维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)04－0561－03

结核分枝杆菌 H37Ra 免疫小鼠后细菌在体内定植的研究

夏长胜,卢贤瑜,陈思静

(重庆医科大学检验系临床免疫学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:了解 H37Ra(人型结核分枝杆菌标准无毒株)免疫小鼠后在体内生长情况。方法:将 H37Ra 和 BCG 分别皮内接种 C57BL/6 小鼠,免疫后 15 天、30 天及 60 天,取稀释小鼠脾脏和肺脏匀浆接种罗氏培养基,培养 18 天后计菌落数(CFU)。结果:免疫后 15 天、30 天及 60 天,H37Ra 在小鼠脾脏、肺脏定植的平均 Log_{10}CFU 为 1.95、1.57、2.54 和 1.37、1.08 及 0.94;BCG 在小鼠脾脏、肺脏定植的平均 Log_{10}CFU 则为 1.72、1.39、1.06 和 1.16、0.96 及 0.50。免疫后 15 天及 30 天,脾脏及肺脏定植的 H37Ra 和 BCG 无显著性差异($P>0.05$);免疫后 60 天,脾脏及肺脏定植的 H37Ra 显著多于 BCG($P<0.05$)。H37Ra 和 BCG 在脾脏定植的细菌数显著多于肺脏($P<0.05$)。结论:H37Ra 在 C57BL/6 小鼠体内至少可以存活 2 个月。

【关键词】H37Ra;BCG;结核;疫苗

【中国图书分类法分类号】R378.911 【文献标识码】A 【收稿日期】2004－05－10

Growth of mycobacterium tuberculosis H37Ra in the organs of mice after immunization

XIA Changsheng, et al

(*Department of Clinical Laboratory Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the growth of H37Ra in the spleen and lung of mice. *Methods*: C57BL/6 mice were subcutaneously immunized with H37Ra and BCG respectively. At various intervals (15 days, 30 days, 60 days) after immunization, the spleen and lung of mice were isolated, dissociated and suitable dilutions of the homogenates were plated on Lowenstein－Jensen medium. The numbers of CFU were counted 18 days after incubation. *Results*: H37Ra (mean Log_{10}CFU) locating in the spleen were 1.95, 1.57 and 2.54; those growing in the lung were 1.37, 1.08 and 0.94. The number of BCG locating in the spleen were 1.72, 1.39 and 1.06; those growing in the lung were 1.16, 0.96 and 0.50. At fifteenth and thirtieth days after immunization, the number of H37Ra and BCG locating in the spleen or lung did not show any significant difference ($P>0.05$). But at sixtieth day after immunization, the number of H37Ra growing in the spleen or lung was significantly larger than those of BCG($P<0.05$). The number of H37Ra or BCG locating in the spleen were significantly larger than those growing in the lung($P<0.05$). *Conclusion*: H37Ra can exist at least for two months in the spleen and lung of C57BL/6 mice.

【Key words】H37Ra; BCG; Tuberculosis; Vaccine

据世界卫生组织报道,全球每年约有 200 万人死于结核病,800 万新发病例。由于传统的 BCG 预防效果不甚理想(0～80%),因而迫切需要研制一种更加安全、有效的结核疫苗。近年来众多学者研究了结核亚单位疫苗及 DNA 疫苗,但至今几乎没有一种疫苗能达到 BCG 的免疫效果。结核病免疫属于传染性免疫,选活菌作为疫苗有其独特的作用。结核活疫苗在体内存活繁殖时间较长,抗原可以持续刺激免疫系统,从而可引发持久的免疫应答。H37Ra 系 Steeken 等于 1934 年从 H37 中分离获得,基本上保留了有毒株的免疫原性,对人毒力极弱。文献报道 H37Ra 具有 BCG 缺失的一些抗原,如 ESAT－6 及 CFP－10 抗原等。其中 ESAT－6 具有良好的免疫原性[1]。此外,人类结核病的病原菌主要是结核分枝杆菌(约 90%),而非牛分枝杆菌(3.8%－16%),故 H37Ra 对机体抗结核的保护作用是否强于 BCG,已受到学者的关注。但 H37Ra 能否在活体内定植生长是免疫成功的关键,本研究对此进行了探讨。

作者介绍:夏长胜(1979－),男,硕士生,
主要研究方向:结核病的免疫与预防。

基金项目:重庆医科大学科技创新基金(CX200204)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 H37Ra 为北京药品生物制品检定所提供,菌号:93020。BCG 为上海生物制品研究所产品;批号:2003010101。

1.1.2 培养基 罗氏培养基和苏通培养液均参照张敦熔主编的《现代结核病学》配制。

1.1.3 动物 8~10 周龄、体重在 20±2g 的 C57BL/6 雄性小鼠,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 细菌制备 H37Ra 菌种用 0.5ml 的生理盐水和苏通培养液(体积比为 1:3)混合液体稀释,BCG 疫苗每支用专用稀释液 0.5ml 稀释,分别接种于罗氏培养基斜面上。培养 18 天后分别取罗氏培养基上生长良好的 H37Ra 和 BCG 约 20mg 于磨菌器中,加少量含 0.05% Tween-80 的生理盐水研磨均匀,生理盐水稀释成 1mg/ml 菌悬液(活菌浓度约为 1.0×10^7/ml)。

1.2.2 动物接种 C57BL/6 小鼠随机分为 2 组,每组 18 只。1 组为 H37Ra 接种组(试验组):每只小鼠尾根部皮内接种制备好的 H37Ra 菌液 0.1ml;2 组为 BCG 接种组(对照组):每只小鼠尾根部皮内接种 BCG 菌液 0.1ml。

1.2.3 细菌在器官内定植实验 分别于免疫后第 15、30、60 天,取 H37Ra 及 BCG 免疫小鼠各 6 只。采用颈椎脱臼法处死小鼠后用 75% 酒精消毒小鼠体表 5min。注意防止酒精进入小鼠的口鼻内。无菌条件下,解剖小鼠,分离出脾脏和肺脏。于组织匀浆器上磨碎脾脏和肺脏,用苏通培养液补足体积至 1ml。分别吸取 0.1ml 脏器匀浆标本接种罗氏培养基,使其均匀平铺于培养基斜面(每个脏器标本接种 5 支培养基),置 37℃ 培养箱中,培养 18 天后计菌落数。以 5 支罗氏培养基上得出的总菌落数乘以 2 为该脏器的细菌定植数。

1.3 统计分析

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

免疫后,小鼠脾脏、肺脏内的细菌定植情况见表 1 或图 1 和图 2。从表中可见:(1)免疫后 15 天,脾脏和肺脏内定植的 H37Ra 平均 Log_{10}CFU 分别为 1.95 和 1.37,BCG 则为 1.72 和 1.16。脾脏及肺脏内定植的 H37Ra 和 BCG 菌数无显著性差异($P>0.05$)。(2)免疫后 30 天,脾脏和肺脏内定植的 H37Ra 平均 Log_{10}CFU 分别为 1.57 和 1.08,BCG 则为 1.39 和 0.96。脾脏及肺脏内定植的 H37Ra 和 BCG 菌数无显著性差异($P>0.05$)。(3)免疫后 60 天,脾脏和肺脏内定植的 H37Ra 平均 Log_{10}CFU 分别为 2.54 和 0.94,BCG 则为 1.06 和 0.50。H37Ra 在脾脏和肺脏内定植的细菌数显著多于 BCG($P<0.05$)。(4)脾脏内定植的 H37Ra 和 BCG 显著多于肺脏($P<0.05$)。

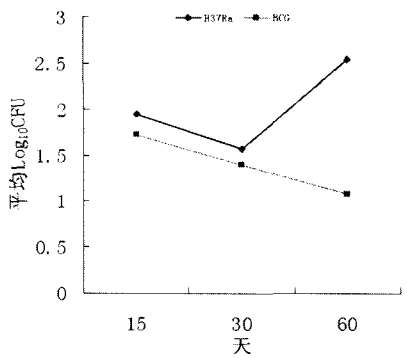


图 1 免疫后不同时间细菌在小鼠脾脏内的定植

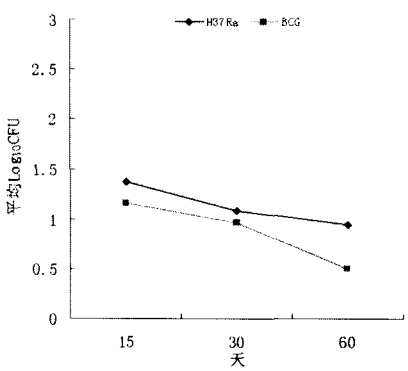


图 2 免疫后不同时间细菌在小鼠肺脏内的定植

表 1 细菌在小鼠脾脏和肺脏内的定植

免疫天数	平均 Log10CFU(SD)			
	H37Ra		BCG	
	脾脏	肺脏	脾脏	肺脏
15	$1.95\pm0.15^{*}$	1.37 ± 0.13	$1.72\pm0.05^{*}$	1.16 ± 0.12
30	$1.57\pm0.10^{*}$	1.08 ± 0.03	$1.39\pm0.09^{*}$	0.96 ± 0.15
60	$2.54\pm0.31^{*\star}$	$0.94\pm0.04^{\triangle}$	$1.06\pm0.03^{*\triangle}$	0.50 ± 0.12

注:* 同期脾脏与肺脏内定植的 H37Ra 或 BCG 的比较 $P<0.05$;☆脾脏内定植 H37Ra 与 BCG 的比较 $P<0.05$;△肺脏内定植 H37Ra 与 BCG 的比较 $P<0.05$。

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨 论

结核分枝杆菌是胞内寄生菌,结核病的免疫主要依靠细胞免疫。理想的结核疫苗接种后应在体内有一定的生长繁殖能力,并在宿主体内存在较长时间。这样才可持续刺激机体产生免疫应答。BCG作为唯一被推广使用的结核疫苗已经有80余年的历史。但由于BCG在长期传代过程中逐渐丢失一些保护性抗原以及非典型分枝杆菌感染的干扰等原因,使得BCG预防结核的效果在全世界不同国家和地区有很大的差异。因此寻找一种更加安全、有效的结核疫苗是预防结核病蔓延的必然要求。国外研究表明,H37Ra的抗原较完整,免疫原性良好[2~4]。Williams等[5]发现BCG免疫动物抵抗牛分枝杆菌攻击的保护效果优于抵抗结核分枝杆菌的攻击。因而对于预防大多由结核分枝杆菌感染所致的结核病来说,H37Ra具有BCG不可比拟的优越性。

活疫苗必备的基本条件之一是要能在宿主体内定植,且定植时间的长短应能诱导宿主发生记忆免疫。曾有报道H37Ra不易在宿主体内繁殖[6]。为了研究H37Ra在小鼠体内定植的情况,我们用BCG免疫小鼠作为对照。通过实验发现H37Ra在小鼠脾脏内的生存时间超过两个月。这表明H37Ra可在小鼠脾脏内长期生存。小鼠脾脏富含淋巴细胞,因此H37Ra可长期刺激小鼠的免疫系统,从而引发持久的记忆免疫[7]。与脾脏内的定植相似,H37Ra可在小鼠肺脏内长期定植。但H37Ra和BCG同期在脾脏中定植的细菌数超过肺脏中定植的细菌数。此结果可能与脾脏和肺脏的解剖学特点及功能相关。H37Ra和BCG分别经皮内接种小鼠后,局部的巨噬细胞发挥第一线防御作用——将它们吞噬。在H37Ra和BCG免疫小鼠的初期,由于体内无抗结核分枝杆菌的特异性免疫,因而巨噬细胞不能立即杀灭胞内吞噬的H37Ra或BCG。这些巨噬细胞经淋巴血液循环将H37Ra或BCG播散至全身。脾脏是小鼠重要的外周免疫器官,同时它又是血细胞的"滤过器",因而大多吞噬了H37Ra或BCG的巨噬细胞会停留在脾脏中,它们通过与T淋巴细胞相互作用,从而诱发特异性的免疫应答。H37Ra及BCG尚具有一定的毒力,因而可在小鼠脾脏中继续繁殖一段时间。小鼠的肺脏不是免疫器官,因此只有少量吞噬了H37Ra或BCG的巨噬细胞经血循环定居于肺脏,所以肺脏中定植的H37Ra或BCG较少。总之,实验表明了H37Ra可在C57BL/6小鼠脾脏和肺脏至少存活2个月。

参 考 文 献

[1] Ravn P, Demissie A, Eguale T, et al. Human T cell responses to the ESAT-6 antigen from Mycobacterium tuberculosis[J]. J Infect Dis, 1999;179(3):637-645.

[2] Dhiman N, Khuller GK. Immunoreactivity of peptides generated by limited proteolysis of 71-kDa cell wall protein of Mycobacterium tuberculosis H37Ra using PLG-microparticles [J]. Lett Appl Microbiol, 2000;30(5):345-350.

[3] Dhiman N, Khuller GK. Immunoprophylactic properties of 71-kDa cell wall-associated protein antigen of Mycobacterium tuberculosis H37Ra[J]. Med Microbiol Immunol(Berl), 1997;186(1):45-51.

[4] Sinha RK, Verma I, Khuller GK. Immunobiological properties of a 30 kDa secretory protein of Mycobacterium tuberculosis H37Ra[J]. Vaccine, 1997;15(6-7):689-699.

[5] Williams A, Davies A, Marsh PD, et al. Comparison of the protective efficacy of bacilli Calmette-Guerin vaccination against aerosol challenge with Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis[J]. Clin Infect Dis, 2000;30(S3):S299-301.

[6] 卢锦汉,张以浩,赵 凯,等,主编. 医学生物制品学[M]. 第1版. 北京:人民卫生出版社,1995;392.

[7] 陶 昆,卢贤瑜、成海恩,等. 结核菌H37Ra免疫小鼠后PPD刺激淋巴细胞增殖转化的探讨[J]. 重庆医科大学学报,2005;30(1):82-84.