

结核分枝杆菌 H37Ra 抗结核作用相关研究进展

樊超, 张万江

摘要: 结核分枝杆菌 H37Ra 菌株(H37Ra)是人型结核分枝杆菌减毒株, 它毒力极弱, 对宿主相对安全, 具备活菌疫苗的条件。与卡介苗(BCG)相比 H37Ra 菌株具有更完整的免疫原性, 并包含一些 BCG 中丢失的抗原性成分。同时, H37Ra 菌株能够充分活化巨噬细胞, 刺激机体产生特异性免疫应答, 在防治结核病中起到重要作用。因此, H37Ra 菌株对机体抗结核的保护作用是否强于 BCG, 是否能作为抗结核的候选活疫苗已受到学者的关注, 为今后研制新型、安全、高效的结核病苗奠定基础。本文对 H37Ra 菌株抗结核的相关研究进行了综述。

关键词: 结核分枝杆菌; BCG; H37Ra; 疫苗

中图分类号:R378.91

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2014)03-0315-04

Research progress on anti-tuberculosis effect of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra

FAN Chao, ZHANG Wan-jiang

(Department of Pathophysiology, Medical School, Shihezi University / Xinjiang Key Laboratory
of Endemic and Ethnic Diseases, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

ABSTRACT: H37Ra is one type of *Mycobacterium tuberculosis* attenuated strain. The advantages of this strain include extremely weakness in virulence, the relative safety for the host, and the requirement of living bacterium vaccine. Compared with BCG, H37Ra has more complete immunogenicity and may contain some antigenic components which BCG missed. At the same time, H37Ra strains can fully activate macrophages, stimulate the body to produce specific immune response, and play an important role in the prevention and treatment of tuberculosis. Thus, protective effect of tuberculosis H37Ra on the body is stronger than BCG. Whether can as a broad prospect at the candidate of anti-tuberculosis vaccine has been attracting the attention of scholars and it laid the foundation for further study of development for new, safe and efficient TB vaccine. This article is an overview concerning the H37Ra anti-tuberculosis related researches.

KEY WORDS: *Mycobacterium tuberculosis*; BCG; H37Ra; the vaccine

Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 81260261 & 81160192), and the Medical Special Foundation of Xinjiang Production and Construction Corps (No. 2012BA022)

Corresponding author: Zhang Wan-jiang, Email: zwj1117@sina.com

结核病是一种古老的疾病。据统计全世界约有 1/3 的人口感染结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB), 每年大约有 200 万结核病患者死亡, 90% 的感染者为潜伏感染, 病原体以休眠的方式存在于机体内, 约有 10% 的感染者为活动性结核患者^[1]。

国家自然科学基金项目(No. 81260261, No. 81160192); 新疆生产建设兵团医药专项资金项目(No. 2012BA022)

通讯作者:张万江, Email: zwj1117@sina.com

作者单位:石河子大学医学院免疫学教研室/新疆地方与民族高发病
教育部重点实验室, 石河子 832002

Email: fc130325@sina.cn

从 1921 年至今, 由牛结核分枝杆菌减毒株制成的卡介苗(Bacillus Calmette-Guerin vaccine, BCG)是世界上唯一获准用于预防结核病的疫苗, 由于其价廉与高安全性的特性, 全球有大约有 40 亿人接受 BCG 免疫^[2]。但目前研究发现卡介苗对结核病的预防作用十分有限, 在不同的人群, 其免疫保护作用差异较大, 效果不稳定, 尽管 BCG 在预防小儿结核病和防止重症化上曾发挥过相当有效的作用, 但对青春期或成人追加接种并未证实能取得如同乳儿期初次接种那样的效果^[3]。迄今为止成年人的肺结核是结核病传播的重要来源, 可是卡介苗并没有控

制疾病的传播,并且给 AIDS 等免疫功能受损的患者接种卡介苗后还可能导致严重的播散性结核病^[4],全球 20 亿人感染结核分枝杆菌但大多数人都没有明显的临床症状,在这样的潜伏感染者中,主要是由病原体与机体免疫细胞相互作用的结果^[5]。接种卡介苗后,还会对结核病患者的实验室诊断产生一定的影响。鉴于上述特点,目前许多研究者都在致力于研制新型的安全的高效的结核病疫苗。

1 结核分枝杆菌 H37Ra 菌株抗结核作用特点

近年来,由于分子生物学技术的发展与应用,使得新型候选疫苗大量涌现,如佐剂联合疫苗、重组 BCG 疫苗、DNA 疫苗、蛋白质亚单位疫苗等。但是结核分枝杆菌是典型的胞内寄生菌,其免疫主要依靠细胞免疫,因此全菌免疫也许优于其他候选的新型疫苗。同时,结核病免疫属于传染性免疫,选用活菌作为疫苗有其独特的作用。近年来的研究表明:活菌疫苗的免疫原性要比灭活菌疫苗的免疫原性强得多:它免疫接种量小,在体内可以长期存活生存繁殖,抗原可以持续刺激免疫系统,从而可引发持久的免疫应答。H37Ra 菌株是由人型结核分枝杆菌有毒株 H37Rv 菌株减毒而来的无毒株,基本上保留了有毒株的免疫原性,对人毒力极弱,对宿主相对安全,国外有学者已经通过体外实验证实 H37Ra 菌株与 BCG 在人源性巨噬细胞内的繁殖速度远远低于结核分枝杆菌毒株 H37Rv 菌株,同时 BCG 毒力下降的同时伴随着抗原性的减弱,缺少了 RD1 和 RD2 区域编码的 ESAT6、CFP10、MPT64 抗原蛋白^[6]而 H37Ra 含有这些缺失的编码区,这些表明了 H37Ra 的免疫原性好、毒力较低、用着疫苗可能比较安全有效。近年来也有学者研究表明, H37Ra 菌株能充分活化巨噬细胞,因此人型结核分枝菌 H37Ra 菌株作为候选减毒活疫苗具有相对优势。

2 结核分枝杆菌 H37Ra 菌株能在宿主体内长期定植

活疫苗必备的基本条件之一是要能在宿主体内定植,且定植时间的长短应能诱导宿主发生记忆免疫。实验发现 H37Ra 菌株在小鼠脾脏内的生存时间超过两个月,这表明 H37Ra 菌株可在小鼠脾脏内长期生存。小鼠脾脏富含淋巴细胞,因此 H37Ra 菌株可长期刺激小鼠的免疫系统,从而引发持久的记忆免疫。与脾脏内的定植相似, H37Ra 菌株可在小鼠肺脏内长期定植。但 H37Ra 菌株和 BCG 同期在脾脏中定植的细菌数超过肺脏中定植的细菌数,

此结果可能与脾脏和肺脏的解剖学特点及功能相关。H37Ra 菌株和 BCG 分别经皮内接种小鼠后,局部的巨噬细胞发挥第一线防御作用—将它们吞噬。在 H37Ra 菌株和 BCG 免疫小鼠的初期,由于体内无抗结核分枝杆菌的特异性免疫,因而巨噬细胞不能立即杀灭胞内吞噬的 H37Ra 菌株或 BCG。这些巨噬细胞经淋巴血液循环将 H37Ra 菌株或 BCG 播散至全身。脾脏是小鼠重要的外周免疫器官,同时它又是血细胞的“滤过器”,因而大多吞噬了 H37Ra 菌株或 BCG 的巨噬细胞会停留在脾脏中,它们通过与 T 淋巴细胞相互作用,从而诱发特异性的免疫应答。H37Ra 菌株及 BCG 尚具有一定的毒力,因而可在小鼠脾脏中继续繁殖一段时间。小鼠的肺脏不是免疫器官,因此只有少量吞噬了 H37Ra 菌株或 BCG 的巨噬细胞经血循环定居于肺脏,所以肺脏中定植的 H37Ra 菌株或 BCG 较少。Williams 等^[7]发现 BCG 免疫动物抵抗牛分枝杆菌攻击的保护效果优于抵抗结核分枝杆菌的攻击。因而对于预防大多由结核分枝杆菌感染所致的结核病来说, H37Ra 菌株具有 BCG 不可比拟的优越性^[8]。

3 结核分枝杆菌 H37Ra 菌株感染机体后能诱导巨噬细胞的充分活化

MTB 为典型的胞内致病菌,胞内菌清除主要依赖于固有免疫和诱导保护性细胞免疫。侵入机体的 MTB 既可被巨噬细胞吞噬和杀灭,也可通过多种特殊受体介导的内吞途径,阻止吞噬溶酶体的形成以及抗活性氧、活性氮等途径逃避杀伤机制而在巨噬细胞中存活、繁殖。对于胞内菌特异性免疫,普遍认为 CD₄ T 细胞产生 IFN- γ 是激活巨噬细胞抗菌活性的主要因素。巨噬细胞另一重要功能是对 MTB 抗原有呈递作用。巨噬细胞加工和提呈 MTB 抗原给 T 淋巴细胞,刺激特异性 CD₄ T 细胞增殖,并可与 T 细胞相互刺激其功能,从而放大特异性免疫效应。由 T 淋巴细胞和巨噬细胞介导的细胞免疫是机体抵抗 MTB 的主要防御机制,其中巨噬细胞不仅在非特异性甚至在特异性防御中,都起着非常重要的作用^[9]。

巨噬细胞的抗结核分枝杆菌机制可分为氧依赖性和非氧依赖性两类。非氧依赖型抗结核分枝杆菌活性包括众多因素,如低 pH、阳离子酸、溶菌酶、酸性和中性水解酶等。巨噬细胞吞噬 MTB 后,在细胞内形成吞噬小体。激活的巨噬细胞可引起呼吸爆发,产生大量活性氧介质(如 H₂O₂),并诱导产生 NO 合成酶,合成大量活性氮介质(如 NO),消灭吞

噬小体内的 MTB,或者抑制 MTB 繁殖,发挥抗菌作用。NO 是活化巨噬细胞杀灭 MTB 的重要效应分子,而氧介质与氮介质的联合作用则能明显增强巨噬细胞杀灭 MTB 功能^[10-11]。与此同时,活化的巨噬细胞还能分泌表达一系列抗结核细胞因子,如 IL-12、TNF- α 等。IL-12 是一种相对分子质量(Mr)为 75 000 的糖蛋白,由 p35 和 p40 链共价联结而成,p40 的作用强于 p35,通常检测 p40 代表 IL-12。IL-12 能促使 Th0 细胞向 Th1 细胞分化,在增强 Th1 型细胞免疫,介导抗结核免疫中起着十分重要的作用。对 MTB 慢性感染鼠模型研究发现,应用 IL-12DNA 疫苗接种,可以显著减少 MTB 数目。而 IL-12 基因或 IL-12 受体基因突变患者,容易出现播散性 BCG 感染^[12-13]。TNF- α 则能显著诱导感染 MTB 的巨噬细胞凋亡,促进结核肉芽肿形成,从而对宿主产生有利的免疫保护应答。TNF- α 仅在调节结 MTB 感染引起的 Th1 免疫反应中也有重要作用,TNF- α 缺陷的小鼠在肺部感染 MTB 后,很快死于过度 Th1 免疫反应活化引起的肉瘤和肺组织结构的损害;而早期通过转基因重建 TNF- α 则能提高小鼠存活率^[14]。因此对 TNF- α 表达水平的调节将影响机体的抗结核免疫反应。有研究表明结核分枝杆菌国际标准无毒株 H37Ra 菌株基因组 DNA 免疫小鼠后第 30d、60d,其腹腔巨噬细胞 NO、H₂O₂ 的产量、巨噬细胞 IL-12、TNF- α 的表达水平较未免疫组高,其差异具有统计学意义;虽然也略高于卡介苗组,但无统计学差异^[15]。该研究结果表明结核分枝杆菌 H37Ra 菌株能显著诱导巨噬细胞活化并产生大量的氮氧化物等效应物质和抗结核细胞因子,从而产生有利于宿主的抗结核免疫应答,且该作用与 BCG 相当,同时巨噬细胞对灭活菌 H37RV 菌株及活菌 H37Ra 菌株吞噬作用相比,后者被吞噬的情况更强^[16]。在体外研究中,发现感染 H37Ra 结核分枝杆菌后的巨噬细胞也能够产生更多的 NO、H₂O₂ 同时也增加了 IL-12、TNF- α 的表达水平^[17]。

4 结核分枝杆菌 H37Ra 菌株能诱导机体产生特异性细胞免疫应答

MTB 作为一种胞内寄生菌,机体主要通过细胞免疫将其杀灭清除。首先抗原递呈细胞的对抗原的递呈,经过致敏阶段、反应阶段、T 细胞分化为效应淋巴细胞并产生细胞因子,从而发生免疫效应。

TH 细胞根据所产生细胞因子的不同分化为不同的 Th 细胞亚群。IL-2 与 IL-2R 结合是促进 T 细胞增殖的一个条件。成熟的 Th0 在 IL-12 作用下分

化为 Th1 细胞,在 IL-4 作用下分化为 Th2 细胞。Th1 细胞分泌 IFN- α ,IL-12,TNF- γ 等细胞因子参与细胞免疫应答,其中 IFN- γ 能有效激活巨噬细胞,促巨噬细胞杀灭进入细胞内的病原菌。诱导巨噬细胞高表达 B7 和 MHCII 类分子,促进抗原的加工和提呈,促进 CTL 分化,辅助 B 细胞产生调理性抗体。刘来成^[18]等研究发现结核分支杆菌 H37Ra 菌株免疫小鼠后能活化 T 细胞增殖,激发产生高水平的 Th1 型细胞因子 IFN- γ 和 IL-2,从而产生抗结核保护性免疫应答,其水平与 BCG 免疫相当。而且与未免疫组比不仅能有效降低肺组织荷菌量还能减轻肺组织的病变。Th2 细胞分泌 IL-4, IL-5, IL-13 参与体液免疫应答,主要功能为促进 B 细胞发育和介导体液免疫应答。在 Th1 细胞辅助下(或以非 Th1 细胞依赖方式),初始 CD₈⁺ T 细胞分化成 CTL(活化的 CTL)。效应 CTL 分泌穿孔素(perforin)和粒酶(granzyme),穿孔素在靶细胞膜上形成孔道,使细胞裂解。颗粒酶通过孔道进入细胞,激活凋亡相关酶系统介导靶细胞凋亡。效应 CTL 表达 FasL,分泌 TNF- α ,TNF- β ,激活 caspase 信号转导途径,诱导靶细胞凋亡。有研究发现 H37Ra 菌株免疫小鼠后能活化 T 细胞增殖,刺激产生高水平的 Th1 型细胞因子 IFN- γ ,Th2 型细胞因子 IL-4 的水平也高于 NS 对照组,但 IFN- γ 升高较 IL-4 更明显,说明 H37Ra 菌株免疫小鼠后在体内诱导的特异性免疫反应以 Th1 型为主,但体液免疫在抗结核免疫中也起到作用^[19]。近年来,一些研究认为体液免疫产生的抗体在抵抗结核感染中也起着重要的作用,B 细胞和体液免疫可以调节免疫反应各种细胞内病原体,包括结核分枝杆菌。在小鼠的结核病模型中,它已被证明,B 细胞可以调节肉芽肿的反应水平、细胞因子的生产和 T 细胞反应^[20]。

目前认为 Th1 型免疫应答在防止结核菌感染中起着重要作用。活化的 Th1 细胞以分泌 IL-2、IFN- γ 为主要特征,主要介导细胞免疫应答,促进细胞毒性 T 细胞的杀伤作用,激活巨噬细胞杀伤胞内病原体^[21]。其中,IL-2 是 T 细胞活化的关键因子,为 T 细胞增殖(从 G0 期进入 S 期)所必需;除此以外,T 细胞从 G1 期进入 S 期还受到 IL-2 受体(IL-2R)的影响。可溶性 IL-2 受体(sIL-2R)是 T 细胞胞外部分 P55 链脱落、溶解在上清液中所为,其释放量与 T 淋巴细胞激活程度及膜受体表达率有关。sIL-2R 的表达可形成高亲和性的 IL-2 结合位点,并能与较低浓度的 IL-2 反应,从而在抗结核免疫中发挥着重要作用^[22]。研究发现^[23] H37Ra 菌株免疫

小鼠后其脾淋巴细胞刺激指数 SI 与未免疫组比较具有显著性差异($P<0.05$)，与 BCG 对照组无显著性差异；脾淋巴细胞 IL-2、sIL-2R 表达水平与未免疫组、BCG 对照组比较均有显著性差异($P<0.05$)，由此说明，H37Ra 免疫小鼠后能增强机体的特异性抗结核细胞免疫。

5 结语

目前使用活疫苗抗原可以提高疫苗对机体的自然保护性和敏感性，因此，确定安全、有效的结核病疫苗，可以对疫苗进行相关生物标记，测定在机体产生的生物效能和早期阶段疫苗生产的免疫稳定性^[24]。为能更好地控制结核病，不仅需要快速诊断和较短时间的化疗，更重要的是需要一种优于 BCG 或可强化 BCG 的疫苗即接触前疫苗，还需要针对结核分枝杆菌潜伏感染的治疗性疫苗。因此，选用活菌 H37Ra 作为疫苗不仅可以长时间在体内可持续较长时间，而且能够不断刺激机体产生持久的免疫反应，诱导机体产生特异的抗结核免疫保护作用，为开发 H37Ra 成为新型抗结核疫苗奠定了一定基础。然而，目前的研究还只是在动物体内进行，能否通过临床实验，成为抗结核的新型疫苗，为结核的防治带来希望还需要进一步的深入研究。

参考文献：

- [1]Kaufmann SH, Hussey G, Lambert PH. New vaccines for tuberculosis[J]. Lancet, 2010, 375(9731): 2110-2119. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60393-5
- [2]Ho MM, Southern J, Kang H, et al. WHO Informal Consultation on standardization and evaluation of BCG vaccines Geneva, Switzerland, 22-23 September, 2009 [J]. Vaccine, 2010, 28(43): 6945-6950.
- [3]Huygen K. On the use of DNA vaccines for the prophylaxis of Mycobacterial diseases[J]. Infect Immun, 2008, 71(4): 1613-1621. DOI: 10.1128/IAI.71.4.1613-1621.2003
- [4]Sonnenberg P, Glynn JR, Fielding K, et al. How soon after infection with HIV does the risk of tuberculosis start to increase? A retrospective cohort study in South African gold miners[J]. J Infect Dis, 2005, 191(2): 150-158. DOI: 10.1086/426827
- [5]Kaufmann SH, Gengenbacher M. Recombinant live vaccine candidates against tuberculosis[J]. Curr Opin Biotechnol, 2012, 23(6): 900-907. DOI: 10.1016/j.copbio.2012.03.007
- [6]Kalra M, Grover A, Mehta N, et al. Supplementation with RD antigens enhances the protective efficacy of BCG in tuberculous mice[J]. Clin Immunol, 2007, 125(2): 173-183.
- [7]Williams A, Davies A, Marsh PD, et al. Comparison of the protective efficacy of bacilli Calmette-Guerin vaccination against aerosol challenge with *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*[J]. Clin Infect Dis, 2000, 30(S3): S299-301.
- [8]He ZL, Du FW, Du XZ. The viable *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra strain induces a stronger mouse macrophage response compared to the heat-inactivated H37Rv strain[J]. Mol Med Reports, 2013, 7(5): 1597-1602. DOI: 10.3892/mmr.2013.1363
- [9]Behar SM, Martin CJ, Booty MG, et al. Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Mucosal Immunol, 2011, 4(3): 279-287. DOI: 10.1038/mi.2011.3
- [10]Choi HS, Rai PR, Chu HW, et al. Analysis of nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in human pulmonary tuberculosis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2002, 166(2): 178-186.
- [11]Yang CS, Yuk JM, Jo EK. The role of nitric oxide in *Mycobacterial* infections[J]. Immune Netw, 2009, 9(2): 46-52. DOI: 10.4110/in.2009.9.2.46
- [12]Robinson CM, Nau GJ. Interleukin-12 and interleukin-27 regulate macrophage control of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. J Infect Dis, 2008, 198(3): 359-366. DOI: 10.1086/589774
- [13]Ottenhoff TH, Kumararatne D, Casanova JL. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-I cytokines in immunity to intracellular bacteria [J]. Immunol Today, 1998, 19(11): 491-494.
- [14]Zganiacz A, Santosuosso M, Wang J, et al. TNF-alpha is a critical negative regulator of type 1 immune activation during intracellular bacterial infection[J]. J Clin Invest, 2004, 113(3): 401-413.
- [15]Zhang WJ, Wu F, Wang P, et al. Pilot study on the function of anti-bacterium immunity of the genome DNA of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra strain[J]. Chin J Pathophysiol, 2008, 24(8): 1534-1537. (in Chinese)
- [16]张万江, 吴芳, 王萍, 等. 结核分枝杆菌国际标准无毒株 H37Ra 菌株基因组 DNA 抗结核免疫效应的初步研究[J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(8): 1534-1537.
- [17]He ZL, Du XZ. Infection of macrophages with viable strain H37Ra and Heat-Killed H37Rv[J]. Chin J Immunol, 2011, 08(001): 675-680. DOI: 0.3969/j.issn.1000-484X (in Chinese)
- [18]何宗林, 杜先智. 活菌 H37Ra 与灭活菌 H37Rv 感染小鼠腹腔巨噬细胞的实验研究[J]. 中国免疫学杂志, 2011, 08(001): 675-680. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X
- [19]Liu LC, Wang SL, Lu XY, et al. Study on macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra in vitro[J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2011, 27(11): 1195-1197. (in Chinese)
- [20]刘来成, 王淑玲, 卢贤瑜, 等. 结核杆菌 H37Ra 感染巨噬细胞的研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(11): 1195-1197.
- [21]Liu LC, Wang SL, Fan XL, et al. Immune response induced by *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra in mice[J]. Chin J Biologicals, 2008, 21(5): 391-394. (in Chinese)
- [22]刘来成, 王淑玲, 范雄林, 等. 结核菌 H37Ra 在小鼠体内诱导的免疫应答[J]. 中国生物制品学杂志, 2008, 21(5): 391-394.
- [23]Glatman-Freedman A. Advances in antibody-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*: implications for a novel vaccine strategy[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2003, 39(1): 9-16. DOI: 10.1016/S0928-8244(03)00172-X

(下转第 323 页)