

# 小鼠对结核分枝杆菌 Ag85B-Esat6-HspX 融合基因的免疫反应

袁伟,董娜,张丽芳,林树柱,向志光,乔红伟,秦川

(中国医学科学院,北京协和医学院,医学实验动物研究所,卫生部人类疾病比较医学重点实验室,  
国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室,北京 100021)

**【摘要】** 目的 研究结核分枝杆菌 Ag85B-Esat6-HspX 融合基因的免疫原性。方法 将 40 只 BALB/c 小鼠随机分成 4 组,NS 组、BCG 组、pcDNA-HspX 组和 pcDNA-Ag85B-Esat6-HspX 组,每组 10 只。BCG 组只在 0 周时皮内注射卡介苗 1 次。NS 组、pcDNA-HspX 组及融合基因组分别于 0、2、4 周肌肉注射生理盐水和重组质粒 DNA,共免疫 3 次。在免疫的第 2 周、4 周及最后一次免疫后 2 周检测血清中的总 IgG 水平。同时,最后一次免疫后 2 周,取脾细胞检测细胞免疫反应。结果 构建的融合基因重组质粒 DNA 免疫动物后能产生针对结核杆菌特定抗原的特异性细胞免疫和体液免疫应答,具有较强的免疫原性。结论 结核分枝杆菌 Ag85B-Esat6-HspX 融合基因可作为 DNA 疫苗进行保护作用的研究。

**【关键词】** 结核分枝杆菌; Ag85B; Esat6; HspX; DNA 疫苗

**【中图分类号】** R521; R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)06-0047-05

doi:10.3969/j.issn.1671.7856.2011.06.011

## Immune Response to Recombinant Plasmid Expressing the Ag85B-Esat6-HspX Fusion Protein in Mice

YUAN Wei, DONG Na, ZHANG Li-fang, LIN Shu-zhu, XIANG Zhi-guang, QIN Chuan

(Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health, Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Human Disease Animal Models Level-3 Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

**【Abstract】 Objective** To study immunogenicity of fusion gene Ag85B-Esat6-HspX of Mycobacterium tuberculosis. **Methods** Forty BALB/c mice were randomly divided into four groups (10 per group): the plasmid pcDNA-HspX group, the pcDNA-Ag85B-Esat6-HspX plasmid group, the BCG group and the saline group. The immunization was repeated three times two weeks apart. A single dose of BCG ( $1 \times 10^6$  CFU/mouse) was injected subcutaneously. Mice in other three groups were administered intramuscularly in the hind limb. Total IgG levels were detected at 2, 4 and 6 weeks after immunization. Meanwhile, cell-mediated immunity responses were examined two weeks after the final immunization as well. **Result** Mice immunized with recombinant plasmid expressing the Ag85B-Esat6-HspX fusion protein generated specific cellular and humoral immunologic response to the stimulation of Ag85B, Esat6 and HspX. **Conclusion** The fusion gene Ag85B-Esat6-HspX of Mycobacterium tuberculosis could be DNA vaccine to carry out the further research of protective efficacy.

[基金项目]十一五重大专项支持(2009ZX1004-402)。

[作者简介]袁伟(1977-),博士生。Email: docyw@sohu.com。

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

【Key words】 Mycobacterium tuberculosis; Ag85B; Esat6; HspX; DNA vaccine

结核病是由结核分枝杆菌引起的一种传染性疾病。据世界卫生组织报道,目前全球有近 1/3 的人感染了结核杆菌。随着多重耐药菌、极度耐药株的出现,艾滋病与结核共感染人群的增加使得活动性结核病人日益增多<sup>[1]</sup>。卡介苗(BCG)用于预防结核病已有 80 多年的历史,在世届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正在广泛使用。它虽然可以极好地预防幼儿粟粒性结核和结核脑膜炎,但不能预防结核病的最流行形式——成人肺结核,因此研究更为有效的 TB 新型疫苗对 TB 的防治有着重要的意义。随着 MTB 基因组测序的完成和比较基因组学的研究进展,人们通过基因工程技术改造 BCG,或研究亚单位疫苗、基因疫苗、载体活疫苗等新型疫苗,或与 BCG 联合建立组合型疫苗,采用基础-加强型免疫策略等,以解决 BCG 的免疫力不足,以及其对成人保护性差和缺乏清除潜伏菌等问题。

有效、特异的保护性抗原是疫苗成功的一个重要因素,近年来,随着基因组学研究的进展,不断有新抗原被发现和鉴定,目前,研究较多的结核杆菌保护性抗原有 Mtb8.4、Mtb32、TB10.4、MPT64 和 38kD 蛋白(PstS-1)等,国际上正在进行临床研究的结核病疫苗采用的抗原主要是 Ag85、ESAT-6 和 Mtb72F 等。HspX 是一种相对分子质量为 16000 的小分子热休克蛋白家族,由基因 *hspX* (*rv2031c*) 表达,属于结核菌休眠期调控子(DosR regulon)。HspX 是结核分枝杆菌在静止生长期或低氧状态下产生的主要蛋白,有研究表明 HspX 在结核分枝杆菌感染后短时间内减缓其在体内生长速度方面可能起到某种关键作用<sup>[2]</sup>。本研究选择了结核重要的保护性抗原 Ag85B 和 ESAT-6,以及休眠期细菌特有的抗原 HspX,构建了 Ag85B-Esat6-HspX 重组质粒,并将其免疫 BALB/c 小鼠,对其免疫原性进行了评价,进而为此疫苗的效力学评价奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株、质粒及蛋白

冻干皮内注射用卡介苗(BCG)购于成都生物制品研究所。pcDNA-Ag85B-Esat6-HspX 和 pcDNA-HspX 质粒由本室构建并保存。HspX 蛋白由本室纯化、保存。

### 1.2 主要试剂

去除内毒素(endo free)的质粒抽提试剂盒为 Qiagen 公司产品(德国)。小鼠干扰素  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 和白细胞介素 2 (IL-2) 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒为美国 Biologend 公司产品。小鼠预包被 ELISPOT 试剂盒为深圳达科为生物技术有限公司产品。

### 1.3 实验动物

BALB/c 小鼠(SPF 级)购于北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2006-0009]。鼠龄 6~8 周,体重 18~22 g,自由饮食进食,昼夜节律 12 h。

### 1.4 动物分组及免疫

采用随机数字表法将 40 只小鼠分为 4 组,每组 10 只:生理盐水组(NS,100  $\mu$ L);BCG 组( $1 \times 10^6$  CFU/只);pcDNA-HspX 组(pcDNA-HspX,100  $\mu$ g)、pcDNA-Ag85B-Esat6-HspX 组(pcDNA-Ag85B-Esat6-HspX,100  $\mu$ g)。

分别在第 0、2、4 周用质粒 DNA 一侧股四头肌肌肉注射免疫动物(100  $\mu$ g/只), $1 \times 10^6$  CFU BCG 第 0 周时在颈部皮内免疫动物 1 次。在免疫的第 2、4 周和最后一次免疫后 2 周,各组小鼠剪取鼠尾取血,分离血清,检测体液免疫指标。动物在最后一次免疫后 2 周处死,无菌分离脾脏淋巴细胞检测细胞免疫指标。

### 1.5 ELISA 法检测血清特异性抗体

HspX 蛋白 100  $\mu$ L/孔(5  $\mu$ g/mL)包被酶标板 4 $^{\circ}$ C 过夜。1% 牛血清白蛋白封闭 30 min,PBST 溶液 300  $\mu$ L/well 洗板 5 次  $\times$  3 min/次。用 PBST 溶液 1:500 稀释血清样品后,100  $\mu$ L/well 加入酶标板 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。再次洗板后,加入 100  $\mu$ L/well 的 1:1000 稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗鼠 IgG,然后加入 100  $\mu$ L/well TMB 显色液,室温避光反应 15 min 显色后,加入 50  $\mu$ L/well 终止液(2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 终止反应,450 nm 处检测吸光度(A)值。

### 1.6 特异性 IFN- $\gamma$ 和 IL-2 的诱导和测定

用含 10% FCS 的 RPMI 1640 培养基调整细胞浓度为  $5 \times 10^6$  /mL,800  $\mu$ L/well 加入 24 孔细胞培养板中,同时每孔加入 80  $\mu$ L HspX 蛋白,置 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中 37 $^{\circ}$ C 培养 72 h 后,收集培养液,5000 rpm 离心 5 min,取上清液,-20 $^{\circ}$ C 冻存备检。IFN- $\gamma$  和 IL-

2 含量的检测用 ELISA 方法,以 IFN- $\gamma$  和 IL-2 的标准品作标准曲线计算二者的含量。

### 1.7 ELISPOT 法检测免疫小鼠脾细胞分泌 IFN- $\gamma$ 细胞数

IFN- $\gamma$  的水平与结核病的保护性免疫反应相关,应用 ELISPOT 方法检测免疫小鼠脾脏淋巴细胞针对特异性抗原分泌 IFN- $\gamma$  的能力。小鼠最后一次免疫 2 周后无菌分离脾脏,应用 ELISPOT 技术检测脾细胞受到 HspX 蛋白刺激后 IFN- $\gamma$  的表达。ELISPOT 板预先用 IFN- $\gamma$  抗体包被过夜,无菌摘除脾脏,研磨后经 200 目尼龙网过滤,经淋巴细胞分离液分离淋巴细胞。将终浓度为  $5 \times 10^6$  /mL 的淋巴细胞  $100 \mu\text{L}/\text{well}$  加入 96 孔 ELISPOT 板中,并分别给予 HspX 蛋白 ( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 刺激,并设阴性对照,加培养基、不加刺激物;阳性对照,用 PMA ( $1 \text{ ng}/\text{mL}$ ) 刺激,共同孵育 24 h 后,按 ELISPOT 操作说明依次加入检测抗体等试剂,洗板、显色,计数斑点数。

### 1.8 统计学处理

采用 SPSS 13.0 进行方差分析,将疫苗免疫组结果与生理盐水组进行比较。 $P < 0.05$  表示差异具有显著性。

## 2 结果

### 2.1 质粒纯度和含量的测定

抽提的质粒 DNA 在 260 nm 处与 280 nm 处的 A 值比值均在 1.80 以上,且经过 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳分析,并没有发现 RNA 的污染。

### 2.2 免疫小鼠血清抗 HspX-IgG 的测定

用 HspX 抗原刺激后,ELISA 法检测总 IgG 抗体结果显示(见图 1),随着免疫时间的增加,免疫小鼠的抗体水平持续增加,DNA 免疫小鼠在最后一次免

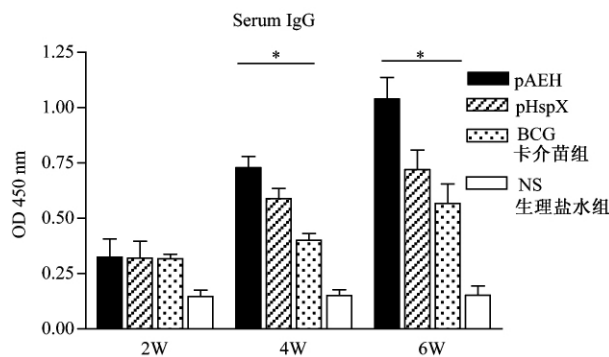


图 1 免疫小鼠体内诱导的特性性抗体水平 (\*  $P < 0.05$ )  
Fig. 1 Serological responses against special antigen in immunized mice (\* indicates  $P < 0.05$ )

疫后 2 周的抗体水平最高,融合基因组(即 pAEH 组)免疫小鼠血清总 IgG OD 值均高于其他三组 ( $P < 0.05$ )。同时,单纯 HspX 质粒 DNA 免疫组(即 pHspX 组)与 BCG 组或生理盐水组相比,也产生了较高水平的 IgG ( $P < 0.05$ ),表明潜伏期抗原能诱导较强的体液免疫反应。

### 2.3 免疫小鼠脾淋巴细胞特异性 IFN- $\gamma$ 的分泌水平

BCG 及各 DNA 疫苗免疫组小鼠脾淋巴细胞在体外经过 HspX 抗原刺激后,可以引起特异性 IFN- $\gamma$  的分泌,但 NS 组小鼠 IFN- $\gamma$  分泌不明显(图 2)。融合基因组与 BCG 组、pHspX 免疫组比较,差异有显著性 ( $P < 0.05$ ),表明 pcDNA-Ag85B-Esat6-HspX 免疫小鼠后产生特异性的 IFN- $\gamma$  水平最高。

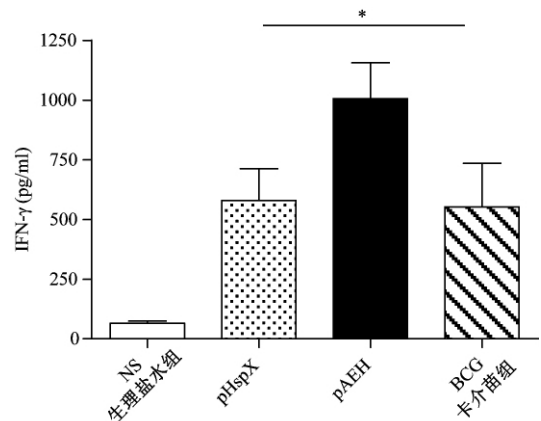


图 2 免疫小鼠脾淋巴细胞诱生的 IFN- $\gamma$  水平 (\*  $P < 0.05$ )

Fig. 2 The level of IFN- $\gamma$  induced in splenolymphocytes of the immunized mice. (\* indicates  $P < 0.05$ )

### 2.4 免疫小鼠脾淋巴细胞特异性 IL-2 的分泌水平

融合基因免疫小鼠后脾淋巴细胞所诱生的 IL-2 含量也最高,为  $84.63 \pm 8.76 \text{ pg}/\text{mL}$ ,高于 BCG 组的  $37.65 \pm 2.72 \text{ pg}/\text{mL}$  ( $P < 0.05$ ) 和 pHspX 免疫组的  $42.42 \pm 3.61 \text{ pg}/\text{mL}$  ( $P < 0.05$ ) (图 3)。

### 2.5 ELISPOT 检测结果

融合基因组经 HspX 抗原 ( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 体外刺激后分泌 IFN- $\gamma$  显著升高,与 pHspX 组或 BCG 组比较,差异有显著性 ( $P < 0.05$ );同时,pHspX 组经 HspX 抗原 ( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 体外刺激后分泌 IFN- $\gamma$  也明显升高,与 NS 组比较差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。阳性对照组(PMA 刺激)分泌 IFN- $\gamma$  的细胞数目和水平均较高且一致,阴性对照组(不刺激)仅见极少

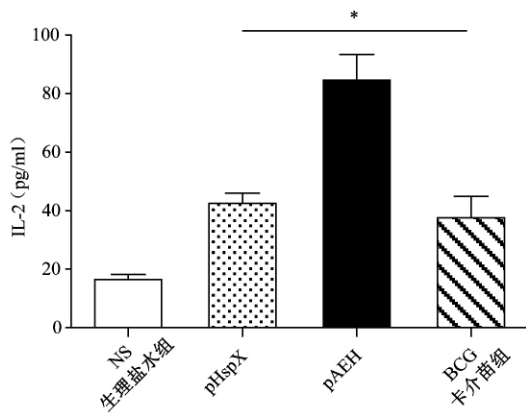
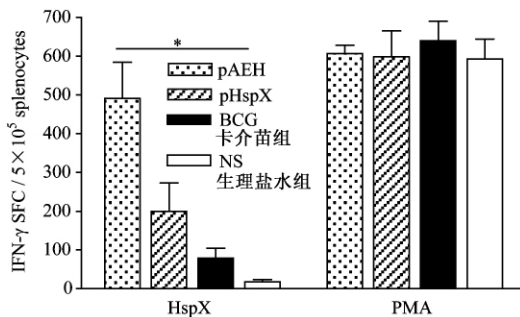


图3 免疫小鼠脾淋巴细胞诱生的 IL-2 水平  
(\*  $P < 0.05$ )

Fig. 3 The level of IL-2 induced in splenolymphocytes of the immunized mice. (\* indicates  $P < 0.05$ )

量的 IFN- $\gamma$  分泌(图4)。



### 3 讨论

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。DNA 疫苗仅由 DNA(如质粒)或 RNA(如 mRNA)组成,疫苗抗原的编码基因插入适当的真核细胞质粒 DNA 的始动子及终止密码之间,它可在细菌体内复制,而不能在人类宿主细胞内复制。此质粒可由大肠杆菌培养中纯化而得到。DNA 被肌肉细胞摄取进入细胞核内,在此抗原基因被转录,mRNA 被转运至细胞质内并被翻译为蛋白质,表达特定的抗原,导致免疫反应的产生。

编码单一结核分枝杆菌抗原的 DNA 疫苗的保护效应一般都不及 BCG,提高 DNA 疫苗效应的方法除继续筛选更为有效的保护性抗原以外,还包括多种单一抗原成分的 DNA 疫苗的联合免疫,与分子佐

剂如细胞因子、共刺激分子等联合使用以及改进免疫接种方式、途径和程序等。Ag85B 和 Esat6 都是结核分枝杆菌的早期培养液分泌蛋白中具有较强免疫保护作用的抗原成分之一,分别含有多个不同 T 细胞的表位,能诱导机体产生保护性细胞免疫。

抗原 85 复合体是一组具有较强细胞免疫及体液免疫活性的分枝杆菌分泌性蛋白<sup>[3]</sup>。最早在结核杆菌和 BCG 的生长期早期培养滤液中发现,在菌体表面也有少量分布。经 SDS-PAGE 和等电聚焦分析可分为 3 个组分即 Ag85A、B、C,大小分别为 31、30、30.5 ( $\times 10^3$ ),由 3 个不同的基因编码。其中有免疫作用的主要为 Ag85A 和 B,Ag85A 比 Ag85B 分泌得多,而 Ag85B 在细菌表面分布较多。范雄林等<sup>[4]</sup>在小鼠模型上将不同结核保护性抗原的 DNA 疫苗进行了免疫原性及保护效力的比较,发现 Ag85B 是比较理想的候选抗原。另外,在感染结核或麻风菌与卡介苗免疫的小鼠及人体上,Ag85 复合体不仅可以刺激产生体液免疫,而且可激发较强 Th1 型细胞免疫,引起 CD8<sup>+</sup> T 细胞增殖和 IL-2、GM-CSF 及 IFN- $\gamma$  等细胞因子水平的上升。

EAST6 即 6KD 早期分泌性抗原性蛋白,是从结核杆菌短期培养滤液(ST-CF)中纯化分离出的一种低分子量的分泌性蛋白,具有较强的细胞免疫活性。EAST6 仅存在于结核杆菌群及少数几种致病性分枝杆菌中,在 90% 以上的非致病性分枝杆菌中缺乏编码该蛋白的基因(除勒萨斯分枝杆菌、海水分枝杆菌和苏加分枝杆菌外),而且在所有 BCG 中也均缺乏。ESAT6 是免疫记忆效应性 T 细胞的主要靶抗原之一,可在再次感染的早期,诱导其迅速增殖和释放高水平的 IFN- $\gamma$ ,有效的激活巨噬细胞来控制结核病感染<sup>[5]</sup>。王清民等<sup>[6]</sup>对融合泛素的 Esat6 核酸疫苗进行了研究,发现该 DNA 疫苗不仅增强了细胞免疫反应,而且对结核感染提供了很好保护。

随着人们对潜伏感染的认识,休眠期结核杆菌开始受到重视。休眠期结核杆菌为了适应缺氧等恶劣生存环境部分基因表达上调。Leyten EM 等<sup>[7]</sup>用 25 种 DosR Regulon 编码的休眠期抗原进行实验,发现与结核病人相比,健康的结核菌素实验阳性者外周血单个核细胞(PBMC)能识别更多的休眠期抗原,并产生更强烈的 IFN- $\gamma$  反应。HspX 抗原可以被致敏的 T 细胞识别,刺激 T 细胞分泌 IFN- $\gamma$ ,具有细胞免疫和体液免疫原性。

机体抗 TB 免疫主要依赖于 T 细胞及一些相关细胞因子的协助。对 MTB 的细胞免疫应答是以 T 细胞为介导、以巨噬细胞为效应细胞的免疫反应。有效的抗 MTB 免疫反应包括巨噬细胞吞噬 MTB 以及处理与递呈抗原, T 淋巴细胞对抗原的特异性识别与结合以及因受刺激而增殖与分化、细胞因子释放、巨噬细胞激活和杀菌等步骤。IL-2 通过 T 淋巴细胞增长因子和激活巨噬细胞释放 IFN- $\gamma$  消灭 MTB, 而 IFN- $\gamma$  在机体的抗 MTB 感染中发挥着重要作用, 它可激活单核细胞和巨噬细胞, 使其发挥杀菌作用。IFN- $\gamma$  主要由 TB 患者体内的 CD4 + T 细胞、CD8 + T 细胞及 NK 细胞产生<sup>[8]</sup>。

本研究将休眠期抗原与生长早期抗原联合使用, 成功构建了能够在真核细胞表达融合蛋白的重组质粒, 并将该重组质粒肌肉注射于小鼠, 进行免疫学评价。一方面, 经过特异性抗原的刺激后, 随着免疫时间的延长, 免疫小鼠的总 IgG 抗体水平持续增加, 并于最后一次免疫后 2 周达到高峰。并且在第 4 周和第 6 周时, DNA 疫苗免疫组 OD 值均高于 BCG 组, 表明融合基因能够诱导较强烈的体液免疫反应并能保持良好的持久性; 另一方面, 融合基因免疫小鼠后脾淋巴细胞诱生的 IFN- $\gamma$  和 IL-2 产量也均高于 BCG 免疫小鼠, 表明该融合基因可诱导小鼠产生强烈的细胞免疫应答。同时, 诱导 T 细胞释放 IFN- $\gamma$  的能力通常被用来作为评价候选疫苗是否诱导 Th1 型细胞免疫反应的关键指标。本研究中 ELISPOT 检测结果表明, 应用 HspX 抗原体外刺激后, 融合基因组小鼠脾淋巴细胞分泌 IFN- $\gamma$  的水平最高, 说明该融合基因诱导机体产生了较强的细胞免疫反应。

总之, Th1 型的细胞免疫应答对控制 MTB 的感染起着重要的作用, 而且 IFN- $\gamma$  和 IL-2 都是重要的 Th1 型细胞因子, 并已被证明在抗 MTB 的治疗中具有一定作用<sup>[9]</sup>。本研究构建的 Ag85B-Esat6-HspX 融合基因疫苗, 目的就是希望其诱导的免疫向着有利于控制 MTB 感染的 Th1 型的应答方向发展, 同时

也为今后该疫苗的效力学评价提供一些理论和实验依据。

#### 参考文献:

- [1] Gandhi NR, Shah NS, Andrews JR, Vella V, Moll AP, Scott M, Weissman D, Marra C, Lalloo UG, Friedland GH. HIV coinfection in multidrug-and extensively drug-resistant tuberculosis results in high early mortality [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 181:80-86.
- [2] Hu Y, Movahdzadeh F, Stoker NG, et al. Deletion of the *Mycobacterium tuberculosis* alpha-crystallin-like HspX gene causes increased bacterial growth in vivo [J]. *Infect Immun*, 2006, 74(2): 861-868.
- [3] Orme IM. Current progress in tuberculosis vaccine development [J]. *Vaccine*, 2005, 23(17-18): 2105-2108.
- [4] Xionglin Fan, Qian Gao, Ruiling Fu. Differential immunogenicity and protective efficacy of DNA vaccines expressing proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in a mouse model [J]. *Microbiol Res*, 2009, 164: 374-382.
- [5] Olsen, A. W., A. Williams, L. M. Okkels, G, et al. Protective effect of a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion of antigen 85B and Esat6 in the aerosol guinea pig model [J]. *Infect Immun*, 2004, 72:6148-6150.
- [6] Qingmin Wang, Lin Kang, Xiaohua Wang. Improved cellular response elicited by a ubiquitin-fused Esat6 DNA vaccine against *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Microbiol Immunol*, 2009, 53: 384-390.
- [7] Leyten EM. Human T-cell responses to 25 novel antigens encoded by genes of the dormancy regulon of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Micobes infect*, 2006, 8:2052-2060.
- [8] Das G, Sheridan S, Janeway CA. The source of early IFN- $\gamma$  that plays a role in Th1 priming [J]. *J. Immunol*, 2001, 167(4): 2004-2010.
- [9] Limei Wang, Yinlan Bai, Changhong Shi, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a DNA vaccine encoding the fusion protein of *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 65 with interleukin-2 against *Mycobacterium tuberculosis* in BALB/c mice [J]. *APMIS*, 2008, 116: 1071-1081.

(修回日期)2011-02-22