维普资讯 http://www.cqvip.com



文章编号:0253－3626(2005)02－0200－03

# 结核菌 H37Ra 免疫小鼠后巨噬细胞 TNF－α 表达的初步探讨

陶　昆[1]，卢贤瑜[1]，成海恩[2]

(1.重庆医科大学检验系临床免疫学教研室，重庆　400016；2.重庆医科大学基础医学院分子生物学教研室，重庆　400016)

【摘　要】目的：探讨小鼠接种结核菌 H37Ra 株后，巨噬细胞表达 TNF－α 的活性情况。方法：H37Ra 皮内、腹腔途径免疫小鼠后第 30、60 天，采用生物学活性方法检测小鼠腹腔巨噬细胞表达的 TNF－α 活性。结果：小鼠接种 H37Ra 后，30 天时 TNF－α 活性分别为 22.06U/ml(腹腔)和 22.63U/ml(皮内)；60 天时 TNF－α 的活性分别为 36.76U/ml(腹腔)和 33.78U/ml(皮内)，明显高于未免疫组($P<0.01$)；与 BCG 皮内免疫组比较，30 天时无显著性差异($P>0.05$)，60 天时有明显差异($P<0.05$)。结论：H37Ra 免疫小鼠后能诱导机体产生 TNF－α。

【关键词】H37Ra；肿瘤坏死因子 α；结核分枝杆菌；巨噬细胞

【中国图书分类法分类号】R378.911　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2004－09－09

# Expression of TNF－α from celiac macrophage after immunization of H37Ra in mice

*TAO Kun, et al*

(*Department of Clinical Immunology, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the activity of tumor necrosis factor－α(TNF－α) from celiac macrophage after immunization of H37Ra in mice. *Methods*: The activity of TNF－α from celiac macrophage was measured by biological method at 30th day and 60th day after subcutaneous immunization and celiac immunization of H37Ra in mice. *Results*: After immunization of H37Ra in mice, the activity of TNF－α by celiac immunized route and subcutaneous immunized route was 22.06U/ml and 22.63U/ml respectively at 30th day; and it was 36.76U/ml and 33.78U/ml respectively at 60th day. The activity of TNF－α immunized with H37Ra at 30th day and 60th day was much higher than that of non－immunization group($P<0.01$). There was no statistically significant difference between H37Ra immunization group and BCG immunization group at 30th day($P>0.05$), however, the activity of TNF－α in H37Ra immunization group was much higher than that in BCG immunization group at 60th day($P<0.05$). *Conclusion*: H37Ra can induce TNF－α.

【Key words】H37Ra; Tumor necrosis factor－α; Mycobacterium tuberculosis; Macrophage

结核病(Tuberculosis，TB)是目前威胁人类的三大感染性疾病之一，全世界有 20 亿人感染过结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis，MTB)，每年约有 800 万新结核病患者产生。近年来，随着人口流动的增加，多重耐药菌株的流行，以及 MTB 和 HIV 的双重感染，导致结核的发病率和死亡率大幅度上升。结核病的预防和治疗再次受到全世界的广泛关注。近年发现，在结核的预防中，BCG 疫苗的保护效果有较大的差异，从 0～80％不等[1]，且主要对小儿结核病的预防有效，对成人结核病的预防效果不理想，原因之一是 BCG 菌株的变异使其保护性抗原丢失，其次与非典型分枝杆菌的感染有关。因此，发展新疫苗控制结核病的传播已成为十分紧迫的任务。H37Ra 是人型结核杆菌有毒株 H37Rv 减毒而来的无毒株，据报道[3～6]，H37Ra 比 BCG 具有更完整的免疫原性，国外也在关注 H37Ra 是否可研制成结核疫苗。肿瘤坏死因子 α(TNF－α)是一种多功能的细胞因子，它能显著诱导巨噬细胞抑制结核杆菌生长，还可诱导 IFN－γ、IL－12 等多种细胞因子产生间接调节免疫细胞的活性，增强特异性免疫保护功能。本研究主要观察 H37Ra 免疫小鼠后腹腔巨噬细胞表达 TNF－α 的活性情况，从而为结核病的预防提供新的疫苗。

作者介绍：陶　昆(1969－　)，女，讲师，硕士，主要研究方向：结核免疫及疫苗。

基金项目：重庆医科大学创新基金资助项目(CX200204)。

维普资讯 http://www.cqvip.com



## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

C57BL/6 小鼠由重庆医科大学实验动物中心提供。

### 1.2 主要试剂

H37Ra 菌购自北京菌种保藏中心，编号为 93020－5；BCG 购自成都生物制品研究所，批号为 2002010101；L929 细胞株，重庆医科大学超声研究所购买；放线菌素 D 购自上海新亚药业有限公司，编号为 008024；TNF－α 标准品购自晶美公司，PEPRO TECH, INC；结核分枝杆菌纯蛋白衍生物 PPD 浓缩品，购自成都生物制品研究所，批号为 2001－1，1600μg/ml。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 H37Ra 菌的准备

取北京菌种保藏中心购买的 H37Ra 株用 0.5ml 生理盐水和改良苏通培养液(体积比为 1:3)混合稀释，接种于罗氏培养基上，待其长出菌落后，转种 1 次，刮取生长好的菌落进行称重、研磨，制成细菌悬液，取一部分接种罗氏培养基，进行活菌计数；另一部分保存备用。

#### 1.3.2 BCG 菌液的制备

每 1 安瓿用 BCG 专用溶解液 1ml 溶解。

#### 1.3.3 小鼠的免疫

取 C57BL/6 小鼠 64 只，随机分成 4 组：

①H37Ra 腹腔接种组：取小鼠 16 只，于每只小鼠腹腔注射 H37Ra 菌 0.1ml(活菌浓度为：50 万个/ml)。

②H37Ra 皮内接种组：取小鼠 16 只，于每只小鼠尾根部皮内注射 H37Ra 菌 0.1ml，使其产生皮丘。活菌浓度同上。

③BCG 皮内接种组：取小鼠 16 只，于每只小鼠尾根部皮内注射 BCG 0.1ml，使其产生皮丘。

④未免疫组：同种小鼠 16 只随养。

#### 1.3.4 腹腔巨噬细胞的准备及上清液的培养

在免疫后第 30 天、60 天，分别取 H37Ra 腹腔接种组、H37Ra 皮内接种组、BCG 皮内接种组及未免疫组小鼠各 8 只，拉颈处死，75%酒精浸泡 30min。无菌打开腹腔，以预冷的无血清 RPMI1640 灌洗腹腔细胞，2500rpm/min 离心 20min，弃上清液，沉淀以无血清 RPMI1640 洗 2 次，调整细胞浓度至 $2\times10^6$/mL[10]。于 96 孔培养板内，每孔加入上述细胞悬液 100μl，含 10%小牛血清的 1640 培养液 100μl，PPD 20μl(浓度为 550μg/ml，每孔终浓度为 12.5μg)，37℃、5% $CO_2$ 温箱孵育 48h 后收集上清备用。

#### 1.3.5 小鼠腹腔巨噬细胞表达 TNF－α 活性的测定

参照文献[2]采用 MTT 法，取对数生长期的 L929 细胞，用 0.01%的胰蛋白酶消化，调整细胞浓度至 $2\times10^5$/ml。取 96 孔板，每孔加入 L929 细胞悬液 100μl，置 37℃，5% $CO_2$ 温箱孵育。24h 后，弃去细胞培养上清，于每孔板中分别加入 100μl 倍比稀释的待测样品(上清液)和 TNF－α 标准品(均设双复孔，同时设阴性、空白对照孔)，并分别加入 10μl 放线菌素 D(1μg/ml)，37℃、5% $CO_2$ 温箱培养 12h 后于每孔中加入 10μl MTT(5mg/ml)，37℃下再孵育 4h，离心弃上清，每孔加入 HCl 异丙醇 100μl，混匀，测 570nm A 值。

$$细胞死亡率\% = \left(1 - \frac{实验组\ A\ 值 - 空白组\ A\ 值}{对照组\ A\ 值 - 空白组\ A\ 值}\right) \times 100\%$$

计算出导致 50%细胞死亡的最大稀释倍数，绘制标准曲线，根据标准曲线，求出待测样品 TNF－α 的活性单位。

### 1.4 统计学处理

采用方差分析和 $q$ 检验。

## 2 结 果

小鼠接种 H37Ra 和 BCG 后，腹腔巨噬细胞 TNF－α 的表达情况

**表 1 免疫及未免疫组腹腔巨噬细胞 TNF－α 的表达**

| 组别 | TNF－α 活性(U/ml) | |
|---|---|---|
| | 免疫 $30^{th}$day | 免疫 $60^{th}$day |
| H37Ra 腹腔 | $22.06^{*\#}$ | $36.76^{\&=}$ |
| H37Ra 皮内 | $22.63^{*\#}$ | $33.78^{\&=}$ |
| BCG 皮内 | 20.16 | 25.40 |
| 未免疫 | 11.36 | 13 |

注 *：与 30 天 BCG 皮内组相比，$P>0.05$；&：与 60 天 BCG 皮内组相比，$P<0.05$；#：与未免疫组相比，$P<0.01$

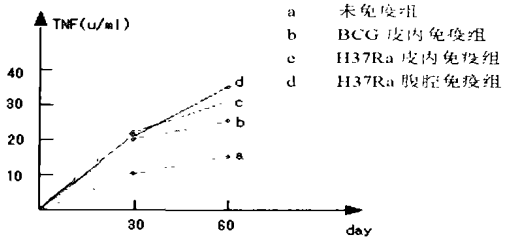



**图 1 免疫及未免疫组腹腔巨噬细胞 TNF－α 的表达**

从表 1 中可见，小鼠接种 H37Ra 菌后，腹腔和皮内免疫组 30 天时巨噬细胞表达的 TNF－α 活性分别为 22.06U/ml 和 22.63U/ml；60 天时表达的 TNF－α 活性分别为 36.76U/ml 和 33.78U/ml。30 天和 60 天表达的 TNF－α 活性均远远高于未免疫组，差异具有显著性($P<0.01$)；与 BCG 皮内组(30 天和 60 天分别为 20.16U/ml 和 25.40U/ml)比较，在 30 天时，差异无显著性($P>0.05$)；在 60 天时，H37Ra 腹腔和皮内接种组表达的 TNF－α 活性高于 BCG 组($P<0.05$)。此外，H37Ra 的腹腔和皮内接种组之间，在 30 天时没有显著性差异；60 天时腹腔组产生的 TNF－α 略高于皮内组，差异也无显

维普资讯 http://www.cqvip.com



著性($P>0.05$)。

从图 1 可以看出,随着免疫时间的延长,巨噬细胞表达的 TNF－α 水平也随之升高,各组在 60 天时表达的 TNF－α 水平均高于 30 天时相应各组。

## 3 讨 论

众所周知,目前结核的预防主要是用 BCG (Bacillus Calmette－Guerin,卡介苗—牛型结核杆菌减毒株)。BCG 作为结核疫苗应用已有 80 多年历史,但近年来发现 BCG 的免疫效果不稳定,其主要原因之一可能是 BCG 在长期的传代过程中,菌株的变异使其保护性抗原丢失。目前各种新型结核疫苗的研究不断出现,如蛋白质亚单位疫苗、DNA 疫苗等。由于结核分枝杆菌是典型的胞内寄生菌,结核病的免疫主要依靠细胞免疫,故全菌免疫优于蛋白质亚单位疫苗、DNA 疫苗。同时近年来研究发现,活菌疫苗的免疫原性要比死疫苗的免疫原性强得多: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而产生抗结核的特异性免疫。因此,是否可用减毒活疫苗 H37Ra 来替代 BCG 及其它疫苗是值得研究的[11]。

H37Ra 是人型结核杆菌减毒株,它毒力极弱,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,并可能包含一些 BCG 中丢失的抗原成分[3~6]。国外研究也表明,H37Ra 的免疫效果优于 BCG。Williams 等[7]发现 BCG 免疫动物抵抗牛结核分枝杆菌攻击的保护效果优于抵抗结核分枝杆菌的攻击,因而对于预防大多数由结核分枝杆菌感染所致的结核病来说,H37Ra 有其不可比拟的优越性。

为深入探讨机体对结核菌 H37Ra 的抗菌机理,我们选取 TNF－α 作为观察指标之一。肿瘤坏死因子 α(Tumor Necrosis Factor,TNF－α)是一种多功能的细胞因子,主要由激活的巨噬细胞和 T 细胞产生。它能显著诱导巨噬细胞抑制结核杆菌生长,并引起机体产生有效的肉芽肿应答[8];同时,TNF－α 可诱导 IFN－γ、IL－12 等多种细胞因子产生间接调节免疫细胞的活性,增强特异性免疫保护功能。此外,TNF－α 还能促进感染结核杆菌的巨噬细胞凋亡,从而阻止病菌在细胞内的传播。但 TNF－α 作为一种多效性的细胞因子具有双向性作用:在其水平过高时反而会引起组织坏死、机体恶病质和消瘦,并导致炎症的级联反应。因此,TNF－α 在结核杆菌感染中对机体是起保护作用还是起破坏作用取决于感染位点 TNF－α 量的多少[9]。

本实验中,我们以 BCG 作为对照,比较了不同途径(腹腔和皮内)接种 H37Ra 后,小鼠腹腔巨噬细胞 TNF－α 的表达情况。结果表明,无论小鼠是通过皮内或腹腔哪种途径接种 H37Ra,其腹腔巨噬细胞表达的 TNF－α 活性均明显高于未免疫组($P<0.01$),说明接种 H37Ra 后,小鼠体内产生了 TNF－α;同时我们对 H37Ra 菌与 BCG 两者免疫效果进行了比较,发现在 30 天时,H37Ra 腹腔和皮内接种组与 BCG 组产生的 TNF－α 没有显著性差异($P>0.05$);60 天时,H37Ra 腹腔和皮内接种组 TNF－α 活性高于 BCG 组($P<0.05$),结果表明两种结核菌均能使小鼠体内产生 TNF－α。此外我们发现,小鼠体内 TNF－α 的表达水平随免疫时间延长而增高,推测机理为特异性 T 细胞分泌细胞因子如 IL－2、IFN－γ 等使巨噬细胞活化并进一步分泌 TNF－α,从而使体内 TNF－α 水平升高。但 TNF－α 对机体的保护作用及致病作用还有待进一步探讨。

## 参 考 文 献

[1] World Health Organization. Health system: improving performance[J]. World health report, 2000; 152－164.

[2] 沈关心,周汝麟. 现代免疫学实验技术[M]. 湖北科学技术出版社, 1998; 281－282.

[3] Andersen P, Munk ME, Pollock JM, et al. Specific immune－based diagnosis of tuberculosis[J]. Lancet, 2000; 356 (9235): 1099－1104.

[4] Dhiman N, Khuller GK. Immunoactivity 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.

[5] 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.

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

[7] Williams A, Davies A, Marsh PD, et al. Comparison of the protective efficacy of Bacillus Calmette－Guerin vaccination against aerosol challenge with Mycobacterium tuberculosis and

(下转第 227 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com



要作用。

3.1 作为共刺激分子,活化静息的 T 细胞

静息的 T 细胞活化不仅需要 CD3/TCR 与 MHC-抗原复合体的作用,还需要 B7/CTLA-4 与 CD28,LFA-1/ICAM-1 等共刺激信号的参与。B7 分子对静息 $CD4^+$ T 细胞的共刺激作用较弱,Damle[8]等发现 VCAM-1 能大大增强 B7 分子对静息 T 细胞的增殖作用,这可能是由于 VCAM-1 导致 CD28 分子表达增强,同时 CD28 介导的胞内游离 $Ca^{2+}$ 动员也增加。他们还发现静息 T 细胞不表达 B7 的另一配体 CTLA-4,但是在 VCAM-1 的作用下,CTLA-4 表达并与 CD28 一起协同刺激 T 细胞的活化增殖。VCAM-1 与相应配体结合,在 TCR 参与下作为共刺激分子可以诱导分化了的抗原特异性 T 细胞的活化。

3.2 在介导活化的淋巴细胞穿过 BBB 中起至关重要的作用

EAE 大鼠脑血管内皮细胞在炎症状态下表达了 ICAM-1、VCAM-1,活化的 T 细胞通过 ICAM-1-LFA-1 以及 VCAM-1—VLA-4 的途径进入 CNS;同时,T 细胞与粘附分子结合后,可诱导产生基质金属蛋白酶,降解血管外基质成分从而介导更多的 T 细胞进入 CNS。

综上所述:ICAM-1,VCAM-1 参与活化静息的 T 淋巴细胞,使其分化增殖并介导 T 淋巴细胞通过 BBB,分泌多种细胞因子,这些细胞因子再通过免疫机制,或直接作用导致髓鞘的脱失。因此 ICAM-1,VCAM-1 在 EAE 的发病以及随后的髓鞘脱失中起着重要的作用,而应用粘附分子的单克隆抗体来抑制淋巴细胞细胞与 EAE 脑内皮细胞的粘附,从而缓解 EAE 临床症状,将是我们值得进一步探讨和研究的工作。

## 参 考 文 献


[1] 曹翠丽,王 惠,马常升. 实验性变态反应性脑脊髓炎大鼠模型的建立[J]. 解剖学杂志,2001;24(1):77-80.

[2] 林嘉友. 灌服碱性髓鞘蛋白对实验性变态反应性脑脊髓炎的抑制作用[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志,1994;1(2):61-67.

[3] Matsumoto Y, Kawai K, Tomita Y, et al. Limiting-dilution analysis of thefrequency of myelin basic protein reactive T cells in lewis, PVG/C and BN rats: implication for susceptibility to autoimmune encephalomyelitis[J]. Immunology, 1990; 69: 215-260.

[4] NjeUga MK, Kodriguez M. Animal model of demyelination[J]. Current opinion in Neurology, 1996; 9: 159-164.

[5] Knobler KL, Marini JC, Goldowitz D, et al. Distribution of blood brain barrier in heterotopic brain transplants and its releationship to the lesion of EAE[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 1992; 51(1): 36-39.

[6] Fabry Z, Raine CS, Hart MN. Neuvous tissue as an immune compartment: the dialect of the immune response in the CNS[J]. Immunol today, 1994; 15(5): 218-224.

[7] 金伯全. 细胞和分子免疫学[M]. 第 2 版,西安:世界图书出版公司,1994;33.

[8] Damle NK, Klussman K, Leytze G. Constimulation of J lymphocytes with integrin ligrands intercellular adhesion molecule-1 or vascular cell adhesion molecule-1 induce functional expression of CTLA-4, a second receptor for BT[J]. J Immunol, 1994; 152(6): 2686-2697.


(上接第 202 页)


Mycobacterium bovis[J]. Clin Infect Dis, 2000; 30(s3): 299-301.

[8] Kanko H, Yamada H, Mizuno S, et al. The role of tumor necrosis factor-alpha in Mycobacterium induced granuloma formation in TNF-alpha deficient mice[J]. Lab Invest, 1999; 79: 379-386.

[9] Beker LG, Andve LM, Amy B, et al. Immunopathologic effects of tumor necrosis factor alpha in murine Mycobacterial infection are dose dependent[J]. Infection and Immunity, 2000; 68(12): 6954.

[10] 汤红明,刘君炎,高立芬. IFN-γ 与 TNF 联合治疗结核菌感染小鼠疗效及机理的研究[J]. 免疫学杂志,2001;17(6):457-459.

[11] 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;1:88-90.