

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2004)19-1741-04

MPT64 DNA 疫苗对鼠结核分枝杆菌感染的保护作用

孙平¹ 骆旭东² 朱道银² 唐国建¹(¹ 航天工业部 3417 医院外科, 贵州 遵义 563000 ; ² 重庆医科大学微生物与免疫学研究室, 重庆 400016)

Protective efficacy of DNA vaccine encoding tubercle MPT64 in mice challenged with *M. tuberculosis*

SUN Ping¹, LUO Xu-Dong², ZHU Dao-Yin², TANG Guo-Jian¹¹Department of Surgery, 3417 Hospital, Zunyi 563000, China,²Department of Microbiology, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China

【Abstract】 AIM: To explore the protective efficacy of the DNA vaccine encoding *Mycobacterium tuberculosis* MPT64 in mice infected with *Mtb*. METHODS: C57BL/6 mice were intramuscularly immunized with the DNA vaccines or BCG (i. d.). The mice were challenged with 10⁶ CFU H37Rv via lateral tail vein 35 d after the third immunization for DNA vaccine groups and 100 d after for BCG vaccinated group. The mice in the vaccinated groups and control groups were sacrificed 42 d after challenge. The lungs and spleens were removed respectively and the number of CFU in organs and histopathologic changes were determined. The antibody level, IFN- γ , IL-4 and the survival time in all of the mice were evaluated. RESULTS: The antibody titer of pcDNA/MPT64 group was higher than that of other groups ($P < 0.05$). Both the level of IFN- γ produced by spleen lymphocytes and the spleen lymphocyte proliferation from BCG group and pcDNA/MPT64 group were higher than those of other groups ($P < 0.05$), and no IL-4 was found in all groups. The number of bacterial colonies in the lungs and spleens significantly decreased at 6th week postchallenge in all the vaccinated groups ($P < 0.05$), especially in BCG group ($P < 0.01$). The pulmonary histopathological changes were observed 6 weeks following challenge with *M. tuberculosis* H37Rv. In PBS and pcDNA3.1 groups, the lesion was characterized by seroplastic inflammatory infiltration and lung tissue necrosis, and in BCG group by granulomas and numerous macrophages, lymphocytes and a few epithelioid cells. The lesion in pcDNA/MPT64 groups was characterized by seroplastic inflammatory infiltration and a

few macrophages. The results in spleen were similar to those in lungs. The survival time of BCG vaccinated mice after challenge with *M. tuberculosis* H37Rv was longer than that of other groups. The survival time of pcDNA/MPT64 group was longer than that of negative control groups. CONCLUSION: The pcDNA/MPT64 can improve the protective efficacy of immunized mice against *M. tuberculosis* challenge.

【Keywords】 *Mycobacterium tuberculosis*; MPT64; DNA vaccine

【摘要】目的: 研究 MPT64 DNA 疫苗对鼠结核杆菌感染的免疫保护效果。方法: C57BL/6 小鼠 36 只, 随机分为 4 组。A 组(PBS)、B 组(pcDNA3.1)、C 组(BCG)、D 组(pcDNA/MPT64); 分别于胫前肌注射质粒 DNA 免疫 70 μ g/次, 1 次/2 wk, 共 3 次。末次免疫后 5 wk 用 10⁶ CFU H37Rv 经尾静脉攻击, 攻击后 6 wk 处死小鼠, 测血清总 IgG、特异性脾淋巴细胞增殖实验、IFN- γ 及 IL-4 分泌水平。作脾、肺组织荷菌量和病理学检查以及观察小鼠存活时间。结果: MPT64 基因疫苗诱导小鼠特异性 IgG 的产生、脾淋巴细胞增殖以及 IFN- γ 的分泌。MPT64 DNA 免疫组肺、脾组织荷菌量、病理学改变和小鼠存活时间明显优于阴性对照组。结论: MPT64 DNA 疫苗在抗结核分枝杆菌(*Mtb*)感染过程中具有一定免疫保护作用。

【关键词】 结核分枝杆菌; MPT64; DNA 疫苗

【中图分类号】 R183 R186.3 **【文献标识码】** A

0 引言

DNA 疫苗是 20 世纪 90 年代发展起来的一种崭新的免疫接种技术, 是继减毒活疫苗、亚单位疫苗之后的第 3 代疫苗, 具有免疫效果良好、尤其是能诱导 CTL 的形成和性质稳定、生产简便、价格低廉等优点而倍受青睐^[1,2]。MPT64 是结核分枝杆菌(*Mtb*)早期分泌蛋白中免疫保护作用比较确切的抗原成分之一, 我们在已经构建 MPT64 真核表达质粒并证实能在小鼠体内诱导特异性体液和细胞免疫应答的基础上, 进一步研究其在小鼠体内抗 *Mtb* 感染的功能。

1 材料和方法

1.1 材料 *Mtb* H37Rv 标准株(中科院微生物菌种保藏中心); pcDNA3.1 + , pcDNA/MPT64 和 *E. coli* DH5 α 由本教研室收藏; Endo free 质粒抽提试剂盒

收稿日期 2004-06-23; 修回日期 2004-08-24

作者简介 孙平(1964-)男(汉族)贵州省遵义市人。副教授。Tel.

13985604125 Email. sunping-58@hotmail.com

(Qaigen 公司); IFN- γ ELISA 试剂盒(上海森雄生物公司); 冻干皮内注射用卡介苗(BCG)、PPD 标准品(成都市生物制品研究所)。SPF 级雌性 C57BL/6 健康小鼠 36 只, $\delta \sim 8$ wk, 体质量 18 ~ 22 g(重庆医科大学实验动物中心)。

1.2 方法 按说明书抽提质粒 DNA, 紫外分光光度计定量。动物随机分为 4 组, 每组 9 只。A 组(PBS, 100 μ L)、B 组(pcDNA3.1, 70 μ g)、C 组(BCG)、D 组(pcDNA/MPT64, 70 μ g); 分别于胫前肌注射 75 g/L 利多卡因和质粒混合物(1:4, 100 μ L)。间隔 2 wk 免疫 1 次, 共 3 次。C 组于每只小鼠胸壁皮内注射 0.3 mL(相当于 0.1 mg), 含活菌 1×10^6 CFU。将经过小鼠体内毒力复苏的 H37Rv 转种于改良罗氏培养基上, 37 $^{\circ}$ C 保湿培养 2 wk; 自罗氏培养基上刮取生长良好的干菌落用体积分数为 0.0005 的吐温-生理盐水研磨成 3 mL 的菌悬液, 每 0.3 mL 菌悬液含 M. H37Rv 1×10^6 CFU 活菌 1 mg。攻击时间为 BCG 接种后 100 d 和末次质粒 DNA 免疫后 5 wk, 于每只小鼠尾静脉注射 0.3 mL 菌悬液, 实施攻击; 攻击后 6 wk 各组处死 5 只小鼠, 测外周血总 IgG, 作 PPD 特异性脾淋巴细胞增殖实验, 测量 IFN- γ 、IL-4 分泌水平, 取肺、脾作荷菌量测定和病理学检查等; 余下的 4 只小鼠用来观察其自然存活时间(采用 T50 法, *Scand J Immunol*, 1992, 36: 307)。

1.2.1 肺、脾荷菌量及病理学检测 无菌手术取左全肺, 称取一定量的左肺组织加入经过灭菌的 5 mL 组织匀浆器中, 加 2 mL 灭菌生理盐水, 研磨成匀浆; 用 40 mL/L 硫酸 2 mL 中和, 摇匀后静置 15 min, 以此原液作 10 倍梯度稀释, 选取 3 个稀释度的悬液 100 μ L, 分别涂布于 3 个经过 37 $^{\circ}$ C 复温的改良罗氏培养基上(含 BCG 抑制剂 2-thiophenecarboxylic acid hydrazide 2 mg/L), 37 $^{\circ}$ C 保湿培养 4 wk, 进行菌落计数, 计算每 1 g 肺组织的荷菌量。脾组织荷菌量检测同肺组织。肺、脾病理学检测: 取右上肺叶和部分脾组织用 40 g/L 多聚甲醛固定, 石蜡包埋切片, 分别行抗酸染色和 HE 染色。

1.2.2 免疫学评价 ① ELISA 法检测血清特异性抗体。PPD 标准品 100 μ L/孔(10 mg/L)包被酶标板, 4 $^{\circ}$ C 过夜。1 g/L 牛血清白蛋白封闭 30 min, 洗涤后加入不同稀释度的待检血清, 二抗为 HRP 酶标羊抗鼠 IgG, DAB 显色, 波长 490 nm 测吸光度(A)值。以正常鼠血清作阴性对照, A 值 0.05 以上, $A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}} \geq 2.1$ 为阳性。② 特异性淋巴细胞增殖实验。分别分离各组小鼠的脾淋巴细胞, 用含 10 g/L FCS 的 RPMI 1640 调整细胞密度为 2×10^7 /L, 活细胞数

为 90% 以上, 200 μ L/孔加入 96 孔细胞培养板中, 实验组每孔加入 5 μ L PPD, 对照孔不加 PPD, 调零孔不加淋巴细胞, 37 $^{\circ}$ C 50 mL/L CO₂ 孵箱培养 68 h 后, 每孔加入 20 μ L MTI(5 g/L 溶于 PBS, pH 7.2), 继续培养 4 h 后终止培养, 1000 r/min 离心 10 min, 吸弃上清, 每孔加入 DMSO 150 μ L, 振荡 10 min, 测 $A_{570 \text{ nm}}$ 值, 结果用刺激指数(stimulation index, SI) = $A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}}$ 表示。③ IFN- γ 的诱导和测定。用含 10 g/L FCS 的 RPMI 1640 调整细胞密度为 5×10^7 /L, 200 μ L/孔加入 96 孔细胞培养板中, 同时每孔加入 5 μ L PPD, 37 $^{\circ}$ C 50 mL/L CO₂ 孵箱培养 72 h 后, 每组 5 个孔的培养液混合, 5000 r/min 离心 5 min, 取上清 -20 $^{\circ}$ C 冻存备检。IFN- γ 的含量的检测用 ELISA 的方法, 以 IFN- γ 的标准品作标准曲线计算 IFN- γ 的含量。

统计学处理: 所有计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 软件包进行处理, 方差不齐时应用秩和检验。

2 结果

2.1 免疫小鼠血清抗-PPD IgG Mtb 尾静脉攻击后 6 wk pcDNA/MPT64 组抗-PPD 抗体滴度明显高于其余各组($P < 0.01$, Tab 1), BCG 组抗体滴度增幅不大。

表 1 小鼠血清抗-PPD 抗体、脾淋巴细胞增殖和 IFN- γ 分泌
Tab 1 Serum anti-PPD Ab, spleen lymphocyte proliferation, supernatants IFN- γ in immunized mice ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

Group	IgG($A_{570 \text{ nm}}$)	SI	IFN- γ (ng/L)
PBS	0.130 \pm 0.011	0.60 \pm 0.01	60.21 \pm 0.72
pcDNA3.1	0.569 \pm 0.014	1.41 \pm 0.03	75.19 \pm 0.25
BCG	0.849 \pm 0.002 ^a	4.70 \pm 0.05 ^a	2456.79 \pm 1.09 ^a
pcDNA/MPT64	1.115 \pm 0.005 ^{bc}	2.80 \pm 0.02 ^{bc}	1913.80 \pm 1.95 ^{bc}

^a $P < 0.05$ vs PBS and pcDNA3.1; ^b $P < 0.05$ vs BCG.

2.2 免疫小鼠脾淋巴细胞增殖 BCG 和 pcDNA/MPT64 免疫组小鼠脾淋巴细胞在体外经 PPD 刺激后, 可引起淋巴细胞显著的增殖反应, 其 SI 超过 PBS 组 2 倍以上; 空质粒免疫组小鼠淋巴细胞增殖不明显, SI 低于 1.3(Tab 1)。BCG 组与 pcDNA/MPT64 组间差异有显著性($P < 0.01$)。

2.3 免疫小鼠脾淋巴细胞特异性 IFN- γ 分泌 PBS 和空质粒免疫组小鼠 IFN- γ 分泌不明显。BCG 组与 pcDNA/MPT64 组间差异显著($P < 0.01$, Tab 1); pcDNA/MPT64 和 PBS、空质粒免疫组组间差异显著($P < 0.05$, Tab 1)。

2.4 免疫小鼠肺、脾组织荷菌量 BCG 组和 MPT64 DNA 疫苗组明显低于对照组($P < 0.01$), BCG 组低于 MPT64 DNA 疫苗组($P < 0.05$, Tab 2).

表 2 DNA 疫苗对鼠结核分枝杆菌感染的保护效果

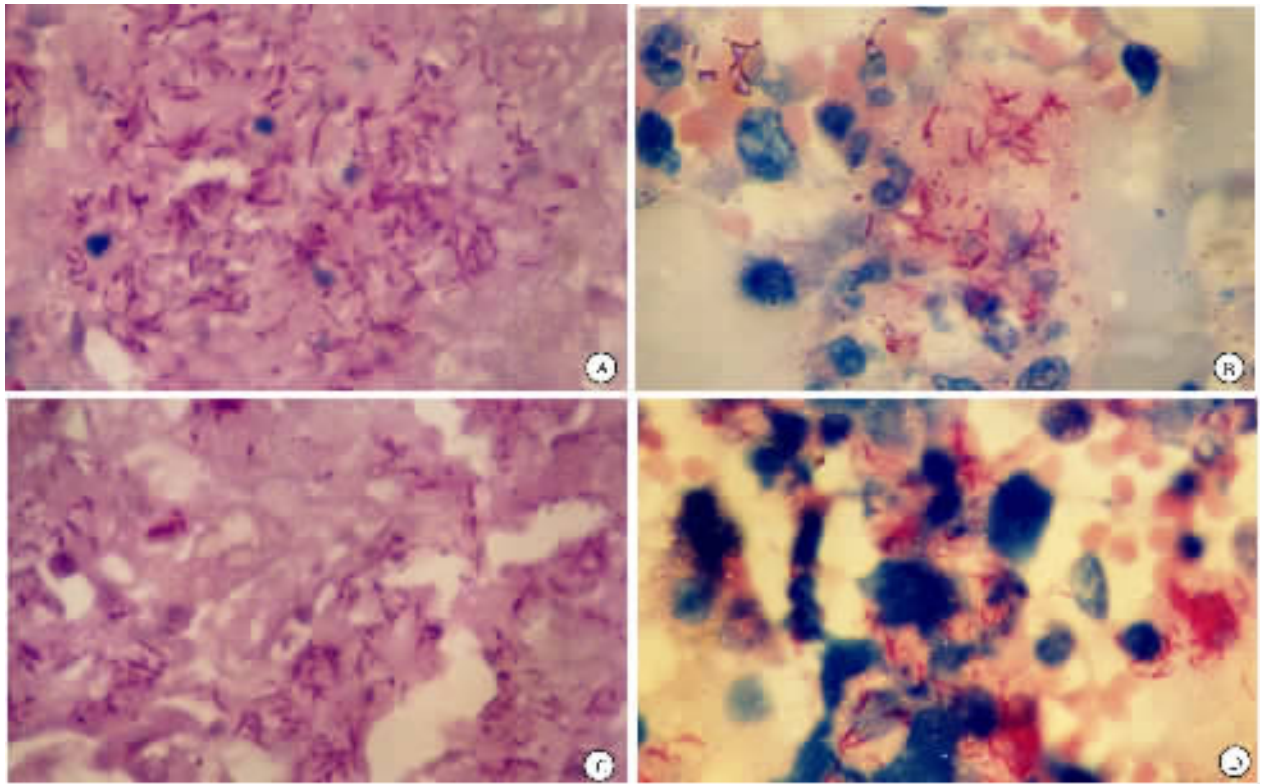
Tab 2 Vaccine-induced protection in mouse model with *M. tuberculosis* ($\bar{x} \pm s$, CFU/g)

Vaccine group	n	Lung	Spleen
PBS	5	7.852 ± 0.001	7.190 ± 0.014
pcDNA3.1 +	4	7.700 ± 0.034	7.081 ± 0.052
BCG	5	6.448 ± 0.006 ^a	5.403 ± 0.062 ^a
pcDNA/MPT64	5	7.322 ± 0.567 ^{bc}	6.496 ± 0.738 ^{bc}

^a $P < 0.01$ vs PBS and pcDNA3.1 ; ^c $P < 0.05$ vs BCG.

2.5 免疫小鼠肺组织病理 *Mtb* 尾静脉攻击后 6 wk 小鼠肺组织切片抗酸染色 PBS 对照组(Fig 1A) :*Mtb*

呈多片簇状分布,数目众多. BCG 组(Fig 1B) *Mtb* 呈零星分布,数目较 PBS 和 pcDNA3.1 + 组(Fig 1C)明显减少. pcDNA/MPT64 组(Fig 1D) *Mtb* 呈小簇状和散在分布,数目较 PBS 和 pcDNA3.1 + 组明显减少,但比 BCG 组为多. *Mtb* 感染后 6 wk 小鼠肺组织 HE 染色镜下病理改变: PBS 和 pcDNA3.1 + 组肺组织充血、实变,部分肺泡结构消失,可见数量不等的浆液纤维素性渗出液、少量淋巴细胞和巨噬细胞浸润以及明显的坏死灶,未见结核肉芽肿形成. pcDNA3.1 + 组病变程度比 PBS 组稍轻. BCG 组:肺少量充血,渗出比 B 组轻,肺泡壁轻度肿胀、增厚,可见由上皮样细胞、多核巨细胞和少量淋巴细胞组成的结核肉芽肿,未见坏死灶. pcDNA/MPT64 组:可见数量不等的浆液纤维素性渗出液及少量淋巴细胞和巨噬细胞浸润,结核性肉芽的形成不明显.



Control mice PBS (A) or mice vaccinated with pcDNA3.1 (B), BCG (C), and pcDNA/MPT64 (D) were challenged (10^6 CFU) of *M. tuberculosis* H37Rv. Ziehl-Neelsen $\times 1000$.

Fig 1 Acid-fast bacillus staining of lung tissues from vaccinated mice infected with *M. tuberculosis* for 6 weeks

图 1 *M. tuberculosis* H37Rv 攻击 6 wk 后免疫小鼠肺抗酸染色

2.6 动物存活时间 观察 200 d 各组小鼠 50% 死亡的平均时间. BCG 组无 1 例死亡, PBS 和空质质组的平均存活时间分别为 59 d 和 75 d, MPT64 DNA 疫苗的平均存活时间为 95 d.

3 讨论

目前,结核病仍然是严重威胁人类健康的主要传染病之一. 由于 BCG 的免疫效果不稳定,寻找一种比 BCG 更有效的抗 *Mtb* 感染的疫苗已经成为当务之

急. MPT64 是 *Mtb* 的早期培养液蛋白成分之一, M_r 23 000, 由 *mpt64* 基因编码, ORF 为 687 bp. MPT64 仅存在于 *Mtb* 的 H37Rv, H37Ra, Erdman 及 BCG 的一些亚株如 Tokyo, Moreau, Russian 株之中, 而 BCG 的其他亚株 Glaxo, Pasteur, Canadian, Tice, Danish 1331 和麻风分枝杆菌则缺乏该基因. MPT64 是重要的 T 细胞抗原, 主要诱导特异性 CTL 的形成和 IFN- γ 的分泌, 也能诱导体液免疫^[3,4]. 在本实验中 H37Rv 攻击后 6 wk, 免疫小鼠的 PPD 特异性抗体较对照组均有不同程度的增加, 以 pcDNA/MPT64 组最高, BCG 组次之. PPD 特异性脾淋巴细胞增殖应答和 IFN- γ 分泌水平, BCG 组和 pcDNA/MPT64 组显著升高, 说明 pcDNA/MPT64 DNA 疫苗和 BCG 一样在小鼠体内诱导了免疫记忆, 当再次遇到相同抗原刺激时便激活了更为强烈的细胞和体液免疫应答.

从肺脾器官荷菌量、组织病理改变和动物存活时间来看, 阴性对照组 (PBS 和 pcDNA 3.1) 菌落计数 (CFU 和抗酸染色) 都较高, 肺组织主要病理改变为大量的浆液纤维素性渗出、极少的炎症细胞浸润和不同程度的灶性坏死, 动物存活时间最短, 脾组织病理表现不典型, 多为淋巴细胞增生和组织细胞浸润. 阳

性对照组 (BCG) 荷菌量较低, 肺、脾组织都可见到大量的淋巴细胞增生、组织细胞浸润, 肺组织还可看到大量类上皮细胞的聚集和结核肉芽肿的形成. pcDNA/MPT64 DNA 免疫组荷菌量也较其 PBS 和空质粒组明显减低, 但是增生性改变没有 BCG 组明显. 以上结果提示, MPT64 DNA 疫苗对鼠 *Mtb* 感染有明显的保护作用, MPT64 可作为结核病新型疫苗的候选抗原之一.

【参考文献】

- [1] Doherty TM, Andersen P. Tuberculosis vaccines: Developmental work and the future [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2000; 6(3): 203-208.
- [2] Enserink M. Driving a stake into resurgent TB [J]. *Science*, 2001; 293(5528): 234-235.
- [3] Kamath AT, Feng CG, Macdonald M, et al. Differential protective efficacy of DNA vaccines expressing secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Infect Immun*, 1999; 67: 1702-1707.
- [4] Delogu G, Howard A, Collins FM, et al. DNA Vaccination against tuberculosis: Expression of a ubiquitin-conjugated tuberculosis protein enhances antimycobacterial immunity [J]. *Infect Immun*, 2000; 68(6): 3097-3102.

编辑 何扬举

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2004)19-1744-01

成人水痘 15 例

胡东风¹, 柴自杰², 杨淑娟² (1 解放军 68232 部队医院, 宁夏 银川 750024; 2 解放军 68202 部队卫生科, 甘肃 天水 741000)

【关键词】水痘; 成人

【中图分类号】R752 【文献标识码】B

1 临床资料 2004-02, 银川市某建筑工地发生成人水痘 15 例, 均为男性, 年龄 18~41(平均 25.2)岁. 其中轻症水痘 13 例, 病情较重 2 例, 皮疹多而密集, 并发病毒性结膜炎. 因首例被误诊为上呼吸道感染和皮炎, 在门诊治疗 10 d, 未隔离, 直至痊愈, 造成局部流行, 共发生 14 例第二代水痘. 主要症状为躯干、头面和四肢近端红色斑、丘、疱疹多, 四肢远端较少, 疱疹进行性增多, 位置表浅, 椭圆形, 形似露珠, 直径多为 3~5 cm, 壁薄, 部分破溃, 周围有红晕, 疱液透明, 混浊或脓性各异^[1], 伴有瘙痒. 除首例外, 本组 14 例均住院隔离治疗 7 d, 分别给予扑尔敏 4 mg 口服, 每日 3 次, 连用 3 d, 薄荷喉片 2

片含服, 每日 3 次, 连用 5 d, 病毒灵 0.2 g 口服, 每日 3 次, 连用 7 d, 青霉素钠 64 Mu 静滴, 每日 1 次, 连用 5 d, 病毒唑 0.5 g 静滴, 每日 1 次, 连用 5 d^[2], 维生素 B₁₂ 0.5 mg 肌注, 每日 1 次, 连用 3 d. 其中 3 例皮肤瘙痒明显者, 加用 50 g/L 碳酸氢钠液局部涂擦, 每日 3 次, 连用 3 d. 2 例并发病毒性结膜炎者, 加用病毒灵眼药水滴眼, 每日 3 次, 连用 3 d; 氟霉素眼药水滴眼, 每日 3 次, 连用 3 d; 并分别一次性注射丙种球蛋白 0.3 g. 均在 7 d 后临床治愈, 并对密切接触者进行医学观察, 未发现继发感染者. 水痘疫情得到控制.

2 讨论 本组首例为该次水痘流行的传染源, 发病时正值民工集中报到, 人员拥挤, 居住区空气流通差; 人员多为偏僻农村籍, 易感者多, 原籍与驻地气候差别明显, 集体处于应激状态, 身体抵抗力下降. 发病后, 未及时确认, 是造成内部传播范围较广的主要原因. 另外, 本组病例治疗方案用药均采用常用的普通药品, 价格低, 适合普通群体, 且效果较好, 一般 7 d 内临床治愈, 值得在卫生医疗条件较差, 民工集中地或偏远地区推广.

【参考文献】

- [1] 蔡菲, 朱天毅. 成人水痘与儿童水痘各 40 例临床分析 [J]. 浙江临床医学, 2003; 5(3): 216.
- [2] 刘辉, 徐宏. 成人水痘 31 例临床分析 [J]. 中国皮肤病学杂志, 2003; 17(4): 942.

编辑 潘伯荣

收稿日期 2004-05-24; 修回日期 2004-06-27

作者简介 胡东风(1973-), 男(汉族), 河南省开封市人. 本科, 医师.

Tel. (0951) 2985809 Email: czj-true@163.com