

表达结核抗原的减毒重组李斯特菌的免疫生物学特性

殷月兰, 赵丹, 康美琴, 谈卫军, 连凯, 胡茂志, 陈祥, 潘志明, 焦新安*

扬州大学, 江苏省人兽共患病重点实验室, 江苏省动物主要疫病防控协同创新中心, 扬州 225009

摘要: 【目的】结核病是一种由结核分枝杆菌复合群引起的严重危害人类健康的慢性传染病, 研制预防结核病的新型疫苗对于有效控制结核病具有重要的公共卫生意义。【方法】本研究对表达 *M. tb* 融合蛋白的重组李斯特菌 LM Δ hly: :Ag85b-esat-6 的免疫生物学特性进行了初步研究。【结果】实验结果显示, 重组菌溶血活性丧失, 对 C57BL/6 小鼠的半数致死剂量提高了 4 个 log 值, 以 0.1 LD₅₀ 的剂量尾静脉注射 C57BL/6 小鼠, 5 天时被完全清除, 病理切片结果未显示明显病理变化, 表明重组菌具有良好的安全性。以尾静脉途径免疫 C57BL/6 小鼠, 对其诱导的免疫应答测定结果表明, 重组菌所运送的结核抗原能诱导小鼠 Th1 型免疫应答, 激发较强的结核抗原特异性的 CTL 效应。【结论】上述实验结果表明, 表达结核分枝杆菌融合蛋白的减毒重组李斯特菌是一种安全的结核病疫苗候选株, 具有潜在的应用价值。

关键词: 结核分枝杆菌, 减毒李斯特菌, 细胞免疫, 融合蛋白

中图分类号: R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 12-1340-07

结核病是目前世界上由单病原菌引起的死亡人数最多、造成危害性最大的疾病。全球约有 20 亿人被感染, 每年因结核病死亡人数约为 200 - 300 万^[1], 严重威胁着全球公共卫生安全。近年来, 随着与 HIV/AIDS 的共感染, 以及结核分枝杆菌多重耐药甚至极端耐药菌株的出现, TB 呈现全球预警状态^[2-3]。WHO 宣布 TB 仍是全球最大的威胁, 强调要利用免疫手段来控制 *M. tb* 的感染和传播^[4]。

卡介苗 (BCG) 是迄今为止人类唯一使用的结核病疫苗, 对儿童具有很好的保护力, 而在防治成人肺结核方面效果甚微等已成为不争的事实。其主要原因是在 BCG 的制备和传代过程, 虽然达到了减毒

的目的, 但同时丢失了部分与保护力相关的基因, 使 BCG 免疫保护力减弱, 导致免疫效果不稳定。研究表明卡介苗在传代过程中丢失了 16 区段, 100 多个基因, 丧失了一些能诱导细胞免疫应答和产生记忆性免疫应答的抗原, 如 RD1 区的 *lhp*, *esat-6* 等^[5-6], 使 BCG 保护性免疫应答减弱, 导致免疫效果不稳定。因此, 安全有效结核病疫苗的研制已成为全球亟待解决的课题。

兼性胞内菌单核细胞增生性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, LM) 以其能逃逸细胞吞噬体、诱导机体产生强烈的 CD8⁺T 细胞免疫应答等特点, 而成为一种具有应用前景的细菌载体。研究者将弱毒化的

基金项目: 国家“973 项目”——国家重点基础研究发展计划 (2012CB518805); 国家自然科学基金 (31101841); 江苏省自然科学基金 (BK2011446); 江苏省科技支撑计划 (BE2012367)

* 通信作者。Tel: +86-514-87971136; Fax: +86-514-87311374; E-mail: xajiao@yahoo.com

作者简介: 殷月兰 (1971 -), 女, 山东青岛人, 博士, 副教授, 从事重要人兽共患病原菌的分子致病机理和免疫机理及疫苗预防相关研究。

E-mail: yylan@yzu.edu.cn

收稿日期: 2013-07-12; 修回日期: 2013-09-06

LM 改造成为可以容纳外源性抗原的载体, 从而成为可诱导较强细胞免疫应答的预防性或治疗性活载体疫苗^[7]。本研究对表达结核分枝杆菌 Ag85B 和 ESAT-6 融合蛋白的减毒重组李斯特菌的免疫生物学特性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细菌: 卡介苗 (Bacillus Calmette-Guérin, BCG)、野生型单核细胞增生性李斯特菌菌株 yzuLM4 由本室保存, 重组李斯特菌 LM Δ hly::Ag85b-esat-6 (利用同源重组的方法, 将 Ag85b-esat-6 定点整合于基因组中 hly 基因启动子和信号肽序列的下游, 从而获得表达 Ag85B 和 ESAT-6 的减毒重组菌株) 由本室构建^[8]。

1.1.2 实验动物: 6 周龄雌性 C57BL/6 (H-2D^b) 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物许可证号为 SCXK (京 2012-001)。

1.1.3 试剂: 抗小鼠 INF- γ 单抗 R4-6A2、抗小鼠 IL-4 单抗 BVD4-1D11、生物素化抗小鼠 INF- γ 单抗 XMG1.2、生物素化抗小鼠 IL-4 单抗 BVD6-24G2、链亲和素-AKP 为 BD Pharmingen 公司产品; 碱性磷酸酶底物溶液 BCIP/NBT 购自 Sigma 公司; 酯纤维素底 96 孔 ELISPOT 板为 Millipore 公司产品。RPMI-1640 细胞培养基、胎牛血清 (FBS) 及胰蛋白酶购自 GBICO 公司。精提牛结核菌素 PPD 为 Prionics 公司产品; ESAT-6 (1-20aa) 多肽、Ag85B (240-259aa) 的多肽由北京中科亚光生物科技有限公司合成, 荧光染料 CFSE (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) 购自 Invitrogen 公司。

1.1.4 仪器: 流式细胞仪 FACSAria 购自 BD 公司; 恒温 CO₂ 细胞培养箱购自 Thermo 公司; 细胞计数仪购自 BD 公司; ELISPOT 读板仪 BIOREADER 5000-V β 购自 Bio-RAD 公司。台式冷冻离心机 Centrifuge 5810R 和 Biophotometer 分光光度计购自 Eppendorf 公司。

1.2 溶血活性的测定

yzuLM4、LM Δ hly::Ag85b-esat-6 在 BHI 培养基中 37 °C 培养 14 h 后, 收集菌液离心取上清, 用 PBS 调整 OD₆₀₀ 至相同大小, 取 70 μ L 上清液加至 96 孔 V 型板中, 用 PBS (pH 6.0) 从原液到 2⁷ 系列倍比稀

释, 然后每孔加入 30 μ L 1% 绵羊红细胞, 混匀, 置于 37 °C 温箱作用 1 h 后观察溶血情况。试验同时设立 PBS 作为对照。

1.3 重组菌 LD₅₀ 的测定

将过夜培养物按 1:20 转接 BHI 培养基, 37 °C 培养 4 h 后, 菌液用 PBS 洗 2 遍, 测定其 OD₆₀₀ 并调整为 0.8。将 yzuLM4 及 LM Δ hly::Ag85b-esat-6 的 PBS 悬液进行梯度稀释, 做平板菌落计数, 取适当稀释度的菌液进行动物实验。将 6 周龄 C57BL/6 小鼠随机分为 9 组, 每组 5 只, 尾静脉注射, 观察 14 d。

1.4 体内感染实验

取 0.1 LD₅₀ 的重组菌 LM Δ hly::Ag85b-esat-6 (2.57 \times 10⁷ CFU) 和野生菌株 yzuLM4 (1.06 \times 10³ CFU) 尾静脉注射 6 周龄雌性小鼠。在免疫后的第 5 天, 取小鼠的脾脏、肝脏中组织称重并研磨。以无菌 PBS 稀释组织匀浆液, 选择合适的梯度涂布 BHI 固体平板, 进行脏器的细菌分离与计数。

1.5 免疫小鼠脏器的组织切片观察

将 6 周龄 C57BL/6 雌性小鼠随机分为 2 组, 每组 3 只, 在 0 d 和 14 d, 分别尾静脉注射 LM Δ hly::Ag85b-esat-6 和 yzuLM4 (剂量为 0.1 LD₅₀, 与 1.4 相同), 于 2 次免疫后 14 d, 取小鼠的脾脏、肝脏用 13% 甲醛固定, 用于组织切片的制作, 分析组织的显微变化。

1.6 ELISPOT 检测特异性 IFN- γ 和 IL-4 分泌细胞

对 C57BL/6 小鼠随机分为 5 组, 每组 5 只, 以 BCG (1 \times 10⁶ CFU/只) 为阳性对照组, 以 PBS (100 μ L) 作为阴性对照组, 对重组菌 LM Δ hly::Ag85b-esat-6 及野生株 yzuLM4, 以 0.1 LD₅₀ 的剂量 (与 1.4 相同) 通过尾静脉注射途径进行初次免疫和加强免疫, 间隔 14 天。在二免第 8 天, 制备各组小鼠的脾脏细胞, 加入到包被有抗小鼠 INF- γ 单抗及 IL-4 单抗的 ELISPOT 板中, 并向孔中分别加入 50 μ L 终浓度为 10 μ g/mL 的 Ag85B₂₄₀₋₂₅₉ 作为刺激原, 培养 48 h。洗涤后加入生物素化抗小鼠 INF- γ 、IL-4 单抗, 孵育作用 3 h。加入链亲和素-AKP, 作用 3 h 后, 加入 BCIP/NBT 底物液显色, 将孔置于立体显微镜下观察, 计数每个孔中的蓝斑数。

1.7 特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 杀伤试验

免疫方法与 2.5 相同, 于 2 免后第 7 天按照 Coles 等^[9]报道的方法分析重组菌诱导小鼠产生的特异性 CTL 杀伤活性, 并计算 CTL 的特异性杀伤

率。具体步骤如下:取 5 只未进行免疫的空白对照小鼠,制备脾脏单细胞悬液,将其分为 A 和 B 两份; A 组细胞 (CFSE^{high}) 用多肽 Ag85B₂₄₀₋₂₅₉ (10 μg/mL) 进行刺激之后,用含 2.5 μmol/L CFSE 的 PBS 进行标记; B 组细胞 (CFSE^{low}) 用含 0.25 μmol/L CFSE 的 PBS 缓冲液进行标记;将 A 组与 B 组细胞以 1:1 比例混合,以 $1 \times 10^7/100 \mu\text{L}$ 尾静脉注射至免疫小鼠体内;15 h 后,制备免疫小鼠的脾脏单细胞悬液,用于 FACS 分析不同免疫组小鼠产生

的特异性 CTL 杀伤活性。

2 结果

2.1 重组菌的溶血实验结果

用 1% 羊红细胞悬液检测重组菌 LMΔ*hly*::*Ag85b-esat-6* 培养上清液的溶血能力,结果显示,野生菌 yzuLM4 的溶血效价达 2^4 ,而重组菌丧失溶血能力(图 1)。

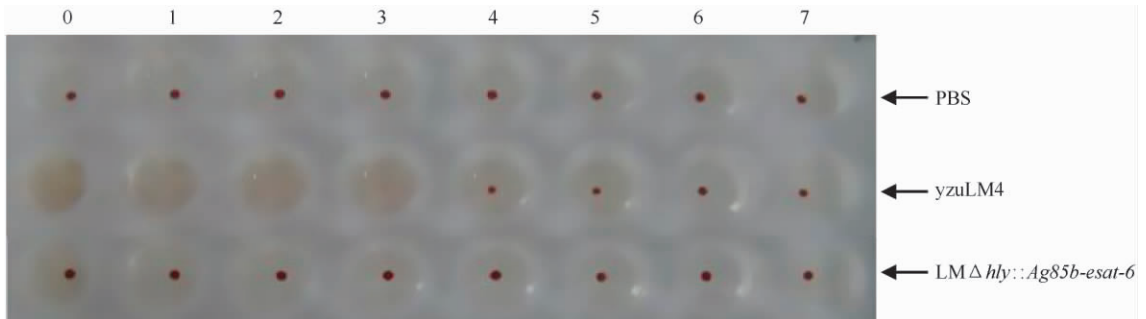


图 1. LMΔ*hly*::*Ag85b-esat-6* 和 yzuLM4 的溶血活性

Figure 1. Haemolytic activity of LMΔ*hly*::*Ag85b-esat-6* and yzuLM4. The culture supernatants were incubated with sheep erythrocytes at 37 °C in two-fold serial dilutions (wells 0–7), the last well added PBS instead of culture supernatant.

2.2 重组菌对 C57BL/6 小鼠 LD₅₀ 的测定

根据小鼠死亡情况和平板菌落计数结果,重组菌的 LD₅₀ 为 2.57×10^8 CFU,而野生菌的 LD₅₀ 为

1.06×10^4 CFU,重组菌的 LD₅₀ 比野生株下降了 2.37×10^4 倍(表 1)。这表明重组菌株对 C57BL/6 小鼠的毒力下降,安全性明显提高。

表 1. 李斯特菌对 C57BL/6 小鼠 LD₅₀ 的测定

Table 1. LD₅₀ of LM to C57BL/6 mice

Dose	yzuLM4 (1×10^5)				LMΔ <i>hly</i> :: <i>Ag85b-esat-6</i> (1×10^7)				
CFU per mouse	39.6	13.2	4.4	1.47	23.0	7.66	2.53	1.69	0.563
Mortality	5/5	5/5	4/5	0/5	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5
LD ₅₀	1.06×10^4 CFU				2.57×10^8 CFU				

2.3 体内感染实验

野生菌株 yzuLM4 和重组菌 LMΔ*hly*::*Ag85b-esat-6* 以尾静脉注射途径感染 C57BL/6 小鼠,从感染后的第 5 天,进行小鼠脏器内细菌的分离与计数。在感染小鼠 5 天时,重组菌被小鼠完全清除(图略);而野生株感染的小鼠脾脏和肝脏中仍存在高于 10^4 CFU 的细菌 ($P < 0.0001$)。本试验结果表明,重组菌侵袭力降低、安全性增加。

2.4 静脉接种后小鼠病理观察

病理切片结果显示,重组菌 LMΔ*hly*::*Ag85b-*

esat-6 以高于野生株 yzuLM4 10^4 倍的细菌量感染小鼠后,小鼠肝脏、肺脏和脾脏均无明显的病理变化(图 2)。而野生株免疫组小鼠的病理切片显示:肺脏肺泡壁轻度增宽,数量不等的淋巴细胞及巨噬细胞浸润;脾脏也出现巨噬细胞浸润的现象;肝脏呈现肝细胞肿胀,说明在免疫剂量仅为 1000 CFU 的条件下,对小鼠仍有一定程度的致病性。由此表明重组菌 LMΔ*hly*::*Ag85b-esat-6* 对小鼠具有较好的安全性。

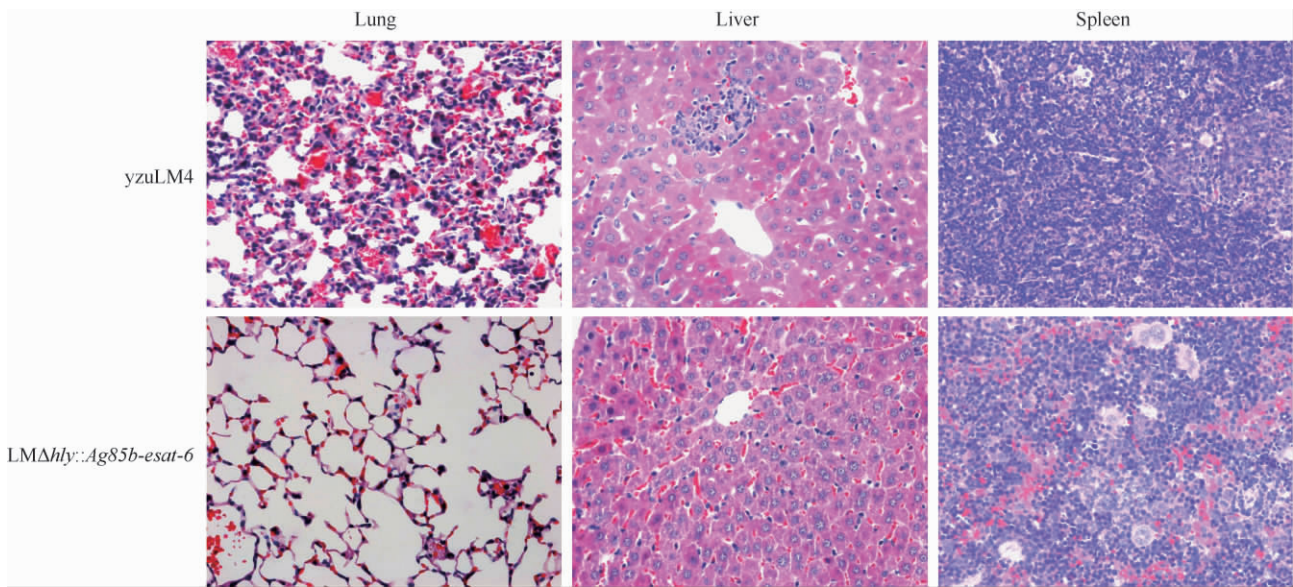


图 2. 不同免疫组的组织切片

Figure 2. Different tissue sections from mice in different groups.

2.5 ELISPOT 实验结果

ELISPOT 结果显示, 与野生株 yzuLM4 组相比, 重组菌免疫组特异性分泌 IFN- γ 细胞数显著增加 ($P < 0.01$) (图 3)。此外, 重组菌诱导小鼠产生的特异性分泌 IFN- γ 细胞数要显著高于特异性分泌 IL-4 的细胞数 ($P < 0.001$), 表明重组菌 LM Δ hly::Ag85b-esat-6 诱导小鼠产生的免疫应答更倾向于 Th1 型免疫应答。

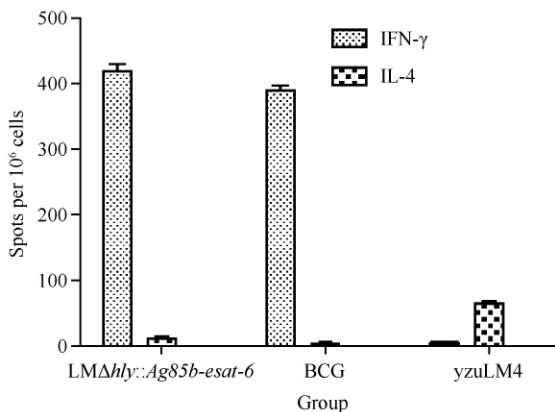


图 3. 不同免疫组脾脏淋巴细胞特异性分泌细胞因子的数量

Figure 3. The number of cells secreting cytokines in different regimens.

2.6 特异性 CTL 试验

通过荧光素 CFSE 标记法对所构建的重组菌诱导的 Ag85B₂₄₀₋₂₅₉ 的特异性 CTL 试验结果显示, 重组

菌免疫组的 CFSE^{high} 的峰值较 CFSE^{low} 明显降低 (图 4), 表明 LM Δ hly::Ag85b-esat-6 诱导小鼠体内产生较强烈的 Ag85B 特异性 CTL 活性, 而 PBS 对照组和 yzuLM4 免疫小鼠却没有产生杀伤性的 CTL 应答。说明重组菌 LM Δ hly::Ag85b-esat-6 能够诱导小鼠产生较强的 Ag85B 特异性的细胞毒性 T 淋巴细胞杀伤效应。

3 讨论

结核病是一种由结核分枝杆菌复合群引起的严重危害人类健康的慢性呼吸道传染病, 是我国重点控制的重大疾病之一, 有效的疫苗对预防和控制结核病具有重要的意义。因此, 研制新型的结核疫苗已成为全球亟待解决的重要问题之一。由于结核分枝杆菌为胞内寄生菌, 这就要求新型的结核疫苗必须能够增强细胞免疫继而加速清除 *M. tb* 的能力^[10-11]。重组 LM 因其诱导强烈的 T 细胞免疫应答, 已经广泛应用于外源抗原的运送载体^[12]。本研究对运送结核抗原的重组李斯特菌 LM Δ hly::Ag85b-esat-6 的安全性和免疫应答特性开展了相关研究。

结核分枝杆菌是胞内寄生菌, 故其疫苗更需要细胞介导的免疫应答。Th1 型细胞在抗结核分枝杆

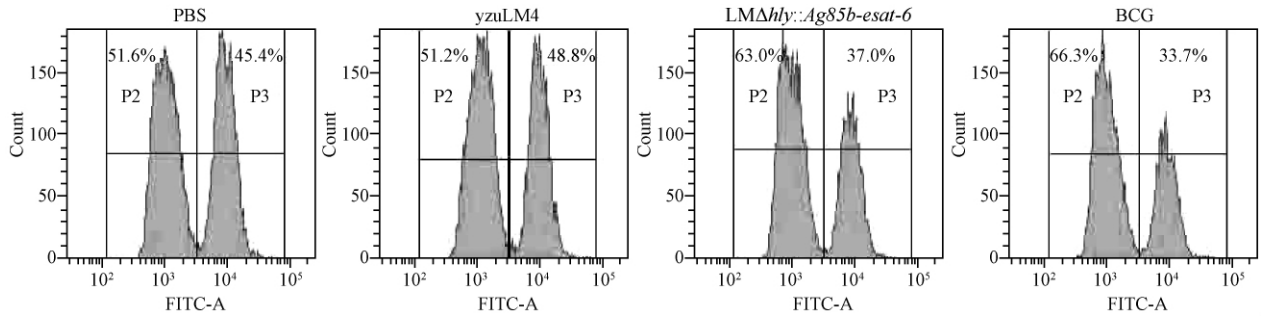


图 4. 不同免疫组诱导的 Ag85B 特异性的细胞毒性 T 淋巴细胞杀伤效应

Figure 4. Ag85B-specific CTL activity in different groups.

菌感染时显得至关重要, $CD4^+$ Th1 型细胞能够识别结核分枝杆菌抗原, 并通过 MHC-II 途径将抗原提呈至 DCs 和巨噬细胞^[13]。在本研究中的 ELISPOT 结果显示, 重组菌能够有效地诱导抗原 Ag85B 和 ESAT-6 特异性免疫应答, 且免疫应答类型倾向于 Th1 型。而 $CD4^+$ Th1 型细胞能够分泌 IFN- γ 、IL-2 以及 TNF- α 等细胞因子发挥免疫调节作用, 介导产生细胞免疫效应, 是宿主防御与防止胞内菌感染的主要组成部分^[14]。因此重组菌 LM Δ hly::Ag85b-esat-6 能够有效地诱导产生 Th1 型免疫应答, 表明其具有有效防止结核分枝杆菌感染的潜力。此外, 研究表明, 部分 Th1 细胞能够辅助细胞毒性 T 淋巴细胞活化增殖为效应性 CTL, 介导清除病原感染的靶细胞^[15-16]。本研究应用 CFSE 标记法进行的 CTL 实验结果表明, 重组菌能够诱导小鼠产生强烈的 Ag85B 特异性效应 CTL 细胞。由此推断效应性 CTL 细胞通过表面 TCR-CD3 复合受体分子和粘附分子, 与胞内的靶细胞表面相应抗原肽-MHC-I 类分子复合物结合, 通过释放颗粒酶、穿孔素及表达 FasL 等细胞毒性介质, 产生细胞毒效应, 介导靶细胞的有效杀伤作用^[17]。上述结果表明, 重组李斯特菌所运送的结核融合蛋白能诱导结核抗原特异的 Th1 型免疫应答以及激发较强的结核抗原特异性的 CTL 效应, 显示出良好的载体疫苗优势。

对重组菌的安全性评价的结果显示, 其溶血活性丧失, 对 C57BL/6 小鼠的半数致死剂量显著提高, 体内滞留时间明显缩短, 组织病理学切片也显示了良好的安全性。值得一提的是, 我们选择的李斯特菌野生株是本实验室的分离株, 其血清型与 Haroula 等构建的菌株一致, 他们敲除了部分 *actA*

和 *plcB* 的基因片段, 将 LM Δ actA/*plcB* 给志愿者口服后, 没有表现出相关疾病症状, 并且部分志愿者显示出体液免疫和细胞免疫应答反应^[18]。非常有意义的是, 本研究中 LD₅₀ 的测定结果显示, 我们构建的重组菌株的毒力低于 Haroula 等构建的 LM Δ actA/*plcB*, 重组菌株所显示的良好安全性为应用奠定基础。

总之, 具有较高安全性的结核病新型疫苗候选株 LM::Ag85b-esat-6 能诱导机体产生强烈的 Th1 型应答和特异性 CTL 杀伤效率, 显示了潜在的疫苗价值。以减毒李斯特菌稳定分泌表达结核抗原的疫苗不但具有良好的免疫原性, 而且因不含抗生素抗性、无内毒素成分, 制作方便, 价格低廉, 是具有较好发展潜力的结核疫苗候选株。

参考文献

- [1] Ottenhoff TH, Kaufmann SH. Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go? *PLoS Pathogen*, 2012, 8(5): e1002607.
- [2] Schmaltz CA, Santoro-Lopes G, Lourenco MC, Morgado MG, Velasque Lde S, Rolla VC. Factors impacting early mortality in tuberculosis/HIV patients: differences between subjects naive to and previously started on HAART. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45704.
- [3] Chang KC, Yew WW. Management of difficult multi-drug-resistant tuberculosis and extensively drug-resistant tuberculosis: update 2012. *Respirology*, 2012, doi: 10.1111/j.1440-1843.
- [4] Global tuberculosis report 2012. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/index.html. 2013-09-06.
- [5] Demangel C, Garnier T, Rosenkrands I, Cole ST.

- Differential effects of prior exposure to environmental mycobacteria on vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG or a recombinant BCG strain expressing RD1 antigens. *Infection and Immunity*, 2005, 73 (4) : 2190-2196.
- [6] Majlessi L, Brodin P, Brosch R, Rojas MJ, Khun H, Huerre M, Cole ST, Leclerc C. Influence of ESAT-6 secretion system 1 (RD1) of *Mycobacterium tuberculosis* on the interaction between mycobacteria and the host immune system. *Journal of Immunology*, 2005, 174 (6) : 3570-3579.
- [7] Schoen C, Loeffler DI, Frentzen A, Pilgrim S, Goebel W, Stritzker J. *Listeria monocytogenes* as novel carrier system for the development of live vaccines. *International Journal of Medical Microbiology*, 2008, 298: 45-58.
- [8] Hui Dong, Xinan Jiao, Yuelan Yin, Debin Tian, Zhiming Pan, Songting Liu, Lijun Fang. Construction of recombinant *Listeria monocytogenes* expressing *Mycobacterium tuberculosis* antigens Ag85B and ESAT-6. *Chinese Veterinary Science*, 2009, 39 (08) :707-711. (in Chinese)
董慧, 焦新安, 殷月兰, 田德斌, 潘志明, 刘松婷, 方丽君. 表达结核分枝杆菌抗原 Ag85B 和 ESAT-6 的重组产单核细胞李斯特菌的构建与鉴定. *中国兽医科学*, 2009, 39 (08) : 707-711.
- [9] Coles RM, Mueller SN, Heath WR, Carbone FR, Brooks AG. Progression of armed CTL from draining lymph node to spleen shortly after localized infection with herpes simplex virus 1. *The Journal of Immunology*, 2002, 168 (2) : 834-838.
- [10] Rook GA, Dheda K, Zumla A. Do successful tuberculosis vaccines need to be immunoregulatory rather than merely Th1-boosting? *Vaccine*, 2005, 23 (17-18) : 2115-2120.
- [11] Kaufmann SH. Novel tuberculosis vaccination strategies based on understanding the immune response. *Journal of International Medicine*, 2010, 267 (4) : 337-3353.
- [12] Eypper EH, Johnson PV, Purro EI, Hohmann EL. Transcutaneous immunization of healthy volunteers with an attenuated *Listeria monocytogenes* vaccine strain and cholera toxin adjuvant. *Vaccine*, 2013, 31 (32) : 3257-3261.
- [13] Ottenhoff TH, Kaufmann SH. Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go? *PLoS Pathogens*, 2012, 8 (5) : e1002607.
- [14] Sykes L, MacIntyre DA, Yap XJ, Tiong Ghee Teoh, Bennett PR. The Th1: th2 dichotomy of pregnancy and preterm labour. *Mediators of Inflammation*, 2012, 967629. doi: 10.1155/2012/967629.
- [15] Katzman SD, Gallo E, Hoyer KK, Abbas AK. Differential requirements for Th1 and Th17 responses to a systemic self-Antigen. *The Journal of Immunology*, 2011, 186 (8) : 4668-4673.
- [16] Li Wang, Yuzhang Wu. Cytotoxic T lymphocyte and the polarization of T helper cells. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2000, 10 (22) : 985-987. (in Chinese)
王莉, 吴玉章. CTL 与 Th1/Th2 极化. *第三军医大学学报*, 2000, 10 (22) : 985-987.
- [17] Cervantes-Barragan L, Lewis KL, Firner S, Thiel V, Huques S, Reith W, Ludewig B, Reizis B. Plasmacytoid dendritic cells control T-cell response to chronic viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109 (8) : 3012-3017.
- [18] Angelakopoulos H, Loock K, Sisul DM, Jensen ER, Miller JF, Hohmann EL. Safety and shedding of an attenuated strain of *Listeria monocytogenes* with a deletion of *actA/pleB* in adult volunteers: a dose escalation study of oral inoculation. *Infection and Immunity*, 2002, 70 (7) : 3592-3601.

Immunobiologic characteristics of a recombinant *Listeria monocytogenes* expressing *Mycobacterium tuberculosis* antigens

Yuelan Yin, Dan Zhao, Meiqin Kang, Weijun Tan, Kai Lian, Maozhi Hu, Xiang Chen, Zhiming Pan, Xin'an Jiao*

Yangzhou University, Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, Jiangsu Co-Innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Disease and Zoonosis, Yangzhou 225009, China

Abstract: [Objective] Tuberculosis is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* complex. Hence, novel vaccines against TB are urgently needed and important to the public health. [Methods] Immunobiologic characteristics of a recombinant attenuated *Listeria monocytogenes* strain LM Δ *hly*:*:Ag85b-esat-6* was evaluated. [Results] LM Δ *hly*:*:Ag85b-esat-6* had lost the hemolytic activity. It was completely cleared from the livers and spleens of mice 5 days after inoculation via intravenous route. Furthermore, the LD₅₀ of the recombinant strain increased by 4 Logs comparing to that of the parent strain. Histopathology reveals no obvious pathological changes following administration of the recombinant strain to mice, indicating its safety. In addition, the potential protective immune response was evaluated on C57BL/6 mice via intravenous immunization route. The results indicate that the antigen delivered by the recombination LM could induce Th1 type immune response and elicit strong cytotoxic lymphocyte effect against Ag85B-ESAT-6. [Conclusion] Thus, LM Δ *hly*:*:Ag85b-esat-6* had high safety to mice, and could be used as a novel vaccines candidate for preventing tuberculosis.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, attenuated *Listeria monocytogenes*, cellular immunity, fusion protein

(本文责编:张晓丽)