

# 牛分枝杆菌 PPE13 蛋白基因的表达及其表达产物的功能分析

何萍,徐翩翩,杨杨\*,宋厚辉\*  
(浙江农林大学 动物科技学院,浙江 临安 311300)

**摘要:** 为了探索 PPE13 蛋白在牛分枝杆菌感染宿主细胞中所发挥的具体调控作用,本研究利用分子克隆技术构建了表达 PPE13 蛋白的耻垢分枝杆菌重组菌株 Ms\_PPE13。首先采用 PCR 技术扩增 *mb0902c* (PPE13) 基因片段,将其克隆于载体 pMN437 中。挑取阳性克隆测序后,将重组质粒电转至耻垢分枝杆菌中,通过 Western-blot 方法检测 PPE13 蛋白是否在耻垢分枝杆菌中表达。然后测定重组菌株 Ms\_PPE13 的体外生长曲线、感染该菌的巨噬细胞的死亡情况以及使用荧光定量 PCR 方法检测巨噬细胞内炎症相关因子 IL-6、TNF- $\alpha$  和 iNOS 的表达情况,以初步探索 PPE13 的功能。结果显示,PPE13 蛋白可在耻垢分枝杆菌中表达,并且 PPE13 的表达不影响耻垢分枝杆菌在体外的生长。另外,使用耻垢分枝杆菌感染巨噬细胞后,发现 PPE13 可促进巨噬细胞的死亡,并且促进 IL-6 的表达。上述研究结果为进一步探索 PPE13 蛋白调控牛分枝杆菌感染的具体机制提供了新的线索。

**关键词:** 牛分枝杆菌;PPE13;耻垢分枝杆菌;巨噬细胞;细胞死亡;IL-6

## Expression of PPE13 protein gene from *Mycobacterium bovis* and functional analysis of the expressed protein

HE Ping, XU Pian-pian, YANG Yang\*, SONG Hou-hui\*  
(College of Animal Science and Technology, Zhejiang A&F University, Lin'an 311300, China)

**Abstract:** To investigate the role of PPE13 in *Mycobacterium bovis* infecting host cells, the recombinant *Mycobacterium smegmatis* expressing PPE13 was constructed by molecular cloning technology in the present study. Firstly, the *mb0902c* gene encoding PPE13 was amplified by PCR and inserted into the vector pMN437. The positive colonies were screened and sequenced to obtain the correct recombinant vector, and then which was transformed into *Mycobacterium smegmatis*. Western-blot was used to examine if PPE13 could express in *Mycobacterium smegmatis*. To investigate the function of PPE13, the growth curve of recombinant *Mycobacterium smegmatis* named Ms\_PPE13 and the death of macrophages infected with Ms\_PPE13 were tested, and the expression of IL-6, TNF- $\alpha$  and iNOS were examined by the quantitative real-time PCR. In result, PPE13 could express in *Mycobacterium smegmatis* and does not influence the growth of bacteria *in vivo*. In addition, PPE13 enhanced the death of macrophages infected with *Mycobacterium smegmatis* and the expression of IL-6. The above-mentioned results provide a new clue for the investiga-

收稿日期:2018-05-20;修回日期:2018-07-20

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31502034);浙江省自然科学基金资助项目(LQ15C180002);浙江农林大学校科研发展基金人才启动项目(2014FR069)

作者简介:何萍(1990-),女,山东日照人,硕士生,主要研究方向为分枝杆菌致病机制的研究,E-mail:heping201511401200@yeah.net。\*通信作者:杨杨(1988-),女,山东德州人,讲师,博士,主要研究方向为分枝杆菌致病机制的研究,E-mail:yyang@zafu.edu.cn;宋厚辉(1975-),男,山东枣庄人,教授,博士,主要研究方向为革兰阳性菌的致病机制的研究,E-mail:songhh@zafu.edu.cn。

tion of the pathogenicity of PPE13.

**Key words:** *Mycobacterium bovis*; PPE13; *Mycobacterium smegmatis*; macrophage; cell death; IL-6

\* **Corresponding authors:** YANG Yang, E-mail: yyang@zafu.edu.cn; SONG Hou-hui, E-mail: songhh@zafu.edu.cn

牛分枝杆菌 (*Mycobacterium bovis*) 是引发牛结核病和人结核病的病原, 其宿主谱广泛<sup>[1]</sup>, 它严重危害养牛业发展以及食品安全和人类健康<sup>[2]</sup>。牛分枝杆菌和结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb) 基因组序列相似度高达 99.95%<sup>[3]</sup>。

PE/PPE 家族蛋白是一群在 N 端具有保守的 Pro-Glu (PE) 和 Pro-Pro-Glu (PPE) 基序的蛋白, 编码该家族成员的基因占整个基因组全长的 10%, 被认为是细菌毒力和抗原变异的主要来源<sup>[4]</sup>, 因此, 研究该家族成员在分枝杆菌感染宿主细胞中的作用有着重要的意义。PPE13 蛋白属于 PPE 家族下的 PPE\_MPTR 亚家族, 该家族的特点是在 C 端含有重复的 NxGxNxG 基序。研究发现许多结核分枝杆菌的临床亚型的活性依赖于 PPE\_MPTR, 因此, PPE\_MPTR 有可能与细菌毒力有关<sup>[5]</sup>。Soldini 等<sup>[5]</sup>发现 PPE13 在慢性结核感染患者的肺中表达量上调。另外, 有研究发现 PPE13 对分枝杆菌在巨噬细胞中的存活非常重要<sup>[6]</sup>, 但其具体机制尚不清楚。本研究利用分子克隆技术在无毒力的耻垢分枝杆菌中成功表达了 PPE13 蛋白, 并且该蛋白可以促进感染了耻垢分枝杆菌的巨噬细胞的死亡, 这为进一步研究 PPE13 蛋白在牛分枝杆菌感染巨噬细胞中的作用机制奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒及细胞

耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155 菌株、大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 $\alpha$  菌株、小鼠巨噬细胞系 J774A.1 由本实验室保存。质粒 pMN437 和 pMS2 由美国阿拉巴马大学伯明翰校区 Michael Niederweis 教授惠赠。

### 1.2 主要试剂

KOD plus Neo (PCR 试剂盒) 购自 TOYOBO 公司。限制性核酸内切酶 *Pac* 和 *Hind* 购自 NEB 公司。T4 DNA 连接酶购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司。潮霉素 B 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。Middle brook 7H9 和 Middle brook 7H10 购自美国 BD 公司。

### 1.3 引物设计与牛分枝杆菌 *mb0902c* (PPE13) 基因的扩增

根据 NCBI 上公布的牛分枝杆菌 *mb0902c* (PPE13)

基因序列, 设计并合成引物, 扩增 C 端带有 HA 标签的 *mb0902c* 基因片段。上游引物 PPE13-*Pac* - Fwd: 5'-CGAGTTAATTAAGAAAGGAGGTTAAT-AATGAATTTTCATGGTGCTGCCGCC-3', 下游引物 PPE13-*Hind* - Rev: 5'-GAAGAAGCTTTTAAGCG-TAATCTGGAACATCGTATGGGTACTTTTTTTGGGGGGGGCA-3'。PCR 扩增体系: 10  $\times$  KOD plus buffer 5  $\mu$ L, 2 mmol/L dNTPs 5  $\mu$ L, 25 mmol/L MgSO<sub>4</sub> 3  $\mu$ L, 上、下游引物各 1.5  $\mu$ L, 牛分枝杆菌基因组 DNA 1  $\mu$ L, DMSO 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 31  $\mu$ L, KOD-plus-Neo 1  $\mu$ L; PCR 扩增条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 98  $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 68  $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 循环 35 次, 68  $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 12  $^{\circ}$ C 结束; PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

### 1.4 重组质粒的构建

使用限制性内切酶 *Pac* 和 *Hind* 分别酶切 *ppe13* 基因扩增片段和质粒 pMN437, 反应体系: 基因片段或质粒 5  $\mu$ L, 10  $\times$  Cut smart buffer 5  $\mu$ L, *Pac* 和 *Hind* 各 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 39  $\mu$ L, 总体积 50  $\mu$ L。37  $^{\circ}$ C 水浴中酶切 4 h 后纯化回收。使用 T4 DNA 连接酶于 16  $^{\circ}$ C 反应 1 h 后, 转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 涂板过夜培养。挑取单个克隆, 使用扩增 *mb0902c* 基因的特异性引物进行菌落 PCR, 以筛选阳性克隆。挑选到的阳性克隆扩大培养后, 提取质粒送至苏州金唯智生物技术有限公司测序。

### 1.5 重组质粒电转入耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155 感受态细胞

取 100~500 ng 重组质粒加入耻垢分枝杆菌感受态细胞内, 转移至 4 mm 电转杯内进行电转。转化条件为 1 000  $\Omega$ , 2.5 kV, 25  $\mu$ F。电转后, 加入 1 mL 7H9 液体培养基, 37  $^{\circ}$ C 摇床中 200 r/min 培养 3 h。取 100  $\mu$ L 菌液涂布于含有潮霉素、200 mL/L Tween-80 的 7H10 固体平板上, 37  $^{\circ}$ C 恒温培养箱内培养大约 3~5 d。

### 1.6 PPE13 蛋白在耻垢分枝杆菌中表达的 Western-blot 检测

将分别含有重组质粒和空载体的重组耻垢分枝杆菌 (分别命名为 Ms\_PPE13 和 Ms\_Vec) 接种于 5 mL 7H9 液体培养基中, 37  $^{\circ}$ C 培养 24 h, 3 000 r/min 离心收集菌体。用 1 mL 1  $\times$  PBS 重悬菌体, 加入 0.1

mm 玻璃珠振荡破碎后, 12 000 r/min 离心 5 min, 收集菌体蛋白。收集的样品中加入  $4 \times$  loading buffer 煮沸 10 min, 进行 SDS-PAGE 分析, 转入 PVDF 膜后, 使用抗 HA 抗体进行 Western-blot, 以检测 PPE13 蛋白的表达情况。

### 1.7 PPE13 蛋白对耻垢分枝杆菌体外生长能力的影响

将重组耻垢分枝杆菌 Ms\_PPE13 和 Ms\_Vec 分别接种于 50 mL 7H9 液体培养基中, 调节初始  $D_{600}$  至 0.01, 于 37 °C 200 r/min 恒温摇床中培养。每隔 3 h 测量  $D_{600}$  数值, 连续测量 36 h。

### 1.8 PPE13 蛋白对巨噬细胞活性的影响

将 J774A.1 细胞接种于含有 100 mL/L 灭活胎牛血清和抗生素(100 U/mL 青霉素和 0.1 mg/mL 链霉素)的 DMEM 高糖培养基中, 在 37 °C、50 mL/L  $CO_2$  的培养箱内培养。以每孔 5 000 个细胞的密度接种到 96 孔板中, 过夜培养。分别依照感染量 MOI 10:1 和 100:1 分别加入适量的重组耻垢分枝杆菌 Ms\_PPE13 和 Ms\_Vec 于细胞孔中, 感染 6 h、24 h 和 48 h。按照 Cell Titer-Lum™ 细胞活性检测试剂盒说明书, 检测每个时间段的巨噬细胞活性。

### 1.9 炎症相关因子表达的实时荧光定量 PCR 检测

按照每孔  $3 \times 10^5$  个细胞铺于 24 孔细胞培养板中, 过夜培养。以感染量 MOI 10:1 分别加入适量的重组耻垢分枝杆菌 Ms\_PPE13 和 Ms\_Vec 于细胞孔中, 感染 6 h、24 h 和 48 h, 用裂解液裂解并收集细胞。按照 RNA 提取试剂盒说明书要求, 提取细胞总 RNA, 并进行反转录。反转录体系:  $5 \times$  RT buffer 2  $\mu$ L, Prime mix 0.5  $\mu$ L, RT enzyme mix 0.5  $\mu$ L, RNA 1  $\mu$ g, 加无 RNA 酶的 ddH<sub>2</sub>O 至 10  $\mu$ L; 反应条件: 37 °C 进行 15 min 逆转录反应; 98 °C 进行 5 min 酶失活反应; 反应完成后置于 -20 °C 保存备用。

分别根据 NCBI 上公布的小鼠 IL-6、TNF- $\alpha$  和 iNOS 序列设计特异性引物, 分别进行实时荧光定量 PCR 检测, 各引物序列见表 1。反应体系: SYBR GC 11  $\mu$ L, cDNA 1  $\mu$ L, 上、下游引物各 0.8  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 6.4  $\mu$ L; 扩增条件: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 循环 40 次, 罗氏荧光定量仪采集数据。所采集到的数据均用相对荧光定量 PCR 的算法  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  进行分析。

## 2 结果

### 2.1 牛分枝杆菌 mb0902c(PPE13)基因的扩增

利用特异性引物进行 PCR 扩增, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定, 结果(图 1)显示, 得到的条带大

表 1 荧光定量 PCR 中所用引物序列

Table 1 The primer sequences for qRT-PCR

| 基因 Gene         | 上游引物(5'→3')<br>Forward primer | 下游引物(5'→3')<br>Reverse primer  |
|-----------------|-------------------------------|--------------------------------|
| TNF- $\alpha$   | GCGGTGCCTATGTCTCAG            | CACTTGGTGGTTTGCTACG            |
| IL-6            | ACACATGTTCTCTGGGAAATCGT       | AAGTGCAT-<br>CATCGTTGTTTCATACA |
| iNOS            | CCTGGTACGGCATTGCT             | CATGCGCCTCCTTTGAG              |
| $\beta$ -act in | GCTTCTTTGCAGCTCCTTCG          | CCTTCTGACCCATTCCCACC           |

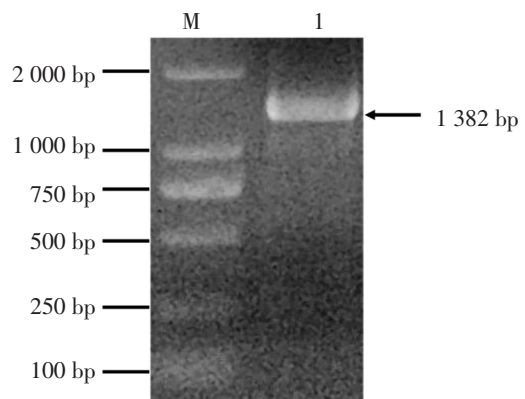


图 1 牛分枝杆菌 mb0902c 基因的 PCR 扩增

Figure 1 PCR amplification of *Mycobacterium bovis* mb0902c gene

M: DNA 分子质量标准; 1: mb0902c 基因的 PCR 扩增产物。

M: DL2000 DNA Marker; 1: PCR product of mb0902c gene.

小与预期大小相符合。

### 2.2 重组质粒的验证

mb0902c 基因的 PCR 扩增产物和质粒 pMN437 经酶切、酶连后, 转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中, 涂布在含有潮霉素的 LB 固体平板上。挑选多个克隆, 经菌落 PCR 筛选, 发现 4 个克隆有明显的目的条带(图 2)。将筛选到的阳性克隆扩大培养后, 提取质粒送去测序, 测序结果与 mb0902c 基因序列一致, 说明重组质粒构建成功。

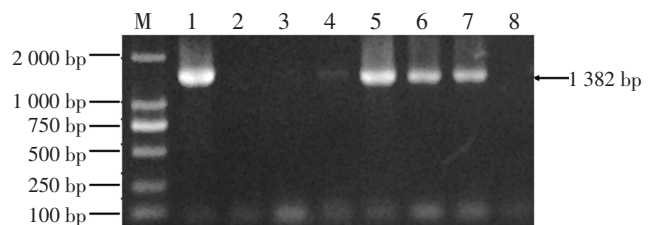


图 2 重组质粒的 PCR 鉴定

Figure 2 Identification of recombinant plasmid by PCR

M: DNA 分子质量标准; 1~7: 重组质粒的 PCR 扩增片段; 8: 阴性对照。

M: DL2000 DNA Marker; 1~7: PCR product of recombinant plasmid; 8: Negative control.

### 2.3 PPE13 蛋白在耻垢分枝杆菌中表达的验证

构建成功的重组质粒电转入耻垢分枝杆菌中,挑取单个克隆培养,收集菌体蛋白和上清,Western-blot 结果(图 3)显示,在菌体和上清中都出现了 1 条特异性条带,大小约为 46 ku,与预期大小相符,说明 PPE13 蛋白在耻垢分枝杆菌中表达。

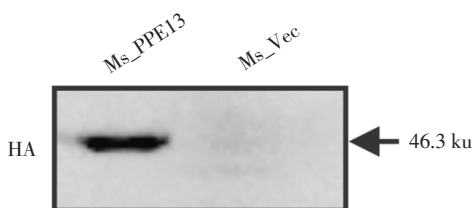


图 3 PPE13 在耻垢分枝杆菌中表达的 Western-blot 验证  
Figure 3 Western-blot analyses of PPE13 expression in *Mycobacterium smegmatis*

### 2.4 PPE13 蛋白对耻垢分枝杆菌体外繁殖的影响

将含有重组质粒和空载体的耻垢分枝杆菌分别接种于 7H9 液体培养基中,每隔 3 h 测定  $D_{600}$  以绘制生长曲线。结果发现两者生长曲线之间没有显著性差异,说明 PPE13 蛋白不影响耻垢分枝杆菌在体外的生长繁殖(图 4)。

### 2.5 PPE13 蛋白促进巨噬细胞的死亡

用表达 PPE13 蛋白的耻垢分枝杆菌 Ms\_PPE13 分别以感染量 MOI 为 10 : 1 和 100 : 1 感染巨噬细胞,在第 6、24 和 48 小时检测细胞的活性,含有空载体的耻垢分枝杆菌 Ms\_Vec 作为对照。在感染量 MOI 为 10 : 1 时,Ms\_Vec 可以促进巨噬细胞的增殖,而 PPE13 却抑制了耻垢分枝杆菌引起的这种细胞增殖作用(图 5A)。然而,当 MOI 为 100 : 1 时,两者都降低细胞的活性,但 PPE13 导致的降低更显著(图 5B)。结果表明,PPE13 可以促进巨噬细胞的死亡。

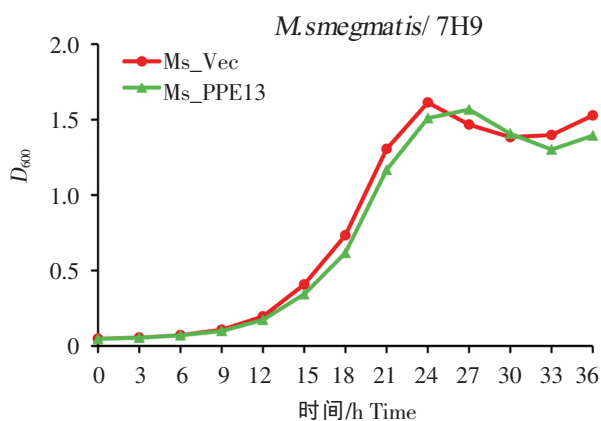
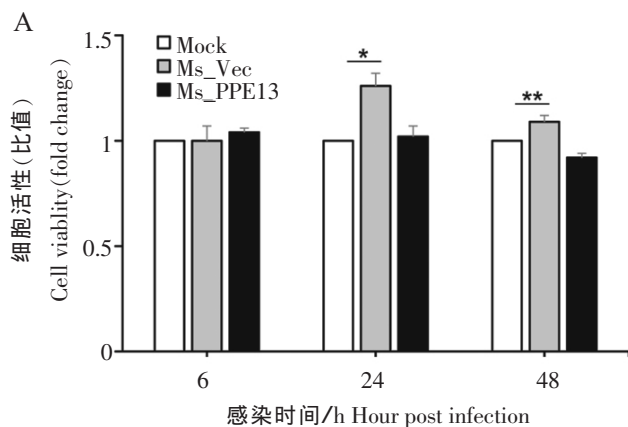


图 4 重组耻垢分枝杆菌的生长曲线  
Figure 4 Growth curve of recombinant *Mycobacterium smegmatis*

### 2.6 PPE13 蛋白促进 IL-6 mRNA 的表达

用重组耻垢分枝杆菌 Ms\_PPE13 感染巨噬细胞,在第 6、24 和 48 小时收取细胞总 RNA,检测 IL-6、TNF- $\alpha$ 和 iNOS mRNA 的表达情况。结果(图 6)表明,与 Ms\_Vec 组相比,PPE13 在感染后第 6、24 和 48 小时可显著性促进 IL-6 转录水平的表达,而不影响 TNF- $\alpha$ 和 iNOS 转录水平的表达。

## 3 讨论

强毒力的分枝杆菌可通过调控和逃避宿主免疫应答来促进其在机体内繁殖扩散,如牛分枝杆菌和结核分枝杆菌。目前已发现许多 PE/PPE 家族成员可以调控巨噬细胞的死亡、细胞因子的分泌和抗原的递呈<sup>[7]</sup>。PE\_PGRS62 可通过阻止 Rab7 和 LAMP1 的募集来抑制吞噬体成熟<sup>[8]</sup>。PE\_PGRS30 同样可以干扰吞噬体的成熟,结核分枝杆菌 PE\_PGRS30 突变株在肺组织定植的能力减弱<sup>[9]</sup>。而 PPE24 和 PPE53 可促进分枝杆菌在巨噬细胞内的存活<sup>[10]</sup>。虽然 PE/PPE 家

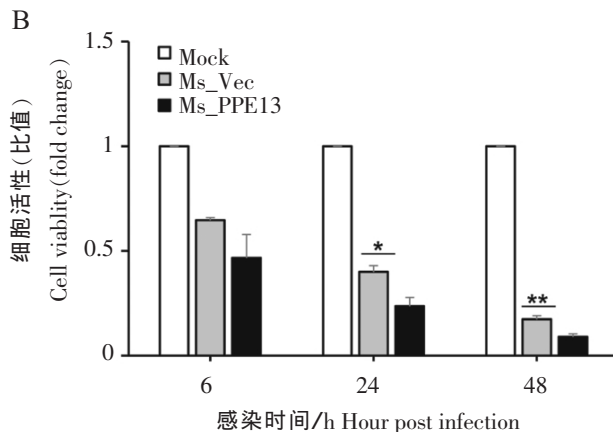


图 5 感染耻垢分枝杆菌的巨噬细胞的活性检测  
Figure 5 Viability of macrophages infected with *Mycobacterium smegmatis*

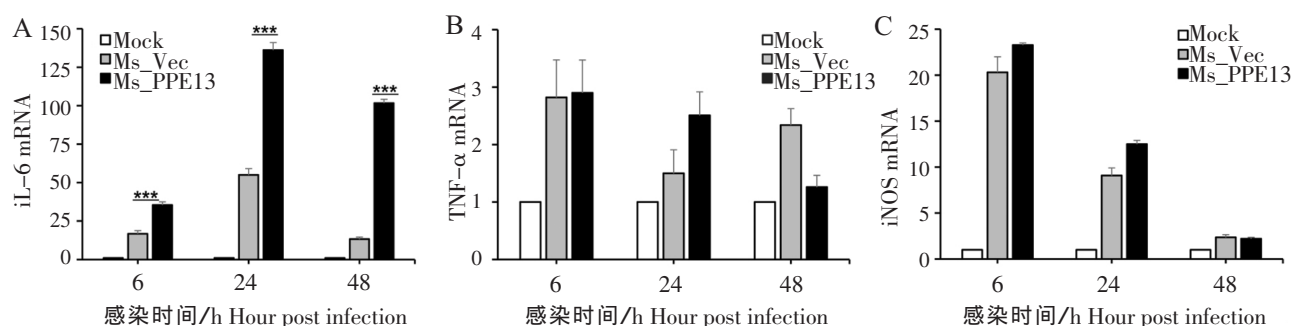


图 6 细胞因子转录水平的表达情况

Figure 6 Expression of cytokines in transcriptional levels

重组耻垢分枝杆菌菌株 Ms\_PPE13 和 Ms\_Vec 分别以感染强度 MOI 为 10 : 1 感染巨噬细胞后,在不同时间点 IL-6(A)、TNF- $\alpha$ (B)和 iNOS(C) mRNA 的表达情况。

Macrophages were infected with recombinant *Mycobacterium smegmatis* Ms\_PPE13 or Ms\_Vec at MOI of 10 : 1, and the mRNA expression of IL-6 (A), TNF- $\alpha$ (B) and iNOS(C) were tested at different time points.

族的部分成员的功能已被证实,但大多数成员的具体功能仍是未知的。

PE/PPE 家族蛋白主要存在于致病性强、生长慢的分枝杆菌中,而在无致病性、生长迅速的耻垢分枝杆菌中仅有 4 种 PE/PPE 蛋白<sup>[11]</sup>。利用 PE/PPE 家族的这一特性,本研究利用分子克隆技术在耻垢分枝杆菌中表达了牛分枝杆菌 PPE13 蛋白。虽然, PPE13 的表达并不影响耻垢分枝杆菌在体外的生长繁殖,但是可以促进巨噬细胞的死亡,其具体机制需要进一步研究。

促炎因子在控制分枝杆菌感染中起着重要的作用。IL-6 可以促进 Th1 免疫反应的发生<sup>[12]</sup>, IL-6 缺失的小鼠对静脉注射的分枝杆菌感染更加敏感<sup>[13]</sup>。本研究发现 PPE13 可以选择性地调节 IL-6 mRNA 的表达,而对其他促炎因子如 TNF- $\alpha$  没有显著性影响。产生具有杀菌作用的一氧化氮是巨噬细胞重要的防御机制之一<sup>[14]</sup>。研究表明,诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的缺乏可导致细菌负荷的加剧<sup>[14]</sup>。然而,结核分枝杆菌可抑制 iNOS 产生一氧化氮<sup>[15]</sup>。当 PE5 和 PE15 在耻垢分枝杆菌中表达时,可降低巨噬细胞 J774A.1 和 THP-1 中 iNOS 的转录水平,并且增强细菌在巨噬细胞中的存活<sup>[16]</sup>。然而本研究发现 PPE13 并没有影响耻垢分枝杆菌感染所致的 iNOS 的表达。

综上所述,本研究发现表达 PPE13 蛋白的耻垢分枝杆菌可以促进巨噬细胞的死亡和 IL-6 的表达,这说明该蛋白可能在分枝杆菌对巨噬细胞的致病性中发挥重要作用,为进一步研究 PPE13 在分枝杆菌感染中的具体机制提供了依据和线索。

## 参考文献(References)

[1] RIVIERE J, CARABIN K, LE S, et al. Bovine tuberculo-

sis surveillance in cattle and free-ranging wildlife in EU Member States in 2013: a survey-based review [J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 173(3-4): 323-331.

- [2] O'REILLY L M, DABOM C J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review [J]. *Tubercle and Lung Disease*, 1995, 76 (Suppl 1): 1-46.
- [3] GAMIER T, EIGLMEIER K, CAMUS J, et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100 (13): 7877-7882.
- [4] PITTUS N C, SAMPSON S L, LEE H, et al. Evolution and expansion of the *Mycobacterium tuberculosis* PE and PPE multigene families and their association with the duplication of the ESAT-6(esx) gene cluster regions [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2006, 6(1): 95.
- [5] SOLDINI S, PALUCCI I, ZUMBO A, et al. PPE\_MPTR genes are differentially expressed by *Mycobacterium tuberculosis in vivo* [J]. *Tuberculosis*, 2011, 91(6): 563-568.
- [6] STEWART G R, PATEL J, ROBERTSON B D, et al. *Mycobacterial mutants with defective control of phagosomal acidification* [J]. *PLoS Pathogens*, 2005, 1(3): 269-278.
- [7] AHMED A, DAS A, MUKHOPADHYAY S. Immunoregulatory functions and expression patterns of PE/PPE family members: Roles in pathogenicity and impact on anti-tuberculosis vaccine and drug design [J]. *Iubmb Life*, 2015, 67(6): 414-427.
- [8] THI E P, HONG C J, SANGHERA G, et al. Identification of the *Mycobacterium tuberculosis* protein PE-PGRS62 as a novel effector that functions to block phago-

- some maturation and inhibit iNOS expression [J]. *Cell Microbiology*, 2013, 15(5):795-808.
- [9] BANUS S, HONORE N, SAINT B, *et al.* Are the PE-PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens? [J] *Molecular Microbiology*, 2002, 44(1):9-19.
- [10] MEHTA P K, PANDEY A K, SUBBIAN S, *et al.* Identification of *Mycobacterium marinum* macrophage infection mutants [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2006, 40(4):139-151.
- [11] TIWARI B M, KANNAN N, VEMU L, *et al.* The *Mycobacterium tuberculosis* PE proteins Rv0285 and Rv1386 modulate innate immunity and mediate bacillary survival in macrophages [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12):e51686.
- [12] LEAL I S, SMEDEGARD B, ANDERSEN P, *et al.* Interleukin-6 and interleukin-12 participate in induction of a type 1 protective T-cell response during vaccination with a tuberculosis subunit vaccine [J]. *Infection and Immunity*, 1999, 67(11):5747-5754.
- [13] LADEL C H, BLUM C, DREHER A, *et al.* Lethal tuberculosis in interleukin-6-deficient mutant mice [J]. *Infection and Immunity*, 1997, 65(11):4843-4849.
- [14] MISHRA B B, RATHINAM V A, MARTENS G W, *et al.* Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1 $\beta$  [J]. *Nature Immunology*, 2013, 14(1):52-60.
- [15] ADAMS L B, DINAUER M C, MORGENSTERN D E, *et al.* Comparison of the roles of reactive oxygen and nitrogen intermediates in the host response to *Mycobacterium tuberculosis* using transgenic mice [J]. *Tubercle and Lung Disease*, 1997, 78(5-6):237-246.
- [16] DAVIS A S, VERGNE I, MASTER S S, *et al.* Mechanism of inducible nitric oxide synthase exclusion from mycobacterial phagosomes [J]. *PLoS Pathogen*, 2007, 3(12):e186.

(责任编辑 胡弘博)