

结核分枝杆菌蛋白抗原 T 细胞表位的研究进展

彭美玉^{1,2}, 李柏青²

[关键词] 结核分枝杆菌; 抗原; T 细胞; 表位; 综述

[中国图书资料分类号] R 378.911 [文献标识码] A

结核分枝杆菌(Mtb)的蛋白抗原根据所处细胞位置的不同,可分为分泌性蛋白、胞质内蛋白和膜脂蛋白三类。其中 Mtb 分泌性蛋白对抗结核菌感染的免疫作用最为重要。因此,目前研究较深入的 Mtb 抗原均集中在 Mtb 的分泌性蛋白,如 ESAT-6、CFP-10、MPT64、38kDa 和 Ag85 复合物等^[1]。

以往的研究已证明,机体对 Mtb 感染的免疫应答以细胞免疫为主,CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞均可被 Mtb 抗原激活。CD4⁺T 细胞活化后分泌多种细胞因子,特别是 γ 干扰素(IFN- γ),可诱导巨噬细胞发挥细胞毒性作用杀死胞内 Mtb。而 CD8⁺T 细胞活化后直接杀伤 Mtb 感染靶细胞和销毁胞内 Mtb。CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞是通过其抗原受体即 T 细胞受体(TCR)分别与抗原提呈细胞的 MHC 的 II 类分子和 I 类分子所结合的抗原肽片段即抗原表位发生特异性结合,并随之激活。因此,对于 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞所识别的 Mtb 抗原中的不同表位的研究,有利

于了解不同 T 细胞亚群的在抗 Mtb 感染中的免疫作用。观察和比较结核病患者和健康个体之间,以及不同 HLA 表型个体之间对 Mtb 蛋白抗原中不同表位的识别能力的差别,可以在免疫识别分子水平上深入揭示机体抗结核感染的免疫机制,也有利于阐明结核病的发病机制,同时对制备新型疫苗时选择最适合广泛人群的有效和优势表位提供重要依据。现将 Mtb 蛋白抗原分子中 T 细胞表位的研究进展作一综述。

1 ESAT-6 家族

结核杆菌早期分泌抗原靶-6(early secretory antigenic target-6, ESAT-6)家族成员是由 RD-1 区基因编码的一系列蛋白质,包括 ESAT-6、TB10.4 和 CFP10 等亚家族的蛋白分子,均属于 Mtb 早期分泌蛋白。已经发现仅致病性 Mtb 可以编码和高表达 ESAT-6 家族蛋白,而卡介苗(BCG)及绝大部分环境分枝杆菌均丢失编码 ESAT-6 家族的基因。

1.1 ESAT-6 蛋白 该蛋白由 RD-1 区的 Rv3875 基因编码,其相对分子质量为 9 975;有 2 个等电点分别为 4 和 4.5。

Pathan 等^[2]发现 ESAT-6 蛋白的 T 细胞表位多为 CD4⁺T 细胞表位,其中 P_{1-15aa}、P_{6-20aa}、P_{71-85aa} 被识别的频率较高,且 P_{1-15aa} 和 P_{71-85aa} 表位受 HLA-DQ 限制。Mustafa 等^[3]研究发现 ESAT-6 受 HLA-DR 限制的 P_{1-20aa}、P_{12-35aa}、P_{22-45aa}、P_{32-55aa}、P_{42-65aa}、P_{52-75aa}、P_{62-85aa}、P_{72-95aa} 均可刺激肺结核患者的 Th 细胞增殖和分泌 IFN- γ ,且 P_{52-75aa} 和 P_{72-95aa} 被 T 细胞识别的频率较

[收稿日期] 2010-08-10

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072426);国家科技重大专项基金课题(2008ZX10003-011)

[作者单位] 1. 山东万杰医学院 医学检验教研室,山东 淄博 255213;
2. 蚌埠医学院 免疫学教研室,感染与免疫安徽省重点实验室,安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 彭美玉(1982-),女,硕士,助教。

[通讯作者] 李柏青,博士,硕士研究生导师,教授。E-mail: baiqingli@bbmc.edu.cn

分重吸收,使大便软化而易排出。此外,中医穴位按摩^[8]也是改善患者排便功能的一种重要方法。

不良排便习惯也会导致便秘发生,因此,我们就指导患者养成良好排便习惯,并尽可能为患者采取舒适姿势排便创造条件,如提供坐便器等。对于不能下床又不适应床上排便的患者可抬高床头,并为其排便提供隐蔽的环境。

总之,便秘形成因素很多,除了药物本身副作用外,心理因素、不合理的饮食结构、活动量减少和不良排便习惯等均可促进便秘形成。本研究结果表明,通过以上有效的健康教育可有效降低芬太尼透皮贴剂所致便秘的发生。

[参考文献]

[1] 张坤强,曾德豪,陈庆生,等.多瑞吉贴剂在癌症晚期疼痛治疗

中的疗效观察[J].中国医药导报,2008,5(23):58-60.

[2] 潘春容.多瑞吉治疗癌痛疗效观察及护理[J].护理研究,2007,21(4):1063.

[3] 徐建芳,陈焰.多瑞吉治疗中重度癌症疼痛 60 例疗效观察[J].肿瘤防治研究,2007,34(6):457-458.

[4] 杨坤海.多瑞吉配合中药制剂治疗晚期癌痛的临床观察[J].现代医药卫生,2008,24(6):809-811.

[5] 罗蕾,向明芳.多瑞吉贴剂治疗老年癌性疼痛的观察与护理[J].现代护理,2008,14(6):825-826.

[6] 陈文彬,潘祥林.诊断学[M].7版.北京:人民卫生出版社,2008.

[7] 吴少芳,郭素萍.护理干预对减轻盐酸格雷斯西隆所致便秘的效果[J].解放军护理杂志,2006,23(12):71.

[8] 余立军,李艳娟,王青平.运用穴位按摩护理习惯性便秘病人的临床观察[J].护理研究,2003,17(2A):146-147.

(本文编辑 章新生)

高。Lalvani 等^[4]发现 ESAT-6 蛋白多个 T 细胞表位中, P_{1-20aa} 和 P_{51-70aa} 是最主要的 T 细胞表位。虽然同一人群可识别多个表位,但不同人群优先识别的表位可能有所不同。Ravn 等^[5]研究发现,不同人群所识别的 ESAT-6 抗原的表位位点不同,如丹麦人对位于 C 端的 P_{72-95aa} 位识别较高,而埃塞俄比亚人对 P_{42-65aa}、P_{52-75aa} 位识别较高;且 P_{8-18aa}、P_{73-81aa} 受 HLA-DPB1 * 0401 限制,而 P_{43-52aa} 则受 HLA-DR7 限制,表明 T 细胞对 ESAT-6 识别的种族多样性与 MHC 类型相关。

Vincenti 等^[6]发现 ESAT-6 受 HLA-DR 限制的 P_{6-28aa} 和 P_{66-79aa} 可刺激活动期结核患者的 PBMC 产生 IFN- γ , 而对潜伏期结核患者的 PBMC 无反应; Carrara 等^[7]发现, 18 例结核病患者外周血单个核细胞 (PBMC) 对 ESAT-6 的 P_{6-28aa}、P_{66-79aa} 多肽均呈阳性反应, 3 个月治疗后除 5 例治疗无效者外, 其余均对 ESAT-6 多肽呈阴性反应^[7], 提示结核患者和健康人对 ESAT 的抗原表位有着不同的识别和应答模式。国内学者近年报道应用计算机软件预测 TCR 表位的方法从 ESAT-6 蛋白序列找出 3 个多肽片段 QQWNFAGIEAAASAI、VTSIHSLLDEGKQSL 和 QKWDATATELNNALQ, 并将其作为制备核酸疫苗的候选表达表位^[8]。

1.2 CFP10 蛋白 是培养滤过物中的蛋白成分之一, 又称为 Mtb b11 或 Mtb SA-10, 相对分子质量为 10 000 ~ 11 000, 由位于 RD-1 区的 lhp 基因 (Rv3874) 编码, 位于 ESAT-6 基因上游, 属于同 1 个 lhp-exe 操纵子, 并受其同 1 个启动子调节转录。

Arend 等^[9]发现, CFP10 对 HLA-DR15 型别的人敏感性较高, 可刺激 T 细胞产生较高水平的 IFN- γ 。Shams 等^[10]研究发现 CFP10 的 P_{71-85aa} 和 P_{76-90aa} 可刺激 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞活化及分泌 IFN- γ 。且 P_{71-85aa} 包括 2 个表位 T1 (IRQAGVQYSR) 和 T6 (EISTNIRQA), 其中 T1 受 DRB1 * 04、DR5 * 0101、DQB1 * 03 和 A2⁺ 限制, 而 T6 受 DRB1 * 04、DQB1 * 03 和 B35⁺ 限制, 且均可活化 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞。T1 和 T6 的 N 端或 C 端被去掉一个氨基酸后其产生 IFN- γ 的能力明显降低, 因此推测 T1 和 T6 是所发现的最小的细菌来源的 T 细胞表位^[10]。Lewinsohn 等^[11]发现 CFP10 受 HLA-B44 限制的 P_{2-11aa} (AEMKTAATL) 和受 HLA-B14 限制的 P_{85-94aa} (RADEEQQAL) 可刺激 CD8⁺ T 细胞活化及分泌 IFN- γ , CFP10 的 P_{1-23aa}、P_{41-59aa} 和 P_{69-100aa} (RADEEQQAL) 可刺激 CD4⁺ T 细胞活化及分泌 IFN- γ 。

1.3 TB10.4 亚家族 TB10.4 亚家族有 3 个成员, TB10.4 (RV0288)、TB10.3 (RV3019c) 和 TB12.9 (RV3017c)。Skjot 等^[12]研究发现, 尽管 TB10.4 与 TB10.3 和 TB12.9 具有很高程度的同源性, 但三者中很少有相同的表位, 而且 T 细胞对各自特异性表位的应答反应有明显不同。TB10.4 的整条肽链上分布有 T 细胞表位, 且均可刺激结核患者 PBMC 增殖和 IFN- γ 分泌, 而刺激 BCG 接种者的表位主要集中于 N 端 (P_{1-18aa})。TB10.3 和 TB12.9 肽链中的 T 细胞表位数量少于 TB10.4 的 T 细胞表位数, 且各自又具有独特的抗原决定簇, 如 TB10.3 的 P_{71-90aa}; TB12.9 的 C 端 P51aa^[12]。Billeskov

等^[13]发现 TB10.4 的 P_{3-11aa} 为 CD8⁺ T 细胞表位。

2 PPE 蛋白

属 PPE 蛋白家族, 由 RD-1 区 Rv3873 基因编码, 与 lhp-exe 操纵子相邻, 位于 Mtb 细胞膜或细胞壁, 结核感染的潜伏期和活动期均可很好地表达, 其免疫学特性与 ESAT-6 和 CFP10 相似。PPE 及其合成多肽可被 Mtb 感染者的 T 淋巴细胞特异地识别, Okkels 等^[14]发现其 P_{118-135aa}、P_{167-184aa}、P_{217-234aa}、P_{237-254aa}、P_{277-294aa}、P_{318-335aa}、P_{329-346aa}、P_{351-368aa} 均可强烈刺激结核患者的 PBMC 出现增殖反应, 而对 BCG 接种者的 PBMC 只有低水平的刺激反应, 其中 P_{118-135aa} 在大部分 PPE 家族成员中存在^[14]。提示结核患者和健康人对 PPE 蛋白抗原表位有着不同的识别和应答模式。

3 MPT64 蛋白

MPT64 蛋白是 Mtb 短期培养滤液中的主要成分, 由 RD-2 区基因 Rv1980c 编码, 其相对分子质量为 24 000, 占分泌蛋白总量的 8%。只有 Mtb、牛分枝杆菌和某些 BCG 菌株如 Tokyo、Morau、Russia 和 Sweden 能表达 MPT64, 而某些 BCG 菌株在减毒传代过程中, 丢失了编码蛋白的基因序列。

MPT64 蛋白羧基端的 P_{184-228aa} 残基区域可刺激人类 T 细胞增殖反应和诱导 IFN- γ 的分泌, 而 P_{124-143aa} 残基区域可诱导 B 细胞免疫反应^[15], 其 C 末端存在一个由 15 个氨基酸残基 (Gly-173 至 Ala-187) 组成的可诱导迟发型超敏反应 (DTH) 的抗原决定簇^[16]。

4 Ag85 复合物

Ag85 复合物属于结核杆菌早期分泌型蛋白质, 包括 3 个组分; Ag85A (又称为 MPT44、p32A、32kDa 抗原)、Ag85B (又称为 MPT59、p30、30kDa 抗原、抗原 6、 α 抗原) 和 Ag85C (又称为 MPT45、MPT51), 三者以 2:3:1 的比例分泌, 相对分子质量分别为 32 000、30 000 和 31.5 000, 等电点分别为 4.55、4.15 和 4.35, 分别由 fbpA (即 Rv3804c)、fbpB (即 Rv1886c) 和 fbpC1 (即 Rv3803c) 基因编码。Ag85A、Ag85B 均具有免疫保护性, 且 Ag85B 的免疫保护性比 Ag85A 强而 Ag85C 无免疫保护性。

4.1 Ag85A 含多个 T 细胞抗原决定簇, 人类对 Ag85A 表位的识别具有多样性。Smith 等^[17]研究发现 Ag85A 有 2 个受 HLA-A * 0201 限制的多肽 P_{48-56aa}、P_{242-250aa} 均可诱导 BCG 接种者的 CD8⁺ T 细胞增殖和分泌 IFN- γ , 且 P_{48-56aa} 不仅存在于分枝杆菌的 Ag85A 中还存在于结核杆菌的 Ag85B 中, 而 P_{242-250aa} 只存在于结核杆菌和 BCG 的 Ag85A 中。国内学者近年报道从 Ag85A 中鉴定出 GLPVEYLQV (P_{48-56aa}) 和 KLIANNTRV (P_{242-250aa}) 是 HLA-A * 0201 限制性 CTL (CD8⁺ T 细胞) 的优势表位^[18]。

4.2 Ag85B 含有多个 HLA-A 限制性表位, 可刺激 CD8⁺ T 增殖和 IFN- γ 的分泌。Geluk 等^[19]研究表明, P_{143-152aa}、P_{65-72aa}、P_{143-151aa}、P_{126-135aa}、P_{199-207aa}、P_{100-109aa} 对 HLA-A * 0201 有

高亲和性,而 P_{228-238aa}、P_{199-207aa}、P_{158-166aa}、P_{37-44aa}、P_{126-135aa}、P_{206-215aa}、P_{93-102aa}、P_{101-109aa}、P_{5-13aa}、P_{93-102aa} 对 HLA-A * 0201 有中亲和性,其中 P_{143-152aa}、P_{126-135aa}、P_{199-207aa}、P_{158-166aa} 可刺激 CD8⁺ T 细胞增殖和 IFN- γ 的分泌。Weichold 等^[16] 研究发现 Ag85B 的受 HLA-A * 0301 和 HLA-A * 1101 限制的 P_{35-43aa}、P_{167-175aa}, 受 HLA-A * 2402 和 HLA-B * 0801、HLA-B * 1501 限制的 P_{232-240aa}, 受 HLA-A * 0201、HLA-A * 2402 和 HLA-B * 0702 限制的 P_{144-152aa}, 受 HLA-A * 2402 限制的 P_{60-68aa}、P_{100-108aa}、P_{144-152aa} 和受 HLA-B * 0801 限制的 P_{92-100aa}、P_{230-238aa}、P_{21-29aa} 均可刺激结核患者 CD8⁺ T 细胞活化; 分别受 HLA-A * 0201 和 HLA-B * 0702 限制的 P_{199-207aa} (KLVANTRL) 和 P_{197-205aa} (IPKLVANNT) 具有重叠的氨基酸序列而仅 P_{197-205aa} 可刺激结核患者 CD8⁺ T 细胞活化^[16], 表明 T 细胞对 Ag85B 的识别与 MHC 种型相关。

Ag85B 还含有多个受 HLA-D 限制的表位,可刺激 CD4⁺ T 淋巴细胞增殖和 IFN- γ 的分泌。Mustafa 等^[20] 研究表明结核患者的 CD4⁺ T 淋巴细胞系与整个 Ag85B 多肽均起反应,而 BCG 接种者的 T 淋巴细胞系只与 Ag85B N 末端的多肽反应,如 P_{19-36aa}、P_{28-45aa}、P_{37-54aa}、P_{46-63aa}、P_{73-90aa}、P_{91-108aa}、P_{109-126aa}、P_{136-153aa}、P_{145-162aa}、P_{181-198aa}、P_{199-216aa}、P_{226-243aa}、P_{262-279aa} 均可刺激结核患者 CD4⁺ Th1 细胞增殖,其中除 P_{262-279aa} 外,还均可刺激 IFN- γ 的分泌; 而 Ag85B N 末端的 P_{1-18aa}、P_{10-27aa}、P_{19-36aa}、P_{28-45aa}、P_{91-108aa} 均可刺激 BCG 接种者的 CD4⁺ Th1 细胞增殖,提示结核患者和健康人对 Ag85B 抗原肽表位有着不同的识别和应答模式。

4.3 Ag85C Ag85C 中的受 HLA-A * 0201 限制性的表位 P_{144-153aa} 可刺激 CD8⁺ T 细胞增殖和 IFN- γ 的分泌^[21]。Ag85C 中的 P_{170-178aa}、P_{317-325aa}、P_{144-153aa} 与 HLA-A * 0201 分子有高结合力,而抗原 FLTREMPAWL (P_{144-153aa}) 能够诱导大多数 HLA-A * 0201 阳性结核患者及 PPD⁺ 健康志愿者产生特异性 CTL 细胞^[22]。

5 脂蛋白

Mtb 脂蛋白包括 38kDa 和 19kDa 蛋白,是 Mtb 糖基化的类脂蛋白质,属于 Mtb 的膜蛋白。

5.1 38kDa 蛋白 相对分子质量是 38 000,又名 Ag5、Ag78、Pab,是一种磷酸盐结合蛋白,参与磷酸盐代谢,是 Mtb 积极分泌的抗原,其表达量是 BCG 的 10 倍。

Hammond 等^[23] 研究发现 38kDa 的 P_{45-53aa}、P_{175-183aa}、P_{292-300aa} 受 HLA-B * 3501 限制。Shams 等^[24] 研究发现 38kDa 的“LLAVLTAAPL”、“TLLYPLFNL”、“FLLPDAQSI”均受 HLA-A * 0201 限制。其中 38kDa 的“LLAVLTAAPL”可刺激结核菌素阳性人的 CD8⁺ T 细胞活化而对结核菌素阴性个体 CD8⁺ T 细胞无活性。提示结核患者和健康人对 38kDa 抗原肽表位有着不同的识别和应答模式。

5.2 19kDa 相对分子质量为 19kDa, Mohaghehpour 等^[25] 研究发现其受 HLA-A * 0201 限制的 P_{88-97aa} 可刺激结核患者和 BCG 接种者 PBMC 中的 CTL 增殖。Shams 等^[24] 研究发现

19 kDa 的“AVAGAAILV”受 HLA-A * 0201 限制。

6 热休克蛋白(HSP)

HSP 存在于 Mtb 胞质内,属于应激蛋白质,因参与蛋白质转位、折叠和装配等细胞生理活动,又被称为“分子伴侣”。HSP 具有高度保守性,在不同的菌属,甚至与真核细胞的同类蛋白质之间也有很高的同源性,容易被免疫系统识别,因此不适用于人类疫苗的研究。

6.1 HSP 60 蛋白 属于热休克蛋白家族,在 Mtb 的稳定生长期被大量诱导并成为主要的蛋白成分;其 P_{91-110aa} 可与广泛的 HLA-DR 分子结合,刺激 Th1 型 IFN- γ 产生,诱导细胞免疫应答^[26]。

6.2 HSP 65 由 cpn6022 (即 groEL2、Rv0440) 基因编码,相对分子质量为 65 000。Mustafa 等^[27] 研究发现麻风分枝杆菌 HSP 65 的 P_{61-75aa}、P_{141-155aa}、P_{151-165aa}、P_{331-345aa}、P_{371-385aa}、P_{411-425aa}、P_{431-445aa}、P_{441-455aa}、P_{501-515aa} 在 Mtb 中也存在,且 P_{61-75aa} 受 HLA-DR1、HLA-DR2 和 HLA-DR7 限制, P_{141-155aa} 受 HLA-DR53、HLA-DR2 和 HLA-DR7 限制, P_{501-515aa} 受 HLA-DR2 和 HLA-DR4 限制^[27]。

7 其他抗原

Rv2653 和 Rv2654 由 RD-11 区基因编码,在所有 BCG 菌株及环境分枝杆菌基因组中均缺乏。Rv2653 具有与 BCG 交叉的表位,可诱导结核病患者和 BCG 免疫者 PBMC 释放高水平的 IFN- γ ,但在 Rv2653 的 N 末端和 C 末端存在着几个只能被结核患者 T 细胞识别的表位; Rv2654 是 Mtb 高度特异的抗原,含有大量 T 淋巴细胞抗原决定簇,只诱导结核病患者 PBMC 释放高水平的 IFN- γ ,尤其是表位 P_{38-55aa} 可广泛被结核患者 T 细胞所识别并诱导 IFN- γ 的释放^[28]。提示结核患者和健康人对 Rv2653 和 Rv2654 的抗原肽表位有着不同的识别和应答模式。

Rv0341 编码蛋白为 43.9kDa,含有 479 个氨基酸。受 HLA-A * 0201 限制的 P_{33-42aa}、P_{33-44aa}、P_{33-45aa} 可刺激 CD8⁺ T 淋巴细胞增殖和 IFN- γ 的分泌,其中 P_{33-42aa}、P_{33-45aa} 与 HLA-A * 0201 的亲性和较强^[29]。

16kDa 是 Mtb 主要的膜蛋白,是 Mtb 在缺氧环境中分泌的蛋白质的主要成分之一(所占含量可达 25%)。Agrewala 等^[30] 研究发现 16kDa 的 P_{21-40aa} 可显著刺激 Th2 细胞分泌 IL-4 而 P_{91-110aa} 可显著刺激 Th1 细胞分泌 IFN- γ 。Caccamo 等^[31] 研究发现 16kDa 受 HLA-A * 0201 限制的 P_{21-29aa}、P_{120-128aa} 可刺激 CD8⁺ T 细胞增殖和 IFN- γ 的分泌;受 HLA-DR 限制的 P_{91-110aa} 可刺激 Th1 和 Th0 增殖且分别产生 IFN- γ 和 IFN- γ 、IL-4^[32]。

Hammond 等^[23] 研究发现 Rv1461 的 P_{324-332aa} (IPRDEVVRVM)、Rv3689 的 P_{9-17aa} (RPKPDTEY)、Rv3378c 的 P_{254-262aa} (RPKPDYSAM)、Rv1280c 的 P_{284-292aa} (RPRLDSTY)、multi hit-5 的 (RPGCDAPAY) 受 HLA-B * 3501 限制; Rv0670 的 P_{38-46aa} (KPRDDAAAL)、Rv1641 的

P_{91-99aa} (RPKIDDHDY)、Rv2182c 的 P_{20-28aa} (RPKVEGLEEY)、Rv2476c 的 P_{785-793aa} (RPRYEIFVY)、multi hit-3 的 (IPKLRQGSY)、multi hit-4 的 (KPGCDAPAY)、multi hit-6 的 (SPKETWLRRL) 受 HLA-B * 3501 和 HLA-B * 53 限制; Rv2823c 的 P_{615-623aa} (RPREATIHY) 受 HLA-B * 3501、HLA-B * 53 和 HLA-B * 07 限制; MPT53 的 P_{134-142aa} 受 HLA-B * 3501 和 HLA-B * 07 限制^[23]。

Dong 等^[33] 研究发现 Mtb 超氧化物歧化酶 (SodA) 的 P_{160-168aa}、丙氨酸脱氢酶 (AlaDH) 的 P_{160-169aa}、谷氨酰胺合成酶 (GlnS) 的 P_{308-316aa} 均可刺激结核患者和 BCG 阳性个体的 CD8⁺ T 细胞活化及 IFN- γ 和 TNF- α 的产生且受 HLA-A * 0201 限制。

24kDa 脂蛋白 (LppX) 是 Rv2945c 编码的一种脂蛋白, 由 233 个氨基酸组成。Al-Attayah 等^[34] 研究发现 LppX 受 HLA-DR 限制的 P_{196-220aa} 可刺激 BCG 阳性个体的 Th1 细胞活化; 且 P_{196-220aa} 的序列在 Mtb、牛分枝杆菌和麻风分枝杆菌中完全一样, 均为 (TVWIAQDGS HHLVRASIDLGSGSIQ)。

GroES 蛋白是一类热休克蛋白或应激蛋白, 参与细胞内蛋白质折叠和装配。Hussain 等研究发现 Mtb 和麻风分枝杆菌的 GroES 蛋白 C 端所共有的氨基酸序列 P_{71-85aa} (IYSKYGGTEIKYNGEEY)、P_{81-95aa} (NGEYLILSARDVLA)、P_{91-100aa} (RDVLAVVSK) 均可刺激 BCG 接种者的 T 细胞增殖和 IFN- γ 的产生^[35]。

Shams 等^[24] 研究发现 45/47 kDa 的 “VLGRLDQKL”、28kDa (Hemolysin) 的 “GALEAFIAIV”、“ALEAFIAIVA”、“LVVADLSFI”、PepA 的 “WLLSVLAAV”、“LLSVLAAVGL”、“GIVIDPNGVV” 均受 HLA-A * 0201 限制。其中 28kDa 的 “ALEAFIAIVA” 可刺激结核菌素阳性个体的 CD8⁺ T 细胞活化而对结核菌素阴性个体的 CD8⁺ T 细胞无活性。

另外, Mtb CFP21 蛋白的 P_{5-13aa}、P_{13-21aa}、P_{134-142aa}、P_{189-197aa}; MTB12 蛋白的 P_{26-34aa}、P_{36-44aa}、P_{40-48aa}、P_{61-69aa}; Rv3881c 蛋白的 P_{204-212aa}、P_{207-215aa}、P_{234-242aa}、P_{260-268aa} 为 HLA-A * 0201 限制性 CTL 优势表位^[36]。Mtb Rv0309 蛋白的 P_{3-12aa} 和 Rv0173 蛋白的 P_{260-269aa} 和 P_{302-311aa} 是 HLA-A * 0201 限制性 CTL 表位^[38]。Mtb Rv0173 蛋白的 RL2SQSADQYL (P_{21-30aa}) 和 LLRGGGLVNL (P_{161-170aa}) 是其两个主要的 HLA-A * 0201 限制性 CTL 表位^[37]。

8 $\gamma\delta$ T 细胞识别的 Mtb 蛋白抗原表位

与普通 T 细胞即 $\alpha\beta$ T 细胞不同的另一类在外周血占有小比例 (大约 5%) 的 T 细胞, 即 $\gamma\delta$ T 细胞, 其识别抗原的方式与 $\alpha\beta$ T 细胞有明显的差别, 最重要的特征是 $\gamma\delta$ T 细胞可以以 MHC 非依赖性的方式识别非肽类抗原, 包括来自 Mtb 的磷酸类抗原, 和烷基胺等, 但也可以识别蛋白抗原, 如 F1-ATP 合酶等^[38]。已经发现对 Mtb 抗原应有反应的 $\gamma\delta$ T 细胞属于 V γ 9 δ 2 T 细胞。最近有报道 ESAT-6 能够诱导 $\gamma\delta$ T 细胞产生 IFN- γ ^[39], 提示 ESAT-6 中存在 $\gamma\delta$ T 细胞所识别的肽类表位。另外, Mtb H37Ra 菌体通过高压释放到上清的

成分, 是热抵抗性对蛋白酶敏感的肽类抗原, 能优势激活人 $\gamma\delta$ T 细胞增殖。我们以前的观察发现, 结核病患者外周血中 V γ 9 δ 2 T 细胞减少, 对这种 Mtb 耐热性抗原 (Mtb-HAg) 的增殖反应明显降低。最近我们的实验证明 Mtb-HAg 可以特异性地与 TCR- $\gamma\delta$ 发生结合, 并诱导 TCR- $\gamma\delta$ 分子发生功能性聚集^[40]。但是这种 Mtb-HAg 中是哪些蛋白的肽表位以何种方式结合 TCR- $\gamma\delta$ 还有待阐明。

9 结语

结核病的卷土重来使人们越来越意识到结核病预防的重要性。已有研究证明常规 BCG 接种只能预防儿童结核病, 对成年人结核病的发病没有明显保护作用。因此, 研发新一代的预防性和具有治疗作用的新型疫苗, 已是当前抗结核免疫研究的首要任务和研究热点。深入了解 Mtb 蛋白抗原中不同 T 细胞识别的表位, 在不同个体之间, 在患者和健康个体之间的差别, 不仅有利于阐明不同 T 细胞的 TCR 在识别 Mtb 抗原后激活和应答机制, 以及结核病发病机制, 对于如何选用 Mtb 蛋白抗原分子中合适的有效和优势 T 细胞表位来设计适合于最广泛人群的新型多价表位疫苗也具有重要的实际意义。目前, 对于 Mtb 分泌性蛋白抗原的表位研究已经相当广泛和深入, 但对于其他菌体抗原和膜蛋白抗原的 T 细胞表位研究相对较少, 而对于 $\gamma\delta$ T 细胞所识别的 Mtb 蛋白抗原的表位研究更少, 而这些抗原表位对于 T 细胞的激活和应答, 参与抗 Mtb 感染的免疫作用是不能忽视的, 在制备新一代 Mtb 疫苗中也是需要考虑的候选表位成分。

[参 考 文 献]

- [1] 吴雪琼. 结核分枝杆菌保护性抗原的研究进展[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2006, 29(5): 340-342.
- [2] Pathan AA, Wilkinson KA, Klennerman P, et al. Direct ex vivo analysis of antigen-specific IFN- γ -secreting CD4⁺ T cells in *Mycobacterium tuberculosis* infected individuals; associations with clinical disease state and effect of treatment [J]. J Immunol, 2001, 167(9): 5217-5225.
- [3] Mustafa AS, Shaban FA, Al-Attayah R, et al. Human Th1 cell lines recognize the *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 antigen and its peptides in association with frequently expressed HLA class II Molecules [J]. Scand J Immunol, 2003, 57(2): 125-134.
- [4] Lalvani A, Nagvenkar P, Udawadia Z, et al. Enumeration of T cells specific for RD1-encoded antigens suggests a high prevalence of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in healthy urban Indians [J]. J Infect Dis, 2001, 183(3): 469-477.
- [5] Ravn P, Demissie A, Eguale T, et al. Human T cell responses to the ESAT-6 antigen from *Mycobacterium tuberculosis* [J]. J Infect Dis, 1999, 179(3): 637-645.
- [6] Vincenti D, Carrara S, De Mori P, et al. Identification of early secretory antigen target-6 epitopes for the Immunodiagnosis of active tuberculosis [J]. Mol Med, 2003, 9(3/4): 105-111.
- [7] Carrara S, Vincenti D, Petrosillo N, et al. Use of a T cell-based assay for monitoring efficacy of antituberculosis therapy [J]. Clin

- Infect Dis, 2004, 38(5): 754 - 756.
- [8] 陈霞, 徐闻欢, 徐娟, 等. 结核杆菌 ESAT-6 抗原多表位 DNA 疫苗的构建与表达[J]. 南京医科大学学报, 2008, 28(4): 412 - 415.
- [9] Arend SM, Geluk A, van Meijgaarden KE, et al. Antigenic equivalence of human T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific RD1-encoded protein antigens ESAT-6 and culture filtrate protein 10 and to mixtures of synthetic peptides [J]. Infect Immun, 2000, 68(6): 3314 - 3321.
- [10] Shams H, Klucar P, Weis SE, et al. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* peptide that is recognized by human CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the context of multiple HLA alleles [J]. J Immunol, 2004, 173(3): 1966 - 1977.
- [11] Lewinsohn DM, Zhu L, Madison VJ, et al. Classically restricted human CD8⁺ T lymphocytes derived from *Mycobacterium tuberculosis*-infected cells; definition of antigenic specificity [J]. J Immunol. 2001, 166(1): 439 - 446.
- [12] Skjot RL, Brock I, Arend SM, et al. Epitope mapping of the Immunodominant antigen TB10. 4 and the two homologous proteins TB10. 3 and TB12. 9, which constitute a subfamily of the esat-6 gene family [J]. Infect Immun, 2002, 70(10): 5446 - 5453.
- [13] Billeskov R, Vingsbo-Lundberg C, Andersen P, et al. Induction of CD8 T cells against a novel epitope in TB10. 4; correlation with mycobacterial virulence and the presence of a functional region of difference-1 [J]. J Immunol, 2007, 179(6): 3973 - 3981.
- [14] 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.
- [15] Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, et al. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis* [J]. J Bacteriol, 1996, 178(5): 1274 - 1282.
- [16] Weichold FF, Mueller S, Kortsik C, et al. Impact of MHC class I alleles on the *M. tuberculosis* antigen-specific CD8⁺ T-cell response in patients with pulmonary tuberculosis [J]. Genes Immun, 2007, 8(4): 334 - 343.
- [17] Smith SM, Brookes R, Klein MR, et al. Human CD8⁺ CTL specific for the mycobacterial major secreted antigen 85A [J]. J Immunol, 2000, 165(12): 7088 - 7095.
- [18] 陈燕, 姜加陶, 吴传勇, 等. KLIANNTRV 是结核抗原 Ag85A 的 HLA-A * 0201 限制性 CTL 表位 [J]. 现代检验医学杂志, 2007, 22(5): 1 - 3.
- [19] Geluk A, van Meijgaarden KE, Franken KL, et al. Identification of major epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B that are recognized by HLA-A * 0201-restricted CD8⁺ T cells in HLA-transgenic mice and humans [J]. J Immunol, 2000, 165(11): 6463 - 6471.
- [20] Mustafa AS, Shaban FA, Abal AT, et al. Identification and HLA restriction of naturally derived Th1-cell epitopes from the secreted *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85B recognized by antigen-specific human CD4⁺ T-cell lines [J]. Infect. Immun, 2000, 68(7): 3933 - 3940.
- [21] 吴传勇, 姜加陶, 蒋廷旺, 等. 结核杆菌抗原多表位融合蛋白的重组表达与鉴定 [J]. 第二军医大学学报, 2006, 27(12): 1281 - 1285.
- [22] 吴传勇, 姜加陶, 蒋廷旺, 等. 结核杆菌抗原 Ag85C 的 HLA-A * 0201 限制性 CD8⁺ TCTL 表位的预测及鉴定 [J]. 第二军医大学学报, 2007, 28(4): 349 - 354.
- [23] Hammond AS, Klein MR, Corrah T, et al. *Mycobacterium tuberculosis* genome-wide screen exposes multiple CD8 T cell epitopes [J]. Clin Exp Immunol, 2005, 140(1): 109 - 116.
- [24] Shams H, Barnes PF, Weis SE, et al. Human CD8⁺ T cells recognize epitopes of the 28-kDa hemolysin and the 38-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. J Leukoc Biol, 2003, 74(6): 1008 - 1014.
- [25] Mohaghehpour N, GamMon D, Kawamura LM, et al. CTL response to *Mycobacterium tuberculosis*: identification of an immunogenic epitope in the 19-kDa lipoprotein [J]. J Immunol, 1998, 161(5): 2400 - 2406.
- [26] Quintana, FJ, Carmi P, Mor F, et al. DNA fragments of the human 60-kDa heat shock protein (HSP60) vaccinate against adjuvant arthritis; identification of a regulatory HSP60 peptide [J]. J Immunol, 2003, 171(7): 3533 - 3541.
- [27] Mustafa AS, Lundin KE, Meloen RH, et al. Identification of promiscuous epitopes from the *Mycobacterial* 65-kilodalton heat shock protein recognized by human CD4⁺ T cells of the *Mycobacterium leprae* memory repertoire [J]. Infect Immun, 1999, 67(11): 5683 - 5689.
- [28] Aagaard C, Brock I, Olsen A, et al. Mapping immune reactivity toward Rv2653 and Rv2654; two novel low-molecular-mass antigens found specifically in the *Mycobacterium tuberculosis* complex [J]. J Infect Dis, 2004, 189(5): 812 - 819.
- [29] Flyer DC, Ramakrishna V, Miller C, et al. Identification by mass spectrometry of CD8⁺ T-cell *Mycobacterium tuberculosis* epitopes within the Rv0341 gene product [J]. Infect Immun, 2002, 70(6): 2926 - 2932.
- [30] Agrewala JN, Wilkinson RJ. Differential regulation of Th1 and Th2 cells by p91-110 and p21-40 peptides of the 16-kD acryllin antigen of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Clin. Exp. Immunol, 1998, 114(3): 392 - 397.
- [31] Caccamo N, Milano S, Di Sano C, et al. Identification of epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* 16-kDa protein recognized by human leukocyte antigen-A * 0201 CD8⁺ T lymphocytes [J]. J Infect Dis, 2002, 186(7): 991 - 998.
- [32] Caccamo N, Barera A, Di Sano C, et al. Cytokine profile, HLA restriction and TCR sequence analysis of human CD4⁺ T clones specific for an immunodominant epitope of *Mycobacterium tuberculosis* 16-kDa protein [J]. Clin Exp Immunol, 2003, 133(2): 260 - 266.
- [33] Dong Y, Demaria S, Sun X, et al. HLA-A2-restricted CD8⁺ cytotoxic-T-cell responses to novel epitopes in *Mycobacterium tuberculosis* superoxide dismutase, alanine dehydrogenase, and glutamine synthetase [J]. Infect Immun, 2004, 72(4): 2412 - 2415.
- [34] Al-Attiyah R, Mustafa AS. Computer-assisted prediction of HLA-DR binding and experimental analysis for human promiscuous Th1-cell peptides in the 24 kDa secreted lipoprotein (LppX) of

- Mycobacterium tuberculosis* [J]. Scand J Immunol, 2004, 59(1): 16-24.
- [35] Hussain R, Shahid F, Zafar S, et al. Immune profiling of leprosy and tuberculosis patients to 15-mer peptides of *Mycobacterium leprae* and *M. tuberculosis* GroES in a BCG vaccinated area; Implications for development of vaccine and diagnostic reagents [J]. Immunology, 2004, 111(4): 462-471.
- [37] 姜加陶, 吴传勇, 陈燕, 等. 结核杆菌抗原 Rv0173 的 HLA2A * 0201 限制性 CTL 表位的预测及鉴定 [J]. 中国实验诊断学, 2007, 11(11): 1444-1447.
- [38] Hao J, Wu X, Xia S, et al. Current progress in gammadelta t-cell biology [J]. Cell Mol Immunol, 2010, 7(6): 409-413.
- [39] Li L, Wu CY. CD4⁺ CD25⁺ Treg cells inhibit human memory $\gamma\delta$ T cells to produce IFN- γ in response to M tuberculosis antigen ESAT-6 [J]. Blood, 2008, 111(12): 5629-5636.
- [40] 陈勇, 李柏青. 人 $\gamma\delta$ T 细胞 TCR 分子与结核杆菌多肽抗原特异性结合的证据 [J]. 中华微生物与免疫学杂志, 2005, 25(1): 15-20.

(本文编辑 章新生)

[文章编号] 1000-2200(2011)04-0426-04

· 综述 ·

生长因子相关的骨髓间充质干细胞成骨诱导研究进展

许克庆 综述, 肖玉周 审校

[关键词] 干细胞, 间充质; 骨髓; 生长因子; 成骨分化; 综述

[中国图书资料分类法分类号] R 329.24 [文献标识码] A

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSC)是具有多方向性分化潜能的干细胞,它可以向骨、软骨、脂肪、血管内皮、神经、肌腱、肌肉等多种组织分化,因此 BMSC 是最有应用前景的骨组织工程的种子细胞^[1]。BMSC 的成骨诱导尤为重要。其增殖分化依靠内源性调控因子与其所处微环境共同作用,因此,培养条件是体外培养诱导 BMSC 增殖分化为成骨细胞的关键。目前,与生长因子相关的 BMSC 成骨诱导分化的方法有:(1)生长因子,如骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、转化生长因子- β (transforming growth factor-beta, TGF- β)、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)、成纤维细胞生长因子(fibroblastic growth factor, FGF)、血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)等诱导;(2)基因转染诱导;(3)化学药物如地塞米松等诱导;(4)富含血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)诱导;(5)成骨细胞及成骨细胞条件培养液诱导。成骨性生长因子在以上方法中有显著地促进 BMSC 增殖并向成骨方向分化作用。本文就与生长因子相关的骨髓间充质干细胞成骨诱导研究的进展作一综述。

1 生长因子成骨诱导

1.1 TGF- β BMP 是一组疏水性的酸性糖蛋白,属于 TGF- β 超家族,来源于骨及骨源性细胞,是骨代谢的分泌产物,也是最早被发现的、已知活性最强的、能单独促进 BMSC 成骨分化的生长因子。BMP 诱导成骨包含 3 个步骤:诱导趋化,诱导有丝分裂,诱导分化。BMP 可以通过募集 BMSC,诱导其

分化成成骨细胞和软骨细胞,并协同其他成骨性细胞因子一同参与促进钙化作用,从而诱导新骨形成。BMP 可以使诱导性骨细胞向确定性骨细胞转化,还能促进多种细胞的增殖和分化,如 BMSC、成纤维细胞、成骨细胞、血管内皮细胞等。植入 BMP 的剂量必须超过一个阈值才能有效发挥骨诱导效应,外伤骨折中应用的剂量浓度为 1.5 mg/ml,低剂量浓度则无效^[2]。

目前已鉴定出 20 种 BMP 分型,其中成骨活性最强的是 BMP-2、BMP-4 和 BMP-7。BMP-2 可以促进未分化和成骨前体细胞的有丝分裂,加速 BMSC 向成骨细胞转化,诱导成骨细胞表型的表达。BMP-4 的氨基酸序列与 BMP-2 有 83% 的同源性,单独使用 BMP-4 亦有促进成骨细胞分化和诱导成骨的能力。BMP-7 即成骨蛋白-1(osteogenic protein-1, OP-1)其生物学作用是诱导骨折周围血肿内未分化 BMSC 向软骨细胞和骨细胞分化,并通过钙质沉积形成新骨来促进骨折修复。BMP-7 在成年动物中还具有保护肾脏作用^[3]。

另外, BMP-14 在关节和软骨形成过程中有重要作用,但在骨折愈合过程中的具体作用不明。Grasser 等^[4]通过鼠的骨缺损模型实验中发现, BMP-6 可通过激活 IGF-I 和 EGF 通路发挥骨诱导作用。Huang 等^[5]发现,重组人 BMP-2 可显著促进兔实验模型的骨形成,在标准的组织培养基中, BMP-2 可诱导 BMSC 及成骨细胞的成骨分化。

TGF- β 是一族具有多种功能的蛋白多肽,属于 TGF 超家族,相对分子质量 $1.0 \times 10^5 \sim 2.5 \times 10^5$,广泛存在于人体组织中,以血小板和骨组织的含量最丰富。TGF- β 有 TGF- β 1、TGF- β 2 和 TGF- β 3 3 种亚型。TGF- β 1 是重要的亚型之一,在骨组织中含量最丰富,可促进骨膜间质细胞增殖分化为成骨细胞,促进成骨细胞增殖向成熟型分化,促进 I 型胶原、骨联结素和骨桥蛋白的合成,诱导新骨形成。TGF- β 1 在软骨的生长与分化过程中起关键性的作用,能促进成软骨细胞增

[收稿日期] 2010-06-03

[作者单位] 蚌埠医学院第一附属医院 骨科,安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 许克庆(1978-)男,硕士研究生。