网络出版时间:2026-03-13 DOI:10.13207/j.jnwafu.2026.09.009

布鲁氏菌对不同免疫状态小鼠 CD4$^+$ T 细胞基因表达的影响

金晶,王康,耿方豪,李怡,高剑峰
(石河子大学 生命科学学院,新疆 石河子 832000)

[摘 要] 【目的】揭示不同免疫状态下感染布鲁氏菌(布菌)对小鼠 CD4$^+$ T 细胞基因表达的影响。【方法】将小鼠随机分为对照组(CK)、布菌 M5^{+gfp}组(M5^{+gfp}组)、环磷酰胺免疫抑制组(CYP 组)、CYP+布菌 M5^{+gfp}组(CYP+M5^{+gfp}组),测定小鼠脾组织相对质量、载菌量,HE 染色评估脾脏病理变化;测定半数溶血值以及 IFN-γ 含量,综合评价模型小鼠机体免疫状态。对 4 种模型小鼠的 CD4$^+$ T 细胞进行转录组测序,对其差异表达基因进行 KEGG 分析。选取差异基因 *Klf*4、*Elane*、*Fosb*、*Fcgr*1、*Chtf*18、*Gadd*45*g* 进行 RT-qPCR 验证。【结果】① M5^{+gfp}组小鼠脾组织相对质量显著高于 CK 组($P<0.05$),CYP+M5^{+gfp}组极显著高于 CYP 组($P<0.01$)。CYP+M5^{+gfp}组载菌量极显著高于 M5^{+gfp}组($P<0.01$)。M5^{+gfp}组和 CYP+M5^{+gfp}组脾组织细菌 PCR 均扩增出 1 000 bp 的 *GFP* 片段,证实侵染脾组织的菌种为布菌 M5^{+gfp}菌株。HE 染色结果显示,M5^{+gfp}组和 CYP+M5^{+gfp}组脾脏均呈现红白髓分界不清、脾结节减少及淋巴细胞稀疏等病理变化,其中 CYP+M5^{+gfp}组病变程度更重。半数溶血值测定结果显示,M5^{+gfp}组低于 CK 组,CYP+M5^{+gfp}组低于 CYP 组,但差异均不显著($P>0.05$)。IFN-γ 含量测定结果显示,M5^{+gfp}组显著高于 CK 组($P<0.05$),CYP+M5^{+gfp}组极显著高于 CYP 组($P<0.01$)。② M5^{+gfp}组较 CK 组 CD4$^+$ T 细胞上调基因富集于抗原加工和呈递、NOD 样受体信号通路,可增强机体对布菌的清除能力;下调基因富集于自然杀伤细胞介导的细胞毒性通路,可导致 NK 细胞功能受损,削弱机体抗布菌能力。CYP+M5^{+gfp}组较 CYP 组 CD4$^+$ T 细胞上调基因富集于细胞因子-细胞因子受体相互作用、中性粒细胞胞外陷阱形成及造血细胞谱系通路,可协同强化机体免疫能力;下调基因富集于细胞因子-细胞因子受体相互作用通路,可导致免疫信号受到干扰。筛选出 M5^{+gfp}组较 CK 组和 CYP+M5^{+gfp}组较 CYP 组均上调的共有基因 56 个,其中 *Clca*3*a*1、*Trbv*19、*Gbp*2*b*、*Klf*1、*Serpina*3*f*、*Trbv*17 在 M5^{+gfp}组和 CYP+M5^{+gfp}组小鼠中表达量较高。*Klf*4、*Elane*、*Fosb*、*Fcgr*1、*Chtf*18、*Gadd*45*g* 基因表达水平转录组测序结果与 RT-qPCR 验证结果吻合,证实转录组测序数据是可靠的。【结论】布菌感染期间,小鼠 CD4$^+$ T 细胞基因表达模式发生了改变;筛选出 56 个不同免疫状态下均上调的核心基因。

[关键词] 布鲁氏菌;CD4$^+$ T 细胞;免疫抑制;转录组测序;差异表达基因
[中图分类号] S852.61$^+$4 [文献标志码] A [文章编号] 1671-9387(2026)09-0089-11

Effects of *Brucella melitensis* on gene expression in CD4$^+$ T cells of mice with different immune statuses

JIN Jing, WANG Kang, GENG Fanghao, LI Yi, GAO Jianfeng
(*College of Life Sciences, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang* 832000, *China*)

Abstract: 【Objective】 This research aims to elucidate the effects of *Brucella melitensis* infection on CD4$^+$ T cell gene expression in mice under different immune statuses. 【Method】 Mice were randomly divided into the

[收稿日期] 2025-06-24 [修回日期] 2025-07-22
[基金项目] 国家重点基础研究发展计划项目(2010CB530200)
[作者简介] 金晶(1998—),女,重庆璧山人,在读硕士,主要从事布鲁氏菌侵染分子机制研究。E-mail:18095982833@163.com
[通信作者] 高剑峰(1964—),男,新疆石河子人,教授,硕士,博士生导师,主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail:jianfengg@shzu.edu.cn

control group (CK group), *Brucella melitensis* M5^{+gfp} group (M5^{+gfp} group), cyclophosphamide immunosuppression group (CYP group), and CYP+*Brucella melitensis* M5^{+gfp} group (CYP+M5^{+gfp} group). Relative mass and bacterial load of mouse spleen tissue were determined, and HE staining was used to assess the pathological changes in the spleen tissue. The half-hemolytic complement activity (CH_{50}) and IFN-γ levels were determined to comprehensively evaluate the immune status of the model mice. Transcriptome sequencing analysis was performed on CD4$^+$ T cells from the four groups, and KEGG analysis was performed on differentially expressed genes. The differentially expressed genes *Klf*4、*Elane*、*Fosb*、*Fcgr*1、*Chtf*18 and *Gadd*45*g* were selected for RT-qPCR validation.【Result】① The relative mass of spleen tissue in the M5^{+gfp} group was significantly higher than that in the CK group ($P<0.05$), and that in the CYP+ M5^{+gfp} group was significantly higher than that in the CYP group ($P<0.01$). The bacterial load in the CYP+M5^{+gfp} group was extremely significantly higher than that in the M5^{+gfp} group ($P<0.01$). 1 000 bp *GFP* fragments amplified in bacterial PCR of spleen tissues were obtained both in the M5^{+gfp} and CYP+M5^{+gfp}groups, confirming that the bacterial strain infecting the spleen tissue was the M5^{+gfp} strain of *Brucella melitensis*. HE staining results showed that pathological changes such as unclear red-white marrow demarcation, reduced spleen nodules, and sparse lymphocytes were observed in both the M5^{+gfp} group and the CYP+M5^{+gfp} group, with the lesions being more severe in the CYP+M5^{+gfp}group. The half-hemolytic complement activity measurement results showed that the half value of hemolysin in the M5^{+gfp} group was lower than that in the CK group, and that in the CYP+M5^{+gfp} group was lower than that in the CYP group, but the differences were not significant ($P>0.05$). IFN-γ level in the M5^{+gfp} group were significantly higher than that in the CK group ($P<0.05$), and that in the CYP+M5^{+gfp} group was extremely significantly higher than that in the CYP group ($P<0.01$). ② Compared with the CK group, the up-regulated genes of CD4$^+$ T cells in the M5^{+gfp}group were enriched in antigen processing and presentation and NOD-like receptor signaling pathways, enhancing the host's clearance of *Brucella melitensis*. The down-regulated genes were enriched in the natural killer cell-mediated cytotoxic pathway, which impaired NK cell function and weakened the antibacterial ability against *Brucella melitensis*. Compared with the CYP group, the up-regulated genes of CD4$^+$ T cells in the CYP+M5^{+gfp} group were enriched in cytokine-cytokine receptor interaction, neutrophil extracellular traps, and hematopoietic cell lineage, synergistically enhancing the host's immune capacity. The down-regulated genes were enriched in the cytokine-cytokine receptor interaction pathway, which led to interference with immune signaling. A total of 56 genes were identified that were upregulated in both the M5^{+gfp} group compared to the CK group and the CYP+M5^{+gfp}group compared to the CYP group. Among them, *Clca*3*a*1、*Trbv*19、*Gbp*2*b*、*Klf*1、*Serpina*3*f* and *Trbv*17 exhibited higher expression levels in the M5^{+gfp} and CYP+M5^{+gfp} model mice. In addition, the transcriptomic sequencing data of *Klf*4、*Elane*、*Fosb*、*Fcgr*1、*Chtf*18 and *Gadd*45*g* genes were consistent with the RT-qPCR validation results, confirming the reliability of the transcriptomic sequencing data.【Conclusion】During *Brucella melitensis* infection, the gene expression patterns of CD4$^+$ T cells in mice changed, and ultimately 56 core genes that were upregulated under different immune conditions were selected.

Key words: *Brucella melitensis*; CD4$^+$ T cells; immunosuppression; transcriptome sequencing; differentially expressed gene

布鲁氏菌病(布病)是人类和动物感染布鲁氏菌(布菌)后引起的一种严重传染病,人类接触患病动物或受污染的动物产品后会引发布病[1-2]。布病作为全球范围内重要的人兽共患病,其致病机制在免疫正常宿主中已有部分解析,然而免疫抑制人群感染布菌后病情进展迅速且治疗效果差,提示机体免疫防御能力的减弱可能触发布菌独特的致病模式。布菌是一种胞内细菌,能够激活免疫系统,促进CD4$^+$和CD8$^+$T细胞的分化[3]。在机体抵抗布菌感染的过程中,CD4$^+$T细胞发挥多种功能,包括辅

助B细胞产生抗体、激活巨噬细胞杀灭胞内细菌以及直接的细胞毒性作用[4]，因此研究CD4$^+$ T细胞基因表达在此过程中的变化对于探讨布菌致病分子机制和药物作用机制具有重要意义。CD4$^+$ T细胞作为适应性免疫的核心协调者，通过协调多种免疫细胞的功能，参与对抗病原体、肿瘤以及自身免疫性疾病[5]。CD4$^+$ T细胞活化的关键起始步骤是其表面的T细胞受体特异性识别由抗原递呈细胞加工处理并与主要组织相容性复合体Ⅱ类分子（major histocompatibility complex class Ⅱ，MHC Ⅱ）结合的抗原肽[6-7]。抗原肽也称免疫多肽，是抗原蛋白质被抗原递呈细胞（antigen-presenting cell，APC）加工处理后产生的短肽片段，其与MHC Ⅱ分子的结合是触发CD4$^+$ T细胞活化并决定免疫应答性质和强度的基础[8]。2016年，MOMMEN等[9]从人类骨髓单核细胞白血病细胞系中鉴定出了近14 000种可与3种人类MHC（HLA-DR异构体蛋白分子）结合的抗原肽，极大地拓展了人们对T细胞表位库的认识。

环磷酰胺（cyclophosphamide，CYP）是一种细胞毒性药物，能够杀死有丝分裂以及进入循环周期的细胞，并对免疫相关的细胞产生强烈的抑制作用，因此被广泛用于建立实验性免疫抑制模型[10-11]。转录组学分析技术已被广泛应用于炎症和自身免疫疾病的研究，转录组学分析可以揭示免疫细胞在炎症组织中的变化，探索免疫系统的异常激活机制，在感染和疫苗研究中有重要应用。前人对布菌MHC Ⅱ-免疫多肽组的筛选及鉴定已有报道[12]，但对布菌侵染小鼠后其脾组织中与布菌MHC Ⅱ-免疫多肽组相结合的细胞转录组测序研究报道较少，并且传统研究多聚焦于单一感染模型，忽略了免疫抑制背景下细菌-宿主互作的特异性。本研究探讨正常小鼠和免疫抑制小鼠感染布菌对机体CD4$^+$ T细胞基因表达的影响，以期揭示布病免疫调控的核心靶点。

1　材料与方法

1.1　材　料

SPF级KM小鼠160只（体质量约33 g/只），由新疆医科大学提供；布菌M5^{+gfp}菌株，由本项目组构建[13]。RPMI 1640培养液，购自美国Sigma公司；TSA和TSB培养基、CYP、胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）、红细胞裂解液，均购自美国GIBCO公司。

布菌M5^{+gfp}菌株注射液：将布菌M5^{+gfp}在含有氯霉素的TSA培养基中于37 ℃下培养72 h后，挑取表面光滑的单个菌落，将其接种到含氯霉素的TSB培养基中，在37 ℃下200 r/min振荡培养72 h，然后使用麦士比浊管将菌液的密度调整为5×10^6 CFU/mL，备用。

CYP注射液：取CYP粉末，用生理盐水溶解配制成13.35 μg/μL的CYP溶液，－20 ℃避光保存，备用。

1.2　试验设计

将160只小鼠适应性饲养7 d后，随机分为对照组（CK组）、布菌M5^{+gfp}组（M5^{+gfp}组）、环磷酰胺免疫抑制组（CYP组）、CYP＋布菌M5^{+gfp}组（CYP＋M5^{+gfp}组），每组40只。CK组小鼠连续6 d每日腹腔注射生理盐水200 μL/只；M5^{+gfp}组小鼠第1～3和5～6腹腔注射生理盐水200 μL/只，第4天腹腔注射上述M5^{+gfp}注射液200 μL/只；CYP组小鼠连续3 d腹腔注射CYP注射液200 μL/只（CYP剂量约为80 mg/kg），第4～6天腹腔注射生理盐水200 μL/只；CYP＋M5^{+gfp}组小鼠连续3天腹腔注射CYP注射液200 μL/只（CYP剂量约为80 mg/kg），第4天腹腔注射上述M5^{+gfp}注射液200 μL/只，第5和6天腹腔注射生理盐水200 μL/只。各组小鼠第7天进行试验。

1.3　试验小鼠的免疫功能评估

1.3.1　脾相对质量测定　从每组小鼠中随机选取3只处死，称体质量（m_1），无菌采集脾脏并称质量（m_2），计算脾脏相对质量（脾脏相对质量＝m_2/m_1）。

1.3.2　脾脏载菌量检测　从M5^{+gfp}组、CYP＋M5^{+gfp}组各随机选取3只小鼠处死，无菌采集脾脏并称质量，随后将脾脏转移至无菌研磨器中，加入1 mL无菌生理盐水充分研磨成匀浆，取100 μL匀浆液进行10倍稀释，取100 μL稀释后的匀浆液均匀涂布于含氨苄青霉素的TSA培养基上，将平板倒置于37 ℃恒温培养箱中培养48 h，培养结束后进行计数，计算脾脏载菌量。脾脏载菌量（CFU/g）＝（$A\times N\times V_1$）/（$V_2\times m$），其中，A为平板平均菌落数，N为稀释倍数，V_1为脾脏匀浆液总体积（mL），V_2为脾脏匀浆液涂布体积（mL），m为脾脏质量。

1.3.3　脾组织细菌PCR鉴定　采用布菌M5^{+gfp}菌株，基于*GFP*基因特有的PMC-221序列，用Primer 5.0软件设计特异性引物，上游引物M13-F序列为5′-TGTAAAACGACGGCCAGT-3′，下游引物M13-R序列为5′-CAGGAAACAGCTATGACC-

3′。对1.3.2节组织培养获得的单菌落样本进行PCR扩增,反应体系为:模板2 μL,上游引物0.3 μL,下游引物0.3 μL,PCR mix 10 μL,ddH$_2$O 7.4 μL。反应程序为:94 ℃ 1 min;94 ℃ 0.5 min,56 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,35个循环;72 ℃ 10 min。利用1%琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行检测,观察1 000 bp位置是否有特异性条带出现,若检测到该条带即可确认所培养的组织细菌为布菌M5^{+gfp}。

1.3.4 脾组织结构检测 从每组小鼠中随机选取3只处死,无菌取脾组织,常规方法制备石蜡切片(厚度为4 μm),HE染色后,光学显微镜下观察脾组织结构。

1.3.5 半数溶血值的测定 从每组中随机选取3只小鼠,腹腔注射绵羊红细胞(sheep red blood cells,SRBC)免疫,4 d后进行眼眶静脉采血,收集血清。设置样品孔与空白对照孔,样品孔加50 μL经SA缓冲液300倍稀释后的血清,空白对照孔加50 μL SA缓冲液;样品孔与空白对照孔均依次加入10%(体积分数)SRBC 25 μL和补体50 μL(SA溶液1∶8倍稀释),37 ℃孵育30 min后冰浴终止反应,1 500 r/min离心10 min;取上清液50 μL转移至新96孔板,加入都氏试剂150 μL。另设半数溶血孔:加入10%(体积分数)SRBC 12.5 μL,以都氏试剂定容至200 μL,振荡混匀后静置10 min,540 nm波长处测各管吸光度(OD_{450}),计算半数溶血值(HC_{50}):HC_{50}=(样品OD_{450}/SRBC半数溶血时的OD_{450})×稀释倍数。

1.3.6 IFN-γ含量测定 从每组中随机选取3只小鼠进行眼眶静脉采血,样品静置1~2 h后3 000 r/min离心10 min,收集血清。采用江苏晶美小鼠干扰素γ检测试剂盒测定血清中的IFN-γ含量。

1.4 CD4$^+$ T细胞转录组测序与差异表达基因分析

4组试验小鼠分别随机处死18只,每组设置3个平行组,每个平行组6只小鼠,无菌采集脾脏组织。按照BeaverBeads小鼠CD4$^+$ T细胞分选试剂盒(阴选)分选小鼠CD4$^+$ T细胞,随后提取各样本总RNA。利用Illumina平台对4组小鼠CD4$^+$ T细胞进行双末端转录组测序,过滤得有效读段(clean reads)后比对小鼠参考基因组,组装转录本,以DESeq2筛选差异基因(CPM值表征),再用clusterProfiler进行KEGG富集分析。

1.5 CD4$^+$ T细胞差异表达基因验证

提取4组小鼠组织样品的总RNA,并将其质量浓度调整为200 ng/μL进行反转录。选择前期基于转录组表达量筛选的6个候选目标基因*Fcgr*1、*Chtf*18、*Elane*、*Gadd*45*g*、*Klf*4、*Fosb*,以*β-actin*为内参基因进行实时荧光定量PCR(RT-qPCR)验证。根据各基因的编码序列信息,利用Primer Premier 5软件设计引物,引物信息见表1。RT-qPCR按照TransScript Green Two-Step qRT-PCR SuperMix荧光定量PCR试剂盒使用说明进行试验操作,反应体系为:Template 2 μL,Forward primer 0.4 μL,Reverse promer 0.4 μL,Passive Rererence Dye(50×)0.4 μL,Nuclease-free Water 6.8 μL,SuperMix 10 μL。反应程序为:94 ℃ 30 s;94 ℃ 5 s,55 ℃ 15 s,72 ℃ 10 s,40个循环。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各基因相对表达量。

表1 CD4$^+$T细胞差异表达基因RT-qPCR试验引物信息

Table 1 RT-qPCR primer information for differential expressed genes of CD4$^+$T cells

基因 Gene	引物序列(5′→3′) Primer sequence (5′→3′)	退火温度/℃ Annealing temperature	基因 Gene	引物序列(5′→3′) Primer sequence (5′→3′)	退火温度/℃ Annealing temperature
*Fcgr*1	F:TCGGTGGGGAAGTGGTTAATG R:ACTGGCCTCTGGGATGCTAT	58	*Klf*4	F:GCGAGTCTGACATGGCTGT R:GTTCCTCACGCCAACGGTTA	59
*Chtf*18	F:GAGTTGTGGTCTGGCTCCAT R:GGTCCCGTGTTCCTTCCAG	59	*Fosb*	F:GAACGCCTGGAGTTTGTCCT R:ACTTGAACTTCACTCGGCCA	58
Elane	F:GCACTGGCCTCAGAGATTGT R:TGACCGGAAATTTAGGCCGT	59	*β-actin*	F:CATTGCTGACAGGATGCAGAAGG R:TGCTGGAAGGTGGACAGTGAGG	58
*Gadd*45*g*	F:GACTCTGGAAGAAGTCCGTGG R:ACATTGTCAGGGTCCACATTCA	59			

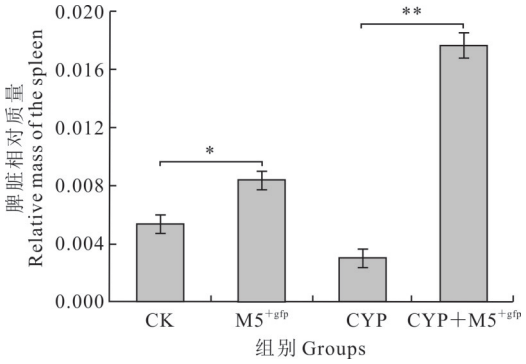
1.6 数据统计分析

试验数据使用Excell软件进行基本统计处理,结果用SPSS 26.0软件进行方差分析和显著性检验并制图。转录组测序数据使用Excell软件进行基本统计处理,使用森恩艾斯科技在线云平台进行制图。

2　结果与分析

2.1　模型小鼠的免疫功能评估

2.1.1　脾脏相对质量测定　脾相对质量检测结果（图 1）显示，M5^{+gfp}组显著高于 CK 组（$P<0.05$），表明小鼠在感染布菌后脾组织发生了炎症反应，导致其质量增加，这可能是脾充血、水肿和增生等多种因素造成的。CYP＋M5^{+gfp}组小鼠脾脏相对质量极显著高于 CYP 组（$P<0.01$），表明小鼠在免疫抑制状态下感染布菌后，脾组织发生了更为明显的炎症反应与增生。



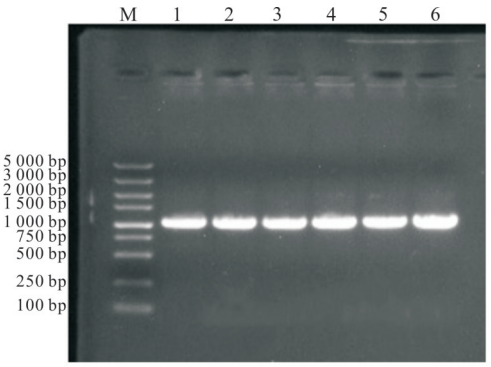
*表示差异显著（$P<0.05$），**表示差异极显著（$P<0.01$）。下图同。
* indicates significant differences ($P<0.05$), and ** indicates highly significant differences ($P<0.01$). The same below.

图 1　布鲁氏菌对不同免疫状态小鼠脾脏相对质量的影响

Fig. 1　Effects of *Brucella melitensis* on the relative mass of the spleen in mice with different immune statuses

2.1.2　脾组织载菌量检测　脾组织载菌量检测结果显示，CYP＋M5^{+gfp}组脾组织载菌量（（56 333.33±8 604.90）CFU/g）极显著高于 M5^{+gfp}组（（133 725.67±7 386.46）CFU/g），表明小鼠在免疫抑制状态下布菌的侵染数量极显著增高。

2.1.3　脾组织细菌 PCR 鉴定　脾组织细菌 PCR 鉴定结果（图 2）显示，M5^{+gfp}和 CYP＋M5^{+gfp}组均扩增出 1 000 bp 的 *GFP* 片段，证明侵染脾组织菌种为布菌 M5^{+gfp}菌株。

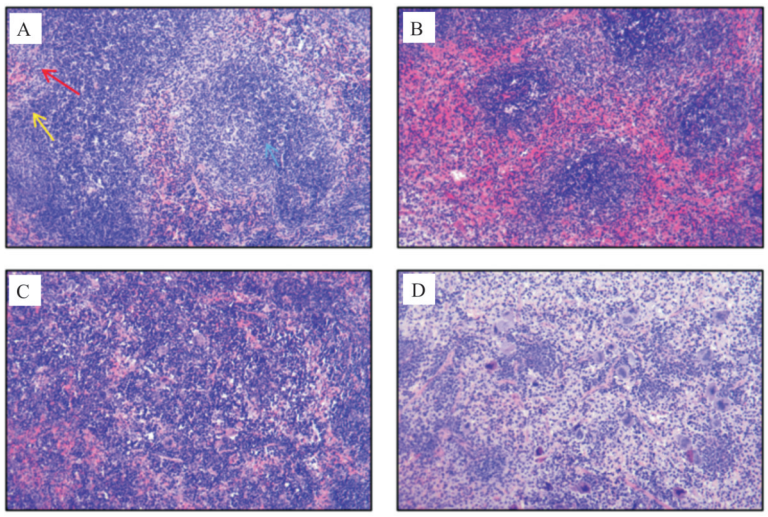


M. DNA Marker；1～3. M5^{+gfp}组；4～6. CYP＋M5^{+gfp}组。
M. DNA Marker; 1－3. M5^{+gfp} group; 4－6. CYP＋M5^{+gfp} group.

图 2　小鼠脾组织细菌 PCR 鉴定

Fig. 2　PCR identification of bacteria in mouse spleen tissue

2.1.4　脾组织 HE 染色　脾组织 HE 染色结果（图 3）显示，CK 组脾结构清晰，淋巴滤泡密集，红髓与白髓分界明显，白髓面积大，动脉周围淋巴鞘及脾小结正常；其他试验组均呈现白髓模糊且面积缩小、红白髓分界不清、脾小结锐减、红细胞脱落、淋巴细胞稀疏且数量减少、脾索变窄等病理改变，其中 CYP＋M5^{+gfp}组病变程度最重。



A. CK 组；B. CYP 组；C. M5^{+gfp}组；D. CYP＋M5^{+gfp}组。黄箭头标示红髓；红箭头标示白髓；蓝箭头标示脾小结。
A. CK group; B. CYP group; C. M5^{+gfp} group; D. CYP＋M5^{+gfp} group. The yellow arrow indicates red pulp; the red arrow indicates white pulp; the blue arrow indicates splenic nodules.

图 3　布鲁氏菌对不同免疫状态小鼠脾脏组织结构的影响（×200）

Fig. 3　Effects of *Brucella melitensis* on the structural composition of spleen tissue in mice with different immune statuses（×200）

2.1.5 半数溶血值测定 由图4可知,M5^{+gfp}组半数溶血值低于CK组,CYP+M5^{+gfp}组半数溶血值低于CYP组,但差异均不显著($P>0.05$),原因可能与机体对抗布菌感染更依赖细胞免疫而非体液免疫的特性有关,或因感染早期体液免疫尚未充分激活。

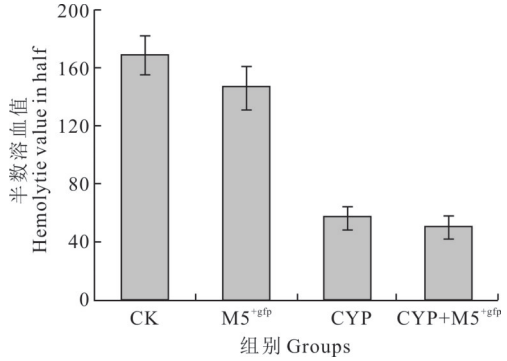


图4 布鲁氏菌对不同免疫状态小鼠半数溶血值的影响

Fig. 4 Effects of *Brucella melitensis* on the half-hemolytic value of mice with different immune statuses

2.1.6 IFN-γ测定结果 由图5可知,M5^{+gfp}组IFN-γ含量显著高于CK组($P<0.05$),CYP+M5^{+gfp}组IFN-γ含量极显著高于CYP组($P<0.01$)。结果表明,布菌感染触发了强烈的Th1型免疫反应,IFN-γ作为关键细胞因子被大量分泌。

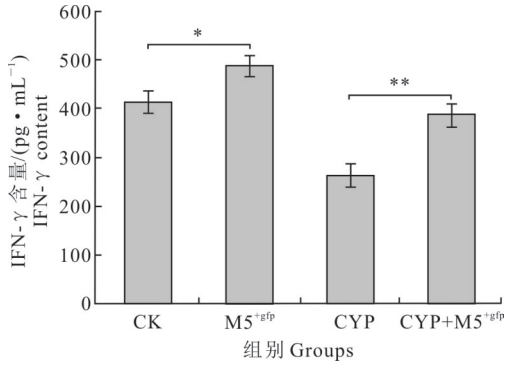


图5 布鲁氏菌对不同免疫状态小鼠IFN-γ含量的影响

Fig. 5 Effects of *Brucella melitensis* on IFN-γ content in mice with different immune statuses

2.2 CD4$^+$ T细胞转录组测序分析

2.2.1 测序原始数据及质控数据统计 测序数据如表2所示。由表2可知,试验各组的Q20质量值碱基数≥4.90 G,Q30质量值碱基数≥4.76 G,表明GC含量以及碱基质量分布较为良好,测序数据可以用于后续分析。

表2 各组小鼠脾CD4$^+$T细胞转录组测序原始数据及质控数据统计结果

Table 2 Raw data and quality control data statistics results of CD4$^+$ T cell transcriptome sequencing in the spleens of mice in each group

样本 Sample ID	原始读段数/M No. raw reads	过滤后读段数/M No. clean reads	原始碱基数/G No. raw bases	过滤后碱基数/G No. clean bases	Q20质量值碱基数/G Q20 bases	Q30质量值碱基数/G Q30 bases	GC含量/% GC content	测序片段长度/bp Sequencing fragment length
CK-1	44.32	42.98	6.65	6.37	6.25	6.07	47.36	217
CK-2	43.67	42.67	6.55	6.34	6.23	6.06	48.15	218
CK-3	44.99	43.60	6.75	6.46	6.33	6.14	49.18	217
M5^{+gfp}-1	41.76	40.63	6.26	6.03	5.92	5.76	49.85	228
M5^{+gfp}-2	40.08	38.98	6.01	5.78	5.67	5.50	48.70	218
M5^{+gfp}-3	40.01	38.77	6.00	5.75	5.63	5.46	48.44	227
CYP-1	35.39	34.63	5.31	5.14	5.04	4.90	48.06	217
CYP-2	40.22	39.25	6.03	5.83	5.73	5.58	49.97	218
CYP-3	46.16	44.88	6.92	6.66	6.54	6.36	48.91	228
CYP+M5^{+gfp}-1	43.18	41.94	6.48	6.22	6.10	5.92	47.23	229
CYP+M5^{+gfp}-2	34.63	33.69	5.19	5.00	4.90	4.76	46.32	229
CYP+M5^{+gfp}-3	46.21	45.04	6.93	6.69	6.57	6.40	49.74	226

注:CK-1~CK-3分别代表CK处理1~3平行组,其他以此类推。表2同。

Note: CK-1—CK-3 represent parallel groups treated with CK 1—3, respectively. The same applies to the other groups. The same as in table 2.

2.2.2 测序数据与参考基因组的比对 将经过过滤的测序数据与参考基因组进行比对分析,结果(表3)显示,各样本组中成功映射到基因组的测序序列占比均不低于91.59%。该结果表明,转录组测序数据的质量可以满足后续分析要求。

2.3 CD4$^+$ T细胞差异表达基因分析

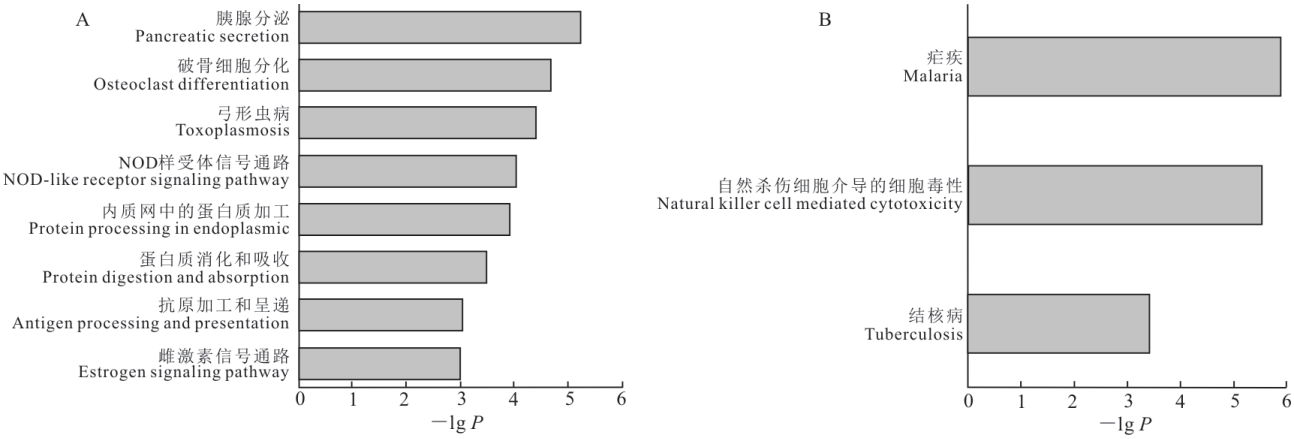
2.3.1 差异表达基因筛选 对CYP+M5^{+gfp}组与CYP组进行比较,筛选出了2 866个上调基因和391个下调基因。对M5^{+gfp}组与CK组进行比较,筛选出了166个上调基因和273个下调基因。

2.3.2　M5^{+gfp}组较CK组差异表达基因KEGG富集分析　如图6-A所示，M5^{+gfp}组较CK组小鼠脾组织CD4$^+$ T细胞中上调基因显著富集在抗原加工和呈递、NOD样受体信号通路等免疫相关通路。如图6-B所示，M5^{+gfp}组较CK组小鼠脾组织CD4$^+$ T细胞中下调基因显著富集在自然杀伤细胞介导的细胞毒性免疫相关通路。

表3　各组小鼠脾CD4$^+$T细胞转录组测序数据与参考基因组的比对结果

Table 3　Alignment results of transcriptomic sequencing data from CD4$^+$ T cells in the spleens of mice in each group with the reference genome

样本 Sample ID	总读段数 Total reads	比对上的读段数 No. of mapped reads	比对率/% Mapped ratio	未比对上的读段数 No. of unmapped reads	唯一比对读段数 No. of unique mapped reads
CK-1	42 983 282	39 750 939	92.48	3 232 343	37 074 103
CK-2	42 672 036	39 428 961	92.40	3 243 075	36 857 929
CK-3	43 601 594	40 113 466	92.00	3 488 128	37 611 967
M5^{+gfp}-1	40 625 938	37 550 554	92.43	3 075 384	35 044 168
M5^{+gfp}-2	38 975 852	35 697 982	91.59	3 277 870	33 002 354
M5^{+gfp}-3	38 773 338	35 644 329	91.93	3 129 009	33 177 415
CYP-1	34 627 074	31 829 206	91.92	2 797 868	29 570 350
CYP-2	39 252 510	36 496 983	92.98	2 755 527	34 185 361
CYP-3	44 884 938	41 195 396	91.78	3 689 542	38 577 321
CYP+M5^{+gfp}-1	41 937 388	38 578 203	91.99	3 359 185	35 153 775
CYP+M5^{+gfp}-2	33 688 328	31 104 433	92.33	2 583 895	28 254 616
CYP+M5^{+gfp}-2	45 037 600	41 533 674	92.22	3 503 926	38 366 380



A. 显著上调基因；B. 显著下调基因。

A. Significantly up-regulated genes; B. Significantly down-regulated genes.

图6　M5^{+gfp}组较CK组小鼠CD4$^+$T细胞差异表达基因KEGG富集分析

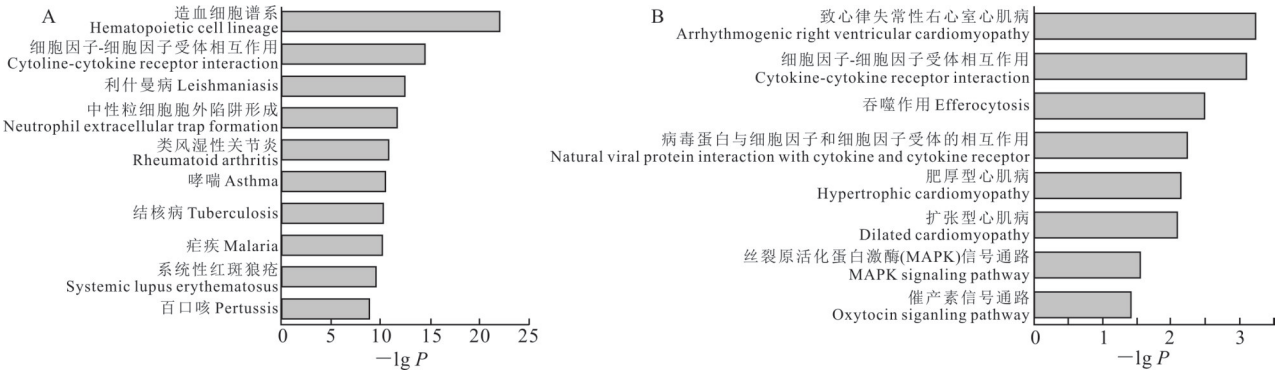
Fig. 6　KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes in CD4$^+$ T cells between the M5^{+gfp} group and the CK group

2.3.3　CYP+M5^{+gfp}组较CYP组差异表达基因KEGG富集分析　如图7-A所示，CYP+M5^{+gfp}组较CYP组小鼠脾组织CD4$^+$T细胞中上调基因显著富集在造血细胞谱系、细胞因子-细胞因子受体相互作用和中性粒细胞胞外陷阱形成等免疫相关通路。如图7-B所示，CYP+M5^{+gfp}组较CYP组小鼠脾组织CD4$^+$T细胞中下调基因显著富集在细胞因子-细胞因子受体相互作用等与免疫相关的通路。

2.3.4　共有差异表达基因分析　对M5^{+gfp}组与CK组和CYP+M5^{+gfp}组与CYP组共有差异基因进行分析，筛选出共有差异基因182个。对筛选出来的182个共有差异基因进行进一步分析，筛选出M5^{+gfp}组较CK组和CYP+M5^{+gfp}组较CYP组均上调的共有基因56个（图8），均下调的共有基因18个（图9）。从图8可知，在共同上调的基因中，*Clca3a1*、*Trbv19*、*Gbp2b*、*Klf1*、*Serpina3f*、*Trbv17*在M5^{+gfp}组和CYP+M5^{+gfp}组小鼠中表达量较高。

2.4　CD4$^+$ T细胞差异表达基因的RT-qPCR验证

在M5^{+gfp}组与CK组比较中，*Klf4*、*Elane*、*Fosb*基因表达水平转录组测序结果与RT-qPCR验证结果一致（图10）；在CYP+M5^{+gfp}组与CYP组比较中，*Fcgr1*、*Chtf18*、*Gadd45g*基因表达水平转录组测序结果与RT-qPCR验证结果吻合（图11）。上述结果表明，转录组测序数据是可靠的。



A. 显著上调基因;B. 显著下调基因。

A. Significantly up-regulated genes; B. Significantly down-regulated genes.

图 7 CYP+M5^{+gfp} 组较 CYP 组小鼠 CD4$^+$ T 细胞差异表达基因 KEGG 富集分析

Fig. 7 KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes in CD4$^+$ T cells between CYP+M5^{+gfp} group and CYP group

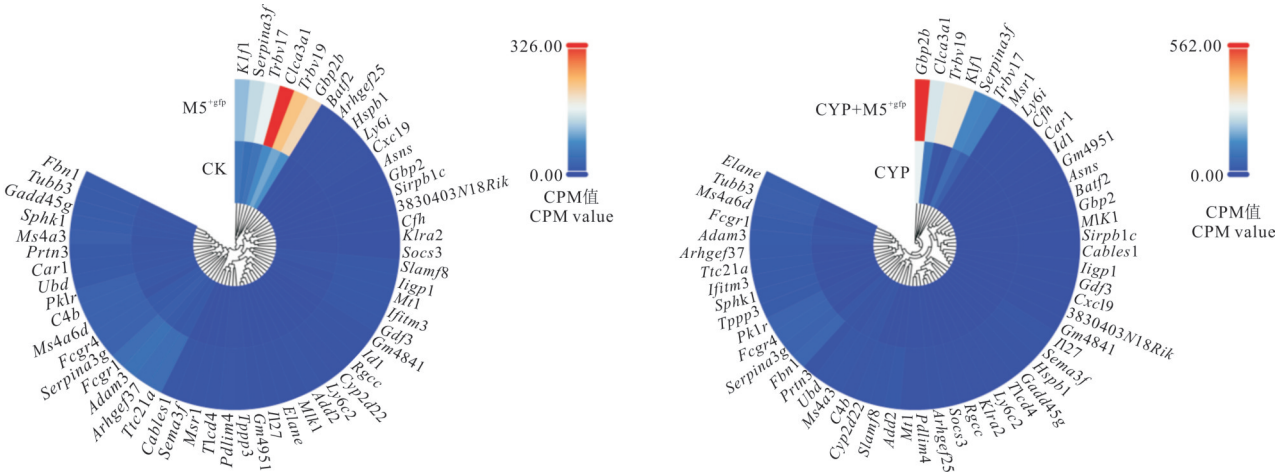


图 8 M5^{+gfp}组较 CK 组和 CYP+M5^{+gfp}组较 CYP 组小鼠 CD4$^+$ T 细胞共同上调差异基因聚类热图

Fig. 8 Cluster heat maps of genes co-upregulated in M5^{+gfp} group compared with the CK group and in CYP+M5^{+gfp} compared with the CYP group in mouse CD4$^+$ T cells

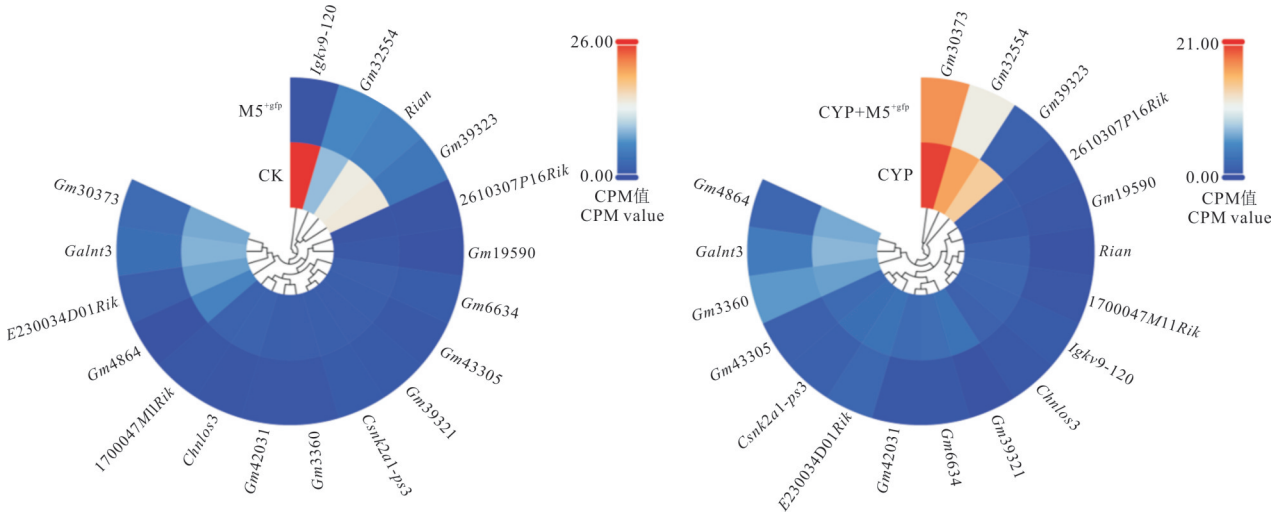


图 9 M5^{+gfp}组较 CK 组和 CYP+M5^{+gfp}组较 CYP 组小鼠 CD4$^+$ T 细胞共同下调差异基因聚类热图

Fig. 9 Cluster heat maps of genes co-downregulated in M5^{+gfp} group compared with the CK group and in CYP+M5^{+gfp} group compared with the CYP group in mouse CD4$^+$ T cells

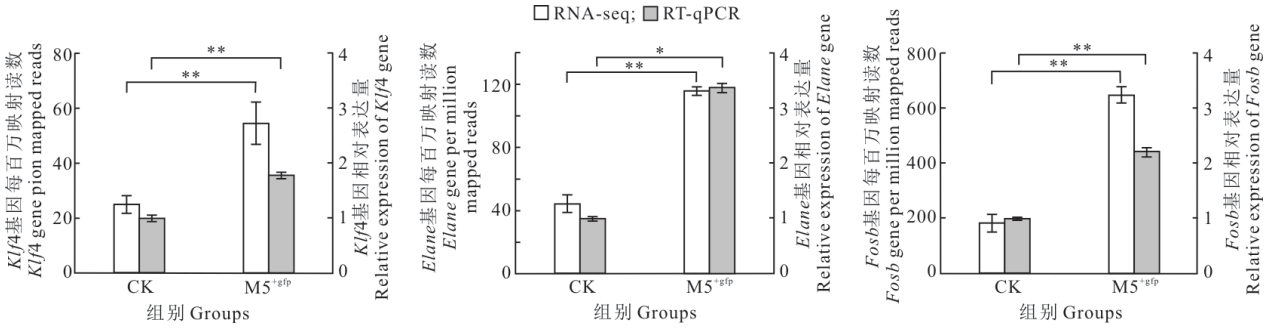


图 10　M5^{+gfp} 组较 CK 组差异表达基因转录组测序结果的 RT-qPCR 检验

Fig. 10　RT-qPCR verification of differentially expressed genes in the transcriptome sequencing results of M5^{+gfp} compared with the CK group

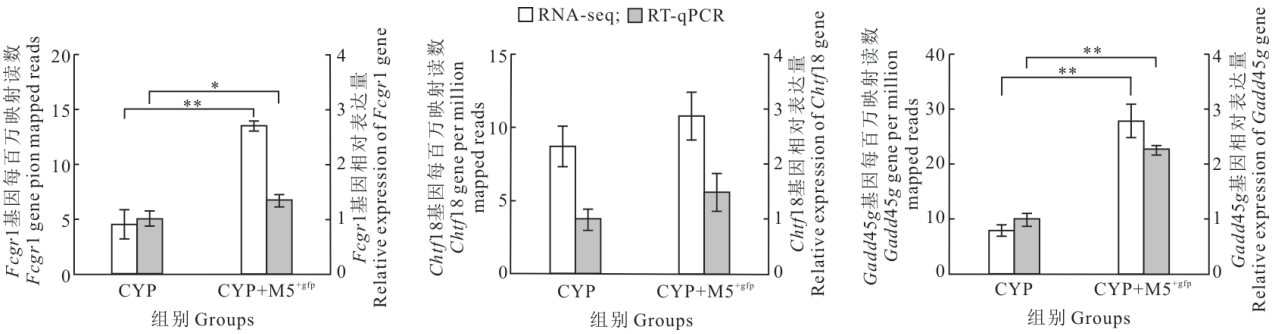


图 11　CYP＋M5^{+gfp} 组较 CYP 组差异表达基因转录组测序结果的 RT-qPCR 检验

Fig. 11　RT-qPCR verification of differentially expressed genes in the transcriptome sequencing results of CYP＋M5^{+gfp} compared with the CYP group

3　讨　论

本研究通过构建 CK、M5^{+gfp}、CYP 及 CYP＋M5^{+gfp} 4 组模型，探究布鲁氏菌感染对正常及免疫抑制小鼠 CD4⁺ T 细胞基因表达的影响。试验结果显示，M5^{+gfp} 和 CYP＋M5^{+gfp} 组小鼠脾相对质量显著或极显著增加，提示感染诱导脾炎症增生，免疫抑制加剧了此反应，与 GÓMEZ 等[14]的研究结果一致；脾载菌量 CYP＋M5^{+gfp} 组极显著高于 M5^{+gfp} 组（$P<0.01$），与 KALLEDA 等[15]研究得出的 CYP 通过抑制 CD4⁺ T 细胞功能削弱 Th1 型免疫，促进细菌增殖的结论相吻合；脾组织细菌 PCR 证实，感染菌株确为布菌 M5^{+gfp}[13]；M5^{+gfp} 和 CYP＋M5^{+gfp} 组小鼠脾组织结构受到损伤，其中 CYP＋M5^{+gfp} 组病变更重，表明免疫抑制加剧了脾组织损伤，此结果与 DENG 等[16]的研究结果吻合；感染 M5^{+gfp} 小鼠脾脏 IFN-γ 水平显著或极显著升高，表明布菌感染激活了 Th1 核心因子 IFN-γ，与 XU 等[17]的研究结果一致；半数溶血值（HC_{50}）在 M5^{+gfp} 及 CYP＋M5^{+gfp} 组中无显著变化，表明感染以细胞免疫主导。上述结果证实，模型构建成功。

M5^{+gfp} 组较 CK 组小鼠 CD4⁺ T 细胞差异表达基因 KEGG 富集分析结果显示，上调基因显著富集于抗原加工和呈递通路、NOD 样受体信号通路。抗原加工和呈递通路通过增强抗原呈递能力激活特异性免疫反应，从而增强机体清除病原体的能力[18]；NOD 样受体信号通路通过识别 PAMPs/DAMPs 模式分子而激活炎症反应和免疫防御应答[19]。M5^{+gfp} 组较 CK 组下调基因显著富集于自然杀伤细胞介导的细胞毒性通路，该通路抑制可导致 NK 细胞功能受损，削弱宿主对布菌的清除能力[20]。CYP＋M5^{+gfp} 较 CYP 组 CD4⁺ T 细胞差异表达基因 KEGG 富集分析结果显示，上调基因主要富集于细胞因子-细胞因子受体相互作用、中性粒细胞胞外陷阱形成通路和造血细胞谱系通路。细胞因子-细胞因子受体相互作用通路通过激活细胞因子网络而促进免疫细胞间协作，以增强免疫应答[21]；中性粒细胞胞外陷阱是中性粒细胞释放的网状结构，用于捕获和杀死病原体，该通路的显著上调表明机体中性粒细胞被激活，从而增强机体的抗感染免疫能力[22]；造血细胞谱系通路可激活造血系统，促进血细胞产生，从而强化免疫应答[23]。CYP＋M5^{+gfp} 较 CYP 组 CD4⁺ T 细胞下调基因显著富集于细胞因子-细胞因子受体相互作用通路，其信号失调可能意

味着免疫细胞之间的通讯受到干扰,导致免疫应答失调,在布菌侵袭过程中,这种失调可能导致机体对布菌的清除能力下降,增加感染的风险[24]。

本研究筛选出$M5^{+gfp}$组较CK组、CYP+$M5^{+gfp}$组较$M5^{+gfp}$组共有的182个差异基因,这些基因可能是$CD4^+$T细胞抗布菌感染的核心基因群。进一步筛选出56个稳定上调的基因,其中*Klf*1、*Trbv*17、*Gbp2b*、*Clca3a*1、*Trbv*19、*Serpina3f*表达量较高。*Klf*1是一种锌指蛋白转录因子,参与红细胞生成和心脏损伤修复,在布菌感染中,其可能通过调控炎症反应和免疫细胞分化来影响宿主的免疫应答,具体来说,*Klf*1可能通过促进Th1细胞中IFN-γ的表达来增强巨噬细胞的杀菌能力[25]。*Trbv*17、*Trbv*19可能参与抗原特异性T细胞应答,发挥重要的免疫保护作用[26]。*Gbp2b*编码产物是一种GTP酶,可能通过破坏布菌的吞噬小体膜结构来促进溶酶体融合,从而帮助宿主清除布菌[27]。*Clca3a*1介导的氯离子通道激活可能改变吞噬小体pH值,抑制布菌在细胞内生存[28]。*Serpina3f*编码产物是丝氨酸蛋白酶抑制剂,其可抑制组织蛋白酶G等炎性蛋白酶,减轻炎症损伤,维持组织完整性,从而有利于宿主对抗感染[29]。这些基因涉及抗原识别、抗菌作用及免疫调节,推测其构成$CD4^+$T细胞清除布菌的关键执行网络。

[参考文献]

[1] CASSATARO J, ESTEIN S M, PASQUEVICH K A, et al. Vaccination with the recombinant *Brucella* outer membrane protein 31 or a derived 27-amino-acid synthetic peptide elicits a $CD4^+$ T helper 1 response that protects against Brucella melitensis infection[J]. Infection and Immunity, 2005, 73(12): 8079-8088.

[2] 刘大虎,许春梅,梁瑞英,等. 犬布鲁氏菌多表位候选疫苗设计与免疫模拟预测[J]. 动物医学进展,2025,46(7):41-51.
LIU D H, XU C M, LIANG R Y, et al. Design and immunological simulation prediction of multi-epitope candidate vaccine for *Brucella canis*[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2025, 46(7): 41-51.

[3] BARRIONUEVO P, GIAMBARTOLOMEI G H. Inhibition of antigen presentation by Brucella: many more than many ways[J]. Microbes and Infection, 2019, 21(3/4): 136-142.

[4] MARTIROSYAN A, VON BARGEN K, ARCE GORVEL V, et al. *In vivo* identification and characterization of $CD4^+$ cytotoxic T cells induced by virulent Brucella abortus infection[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e82508.

[5] SWAIN S L, MCKINSTRY K K, STRUTT T M. Expanding roles for $CD4^+$ T cells in immunity to viruses[J]. Nature Reviews Immunology, 2012, 12(2): 136-148.

[6] WALDBURGER J M, MASTERNAK K, MUHLETHALER-MOTTET A, et al. Lessons from the bare lymphocyte syndrome: molecular mechanisms regulating MHC class Ⅱ expression[J]. Immunological Reviews, 2000, 178: 148-165.

[7] RUSHDI M N, PAN V, LI K T, et al. Cooperative binding of T cell receptor and CD4 to peptide-MHC enhances antigen sensitivity[J]. Nature Communications, 2022, 13: 7055.

[8] LIN Q, JIN S, WANG M J. CAR-T cell therapy based on a TCR mimic nanobody targeting an intracellular antigen for solid cancers[J]. Molecular Therapy Oncology, 2025, 33(1): 200948.

[9] MOMMEN G P M, MARINO F, MEIRING H D, et al. Sampling from the proteome to the human leukocyte antigen-DR (HLA-DR) ligandome proceeds via high specificity[J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2016, 15(4): 1412-1423.

[10] ALPDOGAN O, SCHMALTZ C, MURIGLAN S J, et al. Administration of interleukin-7 after allogeneic bone marrow transplantation improves immune reconstitution without aggravating graft-versus-host disease[J]. Blood, 2001, 98(7): 2256-2265.

[11] LI X W, ZHANG L, FENG Z X, et al. Expression of BTLA/HVEM axis in hematological and prospects for immune target therapy[J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2025, 41(1): 64-70.

[12] 李婷婷,刘子超,周永顺,等. 两种处理方法对小鼠骨髓源性树突状细胞体外递呈布鲁氏菌免疫多肽组分析的影响[J]. 中国畜牧兽医,2023,50(9):3730-3739.
LI T T, LIU Z C, ZHOU Y S, et al. Effects of two treatment on analysis of mouse dendritic cells for presentation of *Brucella abortus* immunopeptidome *in vitro*[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Nedicine, 2023, 50(9): 3730-3739.

[13] 胡梦薇,刘朋涛,严国,等. 两种布鲁氏菌弱毒株侵染小鼠巨噬细胞过程的荧光表征及分析[J]. 中国畜牧兽医,2016,43(8):1944-1950..
HU M W, LIU P T, YAN G, et al. The fluorescent characterization and analysis of two *Brucella* attenuated vaccine infecting mouse macrophagocyte[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2016, 43(8): 1944-1950.

[14] GÓMEZ L A, ALVAREZ F I, FERNÁNDEZ P A, et al. Immunogenicity and protective response induced by recombinant plasmids based on the BAB1_0267 and BAB1_0270 open reading frames of Brucella abortus 2308 in BALB/c mice[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2016, 6: 117.

[15] KALLEDA N, AMICH J, ARSLAN B, et al. Dynamic immune cell recruitment after murine pulmonary Aspergillus fumigatus infection under different immunosuppressive regimens[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1107.

[16] DENG X M, GUO J, SUN Z H, et al. Brucella-induced downregulation of lncRNA Gm28309 triggers macrophages inflammatory response through the miR-3068-5p/NF-κB pathway[J]. Frontiers in Immunology, 2020, 11: 581517.

[17] XU G, ZHANG P J, DANG R J, et al. Dynamic changes of

Th1 cytokines and the clinical significance of the IFN-γ/TNF-α ratio in acute brucellosis[J]. Mediators of Inflammation, 2019, 2019: 5869257.

[18] CERVANTES-SILVA M P, CARROLL R G, WILK M M, et al. The circadian clock influences T cell responses to vaccination by regulating dendritic cell antigen processing[J]. Nature Communications, 2022, 13: 7217.

[19] ZHENG C F. The emerging roles of NOD-like receptors in antiviral innate immune signaling pathways [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 169: 407-413.

[20] LI J R, TAO W Y, ZHOU W Y, et al. The comprehensive analysis of gut microbiome and spleen transcriptome revealed the immunomodulatory mechanism of *Dendrobium officinale* leaf polysaccharide on immunosuppressed mice [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 278: 134975.

[21] ZHENG X H, WU Y Q, BI J C, et al. The use of supercytokines, immunocytokines, engager cytokines, and other synthetic cytokines in immunotherapy[J]. Cellular & Molecular Immunology, 2022, 19(2): 192-209.

[22] ZHANG J H, LIU R Y, XU A T. Whole transcriptome sequencing analysis of blood plasma-derived exosomes from immune-related hearing loss[J]. International Immunopharmacology, 2023, 120: 110361.

[23] ZHANG H Y, LI H S, HILLMER E J, et al. Genetic rescue of lineage-balanced blood cell production reveals a crucial role for STAT3 antiinflammatory activity in hematopoiesis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(10): E2311-E2319.

[24] SUBUDDHI A, UOSEF A, ZOU D W, et al. Comparative transcriptome profile of mouse macrophages treated with the RhoA/Rock pathway inhibitors Y27632, Fingolimod (Gilenya), and Rezurock (Belumosudil, SLx-2119)[J]. International Immunopharmacology, 2023, 118: 110017.

[25] PIAO X Y, JIANG N, LIU S, et al. Schistosoma japonicum EKLF/KLF1 is a potential immune target to tackle schistosomiasis[J]. Parasites & Vectors, 2023, 16(1): 334.

[26] GRAS S, CHADDERTON J, DEL CAMPO C M, et al. Reversed T cell receptor docking on a major histocompatibility class Ⅰ complex limits involvement in the immune response [J]. Immunity, 2016, 45(4): 749-760.

[27] CLOUGH B, FINETHY R, KHAN R T, et al. C57BL/6 and 129 inbred mouse strains differ in Gbp2 and Gbp2b expression in response to inflammatory stimuli *in vivo* [J]. Wellcome Open Research, 2019, 4: 124.

[28] LEVERKOEHNE I, GRUBER A D. Assignment of the murine calcium-activated chloride channel genes Clca1 and Clca3 (alias gob-5) to chromosome 3 band H2-H3 using somatic cell hybrids[J]. Cytogenetics and Cell Genetics, 2000, 88(3/4): 208-209.

[29] DE MEZER M, MARKOWSKA A, MARKOWSKA J, et al. Immunohistochemical expression of the SERPINA3 protein in uterine fibroids [J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2024, 25(13): 1758-1765.

（责任编辑：马秋明）

（上接第 88 页）

[23] 朱晨灵，霍冰洋，李攻科. 功能化光子晶体表面增强拉曼光谱快速检测食品中黄曲霉毒素 B1[J]. 中国科学：化学，2024，54(9)：1607-1616.
ZHU C L, HUO B Y, LI G K. Rapid detection of aflatoxin B1 in food by surface-enhanced Raman spectroscopy of functionalized photonic crystals[J]. Scientia Sinica (Chimica), 2024, 54(9): 1607-1616.

[24] WU X M, GAO S M, WANG J S, et al. The surface-enhanced Raman spectra of aflatoxins: spectral analysis, density functional theory calculation, detection and differentiation[J]. The Analyst, 2012, 137(18): 4226-4234.

[25] 张成. 黄曲霉毒素 B1 和 B2 的太赫兹光谱检测与识别[D]. 北京：中央民族大学，2019.
ZHANG C. Detection and identification of aflatoxin B1 and B2 using terahertz spectroscopy[D]. Beijing: Minzu University of China, 2019.

[26] 廉飞宇，徐朝辉. 黄曲霉毒素 B1 溶液的太赫兹时域光谱分析[J]. 科学技术与工程，2014，14(6)：63-67.
LIAN F Y, XU Z H. Terahertz time-domain spectroscopy analysis for aflatoxin B1 solution[J]. Science Technology and Engineering, 2014, 14(6): 63-67.

[27] 赵鹏广. 基于太赫兹光谱的食用植物油 AFB_1 和氧化进程的快速检测[D]. 合肥：合肥工业大学，2020.
ZHAO P G. Rapid detection of AFB_1 and oxidation process of edible vegetable oil based on terahertz spectroscopy[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2020.

[28] 秦建平. 玉米中黄曲霉毒素的太赫兹光谱检测技术研究[D]. 郑州：河南工业大学，2013.
QIN J P. The terahertz terhertz spectroscopy detection technology research on corn of aflatoxins[D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2013.

[29] 李利龙，吴磊，向洋，等. 黄曲霉毒素的太赫兹检测研究[J]. 光学与光电技术，2014，12(1)：72-74.
LI L L, WU L, XIANG Y, et al. Terahertz time-domain spectroscopy of aflatoxin[J]. Optics & Optoelectronic Technology, 2014, 12(1): 72-74.

[30] 杨承霖，刘嘉祺，郭芸成，等. 结合太赫兹光谱与机器学习的小麦霉变程度判别[J]. 食品科学，2023，44(12)：343-350.
YANG C L, LIU J Q, GUO Y C, et al. Detection of mildew degree of wheat using terahertz spectroscopy and machine learning[J]. Food Science, 2023, 44(12): 343-350.

（责任编辑：温晓平）