

刘红旭,何树梅,张舒林. 海分枝杆菌-斑马鱼模型的抗结核研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(2): 261-265.

Liu HX, He SM, Zang SL. Progress in the anti-tuberculosis research of the zebrafish model of *Mycobacterium marinum*-tuberculosis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(2): 261-265.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.02.021

海分枝杆菌-斑马鱼模型的抗结核研究进展

刘红旭¹,何树梅^{1*},张舒林²

(1. 西藏民族大学基础医学院,陕西咸阳 712082; 2. 上海交通大学免疫学与微生物学系,上海 200001)

【摘要】 斑马鱼(*Danio rerio*, Zebrafish)模型是研究宿主-病原体相互作用的有力平台。因为其光学透明特性,斑马鱼幼虫感染模型有利于探索在活脊椎动物体内实时观察海洋分枝杆菌(*Mycobacterium marinum*, M. marinum)感染的早期阶段的发病机制。此外,斑马鱼幼虫免疫系统提供了探索海洋分枝杆菌与宿主免疫作用机制的条件。还因斑马鱼发育周期短、繁殖产量高、饲养条件低而备受欢迎,而海分枝杆菌因其实验环境要求低,基因相似性与结核分枝杆菌高而作为研究结核的备选细菌。因此,斑马鱼-海分枝杆菌感染模型的使用成为揭示结核病发病机制并研发药物的有效途径之一。

【关键词】 海分枝杆菌;斑马鱼;抗结核

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 02-0261-05

Progress in the anti-tuberculosis research of the zebrafish model of
Mycobacterium marinum-tuberculosis

LIU Hongxu¹, HE Shumei^{1*}, ZHANG Shulin²

(1. School of Basic Medicine, Xizang Minzu University, Xianyang 712082, China.
2. Department of Immunology and Microbiology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200001)

Corresponding author: HE Shumei. E-mail: 573447802@qq.com

【Abstract】 Zebrafish (*Danio rerio*) is a powerful model animal for studies on host-pathogen interactions. Because of its optical transparency, the zebrafish larval infection model facilitates exploring the pathogenesis of *Mycobacterium* infection *in vivo* in real time. In addition, the immune system of zebrafish larvae provides the conditions to explore the mechanisms of immune interactions between *Mycobacterium marinum* and the host. It is also popular because of its short development cycle, high reproductive yield, and low feeding conditions. *Mycobacterium marinum* is an alternative bacterium for tuberculosis research, because of its simple environmental requirements and high genetic similarity with *Mycobacterium tuberculosis*. Therefore, the zebrafish-*Mycobacterium marinum* infection model has become one of the most effective research tools to reveal the pathogenesis of tuberculosis and develop drugs.

【Keywords】 *Mycobacterium marinum*; zebrafish; tuberculosis

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

结核病(tuberculosis, TB)由结核分枝杆菌引起,是一种慢性传染病,主要侵犯肺,感染初期可无

症状,故可能延误诊治和加速传染,后逐渐发展为咳嗽、午后低热、夜间盗汗等。肺结核是世界十大

[基金项目] 西藏自治区科技厅自然科学基金项目(12KJZRYMY04);西藏民族大学重大培育项目(12myZP04)。

Funded by Natural Science Foundation Project of the Science and Technology Department of Xizang Autonomous Region(12KJZRYMY04) and Major Training Projects of Xizang Minzu University(12myZP04)

[作者简介] 刘红旭(1993—),男,硕士,主要从事高原病及心脑血管疾病研究。Email: 411918116@qq.com

[通信作者] 何树梅,女,硕士,副教授,硕士研究生导师,主要从事机体免疫研究。Email: 573447802@qq.com

死因之一。我国是世界上第二大因肺结核死亡的国家,且西藏地区在过去十年间上升最多。目前抗结核的一线和二线药物如异烟肼(isoniazid, INH)、左氧氟沙星(levofloxacin, Lfx)仍是主要抗结核药物,但存在这治疗周期长、药物毒性大的缺点。而新研发的抗结核药物如利奈唑胺、贝达奎林(bedaquiline)、delamanid 和 PA-824 仍然在试验阶段。而斑马鱼作为一种具有通体透明、小而易繁殖、与哺乳动物基因相似度高等优点的模型动物,对于抗结核药物的研发具有重要作用。

1 海分枝杆菌生物学特征

1.1 与结核分枝杆菌相似性

它是鱼类和两栖类的病原菌,其基因相似度与结核分枝杆菌高达 95%^[1],最适生长温度在 30~32℃,可在 BSL-2 级实验室展开研究,而不像传统的结核分枝杆菌需要 BSL-3^[2]。其与结核分枝杆菌都有着相似的致病机理,如都形成肉芽肿。海分枝杆菌感染斑马鱼,表现为感染早期细菌数目的急剧增多及干酪样肉芽肿的形成,且巨噬细胞吞噬海分枝杆菌的方式及运输传播途径相同于结核分枝杆菌^[3]。

1.2 海分枝杆菌在体内的传播机制

首先,斑马鱼对海分枝杆菌非常敏感,且形成的结核性肉芽肿坏死似乎至少部分地由宿主因素决定。其次,巨噬细胞能迅速抑制分枝杆菌的生长,但同时为分枝杆菌的传播提供了保护伞。Clay 等^[4]在小鼠中研究发现,在诱导适应性免疫之前,分枝杆菌在巨噬细胞中的生长不会受到抑制。所以使用该模型,结果巨噬细胞的缺乏迅速导致较高的细菌负担,这表明巨噬细胞控制早期感染。实验结果表明巨噬细胞在分枝杆菌的组织播散中起着关键的作用,作者提出,在巨噬细胞内的驻留代表了致病性分枝杆菌在进化上的权衡,巨噬细胞减缓了它们的早期生长,但提供了组织传播的机制。

同时,结核杆菌在组织中的传播方式借此模型也有新的阐述。Davis 等^[5]在模型中直接观察到了紧密编织的肉芽肿样聚集体以及从远处募集到肉芽肿中的未受感染的巨噬细胞的动态特性。从而揭示了巨噬细胞介导的细菌传播的两个新机制:通过细胞间系索巨噬细胞之间直接转移,以及组织中与死亡巨噬细胞相关的细菌的再吞噬作用。还发现即使斑马鱼在它的胚胎期缺乏适应性免疫要素

的特性下,在感染的胚胎中仍然形成肉芽肿样聚集体,且在胸腺发育不全的斑马鱼中也有巨噬细胞聚集,进一步支持了肉芽肿样聚集体的形成和巨噬细胞向上皮样细胞分化独立于 T 淋巴细胞的观点。分枝杆菌在肉芽肿之间的传播方式可能更为复杂。Fenaroli 等^[6]用共聚焦显微镜观察荧光 NPs(纳米颗粒)可以以小聚集体聚集于肉芽肿附近的内皮管腔侧,EM 分析表明 NPs 通过细胞旁途径穿过内皮细胞,斑马鱼幼虫的血管内皮细胞相邻的肉芽肿允许不同的 NP 颗粒进入感染灶。研究表明,NP 让被感染所在而吸引的巨噬细胞所摄取是 NP 到达结核肉芽肿的一个途径,同时,利用此特点,可以针对性的研发靶向肉芽肿的药物。

在分枝杆菌传播途径上, Van 等^[7]研究结核性脑膜炎发现,在成年斑马鱼中,显示腹腔感染可导致脑膜肉芽肿的形成,数量占据样本量的 20%,偶尔伴有脑实质侵犯。在斑马鱼胚胎和幼虫实验中,都表现出脑组织的浸润。经验证,当用海分枝杆菌 ESX-1 突变株感染胚胎时,脑组织中仅存在小簇和散在分离的具有高细菌负荷的吞噬细胞。表明分枝杆菌通过血流传播导致脑组织中早期肉芽肿的形成。

总之,分枝杆菌在宿主内的传播更多的取决于宿主及其免疫系统,但肉芽肿斑马鱼模型也有其缺点,Swaim 等^[8]就发现肉芽肿多见于斑马鱼肠系膜、胰腺、性腺、肾和肝,但很少见于头部、鳃弓和脾,而从未见于肌肉或皮肤,与人类和一些非人类模型相比,高剂量时会快速压垮斑马鱼免疫系统,斑马鱼似乎不能清除致病性分枝杆菌感染,即使在低感染剂量下也是如此。但是 Hammarén 等^[9]通过实验发现,10%的个体在激活适应性反应(>2wpi)后能够清除感染。此种结果出现的原因可能是由于不同斑马鱼具有的不同遗传特性,因为实验环境和感染细菌数量的差异化理论上区别很小。

2 模型研究的可行性

Ramakrishnan^[10]认为,利用斑马鱼的光学透明度以及遗传和药理学的可跟踪性,实时监测感染。斑马鱼能够展示分枝杆菌和宿主之间天生相互作用的所有步骤。侯曼美等^[11]利用海分枝杆菌-斑马鱼模型得出其相互作用过程为:海分枝杆菌感染组织、巨噬细胞吞噬海分枝杆菌、巨噬细胞进入组织深部并聚集为肉芽肿、海分枝杆菌在巨噬细胞间传

播。因此,利用此模型或许可从中寻找出结核病发病机制或机体与病原相互免疫机制,为进一步开发治疗药物或疫苗提供理论基础。

3 分枝杆菌模型的建立及指标观测

彭世泽^[12]利用斑马鱼卵黄囊微注射技术,建立感染模型,对海分枝杆菌致死剂量做了研究,先后对毒菌和灭活菌感染的斑马鱼进行了生存性观察。并用异烟肼与利福平等进行了药效评价,结果表明药物治疗可明显降低结核感染的鱼卵的死亡率,呈现较好的量效关系。该实验简单有效地验证了传统抗结核药的有效性,同时佐证了斑马鱼作为抗结核模型的科学性。

RD1-RD16 区是结核分枝杆菌与卡介苗的基因之间的差别区,与结核分枝杆菌的毒力有重要的联系。Swaim 等^[8]建立了一个用于大规模纵向研究成年斑马鱼—海分枝杆菌诱导的结核病的流动鱼设施,并用 RD1 突变株作为对照组,通过腹腔感染斑马鱼获得接种模型,观测斑马鱼各个脏器的 CFU 聚集和肉芽肿形成、伊红染色和抗酸染色的病理切片、生存能力的评价,显示出良好的试验预期结果。该突变株感染模型的建立可作为筛选抗结核病药物的理想模型。ERP 基因也是结核分枝杆菌重要的毒力因子,也存在于卡介苗中。Clay 等^[4]通过后脑室或尾静脉感染 *Erp* 基因缺陷突变株,结合 *fli1*:EGFP 转基因斑马鱼胚胎,通过激光共聚焦和实时荧光 PCR 定量分析,对肉芽肿聚集时间、部位及数量进行了细微的观察,着重对巨噬细胞与斑马鱼免疫系统相互作用进行了研究。此种方法有利于细菌耐药性机制的探索和疫苗候选分子的选择。

由于斑马鱼体积小、胚胎透明的特点,尤其适用于同时大量的荧光通路分析。Takaki 等^[13]开发了一个使用海分枝杆菌—斑马鱼幼虫模型和基于荧光的快速体内药物筛选的方法。通过尾静脉注射感染 36 小时后的斑马鱼幼虫,再被置于 96 孔板。通过 APF(自动板荧光法)测量感染负荷的实验。实验在 96 孔饲养,并于低温麻醉后在荧光显微镜下自动成像,这种方法允许快速、连续和高通量的数据收集,并以幼虫感染的细菌负荷(以相对荧光强度 RFU 为观察指标)作为评判指标。

用哪种发育阶段斑马鱼、多少菌量接种来建立模型,胚胎幼虫或成年斑马鱼在上述研究中都有用到。而 Sridevi 等^[14]发现,腹腔内接种 0.75 万细菌/

鱼的模型是最优化模型。所有抗结核药物在该模型中均表现出有效性。用于评估感染和抗菌反应的参数是:(a)细菌计数;(b)体重变化;(c)生存能力,实验建议使用成年斑马鱼模型应优先于幼鱼模型,因为成年斑马鱼具有药物代谢所需的最佳发育器官^[14-15],可溶性差的药物可能沉淀,并在幼体试验中不会吸收,因此不能在幼体斑马鱼中进行试验。使用口服给药方式,药物的剂量可按 mg/kg 确定。

4 分枝杆菌感染与宿主免疫应答

了解分支抗菌与机体免疫系统的作用机制对于开发疫苗和免疫疗法是必要的。在先天性免疫应答(innate immune response)研究中,Ojanen 等^[16]通过腹腔感染成年 *furinA*^{td204e/+} 变异斑马鱼, qRT-PCR 促炎和抗炎生长因子基因发现, *Furin* 减弱了先天性免疫细胞中的促炎反应,后经实验—活化的巨噬细胞 *furin* mRNA 水平降低跟促炎因子 TNF 转录上调相关得以证明。而 *furinA*^{td204e/+} 突变株中增强的天然免疫应答与海分枝杆菌感染模型中显著降低的细菌负担相关。数据表明,上调的 *furinA* 表达可以作为分枝杆菌疾病的标志物,因为它抑制了早期宿主反应,从而促进了慢性感染中的细菌生长。而 *furinA*/*FURIN* 可在巨噬细胞应答脂多糖(LPS)时会分泌且可在血浆中检测到。

在适应性免疫应答(adaptive immune response)研究中,Harjula 等^[17]发现 Th1 反应在抗结核感染中占有重要的地位,他们用 IL10^{e46/e46} 突变株(*il10* 抑制 Th1 激活巨噬细胞)斑马鱼感染海分枝杆菌后,发现斑马鱼的生存率提高了, Th1/Th2 比值升高,降低了促炎因子 *tnfb* 和 *il1b* 表达, IL10 限制 *ifn g1* (CD 4⁺ T 细胞分泌)应答来削弱免疫防御。但 IL10 缺乏并不能提高感染后早期促炎反应,因为 IL10^{e46/e46} 突变株和野生型感染的早期阶段中,促炎细胞因子(proinflammatory cytokine)基因 *tnfa*, *il1b* 和 *tnfb* 表达并没有差异。这突出了 Th1 反应在抗感染中的重要性。

Swaim 等^[8]发现 *rag1* 突变斑马鱼(这种斑马鱼不能使 T、B 细胞发育,可以验证适应性免疫有无参与)对海分枝杆菌感染非常敏感,表明控制鱼结核病依赖于适应性免疫。类似的实验中, Luukinen 等^[18]也用 *rag*^{-/-} 突变斑马鱼,与对照组野生型斑马鱼相比,突变体鱼不能充分限制分枝杆菌的生长,

会导致更高的细菌负荷,增加发病率。与 $\text{rag}^{-/-}$ 突变体鱼相比,野生型鱼中 IL4 的表达水平显著升高,而 IL4 是细胞外适应性免疫应答的介质。这充分说明分枝杆菌感染后的免疫应答中,适应性免疫占有重要的地位。

也有研究表明两种免疫机制都参与了免疫应答。Venkatasubramania 等^[19]发现,记忆样 NK 细胞(被认为传统的先天性免疫细胞)在小鼠模型中有助于保护被结核分枝杆菌感染的小鼠,并且记忆样 NK 细胞的来源依赖于 IL-21(CD4 T 细胞所分泌)。其团队在随后的研究中^[20]也发现活化的 T 细胞增强 NK 细胞对 M.tb 感染的人单核细胞的裂解反应,并通过产生 IL-21 来限制单核细胞内的 M.tb 生长。

综上所述,分枝杆菌感染后的斑马鱼病理发展过程中,宿主先天性免疫和后天性免疫共同参与了病理发展,至于哪种对疾病的控制和杀灭更高效还待解决。有趣的是,豹蛙和感染的青蛙不会发展坏死肉芽肿,即使接种率高。

5 分枝杆菌疾病与治疗监测药物的发展

在预防性抗结核药物研发中,Myllmäki 等^[21]发现,Ag85B-ESAT-6 联合用药可以改善地塞米松激活潜伏性感染斑马鱼,使细菌平均负担减少 85%。重要的是,两种被测试的新型分枝杆菌抗原,即 RpfB 和 MMAR_4207,显著降低了地塞米松处理的鱼的细菌负荷。它们的保护效果可与卡介苗接种感染斑马鱼的效果相媲美。

监测性药物中,Hammarén 等^[9]认为分析来自外周血单核细胞的 Th1/Th2 比值可以提供潜在结核分枝杆菌感染携带者之间疾病活性的相关性,因此 Th1/Th2 比值在评估潜伏感染的再激活风险方面可能有预测价值。Th1/Th2 比值作为人体生物标志物的潜力值得进一步研究。特征性的 GATA3/TBX21 也具有作为分枝杆菌病状态的生物标志物的潜力。Markus 等^[15]研究的可在血浆中检测到的 furinA/FURIN 也可以用作结核分枝杆菌感染的标志物分子。

治疗性药物中,Luukinen 等^[22]随后的研究发现,在感染海分枝杆菌前一天,通过热杀灭单核球增多性李斯特菌(HKLM)启动成年斑马鱼,可显著降低感染斑马鱼的分枝杆菌载量,且证明 HKLM 启动所赋予的保护性免疫仅通过先天免疫即可诱导,为开发针对结核病的宿主导向治疗或预防策略提

供了新方向。Fenaroli 等^[6]试验所得到的结果所示,NPs(纳米颗粒)在斑马鱼体内发生了高通透性和滞留(EPR)效应,肉芽肿允许了不同的 NPs 颗粒进入感染灶(肉芽肿),因此研究长时循环的 NPs 来治疗该疾病很有前景。

6 展望与结论

利用海分枝杆菌—斑马鱼模型,能够更科学、更有效的研究结核病的免疫病理机制,并在此基础上开发针对性的药物及其疫苗。并且它在药物毒性检测、药物筛选、结核预防药效评价等方面相比于其他动物更有优势。因此适合抗结核药物的研发,尤其用来在中药藏药领域筛选抗结核药大有潜力。众所周知的原因,耐多药结核菌和广泛耐多药菌的出现,一线抗结核药药效乏力,而二线药物周期长、毒性大。相比之下,传统的抗结核中药藏药,因为来源于天然化合物,毒性小、易代谢,其发展大有潜力。但是由于中药藏药成分的复杂性,即使是单味药,其成分也非常复杂,而研究其药理机制、毒性大小、治疗作用就更复杂,但是因为斑马鱼的特性—胚胎透明性、小而廉价且繁殖期短、试验用药量少、试验费用低且实验周期短、高通量、实验环境要求低,可以看作是体外细胞培养和哺乳动物系统之间的通用中间模型。即使如此,该模型也有其不足之处,斑马鱼并不能完全代替哺乳动物实验研究,也就是说斑马鱼身上得到的数据并不能说明一定会发生在哺乳动物身上,且斑马鱼自身并不能很好的清除感染细菌。而海分枝杆菌—斑马鱼感染模型仍然是一种连接体外—体内实验的高效中介。例如,我们可以首先提取药物成分初步在体外进行细胞实验,找出对结核分支杆菌杀灭有效地成分,然后再经斑马鱼实验而进一步观察抗结核效果,再进一步在更大型哺乳动物(如小鼠)身上进行实验,这样更有的放矢,不会盲目的耗费人力物力。总之,以海分枝杆菌—斑马鱼为模型而进行抗结核研究和药物研发,事半功倍,终将成为抗结核研究的重要体内模型。

参 考 文 献(References)

- [1] 龙航,陈世玖,徐佳丽,等.海分枝杆菌的研究进展[J].中国医学创新,2017,14(25):145-148.
Long H, Chen SJ, Xu JL, et al. Research progress of *Mycobacterium marinum* [J]. Med Innov Chin, 2017, 14(25): 145-148.
- [2] Lesley R, Ramakrishnan L. Insights into early mycobacterial

- pathogenesis from the zebrafish [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2008, 11(3):277-283.
- [3] 田丽莉,朱国福.斑马鱼在中药研究中的应用[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(5):822-827.
- Tian LL, Zhu GF. Application of zebrafish in the study of traditional Chinese medicine [J]. *China J Chin Mater Med*, 2015, 40(5): 822-827.
- [4] Clay H, Davis JM, Beery D, et al. Dichotomous role of the macrophage in early *Mycobacterium marinum* infection of the zebrafish [J]. *Cell Host Microbe*, 2007, 2(1):29-39.
- [5] Davis JM, Clay H, Lewis JL, et al. Real-time visualization of mycobacterium-macrophage interactions leading to initiation of granuloma formation in zebrafish embryos [J]. *Immunity*, 2002, 17(6):693-702.
- [6] Fenaroli F, Repnik U, Xu Y, et al. Enhanced permeability and retention-like extravasation of nanoparticles from the vasculature into tuberculosis granulomas in zebrafish and mouse models [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(8):8646-8661.
- [7] van Leeuwen LM, van der Kuip M, Youssef SA, et al. Modeling tuberculous meningitis in zebrafish using *Mycobacterium marinum* [J]. *Dis Model Mech*, 2014, 7(9):1111-1122.
- [8] Swaim LE, Connolly LE, Volkman HE, et al. *Mycobacterium marinum* infection of adult zebrafish causes caseating granulomatous tuberculosis and is moderated by adaptive immunity [J]. *Infect Immun*, 2006, 74(11):6108-6117.
- [9] Hammarén MM, Oksanen KE, Nisula HM, et al. Adequate Th2-type response associates with restricted bacterial growth in latent mycobacterial infection of zebrafish [J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(6):e1004190.
- [10] Ramakrishnan L. The zebrafish guide to tuberculosis immunity and treatment [J]. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, 2013, 78:179-192.
- [11] 侯曼美,谢建平.斑马鱼-海分枝杆菌模型研究对结核病致病机理的启示[J]. *微生物学报*, 2010, 50(1):15-22.
- Hou MM, Xie JP. Insight into tuberculosis pathogenic mechanism from the zebrafish-*Mycobacterium marinum* model [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2010, 50(1): 15-22.
- [12] 彭世泽. 海分枝杆菌感染斑马鱼模型在抗结核药物研发中的研究[A]. 中国微生物学会微生物资源专业委员会.第四届全国微生物资源学术暨国家微生物资源平台运行服务研讨会论文集[C].2012:6.
- Peng SZ. Research on zebrafish model infected by *Mycobacterium marinum* in the development of antituberculosis drugs [A]. Professional Committee on Microbial Resources of Chinese Society of Microbiology. Papers of the 4th National Symposium on Microbial Resources Academy and Operational Services of National Microbial Resources Platform [C], 2012:6.
- [13] Takaki, K, Cosma CL, Troll MA, et al. An in vivo platform for rapid high-throughput antitubercular drug discovery [J]. *Cell Rep*, 2012, 2(1):175-184.
- [14] Sridevi JP, Anantaramu HS, Kulkarni P, et al. Optimization and validation of *Mycobacterium marinum*-induced adult zebrafish model for evaluation of oral anti-tuberculosis drugs [J]. *Int J Mycobacteriol*, 2014, 3(4): 259-267.
- [15] Alderton W, Berghmans S, Butler P, et al. Accumulation and metabolism of drugs and CYP probe substrates in zebrafish larvae [J]. *Xenobiotica*, 2010, 40(8):547-557.
- [16] Ojanen MJ, Turpeinen H, Cordova ZM, et al. The proprotein convertase subtilisin/kexin furinA regulates zebrafish host response against *Mycobacterium marinum* [J]. *Infect Immun*, 2015, 83(4): 1431-1442.
- [17] Harjula SE, Ojanen MJT, Taavitsainen S, et al. Interleukin 10 mutant zebrafish have an enhanced interferon gamma response and improved survival against a *Mycobacterium marinum* infection [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):10360.
- [18] Luukinen H, Hammarén MM, Vanha-Aho LM, et al. Modeling tuberculosis in *Mycobacterium marinum* infected adult zebrafish [J]. *J Vis Exp*, 2018, (140): e58299.
- [19] Venkatasubramanian S, Cheekatla S, Paidipally P, et al. IL-21-dependent expansion of memory-like NK cells enhances protective immune responses against *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Mucosal Immunol*, 2017, 10:1031-1042.
- [20] Paidipally P, Tripathi D, Van A, et al. Interleukin-21 regulates natural killer cell responses during *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. *J Infect Dis*, 2018, 217(8):1323-1333.
- [21] Myllymäki H, Niskanen M, Luukinen H, et al. Identification of protective postexposure mycobacterial vaccine antigens using an immunosuppression-based reactivation model in the zebrafish [J]. *Dis Model Mech*, 2018, 11(3).pii:dmm033175.
- [22] Luukinen H, Hammarén MM, Vanha-Aho LM, et al. Priming of innate antimycobacterial immunity by heat-killed *Listeria monocytogenes* induces sterilizing response in the adult zebrafish tuberculosis model [J]. *Dis Model Mech*, 2018, 11(1). pii:dmm031658.

[收稿日期] 2018-12-06