

DOI:10.13350/j.cjpb.240120

• 综述 •

## 结核分枝杆菌毒力因子 ESAT-6 和 CFP-10 的研究进展\*

高利<sup>1,2</sup>, 罗丽莎<sup>1</sup>, 吴新雅<sup>1,2</sup>, 马玮洁<sup>1,2</sup>, 钟蕾<sup>1,2</sup>, 柳爱华<sup>1,3\*\*</sup>, 宝福凯<sup>1,2\*\*</sup>

(1. 昆明医科大学云南省高校热带传染病重点实验室, 云南昆明 65050;

2. 昆明医科大学病原生物学与免疫学系; 3. 昆明医科大学生物化学与分子生物学系)

**【摘要】** ESAT-6 和 CFP-10 是结核分枝杆菌中含量丰富的毒力因子, 分别由 RD1 区相邻的基因 *esxA* 和 *esxB* 编码, 二者可以协同转录形成紧密二聚体。此二聚体在破坏宿主的免疫应答、发挥毒性、参与吞噬溶酶体到宿主细胞质的易位、激活嗜中性粒细胞发挥趋化作用等生物学作用中扮演着重要角色。ESAT-6 和 CFP-10 有良好的免疫原性, 可应用于结核病的诊断和疫苗研究。进一步探索它们的分子结构和致病机制可为结核病的预防、诊断和治疗提供新思路。

**【关键词】** ESAT-6; CFP-10; 结核病; 致病机制; 诊断; 疫苗; 综述

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2024)01-0096-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2024 Jan;19(1):96-100.]

**Advances in the virulence factors ESAT-6 and CFP-10 of *Mycobacterium tuberculosis***

GAO Li<sup>1,2</sup>, LUO Lisha<sup>1</sup>, WU Xinya<sup>1,2</sup>, MA Weijie<sup>1,2</sup>, ZHONG Lei<sup>1,2</sup>, LIU Aihua<sup>1,3</sup>, BAO Fukai<sup>1,2</sup> (1. *Yunnan Province Key Laboratory for Tropical Infectious Diseases in Universities, Kunming Medical University, Kunming 650500, China*; 2. *Department of Microbiology and Immunology, Kunming Medical University*; 3. *Department of Biochemistry and Molecular Biology, Kunming Medical University*)

**【Abstract】** ESAT-6 and CFP-10 are abundant virulence factors in *Mycobacterium tuberculosis*, which are encoded by two adjacent *esxA* and *esxB* genes in RD1, and they can synergically transcribe to form a compact dimer. This dimer plays an important role in pathogenic mechanisms such as destroying the host immune response, exerting toxicity, participating in the translocation of phagolysosomes into the host cytoplasm, and activating neutrophils to exert chemotaxis. In addition, ESAT-6 and CFP-10 can be used in the diagnosis and vaccine research of tuberculosis since they are immunogenic. Further exploration of their molecular structure and pathogenesis may provide new ideas for the prevention, diagnosis and treatment of tuberculosis.

**【Key words】** ESAT-6; CFP-10; tuberculosis; pathogenic mechanism; diagnosis; vaccine; review

\*\*\*结核病 (Tuberculosis, TB) 是由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 引起的慢性传染病, 该病长期以来严重威胁着人类健康, 可侵及许多脏器, 以肺部感染最为常见。据 2022 年 WHO 报道, 2021 年全球范围内约有 640 万例结核病新发病例, 死亡人数达 160 万人。我国的发病者数 (7.4%) 位列世界第三, 是全球 30 个结核病高负担国家之一<sup>[1]</sup>。由于耐药性结核病的出现, 以及结核病与艾滋病合并感染, 结核病治愈率十分不理想。因此, 进一步探索 MTB 的致病机制、开展结核病防治相关研究有着极其深远的意义。本综述对 MTB 中含量丰富的毒力因子早期分泌性抗原靶 (6 kDa early secretory antigenic target, ESAT-6) 和培养滤液蛋白 10 (culture filtrate protein 10, CFP-10) 的研究进展进行总结。

**1 基因定位与分子结构**

**1.1 基因定位** MTB 编码的 VII 型蛋白分泌系统的五个基因簇 (ESX-1 至 ESX-5) 与其致病性有关<sup>[2]</sup>, 其中病原体主要通过 ESX-1 分泌系统操纵宿主细胞在感染过程中的反应<sup>[3]</sup>。ESAT-6 和其伴侣蛋白 CFP10 是 MTB 的 ESX-1 分泌毒力因子中最丰富的蛋白之一, 其相对分子质量分别为 6 ku 和 10 ku。编码 ESAT-6 和 CFP-10 的基因相邻, 分别为 *esxA* 和 *esxB*, 二者均位于 MTB 的差异区域 1 (region of difference 1,

RD1) 基因位点上, 并且可以协同转录<sup>[4]</sup>, 形成紧密的 CFP-10 与 ESAT-6 同源二聚体<sup>[5]</sup>。

**1.2 分子结构** ESAT-6 与 CFP-10 形成的紧密二聚体, 主要由两个相似的螺旋-转角-螺旋发夹结构组成<sup>[6]</sup>, 这些结构由单个蛋白质形成, 它们具有广泛的疏水性, 彼此反平行排列, 形成四个螺旋。发夹结构中的两个长螺旋由 CFP-10 中的残基 Ala8 - Gln40 和 Ala47 - Ala79 以及 ESAT-6 中的 Phe8 - Trp43 和 Glu49 - Ala79 形成。此二聚体的显著特征是两种蛋白的 N-末端和 C-末端为无序结构 (CFP-10 中的残基 2-5 和 86-100, ESAT-6 中的残基 1-3 和 86-95), 形成了长期的柔性臂并位于四螺旋束的两端。其中, CFP-10 的柔性 C 端中第 85-95 位残基可能参与宿主细胞靶蛋白的相互作用<sup>[7]</sup>。

\* **【基金项目】** 国家自然科学基金资助项目 (No. 40121013, 81860644, 81560596)。

\*\* **【通讯作者】** 柳爱华, E-mail: liuaihua@kmmu.edu.cn  
宝福凯, E-mail: baofukai@kmmu.edu.cn

**【作者简介】** 高利 (1999-), 女, 云南大理人, 在读硕士研究生, 主要从事结核病的研究。  
E-mail: gaoli18469146422@163.com

## 2 生物学作用

### 2.1 破坏宿主的免疫应答并发挥毒性

**2.1.1 干扰宿主细胞防御** 当宿主受到病原体入侵,机体的第一道免疫防线是巨噬细胞。病原体通过识别与胞吞作用进入巨噬细胞,巨噬细胞的细胞膜发生闭合,形成吞噬溶酶体。在不断融合与成熟的过程中,吞噬体的内环境逐渐酸化,多种蛋白水解酶被激活,可降解病原体。为了对抗在细胞外或细胞内水平遇到的酸介导的防御机制,MTB已经进化出一系列策略,首先影响宿主巨噬细胞,使溶酶体不能与吞噬体融合成吞噬溶酶体,阻断吞噬体成熟<sup>[8]</sup>,控制吞噬体酸化<sup>[9]</sup>,使其成为适宜繁殖的环境。随后,MTB能够在ESX-1 VII型分泌系统的作用下诱导吞噬体破裂<sup>[10]</sup>。这与CFP-10和ESAT-6在促进MTB从宿主吞噬溶酶体逃逸到宿主细胞质的功能相关,研究表明在酸性条件下ESAT-6与CFP-10发生解离,并且能溶解宿主细胞膜<sup>[11]</sup>。此外,ESAT-6还可驱动单核细胞分化。有研究表明,在感染早期,ESAT-6通过诱导驱动非M0巨噬细胞和抗炎M2巨噬细胞向促炎M1型巨噬细胞分化,促进了原发性先天性肉芽肿的形成。而在感染后期,ESAT-6诱导完全活化的巨噬细胞从M1向免疫调节M2表型转变,使肉芽肿功能对其有利而对宿主不利<sup>[12]</sup>。

**2.1.2 破坏宿主的免疫应答** ESAT-6和CFP10的分泌可能破坏宿主对结核分枝杆菌感染的免疫反应,研究表明,ESAT-6抑制TLR信号通路及转录因子NF- $\kappa$ B和干扰素调节因子(IRF)的激活,可能限制先天免疫反应<sup>[13]</sup>。此外,ESAT-6还可通过独立于细胞毒性或凋亡的机制减少T细胞IFN- $\gamma$ 分泌,直接抑制T细胞反应<sup>[14]</sup>。Sreejit等<sup>[15]</sup>使用酵母双杂交检测系统发现,ESAT-6能够进入内质网(endoplasmic reticulum, ER)与 $\beta$ 2-微球蛋白(beta-2-microglobulin,  $\beta$ 2M)相互作用,抑制 $\beta$ 2M与MHC-I分子结合,导致MHC-I- $\beta$ 2M复合物的表达降低,从而抑制抗原衍生肽加载到MHC-I复合物上,使其介导的抗原呈递受到影响。

**2.1.3 对宿主发挥毒性** 结核分枝杆菌的细胞壁是包围在细菌表面的多孔膜,由短肽链和聚糖形成的聚合物,通过交联形成具有弹性的大分子,催化酶和分泌产物可通过MTB的细胞壁中释放出来,其多为毒力因子。研究表明MTB的分泌产物中有多种蛋白,如过氧化氢酶-过氧化物酶(catalase-peroxidase, KatG)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SodA)、 $\alpha$ -晶体蛋白(alpha-crystallin, HspX)、谷氨酰胺合成酶、ESAT-6和CFP-10等<sup>[16,17]</sup>。

Behr等<sup>[18]</sup>通过比较结核分枝杆菌、牛分枝杆菌和BCG子代菌株的基因组,发现致病性的结核分枝杆菌的基因序列与BCG基因序列相比较存在16个差异区域(region of differences, RDs),差异区域为RD1-RD16,其中RD1存在于结核分枝杆菌和牛分枝杆菌的所有有毒成员中,而在卡介苗菌株中是不存在的。ESAT-6、CFP-10以及ESX-1系统都被编码在RD1的基因组位点上<sup>[19]</sup>,因此它们都是结核病致病性研究的焦点。在ESAT-6和CFP-10的基因缺失突变体均显示宿主的细胞溶解性和细胞毒性降低,并且在感染后期细胞内生长明显下降,细菌以低速率感染宿主,结核分枝杆菌的毒力显著减弱<sup>[20]</sup>。将RD1区域插入BCG菌株中,CFP-10和ESAT-6的

表达恢复会导致细菌的毒性和免疫原性增加<sup>[21]</sup>。

**2.2 激活嗜中性粒细胞诱导炎症反应**多种因素可间接招募嗜中性粒细胞至感染部位,如MTB释放的N-乙酰化肽可通过与甲酰肽受体1(formyl peptide receptor 1, FPR1)作用直接吸引中性粒细胞<sup>[22]</sup>,以及ESAT-6诱导嗜中性粒细胞趋化因子IL-8的产生<sup>[23]</sup>等多种方式。Welin等<sup>[24]</sup>通过研究发现CFP-10通过百日咳毒素敏感的趋化性受体选择性激活人类嗜中性粒细胞。ESAT-6:CFP-10复合物或CFP-10单体均可以通过百日咳毒素敏感的G蛋白偶联受体触发嗜中性粒细胞内Ca<sup>2+</sup>的瞬间释放,而细胞内Ca<sup>2+</sup>的短暂升高是中性粒细胞和其他白细胞激活的基本信号的初始信号<sup>[25]</sup>,在参与G蛋白偶联受体的激活过程时,该反应伴随着嗜中性粒细胞趋化性和产生超氧化物的NADPH氧化酶的活化。由于单核细胞和淋巴细胞在受到结核分枝杆菌蛋白刺激后未能被激活,说明CFP-10对中性粒细胞激活具有特异性。该研究表明,在MTB的早期感染过程中,CFP-10的趋化特性可特异地促进招募嗜中性粒细胞到感染部位。当MTB超过一定感染复数(multiplicity of infection, MOI)时,CFP-10和ESAT-6可降低宿主细胞的活力并且诱导细胞坏死,细胞出现大量DNA断裂、线粒体膜电位丧失以及质膜完整性丧失等,这一系列后果依赖于MTB中ESAT-6的表达<sup>[26]</sup>,而炎性小体也在这一过程中被激活,产生高水平的IL-1 $\beta$ ,从而增加了对感染的炎症反应。炎性小体的激活会引起过度的炎症和组织损伤<sup>[27]</sup>,同时也促进坏死性肉芽肿中心的形成。

## 3 诊断价值

据2022年WHO报道2020年和2021年报告的新诊断结核病人数量大幅减少(与2019年相比),表明未诊断和未治疗的结核病人数量增加,结核病的准确识别至关重要,因为它可以确保人们尽早选择最有效的治疗方案,通过培养分离结核分枝杆菌被认为是肺结核和肺外结核(EPTB)的“金标准”。然而,微生物方法耗时较长,而其他诊断方法灵敏度和特异性有限。以简单、快速和负担得起的方式诊断结核病对结核病的控制是至关重要的。CFP-10和ESAT-6等分枝杆菌抗原蛋白被认为是诊断肺结核的最佳候选物,因为抗原与参与免疫反应的分子的相互作用,它们可以帮助设计新的诊断方法。

**3.1 在皮肤测试中的应用** 使用结核菌素纯化的蛋白衍生物(tuberculin-purified protein derivative, TB-PPD)作为抗原的结核菌素皮肤测试(tuberculin skin testing, TST)已广泛用于检测结核病。然而,TST方法存有局限性,特别是由于其与某些非结核分枝杆菌和卡介苗芽孢杆菌(BCG)疫苗菌株具有交叉反应性而导致的低特异性<sup>[28]</sup>。干扰素 $\gamma$ 释放测定(Interferon gamma release assays, IGRA)是一种基于T淋巴细胞暴露于特定抗原时释放的干扰素 $\gamma$ (Interferon gamma, IFN- $\gamma$ )水平的体外方法。与TST相比,IGRA具有更好的诊断性能,但其价格昂贵且需要实验室专业知识和基础设施<sup>[29]</sup>。基于特定结核分枝杆菌抗原的新皮肤试验已经开发出来,有研究使用重组融合蛋白ESAT6-CFP10作为皮肤测试免疫原,以诊断结核分枝杆菌感染,1期试验与2期试验结果均表明重组融合蛋白ESAT6-CFP10免疫原具有良好的耐受性、安全性与诊断的准确性<sup>[30]</sup>。一项对重组ESAT6-CFP10抗原皮内注射诊断性能系统评估的荟萃分析显示,就一致性和准确性测试而言,其诊

断性能与 IGRA 或 TST 相似,似乎是比较有测试更容易获得和更可靠的替代方法<sup>[31]</sup>。此外,ESAT6-CFP10 皮试对中国合并 HIV 的结核分枝杆菌感染者的评估结果中显示其诊断价值很高,对于诊断特异性尤其明显<sup>[32]</sup>。鉴于目前诊断工具的不足,包括实验室要求、不确定的结果和高成本,ESAT6-CFP10 皮肤试验可能为诊断结核分枝杆菌提供一种合理的替代方法。

**3.2 在清学诊断中的应用** 已有多项研究报道 CFP-10 蛋白和 ESAT-6 蛋白用于结核病的血清学诊断研究<sup>[33-35]</sup>。随着指数富集的配体系统进化技术(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEX)的发展,研究者使用 SELEX 技术生成了单链 DNA 适配体 CE24 和 CE15,它们能与 CFP10-ESAT6 二聚体蛋白特异性结合<sup>[36]</sup>。核酸适配体是一段寡核苷酸序列,可折叠成特定的结构以结合小分子化学物质,蛋白质或细胞等<sup>[37]</sup>。适配体在靶标识别和多样性等应用方面类似于抗体,但比抗体具有更高的特异性和亲和力;其分子量更小;具有更简便、更经济的生产方法;更简单的化学修饰和更高的稳定性<sup>[38]</sup>。采用酶联寡聚核苷酸吸附方法(Enzyme-linked Oligonucleotide assay, ELONA)检测活动性肺结核患者、肺外结核患者和健康供体的血清样品中的 CFP-10 和 ESAT-6 蛋白,结果表明基于 CE24 和 CE15 的 ELONA 方法具有高敏感性和特异性。CE24 和 CE15 作为早期抗原诊断剂具有潜在的广泛用途,不仅可用于诊断活动性肺结核和肺外结核,而且还可用于诊断潜伏性结核感染和免疫缺陷性结核<sup>[36]</sup>。

**3.3 在免疫传感器中的应用** 免疫传感器通常用于在临床诊断中检测和定量疾病相关物质,因为它们对抗原抗体复合物的亲和力较高,具有很大的选择性。用于结核病诊断的电化学免疫传感器基于使用单克隆抗体来检测结核分枝杆菌分泌的特定蛋白质,具有成本低、便于携带、操作简单等优点<sup>[39,40]</sup>。使用 CFP10-ESAT6 作为适配体的电化学免疫传感器,在 5 至 500 ng/mL 的浓度范围内进行 CFP10-ESAT6 抗原的检测,并使用牛血清白蛋白(BSA)、MPT64 和人血清进行了特异性研究,发现检测极限为 1.5 ng/mL,特异性良好,比先前研究中报道的抗体-抗原相互作用高 7%<sup>[41]</sup>。检测临床痰样品中结核分枝杆菌,显示与高特异性和灵敏度的培养方法具有良好相关性<sup>[41-42]</sup>,表明使用 CFP10-ESAT6 作为抗原的免疫传感器有望成为检测结核分枝杆菌的候选物。

#### 4 疫苗研究

卡介苗对儿童有免疫诱导作用,而对成人肺结核的预防效果较低。因此,非常需要生产比卡介苗更有益的新疫苗来预防结核病。现在,不同的抗原被用来开发各种结核病疫苗。其中,ESAT-6 和 CFP-10 是 MTB 重要的 T 细胞抗原,能刺激机体产生特异性细胞免疫应答,并刺激免疫记忆细胞早期分泌 INF- $\gamma$ ,所以它们常被作为疫苗之候选抗原的研究对象<sup>[43]</sup>。有研究表明,使用 ESAT6-CFP10 融合蛋白后抗体滴度明显高于 BCG 或生理盐水组<sup>[44]</sup>,在感染牛分枝杆菌的小牛中诱导了有效的免疫应答,且与单独使用卡介苗相比,卡介苗与 ESAT-6; CFP-10 DNA 疫苗联合使用会诱发更严重的免疫反应<sup>[44-45]</sup>。以上研究表明 ESAT-6; CFP-10 作为加强剂的存在可以与卡介苗结合,以增加体内免疫介质的反应性。Pym 等<sup>[46]</sup>将编码 ESAT-6 和 CFP-10 的基因重组并转入 BCG,形成重组的 BCG 菌株 BCG:RDI-2F,与 BCG 组相比,BCG:RDI-2F 组的脾脏内

MTB 载量更少、结节数目与体积更小。系列使用重组融合蛋白 ESAT-6 与 CFP-10 的疫苗的研究,均显示出较好的免疫效果,如增强疫苗免疫原性、触发机体免疫反应、抑制动物内脏中 MTB 负荷、组织炎性病变减轻以及减少病灶扩散等<sup>[43-44,47]</sup>。均证明了 ESAT-6/CFP-10 重组蛋白用于抗结核分枝杆菌感染疫苗接种的重要性和实用性。同时 Mozhddeh 等使用 ESAT-6/CFP-10(约 24 ku)重组抗原作为亚单位疫苗的候选物,发现能在三种免疫途径(肌肉注射、皮下注射、鼻内注射)中引发特异性体液免疫应答,且在皮下和肌肉注射免疫动物可以诱导高水平的 INF- $\gamma$  和 IL-5,体液和细胞免疫反应均被触发<sup>[48]</sup>,表明在结核病疫苗策略中,选择合适的抗原配方和合适的免疫途径是至关重要的。

#### 5 小结与展望

ESAT-6 和 CFP-10 是 MTB 中含量丰富的毒力因子,它们参与破坏宿主的免疫应答、发挥毒性、易位和扩散、激活嗜中性粒细胞发挥趋化作用等。ESAT-6 和 CFP-10 作为有效的 T 细胞抗原,具有良好的免疫原性,可应用于皮肤测试和血清学诊断研究,以诊断活动性肺结核、肺外结核和潜伏性结核感染等。目前基于 ESAT-6 与 CFP-10 的疫苗研究在动物实验中初步显示出较好的免疫效果,但其安全性和有效性仍然是值得关注的问题,对于将其用于临床中结核病的诊断、预防与防治等方面的探索有待深入。

#### 【参考文献】

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2022. WHO report. Geneva,2022.
- [2] Uplekar S,Heym B,Friocourt V, et al. Comparative genomics of Esx genes from clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* provides evidence for gene conversion and epitope variation [J]. Infect Immun,2011,79(10):4042-4049.
- [3] Champion PA, Champion MM, Manzanillo P, et al. ESX-1 secreted virulence factors are recognized by multiple cytosolic AAA ATPases in pathogenic mycobacteria [J]. Mol Microbiol, 2009,73(5):950-962.
- [4] Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I, et al. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10) [J]. Microbiology (Reading),1998,144 ( Pt 11):3195-3203.
- [5] Meher AK,Bal NC,Chary KV, et al. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ESAT-6-CFP-10 complex formation confers thermodynamic and biochemical stability [J]. Febs J,2006,273 (7):1445-1462.
- [6] Renshaw PS, Panagiotidou P, Whelan A, et al. Conclusive evidence that the major T-cell antigens of the *Mycobacterium tuberculosis* complex ESAT-6 and CFP-10 form a tight, 1:1 complex and characterization of the structural properties of ESAT-6, CFP-10, and the ESAT-6 \* CFP-10 complex. Implications for pathogenesis and virulence [J]. J Biol Chem, 2002,277(24):21598-21603.
- [7] 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.

- [8] Philips JA, Ernst JD. Tuberculosis pathogenesis and immunity [J]. *Annu Rev Pathol*, 2012, 7:353-384.
- [9] Queval CJ, Song OR, Carralot JP, et al. *Mycobacterium tuberculosis* controls phagosomal acidification by targeting CISH-mediated signaling [J]. *Cell Rep*, 2017, 20(13):3188-3198.
- [10] Simeone R, Sayes F, Song O, et al. Cytosolic access of *Mycobacterium tuberculosis*: critical impact of phagosomal acidification control and demonstration of occurrence in vivo [J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11(2):e1004650.
- [11] 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]. *J Bacteriol*, 2007, 189(16):6028-6034.
- [12] Refai A, Gritli S, Barbouche MR, et al. *Mycobacterium tuberculosis* virulent factor ESAT-6 drives macrophage differentiation toward the pro-inflammatory M1 phenotype and subsequently switches it to the anti-inflammatory M2 phenotype [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 8:327.
- [13] 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.
- [14] Samten B, Wang X, Barnes PF. *Mycobacterium tuberculosis* ESX-1 system-secreted protein ESAT-6 but not CFP10 inhibits human T-cell immune responses [J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2009, 89 Suppl 1:S74-S76.
- [15] Sreejit G, Ahmed A, Parveen N, et al. The ESAT-6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* interacts with beta-2-microglobulin ( $\beta 2M$ ) affecting antigen presentation function of macrophage [J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(10):e1004446.
- [16] Egan AJF, Maya-Martinez R, Ayala I, et al. Induced conformational changes activate the peptidoglycan synthase PBP1B [J]. *Mol Microbiol*, 2018, 110(3):335-356.
- [17] Rodriguez-Hernandez E, Quintas-Granados LI, Flores-Villalva S, et al. Application of antigenic biomarkers for *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2020, 21(11):856-870.
- [18] Behr MA, Wilson MA, Gill WP, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray [J]. *Science*, 1999, 284(5419):1520-1523.
- [19] Raghavan S, Manzanillo P, Chan K, et al. Secreted transcription factor controls *Mycobacterium tuberculosis* virulence [J]. *Nature*, 2008, 454(7205):717-721.
- [20] 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.
- [21] Pym AS, Brodin P, Brosch R, et al. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti* [J]. *Mol Microbiol*, 2002, 46(3):709-717.
- [22] Chun T, Serbina NV, Nolt D, et al. Induction of M3-restricted cytotoxic T lymphocyte responses by N-formylated peptides derived from *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Exp Med*, 2001, 193(10):1213-1220.
- [23] Boggaram V, Gottipati KR, Wang X, et al. Early secreted antigenic target of 6 kDa (ESAT-6) protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces interleukin-8 (IL-8) expression in lung epithelial cells via protein kinase signaling and reactive oxygen species [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(35):25500-25511.
- [24] Welin A, Bjornsdottir H, Winther M, et al. CFP-10 from *Mycobacterium tuberculosis* selectively activates human neutrophils through a pertussis toxin-sensitive chemotactic receptor [J]. *Infect Immun*, 2015, 83(1):205-213.
- [25] Lew DP. Receptor signalling and intracellular calcium in neutrophil activation [J]. *Eur J Clin Invest*, 1989, 19(4):338-346.
- [26] Welin A, Eklund D, Stendahl O, et al. Human macrophages infected with a high burden of ESAT-6-expressing *M. tuberculosis* undergo caspase-1- and cathepsin B-independent necrosis [J]. *PLoS One*, 2011, 6(5):e20302.
- [27] Carlsson F, Kim J, Dumitru C, et al. Host-detrimental role of Esx-1-mediated inflammasome activation in mycobacterial infection [J]. *PLoS Pathog*, 2010, 6(5):e1000895.
- [28] Farhat M, Greenaway C, PAI M, et al. False-positive tuberculin skin tests; what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2006, 10(11):1192-1204.
- [29] Diel R, Loddenkemper R, Meywald-Walter K, et al. Predictive value of a whole blood IFN-gamma assay for the development of active tuberculosis disease after recent infection with *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 177(10):1164-1170.
- [30] Li F, Xu M, Qin C, et al. Recombinant fusion ESAT6-CFP10 immunogen as a skin test reagent for tuberculosis diagnosis: an open-label, randomized, two-centre phase 2a clinical trial [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2016, 22(10):889.e9-.e16.
- [31] Krutikov M, Faust L, Nikolayevskyy V, et al. The diagnostic performance of novel skin-based in-vivo tests for tuberculosis infection compared with purified protein derivative tuberculin skin tests and blood-based in vitro interferon- $\gamma$  release assays: a systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet Infect Dis*, 2022, 22(2):250-264.
- [32] Lu P, Wu K, Zhou H, et al. Evaluation of ESAT6-CFP10 skin test for *Mycobacterium tuberculosis* infection among persons living with HIV in China [J]. *J Clin Microbiol*, 2023, 61(4):e0181622.
- [33] 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.
- [34] Xu JN, Chen JP, Chen DL. Serodiagnosis efficacy and immunogenicity of the fusion protein of *Mycobacterium tuberculosis* composed of the 10-kilodalton culture filtrate protein, ESAT-6, and the extracellular domain fragment of PPE68 [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2012, 19(4):536-544.
- [35] Wu X, Yang Y, Zhang J, et al. Humoral immune responses against the *Mycobacterium tuberculosis* 38-kilodalton, MTB48, and CFP-10/ESAT-6 antigens in tuberculosis [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2010, 17(3):372-375.

- [36] Tang XL, Zhou YX, Wu SM, et al. CFP10 and ESAT6 aptamers as effective Mycobacterial antigen diagnostic reagents [J]. J Infect, 2014, 69(6):569-580.
- [37] Chen F, Hu Y, Li D, et al. CS-SELEX generates high-affinity ssDNA aptamers as molecular probes for hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 [J]. PLoS One, 2009, 4(12):e8142.
- [38] Kumar Kulabhusan P, Hussain B, Yuce M. Current perspectives on aptamers as diagnostic tools and therapeutic agents [J]. Pharmaceutics, 2020, 12(7):646-668.
- [39] Dong B, He Z, Li Y, et al. Improved conventional and new approaches in the diagnosis of tuberculosis [J]. Front Microbiol, 2022, 13:924410.
- [40] Mohd Bakhori N, Yusof NA, Abdullah J, et al. Surface enhanced CdSe/ZnS QD/SiNP electrochemical immunosensor for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* by combination of CFP10-ESAT6 for better diagnostic specificity [J]. Materials (Basel), 2019, 13(1):149-163.
- [41] Azmi UZM, Yusof NA, Abdullah J, et al. Aptasensor for the Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Sputum Utilising CFP10-ESAT6 Protein as a Selective Biomarker [J]. Nanomaterials (Basel), 2021, 11(9):2446-2459.
- [42] Mohd Azmi UZ, Yusof NA, Abdullah J, et al. Portable electrochemical immunosensor for detection of *Mycobacterium tuberculosis* secreted protein CFP10-ESAT6 in clinical sputum samples [J]. Mikrochim Acta, 2021, 188(1):20.
- [43] Baghani AA, Soleimanpour S, Farsiani H, et al. CFP10:mFcy2 as a novel tuberculosis vaccine candidate increases immune response in mouse [J]. Iran J Basic Med Sci, 2017, 20(2):122-130.
- [44] Zhang H, Peng P, Miao S, et al. Recombinant *Mycobacterium smegmatis* expressing an ESAT6-CFP10 fusion protein induces anti-mycobacterial immune responses and protects against *Mycobacterium tuberculosis* challenge in mice [J]. Scand J Immunol, 2010, 72(4):349-357.
- [45] Maue AC, Waters WR, Palmer MV, et al. An ESAT-6:CFP10 DNA vaccine administered in conjunction with *Mycobacterium bovis* BCG confers protection to cattle challenged with virulent *M. bovis* [J]. Vaccine, 2007, 25(24):4735-4746.
- [46] 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.
- [47] Permyakova NV, Belavin PA, Pirozhkova DS, et al. The recombinant fusion protein CFP10-ESAT6-dIFN has protective effect against tuberculosis in guinea pigs [J]. Acta Microbiol Immunol Hung, 2018, 65(1):39-58.
- [48] Namvarpour M, Tebianian M, Mansouri R, et al. Comparison of different immunization routes on the immune responses induced by *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6/CFP-10 recombinant protein [J]. Biologicals, 2019, 59:6-11.

【收稿日期】 2023-07-05 【修回日期】 2023-10-01

~~~~~  
(上接 95 页)

## 【参考文献】

- [1] Kanigalpula SPR, Murali S, Raveendranath A, et al. Risk factors associated with unplanned caesarean section in women with placenta previa; a cohort study [J]. J Obstet Gynaecol, 2022, 42(5):1163-1168.
- [2] Fan D, Xia Q, Liu L, et al. The Incidence of Postpartum Hemorrhage in Pregnant Women with Placenta Previa: A Systematic Review and Meta-Analysis [J]. Plos One, 2020, 12(1):170-194.
- [3] Kiondo P, Wandabwa J, Doyle P. Risk factors for placenta praevia presenting with severe vaginal bleeding in Mulago hospital, Kampala, Uganda [J]. Afr Health Sci, 2018, 8(1):44-49.
- [4] Debolt CA, Rosenberg HM, Pruzan A, et al. Patients with resolution of low-lying placenta and placenta previa remain at increased risk of postpartum hemorrhage [J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2022, 60(1):103-108.
- [5] Ahmed S, Kawaguchi M. Puerperal infections of the genital tract: a clinical review [J]. Midwifery Womens Health, 2019, 58(6):632-642.
- [6] 沈铿, 马丁. 妇产科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015.
- [7] Chen Z, Li J, Shen J, et al. Direct puncture embolization of the internal iliac artery during cesarean delivery for pernicious placenta previa coexisting with placenta accreta [J]. Int J Gynecol Obstet, 2021, 135(5):264-268.
- [8] 中华医学会妇产科学分会产科学组. 前置胎盘的临床诊断与处理指南 [J]. 中华妇产科杂志, 2013, 48(2):148-150.
- [9] Onwere C, Gurol-Urganci I, Cromwell DA, et al. Maternal morbidity associated with placenta previa among women who had elective caesarean section [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2021, 159(3):62-66.
- [10] Donders GGG, Vereecken A, Bosmans E, et al. Definition of a type abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis; aerobic vaginitis [J]. Br J Obstet Gynaecol, 2020, 122(4):38-46.
- [11] 吴学明, 陈燕娥, 陈绵. 前置胎盘并发产后出血者病原菌感染特点及影响因素分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(11):1333-1336.
- [12] Bateman BT, Berman MF, Riley LE, et al. The epidemiology of postpartum hemorrhage in a large, nationwide sample of deliveries [J]. Anesth Analg, 2020, 110(11):1368-1373.
- [13] Gomez Lopez N, Roberto R, Galaz J, et al. Cellular immune responses in amniotic infection or intra-amniotic inflammation [J]. Am J Reproductive Immunol, 2019, 82(5):e13171.
- [14] 唐华珍, 杨小芳, 张玉婷. 不同类型胎盘前置状态对妊娠结局的影响 [J]. 中国医药指南, 2020, 18(7):9-11.
- [15] 张小琦, 王燕, 宋梅. 不同类型胎盘前置状态对妊娠结局影响研究 [J]. 陕西医学杂志, 2018, 47(6):723-725.

【收稿日期】 2023-09-20 【修回日期】 2023-11-26