

结核分枝杆菌抗原 Rv0585c 人 T 细胞抗原表位鉴定及其免疫原性评价

王雪枝 陈杏 李雨晴 肖彤洋 蒋毅 李马超 刘海灿 万康林

102206 北京, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 传染病预防控制国家重点实验室 传染病诊治协同创新中心(王雪枝、肖彤洋、蒋毅、李马超、刘海灿、万康林);
421001 衡阳, 南华大学公共卫生学院(陈杏、李雨晴)

通信作者: 万康林, Email: wankanglin@icdc.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2017.05.022

【摘要】 目的 研究结核分枝杆菌抗原 Rv0585c 的抗原表位及其免疫原性, 为结核病特异免疫诊断技术和疫苗的研发提供基础。**方法** 利用生物信息学 TE-predict 和 IEDB 人 T 细胞抗原表位预测软件进行结核分枝杆菌抗原 Rv0585c 的人 T 细胞抗原表位预测, 根据预测结果, 合成表位多肽, 用 ELISpot 试验检测预测表位在临床结核病患者中的免疫反应性。分别采用高、低剂量 (100 $\mu\text{g}/\text{只}$ 和 50 $\mu\text{g}/\text{只}$) 的 Rv0585c 抗原表位多肽、同时以高、低剂量 (50 $\mu\text{g}/\text{只}$ 和 20 $\mu\text{g}/\text{只}$) 的 Ag85B 蛋白抗原为对照, 对随机分组的 BALB/c 小鼠进行免疫。利用 ELISA 方法检测 IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10 的水平。**结果** 经生物信息学技术预测到 Rv0585c 66 个人 T 细胞抗原表位, 选取合成了表位分布集中的抗原表位多肽 9 条。人群 ELISpot 试验筛选出 3 条阳性人 T 细胞表位多肽: P10110、P10112、P10117, 用于肺结核检测的灵敏度分别为 14.00%、12.00% 和 6.00%, 特异度分别为 100.00%、100.00% 和 97.96%; 联合用于肺结核检测的灵敏度和特异度分别为 22.00% 和 97.96%。动物免疫试验结果显示, P10110 多肽高、低剂量刺激小鼠产生较高水平的 IFN- γ 、IL-2、IL-4 和 IL-10, P10112 多肽高、低剂量刺激小鼠产生较高水平的 IFN- γ 、IL-2 和 IL-10, 均高于阴性对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。**结论** Rv0585c 蛋白及其 T 细胞表位具有较好的免疫原性及免疫反应性, 能刺激机体产生较强烈的细胞免疫应答, 具有潜在的结核病细胞免疫诊断和新型结核疫苗的应用价值。

【关键词】 结核分枝杆菌; Rv0585c; 人 T 细胞抗原表位; 免疫原性; 细胞因子

基金项目: 国家传染病重大专项 (2013ZX10003006-002)

Identification and evaluation of T cell epitopes of Rv0585c from *Mycobacterium tuberculosis*

Wang Xuezi, Chen Xing, Li Yuqing, Xiao Tongyang, Jiang Yi, Li Machao, Liu Haican, Wan Kanglin
State Key Laboratory for Communicable Disease Prevention and Control, Collaborative Innovation Center for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China (Wang XZ, Xiao TY, Jiang Y, Li MC, Liu HC, Wan KL); School of Public Health, University of South China, Hengyang 421001, China (Chen X, Li YQ)

Corresponding author: Wan Kanglin, Email: wankanglin@icdc.cn

【Abstract】 Objective To investigate the human T cell epitopes of *Mycobacterium* (*M.*) *tuberculosis* Rv0585c protein antigen and their immunogenicity and provide evidence for the development of specific tuberculosis immune diagnostic techniques and tuberculosis vaccine. **Methods** We synthesized peptides from *M. tuberculosis* Rv0585c protein antigen predicted by TE-predict and IEDB human T cell epitope prediction tool. The cellular immunoreactivity of the predicted peptides was evaluated through ELISpot assay with the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of clinical tuberculosis patients. In animal experiments, BALB/c mice were respectively immunized with high dose (100 $\mu\text{g}/\text{mice}$) and low dose (50 $\mu\text{g}/\text{mice}$) of the peptides of Rv0585c, at the same time, high dose (50 $\mu\text{g}/\text{mice}$) and low dose (20 $\mu\text{g}/\text{mice}$) of Ag85B protein were used in positive control group. The levels of IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL-10 were tested with ELISA kit respectively. **Results** By means of bioinformatics technique, 66 human T cell epitopes of Rv0585c were predicted,

from which 9 peptides concentrated epitopes were synthesized for the animal immune experiments. Peptides P10110, P10112 and P10117 were confirmed to be antigenic. The sensitivity and specificity of P10110, P10112 and P10117 were 14.00%, 12.00%, 6.00% and 100.00%, 100.00%, 97.96% respectively when they were used as diagnostic reagents of tuberculosis. The sensitivity and specificity were 22.00% and 97.96% when the epitopes were combined together. The results of animal immunity test showed that high levels of cytokines IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL-10 were induced by high and low dose of P10110, and high levels of IFN- γ , IL-2 and IL-10 were induced by high and low dose of P10112, which were much higher than that in negative controls, respectively ($P < 0.001$). **Conclusion** Rv0585c, including its human T cell epitopes, has good immunogenicity and immunoreactivity, stimulating the body to produce a stronger cellular immune response and has better potential application value in cellular diagnosis of tuberculosis and the development of new type of tuberculosis vaccine.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Rv0585c; Human T cell epitopes; Immunogenicity; Cytokine

Fund program: National Key Program for Infectious Diseases of China (2013ZX10003006-002)

结核分枝杆菌的清除主要依赖T淋巴细胞和巨噬细胞之间的相互作用^[1]。T细胞表位是被宿主T细胞特异性抗原受体(TCR)特异性识别的抗原部分,是宿主与病原菌相互作用的作用位点,对T细胞表位的研究对了解结核分枝杆菌的致病机制以及研发免疫诊断试剂、有效的治疗药物、疫苗非常重要。本研究利用比较基因组学筛选出结核分枝杆菌H37Rv和BCG共有的保守膜蛋白Rv0585c(主要参与细胞壁的加工处理)^[2],然后对Rv0585c的人T细胞表位进行预测,并通过人群免疫学检测和动物免疫学试验对T细胞表位及其免疫原性进行分析。

材料与方法

1. 多肽的合成:用生物信息学软件TE-predict和IEDB在线T细胞表位预测软件对Rv0585c抗原进行人T细胞抗原表位预测,选择表位聚集区9条表位多肽(表1),由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。其中用于动物免疫实验的多肽是通过多肽半胱氨酸的巯基与血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH)上的伯胺共价偶联。

表1 结核分枝杆菌保守膜蛋白Rv0585c人T抗原表位多肽信息

抗原表位多肽	位置	氨基酸序列
P10107	93 ~ 110	SRQWKLLGAYAAAGLMAV
P10108	193 ~ 219	LGLAVGWLVGALVVLVVGTPALEVPLD
P10109	308 ~ 331	LMAIAFGDLGMANTTVIAVSPLDR
P10110	491 ~ 518	GQLIQLVLIGALVYVAYPFISTVPTFFS
P10111	521 ~ 545	RTANWWWALLGLAVSALTYVGAAAA
P10112	561 ~ 575	IMQVANTFAATTTPA
P10113	586 ~ 600	FLQKGGTLTAVRATAA
P10114	637 ~ 662	TVLYLIAGVALGIVGTFLFVPKLRRW
P10115	719 ~ 733	FVTVTVVTMVGGLTA
P10116	752 ~ 769	GLAAFGVPAALGVPSVLL
P10117	93 ~ 110	SRQWKLLGAYAAAGLMAV

2. 人群样本筛选:结核病患者筛选标准定为经痰培养或痰涂片,或临床验证过的结核病患者,符合中华人民共和国卫生行业标准《肺结核诊断标准(WS 288—2008)》。肺部其他疾病患者筛选标准定为经细菌学试验鉴定或临床诊断排除结核病的肺部疾病患者。本研究通过中国CDC传染病预防控制所伦理审查委员会及动物伦理审查委员会批准,所有参与者均签署知情认同书。被试人群包括结核病患者、肺部其他疾病患者和健康志愿者。

3. 固相酶联免疫斑点技术(ELISpot):根据结核分枝杆菌效应T细胞检测试剂盒T-SPOT.TB(北京金豪制药股份有限公司),用肝素锂抗凝真空采血管采集10 ml新鲜外周静脉血,用Ficoll淋巴细胞分离液分离外周血淋巴细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC),用AIM-V无血清培养基(Gibco, USA)将细胞稀释成 2.5×10^6 /ml的细胞悬液。将PBMC细胞悬液加入到预先包被IFN- γ 抗体的96孔微孔反应板中,100 μ l/孔,来自同一个志愿者PBMCs分别加入9条多肽(终浓度为20 μ g/ml),每条多肽100 μ l,平行加入100 μ l终浓度为15 μ g/ml的植物血凝素PHA作为阳性对照孔,加入100 μ l无菌PBS作为阴性对照孔,然后加入试剂盒中抗原肽100 μ l作为检测孔。将抗原与PBMCs细胞置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的培养箱中培养20 h。次日,按照试剂盒说明对细胞上清中IFN- γ 的水平进行检测。结果判定:当空白对照孔斑点数为0~5,且检测孔斑点数-空白对照孔斑点数 ≥ 6 判定为阳性;当空白对照孔斑点数为6~10,检测孔斑点数 $\geq (2 \times$ 空白对照孔斑点数)时,判定为阳性。

4. 动物免疫试验:为了验证筛选出的T细胞表位的免疫原性,选择其中人T细胞免疫反应强度较强的2条多肽P10110和P10112以及Ag85B蛋白免

疫BALB/c小鼠。随机将48只6周龄的雌性BALB/c小鼠(SPF级,购自武汉生物制品研究所动物中心)分为8组,每组6只。多肽P10110、P10112及Ag85B蛋白和KLH(阴性对照)利用佐剂[100 μl DDA (2.5 mg/ml) DDA及50 μl poly I : C (0.5 mg/ml) (Sigma)]乳化后用于小鼠免疫,见表2。空白对照组仅皮下免疫200 μl PBS。所有小鼠均皮下免疫3次,每次间隔2周。末次免疫4周后处死小鼠,取出小鼠脾脏,用RPMI-1640培养基(20%胎牛血清,1%双抗)将脾细胞稀释成 2×10^6 /ml,将细胞悬液加到24孔细胞培养板中,500 μl/孔,PBS组和KLH组小鼠的脾细胞分别加入相同体积的Ag85B(5 μg/ml)、P10110(5 μg/ml)、P10112(5 μg/ml)进行刺激,Ag85B-L和Ag85B-H组小鼠的脾细胞用500 μl Ag85B(5 μg/ml)进行刺激,P10110-L和P10110-H组的小鼠脾细胞用500 μl P10110(5 μg/ml)进行刺激,P10112-L和P10112-H组的小鼠脾细胞用500 μl P10112(5 μg/ml)进行刺激。每条多肽刺激设置双孔。每组小鼠皮细胞刺激均设阴性对照(加入500 μl PBS)和阳性对照(加入500 μl 5 μg/ml的PHA)。37 °C、5% CO₂的培养箱中培养72 h后,用细胞因子检测试剂盒(美国BD公司)检测细胞上清中的抗原特异性的细胞因子IFN-γ、IL-2、IL-4、IL-10的水平。

表2 结核分枝杆菌保守膜蛋白Rv0585c免疫小鼠程序

分组	免疫原	免疫剂量(μg)
Ag85B-L	Ag85B	20
Ag85B-H	Ag85B	50
P10110-L	P10110	50
P10110-H	P10110	100
P10112-L	P10112	50
P10112-H	P10112	100

5. 统计学分析:ELISpot 试验结果用阳性率和特异度表示,动物实验中细胞因子水平用 $\bar{x} \pm s$ 表示,最后利用SPSS 21 软件进行数据处理,采用独立样本t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 一般情况:共采集全血样本153份,其中结核病患者样本50例、肺部其他疾病患者43例、健康志愿者60例。全部样本中,5例健康志愿者样本的检测结果不符合质量控制标准而被剔除,最终纳入统计的样本为148例。

2. ELISpot:利用多肽刺激志愿者PBMC进行ELISpot 试验,人群筛选试验结果显示,结核病患者对其中3条多肽能产生不同程度的阳性T细胞免疫

应答,P10110、P10112和P10117,用于肺结核检测的阳性率分别为14.00%、12.00%和6.00%,特异度分别为100.00%、100.00%和97.96%。根据单条结核T细胞表位多肽检测阳性即为阳性的原则,3条多肽联合用于肺结核检测的阳性率为22.00%(11/50),特异度为97.96%(95/98),见表3。肺部其他疾病患者和健康志愿者对此9条多肽的T细胞免疫反应均为阴性,因此提示P10110、P10112、P10117为结核分枝杆菌人T细胞抗原表位。

表3 Rv0585c蛋白9条多肽检测结果

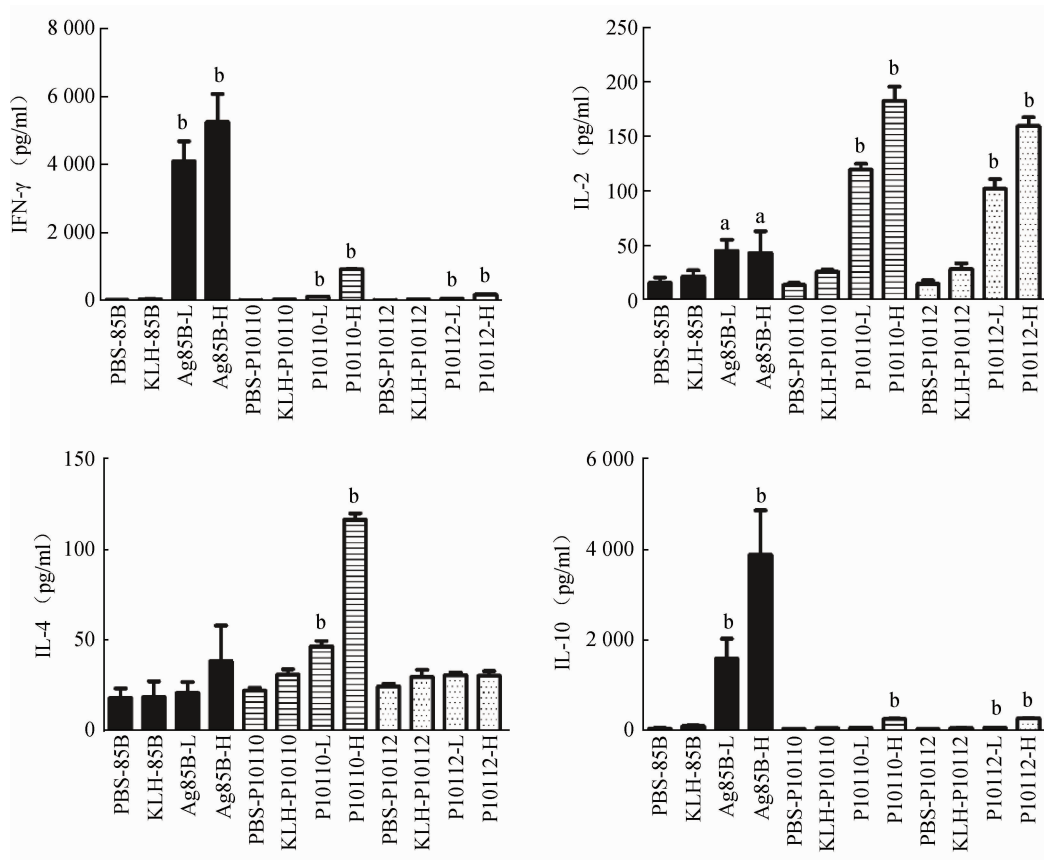
表位多肽	结核病患者		阳性率 (%) ^a	肺部其他疾病患者和健康志愿者		特异度 (%) ^b
	检测数	阳性数		检测数	阴性数	
P10107	50	0	0.00	98	98	100.00
P10108	50	0	0.00	98	98	100.00
P10109	50	0	0.00	98	98	100.00
P10110	50	7	14.00	98	98	100.00
P10111	50	0	0.00	98	98	100.00
P10112	50	6	12.00	98	98	100.00
P10113	50	0	0.00	98	98	100.00
P10114	50	0	0.00	98	98	100.00
P10115	50	0	0.00	98	98	100.00
P10116	50	0	0.00	98	98	100.00
P10117	50	3	6.00	98	96	97.96

注:^a阳性率=(结核病患者检测阳性数/结核病患者总数)×100%;^b特异度=(肺部其他疾病患者检测阴性数+健康志愿者检测阴性数)/(肺部其他疾病患者总数+健康志愿者总数)×100%

3. 细胞因子水平检测:末次免疫4周后,采集每组6只小鼠的脾细胞,以特异性抗原Ag85B、P10110多肽、P10112多肽进行刺激,检测产生的细胞因子IFN-γ、IL-2、IL-4、IL-10。P10110和P10112均能刺激机体产生的IFN-γ、IL-2、IL-4和IL-10(图1),且高剂量组产生的细胞因子的水平均高于低剂量组。与阳性对照Ag85B抗原相比,P10110和P10112高、低剂量组产生的IFN-γ、IL-10的水平低于Ag85B高、低剂量组,差异有统计学意义($P < 0.001$)。但P10110和P10112高、低剂量组产生的IL-2的水平高于Ag85B高、低剂量组,差异有统计学意义($P < 0.001$)。

讨 论

结核病的流行给全球公共卫生带来巨大挑战,而结核疫苗能有效预防和控制结核病的流行^[3]。BCG疫苗虽然被广泛使用,但其保护性只能维持10~15年^[4-5]。新型亚单位疫苗有潜力替代BCG疫苗或用于加强免疫增强BCG引起的免疫应答^[6-9]。结核候选抗原的缺少仍是结核亚单位疫苗研究的最



注:横坐标各组以“免疫组-刺激原”命名,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.001$

图1 不同剂量P10110和P10112免疫小鼠分泌IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10的水平

大阻碍,因此寻找新的免疫优势抗原或抗原表位是新型结核疫苗研发的关键。

在本研究中,从Rv0585c蛋白中鉴定的3个人T细胞表位在人群中的反应强度不同且反应强度较低,推测可能与检测阴性的T细胞表位多肽只是该抗原T细胞表位的一部分或单条多肽结构单一,不足以引起足够的T细胞免疫反应有关。3个T细胞表位联合应用,检测的阳性率较单个表位的阳性率有所升高,因此,多条多肽联合使用,能够提高T细胞反应强度,在人群结核病监测中使用,可更好地监测人群中结核病的流行情况。

机体对结核分枝杆菌的免疫应答主要是CD₄⁺T淋巴细胞和CD₈⁺T淋巴细胞介导的细胞免疫应答。其中CD₄⁺T细胞可以分为Th1和Th2细胞,而前者分泌的IFN- γ 、IL-2、IL-12、TNF- α 中的IFN- γ 能够激活巨噬细胞,释放效应分子活性氮介质、活性氮介质和促进溶酶体成熟等杀菌物质清除细胞内结核分枝杆菌^[10-11],Th2细胞能分泌IL-4、IL-5和IL-10等细胞因子,辅助B细胞激活、增殖调节体液免疫^[11]。本研究中的P10110表位能诱导BALB/c小鼠产生高浓度的IFN- γ 、IL-2、IL-4和IL-10,而P10112表位

则能刺激产生较高浓度的IFN- γ 、IL-2和IL-10,证实2条T细胞表位均能刺激机体产生较强的细胞免疫应答和体液免疫应答。但100 μ g P10110和100 μ g P10112产生的IFN- γ 和IL-10水平均明显低于50 μ g Ag85B,产生的IL-2和IL-4明显高于Ag85B,显示单一多肽,即使提高免疫浓度,免疫效果仍然不如其全蛋白抗原。

综上所述,本研究利用ELISpot试验从预测的Rv0585c抗原表位多肽中首次鉴定出3条人T细胞表位,这些表位可以用作刺激物,用于结核病的检测。通过用T细胞表位免疫BALB/c小鼠,证实了P10110和P10112两条T细胞表位具有较强的免疫原性,能诱导机体产生高水平的细胞因子,因此这两个T细胞表位具有潜在的可能性用于结核亚单位疫苗。若将Rv0585c或其T细胞表位用作新型结核亚单位疫苗的制备,仍需对其免疫保护力进一步验证。

利益冲突 无

参 考 文 献

[1] van Crevel R, Ottenhoff THM, van der Meer JWM. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis* [M]//Marzuki S, Verhoeff J, Snippe H. Tropical Diseases. New York: Springer, 2003:

241–247. DOI:10.1007/978-1-4615-0059-9_20.

[2] de Souza GA, Leversen NA, Målen H, et al. Bacterial proteins with cleaved or uncleaved signal peptides of the general secretory pathway [J]. *J Proteomics*, 2011, 75 (2) : 502–510. DOI: 10.1016/j.jprot.2011.08.016.

[3] Lönnroth K, Raviglione M. Global epidemiology of tuberculosis: prospects for control [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2008, 29 (5):481–491. DOI: 10.1055/s-0028-1085700.

[4] Andersen P, Doherty TM. The success and failure of BCG-implications for a novel tuberculosis vaccine [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3(8):656–662. DOI: 10.1038/nrmicro1211.

[5] Mangtani P, Abubakar I, Ariti C, et al. Protection by BCG vaccine against tuberculosis: a systematic review of randomized controlled trials [J]. *Clin Infect Dis*, 2014, 58(4):470–480. DOI: 10.1093/cid/cit790.

[6] Bertholet S, Ireton GC, Kahn M, et al. Identification of human T cell antigens for the development of vaccines against *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Immunol*, 2008, 181 (11) : 7948–7957. DOI: 10.4049/jimmunol.181.11.7948.

[7] Bertholet S, Ireton GC, Ordway DJ, et al. A defined tuberculosis vaccine candidate boosts BCG and protects against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Sci Transl Med*, 2010, 2 (53):53ra74. DOI: 10.1126/scitranslmed.3001094.

[8] Ottenhoff THM, Doherty TM, van Dissel JT, et al. First in humans: a new molecularly defined vaccine shows excellent safety and strong induction of long-lived *Mycobacterium tuberculosis*-specific Th1-cell like responses [J]. *Hum Vaccin*, 2010, 6(12):1007–1015. DOI: 10.4161/hv.6.12.13143.

[9] van Dissel JT, Soonawala D, Joosten SA, et al. Ag85B–ESAT-6 adjuvanted with IC31[®] promotes strong and long-lived *Mycobacterium tuberculosis* specific T cell responses in volunteers with previous BCG vaccination or tuberculosis infection [J]. *Vaccine*, 2011, 29 (11):2100–2109. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.12.135.

[10] Flynn JA, Chan J. Immunology of tuberculosis [J]. *Annu Rev Immunol*, 2001, 19(1):93–129. DOI: 10.1146/annurev.immunol.19.1.93.

[11] Matucci A, Maggi E, Vultaggio A. Cellular and humoral immune responses during tuberculosis infection: useful knowledge in the era of biological agents [J]. *J Rheumatol Suppl*, 2014, 91:17–23. DOI: 10.3899/jrheum.140098.

(收稿日期:2016–10–01)

(本文编辑:万玉立)

中华流行病学杂志第七届编辑委员会成员名单

(按姓氏汉语拼音排序)

名誉总编辑	郑锡文(北京)					
顾问	曲成毅(山西)	王滨有(黑龙江)	乌正赉(北京)	张孔来(北京)	赵仲堂(山东)	庄辉(北京)
总编辑	李立明(北京)					
副总编辑	曹务春(北京)	冯子健(北京)	顾东风(北京)	何耀(北京)	贺雄(北京)	姜庆五(上海)
	汪华(江苏)	徐建国(北京)	詹思延(北京)			
编辑委员	毕振强(山东)	蔡琳(福建)	曹广文(上海)	曹务春(北京)	陈峰(江苏)	陈坤(浙江)
	陈可欣(天津)	陈维清(广东)	程锦泉(广东)	杜建伟(海南)	段广才(河南)	方向华(北京)
	冯子健(北京)	龚向东(江苏)	顾东风(北京)	郭志荣(江苏)	何耀(北京)	何剑峰(广东)
	贺雄(北京)	胡东生(广东)	胡国良(江西)	胡永华(北京)	胡志斌(江苏)	贾崇奇(山东)
	姜宝法(山东)	姜庆五(上海)	阚飙(北京)	康德英(四川)	李丽(宁夏)	李群(北京)
	李敬云(北京)	李俊华(湖南)	李立明(北京)	廖苏苏(北京)	刘静(北京)	刘民(北京)
	刘殿武(河北)	刘天锡(宁夏)	卢金星(北京)	陆林(云南)	栾荣生(四川)	罗会明(北京)
	吕繁(北京)	吕筠(北京)	马文军(广东)	孟蕾(甘肃)	米杰(北京)	潘凯枫(北京)
	祁禄(美国)	乔友林(北京)	邱洪斌(黑龙江)	仇小强(广西)	沈洪兵(江苏)	施榕(上海)
	施小明(北京)	时景璞(辽宁)	苏虹(安徽)	谭红专(湖南)	唐金陵(中国香港)	汪华(江苏)
	汪宁(北京)	王蓓(江苏)	王岚(北京)	王鸣(广东)	王定明(贵州)	王建华(天津)
	王全意(北京)	王素萍(山西)	吴凡(上海)	吴先萍(四川)	吴尊友(北京)	夏洪波(黑龙江)
	项永兵(上海)	徐飏(上海)	徐爱强(山东)	徐建国(北京)	许汴利(河南)	闫永平(陕西)
	严延生(福建)	杨维中(北京)	叶冬青(安徽)	于普林(北京)	于雅琴(吉林)	余宏杰(北京)
	俞敏(浙江)	詹思延(北京)	张瑜(湖北)	张博恒(上海)	张建中(北京)	张顺祥(广东)
	张作风(美国)	赵方辉(北京)	赵根明(上海)	赵亚双(黑龙江)	周宝森(辽宁)	周晓农(上海)
	朱谦(河南)	庄贵华(陕西)				