

结核分枝杆菌 *higBA* 基因对细菌应激反应及胞内感染免疫机制的研究*

王欣妍, 罗涛, 陈宗海, 廖伟, 王怡, 鲍朗[△]

四川大学华西基础医学与法医学院 病原生物系感染免疫研究室(成都 610041)

【摘要】目的 探究结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, *Mtb*) *higBA* 基因对细菌应激反应及胞内感染免疫的作用。**方法** 从 *Mtb* H37Rv 基因组上扩增获得目的基因, 与载体连接后电转化入耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*, *Ms*) 构建重组菌, 对空载菌 *Ms_vec* 和重组菌 *Ms_higBA* 进行应激实验和 Raw264.7 小鼠巨噬细胞感染实验, 检测细菌菌落形成单位(CFU)和细胞因子白介素(interleukin, *IL*)-1 β 、*IL*-6、*IL*-10、*IL*-12p40, 干扰素(interferon, *IFN*)- γ , 肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, *TNF*)- α 和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, *iNOS*) 的转录水平变化。**结果** 成功构建 *Ms_higBA* 重组菌。应激实验结果表明 *higBA* 确能提高细菌在体外培养特定条件下的生存能力。胞内感染实验证明 *higBA* 能提高细菌在巨噬细胞内存活能力, 影响细胞因子的转录水平。**结论** *Mtb* 的 *higBA* 基因在细菌应激反应和胞内感染免疫中发挥了作用。

【关键词】 结核分枝杆菌 *higBA* 应激反应 胞内感染免疫

Effect of *Mycobacterium tuberculosis higBA* on Bacterial Stress Response and Intracellular Infection and Immunity
WANG Xin-yan, LUO Tao, CHEN Zong-hai, LIAO Wei, WANG Yi, BAO Lang[△]. Laboratory of Infection and Immunology, Department of Pathogenic Biology, West China School of Basic Medical Sciences & Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: baolang@scu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effect of *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) *higBA* on bacterial stress response and intracellular infection and immunity. **Methods** The target gene amplified from *Mtb* H37Rv genome was cloned to the vector and then transferred to *Mycobacterium smegmatis* (*Ms*) to construct a recombinant strain. Stress response experiment and Raw264.7 mouse macrophage infection was carried out with *Ms_higBA*, the recombinant strain, and *Ms_vec*, the vector strain. Tests were conducted to measure bacterial colony forming unit (CFU) and transcriptional levels of cytokines, including interleukin (*IL*)-1 β , *IL*-6, *IL*-10, *IL*-12p40, interferon (*IFN*)- γ , tumor necrosis factor (*TNF*)- α , and inducible nitric oxide synthase (*iNOS*). **Results** The recombinant strain, *Ms_higBA*, was constructed successfully. According to the findings of the stress response experiment, *higBA* could indeed enhance bacterial survival under certain conditions of *in vitro* culture. Intracellular infection experiment demonstrated that *higBA* enhanced bacterial survival in macrophages and influenced the transcriptional level of cytokines. **Conclusion** The *higBA* genes from *Mtb* play a role in bacterial stress response and intracellular infection and immunity.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis* *higBA* Stress response Intracellular infection and immunity

结核病是一种传染病,位列全球十大死因之一,同时也是单一传染病中的头号杀手(排在艾滋病之前),其致病菌为结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, *Mtb*)。2020年全球结核病报告指出,当年中国新发病例数在100万以上,位居全球前十^[1]。

毒素-抗毒素系统(toxin-antitoxin system, TA)是广泛存在于自然界微生物中的一类遗传元件,研究表明它们在细菌应激反应、感染宿主引发的潜伏感染以及对抗生素产生耐受等方面发挥了重要作用^[2-4]。根据结构和相互作用方式可将该系统分为 I ~ VI 型,其中 II 型是分布最

广泛研究最深入的^[5-6]。GUPTA等^[7]在应激条件下对 *Mtb* 的 TA 系统进行了转录组分析,结果显示部分 TA 的基因在各种应激条件下的转录或上调或下调,而 *higBA* 基因在所有设定的应激条件下均表达上调,提示该基因可能在 *Mtb* 应激反应中发挥着重要作用。但转录组分析并不能明确任意一对 TA 系统的具体功能,前期实验大多基于 TA 结构研究和以大肠杆菌作为模式菌进行的应激实验,也有专门针对 *Mtb* 的 TA 系统的相关研究^[8]。

Mtb 基因组约有 90 对编码 TA 系统的基因^[9], 敲除单对基因可能对细菌影响甚微,且 *Mtb* 致病性强、生长缓慢,实验条件要求高且遗传操作难度较大,因此我们选择了与它高度同源且遗传操作较简单的耻垢分枝杆菌

* 国家传染病科技重大专项(No. 2008ZX10003-013)资助

[△] 通信作者, E-mail: baolang@scu.edu.cn

(*Mycobacterium smegmatis*, *Ms*)作为模型研究*higBA*的功能。由于*Ms*本身仅含有少量TA系统,且能够编码Lon和Clp蛋白酶用于降解抗毒素^[10],因此我们认为构建*higBA*重组*Ms*能够初步探究这对基因的功能。本实验通过探索重组菌在应激条件下生存能力和对巨噬细胞固有免疫的影响,为进一步研究TA系统的功能提供依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料和仪器

大肠杆菌感受态DH5α株购自天根公司;pMV261质粒、*Ms*的MC²155菌株为本实验室保存;*Mtb*的H37Rv基因组DNA由四川省疾病预防控制中心提供。DNA Marker、PCR金牌Mix购自北京擎科生物技术有限公司;限制性核酸内切酶*EcoR* I 和*Bam*H I、*T*₄ DNA连接酶购自Thermo Scientific公司;Middlebrooks 7H9和7H10培养基粉末购自美国BD公司;细胞RNA提取试剂盒、2*RT mix、2*real-time mix购自成都福际生物技术有限公司。

PCR仪、荧光定量PCR仪、紫外分光光度计、核酸电泳、蛋白电泳、核酸凝胶成像系统等购自美国Bio-Rad公司;金属浴、电转仪、高速离心机、低温高速离心机等购自德国Eppendorf公司;一体式化学发光成像系统购自勤翔公司;超净工作台购自苏州净化厂;细菌摇床购自湘仪公司;恒温培养箱、二氧化碳恒温培养箱购自新加坡SANYO公司;生物安全柜购自海尔公司;细胞培养皿、12孔板、15 mL离心管、50 mL离心管等购自Corning公司;倒置显微镜购自日本奥林巴斯公司。

1.2 方法

1.2.1 *Mtb*目的基因扩增与构建重组*Ms* 在NCBI上查找*Mtb*的H37Rv基因组序列及*Rv1955-Rv1957(higBA)*基因序列,设计扩增引物并且在*Rv1957*引物序列之后加6*His的编码序列,上、下游引物分别添加*EcoR* I、*Bam*H I 酶切位点,引物由生工公司合成,见表1。以H37Rv基因组DNA为模板扩增*higBA*基因;对PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。

表 1 设计扩增引物
Table 1 Primers used for amplification

Gene	Primer nucleotide sequence (5'-3')	Product size
<i>higBA</i> -F	CGGGATCCGTGCGCCCGCCCTGATCC	1 411 bp
<i>higBA</i> -R	CGGAATTCCTCAATGGTGATGGTGGTGGCGGTTCTCTCGTTG	

The underlying residues are restriction sites, *Bam*H I (F) and *Eco*R I (R).

将PCR产物胶回收后,用限制性核酸内切酶*EcoR* I 和*Bam*H I 对回收产物和pMV261质粒进行酶切,然后用*T*₄ DNA连接酶进行连接。将连接产物分别热激转化入大肠杆菌DH5α,涂板于含25 μg/mL卡那霉素的LB固体培养基,筛选*higBA*基因阳性克隆,大量扩增并按试剂盒提取质粒,经测序鉴定正确后命名为pMV261-*higBA*。将*Ms*的MC²155菌株制作成感受态,然后将pMV261和pMV261-*higBA*电转化入感受态*Ms*,涂板于含25 μg/mL的7H10固体培养基,挑取单克隆进行PCR测序验证正确后,命名为空载菌*Ms-vec*和重组菌*Ms-higBA*。

溶菌酶裂解细菌后使用细胞RNA提取试剂盒提取*Ms_higBA*和*Ms_vec*的总RNA,逆转录至cDNA,然后以此为模板进行实时荧光定量PCR检测重组菌*higBA*基因转录水平,提取细菌总RNA并电泳,分离为23S rRNA、16S rRNA和5S rRNA三个条带。以*sigA*为内参基因,通过相对定量检测*higB*和*higA*基因在重组菌中的表达水平。随后通过超声裂解细菌后获得培养滤液和沉淀,最后对其分别上样进行Western blot定性检测,并用抗His-tag抗体检测目的蛋白HigBA复合物表达。

1.2.2 细菌生长曲线测定、菌落表型及生物膜检测 将培养至对数生长晚期的*Ms*制作成单细胞悬液,调整初始光密度(OD)₆₀₀为0.02,每3 h测定一次OD₆₀₀值,绘制生长曲线。将单细胞悬液倍比稀释至细菌数为1×10³ mL⁻¹,取100 μL后涂板于7H10无抗培养基,培养3 d后拿出,记录细菌表型。在6孔板中加入6 mL苏通液体培养基,然后加入3×10⁵细菌数后静置培养1周,观察细菌生物膜形成。

1.2.3 细菌应激反应条件 将培养至对数生长晚期的细菌制作成单细胞悬液,在玻璃管中加入5 mL 7H9培养基后,再加入单细胞悬液调整菌液浓度(对应的OD₆₀₀值=0.05)用于应激反应。分别给予以下应激条件:热激——水浴加热53℃,处理6 h;溶菌酶——在培养基中添加终质量浓度为2.5 mg/mL的溶菌酶,处理4 h;酸性条件——使用pH= 4的7H9培养基处理细菌48 h;营养缺乏——用PBS处理细菌48 h。在相应时间点收集细菌倍比稀释涂板,计算菌落形成单位(CFU)。

1.2.4 细菌在巨噬细胞内的生存率及细胞因子转录水平检测 复苏液氮冻存的Raw264.7小鼠巨噬细胞并传代至细胞密度达到实验要求,并将该细胞接种于12孔板至细

胞密度达到 1×10^6 /孔后用于感染。将培养至对数生长晚期的*Ms*制作成单细胞悬液后以 $MOI=10:1$ 感染巨噬细胞。检测细菌胞内生存时,在感染后4 h用庆大霉素杀死胞外细菌,6 h、24 h、48 h分别裂解细胞后倍比稀释涂板,计算CFU。因为两种细菌的CFU在同一时间点的CFU计数绝对值不同,不能直接比较,所以我们将6 h时两种细菌CFU的生存率各设为100%,分别计算24 h和48 h两种细菌CFU的生存率并进行比较。检测细胞因子表达水平时,在感染后8 h、24 h、48 h分别裂解细胞,收集产物并用细胞RNA提取试剂盒提取细胞总RNA。

将细胞总RNA逆转录成cDNA后作为模板进行实时荧光定量PCR检测。在NCBI上查找小鼠基因序列,在生工生物提交细胞因子白介素(interleukin, *IL*)-1 β 、*IL*-6、*IL*-10、*IL*-12p40,干扰素(interferon, *IFN*)- γ ,肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, *TNF*)- α 和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, *iNOS*)基因序列,获得并合成荧光定量PCR特异性引物,见表2。以*GAPDH*为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因相对表达量。

1.3 统计学方法

对每组数据进行非配对*t*检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *Mtb*目的基因扩增及*Ms*重组基因表达检测

*Mtb*目的基因的PCR扩增产物大小与预期一致,没有非特异性扩增(图1A)。实时荧光定量PCR结果显示重组菌*Ms_higBA*中*higB*、*higA*基因表达量为内参基因*sigA*的两倍,而空载菌*Ms_vec*中检测不到*higB*和*higA*基因的表达。Western blot检测结果显示重组菌*Ms_higBA*裂解后的上清中出现相对分子质量约 60×10^3 的蛋白条带,与目的蛋白HigBA复合物预期相对分子质量大小一致,而空载菌*Ms_vec*没有(图1B)。

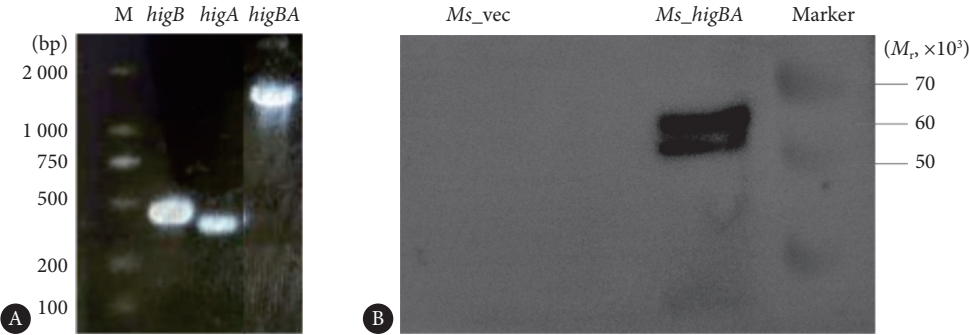


图1 结核分枝杆菌*higBA*基因扩增及耻垢分枝杆菌中基因表达鉴定

Fig 1 Amplification of *higBA* from *Mtb* and Western blot of the expression of the target gene in *Ms*

A: Amplification of *higB*, *higA* and *higBA* from *Mtb* (M: Marker). B: Western blot using anti-His tag antibodies in *Ms*.

表 2 细胞因子qPCR引物

Table 2 Primers used for cytokine qPCR

Cytokine	Primer nucleotide sequence (5'-3')	Product size
<i>IFN</i> - γ -F	CTTGAAAGACAATCAGGCCATC	93 bp
<i>IFN</i> - γ -R	CTTGGCAATACTCATGAATGCA	
<i>TNF</i> - α -F	ATGTCTCAGCCTCTTCTCATTC	851 bp
<i>TNF</i> - α -R	GCTTGTCACTCGAATTTTGAGA	
<i>IL</i> -1 β -F	TGATGTGCTCACTGCCTGGTTTC	81 bp
<i>IL</i> -1 β -R	GTTGATGTGCTGCTGCGAGATTTG	
<i>IL</i> -6-F	CTCCCAACAGACCTGTCTATAC	676 bp
<i>IL</i> -6-R	CCATTGCACAACCTCTTTTCTCA	
<i>IL</i> -10-F	TTCTTTCAAACAAAGGACCAGC	243 bp
<i>IL</i> -10-R	GCAACCCAAGTAACCCCTTAAAG	
<i>IL</i> -12p40-F	TGAGAAGTATTCACTGTCCTGC	772 bp
<i>IL</i> -12p40-R	CTGTGAGTTCTTCAAAGGCTTC	
<i>iNOS</i> -F	CGGACGAGACGGATAGGCAGAG	121 bp
<i>iNOS</i> -R	CCAGACACGGACAAGGCACAC	

2.2 重组菌表型变化

空载菌*Ms_vec*形成典型的粗糙型菌落,菌落表面干燥,边缘及中间都有明显褶皱,形态不规则;重组菌*Ms_higBA*菌落表面干燥但形态更圆润,褶皱明显减少,两种菌落大小无明显差异(图2A)。生长曲线结果显示,两种细菌生长速率无明显差异(图2B)。生物膜形成实验结果显示,两种菌形成的生物膜都能完全覆盖6孔板液体表面,成膜范围无明显差异,重组菌*Ms_higBA*形成的生物膜亲水性更好,类似蛋花样,而空载菌*Ms_vec*形成的生物膜褶皱更多,疏水性更强(图2C)。

2.3 HigBA对细菌应激反应的作用

热激处理3 h后重组菌*Ms_higBA*存活率高于空载菌*Ms_vec*,差异有统计学意义($P<0.05$),6 h后两种菌存活率都降低,差异无统计学意义(图3A)。溶菌酶处理2 h和4 h后重组菌*Ms_higBA*存活率高于空载菌*Ms_vec*,差异有统计学意义($P<0.05$,图3B)。酸性条件处理后24 h重组

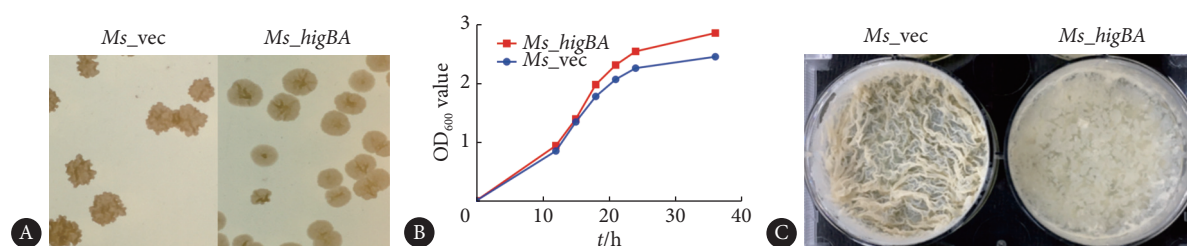


图2 细菌菌落、生长曲线及生物膜形成

Fig 2 Bacterial colonies, growth curve and biofilm formation

A: Bacteria colonies of vector and recombinant strains after incubation at 37 °C for 3 d; B: Growth curve of the two strains showed no significant difference ($n=3$); C: Biofilm formation after incubating bacteria with Sauton's fluid medium at 37 °C for 1 week.

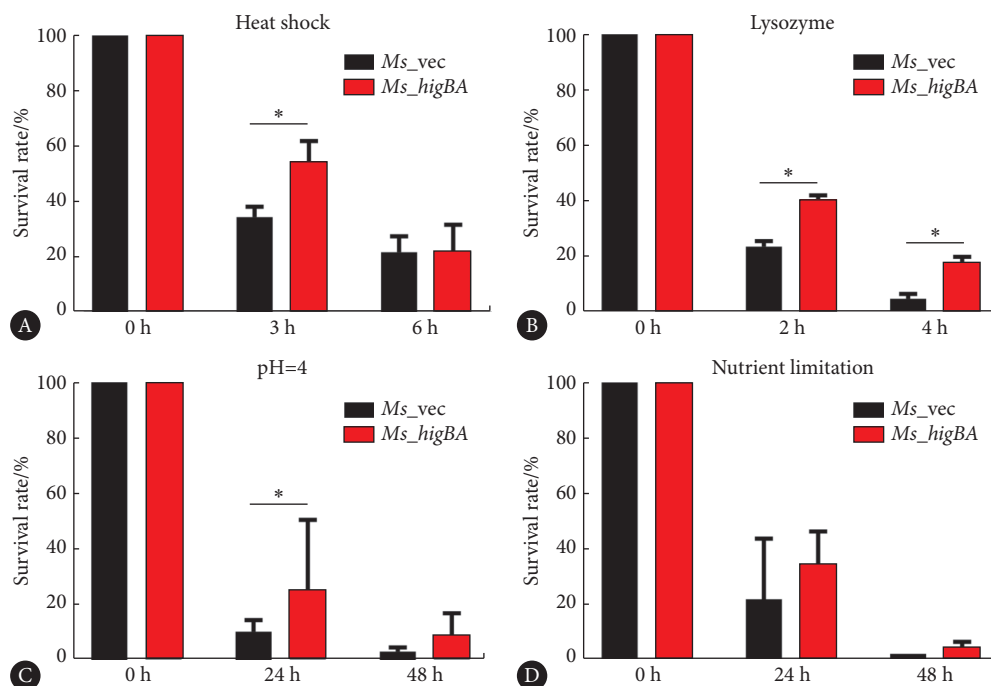


图3 细菌在应激条件下的生存情况

Fig 3 Bacterial survival under stress conditions

A: Recombinant strain could survive significantly better than the control after heat shock for 3 hours; B: When the bacteria were treated with lysosome, *Ms_higBA* could survive better after 2 and 4 hours; C: *Ms_higBA* showed better resistance to acid environment in 24 hours, but it could not survive much in 48 hours; D: The vector and recombinant strains showed no significant difference in survival under nutrient limitation condition. $n=3$, * $P < 0.05$.

菌 *Ms_higBA* 的生存率高于空载菌 *Ms_vec*, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但 48 h 后两种菌的生存率均下降, 组间差异无统计学意义 (图 3C)。营养缺乏环境下, 两种菌在 24 h 和 48 h 的生存率没有明显差异 (图 3D)。

2.4 HigBA 对细菌胞内感染的作用

见图 4。细菌在巨噬细胞内生存结果显示, 重组菌 *Ms_higBA* 在感染后 24 h, CFU 的生存率高于同时点的空载菌 *Ms_vec*, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。细胞因子转录水平检测实验结果显示, *IFN-γ* 在重组菌 *Ms_higBA* 感染后 24 h、48 h 表达量高于空载菌 *Ms_vec* 感染 ($P < 0.05$), *IL-12p40* 在 *Ms_higBA* 感染后 8 h、24 h 表达量低于空载菌 *Ms_vec*, 但 48 h 后高于后者 (P 均 < 0.05); 而其他细胞因子

在感染后 24 h 和 48 h 的表达量都低于空载菌 *Ms_vec* 感染。

3 讨论

II 型抗毒素的化学本质是蛋白质, 与毒素蛋白结合后能形成复合物并拮抗毒素的功能, 因此它们在正常条件下不会影响细菌的生长^[11]。细菌在应对压力条件时会释放出大量游离的毒素蛋白^[12], II 型毒素蛋白是一种 RNA 酶, 能够广泛降解细菌 RNA^[13], 整体性降低细菌基因转录和表达水平, 从而使细菌进入低代谢状态以有效应对压力条件和细胞吞噬。Mtb 能够通过这种方式形成休眠体从而有效躲避宿主免疫系统的杀伤, 这可能是细菌形成潜伏感染的机制之一^[14]。

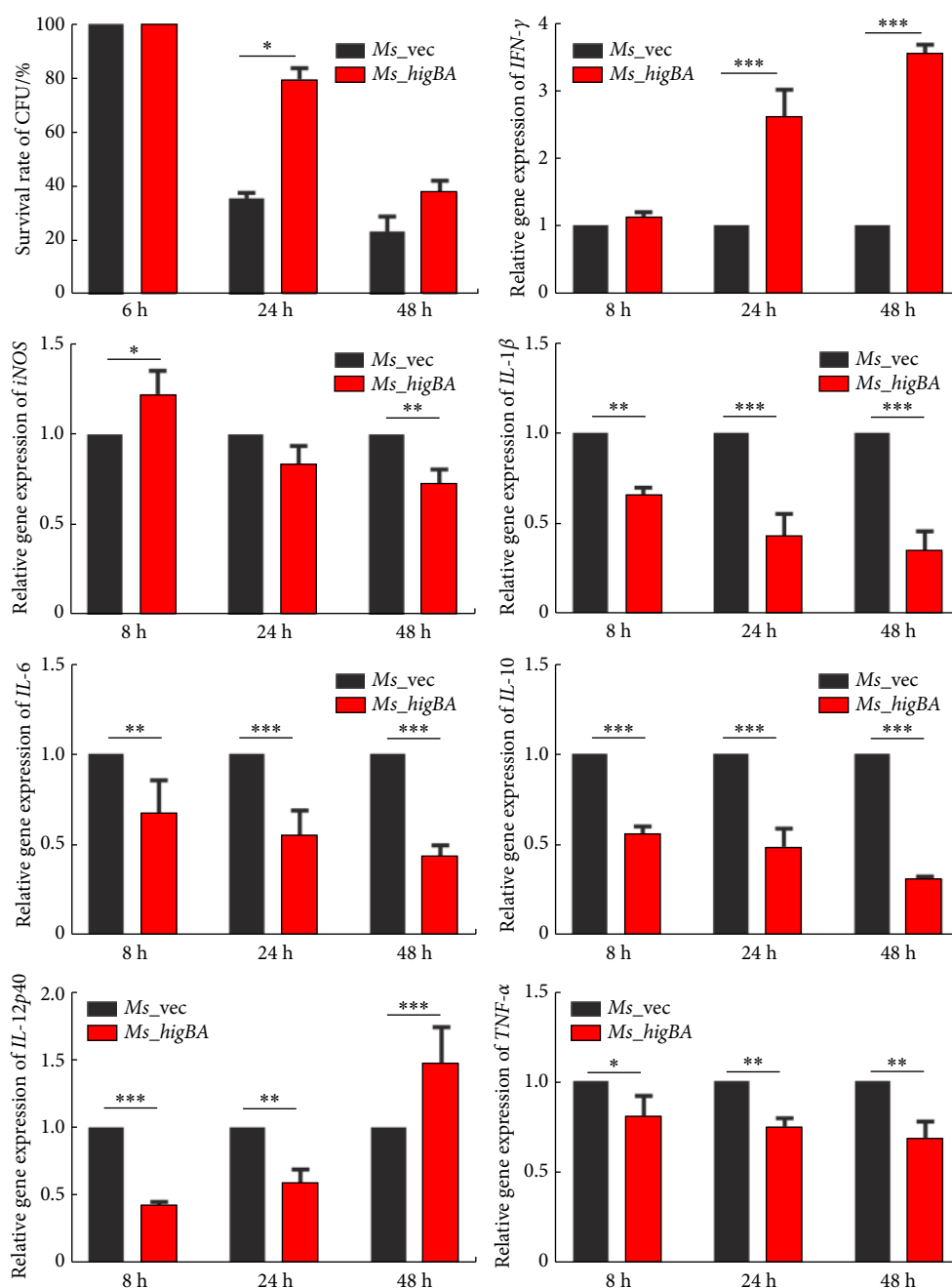


图 4 细菌感染巨噬细胞后CFU及细胞因子表达水平变化

Fig 4 CFU and cytokine transcriptional changes after infecting macrophage

$n=3$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

*Mtb*是一种胞内菌,感染人体后会被巨噬细胞吞噬,细菌可能会在巨噬细胞内形成休眠体,从而有效躲避巨噬细胞的杀伤^[15-16]。因此我们在体外模拟巨噬细胞内的环境,检测细菌应对这些压力条件的生存能力,进而了解细菌应对巨噬细胞吞噬的生理机制。本研究结果显示 *higBA* 基因能够有效帮助细菌应对短时间的热激、溶菌酶处理以及长时间的酸性条件,但对营养缺乏条件并没有明显作用,因此我们推测 *higBA* 基因在 *Mtb* 感染巨噬细胞时也发挥了类似的作用。

研究表明 *Mtb* 感染巨噬细胞会引起细胞因子释放水平的变化^[17]。IL-1β 在感染 *Mtb* 的牛血清中含量明显升高,提示其与 *Mtb* 致病感染机制有关^[18],它是一种促进炎症反应的细胞因子。IL-6 是 *Mtb* 感染机体引发免疫反应的重要细胞因子,有研究表明活动性肺结核的患者血清 IL-6 水平明显高于潜伏感染者,因此学者认为 IL-6 水平可以用于早期诊断^[19]。IL-10 是一种重要的抑制炎症反应的细胞因子,在潜伏感染的患者血清中可以检测到更高水平的 IL-10。IFN-γ 是 II 型干扰素,主要发挥免疫调节作用。

IL-12p40能够与IFN- γ 相互促进。TNF- α 是一种由活化的巨噬细胞产生的重要的免疫调节因子,对大多数免疫细胞都有刺激作用,是一种促炎因子。iNOS是一氧化氮合酶,它是巨噬细胞中一种用于杀伤外来病原体的物质。

从本研究中细胞因子转录水平结果来看,重组菌引发的免疫反应更温和,而空载菌引发的免疫反应更强烈,而这种差异可能就是由*higBA*基因表达引起的。*Ms_higBA*能够在巨噬细胞内存活更多,而且能调节细胞因子的表达水平,说明这种菌能够有效地应对巨噬细胞的不利环境。这可能是通过调节大多数细胞因子的释放水平从而减轻宿主免疫反应,进而使细菌胞内存活率更高,更有利于细菌在宿主内的生长和增殖。

TA系统只存在于微生物尤其是致病微生物中,而人类基因组没有它们的同源基因,因此这些位点可以作为药物靶标^[20]。本实验结果为之探究更多的毒素-抗毒素系统对细菌的作用奠定了基础,但TA调控的分子机制和对细菌的具体作用机理还有待进一步研究。

* * *

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] World Health Organization. WHO global tuberculosis report 2020. (2021-10-14)[2021-11-03]. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240037021/14Oct2021>.
- [2] SULTAN I, RAHMAN S, JAN A T, *et al*. Antibiotics, resistance mechanisms: A bacterial perspective. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2066–2082[2021-11-03]. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02066/full>. doi: 10.3389/fmicb.2018.02066.
- [3] ZAYCHIKOVA M V, ZAKHAREVICH N V, SAGAIDAK M O, *et al*. *Mycobacterium tuberculosis* type II toxin-antitoxin systems: Genetic polymorphisms and functional properties and the possibility of their use for genotyping. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0143682[2021-11-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26658274/>. doi: 10.1371/journal.pone.0143682.
- [4] TRASTOY R, MANSO T, FERNÁNDEZ-GARCÍA L, *et al*. Mechanisms of bacterial tolerance and persistence in the gastrointestinal and respiratory environments. *Clin Microbiol Rev*, 2018, 31(4): e00023–18[2021-11-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30068737/>. doi: 10.1128/CMR.00023-18.
- [5] KANG S M, KIM D H, JIN C, *et al*. A systematic overview of type II and III toxin-antitoxin systems with a focus on druggability. *Toxins (Basel)*, 2018, 10(12): 515–536.
- [6] TANDON H, SHARMA A, SANDHYA S, *et al*. *Mycobacterium tuberculosis* Rv0366c-Rv0367c encodes a non-canonical PezAT-like toxin-antitoxin pair. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 1163–1177.
- [7] GUPTA A, VENKATARAMAN B, VASUDEVAN M, *et al*. Co-expression network analysis of toxin-antitoxin loci in *Mycobacterium tuberculosis* reveals key modulators of cellular stress. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 5868–5882.
- [8] ABIGAIL S, ALAINE R, ANDREWS E S V, *et al*. VapC proteins from *Mycobacterium tuberculosis* share ribonuclease sequence specificity but differ in regulation and toxicity. *PLoS One*, 2018, 13(8): e0203412[2021-11-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30169502/>. doi: 10.1371/journal.pone.0203412.
- [9] DE WELZEN L, ELDHOLM V, MAHARAJ K, *et al*. Whole-transcriptome and -genome analysis of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates identifies downregulation of *ethA* as a mechanism of ethionamide resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61(12): e01461–17[2021-11-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28993337/>. doi: 10.1128/AAC.01461-17.
- [10] LUNGE A, GUPTA R, CHOUDHARY E, *et al*. The unfoldase ClpC1 of *Mycobacterium tuberculosis* regulates the expression of a distinct subset of proteins having intrinsically disordered termini. *J Biol Chem*, 2020, 295: 9455–9473[2021-11-03]. [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021-9258\(17\)48966-6](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021-9258(17)48966-6). doi: 10.1074/jbc.RA120.013456.
- [11] WANG X Y, ZHAO X K, WANG H, *et al*. *Mycobacterium tuberculosis* toxin Rv2872 is an RNase involved in vancomycin stress response and biofilm development. *Appl Microbiol Biot*, 2018, 102(16): 7123–7133.
- [12] YAMADA Y, DICK T. Mycobacterial caseinolytic protease gene regulator ClgR is a substrate of caseinolytic protease. *mSphere*, 2017, 2(2): e00338–16[2021-11-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28317028/>. doi: 10.1128/mSphere.00338-16.
- [13] CULVINER P H, LAUB M T. Global analysis of the *E.coli* toxin MazF reveals widespread cleavage of mRNA and the inhibition of rRNA maturation and ribosome biogenesis. *Mol Cell*, 2018, 70(5): 868–880.
- [14] BARTH V C, ZENG J M, VVEDENSKAYA I O, *et al*. Toxin-mediated ribosome stalling reprograms the *Mycobacterium tuberculosis* proteome. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3035–3045.
- [15] PROZOROV A A, FEDOROVA I A, BEKKER O B, *et al*. The virulence factors of *Mycobacterium tuberculosis*: Genetic control, new conceptions. *Genetika*, 2014, 50(8): 885–908.
- [16] TIWARI P, ARORA G, SINGH M, *et al*. MazF ribonucleases promote *Mycobacterium tuberculosis* drug tolerance and virulence in guinea pigs. *Nat Commun*, 2015, 6: 6059–6072[2021-11-03]. <https://www.nature.com/articles/ncomms7059>. doi: 10.1038/ncomms7059.
- [17] O'GARRA A, REDFORD P S, MCNAB F W, *et al*. The immune response in tuberculosis. *Annu Rev Immunol*, 2013, 31: 475–527[2021-11-03]. https://arjournals.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-032712-095939?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori:rid:crossref.org&rft_dat=cr_pub%20%200pubmed/. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095939.
- [18] KATHAMUTHU G R, MOIDEEN K, BHASKARAN D, *et al*. Reduced systemic and mycobacterial antigen-stimulated concentrations of IL-1 β and IL-18 in tuberculous lymphadenitis. *Cytokine*, 2017, 90(Complete): 66–72.
- [19] ZAMBUZI F A, CARDOSO-SILVA P M, ESPINDOLA M S, *et al*. Identification of promising plasma immune biomarkers to differentiate active pulmonary tuberculosis. *Cytokine*, 2016, 88: 99–107[2021-11-03]. [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043-4666\(16\)30484-7](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043-4666(16)30484-7). doi: 10.1016/j.cyto.2016.08.030.
- [20] LEE I G, LEE S J, CHAE S, *et al*. Structural and functional studies of the *Mycobacterium tuberculosis* VapBC30 toxin-antitoxin system: Implications for the design of novel antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(15): 7624–7637.

(2021-10-13收稿, 2022-08-22修回)

编辑 吕 熙