

DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-9638. 2013. 03. 002

· 论 著 ·

## 重组卡介苗 rBCG-Ag85A-ESAT-6 对人巨噬细胞免疫刺激活性的影响

邓仪昊, 何红云, 张本斯

(大理学院基础医学院人体解剖学教研室, 云南 大理 671000)

**[摘要]** **目的** 探究重组卡介苗(rBCG-Ag85A-ESAT-6, rBCG-AE)对人巨噬细胞免疫刺激活性的影响, 为该疫苗的应用提供重要的理论依据和实验基础。**方法** 将 rBCG-AE(rBCG-AE 感染组)及卡介苗(BCG 感染组)分别感染体外培养的受 PMA 诱导分化的人单核细胞系(THP-1 细胞株), 分别于感染后 24、48 及 72 h, 观察细胞表面分子 CD80 和 CD86 的表达及细胞培养基中干扰素(IFN)- $\gamma$  及肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$  的诱生量。**结果** THP-1 细胞(未受 PMA 诱导分化的细胞)和 PMA 分化的 THP-1 细胞培养 4 h 后, 细菌吞噬率分别为(8.45  $\pm$  1.54)%、(91.26  $\pm$  2.13)%, 后者显著高于前者( $P=0.01$ ); 感染后 24、48 及 72 h, rBCG-AE 组 CD86 阳性细胞比率分别为(32.84  $\pm$  7.13)%、(48.42  $\pm$  5.46)%、(39.48  $\pm$  5.67)%, CD80 阳性细胞比率分别为(20.28  $\pm$  1.13)%、(23.67  $\pm$  1.23)%、(23.19  $\pm$  1.58)%, 均显著高于 BCG 感染组的 CD86[分别为(28.17  $\pm$  5.26)%、(40.09  $\pm$  7.21)%、(31.26  $\pm$  6.85)%]和 CD80 阳性细胞比率[分别为(22.15  $\pm$  1.82)%、(23.27  $\pm$  1.91)%、(22.68  $\pm$  0.87)%], 差异均有统计学意义(均  $P<0.01$ )。感染后 24、48 及 72 h, rBCG-AE 组 IFN- $\gamma$  诱生量分别为(1 986  $\pm$  156)pg/mL、(4 687  $\pm$  168)pg/mL、(3 238  $\pm$  97)pg/mL, TNF- $\alpha$  诱生量分别为(1 153  $\pm$  48)pg/mL、(5 864  $\pm$  97)pg/mL、(4 129  $\pm$  68)pg/mL, 各时间点均显著高于 BCG 感染组的 IFN- $\gamma$ [分别为(1 245  $\pm$  32)pg/mL、(3 067  $\pm$  143)pg/mL、(2 879  $\pm$  186)pg/mL]和 TNF- $\alpha$  诱生量[分别为(486  $\pm$  18)pg/mL、(3 237  $\pm$  86)pg/mL、(1 068  $\pm$  74)pg/mL], 差异均有统计学意义(均  $P<0.01$ )。**结论** rBCG-AE 可显著增强人巨噬细胞免疫刺激活性, 该疫苗可作为替代 BCG 的候选疫苗, 具有进一步开发研究的价值。

**[关键词]** 重组卡介苗; rBCG-Ag85A-ESAT-6; THP-1 细胞; 人巨噬细胞; 免疫刺激活性; 疫苗; 结核

**[中图分类号]** R392.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2013)03-0164-05

## Effect of rBCG-Ag85A-ESAT-6 on immunostimulatory activity of human macrophages

DENG Yi-hao, HE Hong-yun, ZHANG Ben-si (College of Preclinical Medicine, Dali University, Dali 671000, China)

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the effect of recombinant bacillus Calmette-Guerin (BCG) rBCG-Ag85A-ESAT-6(rBCG-AE) on immunostimulatory activity of human macrophages, and provide theoretical proof and experimental basis for vaccine use. **Methods** The previously constructed rBCG-AE and BCG strains were obtained respectively to infect the THP-1 cells that stimulated by phorbol-12-myristate-13-acetate(PMA). 24 h, 48 h and 72 h after infection, expression of macrophage surface markers CD80 and CD86 were measured by flow cytometry, and the concentration of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in supernatant were detected with ELISA kit. **Results** After four hours culture, phagocytic rate of THP-1 stimulated by PMA was significantly higher than that non-stimulated by PMA ([91.26  $\pm$  2.13]% vs [8.45  $\pm$  1.54]%,  $P=0.01$ ); 24 h, 48 h and 72 h after infection, the percentages of CD86 positive cells ([32.84  $\pm$  7.13]%, [48.42  $\pm$  5.46]%, [39.48  $\pm$  5.67]%) and CD80 posi-

[收稿日期] 2012-10-28

[基金项目] 云南省教育厅科学研究基金(2012C069)

[作者简介] 邓仪昊(1979-), 男(汉族), 云南省绥江县人, 讲师, 主要从事结核病感染免疫机制研究。

[通讯作者] 邓仪昊 E-mail: deng13032871868@163.com

ive cells ( $[20.28 \pm 1.13\%]$ ,  $[23.67 \pm 1.23\%]$ ,  $[23.19 \pm 1.58\%]$ ) in rBCG-AE group were obviously higher than those in BCG group (CD86:  $[28.17 \pm 5.26\%]$ ,  $[40.09 \pm 7.21\%]$ ,  $[31.26 \pm 6.85\%]$ ; CD80:  $[22.15 \pm 1.82\%]$ ,  $[23.27 \pm 1.91\%]$ ,  $[22.68 \pm 0.87\%]$ ,  $P < 0.01$ ). 24 h, 48 h and 72 h after infection, the concentration of IFN- $\gamma$  ( $[1\ 986 \pm 156]$  pg/mL,  $[4\ 687 \pm 168]$  pg/mL,  $[3\ 238 \pm 97]$  pg/mL) and TNF-a ( $[1\ 153 \pm 48]$  pg/mL,  $[5\ 864 \pm 97]$  pg/mL,  $[4\ 129 \pm 68]$  pg/mL) in rBCG-AE group were higher than those in BCG group (IFN- $\gamma$ :  $[1\ 245 \pm 32]$  pg/mL,  $[3\ 067 \pm 143]$  pg/mL,  $[2\ 879 \pm 186]$  pg/mL; TNF-a:  $[486 \pm 18]$  pg/mL,  $[3\ 237 \pm 86]$  pg/mL,  $[1\ 068 \pm 74]$  pg/mL,  $P < 0.01$ ). **Conclusion** Recombinant BCG-AE can enhance immunostimulatory activity of human macrophages, and it is an improved TB vaccine as an alternative to BCG for further study.

**[Key words]** recombinant bacillus Calmette-Guerin; rBCG-Ag85A-ESAT-6; THP-1 cell; human macrophage; immunostimulatory activity; vaccine; tuberculosis

[Chin Infect Control, 2013, 12(3): 164-168]

通常认为,较强的细胞免疫是抗结核分枝杆菌感染的关键<sup>[1-2]</sup>。T 细胞的激活需要 2 个来自细胞外的信号刺激,即 T 淋巴细胞活化的双信号(double signal)作用。T 细胞活化的第一信号,即抗原识别信号,对 T 细胞活化是必需的,但不引起 T 细胞增生和细胞因子的分泌;T 细胞活化的第二信号是非抗原依赖性的,又称共刺激信号(costimulatory signal)<sup>[3-4]</sup>,共刺激信号是由抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC)和 T 细胞表面的黏附分子提供,这些黏附分子被称为共刺激分子,其中与结核病免疫密切相关的共刺激分子有 T 细胞表面的 CD28、细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4),以及巨噬细胞等抗原呈递细胞表面的相应配体 CD80 (B7-1)和 CD86(B7-2)等。CD80 及 CD86 是巨噬细胞表面非常重要的协同刺激分子,当其与 T 细胞表面的 CD28 结合后即提供 T 细胞活化的第二信号,激活静息期 T 细胞,促进 T 细胞增殖并分化为效应细胞或记忆细胞,从而调节机体的免疫应答,在结核病免疫中发挥关键作用<sup>[5-6]</sup>。因此,通过检测巨噬细胞表面共刺激分子 CD80 和 CD86 的表达,可间接反映巨噬细胞的活化状态及其抗原呈递能力的变化,是评价细胞免疫应答的主要检测指标。

结核分枝杆菌感染机体后,主要被巨噬细胞吞噬进行免疫处理。当巨噬细胞活化后可启动较多细胞因子的合成和分泌,如白细胞介素(IL)-12、干扰素(IFN)- $\gamma$ 及肿瘤坏死因子(TNF)-a 等。这些细胞因子在抗结核分枝杆菌感染中发挥着极其关键的作用。IFN- $\gamma$ 可提高巨噬细胞表面 MHC-II 类分子的表达水平,增强细胞的抗原呈递能力,并可促进巨噬细胞吞噬免疫复合物,加速病原菌的死亡。TNF-a 可与 IFN- $\gamma$ 产生协同效应,抑制结核分枝杆菌的生长繁殖,并激活更多的免疫细胞遏制结核病的发展。

在前期研究中<sup>[7]</sup>,我们构建了 1 株可表达结核分枝杆菌融合蛋白(Ag85A-ESAT-6)的重组卡介苗新型结核病疫苗(rBCG-Ag85A-ESAT-6, rBCG-AE),该疫苗可诱导 BALB/c 小鼠产生较卡介苗(bacillus Calmette-Guerin, BCG)更强的体液免疫及细胞免疫反应。为进一步探究该 rBCG-AE 的免疫学机制,本研究将此 rBCG-AE 体外感染人巨噬细胞,通过检测受 rBCG-AE 感染后的巨噬细胞表面共刺激分子 CD80、CD86 的表达情况及巨噬细胞细胞因子 IFN- $\gamma$  及 TNF-a 的生成量,观察该 rBCG-AE 对巨噬细胞免疫活性的作用,并从抗原呈递方面探讨 rBCG-AE 对巨噬细胞功能的影响。

## 1 材料与方法

1.1 实验器材 TITC 标记的抗人 CD80 抗体、PE 标记的抗人 CD86 抗体均购自联邦生物技术有限公司(eBioscience);IFN- $\gamma$  及 TNF-a 检测试剂盒为安迪生物科技有限公司(R&D)产品;先前构建的 rBCG-AE,由本实验室常规培养并保存;BCG 菌苗由成都生物制品研究所提供;胎牛血清(NBS)购于杭州四季青公司;人单核细胞株 THP-1 由本室保存;超声破菌仪为宁波新芝生物科技股份有限公司产品;流式细胞仪 FACS Calibur 为 Becton Dickinson 公司产品。

1.2 菌悬液的制备 rBCG-AE 及 BCG 常规培养于 Sauton 培养基,约 4 周;取出菌体,置 56℃ 50 min 灭活;用含 0.05% tween 80 的 PBS 液洗涤 3 次,反复振荡,待菌团下沉后,取上部悬液于紫外分光光度计计数,RPMI-1640 培养基调整细菌浓度至  $5 \times 10^7$  /mL 备用。

1.3 THP-1 细胞的复苏培养及菌苗感染 将冻存于液氮的 THP-1 细胞复苏,常规培养于 37℃ 含 5%

CO<sub>2</sub> 孵箱中,收集处于对数生长期的 THP-1 细胞接种于 6 孔板(1×10<sup>6</sup>/孔, 2 mL),加入终浓度为 50 ng/mL 的 phorbol-12-myristate-13-acetate(PMA)。当细胞形态发生明显变化(贴壁生长、伪足形成等)时,即说明 THP-1 细胞已分化为巨噬细胞。将 PMA 诱导分化后的细胞分为 3 组:rBCG-AE 感染组、BCG 感染组及未感染组。参考 Yuan 等<sup>[8]</sup>的方法,按细菌数(细胞数 = 10 : 1 的比例)向对应组别的细胞培养液中分别加入上述已制备好的 rBCG-AE 或 BCG 菌悬液,未感染组加入等体积 RPMI-1640 培养基;置孵箱中培养 4 h,对巨噬细胞进行抗酸染色,镜下观察感染率,以验证细胞感染模型。PMA 分化的 THP-1 细胞受细菌感染模型建立成功后,置孵箱继续培养,进行以下实验。

1.4 巨噬细胞表面分子 CD80、CD86 的表达 分别于感染后 24、48、72 h,收集各组细胞,PBS 洗涤后,分别加入 FITC 标记的抗人 CD80 抗体和 PE 标记的抗人 CD86 抗体,室温孵育 1 h 进行免疫细胞化学染色,PBS 洗涤 3 次,采用流式细胞术检测阳性细胞比例。每份样本进行 3 次重复试验。

1.5 IFN-γ 及 TNF-α 的诱生量检测 收集细胞培养基上清,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试

剂盒检测细胞因子 IFN-γ 及 TNF-α 的生成量。每份样本进行 3 次重复试验。

1.6 统计学分析 计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 11.5 统计软件对实验数据进行 One-way ANOVA 组间比较分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 菌苗感染 PMA 分化的 THP-1 细胞模型的建立 PMA 诱导 24 h 后,THP-1 细胞形态发生明显变化(呈不规则形,>90% 的细胞贴壁生长,并伸出伪足),菌苗吞噬率为(91.26 ± 2.13)%,显著高于未受 PMA 诱导分化细胞的吞噬率(8.45 ± 1.54)%,差异有统计学意义( $P = 0.01$ )。

2.2 各组巨噬细胞表面分子 CD80、CD86 的表达 rBCG-AE 感染组 CD80、CD86 阳性细胞比例在各时间点(感染后 24、48 及 72 h)均明显高于 BCG 感染组( $P < 0.01$ ),并在感染后 48 h 达到高峰,感染 72 h 后仍维持在较高水平(图 1~2);而未感染组,CD80、CD86 的阳性细胞比例在各时间点均无显著变化( $P > 0.05$ ),且维持在较低水平。

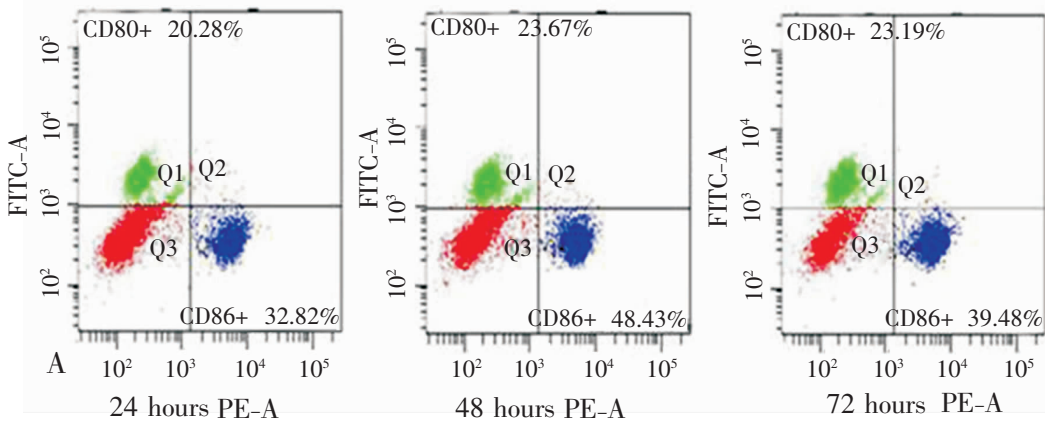


Figure A showed the percentages of CD86 and CD80 positive cells 24 h (L), 48 h (M) and 72 h (R) after infection with vaccine strain in rBCG-AE group.

图 1 rBCG-AE 组巨噬细胞表面分子 CD80 和 CD86 的表达( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Figure 1 Expression of macrophage markers CD80 and CD86 in rBCG-AE group( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

2.3 细胞培养基上清 IFN-γ 及 TNF-α 的诱生 收集感染后不同时间点细胞培养基上清,检测细胞因子 IFN-γ 及 TNF-α 的诱导生成量。rBCG-AE 感染

组 IFN-γ 及 TNF-α 的生成量均显著高于其他各组( $P < 0.01$ );未感染组二者的生成量均明显低于 BCG 感染组( $P < 0.01$ )。见图 3。

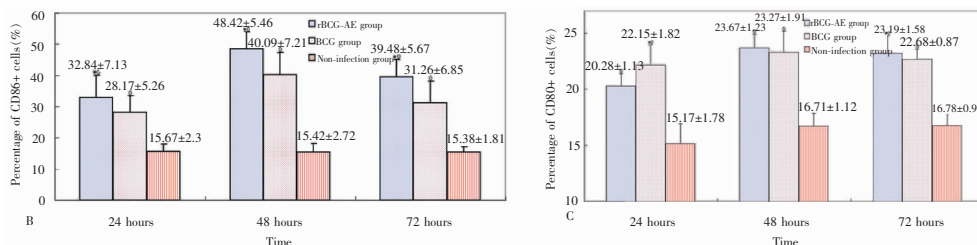


Figure B and Figure C respectively illustrated the proportions of CD86 and CD80 positive cells at different time points after infection.

图 2 各组不同时间点巨噬细胞表面分子 CD80 和 CD86 的表达量 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Figure 2 Expression of macrophage surface markers CD80 and CD86 at different time points ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

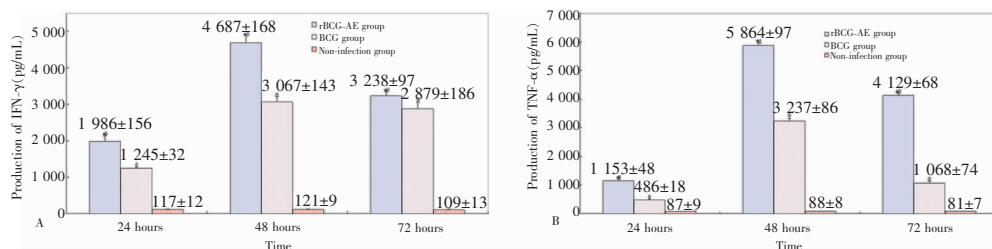


Figure A and B illustrated the concentration of IFN-γ and TNF-α in the supernatant respectively.

图 3 各组不同时间点 IFN-γ 及 TNF-α 在细胞培养上清中的生成量 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Figure 3 Production of IFN-γ and TNF-α in the supernatant at different time points ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3 讨论

刺激并诱导机体免疫系统产生针对特异性病原体的免疫应答,是疫苗预防疾病的基本机制。结核分枝杆菌属胞内寄生菌,巨噬细胞是该病原菌的主要宿主。巨噬细胞吞噬病原菌后,将抗原呈递给 T 细胞,此过程中,共刺激分子如 CD86 及 CD80 等的表达对 T 细胞的活化、增殖、Th0 细胞分化及效应分子的产生均发挥极其重要的调节作用。在生理状态下,巨噬细胞未受抗原刺激时,其表面共刺激分子 CD80、CD86 仅有极少量表达,当受结核分枝杆菌抗原刺激后,二者的表达显著增加,以增强抗原呈递,继而诱发机体免疫系统产生抗感染效应。被结核分枝杆菌激活的 CD4 + T 细胞和 CD8 + T 细胞明显增强其细胞因子 IFN-γ 的产生,而 IFN-γ 可增强巨噬细胞的吞噬和杀伤能力,上调 MHC-II 分子及共刺激分子的表达,进一步加强抗原的呈递<sup>[9]</sup>。因此,本研究组重点研究 rBCG-AE 对巨噬细胞抗原呈递能力的影响。

CD80、CD86 是位于巨噬细胞等抗原呈递细胞表面,与 T 细胞表面 CD28 及 CTLA-4 相对应的配体。T 细胞活化的第二信号正是由 T 细胞的协同分子与抗原呈递细胞表面的配体结合所提供。若阻

断该分子对,则导致共刺激通路阻断,即 T 活化信号中断。研究显示<sup>[10]</sup>,CD80 可促进 CD8 + T 细胞活化,而 CD86 则可增强 CD4 + T 细胞的免疫应答,在结核病免疫中发挥极其重要的作用。因此,本研究通过检测 CD80 和 CD86 的表达,间接观察 T 细胞的活化状态及疫苗诱导机体的免疫反应。结果显示, rBCG-AE 感染组表面分子,包括 CD80 和 CD86 均明显高于 BCG 感染组,说明重组疫苗 rBCG-AE 可诱导产生更强的免疫刺激活性,其原因在于 rBCG-AE 是在 BCG 的基础上引入结核分枝杆菌免疫显性抗原 Ag85A 和 ESAT-6 构建的,该疫苗通过基因重组技术构建<sup>[7]</sup>,可表达融合蛋白 Ag85A-ESAT-6。与 BCG 相比,其免疫刺激作用得到了显著增强,这也是开发此新型结核病疫苗的初衷。THP-1 是人急性单核细胞白血病细胞,可代表人单核-巨噬细胞系统的功能趋势,能真实地反映人类实验模型,因此,本研究选用该细胞株建立细胞吞噬细菌模型。参考 Yuan 等<sup>[8]</sup>的方法,菌苗与细胞共培养 4 h 即可使菌苗吞噬率 > 90%,再次验证了该方法构建细菌感染细胞模型的可靠性和稳定性。单核-巨噬细胞是机体内重要的抗原呈递细胞,具有抗原呈递、吞噬消化和杀灭结核分枝杆菌的能力。此外,巨噬细胞可合成、分泌多种生物活性物质,如

细胞因子等,以激活更多免疫细胞产生针对病原菌的更强的免疫应答。IFN- $\gamma$  是 Th1 型细胞的主要细胞因子,以“正反馈”的形式激活巨噬细胞,加速细菌的死亡<sup>[11]</sup>,并促进 CD8 + T 细胞介导的免疫反应<sup>[12]</sup>。TNF- $\alpha$  可与 IFN- $\gamma$  产生协同效应,清除体内的病原菌。结果显示,rBCG-AE 感染组 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的诱生量显著高于 BCG 感染组,提示此 rBCG-AE 可刺激人巨噬细胞产生较 BCG 更强的免疫反应。

综上所述,rBCG-AE 可刺激人巨噬细胞产生较 BCG 针对结核分枝杆菌感染的更强的免疫应答,是一种具有可替代 BCG 疫苗潜能的新型结核病疫苗,值得进一步深入研究。

#### [参 考 文 献]

[1] Christy A J, Dharman K, Dhandapaani G, *et al.* Epitope based recombinant BCG vaccine elicits specific Th1 polarized immune responses in BALB/c mice[J]. *Vaccine*, 2012, 30(7):1364 - 1370.

[2] Commandeur S, Lin M Y, van Meijgaarden K E, *et al.* Double- and monofunctional CD4+ and CD8 + T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* DosR antigens and peptides in long-term latently infected individuals[J]. *Eur J Immunol*, 2011, 41(10):2925 - 2936.

[3] Bour-Jordan H, Bluestone J A. Regulating the regulators: costimulatory signals control the homeostasis and function of regulatory T cells[J]. *Immunol Rev*, 2009, 229(1):41 - 66.

[4] Lombardi V, Singh A K, Akbari O. The role of costimulatory molecules in allergic disease and asthma[J]. *Int Arch Allergy*

*Immunol*, 2010, 151(13):178 - 189.

[5] Schwarta J C, Zhang X, Fedorov A A, *et al.* Structure basis for co-stimulation by the human CTLA-4/B7-2 complex[J]. *Nature*, 2001, 410(6828):604 - 608.

[6] Woods G M, Doherty K V, Malley R C, *et al.* Carcinogen-modified dendritic cells induce immunosuppression by incomplete T-cell activation resulting from impaired antigen uptake and reduced CD86 expression[J]. *Immunology*, 2000, 99(1):16 - 22.

[7] Deng Y H, Sun Z, Yang X L, *et al.* Improved immunogenicity of recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin strains expressing fusion protein Ag85A-ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Scand J Immunol*, 2010, 72(4):332 - 338.

[8] Yuan Y, Zhu Y, Crane D D, *et al.* The effect of oxygenated mycolic acid composition on cell wall function and macrophage growth in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Mol Microbiol*, 1998, 29(6):1449 - 1458.

[9] Sutherland J S, Adetifa M, Hill P C, *et al.* Pattern and diversity of cytokine production differentiates between *Mycobacterium tuberculosis* infection and disease[J]. *Eur J Immunol*, 2009, 39(3):723 - 729.

[10] Odobasic D, Kitching A R, Tipping P G, *et al.* CD80 and CD86 costimulatory molecules regulate crescentic glomerulonephritis by different mechanisms [J]. *Kidney Int*, 2005, 68(2):584 - 594.

[11] Herbst S, Schaible U E, Schneider B E. Interferon gamma activated macrophages kill mycobacteria by nitric oxide induced apoptosis[J]. *PLoS One*, 2011, 6(5):e19105.

[12] Sud D, Bigbee C, Flynn J L, *et al.* Contribution of CD8 + T cells to control of *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. *J Immunol*, 2006, 176(7):4296 - 4314.

(上接第 230 页)

癌术后化学治疗(化疗)患者占 53.85%,介入性操作比率达 32%,外周静脉置管均 >120 d(带管出院 + 定期回院化疗);化疗患者抵抗力弱,加上介入性操作与导管留置等因素,其感染风险高于普通人群。

妇幼保健院具有专科特点,通过横断面调查,可分析感染流行趋势及感染部位分布的特点,为下一步目标性监测与感染防控提供依据<sup>[1,5-6]</sup>。

#### [参 考 文 献]

[1] 张红梅,李永军. 2007—2011 年医院感染现患率调查与分析

[J]. *中华医院感染学杂志*, 2012, 22(15):3230 - 3231.

[2] 刘欧,刘颖,黄晓玲,等. 1097 例患者医院感染现患率调查与分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2012, 22(10):2029.

[3] 任南,文细毛,吴安华,等. 全国医院感染横断面调查结果的变化趋势研究[J]. *中国感染控制杂志*, 2007, 6(1):16 - 17.

[4] 崔扬文,胡必杰,高晓东,等. 2009 年上海市医院感染现患率调查结果分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2010, 20(12):1667 - 1669.

[5] 李晖,朱岩,高晓玲,等. 医院感染现患率调查与相关因素分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2012, 22(15):3224 - 3226.

[6] 任南. 实用医院感染监测方法与技术[M]. 长沙:湖南科学技术出版社, 2007:87.