Toll 样受体信号通路、NF-κB 信号通路、HIF-1 信号通路及 TNF 信号通路。在 *Mtb* 感染初期, Toll 样受体作为天然免疫细胞活化的调节剂发挥着重要作用, 随后, Toll 样受体及信号通路对特异性细胞免疫产生影响。此外, Toll 样受体信号通路亦参与调控结核菌免疫逃逸的发生, 是导致结核慢性感染的根源所在^[20]。NF-κB 是一类重要的核转录因子, 其活化可激活下游众多的细胞因子的转录, NF-κB 信号通路和 NF-κB 依赖性细胞因子在遏制结核菌感染中至关重要^[21]。HIF-1 是一种重要的转录因

子,是由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 组成的异源二聚体,其中 HIF-1 α 为主要的调节亚基,在缺氧、肿瘤及炎症情况下可广泛表达^[22],是抗结核分枝杆菌感染的重要介质^[23]。TNF 信号传导通路主要包括 Caspase 家族介导的细胞凋亡、衔接蛋白 TRAF 介导的转录因子 NF- κ B 和 JNK 蛋白激酶的活化,在抗结核感染中发挥重要作用^[24]。

本研究通过 GO 富集分析发现的免疫反应有关的 17 个候选基因与 KEGG 富集分析发现的免疫及炎症相关代谢通路的 6 个候选基因,可能是结核感染中 PD-L1 作用相关的特异性分子,后期将对这 23 个基因进行细胞水平和动物体内的验证和功能机制研究,为结核防治的基础研究提供线索。

参考文献:

- [1] WHO. Global Tuberculosis Report 2019[EB/OL]. [2019-10-17]. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/329368/9789241565714-eng.pdf?ua=1>.
- [2] Suarez GV, Melucci Ganzarain CDC, Vecchione MB, et al. PD-1/PD-L1 pathway modulates macrophage susceptibility to mycobacterium tuberculosis specific CD8⁺ T cell induced death [J]. Sci Rep, 2019, 9(1):177-187.
- [3] Huang L, Nazarova EV, Tan S, et al. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* in vivo segregates with host macrophage metabolism and ontogeny [J]. J Exp Med, 2017, 215(4): 1135-1152.
- [4] BoseDasgupta S, Pieters J. Macrophage-microbe interaction; lessons learned from the pathogen *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Semin Immunopathol, 2018, 40(6): 577-591.
- [5] O'Donnell JS, Long GV, Scolyer RA, et al. Resistance to PD1/PD-L1 checkpoint inhibition [J]. Cancer Treat Rev, 2017, 52: 71-81.
- [6] Rao M, Valentini D, Dodoo E, et al. Anti-PD-1/PD-L1 therapy for infectious diseases: learning from the cancer paradigm [J]. Int. J. Infect. Dis, 2017, 56: 221-228.
- [7] Shen L, Gao Y, Liu Y, et al. PD-1/PD-L pathway inhibits M. tb-specific CD4⁺ T-cell functions and phagocytosis of macrophages in active tuberculosis [J]. Sci Rep, 2016, 6: 38362.
- [8] 赵安竹, 付辉蓉, 李昀, 等. Cre-loxp 技术构建肝脏特异性 HIF-2 α 基因敲除小鼠模型 [J]. 中华肝脏外科手术学电子杂志, 2019, 8(3): 270-275.
- [9] Hmama Z, Peña-Díaz S, Joseph S, et al. Immune evasion and immunosuppression of the macrophage by *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Immunol Rev, 2015, 264(1): 220-232.
- [10] Rajaram MV, Ni B, Dodd CE, et al. Macrophage immunoregulatory pathways in tuberculosis [J]. Semin Immunol, 2014, 26(6): 471-485.
- [11] Dorhoi A, Iannaccone M, Maertzdorf J, et al. Reverse translation in tuberculosis: neutrophils provide clues for understanding development of active disease [J]. Front Immunol, 2014, 5: 36.
- [12] Hu JF, Zhang W, Zuo W, et al. Inhibition of the PD-1/PD-L1 signaling pathway enhances innate immune response of alveolar macrophages to mycobacterium tuberculosis in mice [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2019, 60: 101842.
- [13] Zou W, Wolchok JD, Chen L. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations [J]. Sci Transl Med, 2016, 8(328): 328rv4.
- [14] Qian J, Wang C, Wang B, et al. The IFN- γ /PD-L1 axis between T cells and tumor microenvironment: hints for glioma anti-PD-1/PD-L1 therapy [J]. J Neuroinflammation, 2018, 15(1): 290.
- [15] Taube JM, Young GD, McMiller TL, et al. Differential expression of immune-regulatory genes associated with PD-L1 display in melanoma: implications for PD-1 pathway blockade [J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(17): 3969-3976.
- [16] Botti G, Fratangelo F, Cerrone M, et al. COX-2 expression positively correlates with PD-L1 expression in human melanoma cells [J]. J Transl Med, 2017, 15(1): 46.
- [17] Zippelius A, Schreiner J, Herzig P, et al. Induced PD-L1 expression mediates acquired resistance to agonistic anti-CD40 treatment. Cancer Immunol Res [J]. Cancer Immunol Res, 2015, 3(3): 236-244.
- [18] Tsukamoto H, Fujieda K, Miyashita A, et al. Combined blockade of IL6 and PD-1/PD-L1 signaling abrogates mutual regulation of their immunosuppressive effects in the tumor microenvironment [J]. Cancer Res, 2018, 78(17): 5011-5022.
- [19] Moreno-Cubero E, Subirá D, Sanz-de-Villalobos E, et al. According to hepatitis C virus (HCV) infection stage, interleukin-7 plus 4-1BB triggering alone or combined with PD-1 blockade increases TRAF1^{low} HCV-specific CD8⁺ cell reactivity [J]. J Virol, 2018, 92(2): e01443-17.
- [20] Vu A, Calzadilla A, Gidfar S, et al. Toll-like receptors in mycobacterial infection [J]. Eur J Pharmacol, 2017, 808: 1-7.
- [21] Zhang H, Ouyang H, Wang D, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Rv2185c contributes to nuclear factor- κ B activation [J]. Mol, Immunol, 2015, 66: 147-153.
- [22] Cai X, Huang Y, Zhang X, et al. Cloning, characterization, hypoxia and heat shock response of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) from the small abalone *Haliotis diversicolor* [J]. Gene, 2014, 534(2): 256-264.
- [23] Braverman J, Sogi KM, Benjamin D, et al. HIF-1 α is an essential mediator of IFN- γ -dependent immunity to mycobacterium tuberculosis [J]. J Immunol, 2016, 197(4): 1287-1297.
- [24] Xie X, Li F, Chen JW, et al. Risk of tuberculosis infection in anti-TNF- α biological therapy: from bench to bedside [J]. J Microbiol Immunol Infect, 2014, 47(4): 268-274.

收稿日期2019-12-19