

PPE61 重组耻垢分枝杆菌对胁迫压力的响应及 MAPK/NF- κ B 信号的调节

宋丽^{1,2}, 梁志航³, 毕静², 郭庆龙², 张国良^{1,2*}

1 西南医科大学附属医院感染性疾病科, 四川 泸州

2 深圳市第三人民医院, 国家感染性疾病临床医学研究中心, 广东 深圳

3 广东药科大学附属第一医院检验科, 广东 广州

宋丽, 梁志航, 毕静, 郭庆龙, 张国良. PPE61 重组耻垢分枝杆菌对胁迫压力的响应及 MAPK/NF- κ B 信号的调节[J]. 微生物学报, 2025, 65(12): 5380-5391.

SONG Li, LIANG Zhihang, BI Jing, GUO Qinglong, ZHANG Guoliang. Expression of PPE61 enhances stress tolerance and regulates MAPK/NF- κ B signaling of *Mycobacterium smegmatis*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(12): 5380-5391.

摘要: 【目的】比较重组耻垢分枝杆菌 Ms-PPE61 与 Ms-Vec 在不同体外应激条件下的抗压能力, 研究二者感染巨噬细胞后 MAPK/NF- κ B 信号通路的激活/抑制水平, 并探究感染 RAW264.7 细胞后炎症细胞因子表达差异。【方法】构建 Ms-Vec 和 Ms-PPE61 菌株, 培养至对数生长期后分别置于酸性、SDS、H₂O₂ 条件下处理, 检测不同时间点的菌落形成单位(colony-forming unit, CFU); 收集感染后 1-48 h 的细胞, 提取蛋白, 用 Western blotting 检测信号通路标志分子表达水平; 用 Ms-Vec 和 Ms-PPE61 菌株分别感染 RAW264.7 细胞 24 h 和 48 h, 采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测上清中 IL-6、TNF- α 及 IL-1 β 的浓度; 数据用 GraphPad Prism 7.0 分析, 进行 ANOVA 方差分析, $P < 0.05$ 为显著。【结果】PCR 结果显示, Ms-PPE61 有目的条带, Ms-Vec 无目的条带; 考马斯亮蓝染色显示蛋白上样水平一致, Western blotting 显示 Ms-PPE61 表达约 42 kDa 的 Flag 融合蛋白, Ms-Vec 无融合蛋白。采用超高速离心分离耻垢分枝杆菌组分, Western blotting 结果显示细胞质标记蛋白 GroES 在 Ms-Vec 和 Ms-PPE61 细胞质中均有表达, 含 Flag 标签的目的蛋白仅存在于 Ms-PPE61 细胞壁。在酸性条件(pH 3.0)下处理 3 h 时 Ms-PPE61 的存活率显著高于 Ms-Vec ($P < 0.0001$), 6 h 和 9 h 时无显著差异($P > 0.05$); 在 0.2% SDS 条件下处理 3、6 和 9 h 时 Ms-PPE61 的存活率均显著高于 Ms-Vec ($P < 0.0001$); H₂O₂ 处理后 3 h 和 6 h, Ms-PPE61 的存活率也显著高于 Ms-Vec ($P < 0.0001$)。Western blotting 检测显示, Ms-PPE61

资助项目: 国家自然科学基金(82102403); 深圳市科技计划(KCXFZ20211020163545004, RCJC20221008092726022); 深圳市“医疗卫生三名工程”项目(SZZYSM202311009)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82102403), the Shenzhen Scientific and Technological Program (KCXFZ20211020163545004, RCJC20221008092726022), and the Sanming Project of Medicine in Shenzhen (SZZYSM202311009).

*Corresponding author. E-mail: zhanggl2020@mail.sustech.edu.cn

Received: 2025-05-08; Accepted: 2025-08-01; Published online: 2025-09-12

组 p-p38 和 p-ERK 在感染 48 h 时显著降低, I κ B- α 在各时间点均高于 Ms-Vec 组。ELISA 检测显示, Ms-PPE61 组 TNF- α 的分泌水平在 24 h 和 48 h 时无显著差异($P>0.05$), IL-6 在 24 h 和 48 h 时显著低于 Ms-Vec 组($P<0.0001$), IL-1 β 在 48 h 时显著低于 Ms-Vec 组($P<0.01$)。【结论】PPE61 可增强重组耻垢分枝杆菌对酸性、SDS 及 H₂O₂ 胁迫的耐受能力, 能通过下调 p-p38 和 p-ERK 的表达、上调 I κ B- α 的表达来抑制 MAPK 和 NF- κ B 信号通路, 还可减少巨噬细胞中 IL-6 的分泌(24 h 和 48 h 均显著)及 IL-1 β 的分泌(48 h 显著), 但对 TNF- α 的分泌无显著影响。

关键词: 结核分枝杆菌; PPE61; 胁迫压力; MAPK 信号通路; NF- κ B 信号通路

Expression of PPE61 enhances stress tolerance and regulates MAPK/NF- κ B signaling of *Mycobacterium smegmatis*

SONG Li^{1,2}, LIANG Zhihang³, BI Jing², GUO Qinglong², ZHANG Guoliang^{1,2*}

1 Department of Infectious Diseases, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan, China

2 National Clinical Research Center for Infectious Diseases, Shenzhen Third People's Hospital, Shenzhen, Guangdong, China

3 Department of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong, China

Abstract: [Objective] To compare the stress tolerance of recombinant *Mycobacterium smegmatis* strains Ms-PPE61 and Ms-Vec under different external stress conditions, investigate the activation/inhibition levels of the mitogen-activated protein kinase (MAPK)/nuclear factor (NF)- κ B signaling pathway following their infection of macrophages, and explore differences in inflammatory cytokine expression after infection of RAW264.7 cells. **[Methods]** Ms-Vec and Ms-PPE61 were constructed and cultured to the logarithmic growth phase before being subjected to acidic, SDS, and H₂O₂ conditions. Colony-forming units (CFUs) were measured at different time points. Proteins were extracted from cells collected 1–48 h post-infection (hpi), and the expression levels of signaling pathway marker molecules were determined by Western blotting. The interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor (TNF)- α , and IL-1 β concentrations in the supernatants of RAW264.7 cells infected with Ms-Vec and Ms-PPE61 were measured by ELISA at 24 hpi and 48 hpi. GraphPad Prism 7.0 was used for analysis of variance of the data, and $P<0.05$ was considered significant. **[Results]** PCR revealed the presence of a target band in Ms-PPE61 but not in Ms-Vec. Coomassie brilliant blue staining confirmed consistent protein loading. Western blotting showed that Ms-PPE61 expressed a ~42 kDa Flag fusion protein, while Ms-Vec did not. Ultra-high-speed centrifugation was performed to separate the components of *M. smegmatis*. Western blotting revealed that the cytoplasmic marker protein GroES was expressed in the cytoplasmic fractions of both Ms-Vec and Ms-PPE61, while the Flag-tagged target protein was exclusively present in the cell wall of Ms-PPE61. After treatment under acidic conditions (pH 3.0) for 3 h, the survival rate of Ms-PPE61 was higher than that of Ms-Vec ($P<0.0001$), while the survival rate showed no

significant difference after treatment for 6 h and 9 h ($P>0.05$). After treatment with 0.2% SDS for 3, 6, and 9 h, the survival rate of Ms-PPE61 was higher than that of Ms-Vec ($P<0.0001$). Similarly, after H_2O_2 treatment for 3 h and 6 h, the survival rate of Ms-PPE61 was higher than that of Ms-Vec ($P<0.0001$). Western blotting showed that the Ms-PPE61 group had significantly lower p-p38 and p-ERK levels at 48 hpi and higher I κ B- α levels at all time points than the Ms-Vec group. ELISA results indicated no differences in TNF- α secretion between the Ms-PPE61 and Ms-Vec groups at 24 hpi and 48 hpi ($P>0.05$), while the Ms-PPE61 group had lower IL-6 levels at 24 hpi and 48 hpi ($P<0.0001$) and lower IL-1 β level at 48 hpi ($P<0.01$) than the Ms-Vec group. **[Conclusion]** PPE61 can enhance the tolerance of recombinant *Mycobacterium smegmatis* to acidic, SDS and H_2O_2 stress, inhibit the MAPK and NF- κ B signaling pathways by down-regulating the expression of p-p38 and p-ERK and up-regulating the expression of I κ B- α , and reduce the secretion of IL-6 (significantly at both 24 h and 48 h) and IL-1 β (significantly at 48 h) in macrophages, but has no significant effect on the secretion of TNF- α .

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; PPE61; stress; MAPK signaling pathway; NF- κ B signaling pathway

结核病(tuberculosis, TB)是一种由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)引发的传染性细菌性疾病, 主要通过呼吸道传播引发肺结核, 但也会感染除指甲和头发外的任何组织脏器^[1]。2024年, 根据世界卫生组织(world health organization, WHO)发布的《全球结核病报告(Global tuberculosis report 2024)》, 2023年TB仍导致全球约125万人死亡, 并出现1080万新发病例^[2]。此外, 广泛耐药和多重耐药菌株的出现以及与人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)共感染情况的产生进一步加重了结核病的负担^[3-4]。因此, 深入探究Mtb的发病机制并以此为基础开发新的疫苗或治疗药物已刻不容缓。

1998年Mtb基因组测序完成后发现了PE和PPE两大富含甘氨酸的蛋白家族, 其编码基因约占基因组的10%, 特征为高G+C含量和广泛的重复同源序列; PE/PPE蛋白因氨基端含有Pro-Glu(PE)和Pro-Pro-Glu(PPE)序列而得名; PE家族有96个成员, 依据羧基端串联重复序列的差异可分为PE-only和PE-PGRS亚家族; PPE家族包含69个成员, 编码的蛋白具有保守的N末端结构域(180个氨基酸残基)和高度可变

的C末端结构域^[5]。PPE家族根据C末端基序的特点可分为4个亚家族: PPE-SVP(24个成员, 300-500位氨基酸含有Gly-X-X-Ser-Val-Pro-X-X-Trp基序)^[6]、PPE-MPTR(23个成员, C末端含有多个Asn-X-Gly-X-Gly-Asn-X-Gly重复基序, 间隔5个碱基, 由GCCGGTGTG编码)^[7]、PPE-PPW(10个成员, C末端有44个保守氨基酸, 含有Pro-X-X-Pro-X-X-Trp和Gly-Phe-X-Gly-Thr序列基序)以及最后一个C末端各异、序列同源性低的亚家族(12个成员)^[8]。

尽管PE/PPE基因家族的功能尚未明确, 但多项研究表明其与宿主-病原体相互作用相关, 如细菌毒力、分枝杆菌生长及抗原变异等^[9-10]。PE/PPE蛋白能够增强分枝杆菌在巨噬细胞内及应激条件下的存活能力。例如, PPE44(Rv2770c)和PE13可提高耻垢分枝杆菌在巨噬细胞内及低pH、SDS、 H_2O_2 等胁迫条件下的存活率, 且Ms-Rv2770c的毒性更强, 能诱导巨噬细胞死亡并上调IL-6和IL-12 p40的表达^[11-12]。Mtb PPE60通过TLR2依赖性方式激活树突状细胞成熟, 诱导Th1和Th17免疫应答, 显示出其在MTB疫苗开发中的潜力^[13]。此外, 2种PPE蛋白(PPE31/PPE68)和1种PE蛋白(PE35)对分枝杆菌

在小鼠体内的生长至关重要^[14-15]。因此, 基于 PE/PPE 蛋白与宿主细胞的相互作用, 它们可作为免疫逃逸的毒力因子或疫苗抗原靶点。

由于 Mtb 毒性较大、生长周期较长且具有传染性, 研究需在安全防护能力较强的实验室开展。因此, 本研究选用耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*, Ms) 进行实验, 它是一种快速生长的非致病性物种, 能够表达外源分枝杆菌蛋白^[16-17], 还可对其进行多种遗传操作^[18], 是研究结核菌毒力基因较为理想的模型生物。

本研究聚焦于 Mtb Rv3532 基因编码的 PPE61 蛋白, 通过将能够表达该蛋白的重组质粒 pMV261-PPE61 与空质粒 pMV261 分别转化至耻垢分枝杆菌, 构建出 Ms-PPE61 和 Ms-Vec2 株重组菌株, 进而开展相关实验探究。

1 材料与方法

1.1 细菌、细胞和引物

Ms 购自上海晶诺生物科技有限公司, RAW264.7 细胞购自中国科学院细胞库。

从 GenBank 中查询结核分枝杆菌 H37Rv 株 Rv3532 基因的序列, 然后进行引物设计。上游引物的 5'端引入 *EcoR* I 的酶切位点: 5'-tgcagaattcATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGTTCA TGGATTTTCGCGATGCTTC-3' (小写字母为 *EcoR* I 的识别位点; 大写字母代表碱基); 下游引物的 5'端引入 *Hind* III 酶切位点: 5'-cgataagcttTCACCCGCCCCGAGAGTGGACG-3' (小写字母为 *Hind* III 的识别位点; 大写字母代表碱基)。引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 培养基

7H9 培养基: 4.7 g/L 7H9 培养基粉末, 0.05% 吐温-80, 10% OADC (0.85% 氯化钠, 2% 葡萄糖, 5% 牛血清白蛋白, 0.003% 过氧化氢酶和 0.06% 油酸), 混匀。

RAW264.7 细胞培养基: 在瓶装 DMEM 培

培养基 (500 mL) 中加入 50 mL 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS), 混匀。

1.3 主要试剂和仪器

7H9, BD 公司; 吐温-80、氯化钠、葡萄糖, 索莱宝公司; Anti-Flag-antibody、Phospho-p38 MAPK、Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2)、I κ B α (L35A5) Mouse mAb, Cell Signaling Technology 公司; Anti-GroES, Abcam 公司; Anti-TUBA4A (TUBA1) antibody、牛血清白蛋白、过氧化氢酶 (牛肝), Sigma-Aldrich 公司; 油酸, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 人 IL-1 β ELISA 试剂盒、人 TNF- α ELISA 试剂盒、人 IL-6 ELISA 试剂盒, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.4 重组耻垢分枝杆菌构建

1.4.1 结核分枝杆菌基因组提取

将结核分枝杆菌接种于 7H9 培养基中培养至 $OD_{600}=0.8-1.0$, 取 10 mL 菌液 $3\ 200\times g$ 离心 10 min 后弃上清, $13\ 000\ r/min$ 离心 5 min, $80\ ^\circ C$ 金属浴 20 min, $-80\ ^\circ C$ 存放 1 h 后室温放置 30 min 融化, 再放入 $-80\ ^\circ C$, 1 h 后取出于室温放置 30 min, 然后于 $-80\ ^\circ C$ 过夜; 用 250 μL SET 溶液重悬, 加入 50 μL 溶菌酶, $37\ ^\circ C$ 过夜; 加入 10 μL 核糖核酸酶 A, $37\ ^\circ C$ 孵育 30 min; 加入 250 μL 蛋白酶 K 溶液, $55\ ^\circ C$ 孵育 2 h; 加入等体积酚/氯仿/异丙醇, 室温振荡 5 min; $16\ 000\times g$ 离心 10 min, 取上层水相; 加入 0.1 倍体积的 3 mol/L 醋酸钠 (pH 5.2), 0.7 倍体积的异丙醇, 混匀, $-20\ ^\circ C$ 放置超过 1 h; $4\ ^\circ C$, $16\ 000\times g$ 离心 30 min, 弃上清; 加入 1 mL 70% 乙醇洗涤 2 次后干燥, 加入 50-100 μL ddH₂O 重悬, 测浓度, $-20\ ^\circ C$ 保存。

1.4.2 结核分枝杆菌 PPE61 基因的扩增

以结核分枝杆菌 H37Rv 基因组为模板, 使用 1.1 节设计的引物扩增 PPE61 基因。PCR 反应体系 (50 μL): 2 \times PrimeSTAR GC buffer 25.0 μL , dNTP mixture 4.0 μL , 上、下游引物 (10 $\mu mol/L$) 各 1.25 μL , PrimeSTAR HS DNA polymerase

(2 mmol/L) 0.5 μ L, DNA 模板 0.5 μ L, ddH₂O 17.5 μ L。PCR 反应条件: 98 °C 预变性 5 min; 98 °C 变性 10 s, 65 °C 退火 5 s, 72 °C 延伸 90 s, 共 30 个循环; 72 °C 终延伸 5 min。使用通用型 DNA 纯化回收试剂盒进行胶回收。

1.4.3 酶切

用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Eco*R I 对 pMV261 质粒进行双酶切, 双酶切体系(50 μ L): *Hind* III 2.0 μ L, *Eco*R I 2.0 μ L, pMV261 (986 ng/ μ L) 1.02 μ L, ddH₂O 44.98 μ L。按比例配制后于 37 °C 孵育 4 h。用 T4 连接酶将回收后的 PPE61 基因与酶切后的载体片段(pMV261)进行连接。将连接产物通过转化转入大肠杆菌感受态细胞中并涂布于 LB 平板。挑取单菌落进行菌液 PCR, 阳性菌株送生工生物工程(上海)股份有限公司测序验证。制备耻垢分枝杆菌感受态细胞, 通过电转分别将 pMV261 和 pMV261-PPE61 质粒转入耻垢分枝杆菌感受态细胞, 通过 PCR 验证, 选取 PPE61 已成功转入的阳性菌株扩大培养, 分别得到重组耻垢分枝杆菌 Ms-Vec 和 Ms-PPE61。

1.5 重组耻垢分枝杆菌培养

将重组菌 Ms-PPE61 和 Ms-Vec 分别接种于含 Kana 的 7H9 培养基中, 37 °C、100 r/min 培养至 $OD_{600}=0.3$ 。再取少量达到对数生长期的菌液按比例加入到 7H9 培养基中继续培养, 直到重组菌 Ms-PPE61 和 Ms-Vec 再次培养至 $OD_{600}=0.3$ 。

1.6 Western blotting 检测

在指定时间收集细胞, 用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液裂解细胞, 使用 BCA 蛋白试剂盒测定蛋白浓度。随后, 将样品在 100 °C 孵育 10 min, 使用等量蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后, 使用“三明治”法进行转膜, 转膜恒定电流 270 mA, 120 min。转膜结束后用 5% 脱脂牛奶在室温下封闭 1 h, 加入一抗, 4 °C 孵育过夜。用 TBST 洗涤膜, 再加入相

应的二抗进行孵育。最后, 用增强型化学发光检测液检测蛋白条带。

1.7 重组耻垢分枝杆菌亚细胞定位分析

分别培养 50 mL 重组耻垢分枝杆菌 Ms-Vec 和 Ms-PPE61, 常温 1 300 r/min 离心 2 min 收集细菌菌体, 用 PBS 洗涤 2 遍, 置于 -80 °C 保存。将菌体重悬于 10 mL PBS 中, 100 W 超声 3 s 停 5 s 共 10 min 后冰浴。菌液 4 °C、3 000 r/min 离心 10 min, 去掉未被破碎的细胞及细胞碎片, 上清即为全细胞裂解液。收集全细胞裂解液, 4 °C、27 000 r/min 离心 2 h, 沉淀即为细胞壁组分, 上清即为细胞膜及细胞质组分。收集上清, 4 °C、100 000 r/min 离心 2 h 分离细胞膜和细胞质。将细胞壁用 PBS 洗涤 1 遍。将细胞质用 10% 三氯乙酸沉淀浓缩, 再用 80% 丙酮洗涤。

1.8 重组耻垢分枝杆菌在体外不同压力条件下的生存率

参考文献[19]的方法测量重组耻垢分枝杆菌在不同压力条件下生存能力, 并根据实验情况进行了改进。将重组菌 Ms-PPE61 与 Ms-Vec 分别培养至对数期, 用 7H9 培养基调整 OD_{600} 至 0.3。取 10 mL 菌液 4 000 r/min 离心 10 min 后弃上清, 用 20 mL 7H9 洗涤并再次离心。将菌体重悬于 pH 3.0 的 7H9 中, 或直接向 10 mL 菌液中加入 200 μ L 10% SDS 或 0.5 mol/L H₂O₂, 混匀后分装至离心管, 置于 37 °C 摇床培养后, 分别于 0、3、6、9 h 取样, 梯度稀释后涂布于含 Kana 的 LB 平板, 37 °C 倒置培养 3 d 后计数菌落。

1.9 重组耻垢分枝杆菌感染

将 RAW264.7 细胞以 5×10^5 /孔的密度接种于 12 孔板(1 mL DMEM/孔), 37 °C、5% CO₂ 培养 12–14 h。将对数期的重组耻垢分枝杆菌 Ms-Vec 和 Ms-PPE61 于 4 000 r/min 离心 10 min, 用 PBS (含 0.025% SDS) 洗涤后重悬于 5 mL DMEM (无 FBS 和双抗), 测定 OD_{600} 并调整至 0.2, 再作 10 倍稀释。以感染复数(multiplicity of infection,

MOI)=20:1 (细菌:巨噬细胞)感染 RAW264.7 细胞后继续培养。4 h 时, 用 37 °C PBS 洗涤细胞 3 次以去除胞外菌, 随后加入含 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素的 DMEM (无双抗)培养以杀灭残留胞外菌。

1.10 ELISA 检测

按照制造商说明书的描述, 使用 ELISA 试剂盒检测培养上清中的 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6。利用酶标仪检测 OD_{450} 值, 计算相应细胞因子的水平。

1.11 统计学分析

实验数据均使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行分析和绘图。实验数据表示为 mean \pm SEM ($n=3$)。使用 unpaired *t*-test 或者 one-way/two-way ANOVA followed by Tukey's test 对数据进行统计分析。 $P<0.05$ 视为存在显著差异。

2 结果与分析

2.1 PPE61 蛋白在重组耻垢分枝杆菌中的表达分析

Mtb PPE61 基因长度约为 1 200 bp, 该基因编码的蛋白质大小约为 42 kDa。本研究成功构建了 2 株重组耻垢分枝杆菌, 分别为 Ms-Vec 和 Ms-PPE61。重组菌 Ms-Vec 携带 pMV261 质粒, 作为阴性对照菌株; 重组菌 Ms-PPE61 携带 pMV261-PPE61 重组质粒, 能够表达带有 Flag 标签的 PPE61 目的蛋白。PCR 结果显示, 以成功表达 PPE61 的重组菌(阳性对照)的 Mtb 基因组为模板(+)时有明显条带出现。Ms-PPE61 在相同位置也有条带, 条带大小约为 1 200 bp (图 1A), 通过测序证明其所含基因片段为 PPE61。Ms-Vec 和无 DNA 模板的阴性对照(-)均无条带。进一步

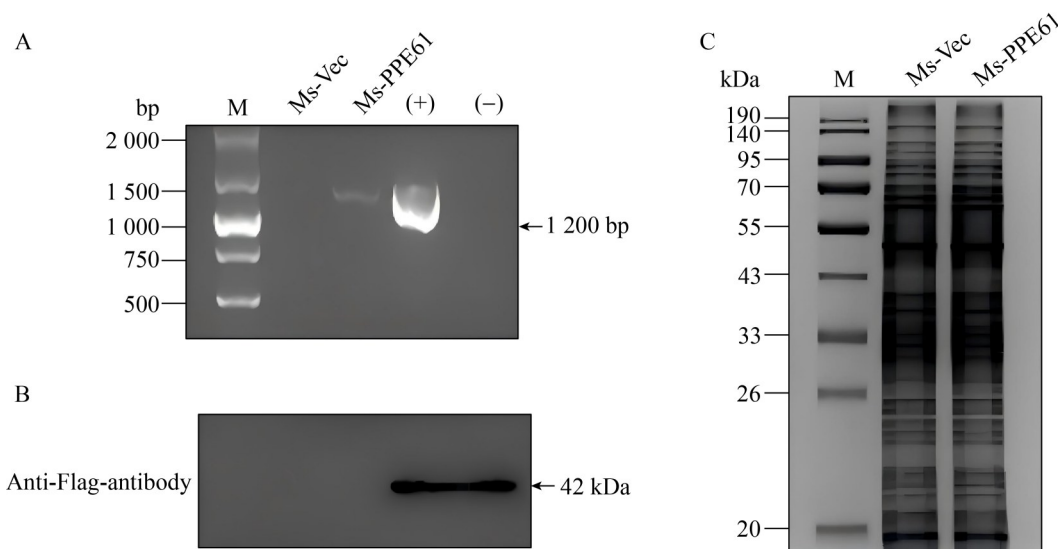


图1 Mtb PPE61蛋白在重组耻垢分枝杆菌中的表达。A: PCR检测重组耻垢分枝杆菌Ms-Vec与Ms-PPE61中的PPE61基因; B: Western blotting验证重组耻垢分枝杆菌Ms-Vec与Ms-PPE61中PPE61蛋白的表达; C: 考马斯亮蓝染色显示重组耻垢分枝杆菌Ms-Vec与Ms-PPE61上样量一致。

Figure 1 Expression of the PPE61 protein from *Mycobacterium tuberculosis* in recombinant *Mycobacterium smegmatis*. A: PCR verification of the PPE61 gene in recombinant *Mycobacterium smegmatis* Ms-Vec and Ms-PPE61; B: Western blotting to verify the expression of the PPE61 protein in recombinant *Mycobacterium smegmatis* Ms-Vec and Ms-PPE61; C: Coomassie brilliant blue staining to show equal sample loading of recombinant *Mycobacterium smegmatis* Ms-Vec and Ms-PPE61. M: Protein marker.

通过 Western blotting 实验证实, Ms-PPE61 能够表达一个大小约为 42 kDa 的带有 Flag 标签的目的蛋白, 阴性对照菌株 Ms-Vec 未检测到 PPE61 蛋白的表达(图 1B)。考马斯亮蓝染色结果显示, Ms-Vec 和 Ms-PPE61 的蛋白上样量一致(图 1C)。上述结果表明, Mtb PPE61 成功在耻垢分枝杆菌中表达。

2.2 PPE61 蛋白在重组耻垢分枝杆菌中的定位分析

使用冷冻高速离心机对处于对数生长期的 Ms-Vec 和 Ms-PPE61 这 2 株重组菌的细胞组分进行分离, 最终分离出细胞壁和细胞质组分, 测定其浓度后加入 5×loading buffer 处理蛋白样品。取等量的胞壁蛋白和细胞质蛋白进行 SDS-PAGE, 运用特异性抗体 Anti-Flag 和 GroES, 通过 Western blotting 确定 PPE61 蛋白在耻垢分枝杆菌中的亚细胞定位。细胞质标记蛋白 GroES 在 Ms-Vec 和 Ms-PPE61 的细胞质组分中均有表达, 而标签蛋白 Anti-Flag 仅存在于重组菌 Ms-PPE61 的细胞壁组分(图 2), 这表明 PPE61 蛋白与分枝杆菌细胞壁相关。

2.3 PPE61 对重组耻垢分枝杆菌在不同条件下耐受能力的影响

为进一步了解 PPE61 对 Ms 存活的影响, 测定了重组耻垢分枝杆菌 Ms-Vec 和 Ms-PPE61 在酸性(pH 3.0)、表面活性剂 SDS 和强氧化剂 H₂O₂ 条件下不同时间点的 CFU, 检测细菌的

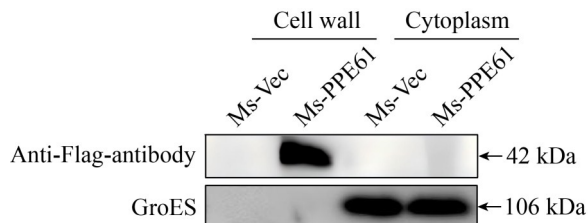


图2 PPE61蛋白在重组耻垢分枝杆菌中的定位
Figure 2 Localization of the PPE61 protein in recombinant *Mycobacterium smegmatis*.

生长情况。在酸处理 3 h 后 Ms-PPE61 的存活率显著高于 Ms-Vec ($P<0.0001$), 在处理第 6 h 和 9 h 后 Ms-Vec 和 Ms-PPE61 的生长无显著差异($P>0.05$) (图 3A)。为检测 Ms-PPE61 对表面活性压力的耐受能力, 将 Ms-Vec 和 Ms-PPE61 暴露于含有 0.2% SDS 的培养基中处理不同时间后, 观察 2 个重组菌的生长情况。SDS 处理后 Ms-Vec 和 Ms-PPE61 的细菌存活率在第 3、6 和 9 h 均快速下降, 且 Ms-PPE61 的存活率显著高于 Ms-Vec ($P<0.0001$) (图 3B)。在 H₂O₂ 处理后的第 3、6 和 9 h, Ms-PPE61 的存活率同样也显著高于 Ms-Vec ($P<0.0001$) (图 3C)。上述结果表明, PPE61 增强了 Ms 耐受酸、表面活性剂 SDS 和强氧化剂 H₂O₂ 的能力。

2.4 PPE61 对 MAPK、NF-κB 信号通路的影响

采用 Western blotting 分析 2 个菌株感染 RAW264.7 细胞 0、1、2、4、8、24、48 h 后 p-p38、p-ERK、IκB-α 和 Tubulin 蛋白的表达水平。与 Ms-Vec 组相比, Ms-PPE61 组 p-p38 和 p-ERK 在感染的第 1、2、4、8、24 h 时表达水平无显著差异, 48 h 时表达水平较低, 磷酸化水平减弱($P<0.0001$), p-JNK 表达水平无明显差异(结果未展示)。Ms-PPE61 组 IκB-α 的表达水平在感染的第 1、2、4、8、24、48 h 均高于 Ms-Vec 组, 且在第 48 h 时差异显著($P<0.01$) (图 4)。这提示 PPE61 可能通过抑制 MAPK 和 NF-κB 信号通路从而调控细胞因子的分泌。

2.5 PPE 重组耻垢分枝杆菌对宿主分泌细胞因子的影响

在细菌感染过程中促炎细胞因子对于免疫系统细胞的募集和激活至关重要。为评估 PPE61 的免疫调节能力, 用重组菌 Ms-Vec 和 Ms-PPE61 分别感染 RAW264.7 巨噬细胞。感染 24 h 和 48 h 后收集感染后的细胞上清, 采用 ELISA 检测 TNF-α、IL-6 以及 IL-1β 的分泌水平。TNF-α 的分泌水平在 24 h 时 Ms-PPE61 组

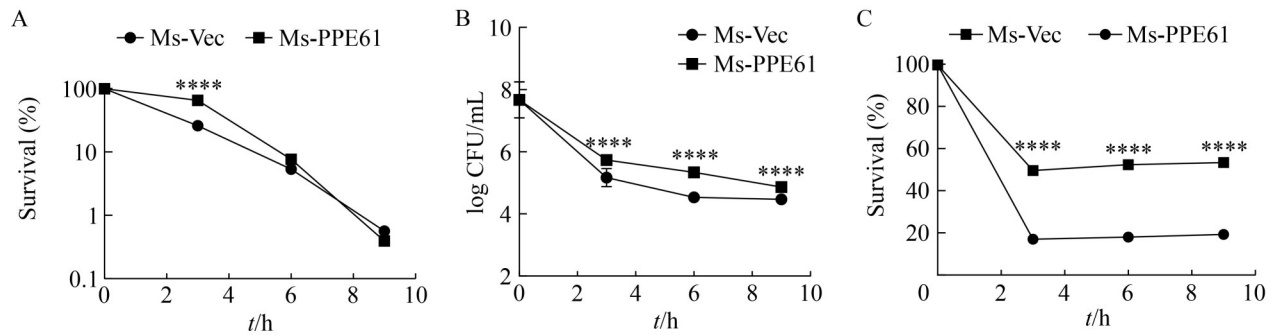


图3 重组耻垢分枝杆菌对不同条件的耐受能力。A: Ms-Vec和Ms-PPE61在酸性(pH 3.0)条件下的生长情况；B: Ms-Vec和Ms-PPE61在表面活性剂SDS条件下的生长情况；C: Ms-Vec和Ms-PPE61在强氧化剂H₂O₂条件下的生长情况。

Figure 3 Tolerance capacity of recombinant *Mycobacterium smegmatis* under diverse conditions. A: Growth of Ms-Vec and Ms-PPE61 under acidic (pH 3.0) conditions; B: Growth of Ms-Vec and Ms-PPE61 under surfactant SDS; C: Growth of Ms-Vec and Ms-PPE61 under strong oxidant H₂O₂ conditions. *****P*<0.000 1 vs. Ms-Vec at each time point, *n*=3.

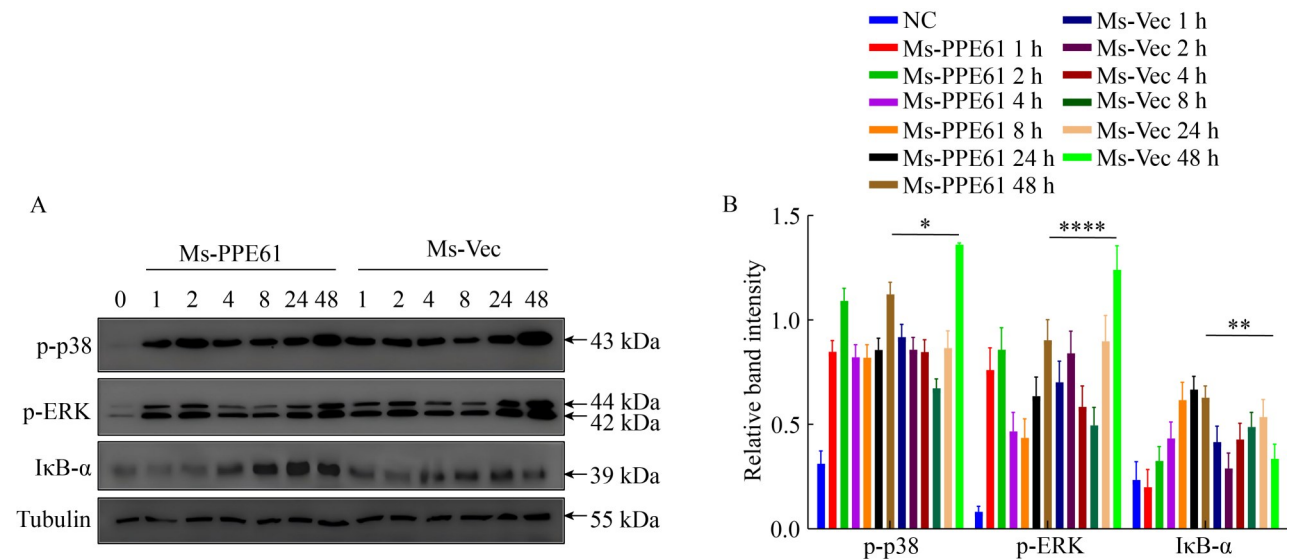


图4 PPE61抑制MAPK和NF-κB信号通路。A: Western blotting检测MAPK和NF-κB信号通路相关蛋白；B: 图A的定量分析。Western blotting显示，与Ms-Vec组相比，感染后48 h Ms-PPE61菌株感染的细胞中p-p38和p-ERK磷酸化水平显著降低，而IκB-α表达水平显著升高。

Figure 4 PPE61 inhibits the MAPK and NF-κB signaling pathways. A: Detection of proteins related to the MAPK and NF-κB signaling pathways by Western blotting; B: Quantitative analysis of Figure A. Western blotting analysis revealed that compared with the RAW264.7 cells infected with Ms-Vec strain, the phosphorylation levels of p-p38 and p-ERK were significantly reduced, while the expression level of IκB-α was markedly increased in cells infected with the Ms-PPE61 strain at 48 hours post-infection. *n*=3, **P*<0.05, ***P*<0.01, and *****P*<0.000 1 compared with the Ms-Vec group.

低于 Ms-Vec 组, 48 h 时两组比较无明显差异 ($P>0.05$) (图 5A)。在 24 h 时, Ms-PPE61 感染的巨噬细胞分泌的 IL-6 低于 Ms-Vec 感染组 ($P<0.01$), 且在 48 h 降低更为明显 ($P<0.0001$) (图 5B)。IL-1 β 的分泌水平测定显示, 24 h 时 Ms-Vec 组和 Ms-PPE61 组无明显差异, 但 48 h 时 Ms-PPE61 组的水平明显低于 Ms-Vec 组 (图 5C) ($P<0.01$)。上述结果数据表明, PPE61 在调节细胞因子表达方面起着关键作用。

3 讨论与结论

截至 2015 年, 在分枝杆菌培养滤液、膜及细胞壁中检测到超过 35 种 PE/PPE 蛋白^[20], 证实其与致病性相关。本研究成功构建了 Ms-PPE61 重组耻垢分枝杆菌, 并鉴定 PPE61 为细胞壁相关蛋白。部分细胞壁 PE/PPE 蛋白可引发生长、形态或结构变化^[21-23], 但在实验过程中观察到 Ms-PPE61 与 Ms-Vec 的菌落大小、形态及生长速度无明显差异 (结果未展示), 这可能是由于 PPE61 未改变细胞壁主要结构或基本代谢。

巨噬细胞是主要的先天免疫细胞, 通过识别、吞噬并最终杀死侵袭性 Mtb 来增强宿主抵抗分枝杆菌感染的免疫力^[24-25]。最近的研究表明, 巨噬细胞是分枝杆菌的主要庇护场所, 因为它能建立多种机制来应对病原体的入侵并调节宿主的命运^[26-27]。分枝杆菌和巨噬细胞之间的相互作用决定了感染的进程。Mtb 可以逃避宿主巨噬细胞的攻击, 并在恶劣环境中持续存在, 包括在 NO、缺铁和低 pH 条件下^[28]。在本研究中, 与 Ms-Vec 相比 Ms-PPE61 对酸、SDS 和 H₂O₂ 更不敏感。PPE61 可在 RAW264.7 巨噬细胞中为重组耻垢分枝杆菌增强细胞内抗压能力。结果表明 PPE61 在调节宿主固有免疫反应和赋予 Ms 抵抗不利环境的抗性方面发挥重要作用。与本研究结果类似, PE13^[12] 和 PE-PGRS62^[29] 也能提高重组体在 H₂O₂、SDS、低 pH 等胁迫条件下的存活率。此外, 有研究报道酸敏感型突变菌表现为细胞壁功能损伤, 并且对抗生素更加敏感^[30]。

作为先天性免疫的一部分, MAPK 和 NF- κ B

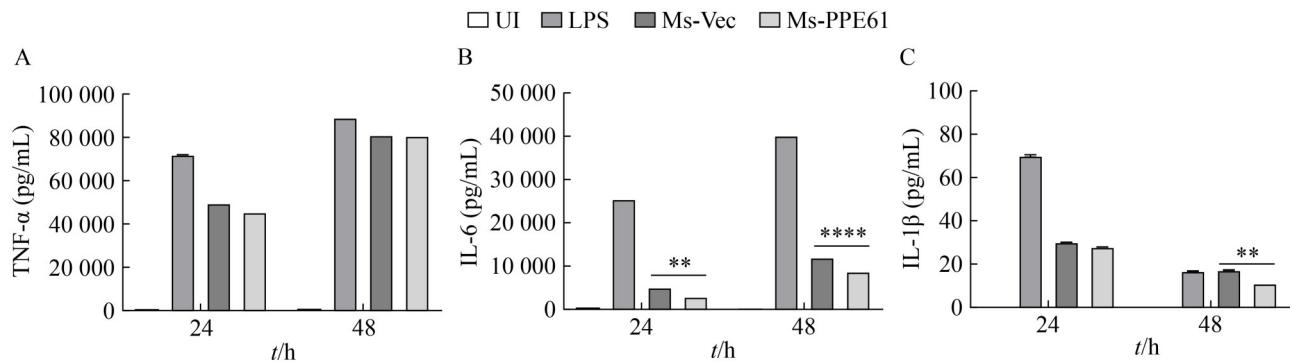


图5 重组耻垢分枝杆菌对宿主分泌TNF- α 、IL-6和IL-1 β 的影响。A: 重组菌Ms-Vec和Ms-PPE61感染RAW264.7细胞24 h和48 h时TNF- α 分泌水平; B: 重组菌Ms-Vec和Ms-PPE61感染RAW264.7细胞24 h和48 h时IL-6分泌水平; C: 重组菌Ms-Vec和Ms-PPE61感染RAW264.7细胞24 h和48 h时IL-1 β 分泌水平。

Figure 5 Impact of recombinant *Mycobacterium smegmatis* on the secretion of TNF- α , IL-6, and IL-1 β by host cells. A: Level of TNF- α detected by ELISA in supernatant of RAW264.7 cells infected with recombinant bacteria Ms-Vec or Ms-PPE61 for 24 h and 48 h, respectively; B: Level of IL-6 detected by ELISA in supernatant of RAW264.7 cells infected with recombinant bacteria Ms-Vec or Ms-PPE61 for 24 h and 48 h, respectively; C: Level of IL-1 β detected by ELISA in supernatant of RAW264.7 cells infected with recombinant bacteria Ms-Vec or Ms-PPE61 for 24 h and 48 h, respectively. ** $P<0.01$ and **** $P<0.0001$ vs. Ms-Vec, $n=3$.

信号在宿主抵抗多种病原体(包括 Mtb)感染中发挥重要作用。Mtb 为逃逸宿主的先天性免疫防御, 也通过靶向关键信号节点来促进自身存活。例如, 其自身分泌的酪氨酸磷酸酶 PtpA 与宿主泛素蛋白结合后激活自身磷酸酶活性, 催化 p-JNK 和 p-p38 去磷酸化, 抑制 MAPK 通路激活; 同时, PtpA 竞争性结合 TAB3 的泛素作用结构域, 阻断由宿主接头蛋白 TAB3 介导的 NF- κ B 通路激活, 抑制宿主先天免疫, 促进细菌存活^[31]。Mtb 分泌蛋白 Mce3E 通过与 ERK1/2 相互作用阻断 ERK1/2 与 MEK1 的互作以及 p-ERK1/2 的核转位, 从而抑制 ERK1/2 信号通路激活, 实现免疫逃逸^[32]。上述结果表明, MAPK 和 NF- κ B 信号在 Mtb 感染过程中发挥重要作用。为探究 PPE61 诱导炎症的机制, 本研究通过 Western blotting 检测 NF- κ B、MAPK 通路相关蛋白标志物。结果显示, PPE61 可降低 Ms 感染后 RAW264.7 细胞中 p38 和 ERK 的磷酸化水平, 减弱巨噬细胞介导的炎症反应, 同时降低 NF- κ B 下游信号分子 I κ B- α 的表达。此外, JNK 磷酸化条带无显著差异。

免疫调节分子, 如 TNF- α ^[33]、IL-6^[34] 和 IL-1 β ^[35] 是宿主免疫防御分枝杆菌感染的重要组成部分。Mtb 效应因子可抑制促炎细胞因子的表达, 促进 Mtb 在巨噬细胞中的存活^[36]。多种分枝杆菌毒力效应因子, 如 PPE37^[37] 和 TB9.8^[38] 等可与宿主巨噬细胞相互作用, 改变细胞因子表达。本研究发现, PPE61 对 TNF- α 表达调控不明显, 但能降低感染早期和晚期 RAW264.7 细胞中促炎细胞因子 IL-6 的表达, 后期对 IL-1 β 分泌调控更明显, 表明其可下调促炎细胞因子产生, 使巨噬细胞持续存在。Mtb Rv0198c (zmp1) 通过抑制小鼠巨噬细胞炎性小体激活抑制 IL-1 β 产生^[39]。Ms PE-PGRS62 的表达降低了感染后巨噬细胞 IL-1 β 和 IL-6 mRNA 的表达^[40]。Mtb Mce3E 抑制巨噬细胞内 TNF- α 和 IL-6 表达, 促进分枝杆菌存活^[32]。

本研究揭示了分枝杆菌 PPE61 蛋白在调控

宿主免疫反应及增强环境抗性中的关键作用。PPE61 定位于分枝杆菌细胞壁, 能显著提升重组耻垢分枝杆菌对酸、SDS 和 H₂O₂ 的抗性, 同时通过降低 p38 和 ERK 磷酸化水平及 NF- κ B 下游信号分子 I κ B- α 的表达, 进而抑制巨噬细胞 IL-6 和 IL-1 β 的分泌, 二者共同作用促进分枝杆菌免疫逃逸, 为 Mtb 慢性感染提供潜在分子基础, 为靶向 PE/PPE 蛋白的抗结核策略提供了新依据。

作者贡献声明

宋丽: 酝酿和设计实验、实施研究、采集数据、起草文章; 梁志航: 采集数据、起草文章; 毕静: 酝酿和设计实验、分析/解释数据、对文章的知识性内容作批评性审阅; 郭庆龙: 统计分析; 张国良: 获取研究经费、技术或材料支持、指导、支持性贡献。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] FURIN J, COX H, PAI M. Tuberculosis[J]. *The Lancet*, 2019, 393(10181): 1642-1656.
- [2] World Health Organization. Global tuberculosis report 2024[R]. Geneva: World Health Organization, 2024.
- [3] FEKADU G, TURI E, KASU T, BEKELE F, CHELKEBA L, TOLOSSA T, LABATA BG, DUGASSA D, FETENSA G, DIRIBA DC. Impact of HIV status and predictors of successful treatment outcomes among tuberculosis patients: a six-year retrospective cohort study[J]. *Annals of Medicine and Surgery*, 2020, 60: 531-541.
- [4] CORBETT EL, WATT CJ, WALKER N, MAHER D, WILLIAMS BG, RAVIGLIONE MC, DYE C. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic[J]. *Archives of Internal Medicine*, 2003, 163(9): 1009-1021.
- [5] COLE ST, BROSCHE R, PARKHILL J, GARNIER T, CHURCHER C, HARRIS D, GORDON SV, EIGLMEIER K, GAS S, BARRY CE, TEKAIA F, BADCOCK K, BASHAM D, BROWN D, CHILLINGWORTH T, CONNOR R, DAVIES R, DEVLIN K, FELTWELL T, GENTLES S, et al.

- Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence[J]. *Nature*, 1998, 393(6685): 537-544.
- [6] BRENNAN MJ. The enigmatic PE/PPE multigene family of mycobacteria and tuberculosis vaccination[J]. *Infection and Immunity*, 2017, 85(6): e00969-16.
- [7] Van PITTIUS NCG, SAMPSON SL, LEE H, KIM Y, van HELDEN PD, WARREN RM. 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: 95.
- [8] AKHTER Y, EHEBAUER MT, MUKHOPADHYAY S, HASNAIN SE. The PE/PPE multigene family codes for virulence factors and is a possible source of mycobacterial antigenic variation: perhaps more[J]. *Biochimie*, 2012, 94(1): 110-116.
- [9] VORDERMEIER HM, HEWINSON RG, WILKINSON RJ, WILKINSON KA, GIDEON HP, YOUNG DB, SAMPSON SL. Conserved immune recognition hierarchy of mycobacterial PE/PPE proteins during infection in natural hosts[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e40890.
- [10] QIAN JN, CHEN R, WANG HH, ZHANG XL. Role of the PE/PPE family in host-pathogen interactions and prospects for anti-tuberculosis vaccine and diagnostic tool design[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020, 10: 594288.
- [11] YU ZX, ZHANG CH, ZHOU ML, LI QM, LI H, DUAN W, LI X, FENG YH, XIE JP. *Mycobacterium tuberculosis* PPE44 (Rv2770c) is involved in response to multiple stresses and promotes the macrophage expression of IL-12 p40 and IL-6 via the p38, ERK, and NF- κ B signaling axis[J]. *International Immunopharmacology*, 2017, 50: 319-329.
- [12] LI H, LI QM, YU ZX, ZHOU ML, XIE JP. *Mycobacterium tuberculosis* PE13 (Rv1195) manipulates the host cell fate via p38-ERK-NF- κ B axis and apoptosis[J]. *Apoptosis*, 2016, 21(7): 795-808.
- [13] SU HB, ZHANG Z, LIU ZJ, PENG BZ, KONG C, WANG HH, ZHANG Z, XU Y. *Mycobacterium tuberculosis* PPE60 antigen drives Th1/Th17 responses via Toll-like receptor 2-dependent maturation of dendritic cells[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(26): 10287-10302.
- [14] CAMACHO LR, ENSERGUEIX D, PEREZ E, GICQUEL B, GUILHOT C. Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis[J]. *Molecular Microbiology*, 1999, 34(2): 257-267.
- [15] SASSETTI CM, RUBIN EJ. Genetic requirements for mycobacterial survival during infection[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(22): 12989-12994.
- [16] SNAPPER SB, MELTON RE, MUSTAFA S, KIESER T, JACOBS WR Jr. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*[J]. *Molecular Microbiology*, 1990, 4(11): 1911-1919.
- [17] WIELES B, OTTENHOFF TH, STEENWIJK TM, FRANKEN KL, de VRIES RR, LANGERMANS JA. Increased intracellular survival of *Mycobacterium smegmatis* containing the *Mycobacterium leprae* thioredoxin-thioredoxin reductase gene[J]. *Infection and Immunity*, 1997, 65(7): 2537-2541.
- [18] T JAS, J R, RAJAN A, SHANKAR V. Features of the biochemistry of *Mycobacterium smegmatis*, as a possible model for *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Journal of Infection and Public Health*, 2020, 13(9): 1255-1264.
- [19] PELOSI A, SMITH D, BRAMMANANTH R, TOPOLSKA A, BILLMAN-JACOB H, NAGLEY P, CRELLIN PK, COPPEL RL. Identification of a novel gene product that promotes survival of *Mycobacterium smegmatis* in macrophages[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31788.
- [20] FISHBEIN S, van WYK N, WARREN RM, SAMPSON SL. Phylogeny to function: PE/PPE protein evolution and impact on *Mycobacterium tuberculosis* pathogenicity[J]. *Molecular Microbiology*, 2015, 96(5): 901-916.
- [21] CHATRATH S, GUPTA VK, DIXIT A, GARG LC. The Rv1651c-encoded PE-PGRS30 protein expressed in *Mycobacterium smegmatis* exhibits polar localization and modulates its growth profile[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2011, 322(2): 194-199.
- [22] DONG DD, WANG DC, LI M, WANG H, YU J, WANG C, LIU J, GAO Q. PPE38 modulates the innate immune response and is required for *Mycobacterium marinum* virulence[J]. *Infection and Immunity*, 2012, 80(1): 43-54.
- [23] SINGH P, RAO RN, REDDY JRC, PRASAD R, KOTTURU SK, GHOSH S, MUKHOPADHYAY S. PE11, a PE/PPE family protein of *Mycobacterium tuberculosis* is involved in cell wall remodeling and virulence[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 21624.
- [24] SHEN L, GAO Y, LIU YY, ZHANG BY, LIU QQ, WU J, FAN L, OU QF, ZHANG WH, SHAO LY. PD-1/PD-L pathway inhibits *M. tb*-specific CD4⁺ T-cell functions and phagocytosis of macrophages in active tuberculosis[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 38362.
- [25] LIU CH, LIU HY, GE BX. Innate immunity in tuberculosis: host defense vs pathogen evasion[J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2017, 14(12): 963-975.
- [26] DEY B, BISHAI WR. Crosstalk between *Mycobacterium tuberculosis* and the host cell[J]. *Seminars in Immunology*, 2014, 26(6): 486-496.
- [27] ARBUÉS A, MALAGA W, CONSTANT P, GUILHOT C, PRANDI J, ASTARIE-DEQUEKER C. Trisaccharides of phenolic glycolipids confer advantages to pathogenic mycobacteria through manipulation of host-cell pattern-recognition receptors[J]. *ACS Chemical Biology*, 2016, 11(10): 2865-2875.
- [28] FLYNN JL, CHAN J. Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: living with the enemy[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2003, 15(4): 450-455.
- [29] LONG QX, XIANG XH, YIN QQ, LI SJ, YANG WM, SUN H, LIU Q, XIE JP, DENG WY. PE_PGRS62 promotes the survival of *Mycobacterium smegmatis* within macrophages via disrupting ER stress-mediated

- apoptosis[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(11): 19774-19784.
- [30] VANDAL OH, ROBERTS JA, ODAIRA T, SCHNAPPINGER D, NATHAN CF, EHRT S. Acid-susceptible mutants of *Mycobacterium tuberculosis* share hypersusceptibility to cell wall and oxidative stress and to the host environment[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(2): 625-631.
- [31] WANG J, LI BX, GE PP, LI J, WANG Q, GAO GF, QIU XB, LIU CH. *Mycobacterium tuberculosis* suppresses innate immunity by coopting the host ubiquitin system[J]. *Nature Immunology*, 2015, 16(3): 237-245.
- [32] LI J, CHAI QY, ZHANG Y, LI BX, WANG J, QIU XB, LIU CH. *Mycobacterium tuberculosis* Mce3E suppresses host innate immune responses by targeting ERK1/2 signaling[J]. *Journal of Immunology*, 2015, 194(8): 3756-3767.
- [33] BOPST M, GARCIA I, GULER R, OLLEROS ML, RÜLICHE T, MÜLLER M, WYSS S, FREI K, Le HIR M, EUGSTER HP. Differential effects of TNF and LTalpha in the host defense against *M. bovis* BCG[J]. *European Journal of Immunology*, 2001, 31(6): 1935-1943.
- [34] JANG S, UEMATSU S, AKIRA S, SALGAME P. IL-6 and IL-10 induction from dendritic cells in response to *Mycobacterium tuberculosis* is predominantly dependent on TLR2-mediated recognition[J]. *Journal of Immunology*, 2004, 173(5): 3392-3397.
- [35] FREMOND CM, TOGBE D, DOZ E, ROSE S, VASSEUR V, MAILLET I, JACOBS M, RYFFEL B, QUESNIAUX VFJ. IL-1 receptor-mediated signal is an essential component of MyD88-dependent innate response to *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. *Journal of Immunology*, 2007, 179(2): 1178-1189.
- [36] NIRANJALA MUTTUCUMARU DG, SMITH DA, McMINN EJ, REESE V, COLER RN, PARISH T. *Mycobacterium tuberculosis* Rv0198c, a putative matrix metalloprotease is involved in pathogenicity[J]. *Tuberculosis*, 2011, 91(2): 111-116.
- [37] DAIM S, KAWAMURA I, TSUCHIYA K, HARA H, KURENUMA T, SHEN YN, DEWAMITTA SR, SAKAI S, NOMURA T, QU HX, MITSUYAMA M. Expression of the *Mycobacterium tuberculosis* PPE37 protein in *Mycobacterium smegmatis* induces low tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 production in murine macrophages[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2011, 60(Pt 5): 582-591.
- [38] JIA H, LIU SQ, WU J, HOU SH, XIN T, GUO XY, YUAN WF, GAO XT, ZHANG GM, LI M, QU HF, ZHU HF. Recombinant TB9.8 of *Mycobacterium bovis* triggers the production of IL-12 p40 and IL-6 in RAW264.7 macrophages via activation of the p38, ERK, and NF-κB signaling pathways[J]. *Inflammation*, 2015, 38(3): 1337-1346.
- [39] ZHANG JL, JIANG R, TAKAYAMA H, TANAKA Y. Survival of virulent *Mycobacterium tuberculosis* involves preventing apoptosis induced by Bcl-2 upregulation and release resulting from necrosis in J774 macrophages[J]. *Microbiology and Immunology*, 2005, 49(9): 845-852.
- [40] HUANG Y, WANG Y, BAI Y, WANG ZG, YANG LF, ZHAO DM. Expression of PE_PGRS 62 protein in *Mycobacterium smegmatis* decrease mRNA expression of proinflammatory cytokines IL-1β, IL-6 in macrophages[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2010, 340(1): 223-229.