

[文章编号] 1000-2200(2005)02-0184-02

结核分枝杆菌疫苗研究进展

马丽娜 综述, 夏佩莹 审校

[关键词] 结核分枝杆菌; 疫苗; 综述

[中国图书资料分类法分类号] R 378.911 [文献标识码] A

结核病是一种人畜共患的慢性消耗性疾病, 发病率和病死率很高。近年来, 全球结核病疫情呈上升趋势。结核病再度肆虐与获得性免疫缺陷综合征(艾滋病)的广泛传播、耐药菌株的出现、人群流动增加、城市化发展、社区人口密度增加等因素有关。有关结核病的研究与日俱增, 其中有关结核病的免疫学和疫苗的研究是这一领域的热点。近年来由于结核分枝杆菌基因组序列的研究, 明确了与疫苗有关的新颖结核分枝杆菌抗原。本文就结核分枝杆菌的有效抗原、机体抗结核细胞免疫特点及结核菌疫苗研究的进展作一综述。

1 结核病细胞免疫特点

结核分枝杆菌的获得性细胞免疫较为复杂, $CD4^+$ 和 $CD8^+$ $\alpha\beta T$ 细胞以及 $\gamma\delta T$ 细胞都参与作用, 其中 $CD4^+$ T 细胞在免疫中的作用受到公认。人类针对分枝杆菌抗原的体外 T 细胞反应亦主要为 $CD4^+$ T 细胞。动物模型研究提示 Th1 细胞分泌的细胞因子 γ 干扰素 (IFN- γ) 是导致巨噬细胞活化、吞噬体酸化及反应氧中间代谢产物释放的主要效应物^[1]。IFN- γ 和白细胞介素 12 (IL-12) 受体遗传缺陷患者对分枝杆菌感染的高度易感性, 说明了 Th1 细胞应答的重要性。Th2 型细胞因子在结核动物模型中只有低水平诱导, 但在某些小鼠品系(如 BALB/c)晚期感染中, 则有高水平表达。预防接种或与环境中高浓度的分枝杆菌接触可诱导 Th2 型细胞因子, 加速疾病发展, 对结核病预后不良。

$CD8^+$ T 细胞通过产生细胞因子及直接杀伤细胞发挥效应, 人类 $CD8^+$ T 细胞可以使靶细胞裂解和通过颗粒溶解素 (granulysin) 途径来控制细胞生长。原发性感染过程中, $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞均聚集于肺部, 由 β_2 微球蛋白 (β_{2m}) 或抗原肽转运蛋白-1 (TAP-1) 基因缺陷小鼠的实验资料, 表明 $CD8^+$ T 细胞在保护力中的重要作用。对这两种 T 细胞亚群的保护作用进行直接比较结果表明, $CD8^+$ T 细胞在原发感染中所起的作用不大, 而在小鼠模型中证实, 这一亚群在原发后感染的保护作用中则是主要的中介体。 $\gamma\delta T$ 细胞及 DN $\alpha\beta T$ 细胞也和结核病的保护性免疫有关, 它们能在 CD1 分子存在的条件下识别分枝杆菌的非蛋白抗原, 如糖脂。有学者报道, CD1d 分子缺陷的小鼠对于结核病感染的易感性甚高。

2 卡介苗预防结核病的现状

作为结核病的传统疫苗, 卡介苗 (BCG) 菌株在体外长期培养, 由于编码 T 细胞抗原的许多读码框架 (ORF) 发生缺失突变^[2]; 导致 T 细胞抗原包括免疫优势分子 ESAT 和 CFP10 的改变。虽然在动物实验中已证实卡介苗具有高度的保护力, 但近期的现场调查发现, 卡介苗只对预防儿童结核病有

效, 对成人结核病预防效果不稳定, 保护率在 0% ~ 80%^[3]。对这一现象曾有不同的解释, 其中大多学者认为是由于疫苗与环境中的分枝杆菌相互作用的结果, 用不同动物模型所做试验证实与环境中的分枝杆菌的事先接触可干扰卡介苗接种后的保护力。因此, 卡介苗只对那些尚未与环境中的分枝杆菌接触的人群有效。这种干扰作用的确切机制尚不清楚。有学者通过动物实验认为, 环境中分枝杆菌所致的保护力部分掩盖了卡介苗接种后的功效, 或者因为环境中分枝杆菌具有拮抗作用, 可扭转细胞免疫应答, 使其从 Th1 细胞转向 Th2 细胞。亦有资料表明, 环境中分枝杆菌与卡介苗有许多共同抗原, 若实验动物受到环境中分枝杆菌的致敏, 则卡介苗在此种动物中的生长受到限制, 难以产生有效保护力。这些均可以解释卡介苗多次接种失败的原因, 也是设计以新型减毒分枝杆菌疫苗替代卡介苗所必须考虑的。

开发涉及细胞免疫应答的疫苗时, 需考虑建立持久的免疫记忆性。接种卡介苗能保护儿童免患结核病。但一旦进入青春期, 结核病的发病率增加, 卡介苗不再具有保护力, 卡介苗所诱导的免疫应答仅在 10 ~ 15 岁时有效。了解免疫记忆机制在研制更为优良的疫苗中也很重要。近期研究证实^[3] 针对结核病的保护力可以通过 $CD4^+$ T 细胞的幼稚表型 ($CD45RB^{hi}L$ 选择素^{hi} $CD44^{lo}$) 而被动传递。因此, 关键的问题是: 多数细胞有效外渗所必需的黏附分子下调时, 已经回复的记忆细胞是否能有效地控制肺部感染; 是否需要抗原的持续存在来维持活化的 T 细胞群体, 以及在周围器官内记忆性的有效表达; 是否在青春期前进行预防接种, 能够使静止记忆细胞转为活化状态, 将成为一种有效的预防接种措施。

3 抗原选择和疫苗设计

研究表明, 结核分枝杆菌分泌蛋白能刺激机体产生保护性免疫反应, 诱导机体产生 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞介导的免疫应答。在结核感染过程中, 患者淋巴细胞早期识别主要是一些分泌蛋白, 如 Ag85 复合体分布于大部分分枝杆菌中, 其中 Ag85B 具有分枝菌酸转移酶的活性, 与分枝杆菌细胞壁的合成有关, 并与人纤维连接蛋白结合后参与致病过程, 在分枝杆菌分泌蛋白中含量占据首位, 该抗原的抗原性最强。MPT-64 也是一种分泌蛋白, 仅限于人结核分枝杆菌、牛分枝杆菌和少数的 BCG 菌株中, 被结核病患者的阳性血清识别, 同时可产生杀伤性 T 淋巴细胞 (CTL) 应答。ESAT-6 是结核分枝杆菌早期分泌的一种小分子蛋白, 只存在于人型结核分枝杆菌和牛分枝杆菌中, BCG 中缺少该抗原的编码基因。最近研究证明, ESAT-6 不仅是抗结核分枝杆菌细胞免疫应答的主要配体, 还是效应性 T 细胞的主要靶抗原之一, 可刺激结核病小鼠释放 γ 干扰素。MPT-63 蛋白能在感染有结核分枝杆菌的豚鼠中诱导体液免疫应答, 并且在结核分枝杆菌致病菌株中特异表达^[4]。近年选用多种结核菌抗原制备疫

[收稿日期] 2004-04-12

[作者单位] 蚌埠医学院病原生物学教研室, 安徽蚌埠 233003

[作者简介] 马丽娜 (1980-), 女, 安徽怀远县人, 助教。

苗,其中经动物试验证实具有增强抗结核保护功能的新颖结核疫苗见表 1。

表 1 新型结核疫苗候选抗原

选用抗原	疫苗性质
ESAT-6	DNA, 亚单位
MPT63, MPT64, MPT83	DNA
Ag85B	DNA, 亚单位
Ag85A	DNA
PstS-1	亚单位
PstS-2, PstS-3	DNA
Hsp60, Hsp70	DNA

结核病患者及带菌者都能识别相同的免疫优势抗原。有学者用肽基础疫苗免疫时发现,自然感染时针对肽类的反应与其诱发保护性免疫之间并无直接相关性。用亚优势表位(subdominant epitope)进行免疫,常可获得有效保护力。这些研究结果提出了这样的可能:即在自然感染时,用基于临界亚优势表位的感染后疫苗进行免疫,可以使获得免疫性增强。流行病学资料表明,人类原发性感染经治疗后所产生的免疫应答不足以防止成年后再度感染或疾病的复活。因此,疫苗制备工作者就赋有艰巨的任务,设计出优于自然感染诱发免疫应答的疫苗。这一工作具有实际意义,据估计全世界约 1/3 人群有潜在性的结核感染,约 5%~10% 的感染者将发展为活动性疾病。有研究提出, Hsp60 能成功的用作前感染和后感染预防接种。Lowrie 等^[5]证实一种编码此种抗原的疫苗能用于一般的前感染预防接种,并可防止潜在性结核病的复发, Turner 等认为应在感染前使用对结核有保护力的疫苗,如在感染后使用则对已形成的感染并无任何效果。由此可见,在感染前或感染后恰当的使用疫苗具有不同的要求,在感染前使用的疫苗,要求能增强保护性免疫应答,使机体免受结核分枝杆菌的感染;在感染后使用的疫苗,要求能增强自然感染时产生的获得性细胞免疫,防止再度感染或疾病的复活。这是在疫苗设计时所必须考虑的。

4 结核杆菌疫苗的研制进展

4.1 分枝杆菌活疫苗 由于分子生物学技术的应用,有关使分枝杆菌菌株减毒的报告与日俱增。有研究应用选择性标记,如抗生素耐药性基因进行研究;转座子诱变和等位交换的应用形成了几种毒力降低的营养缺陷突变株,这些突变株的产生是因为缺少生长因子合成所必需的功能性基因。很多这类突变株是控制细胞壁脂质合成的基因发生突变,而类脂是细菌在人体肺部生存所必须的。虽然这些构建物对以后的结核感染具有保护力,但是毒力与保护力之间似乎存在相关性,而且在目前所检测的突变株中,尚无一种在动物模型中证实具有较之卡介苗更高水平的保护力。

有学者曾提出,如果将卡介苗在体外减毒过程中所丧失的某些基因再次导入,则卡介苗的功效必将加强。在豚鼠试验中证实,高度表达 30×10^3 Ag85 蛋白的卡介苗重组菌株显示有效的保护力。同样,通过导入李斯特菌溶素(listeniolysin)作用于 MHC I 类分子呈递中的抗原或由于 Th1 型细胞因子的表达都可增强卡介苗的 CD8⁺T 细胞刺激能力。不过这些方法有使疫苗菌株毒力增加的危险。

4.2 亚单位疫苗 所谓亚单位疫苗是指利用致病菌的亚单

位,尤其是抗原表位作为疫苗,通常理想的亚单位疫苗应该由几个保护性抗原或抗原表位组成。保护效果优于卡介苗,又克服卡介苗的不足。亚单位疫苗是卡介苗的理想替代品。寻找保护性抗原或表位的主要方法有^[6]:(1)比较蛋白质组学,从血清和胞内复杂的蛋白质混合物中寻找特异蛋白,尤其血清中的许多分泌蛋白均可诱发强烈的免疫反应;(2)构建结核分枝杆菌的基因文库,用不同的 T 细胞(CD8⁺, CD4⁺)或不同遗传背景的动物模型从文库中筛选特定的表位。

以往困扰亚单位疫苗开发的主要问题之一是难以实现大规模生产。目前利用定点突变技术(site-directed mutagenesis)将其密码子修饰为宿主高频使用的密码,重组 Ag85B 在大肠埃希菌中的产量提高了 54 倍, Ag85A 和 SOD 提高了 4~6 倍,仍含有 T、B 表位,蛋白产量的增加主要是因为翻译水平的提高而不是转录水平的提高。

4.3 DNA 疫苗 1992 年, Tang 等直接给动物接种编码抗原的基因可使该动物获得对该抗原的免疫力。这种编码抗原蛋白的外源基因既是载体,又是抗原的来源,并且具有疫苗的功能,因此被称为基因疫苗,又称核酸疫苗。其中 DNA 疫苗由于能诱导持久的细胞免疫抵抗病毒、细菌和寄生虫等病原体的感染而备受关注。另外, DNA 疫苗还有许多优点^[7]:(1)更为有效的免疫,基因疫苗不仅可以诱导针对保守抗原的保护性抗体产生,而且可以同时激发机体的 CTL 免疫;(2)制备简便,省时省力;(3)免疫应答较持久;(4)具有同种异株交叉保护作用;(5)可用于肿瘤防治。最近至少有编码 6 个结核杆菌分泌蛋白的 DNA 疫苗对免疫动物有保护作用。但到目前为止,编码单个抗原的 DNA 疫苗保护率一般都低于 BCG。一般认为,多个基因联合作用,可以提高核酸疫苗的免疫能力。

动物实验证实, DNA 疫苗能诱发体液免疫和有 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞参与的细胞免疫应答,故这些疫苗将以细胞免疫为主的的感染性疾病的保护性疫苗。实验表明, DNA 疫苗能诱发 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞的广谱细胞免疫应答,其免疫保护功效接近于卡介苗。

[参 考 文 献]

- [1] Kamath AT, Groat NL, Bean AG, et al. Protective effect of DNA immunization against mycobacterial infection is associated with the early emergence of interferon- γ (IFN- γ)-secreting lymphocytes [J]. *Clin Exp Immunol*, 2000, 120(3): 476~482.
- [2] Behr MA, Wilson MA, Gill WP, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole genome DNA microarray [J]. *Science*, 1999, 284(5 149): 1 520~1 523.
- [3] Fine PE. Variation in protection by BCG: Implications of and for heterologous immunity [J]. *Lancet*, 1995, 346(8 986): 1 339~1 345.
- [4] 蔡宏, 田霞, 呼西旦, 等. 结核分枝杆菌四联核酸疫苗免疫原性和保护效率 [J]. *中国科学: C 辑*, 2003, 33(3): 240~245.
- [5] Lowrie DB, Silva CL, Colston MJ, et al. Protection against tuberculosis by a plasmid DNA vaccine [J]. *Vaccine*, 1997, 15(8): 834~838.
- [6] 谢建平, 王洪海, 陈永青. 结核分枝杆菌的后基因组研究和新型疫苗 [J]. *微生物学报*, 2001, 41(2): 252~257.
- [7] 李学荣, 余新炳. 核酸疫苗及其免疫机制研究 [J]. *中国人兽共患病杂志*, 2000, 16(6): 82~86.