文章编号:1000-5404(2006)11-1195-03

论著

结核菌H37Ra免疫小鼠后机体抗结核细胞免疫功能的研究

陶 昆,卢贤瑜,陈思静,夏长胜 (重庆医科大学临床免疫学教研室,临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室,重庆 400016)

提 要:目的 探讨小鼠皮内接种H37Ra后,细菌在体内的定植及机体能否产生针对结核菌的免疫力。**方法** 用H37Ra皮内免疫小鼠后15、30、60 d,检测结核菌在小鼠体内脏器的定植;免疫后第30、60天,MTT法检测小鼠脾淋巴细胞受PPD刺激后的增殖转化刺激指数、ELISA法检测小鼠脾淋巴细胞受PPD刺激后IL-2、sIL-2R的表达量。**结果** 小鼠脾、肺脏中有结核菌定植,并至少存活60 d;脾淋巴细胞30、60 d的刺激指数分别为(2.81±0.63)、(2.16±0.52),与BCG皮内接种组无显著性差异,与未免疫组有显著性差异($P<0.05$);脾淋巴细胞IL-2、sIL-2R表达量分别为(126.88±8.11)、(91.26±7.29)pg/ml和(138.58±7.67)、(127.09±5.47)pg/ml,与BCG皮内接种组、未免疫组比较均有显著性差异($P<0.05$)。**结论** H37Ra免疫小鼠后能诱导机体产生特异性的抗结核免疫力,且免疫效果略优于BCG。

关键词: H37Ra;定植;细胞免疫
中图法分类号: R378.911; R392.12; R392.7 **文献标识码:** A

Study of cellular immunity on anti-mycobacterium tuberculosis after immunization of H37Ra in mice

TAO Kun, LU Xian-yu, CHEN Si-jing, XIA Chang-sheng (Department of Clinical Immunology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To study the location of mycobacterium tuberculosis (MTB) and whether the cellular immunity is induced after immunization of H37Ra in mice. Methods Totally 72 BALB/C mice were included. Thirty mice were intracutaneously injected of 0.1 ml H37Ra solution (about 10^6 bacteria) at caudal region; thirty mice were injected of BCG of same quantity instead; twelve were free from immunization as control. Viable MTB were detected in spleen and lungs on day 15, 30 and 60 after intracutaneous vaccination of H37Ra. The proliferation of T lymphocytes stimulated with purified protein derivative (PPD) was measured by MTT assay and the production of interleukin-2 (IL-2) and soluble interleukin-2 receptor (sIL-2R) in the cultural supernatants of T lymphocytes was also determined by ELISA on day 30 and 60 after intracutaneous vaccination of H37Ra. Results Viable H37Ra or BCG could be located in the spleen and lungs in mice for at least 60 d. After H37Ra immunization, the stimulation index (SI) of T lymphocyte proliferation on day 30 and 60 was (2.81±0.63), (2.16±0.52) respectively, which was of no significant difference with that of BCG immunization, but of significant difference with that of non-immunized mice ($P<0.05$). The production of IL-2 and sIL-2R in the H37Ra immunized mice on day 30 and 60 was (126.88±8.11), (91.26±7.29) and (138.58±7.67), (127.09±5.47) pg/ml respectively, both higher than BCG immunized mice and non-immunized mice ($P<0.05$). Conclusion H37Ra immunization can induce cellular immunity in mice and the immunity of H37Ra is slightly better than BCG.

Key words: H37Ra; location; cellular immunity

近年来随着人口流动的增加,人类免疫缺陷病毒与结核菌伴发感染以及结核杆菌多重耐药菌株的出现,使全球结核病死灰复燃,发病率、死亡率呈不断上升趋势。而传统的卡介苗(bacillus calmette guerin, BCG)疫苗保护效果较不稳定,从0%~80%不等[1],且主要对小儿结核的预防有效,对成人结核病预防效果不理想。原因之一是BCG菌株的变异使其保护性抗原丢失,其次与非典型分支杆菌的感染有关。因此,研发新疫苗控制结核病的传播已成当务之急。H37Ra是人型结核杆菌有毒株H37Rv减毒而来的无毒株,对宿主相对安全,具备活菌疫苗的条件;与BCG相比,H37Ra具有更完整的免疫原性,并可能包含BCG丢失的部分抗原成分[2,3];国外一些研究也表明,H37Ra的

基金项目:重庆市教委科研基金资助项目(2004),重庆医科大学科技创新基金资助项目(CX200204)
Supported by the Scientific Research Funds by Chongqing Municipal Education Committee (2004) and the Research Foundation for Innovation of Chongqing University of Medical Sciences (CX200204)
作者简介:陶 昆(1969-),女,江苏省南京市人,硕士研究生,讲师,主要从事结核免疫及疫苗方面的研究。电话:(023)68485240
收稿日期:2005-11-10;修回日期:2006-01-12

免疫效果优于 BCG。鉴于此，是否可用减毒活疫苗 H37Ra 来替代 BCG 及其他疫苗是值得研究的。本研究主要探讨 H37Ra 免疫小鼠后，结核菌在体内的定植情况及产生抗结核细胞免疫功能的情况，从而了解 H37Ra 能否诱导机体产生特异的抗结核免疫保护作用，为开发 H37Ra 成为新型抗结核疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

BALB/c 雌性小鼠 72 只，6～8 周龄，体质量(18±2)g，购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。

1.2 主要试剂

H37Ra 菌购自北京药品生物制品检定所，编号为 93020；BCG 购自上海生物制品研究所，批号为 2003050401；结核分枝杆菌纯蛋白衍生物 PPD 浓缩品购自成都生物制品研究所，批号为 2001-1，1 600 μg/ml；小鼠 IL-2 ELISA 检测试剂盒、小鼠 sIL-2R ELISA 检测试剂盒为深圳晶美生物工程有限公司和上海森雄科技实业有限公司产品。

1.3 细菌增菌

H37Ra 菌种用 0.5 ml 生理盐水和苏通培养基的混合液(体积比为 1∶3)稀释，BCG 疫苗每支用 0.5 ml 专用稀释液稀释，分别接种于罗氏斜面培养基上培养。18 d 后分别刮取培养基上生长良好的菌落于磨菌器中，加入含 0.05% Tween-20 的生理盐水研磨，稀释成均匀浑浊菌液。镜下计数，调整细菌浓度为 3×10^7/ml。

1.4 实验分组和动物接种

BALB/c 小鼠 72 只，分成 3 组：①H37Ra 皮内接种组(实验组)：取小鼠 30 只，于每只小鼠尾根部皮内注射 H37Ra 菌液 0.1ml(含活菌数约 1×10^6)，使其成皮丘。②BCG 皮内接种组(对照组)：取小鼠 30 只，于每只小鼠尾根部皮内注射 BCG 菌液 0.1ml(含活菌数约 1×10^6)，使其成皮丘。③未免疫组(空白对照组)：12 只，不做任何处理，随实验组一同喂养。

1.5 细菌定植实验

于免疫后第 15、30、60 天，取 H37Ra 及 BCG 免疫小鼠各 6 只，无菌取其脾、肺，用组织研磨器磨成匀浆，苏通培养基补足体积至 2 ml，混匀。分别吸取 0.1 ml 组织悬液接种于罗氏斜面培养基上(每一组织接种 5 支培养基)，置 37 ℃孵箱中培养 18 d后计数菌落数。以 5 支培养基的菌落总和×4 为该组织细菌定植数(CFU)(由于未免疫小鼠脾、肺内不会有结核菌存在，故本细菌定植实验未设未免疫对照组)。

1.6 淋巴细胞转化实验

1.6.1 脾细胞的制备　于免疫后第 30、60 天，取各组小鼠 6 只，无菌条件下取出脾脏，200 目不锈钢筛网将其研磨制成单个细胞悬液，分离出淋巴细胞。无血清 RPMI1640 培养液洗涤细胞 2 次，计数，调整细胞浓度为 2×10^6/ml。台盼蓝拒染法计数活细胞数，活细胞率大于 97% 可用。

1.6.2 PPD 最适刺激浓度的选择　于 96 孔培养板内每孔加入免疫后第 30 天的小鼠脾细胞悬液 100 μl(2×10^6/ml)，并分别加入不同浓度 PPD 20 μl，使其终浓度分别为 5、10、15、20 μg/ml(每一剂量重复 3 孔)，再加入含 20% 小牛血清RPMI1640 液 100 μl(并设空白对照 3 孔)，置 37 ℃，5% CO_2 孵箱孵育72 h。在培养结束前 4 h，每孔加入 MTT 10 μl(5 mg/ml)继续培养。结束时将培养板离心 10 min(1 500 r/min)，弃上清，每孔加入 100 μl DMSO(二甲亚砜)振荡，使结晶物充分溶解。于酶标仪上测光密度值 D(570)，计算出淋巴细胞转化刺激指数(stimulation index，SI)。根据 SI 得到 PPD 的最适刺激浓度为 10 μg/ml。

1.6.3 淋巴细胞转化实验　于 96 孔培养板内每孔加入免疫 30、60 d 的小鼠脾细胞悬液 100 μl (2×10^6/ml)，PPD 20 μl (终浓度为 10 μg/ml)或生理盐水 20 μl、含 20% 小牛血清 RPMI1640 培养液 100 μl，置 37 ℃，5% CO_2 孵箱孵育 72 h。在培养结束前 4 h 每孔加入 MTT 10 μl(5 mg/ml)，结束时将培养板离心，弃上清，每孔加入 100 μl DMSO 振荡 10 min，于酶标仪上测 D(570)。根据 D(570)值计算出淋巴细胞转化刺激指数 SI。同一只鼠重复 3 孔。淋巴细胞转化结果以刺激指数 SI 表示：

$$SI=\frac{\text{加 PPD 孔 } D(570)\text{均值}-\text{空白对照孔 } D(570)\text{均值}}{\text{未加 PPD 孔 } D(570)\text{均值}-\text{空白对照孔 } D(570)\text{均值}}$$[4]

1.7 IL-2 活性测定

取免疫后第 30、60 天的小鼠脾淋巴细胞(2×10^6/ml)于培养板内，100 μl/孔，用 PPD 20 μl(终浓度 10 μg/ml)刺激培养(同淋巴细胞转化实验)24 h。收集上清液，-20 ℃冰箱保存备用。取培养上清，按照试剂盒说明书采用 ABC-ELISA 双抗体夹心法测定 IL-2 浓度。

1.8 可溶性 IL-2 受体(sIL-2R)活性测定

上清液收集同 IL-2。取培养上清液，按照试剂盒说明书采用 ABC-ELISA 双抗体夹心法测定 sIL-2R 浓度。

1.9 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，经方差分析后，采用配对 t 检验。

2 结果

2.1 H37Ra、BCG 免疫小鼠后结核菌在体内定植

在 H37Ra、BCG 免疫后 15 d，2 组小鼠脾、肺内均有结核菌定植，H37Ra 在脾脏定植的菌数显著多于在肺脏的菌数($P<0.05$)，也显著多于 BCG 在脾脏的菌数；免疫后 30 d，两组小鼠脾、肺内结核菌数均随时间延长持续升高；免疫 60 d 后有所下降，但 H37Ra 和 BCG 在脾内定植的结核菌仍较肺内高($P<0.05$)，见表 1。

表 1 H37Ra、BCG 免疫小鼠后结核菌定植情况(Log_{10}CFU)

时间(t/d)	H37Ra		BCG	
	脾	肺	脾	肺
15	2.13±0.05[ab]	1.84±0.23	1.67±0.16	1.62±0.14
30	2.58±0.32	2.33±0.39	2.29±0.07	2.06±0.03
60	2.19±0.09[a]	1.92±0.09	2.07±0.07[a]	1.81±0.17

a：$P<0.05$，与肺内定植结核菌数比较；b：$P<0.05$，与 BCG 脾内定植数比较

2.2 H37Ra、BCG 免疫小鼠后 PPD 刺激淋巴细胞增殖转化

H37Ra 和 BCG 免疫小鼠后第 30、60 天，脾淋巴细胞受 PPD 刺激的 SI 分别为(2.81±0.63)、(2.16±0.52)和(2.23±0.20)、(2.02±0.38)与未免疫组(1.33±0.17)、(1.47±0.10)比较均有显著性差异($P<0.05$)，但两免疫组间无显著性差异；免疫 30、60 d 后 H37Ra 组和 BCG 对照组的 SI 均随时间延长呈

下降趋势，但无显著性差异。

2.3　H37Ra、BCG 免疫小鼠后淋巴细胞 IL-2 的表达

H37Ra 和 BCG 在免疫小鼠后第 30、60 天，脾淋巴细胞受 PPD 刺激分泌产生的 IL-2 分别为（126.88 ± 8.11）、（91.26 ± 7.29）、（107.15 ± 9.39）、（77.65 ± 4.23）pg/ml，与未免疫组［（18.71 ± 3.11）、（16.56 ± 2.99）pg/ml］比较均有显著性差异（$P<0.01$）；且两免疫组间 IL-2 表达水平也有显著性差异（$P<0.05$）；免疫 30、60 d 后，H37Ra 组、BCG 组 IL-2 表达水平均随时间延长呈下降趋势。

2.4　H37Ra、BCG 免疫小鼠后淋巴细胞 sIL-2R 的表达

H37Ra 和 BCG 在免疫小鼠后第 30、60 天，脾淋巴细胞受 PPD 刺激分泌表达的 sIL-2R 分别为（138.58 ± 7.67）、（127.09 ± 5.47）、（101.94 ± 12.31）、（93.49 ± 16.38）pg/ml，与未免疫组［（16.57 ± 1.59）、（15.39 ± 2.77）pg/ml］比较有显著性差异（$P<0.01$）；且 H37Ra 组 sIL-2R 水平比 BCG 组高（$P<0.05$）；H37Ra 免疫组和 BCG 对照组 sIL-2R 表达水平均随免疫时间延长呈下降趋势。

3　讨论

细菌能否在宿主体内定植，并诱导宿主产生记忆免疫是活疫苗免疫的基本条件，因而 H37Ra 能否在宿主体内定植以及定植时间长短是影响其免疫效果的关键因素。在本研究中，H37Ra 和 BCG 皮内接种后 15 d，小鼠脾、肺内就有结核菌定植，且 H37Ra 在脾脏定植的数量显著多于其肺内数量（$P<0.05$）；在免疫后30 d，脾、肺内结核菌数进一步升高，免疫 60 d 后有所下降，但 H37Ra 和 BCG 在脾内的定植菌数仍较肺内高，具有显著性差异（$P<0.05$）。这与早期 Larson 等[5]的研究结果相符。H37Ra、BCG 在免疫后 1 ~ 2 个月，小鼠脾、肺中均有结核杆菌存在，于是结核菌在体内脏器中定植、繁殖并长期停留呈局限性生长。这一方面有利于 H37Ra 作为长期免疫刺激因子，刺激机体免疫系统（如脾等）产生细胞免疫反应（细胞增生和细胞因子产生），为机体提供长期的免疫保护作用；另一方面由于 H37Ra 无毒株在肺内呈局限性生长，因此并不会给机体造成大的损伤。

由于结核分枝杆菌是典型的胞内寄生菌，清除这种病菌，主要依靠细胞免疫（即 Th1 型免疫应答）。许多学者认为 Th1 型免疫应答在防止结核菌感染中起着重要作用。活化的 Th1 细胞以分泌 IL-2、IFN-γ 为主要特征，主要介导细胞免疫应答，促进细胞毒性 T 细胞的杀伤作用，激活巨噬细胞杀伤胞内病原体[6]。其中，IL-2 是 T 细胞活化的关键因子，为 T 细胞增殖（从 G_0 期进入 S 期）所必需；除此以外，T 细胞从 G_1 期进入 S 期还受到 IL-2 受体（IL-2R）的影响。可溶性 IL-2 受体（sIL-2R）是 T 细胞胞外部分 P55 链脱落、溶解在上清液中所为，其释放量与 T 淋巴细胞激活程度及膜受体表达率有关。sIL-2R 的表达可形成高亲和性的 IL-2 结合位点，并能与较低浓度的 IL-2 反应，从而在抗结核免疫中发挥着重要作用[7]。

H37Ra 免疫小鼠后，机体能否产生特异性抗结核细胞免疫？为此，我们观察了免疫小鼠受 PPD 刺激后的淋巴细胞转化刺激指数、IL-2、sIL-2R 的表达。研究表明，H37Ra 免疫小鼠后第 30、60 天，其脾淋巴细胞刺激指数 SI 与未免疫组比较具有显著性差异（$P<0.05$），与 BCG 对照组无显著性差异；脾淋巴细胞 IL-2、sIL-2R 表达水平与未免疫组、BCG 对照组比较均有显著性差异（$P<0.05$），由此说明，H37Ra 免疫小鼠后能增强机体的特异性抗结核细胞免疫，且免疫效果略优于 BCG。同时，我们也注意到 H37Ra 免疫组、BCG 对照组的 SI、IL-2、sIL-2R 3 项指标水平均随免疫时间延长而下降，显示出免疫效果似乎随接种时间推移而减弱的趋势。作者认为这可能与免疫 60 d 后体内结核菌生长繁殖减少有关，同时也表明一定数量的结核杆菌在小鼠体内生存繁殖是诱导机体产生一定强度特异性免疫力的先决条件，细菌在体内大量繁殖时诱生的细胞免疫反应似最强烈。而当接种的活菌在体内逐渐消失后，由于机体受 H37Ra 免疫刺激后已产生特异性抗结核的致敏 T 细胞，并有记忆存在，一旦致病性结核杆菌进入体内，即可触发抗结核细胞免疫，从而保护机体避免患病。

本研究结果表明，H37Ra 皮内接种小鼠后，细菌可在体内较长时间存在，从而持续刺激机体产生特异性的抗结核免疫保护力，且该作用略优于 BCG。

参考文献：

[1] World Health Organization. Health system: improving performance [R]//World health report 2000. Geneva: World Health Organization, 2000: 152 - 164.

[2] ANDERSEN P, MUNK M E, POLLOCK J M, *et al*. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis[J]. Lancet, 2000, 356(9235): 1099 - 1104.

[3] DHIMAN N, KHULLER G K. Immunoreactivity of peptides generated by limited proteolysis of 71-kDa cell wall protein of Mycobacterium tuberculosis H37Ra using PLG-microparticles[J]. Lett Appl Microbiol, 2000, 30(5): 345 - 350.

[4] 吕世静，陈育民．免疫学检验[M]．北京：人民卫生出版社，2003：187.

[5] LARSON C L, WICHT W C. Infection of mice with Mycobacterium tuberculosis, strain H37Ra[J]. Am Rev Respir Dis, 1964, 90: 742 - 748.

[6] 卢贤瑜，魏　江．小鼠胃内接种 BCG 后细菌的定植及抗结核细胞免疫功能的探讨[J]．中国免疫学杂志，2005，21(4)：304 - 307.

[7] TCHOU-WONG K M, TANABE O, CHI C, *et al*. Activation of NF-kappaB in Mycobacterium tuberculosis-induced interieukin-2 receptor expression in mononuclear phagocytes[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1999, 159(4 Pt 1): 1323 - 1329.

（编辑　龙　亮）