

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)09-0769-03

结核分枝杆菌 MPT64-ESAT6 融合蛋白在小鼠体内诱导的免疫应答及其保护力

师长宏¹, 安家泽¹, 唐小凤¹, 王晓武², 张海¹, 柏银兰³, 徐志凯³(第四军医大学¹: 实验动物研究中心; ²预防医学系放射医学教研室; ³基础部微生物学教研室 陕西 西安 710033)

Immune responses and protective efficacy induced in mice by *Mycobacterium tuberculosis* MPT64-ESAT6 fusion protein

SHI Chang-Hong¹, AN Jia-Ze¹, TANG Xiao-Feng¹, WANG Xiao-Wu², ZHANG Hai¹, BAI Yin-Lan³, XU Zhi-Kai³¹Lab Animal Center, ²Department of Radiation Medicine, School of Preventive Medicine, ³Department of Microbiology, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To evaluate humoral and cell-mediated immune responses by MPT64 and ESAT6 fusion proteins and to test protective efficacy against *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) challenge. **METHODS:** BALB/c mice were immunized 3 times at 2-week interval subcutaneously on the back with fusion protein MPT64-ESAT6. In the spleen lymphocytes of immunized mice stimulation index (SI) was measured by MTT method and the level of secreted IFN- γ was detected by ELISA. Some of vaccinated BALB/c mice by fusion proteins were intravenously infected with 1×10^5 CFU MTB strain H37Rv. Four weeks later, bacterial load in spleens was determined. **RESULTS:** The titer of sera specific antibody in BALB/c mice immunized with fusion expression protein MPT64-ESAT6 was 1:1500. The SI of lymphocytes in fusion protein immunized group was 2.23, significantly higher than that of saline immunized group (0.88). The IFN- γ level in culture supernatant of spleen lymphocytes from the mice immunized with fusion proteins were $(4.28 \pm 0.27) \mu\text{g/L}$, significantly higher than that of saline immunized group [$(0.48 \pm 0.17) \mu\text{g/L}$, $P < 0.05$], but lower than that of Bacillus Calmette Guerin (BCG) immunized group [$(5.18 \pm 0.31) \mu\text{g/L}$]. Compared with saline immunized mice (bacterial load was 6.45 ± 0.17), dramatic reductions were observed for MTB replication in the spleen from BALB/c mice immunized with fusion proteins

(bacteria load was 5.04 ± 0.11) following a subsequent challenge, but the protective efficacy in mice immunized with MPT64-ESAT6 was not as good as that of BCG immunized group (bacterial load was 4.38 ± 0.22). **CONCLUSION:** MPT64 and ESAT6 fusion proteins could be used as a novel component of the new TB vaccine.

【Keywords】 *Mycobacterium tuberculosis*; vaccine; MPT64; ESAT6 fusion expression

【摘要】目的: 测定 MPT64 与 ESAT6 融合蛋白在小鼠体内诱导的免疫应答及保护力。方法: 将 MPT64 与 ESAT6 的融合蛋白皮下免疫小鼠 3 次, 每次间隔 2 wk, ELISA 测定免疫小鼠血清特异性抗体的滴度。最后一次免疫完成后 4 wk, 分离部分免疫小鼠脾淋巴细胞, MTT 法检测淋巴细胞刺激指数, ELISA 检测悬液中 IFN- γ 水平。另一部分免疫的 BALB/c 小鼠经尾静脉感染 MTB 毒株 H37Rv 4 wk 后计数脾脏细菌负荷数。结果: MPT64-ESAT6 融合蛋白免疫小鼠血清特异性抗体滴度 1:1500, 免疫小鼠后淋巴细胞刺激增殖指数为 2.23, 而生理盐水免疫组只有 0.88, 脾淋巴细胞悬液中诱发的 IFN- γ 为 $(4.28 \pm 0.27) \mu\text{g/L}$, 显著高于生理盐水免疫组 [$(0.48 \pm 0.17) \mu\text{g/L}$, $P < 0.05$], 但不及 BCG 免疫组 [$(5.18 \pm 0.31) \mu\text{g/L}$]。与生理盐水免疫组(细菌负荷 6.45 ± 0.17)相比较, 融合蛋白免疫的小鼠, 对攻击感染后抗 MTB 在脾脏中增殖有显著作用, 细菌负荷为 5.04 ± 0.11 , 但与 BCG 免疫组相比脾脏细菌负荷减少甚微(细菌负荷 4.38 ± 0.22)。结论: MPT64 与 ESAT6 融合蛋白可作为新型结核疫苗的候选组分。

【关键词】 结核分枝杆菌 疫苗 MPT64 ESAT6 融合表达

【中图分类号】 R392.11

【文献标识码】 A

0 引言

ESAT6 (M_t 6000 的早期分泌蛋白)和 MPT64 是结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)中重要的保护性抗原, 编码这两种蛋白的基因只存在于 MTB 毒株中而卡介苗(Bacillus Calmette Guerin, BCG)中缺失^[1], 研究发现重组的 MPT64 和 ESAT6 蛋白免疫小鼠后均可有效抵抗 MTB 感染。本研究在成功获得 MPT64 与 ESAT6 融合蛋白的基础上^[2], 研究该融合蛋白在小鼠体内诱导的免疫应答水平和对 MTB 毒株 H37Rv 攻击的保护力。

收稿日期 2005-11-17; 接受日期 2006-02-20

基金项目 国家自然科学基金(30400381)

通讯作者: 师长宏, 博士, 讲师. Tel: (029)84774787 Email: changhong

@fmmu.edu.cn

1 材料和方法

1.1 材料 MTB 毒株 H37Rv 由陕西省结核病防治研究所王瑞副主任技师惠赠,卡介苗疫苗株由兰州生物制品研究所出品(国药准字 SF20010035,批号 20011201);鼠 IFN- γ 和 ELISA 检测试剂盒购自晶美公司,潮霉素(GIBCO BRL 公司),BCG 培养增强剂(albumin-dextrose-catalase ADC)和 RPMI 1640 培养基均购自 GIBCO 公司,7H9 液体培养基购自美国 Difco 公司,改良罗氏培养基由本室自制,MTB 的培养滤液蛋白(culture filtrate proteins,CFP)由本室制备,羊抗鼠 IgG-HRP 购自华美生物公司,6~8 周龄 BALB/c 小鼠,雌性,由第四军医大学实验动物中心提供,饲养于第四军医大学动物中心感染实验室。

1.2 方法

1.2.1 MTB 毒株 H37Rv 的培养和定量 取罗氏培养基中保存的 MTB 毒株 H37Rv 接种到 7H9 培养基(含 100 g/L ADC 和 0.5 g/L Tween80) 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 3 wk,5000 r/min 离心 10 min,收集细菌,保存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。用 7H9 液体培养基系列稀释浓缩液,接种于罗氏培养基 37 $^{\circ}$ C 培养 2 wk,计数浓缩液细菌的 CFU。

1.2.2 BCG 的培养和定量 取 BCG 疫苗株接种到 7H9 液体培养基(含 100 g/L ADC 和 0.5 g/L Tween 80) 相同方法培养,收集 BCG,并计数细菌的菌落形成单位(colony forming units,CFU)。

1.2.3 融合蛋白的大量制备 取 MPT64-pPro-EX HT-ESAT6 阳性克隆^[21],活化后分别接种到 1000 mL LB 培养液中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养至对数生长期,IPTG 诱导,集菌,先进行 SDS-PAGE,采用 Invitrogen 的 Ni-NTA 纯化试剂盒纯化目的蛋白,分光光度法测定蛋白浓度。

1.2.4 免疫动物 实验随机分为 3 组,每组 10 只小鼠,一组用 MPT64-ESAT6 融合蛋白免疫 BALB/c 小鼠,免疫剂量均为 1 mg/只,共免疫 3 次,第一次和第二次免疫加有不完全福氏佐剂,第三次单纯免疫融合蛋白,每次间隔 2 wk,免疫结束后,收集小鼠血清,用 CFP 作为抗原,ELISA 测定免疫小鼠血清特异性抗体滴度,其余两组分别为 BCG 和生理盐水对照组。最后一次免疫结束后 4 wk,进行以下实验:每组取 5 只小鼠,用于测定淋巴细胞刺激指数(stimulation index,SI)和 IFN- γ 水平;其余 5 只用于毒株攻击实验。

1.2.5 脾脏淋巴细胞的分离与制备 将免疫的小鼠断颈处死,无菌取脾脏,置于平皿内 200 目的钢网上,用注射器针芯研磨,并加入 RPMI 1640 培养液冲洗。将上述细胞悬液转入 2 倍体积的淋巴细胞分离液,

1000 r/min 离心 20 min。吸取中间单核细胞层,用 RPMI 1640 液洗涤两次后计数。

1.2.6 特异性淋巴细胞增殖实验 将分离的淋巴细胞浓度调整至 5×10^8 /L,在 96 孔板中用 100 mL/L FCS 的 RPMI 1640 完全培养液培养 200 μ L/孔,同时实验组每孔加入 25 μ L MTB CFP(25 mg/L 溶于 PBS 本室制备),对照组不加 CFP,调零孔不加脾细胞 37 $^{\circ}$ C 50 mL/L CO₂ 孵箱培养 68 h 后,每孔加 20 μ L MTT(5 g/L 溶于 PBS,pH 7.2,过滤除菌),继续培养 4 h 后弃上清,加 DMSO 150 μ L/孔,振荡 10 min,测定 A_{490 nm} 值。结果用刺激指数 SI = 实验组 A 值 / 对照组 A 值表示。

1.2.7 IFN- γ 的诱生及含量的测定 5×10^9 /L 脾细胞在 24 孔板用含 10 mL/L FCS 的 RPMI 1640 完全培养液中培养 800 μ L/孔,同时加入 MTB CFP 100 μ L/孔 37 $^{\circ}$ C 50 mL/L CO₂ 孵箱培养 72 h,收集培养液,5000 r/min 离心 5 min,取上清,-20 $^{\circ}$ C 冻存备检。参照试剂盒说明(夹心 ELISA 法)测定各标本所含 IFN- γ 浓度。

1.2.8 MTB 毒株 H37Rv 的攻击实验 最后一次免疫完成后 4 wk,用 MTB 毒株 H37Rv 经尾静脉感染小鼠,剂量为 10^5 CFU/只,4 wk 后,断颈处死小鼠,脾脏匀浆,计数细菌 CFU。

统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计分析采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

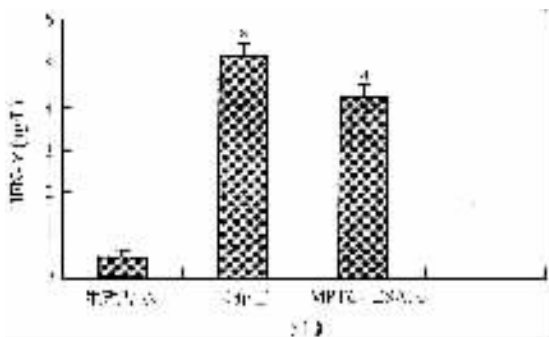
2.1 小鼠体内特异性抗体滴度 MPT64-ESAT6 融合蛋白免疫小鼠三次后血清特异性抗体滴度平均值为 1:1500。

2.2 抗原特异性脾脏淋巴细胞增殖实验 分离免疫小鼠的脾脏淋巴细胞,在体外用 CFP 抗原刺激,测定了淋巴细胞的增殖反应,与生理盐水对照组(SI 为 0.88)相比较融合蛋白 MPT64-ESAT6 免疫小鼠的脾淋巴细胞增殖明显,SI 为 2.23,BCG 免疫组 SI 为 3.58,高于融合蛋白免疫组。

2.3 脾脏淋巴细胞中诱生的 IFN- γ 水平 MPT64-ESAT6 免疫的小鼠的脾淋巴细胞悬液,体外用 CFP 刺激,其悬液 IFN- γ 含量分别为 $(4.28 \pm 0.27) \mu\text{g/L}$,与生理盐水对照组 $(0.48 \pm 0.17) \mu\text{g/L}$ 相比较有明显增加($P < 0.05$),但不及 BCG 免疫组 $(5.18 \pm 0.31) \mu\text{g/L}$, $P < 0.05$ [图 1]。

2.4 免疫小鼠对 MTB 毒株攻击时的抵抗作用 免疫完成后 4 wk,H37Rv 经尾静脉感染 BALB/c 小鼠,4

wk 后计数脾脏细菌负荷数,与生理盐水免疫组(细菌负荷数 6.45 ± 0.17)相比较,融合蛋白 MPT64-ESAT6 免疫的 BALB/c 小鼠,对攻击感染后抗 MTB 在脾脏中增殖有显著作用(细菌负荷数分别为 5.04 ± 0.11),但与 BCG 免疫组(细菌负荷数为 4.38 ± 0.22)相比较脾脏细菌负荷减少甚微。



* $P < 0.05$ vs 生理盐水. $n = 5$.

图1 融合蛋白在小鼠脾脏淋巴细胞中诱生的 IFN- γ 水平

3 讨论

卡介苗 (BCG) 是目前唯一的预防结核病疫苗,但其对成年人结核病的预防效果不稳定,保护力常发生变化 (0 ~ 80%)^[3],因此,研制全面有效的新疫苗是控制结核病的重要途径。融合亚单位疫苗具有成分明确,使用安全,可减少纯化步骤等优点而受到国内外的重视。目前已知的保护性抗原原有 MTB 早期分泌蛋白 Ag85B 复合物、ESAT6 和 MPT64^[4]等,选择这几种抗原制备的亚单位疫苗可诱导强烈的特异性免疫应答,并不受先前接触分枝杆菌的影响。单个蛋白构成的亚单位疫苗产生的特异性体液和细胞免疫应答是针对每一组分抗原的,机体获得的免疫保护力有限,因此新型 TB 疫苗着重于融合多个免疫表位^[5]。

本研究中将纯化的 MPT64 与 ESAT6 融合蛋白,免疫小鼠,特异性抗体滴度可达到 1:1500,显著高于已报道文献^[6]中抗体的滴度,融合蛋白免疫三次后,小鼠特异性淋巴细胞增殖指数显著升高,说明淋巴细胞被有效活化。IFN- γ 常被认为是抵抗 MTB 感染的一个关键性细胞因子,也是 Th1 型细胞免疫反应的重要指标, TB 的保护性效应与分泌 IFN- γ 的淋巴细胞的产生密切相关。融合蛋白 MPT64-ESAT6 免疫小鼠

诱生的 IFN- γ 水平显著高于生理盐水对照组 ($P < 0.05$) 提示这两种融合基因可能是 TB 疫苗中理想的候选基因。MTB 毒株攻击实验中,与生理盐水组相比较, MPT64-ESAT6 免疫组使得细菌数由 6.45 ± 0.17 降为 5.04 ± 0.11 ,有效控制了 MTB 的感染,但与 BCG 免疫组相比免疫保护力还是有一定差距。

研究发现,单独使用结核杆菌短期培养液中分离纯化的分泌型蛋白免疫动物,只会产生很弱的免疫应答,亚单位疫苗必须配以适宜的佐剂多次接种才能达到效果^[7],在本研究中,采用不完全福氏佐剂具有很强的免疫调节作用,可刺激产生 IL-2, IFN- γ 和 IL-12,是本室较常用的一种免疫策略。MPT64-ESAT6 融合蛋白诱导的保护力有限,分析原因可能是因为保护性抗原种类不多,难以诱导产生广泛而全面的细胞免疫应答,同时蛋白质在体内的滞留时间短并且其产生的免疫应答的持续时间也较短,需选择合适的剂量^[8],多次免疫才能达到有效的保护水平。

【参考文献】

- [1] 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(4): 1702-1707.
- [2] 师长宏, 王晓武, 朱德生, 等. 结核分枝杆菌差异蛋白 MPT64 与 ESAT6 的融合表达与纯化 [J]. 第四军医大学学报, 2005, 26(20): 1840-1842.
- [3] 范雄林, 徐志凯, 李元, 等. 结核分枝杆菌 Ag85B 成熟蛋白基因免疫 [J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(14): 1283-1287.
- [4] Doherty TM, Andersen P. Tuberculosis vaccine development [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2002, 8(3): 183-187.
- [5] 师长宏, 范雄林, 徐志凯, 等. 结核分枝杆菌分泌蛋白 Ag85B-ESAT6 的融合表达及纯化 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2004, (2): 89-92.
- [6] 薛莹, 李元, 史皆然, 等. 结核分枝杆菌分泌蛋白 Ag85B 的免疫学特性 [J]. 第四军医大学学报, 2002, 23(13): 1203-1205.
- [7] Langermans JA, Doherty TM, Vervenne RA, et al. Protection of macaques against *Mycobacterium tuberculosis* infection by a subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6 [J]. *Vaccine*, 2005, 23(21): 2740-2750.
- [8] Dietrich J, Aagaard C, Leah R, et al. Exchanging ESAT6 with TB10.4 in an Ag85B fusion molecule-based tuberculosis subunit vaccine: Efficient protection and ESAT6-based sensitive monitoring of vaccine efficacy [J]. *J Immunol*, 2005, 174(10): 6332-6339.

编辑 袁天峰