

# 壳聚糖纳米化的结核杆菌 ESAT-6 和 FL 重组 DNA 疫苗对小鼠产生 Th1 和 Th2 型细胞因子的影响

卢燕来,冯旰珠,蒋青桃,邱文,赵聃,张婧,王迎伟\*

(南京医科大学微生物与免疫学系,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:探讨壳聚糖纳米包被的结核杆菌早期分泌性抗原(6 kd early secretory antigenic target,ESAT-6)与 fms 样酪氨酸激酶 3 配体 (fms-like tyrosine kinase 3 ligand,FL) 重组 DNA 疫苗接种 C57BL/6 小鼠对其 Th1 和 Th2 型细胞因子生成的影响。方法:制备壳聚糖(nano-chitosan,CS)纳米颗粒,然后用 CS 纳米粒包被本室构建的结核杆菌 ESAT-6 与 FL 重组质粒(nano-ESAT-6-FL)、ESAT-6 质粒(nano-ESAT-6)、FL 质粒 (nano-FL)和 pIRES 载体(nano-pIRES),并进行电镜和 Western blot 鉴定。此后将上述质粒分别接种小鼠,同时给小鼠接种未用壳聚糖纳米颗粒包被的上述对应质粒,并设 PBS、CS 纳米粒及 BCG 作为对照。接种后 9 周,取小鼠脾细胞进行培养,并用结核菌纯化蛋白衍生物 (purified protein derivatives tuberculin,PPD) 给予刺激 72 h,然后用 ELISA 试剂盒检查小鼠脾细胞上清液中的 Th1 型细胞因子(IFN- $\gamma$ 、IL-12)和 Th2 型细胞因子(IL-4、IL-10)的分泌水平。结果:成功制备出壳聚糖纳米包被的结核杆菌 ESAT-6 和 FL 重组质粒(包括其他几种质粒),并证实被壳聚糖纳米包被的质粒可在真核细胞中表达。用壳聚糖纳米包被的 ESAT-6-FL 重组质粒免疫小鼠,其脾细胞上清液中的 IFN- $\gamma$  和 IL-12 水平显著高于未用壳聚糖纳米包被的相应质粒免疫组和其他对照组,而 IL-4 和 IL-10 的水平与未用壳聚糖纳米包被的相应质粒免疫组和其他实验组对照组相比均无明显升高。结论:壳聚糖纳米化的 ESAT-6-FL 重组质粒疫苗接种小鼠能够显著提高小鼠体内 Th1 型细胞因子的水平。提示用壳聚糖纳米包被结核杆菌 ESAT-6-FL 重组 DNA 疫苗能提高其细胞免疫效果。

**[关键词]** 壳聚糖纳米;ESAT-6 抗原;FL;重组 DNA 疫苗;细胞因子

**[中图分类号]** R392.11

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)05-580-07

doi:10.7655/NYDXBNS20140509

## Effects on production of Th1 and Th2 cytokines in mice immunized by recombinant plasmid DNA vaccine encoding *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 and FL genes encapsulated with nano-chitosan

Lu Yanlai, Feng Ganzhu, Jiang Qingtao, Qiu Wen, Zhao Dan, Zhang Jing, Wang Yingwei\*

(Department of Microbiology and Immunology, NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate Th1 and Th2 cytokines production in the C57BL/6 mice vaccinated by recombinant ESAT-6 (6KD early secretory antigenic target) and FL (fms-like tyrosine kinase 3 ligand) plasmid DNA vaccine encapsulated with nano-chitosan. **Methods:** The chitosan nanoparticles were prepared, and recombinant plasmid DNA vaccines, namely pIRES-ESAT-6-FL, pIRES-ESAT-6, pIRES-FL and pIRES plasmids, were encapsulated by the nano-chitosan. Then, the size and morphology of nano-ESAT-6-FL plasmid were examined by transmission electron microscope and the expressions of corresponding protein were detected using Western blot. C57BL/6 mice were immunized with nano-ESAT-6-FL, nano-ESAT-6, nano-FL, and nano-pIRES, respectively. At the same time, the corresponding plasmids without nano-chitosan encapsulation, and PBS, nano-chitosan and BCG were also immunized with C57BL/6 mice. Nine weeks after vaccination, the splenocytes separated from the immunized mice were stimulated with PPD for 72 h *in vitro*, and the Th1 cytokines (IFN- $\gamma$  and IL-12) and Th2 cytokines (IL-4 and IL-10) in splenocyte supernatant were measured using ELISA kit. **Results:** Nano-ESAT-6-FL and other chitosan-encapsulated plasmids were well prepared, and nano-ESAT-6-FL plasmid expressed the corresponding protein in glomerular mesangial cells (GMC). The mice immunized with nano-ESAT-6-FL

**[基金项目]** 江苏省高校自然科学研究面上项目(12KJB310007);南京医科大学科技发展基金重点项目(2011NJMU263);南京医科大学基础医学院优势学科教师培养基金项目(11JC005)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: wangyw1508@njmu.edu.cn

plasmid group(nano-ESAT-6-FL) had significantly higher levels of Th1 cytokines (IFN- $\gamma$  and IL-12) in splenocyte supernatants than those of the mice treated with control plasmids, but as for IL-4 and IL-10, the changes of the two cytokines in mice with mentioned-above plasmids did not show obvious differences. **Conclusion:** Recombinant ESAT-6-FL plasmid DNA vaccination encapsulated by nano-chitosan could markedly improve production of Th1 cytokines, suggesting that the mice vaccinated with nano-ESAT-6-FL plasmid DNA vaccine can enhance the cell immune responses.

[Key words] nano-chitosan; ESAT-6; FL; recombinant DNA vaccine; cytokine

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(05):580-586]

结核病 (tuberculosis) 是由结核杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, *M.tb*) 引起的重要的传染病, 感染全世界近 1/3 人口, 每年全世界新增病例约 800 万~1 000 万。目前, 我国结核病年发病人数约为 130 万, 约占全球发病人数的 14%, 位居全球第二位<sup>[1-2]</sup>。由于目前人类唯一可用的卡介苗 (Bacillus Calmette-Guerin, BCG) 对成人的保护效率仅为 0~85%<sup>[3]</sup>, 故结核病的传播已严重威胁人类的生命和生存质量。正鉴于此, 当前研制和改进预防 *M.tb* 感染的新型有效疫苗是一项十分迫切而重要的任务。

*M.tb* 是一种细胞内寄生菌, 其被杀灭有赖于 T 细胞介导的细胞免疫, 但 T 细胞的激活又需要细菌抗原的不断刺激<sup>[4-5]</sup>。已有研究发现, ESAT-6 是 *M.tb* 在巨噬细胞内寄生期间分泌的一种具有免疫原性的早期蛋白, 一般只出现在大多分枝杆菌的毒性菌株中, BCG 和非结核分枝杆菌中并不存在<sup>[6]</sup>。由于 ESAT-6 是 BCG 中丢失的关键基因, 加上该抗原又是 *M.tb* 早期分泌的且具有良好免疫原性的蛋白成分, 故作为疫苗研发的候选者, ESAT-6 的优势十分明显<sup>[7-9]</sup>。另外, 他人的报道和本课题组前期的研究已揭示, 用 ESAT-6 和细胞因子 FL 佐剂重组的 DNA 疫苗接种小鼠, 诱发的免疫应答在抵抗 *M.tb* 感染中能发挥一定的作用<sup>[7-11]</sup>。

近年来, 纳米材料作为多种疫苗的免疫佐剂已为研究者们所关注。有实验发现, 纳米颗粒不仅能有效保护注入体内的 DNA 免遭 DNA 酶的降解, 还能提高质粒转入真核细胞的效率<sup>[12-13]</sup>。壳聚糖 (chitosan, CN) 是一种生物相容性和生物降解型的新型材料, 具有无毒、无刺激性、无免疫原性及不致突变之优点<sup>[14]</sup>, 其分子中的氨基在酸性条件下能结合氢离子带正电荷, 并通过静电吸引与带负电荷的基因药物, 如 DNA、小干涉 RNA (siRNA) 和寡核苷酸等结合, 可形成结构相当致密的纳米级颗粒, 属于效率较高的基因转染和控释载体<sup>[15-16]</sup>。因此, 我们设想, 用壳聚糖纳米材料标记 *M.tb* 某种 DNA 疫苗或

许能增强该疫苗的免疫原性, 进而提高疫苗的免疫效果, 为此我们进行了以下实验。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试剂

pIRES 质粒由东南大学窦骏教授惠赠。T-FL 全长质粒由南京医科大学第一附属医院黄祖瑚教授惠赠。pIRES-FL、pIRES-ESAT-6 及 pIRES-ESAT-6-FL 质粒由本实验室制备保存<sup>[10]</sup>。壳聚糖为上海君创科技生物有限公司的产品, 批号 0090610, 分子量 15 000, 脱乙酰度为 95%。

#### 1.1.2 动物

C57BL/6 小鼠, 雌性, 6~8 周, 体重 18~22 g, 购自扬州大学比较医学中心。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 壳聚糖纳米粒及壳聚糖纳米粒包被质粒乳悬液的制备与鉴定

称取壳聚糖 210 mg, 配制 2% 的醋酸溶液 20 ml, 在保持搅拌状态下将壳聚糖加入到溶于 2% 乙酸中至壳聚糖完全溶解, 测 pH 值为 2.81, 逐滴加入 1% NaOH 至 pH 值为 4.98。取配制好的 0.1% TPP 溶液 5.25 ml 在保持不断搅拌下缓慢加入到上述溶液中, 出现均匀的乳白色悬液, 静置 15 min 未见沉淀出现。取上述分散均匀的壳聚糖纳米乳悬液加入 Eppendorf 管中 (每管 100  $\mu$ l), 再取本室以往已制备好的 pIRES-FL、pIRES-ESAT-6、pIRES-ESAT-6-FL 和 pIRES 质粒各 100  $\mu$ l (1  $\mu$ g/ $\mu$ l), 分别加入各 Eppendorf 管中, 于 50 $^{\circ}$ C 水浴 20 min, 再均匀漩涡 30 s, 即制成壳聚糖纳米包被质粒乳悬液。上述被壳聚糖纳米包被的质粒分别按文献<sup>[17]</sup>方法进行电子显微镜观察。

#### 1.2.2 壳聚糖纳米包被的 ESAT-6 和 FL 胞外段重组质粒 (nano-ESAT-6-FL) 表达相应蛋白的鉴定

采用 Western blot 方法进行。首先用 nano-

pIRES 和 nano-ESAT-6-FL 质粒,对细胞融合度约 70%的肾小球系膜细胞(GMC)进行转染。转染时每孔加入 30  $\mu\text{l}$  壳聚糖纳米质粒,混匀后于 37 $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养。60 h 后将培养板中细胞刮下,用 PBS 洗涤 1 次,每管加入 100  $\mu\text{l}$  细胞裂解液,收集裂解产物后煮沸 10 min。然后取 10  $\mu\text{l}$  蛋白上样于 15% 的 SDS-PAGE 胶进行电泳。电泳结束后转印至 PVDF 膜上。室温下封闭 1 h,再加入特异性抗 His 抗体或 FL 抗体或  $\beta$ -actin 抗体,4 $^{\circ}\text{C}$  震荡过夜。TBST 洗涤 3 次后,加入 HRP 标记的二抗,室温震荡孵育 1 h。洗涤后用 ECL 化学发光法检测。

### 1.2.3 实验动物接种

取 C57BL/6 小鼠,腿部剃毛,接种前 24 h 用布比卡因预处理,每只小鼠给予 100  $\mu\text{g}$  的相应质粒注射,nano-chitosan 组仅给予 100  $\mu\text{l}$  壳聚糖纳米粒悬液,其余各壳聚糖纳米包被质粒组皆为体积比为 50:50 的复合纳米疫苗混悬液。BCG 组免疫小鼠,经背部皮下多点注射 BCG(注射量为 0.5 mg/只);其余各组免疫,在小鼠两侧股四头肌行等剂量肌肉注射。另免疫结束后立即用基因活体导入仪在注射部位进行电击处理,条件为 50 mV,0.1 s。实验动物分组及每组小鼠数量见表 1,每组皆免疫 3 次,每次间隔 3 周。

表 1 壳聚糖纳米包被和未包被各种质粒的名称及其免疫小鼠的分组及数目

Table 1 Mice numbers and the groups vaccinated with nano-chitosan or no-chitosan encapsulating recombinant plasmids

接种物质 (实验分组)	壳聚糖纳米包被处理 (nano-chitosan)	壳聚糖纳米未包被处理 (no-chitosan)
PBS/CS	$n = 6$	$n = 6$
pIRES	$n = 6$	$n = 6$
FL	$n = 6$	$n = 6$
ESAT-6	$n = 6$	$n = 6$
ESAT-6-FL	$n = 6$	$n = 6$
BCG		$n = 6$

PBS 组中被壳聚糖纳米粒包被处理组实为 nano-chitosan,即纳米颗粒对照组。

### 1.2.4 小鼠脾细胞悬液的制备

为观察纳米疫苗免疫小鼠脾细胞分泌细胞因子的情况,全程免疫结束后,分离免疫小鼠脾脏细胞,制备脾细胞悬液。具体步骤如下:

取免疫结束后小鼠,无菌取出小鼠脾脏;用玻璃注射器针芯研磨组织,使分散的细胞滤过 200 目尼龙膜进入培养液中;收集脾细胞悬液,1 000 r/min

离心 10 min;以 1~2 ml RPMI-1640 培养液重悬细胞沉淀,加入 5 倍体积的红细胞裂解液,室温静置 5 min,1 500 r/min 离心 10 min,弃上清,重复 3 次;最后用细胞计数板计数细胞浓度。

### 1.2.5 脾细胞上清 Th1、Th2 型细胞因子的检测

将按上述方法分离制得的脾细胞置于 24 孔板中培养(每孔  $1 \times 10^6$  个细胞),随后用 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 PPD 刺激培养 72 h,收集上清冻存于 -20 $^{\circ}\text{C}$  备用。小鼠脾细胞上清中的 Th1 和 Th2 型代表因子(IFN- $\gamma$ 、IL-12 和 IL-4、IL-10)采用 ELISA 试剂盒测定。操作步骤如下:用 100  $\mu\text{l}$ /孔的抗体包被酶标板,4 $^{\circ}\text{C}$  过夜;洗板 3 次;封闭 1 h;洗板 3 次;加样本和标准品 100  $\mu\text{l}$ /孔,室温孵育 2 h;弃孔内液体,同法洗板 5 次;用相应的检测抗体(100  $\mu\text{l}$ /孔)室温下孵育 1 h;洗板 5 次。加入 HRP 工作液(100  $\mu\text{l}$ /孔)孵育 0.5 h;洗板 7 次后再加入 TMB 显色液,室温下避光显色 15 min 后,加入 2 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止其反应,并在波长 450 nm 处读值。

### 1.3 统计学方法

数据均以均数  $\pm$  标准误( $\bar{x} \pm s_x$ )表示,组内比较使用 two-way ANOVA,组间比较用 one-way ANOVA, $P \leq 0.05$  表示结果有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 壳聚糖纳米包被质粒的电镜观察

本研究按文献成功制备了壳聚糖纳米粒,用此纳米颗粒包被相应的质粒,即 nano-pIRES、nano-FL、nano-ESAT-6 和 nano-ESAT-6-FL。将上述包被的质粒置于透射电子显微镜下检查,结果显示,壳聚糖纳米粒及壳聚糖纳米包被的质粒(nano-ESAT-6-FL)呈实心的不规则球形,纳米包被质粒的粒径在 280~330 nm(图 1)。

### 2.2 壳聚糖纳米包被质粒的体外表达鉴定

Western blot 结果显示,壳聚糖纳米包被的重组质粒 nano-ESAT-6-FL 可成功转染 GMC 细胞,并能在转染该细胞 60 h 后表达相应的 FL 和 His 标签蛋白(图 2)。

### 2.3 Th1 型细胞因子的分泌水平

#### 2.3.1 小鼠脾细胞上清液中 IFN- $\gamma$ 的含量

为观察前述纳米包被的疫苗免疫小鼠后诱导 Th1 型细胞免疫应答的情况,在小鼠接种不同疫苗完成全程免疫后处死小鼠,取小鼠脾脏细胞,在培养上清中加入 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 PPD 孵育 72 h,然后收集上清检测其中 IFN- $\gamma$  的含量。结果表明,PBS、pIRES

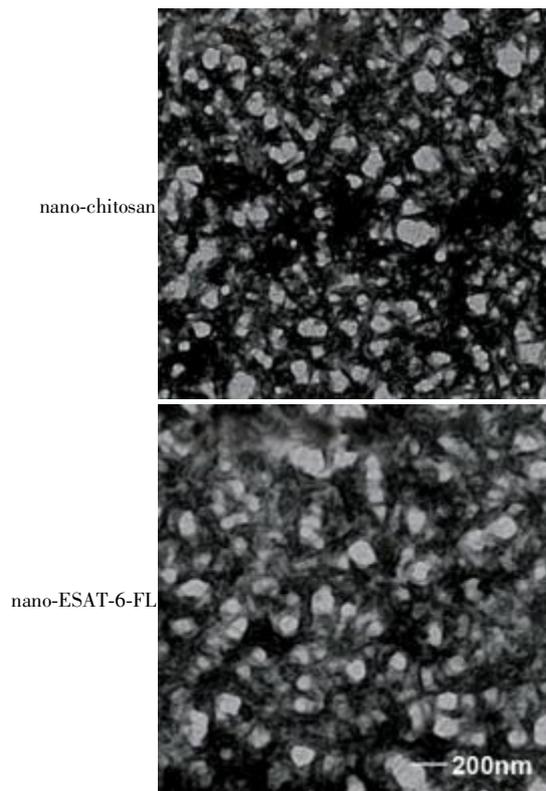
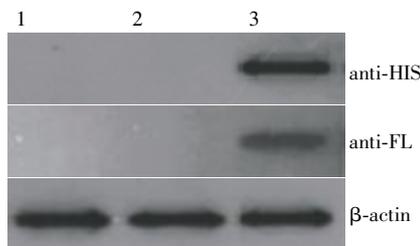


图 1 电镜下壳聚糖纳米粒及壳聚糖纳米包被的质粒(nano-ESAT-6-FL)的形态与大小

Figure 1 Transmission electron micrograph of nano-chitosan and nano-ESAT-6-FL plasmid



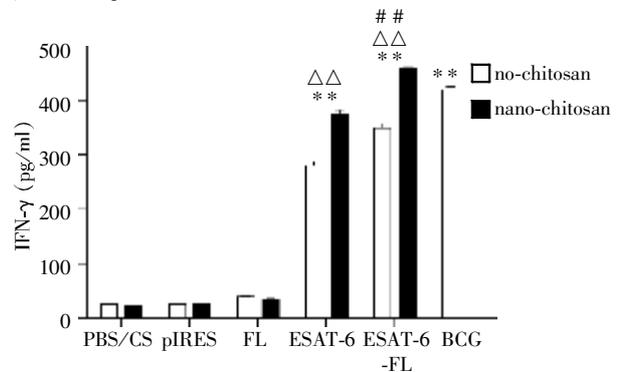
1:未转染的 GMC 细胞;2:转染 nano-pIRES 的 GMC 细胞;3:转染 nano-ESAT-6-FL 的 GMC 细胞。

图 2 壳聚糖纳米包被的质粒 (nano-ESAT-6-FL) 转染 GMC 细胞表达蛋白的 Western blot 鉴定

Figure 2 Identification of nano-ESAT-6-FL plasmids by Western blot after transfection in GMC cells

和 FL 不论是否用纳米包被,免疫后脾细胞上清中的 IFN- $\gamma$  均无明显升高,且均处于较低水平;nano-ESAT-6、ESAT-6、nano-ESAT-6-FL 和 ESAT-6-FL 组的 IFN- $\gamma$  的水平均显著上升( $P < 0.01$ )。其中,用壳聚糖纳米包被的 nano-ESAT-6 和 nano-ESAT-6-FL 可以诱导出较高水平的 IFN- $\gamma$  (分别为 373.3、457.5 pg/ml),明显高于未被壳聚糖纳米包被的相应质粒组( $P < 0.01$ )。所有组别中,以 nano-ESAT-6-FL 诱导

的 IFN- $\gamma$  水平最高,甚至高于 BCG 组( $P < 0.01$ )。另外,BCG 对照组也呈现较高的 IFN- $\gamma$  水平。具体数据见图 3。



与 PBS/CS、pIRES 或 FL 组比,  $**P < 0.01$ , IFN- $\gamma$  水平显著上升;  $\Delta\Delta P < 0.01$ , 指壳聚糖纳米包被的疫苗与相应未包被的疫苗相比, IFN- $\gamma$  水平明显升高;  $\#P < 0.01$ , 指 nano-ESAT-6-FL 组与 BCG 相比, IFN- $\gamma$  水平明显升高。

图 3 ELISA 法检测各组小鼠脾细胞培养上清液中的 IFN- $\gamma$  水平

Figure 3 The IFN- $\gamma$  concentrations in the culture supernatant of splenocytes of mice given with different treatments

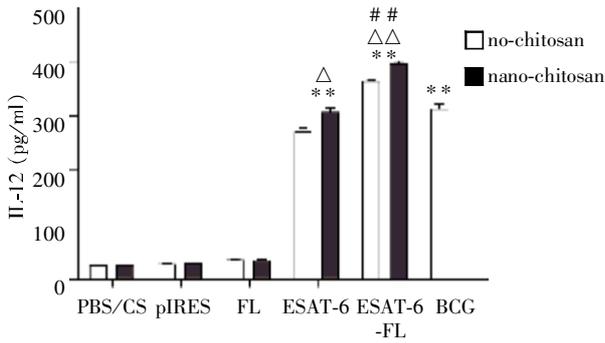
### 2.3.2 脾细胞上清液中的 IL-12 的含量

IL-12 检测结果表明,单独壳聚糖纳米颗粒(nano-chitosan)免疫组不影响小鼠脾细胞 IL-12 分泌水平,且 pIRES 空载质粒和 pIRES-FL 质粒免疫组也不能明显改变上清中 IL-12 含量,并均处于较低水平( $< 35$  pg/ml),同 PBS 或单独用 nano-chitosan 对照组相比无明显差异( $P > 0.05$ )。而用各种相应疫苗质粒免疫的小鼠组(即 nano-ESAT-6、ESAT-6、nano-ESAT-6-FL 和 ESAT-6-FL),其脾细胞上清中 IL-12 的水平均明显高于 pIRES 组或 pIRES-FL 和 PBS/CS 对照组( $P < 0.01$ )。其中壳聚糖纳米包被组(nano-ESAT-6、nano-ESAT-6-FL)上清中 IL-12 的水平升高更为明显,分别为 306.6、396.1 pg/ml,与未包被的相应质粒组相比差异较为显著( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。所有组别中,以 nano-ESAT-6-FL 诱导的 IL-12 水平最高,甚至高于 BCG 对照组( $P < 0.01$ ,图 4)。

### 2.4 Th2 型细胞因子的分泌水平

#### 2.4.1 脾细胞上清液中 IL-4 的含量

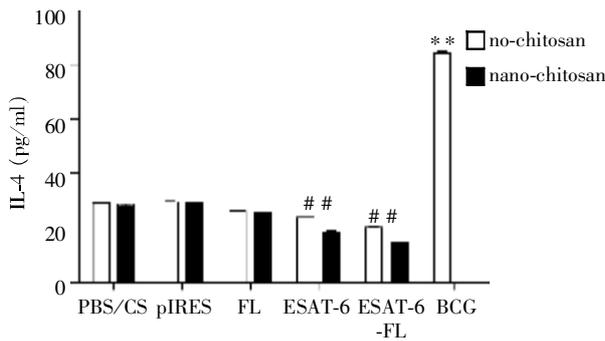
小鼠脾细胞上清液中的 IL-4 分泌水平的检测显示(图 5),各相应质粒免疫小鼠组,其 IL-4 含量均低于 30.0 pg/ml,仅 BCG 组 IL-4 较高,达到 85.0 pg/ml,与 PBS/CS、pIRES 和 FL 组相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。另壳聚糖包被的 nano-ESAT-6、nano-ESAT-6-FL 组,IL-4 的水平亦明显低于未用纳



\*\*P < 0.01, 代表实验组小鼠上清中 IL-12 水平比 PBS/CS、pIRES 或 pIRES-FL 组有显著上升;  $\Delta$ P < 0.05,  $\Delta\Delta$ P < 0.01, 表示壳聚糖纳米颗粒包被的相应质粒组, 小鼠脾细胞上清中 IL-12 水平较未用纳米颗粒包被的相应质粒组有明显上升或显著升高。##P < 0.01, 指 nano-ESAT-6-FL 组与 BCG 相比, IL-12 水平明显升高。

图 4 ELISA 法检测各组小鼠脾细胞培养上清液中的 IL-12 水平

Figure 4 The IL-12 concentrations in the culture supernatant of splenocyte from various groups



与 PBS/CS、pIRES、pIRES-FL 和 BCG 组相比, ##P < 0.01; 与其余各组相比, \*\*P < 0.01。

图 5 ELISA 法检测各组小鼠脾细胞培养上清液中 IL-4 含量  
Figure 5 The IL-4 concentrations in the culture supernatant of splenocyte from the mice were measured by ELISA

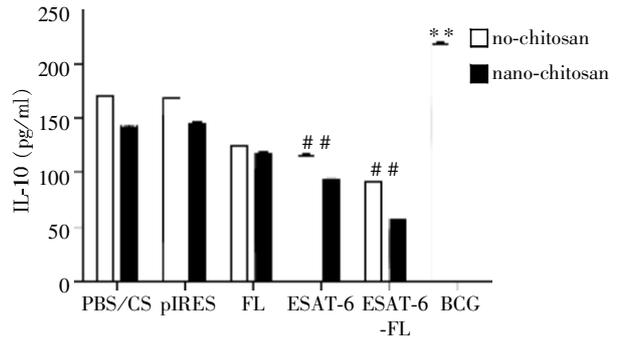
米颗粒包被组 ( $P < 0.01$ )。

#### 2.4.2 脾细胞上清液中 IL-10 的水平

检测各实验组脾细胞分泌的 IL-10 水平, 结果如图 6, 各 ESAT 质粒免疫小鼠组, 其 IL-10 的含量均低于 PBS/CS、pIRES 和 FL 组 ( $P < 0.01$ ), 且 IL-10 含量均低于 140.0 pg/ml (只有 BCG 组 IL-10 最高, 达到 216.5 pg/ml)。此外, 壳聚糖纳米颗粒包被的 nano-ESAT 和 nano-ESAT-6-FL 组小鼠的脾细胞上清液中 IL-10 的水平明显低于相应的未用壳聚糖纳米颗粒包被组 ( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

结核病是一种人类重要的传染病。近年来由于耐药株的出现、HIV 合并感染以及大规模高危人群



与 PBS/CS、pIRES、pIRES-FL 和 BCG 组相比, ##P < 0.01; 与其余各组相比, \*\*P < 0.01。

图 6 ELISA 法检测各组小鼠脾细胞培养上清液中的 IL-10 含量

Figure 6 The IL-10 level in the culture supernatant of mice splenocyte in different groups

流动、BCG 的预防效果下降等原因, 导致结核病的发病率日趋上升, 需要研究开发新型结核菌疫苗进行防治<sup>[18-19]</sup>。由于机体抵抗 *M.tb* 感染最终有赖于宿主的细胞免疫(尤其是 Th1 型的免疫应答), 因此, 设计新型的抗结核疫苗显然应以如何提高 Th1 型细胞反应为重要策略。

ESAT-6 是从 *M.tb* 早期培养物滤液中分离得到的一种分泌性蛋白(分子量仅为 6 000), 其基因位于 *M.tb* 的 RD1 区域内, 该区域在 BCG 和非致病性的 *M.tb* 中已经丢失。鉴于 ESAT6 含有多个 T、B 细胞表位, 能诱导机体产生保护性的细胞和体液免疫应答, 故其作为一种免疫原已得到了广泛的关注<sup>[7,10]</sup>。本课题以往的研究证实, 构建成功的 *M.tb* ESAT-6 质粒 DNA 疫苗能够提高小鼠的免疫功能, 但由于 ESAT-6 质粒 DNA 疫苗免疫原性偏弱, 故在疫苗设计时, 我们又将 *M.tb* ESAT-6 与 FL 胞外段基因进行了重组, 制备出 ESAT-6-FL 重组质粒疫苗, 给小鼠接种后发现, 该重组疫苗免疫效果明显优于未行重组的 ESAT-6 或 FL 质粒疫苗。

DNA 疫苗的缺点之一是免疫原性相对较弱。尽管我们过去的实验已将 ESAT-6 与 FL 胞外段基因进行重组, 构建出了 ESAT-6-FL 重组质粒 DNA 疫苗。但就其免疫原性而言, 该重组 DNA 疫苗的免疫效果仍有待进一步提高。为此, 本研究从提高 DNA 疫苗的免疫原性着手, 试图用纳米材料作为佐剂对已构建的重组质粒疫苗进行包被, 以期达到提高上述疫苗免疫效果之目的。

壳聚糖是甲壳素脱乙酰化而得的一种阳离子天然多糖, 具有低细胞毒性、低免疫原性、良好的生物相容性和生物可降解性<sup>[20]</sup>。在本课题组以往的研究

中已制备出壳聚糖纳米粒,并成功用壳聚糖纳米包被了一些质粒 DNA 疫苗,发现壳聚糖纳米不仅能保护 DNA 免受 DNase I 的降解,还能通过细胞内吞作用携带目的基因进入细胞,并表达相应的目的蛋白<sup>[17]</sup>。

本研究中,利用已制备的壳聚糖纳米颗粒包被构建成功的 *M.tb* ESAT-6 和 ESAT-6-FL 重组质粒,再用电镜和 Western blot 方法鉴定后,将此纳米化的质粒 DNA 疫苗(包括未纳米化的相应质粒对照)接种于小鼠,检测了小鼠体内 Th1 型细胞因子(IFN- $\gamma$ 、IL-12)和 Th2 型细胞因子(IL-4、IL-10)的分泌情况,结果发现,nano-ESAT-6-FL 和 nano-ESAT-6 质粒 DNA 疫苗免疫的小鼠,其脾淋巴细胞上清中 IFN- $\gamma$ 、IL-12 的分泌量明显高于其他各组,但这两组的 IL-4、IL-10 分泌水平无明显升高,甚至还低于其他各组,尤其是低于 BCG 组,提示上述壳聚糖纳米包被的重组疫苗仅对 Th1 型的细胞因子生成有效,推测这可能与 *M.tb* ESAT-6 中含有较多的 Th1 型抗原表位有关。此外,无论是 nano-ESAT-6-FL 还是 nano-ESAT-6 组,同对应的 ESAT-6-FL 和 ESAT-6 组相比,小鼠脾细胞均能分泌较高水平的 IFN- $\gamma$  和 IL-12,但以 nano-ESAT-6-FL 免疫的小鼠更为显著。表明被壳聚糖纳米粒包裹的质粒 DNA 疫苗能够显著提高小鼠的 Th1 型免疫应答的水平,而对 Th2 型的免疫应答不起作用;另壳聚糖纳米化的 *M.tb* ESAT-6 与 FL 重组质粒(即 nano-ESAT-6-FL)DNA 疫苗的免疫效果既优于其他未包被壳聚糖组(ESAT-6-FL)和 BCG 免疫组,也好于纳米化的 ESAT-6 质粒(nano-ESAT-6)免疫组。提示,用壳聚糖纳米包被的 *M.tb* ESAT-6-FL 重组质粒 DNA 疫苗免疫小鼠,诱导 Th1 型细胞因子产生的作用最为有效。值得一提的是,由于 nano-ESAT-6-FL 重组疫苗不像 BCG 容易发生变异,故将来在防治结核杆菌感染方面,该疫苗会有一定的应用前景。

结核杆菌属于胞内寄生菌,而结核病又是一种慢性传染病。虽然本实验应用壳聚糖纳米颗粒包被 ESAT-6-FL 和 ESAT-6 等质粒 DNA 疫苗免疫小鼠,观察到小鼠可明显产生 Th1 型的细胞因子,但这些纳米化的质粒疫苗对小鼠其他细胞免疫功能有何影响目前我们尚未检测。再者,这些纳米化的质粒疫苗接种小鼠后能否抵御结核菌的攻击等目前也不明了。鉴于本研究仅对前述 DNA 疫苗产生小鼠 Th1/Th2 型细胞因子的能力进行了初步的探讨,故上述这些问题仍有待于今后进一步的实验加以阐明。

#### [参考文献]

- [1] WHO. Global tuberculosis report 2012[R]. 2012
- [2] Dye C, Williams BG, The population dynamics and control of tuberculosis[J]. Science, 2010, 328(5980): 856-861
- [3] Pitt JM, Blankley S, McShane H, et al. Vaccination against tuberculosis; how can we better BCG? [J]. Microb Pathog, 2012, 58(1): 2-16
- [4] Begum D, Umemura M, Yahagi A, et al. Accelerated induction of mycobacterial antigen-specific CD8+ T cells in the Mycobacterium tuberculosis-infected lung by subcutaneous vaccination with Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin[J]. Immunology, 2009, 128(4): 556-563
- [5] Cooper AM. T cells in mycobacterial infection and disease[J]. Curr Opin Immunol, 2009, 21(4): 378-384
- [6] Ganguly N, Giang PH, Gupta C, et al. Mycobacterium tuberculosis secretory proteins CFP-10, ESAT-6 and the CFP10:ESAT6 complex inhibit lipopolysaccharide-induced NF-kappaB transactivation by downregulation of reactive oxidative species (ROS) production [J]. Immunol Cell Biol, 2008, 86(1): 98-106
- [7] Brandt L, Oettinger T, Holm A, et al. Key epitopes on the ESAT-6 antigen recognized in mice during the recall of protective immunity to Mycobacterium tuberculosis [J]. J Immunol, 1996, 157(8): 3527-3533
- [8] Brodin P, Rosenkrands I, Andersen P, et al. ESAT-6 proteins; protective antigens and virulence factors? [J]. Trends Microbiol, 2004, 12(11): 500-508
- [9] Majlessi L, Brodin P, Brosch R, et al. Influence of ESAT-6 secretion system 1 (RD1) of Mycobacterium tuberculosis on the interaction between mycobacteria and the host immune system [J]. J Immunol, 2005, 174(6): 3570-3579
- [10] Xu J, Xu W, Chen X, et al. Recombinant DNA vaccine of the early secreted antigen ESAT-6 by Mycobacterium tuberculosis and Flt3 ligand enhanced the cell-mediated immunity in mice[J]. Vaccine, 2008, 26(35): 4519-4525
- [11] Zhou Q, Wang F, Yang F, et al. Augmented humoral and cellular immune response of hepatitis B virus DNA vaccine by micro-needle vaccination using Flt3L as an adjuvant[J]. Vaccine, 2010, 28(5): 1357-1362
- [12] Behrens I, Pena AI, Alonso MJ, et al. Comparative uptake studies of bioadhesive and non-bioadhesive nanoparticles in human intestinal cell lines and rats; the effect of mucus on particle adsorption and transport [J]. Pharm Res, 2002, 19(8): 1185-1193
- [13] Cui Z, Mumper RJ. Chitosan-based nanoparticles for topi-

cal genetic immunization[J]. J Control Release, 2001, 75 (3):409-419

[14] Huang M, Khor E, Lim LY. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles; effects of molecular weight and degree of deacetylation [J]. Pharm Res, 2004, 21(2):344-353

[15] Slutter B, Plapied L, Fievez V, et al. Mechanistic study of the adjuvant effect of biodegradable nanoparticles in mucosal vaccination [J]. J Control Release, 2009, 138(2): 113-121

[16] Yang Y, Chen J, Li H, et al. Porcine interleukin-2 gene encapsulated in chitosan nanoparticles enhances immune response of mice to piglet paratyphoid vaccine[J]. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2007, 30(1):19-32

[17] 蒋青桃, 冯盱珠, 夏梅, 等. 结核杆菌 ESAT-6 抗原 Th1 优势表位与 FL 重组纳米疫苗的制备及其特性研究[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2011, 31(5): 620-623

[18] Trunz BB, Fine P, Dye C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide; a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness[J]. Lancet, 2006, 367(9517): 1173-1180

[19] Tameris MD, Hatherill M, Landry BS, et al. Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with BCG; a randomised, placebo-controlled phase 2b trial [J]. Lancet, 381(9871):1021-1028

[20] Khatri K, Goyal AK, Gupta PN, et al. Plasmid DNA loaded chitosan nanoparticles for nasal mucosal immunization against hepatitis B [J]. Int J Pharm, 2008, 354 (1-2): 235-241

[收稿日期] 2013-12-27

### 参考文献著录原则和方法

1. 为了反映论文的科学依据和作者尊重他人研究成果的严肃态度, 以及读者提供有关信息的出处, 应在论文的结论(无致谢段时)或致谢之后列出参考文献。
2. 参考文献列出的一般应限于作者直接阅读过的、最主要的、发表在正式出版物上的文献。私人通信和未公开发表的资料, 一般不宜列入参考文献, 可紧跟在引用的内容之后注释或标注在当页的地脚。
3. 参考文献著录应执行 GB7714-2005 的规定, 建议采用顺序编码制。
4. 顺序编码制的要求如下:
  - (1) 在引文处按论文中引用文献出现的先后, 用阿拉伯数字连续编序, 将序号置于方括号内, 并视具体情况把序号作为上角标, 或作为语句的组成部分。如“张xx<sup>[1]</sup>研究发现……”, “李xx等<sup>[2]</sup>认为……”, “模型构建参考文献[3]”。
  - (2) 参考文献的每条文献著录项目应齐全, 著录格式为:  
主要责任者. 题名; 其他题名信息[文献类型标志]. 其他责任者. 版本项. 出版地: 出版者, 出版年, 引文页码[引用日期]. 获取和访问路径
  - (3) 论文中若同一篇参考文献出现引用多次的情况, 则不需重复著录, 按参考文献首次出现的顺序标注上角即可。

(本刊编辑: 接雅俐)