

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
53(8):860–866; 4 August 2013
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

结核分枝杆菌 ESX-1 分泌蛋白 ESAT-6 增强巨噬细胞吞噬功能

屈野,殷瑛,李浩,刘炬,杨秀旭,董大勇,徐俊杰*,陈薇*

军事医学科学院生物工程研究所,北京 100071

摘要:【目的】 研究结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 分泌蛋白 ESAT-6 (early secreted antigenic target of 6 kDa) 对巨噬细胞吞噬功能的影响。【方法】 用重组质粒 pFLAG-ESAT-6 和 pFLAG-EGFP 转染 RAW264.7 细胞,经 G418 筛选,PCR、RT-PCR 和 Western blot 鉴定,获得稳定表达 flag-ESAT-6 和 flag-EGFP 的 RAW 细胞系,然后用流式细胞术观察各稳转细胞系吞噬荧光微球的能力,并用共聚焦显微镜和菌落计数法检测稳转细胞系吞噬大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的能力。【结果】 获得了稳定表达 flag-ESAT-6 的 RAW-E6 细胞系和表达 flag-EGFP 的 RAW-EGFP 细胞系;流式细胞术检测结果表明 RAW-E6 吞噬荧光微球的能力显著强于野生型细胞系 RAW264.7 和对照细胞系 RAW-EGFP;菌落计数和激光共聚焦分析表明 RAW-E6 细胞系吞噬 *E. coli* 的能力也显著强于 RAW264.7 和 RAW-EGFP。【结论】 通过胞内表达发现结核分枝杆菌分泌蛋白 ESAT-6 能够增强巨噬细胞的吞噬功能,这将为深入理解结核分枝杆菌的致病机制提供新的思路。

关键词:结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*), ESAT-6, 巨噬细胞, 吞噬作用

中图分类号:R37 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209(2013)08-0860-07

结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 引起的结核病近些年有死灰复燃的趋势,目前全球大约有 20 亿人感染该病原菌,每年约 200 万患者因结核而死亡^[1]。结核分枝杆菌在进入机体后被巨噬细胞所吞噬,但能够在巨噬细胞内长期生存并生长繁殖,在一定时期后引起巨噬细胞死亡,这被认为是结核分枝杆菌致病的重要原因之一^[2]。近些年研究发现,结核分枝杆菌的致病性与其特殊的 ESX-1 分泌系统有密切关系,ESX-1 分泌系统在改变细胞信号转导、促进细菌从巨噬细胞吞噬体逃逸、抑制吞噬体溶酶体融合、影响细胞凋亡及裂解细胞等方面发挥了重要作用,缺少 ESX-1 系统相关分泌蛋白会使结核分枝杆菌的毒力大为下降。但是 ESX-1 系统

是一个共分泌系统,多种分泌蛋白相互依赖,共同分泌,一种蛋白的缺失直接影响到其他蛋白的分泌,所以在结核杆菌中敲除或过表达 ESX-1 系统中某一种蛋白的研究,并不能体现该蛋白对致病机理的直接作用,也不能反映该种分泌蛋白与巨噬细胞的相互作用过程^[3–4]。

本研究中,我们试图通过建立稳定表达 ESX-1 分泌蛋白 ESAT-6 的巨噬细胞系,来探讨 ESAT-6 对巨噬细胞功能的直接影响,这样就可以回避其他 ESX-1 共分泌蛋白对结果的影响。前期研究中,我们曾经建立了稳定表达 EGFP-ESAT-6 融合蛋白的 RAW264.7 巨噬细胞系^[5],初步观察了 ESAT-6 对巨噬细胞功能的影响,但是 EGFP 是一个分子量较

基金项目:国家自然科学基金 (30972772);北京市自然科学基金 (5122035)

* 通信作者。徐俊杰, Tel: +86-10-66948565, E-mail: xujunjie@sina.com; 陈薇, E-mail: chenwei0226@yahoo.com.cn

作者简介:屈野 (1974–), 男, 陕西周至人, 博士研究生, 研究方向为结核分枝杆菌感染的分子机理。E-mail: quye2004@163.com

收稿日期:2012-12-27; **修回日期:**2013-03-13

大的荧光蛋白,与其融合表达会否影响 ESAT-6 的结构与功能还不清楚,同时 EGFP 本身对巨噬细胞功能的影响目前也有争议^[6-7]。因此,我们又采用了较小的 flag 标签,建立了稳定表达 flag-ESAT-6 的 RAW264.7 细胞系,并观察了其吞噬功能的变化,结果显示细胞内表达的 ESAT-6 能够显著增强 RAW264.7 的吞噬功能,这为进一步理解结核分枝杆菌 ESX-1 分泌系统的致病机理提供了新的依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料

小鼠巨噬细胞 RAW264.7、rEGFP、rESAT-6 和 ESAT-6 单抗,以及 pEGFP-C1 和 pEGFP-ESAT-6 质粒为本实验室保存。

Universal Genomic DNA Extraction kit ver. 3.0 购自 TaKaRa 公司。Quantscript RT Kit Quant cDNA 第一链合成试剂盒以及 RNA simple Total RNA kit 购自 Tiangen 公司。真核细胞转染试剂 Lipofectamine™ LTX and PLUS™ Reagents 试剂盒与 ProLong® Antifade Kit 试剂盒购自 invitrogen 公司。Anti-Flag antibody 和 RIPA 裂解缓冲液购自普利莱公司。HRP 标记的 Goat anti-Mouse IgG 购自 Santa Cruze 公司。蓝色荧光微球(APC, 2.2 μm, FP-2068-2)购自 Spherotech 公司。绿色荧光标记大肠杆菌(*Escherichia coli*) (为诱导表达 EGFP 蛋白的 *E. coli* DH5α, 本室构建)。

1.2 稳转细胞系的建立

根据 pEGFP-C1 质粒图谱,我们在 pEGFP-C1 质粒的 EGFP 基因前加入 flag 序列,以此设计了反向引物(Reverse1, 序列中包含 EGFP 序列上游 26 碱基和 flag 标签的 24 个碱基),正向引物分别为 EGFP 基因 N 端(Forward1)与 ESAT-6 基因 N 端(Forward2)的一段序列。以 pEGFP-C1 为模板,通过引物 Reverse1, Forward1 反向 PCR 扩增质粒,加入了 flag 标签序列,获得了表达 flag-ESAT-6 融合蛋白的重组质粒序列;以 pEGFP-ESAT-6 为模板,通过反向 PCR 扩增质粒(引物 Reverse1, Forward2),去除了 EGFP 基因,加入了 flag 标签序列,获得表达 flag-ESAT-6 融合蛋白的重组质粒序列。两种重组质粒序列经纯化、磷酸化、连接、转化与鉴定后,获得完整的重组质粒分别命名为为 pFLAG-EGFP 和 pFLAG-

ESAT-6,用于下一步细胞转染。细胞转染前 24 h 接种 RAW264.7 细胞于 24 孔板(每孔约 2×10^5 个),待细胞汇合度达到 60% - 80% 时用于转染。转染过程按照 Lipofectamine™ LTX and PLUS™ Reagents 说明书操作。转染 24 h 后用含 800 ug/mL 的 G418 细胞培养液换液,每 2 天更换一次,培养 10 天后,转染细胞有抗 G418 的克隆长出,通过有限稀释法克隆化培养于 96 孔培养板中,培养 6 天后,挑选单克隆细胞转接于六孔板扩大培养,进一步鉴定^[7]。反向 PCR 引物分别为: Reverse1: 5'-TTTATCATCATCATCTTTATAATCCATGGTGGCGACCGGTAGCGCTAG-3'; Forward1: 5'-GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACACCGGGTG-3'; Forward2: 5'-ACAGAGCAGCAGTGAATTTCGCGGGTATCGAGGCC-3'。

1.3 稳转细胞系基因组 PCR 检测

收集抗 G418 的克隆细胞,按 Universal Genomic DNA Extraction kit ver. 3.0. 试剂盒操作说明提取全基因组,若转染细胞内有目的蛋白 flag-ESAT-6 与 flag-EGFP 的表达,则可分别扩增出 flag-ESAT-6 序列约 300 bp 和 flag-EGFP 序列约 740 bp。

1.4 稳转细胞系 mRNA 的 RT-PCR 检测

收集 PCR 阳性细胞,按 RNA 全基因组提取试剂盒进行细胞总 RNA 的提取,反转录获得第一条 cDNA 链,取 5 μL cDNA 用于 PCR 扩增 ESAT-6 和 EGFP。

1.5 Western blot 检测稳转细胞系 flag-ESAT-6 和 flag-EGFP 的表达

收集 PCR 阳性细胞,使用 RIPA 裂解缓冲液裂解细胞后,4℃, 13000 × g 离心 10 min,取上清获得细胞总蛋白,制备样品进行 SDS-PAGE 电泳,然后恒流 300 mA, 60 min 将蛋白转移至 NC 膜。膜置于 5% 脱脂奶粉中,室温封闭 1 h,以一抗(1:2000)4℃ 孵育过夜, TBST 洗 3 次,每次 10 min; 以二抗(1:20000)室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次,每次 10 min。加入化学发光剂,暗室显影。

1.6 流式细胞术检测巨噬细胞吞噬荧光微球试验

试验前一天,胰酶消化细胞,以 5×10^5 细胞/孔铺于六孔板中,待第二天细胞汇合度达到 80% 时将荧光微球(微球数: 细胞数 = 10:1)加入六孔板细胞培养液中孵育 2 h,然后用无菌预冷的 PBS 洗细胞 3 次,将未内化的荧光微球洗下来。使用胰酶消化六孔板细胞,吸去胰酶后用 500 μL 10% 的 FCS/PBS

将细胞悬浮,在 1 h 内用流式细胞仪检测 (APC 通道: Ex. 633 nm, Em. 665 nm)。

1.7 平板计数检测巨噬细胞吞噬 *E. coli* 试验

试验前一天,胰酶消化细胞,以 5×10^5 细胞/孔铺于六孔板中,待第二天细胞汇合度达到 80% 时将 *E. coli* (细菌数:细胞数 = 10:1) 加入六孔板细胞培养液中孵育 30 min,然后用无菌预冷的 PBS 洗细胞 3 次,将未内化的细菌洗下来。使用胰酶消化六孔板细胞,吸去胰酶后用 500 μ L10% 的 FCS/PBS 将细胞悬浮,细胞计数。200 \times g 离心 5 min,弃上清,收集细胞,加入无菌双蒸水悬浮细胞,低渗处理 5 min,吹打裂解细胞,倍比稀释后涂布于 LB 平板,37 $^{\circ}$ C 过夜培养,菌落计数。

1.8 共聚焦显微镜观察稳转细胞系吞噬荧光标记 *E. coli* 试验

在六孔板内放置无菌盖玻片,加入 2 mL 的 0.1% gelatin 在 37 $^{\circ}$ C 培养箱包被 30 min,然后以 3×10^5 细胞/孔铺细胞于六孔板中,第二天细胞汇合度达到 50% 时将绿色荧光标记 *E. coli* (细菌数:细胞数 = 10:1) 加入六孔板细胞培养液中孵育 30 min,再用无菌预冷的 PBS 洗细胞 3 次,将未内化的 *E.*

coli 洗下来。加入 2 mL 的 4% 多聚甲醛对细胞进行固定 30 min,取出盖玻片,使用 ProLong[®] Antifade Kit 试剂盒制成切片,于激光共聚焦显微镜扫描,获取图像。

1.9 统计学方法

结果用 Graph Pad Prism 5.0 软件分析。数据用 mean \pm s 表示,以非配对 t 检验进行数据分析, $P < 0.05$ 有显著性差异。

2 结果

2.1 稳转细胞系的建立

分别在基因水平和转录水平上对转染细胞进行了基因扩增,分别扩增出大小约 300 bp 和 740 bp 的片段,与设计的 flag-ESAT-6 和 flag-EGFP 片段的大小一致。使用抗 ESAT-6 单抗、抗 EGFP 单抗和抗 flag 单抗对转染细胞蛋白表达进行 Western blot 检测的结果也显示,flag-ESAT-6 和 flag-EGFP 蛋白在转染细胞中得到了完整的表达。这些结果均表明建立了能够表达 flag-ESAT-6 和 flag-EGFP 的稳转细胞系,分别命名为 RAW-E6 和 RAW-EGFP(图 1)。

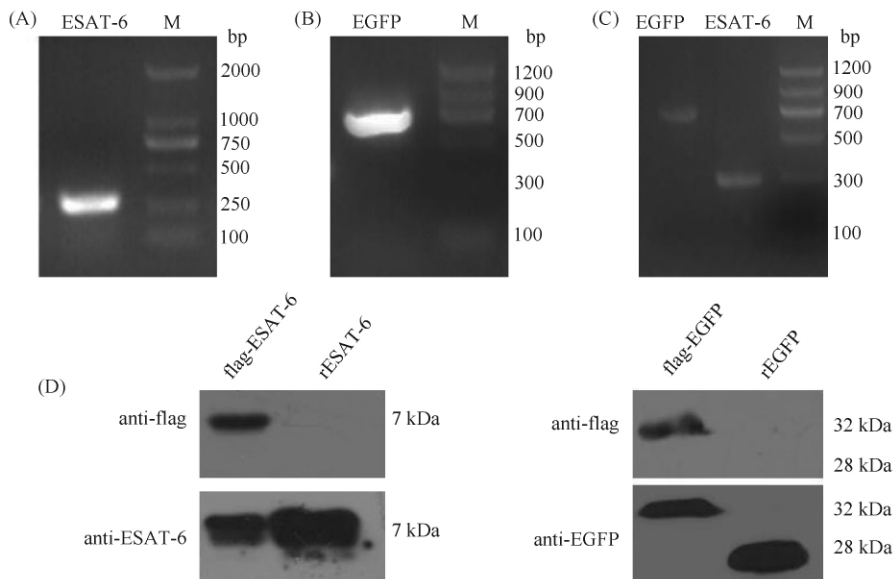


图 1. 稳定表达 flag-ESAT-6 和 flag-EGFP 融合蛋白的巨噬细胞系的鉴定

Figure 1. Identification of the stable transfected cells expressing flag-ESAT-6 or flag-EGFP fusion protein. A: Flag-ESAT-6 fragment amplified by PCR from genomic DNA of RAW-E6; B: Flag-EGFP fragment amplified by PCR from genomic DNA of RAW-EGFP; C: EGFP fragments or ESAT-6 fragment amplified by RT-PCR from RNA extracted from RAW-EGFP and RAW-E6; D: Western blot analysis of flag-ESAT-6 fusion protein from RAW-E6 and flag-EGFP. fusion protein from RAW-EGFP.

2.2 流式细胞术检测稳转细胞系吞噬荧光微球能力

流式细胞术检测了稳转细胞系对荧光微球的吞噬能力,结果用吞噬率,即吞噬荧光微球的细胞数在所有被检测细胞中所占的比率来表示,实验数据显示 RAW264.7、RAW-EGFP 和 RAW-E6 细胞系对荧光微球的吞噬率分别为 $38.21\% \pm 1.02\%$ 、

$38.20\% \pm 1.60\%$ 和 $45.67\% \pm 1.42\%$ 。统计分析表明,稳定表达 flag-ESAT-6 的细胞系 RAW-E6 吞噬荧光微球的能力显著强于野生型 RAW264.7 细胞和对照细胞系 RAW-EGFP(图 2, $P < 0.05$),这提示细胞内表达的 ESAT-6 可显著促进 RAW264.7 细胞对异物的吞噬能力。

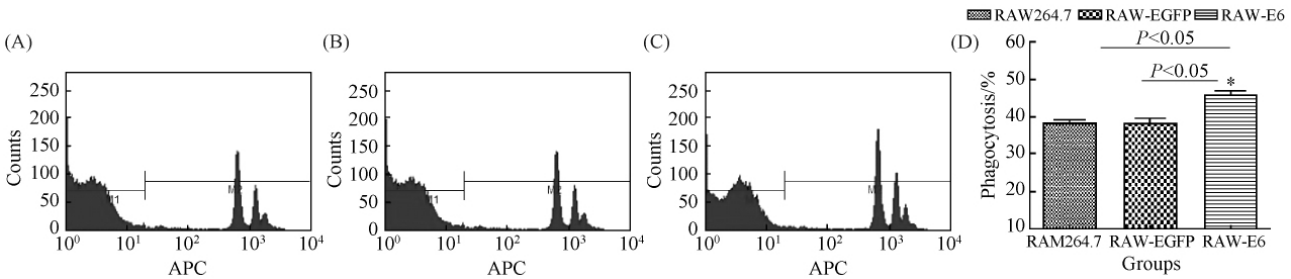


图 2. 不同细胞系吞噬荧光微球能力的比较

Figure 2. Comparison of the phagocytosis of different cells that ingested fluorescent beads. A ,B and C:The histograms of RAW264.7 , RAW-EGFP and RAW-E6 that ingested fluorescent beads; D: The percents of RAW264.7 , RAW-EGFP and RAW-E6 that ingested fluorescent beads.

2.3 菌落计数法检测稳转细胞系吞噬 E. coli 能力

用菌落计数法来检测稳转细胞系对 *E. coli* 的吞噬,细胞系所吞噬的 *E. coli* 数目与被检测巨噬细胞数目的比值代表稳转细胞系吞噬能力的大小,结果显示 RAW264.7、RAW-EGFP 和 RAW-E6 细胞系对 *E. coli* 的吞噬率分别为 $41.25\% \pm 1.77\%$ 、 $39.7\%5 \pm 1.06\%$ 和 $58.0\% \pm 2.83\%$,这表明 RAW-E6 在吞噬 *E. coli* 的能力上显著强于野生型 RAW264.7 细胞和对照细胞系 RAW-EGFP(图 3, $P < 0.01$)。

2.4 激光共聚焦检测稳转细胞系吞噬荧光标记 E. coli 能力

共聚焦显微镜计数检测至少吞噬一个绿色荧光 *E. coli* 的细胞数目与这个视野下总细胞数目的比

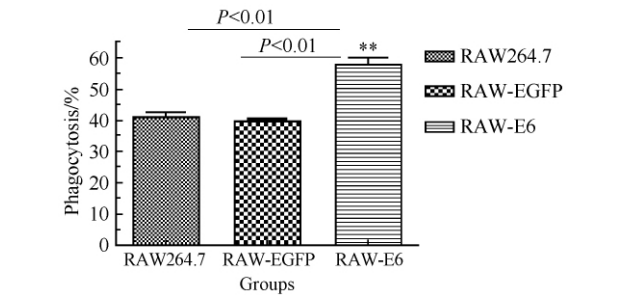


图 3. 不同细胞系吞噬 E. coli 能力的比较

Figure 3. The percents of RAW264.7 , RAW-EGFP and RAW-E6 that ingested *E. coli*.

值,每个实验至少平均计算 100 个细胞,至少观察 10 个视野。结果显示 RAW264.7 细胞和 RAW-E6 细胞的群体吞噬率分别为 $34.54\% \pm 0.95\%$ 和

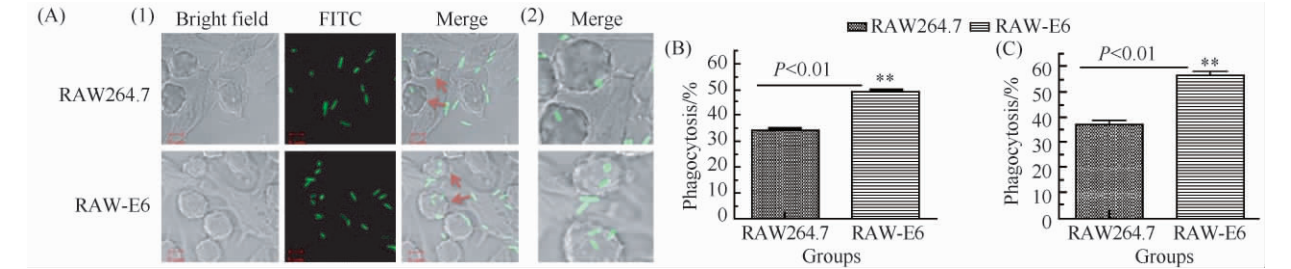


图 4. 共聚焦显微镜分析稳转细胞系吞噬 E. coli 能力

Figure 4. Confocal microscopy analysis of cells that ingested *E. coli* with green fluorescence. A: (1) Cell population that ingested *E. coli*; (2) Single cell that ingested *E. coli*. B: The percents of RAW264.7 and RAW-E6 that ingested *E. coli*. C: Numbers of *E. coli* from single cell from different cell lines.

49.14% \pm 1.39% (图 4-A 和 4-B, $P < 0.01$)。同时也检测了视野中巨噬细胞所吞噬 *E. coli* 的总数目与视野下总细胞数的比值, RAW264.7 细胞和 RAW-E6 细胞的个体吞噬率分别为 37.25% \pm 2.33% 和 56.75% \pm 2.19% (图 4-C, $P < 0.01$)。表明稳转细胞系 RAW-E6 吞噬绿色荧光 *E. coli* 的能力在整体和个体水平上均显著强于野生型 RAW264.7 细胞。

3 讨论

结核分枝杆菌感染机体后, 会被肺部巨噬细胞所吞噬, 并且能够继续在巨噬细胞内生长繁殖, 逃避宿主一系列的免疫杀伤, 最终导致巨噬细胞裂解, 引起相应的疾病病灶。这种逃避机体免疫杀伤的机制是怎样实现的, 为什么它能够在巨噬细胞内生长繁殖而不被巨噬细胞杀死? 这一直是研究者感兴趣的问题。

ESAT-6 是最先被发现的 ESX-1 分泌蛋白之一, 是重要的 T 细胞抗原, 在动物模型中对结核分枝杆菌的感染有一定的保护性, 是候选结核疫苗的重要组分, 被用于新型结核疫苗的设计以及用作结核的诊断抗原^[8]。但是, 许多研究也显示 ESAT-6 还是结核分枝杆菌重要的毒力因子, 从多个方面调节着巨噬细胞功能, 如诱导细胞凋亡, 在细胞膜上穿孔, 参与细菌逃离吞噬体等, 促进结核分枝杆菌在巨噬细胞内生长繁殖和毒力的发挥^[9-11]。有研究表明 ESAT-6 能够直接结合于巨噬细胞 Toll-like receptor 2 (TLR2), 启动 TLR 信号通路, 通过激活 Akt 抑制 MyD88 与 IRAK4 激酶的相互作用, 下调转录因子 NF- κ B 以及干扰素调节因子 IRFs 的表达^[12-13]。最近的研究表明, 结核分枝杆菌进入巨噬细胞后, 可以从吞噬体中完成转位, 逃逸至细胞质中发挥其毒力作用, 且随着感染时间延长, 细胞质中结核分枝杆菌数量逐渐增多, 而该过程严重依赖于 ESAT-6 蛋白, 尤其是 C 末端 12 个氨基酸^[11,14]。与此同时, 也有研究报道, 2-5 μ g/mL 的 ESAT-6 与巨噬细胞过夜孵育能够诱导 THP-1 巨噬细胞凋亡, 其中 caspase-1, -3, -5, -7 和 -8 基因表达明显上调^[9,15]。有报道结核分枝杆菌在进入巨噬细胞后, ESX-1 分泌蛋白抑制了吞噬体溶酶体成熟, 使得结核分枝杆菌在巨噬细胞内存活并生长繁殖^[16]。联系到结核分枝杆菌临床感染的病理特征, 不难发现, 结核分枝杆菌在

侵入机体时, 可能经历了接触-被吞噬-抑制吞噬体成熟-细胞质转位-生长繁殖-诱导细胞凋亡(死亡)-病灶(炎症、肉芽肿等)等一系列活动, 其间结核分枝杆菌通过其 ESX-1 分泌蛋白对巨噬细胞功能进行着精密的调控, 使得能够完成在巨噬细胞内的生长繁殖和致病作用。在我们的研究中, ESAT-6 能够显著增强 RAW264.7 巨噬细胞吞噬作用, 这可能是结核分枝杆菌感染过程中对巨噬细胞功能的一种精细调控, 有利于结核分枝杆菌在巨噬细胞中的生长繁殖及逃避机体其他免疫分子的杀伤作用。

建立稳转细胞系是研究细胞内蛋白相互作用的一个很好的模型^[17]。以往在研究结核分枝杆菌蛋白与免疫细胞相互作用时, 经常是通过基因敲除或过表达刺激来探讨细菌蛋白的生物学功能, 但对于结核分枝杆菌 ESX-1 分泌蛋白来说, 它是一个共分泌系统, 其中一种分泌蛋白不能分泌时, 另外一种分泌蛋白也不能分泌^[15], 因此基因敲除或过表达刺激的研究方法就不能真实地反映细菌蛋白与巨噬细胞的相互作用, 掩盖了其他相关蛋白的生物学功能。本研究中, 通过构建稳定表达细菌蛋白的细胞系, 直接建立了一个蛋白与细胞相互作用的生物学模型, 为研究结核分枝杆菌 ESX-1 分泌蛋白在机体中的生理功能提供了一个很好的平台。在我们的研究中, 分别构建了表达 flag-ESAT-6 和 flag-EGFP 的稳转细胞系, 并用吞噬荧光微球和 *E. coli* 两种方法证明了细胞内表达的 ESAT-6 能够显著增强巨噬细胞的吞噬功能, 而作为对照的表达 EGFP 细胞系的吞噬功能与野生型 RAW264.7 无显著性差异。已有报道显示 ESAT-6 能够与细胞膜结合, 并有膜穿孔活性^[10,13], ESAT-6 对巨噬细胞吞噬功能的增强是否与此有关需要进一步的研究。

参考文献

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis control - epidemiology, strategy, financing. http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/en/index.html. 2010.
- [2] Ganguly N, Siddiqui I, Sharma P. Role of *M. tuberculosis* RD-1 region encoded secretory proteins in protective response and virulence. *Tuberculosis*, 2008, 88 (6): 510-517.
- [3] Li H, Xu J, Chen W. Research progress of ESX secretion systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science in China*

- (*Series C*), 2009, 39(10): 925-932. (in Chinese)
- 李浩, 徐俊杰, 陈薇. 结核分枝杆菌 ESX 分泌系统研究进展. 中国科学(C 辑), 2009, 39(10): 925-932.
- [4] Simeone R, Bottai D, Brosch R. ESX/type VII secretion systems and their role in host-pathogen interaction. *Current Opinion in Microbiology*, 2009, 12(1): 4-10.
- [5] Li H, Yin Y, Dong D, Zhang J, Fu L, Cai C, Wang M, Xu J, Chen W. Establishment of RAW264.7 cell line stably expressing *Mycobacterium tuberculosis* protein ESAT-6. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2011, 27(9): 1390-1396. (in Chinese)
- 李浩, 殷瑛, 董大勇, 张军, 付玲, 蔡晨光, 王猛, 徐俊杰, 陈薇. 稳定表达结核分枝杆菌 ESAT6 蛋白的 RAW264.7 细胞系的建立. 生物工程学报, 2011, 27(9): 1390-1396.
- [6] Dross N, Spriet C, Zwerger M, Muller G, Waldeck W, Langowski J. Mapping eGFP oligomer mobility in living cell nuclei. *PLoS One*, 2009, 4(4): e5041.
- [7] Gibbs JS, Malide D, Hornung F, Bennink JR, Yewdeu JW. The influenza A virus PB1-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a predicted basic amphipathic helix that disrupts mitochondrial function. *Journal of Virology*, 2003, 77(13): 7214-7224.
- [8] Li H, Xu J, Chen W. The structure and function of *M. tuberculosis* RD-1 region encoded proteins. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2009, 36(10): 1260-1266. (in Chinese)
- 李浩, 徐俊杰, 陈薇. 结核分枝杆菌 RD-1 区编码蛋白的结构和功能. 生物化学与生物物理进展, 2009, 36(10): 1260-1266.
- [9] Derrick SC, Morris SL. The ESAT6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression. *Cellular Microbiology*, 2007, 9(6): 1547-1555.
- [10] Smith J, Manoranjan J, Pan M, Bohsali A, Xu JJ, Liu J, McDonald KL, Szyk A, LaRonde-LeBlanc N, Gao LY. Evidence for pore formation in host cell membranes by ESX-1-secreted ESAT-6 and its role in *Mycobacterium marinum* escape from the vacuole. *Infection and Immunity*, 2008, 76(12): 5478-5487.
- [11] Houben D, Demange C, Ingen J, Perez J, Baldeón L, Abdallah AM, Caleechurn L, Bottai D, Zon M, Punder K, Laan T, Kan A, Vries RB, Willemsen P, Bitter W, Soolingen D, Brosch R, Wel N, Peters PJ. ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria. *Cellular Microbiology*, 2012, 14(8): 1287-1298.
- [12] Pathak SK, Basu S, Basu KK, Banerjee A, Pathak S, Bhattacharyya A, Kaisho T, Kundu M, Basu J. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. *Nature Immunology*, 2007, 8(6): 610-618.
- [13] Li H, Yin Y, Mao Y, Dong D, Zhang J, Fu L, Guo J, Xu J, Chen W. Recombinant expression of *Mycobacterium tuberculosis* protein ESAT-6 and the study about its binding to cell membrane. *China Biotechnology*, 2011, 31(5): 55-59. (in Chinese)
- 李浩, 殷瑛, 毛亚丽, 董大勇, 张军, 付玲, 郭继红, 徐俊杰, 陈薇. 结核分枝杆菌 ESAT6 蛋白的重组表达及膜定位研究. 中国生物工程杂志, 2011, 31(5): 55-59.
- [14] Simeone R, Bobard A, Lippmann J, Bitter W, Majlessi L, Brosch R, Enninga J. Phagosomal rupture by *Mycobacterium tuberculosis* results in toxicity and host cell death. *PLoS Pathogens*, 2012, 8(2): e1002507.
- [15] Welin A, Eklund D, Stendahl O, Lerm M. Human macrophages infected with a high burden of ESAT-6-expressing *M. tuberculosis* undergo caspase-1-and cathepsin B-independent necrosis. *PLOS One*, 2011, 6(5): e20302.
- [16] Xu J, Laine O, Masciocchi M, Manoranjan J, Smith J, Du SJ, Edwards N, Zhu XP, Fenselau C, Gao LY. A unique *Mycobacterium* ESX-1 protein co-secretes with CFP-10 / ESAT-6 and is necessary for inhibiting phagosome maturation. *Molecular Microbiology*, 2007, 66(3): 787-800.
- [17] Gao M, Zhong D, Zhang B. Roles of CD59 and CD2 in T cell signal transduction. *Immunological Journal*, 2011, 27(9): 773-780. (in Chinese)
- 高美华, 钟丹丹, 张蓓. CD59-CD2 对 T 细胞信号转导的作用. 免疫学杂志, 2011, 27(9): 773-780.

ESX-1 secreted protein ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* enhances the phagocytosis of RAW264.7 macrophages

Ye Qu, Ying Yin, Hao Li, Ju Liu, Xiuxu Yang, Dayong Dong, Junjie Xu^{*}, Wei Chen^{*}

Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

Abstract: [**Objective**] To investigate the effects of *Mycobacterium tuberculosis* ESX-1 protein early secreted antigenic target of 6 kDa (ESAT-6) in modulating phagocytosis of RAW264.7 cells. [**Methods**] RAW264.7 cells were transfected with recombinant plasmids pFLAG-ESAT-6 and pFLAG-EGFP by liposome. After screening with a high level of G418, the macrophage cell lines stably expressing flag-ESAT-6 or flag-EGFP proteins were obtained. The cell lines were further identified by PCR, RT-PCR and western blot. The phagocytosis of those cell lines was analyzed for ingested fluorescent beads by flow cytometry and for phagocytized *Escherichia coli* (*E. coli*) by colony count and confocal microscopy. [**Results**] We established successfully RAW-E6 cell line stably expressing flag-ESAT-6 and RAW-EGFP cell line stably expressing flag-EGFP. Flow cytometric analysis shows that the percentage of phagocytosis of RAW-E6 was higher than that of RAW264.7 and RAW-EGFP. Colony count and confocal microscopy test also show that RAW-E6 had higher phagocytosis ability than RAW264.7 and RAW-EGFP. [**Conclusion**] The secreted protein ESAT-6 can enhance the phagocytosis of macrophages, which provides new evidence to understand the pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, ESAT-6, macrophage, phagocytosis

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30972772) and by the Beijing Natural Science Foundation (5122035)

^{*} Corresponding authors. Junjie Xu, Tel: +86-10-66948565, E-mail: xujunjie@sina.com; Wei Chen, E-mail: chenwei0226@yahoo.com.cn

Received: 27 December 2012/Revised: 13 March 2013

《微生物学报》审稿程序

本刊严格遵守“三审制”,即:编辑部内审,专家外审,主编总审。从投稿日期开始,争取在2个月之内给出审稿结果,3-6个月之内发表。

- (1) 收到来稿后,首先要由编辑初审,通过后再送外审。将请2位专家进行审阅,再送主编进行最后的总审,这个过程一般不会超过2个月。如果初审2位专家的意见分歧较大,编辑部将再请第3位专家进行初审,之后再送主编总审,那么此稿的审理时间可能会超过2个月。
- (2) 完成审稿后(即主编给出总审意见),编辑会给出作者发出E-mail告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的)。作者在返回修改稿后,经本刊审核合格后方可被录用。

在此提醒作者,在没有完成全部审稿之前,不要在远程系统中看到初审意见时就急于返回修改稿件。