基础研究 文章编号:0253-3626(2009)05-0516-05

重组耻垢分枝杆菌联合抗痨药物对鼠结核病治疗作用的探讨

杨晓燕[1,3],杨 春[2,3],何永林[2,3],徐 蕾[2,3]

(重庆医科大学基础医学院 1. 免疫学教研室;2. 病原生物学教研室;3. 神经科学研究中心,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨携带编码人天然颗粒溶素(Granulysin,GLS)和小鼠 IL-12 基因的重组耻垢分枝杆菌(M.smegmatis,MS)与抗痨药物对结核分枝杆菌感染的协同治疗效果。方法:将结核分枝杆菌 H37Rv 感染的 Balb/c 小鼠 40 只随机分成 4 组。感染 4 周后分别用生理盐水、重组 MS、INH+PZA 和重组 MS 联合 INH+PZA 治疗,于第一次治疗后 3 个月,处死小鼠,检测器官荷菌量、脾淋巴细胞 IFN-γ 和 TNF-α 的分泌水平、血清 IL-12 和 IFN-γ 和肺、脾组织中 GLS 表达,同时观察小鼠肺、脾组织病理改变情况。结果:重组 MS 联合 INH+PZA 治疗组肺、脾组织荷菌量(lg CFU/g)比重组 MS 和 INH+PZA 治疗组显著降低;重组 MS 和 INH+PZA 治疗组肺、脾组织荷菌量比生理盐水组显著降低。重组 MS 组经 PPD 刺激后 IFN-γ 和 TNF-α 分泌水平明显高于其它组。重组 MS 联合 INH+PZA 治疗组和重组 MS 组血清 IL-12 和 IFN-γ 水平明显高于生理盐水组。重组 MS 和 INH+PZA 组病变轻且局限,生理盐水组肺组织病理改变以渗出为主,病变广泛。重组 MS 联合 INH+PZA 治疗组肺组织病变最轻。结论:GLS/IL-12 重组 MS 对小鼠结核病有一定免疫治疗作用;重组 MS 联合临床常用的抗痨药可增强抗结核病的疗效。

【关键词】颗粒溶素;IL-12;重组 MS;结核病;抗痨药

【中国图书分类法分类号】R378.911 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-07-24

作者介绍:杨晓燕(1963-),女,讲师,
研究方向:结核分枝杆菌的感染与免疫研究。

通讯作者:杨 春,女,教授,E-mail: yangchunim@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30400375)。

丸 Leydig 细胞有明显的增殖抑制效应,超微结构显示出细胞毒性作用;原位分子杂交技术和 RT-PCR 检测发现体外各实验组 INSL3 mRNA 表达水平与对照组比较差异有统计学意义,提示 DES 可下调原代培养睾丸 Leydig 细胞 INSL3 mRNA 的表达。

宫内接触 DES 的仔鼠睾丸生精小管、睾丸间质组织均出现不同程度的病理改变,推测 DES 不仅影响睾丸 Leydig 细胞的数量,可能还影响其功能。通过 RT-PCR 检测,各实验组 INSL3 mRNA 表达水平与对照组比较差异有统计学意义,且与 DES 接触剂量相关,提示 DES 通过胎盘或乳汁作用于仔鼠,可有效下调雄性仔鼠 INSL3 mRNA 的表达水平。高剂量组雄性仔鼠在 PND15 时,INSL3 mRNA 表达的相对强度仍明显低于对照组($P<0.01$),表明高剂量DES 对睾丸 Leydig 细胞的损害比较严重,短期难以恢复,甚至可能是不可逆的。

实验结果提示 DES 对 Leydig 细胞 INSL3 mRNA 表达呈抑制效应,推测 DES 通过下调 INSL3 的表达,间接影响睾丸引带发育,从而导致隐睾发生。

参 考 文 献

[1] 曾北危,姜 平.环境激素[M].北京:化学工业出版社,2005.14-18.

[2] Guzmán C,Zambrano E. Endocrine disruptor compounds and their role in the developmental programming of the reproductive axis[J]. Rev Invest Clin,2007,59(1):73-81.

[3] Storgaard L,Bonde J P,Olsen J.Male reproductive disorders in humans and prenatal indicators of estrogen exposure. A review of published epidemiological studies[J]. Reprod Toxicol,2006,21(1):4-15.

[4] 宋晓峰,魏光辉,邓永继.小鼠胚胎睾丸 Leydig 细胞培养、纯化及其功能研究[J]. 中华男科学杂志,2006,12(1):6-9.

[5] 宋晓峰,张德迎,魏光辉,等.邻苯二甲酸二乙基己酯诱发小鼠隐睾与 INSL3 mRNA 表达的相关性研究[J]. 生殖与避孕,2006,26(12):712-716.

[6] Kubota Y,Nef S,Farmer P J,et al. Leydig insulin-like hormone, gubernacular development and testicular descent[J]. J Urol,2001,165(5):1673-1675.

[7] Hutson J M,Hasthorpe S. Abnormalities of testicular descent[J].Cell Tissue Res,2005,322(1):155-158.

[8] Emmen J M,McLuskey A,Adham I M,et al. Hormonal control of gubernaculums development during testis descent:Gubernaculum outg rowth in vitro requires both insulin-like factor and androgen[J]. Endo crinology,2000,141(12):4720-4727.

(责任编辑:冉明会)

Evaluation synergism of GLS/IL-12 recombinant M. smegmatis to anti-tuberculosis chemotherapy in murine model of M.tuberculosis infection

YANG Xiao-yan, et al

(*Department of Immunology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To evaluate the synergism of recombinant M.smegmatis(MS)encoding human granulysin and murine IL-12 to anti-tuberculosis chemotherapy in murine M.tuberculosis M.tuberculosis infection. *Methods*: Balb/c mice were infected with normal saline, recombinant MS, INH(Isoniazid)+PZA(pyrazinamide), recombinant MS + INH+PZA respectively. The numbers of viable bacteria in the lung and the spleen were counted. The levels of IL12 and IFN-γ in serum and IFN-γ and TNF-α released from spleen lymphocytes stimulated with PPD were detected with ELISA . Lungs and spleens were prepared for pathological analysis. *Results*: The recombinant MS group, INH+PZA group, and recombinant MS + INH+PZA group showed significantly reduced number of colony forming units(log CFU/g) compared with saline group.The increase of IL-12 and IFN-γ in serum were found in recombinant MS group. IFN-γ and TNF-α released from spleen lymphocytes stimulated with PPD in recombinant MS group was higher than that in other groups ($P<0.01$). The pathological changes in lungs of the recombinant MS group, INH(Isoniazid)+PZA(pyrazinamide)group, and recombinant MS +INH+PZA group were localized, while those in the control group were extensive. The significant pathological changes were not found in the spleens of all groups. *Conclusion*: The recombinant MS had immunotherapeutic effects, the recombinant MS had a synergism to anti-tuberculosis chemotherapy.

【Key words】Granulysin; IL-12; Recombinant MS; Tuberculosis; Anti-tuberculosis chemotherapy

全球约 20 亿人口感染结核分枝杆菌(M.tuberculosis, Mtb)。我国结核病疫情十分严重,现全国约有 5 亿人口受到 Mtb 的感染,肺结核患者 450 万,每年新发肺结核病例约 145 万[1]。在结核病的治疗中,由于耐多药结核病的流行,合并人类免疫缺陷病毒感染以及化疗疗程长等问题的出现,使单纯依靠化学治疗的治疗方案难以攻克。以化疗为主的,辅以免疫治疗、基因治疗的综合治疗应运而生,对结核病进行全面、综合治疗的手段日益受到重视。白细胞介素 12(IL-12)具有促进 CTL 成熟、诱导Th1 型细胞分化、刺激 T 细胞和 NK 细胞释放 IFN-γ 等作用,主要诱导 Th1 型细胞免疫应答。颗粒溶素(Granulysin, GLS)是一种天然的抗菌肽,具有抗病原微生物(特别是抗结核分枝杆菌)、抗肿瘤[2]等多种生物活性。本研究探讨了携带人天然 GLS 和鼠单链 IL-12 的重组 MS 对小鼠结核分子杆菌感染的免疫治疗作用及机制;同时观察重组 MS 联合抗结核病的化疗药物的协同治疗效果。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和试剂

携带人 GLS 基因和鼠单链 IL-12 基因的质粒 pZM03 由本实验室构建,其活性和用分枝杆菌作为载体的靶向性在细胞内已得到证实[3]。结核分枝杆菌 H37Rv 由重庆肺科医院赠送,在动物体内回恢复毒力后使用。PPD 标准品购自北京药品生物制品检定所;质粒 DNA 小量抽提试剂盒购自上海华舜公司;山羊抗人 GLS 抗体购自基因公司;小鼠 IL-12 细胞因子 ELISA 试剂盒购自 *Invitrogen* 公司;IFN-γ 和 TNF-α ELISA 试剂盒购自晶美公司。

1.2 动物及建模

SPF 级 Balb/c 小鼠,雌性,6 ~ 8 周,购自重庆医科大学实验动物中心。刮取改良罗琴氏培养基生长 4 周的结核分枝杆菌 H37Rv 标准株,加 0.05%Tween80 生理盐水磨菌制成悬液,用菌落计数后滴鼻感染,制作结核分枝杆菌感染模型。感染剂量参照 Wang 等[4]用 2×10^4 CFU/50 μl 和预实验结果最终我们用 5×10^4 CFU/50 μl 滴鼻感染小鼠建模。

1.3 动物分组及治疗

实验动物共分为 4 组,包括生理盐水对照组、重组 MS治疗组、INH(异烟肼)+PZA(吡嗪酰胺)药物组和重组 MS+INH+PZA 组。每组 10 只动物。H37Rv 5×10^4 CFU/50 μl 滴鼻感染小鼠 4 周后,各组分别给予 50 μl 生理盐水、5×10^5 CFU/50 μl 重组 MS 滴鼻治疗,每 2 周治疗 1 次,共 6 次。药物组治疗按照 INH(25 mg/kg)+PZA(150 mg/kg)联合用药,每周口服(加入饮水中)5 d[5]。治疗 12 周后,即第 6 次治疗后 7 d,一次性处死小鼠,分别无菌采取器官、血清备用。血清中 IL-12 和 IFN-γ 测定用 ELISA。操作按试剂盒说明进行。

1.4 肺、脾器官荷菌量检测

无菌条件下取左肺及部分脾组织准确称量,研磨(4% H_2SO_4+ 生理盐水各 500 μl)、倍比稀释后接种于改良罗琴氏培养基平板,每只小鼠肺、脾组织各个稀释度同时接种 3 个平板,计数时取平均值,37℃培养 4 周后菌落计数。

1.5 脾淋巴细胞 IFN-γ 和 TNF-α 的诱导和测定

分离各组小鼠脾淋巴细胞,用含 10%胎牛血清的 RPMI1640

调整细胞浓度为 2×10^7 个/L,200 μl/孔加入 96 孔细胞培养板,每组设 3 个复孔,每孔 5 μl PPD(1.5 μg/μl)刺激,37℃、5%CO_2 孵箱中培养 72 h。每组 3 个孔的培养液混合,5 000 r/min 离心 5 min,取上清 -20℃冻存备检。IFN-γ 和 TNF-α 含量的测定用 ELISA。操作按试剂盒说明进行。

1.6 病理学检查

取右下肺叶和部分脾组织用 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋切片,苏木精 - 依红(HE)染色后观察。

1.7 统计学分析

所有计量资料应用 SAS8.1 软件进行统计处理。器官荷菌量、IFN-γ、TNF-α、IL-12 和 SIgA 均采用单因素方差分析及 SNK 检验,以 $P<0.05$ 判断为有统计学意义。

2 结 果

2.1 动物建模

感染组肺、脾组织切片抗酸染色后,光镜下观察到染成红色的分枝杆菌,呈簇状或散在分布。HE 染色后镜下观察发现肺组织充血、实变,肺泡间隔消失,大量巨噬细胞和淋巴细胞浸润,脾组织充血,炎症细胞浸润,淋巴细胞增生。

2.2 肺、脾器官荷菌量

重组 MS+INH+PZA 组肺器官荷菌量与 INH+PZA 组比较差异有统计学意义($P<0.01$);INH+PZA 组与重组 MS 组比较差异有统计学意义($P<0.01$);重组 MS 组与生理盐水组比较差异有显著统计学意义($P<0.01$)。重组 MS+INH+PZA 组脾器官荷菌量与重组 MS 组和 INH+PZA 组比较差异有统计学意义($P<0.01$);重组 MS 组和 INH+PZA 组与生理盐水组比较差异有统计学意义($P<0.01$);重组 MS 组与 INH+PZA 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

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

组别	数量	肺菌落计数	脾菌落计数
生理盐水	10	5.769 ± 0.117	4.658 ± 0.177
重组 MS	10	4.564 ± 0.135	3.473 ± 0.251
INH +PZA	10	3.702 ± 0.438	3.320 ± 0.358
重组 MS+INH+PZA	10	2.499 ± 0.362	<2.0

肺荷菌量:重组 MS+INH+PZA 与 INH+PZA 组比较,$P<0.01$;INH+PZA 与重组 MS 组比较,$P<0.01$;重组 MS 与生理盐水比较,$P<0.01$;脾荷菌量:重组 MS+INH+PZA 与 INH+PZA 组和重组 MS 组比较,$P<0.01$;INH+PZA 组和重组 MS 组与生理盐水比较;$P<0.01$

2.3 肺、脾组织病理表现

生理盐水对照组肺组织病变严重、广泛;正常肺泡结构消失,以充血实变、淋巴细胞、巨噬细胞浸润为主,增生性改变不明显,未见明显的组织坏死。重组 MS 组小鼠肺部病变范围局限,2/3 区域仍见正常肺泡结构,病变区域可见大量泡沫细胞、类上皮细胞等细胞。INH+PZA 药物组病变范围局限,3/4 区域可见正常肺泡结构,病变区域泡沫细胞、类上皮细胞等细胞少见。重组 MS+INH+PZA 组病变最轻,几乎接近正常。见图 1。

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 小鼠脾淋巴细胞 IFN-γ 和 TNF-α 的分泌水平

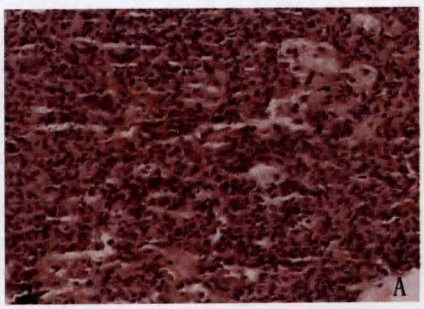
重组 MS 组经 PPD 刺激后 IFN-γ 和 TNF-α 分泌水平明显高于其它组($P<0.01$),生理盐水对照组、INH+PZA 组和重组 MS+INH+PZA 组比较差异无显著意义($P>0.05$)。表 2。

2.5 小鼠血清 IL-12 和 IFN-γ 的测定

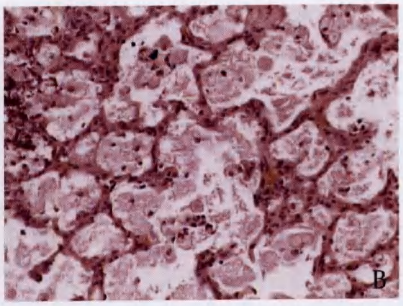
重组 MS 组血清 IL-12 和 IFN-γ 水平明显高于 INH+PZA 组和重组 MS+INH+PZA 组($P<0.01$),INH+PZA 组和重组 MS+INH+PZA 组血清 IL-12 和 IFN-γ 水平明显高于生理盐水对照组($P<0.01$)。

3 讨 论

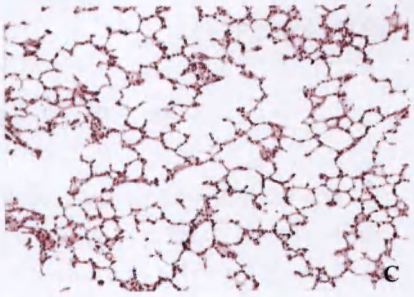
目前,临床上结核病治疗仍然是化疗为主,短程疗法取得了效果。但由于涂阳肺结核病的疗程很难再缩短到 6 个月以下,不充分的化疗常造成高复发率与细菌的耐药病例增多。而结核病的感染、发病与治疗过程中,宿主本身的免疫素质和免疫状态是决定预后转归的重要因素。因此,如何调控机体的免疫应答,使感染后的机体以 Th1 免疫应答为主,对成功的化疗是至关重要的。耻垢分枝杆菌属于分枝杆菌属中快生长菌,一般 2~3 d 长出典型的粗糙型菌落,而 BCG 需要 14~28 d 生长期。MS 和 Mtb 有相同的属特异性抗原成分,但毒力很低,甚至无毒,在



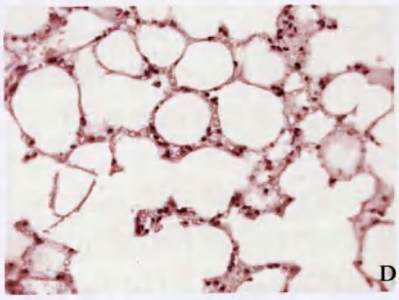
A. 生理盐水组：肺泡正常结构消失，以充血，淋巴细胞、巨噬细胞浸润为主（HE 染色 × 200）



B. 重组 MS 组：治疗后病变部位见大量泡沫细胞（HE 染色 × 400）



C. 重组 MS 组：治疗 3 月后 2/3 区域肺泡结构正常（HE 染色 × 200）



D. INH+PZA 组：治疗后 3/4 区域肺泡结构正常（HE 染色 × 400）

图 1　治疗 12 周后，各组小鼠肺组织的病理改变

表 2　各组小鼠脾淋巴细胞培养上清液 IFN-γ 和 TNF-α 细胞因子水平（pg/ml）

组别	数量	干扰素 - γ	肿瘤坏死因子 - α
生理盐水	10	180.133 ± 83.536	135.308 ± 24.871
重组 MS	10	1 371.250 ± 464.061	368.397 ± 62.716
INH+PZA	10	194.883 ± 103.086	120.342 ± 36.956
重组 MS+INH+PZA	10	168.113 ± 91.869	128.441 ± 37.826

IFN-γ：重组 MS 与生理盐水，INH+PZA，重组 MS +INH+PZA，$P<0.01$；TNF-α：重组 MS 与 生理盐水，INH+PZA，重组 MS +INH+PZA，$P<0.01$

表 3　各组小鼠治疗后血清 IL-12 和 IFN-γ（pg/ml）水平

组别	数量	白介素 -12	干扰素 - γ
生理盐水	10	296.68 ± 68.546	43.434 ± 10.865
重组 MS	10	588.728 ± 76.862	136.773 ± 62.015
INH+PZA	10	410.638 ± 64.743	71.326 ± 19.308
重组 MS +INH+PZA	10	413.825 ± 80.556	63.850 ± 26.323

IL-12：重组 MS 与 INH+PZA 和重组 MS +INH+PZA 比较，$P<0.01$，INH+PZA 和重组 MS +INH+PZA 与生理盐水比较，$P<0.01$；IFN-γ：重组 MS 与 INH+PZA 和重组 MS +INH+PZA 比较，$P<0.01$，INH+PZA 和重组 MS +INH+PZA 与生理盐水比较，$P<0.01$

一般情况下不致病，属于人体正常菌群。同时 MS 具有较强的 Th1 细胞免疫佐剂作用，作为非致病的分枝杆菌在结核病疫苗的研究中，越来越受到重视[5]。本研究利用重组 MS 的免疫治疗和基因治疗作用，再联合抗痨药物的化疗作用，以达到综合治疗结核病的目的。

GLS 是近几年发现的一种天然的抗菌肽，研究发现结核病患者中 GLS 的产生受到选择性抑制，成功治疗后则持续回升[7]。GLS 在体外高效杀伤多种靶细胞，如在体外试验 72 h 内可直接杀死结核杆菌达 90%以上，在穿孔素的配合下可进入细胞内杀死胞内结核杆菌[2]。Toro 等[8]研究发现 GLS 对 Mtb 耐药

株有抑菌活性。Mtb 是胞内寄生菌,侵入机体后首先经由巨噬细胞吞噬和提呈,因此在巨噬细胞中表达 GLS 进行基因治疗,可对胞内潜伏的 Mtb 进行直接杀伤。我们在前期实验结果证明,在支气管黏膜上皮细胞和巨噬细胞的胞浆中检测到 GLS 的表达[9],提示 GLS 可进入巨噬细胞杀死细胞内结核分枝杆菌。IFN-γ 和 IL-12 是典型的诱导 Th1 型细胞免疫应答的细胞因子,GLS/IL-12 重组 MS 疫苗组治疗后,脾细胞 IFN-γ、TNF-α 和血清中 IL-12 和 IFN-γ 分泌水平明显高于其它对照组。由此可见,重组 MS 疫苗治疗作用可能是通过促进 IFN-γ、IL-12 的分泌,使机体的免疫状态倾向 Th1 型免疫应答而达到免疫治疗作用;同时利用 GLS 在巨噬细胞内的表达直接杀伤胞内的结核分枝杆菌。

临床常用的抗痨药物主要有异烟肼(INH)、利福平(RLZ)、吡嗪酰胺(PZA)和乙胺丁纯(EMB)等。在本实验中,作为药物对照我们选用 INH+PZA 联合治疗,每周口服(加入饮水中)5 d,共治疗 12 周[6]。治疗后,肺、脾器官荷菌量明显下降,肺组织病变轻微、局限,类上皮细胞、泡沫细胞等细胞少见。药物对照组和重组 MS 组治疗效果比较,重组 MS 组 Th1 免疫应答的改善明显好于药物组;而药物组在肺、脾器官荷菌量下降和病变好转方面优于重组MS 组。因此,虽然我们知道抗结核化疗药物可能杀死重组 MS 菌苗,但我们仍设计重组 MS 联合 INH+PZA 组(分别通过滴鼻和口服途径给药),观察两者作用是否有协同性。结果显示,GLS/IL-12 重组 MS 联合 INH+PZA 组的肺、脾器官荷菌量下降与单纯重组 MS 或单纯 INH+PZA 比较差异有显著意义;其肺、脾组织病变也最轻。其机制可能是两者通过不同途径到达靶细胞发挥作用,即使化学药物杀死重组 MS,重组 MS 所携带的质粒可释放发挥相应作用。我们实验结果提示,GLS/IL-12 重组 MS 的免疫治疗联合化学治疗的综合治疗效果超过单纯的免疫治疗或化学治疗,说明重组 MS 对临床常用的抗结核药有协同作用。

本研究利用 MS 菌体抗原与 IL-12 共同促进并激发宿主针对结核杆菌的特异性与非特异性细胞免疫,纠正机体的免疫状态,间接清除体内的结核杆菌;同时 MS 还可以作为基因治疗的减毒有机载体,将含有天然抗菌肽 GLS 基因靶向导入巨噬细胞中表达,由于 GLS 行使杀菌功能无种属特异性,其杀菌机制与目标细菌是否耐多药菌株无关。因此,GLS/IL-12 重组 MS 疫苗有望解决结核病防治中的 Mtb 胞内潜伏与耐多菌株等棘手问题。实验结果提示,GLS/IL-12 重组 MS 的免疫治疗联合化学治疗的综合治疗效果超过单纯的免疫治疗、化学治疗,说明重组 MS 对临床常用的抗结核药有协同作用。这种协同作用有望协作解决对目前困扰结核病治疗中的几个问题:合并 AIDS 感染、耐药菌株的产生和治疗时间过长等。

参 考 文 献

[1] 世界卫生组织.中国的结核病控制[EB/OL]. http:// www.5413.org/node/15,2005-03-24/2005-04-16.

[2] Stenger S,Hanson D A,Teitelbaum R,et al. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin[J]. Science,1998,282(5386):121-125.

[3] Yi Z Y,Yang C,Zhu D Y,et al. Recombinant M.smegmatis vaccine targeted delivering GLS/IL-12 into macrophags can induce specific cellular immunity against M.tuberculosis in BALB/c mice[J]. Vaccine,2007,25(4):638-648.

[4] 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.

[5] Divison of microbiology & infectious diseases,microbial research. Global health.tuberculosis vaccines:state of the science [EB/OL]. http://www.niaid.nih.gov/dmid/tuberculosis/tbvaccinehtmJ,2001-01-05/2007-04-01.

[6] Lenaerts A M,Chase S E,Cynamon M H. Evaluation of rifalazil in a combination treatment regimen as an alternative to isoniazid-Rifampin therapy in a mouse tuberculosis model[J]. Antimicrob Agents Chemother,2000,44(11):3167-3168.

[7] Dieli F,Sireci G,Caccamo N,et al. Selective depression of interferon-gamma and granulysin production with increase of proliferative response by Vgamma9/Vdelta2 T cells in children with tuberculosis[J]. J Infect Dis,2002,186(12):1835-1839.

[8] Toro J C,Hoffner S,Linde C,et al. Enhanced susceptibility of multidrug resistant strains of Mycobacterium tuberculosis to granulysin peptides correlates with a reduced fitness phenotype[J]. Microbes Infect,2006,8(8):1985-1993.

[9] 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.

(责任编辑:冉明会)