DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.16.021
第26卷第16期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 16
1476 2004年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)16-1476-03

采用母牛分支杆菌菌苗预防糖尿病患者并发肺结核的临床观察

黄重敏,黄其文,覃亚勤 (广西百色市右江民族医学院附属医院传染科,百色 533000)

提 要:目的 探讨母牛分支杆菌菌苗[*Mycobacterium vaccae* vaccine(*M. vaccae* vaccine)]对糖尿病患者预防并发肺结核的临床疗效及安全性。方法 随机配对分组法将76例糖尿病患者分为*M. vaccae* vaccine治疗组(M组,38例)和对照组(C组,38例)。两组常规使用降糖药及饮食控制血糖。M组加用*M. vaccae* vaccine治疗3个月,C组不用*M. vaccae* vaccine。结果 治疗结束3个月后,M组未见*M. vaccae* vaccine对血糖控制等产生不良影响,细胞免疫功能显著改善,M组T细胞亚群各项指标与C组比较:CD3、CD4显著升高($P<0.01$),CD8显著下降($P<0.05$);PPD皮试阳转率M组较C组显著提高($P<0.05$);随访2年观察M组无1例发生肺结核,C组有2例发生。结论 *M. vaccae* vaccine临床使用安全,有显著改善糖尿病患者的细胞免疫功能,对并发肺结核有较好的预防作用。

关键词:母牛分支杆菌;菌苗;结核;糖尿病
中图法分类号:R587.1;R521;R186 文献标识码:A

Clinical observation on prevention of diabetes complicated with pulmonary tuberculosis by *Mycobacterium vaccae* vaccine

HUANG Zhong-min, HUANG Qi-wen, QIN Ya-qin (Department of Infectious Diseases, Affiliated Hospital, Youjiang Medical College for Nationalities, Bose 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China)

Abstract: Objective To investigate the effect and safety of *Mycobacterium vaccae* vaccine (*M. vaccae* vaccine) on diabetes patients complicated with pulmonary tuberculosis. Methods A total of 76 diabetes patients complicated with pulmonary tuberculosis were randomized into immunotherapy group (M, $n=38$) and control group (C, $n=38$). Administration of routine anti-diabetic drugs and diet treatment were conducted in both groups. In addition, patients in group M were treat with additional *M. vaccae* vaccine for 3 months, but those in group C were not. Results At the end of the treatment, no side effects of *M. vaccae* vaccine were found in group M, but immunological function of T cells was significantly improved. Compared with those in group C, CD3 and CD4 in group M were significantly higher ($P<0.01$), but CD8 in group M was significantly lower ($P<0.05$), and PPD positive conversion rate in group M was significantly higher ($P<0.05$). A follow-up for 2 years showed no occurrence of pulmonary tuberculosis in group M, but 2 cases in group C. Conclusion Immunotherapy with *M. vaccae* vaccine is clinically safe and can improve the T cell function of diabetes patients, suggesting that immunotherapy with *M. vaccae* vaccine. may play an important role in the prevention of complicated pulmonary tuberculosis.

Key words: *Mycobacterium vaccae*; vaccine; tuberculosis; diabetes

糖尿病并发肺结核病逐年增多,患病率比普通人群高达4~8倍[1]。由于糖尿病属于终身性疾病,如何有效地预防糖尿病发生肺结核日益成为研究热点,许多学者通过动物模型研究,提出母牛分支杆菌菌苗[*Mycobacterium vaccae* vaccine(*M. vaccae* vaccine)]可作为糖尿病患者预防肺结核的菌苗[2]。为此,我们采用*M. vaccae* vaccine对糖尿病患者进行预防性治疗的临床研究,现将初步结果报告如下。

1 对象与方法

1.1 对象

选择我院2000年10月至2002年5月门诊及住院的2型糖尿病患者共76例为研究对象,诊断符合1997年WHO糖尿病诊断标准及分类方法,摄X线胸片和肺部CT检查排除肺结核,无肺外结核依据,无严重器质性心、肝、肾慢性病及其它感染。纳入对象均能按设计完成治疗和观察项目。

作者简介:黄重敏(1957—),男,广西省平果县人,副主任医师,副教授,主要从事传染病防治方面的研究,发表论文30余篇。电话:(0776)2830581

收稿日期:2004-04-12;修回日期:2004-07-17

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2　分组方法

采用随机配对方法将患者分为使用 *M. vaccae* vaccine 治疗组(M 组)和不使用 *M. vaccae* vaccine 对照组(C 组)。M 组 38 例, 男 27 例, 女 11 例, 年龄 40～79 岁, 平均 60.2 岁, 病程平均 6.8 年; C 组 38 例, 男 25 例, 女 13 例, 年龄 41～78 岁, 平均 59.8 岁, 病程平均 7.1 年。两组病例性别、年龄、病情、病程等指标经统计学处理具有可比性($P>0.05$)。

1.3　治疗方法

两组均常规使用降糖药物及饮食控制血糖, 其中 M 组每月臀部肌肉深部注射 *M. vaccae* vaccine(安徽龙科马生物制药有限责任公司生产)22.5 μg/次, 2 次/月, 间隔 15 d, 1 个疗程 3 个月共 6 次。

1.4　观察项目

1.4.1　一般化验检查　　包括血常规、肝功能、肾功能、血糖, M 组治疗开始后第 2、4、6 个月各 1 次。

1.4.2　观察 M 组使用 *M. vaccae* vaccine 不良反应。

1.4.3　免疫学检查　　T 细胞亚群检测: M 组在治疗前和自治疗起 6 个月后与 C 组同步各检测 1 次; 两组在 T 细胞亚群检测的同时, 同步作 PPD(结核菌素纯蛋白衍生物)皮试, 试验 72 h 记录阳性例数。

1.4.4　X 线片和 CT 检查　　摄胸片: 两组治疗前摄胸片及肺 CT 1 次, 每 6 个月复查胸片 1 次, 1 年后复查肺部 CT, 2 年以上随访率达 100%。

1.5　统计学处理

数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用 SAS 统计软件进行 t 配对检验, 两组均数 t 检验, PPD 皮试结果用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　一般情况

M 组未见 *M. vaccae* vaccine 对血糖的控制、血常规、肝功和肾功能产生不良影响。

2.2　免疫指标的变化

2.2.1　T 细胞亚群两组在治疗前无显著性差异($P>0.05$)。其变化见表 1, 6 个月后, M 组 CD3 和 CD4 较治疗前显著升高($P<0.01$), CD8 显著降低($P<0.01$); C 组各项变化与治疗前对比也有显著性差异($P<0.05$); M 组各项指标与 C 组比较, CD4 显著升高($P<0.01$), CD8 显著下降($P<0.05$)。

表 1　两组治疗前和 6 个月后 T 细胞亚群测定结果($n=38$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Results of T cell test before treatment and after 6 months in the two groups ($n=38$, $\bar{x}\pm s$)

Standers	Group M		Group C		*P*1	*P*2	*P*3
	Before treatment	6 months later	Before treatment	6 months later			
CD3	58.6±7.2	67.5±6.4	59.4±5.7	61.8±3.6	<0.01	<0.05	<0.01
CD4	35.6±3.5	45.4±2.6	35.2±1.8	36.7±3.8	<0.01	<0.05	<0.01
CD8	30.4±5.8	27.6±3.2	31.7±3.4	29.8±4.1	<0.01	<0.05	<0.05
CD4/CD8	1.07±0.5	1.55±0.4	1.05±0.2	1.19±0.3	<0.01	<0.05	<0.01

*P*1: the comparison of group M before treatment and 6 months later; *P*2: the comparison of group C before treatment and 6 months later; *P*3: comparison of the two groups 6 months later

2.2.2　PPD 皮试反应的变化见表 2, 两组在治疗前阳性、阴性例数比较无显著性差异($P>0.05$), 6 个月后 PPD 皮试阴性病例转阳率 M 组较 C 组显著提高($\chi^2=18.687$, $P=0.000$)。

表 2　两组 6 个月前后 PPD 皮试反应的变化

Tab 2　Change of results of PPD test before and after 6 months in two groups

Location	*n*	Before therapy		6 months later	
		Positive (%)	Negative (%)	Positive conversion (%)	Negative(%)
M	38	4(10.5)	34(89.5)	18(52.9) **	16(47.1)
C	38	3(7.9)	35(92.1)	2(5.7)	33(94.3)

**: $P<0.01$ *vs* C

2.3　发生肺结核情况

2002 年 5 月至 2004 年 3 月 M 组无 1 例发病, C 组发病 2 例, 均为继发性肺结核, 患病率为 5.26%。

2.4　不良反应

M 组在使用 *M. vaccae* vaccine 过程中未见过敏、发热、局部红肿硬结等副反应, 无过敏性休克发生。

3　讨论

许多研究表明, 糖尿病容易并发肺结核[3～5], 在临床上两病常合并存在, 一旦两病并存即导致肺结核病情加重、进展快, 治疗上存在诸多矛盾。病菌阳性率高并成为主要传染源[2]。因此, 对糖尿病患者并发肺结核的关键在于预防。由于糖尿病是终身性疾病, 何时并发结核病难于估计, 异烟肼因为存在副作用、干扰糖代谢等原因, 作为长期预防性治疗是不现实的, 也不科学。另外糖尿病患者年龄多数均为 40 岁以上成年人, BCG 作为糖尿病患者的预防性治疗已被否定, 因此需寻找新的预防方法。近年来, 许多学者[1,2]在建立动物糖尿病模型的研究中, 发现 *M. vaccae* vaccine 有预防和治疗结核病的作用, 而真正应用于临床的研究仍在不断探索中。如何进行病例选择, 我们从糖尿病结核菌感染者普查着手进行 PPD 试验, 结果观察到多数患者均为阴性或仅少数为弱阳性, 甚至对糖尿病患者已证实发生肺结核病, 多数进行 PPD 试验亦得到同样的结

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

果,这可能与糖尿病患者免疫力低下有关,因此对预防糖尿病患者并发肺结核不仅只根据 PPD 试验结果而定,应把糖尿病患者列为结核病的高危人群和作为预防结核病的主要对象。研究表明糖尿病患者免疫功能低下,使用 *M. vaccae* vaccine 疗程结束 3 个月后,CD3 和 CD4 较治疗前有显著升高,CD8 显著下降,各项指标与对照组比较具有显著性差异;对 PPD 皮试阴性病例使用 *M. vaccae* vaccine 治疗后,转阳率比对照组显著性提高,其结果可能是由于 *M. vaccae* vaccine 的免疫增强作用。通过对两组近 2 年随访观察,M 组无 1 例发生肺结核,而 C 组有 2 例发生,患病率为 5.26%。表明 *M. vaccae* vaccine 有显著改善或增强糖尿病患者的细胞免疫功能,对预防肺结核的发生有较好的作用。同时我们还观察到 *M. vaccae* vaccine 对糖尿病患者的血糖控制等指标无不良影响,使用安全。但由于本研究观察的时间仅有 2 年,该菌苗改善糖尿病患者的免疫功能能维持多长时间,长期预防效果如何,在疗程结束是否需要以后每 1~2 年继续使用 *M. vaccae* vaccine 给予增强或巩固等问题,还需作进一步研究。

参考文献:

[1] 陈 虹,罗永艾. 母牛分枝杆菌菌苗对糖尿病结核大鼠 NO 的影响[J]. 医药导报, 2002, 21(3): 136-137.
[2] 陈 虹,罗永艾,黄习臣,等. 母牛分枝杆菌菌苗预防糖尿病并发肺结核的实验研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25(1): 21-24.
[3] 石晓建,李军华,刘 群,等. 糖尿病合并肺结核患者肺泡巨噬细胞人类组织相容性类抗原信使核糖核酸的表达[J]. 临床荟萃, 2004, 19(4): 193-195.
[4] Gambelunghe G, Ghaderi M, Tortoioli C, *et al*. Two distinct MICA gene markers d discriminate major autoimmune diabetes types[J]. Clin Endocrinol Metab, 2001, 8(6): 3754-3760.
[5] Zeidler A, Raffel L J, Costin G, *et al*. Autoantibodies and human leucocyte antigen class II in first-degreefamily members of Mexican-American type I diabetic Patients[J]. Clin Endocrinol Metab, 2001, 8(6): 4957-4962.

(编辑 栾 嘉)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2004)16-1478-02

携带反义热休克蛋白 70 的重组腺病毒载体的构建

Construction of human antisense heat shock protein 70 recombinant adenovirus

王晓侠[1],李胜利[2],姚小宝[3],嵇宪生[1],朱宏亮[3],樊代明[4] ([1] 中国人民解放军第 451 医院耳鼻咽喉科,西安 710054; [2] 西安交通大学第二医院耳鼻咽喉科,西安 710004; [3] 西安交通大学第一医院耳鼻咽喉科,西安 710061; [4] 第四军医大学西京医院消化病研究所,西安 710032)

反义核苷酸是近几年肿瘤基因治疗的新热点。已有许多报道证实,恶性肿瘤常常高表达热休克蛋白 70(heat shock protein 70, HSP70),并且在体内外许多不利于肿瘤生长的环境中,具有保护肿瘤细胞的作用,严重影响抗肿瘤治疗的效果[1]。肿瘤细胞 HSP70 表达增高,并使其获得抗拒凋亡的能力;若减少细胞内 HSP70 的表达可使多种恶性肿瘤不能维持其正常代谢,发生生长抑制及死亡[2]。因而本研究采用新的,简便易行的重组腺病毒 AdEasy 系统[3] 构建反义 HSP70 的重组腺病毒,为进一步开展喉癌基因治疗研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pAdTrack-CMV、pAdEasy-1、菌株 Bj5183 由第四军医大学西京医院消化病研究所提供。质粒 PcDNA 3.1-ASHSP70 由本人构建保存于西安交通大学第二医院耳鼻咽喉科。

作者简介: 王晓侠(1975-),女,河北省易县人,硕士,医师,主要从事喉癌的基因治疗方面的研究,发表论文 6 篇。电话: (029)2257076

收稿日期: 2003-03-10; 修回日期: 2003-08-15

1.2 方法

1.2.1 反义热休克蛋白 70 的重组腺病毒的重组穿梭质粒的构建 *Hind* Ⅲ和 *Eco* Ⅴ双酶切 PcDNA 3.1-ASHSP70 回收 HSP70 的 cDNA 与 *Hind* Ⅲ和 *Eco* Ⅴ双酶切的穿梭质粒 PTrack-CMV 按摩尔比 2∶1 混合,连接转化后抽提质粒。获得重组质粒 pTrack-CMV-HSP70;经双酶切鉴定后,将反向插入的重组质粒命名为 pTrack-CMV-ASHSP70。

1.2.2 细菌内的同源重组产生重组腺病毒质粒 提取 10 μl pTtrack-CMV 和 pTrack-CMV-HSP,质粒用 *Pme* Ⅰ限制性内切酶线性化,乙醇沉淀后分别与 1 μl 超螺旋质粒 pAdEasy-1 在 2 500 V, 200 Ω, 25 μF 条件下,电穿孔共转化 20 μl Bj5183 感受态细菌,50 μg/ml 卡那霉素培养基平板筛选,37 ℃孵育 16~20 h 后挑 5 个克隆,抽提质粒电泳鉴定,将重组子转化至 DH5α 菌,提取质粒。进一步进行酶切鉴定。

1.2.3 哺乳动物细胞中产生腺病毒 待 293 细胞长至丰度 80%时将 10 μl *Pac* Ⅰ酶切后的重组腺病毒质粒按 Lipofectamine 说明书加到 90 μl 无血清 DMEM, 4 h 后加含 10% FBS 培养液 800 μl/孔。7~10 d 后,收集细胞反复冻融 3 次,收上清,为第 1 代病毒。

(下转 1481 页)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net