

卡介苗的免疫保护机制及其改造策略进展

杨鲁琦 沈鸣逸 沙巍 陈颖盈 王颖

【摘要】 结核病是目前全球死亡率最高的单一感染性疾病。卡介苗(bacille Calmette-Guérin, BCG)作为唯一的预防性疫苗,在包括中国在内的结核病高危地区的新生儿出生时即被接种,在结核病防控中发挥了重要作用。然而,近年来的研究结果显示,BCG的保护力具有一定的时效性,尤其在成年人中保护力明显减弱。因此,如何改造 BCG 以增强其抗结核免疫保护作用将成为结核病疫苗研发和结核病防控的重点研究方向之一。作者复习相关文献,从 BCG 的改造和接种两方面论述 BCG 的研究现状和未来应用策略。

【关键词】 结核; 卡介苗; 免疫活性; 药物评价; 疫苗,合成; 预防和控制; 综述

Research progress in immunoprotective mechanism of bacille Calmette-Guérin and vaccine development strategies
YANG Lu-qi, SHEN Ming-yi, SHA Wei, CHEN Ying-ying, WANG Ying. Shanghai Institute of Immunology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China
Corresponding author: CHEN Ying-ying, Email: yingying.chen@shsmu.edu.cn

【Abstract】 Tuberculosis (TB) remains one of the most severe single infectious diseases leading to high mortality in the world. Bacille Calmette-Guérin (BCG) is the only licensed preventive TB vaccine, which is routinely administered in newborns in high burden countries including China, and provides significant protection against TB. However, recent researches reveal that the protection provided by BCG is time-sensitive, especially declined in adults. Therefore, how to reform BCG to augment the protective immunity against TB becomes one of the principal strategies in the vaccine development and the prevention of infection. Herein, the authors will review the research progress to discuss about the current status in BCG vaccine development and vaccination strategies and their future application.

【Key words】 Tuberculosis; Bacille Calmette-Guérin; Immunocompetence; Drug evaluation; Vaccines, synthetic; Prevention and control; Review

结核病是慢性呼吸道传染性疾病,以肺结核多见。世界卫生组织^[1]《2019 年全球结核病报告》估算,2018 年全球约有 1000 万例新发结核病及 150 万例因结核病死亡的患者,中国结核病负担位列全球第二。此外,有研究估计全球约

1/4 的人口存在结核感染^[2],提示潜伏感染者体内 MTB 的再激活可能是结核病防控的更大挑战。

预防性疫苗接种是结核病防控的重要环节。卡介苗(bacille Calmette-Guérin, BCG)作为当今世界上应用了近百年的,且唯一获得临床许可的疫苗,已成为结核病高负担国家和地区新生儿强制接种的手段,呈现出一定的保护性。但有研究认为,BCG 的抗结核保护时间不长于 20 年,仅在 10 岁以下儿童中表现出良好的免疫保护力^[3]。故是否在成年人人群中再次接种 BCG 以增强人群的抗结核免疫力成为了研究者关注的重点。现阶段还缺乏重复接种 BCG 获得有效免疫的证据,因此并不推荐重复接种 BCG^[4];但是否可以通过改造 BCG 来提高其保护效力及时效将是近年来结核病防控领域的关注点之一。目前认为,可以通过在 BCG 中加载具有良好免疫原性的新结核抗原,或开发不同的疫苗形式(如重组 BCG 或新型 MTB 减毒株,或以结核蛋白为主要形式的亚单位疫苗等)来提高新型 BCG 的免疫保护效力^[5],但要注意人群接种 BCG 后的免疫状态及接种者是否存在 MTB 感染史可能给新型 BCG 的免疫效应带来的影响。笔者将围绕当前 BCG 免疫保护机制和基于 BCG 的改造策略进行综述。



开放科学(资源服务)标识码(OSID)的开放科学计划以二维码为入口,提供丰富的线上扩展功能,包括作者对论文背景的语音介绍、该研究的附加说明、与读者的交互问答、拓展学术圈等。读者“扫一扫”此二维码即可获得上述增值服务。

doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2020.08.016

基金项目:“十三五”国家科技重大专项(2018ZX10731301001004, 2018ZX1030230100-2002);国家自然科学基金(81873868);上海市科委“优秀学术带头人”计划项目(18XD1403300);上海交通大学医学院“大学生创新训练计划”(1319018);上海市“科技创新行动计划”自然科学基金面上项目(19ZR1445800);上海市感染性疾病(结核病)临床医学研究中心(19MC1910800)

作者单位:200025 上海交通大学医学院上海市免疫学研究所(杨鲁琦、沈鸣逸、陈颖盈、王颖);同济大学附属上海市肺科医院结核科(沙巍)

通信作者:陈颖盈,Email:yingying.chen@shsmu.edu.cn

一、BCG 的抗结核免疫机制及其局限性

BCG 是由法国医生 Albert Calmette 与其助手 Camille Guérin 在甘油-马铃薯培养基上对牛分枝杆菌历经 13 年 230 次传代培养后分离获得的减毒株^[6]。自 1921 年第一次接种于新生儿后,BCG 开始在全球范围内广泛应用。1933 年,王良将 BCG 引入中国并在小范围内实施接种,后于 1979 年在全国范围内实施强制接种^[7]。目前,BCG 在我国的新生儿接种率达到 99%,产生的保护力不仅能有效降低婴儿罹患结核性脑膜炎和粟粒性肺结核的风险^[8],还能对抗其他感染性病原体(如呼吸道病毒等)的入侵,有效降低新生儿出生后 1 年内的死亡率^[9]。

(一)抗结核免疫机制

BCG 能够编码 4000 多种蛋白,抗原谱丰富,接种后可在机体内引起丰富的免疫应答反应。研究显示,疫苗接种 1~3 d 后,BCG 可诱导接种部位的固有免疫细胞在接种部位产生局部炎症细胞因子[如白细胞介素-1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等],并可招募单核细胞到达接种部位;9 d 后,局部浸润的单核细胞成为炎症因子的主要来源^[10]。BCG 的病原相关分子模式(pathogen associated molecular pattern, PAMP;如肽聚糖、阿拉伯半乳糖和霉菌酸等)存在于 BCG 菌株的细胞壁中,可通过与固有免疫细胞表面的病原识别受体[pathogen recognition receptor, PRR;如补体受体、Toll 样受体(TLR)-2 和 TLR-4 等]作用而启动免疫应答^[11]。随后,疫苗接种部位的树突状细胞携带 BCG 抗原进入淋巴结,向初始 T 细胞递呈 BCG 抗原,启动适应性免疫应答。此外,被吞噬进入单核-巨噬细胞内的 BCG 还可通过细胞内模式识别受体——核苷酸结合寡聚化结构域蛋白 2(nucleotide-binding oligomerization domain-2, NOD2)受体介导的信号通路使其发生表观遗传修饰,最终导致细胞功能的改变^[12]。

BCG 主要诱导人体内产生辅助性 T 细胞 1(Th1)。同时树突状细胞发挥其抗原交叉呈递功能,引起 CD8⁺ T 淋巴细胞免疫应答^[13]。虽然目前普遍认为 BCG 引发的免疫应答以细胞免疫为主,但 BCG 接种者血清中可以检测到 MTB 脂阿拉伯甘露聚糖(LAM)特异性 IgG 水平显著增加^[14],且 LAM 的糖成分——阿拉伯甘露糖(AM)的单克隆抗体在研究中显示出保护作用^[15],因此推测体液免疫也可能在 BCG 诱导的免疫保护中同样具有一定的意义。

(二)BCG 保护力的局限性

尽管已有的研究结果显示,接种 BCG 可以通过产生有效的固有免疫应答和适应性免疫应答介导抗 MTB 的免疫保护作用,但是 BCG 对抗结核感染的保护力仍存在以下 4 个方面的不足。

1. BCG 菌株间保护力差异:世界卫生组织^[16]认为,不同

国家之间 BCG 的抗结核保护效力存在差别,但原因尚不明朗。目前,已在动物模型中完成比较共 4 类 13 株 BCG 亚株,结果发现不同 BCG 亚株的保护力存在差异:其中 BCG-Phipps 株、BCG-Frappier 株、BCG-Pasteur 株和 BCG-Tice 株等 BCG 菌株(属于 DU2-IV 组)的保护力较强,而包括 BCG-Sweden 株和 BCG-Birkhaug 株在内的 DU2-II 组 BCG 菌株保护力相对较弱^[17]。因此有人推测,BCG 保护力在各国间出现差异是由于长期培养和传代导致不同国家应用的 BCG 菌株间产生了基因多态性,包括序列的重复、缺失和单核苷酸多样性。

2. BCG 保护力的时效性:虽然有研究显示,BCG 免疫能够在某些人群中表现出 20 年或者更长时间的保护效力,但明显增加的 20 岁以上结核病患者数量,则提示 BCG 可能无法提供长效保护^[18],可能是以下多种免疫学因素共同造成的。

1)免疫记忆 T 细胞数量不足:任何一种预防性疫苗接种后保护力的维持都依赖于免疫记忆功能。BCG 诱导的保护性免疫应答主要由 T 细胞介导,因此特异性记忆性 T 细胞(memory T cells, T_M)的持续存在和功能维持对于抗结核保护至关重要。其中,当中央记忆性 T 细胞(central memory T cells, T_{CM})再次受到抗原刺激时能迅速分化成效应 T 细胞(effector T cells, T_E)而参与再次应答,对免疫保护的长期维持意义更大^[19]。然而目前的研究结果显示,BCG 在成年人外周诱导产生的免疫记忆 T 细胞以效应记忆性 T 细胞(effector memory T cells, T_{EM})为主,而 T_{CM}细胞数量偏少,这可能是 BCG 保护力存在时效性的重要原因^[20]。

2)免疫记忆 T 细胞耗竭:在结核病高发地区,影响 BCG 保护力减弱的因素也许不仅局限于 T_{CM}细胞产生数量的降低,长期接触结核抗原导致 T_M细胞消耗或 T 细胞功能受损也可能是另一重要原因^[20]。由于接触结核抗原的概率高于其他地区,高发地区接种者体内结核抗原特异性 T_M细胞可能频繁地产生应答,缓慢消耗抗结核特异性 T_M细胞池,最终导致 BCG 保护力持久性减弱^[21]。同时,可观察到患者体内 T_E表面程序性死亡配体-1(PD-L1)和 PD-L2 分子的表达上调,提示频繁暴露于 MTB 高负担环境下,不仅持续消耗 T_M细胞,也会不断抑制 T 细胞免疫功能^[22]。

3)Th17 细胞数量减少:有研究报道,BCG 在肺脏局部诱导产生的 Th17 细胞的含量与 BCG 的保护效力呈正相关^[23]。但随着接种时间的延长,Th17 细胞的衰减可能导致 BCG 保护效力降低。

4)定植记忆性 T 细胞的衰减:由于 MTB 通过呼吸道感染,肺部定植记忆性 T 细胞(resident memory T cells, T_{RM})在抗结核免疫应答中位居一线,发挥的抗结核保护作用也日益受到关注^[24]。然而,目前尚未见关于 BCG 皮内接种后肺

脏局部 T_{RM} 长期维持高水平的报道,其衰减亦可能导致 BCG 保护力具有时效性。

5) BCG 活菌在体内的存活时间: 结核特异性 T 细胞对抗原的应答水平与 BCG 活菌的体内滞留具有较强的关联性,可能在一定程度上影响着 BCG 保护力的持续性。当小鼠体内 BCG 活菌被清除,其诱导的免疫应答水平亦会呈现逐渐减弱的趋势^[25],其在接种部位的存活时间可能仅为 4 周左右^[26],尚未见 BCG 更长时间在胞内滞留的相关报道。

3. 注射途径的影响: 当前,BCG 主要通过皮内接种,其他的接种方式也在不断尝试中。在最新非人灵长类模型中发现,静脉注射 BCG 能极大地提高其保护力^[27]。然而,由于 BCG 是一种活菌疫苗,静脉接种是否会造成 BCG 在血液中的留存或播散,以及是否会导致被接种者形成新的感染,是静脉接种面临的最大的安全性挑战。同时,也有学者提出通过鼻腔吸入 BCG 进行免疫^[28],其安全性和免疫保护作用也需要进一步实验证明^[29]。这些研究在未来能否在人群中应用目前还很难判断,但均为 BCG 的作用机制研究和新的接种途径提供了重要方向。

4. 基础疾病和其他因素的影响: 接种者自身的基础疾病和其他因素也对 BCG 的保护效力产生不可忽视的影响。如 HIV 感染、糖尿病、恶性肿瘤等疾病,以及空气污染和低体质指数(BMI)都可能削弱 BCG 的保护力^[30-31]。当 BCG 接种者感染 HIV 后,其体内 CD4⁺ T 淋巴细胞的数量和功能会逐渐降低,导致 BCG 免疫应答下降、保护力降低,成为结核病发病的重要诱因,也是目前 MTB 与 HIV 双重感染防控的难点。

二、基于 BCG 的疫苗改造策略

来自世界卫生组织^[3]的报告指出,BCG 不能为全人群,特别是成年人提供足够的抗结核免疫保护,新型抗结核疫苗的研发将成为结核病防控中的核心科学问题之一。新型抗结核疫苗的形式主要包含重组 BCG (rBCG) 和亚单位疫苗。rBCG 的优点在于其包含更广谱的抗原且与自然结核感染有一定相似性。而亚单位疫苗仅含有 MTB 的部分抗原,具有安全、保护力良好的优点^[31],但如果作为初次免疫疫苗,其保护效果很可能弱于现有的 BCG,可能更适用于 BCG 初次免疫后的加强免疫^[5]。故在新型抗结核疫苗研发过程中,以 BCG 为基础的基因工程改造策略成为主要研究目标,主要包含两种: 其一是改造 BCG 使其表达不同的结核抗原,提高改造后 BCG 的抗原多样性和免疫原性; 其二是通过改造 BCG 进一步增强宿主对其抗原的提呈能力^[32]。

(一) 增加现有 BCG 菌株的抗原多样性

采用基因工程技术,在现有 BCG 菌株中加入 MTB 不同感染状态下表达的特异性抗原,以增加 BCG 的抗原多样性,继而增强其诱导的抗结核免疫应答,是目前最为常用的改造

策略。

1. 利用 MTB 复合群基因组与 BCG 的差异。与 MTB 相比,BCG 全基因组缺失 16 个基因差异区域 (region of differences, RD)^[33]。这为改造 BCG 提供了重要的思路,即将 RD 区的部分基因整合到 BCG 中,构建可表达相应抗原的 rBCG,有望提高疫苗对结核感染的特异性免疫保护力。

RD1 在 MTB 致病过程中起着关键的作用。其表达的早期分泌性抗原靶 6 (ESAT-6) 和培养滤液蛋白 10 (CFP-10) 作为 MTB 特异性抗原,已在结核病的免疫学诊断中得到广泛应用。小鼠实验结果显示,将 ESAT-6 与双十八烷基二甲基溴化铵 (DDA)/单磷脂脂质体 A (MPL) 佐剂共同免疫小鼠后,可诱导产生 ESAT-6 的特异性 T 细胞反应,其对结核感染的保护力与 BCG 免疫相当^[34]。目前已尝试在 BCG 菌株原有的基因序列中加入 RD1 区,形成新菌株 BCG::RD1,在动物模型中可观察到保护力的提高;然而,对免疫缺陷小鼠行静脉注射 BCG::RD1 后,小鼠肺、脾脏的菌载量为 BCG 母株的 100~1000 倍,且易诱发脾肿大和肉芽肿,可见 BCG 经此改造后毒力被增强^[35]。这可能与用于重组的 MTB 抗原诱导的免疫应答能力过强有关。RD2 仅在部分 BCG 菌株中存在,其编码的 MPT64 蛋白可在结核感染者体内诱发迟发型超敏反应^[36]。

2. BCG 中存在过表达强免疫原性的保护性抗原也是目前增加 BCG 抗原多样性的策略之一。Ag85 家族是目前 rBCG 构建中最常用的抗原,包含 Ag85A、Ag85B 和 Ag85C 3 个蛋白,是 MTB 生长过程中主要的分泌型蛋白。过表达 Ag85A 的 rBCG 可使小鼠脾脏细胞分泌的 γ -干扰素 (IFN- γ) 水平上升,且可诱导强 IgG2a 抗体反应^[37]。此外,脂蛋白家族中也存在具有强免疫原性的蛋白,如可在活动性结核病患者外周血中检测到高免疫反应性脂蛋白 Z (LppZ; 由 Rv3006 基因编码),其免疫小鼠后,可诱导产生和 BCG 免疫相当的抗 MTB 免疫保护作用^[38],有望成为未来构建 rBCG 的新型候选抗原;其他如 PstS3、Mpt83、RpfB 等脂蛋白抗原均呈现出良好的免疫原性,亦可成为构建 rBCG 的重要候选抗原^[39]。

(二) 以增强宿主抗原提呈能力为目标的改造策略

德国马普所 Kauffmann 教授课题组尝试不同的 rBCG 构建策略。由于 MTB 中脲酶 C 可抑制吞噬体的酸化作用,阻碍吞噬体成熟,进而导致主要组织相容性复合体 (MHC II) 分子表达和抗原提呈减少,使宿主免疫系统不能很好地发挥免疫学功效^[40]。而李斯特菌的穿孔素 O (LLO) 则有利于吞噬体和溶酶体融合,可帮助细菌逃逸到被感染细胞的细胞质中,促进干扰素诱导黑色素瘤缺乏因子 2 (absent in melanoma 2, AIM2) 蛋白炎症小体的激活、增强细胞自噬和凋亡。故 Kauffmann 课题组将原 BCG 中的脲酶 C 替换成穿

孔素 O, 构建了具有更好免疫保护力的新型结核病疫苗——VPM1002^[41]。VPM1002 临床 I 期试验开展于 2008 年, 结果显示, 在接种人群中除了具有良好的安全性以外, 还展现出较好的免疫原性, 可诱导 IFN- γ 阳性的 T 细胞和特异性抗体的产生^[42]。继而研究者在结核病高发地区的新生儿中进行临床 II 期试验, 进一步评估 VPM1002 的安全性。结果显示, BCG 和 VPM1002 均可诱导 IL-17 的免疫应答, 且 VPM1002 的受接种者注射部位脓肿形成的占比低于 BCG, 进一步证实了 VPM1002 的安全性、耐受性和免疫原性^[43]。目前, VPM1002 正在开展临床 III 期试验。

全球结核病疫苗基金会也采用过类似的策略开展 BCG 改造试验。他们将原有 BCG 中的脲酶 C 替换为产气荚膜梭菌溶素 O (Pfo) 构建 rBCG 菌株——AERAS-401, 其在重症联合免疫缺陷 (SCID) 小鼠中表现出良好的耐受性和安全性; 第二代 rBCG 菌株——AERAS-422 在动物实验中也显示出具有抗原多样性及增强抗原提呈能力的特点, 且优于 BCG 的免疫原性和免疫保护性^[44]。但在人体临床试验 I 期的受试者中有 2 名出现了水痘带状疱疹病毒的再激活, 导致该疫苗的开发被中断^[45]。

三、rBCG 的免疫策略

目前, rBCG 的免疫策略理论上包括以新生儿为接种对象的 rBCG 初次免疫疫苗和用于 BCG 初次免疫地区的加强免疫用 rBCG 疫苗。笔者上面提及的两种 BCG 改造策略, 不论是增加结核抗原的多样性还是增强宿主的免疫应答水平, 构建出的 rBCG 均可作为初次免疫用疫苗。然而, 我国作为结核病高负担国家, BCG 第一针接种通常在婴儿出生后 24~96 h 内完成, 而这个时间也是新生儿发生与疫苗接种无关的死亡或接种后异常反应的高发时期, 如果将改造后的 rBCG 疫苗用于新生儿的初次免疫, 要求监护人签知情同意的可能性极低, 处理偶合反应后的不良事件也会极其困难, 故 rBCG 用于新生儿初次免疫的可能性几乎为“0”^[46]。所以, “BCG 初免-rBCG 再免”这一免疫策略成为现阶段 rBCG 可在我国临床应用的唯一共识。

四、新型 BCG 疫苗研究的展望

尽管目前对于 BCG 接种后的免疫保护机制有所了解, 并已经提出一些 BCG 重组改造策略, 但仍有很多有待解决的问题。

1. 如何选择构建 rBCG 的基础 BCG 菌株是目前面临的问题之一。目前, 对 13 株 BCG 菌株的全基因组进行解析后发现, 不同 BCG 菌株的缺失基因在数量和种类上不尽相同。因此, 深入探索不同菌株间保护力的差异和缺失基因间差异的关系, 不仅对 BCG 菌株的选择具有重要意义, 也可为后续这些菌株的免疫原性和可能存在的免疫病理学提供更多的实验数据支持。

2. 选择新的结核抗原也是 BCG 改造的重要部分。目前, 构建 rBCG 常用的抗原主要集中在 Ag85 家族, 但是该家族分子所诱导的免疫保护作用亟待进一步的实验结果支持。同时, 由于 MTB 在不同感染状态下的基因表达谱不尽相同, 因此选择其在潜伏感染、早期感染和(或)晚期感染状态下的特征性抗原用于构建 rBCG, 有望实现对不同人群的全面保护。但免疫原性过强的蛋白(如 ESAT-6)会导致免疫病理的发生, 并不是理想的候选抗原。因此, 用于重组的结核抗原的免疫原性强度也将成为抗原选择的另一个重要标准。

3. 对于构建成功的 rBCG, 选择接种人群也是另一个关键问题。由于各方面原因, 当前在我国使用 rBCG 取代 BCG 可行性较低。但是否能够在 BCG 免疫过的青少年或成年人中使用 rBCG 以延长抗结核保护力时间、降低人群 MTB 感染率, 或是将构建成功的 rBCG 作为治疗性疫苗, 亦或是构建出具有足够安全性的 rBCG 用于潜伏性结核感染人群, 都将是研究者未来努力的方向^[47-48]。

笔者在前期的研究中发现, 不同年龄段的结核感染 T 淋巴细胞斑点试验 (T-SPOT. TB) 检测阴性人群对于存在于 BCG 中的不同结核抗原的响应强度和免疫应答能力不尽相同(待发表); 因此推测, 不同年龄段人群对于加强抗结核免疫用抗原的需求也可能不同。而从需要接种的人群来看, 结核病密切接触者及参与其诊疗过程的医务人员是实施再接种的首选人群; 而结核病高发年龄段 (15~25 岁) 人群也可成为潜在接种人群。因此, 在考虑加强疫苗免疫前是否可以先对健康人群按年龄段或者其他指标初步筛选接种人群, 利于实现特殊人群精准再免疫, 发挥更有效的免疫保护作用。对于上述研究, 值得做进一步探讨。

4. BCG 接种的驯化免疫 (trained immunity) 作用。有研究报道, 婴幼儿接种 BCG 后可以明显降低其他病原体感染造成的死亡率, 这可能与驯化免疫相关, 即固有免疫细胞在适当的病原体刺激下可以通过表观遗传机制产生类免疫记忆样功能, 从而整体提高机体对其他病原体的免疫功能^[49]。在最近发生的新型冠状病毒肺炎 (corona virus disease 2019, COVID-19) 疫情中, 有研究显示各国 COVID-19 发病率与其 BCG 接种率呈负相关^[50]。虽然这项研究仅局限于两者之间存在相关性而非因果关系, 但也可能再一次说明 BCG 接种后驯化免疫带来的免疫保护。但在接种 BCG 的人群中, 这种驯化免疫功能可以维持多长时间、在 rBCG 免疫后驯化免疫是否可以和 T 细胞协同发挥更好的保护作用, 以及 BCG 接种后带来的驯化免疫能否对 COVID-19 有防治作用, 均是未来值得做进一步探索的前沿问题。

综上所述, 关于 BCG 的免疫保护力及其改造策略的研究仍然具有很多未解决的科学问题, 对其进行深入的探索将

推动结核病防治的发展。

参 考 文 献

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2019. Geneva; World Health Organization, 2019.
- [2] Houben RM, Dodd PJ. The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling. *PLoS Med*, 2016, 13(10): e1002152. doi: 10.1371/journal.pmed.1002152.
- [3] World Health Organization. BCG vaccines; WHO position paper-February 2018. *Wkly Epidemiol Rec*, 2018, 93(8): 73-96.
- [4] World Health Organization. SAGE evidence to recommendations framework. Geneva; World Health Organization, 2017.
- [5] Nieuwenhuizen NE, Kaufmann SHE. Next-Generation Vaccines Based on Bacille Calmette-Guérin. *Front Immunol*, 2018, 9: 121. doi: 10.3389/fimmu.2018.00121.
- [6] Ravenel MP. La Vaccination Préventive Contre la Tuberculose par le "BCG". *Am J Public Health Nations Health*, 1928, 18(8):1075.
- [7] Chen ZR, Wei XH, Zhu ZY. BCG in China. *Chin Med J (Engl)*, 1982, 95(6): 437-442.
- [8] Mangtani P, Abubakar I, Ariti C, et al. Protection by BCG vaccine against tuberculosis: a systematic review of randomized controlled trials. *Clin Infect Dis*, 2014, 58(4): 470-480. doi: 10.1093/cid/cit790.
- [9] Aaby P, Kollmann TR, Benn CS. Nonspecific effects of neonatal and infant vaccination: public-health, immunological and conceptual challenges. *Nat Immunol*, 2014, 15(10): 895-899. doi: 10.1038/ni.2961.
- [10] Sugisaki K, Dannenberg AM Jr, Abe Y, et al. Nonspecific and immune-specific up-regulation of cytokines in rabbit dermal tuberculous (BCG) lesions. *J Leukoc Biol*, 1998, 63(4): 440-450. doi:10.1002/jlb.63.4.440.
- [11] Tsuji S, Matsumoto M, Takeuchi O, et al. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin: involvement of toll-like receptors. *Infect Immun*, 2000, 68(12): 6883-6890. doi:10.1128/iai.68.12.6883-6890.2000.
- [12] Kleinnijenhuis J, Quintin J, Preijers F, et al. Bacille Calmette-Guérin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(43): 17537-17542. doi:10.1073/pnas.1202870109.
- [13] Turner J, Dockrell HM. Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells with live *Mycobacterium bovis* BCG activates cytolytic CD8⁺ T cells *in vitro*. *Immunology*, 1996, 87(3): 339-342. doi:10.1046/j.1365-2567.1996.512590.x.
- [14] Brown RM, Cruz O, Brennan M, et al. Lipoarabinomannan-reactive human secretory immunoglobulin A responses induced by mucosal bacille Calmette-Guérin vaccination. *J Infect Dis*, 2003, 187(3): 513-517. doi:10.1086/368096.
- [15] Hamasur B, Haile M, Pawlowski A, et al. *Mycobacterium tuberculosis* arabinomannan-protein conjugates protect against tuberculosis. *Vaccine*, 2003, 21(25/26): 4081-4093. doi:10.1016/s0264-410x(03)00274-3.
- [16] World Health Organization. WHO preferred product characteristics for new tuberculosis vaccines. Geneva; World Health Organization, 2018.
- [17] Zhang L, Ru HW, Chen FZ, et al. Variable Virulence and Efficacy of BCG Vaccine Strains in Mice and Correlation with Genome Polymorphisms. *Mol Ther*, 2016, 24(2): 398-405. doi:10.1038/mt.2015.216.
- [18] Nguipod-Djomo P, Heldal E, Rodrigues LC, et al. Duration of BCG protection against tuberculosis and change in effectiveness with time since vaccination in Norway: a retrospective population-based cohort study. *Lancet Infect Dis*, 2016, 16(2): 219-226. doi:10.1016/S1473-3099(15)00400-4.
- [19] Kirman JR, Henaio-Tamayo MI, Agger EM. The Memory Immune Response to Tuberculosis. *Microbiol Spectr*, 2016, 4(6). doi:10.1128/microbiolspec.TB2-0009-2016.
- [20] Orme IM. The Achilles heel of BCG. *Tuberculosis (Edinb)*, 2010, 90(6): 329-332. doi:10.1016/j.tube.2010.06.002.
- [21] Lindenström T, Knudsen NP, Agger EM, et al. Control of chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection by CD4 KLRG1-IL-2-secreting central memory cells. *J Immunol*, 2013, 190(12): 6311-6319. doi:10.4049/jimmunol.1300248.
- [22] Jurado JO, Alvarez IB, Pasquinelli V, et al. Programmed death (PD)-1; PD-ligand 1/PD-ligand 2 pathway inhibits T cell effector functions during human tuberculosis. *J Immunol*, 2008, 181(1): 116-125. doi:10.4049/jimmunol.181.1.116.
- [23] Cruz A, Torrado E, Carmona J, et al. BCG vaccination-induced long-lasting control of *Mycobacterium tuberculosis* correlates with the accumulation of a novel population of CD4⁺ IL-17⁺ TNF⁺ IL-2⁺ T cells. *Vaccine*, 2015, 33(1): 85-91. doi:10.1016/j.vaccine.2014.11.013.
- [24] Connor LM, Harvie MC, Rich FJ, et al. A key role for lung-resident memory lymphocytes in protective immune responses after BCG vaccination. *Eur J Immunol*, 2010, 40(9): 2482-2492. doi:10.1002/eji.200940279.
- [25] Kaveh DA, Garcia-Pelayo MC, Hogarth PJ. Persistent BCG bacilli perpetuate CD4 T effector memory and optimal protection against tuberculosis. *Vaccine*, 2014, 32(51): 6911-6918. doi:10.1016/j.vaccine.2014.10.041.
- [26] Minassian AM, Satti I, Poulton ID, et al. A human challenge model for *Mycobacterium tuberculosis* using *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin. *J Infect Dis*, 2012, 205(7): 1035-1042. doi:10.1093/infdis/jis012.
- [27] Darrah PA, Zeppa JJ, Maiello P, et al. Prevention of tuberculosis in macaques after intravenous BCG immunization. *Nature*, 2020, 577(7788): 95-102. doi:10.1038/s41586-019-1817-8.
- [28] Derrick SC, Kolibab K, Yang A, et al. Intranasal administration of *Mycobacterium bovis* BCG induces superior protection against aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Clin Vaccine Immunol*, 2014, 21(10): 1443-1451. doi: 10.1128/CVI.00394-14.
- [29] Manjaly Thomas ZR, McShane H. Aerosol immunisation for TB: matching route of vaccination to route of infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2015, 109(3): 175-181. doi:10.1093/trstmh/tru206.
- [30] Oxlade O, Murray M. Tuberculosis and poverty: why are the poor at greater risk in India? *PLoS One*, 2012, 7(11): e47533. doi:10.1371/journal.pone.0047533.
- [31] Olmos P, Donoso J, Rojas N, et al. Tuberculosis and diabetes mellitus: a longitudinal-retrospective study in a teaching hospital. *Rev Med Chil*, 1989, 117(9): 979-983.
- [32] Zhu B, Dockrell HM, Ottenhoff THM, et al. Tuberculosis vaccines: Opportunities and challenges. *Respirology*, 2018, 23(4): 359-368. doi:10.1111/resp.13245.
- [33] Behr MA, Wilson MA, Gill WP, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science*, 1999, 284(5419): 1520-1523. doi: 10.1126/science.284.5419.1520.
- [34] Brandt L, Elhay M, Rosenkrands I, et al. ESAT-6 subunit vaccination against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 2000, 68(2): 791-795. doi:10.1128/iai.68.2.791-795.2000.
- [35] Pym AS, Brodin P, Brosch R, et al. Loss of RD1 contributed

- to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol*, 2002, 46 (3): 709-717. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03237.x.
- [36] Roche PW, Winter N, Triccas JA, et al. Expression of *Mycobacterium tuberculosis* MPT64 in recombinant *Myco. smegmatis*; purification, immunogenicity and application to skin tests for tuberculosis. *Clin Exp Immunol*, 1996, 103 (2): 226-232. doi:10.1046/j.1365-2249.1996.d01-613.x.
- [37] Dhar N, Rao V, Tyagi AK. Immunogenicity of recombinant BCG vaccine strains overexpressing components of the antigen 85 complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Med Microbiol Immunol*, 2004, 193 (1): 19-25. doi:10.1007/s00430-002-0170-x.
- [38] Chen Y, Xiao JN, Li Y, et al. Mycobacterial Lipoprotein Z Triggers Efficient Innate and Adaptive Immunity for Protection Against *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Front Immunol*, 2019, 9: 3190. doi:10.3389/fimmu.2018.03190.
- [39] Becker K, Sander P. *Mycobacterium tuberculosis* lipoproteins in virulence and immunity-fighting with a double-edged sword. *FEBS Lett*, 2016, 590 (21): 3800-3819. doi:10.1002/1873-3468.12273.
- [40] Clemens DL, Lee BY, Horwitz MA. Purification, characterization, and genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* urease, a potentially critical determinant of host-pathogen interaction. *J Bacteriol*, 1995, 177 (19): 5644-5652. doi:10.1128/jb.177.19.5644-5652.1995.
- [41] Vogelzang A, Perdomo C, Zedler U, et al. Central memory CD4⁺ T cells are responsible for the recombinant Bacillus Calmette-Guérin ΔureC::hly vaccine's superior protection against tuberculosis. *J Infect Dis*, 2014, 210 (12): 1928-1937. doi:10.1093/infdis/jiu347.
- [42] Grode L, Ganoza CA, Brohm C, et al. Safety and immunogenicity of the recombinant BCG vaccine VPM1002 in a phase 1 open-label randomized clinical trial. *Vaccine*, 2013, 31 (9): 1340-1348. doi:10.1016/j.vaccine.2012.12.053.
- [43] Loxton AG, Knaul JK, Grode L, et al. Safety and Immunogenicity of the Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG Vaccine VPM1002 in HIV-Unexposed Newborn Infants in South Africa. *Clin Vaccine Immunol*, 2017, 24 (2): e00439-16. doi:10.1128/CVI.00439-16.
- [44] Sun R, Skeiky YA, Izzo A, et al. Novel recombinant BCG expressing perfringolysin O and the over-expression of key immunodominant antigens; pre-clinical characterization, safety and protection against challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine*, 2009, 27 (33): 4412-4423. doi:10.1016/j.vaccine.2009.05.048.
- [45] Hoft DF, Blazevic A, Selimovic A, et al. Safety and Immunogenicity of the Recombinant BCG Vaccine AERAS-422 in Healthy BCG-naïve Adults: A Randomized, Active-controlled, First-in-human Phase 1 Trial. *EBioMedicine*, 2016, 7: 278-286. doi:10.1016/j.ebiom.2016.04.010.
- [46] 赵爱华,徐苗,王国治. 新一代抗结核分枝杆菌疫苗将会建立在现用卡介苗的基础上吗? *微生物与感染*, 2017, 12 (4): 206-210. doi:10.3969/j.issn.1673-6184.2017.04.004.
- [47] 卢锦标,赵爱华,王国治,等. 对我国结核病免疫预防策略的探讨. *中国防痨杂志*, 2014, 36 (11): 927-929. doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2014.11.001.
- [48] 卢锦标,赵爱华,王国治,等. 结核病新疫苗临床研究进展. *中华结核和呼吸杂志*, 2019, 42 (10): 783-790. doi:10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2019.10.015.
- [49] Lerm M, Netea MG. Trained immunity: a new avenue for tuberculosis vaccine development. *J Intern Med*, 2016, 279 (4): 337-346. doi:10.1111/joim.12449.
- [50] Madan M, Pahuja S, Mohan A, et al. TB infection and BCG vaccination: are we protected from COVID-19? *Public health*, 2020, 185: 91-92. doi:10.1016/j.puhe.2020.05.042.

(收稿日期:2020-03-23)

(本文编辑:孟莉 薛爱华)