

母牛分枝杆菌制剂对 T 淋巴细胞增殖反应影响的研究

庄玉辉 李晓明 李国利

(解放军三〇九医院结核病研究室 北京 100091)

王国治 赵桂芳

(中国药品生物制品检定所 北京 100050)

摘要 以氚标记胸腺嘧啶核苷 (^3H -TdR) 掺入法检测每分钟脉冲数 (CPM), 比较母牛分枝杆菌活菌悬液、辐射杀死菌悬液及高温杀死菌悬液对健康人外周血 T 淋巴细胞增殖反应的影响。以此作为评价治疗以细胞介导免疫为主的结核病免疫功能障碍免疫制剂效力的一个重要参数。在加入单一刺激因子实验中, 对照组 CPM 为 448 ± 131 ; 加入 BCG、母牛分枝杆菌活菌悬液、辐射杀死菌悬液以及高温杀死菌悬液的 CPM 分别为 1037 ± 194 , 2299 ± 140 , 1819 ± 528 , 994 ± 186 。这 4 种制剂的刺激指数均在 2.0 以上, 尤其是母牛分枝杆菌活菌悬液、辐射杀死菌悬液分别为 5.13, 4.06。结果表明, 母牛分枝杆菌 3 种制剂与 BCG 基本相似, 在体外对 T 淋巴细胞增殖反应有明显的促进作用, 其中以活菌悬液和辐射杀死菌悬液更为显著。另一试验中, 以重组白细胞介素-2 (rIL-2) 作对照, BCG、母牛分枝杆菌悬液、辐射杀死菌悬液及高温杀死菌悬液分别加入 rIL-2, 目的在于观察菌体抗原加淋巴因子对 T 淋巴细胞增殖反应有无协同刺激作用。对照组的 CPM 为 3721 ± 1336 , BCG 加 rIL-2 组 CPM 为 6904 ± 1218 ; 母牛分枝杆菌 3 种制剂的 CPM 分别为 9544 ± 1727 ; 8530 ± 744 ; 8230 ± 1035 。结果说明, 除 BCG 加 rIL-2 组外, 母牛分枝杆菌 3 种制剂加 rIL-2 对 T 淋巴细胞增殖反应均有明显的协同促进作用。

关键词 母牛分枝杆菌, 免疫治疗剂, T 淋巴细胞增殖反应, ^3H -TdR 掺入检测法

母牛分枝杆菌 (*Mycobacterium vaccea*) 是抗酸分枝杆菌属内广泛分布于自然界的一种快生长腐生菌。它对人、动物没有致病性, 长期以来未曾引起人们的重视。本世纪 80 年代后期, Stanford 等^[1]报道用母牛分枝杆菌死菌悬液作结核病免疫治疗剂, 有助于提高免疫细胞活性, 消除巨噬细胞内结核杆菌顽固菌。该作者进一步观察发现, 以煮沸、高压杀死菌悬液比辐射杀死或活菌悬液效果更好。有关这几种菌悬液(或菌体抗原)制剂对人外周血 T 淋巴细胞是否有作用尚未见详细报道。

氚标记胸腺嘧啶核苷 (^3H -TdR) 掺入法检测 T 淋巴细胞增殖反应是体外检测细胞免疫功能的一种重要方法。作者采用这一方法, 比较了母牛分枝杆菌制剂对人外周血 T 淋巴细胞增殖反应的影响, 作为评价免疫制剂效力的一种指标, 现将结果报道如下。

作者还有张小刚、吴雪琼、沈小兵。

本文于 1994 年 6 月 21 日收到。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源: BCG、母牛分枝杆菌均由中国药品生物制品检定所提供。

1.1.2 植物血凝素 (PHA): 广州医药工业研究所生产, $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

1.1.3 RPMI1640 细胞培养基 (J. R. Scientific 产品): 含青霉素 $100\text{u}/\text{ml}$, 链霉素 $100\mu\text{g}/\text{ml}$, 2-巯基乙醇 $5 \times 10^{-3}\text{mol}$, 谷氨酰胺 $2\text{mol}/\text{L}$, HEPES $10\text{mol}/\text{L}$, 10% 热灭活小牛血清。

1.1.4 ^3H -TdR: 中国科学院上海原子能研究所生产, 放射性比活性 $20\text{Ci}/\text{mmol}$ 。

1.1.5 人重组白细胞介素-2 (rIL-2): 购自美国 Cetus 公司, 使用浓度 $100\text{Cu}/\text{ml}$ 。

1.2 方法

1.2.1 BCG 与母牛分枝杆菌制剂的处理方法: 这 2 株菌在苏通液体培养基内生长旺盛后收获, 配制成菌悬液。母牛分枝杆菌浓度约为 $4.9 \times 10^9/\text{ml}$ 活菌, 分为活菌悬液, 辐射杀死菌悬液, 高温杀死菌悬液。

1.2.2 人外周血单核细胞 (PBMC) 的分离与培养: 采集正常献血员外周静脉血, 用密度梯度离心常规分离 PBMC, 悬浮于含有 10% 小牛血清的完全 RPMI 1640 培养基内, 调整细胞数至 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 。

1.2.3 PBMC 细胞增殖实验: PBMC 细胞培养液内按实验设计要求加入各种刺激因子。96 孔培养板每孔加入 0.2ml , 混均, 置 37°C , 5% CO_2 培养箱内培养 3d, 提前 18h 加入 ^3H -TdR。终止培养后, 将细胞收集在玻璃纤维纸上 (9999 型, 上海红光造纸厂)。自然冷干后, 放入闪烁液内 (PPO 5g 和 POPOP 0.3g 溶于 1000ml 二甲苯内), 用 FJ-2107 液体闪烁仪 (西安 262 厂制造) 检测培养液内 ^3H -TdR 掺入量 (CPM)。每份血设 3 个平行标本, 每份标本测定 3 次 CPM, 取平均值。计算刺激指数 (SI):

$$\text{SI} = \frac{\text{试验管 CPM 均数}}{\text{对照管 CPM 均数}}$$

2 结果

2.1 母牛分枝杆菌 3 种制剂对外周血 T 淋巴细胞增殖反应的影响

本试验以广泛使用的 BCG 和未加任何刺激因子的 T 淋巴细胞培养液作对照, 给予试验组分别加入母牛分枝杆菌活菌悬液, 辐射杀死及高温杀死菌悬液, 终浓度均为 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ (湿重)。表 1 结果说明, 无论是加入 BCG 还是上述 3 种母牛分枝杆菌制剂, 在体外对人外周血 T 淋巴细胞增殖反应均有明显的促进作用, 刺激指数均在 2.0 以上, 经统计学处理, 差异显著 ($P < 0.05-0.001$)。其中, 母牛分枝杆菌活菌悬液, 辐射杀死菌悬液比其他 2 种被试菌悬液制剂增殖反应效果更好。

2.2 母牛分枝杆菌制剂与 rIL-2 联用对人外周血 T 淋巴细胞增殖反应的影响

加入 rIL-2 终浓度为 $100\text{Cu}/\text{ml}$, 其他制剂的浓度如前述。其目的是了解各种不同母牛分枝杆菌制剂同时加入 rIL-2 对 T 淋巴细胞增殖反应有无协同作用。表 2 说明, 除 BCG 加 rIL-2 组之外, 母牛分枝杆菌 3 种制剂分别加入 rIL-2 对 T 淋巴细胞增殖反应

表 1 母牛分枝杆菌 3 种制剂对外周血 T 淋巴细胞增殖反应的比较

Table 1 Comparison of the proliferative response of peripheral blood T lymphocyte of healthy persons by preparations of *M. vaccea*

加入制剂类型 Preparations added	³ H-TdR 每分钟脉冲数 ($\bar{X} \pm s$) CPM n = 9	刺激指数 Stimulation index (SI)	P 值
对照组(未加) Control (no adding)	448 ± 131		
+ 卡介苗 + <i>M. bovis</i> BCG	1037 ± 194	2.31	<0.05
+ 母牛分枝杆菌活菌液 + <i>M. vaccea</i> live bacilli suspension	2299 ± 140	5.13	<0.001
+ 母牛分枝杆菌辐射杀死菌液 + irradiation killed bacilli suspension	1819 ± 528	4.06	<0.001
+ 母牛分枝杆菌热杀死菌液 + <i>M. vaccea</i> high temperature killed bacilli suspension	994 ± 166	2.22	<0.05

表 2 母牛分枝杆菌制剂 + rIL-2 对外周血 T 淋巴细胞增殖反应的比较

Table 2 Comparison of proliferative response of peripheral blood T lymphocyte of healthy persons by preparations of *M. vaccea* + rIL-2

加入刺激因子 Stimulative agents	³ H-TdR 每分钟脉冲数 ($\bar{X} \pm s$) CPM n = 9	刺激指数 Stimulation index (ST)	P 值
对照组 + rIL-2 Control	3721 ± 1336		
卡介苗 + rIL-2 <i>M. bovis</i> BCG	6904 ± 1218	1.86	>0.05
母牛分枝杆菌活菌悬液 + rIL-2 <i>M. vaccea</i> live bacilli suspension + rIL-2	9544 ± 1732	2.56	<0.05
母牛分枝杆菌辐射杀死菌悬液 + rIL-2 irradiation killed bacilli suspension + rIL-2	8530 ± 744	2.29	<0.05

续表 2

加入刺激因子 Stimulative agents	³ H-TdR 每分钟脉冲数 (X±s) CPM n = 9	刺激指数 Stimulation index (ST)	P 值
母牛分枝杆菌热杀死菌悬液 + rIL-2 <i>M. vaccea</i> high temperature killed bacilli suspension + rIL-2	8230±1035	2.21	<0.05

表 3 母牛分枝杆菌制剂+PHA 对外周血 T 淋巴细胞增殖反应的比较

Table 3 Comparison of proliferative response of peripheral blood T lymphocyte of healthy persons by preparations of *M. vaccea* + PHA

加入刺激因子 Stimulative agents	³ H-TdR 每分钟脉冲数 (X±s) CPM n = 9	刺激指数 Stimulation index(ST)	P 值
对照组 (+ PHA) Control	1298±359		
卡介苗+PHA <i>M. bovis</i> BCG + PHA	1655±323	1.28	>0.05
母牛分枝杆菌活菌悬液 + PHA <i>M. vaccea</i> live bacilli suspension + PHA	2403±575	1.85	>0.05
母牛分枝杆菌辐射杀死菌悬液 + PHA irradiation killed bacilli suspension + PHA	1762±702	1.36	>0.05
母牛分枝杆菌热杀死菌悬液 + PHA <i>M. vaccea</i> high temperature killed bacilli suspension + PHA	1157±291	0.39	>0.05

有明显促进作用,显示了母牛分枝杆菌菌体抗原与 rIL-2 有协同刺激作用。

2.3 母牛分枝杆菌制剂与 PHA 联用对外周血 T 淋巴细胞增殖反应的影响

以单加 PHA, BCG 加 PHA 作对照,比较母牛分枝杆菌 3 种制剂加 PHA 对 T 淋巴细胞增殖反应有无协同促进作用。表 3 结果显示,母牛分枝杆菌 3 种制剂分别与 PHA 联

合加入未见协同刺激作用。

3 讨论

细胞介导免疫是机体抵抗结核杆菌的主要防御机理。但是结核病人,特别是活动性或重症免疫无反应性肺结核病,细胞介导的免疫功能低下、失衡,T淋巴细胞总数减少等,单用抗结核药物治疗疗效差或者根本无效。近年来,国外研究者已开展结核病免疫治疗研究。Stanford 等^[2]报道,用母牛分枝杆菌死菌悬液可提高免疫细胞活性。本研究结果表明,母牛分枝杆菌辐射杀死菌悬液,高温杀死菌悬液在体外对人外周血T淋巴细胞增殖反应有明显的促进作用,推测在体内对于结核病的免疫治疗可能是有益处的。尽管BCG与母牛分枝杆菌活菌悬液也有相似的促进作用,但活菌悬液直接应用于临床尚需进一步研究。

在另一试验中发现,母牛分枝杆菌3种制剂分别与rIL-2联合加入淋巴细胞培养液内,对T淋巴细胞生长、繁殖有明显的协同诱导作用。其机理可能是^[3]:人外周血淋巴细胞主要是带 α/β 受体的T淋巴细胞,其中主要是CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞带有 α/β T淋巴细胞受体。而CD4⁺ α/β T淋巴细胞的主要功能是分泌白细胞介素,加入外源性白细胞介素-2诱导 α/β 受体的表达,进而刺激T淋巴细胞的生长、繁殖。同时,T淋巴细胞的 α/β 受体接受分枝杆菌菌体抗原刺激活化后促进其生长与增殖,显示了2种刺激因子的协同作用。至于BCG加rIL-2未见这种作用的原因有待深入研究。

参 考 文 献

- [1] Stanford J L, Bahr G M, Rook G A W *et al.* *Bulletin of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*, 1988, **63**: 10.
- [2] Stanford J L, Lucas S, Cordess G *et al.* *Bulletin of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*, 1988, **62**: 10.
- [3] Munk M E(鲁仲云译). 国外医学(微生物分册),1991,**14**: 66.

THE STUDIES ON THE EFFECT OF PROLIFERATIVE RESPONSE OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTE OF HEALTHY PERSONS BY PREPARATIONS OF *M. VACCEA*

Zhuang Yuhui Li Xiaoming Li Guoli

(309 Hospital of PLA Tuberculosis Research Laboratory, Beijing 100091)

Wang Guozhi Zhao Guifang

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products,
Beijing 100050)

Abstract This paper present that preparations of *M. vaccea*, which included suspensions of live bacilli, irradiation-killed bacilli and high temperature killed bacilli, for the effect on lymphocyte proliferative response of peripheral blood in healthy persons were compared by ^3H -TdR incorporation method. CPM of control was 448 ± 131 , CPM adding suspensions of live *M. vaccea*, irradiation-killed bacilli and high temperature killed bacilli were 1037 ± 194 , 2299 ± 140 , 1819 ± 528 , 994 ± 186 , respectively. Stimulative index of all four preparations were more than 2.0, specially suspensions of live and irradiation killed *M. vaccea* is more effective than BCG and high temperature killed *M. vaccea*, which were 5.13, 4.06, respectively. In another experiment, suspensions of live, irradiation-killed and high temperature killed *M. vaccea* plus rIL-2 were found more effective than rIL-2 alone. CPM of them were 9544 ± 1727 , 8530 ± 714 , 8230 ± 1035 , and 3721 ± 1336 , respectively, but BCG was 6904 ± 1218 . The results show that preparations of *M. vaccea* tested have distinctly promotive effect for proliferative respinse of lymphocyte in vitro. The addition of rIL-2 to suspensions of live *M. vaccea*, irradiation killed and high temperature killed *M. vaccea* cooperatively increased the effects of proliferative response mentioned above.

Key words *M. vaccea*, Immunotherapy, Proliferative response of lymphocyte in vitro, ^3H -TdR incorporation method