维普资讯 http://www.cqvip.co

文章编号:0253－3626(2005)01－0082－03

结核菌 H37Ra 免疫小鼠后 PPD 刺激淋巴细胞增殖转化的探讨

陶　昆[1]，卢贤瑜[1]，成海恩[2]，徐以民[3]

(1.重庆医科大学检验系临床免疫教研室，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；
3.重庆医科大学计生系生殖遗传教研室，重庆　400016)

【摘　要】目的：探讨小鼠接种 H37Ra 后，PPD 刺激鼠淋巴细胞的增殖转化情况。方法：用 H37Ra 皮内、腹腔免疫小鼠后 30、60 天，检测小鼠脾淋巴细胞受 PPD 刺激后的转化率。结果：小鼠接种 H37Ra 后，30 天淋转率分别为 21.98%(腹腔)和 24.85%(皮内)；60 天淋转率分别为 25.50%(腹腔)和 25.02%(皮内)，明显高于未免疫组($P<0.01$)；与 BCG 皮内免疫组比较，无显著性差异($P>0.05$)；H37Ra 腹腔和皮内不同途径接种，淋巴细胞转化率无明显差异。结论：H37Ra 免疫小鼠后能诱导机体产生抗结核的免疫应答。

【关键词】H37Ra；淋巴细胞转化；结核分枝杆菌；PPD

【中国图书分类法分类号】R446.63　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2004－09－09

The proliferation of lymphocyte with stimulation of PPD after immunization with H37Ra in mice

TAO Kun, et al

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

【Abstract】*Objective*: To research the proliferation of lymphocyte with stimulation of purified protein derivative (PPD) after immunization with H37Ra in mice. *Methods*: The rate of lymphocyte proliferation with stimulation of PPD was determined at day 30 and day 60 after subcutaneous immunization and celiac immunization with H37Ra in mice. *Results*: After immunization with H37Ra in mice, the rate of lymphocyte proliferation by celiac immunization route and subcutaneous immunization route was 21.98% and 24.85% respectively at day 30; and it was 25.50% and 25.02% respectively at day 60. The rate of lymphocyte proliferation immunized with H37Ra at day 30 and day 60 were much higher than that of non－immunization($P<0.01$); compared with the proliferation of lymphocyte by subcutaneous immunization route of BCG, there were no statistically significant difference($P>0.05$); there were no significant difference between subcutaneous immunization route and celiac immunization route of H37Ra in mice. *Conclusion*: H37Ra can induce anti－tuberculosis immune response.

【Key words】H37Ra; Lymphocyte proliferation; Mycobacterium tuberculosis; PPD

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，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 疫苗的保护效果有很大差异，从 0～80%不等[1]，且主要对小儿结核的预防有效，对成人结核病的预防效果不理想[2]。究其原因之一是 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(非典型分枝杆菌可干扰 BCG 的免疫效果)。因此，目前急待寻找更新更好的抗结核疫苗来取代 BCG。H37Ra 是人型结核杆菌有毒株 H37Rv 减毒而来的无毒株。据报道，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。本研究主要观察 H37Ra 免疫小鼠后脾淋巴细胞受 PPD 刺激的增殖情况，从而了解 H37Ra 能否诱导机体产生抗结核的免疫保护作用。

作者介绍：陶　昆(1969－　)，女，讲师，硕士生，
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.co

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；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 菌用生理盐水溶解后，接种到罗氏培养基上，待其长出菌落后，转种一次，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：50×10^4/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。（活菌浓度为：50 万个/ml）

④未免疫组：同种小鼠 16 只随养。

1.3.4 小鼠脾细胞的制备

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。断颈处死小鼠，无菌条件下解剖，取小鼠脾脏，用 200 目钢网研磨成细胞悬液，弃组织残渣，用 Ficoll 液分离淋巴细胞，洗涤两次后调整细胞浓度为 2×10^6 个/ml。台盼蓝拒染法计数活细胞数，活细胞率大于 97% 可用。

1.3.5 小鼠脾淋巴细胞转化试验

于 96 孔培养板内，每孔加入小鼠脾细胞悬液 100μl，含 10% 小牛血清的 1640 培养液 100μl，PPD 20μl（PPD 的浓度为 550μg/ml），使每孔 PPD 的终浓度为 12.5μg^{-3}，每只小鼠做 4 个复孔。置培养板于 37℃、5% CO_2 孵箱内培养 72h。培养结束前 4h，于每孔加入 MTT 10μl（5mg/ml），继续培养。培养结束后将培养板置于离心机上 2000rpm 离心 10min，弃上清 100μl，每孔加入 100μl 二甲亚砜（DMSO），振荡 10min，使结晶物充分溶解。于酶标仪上测 A_{570nm}，以复孔均值计算淋巴细胞转化率。

淋转率（%）=（实验组 A 值－对照组 A 值）/对照组 A 值[4]

1.4 统计学处理

采用方差分析和 q 检验。

2 结 果

小鼠接种 BCG 和 H37Ra 后，脾淋巴细胞的增殖转化情况：

从表 1 中可见，小鼠接种 H37Ra 菌后，30 天腹腔和皮内免疫组淋转率分别为 21.98% 和 24.85%；60 天腹腔和皮内免疫组淋转率分别为 25.50% 和 25.02%。30 天和 60 天的淋巴细胞转化率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 20.46% 和 22.66%）比较，差异无显著性（$P>0.05$）。H37Ra 的腹腔和皮内接种组，在 30 天和 60 天时两者差异无显著性。

表 1 免疫与未免疫小鼠脾淋巴细胞受 PPD 刺激后的增殖情况

组别	淋巴细胞转化率（%）	
	免疫 30 天	免疫 60 天
H37Ra 腹腔	21.98*=	25.50*=
H37Ra 皮内	24.85*=	25.02*=
BCG 皮内	20.46	22.66
未免疫	7.17	9.71

注：*：与 BCG 皮内组相比，$P>0.05$ =：与未免疫组相比，$P<0.01$

3 讨 论

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。由于结核的免疫主要是细胞免疫（即 Th1 型免疫），故活化的巨噬细胞和致敏的淋巴细胞（Th1 细胞和 CD8＋CTL）在结核分枝杆菌感染期间起着重要的作用：Th1 细胞与巨噬细胞相互作用（如释放 IL－2、IFNγ 等），使巨噬细胞杀伤能力增强，杀灭结核菌；另一方面，$CD8^+$ 的 CTL 也可杀灭带有靶抗原的靶细胞，从而使结核菌被杀灭。

由于结核的免疫是活菌传染性免疫，一旦细菌在体内消失，特异性免疫也就消失。因此，尽管近年

维普资讯 http://www.cqvip.co

来众多学者研究了许多关于结核的亚单位疫苗、DNA 疫苗,但至今还没有一种免疫效果能达到 BCG 的效果。但 BCG 由于长期传代,部分有效抗原丢失,也使得免疫效果不稳定。据报道,DNA 疫苗、蛋白质亚单位疫苗、死疫苗所诱导的抗结核免疫均较低且不持久,而活菌疫苗的免疫原性则较强,能诱导机体产生更强免疫反应: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。

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 中丢失的抗原性成分。基因组对比研究发现,BCG 缺乏 H37Ra 具有的 RvD2 片断,提示 H37Ra 中可能含有 BCG 中没有的抗原物质。Tanghe[5]发现 H37Ra 培养滤液蛋白中有一分子量为 30—32KDa 的分泌蛋白(Ag85A、Ag85B, Ag85c)可在小鼠和人中诱导很强的 T 细胞增殖和 INFγ 产生。Sinha RK[6]等研究发现 H37Ra 株的 30kDa 分泌蛋白,是一种免疫保护性抗原,其保护效力优于现有 BCG。同时,H37Ra 含有 BCG 没有的 MPT64 抗原和 BCG 不能表达的 ESAT—6 抗原。MPT64 可诱发中等程度的淋巴细胞应答,而 ESAT—6 可提高巨噬细胞活性及对结核菌的抵抗力[7]。

淋巴细胞增殖转化是观察细胞免疫功能的指标之一。本实验主要探讨 H37Ra 免疫小鼠后,能否诱导机体发生淋巴细胞增殖转化,不同途径接种 H37Ra 后诱导淋巴细胞增殖转化的差异。结果表明,无论小鼠通过皮内或腹腔途径接种 H37Ra,其淋巴细胞受 PPD 刺激后转化率均明显高于未免疫组($P<0.01$),说明接种 H37Ra 后,小鼠体内产生了抗结核的细胞免疫;同时我们对 H37Ra 菌与 BCG 菌两者免疫效果进行了比较,发现接种 H37Ra 小鼠的淋巴细胞转化率略高于接种 BCG 的小鼠,但两者无显著性差异($P>0.05$);H37Ra 腹腔和皮内不同途径接种,在免疫 30 天时淋转率皮内组略高于腹腔组,而在 60 天时两者差异不大,表明两种途径均能使小鼠产生抗结核的免疫应答。以上结果均初步证实了 H37Ra 能诱导机体产生抗结核的免疫保护作用,但进一步的研究仍在进行之中。

参 考 文 献

[1] World Health Organization. Tuberculosis prevention trials: Madras. Trial of BCG vaccine in South India for tuberculosis prevention[J]. Bull WHO, 1979;57:819 - 827.

[2] Shafer RW, Gold R, Sierra M. Frequency of Mycobacterium tuberculosis bacterium in patients with tuberc ulosis in an area endmic for AIDS[J]. Am Rev Respir Dis, 1989;140:1611 - 1613.

[3] 陶 敏. PPD 为丝裂原作淋巴细胞转化试验对结核性胸腹炎的诊断价值[J]. 江苏医药, 1993;5:234 - 236.

[4] Mossman T. Rapid colorimetric assay for celluar growth and survival application to proliferation and cytot - oxicity assay [J]. Immunol Methods, 1983;65:55 - 63.

[5] Tanghe A, Denis D, Llambrecht B, et al. Tuberculosis DNA vaccine encoding Ag85A is immunogenic and protective when administered by intramuscular needle injection but not by epiderminal gene gun bombardment[J]. Infect Immunol, 2000;68(7):3854 - 3860.

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

[7] Sano K, Sato K, Sano C, et al. Comparative profiles of intra - macrophage behavior of Mycobacterium tuber culosis and Mycobacterium avium with different levels of virulence[J]. Microbiol Immuno, 2002;46(7):483 - 486.