

增强 ESAT6-CFP10 融合蛋白诱导小鼠细胞免疫应答佐剂的筛选

由鹏飞^{1,2}, 叶祥忠², 葛胜祥³, 李益民², 张怡轩¹

【摘要】 目的 筛选能增强特异性抗原早期分泌抗原靶 6 蛋白(Early secretory antigenic target 6, ESAT6)-培养滤出液蛋白-10(Culture filtrate protein 10, CFP-10)融合蛋白(EIC0)诱导小鼠细胞免疫应答的佐剂, 建立基于细胞免疫应答的小鼠模型, 以评价基于体外干扰素 γ 释放分析(IFN γ release assay, IGRA)结核诊断方法中特异性刺激抗原 EIC0 的活性。方法 建立小鼠 IFN γ 双抗体夹心 SABC-ELISA 检测系统, 并验证系统的线性、灵敏度、重复性和特异性。将 BALB/c 小鼠随机分为 7 组: EIC0 + 单磷酸类脂 A(Monophosphoryl lipid A, MPL) + 双十八烷基二甲基溴化铵(Dimethyl dioctadecylammonium bromide, DDA)组、EIC0 + DDA 组、EIC0 + MPL 组、EIC0 + 弗氏不完全佐剂(IFA)组、EIC0 组、生理盐水组和 MPL + DDA 联合组, 每组 6 只, 经小鼠后肢内侧皮下免疫 3 次, 间隔 2 周, 免疫剂量为: EIC0 100 μg /只, MPL 25 μg /只, DDA 250 μg /只, IFA 100 μl /只。末次免疫 4 周后处死小鼠, 无菌取脾, 分离脾淋巴细胞, 加入 EIC0 进行培养, MTT 法检测特异性淋巴细胞增殖反应, ELISA 法检测培养上清中 IFN γ 水平。采用筛选出的最佳佐剂与抗原组合免疫 3 批 BALB/c 小鼠, 进行 IFN γ 诱生测定。结果 检测系统的线性范围为: 40 ~ 2 560 pg/ml ($R > 0.98$); 灵敏度为 40 pg/ml ; 变异系数(CV) < 15%, 检测大鼠、豚鼠和兔血清 IFN γ 均为阴性; EIC0 + MPL + DDA 组、EIC0 + IFA 组和 EIC0 + DDA 组小鼠特异性淋巴细胞增殖刺激指数均明显高于生理盐水组($P < 0.01$); EIC0 + MPL + DDA 组小鼠的脾淋巴细胞经 EIC0 体外刺激后, 产生的 IFN γ 水平明显高于其他组($P < 0.001$); 重复试验结果显示, EIC0 + MPL + DDA 组 3 批小鼠免疫后, 脾淋巴细胞诱生的 IFN γ 水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 EIC0 与 MPL 和 DDA 联合免疫所诱导的小鼠 Th1 型细胞免疫应答最强, 成功建立了用于评价刺激抗原 EIC0 活性的小鼠模型。

【关键词】 结核杆菌; 早期分泌抗原靶 6 蛋白; 培养滤出液蛋白-10; 融合蛋白; 佐剂; 干扰素

【中图分类号】 R378.91 + 1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1004-5503(2012)12-1607-04

Screening of adjuvant enhancing cellular immune response induced by ESAT6-CFP10 fusion protein in mice

YOU Peng-fei^{*}, YE Xiang-zhong, GE Sheng-xiang, LI Yi-min, ZHANG Yi-xuan (^{*}Department of Biotechnology Pharmaceuticals, College of Life Science and Biopharmaceutics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

【Abstract】 Objective To screen the adjuvant enhancing the cellular immune response induced by early secretory antigenic target 6 (ESAT6)-culture filtrate protein-10 (CFP10) in mice, and establish an animal model based on cellular immune response for evaluation of activity of specific stimulating antigen EIC0 in IFN γ release assay (IGRA) for diagnosis of tuberculosis (TB). **Methods** Double antibody sandwich SABC-ELISA system for mouse IFN γ was developed and verified for linearity, sensitivity, reproducibility and specificity. BALB/c mice were randomly divided into seven groups, 6 for each, and immunized s.c. with EIC0 + monophosphoryl lipid A (MPL) + dimethyl dioctadecylammonium bromide (DDA), EIC0 + DDA, EIC0 + MPL, EIC0 + IFA, EIC0, physiological saline and MPL + DDA for 3 times, respectively, each at an interval of 2 weeks. The dosages of EIC0, MPL, DDA and IFA for immunization were 100 μg , 25 μg , 250 μg and 100 μl , respectively. The mice were killed 4 weeks after the last immunization, and their spleens were collected aseptically, from which splenic lymphocytes were isolated, cultured with EIC0, then determined for proliferation level by MTT method, and for IFN γ level in culture supernatant by ELISA. Three batches of BALB/c mice were immunized with the screened adjuvant combined with antigen, and determined for IFN γ induced. **Results** The linear range, sensitivity and CV value of developed SABC-ELISA system were 40 ~ 2 560 pg/ml ($R > 0.98$), 40 $\mu\text{g/ml}$ and less than 15% respectively, by which all the detection results of IFN γ in rat, guinea pig and rabbit sera were negative. The stimulating index(SI) of specific lymphocyte proliferation in EIC0 + MPL + DDA, EIC0 + IFA and EIC0 + DDA groups were significantly higher than those in physiological saline group ($P < 0.01$). The IFN γ level secreted by lymphocytes in EIC0 + MPL + DDA group after stimulation with EIC0 in vitro was significantly higher than those in other groups ($P < 0.001$). No significant differences were observed in IFN γ levels induced in 3 batches of mice in EIC0 + MPL + DDA group ($P > 0.05$). **Conclusion** The immunization with

基金项目: 十一五重大专项(2008ZX10003-004).

作者单位: 1 沈阳药科大学生命科学与生物制药学院生物技术制药教研室(沈阳 110016); 2 北京万泰生物药业股份有限公司(北京 102206);

3 厦门大学生命科学学院国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心(厦门 361005).

通讯作者: 叶祥忠, E-mail: yxzh_hb@163.com

E1C0 in a combination with MPL and DDA elicited a strong Th1 cellular immune response in mice. Mouse model for evaluation of activity of E1C0 antigen was successfully established.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Early secretory antigenic target 6 (ESAT6); Culture filtrate protein-10 (CFP10); Fusion protein; Adjuvant; Interferon

结核分枝杆菌感染不仅可引发临床上的结核病,同时也存在很高比例的潜伏感染,给结核病的治疗和预防带来较大困难。结核菌素皮试(Tuberculin skin test, TST)是长期以来快速诊断结核杆菌潜在感染的唯一手段,但该方法特异性较低,给结核病的诊断带来很大困难。随着免疫学技术的发展,建立了基于体外干扰素 γ 释放分析(IFN γ release assay, IGRA)诊断结核病的方法。该方法是通过检测人外周血中T淋巴细胞经结核特异性抗原刺激后所产生的IFN γ 的量来判定结核杆菌感染情况,较TST方法具有更强的特异性和更高的灵敏度^[1]。

早期分泌抗原靶6蛋白(Early secretory antigenic target 6, ESAT6)和培养滤出液蛋白-10(Culture filtrate protein-10, CFP-10)的编码基因只特定存在于结核分枝杆菌而缺失于BCG中的开放读码框RD1,可有效提高结核诊断的特异性 and 发现结核菌潜伏感染,因此,本研究选择ESAT6-CFP10融合蛋白(E1C0)作为体外IFN γ 释放反应的特异性刺激抗原。目前,国内外尚未见相关报道。若采用人血评价E1C0刺激IFN γ 的释放活性难度较大:一方面采集人血细胞进行E1C0的生产质控有悖伦理,另一方面无法找到结核感染且稳定分泌IFN γ 的人血细胞。结核的保护性反应主要基于Th1型细胞免疫应答,可通过IFN γ 的释放量进行评价^[2]。但抗原多肽通常免疫原性较差,需要与合适的佐剂联合应用才能达到良好的免疫效果。因此,本实验通过比较不同佐剂增强E1C0诱导小鼠Th1型细胞免疫应答的差异,筛选能稳定增强小鼠淋巴细胞经E1C0体外刺激释放IFN γ 水平的佐剂,以建立可用于不同批次E1C0活性评价的实验动物模型。

1. 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级BALB/c小鼠,雌性,6~8周龄,体重18~22g,购自中国军事医学科学院动物实验中心,动物合格证号:0005506。

1.2 主要试剂

单磷酸类脂A(Monophosphoryl lipid A, MPL)、ConA和弗氏不完全佐剂(IFA)购自Sigma公司;双十八烷基二甲基溴化铵(Dimethyl dioctadecylammonium bromide, DDA)购自百灵威科技有限公司;ESAT6-

CFP10融合蛋白(E1C0)由厦门大学提供;鲎试剂($\lambda = 0.125$ EU/ml)购自湛江安度斯生物有限公司;RPMI-1640培养基和胎牛血清购自GIBCO公司;小鼠IFN γ 单抗、生物素标记的小鼠IFN γ 单抗和小鼠IFN γ 标准品均购自BioLegend公司;含IFN γ 的大鼠、豚鼠、兔血清、链霉亲和素标记的HRP、样品稀释液、酶稀释液、显色液和终止液均由北京万泰生物药业股份有限公司提供。

1.3 小鼠IFN γ 双抗体夹心链霉亲和素-生物素复合物(SABC)-ELISA检测系统的建立

参考BioLegend公司说明书,根据其推荐的抗体使用浓度,通过单因素试验、正交试验和平行试验筛选包被缓冲液、封闭液、样品稀释液、生物素标记抗体稀释液、酶稀释液,确定反应时间、抗体包被浓度、生物素标记抗体使用浓度及酶浓度,建立IFN γ 双抗体夹心ELISA检测方法:抗体按0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 包被酶标板,100 $\mu\text{l}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育2 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;加封闭液[5%蔗糖,1% BSA,0.1%山梨醇,20 mmol/L PB(pH 7.5)],200 $\mu\text{l}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育2 h;加样品,100 $\mu\text{l}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育1.5 h;PBST洗板5次,加生物素标记的小鼠IFN γ 单抗(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$),100 $\mu\text{l}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育1 h;PBST洗板5次,加链霉亲和素标记的HRP(1:5 000稀释),100 $\mu\text{l}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育30 min;PBST洗板5次,加显色液,100 $\mu\text{l}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育20 min;加2 mol/L H_2SO_4 终止反应,50 $\mu\text{l}/\text{孔}$,读取 $A_{450/630}$ 值。验证检测系统的线性、灵敏度、重复性,采用含IFN γ 的大鼠、豚鼠、兔血清验证该系统的特异性。

1.4 E1C0内毒素的检测

采用鲎试剂凝胶法,将E1C0稀释至使用浓度(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$),检测限定为1 EU/ml,参照鲎试剂使用说明操作,检测E1C0中的内毒素含量。

1.5 小鼠分组及免疫

将BALB/c小鼠随机分为7组:E1C0 + MPL + DDA组、E1C0 + DDA组、E1C0 + MPL组、E1C0 + IFA组、E1C0组、生理盐水组和MPL + DDA组,每组6只。参照文献[3]方法处理MPL和DDA:MPL用注射用水溶解,70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30 s,超声30 s,重复2次;DDA用注射用水溶解,80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴10 min,冷却至室温。将MPL和/或DDA与E1C0溶液均匀混合。免疫剂量分别为:E1C0 100 $\mu\text{g}/\text{只}$,MPL 25 $\mu\text{g}/\text{只}$,DDA 250 $\mu\text{g}/\text{只}$,IFA 100 $\mu\text{l}/\text{只}$ 。免疫方式为:经小

鼠后肢内侧皮下多点接种,共免疫 3 次,间隔 2 周。

1.6 脾淋巴细胞的分离

末次免疫 4 周后,将小鼠引颈处死,无菌取脾脏,置于平皿的滤网上,加入 4 ml 淋巴细胞分离液,研磨,收集细胞悬液,2 000 r/min 离心 20 min,吸取白色单核细胞层,用 RPMI1640 培养液洗涤 2 次后计数,活细胞数应在 95% 以上。

1.7 特异性淋巴细胞增殖试验

采用 MTT 法。用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液调整各组小鼠脾淋巴细胞密度为 5×10^9 个/L,加入 96 孔板中,200 μ l/孔,试验组加入 E1C0 蛋白,10 μ l/孔(0.4 μ g),对照组不加 E1C0 蛋白,调零孔不加脾细胞。于 37 $^{\circ}$ C 培养 68 h 后,加入 5 g/L 的 MTT,20 μ l/孔,培养 4 h;3 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入 DMSO,150 μ l/孔,振荡 10 min,酶标仪测定 A_{490} 值,并计算刺激指数(Stimulating index, SI)。

$$SI = \text{试验组 } A_{490} \text{ 值} / \text{对照组 } A_{490} \text{ 值}$$

1.8 免疫小鼠脾淋巴细胞诱生 IFN γ 的检测

用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液调整各组脾淋巴细胞密度为 5×10^9 个/L,将细胞悬液分装至 2 ml EP 管中,1 ml/管,试验管加入 E1C0 蛋白,25 μ l/管(2 μ g),阳性对照管加入 ConA,25 μ l/管(2 μ g),阴性对照管不加刺激物。于 37 $^{\circ}$ C 培养 72 h,培养液以 3 000 r/min 离心 10 min,收集上清,于 -20 $^{\circ}$ C 冻存,采用建立的小鼠 IFN γ 双抗体夹心 ELISA 法检测样品的 IFN γ 浓度。

1.9 重复验证试验

采用上述试验筛选出的最佳佐剂与抗原组合免疫 3 批 BALB/c 小鼠,每批 10 只,按照 1.8 项方法进行 IFN γ 诱生测定。

1.10 统计学分析

应用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2. 结果

2.1 小鼠 IFN γ 双抗体夹心 SABC-ELISA 检测系统的线性、灵敏度、重复性和特异性

检测系统的线性范围为 40 ~ 2 560 pg/ml, $R > 0.98$, 见图 1; 灵敏度为 40 pg/ml; 变异系数(CV) < 15%; 该系统检测大鼠、豚鼠和兔血清 IFN γ 均为阴性。

2.2 E1C0 的内毒素含量

检测结果显示, E1C0 稀释至 2 μ g/ml 时, 其内毒素含量低于 1 EU/ml, 不刺激小鼠产生 IFN γ , 符合实验要求。

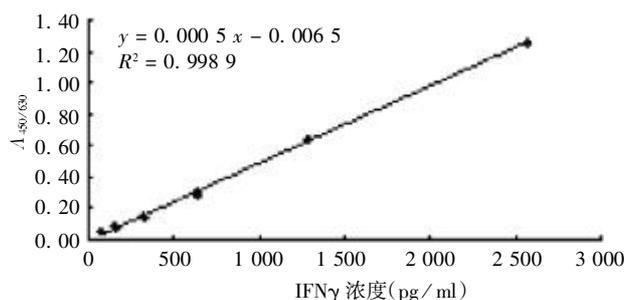


图 1 小鼠 IFN γ ELISA 标准曲线

Fig 1. Standard curve of ELISA for mouse IFN γ

2.3 特异性淋巴细胞增殖试验结果

MTT 法检测结果显示, E1C0 + MPL + DDA 组、E1C0 + IFA 组和 E1C0 + DDA 组小鼠的脾淋巴细胞 SI 均明显高于生理盐水组, 且差异均有统计学意义(P 值分别为 0.000、0.006 和 0.002); E1C0 + MPL 组、E1C0 组和 MPL + DDA 组增殖不明显, SI 与生理盐水组相比, 差异无统计学意义(P 值分别为 0.079、0.401 和 0.660); E1C0 + MPL + DDA 组 SI 值明显高于其他组, 且差异均有统计学意义(P 值均为 0)。见表 1。

表 1 不同佐剂与 E1C0 免疫诱导的抗原特异性淋巴细胞增殖反应($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab 1. Antigen-specific lymphocyte proliferation induced by various adjuvant and E1C0 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	SI
E1C0 + MPL + DDA	2.03 \pm 0.18
E1C0 + IFA	1.13 \pm 0.09
E1C0 + DDA	1.21 \pm 0.14
E1C0 + MPL	1.06 \pm 0.09
E1C0	0.98 \pm 0.07
MPL + DDA	0.97 \pm 0.11
生理盐水	0.94 \pm 0.08

2.4 各组小鼠脾淋巴细胞诱生的 IFN γ 水平

ELISA 检测结果显示, E1C0 + MPL + DDA 组小鼠的脾淋巴细胞经 E1C0 体外刺激后产生的 IFN γ 水平明显高于 E1C0 + IFA、E1C0 + DDA、E1C0 + MPL、E1C0、MPL + DDA 和生理盐水组, 且差异均有统计学意义(F 值分别为 3.134、2.012、3.258、5.084、4.991 和 5.179, P 值均为 0), 见表 2。

2.5 重复验证试验结果

检测结果显示, E1C0 + MPL + DDA 组 3 批小鼠免疫后脾淋巴细胞诱生的 IFN γ 水平分别为(1 434 \pm 298)、(1 685 \pm 324)和(1 502 \pm 303)pg/ml, 3 者比较差异无统计学意义(P 值分别为 0.155、0.689 和 0.297)。

表 2 不同佐剂与 E1C0 免疫小鼠脾淋巴细胞诱生的 IFN γ 水平($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab 2. IFN γ levels secreted in splenic lymphocytes of mice immunized with various adjuvant and E1C0 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	IFN γ 浓度(pg/ml)
E1C0 + MPL + DDA	1 892 \pm 247
E1C0 + IFA	187 \pm 53
E1C0 + DDA	306 \pm 79
E1C0 + MPL	124 \pm 47
E1C0	82 \pm 11
MPL + DDA	58 \pm 12
生理盐水	49 \pm 9

3. 讨论

采用体外 IFN γ 释放试验诊断结核感染或结核病, 结核分枝杆菌特异性体外刺激抗原的选择至关重要。IGRA 方法建立早期使用结核菌素纯蛋白衍生物(Purified protein derivatives, PPD)作为刺激抗原, 但其特异性和灵敏度均不理想。1999 年, Behr 等^[4]发现了 129 个存在于天然结核分枝杆菌而缺失于卡介苗菌株(BCG)中的开放读码框, 这些缺失的部分被划分为 16 个区域, 分别命名为 *RDI* ~ *RDI6*, 其中 *RDI* 被证实所有的 BCG 中均不存在, 因此, 其最具有编码特异性抗原的潜质。ESAT-6 和 CFP-10 的蛋白编码来源于 *RDI*, 二者联合作为刺激抗原的灵敏度和特异性显著优于 PPD^[5]。

E1C0 作为免疫优势抗原用于结核亚单位疫苗的研究中, 其单独免疫诱导的细胞免疫应答较差, 因此, 本实验选用不同佐剂与 E1C0 联合免疫小鼠, 考察其对细胞免疫应答的影响。IFA 是一种最常用的动物免疫佐剂, 但其只能诱导 Th2 型细胞应答。MPL 是一种毒性较低、可用于人体的佐剂, 能刺激巨噬细胞分泌细胞因子, 同时增强抗原的摄取和递呈, 从而诱导强烈的 Th1 型细胞免疫应答^[6]。MPL 虽然可以单独使用, 但其疏水性通常需与一些传递介质同时应用, 如表面活性剂 QS21 等^[7]。DDA 也是一种主要诱导 Th1 型细胞应答的佐剂, 可增强抗原的递呈^[8]。本实验选择 E1C0 与 MPL 和 DDA 联合免疫, 获得了良好的细胞免疫应答效果, 但 MPL 和 DDA 单独应用时效果不显著。

研究证实, 小鼠和人对结核杆菌的感染保护主要源于 Th1 型细胞应答, 而 IFN γ 是评价 Th1 型细胞

应答水平的一项重要指标^[9]。本研究结果表明, 虽然 E1C0 自身免疫原性较差, 但与佐剂 MPL 和 DDA 联合应用可显著提高其细胞免疫应答水平, 免疫小鼠的 IFN γ 体外释放水平较高, 且不同批次小鼠的体外 IFN γ 释放水平无明显差异。本文成功构建了用于 E1C0 活性质控的小鼠模型, 同时也为结核多肽疫苗的研发奠定了基础。

参考文献

- [1] Syed Ahamed Kabeer B, Raman B, Thomas A, et al. Role of QuantiFERON-TB gold, interferon gamma inducible protein-10 and tuberculin skin test in active tuberculosis diagnosis [J]. PLoS One, 2010, 5 (2): e9051.
- [2] Gao HF, Li K, Yu SS, et al. A novel DNA vaccine containing multiple TB-specific epitopes cast in a natural structure elicits enhanced Th1 immunity compared with BCG [J]. Microbiol Immunol, 2009, 53 (10): 541-549.
- [3] Sable SB, Verma I, Khuller GK. Multicomponent antituberculous subunit vaccine based on immunodominant antigens of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Vaccine, 2005, 23 (32): 4175-4184.
- [4] Behr MA, Wilson MA, Gill WP, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray [J]. Science, 1999, 284 (5419): 1520-1523.
- [5] Farris AB, Branda JA. QuantiFERON-TB gold assay for tuberculosis infection [J]. Clin Microbiol Newslett, 2007, 29 (17): 129-136.
- [6] Didierlaurent AM, Morel S, Lockman L, et al. AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity [J]. J Immunol, 2009, 183 (10): 6186-6197.
- [7] Stoute JA, Slaoui M, Heppner DG, et al. A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. RTS, S Malaria Vaccine Evaluation Group [J]. N Engl J Med, 1997, 336(2): 86-91.
- [8] Moreno-Mendieta SA, Rocha-Zavaleta L, Rodriguez-Sanoja R. Adjuvants in tuberculosis vaccine development [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2010, 58(1): 75-84.
- [9] 姜雯雯, 景涛, 于红娟, 等. 结核融合蛋白 AMM 亚单位疫苗强化 BCG 初始免疫的免疫效应 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2009, 29 (7): 631-635.

(收稿日期: 2012-02-21)