维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)06-0584-04

Ag85B DNA/H37Ra 序贯免疫效果的探讨

王锦彤,卢贤瑜,冉柏林

(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)

【摘 要】目的:初步探讨含结核分枝杆菌 Ag85B 成熟蛋白的 DNA(pTB30m)和结核菌 H37Ra 序贯免疫小鼠产生的特异性免疫应答。方法:重组质粒 pTB30m 用碱裂解法制备后进行质量鉴定。用 pTB30m 肌注初次免疫小鼠 2 周后,H37Ra 皮内加强免疫作为 DNA-85B/H37Ra 组,同时设定 DNA-85B/BCG 组、H37Ra 组、BCG 组及未免疫组。免疫 4 周或 8 周后,用 ELISA 法检测小鼠血清中抗 PPD IgG 抗体的水平和 MTT 法检测其脾淋巴细胞的刺激指数(SI)。结果:酶切鉴定 pTB30m 所含外源基因片段大小正确,并且纯度较高。DNA-85B/H37Ra 组小鼠血清中抗 PPD IgG 水平、脾淋巴细胞的 SI 均显著高于未免疫组($P<0.05$);其抗 PPD IgG 水平稍高于 DNA-85B/BCG 组、H37Ra 组及 BCG 组,但它们之间无显著性差异($P>0.05$);其脾淋巴细胞的 SI 显著高于 H37Ra、BCG 组($P<0.05$),而与 DNA-85B/BCG 组比较,仅在 4 周有显著性差异。在 DNA-85B/H37Ra 组内,SI 在 4 周显著高于 8 周($P<0.05$),而血清中抗 PPD IgG 水平 8 周均显著高于 4 周($P<0.05$)。结论:DNA-85B/H37Ra 序贯免疫策略可以诱导小鼠产生特异性体液免疫和细胞免疫,初步证明其免疫效果略优于 BCG。

【关键词】结核分枝杆菌;序贯免疫策略;初免 - 加强免疫接种策略;抗原 Ag85B;H37Ra

【中国图书分类法分类号】R378.911 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-10-12

Immune efficacy of Ag85B DNA/H37Ra prime-boost vaccination regimen for tuberculosis in mice

WANG Jintong, et al

(*Department of Clinical Immunology, Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnosis, Ministry of Education, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the immune efficacy after sequential immunization with Mycobacterium tuberculosis DNA vaccine encoding mature form of Ag85B(pTB30m)and Mycobacterium tuberculosis H37Ra in mice. *Methods*: Much of highly pure plasmid DNA (pTB30m)extracted by alkaline lysis method was confirmed by restriction endonuclease digestion. Then, its DNA concentration and purity were determined by UV spectrophotometry. At various intervals (4weeks, 8weeks)after sequential immunization, ELISA was used to detect the level of the serum antibody against PPD. Also, the spleen lymphocytes of mice were cultured with PPD in vitro. Lymphocyte transformation was detected by MTT assay. Results: Prepared pTB30m was highly pure and came to the needed concentration. Compared with Group Naive control, the specific antibody levels against PPD and the stimulation index (SI)of spleen lymphocytes were all statistically higher in Group DNA-85B/H37Ra ($P<0.05$), but the specific antibody levels were not significant different($P>0.05$), as compared with Group DNA-85B/BCG, Group H37Ra and Group BCG, However, compared with Group H37Ra and Group BCG, the SI of mice was significantly larger in Group DNA-85B/H37Ra ($P<0.05$), but compared with Group DNA-85B/BCG, it was only statistically higher at 4weeks but not at 8 weeks. Simultaneously, in Group DNA-85B/H37Ra, the SI of the spleen lymphocytes was much higher at 4weeks than that at 8weeks($P<0.05$), but the specific antibody levels were much higer at 8weeks than those at 4weeks ($P<0.05$). *Conclusion*: The DNA-85B/H37Ra regimen for tuberculosis prevention in mice stimulate the specific antibody and induce cellular immunity. The immune efficacy of the DNA-85B/H37Ra regimen is slighterly better than that of BCG.

【Key words】Mycobacterium tuberculosis; Sequential immunization strategy; Prime-boost vaccination regimen; Antigen 85B; H37Ra

作者介绍:王锦彤(1976-),女,硕士研究生,主要研究方向:结核疫苗的研究。

基金项目:重庆市教委资助项目(渝教科[2004]12 号文),重庆医科大学科技创新资助项目(CX200204)。

由于当前结核病(Tuberculosis, TB)流行的严重程度和 BCG 预防 TB 的不足之处,目前探讨的基因疫苗及亚单位疫苗的免疫效果尚不及 BCG,国内外学者已转向改变免疫接种的策略。目前,序贯免疫

维普资讯 http://www.cqvip.com

策略已经成为 TB 疫苗研究的又一新趋势，其前景广阔。由于初免-加强疫苗的免疫效果会更强更持久，将会对预防和控制 TB 具有重要意义[1]。结核分枝杆菌 Ag85B 是 TB 重要的保护性靶抗原之一。研究表明用含分枝杆菌 Ag85B 的 DNA(DNA-85B)和 BCG 序贯免疫的小鼠获得抗结核分枝杆菌的保护力强于 BCG 免疫[2]。而 H37Ra 由 H37Rv 传代减毒获得，其毒力极弱。综合国内外学者[3-6]的报道，H37Ra 具有 BCG 不可比拟的优越性，有希望被开发为新一代结核活疫苗。本研究首先制备高纯度的含结核杆菌 Ag85B 成熟蛋白的质粒 DNA(pTB30m)，再将该质粒 pTB30m 肌注初次免疫后，用人型结核分枝杆菌的标准无毒株(H37Ra)皮内加强免疫小鼠，初步探讨这种 DNA-85B/H37Ra 序贯免疫策略所诱导产生的特异性免疫应答。

1 材料与方法

1.1 质粒和菌株

MTB 抗原 Ag85B 的真核表达质粒 DNA(pTB30m)由华中科技大学同济医学院范雄林博士馈赠，DH5α 受体菌由本室保存。H37Ra 为北京药品生物制品检定所提供，菌号为 93020。BCG 为上海生物制品研究所产品，批号为 2003050401。

1.2 实验动物

C57BL/6 雌性小鼠，6~8 周龄，体重(18 ± 1)g，购于重庆医科大学实验动物中心。

1.3 主要试剂

胰蛋白胨、酵母浸膏购自成都天泰生物技术有限公司。*Hind* Ⅲ和 EcoR Ⅰ购自 Takara 公司。高纯度去内毒素质粒中量抽提试剂盒购自 QIAGEN 公司。结核分枝杆菌纯蛋白衍生物 PPD 浓缩品(批号为 2002-1，规格为 1500μg/ml)购自成都生物制品研究所。辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗鼠 IgG(H ± L)购自北京鼎国生物技术有限公司。MTT 为美国 AMRESLO 公司分装产品。

1.4 重组质粒的制备

选用范雄林等构建的重组质粒 pTB30m[7,8]转化大肠杆菌 DH5α 受体菌，用含氨苄青霉素(100mg/L)LB 平板筛选阳性克隆菌落。LB 肉汤大量培养后，按照 QIAGEN 公司提供的高纯度去内毒素质粒中量抽提试剂盒进行质粒抽提，并经 EcoR Ⅰ、*Hind* Ⅲ双酶切鉴定证实。紫外分光光度仪测定蛋白含量，用无菌生理盐水稀释成浓度为 1.25g/L。

1.5 动物分组及免疫

C57BL/6 雌性小鼠随机分为 5 组(12 只 / 组)，免疫接种方案见表 1。

表 1 序贯免疫接种方案

组别	初次免疫的疫苗及接种方式	加强免疫的疫苗及接种方式
Ag85B-DNA/H37Ra 组	Ag85B -DNA(肌注)#	H37Ra(皮内)*
Ag85B-DNA/BCG 组	Ag85B -DNA(肌注)#	BCG(皮内)△
H37Ra 皮内接种组	无	H37Ra(皮内)*
BCG 皮内接种组	无	BCG(皮内)△
未免疫组	无	无

注：# 麻醉状态下用 pTB30m 肌注初次免疫 C57BL/6 小鼠，*，△初免 2 周后 H37Ra 或 BCG(1 × 10⁶cfu)皮内加强免疫

1.6 抗 PPD IgG 抗体水平的检测

在序贯免疫后第 4 周或第 8 周摘除小鼠眼球取血，分离血清。采用间接酶联免疫吸附试验(ELISA)检测小鼠血清中抗 PPD IgG。用 PPD(18.75μg/ml，100μl/ 孔)包被酶联板，4℃过夜。1%牛血清白蛋白(BSA)37℃封闭 30min，洗涤后加入待测血清(1:200 稀释)，二抗为羊抗鼠 IgG-HRP，邻苯二胺底物显色后，波长 490nm 测吸光度(A)。

1.7 脾淋巴细胞转化试验

在序贯免疫后第 4 周或第 8 周分离各组小鼠的脾淋巴细胞，调整细胞数为 2×10^6/ml。96 孔细胞培养板每孔加细胞悬液 100μl、完全 RPMI 1640 培养液 100μl 及生理盐水稀释的 PPD 20μl(终浓度为 10μg/ml)或生理盐水 20μl，同时做培养液对照孔。37℃，5%CO_2 细胞培养箱培养 72h。培养结束前 4h，取出细胞培养板，每孔加 5mg/ml MTT 10μl，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。培养结束，取出细胞培养板，1500r/min 离心 10min 完毕去尽上清液，每孔加 100μl DMSO，微型震荡器上震荡混匀 5min，室温放置 20min 后，在酶标仪上测 A570 值。脾淋巴细胞刺激指数(SI)按公式 1 计算。

$$\text{刺激指数(SI)} = \frac{\overline{A}_{\text{加 PPD 孔}} - \overline{A}_{\text{培养液对照孔}}}{\overline{A}_{\text{未加 PPD 孔}} - \overline{A}_{\text{培养液对照孔}}} \quad \text{(公式 1)}$$

1.8 统计学处理

统计学处理应用 Origin7.0 软件进行方差分析(Bonferroni Test)。

2 结 果

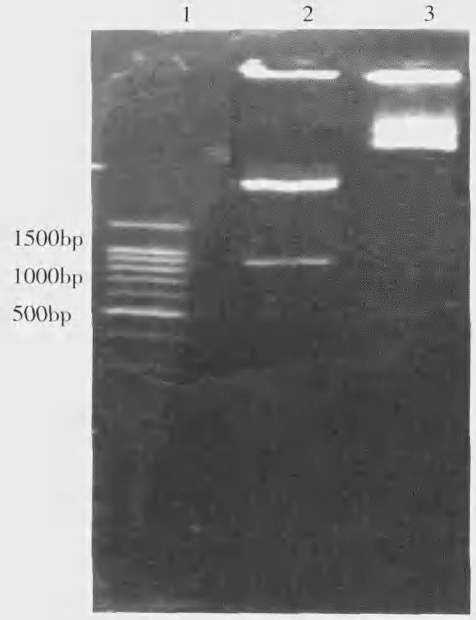
2.1 重组质粒 pTB30m 的鉴定

用所制备的 Ag85B 成熟蛋白基因真核表达载体(pTB30m)，经 EcoR Ⅰ、*Hind* Ⅲ双酶切，全部切出约 900bp 大小的片段(图 1)。经紫外分光光度仪测定，A260/A280 的比值在 1.8~2.0 之间，纯度较高。

2.2 血清抗 PPD IgG 抗体水平分析

免疫 4 周或 8 周后，用间接 ELISA 法对各组小鼠血清中抗 PPD IgG 抗体的水平进行了测定(见表

维普资讯 http://www.cqvip.com



1. DNA Marker (100bp~1500bp); 2. EcoR I an 和 *Hind* Ⅲ 双;酶切重组质粒 pTB30; 3. EcoR I 酶切重组质粒 pTB30m

图 1 重组质粒 pTB30m 的酶切鉴定

表 2 小鼠血清抗 PPDIgG 水平(A 值)

Groups	4 周	8 周
Ag85B-DNA/H37Ra	0.63±0.11*☆	0.97±0.26*
Ag85B-DNA/BCG	0.68±0.08*	0.66±0.18*
H37Ra	0.48±0.21*△	0.98±0.41*
BCG	0.48±0.27*	0.60±0.23*
Naive control	0.11±0.01	0.13±0.01

注: 免疫组与未免疫组比 *P<0.05, Ag85B-DNA/H37Ra 组 4 周与 8 周比*P<0.05, H37Ra 组 4 周与 8 周比△P<0.05

2), 发现所有组均显著高于未免疫组 (P<0.05), 且 DNA-85B/H37Ra 组和 H37Ra 组, 血清中抗 PPD IgG 水平 8 周显著高于 4 周(P<0.05)。

2.3 脾脏淋巴细胞转化试验

实验组 Ag85B-DNA/H37Ra 的小鼠脾淋巴细胞体外用 PPD 刺激, 可引起淋巴细胞显著增殖反应, 其 SI 均值超过未免疫组的两倍以上, 且比单独用 H37Ra 或 BCG 皮内接种组小鼠的增殖反应强 (P<0.05); 而与 Ag85B-DNA/BCG 组比较, 在 4 周有显著性差异(P<0.05); 在 Ag85B-DNA/H37Ra 组内, SI 随着免疫时间的延长而呈降低的趋势, 且 8 周显著低于 4 周(P<0.05)(见表 3)。

表 3 小鼠脾淋巴细胞转化试验(SI)

Groups	4 周	8 周
Ag85B -DNA /H37Ra	5.22±0.83*★※	3.64±0.23*★
Ag85B -DNA /BCG	3.87±0.74*★	3.45±0.08*★
H37Ra	3.42±0.10*★	3.14±0.13*★
BCG	3.08±0.37*★	3.22±0.39*★
Naive control	1.32±0.13	1.22±0.21

注: 免疫组与未免疫组比 *P<0.05, Ag85B-DNA/H37Ra 组与 H37Ra 组比 ★ P<0.05, Ag85B-DNA/H37Ra 组与 Ag85B-DNA/BCG 组比仅 4 周时高, Ag85B-DNA/H37Ra 组 4 周与 8 周比※P<0.05

3 讨论

序贯免疫策略又称初免-加强免疫策略(Prime-boost regimen)[6], 即是当单用一种疫苗产生的免疫效力不足时, 使用相同或不同的疫苗来重复免疫接种可增强疫苗的免疫效果, 其疫苗形式为初免-加强疫苗, 属于组合式疫苗。该领域最新的进展是运用传递系统和亚单位疫苗之间的不同组合, 以获得最佳平衡以及持续的抗各种传染病应答[7]。目前, 序贯免疫策略用于结核疫苗研究, 主要有 DNA/病毒载体系统组合、DNA/BCG 组合、重组菌/DNA 组合、BCG/DNA 组合以及 BCG/病毒载体组合等方式[1]。与用病毒载体来加强免疫比较, 用 BCG 活菌苗来加强免疫能够很大程度地增强 Th_1 型 CD_4^+T 细胞的应答, 而 Th_1 型 CD_4^+T 细胞是对抗 MTB 的关键[2]。

Ag85B 是刺激机体抗结核免疫重要的保护性靶抗原之一。本研究选用构建成功的 MTB 抗原 Ag85B 的真核表达质粒 DNA (pTB30m)[8,9] 作为 Ag85B-DNA/H37Ra 序贯免疫策略中的初次免疫疫苗, 初免 2 周后, 用 H37Ra 活菌苗皮内接种来进行加强免疫, 从而形成 Ag85B-DNA/H37Ra 组合式疫苗。H37Ra 由 H37Rv 传代减毒获得, 其毒力极弱。综合文献报道[3-6], H37Ra 具有毒力较低、能充分活化巨噬细胞、抗原性完整以及免疫性强、免疫效果略好于 BCG 等优势。本课题组已证实 H37Ra 免疫 C57BL/6 小鼠后, 其在体内至少可以存活 2 个月, 在易感宿主体内呈局限性生长, 并且在免疫 60 天后, 脾脏及肺脏定植的 H37Ra 显著多于 BCG[3]。

虽然体液免疫在抗结核中作用不大, 但是抗体是评价疫苗免疫原性的重要指标。对一种疫苗免疫

维普资讯 http://www.cqvip.com

效果的评定,需要测定机体的体液免疫反应和细胞免疫反应,只有这样才能全面地认识机体对结核感染的免疫应答。本研究结果表明,实验组 Ag85B-DNA/H37Ra 可以诱导小鼠产生特异性体液免疫和细胞免疫。免疫 4 周或 8 周后,小鼠血清中抗PPDIgG 水平显著高于未免疫组,且在 Ag85B -DNA/H37Ra 组和 H37Ra 组中,8 周显著高于 4 周(表 2)。这表明实验组 Ag85B -DNA/H37Ra 产生的抗体较持久,并随着时间的延长明显增高。也说明 H37Ra 单独免疫产生的抗体也较持久。而 Ag85B -DNA/BCG 组或 BCG 组的抗 PPD IgG 水平 8 周虽高于 4 周,但无显著性差异。所以,可以认为 Ag85B-DNA/H37Ra 组的组合较 Ag85B-DNA/BCG 组的组合更优越,可能与 H37Ra 比 BCG 的抗原性完整[5-6]等方面有关。

淋巴细胞增殖转化是观察细胞免疫功能的指标之一。免疫 4 周或 8 周后,本研究的实验组 Ag85B-DNA/H37Ra 的脾淋巴细胞 SI 均值超过未免疫组的两倍以上,且比单独用 H37Ra 或 BCG 皮内接种组小鼠的增殖反应较强;其与 Ag85B-DNA/BCG 组比较,在 4 周有显著性差异,而 8 周无显著性差异(见表 3)。这些结果表明,Ag85B-DNA 初次免疫后,再用 H37Ra 活菌苗加强免疫,小鼠脾淋巴细胞发生了显著的增殖转化,其结果优于 H37Ra 或 BCG 单独免疫,也略好于 Ag85B-DNA/BCG 组。

综上所述,Ag85B-DNA/H37Ra 序贯免疫策略可以诱导小鼠产生持久的高抗体水平和较强的细胞免疫应答,初步证明其免疫效果略优于 BCG,其初次免疫疫苗和加强免疫疫苗对于整个序贯免疫策略起到相辅相成的作用。Ag85B-DNA/H37Ra 组合式疫苗较 Ag85B-DNA/BCG 组合式疫苗的免疫应答稍好些,而且对于预防大多由 MTB 感染所致的 TB,H37Ra 具有 BCG 不可比拟的优越性。这些说明选用 H37Ra 来进行加强免疫更具潜力,但仍需要更全面地研究 Ag85B-DNA/H37Ra 组合式疫苗的免疫效果,从而为 TB 的防治开辟新途径。

(通讯作者:卢贤瑜,电话:68485813,E-mail:lxy0627@sina.com)

参 考 文 献

[1] 王锦彤,卢贤瑜.序贯免疫策略用于结核疫苗研究的进展[J].微生物学免疫学进展,2006;34(2):43-45.

[2] Feng CG,Palendira U,Demangel C,et al.Priming by DNA immunization augments protective efficacy of Mycobacterium bovis Bacille Calmette-Guerin against tuberculosis[J].Infect Immun,2001;69(6):4174-4176.

[3] 夏长胜,卢贤瑜,陈思静. 结核分枝杆菌 H37Ra 免疫小鼠后细菌在体内定植的研究[J].重庆医科大学学报,2005;30(4):561-563.

[4] 陶 昆,卢贤瑜. H37Ra 皮内接种对巨噬细胞的激活效应[J].中国人兽共患疾病学报,2006;22(3):232-235.

[5] Mostowy S,Cousins D, Brinkman J,et al.Genomic eletions suggest a phylogeny for the Mycobacterium tuberculsis complex[J].J Infect Dis,2002;186(1):74-80.

[6] Brosch R,Gordon SV,Marmiesse M,et al.A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex[J].Proc Natl Acad Sci USA,2002;99(6):3684-3689.

[7] 方海红.结核病疫苗新策略[J].国外医学-预防、诊断、治疗用生物制品分册,2003;26(5):207-210.

[8] 范雄林,徐志凯,李 元,等.结核分枝杆菌 Ag85B 成熟蛋白基因免疫[J].第四军医大学学报,2001;22(14):1283-1282.

[9] 范雄林,徐志凯,李 元,等.结核分枝杆菌 Ag85B 基因疫苗免疫保护作用的初步研究[J].细胞与分子免疫学杂志,2003;19(1):90-92.

(上接第 570 页)

1683-1693.

[5] OrlTle IM,Mcmurray DN,Belisel JT.Fuberculosis vaccinedevelopment:recent progress[J].Trends Microbiol,2001;9(3):115-118.

[6] 冯 涛, 何通川, 宋文鑫.HBX 基因重组腺病毒载体的构建[J].重庆医科大学学报,2004;29(3):273-275.

[7] HwangGY,LinCY,HuangLM, et al.Detection of the hepatitis B virus X protein(HBX)antigen and anti-HBX anti-HBX antibodies in case of human hepatocellular carcinoma[J].Clinical microbiology reviews,2003;41: 5598-5603.

[8] Koike k,Moriya K,Lino s,et al.High-level expression of hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis in transgenic mice [J].Hepatology,1994;19(4):810-819.

[9] Slagle BL,Lee TH,Median D,et al Increased sensitivity to the hepatocarcinogen diethylnitrosamine in transgenic mice carrying the hepatitis B virus X gene[J].Mol Carcinog,1996;15(4):261-269.

[10] Terradilos O,Billet O,Renard CA,et al. The hepatitis B virus X gene potentiates c-myc-induced liver oncogenesis in transgenic mice[J].Oncogene,1997;14(4):395-404.

[11] ChalifeM,Tu Y,EuskirchenG,et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J].Science,1994;263(5148):802-805.

[12] ChalifeM.Green fluorescent protein[J].Photochem photobiol,1995;62(4):6512-6656.