

· 论著 ·

结核分枝杆菌重组 EIS 蛋白血清学诊断价值的研究

肖松生 李美忠 王火生 邓群益 蔡雄茂 周伯平 张维 陈心春

(广东省深圳市东湖医院深圳 深圳 518020)

摘要: **目的** 研究结核分枝杆菌重组 EIS 蛋白的抗原性,观察抗结核化疗对抗 EIS 抗体滴度影响,初步探讨 EIS 蛋白作为血清诊断抗原在筛选活动性肺结核作用的可能性。**方法** 采用基因工程方法表达纯化 EIS 抗原,以 EIS 为抗原建立酶联免疫方法,检测肺结核病人和健康对照者中抗 EIS 抗体的存在情况。对初次化疗的肺结核病人进行抗 EIS 抗体水平的随访,观察化疗对抗体反应的影响。**结果** 肺结核病人抗 EIS 抗体的水平显著高于健康对照和肺部非肺结核疾病对照($P < 0.0001$),结核化疗对抗体反应的影响不大,在整个化疗过程中抗体水平无显著差别。**结论** EIS 抗体的检测可能有助于活动性肺结核的筛选。

关键词: EIS 蛋白;结核,肺/诊断;抗体反应

Antibody response against recombinant EIS protein of *Mycobacterium tuberculosis* in patients with pulmonary tuberculosis: possible application for screening the active tuberculosis

Xiao Songsheng, Li Meizhong, Wang Huosheng, et al.

Shenzhen East Lake Hospital, Shenzhen 518020, China

Abstract: Objective To study the immunogenicity of recombinant EIS protein, a novel antigen encoded by enhanced intracellular survival gene of *Mycobacterium tuberculosis*, and its possible application to screen the active tuberculosis. **Methods** The purified recombinant EIS protein was used as antigen to detect the antibody responses in the sera from the patients with pulmonary tuberculosis, healthy donors and patients with lung disease other than tuberculosis by ELISA. **Results:** The level of antibody responses was significant higher in the sera from patients with pulmonary tuberculosis than that from healthy donors and patients with non-tuberculosis lung disease. The titer of anti-EIS antibody in the sera from patients with pulmonary tuberculosis had not significant changed during the anti-tuberculosis chemotherapy. **Conclusion** EIS antigen may be a useful antigen for screening the active tuberculosis.

Key words: EIS protein; Pulmonary tuberculosis/diagnosis; Antibody response

肺结核诊断有时在临床上颇困难。随着全球结核病发病的迅速增加,结核病的诊断和鉴别诊断显得更为重要。结核病诊断的延误不仅影响病人个体的健康,同时增加了结核菌播散的机会。目前结核病的诊断主要依赖痰涂片镜检、结核菌培养、PPD 试验和影像学诊断。抗酸染色镜检是检测肺结核的直接简便方法,但该方法的敏感性较低,每毫升痰液结核菌的量达到 5 000 ~ 10 000 条才能检测到^[1-2]。相比之下,结核菌培养可以检测痰液中较低菌量的存在,但需要的时间较长(约 3 ~ 6

周)^[2]。PPD 试验无法准确区分结核菌感染还是卡介苗免疫应答,这意味着对于中国这样广泛接种卡介苗的国家来说,PPD 试验在诊断方面的应用价值受到影响^[3]。

免疫学诊断是病毒感染和某些细菌感染常用的诊断方法,具有操作简便、特异性好、敏感性高的特点。然而目前市场上结核病的血清诊断试剂盒敏感性和特异性方面远不能满足临床的要求,特别是后者。最主要的原因是没有合适的抗原。新近发现的结核菌抗原如 CFP-10、ESAT-6 等大大提

高了结核病免疫诊断的特异性,提示结核病免疫诊断的广阔应用前景在于发现新的结核菌特异的抗原。

EIS(enhance intracellular survival)基因为结核分枝杆菌复合群特有的基因,EIS 基因产物具有提高结核菌在巨噬细胞中的生存能力,这也是 Friedman^[4]教授发现这一基因并命名的由来。既往的实验结果提示 EIS 蛋白可能是很好的结核菌特异性抗原^[5]。本实验对 EIS 的抗原进行进一步的分析,发现肺结核病人抗 EIS 抗体水平显著高于健康对照。

资料与方法

1. 病例资料:100 例初治肺结核病人为深圳市宝安区慢性病防治院和深圳市东湖医院收治的结核病患者,其中 80 例为初治涂阳的肺结核病人,20 例为初治涂阴的肺结核患者。其中,男 55 例,女 45 例,平均年龄(30.05 ± 11.25)岁。均接受世界银行结核病控制项目“直接面试下的短程治疗”(简称 DOTS)并完成了 6 个月疗程。100 例健康对照者为某物业公司员工,其中男 60 例,女 40 例,平均年龄(29.78 ± 8.45)岁,无结核病史和任何临床症状,经胸部影像学确定无异常。健康对照者 PPD 试验结果如下:硬结 < 5 mm 13 例,5 ~ 9 mm 43 例,10 ~ 19 mm 39 例, ≥ 20 mm 或有明显水泡 5 例。健康对照与肺结核患者 PPD 试验结果无显著差别。20 例非肺结核的肺部疾病对照没有进行 PPD 试验,诊断依据为病史、临床症状和体征、细菌学检查结果和影像学检查。20 例非肺结核的肺部疾病对照来自深圳市人民医院和深圳市东湖医院的住院病例,包括慢性支气管炎合并感染 10 例、细菌性肺炎 10 例。其中,男性 15 例,女性 5 例。平均年龄(39.2 ± 12.45)岁。

2. 标本收集:静脉血 2 ml,分离血清分装后保存在 -20°C 待检。采血时间分别为确定诊断但未进行抗结核治疗前、抗结核治疗 1 个月、抗结核治疗 3 和 6 个月。健康对照和疾病对照只采血 1 次。

3. EIS 蛋白的表达纯化:表达 EIS 蛋白的工程菌 BL21(DE3)由美国亚利桑那大学微生物系教授 Friedman 教授提供,挑取含重组表达 EIS 的单菌落,扩大培养,37℃,IPTG 诱导表达 4 h,将诱导表达菌体重悬浮,超声,取超声上清,通过 Ni - Chelating Sepharose 亲和层析纯化融合蛋白 EIS,经 0.05 ~ 0.2 mol/L 咪唑梯度洗脱,收集融合蛋白洗脱峰。

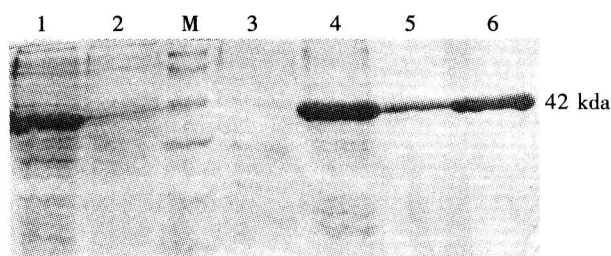
4. 抗 EIS 抗体的检测:采用酶联免疫吸附实验

方法(ELISA)检测血清样本中抗 EIS 抗体的存在情况。简要的程序如下:将纯化的 EIS 蛋白按 $1 \mu\text{g}$ 每孔包被 96 孔板,置于 4°C 过夜。次日用封闭液封闭 2 h,再用 PBS - T 洗涤 3 次,吸干后加入病人血清(1:50 稀释),37℃ 孵育 1 h,洗涤后加入 HRP 标记的羊抗人 IgG,37℃ 孵育 0.5 h,洗涤后加入显色剂显色 10 min,用 0.1 N 硫酸中止显色反应,用酶标仪在 450 nm/630 nm 读取 OD 值。

5. 统计学分析:应用统计分析软件 PRIZM 进行统计分析,各组间抗体水平的差别采用 *t* 检验。

结 果

1. EIS 蛋白的表达和纯化:由于 EIS 融合蛋白含有 6 × His 亲和纯化标签,因此选择亲和层析进行纯化,在 0.2 M 咪唑和 0.15 M NaCl 洗脱条件下,获得纯化的分子量为 42 kda 的 EIS 蛋白。SDS - PAGE 结果表明,纯化的融合蛋白纯度达 90%(图 1)。



1,表达 EIS 的大肠杆菌的裂菌沉淀; 2,表达 EIS 的大肠杆菌裂菌上清;3,穿透液; 4~5,不同条件洗脱液;6,0.2 M 咪唑洗脱的 EIS 蛋白; M,分子量标准(依次是 94 kda,67 kda,43 kda,30 kda, 20.1 kda,14.4 kda)

图 1 重组 EIS 蛋白的表达和纯化

2. EIS 蛋白的抗原性分析:比较肺结核病人和健康对照抗 EIS 抗体免疫情况见图 2,结果表明肺结核病人能对 EIS 蛋白产生强烈的体液免疫应答,产生的抗 EIS 滴度($\text{OD 值} \bar{x} \pm s, 0.88 \pm 0.044$)显著高于健康对照($\text{OD 值为 } 0.39 \pm 0.023$)以及非肺结核肺部疾病病例对照(0.4057 ± 0.068), $P < 0.0001$ 。

3. 抗结核化疗对抗 EIS 抗体水平的影响:对 80 例肺结核初治病人的随访。收集病人治疗前、治疗 1、3、6 个月的血清标本,检测血清中抗 EIS 的滴度,结果显示抗结核化疗前后抗 EIS 抗体水平基本一致,不同时间点的抗 EIS 抗体水平无显著性差异($P > 0.05$)(图 3)。

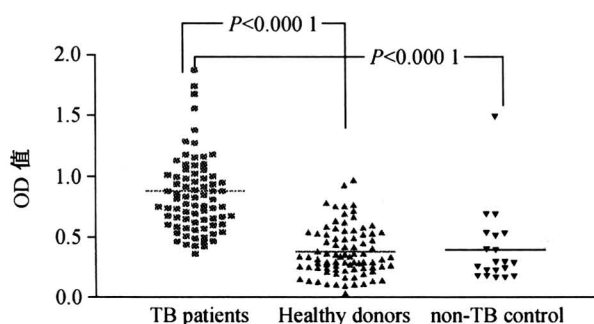


图2 肺结核病人、健康对照及非肺结核肺部疾病病例抗 EIS 抗体水平

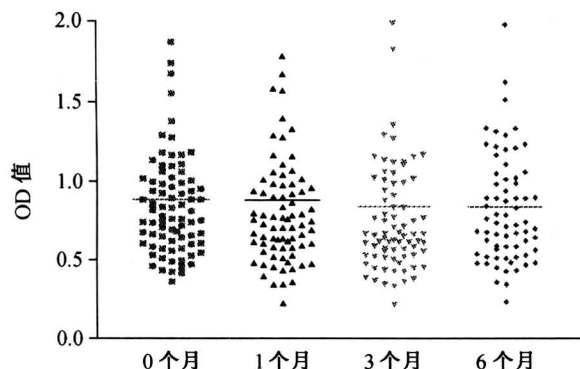


图3 抗结核化疗对抗 EIS 抗体反应的影响

讨 论

EIS 蛋白主要存在于细菌的胞质中,并可以分泌到菌体外成为分泌型蛋白。体外试验发现巨噬细胞感染结核菌后,结核菌产生的 EIS 蛋白不但可以分泌到菌体寄生的细胞内,还可以游离形式分泌到培养上清^[5]。理论上,在结核菌感染机体后,产生的 EIS 诱导特异性的抗体免疫应答。另外,由于 EIS 基因仅存在于结核分枝杆菌复合群,而不存在于其他非结核分枝杆菌,且 EIS 基因产物与结核分枝杆菌致病性相关,提示 EIS 抗原可能是一较为理想的筛选活动性肺结核的免疫学抗原。既往小样本资料免疫印迹结果显示 40% (6/15) 结核病人血清中存在针对 EIS 的抗体,而 5 例健康对照中无 1 例阳性,结果支持上述观点^[5]。本文在已有实验基础上,采用简便易行的 ELISA 方法对 EIS 的免疫学特性进行较大样本资料的系统分析,发现肺结核病人抗 EIS 抗体的滴度显著高于健康对照以及非肺结核的肺部疾病对照 ($P < 0.0001$)。此外,通过对 80 例涂阳初治患者的随访,发现在抗结核化疗的 6 个月疗程中,抗 EIS 抗体的滴度无明显变化,说明抗 EIS 抗体检测是一相对稳定可靠的肺结核免疫学诊断方法。为何抗体水平在 6 个月化疗过程相对稳定,我们尚不确定,

可能是抗 EIS 的代谢时间较长的原因或机体彻底清除结核分枝杆菌的时间相对漫长所致。进一步延长对病人的随访及观察年限较长的康复者,可能对此有深入的认识。

PPD 是一用于诊断结核分枝杆菌感染的常用抗原,但我们发现肺结核病人和健康对照者的 PPD 试验结果没有显著性差别,其中一个可能的原因是卡介苗接种的影响;也可能是健康对照组中存在结核分枝杆菌的潜伏感染或环境分枝杆菌感染。进一步的随访和采用全血干扰素测定受试者针对结核分枝杆菌特异性抗原 ESAT-6 的应答,可能有助于对这一问题的解答。但无论结论如何,均提示 PPD 皮试在肺结核诊断方面的应用价值有限。而肺结核病人和健康对照者之间抗 EIS 抗体存在显著性差别,提示 EIS 抗原的免疫学诊断价值。本文的主要目的是探讨 EIS 的免疫原性及其在筛选活动性肺结核中的应用可能性,我们所建立的酶免疫诊断方法是围绕这一目的进行的初步实验,未能涉及区别结核感染与临床活动性和非活动性有关问题。我们也没有计算确切的切点以及检测抗 EIS 用于诊断肺结核敏感性和特异性。进一步优化检测抗 EIS 抗体的 ELISA 方法和试剂,或者将 EIS 抗原联合其他结核菌抗原^[6],可望进一步提高 EIS 抗原在筛选活动性肺结核方面的应用前景。

参考文献:

- 1 Dye C, Espinal MA, Watt CJ, et al. Worldwide incidence of multidrug-resistant tuberculosis [J]. J Infect Dis. 2002, 185(8): 1197-202
- 2 Banerjee S, Nandyal A, Podili R, et al. Mycobacterium tuberculosis (Mtb) isocitrate dehydrogenases show strong B cell response and distinguish vaccinated controls from TB patients [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(34): 12652-12657
- 3 Roche PW, Triccas JA, Avery DT, et al. Differential T cell responses to mycobacteria-secreted proteins distinguish vaccination with bacille Calmette-Guerin from infection with Mycobacterium tuberculosis [J]. J Infect Dis, 1994, 170(5): 1326-30
- 4 Wei J, Dahl JL, Moulder JW, et al. Identification of a Mycobacterium tuberculosis gene that enhances mycobacterial survival in macrophages [J]. J Bacteriol, 2000, 182(2): 377-84
- 5 Dahl JL, Wei J, Moulder JW, et al. Subcellular localization of the intracellular survival-enhancing Eis protein of Mycobacterium tuberculosis [J]. Infect Immun, 2001, 69(7): 4295-302
- 6 Ben Amor Y, Shashkina E, Johnson S. Immunological characterization of novel secreted antigens of Mycobacterium tuberculosis [J]. Scand J Immunol, 2005, 61(2): 139-46