

# 人 IL-12 与结核分枝杆菌抗原 ESAT-6 联合 基因疫苗的免疫效果观察

郝 牧 鲍 朗\* 高 蕾

(四川大学华西医学中心基础与法医学院感染免疫研究室 成都 610041)

**摘 要:** 人白细胞介素 12 (IL-12) 与结核分枝杆菌免疫优势抗原 ESAT-6 真核表达质粒联合基因免疫, 诱导免疫应答效果观察。近交系 BALB/c 小鼠 随机分组: A 组(生理盐水对照) B 组( pcDNA3.1 空质粒对照) C 组( BCG 对照) D 组( pcESAT-6 ) 和 E 组( pcIL-12 + pcESAT-6 )。B、D、E 质粒免疫组小鼠分别于胫前肌肌肉注射布比卡因( 7.5g/L ) 和质粒的混和物( 1:4, 100 $\mu$ L, 含质粒 70 $\mu$ g/次), A 组小鼠肌肉注射生理盐水和布比卡因的混和物( 1:4, 100 $\mu$ L ), 均间隔 2 周免疫一次, 共免疫 3 次。末次免疫时, C 组小鼠皮下注射 BCG 菌液 0.3mL/只, 含 10<sup>6</sup> CFU/mL。末次免疫后 14d 和 28d, 各组小鼠分别取血分离血清用于总 IgG 测定, 同时分离脾细胞, 经 TB-PPD 刺激后检测脾细胞增殖( XTT 比色法 ) 活性和脾细胞培养上清液中  $\gamma$  干扰素( IFN- $\gamma$  ) 白介素 4 ( IL-4 ) 分泌水平。pcESAT-6 质粒 DNA 单独免疫( D 组 ) 或与 pcIL-12 质粒 DNA 联合免疫( E 组 ) 均能诱导小鼠产生特异性抗体, 且抗体水平在末次加强免疫后 14~28d 逐渐增加, 但 pcIL-12 与 pcESAT-6 联合免疫后, 特异性抗体水平较 pcESAT-6 单独免疫增加不明显(  $P < 0.05$  )。C、D、E 组免疫小鼠脾细胞体外经 TB-PPD 刺激后, E 组小鼠特异性淋巴细胞增殖活性和 IFN- $\gamma$  分泌水平明显强于 C 组和 D 组(  $P < 0.05$  ), 而 IL-4 分泌水平相互间未发现明显差异。末次加强免疫后 14~28d, E 组小鼠脾细胞增殖活性维持在较高水平, 而 C 组小鼠脾细胞增殖活性先低后高, D 组则先高后低, IFN- $\gamma$  诱生水平, E 组最高, C 组次之, D 组最低。pcIL-12 与 pcESAT-6 质粒 DNA 联合免疫后能刺激机体产生强烈的细胞免疫和稳定的体液免疫, 在动物体内诱发的细胞免疫较 ESAT-6 或 BCG 单独免疫时均有明显增加并维持较长时间, 此外联合免疫后诱导的体液免疫也较 BCG 免疫有明显增加。

**关键词:** 白细胞介素 12 结核分枝杆菌 ESAT-6 DNA 疫苗

中图分类号: R392.11 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209( 2007 ) 03-0477-05

当前结核耐多药菌株的出现以及人类免疫缺陷病毒( HIV )合并结核分枝杆菌感染病例的增多, 结核病重新成为严重威胁人类健康的重要疾病。BCG 是目前唯一的抗结核病疫苗, 但是其保护作用不肯定, 因此亟需寻找一种保护作用更好, 更稳定的疫苗<sup>[1]</sup>。基因疫苗又称 DNA 疫苗, 制备简单, 可产生持久而强烈的体液及细胞免疫应答, 在疫苗研究中倍受关注。目前研究发现编码单个结核杆菌抗原的 DNA 疫苗免疫效果仍不理想, 因而有研究者以表达免疫调节因子的质粒与表达病原体保护性抗原的质粒共同免疫, 希望通过细胞因子的免疫调节作用及佐剂作用增强宿主的特异性免疫应答, 从而产生有效的免疫保护作用<sup>[2,3]</sup>。本研究在已构建人 IL-12 和结核杆菌保护性抗原 ESAT-6 基因真核表达质粒, 并在体外成功表达的基础上, 进一步研究其联合免疫后在小鼠体内诱导细胞和体液免疫应答的能力, 并探讨细胞因子与结核杆菌抗原共同免疫对小鼠免

疫功能的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 近交系 BALB/c 小鼠 30 只, 雌性, 6~8 周龄, 20~25g, 本校实验动物中心提供。

**1.1.2 质粒** pcIL-12 和 pcESAT-6 均以 pcDNA3.1 ( + ) 真核表达质粒为载体, 由本实验室构建。pcESAT-6 能表达具有生物学活性的 ESAT-6 蛋白, 已在体外得到证实<sup>[4]</sup>。pcIL-12 真核表达质粒, 能同时表达人 IL-12 基因并具有生物活性, 由本室构建<sup>[5]</sup>。pcDNA3.1 ( + ) 真核表达质粒由本实验室保存。

**1.1.3 结核杆菌卡介苗上海株( BCG )** 由成都生物制品研究所提供, 本室常规培养。

**1.1.4 结核病人阳性血清** 由四川大学华西附一院呼吸内科结核病房惠赠。

**1.1.5 主要试剂** Endo-Free 质粒中量抽提试剂盒

基金项目: 国家自然科学基金( 30271172 ) 教育部科学技术研究基金重点项目( 104152 )

\* 通讯作者。E-mail: Baolang@moe.edu.cn

作者简介: 郝 牧( 1978 - ), 女, 河北保定人, 博士研究生, 主要从事结核杆菌感染与免疫研究。Tel: 86-28-85503376; E-mail: haomusg@163.com

收稿日期: 2006-09-01 接受日期: 2006-10-11 修回日期: 2006-12-15

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

购自 Omega 公司,结核杆菌纯蛋白衍生物(TB-PPD)标准品(1mg/L)由北京祥瑞生物制品公司提供;RPMI 1640 培养基购自 Hyclone 公司,小鼠干扰素  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) IL-4 细胞因子检测试剂盒购自 Bio-source 公司,HRP 标记的羊抗鼠 IgG,邻苯二胺(OPD)购自北京博瑞克公司,XTT 是 BBI 公司产品。

1.2 质粒扩增及抽提

以质粒 pcDNA3.1(+)、pcESAT-6 和 pcIL-12 分别转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  宿主菌,提取质粒,经酶切及测序鉴定得到阳性克隆。将阳性克隆分别接种于 5mL 含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,于 37℃ 振荡培养 16h。次日,按照 1:100 的比例扩大培养,并按 Endo-Free 质粒抽提试剂盒说明书抽提质粒 DNA。以紫外分光光度计(Bio-Rad)测定  $A_{260}/A_{280}$  比值并定量后,用生理盐水调整浓度为 1mg/mL 备用。

1.3 BCG 的复苏和培养

将 -70℃ 保存的 BCG 菌株复苏后在苏通氏培养基中、37℃ 静置培养 4~5 周,待菌膜长出,其间转种 3~4 次,直至菌体恢复正常生长状态,菌体呈白色或略带黄色,有皱褶并覆盖整个培养基液面时,用于 CFU 计算。

1.4 BCG CFU 计算

取在苏通氏培养基上生长良好的 BCG 两周培养物,称取湿重为 10mg 的菌体,加入 3mL PBST 溶液(含 0.05% Tween80),用乳钵研磨成均匀的菌悬液,-70℃ 保存备用。注射前冻融并充分混匀,用生理盐水稀释成 1mg/3mL 的菌悬液,于小鼠皮下注射 0.3mL/只,相当于湿菌 0.1mg/只,其中活菌量为 10<sup>6</sup> CFU/mL。

1.5 动物免疫

近交系 BALB/c 小鼠 30 只,随机分为 5 组,每组 6 只:A 组(生理盐水对照组)、B 组(pcDNA3.1 对照组)、C 组(BCG 对照组)、D 组(pcESAT-6)和 E 组(pcIL-12 + pcESAT-6)。B 组、D 组和 E 组小鼠分别于胫前肌肌肉注射 7.5g/L 布比卡因和质粒混和物(1:4, 100 $\mu$ L),含质粒 70 $\mu$ g/次,A 组小鼠肌肉注射生

表 1 动物实验免疫方案

Table 1 Immunization strategy of animal experiment				
Group	Immunized time	Interval	Dosage	Administration method
A Saline control	3	2 weeks	100 $\mu$ L	intramuscular injection
B pcDNA3.1( + )	3	2 weeks	100 $\mu$ L	intramuscular injection
C BCG control	1	0 weeks	300 $\mu$ L	intradermally injection
D pcESAT-6	3	2 weeks	100 $\mu$ L	intramuscular injection
E pcIL-12 + pcESAT-6	3	2 weeks	100 $\mu$ L	intramuscular injection

理盐水和 7.5g/L 布比卡因混和物(1:4, 100 $\mu$ L),均间隔 2 周免疫 1 次,共免疫 3 次。末次免疫时,C 组小鼠,皮下注射 0.3mL/只 BCG 菌液,含 10<sup>6</sup> CFU/mL。

1.6 小鼠特异性抗体的 ELISA 检测

末次免疫后第 14d 和 28d,每组取 3 只小鼠,摘除眼球取血,分离血清,采用 ELISA 法测定特异性抗体水平的变化。用 TB-PPD 标准品(100 $\mu$ L/孔)包被酶标板,4℃ 避光过夜。洗涤和封板后,依次加入 2 倍系列稀释的待检血清,37℃ 温育 1h 30min,加入经适当稀释的 HRP 酶标记羊抗鼠 IgG,再次 37℃ 温育 1h 30min,之后用 OPD 显色,待黄色稳定后,用 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应,于波长 490nm 测定吸光度( $A_{490}$ )值。实验中以 A 组小鼠血清作为阴性对照,以结核病人血清作为阳性对照(1:100 稀释), $A$  值 > 0.05、 $A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}} \geq 2.0$  时,判为阳性。将抗体滴度定义为:实验组和阴性对照组  $A_{490}$  比值  $\geq 2.0$  时最大的血清稀释倍数。

1.7 特异性淋巴细胞增殖实验

末次免疫后第 14d 和 28d,无菌条件下分离小鼠脾细胞,每组小鼠脾细胞混合后进行细胞计数,用含 100mL/L 小牛血清的 RPMI1640 培养液调整细胞密度为  $4 \times 10^5$  /L,活细胞数在 90% 以上,200 $\mu$ L/孔加入 96 孔圆底细胞培养板中。每组小鼠脾细胞做 6 个复孔,并设阴性对照孔和调零孔,其中试验组每孔加入 10 $\mu$ L TB-PPD 标准品,对照孔不加 TB-PPD 标准品,调零孔不加淋巴细胞,于 37℃ 50mL/L CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 5d,终止培养前 4h 每孔加入 1g/L XTT,20 $\mu$ L 及终浓度为 0.1mmol/L 的维生素 K3,之后测定其  $A_{450}$  吸光值。结果用刺激指数(stimulation index, SI)表示,  $SI = A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}}$ 。

1.8 细胞因子的诱生和测定

末次免疫后第 14d 和 28d,无菌条件下分离小鼠脾细胞,用含 100mL/L 小牛血清的 RPMI1640 培养液调整细胞密度为  $4 \times 10^5$  /L,200 $\mu$ L/孔加入 96 孔圆底细胞培养板中,每组小鼠脾细胞做 6 个复孔。每孔加入 10 $\mu$ L TB-PPD 标准品,于 37℃ 50mL/L CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 72h,收集培养液上清 -20℃ 冻存备检。IFN- $\gamma$ 、IL-4 水平的检测采用 Bio-Source ELISA 试剂盒,按说明书操作,分别以标准品绘制标准曲线,计算待检测样品中相应细胞因子的含量。

1.9 统计学处理

特异性抗体、特异性淋巴细胞增殖及细胞因子产生水平均采用 SPSS11.5 统计软件进行统计学分

析,计量资料进行  $t$  检验。

## 2 结果

### 2.1 血清特异性抗体水平的检测

用 ELISA 法对各组小鼠血清中抗 TB-PPD 抗体水平进行了测定。免疫后 14d ,A 组和 B 组小鼠血清中抗 TB-PPD 抗体呈阴性,而 C、D、E 组抗体产生不明显,其  $A_{490}$  值差别不大(  $P > 0.05$  )。免疫后 28d ,C 组抗体产生仍不明显,与 14d 时抗体水平相比没有明显差别(  $P > 0.05$  );而 D 和 E 组抗体水平较 14d 时有明显增加,抗体滴度测定分别为 :D 组 1:160 ,E 组 1:80 ; $A_{490}$  D 组 0.10 ,E 组 0.12 ,生理盐水对照组 0.03 , $A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}}$  D 组 3.3 ,E 组 4.0 ,均  $\geq 2.0$  ,但 D 组和 E 组相互间抗体产生水平无明显差别(  $P > 0.05$  ,图 1 )。

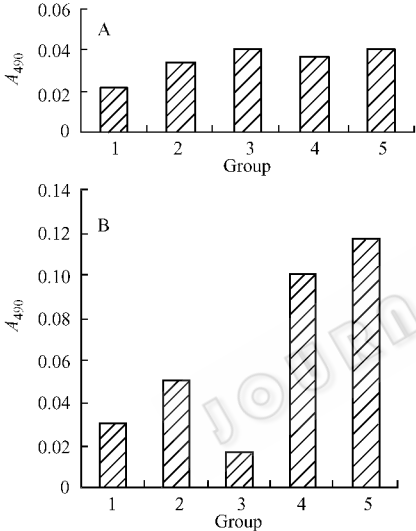


图 1 DNA 疫苗免疫诱发的特异性抗体水平  
Fig.1 Antigen specific antibody production induced by DNA vaccine immunization. A : Postimmunized 14d ;B : Postimmunized 28d. 1. Group A ; 2. Group B ; 3. Group C ; 4. Group D ; 5. Group E.

### 2.2 特异性淋巴细胞增殖实验

末次免疫后 14d ,各组小鼠脾淋巴细胞在体外经 TB-PPD 刺激后 ,A 组和 B 组淋巴细胞增殖不明显,其 SI 值均低于 1.4 (图 2-A )。C、D、E 组,出现不同程度的增殖,C 组 SI 值是 A 组的 1.5 倍,D 组和 E 组 SI 值均是 A 组的 2 倍。免疫 28d 后,C 组、D 组和 E 组小鼠脾淋巴细胞亦出现了明显增殖,与 14d 相比较 C 组和 E 组 SI 值均有不同程度的增加,而 D 组 SI 值有所下降(图 2-B )。

2.3 脾淋巴细胞培养上清液 IFN- $\gamma$ 、IL-4 水平测定  
C 组、D 组、E 组小鼠脾淋巴细胞体外经 TB-PPD 刺激后,细胞培养上清液中 IFN- $\gamma$  的分泌水平分别

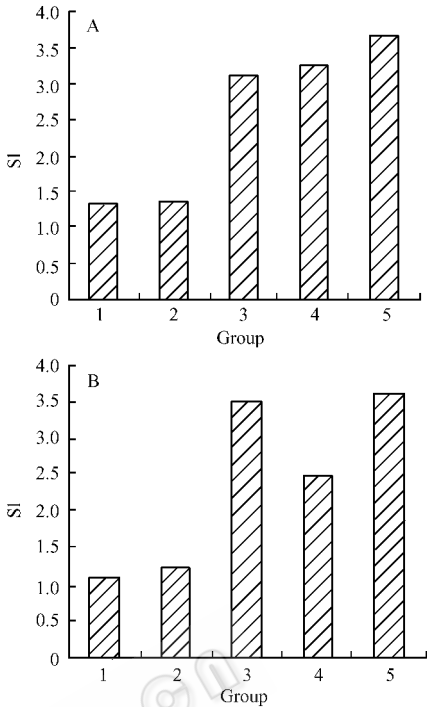


图 2 DNA 疫苗免疫诱发的特异性淋巴细胞增殖反应  
Fig. 2 Antigen specific splenocyte proliferation after DNA vaccine immunization. A : Postimmunized 14d ;B : Postimmunized 28d. 1. Group A ; 2. Group B ; 3. Group C ; 4. Group D ; 5. Group E.

为 :14d 时,130pg/mL、120pg/mL、245pg/mL ;28d 时,110pg/mL、115pg/mL、235pg/mL (表 2 ) ;IL-4 分泌水平分别为 :14d 时,58.5pg/mL、77.2pg/mL、71.2pg/mL ;28d 时,66.5pg/mL、63.2pg/mL、69.5pg/mL (表 3 )。

表 2 DNA 疫苗免疫小鼠脾淋巴细胞培养上清中  
抗原特异性 IFN- $\gamma$  水平

Table 2 IFN- $\gamma$ production in culture supernatant of splenocytes after immunization ( n = 3 , $\bar{x} \pm s$ )		
Group	14d( pg/mL )	28d( pg/mL )
A Saline control	6.0 $\pm$ 1.6	4.75 $\pm$ 0.07
B pcDNA3.1( + )	5.0 $\pm$ 0.01	4.0 $\pm$ 0.78
C BCG control	130.0 $\pm$ 16.5	110.7 $\pm$ 5.0
D pcESAT-6	120.2 $\pm$ 18.7	115.5 $\pm$ 5.45
E pcESAT-6 + pcIL-12	245.6 $\pm$ 9.8 * $\triangle$	235.2 $\pm$ 16.5 * $\triangle$

\*  $P < 0.05$  vs group C ;  $\triangle$   $P < 0.05$  vs group D .

表 3 DNA 疫苗免疫小鼠脾淋巴细胞培养上清中  
抗原特异性 IL-4 水平

Table 3 IL-4 production in culture supernatant of splenocytes after immunization ( n = 3 , $\bar{x} \pm s$ )		
Group	14d( ng/mL )	28d( pg/mL )
A Saline control	—	—
B pcDNA3.1( + )	—	—
C BCG control	58.5 $\pm$ 0.05 *	66.5 $\pm$ 0.03 *
D pcESAT-6	77.2 $\pm$ 0.01 *	63.2 $\pm$ 0.01 *
E pcESAT-6 + pcIL-12	71.2 $\pm$ 0.02 *	69.5 $\pm$ 0.02 *

\*  $P > 0.05$  vs groups C ,D and E .

### 3 讨论

由于 BCG 在结核病预防方面存在种种缺陷,研制新型结核病疫苗势在必行。基因疫苗是将含外源基因的真核表达质粒导入机体,使其能在体内表达外源性抗原,从而刺激机体产生特异性体液和细胞免疫,达到防治病原体感染的目的。国内外学者对结核病 DNA 疫苗进行了一系列的研究,如何提高结核病 DNA 疫苗的有效性和稳定性是目前研制的的关键问题。

近年来,细胞因子用作 DNA 疫苗分子佐剂的报道很多。IL-12 是具有多种生物学活性的细胞因子,参与机体免疫调节的多个方面,在启动 Th0 细胞向 Th1 细胞的发育中发挥重要作用,具有重要的抗细胞内感染和抗肿瘤作用<sup>[6]</sup>;作为 DNA 疫苗分子佐剂,IL-12 还可增强疫苗诱导的记忆性 Th1 细胞应答,在与疫苗的联合免疫中有广泛的应用前景<sup>[7,8]</sup>。ESAT-6 抗原属于结核分枝杆菌早期分泌蛋白,只在致病菌株中表达<sup>[9]</sup>;具有多个 T、B 细胞表位,能诱导机体产生以 Th1 型为主的细胞免疫应答,对结核杆菌感染具有免疫保护性<sup>[10]</sup>。本试验将 IL-12 (pcIL-12) 和 ESAT-6 (pcESAT-6) 真核表达质粒联合免疫小鼠,血清中检测到了特异性抗体的存在,抗体水平与生理盐水对照组、pcDNA3.1 对照组和 BCG 组比较均有明显差异,并且在末次加强免疫后 14 ~ 28d 有逐渐增加的趋势,但 pcIL-12 与 pcESAT-6 共同免疫后,特异性抗体水平较 pcESAT-6 单独免疫时增加不明显,说明 IL-12 对机体体液免疫应答的促进作用较弱。

DNA 疫苗在宿主体内表达的蛋白抗原不仅能与 MHC II 类分子结合而且还能与 MHC I 类分子结合递呈给 CD4<sup>+</sup> T 细胞,因而 DNA 疫苗的一个显著优势是能产生较强的细胞免疫应答。本试验结果显示当 IL-12 与 ESAT-6 质粒 DNA 共同免疫后,小鼠脾淋巴细胞体外诱导培养后,其增殖活性、IFN- $\gamma$  分泌水平都明显强于单独 ESAT-6 DNA 免疫和 BCG 免疫 ( $P < .05$ ),而 IL-4 分泌水平相互间却没有明显差异。产生这一现象可能的解释是:pcIL-12 真核质粒 DNA 免疫小鼠后,在体内表达 IL-12 蛋白,促进了 IFN- $\gamma$  大量分泌,进而诱导机体产生更强的细胞免疫应答,导致免疫小鼠脾淋巴细胞大量增殖,而促进体液免疫应答的 IL-4 的产生没有明显改变,这一结

果与特异性抗体的产生在 pcESAT-6 组和 pcIL-12 + pcESAT-6 组间没有明显差异的结果一致,进一步说明 IL-12 作为分子佐剂主要针对细胞免疫有促进作用,而对体液免疫的促进作用较弱。此外,本研究还发现在末次加强免疫 14 ~ 28d, pcIL-12 + pcESAT-6 组脾淋巴细胞增殖活性维持在较高水平,而 BCG 组脾淋巴细胞增殖活性升高不明显, pcESAT-6 组则略有降低; IFN- $\gamma$  诱生水平, pcIL-12 + pcESAT-6 组最高, BCG 组次之, pcESAT-6 组最低。

将细胞因子作为分子佐剂与结核杆菌免疫保护性抗原联合免疫是对如何提高抗结核杆菌感染 DNA 疫苗免疫效应研究的一个新尝试。将 IL-12 与 ESAT-6 质粒 DNA 联合免疫后,能刺激机体产生强烈的细胞免疫和稳定的体液免疫,在动物体内诱发的细胞免疫较 ESAT-6 或 BCG 单独免疫时均有明显增加并维持较长时间,此外联合免疫后诱导的体液免疫也较 BCG 免疫有明显增加。但这种联合免疫在抗结核杆菌感染中的免疫保护作用是否也优于单独的 ESAT-6 DNA 免疫和 BCG 免疫还有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] Fine PE. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet*, 1995, **346** (8936): 1339–1345.
- [2] Britton Warwick J, Umaimainthan P. Improving vaccines against tuberculosis. *Immunol Cell Biol*, 2003, **81** (1): 34–45.
- [3] Kerige AM, Love Homan L, Yi AK, et al. CpG DNA induces sustained IL-12 expression *in vivo* and resistance to *Listeria* monocytogenes challenge. *J Immunol*, 1998, **161**: 2428–2434.
- [4] 龙 洋, 鲍 朗, 吴悦涵, 等. 结核分枝杆菌免疫优势抗原 ESAT-6 真核表达载体的构建及蛋白表达的鉴定. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2004, **3** (3): 181–184.
- [5] 郝 牧, 鲍 朗, 张会东, 等. IL-12 基因不同亚基真核表达载体的构建及表达. *细胞与分子免疫学杂志*, 2006, **22** (6): 698–702.
- [6] Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Review Immunology*, 2003, **3** (2): 133–146.
- [7] Stobie L, Gurunathan S, Prussin C, et al. The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells *in vivo*: IL-12 is required to maintain memory/effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (15): 8427–8432.
- [8] Palendira U, Kamath AT, Feng CG, et al. Coexpression of interleukin-12 chains by a self-splicing vector increases the protective

- vaccines against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 2002, **70**(4): 1949 – 1956.
- [ 9 ] Ajit L, Roger B, Robert JW, *et al.* Human cytolytic and interferon  $\gamma$  secreting CD8 + T lymphocytes specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *PNAS*, 1998, **95**: 270 – 275.
- [ 10 ] Harboe M, Oettinger T, Wiker HG, *et al.* Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun*, 1996, **64**: 16 – 22.

## Immune effects research of interleukin 12 and *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 antigen combined DNA immunization

HAO Mu, BAO Lang\*, GAO Lei

(Research Unit of Infection and Immunity, West China Medical Center, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**Abstract** To investigate the immune effects of combined DNA immunization of human interleukin 12 and *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 antigen. Thirty BALB/c mice were divided into 5 groups. They were immunized inter-muscularly with 100  $\mu$ L solution of normal saline (group A), pcDNA3.1 control plasmid (group B), pcESAT-6 plasmid (group D) and pcIL-12 + pcESAT-6 plasmid (group E), respectively, for three times with 2 weeks interval. At the last time immunization, group C mice were immunized intra-dermally with 10<sup>6</sup> CFU BCG suspended in normal saline in a volume of 100  $\mu$ L. After the last immunization 14 and 28 days, groups of mice (three mice per group) were sacrificed and separated their serum and splenocytes at once, respectively. The sera were cryopreserved for antigen-specific antibody production tests with ELISA. The separated mice spleen cells were cultured with completed RPMI 1640 medium *in vitro*. Specific splenocytes proliferation responses to TB-PPD antigen were measured by XTT colorimetry after five days culture. Another part of the culture spleen cells were stimulated with TB-PPD antigen for three days, then collected the supernatants to determine IFN- $\gamma$  and IL-4 secretions level by ELISA test as well, respectively. The results show that both ESAT-6 immunization and IL-12 + ESAT-6 combined immunization induce significantly anti-TB-PPD antibody production. Further, the antigen-specific splenocytes proliferation and IFN- $\gamma$  production level of IL-12 + ESAT-6 combined immunization are higher than pcESAT-6 or BCG immunization alone ( $P < 0.05$ ). However, it displays no distinct differences of IL-4 secretion among ESAT-6, BCG and IL-12 + ESAT-6 combined immunization groups. It indicates that ESAT-6 immunization combined with IL-12 could induce much stronger specific cellular immunity than only ESAT-6 or conventional BCG immunization. (Therefore, codelivery of an IL-12 secreting plasmid with *M. tuberculosis* antigen may be a potent strategy for enhancing cellular immunity against *M. tuberculosis*).

**Keywords**: Interleukin 12; *Mycobacterium tuberculosis*; ESAT-6 antigen; DNA vaccine