

- with coronary spastic angina[J]. J Hum Genet, 2010, 55(1): 42-49.
- [21] Takefujii M, Asano H, Mori K, et al. Mutation of ARHGAP9 in patients with coronary spastic angina[J]. J Hum Genet, 2010, 55(1): 42-49.
- [22] Kumar P, Luthra K, Kwivedi M, et al. Apolipoprotein E genepolymorphisms in patients with premature myocardial infarction: a case-controlled study in Asian Indians in North India[J]. Ann Clin Bio chem, 2003, 40(1): 382-386.
- [23] Shin MH, Kim HN, Cui LH, et al. The Effect of Apolipoprotein E Polymorphism on Lipid Levels in Korean Adults[J]. Korean Med Sci, 2005, 20: 361-366.
- [24] Socquard E, Durlach A, Clavel C, et al. Association of Hind III and PvuII genetic polymorphisms of lipoprotein lipase with lipid metabolism and macrovascular events in type 2 diabetic patients[J]. Diabetes Metab, 2006, 32(3): 262-269.
- [25] Kawasaki I, Tahara H, Emoto M, et al. Relationship between TaqIB cholesteryl ester transfer protein gene polymorphism and macrovascular complications in Japanese patients with type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2002, 51(3): 871-874.
- [26] de Maat MP, Kastelein JJ, Jukema J, et al. -455G/A polymorphism of the beta-fibrinogen gene is associated with the progression of coronary atherosclerosis in symptomatic men; proposed role for an acute-phase reaction pattern of fibrinogen. REGRESS group[J]. Thrombosis and Vascular Biology, 1998, 18(7): 265-271.
- [27] Lam KS, Ma OC, Wat NM, et al. Beta fibrinogen gene G/A-455 polymorphism in relation to fibrinogen concentrations and ischaemic heart disease in Chinese patients with type II diabetes[J]. Diabetologia, 1999, 42(10): 1250-1253.
- [28] Yamashina M, Kaneko Y, Maesawa C, et al. Association of TNF-alpha gene promoter C-857T polymorphism with higher serum LDL cholesterol levels and carotid plaque formation in Japanese patients with type 2 diabetes[J]. Tohoku J Exp Med, 2007, 211(3): 251-258.
- [29] Vendrell J, Real JM, Gutierrez C, et al. A polymorphism in the promoter of the tumor necrosis factor-lpha gene(-308) is associated with coronary heart disease in type 2 diabetic patients[J]. Atherosclerosis, 2003, 167(2): 257-264.
- [30] 康维强, 李梅, 宋达琳, 等. 白介素-8 基因与早期糖尿病大血管并发症的关系[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 127(11): 961-963.
- [31] Hao Q, Wang L, Tang H. Vascular endothelial growth factor induces protein kinase D-dependent production of proinflammatory cytokines in endothelial cells[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2009, 296(4): C821-827.
- [32] 王海珍. 血管内皮生长因子与 2 型糖尿病大血管病变的关系[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2007, 10(12): 1381-1382.
- [33] Kronenberg F. Genome-wide association studies in aging-related processes such as diabetes mellitus, atherosclerosis and cancer [J]. Exp Gerontol, 2008, 43(1): 39-43.
- [34] Ruth FS, Charles F, Sing RS. Subsets of SNPs define rare genotype classes that predict ischemic heart disease[J]. Hum Genet, 2007, 120(6): 865-877.
- [35] Stephens M, Donnelly P. A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data[J]. Am J Hum Genet, 2003, 73(6): 1162-1169.
- [36] 仪军玲, 李彩霞, 胡兰. 单核苷酸多态性及其检测方法[J]. 证据科学, 2008, 16(6): 757-763.

(收稿日期: 2010-12-14)

• 综 述 •

ESAT6 在结核病中的最新研究进展*

何宗林 综述, 杜先智 审校

(重庆医科大学附属第二医院呼吸内科 400010)

关键词: 分枝杆菌, 结核; 研究; ESAT6

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 06. 022

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)06-0663-03

结核病是由结核分枝杆菌(MTB)引起的人兽共患慢性传染病, 是威胁人类的三大传染性疾 病之一, 目前全世界大约有 20 亿人感染结核分枝杆菌, 每年大约有 200~300 万的人死于结核^[1]。在亚洲和非洲一些发展中国家, 由于人类免疫缺陷病毒感染的盛行以及结核分枝杆菌多重耐药性的出现使结核病的传播更加迅速^[2]。为了预防和抵制结核病, 卡介苗(BCG)已经使用了 70 年, 但其免疫保护效果在不同地区的人群中存在显著差异(0~80%)。AIDS 等免疫功能严重受损的患者接种 BCG 后, 可能引起致死的播散性疾病。鉴于上述特点, 研制安全、高效、新型的结核疫苗成为热点。结核分枝杆菌的分泌蛋白是目前发现对结核分枝杆菌感染保护性最好的一组蛋白抗原, 对结核病的诊断和预防有着重要的意义。而 ESAT6 是结核分枝杆菌培养的相对分子质量为 6×10^3 的早期分泌抗原

靶, 具有较强的细胞免疫活性, 因此 ESAT6 有望成为 DNA 疫苗和亚单位疫苗的候选目的基因。现将分泌蛋白 ESAT6 近年来在结核病中的最新研究作一综述。

1 ESAT6 的一般特性

1.1 理化特性 ESAT6 是由结核分枝杆菌 RD1 区的开放读码框(RV3785)编码的一种早期分泌蛋白。含有 285 个碱基对(bp)的开放阅读框架(ORF), 介于第 13~16 位的起始密码 ATG 和第 298~300 位的终止密码 TAG 之间, 该阅读框架编码 95 个氨基酸。ESAT6 蛋白未糖基化, 有两个等电点(PI)为 4.0 和 4.5, 聚丙烯凝胶电泳(SDS-PAGE)显示相对分子质量为 6×10^3 , 但在凝胶过滤和未变性 PAGE 条件下显示相对分子质量为 24×10^3 。因此 ESAT6 的自然构型可能为四聚体, 但他们之间的联系很脆弱。1998 年有研究者应用前后重复多

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30872261)。

肽 ELISA 检测 ESAT6 蛋白的结构发现其 N 末端区的 3~15 的氨基酸位(EQQWNFAGTEAAA)有一个亲水区,并沿着多肽链发现另外两个亲水区。近年来有研究表明,ESAT6 和 Mh3881c 相互协同分泌是分枝杆菌在巨噬细胞中的增殖和抑制吞噬体成熟所必需的,同时 Mh3881c 在分泌过程中 C 端会被切除,并且保持 ESAT6 在细胞内的水平,这也体现了 ESAT6 的分泌特点^[3]。

1.2 分布特性 通过 PCR、Southern 杂交和免疫印迹分析,从基因和蛋白水平上揭示 ESAT6 仅存在于致病性分枝杆菌中,包括人型结核分枝杆菌、牛型结核分枝杆菌、非洲分枝杆菌以及苏尔加分枝杆菌、海水分枝杆菌和堪萨分枝杆菌等非典型分枝杆菌。Sorensen 发现 ESAT6 不仅存在于培养物的滤液中,还存在于结核分枝杆菌的细胞壁和细胞质中,但不存在于细胞膜中,而且没有信号肽的序列,表明它可能是通过一种非信号肽依赖形式分泌到细胞外。

1.3 免疫学特性 ESAT6 是目前体外实验中的刺激性抗原,许多实验工作已经证实了它作为有代表性诊断的特异性和敏感性抗原。同时,它也是很重要的 T 细胞抗原,可以被感染结核分枝杆菌的人或动物有免疫活性的 T 淋巴细胞识别,进而产生高水平的 γ 干扰素(IFN- γ),这种识别发生在感染早期阶段,可诱导宿主特异性 CD8⁺ CTL, CD4⁺ T 细胞增殖及 γ 干扰素的大量产生,在保护性细胞免疫反应中发挥重要作用,且能介导长期持久的免疫记忆。除此之外,ESAT6 CD4⁺ T 淋巴细胞抗原决定簇可被不同遗传背景的人、牛、小鼠的 T 淋巴细胞识别,产生大量 γ 干扰素;不同种族、个体的抗原特异性 CD4⁺ T 淋巴细胞体系对 ESAT6 多肽反应各不相同,多肽的识别受遗传因素影响。同时,ESAT6 有两个 CD8⁺ T 淋巴细胞抗原决定簇,分别位于第 21~29 位和第 69~76 位氨基酸,前者通过人类白细胞抗原(HLA)-A68.02 限制的,是非洲人群 HLA-A28 常见的亚型;后者是通过非洲和亚洲人群常见的 HLA-B52 限制的,是特异性 CD8⁺ 细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)的作用靶。近年来多位学者采用更敏感的酶联免疫斑点技术(ELISPOT),证明 ESAT6 蛋白及其肽段可刺激结核病患者或潜伏感染者 T 细胞释放 γ 干扰素。国外有学者发现,ESAT6 通过影响 ZAP70 下游的 TCR 信号路径直接抑制人类 T 细胞的反应。Kumar 等^[4]用流式细胞仪和 ELISA 检测由 ESAT6 抗原引起的 γ 干扰素和 CD4⁺ T 细胞的增殖,结果显示在正常组出现 γ 干扰素,结核病患者组对这种抗原只出现很低的反应;治疗组只对 Esp1 和 Esp8 反应;CD4⁺ T 细胞的增殖在结核病患者和治疗组间相同,但是正常组对 Esp1 和 Esp6 的反应有所提高,表明特异性抗原 ESAT6 在印度人群中对结核有较强的免疫作用。

2 ESAT6 毒力和免疫调节机制

2.1 毒力作用 ESAT6 蛋白的个别氨基酸改变时不会抑制 ESAT6 的分泌,但是会导致重组结核分枝杆菌毒力的减弱^[5]。现在有研究表明,ESAT6 能够形成螺旋-转角-螺旋的发夹结构,而且彼此相互平行,同时在 ESAT6 结构中存在一种含有甘氨酸和色氨酸的称作 WXG 基序的结构,这种基序主要位于发夹结构的转角处,WXG 基序可能与结核分枝杆菌的毒力有关^[5]。De Jonge 等^[6]通过密度梯度离心法发现 ESAT6 蛋白单独存在时与脂质体有很强的结合能力,但是当与 CFP10 形成二聚体时不能够与脂质体的膜相结合。当降低 pH 值时,发

现 ESAT6/CFP10 的二聚体降解,然后 ESAT6 能够和脂质体结合。他们还采用冷冻电子显微镜技术发现,ESAT6 能够使脂质体变得不稳定甚至使脂质体溶解,而 CFP10 没有这种功能。在这之前,国外也有研究者发现,ESAT6 蛋白无论是单独存在还是与 CFP10 形成二聚体,均会导致巨噬细胞的溶解,但是 CFP10 单独存在时则不会有此种现象发生。在这种基础上,他们提出了 ESAT6 可能调节宿主细胞膜的离子通道进而导致细胞的溶解。Pathak 等^[7]发现,ESAT6 与一种 Toll 样受体 TLR2 在巨噬细胞表面上有特定的相互作用。通过与 TLR2 的结合,ESAT6 诱导一种能关闭所有 Toll 样受体功能的信号,这种阻断机制也许是一种治疗肺结核的潜在方法。

2.2 免疫调节机制 Gangul 等^[8]发现分泌蛋白 ESAT6 参与调节巨噬细胞内有丝分裂原激活蛋白(MAP)激酶途径。ESAT6 在细胞质内参与诱导细胞外信号调节激酶 1/2 (ERK 1/2)的磷酸化作用。ESAT6 同样参与到拮抗细胞核内的脂多糖诱导的 ERK1/2 的磷酸化作用。实验发现,ESAT6 能够下调依赖 ERK1/2 的脂多糖(LPS)诱导基因 c-myc 的表达。Derriek 和 Morris^[9]通过异硫氰酸酯锚定蛋白荧光素和细胞内半胱天冬酶染色法,发现 ESAT6 可以导致人类 THP21 巨噬细胞程序性死亡。通过实时逆转录 PCR 技术发现半胱天冬酶基因 21、3、5、7、8 在 ESAT6 处理过的细胞内被上调,进一步研究发现当 THP21 巨噬细胞被 H37Rv 感染时,会在 48 h 后导致显著的细胞程序性死亡,而不表达 ESAT6 的缺失型突变体不能导致显著的细胞程序性死亡。通过细胞不通透的荧光染料实验表明,ESAT6 激发细胞程序性死亡反应的主要机制可能是一些膜孔的形成。因此对 ESAT6 导致细胞程序性死亡新的理解,可以帮助研究者从新的途径开发新型疫苗。Smith 等^[10]为了确定 ESAT6 是否在膜孔的形成中有着直接作用,比较了从大肠杆菌中纯化的 rESAT6、rCEP-10-HIS、rMh3881c-HIS 的活跃性。实验结果表明,30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 rESAT6 引起巨噬细胞释放 LDH,而 rCEP-10-HIS 和 rMh3881c-HIS 的剂量甚至达到 60、120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 都没有引起巨噬细胞释放 LDH。也进一步证明了 ESAT6 在 MCV 中的膜孔形成中起着直接作用,进而去促进结核分枝杆菌从细胞膜孔中逃逸。

3 ESAT6 诊断试剂的研究

3.1 皮肤诊断试剂 Wu 等^[11]研究了不同人群对 PPD 和 rESAT6 抗原的反应,实验结果显示,rESAT6 能够诱发暴露于结核分枝杆菌中的皮肤,其测试反应呈阳性,但是对于有 BCG 接种史而没有结核接触史的受试者,其皮肤反应呈阴性;同时发现 rESAT6 在皮肤测试反应中的特异性比 PPD 敏感,此结果为 rESAT6 作为结核病的皮肤试验诊断试剂提供了一定的实验基础。有学者对 ESAT6 作为皮肤反应试剂进行了较多的研究,通过一系列动物实验发现,rESAT6 可很好地区分结核分枝杆菌与 BCG 和多种非结核分枝杆菌致敏的动物,而且 rESAT6 对结核分枝杆菌活菌感染的动物皮试呈明显的阳性反应,但与结核分枝杆菌死菌致敏的动物同 BCG 致敏动物一样呈阴性反应。

3.2 血清诊断试剂 在分泌蛋白的抗原选择上,ESAT6 由于能鉴别 BCG 及分支杆菌在 PPD 检测中的假阳性反应,成为目前血清学诊断中最重要和使用最多的特异性抗原。拾莉等^[12]构建了重组蛋白 19KD-ESAT6,该蛋白与确诊的结核病患者血清发生特异性免疫反应,并具有特异的抗原性,重组蛋白

19KD-ESAT6 为结核病血清学诊断试剂的开发提供了依据。ESAT6 能刺激机体产生特异性 IgG, 利用 ESAT6 蛋白抗原能与结核分枝杆菌感染者血中特异性 IgG 结合, 利用 ELISA 等方法可特异性地区分是真正结核分枝杆菌感染还是接种 BCG 所致敏, 该方法明显优于 PPD 作包被抗原的 ELISA。犹真明和王伟佳^[13]用两种佐剂联合 ESAT6 疫苗, 在免疫 4 周后的小鼠血清中检测到高滴度的 ESAT6 特异性 IgG。还有学者以 CFP10-ESAT6 融合蛋白为抗原, 用 ELISA 方法检测豚鼠血清中的抗结核分枝杆菌抗体, 11 例 H37Rv 感染豚鼠血清全部呈阳性反应, 11 例 BCG 免疫豚鼠血清仅 1 例呈阳性反应。这也说明了 ESAT6 可以作为结核血清学的诊断试剂。

3.3 黏膜诊断试剂 结核病是通过呼吸道黏膜组织吸入带有传染性的飞沫而感染的。新型结核疫苗的研发已经关注到了这点。大量的研究表明, 通过黏膜免疫也许会引起局部呼吸道黏膜的免疫防御机制, 从而增加对结核分枝杆菌入侵的保护机制^[14-15]。研究者通过比较皮下、肌肉注射以及鼻腔黏膜接种小鼠和设置阴性对照实验后, 得出重组疫苗鼻腔黏膜接种组与皮下注射组和肌肉注射组比较, 菌落计数明显减低, 有显著性差异, 也较阴性对照组明显减低; 皮下注射组较肌肉注射组和阴性对照组菌落计数明显减低, 但是没有鼻腔黏膜接种组显著。这提示 rBb-ESAT6 疫苗鼻腔黏膜免疫对鼠结核分枝杆菌感染有明显的保护作用。Dietrich 等^[14]把 LTK63/Ag85B-ESAT6 疫苗免疫小鼠鼻腔 3 次, 每两周 1 次。免疫结果发现 LTK63-Ag85B-ESAT6 疫苗在小鼠的血液和脾脏中引起了强烈的反应 (0.05 μg/mL 的抗原引起 1 500~4 000 pg/mL γ 干扰素的分泌, 在高剂量的抗原 0.5 μg/mL 引起 3 500~9 000 pg/mL γ 干扰素的分泌), 除此之外, 鼻腔淋巴结 T 细胞引起 6 500 pg/MI γ 干扰素的分泌。这提示了 LTK63-Ag85B-ESAT6 疫苗鼻腔黏膜免疫后主要诱导 Th1 的反应和诱导 CD4⁺ T 细胞引起 γ 干扰素的分泌。同时也提示了鼻腔黏膜免疫在保护结核病的入侵是一种有效的途径。

4 结 语

综上所述, ESAT6 蛋白因其高度特异性和免疫活性对结核分枝杆菌感染筛查的特异性抗原极具潜力。近年来的研究表明, 人们对 ESAT6 基因及其相关表达产物研究较多, ESAT6 不仅是抗结核免疫的靶抗原, 而且也是结核杆菌感染记忆免疫应答的主要抗原。对 EAST6 的毒力和免疫机制的研究表明, 有利于从免疫学和分子生物学方面入手探索结核病诊断的新途径, 也许是治疗结核病的潜在方法。同时, 目前对 ESAT6 作为皮肤、血清、黏膜诊断试剂的研究, 这也为今后在结核病的诊断与预防方面提供了更好的辅助手段。但其特异性抗原应用的潜力, 特别是在结核病的诊断、治疗及疫苗开发方面仍需要进一步的研究。

参考文献

[1] WHO. Global tuberculosis control-surveillance, planning, financing[EB/OL] <http://www.who.int/tb/publications/global-report/2008/en/index.html>.
 [2] Padayatchi N, Friedland G. Managing multiple and extensively drug-resistant tuberculosis and HIV[J]. Expert Opin Pharmaco-

ther, 2007, 8(8):1035-1037.
 [3] Xu J, Laine O, Masciocchi M, et al. A unique mycobacterium ESX-1 protein co-secreted with CFP-10/ESAT-6 and is necessary for inhibiting phagosome maturation[J]. Mol Microbiol, 2007, 66(3): 787-800.
 [4] Kumar M, Meenakshi N, Sundaramurthi JC, et al. Immune response to mycobacterium tuberculosis specific antigen ESAT-6 among south Indians[J]. Tuberculosis (Edinb), 2010, 90(1): 60-69.
 [5] Brodin P, de Jonge MI, Majlessi L, et al. Functional analysis of early secreted antigenic target-6, the dominant T-cell antigen of mycobacterium tuberculosis, reveals key residues involved in secretion, complex formation, virulence, and immunogenicity[J]. Biol Chem, 2005, 280(40): 33953-33959.
 [6] de Jonge MI, Pehau-Arnaudet G, Fretz MM, et al. ESAT-6 from mycobacterium tuberculosis dissociates from its putative chaperone CFP-10 under acidic conditions and exhibits membrane-lysing activity[J]. Bacteriol, 2007, 189(16): 6028-6034.
 [7] Pathak SK, Basu KK, Banerjee A, et al. Direct extracellular interaction between the secreted antigen ESAT-6 of Mycobacterium tuberculosis and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages[J]. Nat Immunol, 2007, 8(6): 610-618.
 [8] Ganguly N, Giang PH, Gupta C, et al. Mycobacterium tuberculosis secretory proteins CFP-10, ESAT-6 and CFP10; ESAT6 complex inhibit lipopolysaccharide induced NF-kappaB transactivation by downregulation of reactive oxidative species(ROS) production[J]. Immunol Cell Biol, 2008, 86(1): 98-106.
 [9] Derrick SC, Morris SL. The ESAT6 protein of Mycobacterium tuberculosis induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression[J]. Cell Microbiol, 2009, 9(6): 1547-1555.
 [10] Smith J, Manoranjan J, Pan M, et al. Evidence for pore formation in host cell membranes by ESX-1-Secreted ESAT-6 and its role in mycobacterium marinum escape from the vacuole[J]. Infection and Immunity, 2008, 76(12): 5478-5487.
 [11] Wu X, Zhang L, Zhang J, et al. Recombinant early secreted antigen target 6 protein as a skin antigen for the specific detection of mycobacterium tuberculosis infection [J]. Clin Exp Immunol, 2008, 152(1): 81-87.
 [12] 拾莉, 丁元生, 杨华, 等. 结核分枝杆菌 19KD-ESAT6 融合蛋白的克隆与表达[J]. 微生物与感染, 2009, 4(1): 26-29.
 [13] 犹真明, 王伟佳. 不同佐剂在 ESAT6 亚单位结核基因疫苗中的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(4): 328-331.
 [14] Dietrich J, Andersen C, Rappuoli R, et al. Mucosal administration of Ag85B-ESAT-6 protects against infection with Mycobacterium tuberculosis and boosts prior bacillus calmette-guerin immunity [J]. Immunol, 2006, 177(9): 6353-6360.
 [15] Andersen CS, Dietrich J, Agger EM, et al. The combined CTA1-DD/ISCOMs vector is an effective intranasal adjuvant for boosting prior mycobacterium bovis BCG immunity to mycobacterium tuberculosis[J]. Infect Immun, 2007, 75(1): 408-4016.