



结核疫苗研究进展

袁伟秦川

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京 100021)

【摘要】 结核病是由结核分枝杆菌感染引起的传染病,是危害人类健康的主要传染病之一。目前被广泛应用的卡介苗对于新生儿和儿童的严重播散性疾病有很好的保护效果,但对于成人活动性结核病的有效性,却存在很大的争议。近年来,人们一直努力研发新疫苗并且已经取得了一些成果。这些新型结核疫苗在临床测试中的结果是非常令人兴奋和鼓舞人心的。但是,我们仍需继续探索新型结核疫苗。

【关键词】 结核病;疫苗

【中图分类号】 R521;R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)02-0060-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.02.14

Advances in Research on Tuberculosis Vaccine

YUAN Wei, QIN Chuan

(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Tuberculosis is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is one of the major infectious diseases that are harmful to human health. The vaccine currently used, Bacille Calmette and Guerin (BCG), is effective in preventing the most severe disseminated forms of disease in children and newborns, but its efficacy against active TB in adults has been challenged by several clinical studies. In the last few years, the search for a new vaccine has obtained a new momentum. These recent advances in the clinical testing of new TB vaccines are very exciting and promising. However, there is a need to continue the search for additional vaccine candidates.

【Key words】 Tuberculosis; Vaccine

1 前言

结核病是一种可以通过空气传播的传染性疾病,仅肺结核患者才具有传染性。每个患者平均每年可以传染10~15人,每秒钟都会有人感染结核菌。据世界卫生组织报道,目前全球有近1/3的人已感染结核杆菌,也就是20亿人口感染了结核菌。全球有活动性肺结核病人约2000万,每年新发结核病人约800~1000万,每年约有300万人死于结

核病^[1]。卫生服务体系的不力,艾滋病和耐药结核的传播加剧了结核病对人类的威胁。据估计^[2],如果不能有效控制结核病:2000年~2020年间,将有10亿人感染结核菌,2亿人将发展为结核病,3500万人将死于结核病。结核病已成为全世界成人因传染病而死亡的主要疾病之一。我国是全球22个结核病高负担国家之一,活动性肺结核病人人数居世界第二位。

卡介苗(BCG)是法国科学家Camille Guerin和

[基金项目] 十一五重大专项支持(2009ZX1004-402)。

[作者简介] 袁伟(1977-),博士研究生。E-mail: docyw@sohu.com。

[通讯作者] 秦川,教授,博士生导师。E-mail: chuanqin@vip.sina.com。

Albert Calmette 在上世纪第一个 10 年中开发出来的,1921 年开始应用于人类,迄今已使用了 80 多年。在世界卫生组织免疫接种扩大方案中,卡介苗作为目前唯一的结核病疫苗广泛使用。接种后可预防儿童发生结核病,特别是能防止那些严重类型的结核病,如结核性脑膜炎。然而在不同地区进行的临床调查中,卡介苗对成人肺结核的保护效率差别很大(0% ~ 80%),此外,卡介苗只对预防原发性结核病有效,对已感染结核分枝杆菌的患者没有保护作用。因此,新型疫苗的研发迫在眉睫。

2 结核分枝杆菌新型疫苗类型

从疫苗结构完整性来看一般可分为:重组 BCG、亚单位疫苗、DNA 疫苗和活载体疫苗等。根据其应用方式,又可以分为预防性疫苗和治疗性疫苗。我们习惯所说的疫苗就是指预防性疫苗,主要起到疾病的预防作用。治疗性疫苗具有疾病的治疗作用,概括讲是指在已感染结核分枝杆菌的机体内,通过疫苗免疫调动宿主的免疫能力,杀伤入侵的结核分枝杆菌(尤其是潜伏感染的细菌),从而起到治疗或辅助化学药物治疗的作用。结核疫苗在最近几十年里,有了长足的进展,一部分已经进入了临床第一期实验,还有一部分进入了第二期、三期临床实验(见表 1)。

2.1 重组卡介苗

卡介苗 (BCG) 是 Albert Calmette 和 Camille Guérin 在 1908 年将 1 个牛型结核分枝杆菌强毒株在含甘油、胆汁和马铃薯的培养基中历经 13 年共 230 次传代培养,于 1920 年获得的 1 个减毒株,命名为卡介苗。目前卡介苗仍在继续使用,其免疫效

果在 10 ~ 15 年之后开始减退,使得其对儿童的保护作用以及对预防青少年和成年人患肺结核的有效性受到限制。

在过去的几十年里,人们在遗传学方面操控卡介苗的能力使得新开发的重组卡介苗比亲代卡介苗 (BCG) 更为有效。Horwitz 研究小组构建的过表达 Ag85B 蛋白的重组卡介苗 (rBCG30) 在小鼠和豚鼠模型中表现出比亲代卡介苗更为有效的保护作用^[3]。rBCG30 已经通过临床 1 期试验,人体对其显示了良好的耐受性^[4]。卡介苗的主要局限性在于不能诱导 CD8⁺T 细胞免疫反应,而其却在机体抵制结核入侵的防御反应中起着重要作用。为增强 BCG 的 CD8⁺T 细胞免疫反应,Kaufmann 研究小组利用 rBCG 表达 Hly (李斯特菌溶解素),从而构建了一种可以穿过吞噬小体膜、改变其通透性、因而使 BCG 及其抗原在吞噬体中释放,经由 MHC-I 分子递呈抗原,激发 CD8⁺T 细胞活化^[5],感染结核分枝杆菌的巨噬细胞凋亡和树突状细胞的激活是提高疫苗效力的主要机制^[6]。

卡介苗是牛型结核分枝杆菌的减毒株,和致病的人型结核分枝杆菌基因组比较,缺失 129 个编码基因,并且卡介苗基因在传代培养过程中仍然会继续发生丢失。因此,在卡介苗中重组入人型结核杆菌的重要保护性抗原将是增强卡介苗免疫力的有效方法。Sugawara 等^[7]将 H37Rv 株的 Ag85A 基因重组入卡介苗,构建的重组卡介苗 (rBCG-Ag85A) 对恒河猴有很好的保护作用。此外,在卡介苗中重组表达 γ 干扰素和 IL-12 等细胞因子,可以增强卡介苗诱导细胞免疫反应的能力,有助于促进脾细胞增殖,促进免疫反应向 Th1 型转化,具有重要的免疫调

表 1 结核病临床候选疫苗
Tab. 1 TB vaccine candidate in/entering clinical trials

疫苗名称	开发阶段	开发公司
MVA 85A	1 期临床完成 2 期 b 婴儿测试中	Aeras 全球结核病疫苗基金会 Emergent BioSolutions 公司
rBCG30	1 期临床完成	美国加利福尼亚大学洛杉矶分校 Aeras 全球结核病疫苗基金会
rBCG Δ UreC:Hly (VPM1002)	1 期临床完成	德国柏林 Max-Planck 研究所 德国疫苗计划管理处
AERAS-402	1 期 2 期临床进行中	Aeras 全球结核病疫苗基金会
M72	1 期 2 期临床完成 附加测试进行中	葛兰素史克生物制品公司
H1-4C31	1 期临床完成	丹麦国立血清研究所
Ag85B、ESAT-6、MPT-63 和 MPT-64 基因组合的 DNA 四联疫苗	研究中,未进入临床	中国
<i>M vaccae</i>	3 期临床完成	美国国立卫生研究院

节作用。

2.2 亚单位(蛋白质和多肽)疫苗

蛋白质疫苗能特异性地诱导 CD4⁺ Th1 细胞和 CD8⁺ 细胞毒性 T 淋巴细胞活化,并且使用安全,是理想的疫苗形式之一。使用蛋白质多肽疫苗主要考虑抗原的选择和佐剂的应用,人群呈现遗传多态性,单个抗原虽然具有一定的免疫保护性,但是由于抗原谱窄,不足以引起有效的免疫保护,将多个抗原或多肽融合表达,有助于提高疫苗的免疫保护效率。将结核分枝杆菌最重要的抗原 Ag85B 和 ESAT-6 融合表达可以引发强烈的细胞介导的免疫反应,并且该反应并不会因为以前接触过环境分枝杆菌而受到影响。同时,该融合蛋白也可以使卡介苗诱导的初始抗结核免疫反应更为加强。

Mtb72f 是两种结核抗原 Rv0125 (MTB39) 和 Rv1196 (MTB32) 的融合蛋白。此融合蛋白配合免疫佐剂 AS02A 已经在多种动物模型上表现出强烈的 Th1 细胞应答^[8,9]。美国和比利时已在 PPD 阴性的健康者上完成了 MTB72f/AS02A 的第一期临床试验,证明了 MTB72f 疫苗可引起抗原特异性的体液免疫和细胞介导的免疫应答,并且表现出强大、持久的细胞免疫反应。

蛋白质、多肽需要有效的佐剂辅助才能引起理想的免疫应答。不同的免疫佐剂可以引起 Th1 或 Th2 不同方向的免疫反应。AS 佐剂是由葛兰素史克生物制品公司研制开发的。AS02A 由单磷酸类脂 A 和皂角苷 QS-21 构成的水-油乳浊液。作为佐剂,它已成功应用于人类的 Mtb72f 疫苗;应用于豚鼠攻毒研究的 Mtb41 疫苗,以及应用于人类和非人灵长类的 Hyvac1 融合蛋白疫苗^[10,11]。

佐剂 IC31 由 Intercell 公司研发,它是一种由多阳离子氨基酸和寡脱氧核苷酸构成的佐剂。将以 IC31 为佐剂的 Ag85B-ESAT-6 亚单位疫苗免疫新生儿,可引发像成人一样的抗结核反应,即激活了体内树突状细胞,进而引起一系列的 T 细胞免疫反应^[12]。与未免疫或仅用卡介苗免疫的豚鼠相比,用卡介苗初始-HyVac4 (IC31 为佐剂的 Ag85B-TB10.4 亚单位疫苗)加强免疫对强毒结核分枝杆菌引起的死亡有明显的保护作用^[13]。

2.3 DNA 疫苗

DNA 疫苗是指将含有编码某种抗原蛋白的外源序列质粒载体作为疫苗,直接导入到动物细胞内,通过宿主细胞的表达系统合成抗原蛋白,诱导

宿主产生对该抗原蛋白的免疫应答,以达到预防和治疗疾病的目的。该疫苗有如下特点:①细胞内生成的抗原易于被 MHC I 类和 II 类分子呈递,可激活细胞毒性 T 淋巴细胞和辅助 T 淋巴细胞;②在一段时间里持续表达抗原,具有较强的免疫刺激作用;③操作技术简单。

DNA 疫苗常被用来结核抗原免疫原性及保护力的评价。一些结核保护性抗原的 DNA 疫苗如 Mtb8.4、Ag85、ESAT6、hsp65 和 MPT83 等都能诱导小鼠细胞介导的免疫反应。许多研究对 DNA 疫苗抗结核感染时所诱导的免疫反应进行了剖析,但迄今为止并未在免疫机制和保护作用上建立起很好的联系。因为 DNA 疫苗所提供的保护效力经常变化,而且其保护效力只有同样实验条件下卡介苗的 50%~80%。使人们感兴趣的是,DNA 疫苗可以对 CD4⁺ T 细胞缺乏的小鼠提供很好的保护^[14],这也为 HIV 阳性易感结核的高危人群的免疫策略提供了很好的思路。

DNA 疫苗可以不使用佐剂,但是佐剂的应用可以明显提高 DNA 疫苗的免疫效果,减少 DNA 疫苗的用量和免疫次数。细胞因子 IL-2、 γ 干扰素、IL-18、IL-15 和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子等具有免疫调理作用,可以增强 DNA 疫苗免疫反应。将细胞因子和抗原嵌合表达或共同导入体内表达被证实有增强结核疫苗保护力的作用。师长宏等^[15]构建的人 IL-2 与 Hsp65 融合基因的 DNA 疫苗,对结核感染的小鼠有很好的预防保护效果。

目前 DNA 疫苗主要有如下几种常用的接种方式:①非肠道直接注射法:即将重组质粒 DNA 直接注射到动物或人体的不同部位,如肌肉、静脉、腹腔、皮内和皮下等。该法需要大量重组质粒 DNA,但操作简单,无需复杂设备,是一种常用的方法;②基因枪法:基因枪法是一种全新的基因导入技术,它采用金或钨微粒为载体,以压缩气体(氩或氮)冲击波为动力,把重组质粒 DNA 附着于高速金颗粒上,直接射入需要改造的动植物细胞、组织或细胞器内,实现基因转移,具有一枪发射、多处击中、没有污染且细胞几乎无损伤的特点;③粘膜免疫法:由于粘膜免疫具有效率高、维持时间长、使用方便、用药量小等特点,为核酸疫苗的优化提供了一个很好的思路。裸露 DNA 是带负电的生物大分子,几乎不能穿越粘膜屏障,因此常借助以纳米或微米颗粒的形式进入粘膜免疫系统。这种新型给药系统常

以脂质体、阳离子脂类和乳剂、天然生物阳离子多聚物(如明胶和壳聚糖)为载体。

DNA 疫苗面临的一大障碍就是较大哺乳动物缺乏免疫原性,其原因可能是质粒在体内转染效率低。为了解决这一问题,应用体内电击法或者能表达结核保护性抗原的活病毒为载体来增强 DNA 疫苗的免疫原性。Okada 等^[16]发现,使用脂质体-仙台病毒包裹的 Hsp65 + IL-12DNA 疫苗对感染结核的食蟹猴提供了良好的保护作用。

2.4 活载体疫苗

活载体疫苗利用对机体安全的微生物作为载体,在体内持续表达结核特异性抗原,具有高效和经济的优点。该类疫苗通常应用于加强免疫中,这就会使初始免疫中产生的 T 细胞免疫反应更加强烈。常用的活载体有:痘病毒载体、腺病毒载体和沙门氏菌等。

重组 Ag85A 的痘苗病毒(MVA85A)在人体一期临床试验中取得了良好的安全性和耐受性。它的特点主要是可以在已接种卡介苗的个体上能诱导出更强的免疫应答。目前二期临床试验正在进行中,但已有该疫苗能诱导多功能 T 细胞的报道^[17]。此外,英国和南非正在利用该疫苗对 HIV 阳性的成人和 HIV、结核双重感染的症状不典型成人进行临床试验。

腺病毒家族是双链 DNA 病毒,其应用于人类的安全性是不言而喻的。它有强烈的免疫原性及佐剂特性,可增强对外来微生物抗原的免疫反应并引发强烈的抗原特异的记忆性免疫反应。其血清型有大约 50 种,其中第 5 型被普遍用于结核疫苗的研究^[18]。在感染结核小鼠的免疫治疗实验中发现,表达 ESAT6 的重组腺病毒疫苗,增加了肺部结核杆菌的清除率,减少了特异炎症反应病灶的程度并改变了肉芽肿的细胞组成^[19](从类上皮细胞转变为淋巴细胞)。在美国,腺病毒疫苗临床一期的安全性已经在未接种过卡介苗的健康成人和接受过卡介苗初始-加强免疫方案的成人中获得成功评价。南非结核疫苗倡议协会(South African Tuberculosis Vaccine Initiative)将与 Aeras 全球结核疫苗基金会合作,在南非好望角发起腺病毒疫苗的二期临床研究。

2.5 其他疫苗

热灭活的 *M. vaccae* 是一种来源于环境分枝杆菌的疫苗。它既有结核分枝杆菌的许多抗原又有

非结核杆菌的许多抗原,故被称为交叉反应分枝杆菌。许多研究表明,该疫苗在动物体内可诱导保护性的免疫反应。Hernandez-Pando 发现用热灭活的 *M. vaccae* 免疫小鼠,低剂量(10^7)可诱导 Th1 反应,而高剂量(10^9)可诱导 Th1 和 Th2 反应。在坦桑尼亚,一项随机双盲试验中,给予儿时曾接种过卡介苗的 HIV 阳性成人较高剂量的 *M. vaccae* 可以对结核感染产生保护并且是安全的^[20]。

3 结语

近几年来随着结核分枝杆菌多耐药性菌株(MDR)的增多和艾滋病的不断流行,使结核病死灰复燃,因此如何能够有效地控制和预防结核病的发生就显得极其重要。在过去的几年里,已有 5 个新型结核疫苗进入了临床试验,其他疫苗的研发也在进行中。预计在未来的 2~3 年里将会有 1~2 种候选疫苗进入三期临床,到 2015 年时将会有 1 种疫苗或疫苗组合被批准上市使用。

理想的预防结核的疫苗应该具有安全、经济、能预防结核的发生、免疫效应持续时间长、并能引起免疫记忆等特点。但目前尚无一种候选疫苗的保护性和持续性优于卡介苗。重组卡介苗价格低廉且适合大量生产,不过其生物安全性仍需进一步的观察研究;蛋白质疫苗易于被人们接受,不过需要对免疫佐剂做更深入的探索研究;重组活疫苗利用安全的生物体将抗原带入体内,生物体本身也具有类似免疫佐剂的作用,不失为一种有益的探索。

DNA 疫苗是 20 世纪 90 年代发展起来的一种新型疫苗。DNA 疫苗不仅可引起体液免疫反应,而且能诱导高水平的细胞免疫应答,尤其是细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)反应,被认为在病毒、细菌、寄生虫等病原体感染的防治中具有更大的优势。尽管其也存在抗原基因的选择、免疫途径和免疫程序的选择、免疫佐剂的使用、安全性和免疫耐受性等问题,但是在不久的将来,随着基础理论研究以及 DNA 疫苗优化方案研究的深入,这些问题都将逐步得到解决,DNA 疫苗会以其他疫苗无可比拟的优点而获得广泛应用。

参考文献:

- [1] Cegielski J, Chin DP, Espinal MA, et al. The global tuberculosis situation. Progress and problems in the 20th century, prospects for the 21st century [J]. Infect Dis Clin North Am, 2002, 16:1 - 158.
- [2] WHO Report. Global Tuberculosis Control: Epidemiology,

- Strategy ,Financing [N]. WHO 2009.
- [3] Horwitz ,MA. and Harth ,G. A new vaccine against tuberculosis affords greater survival after challenge than the current vaccine in the guinea pig model of pulmonary tuberculosis [J]. *Infect Immun* 2003 ,71:1672 - 1679.
- [4] Hoft DF ,Blazevic A ,Abate G ,et al. A new recombinant bacille Calmette-Guerin vaccine safely induces significantly enhanced tuberculosis-specific immunity in human volunteers [J]. *J Infect Dis* 2008 ,198:1491 - 1501.
- [5] Grode L ,Kursar M ,Fensterle J ,et al. Cell-mediated immunity induced by recombinant *M. bovis* Bacille Calmette-Guerin strains against an intracellular bacterial pathogen: importance of antigen secretion or membrane-targeted antigen display as lipoprotein for vaccine efficacy [J]. *J Immunol* 2002 ,168:1869 - 1876.
- [6] Winau F ,Weber S ,Sad S ,et al. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis [J]. *Immunity* 2006 , 24:105 - 117.
- [7] Sugawara I ,Sun L , Mizuno S ,et al. Protective efficacy of recombinant BCG Tokyo (Ag85A) in rhesus monkeys infected intratracheally with H37Rv *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Tuberculosis* 2009 ,89:62 - 67.
- [8] Brandt L ,Skeiky YAW ,Alderson MR ,et al. The protective effect of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine is increased by co-administration with the *Mycobacterium tuberculosis* 72-kilodalton fusion polyprotein Mtb72F in *M. tuberculosis*-infected guinea pigs [J]. *Infect Immun* 2004 ,72:6622 - 6632.
- [9] Reed SG ,Coler RN ,Daleman W ,et al. Defined tuberculosis vaccine ,Mtb72F/AS02A ,evidence of protection in cynomolgus monkeys [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* ,2009 ,106: 2301 - 2306.
- [10] Reed SG ,Bertholet S ,Coler RN ,et al. New horizons in adjuvants for vaccine development [J]. *Trends Immunol* ,2009 ,30: 23 - 32.
- [11] Moreno-Mendieta SA , Rocha-Zavaleta L , Rodriguez-Sanoja R. Adjuvants in tuberculosis vaccine development [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010 ,58:75 - 84.
- [12] Kamath AT ,Rochat AF ,Valenti MP ,et al. Adult-like anti-mycobacterial T cell and in vivo dendritic cell responses following neonatal immunization with Ag85B-ESAT-6 in the IC31 adjuvant [J]. *PLoS One* 2008 ,3:e3683.
- [13] Skeiky YA ,Dietrich J ,Lasco TM ,et al. Non-clinical efficacy and safety of HyVac4:IC31 vaccine administered in a BCG prime-boost regimen [J]. *Vaccine* 2009 ,28:1084 - 1093.
- [14] Derrick SC ,Repique C ,Snoy P. et al. Immunization with a DNA vaccine cocktail protects mice lacking CD4 cells against an aerogenic infection with *M. tuberculosis* [J]. *Infect Immun* , 2004 ,72:1685 - 1692.
- [15] Shi CH ,Zhang H ,Wang LM ,et al. Therapeutic efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding heat shock protein 65 of *Mycobacterium tuberculosis* and the human interleukin2 fusion gene [J]. *Tuberculosis* 2009 ,89:54 - 61.
- [16] Okada M ,Kita Y ,Nakajima T ,et al. Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB [J]. *Vaccine* 2007 ,25:2990 - 2993.
- [17] Scriba TJ ,Tameris M ,Mansoor N ,et al. Modified vaccinia Ankara-expressing Ag85A ,a novel tuberculosis vaccine ,is safe in adolescents and children ,and induces polyfunctional CD4⁺ T cells [J]. *Eur J Immunol* 2010 ,40:279 - 290.
- [18] Mu J ,Jeyanathan M ,Small CL ,et al. Immunization with a bivalent adenovirus-vectored tuberculosis vaccine provides markedly improved protection over its monovalent counterpart against pulmonary tuberculosis [J]. *Mol Ther* ,2009 ,17: 1093 - 1100.
- [19] Zabolotnykh NV , Vinogradova TI , Stukova MA , et al. The effectiveness of influenza vectors expressing the protective mycobacterial antigen ESAT-6 in the complex therapy of generalized tuberculosis in mice [J]. *Probl Tuberk Bolezn Legk* , 2008:30 - 34.
- [20] von Reyn CF ,Mtei L ,Arbeit RD ,et al. Prevention of tuberculosis in Bacille Calmette-Guerin-primed ,HIV-infected adults boosted with an inactivated whole-cell mycobacterium vaccine [J]. *AIDS* 2010 ,24:675 - 685.

修回日期)2010-09-26