论著

文章编号:1000-5404(2009)22-2262-04

Ipr1重组卡介苗对小鼠结核病的治疗效果

候 艳,陈 全,王瑜伟,严 莎,吕玉春,郭荫广 (重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心,基础医学院免疫学教研室,重庆 400016)

摘 要:目的 评估携带小鼠胞内病原体抗性基因1(intracellular pathogen resistance 1, Ipr1)质粒(pBOGI)的重组卡介苗(BCG)对结核分枝杆菌(Mtb)感染的治疗效果。**方法** BALB/c小鼠30只,随机分为3组:分别滴鼻给予磷酸盐缓冲液(PBS)、BCG和重组BCG,2周后用人型Mtb H_{37}Rv标准株感染所有小鼠;感染后分别用PBS、BCG和重组BCG治疗7次;末次治疗后处死小鼠,检测肺脾荷菌量,肺脾脏器指数,血清IFN-γ、IL-10及TNF-α分泌水平和肺脾组织中Ipr1的表达,同时观察小鼠肺脾组织病理改变情况。**结果** 重组BCG组肺脾荷菌量比PBS组和BCG组显著降低($P<0.01$);重组BCG组肺脾脏器指数比PBS组和BCG组显著降低($P<0.05$);重组BCG组血清IFN-γ分泌水平比PBS组和BCG组显著升高($P<0.01$)。用免疫组化检测到小鼠肺脾组织中有Ipr1表达。PBS组肺组织病理改变以渗出为主,病变广泛;重组BCG组肺部病变最轻,肺泡结构基本正常;BCG组病变范围局限,病变程度界于PBS组与重组BCG组之间;各组间比较脾脏病理改变不明显。**结论** 携带小鼠Ipr1基因的重组BCG对结核分枝杆菌感染有一定的治疗作用。

关键词: 细胞内病原体抗性基因1;结核分枝杆菌;卡介苗
中图法分类号: R392.7;R521.05;R969.4 **文献标识码:** A

Therapeutic effects of murine Ipr1 recombinant BCG vaccine on *Mycobacterium tuberculosis* infection in murine model

HOU Yan, CHEN Quan, WANG Yu-wei, YAN Sha, LU Yu-chun, GUO Yin-guang (Molecular Medicine and Tumor Research Center, Department of Immunology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To evaluate the effects of recombinant BCG vaccine encoding murine Ipr1 on *Mycobacterium tuberculosis infection* in rats. Methods Thirty BALB/c mice were randomized into 3 groups which were intranasally given PBS, BCG and recombinant BCG respectively. Two weeks later, the 3 groups were infected with Mycobacterium tuberculosis and were intranasally treated with PBS, BCG, recombinant BCG for once per 3 d, 7 times totally respectively. The mice were sacrificed after the final treatment. The viable quantity of bacteria in the lungs and the spleens was detected. The weight indexes of the lungs and the spleens were calculated. ELISA was used to detect the levels of IL-10, TNF-α and IFN-γ in the serum. The expression of Ipr1 in lung and spleen tissues was detected by immunohistochemistry. Lungs and spleens were prepared for pathological analysis. Results In the recombinant BCG group, significant reduce was observed in number of colony forming units and weight indexes of lungs and spleens compared with the PBS group and the BCG group in the same murine strain. The level of IFN-γ was significantly increased in the recombinant BCG group compared with the other 2 groups. The expression of Ipr1 in the tissues was found in the recombinant BCG group. The pathological changes in lungs of the recombinant BCG group and the BCG group were localized, while those in the PBS group were extensive. There was no significant changes in the spleen of all groups. Conclusion The recombinant BCG encoding murine Ipr1 has therapeutic effects on murine *Mycobacterium tuberculosis* infection.

Key words: Ipr1; *Mycobacterium tuberculosis*; BCG vaccine

目前,结核病仍是严重威胁人类健康的疾病。结核分枝杆菌的感染者约占全球总人口的1/3,死亡数居单一传染病之首[1]。结核病防治工作的难题是大量潜伏感染的存在、多耐药菌株的流行[2]、化疗疗程

作者简介:候 艳,女,山西省晋城市人,硕士研究生,医师,主要从事抗感染免疫和基因工程与疫苗方面的研究。E-mail:bugs1903@sohu.com
通信作者:陈 全,E-mail:quanchen@tom.com
收稿日期:2009-06-19;修回日期:2009-07-20

长、防治效果不确定与复发,因此疫苗的研制工作日益得到重视,治疗性疫苗已成为抗结核研究领域的前沿和亮点。传统的 BCG 免疫作用不稳定以及对成人的保护效果受到质疑,因此寻找一种比 BCG 免疫保护作用更好的疫苗势在必行。Pan 等[3]在小鼠巨噬细胞内发现了一个介导巨噬细胞抗胞内病原体的基因——胞内病原体抗性基因 1(Ipr1),在转基因动物水平及体外细胞水平观察到该基因的表达可以增强巨噬细胞抗结核分枝杆菌的能力。本研究前期已经将绿色荧光蛋白 GFP 基因、分枝杆菌复制子 Orim 和 Ipr1 基因同时克隆入双启动子真核共表达载体 pBudCE4.1 质粒中,构建了 pBOGI 穿梭质粒。本研究以 pBOGI 电转化入 BCG,获得重组 BCG 疫苗,探讨 Ipr1 基因重组 BCG 在小鼠结核病模型中的治疗效果。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　动物　　雌性 SPF 级 BALB/c 小鼠 30 只,6 ~ 8 周龄,体质量 22 ~ 25 g,由华中科技大学同济医学院提供。

1.1.2　结核分枝杆菌的准备　　结核分枝杆菌 $H_{37}Rv$ 由重庆市肺科医院赠送。挑取改良罗-琴氏培养基上生长 4 周已恢复毒力的 Mtb $H_{37}Rv$,加 0.5 ml/L Tween80 生理盐水磨菌制成悬液,自然沉淀后,去除沉淀,再磨菌,重复 5 次,-20 ℃保留悬液。取 10 μl 悬液于改良罗-琴氏培养基,培养后菌落计数,按要求稀释保留悬液为 5×10^5 CFU/50 μl 备用。

1.1.3　质粒及菌株　　多启动子真核共表达载体 pBudCE4.1 购自美国 Invitrogen 公司;携带小鼠 Ipr1 基因的质粒 pBGOI 由本实验室前期构建,其生物学活性已在细胞内证明[4];BCG(丹麦株)由本实验室保存。

1.1.4　主要试剂　　羊抗鼠 HIS 抗体购自 KPL 公司,免疫组化试剂盒购自武汉博士德生物技术有限公司,IFN-γ、IL-10 和 TNF-α 细胞因子 ELISA 检测试剂盒购自晶美生物公司,质粒小量抽提试剂盒购自日本 TaKaRa 公司,RPMI1640 培养基干粉购自美国 Gibco 公司和胎牛血清购自杭州四季青公司。

1.2　方法

1.2.1　重组 BCG 的构建[5,6]和 BCG 菌株的制备　　将对数生长期的 BCG 菌株以预冷的 100 ml/L 甘油在 4 ℃低温洗涤 3 次。取 180 μl 预冷的感受态 BCG 细菌加入 20 μl 纯化的 pBGOI 质粒,冰浴 10 min 转入预冷的 2 mm 电转杯中,2 500 V 电击 1 次,迅速加入 0.5 ml Middlebrook 7H9 培养基,轻柔混匀,将菌液转移至 1 ml 预冷的干净 EP 管,37 ℃孵育过夜。将上述菌液涂布到含 Zeocin 40 mg/L 的 Middlebrook 7H10 固体培养基上,37 ℃孵育 2 ~ 3 周后挑取阳性菌落接种于含 Zeocin 40 mg/L 的 Middlebrook 7H9 液体培养基中,37 ℃孵育 2 ~ 3 周,增菌后取 1 ml 菌液,离心弃上清,沉淀加入 0.5 ml 三蒸水,100 ℃热裂解 8 min,取上清 2 μl 为模板,分别作 Ipr1、GFP 和 Orim 的 PCR 扩增。同时将鉴定的重组菌传代 5 代后再次以 PCR 法进行鉴定,以观察重组质粒的稳定性。将 BCG 和重组 BCG 分别接种在液体苏通培养基培养 2 周,0.5 ml/L Tween80 生理盐水洗涤自然沉淀 3 次,每次 10 min,取上清,弃沉淀,-20 ℃保留悬液。取 10 μl 悬液涂于苏通固体培养基,培养后菌落计数,按要求稀释为 5×10^5 CFU/50 μl 备用。

1.2.2　动物分组及治疗　　参照 Wang 等[7]用 2×10^4 CFU/50 μl 结核分枝杆菌 $H_{37}Rv$ 滴鼻感染小鼠的剂量,用 5×10^5 CFU/50 μl 滴鼻感染建立小鼠结核病模型。实验动物随机分为 3 组:PBS 组、BCG 组、重组 BCG 组($n = 10$)。每只小鼠用乙醚麻醉 10 s,再用滴鼻的方法分别给予 50 μl PBS,5×10^5 CFU/50 μl BCG,5×10^5 CFU/50 μl 重组 BCG,1 次/3 d,共 6 次。各组动物分笼饲养,自由取食饮水。各组动物处理 2 周后,用已恢复毒力的人型 Mtb $H_{37}Rv$ 标准株 50 μl 滴鼻感染小鼠,建立结核分枝杆菌感染模型。感染 $H_{37}R_V$ Mtb 后开始治疗,1 次/3 d,治疗时用乙醚麻醉小鼠 10 s,再用移液器取 50 μl 菌液滴鼻治疗,共 7 次。第 7 次治疗后一次性处死小鼠,分别无菌取器官、血清备用。

1.2.3　肺、脾荷菌量的检测　　无菌条件下取小鼠左肺及部分脾组织,准确称量,研磨(40 ml/L H_2SO_4 + 灭菌生理盐水各 1 ml),倍比稀释后接种于改良罗氏培养基平板,37 ℃培养 4 周后菌落计数。

1.2.4　脏器指数(WI)　　准确称取小鼠体质量及肺、脾各脏器质量,按 WI = 100 × 脏器质量(mg)/小鼠体质量(mg) 计算肺、脾各脏器指数。

1.2.5　病理学检查　　取小鼠右下肺和部分脾组织用 40 g/L 多聚甲醛固定,石蜡包埋切片,苏木精-伊红(HE)染色后观察。

1.2.6　重组 BCG 中 Ipr1 的表达　　取部分右肺和脾组织用 40 g/L 多聚甲醛固定,石蜡包埋切片,作免疫组化检测肺组织中 Ipr1 的表达,免疫组化操作按试剂盒说明进行。

1.2.7　小鼠血清 IFN-γ、IL-10 和 TNF-α 的检测　　摘除小鼠眼球取血,分离血清,定量 ELISA 法检测 IFN-γ、IL-10 和 TNF-α 水平,按试剂盒说明进行。

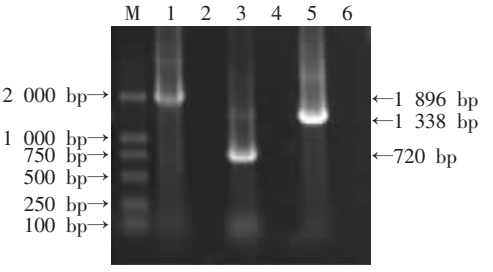
1.3　统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件,样本均数的两两比较采用 t 检验(方差齐同)及 t' 检验(方差不齐)。

2　结果

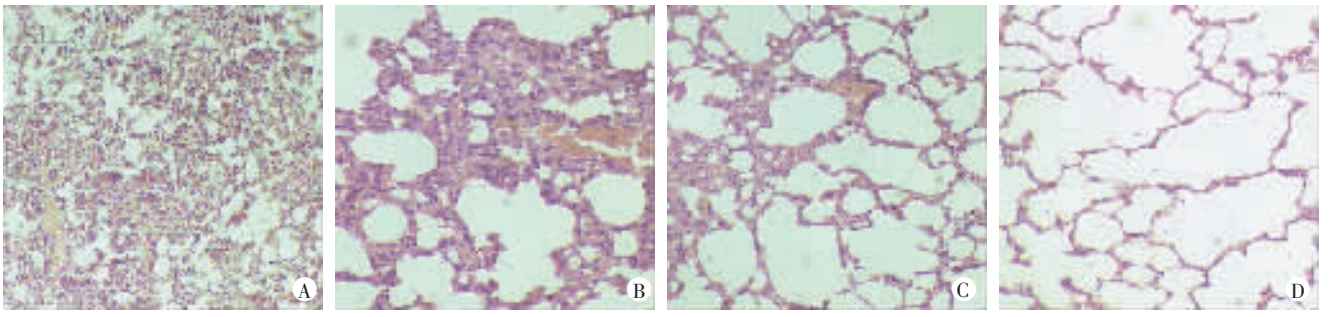
2.1　重组 BCG 的构建及鉴定

将获得的携带质粒 pBGOI 的重组 BCG 划线传代 5 代后作 GFP、Ipr1 和 Orim 的菌落 PCR,扩增得到了预期产物(图 1)。



M: DNA 标准; 1:Orim 的 PCR 扩增片段;2:Orim 的阴性对照;3:GFP的 PCR 扩增片段;4:GFP 的阴性对照;5:Ipr1 的 PCR 扩增片段;6:Ipr1 的阴性对照

图 1　重组 BCG 的菌落 PCR 鉴定



A:PBS 组; B:BCG 组; C:重组 BCG 组; D:正常对照组

图 2 各组小鼠肺组织的病理变化 (HE ×200)

2.2 肺、脾器官荷菌量和小鼠脏器指数

取上述各组小鼠一定量的肺及脾组织制备组织匀浆,倍比稀释后接种改良罗氏培养基,4 周后作菌落计数(表 1)。重组 BCG 组肺、脾器官荷菌显著低于 PBS 组和 BCG 组($P<0.01$);BCG 组和 PBS 组比较差异无显著意义($P>0.05$)。重组 BCG 组肺、脾 WI 显著低于 PBS 组和 BCG 组($P<0.05$,表 2)。

表 1 各组小鼠经治疗后肺、脾组织菌落计数比较 (log CFU/g,$\bar{x}\pm s$)

组别	n	肺组织荷菌量	脾组织荷菌量
PBS 组	5	4.00 ±0.22	3.71 ±0.19
BCG 组	5	3.89 ±0.11	3.62 ±0.14
重组 BCG 组	5	3.17 ±0.19[a]	2.93 ±0.11[a]

a:$P<0.01$,与 PBS 组和 BCG 组比较

表 2 感染小鼠肺、脾脏器指数 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	肺	脾
PBS 组	10	0.62 ±0.10	0.67 ±0.06
BCG 组	10	0.58 ±0.07	0.65 ±0.07
重组 BCG 组	10	0.51 ±0.05[a]	0.59 ±0.05[a]

a:$P<0.05$, 与 PBS 组 和 BCG 组比较

2.3 肺、脾组织病理表现

建模 2 周后小鼠出现寒颤、竖毛、食欲下降及消瘦等表现,处死小鼠,观察到肺、脾组织的病理改变。PBS 组肺组织病变严重、广泛;正常肺泡结构消失,肺泡壁毛细血管扩张充血,伴肺泡间隙水肿,大量淋巴细胞、巨噬细胞浸润,增生性改变不明显。重组 BCG 组小鼠肺部病变最轻,肺泡结构基本正常,渗出少,部分肺泡壁扩张充血。BCG 组病变范围局限,界于 PBS 组与重组 BCG 组之间,病变区域可见大量泡沫细胞、类上皮细胞等细胞(图 2)。脾组织病理改变主要是巨噬细胞增生,病变重的脾组织巨噬细胞增生较多。各组间脾组织病理表现未见特殊改变。

2.4 小鼠血清 IFN-γ、IL-10 和 TNF-α 的测定

重组 BCG 组血清 IFN-γ 的分泌水平比同种小鼠 PBS 组、BCG 组显著升高($P<0.01$);BCG 组和 PBS 组比较差异无显著意义($P>0.05$)。重组 BCG 组与 BCG 组比较 IL-10、TNF-α 的分泌水平差异无显著意义($P>0.05$)。见表 3。

表 3 各组小鼠治疗后血清 IL-10、TNF-α 和 IFN-γ 水平 (pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	IL-10	IFN-γ	TNF-α
PBS 组	10	52.05 ±13.20	32.67 ±5.82	24.93 ±6.31
BCG 组	10	58.80 ±39.85	34.09 ±10.99	39.87 ±8.24
重组 BCG 组	10	49.42 ±25.07	50.20 ±7.34[a]	43.10 ±14.75

a: $P<0.01$,与 PBS 组 和 BCG 组比较

2.5 重组 BCG 的 Ipr1 表达

重组 BCG 治疗后,用免疫组化检测到小鼠肺及脾组织中有褐色的 Ipr1 表达。图 3 中可见褐色的 Ipr1 在小鼠肺泡周围巨噬细胞中高表达。

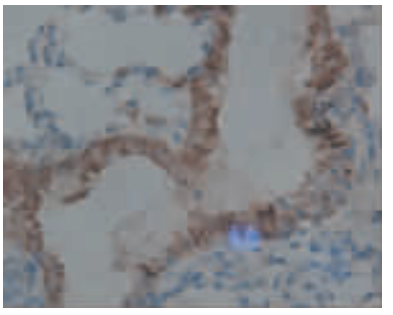


图 3 免疫组化检测 Ipr1 在小鼠肺组织中的表达 (SABC ×400)

3 讨论

结核分枝杆菌(Mtb)是典型的胞内致病菌,主要在巨噬细胞等宿主免疫细胞内存活和繁殖。宿主的免疫素质和免疫状态是决定结核病发生、发展和转归的本质因素[8]。传统观点认为其免疫关键依赖于 T 细胞为主的细胞免疫。研究人员在小鼠身上发现了一种对结核病先天免疫力有调节作用的基因(Ipr1)[3],它在巨噬细胞中的表达可以限制 Mtb 的感染。Ipr1 基因缺陷的小鼠感染 Mtb 后巨噬细胞表现为坏死,从而利于细菌在体内的增殖与扩散;而表达 Ipr1 基因的小鼠,感染 Mtb 后巨噬细胞发生凋亡,细胞不易增殖,对 Mtb 表现出天然的抗性,表明了固有免疫在抗结核中的重要地位。巨噬细胞固有免疫机制中一些基因的遗

传变异可能和宿主对结核病的易感性相关,Ipr1 基因的发现为全面解释结核易感性及研究巨噬细胞抗 Mtb 感染固有免疫机制提供了重要的线索。人体中与 Ipr1 蛋白最接近的同源蛋白(41% 相同)是核体蛋白 SP110,推测 Ipr1 和 SP110 可能具有相同的功能,所以 SP110 基因是验证与结核病易感性之间联系的一个候选基因,这对探讨人类结核病的治疗是一种新的思路。本研究将小鼠 Ipr1 基因重组 BCG 作为治疗性疫苗用于小鼠结核病模型,通过器官荷菌量、组织病理等指标观察其治疗效果。

器官的荷菌量是动物实验中观察抗 Mtb 感染疗效的重要指标。Orme 等[9]认为,在 4 ~ 5 只小鼠为 1 组的实验中,如果某种处理措施能使肺部荷菌量下降 0.7 log CFU/g 则为有效。本实验中重组 BCG 组与 BCG 组比较发现,肺荷菌量下降 0.72 log CFU/g,脾荷菌量下降约 0.7 log CFU/g,表明重组 BCG 疫苗对小鼠结核病器官荷菌量下降有较好作用。脏器指数是实验动物某脏器质量与体质重之比值。脏器指数增大,表示脏器充血、水肿或增生肥大等;脏器指数减小,表示脏器萎缩及其他退行性改变。从肺组织病理改变来看,重组 BCG 组病变明显局限,渗出少,肺泡结构基本正常,表明了重组 BCG 组比 BCG 组能更有效地发挥抗 Mtb 感染效应。小鼠血清 IFN-γ 的分泌水平以重组 BCG 组最高。IFN-γ 是 T 细胞和 NK 细胞早期分泌的一种主要的 Thl 型细胞因子,在宿主巨噬细胞控制 Mtb 感染过程中发挥非常重要的作用。IFN-γ 主要通过刺激宿主巨噬细胞产生一氧化氮合酶(NOS2)发挥抗 Mtb 感染作用[10]。因此,提示重组 BCG 还可能通过增加巨噬细胞对 IFN-γ 刺激的敏感性而发挥抗菌作用。

本研究使用重组 BCG 疫苗,一方面 BCG 可作为新型减毒有机体载体向机体靶向递送 Ipr1 真核共表达质粒到巨噬细胞,并有效诱导相应的免疫反应,发挥 Ipr1 的作用;另一方面利用 BCG 具有与 Mtb 相同菌体抗原成分的特点,还可对已经感染结核杆菌的机体进行二次免疫激发,以对结核病进行免疫治疗。最终选择 BALB/c 小鼠作为本研究的动物是因为目前国内外还少见报道其有 Ipr1 基因的表达,在预实验中我们也未在 BALB/c 小鼠胸腺组织中检测到 Ipr1 的表达。在建模过程中,考虑到小鼠数量多,最终选择一种和呼吸道感染最接近的方式——滴鼻感染途径。既确保了靶向定位和治疗剂量的准确性,同时还最大程度模拟了自然状态下 Mtb 对免疫系统的激发过程。Chen 等[11]对比同等剂量的 BCG 皮下接种和滴鼻途径在 BALB/c 小鼠产生的免疫和抵御 $H_{37}RV$ 攻击的保护效果,得出滴鼻途径在保护肺组织方面更有效。

当代疫苗的发展和应用不仅限于传染病领域,它已不再是单纯的预防制剂,还可通过加强和调整机体的免疫功能达到治疗的目的,成为有前途的治疗性制剂。本实验证明,重组 BCG 治疗性疫苗通过滴鼻的途径,可以有效提高巨噬细胞抗 Mtb 的能力,为后续对结核病的治疗提供理论和实践依据。

参考文献:

[1] Young D B, Perkins M D, Duncan K, *et al*. Confronting the scientific obstacles to global control of tuberculosis[J]. J Clin Invest, 2008, 118(4): 1255 - 1265.

[2] Dye C, Williams B G, Espinal M A, *et al*. Erasing the world's slow stain: strategies to beat multidrug-resistant tuberculosis[J]. Science, 2002, 295(5562): 2042 - 2046.

[3] Pan H, Yan B S, Rojas M, *et al*. Ipr1 gene mediates innate immunity to tuberculosis [J]. Nature, 2005, 434(7034): 767 - 772.

[4] 王瑜伟, 朱道银, 李　娜. 稳定表达细胞内病原体抗性基因 1 的 RAW264.7 细胞克隆的建立[J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(2): 122 - 125.

[5] 杨　春, 何永林, 伊正君, 等. GLS/IL-12 重组耻垢分枝杆菌的构建及其在小鼠体内的表达[J]. 免疫学杂志, 2007, 23(1): 34 - 37.

[6] 吕　琳, 曹红丹, 王丕龙, 等. 分枝杆菌穿梭表达质粒 pJHSP70 的构建及鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(10): 890 - 893.

[7] Wang J, Thorson L, Stokes R W, *et al*. Single mucosal, but not parenteral, immunization with recombinant adenoviral-based vaccine provides potent protection from pulmonary tuberculosis[J]. J Immunol, 2004, 173(10): 6357 - 6365.

[8] Ottenhoff T H, Verreck F A, Lichtenauer-Kaligis E G, *et al*. Genetics, cytokines and human infectious disease: lessons from weakly pathogenic mycobacteria and salmonellae[J]. Nat Genet, 2002, 32(1): 97 - 105.

[9] Orme I M, McMurray D N, Belisle J T. Tuberculosis vaccine development: recent progress [J]. Trends Microbiol, 2001, 9(3): 115 - 118.

[10] Feng C G, Kaviratne M, Rothfuchs A G, *et al*. NK cell-derived IFN-gamma differentially regulates innate resistance and neutrophil response in T cell-deficient hosts infected with Mycobacterium tuberculosis[J]. J Immunol, 2006, 177(10): 7086 - 7093.

[11] Chen L, Wang J, Zganiacz A, *et al*. Single intranasal mucosal Mycobacterium bovis BCG vaccination confers improved protection compared to subcutaneous vaccination against pulmonary tuberculosis[J]. Infect Immune, 2004, 72(1): 238 - 246.

(编辑　栾　嘉)