维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)04-0470-04

重组耻垢分枝杆菌经鼻粘膜免疫在小鼠体内的分布与表达

杨 春,何永林,伊正君,李俊明,李 娜,朱道银

(重庆医科大学基础医学院微生物学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨携带编码人天然颗粒溶素(GLS)和小鼠 IL-12 基因质粒(pZM03)的重组耻垢分枝杆菌经鼻粘膜免疫在小鼠体内的分布与表达。方法:将携带绿色荧光蛋白(GFP)基因质粒(pUV15)的重组耻垢分枝杆菌滴鼻 BALB/c 小鼠后 2 周,处死小鼠,观察肺、脾组织中荧光蛋白和耻垢分枝杆菌的分布;将携带 GLS 和 IL-12 质粒(pZM03)的重组耻垢分枝杆菌滴鼻免疫 BALB/C 小鼠 3 次,第 1 次免疫后 4 周,处死小鼠,用免疫组化检测肺、脾组织中 GLS 表达,用 ELISA 检测血清 IL-12 和肺泡灌洗液特异性 SIgA 的水平。结果:在 BALB/c 小鼠肺、脾组织中均检测到绿色荧光蛋白和耻垢分枝杆菌的分布,以及 GLS 的表达,并有血清 IL-12 水平升高和粘膜特异性 SIgA 的产生。结论:携带 GFP 的重组耻垢分枝杆菌可在肺和脾组织分布;携带 GLS 和 IL-12 的重组耻垢分枝杆菌经鼻粘膜免疫小鼠后,可引起呼吸道粘膜特异性抗菌免疫,以及 GLS 和 IL-12 的体内表达,为新型疫苗的研究奠定了基础。

【关键词】绿色荧光蛋白;GLS;IL-12;耻垢分枝杆菌;鼻粘膜免疫

【中国图书分类法分类号】R378.911 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-03-21

The distribution and expression of recombinant M. smegmatis in mice receiving intranasal immunization

YANG Chun, et al

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

【Abstract】*Objective:* To observe the distribution and expression of recombinant Mycobacterium smegmatis carrying the plasmid encoding human granulysin (GLS) and murine IL-12 by intranasal immunization in mice. *Methods:* BALB/C mice were intranasally immunized with recombinant M. smegmatis carrying the plasmid encoding green fluorescent protein (GFP). The distribution of GFP and recombinant Mycobacterium smegmatis in the lungs and spleens was detected 14 days after the first immunization. BALB/C mice were intranasally immunized three times with recombinant M. smegmatis carrying the plasmid encoding GLS and IL-12. 28 days after the first immunization, the expression of GLS in tissue, levels of IL-12 in serum and SIgA in BALF (bronchoalveolar lavage fluid) were detected with immunohistochemistry and ELISA respectively. *Results:* The distribution of GFP and recombinant Mycobacterium smegmatis in lung and spleen was detected. The expression of GLS, the increased of IL-12 in serum and the specific SIgA in BALF were found. *Conclusion:* The distribution of recombinant Mycobacterium smegmatis carrying the plasmid encoding of GFP in lung and spleen is detected. The specific anti-bacterium SIgA is generated. GLS and IL-12 are expressed in BALB/C mice after intranasal immunization with recombinant Mycobacterium smegmatis carrying the plasmid encoding GLS and IL-12. The results lay the foundation for new vaccine study.

【Key words】Green fluorescent protein; Granulysin; IL-12; Mycobacterium smegmatis; Intranasal immunization

耻垢分枝杆菌属于分枝杆菌属中的快速生长菌,具有与结核分枝杆菌相同菌体抗原成分,在一般情况下不致病,属于人体正常菌群。由结核分枝杆菌引起的结核病,近年来在我国的流行趋势日趋严重。特别是在各种原因(如 AIDS、衰老、肿瘤等)导致的免疫低下人群中形势更为严峻。在结核病的感染、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[1]。本研究将我室构建的携带编码 GFP 的质粒(pUV15),编码人天然颗粒溶素(Granulysin,GLS)和小鼠 IL-12 基因的真核共表达质粒(pZM03),分别电转到耻垢分枝杆菌,再滴鼻小鼠,观察 GFP 重组菌在体内的分布以及 GLS/IL-12 重组菌在体内的表达。为重组耻

作者介绍:杨 春(1964-),女,博士生,副教授,
主要研究方向:结核分枝杆菌感染与免疫。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30400375)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

垢分枝杆菌菌苗治疗小鼠结核杆菌感染的实验研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和试剂

携带人 GLS 基因和小鼠 IL-12 基因的质粒 pZM03 由本实验室构建并完成其在体外活性的鉴定[3]，含有绿色荧光蛋白的质粒 pUV15 重组耻垢分枝杆菌 mc²-155 均由本实验室构建，耻垢分枝杆菌 mc²-155 由 Torin 博士惠赠，耻垢分枝杆菌 ATCC607 由本实验室保存；质粒 DNA 小量抽提试剂盒、PCR 产物及凝胶回收试剂盒均购自上海华舜公司，羊抗人 GLS 抗体购自基因公司，即用型免疫细胞化学试剂盒购自武汉博士德，小鼠 IL-12 细胞因子酶联免疫吸附试验（ELISA）试剂盒购自 eBioscience 公司，PPD 标准品购自北京药品生物制品检定所，羊抗鼠 SIgA 购自 KPL 公司。

1.2 实验动物及分组

6～8 周龄，雌性 SPF 级 BALB/c 小鼠 21 只，体重 18～22g，其中 3 只用于观察分布；18 只随机分为 3 组，即重组耻垢分枝杆菌 ATCC607 菌苗组、pZM03 质粒组、生理盐水组，每组 6 只，用于观察 GLS、IL-12 和特异性 SIgA 水平。

1.3 携带 GFP 基因的重组耻垢分枝杆菌 mc²-155 在肺、脾组织的分布

用 1×10^6CFU/50μl 重组 mc²-155 滴鼻小鼠 2 次（分别为 0、4 天），第 1 次滴鼻后 2 周，处死小鼠，取右上肺叶和部分脾组织用 4%多聚甲醛固定，冰冻切片。荧光显微镜观察 GFP 在肺、脾组织中的分布，普通显微镜的油镜观察抗酸阳性菌在肺、脾组织中的分布。

1.4 重组耻垢分枝杆菌 ATCC607 的构建

将对数生长期的 ATCC607 菌株以预冷的 10%甘油在 4℃低温洗涤 3 次，取 90μl 细菌加入 10μl 纯化的 pZM03 质粒，轻轻混匀，冰浴 10min，转入预冷的 1mm 电转杯中，1800V、4ms 电击 1 次，迅速加入 500μl 苏通液体培养基。37℃孵育 3h 后涂布到含 Zeocin 40μg/ml 的苏通固体平板上，37℃孵育 72h 后挑取阳性菌落增菌后抽提质粒，同时取 1ml 菌液，离心弃上清，沉淀加入 500μl 三蒸水，100℃热裂解 8min，取上清 2μl 或质粒抽提物 1μl 为模板，分别作 GLS、IL-12 和 OriM 的 PCR 扩增。同时将鉴定的重组菌传代 5～10 代后再次以 PCR 法进行鉴定，以观察重组质粒的稳定性。

1.5 ATCC607 重组菌 GLS 基因在肺、脾组织的表达

用 ATCC607 重组菌 1×10^6CFU/50μl 滴鼻小鼠 3 次（分别为 0、4、14 天），第 1 次滴鼻后 4 周，引颈处死小鼠，取右上肺叶和部分脾组织用 4%多聚甲醛固定，石蜡包埋切片，作免疫组化。免疫组化操作按试剂盒说明进行。

1.6 小鼠血清 IL-12 的检测

滴鼻小鼠方法同 GLS，第 1 次滴鼻后 4 周，摘除小鼠眼球取血，分离血清，作定量 ELISA 测小鼠血清中 IL-12，操作步骤按试剂盒说明进行。

1.7 小鼠支气管肺泡灌洗液（BALF）的制备及检测

固定摘取脾组织的小鼠，无菌操作切开气管上皮组织，暴露气管，将连接 5 号采血针的注射器水平插入小鼠气管中，每只用 500μl 无菌生理盐水反复冲洗气管及肺泡 8 次，收集 BALF 置 -70℃待检。包被抗原为 PPD，二抗为羊抗鼠 SIgA，间接 ELISA 法检测 BALF 中特异 SIgA 抗体。

1.8 统计学分析

所有计量资料应用 SAS8.1 软件进行统计处理，采用单因素方差分析及 SNK 检验（q 检验），以 $P<0.05$ 判断有明显差异。

2 结 果

2.1 重组耻垢分枝杆菌 mc²-155 在肺、脾组织的分布

荧光显微镜观察到肺、脾组织中均有散在的绿色荧光，图 1 显示肺组织终末支气管上皮细胞的绿色荧光。



图 1 小鼠肺组织中分布的 GFP(×250)

用抗酸染色在肺、脾组织中可见红色的成团或散在的耻垢分枝杆菌，在肺组织中分布于肺间质（图 2）。

2.2 重组耻垢分枝杆菌 ATCC607 的构建及鉴定

以重组菌裂解物或质粒抽提物为模板，作 GLS、IL-12 和 OriM 的 PCR 扩增，各片段与理论预计值完全相符（图 3），重组菌传代 10 代后再次以 PCR 法进行鉴定，结果不变。

2.3 重组耻垢分枝杆菌 GLS 的表达

以羊抗鼠 GLS 抗体为抗体，用免疫组化检测到小鼠肺及脾组织中成褐色的 GLS 的表达，图 4 见肺终末支气管粘膜上皮细胞胞浆中褐色的 GLS。

维普资讯 http://www.cqvip.com

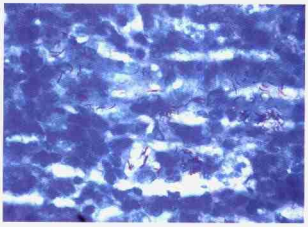
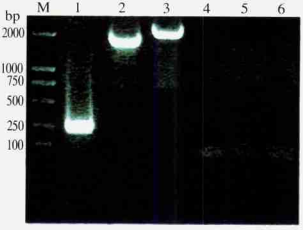


图 2 小鼠肺组织中分布的耻垢分枝杆菌
(抗酸染色,× 1000)



M:DNA Marker
1:GLS of 267bp 2:IL-12 of 1671bp
3:OriM of 1914bp 4～6:Control

图 3 携带 pZM03 质粒的重组分枝杆菌
ATCC607PCR 鉴定结果



图 4 小鼠肺组织中表达的 GLS(免疫组化染色,×100)

2.4 小鼠血清 IL-12 的测定

重组耻垢分枝杆菌组 IL-12 水平明显高于 pZM03 质粒组和生理盐水对照组($P<0.05$, $P<0.01$),pZM03 质粒组明显高于生理盐水对照组($P<0.05$)。

表 1 鼻粘膜免疫小鼠后血清 IL-12 水平比较(pg/ml)

组 别	鼠数	IL-12($\bar{x}\pm s$)
重组耻垢分枝杆菌	6	117.17 ± 0.61ab
pZM03质粒	6	39.82 ± 0.75c
生理盐水	6	15.18 ± 0.41

注:a 与质粒组比较 $P<0.05$,b 与生理盐水组比较 $P<0.01$;c 与生理盐水组比较 $P<0.05$。

2.5 小鼠支气管肺泡灌洗液 PPD 特异 SIgA 的测定

重组耻垢分枝杆菌菌苗经鼻粘膜免疫后,重组耻垢分枝杆菌组 OD 值明显高于生理盐水对照($P<0.01$)。

表 2 鼻粘膜免疫小鼠后支气管肺泡灌洗液 SIgA 的变化

组 别	鼠数	OD of SigA($\bar{x}\pm s$)
重组耻垢分枝杆菌	6	0.928 ± 2.125 a
生理盐水	6	0.372 ± 1.043

注:a 与生理盐水组比较 $P<0.01$。

3 讨 论

耻垢分枝杆菌属于分枝杆菌属中快生长菌,一般 2～3 天长出典型粗糙型菌落,而结核分枝杆菌及卡介苗(BCG)需要 14～28 天。耻垢分枝杆菌和结核分枝杆菌有相同菌体抗原成分,但毒力很低甚至无毒,在一般情况下不致病。Young 等[4]将 TNF-α 修饰的耻垢分枝杆菌作为免疫治疗剂用于治疗膀胱癌取得良好效果。本研究试图利用耻垢分枝杆菌上述特点作为减毒载体,分别携带 GFP 和 GLS/IL-12,滴鼻进入小鼠体内,观察 GFP 重组耻垢分枝杆菌在小鼠在体内的分布,及 GLS 和 IL-12 能否在小鼠体内表达。

粘膜免疫是抵御从粘膜途径入侵的外来物质的第一道防线,在保护性免疫有重要作用。结核分枝杆菌是主要通过呼吸道传播的病原体,而无论是人类还是啮齿动物,其鼻咽部和气管都存在固有的淋巴组织和淋巴结,它们在启动粘膜相关的抗感染免疫方面扮演重要角色。Chen 等对比同等剂量(5×10^6CFU)的 BCG 皮下接种和滴鼻途径在 BALB/c 小鼠产生的免疫和抵御 H37RV 攻击的保

维普资讯 http://www.cqvip.com

护效果，得出滴鼻途径在保护肺组织方面更有效[3]。很多研究显示，机体存在共同粘膜免疫系统，即在某一局部粘膜免疫可引起远端的其它粘膜免疫应答。鼻粘膜免疫与口服免疫、生殖道免疫、直肠免疫等相比有以下优势：对抗原剂量要求低，因不受消化道 pH 低和酶分解的影响；能诱导有效的呼吸道和全身免疫应答；操作简单，易接受等[5]。本实验结果实验组针对 PPD 产生特异 SIgA 明显高于对照组，证实通过滴鼻途径能产生特异性粘膜免疫。鼻粘膜免疫为结核病预防和治疗提供新的思路。

IL-12 是一种功能强大的 Th1 型免疫反应诱导剂，外源给予 IL-12 可产生 Th2 免疫状态向 Th1 型免疫状态的偏转。Pollock 等[6]发现能够促进 Th2 反应和强烈 IgE 反应的 CPB2.8 抗原当与 IL-12 共同免疫小鼠时，依旧能够引发出 Th1 型反应并与一定程度上的保护作用有关。江山等[7]将共表达小鼠单链 IL-12 与分枝杆菌保护性抗原 Ag85B 的真核质粒免疫小鼠，可诱导机体产生更加有效的免疫保护作用。同时 IL-12 对维持一定数量的 Th1 记忆细胞也是必需的[8]。本实验结果重组耻垢分枝杆菌经鼻粘膜免疫后，可引起血清中 IL-12 水平增高，与单用质粒和生理盐水组相比差别有显著意义。

GLS 是人类 NK 细胞和 CTL 细胞胞浆颗粒中可溶性分子，是一种天然的抗菌肽，具有抗病原微生物、抗肿瘤等多种生物活性。研究发现 GLS 在体外高效杀伤多种靶细胞，如在体外试验 72h 内可直接杀死结核杆菌达 90%以上，在穿孔素辅助下进入巨噬细胞后还可对胞内吞噬的细菌进行有效杀伤[9]。同时体内 GLS 的水平与机体的细胞免疫状态直接相关，细胞免疫功能低下时体内 GLS 表达缺乏。Ogawa 等[10]认为血清 GLS 的水平是评价机体细胞免疫功能状态的新指标。目前国内外未见报道小鼠能分泌鼠 GLS。故我们用免疫组化检测到小鼠肺、脾组织中有人 GLS，即可认定人 GLS 在小鼠体内表达。

本实验先将携带 GFP 的重组耻垢分枝杆菌滴鼻，观察其在小鼠体内主要分布于肺和脾，为 GLS/IL-12 重组耻垢分枝杆菌能否在体内的表达等进一步研究打下基础。实验证明携带 GLS 和 IL-12 的重组耻垢分枝杆菌经滴鼻免疫小鼠，在肺和脾组织有 GLS 的表达，血清中 IL-12 的含量增高。利用耻垢分枝杆菌与结核分枝杆菌具有相同菌体抗原可激发宿主针对结核杆菌的特异性细胞免疫，而 IL-12 可激发宿主针对结核杆菌的非特异性细胞免疫，两者共同作用使机体的免疫状态以 Th1 细胞免疫为主，有利于间接清除体内的结核杆菌。GLS 在小鼠体内表达一方面可杀灭胞内潜伏的结核杆菌，另一方面增强机体细胞免疫。实验结果证实重组耻垢分枝杆菌可通过滴鼻产生针对特异抗原粘膜免疫和特异性抗菌免疫；GLS 和 IL-12 可通过粘膜免疫在小鼠体内表达，发挥相应作用，为进一步开发重组分枝杆菌治疗结核病打下实验基础。

参 考 文 献

[1] Ottenhoff TH, Verreck FA, Lichtenauer-Kaligis EG, et al. Genetics, cytokines and human infectious disease: lessons from weakly pathogenic mycobacteria and salmonellae[J]. Nature Genetics, 2002 ; 32(1):97-105.

[2] 伊正君，朱道银，陈 全，等.人颗粒溶素与小鼠单链 IL-12 真核共表达质粒的构建及其在 RAW264.1 细胞中的表达[J].中国人兽共患病杂志，2005；21（11）：936-939.

[3] Chen LH, Wang J, Anna Z, 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.

[4] Young SL , Murphy M , Zhu XW, et al. Cytokine-modified Mycobacterium smegmatis as a novel anticancer immunotherapy [J].Cancer, 2004；112:653-660.

[5] McGhee JR, Lamm ME, Strober W. Mucosal immune responses, in: P.L. Ogra, Mestecky. J, Lamm. ME, Strober. W, Bienenstock. J, McGhee. JR (Eds.), Mucosal Immunology[M]. Vol. 2. Academic Press., San Diego, CA, 1999.485-506.

[6] Pollock KG, McNeil KS, Mottram JC, et al.The Leishmania mexicana cysteine protease, CPB2.8, induces potent Th2 responses[J]. J Immunol, 2003；170(4): 1746-1753.

[7] 江 山，朱道银，骆旭东，等. 结核分枝杆菌 Ag85B 与 IL-12 基因真核共表达质粒的构建及表达 [J]. 细胞与分子免疫学杂志，2004；20(6):664-666.

[8] Seder RA, Hill AV.Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity [J]. Nature, 2000；406（6797）：793-798.

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

[10] Ogawa K, Takamori Y.Granulysin in human serum as a marker of cell-mediated immunity[J]. European Journal Immunology, 2003；33 (7): 1925-1033.