

were higher than that in PBS group on the 14th day after the last immunization (q values were 10.80 and 4.34 respectively, with both $P < 0.05$), and were lower than that in PBS group on the 42th day after the last immunization (q values were 7.08 and 6.12 respectively, with both $P < 0.05$). The release level of INF- γ in EspB group and EspBN group showed an increasing trend, and were higher than that in PBS group on the 42th day after the last immunization (q values were 5.37 and 3.61 respectively, with both $P < 0.05$). **Conclusion** The results showed that both EspB protein and EspBN protein could induce humoral and cellular immune responses in mice.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; ESAT-6-system-1 substrate protein B; Immunogenicity

结核病是结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 引起的重大传染病, 严重危害人类健康^[1]。卡介苗 (*Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin, BCG) 用于人体免疫接种预防结核病已有 100 余年的历史, 但长时间的连续传代培养使卡介苗的抗原性减弱, 导致人群接种后预防效果不佳^[2], 急需研制新型疫苗, 将其与 BCG 联用以增强对结核病的预防效果。

ESAT-6 系统-1 (ESAT-6-system-1, ESX-1) 分泌蛋白 B (ESX-1 substrate protein B, EspB) 由 Rv3881c 基因编码, 是调控 ESAT-6 分泌的重要蛋白之一^[3-4]。在海分枝杆菌实验中, Gao 等^[5]报道 Mh3881 (Rv3881c) 敲除株比 ESX-1 分泌系统其他基因敲除株在体内外减毒效果更明显。表明 EspB 除了调控 ESAT-6 分泌外, 还有其它功能^[6-7]。Ohol 等^[8]报道完整的 EspB 可能充当一个限制性分泌通道的作用, 并发现结核分枝杆菌可能在慢性感染过程中通过枯草杆菌丝氨酸蛋白酶 (MycP1) 水解 EspB 蛋白为 EspBC (11 ku) 和 EspBN (50 ku) 两个片段, 使该通道关闭停止分泌抗原。目前已有的研究集中在 EspB 蛋白的调控作用及其与巨噬细胞的关系两方面^[9-10], 对其免疫原性的研究鲜见报道。本研究通过原核重组表达获得 EspB 和 EspBN 重组蛋白并免疫 BALB/c 小鼠, 检测小鼠血清特异性抗体滴度的变化、脾淋巴细胞增殖情况以及培养液上清中 INF- γ 、IL-4 分泌水平等, 评估两种重组蛋白的免疫原性, 以期对结核疫苗候选抗原的筛选和药物的研发提供实验依据。

材料与方 法

1 材料

1.1 菌株、质粒和实验动物 *E. coli* DH5 α 购自天根公司; *E. coli* BL21 (DE3) 购自全式金公司; pUC57-Rv3881c 质粒购自上海生工公司; pGEX-4T-1 质粒由本实验室保存。雌性 BALB/c 小鼠由本校实验动物中心代购。

1.2 主要试剂 EcoRI、XhoI 限制性核酸内切酶和预染蛋白 Mark 均购自美国 Thermo 公司; 2 \times 高保真 PCR Mix 预混液, SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒, 质粒 DNA 小量提取试剂盒及 PCR 产物纯化试剂盒

均购自上海生工公司; T₄ DNA Ligase 购自宝生物公司; GST 标签蛋白纯化试剂盒购自上海碧云天生物公司; 弗氏不完全佐剂购自德国 BioFroxx 公司; 小鼠 INF- γ 检测试剂盒, 小鼠 IL-4 检测试剂盒, 兔抗 GST 标签单克隆抗体, HRP-羊抗兔 IgG 及 HRP-羊抗小鼠 IgG 购自武汉 Boster 公司; HRP-山羊抗小鼠 IgG, HRP-山羊抗小鼠 IgG1 和 HRP-山羊抗小鼠 IgG2a 均购自德国 SBA 公司。

2 方法

2.1 重组质粒 pGEX-4T-1-EspB 和 pGEX-4T-1-EspBN 的构建与鉴定 根据结核分枝杆菌 H37RV 菌株编码 EspB 蛋白的基因 Rv3881c (Accession number: NC_000962.3) 序列设计 3 条引物。P1: 5'-TapGAATTCATGACGC AGTCGCAGAC-3'; P2: 5'-GCCTCGAGTCACTTTCGACTCCTTACTGT-3'; P3: 5'-GCCTCGAGTCATGCCGCTTTGACCGCCACG TCGCC-3'。以 pUC57-Rv3881c 为模板, 以 P1、P2 为引物扩增 EspB 基因, 以 P1、P3 为引物扩增 EspBN 基因, 连接产物分别连接到质粒 pGEX-4T-1, 对重组质粒进行 PCR 鉴定、双酶切鉴定和 DNA 测序鉴定。

2.2 重组蛋白的诱导、纯化及鉴定 挑选含 pGEX-4T-1-EspB、pGEX-4T-1-EspBN 及 pGEX-4T-1 空质粒转染 BL21 (DE3) 单菌落接种于 5 mL 含 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基, 于 37 $^{\circ}$ C 空气浴摇床以 160 r/min 培养 12~16 h。吸取 50 μ L 菌液加入 5 mL 含 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基, 于 37 $^{\circ}$ C 空气浴摇床以 160 r/min 培养 3 h 电泳。加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L 或不加 IPTG, 继续放入空气浴摇床以 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 诱导表达 5 h。收集菌液离心, 用 PBS 溶液重悬菌体沉淀, 煮沸后取上清进行 SDS-PAGE 分析。根据 GST 标签蛋白纯化试剂盒说明书纯化 GST-EspB 蛋白、GST-EspBN 蛋白及切除 GST 标签蛋白后的 EspB 蛋白、EspBN 蛋白。取纯化蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析及 Western blot 鉴定。

2.3 动物免疫 将 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠随机分成 3 组, 分别为 PBS 对照组, EspB 组, EspBN 组, 每组 15 只。取 25 μ g 蛋白 (EspB 蛋白或 EspBN 蛋白) 溶于 100 μ L PBS 溶液并与等体积的弗氏不完全佐剂混合,

注射于小鼠颈背部皮下注射。PBS组小鼠注射100 μ L PBS溶液与等体积弗氏不完全佐剂。初次免疫后14、28 d进行加强免疫。免疫期间密切观察各组小鼠的精神状态、平均体重的动态变化、饮食及注射部位皮肤的变化。

2.4 免疫鼠血清抗体滴度测定 每组小鼠每次随机取5只分别于末次免疫后第14、28、42 d内眦取血,分离血清,以EspB蛋白或EspBN蛋白为包被抗原,采用ELISA方法测定血清性抗体滴度。以样品测定孔 A_{450} 值/对照孔 A_{450} 值 ≥ 2.1 的最高稀释倍数为抗体效价,并计算 \log_2 (抗体效价/1000)的值。

2.5 脾淋巴细胞增殖试验 每次采血后的小鼠处死后于无菌条件下取脾,分离脾淋巴细胞,适当稀释后接种在96孔板,空白对照孔不接种任何细胞,每孔加入0.5 μ g EspB蛋白或EspBN蛋白,置于CO₂培养箱37 $^{\circ}$ C、5% CO₂条件下培养20 h;每孔加入10 μ L CCK-8,继续孵育4 h,用酶标仪测定各孔450 nm处的吸光度A值,计算刺激指数(SI)。SI=试验孔 A_{450} 平均值/PBS对照孔 A_{450} 平均值。

2.6 细胞因子诱导及含量测定 将免疫小鼠脾淋巴细胞接种于6孔板中,每孔加入终浓度5 μ g/mL EspB蛋白或EspBN蛋白,置于CO₂培养箱37 $^{\circ}$ C、5% CO₂条件下培养48 h,收集培养上清,采用小鼠IL-4检测试剂盒检测IL-4水平,采用小鼠INF- γ 检测试剂盒检测INF- γ 水平。

结 果

1 重组质粒 pGEX-4T-1-EspB、pGEX-4T-1-EspBN 的构建与鉴定

PCR扩增目的基因,扩增产物经0.8%琼脂糖凝胶电泳分析,EspB基因、EspBN基因PCR产物分别为1 000、1 400 bp,片段大小与理论值相一致。EspB基因(EspBN基因)与pGEX-4T-1质粒连接后转化DE3,随机挑选阳性克隆提取质粒,经限制性核酸内切酶EcoRI、XhoI双酶切,0.8%琼脂糖凝胶电泳结果证实EspB基因(EspBN基因)所对应大小的片段插入到pGEX-4T-1质粒(图1)。DNA测序表明重组质粒构建成功。

2 重组蛋白的诱导表达、纯化及鉴定

含重组质粒菌株经IPTG诱导后,按GST标签蛋白纯化试剂盒纯化,所得产物经SDS-PAGE电泳分析,GST-EspB蛋白、EspB蛋白、GST-EspBN蛋白、EspBN蛋白所对应的相对分子质量分别为 85×10^3 、 60×10^3 、 75×10^3 、 50×10^3 ,与预期大小相符。Western blot检测显示GST-EspB蛋白、GST-EspBN蛋白均能被兔抗GST标签单克隆抗体识别(图2)。

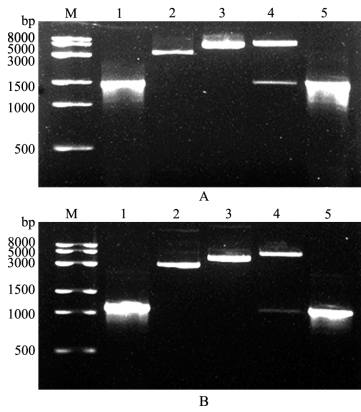


图1 重组质粒 pGEX-4T-1-EspB 及 pGEX-4T-1-EspBN 的酶切鉴定图谱

A PCR amplification of EspB gene and enzyme digestion identification of recombinant plasmids pGEX-4T-1-EspB M Protein molecular weight standard 1 PCR amplification of EspB gene 2 pGEX-4T-1 plasmid 3 Recombinant plasmid pGEX-4T-1-EspB 4 The recombinant plasmid pGEX-4T-1-EspB was digested by EcoRI and XhoI 5 The recombinant plasmid pGEX-4T-1-EspB was amplified by PCR B PCR amplification of EspBN gene and Enzyme digestion identification of recombinant plasmids pGEX-4T-1-EspBN M Protein molecular weight standard 1 PCR amplification of EspBN gene 2 pGEX-4T-1 plasmid 3 Recombinant plasmid pGEX-4T-1-EspBN 4 The recombinant plasmid pGEX-4T-1-EspBN was digested by EcoRI and XhoI 5 The recombinant pGEX-4T-1-EspBN was amplified by PCR

Fig. 1 Enzyme digestion identification map of recombinant plasmids pGEX-4T-1-EspB and pGEX-4T-1-EspBN

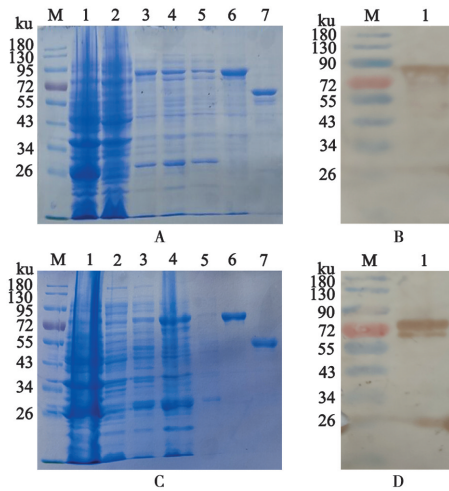
3 免疫小鼠血清的抗体特异性分析

以GST-EspB蛋白、EspB蛋白为抗原,以EspB蛋白、EspBN蛋白免疫BALB/c小鼠血清为一抗,HRP-羊抗小鼠IgG为二抗进行Western blot,检测免疫血清的抗体特异性,结果见图3。GST-EspB蛋白、EspB蛋白均能被经切除GST标签EspB蛋白免疫BALB/c小鼠血清识别;GST-EspBN蛋白、EspBN蛋白均能被经EspBN蛋白免疫BALB/c小鼠血清识别。

4 免疫鼠血清抗体滴度

采用间接ELISA法测定EspB蛋白、EspBN免疫BALB/c小鼠血清总IgG、IgG1、IgG2a抗体效价。其中,EspB组在各监测时间点血清总IgG滴度较稳定,EspBN组有轻微上升趋势。末次免疫后14 d和28 d,EspB组特异性抗血清总IgG高于EspBN组(t 值分别为4.38和3.29,均 $P < 0.05$),末次免疫后42 d两组比较差异无统计学意义($t = 0.00, P > 0.05$)(图4A)。血清IgG1 EspB组呈先下降,再回升的趋势;

EspBN 组较稳定; EspB 组末次免疫后第 28 d 低于 EspBN 组 ($t=4.90, P<0.05$), 末次免疫后 42 d 两组比较差异无统计学意义 ($t=0.61, P>0.05$) (图 4B)。血清 IgG2a EspB 组开始先呈上升趋势, 后趋于稳定; EspBN 组较稳定; EspB 组末次免疫后 14 d 低于 EspBN 组 ($t=5.77, P<0.05$), 末次免疫后 28 d 两组比较差异无统计学意义 ($t=1.73, P>0.05$) (图 4C)。EspB 组血清 IgG2a/IgG1 值在末次免疫后 14 d 低于 EspBN 组 ($t=4.71, P<0.05$), 末次免疫后 28 d 高于 EspBN 组 ($t=4.24, P<0.05$), 末次免疫后 42 d 差异无统计学意义 ($t=0.00, P>0.05$) (图 4D)。

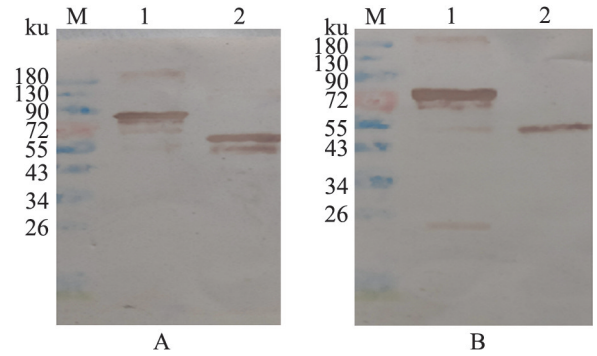


A EspB 蛋白 SDS-PAGE 电泳分析 M 蛋白质分子质量标准 1 IPTG 诱导的 pGEX-4T-1 质粒转化菌 2 未诱导的重组质粒 pGEX-4T-1-EspB 转化菌 3 IPTG 诱导的重组质粒 pGEX-4T-1-EspB 转化菌裂解上清 4 裂解上清柱层析流穿液 5 柱层析洗涤液 6 柱层析 GST-EspB 蛋白 7 EspB 蛋白 B GST-EspB 蛋白 Western blot 检测 M 蛋白质分子质量标准 1 GST-EspB 蛋白与相应抗体反应条带 C EspBN 蛋白 SDS-PAGE 电泳分析 M 蛋白质分子质量标准 1 IPTG 诱导的 pGEX-4T-1 空质粒转化菌 2 未诱导的重组质粒 pGEX-4T-1-EspBN 转化菌 3 IPTG 诱导的重组质粒 pGEX-4T-1-EspBN 转化菌裂解上清 4 裂解上清柱层析流穿液 5 柱层析洗涤液 6 柱层析纯化的 GST-EspBN 蛋白 7 EspBN 蛋白 D GST-EspBN 蛋白 Western blot 检测 M 蛋白质分子质量标准 1 GST-EspBN 蛋白与相应抗体反应条带

图 2 EspB 及 EspBN 蛋白的表达及纯化分析

A SDS-PAGE electrophoresis of EspB M Protein molecular weight standard 1 Induced pGEX-4T-1 plasmid strain 2 Uninduced strain containing recombinant plasmid pGEX-4T-1-EspB 3 The lysate supernatant of the induced strain containing recombinant plasmid pGEX-4T-1-EspB 4 Flow through liquid of cracking supernatant 5 Washing solution 6 GST-EspB protein 7 EspB protein B GST-EspB protein was detected by Western blot M Protein molecular weight standard 1 GST-EspB protein; C: SDS-PAGE electrophoresis of espbn M Protein molecular weight standard 1 Induced pGEX-4T-1 plasmid strain 2 Uninduced strain containing recombinant plasmid pGEX-4T-1-EspBN 3 The lysate supernatant of the induced strain containing recombinant plasmid pGEX-4T-1-EspBN 4 Flow through liquid of cracking supernatant 5 Washing solution 6 GST-EspBN protein 7 EspBN protein; D: GST-EspBN protein was detected by Western blot M Protein molecular weight standard 1 GST-EspBN protein

Fig. 2 Expression and purification analysis of EspB and EspBN proteins

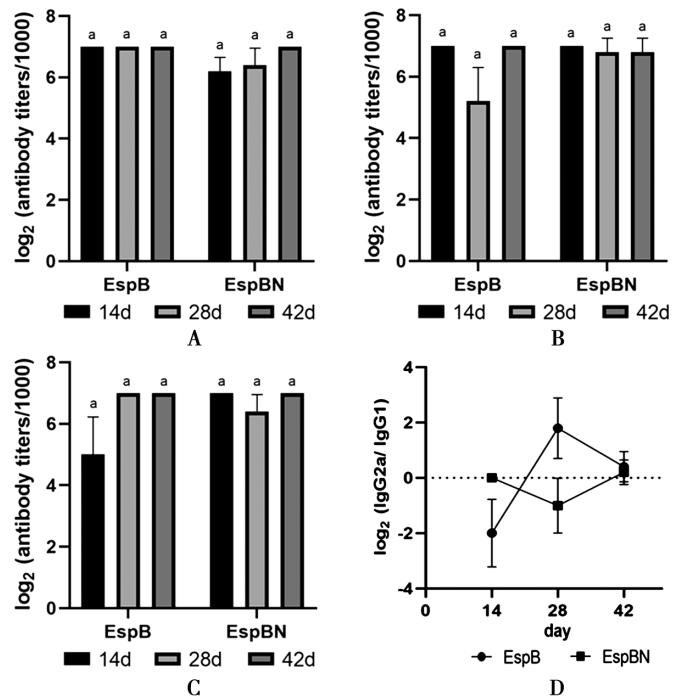


A EspB 免疫小鼠血清-Western blot M 蛋白质分子质量标准 1 抗血清与 ST-EspB 反应条带 2 抗血清与 EspB 反应条带 B EspBN 免疫小鼠血清 Western blot M 蛋白质分子质量标准 1 抗血清与 GST-EspBN 反应条带 2 抗血清与 EspBN 反应条带。

图 3 Western blot 检测 EspB 及 EspBN 免疫小鼠血清的特异性

A Mouse antiserum immunized with EspB M Protein molecular weight standard 1 GST-EspB protein 2 EspB protein B EspBN immunized mouse antiserum M Protein molecular weight standard 1 GST-EspBN protein 2 EspBN protein

Fig. 3 Specificity of mouse antiserum immunized with EspB and EspBN protein detected by Western blot



A 血清总 IgG 滴度 B 血清总 IgG1 滴度 C 血清 IgG2a 滴度 D 血清特异性 IgG2a/IgG1 比值。^a 与 PBS 组比较, $P<0.05$ 。

图 4 小鼠抗血清总 IgG 及亚型分析

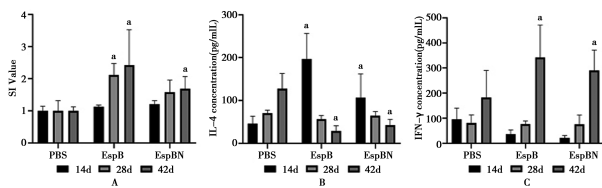
A Serum total IgG titer B Serum total IgG1 titer C Serum IgG2a titer D Serum specific IgG 2a/ IgG 1 ratio. ^a It indicates that there is difference compared with PBS group ($P<0.05$).

Fig. 4 Analysis of total IgG and subtype of mouse antiserum

5 脾淋巴细胞增殖活性及细胞因子释放检测

经 EspB 蛋白、EspBN 免疫 BALB/c 小鼠的脾淋巴细胞在相应同种抗原刺激下体外继续培养, 通过 CCK8 试验检测小鼠脾淋巴细胞增殖情况, 结果如图 18。末次免疫 28 d, EspB 组小鼠脾淋巴细胞增殖活性

显著高于 PBS 组 (q 值分别为 5.64, 7.17, 均 $P < 0.05$); 末次免疫后 42 d, EspBN 组小鼠脾淋巴细胞增殖活性高于 PBS 组 ($q = 3.47, P < 0.05$), 且 EspB 组小鼠脾淋巴细胞增殖活性高于 EspBN 组 ($q = 3.70, P < 0.05$)。EspB 组、EspBN 组在整个实验过程中脾淋巴细胞增殖活性有增大趋势(图 5A)。免疫小鼠的脾淋巴细胞体外经相应抗原再次刺激后继续培养 48 h 后, 收集上清, 采用小鼠 IL-4 检测试剂盒检测上清中 IL-4 释放水平, EspB 组与 EspBN 组均呈降低趋势, 其中在末次免疫后 14 d 显著高于 PBS 组 (q 值分别为 10.80, 4.34, 均 $P < 0.05$), 末次免疫后 42 d 显著低于 PBS 组 (q 值分别为 7.08, 6.12, 均 $P < 0.05$) (图 5B)。采用小鼠 INF- γ 检测试剂盒检测上清中 INF- γ 释放水平, EspB 组与 EspBN 组均呈升高趋势, 其中在末次免疫后 42 d 显著高于 PBS 组 (q 值分别为 5.37, 3.61, $P < 0.05$) (图 5C)。



注: a 与 PBS 组比较, $P < 0.05$ 。

图 5 脾淋巴细胞增殖检测

Notes: It indicates that there is difference compared with PBS group, $P < 0.05$ 。

Fig. 5 Detection of splenic lymphocyte proliferation

讨论

在所有卡介苗菌株中均缺失 RD1 区, 而其它结核杆菌复合菌株中均未缺失, 该区域的缺失被认为是 BCG 减毒的主要原因^[11]。RD1 区基因编码的蛋白构成 ESX-1 分泌系统。ESAT-6 是最先被发现的由该系统分泌的蛋白, 被认为是结核分枝杆菌的免疫优势抗原和疫苗候选分子^[12]。EspB 是 ESX-1 分泌系统的重要分泌蛋白之一。该蛋白既能以完整蛋白的形式充当 ESAT-6 的分泌通道^[13], 又可以在 MycP1 的作用下被水解成两个部分, 以 EspBN 的形式分泌。在结核分枝杆菌感染宿主的过程中, EspB 蛋白的上两种形式同时存在^[14]。目前, 该蛋白的免疫原性尚未完全阐明。

pGEX-4T-1 质粒能够高效表达可溶性 GST 融合蛋白, 可通过 GST 层析柱快速纯化^[15] 得到较高纯度的重组蛋白, 为动物试验奠定了基础。弗氏不完全佐剂是油包水乳剂, 不可代谢, 并不含卡介苗成份^[16]。其包被抗原免受代谢过程的破坏, 使抗原持久、缓慢释放, 促进抗体形成。本研究将目的蛋白与佐剂联合免疫动物后, 小鼠能够自由活动, 正常饮水、饮食, 未出现明显消瘦和肥胖, 处于健康状态, 表明目的蛋白与弗氏

不完全佐剂联用接种小鼠是安全的。

通常结核分枝杆菌诱导机体产生的 Th1 型免疫反应是抗结核病必需的保护性免疫^[17], 一般用 IgG2a 和 IFN- γ 水平作为评价指标^[18-21], 而 Th2 型反应以 IgG1 和 IL-4 水平为评价指标^[22-24]。本研究结果显示, EspB 蛋白组与 EspBN 蛋白组血清特异性抗体总 IgG、IgG1、IgG2a 滴度在不同时间点均显著高于 PBS 组, 表明两种蛋白无可引起强烈且持久的的体液免疫反应, 具有较强的免疫原性。EspB 组血清 IgG2a/IgG1 比值在末次免疫后 28 d 达到峰值, EspBN 组比值 IgG2a/IgG1 基本接近 1。提示 EspB 蛋白引起的免疫反应有从 Th2 型免疫反应转向 Th1 型免疫反应的趋势。

在末次免疫后 28 d 和 42 d, EspB 蛋白组及 EspBN 蛋白组小鼠脾淋巴细胞增殖活性显著高于 PBS 对照组。表明 EspB 蛋白及 EspBN 蛋白免疫小鼠能够产生记忆淋巴细胞, 在同种抗原再刺激后迅速增殖。两种蛋白组的小鼠脾淋巴细胞以及培养液中 IFN- γ 水平高于 PBS 组, 表明 EspB 蛋白和 EspBN 蛋白均可诱导产生 Th1 型免疫反应^[25-27]。同时, 两种蛋白免疫组的 IL-4 水平呈下降趋势, 也提示蛋白免疫动物后趋向产生 Th1 型免疫反应。

本研究通过原核表达获得 EspB 蛋白及 EspBN 蛋白重组蛋白, 两种蛋白接种小鼠后均能诱导体液免疫和细胞免疫应答, 表明 EspB 蛋白具有较强免疫原性, 可作为亚单位疫苗或基因重组卡介苗的候选抗原。

【参考文献】

- [1] WHO. Global tuberculosis report 2021 [R]. Geneva: World Health Organization, 2021.
- [2] Scriba TJ, Netea MG, Ginsberg AM. Key recent advances in TB vaccine development and understanding of protective immune responses against *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Semin Immunol, 2020(50):101431.
- [3] Champion PA, Stanley SA, Champion MM, et al. C-terminal signal sequence promotes virulence factor secretion in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Science, 2006, 313 (5793): 1632-1636.
- [4] Abdallah AM, Gey VPN, Champion PA, et al. Type VII secretion-mycobacteria show the way [J]. Nat Rev Microbiol, 2007, 5(11):883-891.
- [5] Gao LY, Guo S, McLaughlin B, et al. A mycobacterial virulence gene cluster extending RD1 is required for cytolysis, bacterial spreading and ESAT-6 secretion [J]. Mol Microbiol, 2004, 53 (6):1677-1693.
- [6] Wagner JM, Evans TJ, Chen J, et al. Understanding specificity of the mycosin proteases in ESX/type VII secretion by structural and functional analysis [J]. J Struct Biol, 2013, 184(2):115-128.
- [7] Solomonson M, Setiাপutra D, Makepeace K, et al. Structure of EspB from the ESX-1 type VII secretion system and insights

- into its export mechanism[J]. *Structure*, 2015, 23(3):571-583.
- [8] Ohol YM, Goetz DH, Chan K, et al. *Mycobacterium tuberculosis* MycP1 protease plays a dual role in regulation of ESX-1 secretion and virulence[J]. *Cell Host Microbe*, 2010, 7(3):210-220.
- [9] 李浩. 结核分枝杆菌 ESAT-6 与 EspB 蛋白调控巨噬细胞功能的初步研究[D]. 北京:中国人民解放军军事医学科学院, 2011.
- [10] 屈野. 结核分枝杆菌 ESX-1 分泌蛋白调控巨噬细胞功能的研究[D]. 北京:中国人民解放军军事医学科学院, 2013.
- [11] Agerbeck H, Ruhwald M, Hoff S T, et al. Interaction between C-Tb and PPD given concomitantly in a split-body randomised controlled trial[J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2019, 23(1):38-44.
- [12] Pym AS, Brodin P, Majlessi L, et al. Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis[J]. *Nat Med*, 2003, 9(5):533-539.
- [13] Kaufmann S. Vaccination against tuberculosis: Revamping BCG by molecular genetics guided by immunology [J]. *Front Immunol*, 2020(11):316.
- [14] Yi X H, Zhang B, Fu YR, et al. STAT1 and its related molecules as potential biomarkers in *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(5):2866-2878.
- [15] Dominari A, Hathaway ID, Pandav K, et al. Thymosin alpha 1: A comprehensive review of the literature[J]. *World J Virol*, 2020, 9(5):67-78.
- [16] Llanos SS, Castillo SL, Castaneda M G, et al. GspD, the type II secretion system secretin of *Leptospira*, protects hamsters against lethal infection with a virulent *L. interrogans* isolate [J]. *Vaccines (Basel)*, 2020, 8(4):759.
- [17] McLaughlin TA, Khayumbi J, Ongalo J, et al. CD4 T Cells in *Mycobacterium tuberculosis* and *Schistosoma mansoni* co-infected individuals maintain functional TH1 responses [J]. *Front Immunol*, 2020(11):127.
- [18] Arora SK, Alam A, Naqvi N, et al. Immunodominant *Mycobacterium tuberculosis* protein Rv1507A elicits Th1 response and modulates host macrophage effector functions[J]. *Front Immunol*, 2020(11):1199.
- [19] Radwanska M, Nguyen HTT, Magez S. African trypanosomiasis obliterates DTPa vaccine-induced functional memory so that post-treatment *Bordetella pertussis* challenge fails to trigger a protective recall response[J]. *Vaccines*, 2021, 9(6):603.
- [20] Ji Z, Jian M, Chen T, et al. Immunogenicity and safety of the M72/AS01E candidate vaccine against tuberculosis: a meta-analysis[J]. *Front Immunol*, 2019(10):02089.
- [21] Jeremiah K, Lyimo E, Ritz C, et al. Prevalence of *Mycobacterium tuberculosis* infection as measured by the QuantiFERON-TB Gold assay and ESAT-6 free IGRA among adolescents in Mwanza, Tanzania[J]. *PLoS One*, 2021, 16(6):e252808.
- [22] Wang W, Sung N, Gilman-Sachs A, et al. T helper (Th) cell profiles in pregnancy and recurrent pregnancy losses: Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Tfh Cells [J]. *Front Immunol*, 2020(11):2005.
- [23] Pooran A, Davids M, Nel A, et al. IL-4 subverts mycobacterial containment in *Mycobacterium tuberculosis* infected human macrophages[J]. *Eur Respir J*, 2019, 54(2):1802242.
- [24] Chung AW, Mabuka JM, Ndlovu B, et al. Viral control in chronic HIV-1 subtype C infection is associated with enrichment of p24 IgG1 with Fc effector activity[J]. *AIDS*, 2018, 32(10):1207-1217.
- [25] Ullah N, Hao L, Wu Y, et al. Differential immunogenicity and protective efficacy elicited by MTO- and DMT- adjuvanted CMFO subunit vaccines against *Mycobacterium tuberculosis* Infection[J]. *J Immunol Res*, 2020(2020):1-8.
- [26] Amiano NO, Morelli MP, Pellegrini JM, et al. IFN- γ and IgG responses to *Mycobacterium tuberculosis* latency antigen Rv2626c differentiate remote from recent tuberculosis infection [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):7472.
- [27] Wang Y, Li Z, Wu S, et al. Systematic evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* proteins for antigenic properties identifies Rv1485 and Rv1705c as potential protective subunit vaccine candidates[J]. *Infect Immun*, 2021, 89(3):e00585-20.

【收稿日期】 2022-12-20 【修回日期】 2023-03-05

(上接 676 页)

- [14] Yogavel M, Tripathi T, Gupta A, et al. Atomic resolution crystal structure of glutaredoxin 1 from *Plasmodium falciparum* and comparison with other glutaredoxins[J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2014, 70(Pt 1):91-100.
- [15] Song X, Yan M, Hu D, et al. Molecular characterization and serodiagnostic potential of a novel dithiol glutaredoxin 1 from *Echinococcus granulosus*[J]. *Parasit Vectors*, 2016(9):456.
- [16] Balatti GE, Barletta GP, Parisi G, et al. Intrinsically disordered region modulates ligand binding in glutaredoxin 1 from *Trypanosoma brucei*[J]. *J Phys Chem B*, 2021, 125(49):13366-13375.
- [17] Discola KF, de Oliveira MA, Rosa Cussiol JR, et al. Structural aspects of the distinct biochemical properties of glutaredoxin 1 and glutaredoxin 2 from *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *J Mol Biol*, 2009, 385(3):889-901.
- [18] Song X, Yang X, Xue Y, et al. Glutaredoxin 1 deficiency leads to microneme protein-mediated growth defects in *Neospora caninum* [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11:536044.
- [19] Yang RS, Xu F, Wang YM, et al. Glutaredoxins regulate maize inflorescence meristem development via redox control of TGA transcriptional activity[J]. *Nat Plants*, 2021, 7(12):1589-1601.
- [20] Sousa SF, Neves RPP, Waheed SO, et al. Structural and mechanistic aspects of S-S bonds in the thioredoxin-like family of proteins[J]. *Biol Chem*, 2019, 400(5):575-587.
- [21] Deponte M. The incomplete glutathione puzzle: Just guessing at numbers and figures? [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2017, 27(15):1130-1161.
- [22] Bushweller JH, Aslund F, Wuthrich K, et al. Structural and functional characterization of the mutant *Escherichia coli* glutaredoxin (C14-S) and its mixed disulfide with glutathione [J]. *Biochemistry*, 1992, 31(38):9288-9293.

【收稿日期】 2022-12-28 【修回日期】 2023-03-08