

# DNA 疫苗对感染结核分枝杆菌耐药株小鼠治疗效果的病理学评价

白雪娟 李宁 余琦 梁艳 刘成龙 张俊仙 阳幼荣 吴雪琼

**【摘要】** 目的 观察 HSP65 DNA、Ag85A DNA、Ag85A DNA 联合利福平、Ag85A/ESAT-6 嵌合 DNA、Ag85A/ESAT-6 嵌合 DNA 联合利福平对感染结核分枝杆菌耐药株小鼠治疗后的肺、肝、脾脏病理组织学变化,研究和评价该 DNA 疫苗治疗效果。**方法** 将用结核分枝杆菌高耐利福平低耐异烟肼临床分离株 HB361 尾静脉注射 17~19 g 的 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠随机分为 8 组,每组 10 只。感染后 3 d 开始,分别用生理盐水、pVAX1 空载体、利福平、HSP65 DNA、Ag85A DNA、Ag85A DNA 联合利福平、Ag85A/ESAT-6 嵌合 DNA、Ag85A/ESAT-6 嵌合 DNA 联合利福平治疗 60 d。治疗结束后 3 周,分别取肺、肝、脾脏组织观察病理改变,抗酸染色计数脾脏残余菌量。**结果** 生理盐水组、pVAX1 空载体组及利福平组小鼠肺、肝、脾脏组织病变严重,范围广泛,各 DNA 疫苗治疗组小鼠的肺、肝、脾脏组织病变得不同程度改善,以 Ag85A DNA、Ag85A DNA 联合利福平组最为显著,该组小鼠脾脏组织中残余菌数也最少。**结论** 根据小鼠肺、肝、脾脏组织病理学指标变化,能够客观且有效地评价 DNA 疫苗对结核小鼠的治疗效果,结果表明 Ag85A DNA 疫苗治疗结核分枝杆菌耐药株感染小鼠效果最优。

**【关键词】** 分枝杆菌,结核; 结核,抗多种药物性; 疫苗,DNA; 病理学

## Histopathological evaluation of DNA vaccines on mice infected with multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*

BAI Xue-juan, LI Ning<sup>△</sup>, YU Qi, LIANG Yan, LIU Cheng-long, ZHANG Jun-xian, YANG You-rong, WU Xue-qiong<sup>\*</sup>. <sup>△</sup>Department of Pathology, <sup>\*</sup>The Institute for Tuberculosis Research, the 309 hospital of PLA, Beijing 100091, China

Corresponding author: LI Ning, Email: davidlee65@sina.com.cn; WU Xue-qiong, Email: wu-xueqiong@263.net

**【Abstract】 Objective** By observing the histopathological changes in lung, liver and spleen of mice, to study the therapeutic effects of DNA vaccines (HSP60 DNA, Ag85A DNA, Ag85A DNA combined with rifampin, chimeric Ag85A/ESAT-6, chimeric Ag85A/ESAT-6 combined with rifampin) in the mouse model of multi-drug resistant (MDR) *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Methods** Pathogen-free female BALB/c mice of 6-8 weeks of age were purchased. 80 BALB/c mice were infected with strain HB361 by intratail-vein injection HB361, which was resistant to high level of RFP, and low level of isoniazid (INH), and then were divided into 8 groups. After 3 days, the mice were treated by saline, vector pVAX1, rifampin, HSP60 DNA, Ag85A DNA, Ag85A DNA combined with rifampin, chimeric Ag85A/ESAT-6, chimeric Ag85A/ESAT-6 combined with rifampin for 60 days, respectively. The mice were killed after 3 weeks' treatment. We observed the lung, liver and spleen pathological changes and counted the residual TB in spleen by acid-fast staining. **Results** The pathological condition of lung, liver and spleen in mice treated by DNA vaccine were better than the control groups, especially the Ag85A DNA group and Ag85A DNA combined with rifampin group. Also the residual TB of the Ag85A DNA group and Ag85A DNA combined with rifampin group were least in spleen. **Conclusions** We can evaluate the therapeutic effects of DNA vaccine objectively and accurately according to the histopathological changes in lung, liver and spleen. And the results show that Ag85A DNA vaccine could be an effective agent to therapy the mouse infected by MDR-TB.

**【Key words】** *Mycobacterium*, tuberculosis; Tuberculosis drug multidrug-resistant; Vaccines, DNA; Pathology

结核病是由结核分枝杆菌引起的人兽共患传染性疾病,可累及全身多个脏器,以肺结核最为常见。由于菌株耐药、菌株变异及高危人口流动等多方面原因,结核发病率在世界范围内呈不断上升趋势,其中菌株耐药问题尤为严重,这使得临床上部分结核病患者“无药可治”,同时给结核病的防治带来困难。众多研究已经从结核分枝杆菌分泌性蛋白和紧张性蛋白中发现了多种保护性抗原,如 Ag85A、6 kD 早期分泌蛋白(6

kD early secretory antigenic target, ESAT-6)、65 kD 热休克蛋白(HSP65)、HSP70 等<sup>[1-3]</sup>,其编码基因的质粒 DNA 可不同程度增加结核小鼠免疫力,因此这些 DNA 有可能成为结核病防治的新型疫苗,很多学者在其防治结核病方面进行了系列研究。本研究应用 HSP65 DNA、Ag85A DNA、Ag85A DNA 联合利福平、Ag85A/ESAT-6 嵌合 DNA、Ag85A/ESAT-6 嵌合 DNA 联合利福平治疗高耐利福平低耐异烟肼临床分离株 HB361 小鼠实验模型,比较不同治疗组间小鼠肺、肝、脾脏组织病变损害范围、病损程度、结核分枝杆菌残存量及病理组织学改变的特点,以评价上述 DNA 疫苗的治疗效果。

## 材料与方法

### 一、材料

1. 质粒和菌株:结核分枝杆菌 Ag85A DNA 疫苗和 pVAX1 空载体由上海海归生物科技有限公司制备,结核分枝杆菌 HB361 为临床分离的高耐利福平低耐异烟肼耐药株。结核分枝杆菌 Ag85A DNA 疫苗和 pVAX1 空载体浓度均为 1 mg/ml,纯度较高, A260/A280 = 2.016 > 1.800,几乎不含蛋白质和 RNA。

2. 实验动物:6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠,体重 17~19 g,购自解放军军事医学科学院实验动物中心。

### 二、方法

1. 结核病模型制备:尾静脉注射 0.4 ml 结核分枝杆菌临床分离株 HB361 菌悬液,建立结核分枝杆菌耐药株感染的动物模型。

2. 小鼠感染情况:感染后 8 周,随机选取 4 只小鼠进行解剖,观察小鼠肺、肝、脾大体病理及组织病理学改变。

3. DNA 疫苗免疫及利福平治疗:将感染后的小鼠随机均匀分为 8 组,每组 10 只小鼠,分别给予不同处理。生理盐水组:每次每只小鼠肌内注射生理盐水 100  $\mu$ l,每 15 d 注射 1 次,共 5 次。pVAX1 空载体组:每次每只小鼠肌内缓慢注射 pVAX1 载体 DNA 100  $\mu$ g/100  $\mu$ l,每 15 d 注射 1 次,共 5 次。利福平组:每天 0.02 mg/g 体重给药,共服药 2 个月。HSP65 DNA 组、Ag85A DNA 疫苗组、Ag85A DNA 联合利福平组、Ag85A/ESAT-6 嵌合 DNA 组及 Ag85A/ESAT-6 嵌合 DNA 联合利福平组的给药方式及剂量同前。

4. 小鼠肝、脾、肺组织病理学检查:治疗结束后 3 周,取小鼠肺、肝、脾脏组织固定于 10% 中性甲醛溶液中,经脱水处理后,石蜡包埋,切片,HE 染色,镜下观察各组小鼠肺、肝、脾脏组织病理改变。观察肺及脾脏组织时,估算病变区域在整个组织切片中所占百分比进行比较。观察肝脏组织时,在每只小鼠组织切片中随机选取 5 个低倍视野( $\times 20$  视野,LPF),计算平均视野中病灶数进行比较。

5. 小鼠脾脏组织残余结核分枝杆菌计数:将小鼠脾脏石蜡标本切片,行抗酸染色,将切片中组织以 1 mm<sup>2</sup> 为单位标记分割,显微镜下计数每个单位格中结核分枝杆菌数量,以此计算平均 1 mm<sup>2</sup> 面积中残余菌量。

## 结 果

1. 小鼠感染情况:感染后 8 周,4 只小鼠脾脏可见大小不等灰黄色病灶,镜下均为干酪样坏死;脾脏有不同程度肿大,血管及血窦扩张充血,淋巴组织增生;肝脏变化不明显。

2. 肺脏组织病理变化(表 1,图 1):治疗结束后 3 周,生理盐水组及 pVAX1 空载体组小鼠肺组织病变广泛、严重,肺泡结构破坏显著,肺泡腔内可见多量渗出的蛋白液、泡沫细胞及中性粒细胞,肺泡间隔水肿、增宽伴有多量淋巴细胞浸润;细支气管管腔内可见坏死的中性粒细胞碎屑;病灶组织局部伴有干酪样坏死,整体病变范围占到 80%。利福平治疗组小鼠肺组织渗出性病变广泛,局部仍可见干酪样坏死,但部分区域可见上皮样细胞增生构成的肉芽肿病变,病变区域约 70%。DNA 疫苗治疗后小鼠病变较局限,渗出性改变减轻,肉芽肿样增生性病变为主,坏死不明显,病变区域约 10%~50%。Ag85A/ESAT-6 嵌合 DNA 疫苗组及其联合利福平治疗组病变范围约为 30%~50%。Ag85A DNA、Ag85A DNA 联合利福平及 HSP65 治疗组病变范围约为 10%~20%,大部分肺泡结构完整、清晰,肺泡上皮延续。

表1 治疗后小鼠不同脏器组织病理学变化

组别	肺	肝	脾
生理盐水组	渗出及坏死性病变为主,范围约 80%	肝细胞点、灶性坏死(9 灶/LPF), 汇管区可见多量淋巴细胞及浆细胞浸润	坏死为主,范围约 80%
pVAX1 空载体组	渗出及坏死性病变为主,范围约 80%	肝细胞点、灶性坏死(5 灶/LPF), 汇管区可见多量淋巴细胞及浆细胞浸润	坏死为主,范围约 80%
利福平组	渗出及坏死性病变为主,肉芽肿病变可见,范围约 60%	肝细胞点、灶性坏死(7 灶/LPF), 汇管区可见多量淋巴细胞及浆细胞浸润	坏死为主,范围约 80%
HSP65 DNA 组	肉芽肿性病变为主,范围约 30%	肝细胞点、灶性坏死(2 灶/LPF), 汇管区可见少量淋巴细胞及浆细胞浸润	肉芽肿性病变为主,病变范围约 20%
Ag85A DNA 组	肉芽肿性病变为主,范围约 20%	肝细胞点、灶性坏死(0~1 灶/LPF), 汇管区可见少量淋巴细胞及浆细胞浸润	肉芽肿性病变为主,病变范围约 10%~20%
Ag85A DNA 联合利福平组	肉芽肿性病变为主,范围约 20%	肝细胞点、灶性坏死(2 灶/LPF), 汇管区可见少量淋巴细胞及浆细胞浸润	肉芽肿性病变为主,病变范围约 30%
Ag85A/ESAT-6 嵌合 DNA 组	肉芽肿性病变为主,范围约 50%	肝细胞点、灶性坏死(2 灶/LPF), 汇管区可见少量淋巴细胞及浆细胞浸润	肉芽肿性病变为主,病变范围约 40%
Ag85A/ESAT-6 嵌合 DNA 联合利福平组	肉芽肿性病变为主,范围约 40%~50%	肝细胞点、灶性坏死(3 灶/LPF), 汇管区可见少量淋巴细胞及浆细胞浸润	肉芽肿性病变为主,病变范围约 50%

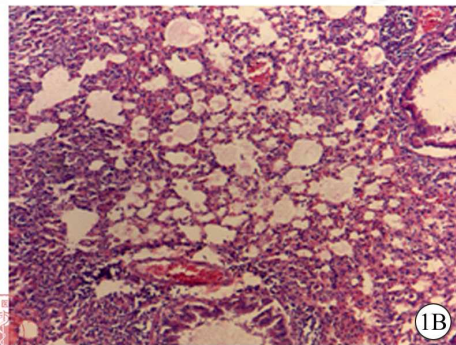
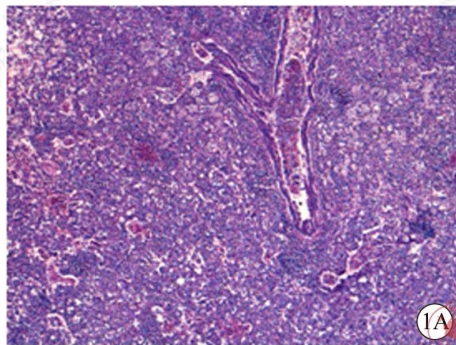


图1A 生理盐水组小鼠肺组织病变广泛、严重 图1B Ag85A DNA组病变范围约为20%,大部分肺泡结构完整、清晰,肺泡上皮延续(HE ×20)

3. 肝脏组织病理变化(表1,图2):治疗结束后3周,生理盐水组、pVAX1空载体组及利福平组小鼠肝脏大体观为红褐色,质地软,均质,显微镜下观察主要表现为肝细胞点、灶性坏死,肝内血管扩张、充血,血管周围和汇管区可见淋巴细胞浸润,汇管区纤维结缔组织增生。其余各治疗组均表现为肝细胞点、灶性坏死,血管周围和汇管区淋巴细胞浸润,但坏死范围及程度低于生理盐水、pVAX1空载体组及利福平组。

4. 脾脏组织病理变化(表1,图3):治疗结束后3周,各组小鼠脾脏组织不同程度肿大,呈红褐色,质中等,切面均质。生理盐水、pVAX1空载体及利福平组小鼠的脾脏正常组织结构消失,表现为片状坏死伴多量中性粒细胞浸润,坏死灶周边偶见上皮样细胞聚集伴淋巴组织增生,整个病变区域占到80%,以坏死为主。DNA疫苗治疗组小鼠脾脏病变区域约20%~40%,表现为不同程度的坏死伴中性粒细胞浸润,坏死周边为增生性肉芽肿结节,其中Ag85A DNA及HSP65 DNA疫苗治疗组病变区域约占10%~20%,以肉芽肿样增生性病变为主,小血管壁增厚明显,坏死区较少。

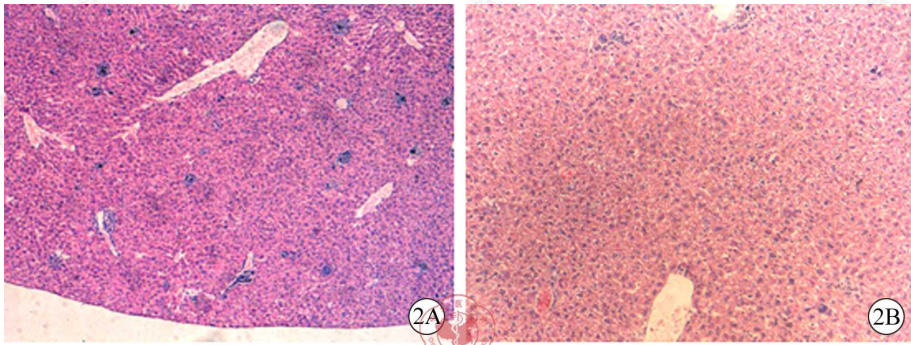


图2 生理盐水组(2A)及Ag85A DNA组(2B)小鼠肝脏病理改变,其中可见肝细胞点、灶性坏死并淋巴细胞浸润。Ag85A DNA疫苗组病灶数量明显少于生理盐水组(HE ×20)

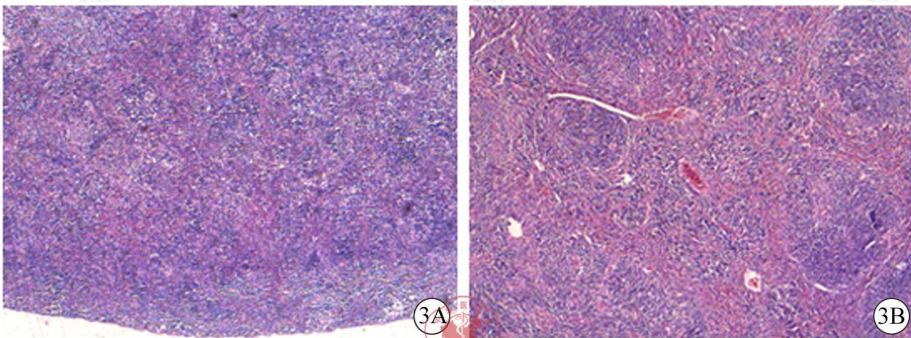


图3A 生理盐水组脾脏正常组织结构消失,整个病变区域占到80% 图3B Ag85A DNA病变范围明显减小,可见脾小体结构(HE ×20)

5. 小鼠肺、肝、脾脏组织结核分枝杆菌残存量比较(表2,3;图4):抗酸染色显示各分组小鼠脾脏组织中残余结核杆菌只数比例最高,肝脏组织阳性只数最少。小鼠脾脏组织切片中平均每1 mm<sup>2</sup>面积残余菌量以Ag85A DNA疫苗联合利福平组、Ag85A DNA疫苗组较少,生理盐水、pVAX1空载体及利福平组较多。

### 讨 论

近来结核病重新成为危害全球健康的呼吸道传染病,继之对该病的防控和治疗已成为国内外科科研人员关注的焦点。很多研究表明,抗结核治疗结合免疫治疗不仅可提高机体免疫力,而且可以提高化疗效果,缩短疗程,由此可见DNA疫苗在结核病疫苗的开发中占有重要的地位。1999年Lowrie等<sup>[4]</sup>首次将HSP65质粒DNA疫苗用于小鼠结核病模型的治疗,多名学者曾使用HSP65 DNA疫苗或联合不同抗生素治疗小鼠结核模型,发现HSP65 DNA不仅能显著减少小鼠肺脏、脾脏组织的结核分枝杆菌载量,而且能增加抗生素的治

表2 免疫治疗后各组小鼠肺、肝、脾脏组织抗酸染色情况(只)

组别	鼠数	抗酸染色阳性		
		肺	肝	脾
生理盐水组	10	2	3	8
pVAX1空载体组	10	2	1	8
利福平组	10	2	1	7
HSP65 DNA组	10	1	0	7
Ag85A DNA组	10	0	0	3
Ag85A DNA联合利福平组	10	3	0	8
Ag85A/ESAT-6嵌合DNA组	10	2	1	8
Ag85A/ESAT-6嵌合DNA联合利福平组	10	0	1	6

表3 治疗后各组小鼠脾脏组织切片中每单位面积抗酸染色阳性菌数量比较

组别	脾脏组织切片抗酸染色阳性菌数量(条/单位面积个数)										合计 (条/mm <sup>2</sup> )
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
生理盐水组	0/7 <sup>a</sup>	70/6	52/8	0/6	2/6	14/6	3/6	3/10	25/8	4/6	2.5
pVAX1 空载体组	15/5	14/7	34/6	14/9	27/6	18/8	22/4	10/5	0/6	0/8	2.4
利福平组	4/3	1/5	0/6	69/6	65/5	0/5	0/12	4/4	2/6	44/10	3.0
HSP65 DNA 组	0/12	16/6	22/5	5/6	4/4	1/6	0/5	0/12	6/6	9/8	0.9
Ag85A DNA 组	0/15	6/7	0/11	0/6	16/7	15/8	0/14	0/9	0/10	0/10	0.4
Ag85A DNA 联合利福平组	3/8	7/14	8/8	5/6	11/6	5/6	0/12	0/8	3/8	3/8	0.5
Ag85A/ESAT-6 嵌合 DNA 组	3/5	15/7	14/8	12/5	13/10	0/9	2/3	0/10	9/10	11/10	1.0
Ag85A/ESAT-6 嵌合 DNA 联合利福平组	5/3	7/4	10/5	40/4	0/6	0/6	4/4	0/8	0/10	19/10	1.4

注:<sup>a</sup>表示生理盐水组第一只小鼠脾脏组织切片约7个单位面积,抗酸染色共查到0条阳性杆菌

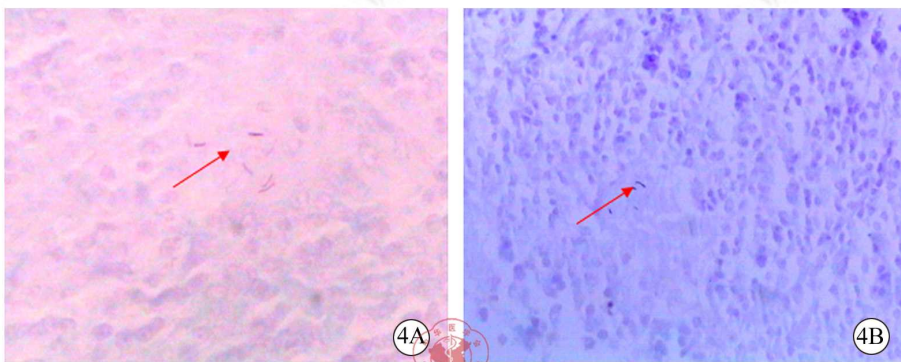


图4A 生理盐水组小鼠脾脏组织每高倍视野残存菌量较多(6条/HPF) 图4B Ag85A DNA疫苗组小鼠脾脏组织每高倍视野残存菌量较少(1条/HPF)(抗酸染色×400)

疗活性,可见 HSP65 DNA 疫苗确实对结核病具有一定的免疫治疗作用<sup>[4-5]</sup>。本实验中我们用 HSP65 DNA 疫苗治疗感染多耐药结核分枝杆菌的小鼠模型,作为阳性对照,结果显示该疫苗治疗后小鼠的肺、肝、脾脏组织病变确实得到不同程度改善,结果与文献报道相符,同时也表明我们的研究方法可行。Ag85A 是结核分枝杆菌和卡介苗主要的分泌性蛋白,可从早期培养液中分离,是一种热不稳定的蛋白,Ag85A DNA 能显著增强小鼠的免疫功能<sup>[6]</sup>,吴雪琼等<sup>[7]</sup>对 Ag85A DNA 疫苗免疫治疗方面的研究发现,其对结核小鼠亦具有一定的免疫治疗作用。ESAT-6 DNA 免疫小鼠可产生保护性,也可作为结核病 DNA 疫苗的候选者,其在结核免疫治疗方面研究亦有报道<sup>[8]</sup>。我们研究的目的是应用上述不同 DNA 疫苗、DNA 基因嵌合体疫苗并分别联合利福平治疗多耐药结核小鼠模型,通过组织病理学变化评估其疗效,寻找最优的 DNA 疫苗。

结核基本病理变化包括渗出、增生及坏死。渗出性病变更为组织充血、水肿,白细胞浸润,通常出现在结核炎症的早期或病灶恶化时;增生为主的病变多发生在菌量较少、细胞免疫占优势的情况下,表现为组织细胞聚集成团及结核结节形成;若机体抵抗力降低、菌量较多、变态反应强烈时组织溶解坏死,形成典型的结核改变即干酪样坏死。上述三种病变可同时存在,但通常以其中一种病变为主。我们首先构建了感染结核分枝杆菌耐药株的小鼠模型,设阴性及阳性对照组,利用 HSP65 DNA 疫苗、Ag85A DNA 疫苗、Ag85A/ESAT-6 嵌合 DNA 疫苗并分别联合利福平治疗 3 周后发现,与生理盐水和空载体对照组相比,DNA 疫苗治疗组肝脏组织切片中肝细胞点、灶状坏死约 2~3 灶/LPF,病变轻于前三组(5~9 灶/LPF);DNA 疫苗治疗后小鼠的肺脏和脾脏组织病理状况得到显著改善,病变范围明显缩小,且主要以增生病变为主,如多量组织细胞增生、聚集伴多量淋巴细胞浸润。Ag85A DNA、Ag85A DNA 联合利福平组病变范围明显小于 Ag85A/ESAT-6 嵌合 DNA 疫苗及其联合利福平治疗组,利福平治疗组小鼠病变程度与生理盐水及空载体组一致,说明利福

平治疗无效。对肺、肝、脾脏组织进行抗酸染色,发现结核分枝杆菌主要残存于小鼠脾脏组织中,可能由于脾脏组织是主要储血及免疫器官,因而成为机体抵抗结核免疫反应的主要场所,提示进一步在脾脏组织中比较结核杆菌残余菌量更有意义。抗酸染色后显微镜下计数各组小鼠脾脏组织切片中每  $1 \text{ mm}^2$  面积阳性菌数,结果生理盐水、空载体组及利福平治疗组数目远远高于 DNA 疫苗治疗组,而 Ag85A DNA 组数量最少,Ag85A DNA 联合利福平组次之。

综合肺、肝、脾脏组织病理学表现和抗酸染色计数结果,发现 Ag85A DNA、Ag85A DNA 联合利福平治疗组对耐多药结核小鼠的免疫治疗作用优于 HSP65 治疗组、Ag85A/ESAT-6 嵌合 DNA 疫苗及其联合利福平治疗组,由此我们也探索和总结出一种合理且有效评价 DNA 疫苗治疗效果的病理学研究方法,进一步推测 Ag85A DNA 疫苗是一种治疗多药耐药结核病的有效免疫制剂,可能会给临床上因耐药而无药可治的结核病患者带来治疗的曙光。

### 参 考 文 献

- [1] Scriba TJ, Tameris M, Mansoor N, et al. Modified vaccinia Ankara-expressing Ag85A, a novel tuberculosis vaccine, is safe in adolescents and children, and induces polyfunctional CD4 + T cells. *Eur J Immunol*, 2010, 40(1): 279-290.
- [2] Araujo Z, Acosta M, Escobar H, et al. Immunity response in tuberculosis and the role of Mycobacterium tuberculosis secretion antigens in its protection, pathology and diagnosis. *Invest Clin*, 2008, 49(3): 411-441.
- [3] 吴雪琼. 结核病 DNA 疫苗的研究进展. *中华结核和呼吸杂志*, 2000, 23(4): 253-254.
- [4] Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VL, et al. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature*, 1999, 400(6741): 269-271.
- [5] Silva CL, Bonato VL, Coelho-Castelo AA, et al. Immunotherapy with plasmid DNA encoding mycobacterial hsp65 in association with chemotherapy is a more rapid and efficient form of treatment for tuberculosis in mice. *Gene Ther*, 2005, 12(3): 281-287.
- [6] 吴雪琼, 姚光大, 王一平, 等. 由小鼠肺组织病理学改变评价结核 DNA 疫苗的保护效力. *中华预防医学杂志*, 2001, 35(6): 384-386.
- [7] 吴雪琼, 张俊仙, 李洪敏, 等. 结核分枝杆菌疫苗免疫治疗作用的研究. *中国免疫学杂志*, 2002, 18(1): 17-22.
- [8] Li Z, Song D, Zhang H, et al. Improved humoral immunity against tuberculosis ESAT-6 antigen by chimeric DNA prime and protein boost strategy. *DNA Cell Biol*, 2006, 25(1): 25-30.

(收稿日期: 2010-06-23)

(本文编辑: 吴莹)

白雪娟, 李宁, 余琦, 等. DNA 疫苗对感染结核分枝杆菌耐药株小鼠治疗效果的病理学评价[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2011, 5(1): 74-79.