

• 论著 •

DNA 疫苗治疗小鼠耐多药结核病的研究

梁艳¹ 吴雪琼¹ 李忠明² 张俊仙¹ 李宁¹ 阳幼荣¹ 余琦¹ 白雪娟¹ 宋晶莹¹王兰¹ 史迎昌¹ 刘洁¹ 刘成龙¹ 朱琰¹ 徐雪玉¹

(1. 中国人民解放军第 309 医院全军结核病研究所 北京 100091; 2. 上海海规生物科技有限公司 上海 200436)

摘要: **目的** 研究结核分枝杆菌 DNA 疫苗治疗小鼠耐多药结核病的效果。**方法** 用结核分枝杆菌耐利福平和异烟肼临床分离株 HB361 尾静脉注射 60 只雌性 BALB/c 小鼠后,将小鼠随机均匀地分为 6 组,感染后第 3 d 开始,分别用生理盐水(A 组)、pVAX1 载体(B 组)、利福平(C 组)、HSP65 DNA 疫苗(D 组)、Ag85A DNA 疫苗(E 组)、Ag85A/ESAT6 嵌合 DNA 疫苗(F 组)治疗 60 d, DNA 疫苗每隔 15 d 肌肉注射 1 次,共 5 次。治疗结束后 3 周,分别取肺和脾观察病理改变、称取重量、做菌落计数。**结果** 治疗结束后 3 周,与对照组比较,D 组、E 组和 F 组肺脏病变有不同程度减轻,病变局限,2/3 区域可见正常的肺泡结构,肺泡轮廓相对清晰,细胞分布均匀。与 A 组相比,D 组、E 组和 F 组肺脏菌落数分别减少了 0.34、0.50 和 0.26 logs;脾脏菌落数依次减少了 0.37、0.46 和 0.28 logs ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** Ag85A DNA 疫苗治疗小鼠耐多药结核病效果优于 HSP65 DNA 和 Ag85A/ESAT6 嵌合 DNA 疫苗。

关键词: 结核, 抗多种药物性/治疗; 疫苗, DNA; 分枝杆菌, 结核

Therapeutic effects of DNA vaccines in a mouse model of multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* infection

Liang Yan¹, Wu Xueqiong¹, Li Zhongming², Zhang Junxian¹, Li Ning¹, Yang Yourong¹, Yu Qi¹, Bai Xuejuan¹, Song Jingying¹, Wang Lan¹, Shi Yingchang¹, Liu Jie¹, Liu Chenglong¹, Zhu Yan¹, Xu Xueyu¹

1. Tuberculosis Research Institute, the 309th Hospital of PLA, Beijing 100091, China;

2. Shanghai H&G Biotechnology company, Shanghai 200436, China

Abstract: **Objective** To evaluate the therapeutic effects of DNA vaccines in mouse models of *M. tuberculosis* infection to establish new immunotherapeutic agents to treat MDR-TB. **Methods** 60 female BALB/C mice were infected intravenously via the tail vein with 220 000 CFU of clinical isolate *M. tuberculosis* HB361 which was resistant to RFP and INH, then randomly divided into 6 groups and treated as follow at the third day after infection for 60 days: saline, plasmid vector, rifampin, HSP65 plasmid DNA, Ag85A plasmid DNA vaccines, Ag85A/ESAT-6 chimeric plasmid DNA vaccines. DNA vaccines were injected intramuscularly 5 times at 15 days intervals. The lungs and spleens from the mice were taken and their pathological changes, weight and number of mycobacterial colony were examined at 3 weeks after the end of treatment. **Results** The histopathological changes of lung showed that the lung lesions were slight and limited, there were rela-

基金项目:国家重大传染病专项资助(基金编号 2008ZX-10003-013);中国人民解放军总医院第二附属医院基金资助项目(基金编号 2007AY04)。

通讯作者:吴雪琼(wu-xueqiong@263.net)

共同通信作者:李忠明(zhongmingli1946@yahoo.com)

tively clear profile and normal structure of the alveoli in the treatment groups compared with the control groups. Compared with vector group, HSP65, Ag85A, Ag85A/ESAT-6 DNA vaccines groups reduced the pulmonary bacterial loads by 0.30, 0.50, 0.26 logs, and reduced the splenic bacterial loads by 0.37, 0.46, and 0.28 logs ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), respectively.

Conclusion The immunotherapeutic effects of Ag85A DNA was significantly stronger than that of chimeric Ag85A/ESAT6 DNA, HSP65 DNA vaccine in the mouse model of multi-drug resistant tuberculosis.

Key words: tuberculosis, multidrug-resistant/therapy; vaccines, DNA; *Mycobacterium tuberculosis*

Correspondence to: Wu Xueqiong, e-mail: wu-xueqiong@263.net; Li Zhongming, e-mail: zhongmingli1946@yahoo.com

由于耐多药结核病的流行、化疗药物的不良反应,以及人类免疫缺陷病毒的感染、免疫抑制剂的使用和老年性结核病等原因引起的机体免疫功能低下,使难治性结核病增多,抗结核治疗面临巨大的挑战,尤其是耐多药结核病(MDR-TB)、广泛耐药结核病面临无药可治的困难局面^[1]。近年来通过免疫调节治疗结核病成为研究的热点之一,治疗性疫苗的研究与开发成为一个十分重要的研究方向。前期研究中,我们采用 Ag85A/ESAT-6 嵌合 DNA 疫苗治疗小鼠敏感结核病模型,发现 Ag85A/ESAT6 嵌合 DNA 疫苗联合药物治疗敏感性结核病具有一定的疗效^[2]。因此本研究将 Ag85A DNA 疫苗、Ag85A/ESAT6 嵌合 DNA 疫苗用于小鼠耐多药结核病的治疗,以利福平和 HSP65 DNA 疫苗为对照,通过动物实验观察其治疗效果,以期寻找用于治疗耐多药结核病的有效疫苗。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 DNA 疫苗和菌株来源 pVAX1 载体由上海海规物科技有公司提供,结核分枝杆菌 Ag85A DNA 疫苗、Ag85A/ESAT6 嵌合 DNA 疫苗、HSP65 DNA 疫苗由上海海规物科技有公司纯化,结核分枝杆菌 HB361 为河北省胸科医院临床分离的高耐利福平、低耐异烟肼的耐多药株。结核分枝杆菌 Ag85A DNA 疫苗 Ag85A/ESAT6 嵌合 DNA 疫苗、HSP65 DNA 疫苗和 pVAX1 载体浓度均为 1 mg/ml,纯度较高 $A_{260}/A_{280} = 2.011 > 1.80$,几乎不含蛋白和 RNA。Ag85A DNA 疫苗和 Ag85A/ESAT6 嵌合 DNA 疫苗已申请专利,Ag85A DNA 疫苗国内专利号为 200710121034.6; Ag85A/ESAT6 嵌合 DNA 疫苗的国际和国内专利号分别是 PCT/CN2005/001914 和 200410084376.1。

1.1.2 药物 利福平胶囊购自沈阳红旗制药有限

公司,批号 0611071,规格 0.15 g。

1.1.3 实验动物 17~19 g 6~8 周龄雌性 BALB/C 小鼠购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 结核分枝杆菌 HB361 药物敏感性试验 方法按照 2006 年中国防痨协会基础专业委员会编写的《结核病诊断实验室检验规程》中绝对浓度法测定结核分枝杆菌药物敏感性试验方法进行。

1.2.2 小鼠耐多药结核病感染模型的制备 每只小鼠经尾静脉注射 0.4 ml 含 2.2×10^5 CFU 的结核分枝杆菌 HB361 菌悬液,制备耐多药结核病模型。

1.2.3 小鼠感染情况 感染后 8 周,随机取 4 只小鼠进行解剖,解剖后肉眼观察小鼠肺和脾大体病理改变;并进行肺和脾的活菌计数,方法是取小鼠全肺和脾加生理盐水研磨,加等体积 4% NaOH 消化 30 min 后,倍比稀释取 100 μ l 接种于改良罗氏鸡卵平皿培养基上,置 37 $^{\circ}$ C 温箱培养 4 周;取小鼠脾加生理盐水研磨,倍比稀释后取 100 μ l 接种于改良罗氏鸡卵平皿培养基上,置 37 $^{\circ}$ C 温箱培养 4 周,进行菌落计数。

1.2.4 实验分组 小鼠感染后,将小鼠随机均匀地分为 6 组,每组 10 只小鼠。小鼠感染后第 3 d 开始治疗。治疗前称体质量 1 次;治疗后每周称体质量 1 次。小鼠感染后第 3 d 开始,生理盐水组(A 组)每只小鼠肌肉注射 100 μ l 生理盐水;pVAX1 载体组(B 组)每只小鼠肌肉注射 100 μ g/100 μ l pVAX1 载体;利福平组(C 组)口服利福平(0.02 mg/g/d)连续 60 d;HSP65 DNA 疫苗组(D 组)每只小鼠肌肉注射 100 μ g/100 μ l HSP65 DNA 疫苗;Ag85A DNA 疫苗组(E 组)每只小鼠肌肉注射 100 μ g/100 μ l Ag85A DNA 疫苗;Ag85A/ESAT6 嵌合 DNA 疫苗组(F 组)每只小鼠肌肉注射 100 μ g/100 μ l Ag85A/ESAT6 嵌合 DNA 疫苗,各治疗组每 15 d 肌肉注射

1 次,共注射 5 次。

1.2.5 肺组织病理学检查 治疗结束后 3 周,取小鼠肺右叶固定于 10% 中性福尔马林,石蜡包埋切片,苏木精/伊红(HE)染色后,镜下观察肺组织病理改变。

1.2.6 肺、脾菌落计数 治疗结束后 3 周,取小鼠肺左叶称重,加生理盐水研磨,加等体积 4% NaOH 消化 30 min 后,倍比稀释取 100 μ l 接种于改良罗氏鸡卵平皿培养基上,置 37 $^{\circ}$ C 温箱培养 4 周,将得到的肺左叶菌落数根据肺左叶和全肺的重量换算为全肺菌落数;取脾的上半部分称重,加生理盐水研磨,倍比稀释后取 100 μ l 接种于改良罗氏鸡卵平皿培养基上,置 37 $^{\circ}$ C 温箱培养 4 周,将得到的脾的上半部分的菌落数根据其重量和全脾的重量换算为全脾菌落数。

1.2.7 统计学分析 应用 SAS6.12 软件处理数据,定量资料用单因素方差分析,两两比较用 q 检验。

2 结果

2.1 结核分枝杆菌 HB361 药物敏感性试验结果

结核分枝杆菌 HB361 临床分离株为高耐利福平、低耐异烟肼的耐多药株见表 1。

表 1 结核分枝杆菌 HB361 药物敏感试验结果

菌株	对照	RFP		INH	
		50 μ g/ml	250 μ g/ml	1 μ g/ml	10 μ g/ml
HB361	+++/-	+++/-	++/-	+++/-	0/0
	+++	+++	++	+++	

2.2 小鼠感染情况 感染后 8 周,全肺荷菌量为 (6.30 ± 0.11) logs;全脾荷菌量为 (5.83 ± 0.11) logs,小鼠肺脏均有明显的坏死,脾脏都有肿大。

2.3 肺脏组织病理改变 治疗结束后 3 周,小鼠肺组织的镜下病理改变(图 1)。生理盐水组肺组织病变严重、广泛,充血、实变,正常肺泡结构消失,可见大片坏死灶,肺泡腔内可见大量的浆液纤维素性渗出,可见少量的淋巴细胞浸润。pVAXI 载体组病变程度比生理盐水组稍轻,可见大片坏死灶。RFP 组肺少量充血,渗出比生理盐水组轻,肺泡壁轻度肿胀、增厚,可见少量由类上皮细胞、多核巨细胞和大量淋巴细胞组成的结核肉芽肿,可见较多的坏死灶。HSP65 DNA 疫苗组、Ag85A DNA 疫苗组和 Ag85A/ESAT6 嵌合 DNA 疫苗组肺组织病变局限,2/3 区域可见正常的肺泡结构,肺泡轮廓相对清晰,细胞分布均匀,病变区域出现典型的由类上皮

细胞、多核巨细胞、泡沫样细胞和少量淋巴细胞组成的结核肉芽肿,坏死灶不明显。

2.4 肺、脾活菌计数 生理盐水组、pVAXI 载体组、RFP 组、HSP65 DNA 疫苗组、Ag85A DNA 疫苗组和 Ag85A/ESAT6 嵌合 DNA 疫苗组全肺平均菌落数依次是 (6.46 ± 0.22) 、 (6.37 ± 0.18) 、 (6.47 ± 0.13) 、 (6.20 ± 0.19) 、 (5.96 ± 0.27) 和 (6.12 ± 0.22) logs。生理盐水组、pVAXI 载体组和 RFP 组肺、脾菌落数差别无统计学意义,与生理盐水组相比,各治疗组全肺菌落数差异有统计学意义,HSP65 DNA 疫苗组和 Ag85A/ESAT6 嵌合 DNA 疫苗组分别减少了 0.26 和 0.34 logs($P < 0.05$),Ag85A DNA 疫苗组则分别减少了 0.50 logs($P < 0.01$)(图 2)。

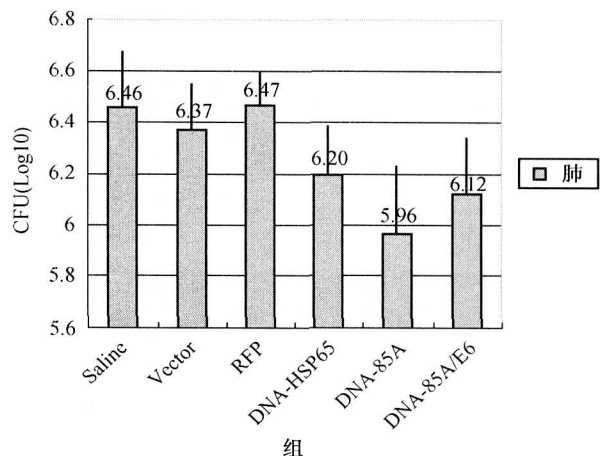


图 2 各组小鼠肺脏活菌计数结果

生理盐水组、pVAXI 载体组、RFP 组、HSP65 DNA 疫苗组、Ag85A DNA 疫苗组和 Ag85A/ESAT6 嵌合 DNA 疫苗组全脾平均菌落数依次是 (5.73 ± 0.28) 、 (5.58 ± 0.21) 、 (5.75 ± 0.16) 、 (5.45 ± 0.21) 、 (5.27 ± 0.16) 、 (5.36 ± 0.21) logs。

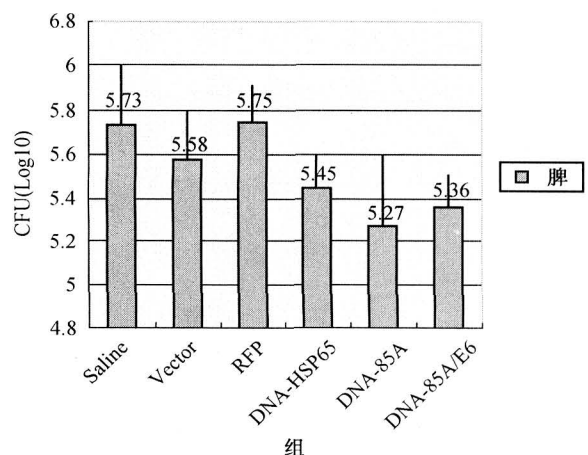


图 3 各组小鼠脾脏活菌计数结果

± 0.20)、(5.27 ± 0.33) 和 (5.36 ± 0.15) logs。与生理盐水组相比,各治疗组全脾菌落数差别也具有统计学意义,HSP65 DNA 疫苗组和 Ag85A/ES-AT6 嵌合 DNA 疫苗组全脾菌落数分别减少了 0.28 和 0.37 logs ($P < 0.05$),Ag85A DNA 疫苗组则分别减少了 0.46 logs ($P < 0.01$) (图 3)。

3 讨论

DNA 疫苗的实质是基因免疫。由能引起机体保护性免疫应答的病原体抗原的编码基因和载体组成,将其直接导入机体细胞后,并不与宿主染色体整合,而是通过宿主细胞的转录系统表达蛋白抗原,诱导宿主产生细胞免疫应答和体液免疫应答。小鼠和人体研究都表明:有效控制结核杆菌等胞内致病菌感染必需细胞介导的 Th1 型应答^[3]。DNA 疫苗是对付结核杆菌感染的有效途径,它可以产生并长期维持所需的细胞免疫应答。

1996 年 Huygen 等^[4]报道,用编码 Ag85A DNA 基因免疫小鼠,可诱导小鼠产生强烈 Th1 型细胞应答和 CD8⁺ T 细胞介导的细胞毒性应答,并能抵御气溶胶或静脉内结核杆菌的攻击,提示编码 Ag85A DNA 免疫可诱生强烈、广泛的免疫应答。吴雪琼等^[5]实验证明 Ag85A 具有一定的免疫治疗效果,可作为新疫苗的候选成分。近年来国内外学者在结核 DNA 疫苗方面进行了一系列的研究,其中在 Ag85A DNA 疫苗上取得了良好的实验效果^[6-7]。因此本文在前期研究的基础上,进一步评价 Ag85A DNA 疫苗、Ag85A/ESAT-6 嵌合 DNA 疫苗治疗小鼠耐多药结核病的疗效。

本研究发现:从肺、脾细菌载量来看,与生理盐水组比较,载体组肺、脾活菌数均比生理盐水组略有减少,可能是载体 DNA 本身的免疫刺激佐剂作用的结果;利福平组肺、脾活菌数均比生理盐水对照组略有增加,说明利福平无杀菌作用;各疫苗组肺脏活菌数和脾脏活菌数均有不同程度的减少,尤其是 Ag85A DNA 疫苗组,肺脏和脾脏活菌数分别减少了 0.50 logs 和 0.46 logs,显著少于 Ag85A/ES-AT6 嵌合 DNA 疫苗组和 HSP65 DNA 疫苗组 ($P < 0.05$),表明 Ag85A DNA 疫苗具有显著的治

疗作用,且优于 HSP65 DNA 疫苗和 Ag85A/ES-AT6 嵌合 DNA 疫苗。从肺脏病变程度和组织病变评价,各疫苗组均有不同程度的疗效,与生理盐水组和载体组病变严重、广泛相比,利福平组可见肉芽肿,病灶相对局限,说明具有一定的抑菌作用;各疫苗组肺脏病变均有不同程度减轻,病变局限,2/3 区域可见正常的肺泡结构,肺泡轮廓相对清晰,且与肺菌落计数相一致。以上研究结果表明:Ag85A DNA 疫苗具有一定疗效,Ag85A DNA 疫苗有望成为治疗耐药结核病新的免疫制剂。(本文图 1~6 见封三)

4 参考文献

- [1] Anderson P. TB Vaccines: progress and problems [J]. Trends Immunol, 2001,22(3):160-168.
- [2] 梁艳,吴雪琼,李宁,张俊仙,阳幼荣,余琦,白雪娟,宋晶莹,刘瑞,李忠明,王兰,史迎昌. 结核分枝杆菌 Ag85A/ESAT6 嵌合基因 DNA 疫苗与抗痨药物联合治疗小鼠结核病 [J]. 中国人兽共患病杂志,2008,24(9):864-867.
- [3] Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis [J]. Annu Rev Immunol, 2001,19:93-129.
- [4] Huygen K, Content J, Denis O, Montgomery DL, Yawman AM, Deck RR, DeWitt CM, Orme IM, Baldwin S, D'Souza C, Drowart A, Lozes E, Vandenbussche P, Van Vooren JP, Liu MA, Ulmer JB. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine [J]. Nat Med, 1996,2(8):857-859.
- [5] 吴雪琼,张俊仙,李洪敏,史迎昌,张灵霞,梁建琴,金关甫,由昆. 结核分枝杆菌 Ag85A DNA 疫苗免疫治疗作用的研究 [J]. 中国免疫学杂志,2002,18(1):17-22.
- [6] Ha SJ, Jeon BY, Kim SC, Kim DJ, Song MK, Sung YC, Cho SN. Therapeutic effect of DNA vaccines combined with chemotherapy in a latent infection model after aerosol infection of mice with Mycobacterium tuberculosis [J]. Gene Therapy, 2003,10(18):1592-1599.
- [7] Denis O, Tanghe A, Palfliet K, Jurion F., van den Berg TP, Vanonckelen A, Ooms J, Saman E, Ulmer JB., Content J, Huygen K. Vaccination with plasmid DNA encoding mycobacterial antigen 85A stimulates a CD4⁺ and CD8⁺ T cell epitope repertoire broader than that stimulated by M. tuberculosis H37Rv infection [J]. Infect Immun 1998,6(4):1527-1533.

(收稿日期:2009-04-15)