

- 114.
- [7] 韩亚萍, 李军, 蒋龙凤, 等. HBeAg 导致慢性乙型肝炎患者外周血 Th1/Th2 型细胞因子失衡[J]. 中华肝脏病杂志, 2013, 21(8): 584-589.
- [8] Cai G, Nie X, Li L, et al. B and T lymphocyte attenuator is highly expressed on intrahepatic T cells during chronic HBV infection and regulates their function[J]. J Gastroenterol, 2013, 48(12): 1362-1372.
- [9] Bréchet C, Thiers V, Kremsdorf D, et al. Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely “occult”[J]. Hepatology, 2001, 34(1): 194-203.
- [10] Mulrooney-Cousins PM, Michalak TI. Persistent occult hepatitis B virus infection: experimental findings and clinical implications [J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(43): 5682-5686.
- [11] Hu KQ. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications[J]. J Viral Hepat, 2002, 9(4): 243-257.
- [12] Cassini R, De Mitri MS, Gibellini D, et al. A novel stop codon mutation within the hepatitis B surface gene is detected in the liver but not in the peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected individuals with occult HBV infection[J]. J Viral Hepat, 2013, 20(1): 42-49.
- [13] Vakili Ghartavol Z, Alavian SM, Amini S, et al. Prevalence of occult hepatitis B virus in plasma and peripheral blood mononuclear cell compartments of patients with chronic hepatitis C infection in tehran-iran[J]. Hepat Mon, 2013, 13(5): e10134.
- [14] Giles ML, Grace R, Tai A, et al. Prevention of mother-to-child transmission of hepatitis B virus (HBV) during pregnancy and the puerperium: current standards of care[J]. Aust N Z J Obstet Gynaecol, 2013, 53(3): 231-235.
- [15] Kumar A. Hepatitis B virus infection and pregnancy: a practical approach[J]. Indian J Gastroenterol, 2012, 31(2): 43-54.
- [16] Chang MH. Natural history and clinical management of chronic hepatitis B virus infection in children[J]. Hepatol Int, 2008, 2(1): 28-36.
- [17] 赵隼, 邱申熊, 杨李, 等. 阻断乙肝病毒宫内感染失败的原因与对策[J]. 中国临床医生, 2013, 41(4): 58-60.
- [18] 冯永亮, 王素萍, 史晓红, 等. PBMC 中 HBV cccDNA 与 HBV 宫内感染关系的研究[J]. 现代预防医学, 2005, 32(3): 192-194.
- [19] Shao Q, Zhao X, Yao Li MD. Role of peripheral blood mononuclear cell transportation from mother to baby in HBV intrauterine infection[J]. Arch Gynecol Obstet, 2013, 288(6): 1257-1261.
- [20] 龚钰清, 盛国光. 替比夫定对慢性乙型肝炎患者血清和外周血单个核细胞 HBV DNA 含量及 IL-18 水平的影响[J]. 中西医结合肝病杂志, 2010, 20(5): 272-273.
- [21] 杜以真, 张纵, 徐皖苏, 等. 慢性乙型肝炎抗病毒疗效与外周血单个核细胞内乙型肝炎病毒 DNA 水平的关系[J]. 中华传染病杂志, 2011, 29(3): 158-163.
- [22] Coffin CS, Mulrooney-Cousins PM, Osiowy C, et al. Virological characteristics of occult hepatitis B virus in a North American cohort of human immunodeficiency virus type 1-positive patients on dual active anti-HBV/HIV therapy[J]. J Clin Virol, 2014, 60(4): 347-353.
- [23] Cassini R, De Mitri MS, Gibellini D, et al. A novel stop codon mutation within the hepatitis B surface gene is detected in the liver but not in the peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected individuals with occult HBV infection[J]. J Viral Hepat, 2013, 20(1): 42-49.
- [24] 朱圣涛, 谢琴秀, 张亚飞, 等. 乙型肝炎患者外周血单个核细胞中共价闭合环状 DNA 的检测及其临床意义[J]. 中华传染病杂志, 2014, 32(4): 214-218.

(收稿日期: 2015-05-18)

• 综 述 •

结核分枝杆菌 PPE36、TB10.4 蛋白的研究进展

黄焕源¹综述, 居 军^{2△}审校

(1. 兰州大学第一临床医学院, 甘肃兰州 730000; 2. 甘肃省人民医院检验科, 甘肃兰州 730000)

关键词: 结核分枝杆菌; PPE36; TB10.4

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.13.048

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)13-1917-03

结核杆菌全称结核分枝杆菌(MTB), 于 1882 年由德国细菌学家罗伯特科赫发现并证明是结核病的病原菌, 其繁殖时有分支生长趋势, 故得此名。因为菌体本身含有大量分支菌酸, 进行细胞染色时不易着色, 加温或者延长着色时间后能抵抗盐酸乙醇的脱色, 因此又称为抗酸杆菌^[1-2]。这种细菌能够逃避宿主免疫系统的防御, 在体内持续多年, 感染后几十年被激活引起疾病^[3]。20 世纪 80 年代以来, 由于对结核病疫情控制过于乐观、结核病与人类免疫缺陷病毒合并感染和多重耐药性的发生, 结核病发病率和死亡率有所增加且令人担忧。MTB 感染仍然是一个威胁人类健康的主要因素, 全球估计有二十亿人感染 MTB。每年大约有 150 万人因结核病而丧生, 目前唯一

可用的疫苗卡介苗(BCG)显然是失败的^[1], 只有极少数的界定的亚单位疫苗已被证明在暴露后的动物模型中具有显著的保护作用^[4-6]。因此需要加强活动性结核的控制措施, 尽早发现并予以治疗。现有的结核病实验室诊断方法因为检测时间长、特异度与灵敏度低、费用较高等原因, 在结核病的防治工作中会受到限制。尽管有许多已经商业化的结核病血清学检测方法, 但这些方法都不能单独使用或取代其他的检测方法^[7-8]。因此, 建立快速、灵敏、特异的检测方法对结核病的诊断和预防意义重大。而寻找特异的抗原成分是解决结核病早期、快速诊断的关键。近年来, MTB 的 PPE 蛋白家族和早期分泌靶抗原-6(ESAT-6)家族作为候选抗原应用于各种检测方法已有所

报道,但 PPE36 和 TB10.4 蛋白在这方面的应用还有待深入探索。了解和研究它们的结构及生物学功能,可以为 MTB 的检测提供新的指标,使建立新的 MTB 检测方法成为可能。

1 PPE 蛋白家族及 PPE36 蛋白的特点及功能

MTB 全基因组序列测序完成后,发现其中大约 3% 的开放阅读框编码 PPE 蛋白家族^[9]。PPE 蛋白因其 N 端区域具有保守的 Pro-Pro-Glu(PPE)的基序而得名。对于 PPE 蛋白的作用,不同研究间存在较大争议,有研究强调在结核病患者或受感染的动物体内,PPE 蛋白有诱导高水平的 B 淋巴细胞反应的能力^[10]。相反,另一项研究表明,结核病患者对 PPE 蛋白没有产生强烈的体液反应^[11]。虽然 PPE 蛋白的精确作用尚不明确,但是它们可能在诱导 MTB 毒性^[12]和维持巨噬细胞中细菌的生长方面发挥作用^[13]。也有人认为,PPE 蛋白参与管理细菌的缺铁和氧化应激^[14]。

PPE36 蛋白是 MTB 的 PPE 蛋白家族中的第 3 个成员,定位于细胞膜的表面^[15]。由 Rv2108 基因编码,理论相对分子质量为 27×10^3 。也有文献报道,在大肠杆菌中表达的重组 PPE36 蛋白,经过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析,相对分子质量为 43×10^3 ^[16]。造成这种差异可能是 PPE36 蛋白的本质引起的,因为它所属的蛋白家族存在一个不规则的氨基酸序列结构^[17],相比于其他大部分的蛋白,这类蛋白与 SDS 的结合会减少,因此显示的相对分子质量往往比根据序列计算或用质谱方法测量所得到的真值高出 1.2~1.8 倍^[18]。用酶联免疫吸附试验(ELISA)和蛋白质免疫组学(Western Blot)方法分析,发现 PPE36 具有免疫活性,能够与结核病患者血清中的抗体结合^[16]。而且因为其在 MTB 复合群中的高度特异性,从而被认为可以应用于检测和识别这些分枝杆菌的快速试验^[19]。有研究发现,在结核病患者血清中,PPE36 蛋白能引起 IgA 反应,而没有 IgG 应答,这有可能使 PPE36 蛋白成为一个特殊的 MTB 诊断指标^[20]。

2 ESAT-6 蛋白家族及 TB10.4 蛋白

MTB 释放的蛋白可以分为 3 种:分泌蛋白、细胞壁(外)蛋白和菌体裂解释放出的胞浆蛋白。而致病性 MTB 的分泌蛋白被发现在宿主的免疫反应调节中起着重要的作用^[21]。除了经典的 Sec 分泌途径和 Tat 分泌途径,MTB 还具有 ESX 分泌系统,该系统是一个在细菌的体外生长中不起关键作用但对细菌的毒力为必需的Ⅶ型分泌系统(t7ss)^[22]。MTB 具有至少 5 个 ESX 分泌系统,即 ESX-1 到 ESX-5^[23]。MTB 的 ESAT-6 和培养滤液蛋白 10(CFP10)在培养中大量产生和分泌。他们也被认为是培养滤液中最具免疫原性的分子^[24]。但是这些蛋白质缺乏经典的 Sec 分泌途径而被认为依赖于 ESX-1^[25]。ESAT-6 和 CFP-10 一起形成一个紧密的二聚体,并且互相依赖确保它们的分泌和稳定^[26]。有趣的是,在不影响 ESX-1 分泌系统功能的情况下,ESAT-6 特定的基因突变会造成 MTB 毒力的损失^[27]。这意味着,ESAT-6 本身在调节与 ESX-1 分泌系统相关的毒力时是至关重要的。ESAT-6 通过激活半胱天冬酶的表达诱导巨噬细胞凋亡^[28]。它单独或联合 CFP-10 通过与宿主蛋白比如肺泡上皮细胞基底膜表面的层黏连蛋白相互作用引起这些细胞的溶解,从而帮助肺内 MTB 的扩散^[29]。此外,ESAT-6 已被证明直接与 Toll 样受体 2(TLR2)相互作用从而降低白细胞介素-12(IL-12)p40 在巨噬细胞的分泌,这可能有利于 2 型辅助性 T 淋巴细胞(Th2)帮助 MTB 在细胞内的持久性与存活^[30]。因此,可以推测,ESAT-6 通过与宿主细胞因子相互作用从而在 MTB 的毒力方面起到关键作

用,这也有利于更好地理解其在宿主免疫应答中的调节作用。

继 ESAT-6 蛋白之后,在 MTB 的基因组中发现了结构特性与 ESAT-6 十分相近的一组基因,并称之为 ESAT-6 基因家族。这些基因与 ESAT-6 有 10%~35% 的同源性^[9]。TB10.4 蛋白是后续分离出的 ESAT-6 蛋白家族成员,由 Rv0288 基因编码,编码 ESAT-6 蛋白的基因没有单核苷酸多态性^[31]。TB10.4 在 MTB 复合群和 BCG 中都有表达,但在 MTB 减毒株 H37Ra 中的表达明显下调,这或许可以提示 TB10.4 蛋白在 MTB 的致病性和毒性方面有很大作用。与 ESAT-6 蛋白不同,TB10.4 蛋白的分泌依赖于 ESX-3 分泌系统^[21]。ESX-3 系统已被证明参与铁元素的摄取^[32],而且最近发现 TB10.4 蛋白本身有一个锌的结合位点,这提示 TB10.4 蛋白直接参与锌离子的摄取^[33]。尽管 ESAT-6 和 TB10.4 在 MTB 的生长及毒力方面有不同的功能。但它们先前已被证明有着非常相似的免疫学特性,都能在感染的动物模型和病患中被强烈地识别,而且 TB10.4 的免疫性能还要优于 ESAT-6^[34],比如在感染了牛分枝杆菌的牛体内,对 TB10.4 的适应性免疫反应会逐渐增强^[35]。在 RAW264.7 巨噬细胞中,重组 TB10.4 蛋白能够通过 TLR2 受体促进肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-6(IL-6)和 IL-12 p40 的产生^[36]。实际上,TB10.4 可能比结核菌的其他大多数基因更具有多样性^[37],在一个多级结核疫苗中,使用 TB10.4 代替 ESAT-6 亚基,能提供更好的综合人口覆盖率^[38]。这更加体现了 TB10.4 在免疫原性方面的优势。

3 PPE36 和 TB10.4 的应用展望

综上所述,MTB 的 PPE36、TB10.4 蛋白因为具有很高的特异性和良好的免疫原性,而且都属于 RD1 区编码蛋白,从而具有成为优质的诊断抗原或疫苗成分的潜在可能。随着分子生物学的快速发展,利用基因工程技术,可以轻易得到重组 PPE36、TB10.4 蛋白,也可以得到与其他分子的融合蛋白,这将使它们得到更加广泛和深入的应用。

参考文献

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2012[R]. Geneva:WHO,2012.
- [2] Tanrikulu AC,Acemoglu H,Palanci Y,et al. Tuberculosis in Turkey:high altitude and other socio-economic risk factors[J]. Public Health,2008,122(6):613-619.
- [3] Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis[J]. Nat Rev Immunol,2001,1(1):20-30.
- [4] Ahn SS,Jeon BY,Kim KS,et al. Mtb32 is a promising tuberculosis antigen for DNA vaccination in pre-and post-exposure mouse models[J]. Gene Ther,2012,19(5):570-575.
- [5] Coler RN,Bertholet S,Pine SO,et al. Therapeutic immunization against Mycobacterium tuberculosis is an effective adjunct to antibiotic treatment[J]. J Infect Dis,2013,207(8):1242-1252.
- [6] Aagaard C,Hoang T,Dietrich J,et al. A multistage tuberculosis vaccine that confers efficient protection before and after exposure[J]. Nat Med,2011,17(2):189-194.
- [7] Flores LL,Steingart KR,Dendukuri N,et al. Systematic review and meta-analysis of antigen detection tests for the diagnosis of tuberculosis[J]. Clin Vaccine Immunol,2011,18(10):1616-1627.
- [8] Steingart KR,Flores LL,Dendukuri N,et al. Commercial serological tests for the diagnosis of active pulmonary and extrapulmonary tuberculosis:an updated systematic review and meta-analysis[J]. PLoS Med,2011,8(8):e1001062.

- [9] Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence [J]. *Nature*, 1998, 393(6685): 537-544.
- [10] Tundup S, Pathak N, Ramanadham M, et al. The co-operonic PE25/PPE41 protein complex of *Mycobacterium tuberculosis* elicits increased humoral and cell mediated immune response [J]. *PLoS One*, 2008, 3(10): e3586.
- [11] Zanetti S, Bua A, Delogu G, et al. Patients with pulmonary tuberculosis develop a strong humoral response against methylated heparin-binding hemagglutinin [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2005, 12(9): 1135-1138.
- [12] Rindi L, Lari N, Garzelli C. Search for genes potentially involved in *Mycobacterium tuberculosis* virulence by mRNA differential display [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 258(1): 94-101.
- [13] Dubnau E, Fontán P, Manganelli R, et al. *Mycobacterium tuberculosis* genes induced during infection of human macrophages [J]. *Infect Immun*, 2002, 70(6): 2787-2795.
- [14] Rodriguez GM, Voskuil MI, Gold B, et al. IdeR, an essential gene in *Mycobacterium tuberculosis*; role of IdeR in iron-dependent gene expression, iron metabolism, and oxidative stress response [J]. *Infect Immun*, 2002, 70(7): 3371-3381.
- [15] Okkels LM, Brock I, Follmann F, et al. PPE protein (Rv3873) from DNA segment RD1 of *Mycobacterium tuberculosis*; strong recognition of both specific T-cell epitopes and epitopes conserved within the PPE family [J]. *Infect Immun*, 2003, 71(11): 6116-6123.
- [16] Le Moigne V, Robreau G, Borot C, et al. Expression, immunochemical characterization and localization of the *Mycobacterium tuberculosis* protein p27 [J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2005, 85(4): 213-219.
- [17] Tompa P. Intrinsically unstructured proteins [J]. *Trends Biochem Sci*, 2002, 27(10): 527-533.
- [18] Dunker AK, Lawson JD, Brown CJ, et al. Intrinsically disordered protein [J]. *J Mol Graph Model*, 2001, 19(1): 26-59.
- [19] Chevrier D, Casademont I, Guesdon JL. Cloning of a gene from *Mycobacterium tuberculosis* coding for a hypothetical 27 kDa protein and its use for the specific PCR identification of these mycobacteria [J]. *Mol Cell Probes*, 2000, 14(4): 241-248.
- [20] Le Moigne V, Le Moigne D, Mahana W. Antibody response to *Mycobacterium tuberculosis* p27-PPE36 antigen in sera of pulmonary tuberculosis patients [J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2013, 93(2): 189-191.
- [21] Ligon LS, Hayden JD, Braunstein M. The ins and outs of *Mycobacterium tuberculosis* protein export [J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2012, 92(2): 121-132.
- [22] Hsu T, Hingley-Wilson SM, Chen B, et al. The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(21): 12420-12425.
- [23] Gey Van Pittius NC, Gamielidien J, Hide W, et al. The ESAT-6 gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* and other high G+C Gram-positive bacteria [J]. *Genome Biol*, 2001, 2(10): 1-18.
- [24] Dillon DC, Alderson MR, Day CH, et al. Molecular and immunological characterization of *Mycobacterium tuberculosis* CFP-10, an immunodiagnostic antigen missing in *Mycobacterium bovis* BCG [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(9): 3285-3290.
- [25] Tan T, Lee WL, Alexander DC, et al. The ESAT-6/CFP-10 secretion system of *Mycobacterium marinum* modulates phagosome maturation [J]. *Cell Microbiol*, 2006, 8(9): 1417-1429.
- [26] Renshaw PS, Lightbody KL, Veverka V, et al. Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulence Factors CFP-10 and ESAT-6 [J]. *EMBO J*, 2005, 24(14): 2491-2498.
- [27] Houben D, Demangel C, van Ingen J, et al. ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria [J]. *Cell Microbiol*, 2012, 14(8): 1287-1298.
- [28] Derrick SC, Morris SL. The ESAT6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression [J]. *Cell Microbiol*, 2007, 9(6): 1547-1555.
- [29] Kinshikar AG, Verma I, Chandra D, et al. Potential role for ESAT6 in dissemination of *Mycobacterium tuberculosis* via human lung epithelial cells [J]. *Mol Microbiol*, 2010, 75(1): 92-106.
- [30] Pathak SK, Basu S, Basu KK, et al. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages [J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(6): 610-618.
- [31] Dietrich J, Aagaard C, Leah R, et al. Exchanging ESAT6 with TB10. 4 in an Ag85B fusion molecule—based tuberculosis subunit vaccine: efficient protection and ESAT6—based sensitive monitoring of vaccine efficacy [J]. *J Immunol*, 2005, 174(10): 6332-6339.
- [32] Feltcher ME, Sullivan JT, Braunstein M. Protein export systems of *Mycobacterium tuberculosis*; novel targets for drug development [J]. *Future Microbiol*, 2010, 5(10): 1581-1597.
- [33] Ilghari D, Lightbody KL, Veverka V, et al. Solution structure of the *Mycobacterium tuberculosis* EsxGoEsxH complex; functional implications and comparisons with other *M. tuberculosis* Esx family complexes [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(34): 29993-30002.
- [34] Dietrich J, Weldingh K, Andersen P. Prospects for a novel vaccine against tuberculosis [J]. *Vet Microbiol*, 2006, 112(2/4): 163-169.
- [35] Xin T, Jia H, Ding J, et al. Assessment of a protein cocktail-based skin test for bovine tuberculosis in a double-blind field test in cattle [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2013, 20(4): 482-490.
- [36] Liu S, Jia H, Hou S, et al. Recombinant TB10. 4 of *Mycobacterium bovis* induces cytokine production in RAW264. 7 macrophages through activation of the MAPK and NF- κ B pathways via TLR2 [J]. *Mol Immunol*, 2014, 62(1): 227-234.
- [37] Comas I, Chakravartti J, Small PM, et al. Human T cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* are evolutionarily hyperconserved [J]. *Nature Genetics*, 2010, 42(6): 498-503.
- [38] Davila J, McNamara LA, Yang Z. Comparison of the predicted population coverage of tuberculosis vaccine candidates Ag85B-ES-AT-6, Ag85B-TB10. 4, and Mtb72f via a bioinformatics approach [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40882.

(收稿日期: 2015-01-08)