

DNA疫苗初免-BCG加强免疫法提高小鼠抗结核分枝杆菌感染效率的研究*

李 敏 余大海 蔡 宏**

(北京大学蛋白质工程与植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871)

摘要 对结核分枝杆菌 DNA 四价疫苗(编码 Ag85B, MPT64, MPT70 和 TB10.4 抗原)初发免疫、卡介苗(BCG)加强免疫后小鼠产生免疫应答的能力和抗结核杆菌感染效率进行了分析. 攻毒后细菌计数结果显示, DNA 初免、BCG 加强组肺脏和脾脏载菌数的对数值比阴性对照组下降 1.0~1.3 ($P < 0.01$), 且显著低于 DNA 四价苗和 BCG 组($P < 0.05$). 3 次免疫后, BCG 加强组外周血中 CD4⁺ 和 CD8⁺T 淋巴细胞显著增多($P < 0.05$); 经 4 种抗原分别刺激, BCG 加强组脾细胞产生的抗原特异性 IFN- γ 和 IL-2 水平显著高于其他免疫组, 其中 Ag85B 抗原诱导产生的 IFN- γ 浓度为 1 250 ng/L, IL-2 浓度为 230 ng/L, 分别是 DNA 四价苗组的 1.6, 1.7 倍($P < 0.05$), 是 BCG 组 PPD 诱导产生相应细胞因子浓度的 2.6 倍和 2.2 倍($P < 0.05$); 此外, BCG 加强组肺脏中分泌穿孔素的淋巴细胞数量也显著增加($P < 0.05$). 结果表明, DNA 初发免疫、BCG 加强免疫法能显著提高小鼠 CD4⁺, CD8⁺T 细胞介导的免疫应答, 增强小鼠抗结核杆菌感染能力, 是提高结核病疫苗免疫效果的新途径.

关键词 结核分枝杆菌, DNA 疫苗, BCG 疫苗, 免疫应答, Th1 型细胞因子, 保护效率

学科分类号 S855.2

结核病是严重危害人类健康的重要传染病, 给新生儿注射卡介苗(*Bacillus Calmette Guérin*, BCG)被认为是预防结核杆菌感染的最有效方案^[1], 但其免疫效果不稳定^[2], 对成年人没有保护作用^[3], 无法应用于免疫缺陷人群^[4]. 因此, 研制和探讨更有效的新一代结核病疫苗是国内外研究者面临的重要课题.

结核分枝杆菌是典型的胞内寄生菌, 机体抵抗其感染的主要途径是细胞免疫, 其中 CD4⁺T 细胞分泌的 IFN- γ 能够激活巨噬细胞, 使其有效杀死入侵的结核杆菌^[5], CD8⁺T 细胞主要通过分泌穿孔素, 颗粒酶途径杀死被结核分枝杆菌感染的巨噬细胞^[6]. DNA 疫苗注射后被机体细胞吞噬, 表达的抗原蛋白能通过 MHC I 和 MHC II 途径有效提高 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞免疫应答^[7,8], 因而在结核病疫苗的研究中占重要地位.

结核杆菌分泌蛋白和细胞壁相关蛋白是细菌侵入宿主后机体首先遇到的抗原, 因此这些蛋白质在诱发机体产生抗结核免疫应答方面发挥重要作用. 例如: Ag85B 与分枝杆菌细胞壁的合成有关, 是

结核杆菌分泌蛋白中含量最多, 免疫原性最强的蛋白^[9]; MPT64 是结核杆菌生长分裂旺盛时期分泌表达的蛋白质, 具有 MHC I 类分子识别位点, 能引起杀伤性 T 淋巴细胞应答(CTL)^[10]; MPT70 也是结核分枝杆菌分泌蛋白, 能刺激产生体液应答和细胞应答, 免疫后具有很好的保护效率^[11]; TB10.4 蛋白具有很强的细胞免疫原性, 能被结核病人和 BCG 免疫者的 T 细胞强烈识别^[12]. MPT64, MPT70 和 TB10.4 蛋白在大多数 BCG 株中不表达, 但在 H37Rv 强毒株中高度表达^[13], 这可能是限制 BCG 疫苗免疫效果的原因之一. 因此, 本研究试图用编码 Ag85B 抗原与 MPT64, MPT70 和 TB10.4 抗原的 DNA 四价疫苗初发免疫小鼠, 与 BCG 加强免疫形成抗原互补, 研究其在小鼠体内诱导免疫应答的能力和对小鼠结核杆菌感染的保护效率, 为研制更安全, 有效的结核病疫苗提供依据.

*国家高技术研究发展计划资助项目(863)(2002AA206411).

** 通讯联系人. Tel: 010-62756077, E-mail: Hcai@pku.edu.cn

收稿日期: 2006-12-17, 接受日期: 2007-02-13

1 材料与方法

1.1 材料

6~8 周龄 C57BL/6 小鼠购自中国人民解放军军事医学科学院动物中心, 饲养于北京市胸部肿瘤研究所一级动物房内. 卡介苗(BCG)及 PPD 由中国生物制品检定所提供, 结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)标准强毒株 H37Rv 由北京市胸部肿瘤研究所提供. 真核表达载体 pJW4303 由美国斯坦福大学 Mullins 教授惠赠. pJW4303-85、pJW4303-64、pJW4303-70、pJW4303-10.4、pET22bAg85B、pET22bMPT64、pET22bMPT70 和 pET22bTB10.4 载体由本室构建. 质粒提取试剂盒 Qiagen Plasmid Mega Kit 购自 Qiagen 公司. 抗小鼠 CD4⁺(RPE), 抗小鼠 CD8⁺(FITC) 抗体购自 Southern- Biotech 公司、兔抗穿孔素(perforin)抗体购自 Abcam 公司、羊抗兔抗体(HRP) 购自 Promega 公司、RPMI1640 细胞液体培养基购自北京奥基生物公司、胎牛血清购自杭州四季青公司. Mouse Th1/ Th2 Cytokine Cytometric Bead Array (CBA)试剂盒购自 BD Biosciences 公司. DAB 试剂盒购自北京中杉试剂公司, 其他试剂均为国产分析纯试剂.

1.2 方法

1.2.1 DNA 疫苗的制备. 用去内毒素质粒提取试剂盒 Qiagen-Plasmid Mega Kit 提取 pJW4303-85、pJW4303-64、pJW4303-70、pJW4303-10.4 质粒 DNA, 溶解于无菌生理盐水, 等量混合制备 DNA 四价疫苗.

1.2.2 重组蛋白的表达与纯化. 将本室构建的 pET22bAg85B、pET22bMPT64、pET22bMPT70、pET22bTB10.4 原核表达载体分别转化 BL21(DE3) plysS 菌株, 用适量 IPTG 诱导表达, 经 Ni-NTA 柱纯化后用于抗体的检测和细胞因子的刺激^[14,15].

1.2.3 动物免疫实验. 60 只 C57BL/6 小鼠随机分为 4 组进行免疫, 共免疫 3 次, 每次间隔 3 周. DNA 初免、BCG 加强组用 DNA 四价疫苗免疫 2 次, 每只小鼠用量为 400 μ g, 注射部位为后腿内侧肌肉, 第 3 次免疫皮下注射 1×10^6 CFU BCG. 以肌肉注射 DNA 四价疫苗 3 次作为 DNA 四价苗对照组; 第 1, 3 次免疫时皮下注射 1×10^6 CFU BCG 作为阳性对照组; 肌肉注射等量生理盐水 3 次作为阴性对照组.

1.2.4 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测小鼠的特异

性抗体水平. 3 次免疫后 21 天, 从每组 3 只小鼠眼窝后静脉采血, 按常规方法收集血清. 用 4 种抗原 Ag85B, MPT64, MPT70, TB10.4 分别包被酶标板(浓度为 10 mg/L), 血清从 1:50 开始倍比稀释, 以正常鼠血清相对应的稀释度作为阴性对照, 于 450 nm 波长处测定光吸收值. 抗体滴度定义为: 实验组和阴性对照组光吸收比值 ≥ 2.1 时最大的血清稀释倍数, 滴度低于该稀释度时判为阴性. 具体操作方法见参考文献[15].

1.2.5 流式细胞术(flow cytometry)分析小鼠外周血淋巴细胞中 CD4⁺, CD8⁺ T 细胞. 3 次免疫后 21 天, 从每组 3 只小鼠眼窝后静脉采血, 并加入肝素抗凝. 用红细胞裂解液充分裂解红血球, 离心后弃上清, 用 RPMI1640 培养液(含 2.05 mmol/L 谷氨酰胺, 20 mmol/L HEPES, 100 U/ml 青霉素, 100 mg/L 链霉素, 10% BSA, 50 μ mol/L 巯基乙醇)重悬白细胞沉淀, 培养于 96 孔板中(0.2 ml/孔), 用纯化的抗原混合物(含 Ag85B, MPT64, MPT70 和 TB10.4, 终浓度分别为 5 mg/L)刺激, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中培养 48 h 后收集细胞, PBS 洗涤后悬浮于 100 μ l 含 1% BSA 的 PBS 中, 加入适量抗鼠 CD8⁺(RPE)和抗鼠 CD4⁺(FITC)抗体, 室温避光孵育 30 min. 通过流式细胞仪(FACS)测定各细胞亚群水平.

1.2.6 细胞因子的检测. 3 次免疫后 21 天, 每组处死 3 只小鼠, 无菌分离脾细胞, 用上述 RPMI 1640 培养液调整细胞密度为 1×10^6 个/ml, 培养于 96 孔板中(0.2 ml/孔). 分别用纯化的抗原(Ag85B, MPT64, MPT70, TB10.4, 终浓度为 5 mg/L)或 PPD(终浓度为 10 mg/L)刺激, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中培养 72 h 后收集上清. 用小鼠 Th1/Th2 细胞因子 CBA(Cytometric Bead Array)试剂盒检测 IFN- γ , IL-2, IL-5 和 IL-4 的浓度.

1.2.7 免疫小鼠的保护性试验. 3 次免疫 7 周后, 对每组剩余的 8 只小鼠尾静脉注射 1×10^6 CFU H37Rv 结核杆菌. 每日记录小鼠存活状态, 并于攻毒 7 周后处死小鼠, 将肺脏、脾脏分别匀浆, 系列稀释后接种到罗氏固体培养基上, 培养 4 周后活菌计数.

1.2.8 免疫组织化学反应. 取攻毒 7 周后处死小鼠的部分肺脏固定于中性福尔马林溶液中, 按常规方法制作石蜡病理切片. 以兔抗鼠穿孔素抗体(1:1 000 倍稀释)为一抗, HRP 标记的羊抗兔抗体(1:2 000 倍稀释)为二抗进行免疫组织化学反应, DAB 显色、苏木精复染后阳性细胞显色为棕黄色.

1.2.9 结果统计. 多组实验数据采用单因素方差分析. $P < 0.05$ 表示各组间有显著差异, $P < 0.01$ 表示各组间有极显著差异.

2 结 果

2.1 小鼠的存活率和保护效率分析

统计静脉攻毒后 45 天内各组小鼠的存活率, 发现 DNA 疫苗初免、BCG 加强组小鼠存活率最高, 为 87.5%(7/8), DNA 四价苗组存活率为 62.5%(5/8), BCG 组存活率为 50%(4/8), 阴性组小鼠在攻毒后 26 天内全部死亡.

分离攻毒 7 周后实验小鼠的肺脏, 脾脏并进行

细菌计数, 结果表明: 与阴性组相比, 各免疫组肺、脾脏载菌数均显著降低 ($P < 0.01$). 其中 DNA 疫苗初免、BCG 加强组载菌数最低, 脾脏载菌数对数值比阴性组下降 1.3 ($P < 0.01$), 比 DNA 四价苗组下降 0.37 ($P < 0.05$), 比 BCG 组下降 0.54 ($P < 0.05$)(图 1a); 脾脏载菌数对数值比阴性组下降 1.1 ($P < 0.01$), 并低于 DNA 四价苗和 BCG 单独免疫组(图 1b). 上述结果表明, 结核杆菌强毒攻击后, DNA 疫苗初免、BCG 加强免疫能显著降低肺和脾脏载菌数, 提高小鼠存活效率, 综合保护效果优于 DNA 四价苗和 BCG 单独免疫组.

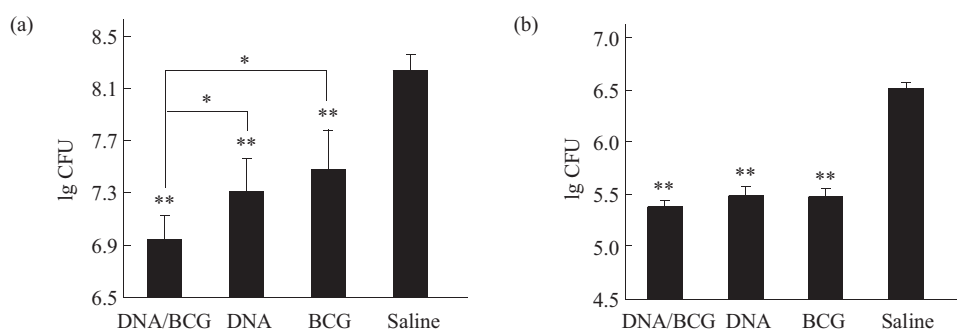


Fig. 1 Priming with DNA encoding Ag85B, MPT64, MPT70, TB10.4 protein increase the protect efficacy in mice

7 weeks after last vaccination, mice were challenged intravenously with 1×10^6 CFU of *M. tuberculosis* H37Rv and the bacterial burden (expressed as lg CFU) in the lung (a) and spleen (b) was measured 7 weeks after H37RV challenge. * $P < 0.05$ (compare to CFU counts of DNA primed, BCG boosted mice). ** $P < 0.01$ (compare to CFU counts of saline control mice). Results are the mean and SEM from groups of four mice.

2.2 血清中抗原特异性抗体水平变化

用 ELISA 法检测血清中特异性抗体, 发现各免疫组抗体滴度均随着免疫次数增加逐渐升高. 首免和二免后, BCG 加强组与 DNA 四价苗组滴度基本一致(数据未显示). 三免后, DNA 疫苗初免、BCG 加强组抗体水平高于 DNA 四价苗组. 其中 Ag85B 抗原特异抗体水平分别为 1 : 102 400 和

1 : 51 200; MPT64 抗原特异性抗体滴度分别为 1 : 25 600 和 1 : 12 800; MPT70 分别为 1 : 6 400 和 1 : 1 600; TB10.4 抗原分别为 1 : 200 和 1 : 100. 上述结果表明, DNA 疫苗免疫能刺激机体产生高水平抗原特异性抗体, BCG 加强后抗体水平得到提高(表 1).

Table 1 Serum IgG titer analysis of immunized mice after the third vaccination

Groups	Total	IgG		Titers ¹⁾	
	Ag85B	MPT64	MPT70	TB10.4	PPD
DNA prime, BCG boost	1 : 102 400	1 : 25 600	1 : 6 400	1 : 200	ND
Combined DNA vaccine	1 : 512 00	1 : 12 800	1 : 1 600	1 : 100	ND
BCG	1 : 800	1 : 200	1 : 100	1 : 50	1 : 800
Saline control	1 : 25	1 : 25	1 : 25	1 : 25	ND

¹⁾Pooled sera from three mice per group were analyzed for antigen specific antibody products. ND, Not done.

2.3 外周血淋巴细胞中 CD4⁺, CD8⁺ T 淋巴细胞亚群分析

用流式细胞术分析三免后 21 天各组小鼠外周血淋巴细胞中 CD4⁺, CD8⁺T 淋巴细胞比例, 数据显示, DNA 疫苗初免、BCG 加强组中抗原特异性 CD4⁺, CD8⁺T 淋巴细胞数目显著增多, 其中 CD4⁺ T 细胞是 DNA 四价苗组的 1.4 倍($P < 0.05$); CD4⁺, CD8⁺T 细胞分别是 BCG 组的 1.6 倍和 1.8 倍($P < 0.05$); DNA 四价苗组 2 种 T 细胞数量也显著增

Table 2 Number analysis of CD4⁺, CD8⁺ T cells after the third vaccination

Groups	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)
DNA prime, BCG boost	33.2 ± 0.7 ^{*△§}	18 ± 1.5 ^{*△}
Combined DNA vaccine	23 ± 0.5 [*]	15.9 ± 0.7 ^{*△}
BCG	21 ± 0.3 [*]	10.7 ± 0.9
Saline control	16.7 ± 0.6	10.1 ± 0.4

Twenty-one days after third vaccination, T-cell subpopulations in mice lymphocyte (5×10⁴ cells/ sample) were determined with FACS can using anti-mouse CD4-FITC and CD8-RPE. ^{*} $P < 0.05$ (compare to the relevant level of saline control mice); [△] $P < 0.05$ (compare to the relevant level of BCG vaccinated mice); [§] $P < 0.05$ (compare to the relevant level of DNA vaccinated mice). Results are the mean and SEM from groups of three mice.

加, 但低于 DNA 疫苗初免、BCG 加强组; 而在 BCG 组中, 只有 CD4⁺T 细胞显著升高($P < 0.05$), CD8⁺T 细胞无明显变化(表 2).

2.4 抗原特异性 Th1, Th2 型细胞因子的分析

用小鼠 CBA 试剂盒检测脾细胞培养上清中抗原特异性 Th1, Th2 型细胞因子, 与阴性组相比, 各免疫组 IFN- γ 和 IL-2 水平明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$). DNA 疫苗初免、BCG 加强组的细胞因子水平高于 DNA 四价苗组和 BCG 组, 该组 Ag85B 抗原诱导产生的 IFN- γ 浓度(1 250 ng/L)显著高于 DNA 四价苗组中相应的 IFN- γ 浓度(900 ng/L)和 BCG 组 PPD 诱导产生的 IFN- γ 浓度(560 ng/L) ($P < 0.05$)(图 2a), 其诱导产生的 IL-2 浓度(230 ng/L)也显著高于 DNA 四价苗组(135 ng/L)和 BCG 组(106 ng/L) ($P < 0.05$)(图 2b). 各组产生的 Th2 型细胞因子 IL-5 和 IL-4 浓度均较低(结果未显示). 以上结果表明, DNA 疫苗初免、BCG 加强组 Th1 型细胞免疫应答效应显著加强, 该组 T 淋巴细胞分泌 IFN- γ 和 IL-2 的水平明显升高. 4 种免疫抗原中, Ag85B 诱导产生 Th1 型免疫反应的能力最强, TB10.4 抗原次之, MPT70 抗原诱导产生的 IFN- γ 浓度高, IL-2 浓度较低.

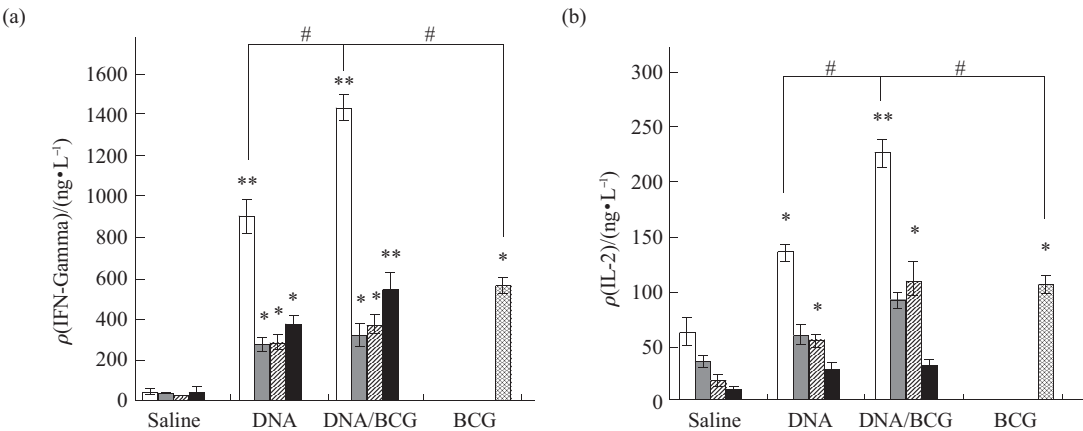


Fig. 2 Antigen specific cytokines produced by spleen cells of immunized mice

Twenty-one days after third vaccination, three mice were sacrificed in each group and spleen cells were pooled. Mean cytokine levels were determined in 72 h cell culture supernatants from cells stimulated with Ag85B, MPT64, TB10.4, MPT70 (final concentration at 5 mg/L) or PPD (final concentration at 10 mg/L) and the levels of IFN- γ (a), IL-2 (b) were measured by CBA. ^{*} $P < 0.05$; ^{**} $P < 0.01$ (compare to the relevant level of saline control mice); [#] $P < 0.05$ (compare to the relevant level of DNA primed, BCG boosted mice). Results are the mean and SEM from groups of three mice. □: Ag85B; ▨: MPT64; ■: MPT64; ■: TB10.4; ▤: BCG

2.5 小鼠肺脏中穿孔素 (perforin) 阳性细胞的检测

主要由 CD8⁺T 淋巴细胞分泌的穿孔素在杀死被结核杆菌感染的巨噬细胞过程中发挥重要作用.

肺脏的免疫组化结果显示: DNA 疫苗初免、BCG 加强组肺脏中, 穿孔素阳性细胞最多, 占组织中总细胞数的 14.7%; DNA 四价苗组肺组织中淋巴细

胞和上皮细胞增生, 穿孔素阳性细胞减少, 占总细胞数的 10.2%; BCG 组阳性细胞占总细胞数的 8.2%; 阴性对照组肺组织发生实变和坏死, 穿孔

素阳性细胞数量和比例最少, 为 3.6% (图 3, 表 3). 结果表明, DNA 疫苗初免、BCG 加强免疫显著增强了 CD8⁺T 淋巴细胞杀伤能力.

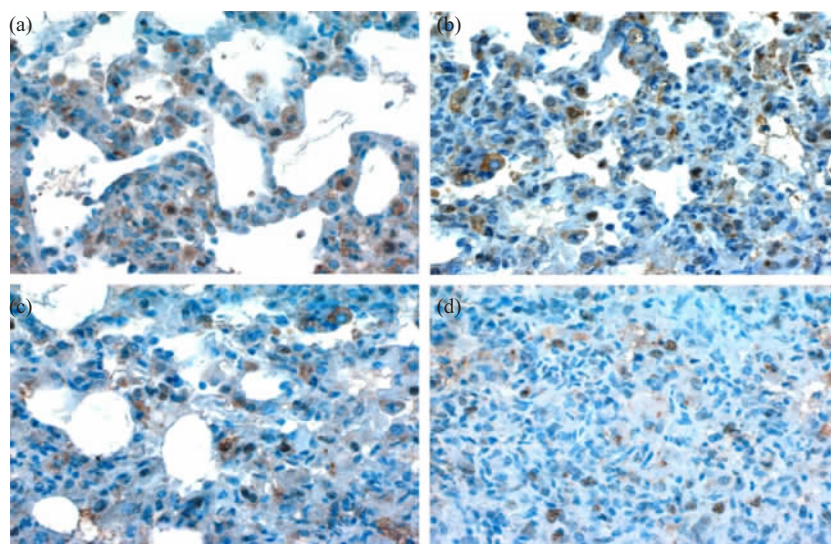


Fig. 3 Perforin secreted cells in lung tissue of mice after intravenous infection with *M. tuberculosis* H37Rv

Lung tissues of mice infected with *M. tuberculosis* H37Rv were harvested 7 weeks post-infection and were stained with anti-perforin. (a) DNA primed, BCG boosted group. (b) Combined DNA vaccinated group. (c) BCG vaccinated group. (d) Saline control mice. All slides original magnifications are 40.

Table 3 The number analysis of perforin secreted cells in lung tissue

Groups	Number of perforin secreted cells	Percent of perforin secreted cells/%
DNA prime, BCG boost	$33 \pm 1.3^{*\Delta}$	$18.8 \pm 0.60^{**\Delta\delta}$
Combined DNA vaccine	$27 \pm 2.0^{*\Delta}$	$11.2 \pm 0.10^{*\Delta}$
BCG	$19 \pm 2.0^*$	$7.3 \pm 0.07^*$
Saline control	13 ± 1.0	3.6 ± 0.03

The number and percent of Perforin secreted cells in lung tissue of the above four group's mice were counted. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (compare to the relevant level of saline control mice); $\Delta P < 0.05$ (compare to the relevant level of BCG vaccinated mice); $\delta P < 0.05$ (compare to the relevant level of DNA vaccinated mice).

3 讨 论

研究表明, 以结核分枝杆菌的分泌蛋白和细胞壁相关蛋白的编码基因作为 DNA 疫苗抗原能给机体提供有效保护^[16], 然而到目前为止, 单价结核杆菌核酸疫苗的免疫效果未超过现有疫苗 BCG. 近年来, 我们构建了多个编码结核分枝杆菌保护性抗原 (如 Ag85B, MPT64, MPT70, TB10.4, ESAT6, MPT83, Hsp60, Pst III, Apa I 等) 的 DNA 疫苗并

研究了以上不同疫苗组合后的免疫效果, 发现多价联合 DNA 疫苗诱导的保护效率优于单价疫苗, 甚至高于 BCG^[14,15,17]. Morris 等^[18]通过比较 MPT64, ESAT6, MPT83, KatG 四联苗和不同的单价苗免疫效果后也得到相同结论. 本研究用编码 Ag85B 抗原与 BCG 自身不表达的 MPT64, MPT70 和 TB10.4 抗原组合成 DNA 四价疫苗初发免疫小鼠, 再用 BCG 加强免疫, 两者通过抗原互补进一步提高了

免疫效果和保护效率. 攻毒结果表明, BCG 加强免疫组对肺脏的保护率达到 1.3, 显著高于 DNA 四价苗和 BCG 单独免疫组(图 1), 比 Feng, Skinner 等 DNA 单价疫苗初免, BCG 加强免疫后的保护率分别高 1.98 倍^[19] 和 10 倍^[20], 与 Skeiky 研究组用 Hsp65, Hsp70, Apa DNA 三价疫苗初免小鼠, BCG 加强免疫的保护率相当^[21], 但近期研究表明 Hsp65 抗原可能会引发自身免疫性疾病^[22].

经典的弱毒菌苗 BCG 免疫机体后被吞噬于巨噬细胞内, 在酸性内吞体和溶酶体逐步降解, 形成的免疫原性多肽与 MHC II 类分子结合, 主要递呈给 CD4⁺T 淋巴细胞^[23], 因此不能被 CD8⁺ 细胞有效识别, 本实验 BCG 组低水平的 CD8⁺T 细胞数量也证实了这一观点(表 2). 与 BCG 相比, DNA 疫苗的显著优点在于抗原蛋白在细胞内正常表达, 能有效刺激 CD4⁺ 和 CD8⁺ 两种 T 淋巴细胞的免疫应答. 我们用 DNA 四价苗初发免疫后, 再用 BCG 加强免疫, 抗原特异性 CD4⁺, CD8⁺T 淋巴细胞均显著增加, 分别达到 BCG 组的 1.6 倍和 1.8 倍($P < 0.05$), CD4⁺T 细胞也显著高于 DNA 四价苗组($P < 0.05$) (表 2). 近期研究证明, 主要由 CD4⁺T 细胞分泌的 IFN- γ 能有效刺激 CD8⁺T 细胞增殖, 增强巨噬细胞杀伤病原微生物的能力, IFN- γ 受体基因突变小鼠和 IFN- γ 基因遗传性缺失患者对结核杆菌易感性均显著增加^[24], CD8⁺T 在控制结核杆菌晚期感染中发挥重要作用^[25]. 因此, 能否提高 CD4⁺, CD8⁺T 细胞介导的细胞免疫应答已成为评估结核病疫苗免疫效果的关键标准. 本实验中, DNA 初免、BCG 加强免疫组产生的抗原特异性 IFN- γ , IL-2 显著高于 DNA 四价苗和 BCG 免疫组($P < 0.05$), 其中, Ag85B 诱导产生 IFN- γ , IL-2 水平分别是 DNA 四价苗组的 1.6 和 1.7 倍($P < 0.05$), 是 BCG 组 PPD 抗原诱导产生相应细胞因子浓度的 2.6 倍和 2.2 倍($P < 0.05$), 虽然 TB10.4, MPT64 和 MPT70 的免疫原性低于 Ag85B 抗原, 但在 BCG 加强后也有较大程度的增加(图 2). 免疫组化结果显示, BCG 加强组肺脏中分泌穿孔素的淋巴细胞也较 DNA 四价苗和 BCG 免疫组显著增多($P < 0.05$)(图 3, 表 3), 说明主要由 CD8⁺T 细胞介导的细胞杀伤能力在 BCG 加强免疫后也显著提高.

目前有多种方案用于提高结核病的免疫预防效果, 例如: DNA 疫苗^[14-18], 重组蛋白亚单位疫苗^[26], 重组性卡介苗 rBCG30^[27], rBCG Δ Urec: Δ Hly^[28]等, 其中重组性卡介苗面临能否克服环境中

分枝杆菌的干扰等相关问题, 重组蛋白亚单位疫苗必须使用加强细胞免疫效果的佐剂才能达到预期保护效果, DNA 疫苗却具有制备简便、性质稳定、能均衡刺激 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞免疫和体液免疫应答等优点, 其不足之处在于免疫保护期有限, 但在此基础上的 BCG 异源加强免疫法被认为是安全有效的免疫方案^[29-31]. 本实验也证实用 DNA 四价疫苗初免后, 再用抗原谱广泛、保护时间长的 BCG 加强免疫, 能显著提高小鼠的细胞免疫应答能力和抗结核杆菌感染效率. 虽然, 传统的 BCG 疫苗主要用于初生儿免疫, DNA 疫苗用于加强免疫比较符合实际应用要求, 但 Marta 等^[32]最近的报道却认为, BCG 初发免疫小鼠后再用编码 Ag85A 的 DNA 疫苗加强免疫, 保护效率不及 DNA 疫苗初免、BCG 加强或 BCG 单独免疫组. 因此, 结核杆菌 DNA 多价疫苗初免、BCG 加强免疫法可能是现阶段提高结核病疫苗免疫效果的最有效途径.

参 考 文 献

- 1 Fine P E. Bacille Calmette-Gue'rin vaccines: a rough guide. Clin Infect Dis, 1995, **20** (1): 11~14
- 2 Colditz G A, Brewer T F, Berkey C S, *et al.* Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. J Am Med Asso, 1994, **271** (2): 698~672
- 3 Fine P E. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. Lancet, 1995, **346** (8986): 1339~1345
- 4 Brooks J V, Frank A A, Keen M A, *et al.* Boosting vaccine for tuberculosis. Infect Immun, 2001, **69** (4): 2714~2717
- 5 Flynn J, Chan J, Triebold K, *et al.* An essential role for Interferon- γ in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. J Exp Med, 1993, **178** (6): 2249~2253
- 6 Steffen S, Richard J M, Koichi U, *et al.* Differential effects of catalytic T cell subsets on intracellular infection. Science, 1997, **273** (13): 1684~1687
- 7 Donnelly J J, Ulmer J B, Shiver J W, *et al.* DNA vaccines. Annu Rev Immuno, 1997, **15** (4): 617~648
- 8 Huygen K, Content J, Dennis O, *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. Nature Med, 1996, **2** (8): 893~898
- 9 Lozes E, Huygen K, Content J, *et al.* Immunogenicity and efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding the components of the secreted antigen 85 complex. Vaccine, 1997, **15** (8): 830~833
- 10 Wang Z, Potter B M, Gray A M, *et al.* The solution structure of antigen MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis* defines a new family of beta-grasp proteins. J Mol Biol, 2007, **366** (2): 375~381
- 11 Attiyah R A, Shaban F A, Wiker H G, *et al.* Synthetic peptides identify promiscuous human Th1 cell epitopes of the secreted mycobacterial antigen MPB70. Infect Immun, 2003, **71** (40): 1953~1960

- 12 Jes D, Claus A, Robert L, *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 Immunol*, 2005, **174** (10): 6332~6339
- 13 Marti'n C. The dream of a vaccine against tuberculosis; new vaccines improving or replacing BCG?. *Eur Respir J*, 2005, **26** (1): 162~167
- 14 蔡宏, 田霞, 呼西旦, 等. 结核分枝杆菌四联核酸疫苗免疫原性和保护效率. *中国科学(C辑)*, 2003, **33** (3): 240~245
Cai H, Tian X, Hu X D, *et al.* *Science in China (Series C)*, 2003, **33** (3): 240~245
- 15 蔡宏, 潘怡, 李国立, 等. 结核分枝杆菌多价核酸疫苗的构建及免疫原性. *科学通报*, 2002, **47** (13): 966~971
Cai H, Pan Y, Li G L, *et al.* *Chinese Science Bulletin*, 2002, **47** (13): 966~971
- 16 Kamath A T, Feng C G, Macdonald M, *et al.* Differential protective efficacy of DNA vaccines expressing secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 1999, **67** (4): 1702~1707
- 17 Cai H, Tian X, Hu X D, *et al.* Combined DNA vaccines formulated either in DDA or in saline protect cattle from *Mycobacterium bovis* infection. *Vaccine*, 2005, **23** (3): 3887~3895
- 18 Morris S, Kelly C, Howard A, *et al.* The immunogenicity of single and combination of DNA vaccines against Tuberculosis. *Vaccine*, 2000, **18** (20): 2155~2163
- 19 Feng C G, Palendira U, Demangel C, *et al.* Priming by DNA immunization augments protective efficacy of *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin against tuberculosis. *Infect Immun*, 2001, **69** (6): 4174~4176
- 20 Skinner M A, Ramsay A J, Buchan G S, *et al.* A DNA prime-live vaccine boost strategy in mice can augment IFN-gamma responses to mycobacterial antigens but does not increase the protective efficacy of two attenuated strains of *Mycobacterium bovis* against bovine tuberculosis. *Immunology*, 2003, **108** (4): 548~555
- 21 Ferraz J C, Stavropoulos E, Yang M, *et al.* A heterologous DNA priming-*Mycobacterium bovis* BCG boosting immunization strategy using mycobacterial Hsp70, Hsp65, and Apa antigens improves protection against tuberculosis in mice. *Infect Immun*, 2004, **72** (12): 6945~6950
- 22 Taylor J L, Ordway D J, Troudt J, *et al.* Factors associated with severe granulomatous pneumonia in *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice vaccinated therapeutically with hsp65 DNA. *Infect Immun*, 2005, **73** (8): 5189~5193
- 23 Martin O, Isibasi N, Ortiz N, *et al.* Macrophages present exogenous antigens by class I major histocompatibility complex molecules *via* a secretory pathway as a consequence of interferon-gamma activation. *Immunology*, 2001, **103** (1): 41~48
- 24 Jouanguy E, Lammas D, Dorman S E, *et al.* A human IFNGR1 small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection. *Nature Genet*, 1999, **21** (4): 370~378
- 25 Pinxteren V, Cassidy L, Smedegard B, *et al.* Control of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection is dependent on CD8 T cells. *Eur J Immunol*, 2000, **30** (12): 3689~3698
- 26 Skeiky Y A, Alderson M R, Ovendale P J, *et al.* Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein. *J Immunol*, 2004, **172** (12): 7618~7628
- 27 Horwitz M A, Harth G, Dillon B J, *et al.* Recombinant bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (25): 13853~13858
- 28 Hess J, Diana M, André C, *et al.* *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin strains secreting listeriolysin of *Listeria monocytogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(9): 5299~5304
- 29 Skinner M A, Buddle B M, Wedlock D N, *et al.* A DNA prime-*Mycobacterium bovis* BCG boost vaccination strategy for cattle induces protection against bovine tuberculosis. *Infect Immun*, 2003, **71** (9): 4901~4907
- 30 Cai H, Yu D H, Hu X D, *et al.* A combined DNA vaccine-prime, BCG-boost strategy results in better protection against *Mycobacterium bovis* challenge. *DNA Cell Biol*, 2006, **25** (8): 438~447
- 31 Yasir A W, Jerald C S. Advances in tuberculosis vaccine strategies. *Nature*, 2006, **4** (7): 469~476
- 32 Marta R, Sushila D, Pierre Y, *et al.* Priming but not boosting with plasmid DNA encoding mycolyl-transferase Ag85A from *Mycobacterium tuberculosis* increases the survival time of *Mycobacterium bovis* BCG vaccinated mice against low dose intravenous challenge with *M. tuberculosis* H37Rv. *Vaccine*, 2006, **24** (16): 3353~3364

DNA Prime-BCG Boost Vaccination Strategy Improved The Protective Efficacy Against *M. tuberculosis* H37Rv in Mice*

LI Min, YU Da-Hai, CAI Hong**

(National Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic engineering, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract The immunogenicity and protective efficacy of combined DNA priming, Bacillus Calmette Guerin (BCG) boosting vaccination in mice were examined. Following intravenous challenge with virulent *M. tuberculosis* H37Rv, the BCG boost approach resulted in significant protection in both lungs (1.3, $P < 0.01$) and spleens (1.1, $P < 0.01$) compared with the saline control. In addition, this approach also have much better protection than that vaccination with combined DNA or BCG alone ($P < 0.05$). The elevated CD4⁺ and CD8⁺ T cells percentage ($P < 0.05$) in PBMC and higher IFN- γ concentration (1250 ng/L, $P < 0.01$), IL-2 concentration (230 ng/L, $P < 0.05$) stimulated by Ag85B protein in spleen cells supernatant in BCG boosted mice 21 days after third vaccination, indicating that the DNA prime-BCG boost strategy significantly enhanced the Th1 type cell response, which is correlated with the protective efficacy against tuberculosis. Furthermore, immuno-histochemistry assay showed that there were more Perforin expression cells, secreted mainly by CD8⁺ T cells, in the lung tissue of the mice primed with DNA prior to BCG. Taken together, the heterogonous boost combination provided superior protection by stronger CD4⁺ (Th1) and CD8⁺T cell mediated immune response, which suggested that it will be a promising regimen for MTB vaccine development.

Key words *M. tuberculosis*, DNA vaccine, BCG, immune response, Th1 type cytokine, protective efficacy

*This work was supported by a grant from State 863 Hi-Tech Research and Development Program China (2002AA206411).

**Corresponding author. Tel: 86-10-62756077, E-mail: Hcai@pku.edu.cn

Received: December 17, 2006 Accepted: February 13, 2007