

结核分枝杆菌 Rv2941 蛋白抗原表位集中区免疫原性研究

范雪亭¹, 栾秀丽¹, 赵秀芹¹, 李马超¹, 万康林¹, 卢选成², 李晓燕², 刘海灿¹

摘要:目的 分析结核分枝杆菌 Rv2941 抗原的 T 细胞表位集中区的免疫原性, 探究其作为结核病疫苗候选抗原的潜力。方法 通过免疫表位数据库(Immune Epitope Database, IEDB)分析 Rv2941 抗原的 T 细胞表位区(命名为 Rv2941p)并构建表达载体 PET32a-Rv2941p, 诱导表达并纯化 Rv2941p。将其与免疫佐剂二甲基三六烷基铵(DDA)和 PolyI:C 乳化后, 皮下免疫 BALB/c 小鼠 3 次, 每次免疫间隔 10 d, 末次免疫 1 周后处死小鼠, 进行免疫效果评价。采用 ELISA 法检测免疫后小鼠血清中 IgG、IgG1 和 IgG2a 抗体滴度以及免疫后小鼠脾脏淋巴细胞分泌 IL-4、IL-2、IL-6 和 IFN- γ 的水平。同时, 利用流式细胞技术检测淋巴细胞内 CD4⁺T、CD8⁺T 细胞增殖情况以及胞内细胞因子(IFN- γ 、TNF- α 和 IL-4)表达水平。**结果** Rv2941p 可溶性表达, 并获得高纯度的蛋白。Rv2941p 诱导产生了高水平的特异性抗体 IgG, 与对照组相比, 差异有统计学意义($P < 0.001$)。另外, Rv2941p 提高了 IgG2a/IgG1 的比值。细胞因子检测结果显示, Rv2941p 提高了 IFN- γ 和 IL-6 的分泌, 与 Ag85B 组比较, 差异有统计学意义($P < 0.001$)。同时, Rv2941p 可以促进 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的增殖分化, 以及提高胞内 IFN- γ 和 TNF- α 的表达。**结论** Rv2941p 可以刺激小鼠产生较高的体液和细胞免疫, 尤其 Th-1 类细胞免疫, 可以作为结核病疫苗候选抗原, 为结核病新型疫苗的开发奠定了基础。

关键词: 结核分枝杆菌; Rv2941; T 细胞表位; 结核病疫苗

中图分类号: R378.91

文献标识码: A

文章编号: 1002-2694(2022)05-0394-06

Evaluation on the immunogenicity of the antigen epitopes concentrated areas of Rv2941 protein from *Mycobacterium tuberculosis*

FAN Xue-ting¹, LUAN Xiu-li¹, ZHAO Xiu-qin¹, LI Ma-chao¹, WAN Kang-lin¹,
LU Xuan-cheng², LI Xiao-yan², LIU Hai-can¹

(1. State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control,

National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China;

2. Laboratory Animal Center, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

Abstract: To analyze the immunogenicity of the antigen epitopes concentrated areas of Rv2941 protein from *Mycobacterium tuberculosis*, and investigate its potential candidate antigen for tuberculosis vaccine. T cell epitopes of Rv2941 antigen was analyzed by Immune Epitope Database (IEDB). The antigen epitopes concentrated areas (649-1 017 bp, named Rv2941p) of Rv2941 gene was inserted into pET32a vector, then expressed in *Escherichia coli* (*E. coli*) (DE3) BL21 cells. Prokaryotic expression showed that this protein was mainly in the form of soluble form, BALB/c mice were immunized subcutaneously in triplicate over a 10-day interval. One week after the last immunization, the samples were collected to assess the immunogenicity.

Rv2941p elicited significantly higher antigen-specific immunoglobulin G (IgG) than control groups ($P < 0.001$), indicating that Rv2941p enhanced antibody response. To evaluate the cell mediated immune response, the cytokines (e.g., IL-4, IL-2, IL-6 and IFN- γ) were detected by ELISA. These results showed that Rv2941p significantly improved the level of IFN- γ and IL-6 compared with Ag85B ($P < 0.001$). Meanwhile, the results of IgG subclass shown that Rv2941p could improve the ratio of IgG2a/IgG1. And the percentage of splenic CD4⁺ T and CD8⁺ T cells

“十三五”传染病重大专项(No. 2018ZX10731301-002)

通讯作者: 刘海灿, Email: liuhaican@icdc.cn;

ORCID: 0000-0002-9420-1211

李晓燕, Email: lixy@chinaacdc.cn;

ORCID: 0000-0002-4402-1861

作者单位: 1. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 传染病预防控制国家重点实验室, 北京 102206;

2. 中国疾病预防控制中心实验动物中心, 北京 102206

were measured by flow cytometry. In addition, the intracellular cytokines (e.g., IFN- γ , TNF- α and IL-4) were detected by flow cytometry. We found that Rv2941p enhanced intracellular expression of IFN- γ and TNF- α cytokines, and promoted CD4⁺ T cell and CD8⁺ T cell proliferation. Further this study provided evidence that the T cell epitopes of Rv2941 promoted stronger cell-mediated immune response, and skewed to Th-1 type cellular immune response. In conclusion, the T cell epitope of Rv2941 could promote humoral and cell-mediated immune responses, which supports it as a promising antigen for TB vaccines.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; Rv2941; antigen epitope concentrated areas; tuberculosis vaccine

Supported by the Major Projects of the Thirteenth Five-Year Plan Special for Infectious Diseases (No. 2018ZX10731301-002)

Corresponding authors: Liu Hai-can, Email: liuhaican@icdc.cn; Li Xiao-yan, Email: lixy@chinaicdc.cn

结核病(Tuberculosis, TB)是由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)引起的一种人兽共患病。它仍然是世界上传染病中致命的主要原因之一,对人类健康造成巨大威胁^[1-2]。据估计,全世界约 1/4 的人感染过结核,每年约 150 万人死于结核病^[3]。随着耐药结核菌感染以及 HIV 合并感染的出现,使得结核病的防治面临更加严峻的挑战。

目前,预防和控制传染病最有效的方法是有效疫苗的预防接种。卡介苗(Bacillus Calmette Guérin, BCG)仍然是唯一批准用于人预防结核病的疫苗。有研究结果显示,接种 BCG 可以有效预防儿童结核病,同时也可以为麻风病患者提供结核病保护^[4-5]。BCG 的保护效果可以持续 5~10 年,可能更长。但是,BCG 对于预防成人结核分枝杆菌的感染以及结核病复发的效果具有较大差异,从 0~80% 不等^[6-8],以致认为无保护效果。因此,新型结核病疫苗及其免疫策略的研发变得十分迫切。国内外大量的研究者致力于寻找更为有效的结核病疫苗,主要包括以下几种类型:①活菌疫苗,主要有重组 BCG 和结核分枝杆菌减毒活疫苗;②亚单位疫苗,主要有病毒载体疫苗、蛋白疫苗等;③灭活疫苗等。

Rv2941 又名 fadD28,属于结核分枝杆菌脂肪酰基 AMP 连接酶(fatty-acyl AMP ligase, FAAL)家族蛋白,与结核分枝杆菌毒力相关^[9]。目前,国内外关于该抗原的研究较少,对其生物学功能了解较少。本研究将 Rv2941 的 T 细胞表位集中区(命名为 Rv2941p)在大肠杆菌中表达,同时与佐剂 PolyI:C 和 DDA 混合免疫 BALB/c 小鼠,评价其免疫原性,旨在为筛选新型结核病疫苗优势候选抗原提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒 本实验中所用的大肠杆菌菌株 DH5 α 和 BL21(DE3)感受态购买自北京金生物技术有限公司,所用载体 pET32a 由本实验室

保存。

1.2 实验动物 本实验所用动物为 6~8 周龄 SPF 级 BALB/c 购买自斯贝福(北京)生物技术有限公司。所有动物实验均在中国疾病预防控制中心实验动物中心完成。

1.3 培养基及主要试剂 大肠杆菌使用 LB 培养基(1%胰蛋白胨,0.5%酵母提取物,1%氯化钠,固体培养基中添加 1.5%~2%琼脂粉)培养。蛋白纯化所用 Ni-NTA 填料购买自 GE Healthcare 公司;HRP 标记的羊抗鼠二抗(IgG、IgG1、IgG2a)购买自 Biotech 公司;淋巴细胞分离液购买自达科为生物技术有限公司;蛋白转运抑制剂(GolgiPlugTM Brefeldin A)、FITC 标记的抗 CD3 抗体、BV421 标记的抗 CD4 抗体、APC-Cy7 标记的抗 CD8 抗体、PE-CF594 标记的抗 IL-4 抗体、PE-Cy7 标记的抗 IFN- γ 抗体以及 BV650 标记的抗 TNF- α 抗体均购自 BD 公司;免疫佐剂 DDA 和 PolyI:C 购买自 Sigma 公司。

1.4 重组质粒的构建 利用 IEDB 检索结核分枝杆菌 Rv2941(NCBI Gene ID:887454)基因 T 细胞表位集中区,选取表位集中区用于后续实验。该段基因由生工生物合成连接至 pET32a 载体,命名为 pET32a-2941p,用于后续实验。

1.5 重组蛋白的表达与纯化 将构建成功的重组质粒 pET32a-2941p 转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中。挑取单克隆于含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37℃ 培养过夜后,按照 1:1 000 的比例转接至 300 mL 培养基中,当培养液 OD 值到达 0.6~0.8 时,加入终浓度为 0.1 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG),37℃ 震荡培养 4 h。

将培养后菌液 4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体。将菌体用普通裂解液(10 mmol/L pH8.0 Tris-HCl,10% TritonX-100)重悬后,超声破碎 10 min 后 12 000 r/min 离心 10 min。离心后上清用 Ni 亲和层析纯化,具体操作如下:上清中加入终浓度为

500 mmol/L 的 NaCl 后上样于处理后的 Chelating Sepharose Fast Flow 层析介质中,待上样完成后分别用含有 30 mmol/L、60 mmol/L 以及 300 mmol/L 咪唑的平衡液洗脱,洗脱液用 SDS-PAGE 电泳分析。将纯化后的抗原利用 BCA 法检测蛋白质浓度, -20 °C 保存备用。

1.6 动物免疫及抗体检测 实验选用 SPF 级 6~8 周龄的 BALB/c 雌性小鼠,随机将 20 只小鼠分成 4 组,每组 5 只小鼠,分别为 PBS 对照组、单独佐剂组、Rv2941p 混合佐剂组以及阳性对照组 (Ag85B 混合佐剂),具体分组见表 1。本研究选用 DDA 以及 PolyI:C 作为免疫佐剂,使用方法为抗原与佐剂按照体积 1:1 混匀后乳化,经皮下多点免疫方式免疫 3 次,间隔周期为 10 d。

表 1 小鼠免疫实验设计

Tab.1 Experimental design of mice immunization

组别	佐剂	抗原	免疫剂量
A	—	PBS	100 μ L
B	DDA/poly(I:C)	—	100 μ L
C	DDA/poly(I:C)	Rv2941p	100 μ L(含 100 μ g 抗原)
D	DDA/poly(I:C)	Ag85B	100 μ L(含 100 μ g 抗原)

注:“—”表示不加入该物质。

在每次免疫前以及最后一次免疫后 1 周通过眼眶采血,将收集的血液在 37 °C 静置 2 h,4 000 r/min 离心 10 min,收集血清,放于 -20 °C 保存。利用 ELISA 法检测血清中抗原特异性 IgG 抗体以及 IgG 亚型抗体滴度。

1.7 ELISA 法检测淋巴细胞细胞因子分泌水平 末次免疫后 1 周处死小鼠,取脾脏按照达科为淋巴细胞分离液说明书分离淋巴细胞,然后测定淋巴细

胞浓度,将部分细胞浓度调整至 2×10^5 个细胞/mL,置于 24 孔板中,每孔 500 μ L,加入刺激抗原,在 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 48 h,收集细胞培养上清用于细胞因子检测。ELISA 法测定细胞因子使用 BD 公司生产小鼠细胞因子检测试剂盒,检测方法按照说明书进行。本研究主要检测 IFN- γ 、IL-2、IL-4 和 IL-6。

1.8 流式细胞仪分析小鼠 CD4⁺T、CD8⁺T 细胞增殖及胞内细胞因子表达 将分离淋巴细胞调整浓度至 $2 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 个细胞/mL,置于 96 孔板中,每孔 100 μ L 细胞,加入蛋白转运抑制剂以及刺激抗原,在 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 12 h 后收集培养细胞。用 50 μ L Staining Buffer 重悬细胞,然后加入 7-ADD、CD3、CD4 以及 CD8 抗体,4 °C 孵育 30 min,用 Staining Buffer 清洗细胞 2 次。然后利用 BD 公司的固定破膜试剂盒将细胞进行破膜,破膜后加入 IFN- γ 、IL-4 以及 TNF- α 抗体,4 °C 孵育 30 min,然后 Perm/WashTM buffer 清洗两次,用 50 μ L Staining Buffer 重悬细胞后加入 250 μ L 4% 多聚甲醛溶液,上流式细胞仪检测。

1.9 统计学分析 采用 GraphPad Prim 5.0 中的 Tukey 的多重比较检验进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Rv2941 基因 T 表位预测结果 利用 IEDB 数据库分析后,结果如图 1。根据分析结果显示,Rv2941 的氨基酸第 220 位至第 340 位存在 7 个表位区(F004-F010),占总表位数目的 50%,同时考虑表位结构的完整性,因此,选择核苷酸第 649~1 017 bp 即氨基酸第 216 位至第 339 位用于后续重组表达载体构建。

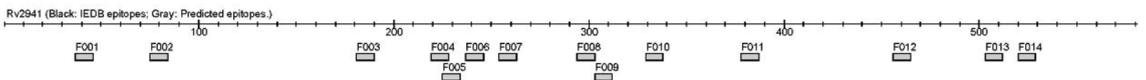
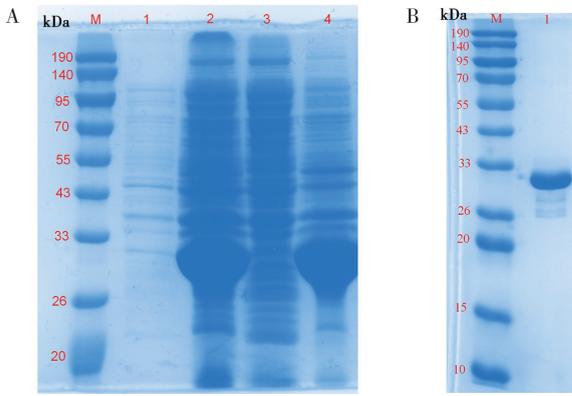


图 1 Rv2941 基因 T 表位预测结果

Fig.1 T cell epitopes prediction of Rv2941

2.2 重组蛋白的表达与纯化 重组质粒 pET32a-2941p 由生工生物(上海)合成后,将质粒交由北京擎科生物科技有限公司测序,测序结果比对正确,用于后续实验。在 0.1 mmol/L IPTG,37 °C 诱导 4 h 后收集菌体,超声破碎离心,SDS-PAGE 电泳结果显示在超声上清样品 34 kDa 处有明显的表达带,与

目的蛋白大小一致,即该抗原在大肠杆菌表达系统中呈可溶性表达(图 2A)。利用 His 亲和层析纯化处理的超声上清,电泳结果发现目的蛋白主要存在于 300 mmol/L 咪唑洗脱液中,纯化后的目的蛋白纯度达 98.89%(图 2B),将蛋白分装于 -20 °C 保存以用于后续实验。



A: Rv2941p 小量表达(M:蛋白标准分子质量;1:阴性对照;2:全菌;3:沉淀;4:上清);B:纯化后蛋白(M:蛋白标准分子质量;1:洗脱目的蛋白)

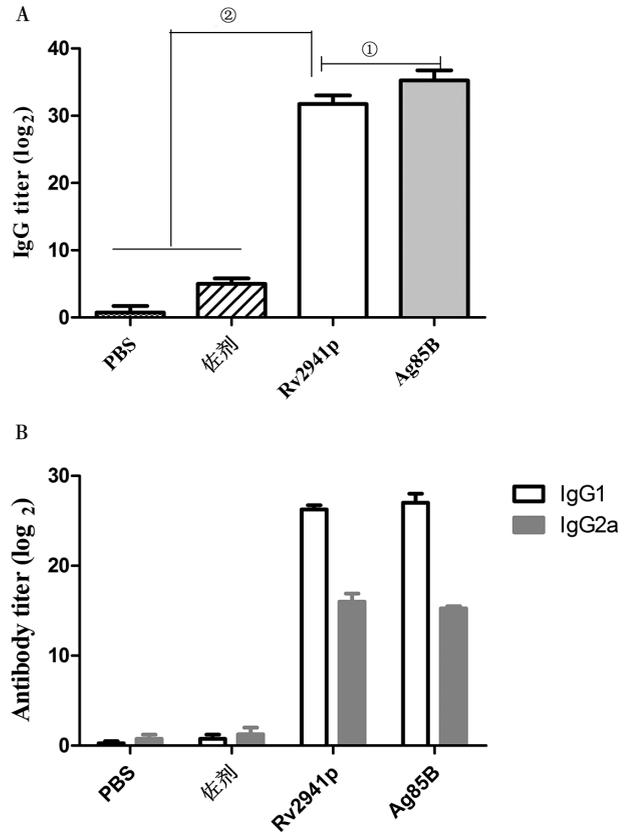
图 2 Rv2941p 蛋白表达纯化

Fig.2 Expression and purification of Rv2941p

2.3 小鼠体内特异性抗体检测 BALB/c 小鼠第 3 次免疫后 1 周,利用 ELISA 法检测血清中特异性 IgG 抗体滴度。结果显示 Rv2941p 联合佐剂使用后与单独佐剂组以及 PBS 组间的差异有统计学意义($P < 0.001$),即该蛋白作为抗原免疫小鼠,能产生高滴度的特异性抗体(图 3A)。然而,与 Ag85B 组相比, Rv2941p 免疫小鼠产生的特异性抗体滴度较低,两者间的差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.4 Rv2941p 促进 IgG2a 抗体分化 处死前小鼠血清检测 IgG1 和 IgG2a 抗体滴度,结果显示 Rv2941p 和 Ag85B 都提高了 IgG2a/IgG1 比值,且 Rv2941p 比 Ag85B 高(图 3B)。

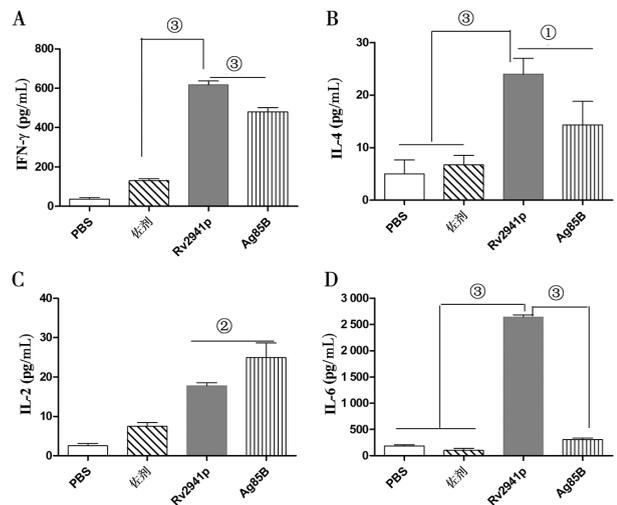
2.5 Rv2941p 诱导的细胞免疫反应类型 为进一步评估 Rv2941p 作为疫苗候选抗原诱导的细胞免疫反应类型,本研究利用 ELISA 法检测免疫 48 h 后小鼠脾脏淋巴细胞分泌 IFN- γ 、IL-4、IL-2 以及 IL-6 的水平。结果显示,与佐剂组相比, Rv2941p 显著提高了 IFN- γ 的分泌,高达 620 pg/mL,且差异具有统计学意义($F = 5.193, P < 0.001$)。同时比 Ag85B 组(480 pg/mL)也显著提高($F = 1.152, P < 0.001$) (图 4A)。此外,与其他各组相比,免疫 Rv2941p 后显著提高了 IL-6 细胞因子的分泌,高达 2 600 pg/mL,是 Ag85B 的 10 倍($F = 2.408, P < 0.001$) (图 4D)。而 IL-2 和 IL-4 各组分泌都较低(图 4B 和 4C)。同时,本研究利用流式细胞技术检测淋巴细胞内 IFN- γ 、IL-4 和 TNF- α 的分泌水平。与其他组相比,免疫 Rv2941p 后 T 细胞内 IFN- γ 的表达明显提高($F = 1.377, P < 0.05$) (图 5B)。免疫 Ag85B 和 Rv2941p 后,都提高了 T 细胞内 TNF- α 的表达,且两组的表达水平几乎一致(图 5B)。显示



A: IgG 抗体滴度;B: IgG 亚型抗体滴度;①: $P < 0.01$; ②: $P < 0.001$

图 3 体液免疫反应

Fig.3 Humoral response



A: IFN- γ 分泌水平;B: IL-4 分泌水平;C: IL-2 分泌水平;D: IL-6 分泌水平;①: $P < 0.05$; ②: $P < 0.01$; ③: $P < 0.001$

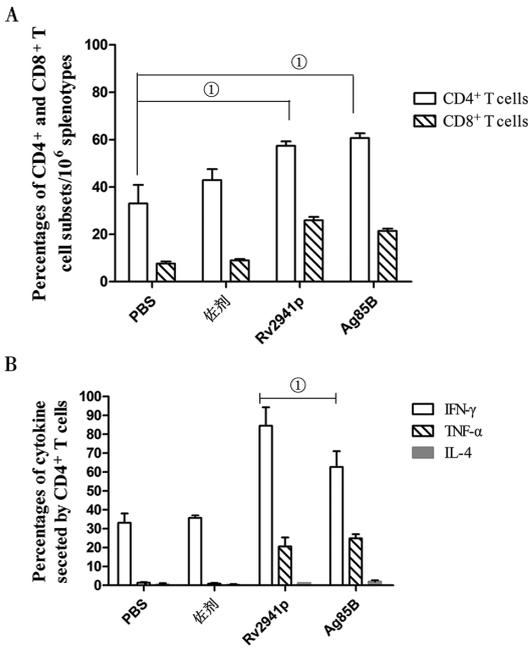
图 4 小鼠脾脏 T 淋巴细胞中细胞因子分泌水平

Fig.4 Representative cytokine production in mouse spleen T cells after immunization

Rv2941p 诱导更强的 Th-1 类免疫反应。

2.6 Rv2941p 促进 T 淋巴细胞增殖 流式细胞技

术分析免疫后小鼠脾脏 T 淋巴细胞内 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞增殖分化情况。结果显示, Rv2941p 和 Ag85B 都提高了 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞的比例(图 5A)。Rv2941p 中 CD4⁺ T 细胞比例比 Ag85B 中略低, 而 CD8⁺ T 细胞则比较高。



①: $P < 0.05$

图 5 T 细胞增殖(A)及胞内细胞因子(B)表达情况

Fig. 5 Proliferation and cytokine profiles of T cells after immunization

3 讨论

尽管目前广泛采用了标准药物治疗方案, 现代诊断方法和疫苗(卡介苗), 但是全球结核病的流行仍未得到充分的控制, 因此, 研发新型安全有效的结核病疫苗迫在眉睫。而不管是亚单位疫苗还是重组 BCG 疫苗, 筛选有效的抗原尤为关键。据研究报告, 迄今为止, 只有 7% 的结核分枝杆菌抗原能够激活 T 细胞反应^[10]。因此, 在剩余的结核分枝杆菌抗原中筛选更多的免疫显性 T 细胞表位至关重要。Rv2941 是一种参与调控 Mtb 细胞壁脂质形成的基因, 而这种脂质在致病 Mtb 逃避宿主的防御能力发挥重要作用^[11], 但是对于该抗原的免疫原性未见报道, 关于其 T 细胞表位区更是鲜有报道。因此, 我们利用免疫表位数据库 (IEDB, <https://www.iedb.org/>) 分析抗原 Rv2941 的 T 细胞表位区, 根据分析结果选择位于第 649~1 017 bp 的 T 细胞表位集中区进行免疫原性分析。

结核分枝杆菌是一种胞内寄生菌, 寄生在特殊

的囊泡和结核分枝杆菌吞噬体, 因此, T 细胞免疫对结核免疫至关重要, 尤其是 Th-1 类免疫反应^[12]。IgG1 和 IgG2a 分别是代表 Th-2 和 Th-1 型反应的重要生物标志物^[13]。本研究发现 Rv2941p 可以促进 IgG2a 的分化, 提高 IgG2a/IgG1 的比值, 这一结果表明 Rv2941p 倾向于刺激机体 Th-1 类免疫反应。此外, 本研究中还检测了 Th-1 类细胞因子 IFN- γ 和 IL-2, 结果显示免疫 Rv2941p 后, 小鼠脾脏淋巴细胞 IFN- γ 和 IL-2 的分泌显著提高, 尤其是 IFN- γ , 这一数据也表明 Rv2941p 可以刺激机体产生较强的 Th-1 类免疫反应。

在结核分枝杆菌感染中, IL-6 是激活分泌 IFN- γ 的 T 细胞的关键, 同时是一种主要的诱导保护性 T 细胞的分子, 加强 IFN- γ 的作用^[14]。本研究证实 Rv2941p 可以明显促进 T 淋巴细胞分泌 IL-6 细胞因子, 高达 2 600 pg/mL (图 4D), 这一结果为 Rv2941p 可以作为结核病新型疫苗候选抗原提供依据。

在小鼠感染模型研究中证实 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞在抗结核免疫中发挥关键作用。CD4⁺ T 细胞可以与感染 Mtb 的巨噬细胞相互作用, 通过分泌细胞因子(如 IFN- γ 等)限制结核分枝杆菌在细胞内的复制。同时, CD8⁺ T 细胞分泌穿孔素裂解 Mtb 感染的巨噬细胞和直接杀死细胞内 Mtb^[15]。本研究发现, Rv2941 的 T 细胞表位区(Rv2941p)显著提高了 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的增殖分化(图 5A)。另外, 有研究证实, IFN- γ 、TNF- α 、IL-12 以及 IL-17 的表达是对抗结核的保护性免疫的重要指标, 特别是对高毒性结核分枝杆菌谱系^[16]。本研究利用流式细胞技术发现淋巴细胞胞内 CD4⁺ T 细胞内 IFN- γ 和 TNF- α 的表达水平较高(图 5B), IFN- γ 和 TNF- α 属于 Th-1 类细胞因子, 这一结果表明 Rv2941p 可以加强 CD4⁺ Th-1 类免疫反应。同时, 从人类疾病和实验小鼠模型中可以明显看出, 结核分枝杆菌特异性 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞产生的 IFN- γ 和 TNF- α 都是控制结核分枝杆菌感染的基础^[17]。这些结果都提示 Rv2941p 的 T 细胞表位区可能是潜在结核病疫苗抗原。

B 细胞在介导结核病疫苗效力方面的作用也在逐渐凸显, 但是尚未完全了解其具体功能。在动物模型和人类感染的相关研究已经提供了明确的证据, 即增殖的抗原特异性 B 细胞定殖于保护性肉芽肿内, 这些肉芽肿是高度特殊化的空间结构, 可以控制 Mtb 的进一步感染^[18]。因此, 除了 T 细胞外, B 细胞有可能也参与疫苗诱导有效的抗结核病免疫反

应的产生。本研究也证实 Rv2941p 可以刺激机体产生较强的 IgG 抗体,这一结果表明它可以刺激机体产生较强的体液免疫反应。

综上所述,本研究发现 Rv2941 的 T 细胞表位区核苷酸第 649~1 017 bp 具有较强的免疫原性,可以刺激机体产生较强的 Th-1 类免疫反应,可以作为结核病新型疫苗的候选抗原之一。

利益冲突:无

引用本文格式:范雪亭,栾秀丽,赵秀芹,等. 结核分枝杆菌 Rv2941 蛋白抗原表位集中区免疫原性研究[J]. 中国人兽共患病学报,2022,38(5):394-399. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2022.00.061

参考文献:

- [1] Karbalaee Zadeh Babaki M, Soleimanpour S, Rezaee SA. Antigen 85 complex as a powerful *Mycobacterium tuberculosis* immunogene: Biology, immune-pathogenicity, applications in diagnosis, and vaccine design [J]. *Microb Pathog*, 2017, 112: 20-29. DOI:10.1016/j.micpath.2017.08.040
- [2] Steingart KR, Ng V, Henry M, et al. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review [J]. *Lancet Infect Dis*, 2006, 6(10): 664-674. DOI:10.1016/S1473-3099(06)70602-8
- [3] Houben RM, Dodd PJ. The global burden of latent tuberculosis infection; a re-estimation using mathematical modelling [J]. *PLoS Med*, 2016, 13(10): e1002152. DOI:10.1371/journal.pmed.1002152
- [4] Fine PE. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity [J]. *Lancet*, 1995, 346(8986): 1339-1345. DOI:10.1016/s0140-6736(95)92348-9
- [5] Lin MY, Geluk A, Smith SG, et al. Lack of immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* DosR regulon proteins following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination [J]. *Infect Immun*, 2007, 75(7): 3523-3530. DOI:10.1128/IAI.01999-06
- [6] Aronson NE, Santosham M, Comstock GW, et al. Long-term efficacy of BCG vaccine in American Indians and Alaska Natives: a 60-year follow-up study [J]. *JAMA*, 2004, 291(17): 2086-2091. DOI:10.1001/jama.291.17.2086
- [7] Levillain F, Kim H, Woong Kwon K, et al. Preclinical assessment of a new live attenuated *Mycobacterium tuberculosis* Beijing-based vaccine for tuberculosis [J]. *Vaccine*, 2020, 38(6): 1416-1423. DOI:10.1016/j.vaccine.2019.11.085
- [8] Nguipodop-Djomo P, Heldal E, Rodrigues LC, et al. Duration of BCG protection against tuberculosis and change in effectiveness with time since vaccination in Norway: a retrospective population-based cohort study [J]. *Lancet Infect Dis*, 2016, 16(2): 219-226. DOI:10.1016/S1473-3099(15)00400-4
- [9] Goyal A, Yousuf M, Rajakumara E, et al. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of the N-terminal domain of FadD28, a fatty-acyl AMP ligase from *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2006, 62(Pt4): 350-352. DOI:10.1107/S1744309106005938
- [10] Madan R, Pandit K, Bhati L, et al. Mining the *Mycobacterium tuberculosis* proteome for identification of potential T-cell epitope based vaccine candidates [J]. *Microb Pathog*, 2021, 157: 104996. DOI:10.1016/j.micpath.2021.104996
- [11] Sirakova TD, Fitzmaurice AM, Kolattukudy P. Regulation of expression of mas and fadD28, two genes involved in production of dimycocerosyl phthiocerol, a virulence factor of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Bacteriol*, 2002, 184(24): 6796-6802. DOI:10.1128/JB.184.24.6796-6802.2002
- [12] Lindestam Arlehamn CS, Lewinsohn D, Sette A, et al. Antigens for CD4 and CD8 T cells in tuberculosis [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2014, 4(7): a018465. DOI:10.1101/cshperspect.a018465
- [13] Orr MT, Duthie MS, Windish HP, et al. MyD88 and TRIF synergistic interaction is required for TH1-cell polarization with a synthetic TLR4 agonist adjuvant [J]. *Eur J Immunol*, 2013, 43(9): 2398-2408. DOI:10.1002/eji.201243124
- [14] Leal IS, Smedegard B, Andersen P, et al. Interleukin-6 and interleukin-12 participate in induction of a type 1 protective T-cell response during vaccination with a tuberculosis subunit vaccine [J]. *Infect Immun*, 1999, 67(11): 5747-5754. DOI:10.1128/IAI.67.11.5747-5754.1999
- [15] Sia JK, Rengarajan J. Immunology of *Mycobacterium tuberculosis* infections [J]. *Microbiol Spectr*, 2019, 7(4): GPP3-0022-2018. DOI:10.1128/microbiolspec.GPP3-0022-2018
- [16] Portevin D, Gagneux S, Comas I, et al. Human macrophage responses to clinical isolates from the *Mycobacterium tuberculosis* complex discriminate between ancient and modern lineages [J]. *PLoS Pathog*, 2011, 7(3): e1001307. DOI:10.1371/journal.ppat.1001307
- [17] Li J, Jin C, Wu C, et al. PD-1 modulating *Mycobacterium tuberculosis*-specific polarized effector memory T cells response in tuberculosis pleurisy [J]. *J Leukoc Biol*, 2019, 106(3): 733-747. DOI:10.1002/JLB.MA1118-450RR
- [18] Slight SR, Rangel-Moreno J, Gopal R, et al. CXCR5⁺ T helper cells mediate protective immunity against tuberculosis [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(2): 712-726. DOI:10.1172/JCI65728

收稿日期:2022-03-07 编辑:梁小洁