维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)05-0553-04

结核菌 H37Ra 在小鼠体内诱导的抗结核细胞免疫应答的研究

王淑玲[1],刘来成[2],卢贤瑜[3],冯文莉[1]

(1. 重庆医科大学医学检验系临床血液学教研室,重庆 400016;2. 重庆医科大学附属儿童医院检验科,重庆 400014;
3. 重庆医科大学临床免疫学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究结核菌 H37Ra 免疫小鼠后产生的特异性细胞免疫应答及其对结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis,MTB)毒株感染的保护力。方法:Balb/c 小鼠随机分为 H37Ra 组、BCG 组和生理盐水(NS)组,皮内免疫 8 周后处死小鼠,流式细胞分析仪检测小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚群的变化;取小鼠脾淋巴细胞体外培养并用 PPD 刺激,MTT 法检测脾淋巴细胞的刺激指数(SI);ELISA 法检测培养上清液中 IFN-γ;免疫后第 8 周,用 MTB 毒株 H37Rv 经小鼠腹腔注射,4 周后处死小鼠,测定小鼠肺脏荷菌量,观察免疫小鼠对 MTB 抵抗作用。结果:H37Ra 免疫小鼠脾脏 $CD3^+T$ 细胞、$CD4^+T$ 细胞的百分率分别为 (41.63 ± 1.68)%、(27.08 ± 0.58)%,显著高于 NS 对照组 (38.34 ± 0.74)%、(24.37 ± 1.60)%($P<0.05$)。H37Ra 免疫组脾脏 $CD3^+T$ 细胞、$CD4^+T$ 细胞及 $CD8^+T$ 细胞的百分率均不同程度地高于 BCG 免疫组,但差异无统计学意义。脾淋巴细胞 SI 和 IFN-γ 水平检测均发现 H37Ra 免疫组显著高于 NS 对照组($P<0.05$),略高于 BCG 免疫组。感染 4 周后 H37Ra 组小鼠肺脏荷菌量与 NS 对照组比较下降 $0.954\log_{10}$CFU,差异有显著性($P<0.05$),与 BCG 组之间差异均无显著性($P>0.05$)。结论:H37Ra 免疫小鼠后可以诱导产生特异性抗结核的细胞免疫应答,能够抵抗毒株 H37Rv 的攻击,且免疫效果与 BCG 相近。

【关键词】结核分枝杆菌;H37Ra;细胞免疫
【中国图书分类法分类号】R392.12 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-09-28

The cellular immune responses induced by Mycobacterium tuberculosis H37Ra in mice

WANG Shu-ling, et al

(*Department of Clinical Hematology, Key Laboratory of Clinical Medical Diagnostics of Education Ministry, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the cellular immune responses induced by Mycobacterium tuberculosis H37Ra and examine its protective efficacy against MTB in mice. *Methods*: Balb/c mice were divided into H37Ra, BCG and NS groups randomly, and intracutaneously injected at caudal region with H37Ra, BCG and NS respectively. At 8 weeks after immunization, some mice were sacrificed, and the percentages of $CD3^+T$, $CD4^+T$ and $CD8^+T$-lymphocyte in spleen were detected by flow cytometry. The spleen lymphocytes of mice were cultured with PPD in vitro; the proliferation of splenocytes was detected by MTT assay. The productions of IFN-γ in the supernatant of culture were determined by ELISA. After 8 weeks of immunization, Balb/c mice were challenged via intraperitoneal route with MTB H37Rv strain. Four weeks later, mice were sacrificed, then the bacteria load in the lung were determined. *Results*: After 8 weeks of immunization, the percentages of $CD3^+T$ and $CD4^+T$-lymphocyte in mice of H37Ra vaccination were significantly higher than those of the NS control subjects (41.63 ± 1.68)%, (27.08 ± 0.58)% vs (38.34 ± 0.74)%, (24.37 ± 1.60)% ($P<0.05$). Compared with the BCG group, the percentages of $CD3^+T$, $CD4^+T$ and $CD8^+T$-lymphocyte in mice of H37Ra vaccination were slightly higher, the percentages of $CD4^+T$ and $CD8^+T$-lymphocyte were not significantly different among 3 groups ($P>0.05$). The proliferation of antigen-specific lymphocytes, the productions of IFN-γ in the H37Ra group were significantly higher than those of the NS group ($P<0.05$), while proliferation and IFN-γ were not significantly different between the H37Ra and BCG groups ($P>0.05$). At 4 weeks after challenge, compared with the NS group, the mean numbers of viable bacteria in the lung of the H37Ra group reduced $0.954\log_{10}$CFU ($P<0.05$). Between the H37Ra and BCG groups, there were no difference ($P>0.05$). *Conclusion*: Mycobacterium tuberculosis H37Ra could induce specific cellular immune responses in mice. The immunity effect of H37Ra is similar to BCG.

【Key words】 Mycobacterium tuberculosis; H37Ra; Cellular immune response

作者介绍:王淑玲(1980-),女,硕士,
研究方向:结核疫苗。
通讯作者:冯文莉,女,教授,E-mail:fengwlcqmu@sina.com。
基金项目:重庆市教委科研基金资助项目(2004-12),
重庆医科大学科技创新基金资助项目(CX200204)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

近年来随着人口流动的增加,人类免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus,HIV)与结核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[1]。近年来发现 BCG 免疫保护效果有较大差异,从 0~80%不等[2],主要对小儿结核的预防有效,对成人结核病预防效果不甚理想。原因可能与 BCG 菌株长期传代使其保护性抗原不断丢失、BCG 不能有效刺激 $CD8^+T$ 细胞亚群等有关。发展新型疫苗控制结核病的传播已成当务之急。H37Ra 是人型结核分枝杆菌减毒株,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。鉴于此,是否可用 MTB 的 H37Ra 来代替 BCG 疫苗现已引起学者的关注。本研究将 H37Ra 皮内免疫 Balb/c 小鼠,检测在小鼠体内诱导的特异性细胞免疫的相关指标及其保护力,评价 H37Ra 作为候选结核疫苗的可行性。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 Balb/c 小鼠,4~6 周龄,平均体重(20±2)g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供,随机分为 3 组(H37Ra、BCG 和 NS 组)饲养于华中科技大学同济医学院生物安全实验室(BSL-3)。

1.2 菌种及主要试剂

H37Ra 菌购自北京药品生物制品检定所,菌号为 93020;BCG 为上海生物制品研究所产品,批号为 2003050401;MTB 毒株 H37Rv 标准株购自中国微生物菌种保藏中心。IFN-γ ELISA 检测试剂盒为深圳晶美生物工程有限公司产品。RPMI1640 培养液(美国 Gibco 公司);胎牛血清(杭州四季青生物公司);HEPES 液(美国 Sigma 公司);Purified anti-mouse CD16/CD32、PE anti-mouse CD8α、FITC anti-mouse CD3、PE anti-mouse CD4 试剂均为 BioLegend 公司产品;PPD(purified protein derivative 纯蛋白衍生物)购自成都生物制品研究所。

1.3 菌悬液制备及免疫 Balb/c 小鼠

H37Ra、BCG 和毒株 H37Rv 菌种用 0.5ml NS 稀释,分别接种于改良罗氏培养基斜面上。培养 18d 后刮取生长良好的 H37Ra、BCG 和毒株 H37Rv 菌苔于电子天平上称重,加少量 NS 充分研磨均匀,调整菌悬液浓度为 1mg/ml。H37Ra 组、BCG 组每只小鼠尾根部皮内接种制备好的 H37Ra 或 BCG 菌液 0.1ml(含活菌数约为 1.0×10^6 个);NS 组每只小鼠尾根部皮内注射 NS 0.1ml。毒株 H37Rv 菌悬液用于毒株攻击实验。

1.4 小鼠脾淋巴细胞的制备

免疫 8 周后处死小鼠,将无菌分离的脾脏置于平皿内 200 目不锈钢筛网上,加含 5%FCS RPMI1640 培养液 1ml 研磨,收集分离的脾细胞悬液,1 000r/min 离心 5min,弃上清,加入红细胞裂解液 3ml,混匀,静置 4~5min,待红细胞完全破碎,1 000r/min 离心 5min,弃上清。用含 5%FCS 的 RMPI1640 培养液洗 2~3 遍,然后用完全 RMPI1640 培养液(含 10%FCS、终浓度为 100U/ml 的青、链霉素)重悬细胞,台细胞稀释液稀释计数,调整细胞浓度为 2×10^6 个 /ml。4%台盼蓝染色做活细胞测定,活细胞比率大于 95%。

1.5 脾脏 T 淋巴细胞亚群的检测

取 0.5ml 脾淋巴细胞悬液于流式检测管,1 200r/min 离心 5min,弃上清。加入 99μl 洗涤液和 1μl Fc 抗体(CD16/32),轻轻颠倒混匀,4℃孵育 30min。加 3ml 洗涤液洗涤 2 次,离心同上。然后加入 98μl 洗涤液、1μl CD3 抗体和 1μl CD4 抗体(或 1μl CD8 抗体),4℃孵育 30min。同上洗涤后,加入 300~500μl 固定液,流式细胞仪检测。同时每组做 1 个细胞对照管。

1.6 脾淋巴细胞转化实验

96 孔细胞培养板每孔加细胞悬液 100μl、完全 RPMI 1640 培养液稀释的 PPD 20μl(终浓度为 10μg/ml)或完全 RPMI1640 培养液 20μl, 每个刺激物浓度平行做 3 个复孔,同时做培养液调零孔(每孔加完全 RPMI1640 培养液 120μl)。37℃ 5%CO_2 细胞培养箱培养 72h,取出细胞培养板,每孔加 5mg/ml MTT 20μl,微型震荡器上震荡混匀后放 37℃ 5%CO_2 细胞培养箱内继续培养 4h。培养结束,取出细胞培养板,2 500r/min 离心 10min,弃上清培养液,每孔加甲瓒裂解液 100μl,待甲瓒沉淀溶解,微型震荡器上震荡混匀 5min,于酶标仪上测 OD_{570nm} 值。结果用公式表示。脾淋巴细胞刺激指数(Stimulation Index,SI)= 加 PPD 孔 OD_{570nm} 均值 / 未加 PPD 孔 OD_{570nm} 均值。

1.7 脾淋巴细胞培养上清液中 IFN-γ

96 孔细胞培养板每孔加细胞悬液 100μl、完全 RPMI 1640 培养液稀释的 PPD 20μl(终浓度为 10μg/ml),平行做 3 个复孔。37℃ 5%CO_2 细胞培养箱培养 72h,取出细胞培养板,2 500r/min 离心 10min,收集上清培养液,置 -40℃冰箱内冻存备检。细胞培养上清液中 IFN-γ 浓度的检测按 IFN-γ ELISA 试剂盒说明书进行。

1.8 H37Rv 毒株攻击实验

免疫 8 周后,用 5×10^6CFU MTB 毒株 H37Rv 菌悬液经腹腔感染小鼠,4 周后处死小鼠,测定小鼠肺脏荷菌量。

1.9 统计学处理

采用 SPSS11.5 软件进行统计分析,所有数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,包括单因素方差分析中的 SNK 检验处理;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.1 脾脏 T 淋巴细胞亚群的数量

H37Ra 免疫小鼠 8 周后，脾脏 $CD3^+T$ 细胞、$CD4^+T$ 细胞的百分率分别为(41.63 ± 1.68)%、(27.08 ± 0.58)%，显著高于 NS 对照组(38.34 ± 0.74)%、(24.37 ± 1.60)%($P<0.05$)。H37Ra 免疫小鼠后脾脏 $CD3^+T$ 细胞、$CD4^+T$ 细胞及 $CD8^+T$ 细胞的百分率均不同程度地高于 BCG 免疫小鼠，但差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

2.2 脾淋巴细胞增殖转化实验

H37Ra、BCG 免疫小鼠 8 周后，脾淋巴细胞在体外经 PPD 刺激后显著增殖($P<0.05$)；NS 对照组小鼠淋巴细胞增殖不明显。H37Ra 免疫小鼠脾淋巴细胞 SI 稍高于 BCG 免疫组，但无显著性差异($P>0.05$)(表 2)。

2.3 脾淋巴细胞培养上清液 IFN-γ 的分泌水平

H37Ra 及 BCG 免疫小鼠 8 周后脾淋巴细胞在体外经 PPD 刺激 72h 后 IFN-γ 产量均显著高于 NS 对照组($P<0.05$)；H37Ra 免疫组略高于 BCG 免疫组，差异无统计学意义($P>0.05$)，见表 3。

2.4 毒株 H37Rv 攻击小鼠 4 周后肺组织荷菌量

免疫小鼠毒株 H37Rv 攻击 4 周后，小鼠肺脏组织匀浆培养计数的结果见表 4。H37Ra 组小鼠肺组织荷菌量与 NS 对照组比较下降 0.95lgCFU，差异有显著性 ($P<0.05$)，但与 BCG 组之间差异无显著性($P>0.05$)。

3 讨 论

近年来各种新型结核疫苗的研究不断兴起，如蛋白质亚单位疫苗、DNA 疫苗、重组 BCG 等，但至今尚没有一种能取代 BCG 的候选疫苗[3]。在结核病的预防中，活菌疫苗有着其它疫苗不可比拟的优点：它免疫接种量小，在体内可长期存活繁殖，抗原可以持续刺激免疫系统，并符合传染性免疫的机理。一旦结核菌及有效抗原成分在体内消失，特异性免疫也就消失，因此认为活菌疫苗可能是较理想的抗结核的候选疫苗。

H37Ra 系 Steeken 等[4]于 1934 年从 H37 中分离获得，具有毒株 H37Rv 的免疫原性，但对人毒力极弱。BCG 毒力下降的同时伴随着抗原性的减弱，缺

表 1 小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚群的水平($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	H37Ra 组	BCG 组	NS 对照组
$CD3^+T$%	41.63 ± 1.68#	41.10 ± 1.60#	38.34 ± 0.74
$CD4^+T$%	27.08 ± 0.58#	27.02 ± 1.22#	24.37 ± 1.60
$CD8^+T$%	12.69 ± 1.08	11.17 ± 2.12	10.05 ± 1.92

注：#. 与 NS 对照组比较，$P<0.05$

表 2 PPD 诱发的小鼠脾淋巴细胞特异性增殖实验($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	H37Ra 组	BCG 组	NS 对照组
SI	2.16 ± 0.52#	2.02 ± 0.38#	1.47 ± 0.10

注：#. 与 NS 对照组比较，$P<0.05$

表 3 脾淋巴细胞 PPD 体外刺激后 IFN-γ 的分泌水平($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	H37Ra 组	BCG 组	NS 对照组
IFN-γ (ng/L)	97.55 ± 7.02#	88.61 ± 5.89#	18.75 ± 1.95

注：#. 与 NS 对照组比较，$P<0.05$

表 4 肺组织荷菌量($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	H37Ra 组	BCG 组	NS 对照组
肺脏荷菌量	5.536 ± 0.294*	5.339 ± 0.304*	6.490 ± 0.298

注：* 与 NS 对照组比较，$P<0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com

少了 RD1 和 RD2 区域编码的 ESAT-6、CFP-10 和 MPT64 抗原蛋白质，而 H37Ra 存在 RD1 和 RD2 区域[5]。这些表明 H37Ra 的免疫原性较好、毒力较低，用作疫苗可能比较安全有效。

机体抗结核病免疫主要依靠 T 淋巴细胞介导的细胞免疫。MTB 经呼吸道进入肺泡后，肺泡巨噬细胞吞噬细菌，MTB 产生的抗原性物质，可分别经 MHC-II 类和 I 类分子途径激活机体的 $CD4^+$T 细胞和 $CD8^+$T 细胞[6]。活化的 $CD4^+$T 细胞产生 IFN-γ 和 IL-2 等细胞因子，其中 IFN-γ 可充分活化巨噬细胞，促其杀伤胞内吞噬的 MTB[7-9]。$CD8^+$T 细胞通过识别靶细胞，诱导细胞凋亡，破坏 MTB 生长环境，使新增抗原提呈细胞呈递 MTB 而起到免疫监视的作用。$CD8^+$T 细胞也能够分泌 IFN-γ。除产生细胞因子外，$CD8^+$T 细胞还直接攻击感染靶细胞，通过释放穿孔素或颗粒溶素(Granulysin)途径溶解感染细胞。CD3 是所有成熟 T 细胞表面标志。我们用结核菌 H37Ra 免疫小鼠后脾脏 $CD3^+$T 细胞、$CD4^+$T 细胞显著高于 NS 对照组，表明 H37Ra 免疫小鼠后能有效激活机体 T 淋巴细胞及其亚群，从而产生抗结核保护性免疫。H37Ra 免疫小鼠后脾脏 $CD3^+$T 细胞、$CD4^+$T 细胞及 $CD8^+$T 细胞的百分率均不同程度地高于 BCG 免疫小鼠，表明 H37Ra 可能比 BCG 更能激活 $CD4^+$T、$CD8^+$T 细胞，从而产生抗结核保护性免疫。PPD 特异性脾淋巴细胞增殖反应和 IFN-γ 的分泌水平，都说明 H37Ra 和 BCG 一样在小鼠体内诱导了免疫记忆，当再次遇到相同抗原刺激时便激活了更为强烈的细胞免疫应答。

Orme 等[10]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 $0.7\log_{10}$ CFU 则为有效。本研究发现毒株 H37Rv 攻击 4 周后，H37Ra 免疫小鼠与 NS 对照组比较肺组织荷菌量下降 $0.954\log_{10}$CFU，说明 H37Ra 和 BCG 一样免疫小鼠后能够抵抗毒株 H37Rv 的攻击，表明 H37Ra 有可能作为新型结核疫苗。

参 考 文 献

[1] Behera,D. Global Tuberculosis Control:Surveillance,Planning, Financing[R]. Geneva:WHO,2007.

[2] Fattorini L. Strategies for the development of new tuberculosis vaccines[J]. Minerva Med,2007;98(2):109-119.

[3] Orme IM. Tuberculosis vaccines:current progress[J]. Drugs,2005; 65(17):2437-2444.

[4] North RJ,Izzo AA. Mycobacterial virulence. Virulent strains of Mycobacteria tuberculosis have faster in vivo doubling times and are better equipped to resist growth-inhibiting functions of macrophages in the presence and absence of specific immunity[J]. J Exp Med,1993; 177(6):1723-1733.

[5] Kalra M,Grover A,Mehta N,et al. Supplementation with RD antigens enhances the protective efficacy of BCG in tuberculous mice [J]. Clin Immunol,2007;125(2):173-183.

[6] Yoshikai Y. Immunological protection against mycobacterium tuberculosis infection[J]. Crit Rev Immunol,2006;26(6):515-526.

[7] Mitsuyama M,Akagawa K,Kobayashi K,et al. Up-to-date understanding of tuberculosis immunity[J]. Kekkaku,2003;78(1):51-55.

[8] MacMicking JD,Taylor GA, Mckinney JD,et al. Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47[J]. Science,2003; 302(5645):654-659.

[9] 陶 昆，卢资瑜，陈思静，等. 结核菌 H37Ra 免疫小鼠后机体抗结核细胞免疫功能的研究[J]. 第三军医大学学报，2006;28(11): 1195-1197.

[10] Orme IM,McMurray DN,Belisle JT,et al. Tuberculosis vaccine development:recent progress[J]. Trends Microbiol,2001;9(3):115-118.

(责任编辑：谭乐勤)

(上接第 552 页)

临床意义[J]. 癌症，2006;25(11):1439-1442.

[8] Urano N, Fujiwara Y,Doki Y,et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in gastric adenocarcinoma[J]. Gastric Cancer, 2006;9(1):44-49.

[9] Forsythe JA,Jiang BH,Iyer NV,et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1[J]. Mol Cell Biol,1996;16(9):4604-4613.

[10] Mizukami Y, Li J,Zhang X,et al. Hypoxia-inducible factor-1-independent regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia in colon cancer[J]. Cancer Res,2004;64(5):1765-1772.

[11] Dvorak HF,Brown LF,Detmar M,et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor,microvascular hypermeability, and angiogenesis[J]. Am J Pathol,1995;146(5):1029-1039.

[12] 梁启廉，陈小东，王三明，等. VEGF 和抑痰基因 maspin 在胃癌组织中的表达及意义[J]. 第三军医大学学报，2007;29(14):1416-1418.

[13] HIF-1α、JNK1、P-gp、MRP1 和 LRP 蛋白在胃痰中的表达与临床病理及预后的关系[J]. 第三军医大学学报，2007;29(18):1755-1759.

[14] Folkman J,Watson K,Ingber D,et al. Inducation of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasis[J]. Nature, 1989;339(6219):58-61.

(责任编辑：关蕴良)