

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2004)18-1633-04

结核分枝杆菌 Ag85B-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, 范雄林, 柏银兰, 薛莹, 张海, 徐志凯 (第四军医大学基础部微生物学教研室 陕西 西安 710033)

Immunity responses and protective efficacy induced by Mycobacterium tuberculosis Ag85B-ESAT6 fusion protein in mice

SHI Chang-Hong, FAN Xiong-Lin, BAI Yin-Lan, XUE Ying, ZHANG Hai, XU Zhi-Kai

Department of Microbiology, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To evaluate humoral and cell-mediated immune response by Ag85B and ESAT6 fusion proteins and to test their protective efficacy against Mycobacterium tuberculosis (MTB) challenge. METHODS: BALB/c mice were immunized three times at a 2-week interval subcutaneously on the mouse back respectively with fusion protein Ag85B-ESAT6 and ESAT6-Ag85B that were transferred to membrane beforehand. The spleen lymphocytes of the immunized mice stimulation index (SI) were measured by MTT method and the level of secreted IFN- γ which upon antigen-specific stimulation was detected by ELISA. The fusion proteins vaccinated BALB/c mice were intravenously infected with 10^5 CFU MTB H37Rv. Four weeks later the numbers of CFU in spleens were determined. RESULTS: The titer of sera specific antibody in BALB/c mice immunized with fused expression protein Ag85B-ESAT6 was 1:1000 and that of ESAT6-Ag85B was 1:5000. The SI of fusion proteins immunized groups was significantly higher (which was 2.40 ± 0.17 and 2.60 ± 0.25 for Ag85B-ESAT6 and ESAT6-Ag85B immunized groups respectively) than that of saline immunized group (0.90 ± 0.21). The IFN- γ levels in culture supernatant of spleen lymphocytes from the fusion proteins immunized mice were (3.51 ± 0.30) $\mu\text{g/L}$ and (4.05 ± 0.41) $\mu\text{g/L}$ for Ag85B-ESAT6 and ESAT6-Ag85B immunized groups respectively, significant different from those of saline immunized group (0.50 ± 0.25) $\mu\text{g/L}$, $P <$

0.05, which were lower than that of Bacillus Calmette Guerin (BCG) immunized group (5.55 ± 0.31) $\mu\text{g/L}$. Compared with the saline immunized mice (bacteria load was 6.31 ± 0.13) dramatic reductions of MTB replication were observed in the spleen (bacteria load was 5.04 ± 0.11 and 5.15 ± 0.29 respectively, $P < 0.05$) of BALB/c mice immunized with fusion proteins following a subsequent challenge, but the protection efficacy of the mice immunized with Ag85B-ESAT6 or ESAT6-Ag85B was higher than that of BCG vaccination group. CONCLUSION: Ag85B and ESAT6 fusion protein can be used as novel components of the new TB vaccine.

【Keywords】 Mycobacterium tuberculosis; vaccines; Ag85B; ESAT6; recombinant fusion proteins

【摘要】目的: 研究 Ag85B 与 ESAT6 融合蛋白在小鼠体内诱导的体液和细胞免疫应答以及对 MTB 感染小鼠的保护力。方法: 采用皮下包埋的方法, 将预先转移到硝酸纤维素膜上的表达蛋白免疫小鼠 3 次, 每次间隔 2 wk, 用 MTB 培养上清滤液蛋白 (culture filtrate proteins, CFP) 作为抗原, ELISA 测定免疫小鼠血清特异性抗体的滴度。为了检测融合蛋白免疫小鼠引起的细胞免疫应答, 最后一次免疫完成后 4 wk, 取一部分免疫小鼠分离脾淋巴细胞, 体外用抗原刺激, MTT 法检测淋巴细胞刺激反应, 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: Ag85B-ESAT6 蛋白免疫小鼠血清特异性抗体滴度为 1:1000, ESAT6-Ag85B 蛋白免疫小鼠血清特异性抗体滴度为 1:5000。融合蛋白 Ag85B-ESAT6 和 ESAT6-Ag85B 免疫组淋巴细胞刺激增殖指数分别为 2.40 ± 0.17 和 2.60 ± 0.25 , 而生理盐水组只有 0.90 ± 0.21 ; 相对应的 IFN- γ 含量分别为 (3.51 ± 0.30) $\mu\text{g/L}$ 和 (4.05 ± 0.41) $\mu\text{g/L}$, 显著高于生理盐水对照组 (0.50 ± 0.25) $\mu\text{g/L}$, $P < 0.05$, 但不及 BCG 免疫组 (5.55 ± 0.31) $\mu\text{g/L}$ 。与生理盐水免疫组 (细菌负荷 6.31 ± 0.13) 相比较, 融合蛋白免疫的 BALB/c 小鼠, 对攻击感染后抗 MTB 在脾脏中增殖有显著作用 (细菌负荷分别为 5.04 ± 0.11 和 5.15 ± 0.29 , $P < 0.05$) 但与 BCG 免疫组相比脾脏细菌负荷减少甚微。结论: Ag85B 与 ESAT6 融合蛋白可作为新型结核疫苗的候选组分。

【关键词】 分支杆菌; 结核; 疫苗; 抗原 85B; ESAT6; 重组融合蛋白质类

【中图分类号】 R392.11 **【文献标识码】** A

收稿日期 2004-04-13; 修回日期 2004-06-22

基金项目 国家 863 课题资助项目(2001AA215201); 国家自然科学基金资助项目(30170855)

通讯作者 徐志凯. Tel. (029) 83374523 Email. Zhikaixu@fmmu.edu.cn

作者简介 师长宏(1973-), 男(汉族), 陕西省眉县人, 博士生(导师徐志凯), 讲师. Tel. (029) 83374527 Email. changhong@fmmu.edu.cn

0 引言

包含免疫优势蛋白 Ag85B 和早期分泌蛋白 ES-AT6 的重组亚单位疫苗所提供的保护效力与曾经接触过环境分枝杆菌无关,这个发现证实亚单位疫苗不受致敏作用的影响而能刺激保护性 T 细胞应答,从而使得这种疫苗可能在 BCG 免疫无效的地区应用^[1]. 亚单位疫苗在小鼠中证实有效,可产生与 BCG 相同的免疫效果. 为了全面评估我们表达的 Ag85B 与 ESAT6 融合蛋白的免疫学特性^[2],我们研究了两种融合蛋白 Ag85B-ESAT6 和 ESAT6-Ag85B 在小鼠体内诱导的体液和细胞免疫应答水平,同时测定免疫小鼠对 MTB 毒株 H37Rv 攻击的保护力.

1 材料和方法

1.1 材料 MTB H37Rv 毒株:由陕西省结核病防治研究所王瑞副主任技师惠赠. BCG 疫苗株:陕西省生物制品研究所出品. 鼠 IFN- γ ELISA 检测试剂盒(GENEZYME 公司),潮霉素(GIBCO BRL 公司),7H9 液体培养基,BCG 培养增强剂(albumin-dextrose-catalase, ADC)和 RPMI1640 培养基均购自 GIBCO 公司. MTB 的 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,饲养于该中心 P3 级感染实验室.

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 CFU.

1.2.3 融合蛋白的大量制备和转膜 取 AZ-pProEX HT-EF 和 EZ-pProEX HT-AF 阳性克隆^[2],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,然后将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,剪下表达位置的条带.

1.2.4 免疫动物分组 实验共分 4 组,每组 10 只小鼠. 一组用 Ag85B-ESAT6 融合蛋白转膜条带免疫 BALB/c 小鼠;一组用 ESAT6-Ag85B 融合蛋白免疫 BALB/c 小鼠. 两组免疫剂量均为 10 份条带/只,包

埋于小鼠腹股沟处皮下,共免疫 3 次,每次间隔 2 wk,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,同时设 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 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 RPMI1640 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 RPMI1640 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 RPMI1640 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 $A_{490\text{nm}}$ 值. 结果用刺激指数 $SI = A(\text{实验组})/A(\text{对照组})$ 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 RPMI1640 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 MTBH37Rv 毒株的攻击实验 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.

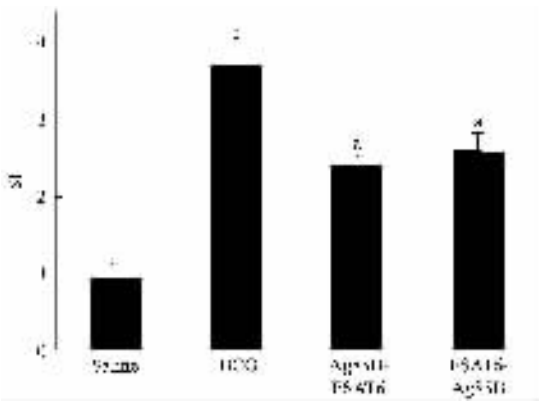
统计学处理:实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计分析采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 小鼠体内特异性抗体滴度 Ag85B-ESAT6 融合蛋白免疫小鼠血清特异性抗体滴度为 1:1000,ES-AT6-Ag85B 融合蛋白免疫小鼠血清特异性抗体滴度达 1:5000.

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

0.90 ± 0.21) 相比较两种融合蛋白 Ag85B-ESAT6 和 ESAT6-Ag85B 免疫小鼠的脾淋巴细胞增殖明显, SI 分别为 2.40 ± 0.17 和 2.60 ± 0.25 ($P < 0.05$), BCG 免疫组 SI 为 3.70 ± 0.28 , 高于两种融合蛋白免疫组 ($P < 0.05$, Fig 1)。

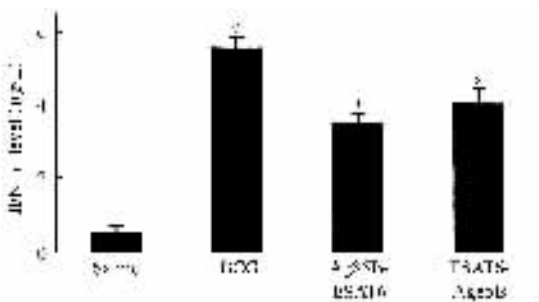


* $P < 0.05$ vs saline; ° $P < 0.05$ vs Ag85B-ESAT6 and ESAT6-Ag85B ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$). SI: Stimulation index; BCG: Bacillus calmette guerin.

Fig 1 Proliferation of splenocytes induced by MTB CFP immunization with fusion proteins

图1 融合蛋白免疫诱发的抗原特异的淋巴细胞增殖反应

2.3 脾脏淋巴细胞中诱生的 IFN- γ 水平 Ag85B-ESAT6 和 ESAT6-Ag85B 两种蛋白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 $(3.51 \pm 0.30) \mu\text{g/L}$ 和 $(4.05 \pm 0.41) \mu\text{g/L}$, 与生理盐水对照组 $(0.50 \pm 0.25) \mu\text{g/L}$ 相比较有明显增加 ($P < 0.05$), 但不及 BCG 免疫组 $(5.55 \pm 0.31) \mu\text{g/L}$, $P < 0.05$, Fig 2.]



* $P < 0.05$ vs saline; ° $P < 0.05$ vs Ag85B-ESAT6 and ESAT6-Ag85B ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$). BCG: Bacillus calmette guerin.

Fig 2 IFN- γ level induced in spleen culture supernatant of immunization mice with fusion proteins

图2 融合蛋白免疫小鼠脾脏淋巴细胞中诱生的 IFN- γ 水平

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 6.31 ± 0.13) 相比较, 融合蛋白 Ag85B-ESAT6

和 ESAT6-Ag85B 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 和 5.15 ± 0.29 , $n = 5$, $P < 0.05$), 但与 BCG 免疫组(细菌负荷数为 4.09 ± 0.29) 相比较脾脏细菌负荷减少甚微。

3 讨论

MTB 的 CFP 可诱导产生 T 细胞免疫反应, 从培养上清液中所获得的单个蛋白、蛋白混合物以及构成这些蛋白 T 细胞表位的基因工程肽具有同样的功能。这些免疫反应成分 M_i 主要集中在 4000 ~ 11 000 和 26 000 ~ 35 000 范围内, 已知的有早期分泌蛋白 Ag85B 复合物、ESAT6 和 MPT-64^[3], 由于集中针对那些在免疫保护效应中发挥关键作用的蛋白, 因此避免了无关抗原对免疫应答干扰。选择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^[1]。

机体对结核病(tuberculosis, TB)的免疫保护需要多种类型的 T 细胞参与, 而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, 难于达到上述目的, 因此新型 TB 疫苗着重于融合多个免疫表位^[4]。我们采用两种纯化的 Ag85B 与 ESAT6 融合蛋白, 分别免疫小鼠, 特异性抗体滴度分别达到 1:1000 和 1:5000, 显著高于文献[5]中抗体的滴度。夹心 ELISA 的方法确定了 Ag85B 与 ESAT6 融合表达产物的滴度存在着差异, 说明 Ag85B 和 ESAT6 的不同连接方式影响表达产物的免疫学特性, 有可能大分子量的 Ag85B 影响了 ESAT6 的表达, 或者说小分子量的 ESAT6 更有利于启动转录和翻译, 这在亚单位疫苗的应用和动物实验中需作进一步的研究。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, 融合蛋白 Ag85B-ESAT6 和 ESAT6-Ag85B 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, Ag85B-ESAT6 免疫组使得细菌数由 6.31 ± 0.13 降为 5.04 ± 0.11 , 而 ESAT6-Ag85B 免疫组降为 5.15 ± 0.29 , 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在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^[6]。本研究中, 使用蛋白电泳分离的目的条带免疫动物也是常用的免疫方法, 一方面可得到大量

纯化的蛋白,另一方面硝酸纤维素膜作为载体和佐剂具有良好的免疫效果,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。两种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^[7],多次免疫才能达到有效的保护水平。

【参考文献】

[1] Doherty TM, Andersen P. Tuberculosis vaccine development [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2002 8(3): 183-187.
 [2] 师长宏,范雄林,徐志凯,等. 结核分枝杆菌分泌蛋白 Ag85B-ES-AT-6 的融合表达及纯化[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2004; 27(2): 89-92.
 Shi CH, Fan XL, Xu ZK, et al. *Mycobacterium tuberculosis* secreting protein Ag85B and ESAT6 fused expression and purified [J]. *Chin J*

Tuber Respir Dis, 2004 27(2): 89-92.
 [3] Amoudy M, Abal W, Oftung R, et al. Comparison of antigen-specific T-Cell responses of tuberculosis patients using complex or single antigens of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Scand J Immunol*, 1998; 48(5): 1365-3083.
 [4] Warwick JB, Umaimathan P. Improving vaccines against tuberculosis [J]. *Immunol Cell Biol*, 2003; 81: 34-45.
 [5] 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.
 Xue Y, Li Y, Shi JR, et al. Immunobiological properties of secretory protein Ag85B from *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2002 23(13): 1203-1205.
 [6] Sinha RK, Khuller GK. The protective efficacy of a liposomal encapsulated 30 kDa secretory protein of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv against tuberculosis in mice [J]. *Immunol Cell Biol*, 1997; 75: 461-466.
 [7] Elhay, Martin J, Ersen P, et al. Immunological requirements for a subunit vaccine against tuberculosis [J]. *Immunol Cell Biol*, 1997; 75(6): 595-603.

编辑 甄志强

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2004)18-1636-01

肾病综合征继发隐球菌脑膜炎 6 例

边宝娟,余青,杜云真

(开封市第二人民医院肾内科,河南 开封 475002)

【关键词】 脑膜炎, 综合征, 隐球菌

【中图分类号】 R512.3 **【文献标识码】** B

1 临床资料 肾病综合征(NS)继发隐球菌脑膜炎(隐脑)患者 31 例(A组),男 10 例,女 21 例,平均年龄(36.3 ± 16.2)岁,平均病程(25.7 ± 12.8) mo,脑脊液(CSF)中均检测到隐球菌。6 例肾病综合征(NS)合并隐脑患者中 3 例为原发性 NS, 3 例继发于全身性红斑狼疮(SLE),均有肾上腺皮质激素应用史。从出现脑膜炎症状到确诊平均时间(8.4 ± 5.2) wk。5 例最初诊断为狼疮性脑病或结核性脑病。CSF 真菌培养阳性 1 例, 6 例墨汁负染色涂片镜检找到隐球菌。另原发性隐脑 25 例(B组),CSF 真菌培养 6 例阳性,阳性率为 24%, 25 例墨汁负染色涂片镜检找到隐球菌。一旦确诊即予抗隐球菌治疗:两性霉素 B(AMP)由 1 mg/d 渐增至 20~25 mg/d,避光静脉滴注 6~8 h, 5-氟胞嘧啶(5-FC)4~5 g/d po;氟康唑 200~400 mg/d, iv gtt。治疗期间,每间隔 1~2 wk 复查腰穿,连续 3 次 CSF 涂片镜检均阴性为治愈。A 组单用氟康唑、联

用 AMP+5-FC 及 AMP+氟康唑各 2 例,联用 AMP+5-FC+氟康唑 1 例。有效率 100%(表 1)。

表 1 隐球菌脑膜炎症状及死亡率比较 [n, (%)]

| 分组 | n | 头痛 | 呕吐 | 发热 | 意识障碍 | 脑膜刺激症 | 死亡 |
|-----|----|----------|---------------------|---------|---------------------|---------------------|--------------------|
| A 组 | 6 | 5 (83) | 1 (17) ^b | 6 (100) | 1 (17) ^b | 3 (50) ^b | 0 (0) ^b |
| B 组 | 25 | 25 (100) | 25 (100) | 19 (76) | 25 (100) | 7 (28) | |

^bP < 0.01 vs B 组。

2 讨论 NS 继发隐脑的发病率为 4.73%,其中 SLE 继发隐脑的发病率为 2.89%,原发性 NS 继发隐脑的发病率为 1.84%,明显高于其他疾病导致的隐脑(其发病率为 0.093%)。NS 合并隐脑的临床表现呈非特异性^[1]。NS 患者在接受大剂量激素治疗后,出现头痛、神经精神症状或脑膜刺激症等表现,如果原发病为 SLE,且不能用 SLE 活动或狼疮脑病解释者应想到合并中枢神经系统感染的可能。及时行腰穿、CSF 涂片或真菌培养发现隐球菌。NS 合并隐脑主要应与狼疮脑病及合并结脑鉴别^[2],三者可有相似的临床表现、CSF 常规和生化改变。隐脑以颅脑高压表现突出,结脑和狼疮脑病的 CSF 蛋白升高常较明显(>2.0 g/L)。鉴别的关键是 CSF 中找到隐球菌。

【参考文献】

[1] 王爱霞. 隐球菌脑膜炎的诊断和治疗[J]. 中华内科杂志, 1999; 36(2): 714-715.
 [2] 崇雨田,何有成,李学俊. 隐球菌脑膜炎误诊研究[J]. 中华误诊学杂志, 1998 8(4): 14-15.

编辑 潘伯荣

收稿日期 2004-07-05; 修回日期 2004-08-05

作者简介 边宝娟(1967-),女(汉族),河南省开封市人。本科,主治医师。Tel. (0378) 2651314