

佐剂 DDA 和 MPL 对提高结核杆菌组合 DNA 疫苗免疫效果的比较研究*

余大海 蔡宏** 朱玉贤

(北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871)

摘要 编码结核杆菌 3 种抗原 Ag85B, MPT64, MPT83 的基因片段插入真核表达载体作为组合疫苗免疫小鼠, DDA 和 MPL 作为佐剂分别提高了此三价苗的免疫原性和免疫保护效果, 且相比之下 DDA 优于 MPL. 添加 DDA 后, Ag85B, MPT64, MPT83 抗原特异的 IFN- γ 含量分别为(265.37 $\pm$ 79.2) U/ml, (185.31 $\pm$ 58.3) U/ml, (108.13 $\pm$ 54.4) U/ml, 分别比非佐剂组的高 16 U/ml, 45 U/ml 和 2 U/ml, 与 MPL 组 3 种抗原特异性 IFN- γ 的含量无显著差异. IL-4 的含量在各组中无显著差异. 攻毒后细菌计数结果显示, 添加佐剂的三价苗组小鼠的肺脏和脾脏的载菌量分别比空载体组降低了 2~3 个数量级, 且佐剂 DDA 组显著优于佐剂 MPL 组和未加佐剂组. 病理切片结果与载菌量数据相一致, 添加佐剂组, 特别是 DDA 组小鼠肺部淋巴细胞相对减少, 巨噬细胞增多. 因此, DDA 作为佐剂能显著提高核酸疫苗的免疫效率, 佐剂 MPL 不能提高结核杆菌多价核酸疫苗的免疫效率.

关键词 结核分支杆菌, 组合疫苗, 佐剂, DDA, MPL, 免疫效果

学科分类号 S855.2

结核病是严重危害人类健康的重要疾病, 同艾滋病、疟疾并列为世界三大疾病. 结核病传染性强, 平均每分钟有 15 个人感染结核病. 全世界感染结核杆菌的人超过世界人口的 1/3(约 20 亿)^[1]. 实际只有 5%~10% 的感染者发展为活动性结核病, 表现出结核病的症状. 其他的感染者只有在 1~2 年后外来其他病原体侵袭或免疫力低下的情况下才有可能发展为结核病. 说明人体内存在对抗结核的机制, 但这种机制不足以抵抗结核杆菌的侵染, 因此提高机体针对结核杆菌的免疫力是预防结核病的有效途径^[2]. 卡介苗 (Bacillus Calmette Guerin, BCG) 是目前预防结核病的唯一疫苗, 但存在局限性^[3]. 发展新型疫苗一直是控制结核病的研究热点. 核酸疫苗是发展前途较好的一种新型疫苗.

分泌蛋白和菌体的细胞壁蛋白是结核杆菌侵入宿主后机体首先遇到的抗原, 在模式动物和结核病患者感染的初级阶段能与 Th1 型细胞发生强烈的反应, 因此这些蛋白质在诱发机体产生抗结核的免疫反应方面发挥重要作用. Ag85 复合体是结核杆菌分泌的主要抗原, 占分泌蛋白的 1/3, 是作为疫苗研究较广泛的候选物. 作为分泌蛋白, MPT64 也是重要的免疫保护性抗原. MPT83 是结核杆菌的细胞壁蛋白, 在牛型结核杆菌中分布较多, 有糖基化位点. 作为核酸疫苗, 3 种抗原的基因都有研究, 都

产生了一定的保护效果, 但未超过 BCG^[4,5]. 几种抗原联合使用是提高保护效果的有效方法^[6-10]. 抗结核免疫中主要是 Th1 型细胞通过分泌 IFN- γ 发挥作用, 不同的佐剂诱发产生不同的细胞型反应, 添加适当的佐剂能有效地调节核酸疫苗的免疫效果^[11]. 双十八烷基二甲基溴化铵 (dimethyl-dioctyldecyl ammonium bromide, DDA) 能增强 IFN- γ 的分泌和诱发免疫保护反应, 并且价格低廉, 已作为佐剂应用在亚单位疫苗和核酸疫苗上^[11,12]. 而单磷酸脂质体 A(monophosphoryl lipid A, MPL) 则通过非特异性免疫反应以提高抗原提呈. 本实验把 DDA 和 MPL 分别作为佐剂与 3 种抗原同时免疫小鼠. 通过比较免疫小鼠的细胞免疫, 体液免疫和免疫保护性在四个组别中的差别, 发现免疫效果高低依次为佐剂 DDA 组、佐剂 MPL 组、非佐剂三价组和 BCG 组.

1 材料与方法

1.1 材料

6~8 周龄 C57BL/6 雌性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

*国家高技术“863”计划资助项目 (2002AA206411).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62756077, E-mail: Hcai@pku.edu.cn

收稿日期: 2005-03-14, 接受日期: 2005-03-28

肿瘤研究所 P2 和 P3 试验室. 结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*) H₃₇Rv 和羊抗 H₃₇Rv 菌株阳性血清由解放军第三零九医院结核病研究中心提供. Dh5 α 和 BL21(DE3) plySs 由本室保存. 真核表达载体 pJW4303 由美国斯坦福大学 Mullins 教授惠赠. 原核表达载体 pET22b(+)由本室保存. 内切酶类购自美国 Promega 公司, 质粒大量提取试剂盒 Qiagen Plasmid Mega Kit 购自美国 Qiagen 公司. 抗体和细胞因子及其抗体购自美国 BD Pharmingen 公司.

1.2 方法

1.2.1 结核杆菌重组蛋白的制备. 本室构建好的 3 种原核重组表达载体在 BL21(DE3) plySs 中进行大量表达, 纯化后的带 6 $\times$ His 的重组抗原用于抗体检测和刺激细胞因子的产生.

1.2.2 真核表达载体的大量制备. 已构建好的 3 种真核表达载体 DNA-85B, DNA-64, DNA-83 大量提取和纯化, 控制质量和内毒素的含量 (<50 U/ml). 3 种质粒用生理盐水溶解, 混合后作为疫苗使用.

1.2.3 动物免疫试验. 3 种真核表达载体混合作为三价疫苗组联合免疫小鼠, 免疫 3 次, 中间间隔 3 周. 每只鼠在后腿肌肉注射 150 μ l, 每种质粒的用量为 50 μ g, DDA 的用量 250 μ g/ 只, MPL 为 100 μ g/ 只. 分别与 3 种抗原基因同时注射, 注射 3 次. 用 150 μ l 空载体 pJW4303 (1 g/L) 注射小鼠作为阴性对照. 在第 3 次免疫时皮下注射 10⁶ BCG 作为阳性对照组.

1.2.4 小鼠抗原特异性抗体检测. 免疫前和每次免疫后的 3 周, 分别从小鼠的眼窝后静脉采血, 每组 5 只, 等量混合后用酶联免疫试验(ELISA)检测抗原特异抗体水平的变化. 3 种抗原 Ag85B, MPT64, MPT83 分别以 10 mg/L 包被酶标板, 血清从 1:25 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. 检测方法同前^[11]. A₄₅₀ 处测定光吸收值. 将抗体滴度定义为: 实验组和阴性对照组光吸收比值 ≥ 2.0 时最大的血清稀释倍数. 抗体最小稀释度为 1:50, 滴度低于该稀释度时判为阴性.

1.2.5 细胞因子的检测.

第 3 次免疫后的 3 周, 无菌取小鼠的脾脏, 每组 3 只, 等量混合脾细胞进行细胞培养. 3 种抗原的刺激浓度为 5 mg/L, 重复 3 个孔, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中培养 72 h 后收集上清, 保存于 -20 $^{\circ}$ C.

双抗夹心法分别测定 IFN- γ 和 IL-4 的含量. 用 5 mg/L 的抗鼠 IFN- γ 和 IL-4 的单抗分别包被酶标

板, 封闭后加入一定稀释度的待检样品, 4 $^{\circ}$ C 反应过夜后, 分别加入生物素标记的抗鼠 IFN- γ 和 IL-4 的单抗, 室温 1 h, 加入与辣根过氧化物酶偶联的亲合素作用 45 min, 以 TMB 为底物进行显色反应, 在 A₄₅₀ 处测定光吸收值. 商用的重组 IFN- γ 和 IL-4 作为标准品分别标定 IFN- γ 和 IL-4 的含量.

1.2.6 免疫小鼠的保护性试验. 第 3 次免疫后 6 周, 每组 9 只鼠, 尾静脉注射 1 $\times$ 10⁶ CFU H37Rv 结核杆菌, 继续饲养 8 周, 之后杀死小鼠, 肺脏和脾脏分别匀浆, 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. 部分肺脏固定于中性福尔马林溶液中, 苏木精和伊红染色, 制作病理切片, 镜检观察肺部病理变化.

1.2.7 结果统计. 对多样本数据进行 *t* 检验. 与空载体组比较, $P \leq 0.05$ 为显著差异, $P \leq 0.01$ 为极显著差异.

2 结 果

2.1 抗原特异性抗体在 3 种组别联合免疫小鼠体内的变化

用 ELISA 法测定特异性抗体滴度发现, 免疫前小鼠体内均不产生特异性抗体. 第一次免疫后, Ag85B 抗原特异的抗体在三价组、三价组 +MPL 和三价组 +DDA, 分别上升到 1:800, 1:1 600 和 1:3 200; 第二次免疫后, 抗体滴度都达到了 1:51 200; 第三次免疫后, 都达到 1:102 400, 3 个组别中 MPT64 抗原特异的抗体滴度在一次免疫后分别上升到 1:200, 1:800 和 1:1 600, 二次免疫后达到 1:12 800, 1:25 600 和 1:51 200, 三次免疫后达到 1:51 200, 1:51 200 和 1:102 400; MPT83 抗原特异的抗体滴度在三个组别中第一次免疫后都为 1:100, 二次免疫后分别上升到 1:400, 三次免疫后为 1:400, 1:800 和 1:3 200 (表 1). 空载体组未检测到抗原特异性抗体 (结果未显示).

2.2 抗原特异性 IFN- γ 和 IL-4 在小鼠体内含量分析

抗原特异的脾细胞培养上清经双抗夹心法分析, 发现抗原特异的 IFN- γ 含量 Ag85B 诱导的最高, MPT64 次之, MPT 83 最低. 与空载体组相比, 三价苗的 3 个组别都诱导产生了较高水平的抗原特异性 IFN- γ , 但 DDA 与 MPL 组之间差异不显著. 即使与未加佐剂组相比, IFN- γ 的含量亦无太大差别 (图 1a). 在各组特异抗原刺激的脾细胞培养上清中仅检测到 pg 水平的 IL-4, 且各组之间均无显著差异 (图 1b).

Table 1 Antibody titers 21 days after three immunizations

Groups	Antigens	21 days after 1st immunization	21 days after 2nd immunization	21 days after 3rd immunization
Combined DNA vaccine	Ag85B	1 : 800	1 : 51 200	1 : 102 400
	MPT64	1 : 200	1 : 12 800	1 : 51 200
	MPT83	1 : 100	1 : 400	1 : 400
Combined DNA vaccine +MPL	Ag85B	1 : 1 600	1 : 51 200	1 : 102 400
	MPT64	1 : 800	1 : 25 600	1 : 51 200
	MPT83	1 : 100	1 : 400	1 : 800
Combined DNA vaccine +DDA	Ag85B	1 : 3 200	1 : 51 200	1 : 102 400
	MPT64	1 : 1 600	1 : 51 200	1 : 102 400
	MPT83	1 : 100	1 : 400	1 : 3200
BCG	PPD	ND	ND	1 : 800
Vector DNA only	Three antigens	0	0	0

ND, Not done.

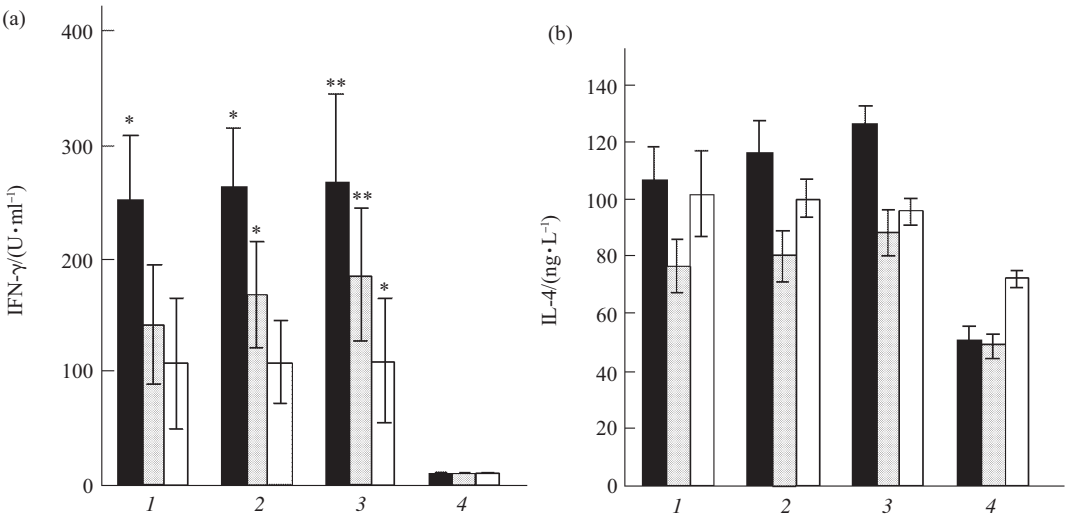


Fig.1 Analysis of cytokine production after immunization

■: Ag85B; □: MPT64; □: MPT83. 1: DNA vaccine; 2: DNA vaccine+MPL; 3: DNA vaccine+DDA; 4: Vector DNA only. (a) IFN- γ concentrations in spleens of experimental mice 21 days after the third immunization. Test sensitivity $\leq 1.0\text{U}$ (1U=100 ng/L). (b) IL-4 concentrations in spleens of experimental mice at the same time. Test sensitivity $\leq 10\text{ ng/L}$.

2.3 免疫小鼠肺部病理变化分析

攻毒后 8 周小鼠的肺部切片观察发现，三价疫苗组中肺部有淋巴细胞聚集，部分肺泡破碎严重(图 2a). 三价苗 +MPL 组中，小鼠肺部有淋巴细胞聚集，部分肺泡破碎，聚集到肺泡周围的上皮样巨噬细胞相对三价组较少(图 2b). 三价苗 +DDA 组中，小鼠肺部有淋巴细胞聚集，肺泡较完整，聚集到肺泡周围的上皮样巨噬细胞为最少(图 2c). BCG 组中，淋巴细胞大量聚集，肺泡有破裂，巨噬细胞也较多(图 2d). 空载体组中，淋巴细胞大量渗出，

肺泡结构消失(图 2e, 2f).

2.4 免疫小鼠的保护效果分析

静脉攻毒 8 周后，对每组 9 只实验小鼠的肺脏，脾脏分离并进行细菌培养计数. 几种疫苗组合免疫 3 次后，小鼠肺脏和脾脏的载菌量比空载体对照组均降低了 2~3 个数量级. 其中三价组 +DDA 组与空载体比较，载菌量降低最多，并且存在极显著差异. 与 BCG 免疫组相比，除三价组脾脏载菌量比 BCG 组增加外，其余组的肺脏和脾脏载菌数都有明显减少(表 2).

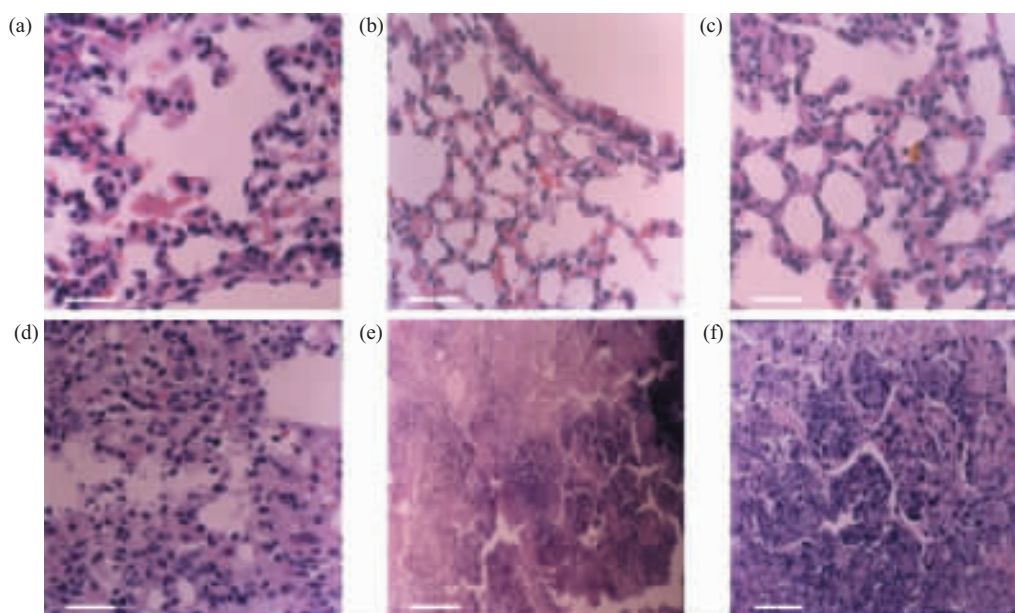


Fig.2 Representative photomicrographs of lung tissue sections harvested from vaccinated mice after intravenous infection with *M. tuberculosis* H37Rv

(a) In the combined DNA vaccine without adjuvant group, neutrophils were aggregated and alveolars damaged. (b) In the combined DNA vaccine with MPL group, less neutrophils were aggregated and part of the alveolar structures were damaged. (c) In the combined DNA vaccine with DDA group, clear alveolar structures were scattered more uniformly, with even less neutrophil detected. (d) In BCG group, neutrophils aggregated and alveolars damaged with a number of macrophages observed. (e) and (f) Vector DNA group. Note that neutrophils infiltrated throughout the whole lung and severe aggregates were seen all over the sample. No alveolars structures were observed. Bars in (a), (b), (c), (d) and (e) = 40 μm , in (f) = 10 μm .

Table 2 Bacteria count after H37Rv challenge

Groups	Lung	Spleen
Vector DNA only	$(1.23 \pm 0.39) \times 10^8$	$(4.57 \pm 2.26) \times 10^6$
Combined DNA vaccine	$(6.88 \pm 0.32) \times 10^{3*}$	$(4.14 \pm 0.33) \times 10^4$
Combined DNA vaccine +MPL	$(6.12 \pm 0.34) \times 10^{3*}$	$(3.17 \pm 0.32) \times 10^4$
Combined DNA vaccine +DDA	$(5.46 \pm 0.36) \times 10^{3**}$	$(2.22 \pm 0.84) \times 10^{4*}$
BCG	$(9.41 \pm 0.28) \times 10^5$	$(3.48 \pm 0.23) \times 10^4$

* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

3 讨 论

结核杆菌不同抗原的核酸疫苗近几年来已有大量报道^[4,5],但免疫效果和现有疫苗 BCG 比起来相差无几,在现有疫苗的基础上提高免疫保护性是目前研究疫苗的一个重要方面.组合疫苗的作用已受到了重视.文献报道^[6,7]和我们实验室的工作^[8-10,12,13]都证实现有的几种重要抗原的核酸疫苗联合免疫小鼠能提高疫苗的免疫原性和免疫保护性,添加佐剂后免疫效果更明显^[9].本实验用结核杆菌的 3 种抗原基因的真核表达载体联合免疫小鼠,添加不同佐剂

后均提高了免疫原性和免疫效果.与空载体组相比,3 种抗原特异性的 IFN- γ 含量均有极显著增加,表明 IFN- γ 可能在对抗结核杆菌的感染中发挥重要作用.就两种佐剂组而言,IFN- γ 的产生量却无明显差异,表明诱导产生大量 IFN- γ 可能仅仅是小鼠抗病反应的一部分,其他因子或途径也在这个过程中发挥作用.而 IL-4 主要是一种 Th2 型反应的指标,在本实验中其含量水平低,仅为 pg 级,可能不参与抵抗结核杆菌感染的反应.

裸 DNA 疫苗被称为第一代核酸疫苗,第二代

核酸疫苗主要通过添加不同的佐剂来增强疫苗的效果. 一般认为, 理想的佐剂一方面能够提高疫苗的免疫原性和免疫保护性, 另一方面又可延长疫苗在体内持续表达的时间, 减少免疫次数^[14,15]. 一般认为, DDA 的作用类似于微胶囊, 能缓慢释放所包裹的质粒载体, 从而延长抗原表达时间. 本文用 DDA 作为佐剂, 与结核杆菌的 3 种抗原基因共免疫小鼠, 与非佐剂三价苗组及 MPL 佐剂组相比较后发现, DDA 能显著提高多价核酸疫苗弱抗原基因, 如 MPT64 和 MPT83 基因, 诱导产生特异性抗体和 IFN- γ 的能力, 从而显著提高多价核酸疫苗的联合免疫效率, 使实验动物得到更进一步的保护 (表 2, 图 2). 因此, 我们认为 DDA 能够有效提高结核杆菌多价核酸疫苗的联合免疫效果, 可用于进一步的研究或生产性试验. MPL 尽管已作为一些疫苗的佐剂用于工业化生产, 但本实验的结果表明它对结核杆菌多价核酸疫苗的促进作用不如 DDA.

参 考 文 献

- Collins H L, Kaufmann S H E. Prospects for better tuberculosis vaccines. *Lancet Infect Dis*, 2001, **1** (1): 21~28
- Bloom B R, Murray C J. Tuberculosis: commentary on a reemerging killer. *Science*, 1992, **257** (5073): 1055~1064
- Orme I M. Beyond BCG: The potential for a more effective TB vaccine. *Mol Med Today*, 1999, **5** (11): 487~492
- Huygen K, Content J, Denis O, *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nat Med*, 1996, **2** (8): 893~898
- Tascon, R E, Colston M J, Ragno S, *et al.* Vaccination against tuberculosis by DNA injection. *Nat Med*, 1996, **2** (8): 888~892
- 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
- Morris S, Kelley C, Howard A, *et al.* The immunogenicity of single and combination DNA vaccines against tuberculosis. *Vaccine*, 2000, **18** (20): 2155~2163
- Tian X, Cai H, Zhu Y X. Protection of mice with a divalent tuberculosis DNA vaccine encoding antigens Ag85B and MPT64. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2004, **36** (4): 269~276
- Cai H, Pan Y, Li G L, *et al.* Construction of multivalent DNA vaccines for *Mycobacterium tuberculosis* and its immunogenicity. *Chinese Science Bulletin*, 2002, **47** (19): 1589~1593
- 潘 怡, 蔡 宏, 李淑霞, 等. 结核分枝杆菌组合 DNA 疫苗的免疫效果. *生物化学与生物物理学报*, 2003, **35** (1): 71~76
Pan Y, Cai H, Li S X, *et al.* *Acta Biochem Biophys Sin*, 2003, **35** (1): 71~76
- Lindblad E B, Elhay M J, Silva R, *et al.* Adjuvant modulation of immune responses to tuberculosis subunit vaccines. *Infect Immun*, 1997, **65** (2): 623~629
- Cai H, Tian X, Hu X D, *et al.* Combined DNA vaccines formulated in DDA enhance protective immunity against tuberculosis. *DNA and Cell Biology*, 2004, **23** (7): 450~456
- Cai H, Tian X, Hu X D, *et al.* Immunogenicity and protective efficacy study using combination of four tuberculosis DNA vaccines. *Science in China (C)*, 2003, **46** (4): 495~502
- Zhu X, Venkataprasad N, Thangaraj H S, *et al.* Functions and specificity of T cells following nucleic acid vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol*, 1997, **158** (12): 5921~5926
- Vogel F R. Improving vaccines performance with adjuvants. *Clin Infect Dis*, 2000, **30** (S3): s266~270

DDA is More Efficacious Than MPL as Adjuvants That Enhanced Immunogenicity and Protection of Combined DNA Vaccine Against *Mycobacterium tuberculosis**

YU Da-Hai, CAI Hong**, ZHU Yu-Xian

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

Abstract Combined DNA vaccine encoding Ag85B, MPT64 and MPT83 of *Mycobacterium tuberculosis* were formulated into DDA and MPL to immunize mice and then the immunogenicity and protective efficacy of each group were evaluated. The DDA and MPL groups induced a much more enhanced Th1-type cellular response indicated by the higher levels of IFN- γ compared with that without any adjuvant. In DDA group, antigens specific IFN- γ for Ag85B, MPT64, MPT83 are (265.37 $\pm$ 79.2) U/ml, (185.31 $\pm$ 58.3) U/ml, (108.13 $\pm$ 54.4) U/ml respectively which are 16 U/ml, 45 U/ml, 2 U/ml higher than that of the non-adjuvant group. The bacterial CFU in lungs and spleens of the DDA group was reduced 1/5 and 1/4 respectively relative to the same combined vaccine

with MPL and without adjuvants. The pathological lungs slices of adjuvant groups gave consistent result that showed less damage than non-adjuvant group due to influx of epithelioid macrophages and less neutrophils. In conclusion, DDA is more efficacious than MPL as adjuvants to enhance immune efficacy of combined DNA vaccine in mice.

Key words *Mycobacterium tuberculosis*, combined DNA vaccine, DDA, MPL, immune efficacy

*This work was supported by a grant from State 863 High Technology R&D Project of China (2002AA206411).

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

Received: March 14, 2005 Accepted: March 28, 2005