

· 论著 ·

重组结核杆菌融合蛋白(EC)的免疫特性和临床前安全性研究

张凯 陶立峰 韦芬 都伟欣 仇晶晶 陈伟 陈保文 朱银猛 程兴
苏城 钟再新 卢锦标 蒲江

【摘要】 目的 通过对重组结核杆菌融合蛋白(EC)[该制品名称是国家药典委员会确定的药品中文通用名称,“EC”为重组融合蛋白“结核分枝杆菌早期分泌性抗原靶 6(ESAT-6)和培养滤液蛋白 10(CFP-10)”](简称“EC”)的免疫特性和临床前安全性研究,探讨其临床应用前景。**方法** (1)免疫特性研究:取 6 只雌性豚鼠,使用结核分枝杆菌 H37Ra 活菌菌液致敏,5 周后,皮内注射 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EC 原液 0.2 ml;取 4 只雌性豚鼠,使用卡介苗活菌菌液致敏,5 周后,皮内注射 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EC 原液 0.2 ml;观察注射部位平均硬结或红晕反应直径[(纵径+横径)/2], ≥ 5 mm 判为阳性, < 5 mm 判为阴性。(2)急性毒性试验:取 80 只 ICR[(美国)Institute of Cancer Research]小鼠,分为单次肌内和皮内注射组,每组 40 只,雌雄各半;每组再分为 4 组,每组 10 只,雌雄各半。高剂量组(注射 EC 53.61 $\mu\text{g}/0.1$ ml)、低剂量组(注射 EC 0.2 $\mu\text{g}/0.1$ ml)、溶剂对照组(注射 EC 稀释液 0.1 ml)、空白对照组(不给予任何受试物),观察小鼠的外观、运动功能、体质量、各脏器和药物注射部位皮肤等是否有异常。(3)豚鼠全身主动过敏试验:取豚鼠 24 只,分为 4 组,每组 6 只,雌雄各半,各组豚鼠分别隔日腹腔注射高剂量(5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)EC、低剂量(0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)EC、牛血清白蛋白(60 mg)和 0.9%NaCl(质量分数为 0.9%的 NaCl 溶液)注射液(2 ml),连续 3 次。致敏结束,末次致敏后第 12 天静脉快速注射 2 倍致敏剂量对以上相应的各组致敏豚鼠进行激发。致敏期间,每天观察豚鼠的症状,并于初次和最后一次致敏及激发当日测定每只豚鼠的体质量。(4)皮内刺激试验:取 6 只新西兰兔,单次皮内注射 EC 10 μg (0.2 ml)/点,每侧 5 个点,观察皮内注射后的刺激反应情况。**结果** (1)免疫特性研究结果:EC 原液对卡介苗活菌菌液致敏的 4 只豚鼠的皮肤试验,阳性为 0 只;EC 原液对结核分枝杆菌 H37Ra 活菌菌液致敏的 6 只豚鼠的皮肤试验,阳性为 6 只。(2)急性毒性试验结果:所有小鼠未出现明显的急性中毒反应和显示急性中毒靶器官。小鼠皮内注射 EC 前、注射 EC 后 1 d、3 d、5 d、7 d、8 d、10 d、12 d、14 d 高剂量组、低剂量组小鼠平均体质量分别为(20.6 $\pm$ 1.3) g~(24.9 $\pm$ 2.1) g、(20.5 $\pm$ 1.6) g~(26.0 $\pm$ 3.1) g;注射后不同观察时间各组平均体质量与空白对照组[(21.0 $\pm$ 1.1) g~(25.3 $\pm$ 2.3) g]比较差异均无统计学意义(t 值分别为 0.571~0.392, 0.695~0.615; P 值分别为 0.575~0.700, 0.496~0.546);小鼠肌内注射 EC 前、注射 EC 后 1 d、3 d、5 d、7 d、8 d、10 d、12 d、14 d 高剂量组、低剂量组小鼠平均体质量分别为(21.0 $\pm$ 1.5) g~(26.2 $\pm$ 1.9) g、(20.5 $\pm$ 2.1) g~(25.8 $\pm$ 3.8) g;注射后不同观察时间各组平均体质量与空白对照组[(21.2 $\pm$ 1.7) g~(25.8 $\pm$ 3.1) g]比较差异均无统计学意义(t 值分别为 0.360~0.318, 0.900~0.006; P 值分别为 0.723~0.754, 0.380~0.995)。(3)豚鼠全身主动过敏试验结果:豚鼠无过敏反应。高剂量组、低剂量组豚鼠首次致敏、末次致敏、激发的平均体质量分别为(327.5 $\pm$ 24.3) g、(347.2 $\pm$ 32.7) g、(402.2 $\pm$ 34.9) g;(331.3 $\pm$ 26.7) g、(346.2 $\pm$ 32.0) g、(411.3 $\pm$ 38.9) g,与相应观察时间注射 0.9%NaCl 的阴性对照组[(329.5 $\pm$ 27.4) g、(348.3 $\pm$ 27.0) g、(399.4 $\pm$ 25.4) g]比较,差异均无统计学意义(t 值分别为 0.328、0.181、0.284、0.474、0.366、0.875; P 值分别为 0.757、0.864、0.788、0.656、0.730、0.422)。(4)兔皮内刺激试验结果:单次皮内注射 10 μg (0.2 ml)/点 EC,无明显刺激反应。**结论** EC 能够鉴别结核感染与卡介苗免疫,临床前动物试验安全性好,有望应用于人群结核感染的诊断与鉴别诊断。

【关键词】 重组结核杆菌融合蛋白(EC); 分枝杆菌, 结核; 动物实验; 免疫学试验; 免疫活性; 药物评价, 临床前



开放科学(资源服务)标识码(OSID)的开放科学计划以二维码为入口,提供丰富的线上扩展功能,包括作者对论文背景的语音介绍、该研究的附加说明、与读者的交互问答、拓展学术圈等。读者“扫一扫”此二维码即可获得上述增值服务。

doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2020.08.006

基金项目:“十二五”国家科技重大专项(2014ZX10003002-004, 2015ZX09108-004);“十三五”国家科技重大专项(2017ZX10201301-001-003, 2018ZX10103001-001-008)

作者单位:230000 合肥,安徽智飞龙科马生物制药有限公司(张凯、陶立峰、韦芬、仇晶晶、陈伟、朱银猛、程兴、钟再新、蒲江);中国食品药品检定研究院结核病疫苗和过敏原产品室 中国医学科学院生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室(都伟欣、陈保文、苏城、卢锦标)

通信作者:蒲江, Email:pujiang@zhifeishengwu.com; 卢锦标, Email:lujinbiao@nifdc.org.cn

Immune characteristics and preclinical animal safety studies of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* fusion protein (EC) ZHANG Kai, TAO Li-feng, WEI Fen, DU Wei-xin, QIU Jing-jing, CHEN Wei, CHEN Bao-wen, ZHU Yin-meng, CHENG Xing, SU Cheng, ZHONG Zai-xin, LU Jin-biao, PU Jiang. Anhui Zhifei Longcom Biopharmaceutical Co., Ltd., Hefei 230000, China

Corresponding authors: PU Jiang, Email: pujiang@zhifeishengwu.com; LU Jin-biao, Email: lujinbiao@nifdc.org.cn

【Abstract】 Objective By perform the immunological characteristics and preclinical animal safety study of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* fusion protein ESAT-6—CFP-10 (Which is the Chinese generic name of the drug determined by the National Pharmacopoeia Committee, EC stands for recombinant fusion protein 6 kDa early secretory antigenic target (ESAT-6) and 10 kDa culture filtrate protein (CFP-10))(EC), to discuss its clinical application prospect. **Methods** (1) Immunological characteristics study: 6 female guinea pigs were sensitized with *Mycobacterium tuberculosis* live bacteria solution (H37Ra), 5 weeks later, intradermally injected 0.2 ml EC (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$); and 4 female guinea pigs were sensitized with live BCG bacteria solution, 5 weeks later, intradermally injected 0.2 ml EC (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Observed the mean diameter of the induration or redness reaction ((longitudinal diameter + transverse diameter)/2, ≥ 5 mm is considered positive, < 5 mm is considered negative). (2) Acute toxicity test: 80 ICR mice (Institute of Cancer Research (USA)) were divided into single intramuscular injection group and intradermal injection group, each group with 40, half male and half female. And then, each group was divided into 4 subgroups, each subgroup with 10, half male and half female. High dose subgroup was injected with EC of 53.61 $\mu\text{g}/0.1$ ml, while low dose subgroup was 0.2 $\mu\text{g}/0.1$ ml, solvent control subgroup was injected with diluent (0.1 ml) of EC, and the blank control subgroup would receive no injection. These mice were observed for abnormality in appearance, motor function, body weight, various organs and skin of injection site. (3) Guinea pig systemic active allergy test: 24 guinea pigs were divided into 4 subgroups, each subgroup with 6, half male and half female. Subgroups were injected intraperitoneally every other day with EC of 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (high dose), 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (low dose), bovine Serum Albumin, and 0.9% NaCl (2 ml) respectively, after 3 successive times, the sensitization finished. On the 12th day after the last sensitization, the sensitized guinea pigs were irritated by rapid intravenous injection with 2 times doses or more sensitizer. During sensitization, each animal's symptom was observed daily and the body mass of each animal was measured on the first and last sensitization and irritation days. (4) Intradermal irritation experiment: 6 New Zealand rabbit was injected intradermally with EC of 10 μg (0.2 ml)/spot, 5 spots on each side, observed the intradermal irritation reaction on the injection site. **Results** (1) Immunological characteristics study: In 4 BCG live bacteria solution sensitized guinea pigs, the skin tests with EC showed 0 positivity, and in 6 live MTB (H37Ra) sensitized guinea pigs, skin tests showed 6 with positivity. (2) Acute toxicity test: No significant acute toxic reactions or acute target organ poisoning were observed in all mice. The mean body masses of EC intradermally injected mice group at the time of: before injection, 1 d, 3 d, 5 d, 7 d, 8 d, 10 d, 12 d, 14 d post injection, respectively in high dose subgroup and low dose subgroup were (20.6 $\pm$ 1.3) g—(24.9 $\pm$ 2.1) g, (20.5 $\pm$ 1.6) g—(26.0 $\pm$ 3.1) g; and compare to blank control group ((21.0 $\pm$ 1.1) g—(25.3 $\pm$ 2.3) g) in the corresponding time, the t values were 0.571—0.392; 0.695—0.615; while P values were 0.575—0.700; 0.496—0.546, respectively; the differences were not statistically significant. The mean body masses of EC intramuscularly injected mice group at the time of: before injection, 1 d, 3 d, 5 d, 7 d, 8 d, 10 d, 12 d, 14 d post injection, respectively in high dose subgroup and low dose subgroup were (21.0 $\pm$ 1.5) g—(26.2 $\pm$ 1.9) g, (20.5 $\pm$ 2.1) g—(25.8 $\pm$ 3.8) g; and compare to blank control group ((21.2 $\pm$ 1.7) g—(25.8 $\pm$ 3.1) g) in the corresponding time, the t values were 0.360—0.318; 0.900—0.006; while P values were 0.723—0.754; 0.380—0.995; the differences were not statistically significant. (3) Guinea pig systemic active allergy test: no allergic reactions in guinea pigs. The average body mass of guinea pigs in the high, the low dose group of EC and 0.9% NaCl injected negative control group at the time of the first sensitization, the last sensitization, irritation and post irritation were (327.5 $\pm$ 24.3) g, (347.2 $\pm$ 32.7) g, (402.2 $\pm$ 34.9) g; (331.3 $\pm$ 26.7) g, (346.2 $\pm$ 32.0) g, (411.3 $\pm$ 38.9) g; (329.5 $\pm$ 27.4) g, (348.3 $\pm$ 27.0) g, (399.4 $\pm$ 25.4) g, respectively. Compare to 0.9% NaCl injected negative control group, the t values were 0.328, 0.181, 0.284; 0.474, 0.366, 0.875; while P values were 0.757, 0.864, 0.788; 0.656, 0.730, 0.422, respectively, the differences were not statistically significant. (4) Intradermal irritation experiments in rabbits: for rabbits with single intradermal injection with 10 μg (0.2 ml)/spot EC, no significant irritation reaction were observed. **Conclusion** EC is able to differentiate tuberculosis infection from BCG immunization. With good preclinical safety, it is expected to be applied in the in vivo diagnosis for *Mycobacterium tuberculosis* infection.

【Key words】 Recombinant *Mycobacterium tuberculosis* fusion protein (EC); *Mycobacterium tuberculosis*; Animal experimentation; Immunologic tests; Immunocompetence; Drug evaluation, preclinical

肺结核是由结核分枝杆菌感染引起的严重危害人类健康的疾病。据 WHO^[1] 估计,全球潜伏性结

核感染(latent tuberculosis infection, LTBI)人群约 17 亿,约占全人群的 1/4 左右。2018 年全球结核病

新发患者约 1000 万例,约 145 万例死于结核病^[2]。WHO^[3]提出了 2035 年“终止结核病”战略目标,将结核病发病率控制在 10/10 万以下。WHO 2018 年发布的 LTBI 管理指南及关于结核病发病率低的国家及地区消灭结核病的新框架文件中,都将 LTBI 者的筛查与预防作为控制结核病疫情的重要手段^[4]。因此,如何简便、高通量诊断结核感染者并实施预防是结核病防治工作的关键。

差异区域 1(region of difference-1, RD-1)是结核分枝杆菌在长期传代过程中丢失的重要保护性抗原, RD-1 仅存在于致病性分枝杆菌中,而在卡介苗及环境分枝杆菌中缺失。目前,国内外均以 RD-1 基因编码的结核分枝杆菌早期分泌性抗原靶 6 (ESAT-6)和培养滤液蛋白 10(CFP-10)为研究热点^[5],制成的结核感染鉴别用变态反应原皮肤试验 (IST),既有 γ -干扰素释放试验 (IGRA) 特异性又有结核菌素皮肤试验 (TST) 适合大规模筛查的简便性,是极具潜力的新一代结核分枝杆菌感染筛查试剂。本研究的重组结核杆菌融合蛋白 (EC) (该制品名称是国家药典委员会确定的药品中文通用名称,“EC”为重组融合蛋白“ESAT-6 和 CFP-10”) (简称“EC”),有望应用于结核分枝杆菌感染的诊断和结核病的辅助诊断。

资料和方法

一、材料

(一) 菌株

结核分枝杆菌 H37Ra, 上海复旦大学三级安全防护实验室提供并开展相关试验; 卡介苗, 安徽智飞龙科马生物制药有限公司提供。

(二) 主要试剂

EC 原液, 安徽智飞龙科马生物制药有限公司生产; TB-PPD (50 IU/ml, 批号: 20171010), 北京祥瑞生物制品有限公司生产。

(三) 实验动物

无特殊病原体 (specific pathogen free, SPF) 级白色豚鼠, 34 只, 雌性 22 只, 雄性 12 只, 体质量 300~400 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司; 新西兰兔, 6 只, 雌雄各半, 体质量 2~3 kg, 由浙江省实验动物中心提供; ICR [(美国) Institute of Cancer Research] 小鼠, 80 只, 雌雄各半, 体质量 17~19 g, 由浙江省实验动物中心提供。

二、方法

(一) 迟发型超敏反应试验

1. 动物筛选 (TB-PPD) 皮肤试验: 将体质量合格豚鼠背部局部去毛, 用酒精棉消毒去毛部位皮肤, 用 1 ml 注射器吸取 50 IU/ml 的 TB-PPD, 在去毛部位皮内注射 0.2 ml TB-PPD, 注射部位应有皮丘凸起, 旋转 180° 拔出针头。于注射后 48 h 观察局部硬结或红晕反应的纵径与横径 (以硬结或红晕反应大者为准), 平均硬结或红晕反应直径 $[(\text{纵径} + \text{横径}) / 2] \geq 5 \text{ mm}$ 判为阳性, $< 5 \text{ mm}$ 判为阴性; TB-PPD 皮肤试验阴性豚鼠留做试验用。

2. 效价测定: 选取 6 只经 TB-PPD 皮肤试验阴性的 300~400 g SPF 级雌性豚鼠, 每只豚鼠大腿腹股沟内侧皮下注射结核分枝杆菌 H37Ra 活菌菌液 0.5 ml, 致敏 5 周后, 将豚鼠背部脊柱两侧去毛, 去毛后每只豚鼠于背部脊柱两侧以轮圈法皮内注射 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EC 原液 0.2 ml。于注射后 24 h 观察局部硬结或红晕的纵径与横径 (以硬结或红晕反应大者为准), 平均硬结或红晕反应直径 $[(\text{纵径} + \text{横径}) / 2] \geq 5 \text{ mm}$ 判为阳性, $< 5 \text{ mm}$ 判为阴性。

3. 鉴别试验: 选取 4 只经 TB-PPD 皮肤试验检测阴性的 300~400 g SPF 级雌性豚鼠, 豚鼠大腿腹股沟内侧皮下注射卡介苗活菌菌液 0.5 ml, 致敏 5 周后, 将豚鼠背部脊柱两侧去毛, 去毛后每只豚鼠于背部脊柱两侧以轮圈法皮内注射 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EC 原液和 50 IU/ml TB-PPD 各 0.2 ml, 于注射后 48 h 观察局部硬结或红晕的纵径与横径 (以硬结或红晕反应大者为准), 平均硬结或红晕反应直径 $[(\text{纵径} + \text{横径}) / 2] \geq 5 \text{ mm}$ 判为阳性, $< 5 \text{ mm}$ 判为阴性。

(二) EC 临床前安全性研究

将 EC 原液送浙江省医学科学院安全性评价研究中心进行急性毒性试验、豚鼠全身主动过敏试验和兔皮内刺激试验进行临床前安全性研究。

1. 急性毒性试验: 取 80 只健康 ICR 小鼠, 分为背部皮肤单次单点肌肉注射组和皮内注射组, 每组 40 只, 雌雄各半; 每组再分为 4 组, 每组 10 只, 雌雄各半。高剂量组 (注射 EC 53.61 $\mu\text{g}/0.1 \text{ ml}$)、低剂量组 (注射 EC 0.2 $\mu\text{g}/0.1 \text{ ml}$)、溶剂对照组 (注射 EC 稀释液 0.1 ml)、空白对照组 (不给予任何受试物)。给药前禁食, 给药后立即观察小鼠的外观、运动功能、排便、尿、皮肤、口、眼、鼻等一般情况。给药第一天每隔 0.5~1.0 h 观察 1 次, 以后每天观察 1 次, 连续观察 14 d。在此期间, 观察记录所有出现的症状、症状起始时间、严重程度、持续时间及死亡

分布情况,并在 0 d、1 d、3 d、5 d、7 d、8 d、10 d、12 d、14 d 称量小鼠体质量。试验结束后,将小鼠通过颈椎脱臼安乐处死,并进行大体解剖,观察各脏器和药物注射部位皮肤是否有异常病变。

2. 豚鼠全身主动过敏试验:取健康无伤白色普通级豚鼠 24 只,分为 4 组,每组 6 只,雌雄各半,各组豚鼠分别隔日腹腔注射高剂量($5 \mu\text{g}/\text{kg}$)、低剂量($0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$)EC,牛血清白蛋白(60 mg)(阳性对照组)和 0.9%NaCl(质量分数为 0.9%的 NaCl 溶液)注射液(2 ml)(阴性对照组),连续 3 次。致敏结束,末次致敏后第 12 天静脉快速注射 2 倍致敏剂量对以上相应的各组致敏豚鼠进行激发。致敏期间,每天观察豚鼠的症状,并于初次和最后一次致敏及激发当日测定豚鼠的体质量。静脉注射激发后即刻至 30 min,观察并记录豚鼠反应症状,并评价豚鼠全身过敏反应,过敏反应阴性(-):正常;过敏反应弱阳性(+):出现不安宁、竖毛、发抖、搔鼻;过敏反应阳性(++):出现喷嚏、咳嗽、呼吸急促、排尿、排粪、流泪;过敏反应强阳性(+++):出现呼吸困难、哮喘音、皮肤紫癜、步态不稳、跳跃、喘息、痉挛、旋转、潮式呼吸;过敏反应极强阳性(++++) :死亡。

3. 兔皮内刺激试验:取健康皮肤无伤新西兰兔 6 只,试验前 24 h,剃毛刀剔除每兔脊椎两侧的毛。兔背部左右侧去毛区分别单次皮内注射 EC $10 \mu\text{g}$

(0.2 ml)/点和相同容量的 0.9% NaCl(质量分数为 0.9%的 NaCl 溶液)注射液 0.2 ml/点剂量,每侧 5 个点,每点间隔 2 cm,注射后即刻、24 h、48 h 和 72 h 观察注射局部及其周围皮肤组织反应,包括红斑、水肿和坏死等。于末次给药后 72 h 由耳静脉注入空气处死兔,解剖观察注射部位的皮肤组织的变化,并进行病理组织学检查。

三、统计学处理

采用 Minitab 17.1.0 软件进行统计学分析。计量资料采用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,组间差异的比较使用配对 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、迟发型超敏反应试验

EC 原液诱导结核分枝杆菌 H37Ra 活菌致敏豚鼠的 24 h 皮肤试验,阳性为 6 只(表 1);TB-PPD 诱导卡介苗活菌致敏豚鼠的 48 h 皮肤试验,阳性为 4 只;EC 诱导卡介苗活菌致敏豚鼠的 48 h 皮肤试验,阳性为 0 只(表 2)。

二、急性毒性试验结果

在整个试验过程中,高剂量组、低剂量组、溶剂对照组、空白对照组小鼠的外观、运动功能、排便、排尿、皮肤、口、眼、鼻等一般情况未出现任何异常反应和死亡。小鼠皮内注射 EC 在不同观察时间点,即

表 1 EC 对结核分枝杆菌 H37Ra 活菌致敏豚鼠迟发型超敏反应试验结果

豚鼠编号	皮肤试验 24 h 后观察硬结或红晕平均直径(mm)			反应结果
	横径	纵径	平均直径	
1	16.0	17.5	16.75	阳性
2	15.6	14.7	15.15	阳性
3	16.4	17.0	16.70	阳性
4	14.3	15.6	14.95	阳性
5	17.6	19.2	18.40	阳性
6	16.3	17.2	16.75	阳性

注 平均直径=(纵径+横径)/2;反应结果判定标准为平均直径 ≥ 5 mm 判为阳性, < 5 mm 判为阴性

表 2 EC 与 TB-PPD 对卡介苗活菌致敏豚鼠迟发型超敏反应试验结果

豚鼠编号	皮肤试验 48 h 后观察硬结或红晕平均直径(mm)							
	EC				TB-PPD			
	横径	纵径	平均直径	反应结果	横径	纵径	平均直径	反应结果
1	0.0	0.0	0.0	阴性	16.0	15.0	15.5	阳性
2	0.0	0.0	0.0	阴性	15.0	16.0	15.5	阳性
3	0.0	0.0	0.0	阴性	15.0	17.0	15.0	阳性
4	0.0	0.0	0.0	阴性	15.0	15.0	15.0	阳性

注 平均直径=(纵径+横径)/2;反应结果判定标准为平均直径 ≥ 5 mm 判为阳性, < 5 mm 判为阴性

注射前、注射后 1 d、3 d、5 d、7 d、8 d、10 d、12 d、14 d EC 高剂量组、低剂量组小鼠平均体质量分别为 $(20.6 \pm 1.3) \text{ g} \sim (24.9 \pm 2.1) \text{ g}$ 、 $(20.5 \pm 1.6) \text{ g} \sim (26.0 \pm 3.1) \text{ g}$ ；注射后不同观察时间各组平均体质量和相应时间的空白对照组 $[(21.0 \pm 1.1) \text{ g} \sim (25.3 \pm 2.3) \text{ g}]$ 比较差异均无统计学意义 (P 值均 > 0.05) (表 3)。小鼠肌内注射 EC 在不同观察时间

点,即注射前、注射后 1 d、3 d、5 d、7 d、8 d、10 d、12 d、14 d EC 高剂量组、低剂量组小鼠平均体质量分别为 $(21.0 \pm 1.5) \text{ g} \sim (26.2 \pm 1.9) \text{ g}$ 、 $(20.5 \pm 2.1) \text{ g} \sim (25.8 \pm 3.8) \text{ g}$ ；注射后不同观察时间各组平均体质量和相应时间的空白对照组 $[(21.2 \pm 1.7) \text{ g} \sim (25.8 \pm 3.1) \text{ g}]$ 比较差异均无统计学意义 (P 值均 > 0.05) (表 4)。试验结束后解剖所有试验小鼠,各脏器和药物注射部位皮肤均未发现任何肉眼可见的异常病变。

表 3 皮内注射 EC 前后不同观察时间各组小鼠的体质量比较

观察时间	空白对照组 (g, $\bar{x} \pm s$)	高剂量组 (g, $\bar{x} \pm s$)	t 值 ^a	P 值	低剂量组 (g, $\bar{x} \pm s$)	t 值 ^a	P 值	溶剂对照组 (g, $\bar{x} \pm s$)	t 值 ^a	P 值
注射前	21.0 $\pm$ 1.1	20.6 $\pm$ 1.3	0.571	0.575	20.5 $\pm$ 1.6	0.695	0.496	20.5 $\pm$ 1.1	0.945	0.357
注射后 1 d	21.3 $\pm$ 1.3	20.6 $\pm$ 1.6	1.047	0.309	21.0 $\pm$ 1.6	0.453	0.656	20.2 $\pm$ 1.7	1.686	0.109
注射后 3 d	21.1 $\pm$ 2.1	21.3 $\pm$ 2.6	0.151	0.882	22.2 $\pm$ 2.7	0.920	0.370	20.4 $\pm$ 3.0	0.682	0.504
注射后 5 d	20.3 $\pm$ 2.3	20.9 $\pm$ 2.8	0.570	0.576	22.2 $\pm$ 2.9	1.676	0.111	20.6 $\pm$ 3.6	0.221	0.828
注射后 7 d	21.6 $\pm$ 2.1	22.0 $\pm$ 2.4	0.379	0.709	23.2 $\pm$ 2.8	1.462	0.161	21.6 $\pm$ 3.3	0.000	1.000
注射后 8 d	22.2 $\pm$ 2.1	22.6 $\pm$ 1.8	0.452	0.657	23.8 $\pm$ 2.7	1.574	0.133	22.3 $\pm$ 3.5	0.108	0.915
注射后 10 d	23.2 $\pm$ 2.3	23.4 $\pm$ 1.6	0.189	0.852	24.5 $\pm$ 2.6	1.184	0.252	24.2 $\pm$ 3.2	0.765	0.454
注射后 12 d	24.4 $\pm$ 2.0	24.3 $\pm$ 2.0	0.099	0.922	25.5 $\pm$ 3.0	0.933	0.363	24.7 $\pm$ 2.9	0.262	0.796
注射后 14 d	25.3 $\pm$ 2.3	24.9 $\pm$ 2.1	0.392	0.700	26.0 $\pm$ 3.1	0.615	0.546	25.5 $\pm$ 3.1	0.145	0.886

注^a:与空白对照组间的比较

表 4 肌内注射 EC 前后不同观察时间各组小鼠的体质量比较

观察时间	空白对照组 (g, $\bar{x} \pm s$)	高剂量组 (g, $\bar{x} \pm s$)	t 值 ^a	P 值	低剂量组 (g, $\bar{x} \pm s$)	t 值 ^a	P 值	溶剂对照组 (g, $\bar{x} \pm s$)	t 值 ^a	P 值
注射前	21.2 $\pm$ 1.7	21.0 $\pm$ 1.5	0.360	0.723	20.5 $\pm$ 2.1	0.900	0.380	20.8 $\pm$ 1.8	0.552	0.588
注射后 1 d	21.7 $\pm$ 2.5	21.2 $\pm$ 2.0	0.549	0.590	20.7 $\pm$ 2.4	0.870	0.396	20.9 $\pm$ 2.4	0.767	0.453
注射后 3 d	22.3 $\pm$ 3.3	21.6 $\pm$ 3.1	0.543	0.594	21.6 $\pm$ 3.1	0.509	0.617	21.3 $\pm$ 2.7	0.786	0.442
注射后 5 d	22.2 $\pm$ 3.7	21.5 $\pm$ 3.0	0.489	0.631	22.2 $\pm$ 3.2	0.006	0.995	21.5 $\pm$ 2.6	0.480	0.637
注射后 7 d	22.5 $\pm$ 3.5	22.2 $\pm$ 2.1	0.251	0.805	23.0 $\pm$ 3.5	0.312	0.759	22.8 $\pm$ 2.5	0.214	0.833
注射后 8 d	23.2 $\pm$ 3.1	22.9 $\pm$ 1.9	0.305	0.764	23.3 $\pm$ 3.3	0.070	0.945	23.8 $\pm$ 2.9	0.421	0.679
注射后 10 d	24.3 $\pm$ 2.9	24.0 $\pm$ 2.2	0.277	0.785	23.6 $\pm$ 3.9	0.433	0.670	25.2 $\pm$ 3.0	0.716	0.483
注射后 12 d	25.0 $\pm$ 3.0	25.0 $\pm$ 1.8	0.018	0.986	24.9 $\pm$ 3.7	0.093	0.927	25.8 $\pm$ 3.4	0.531	0.602
注射后 14 d	25.8 $\pm$ 3.1	26.2 $\pm$ 1.9	0.318	0.754	25.8 $\pm$ 3.8	0.006	0.995	26.7 $\pm$ 3.4	0.565	0.579

注^a:与空白对照组间的比较

表 5 注射 EC 全身主动过敏试验致敏后不同时间各组豚鼠的体质量比较

致敏情况	阴性对照组 (g, $\bar{x} \pm s$)	高剂量组 (g, $\bar{x} \pm s$)	t 值 ^a	P 值	低剂量组 (g, $\bar{x} \pm s$)	t 值 ^a	P 值	阳性对照组 (g, $\bar{x} \pm s$)	t 值 ^a	P 值
首次	329.5 $\pm$ 27.4	327.5 $\pm$ 24.3	0.328	0.757	331.3 $\pm$ 26.7	0.474	0.656	328.7 $\pm$ 31.8	0.215	0.838
末次	348.3 $\pm$ 27.0	347.2 $\pm$ 32.7	0.181	0.864	346.2 $\pm$ 32.0	0.366	0.730	336.7 $\pm$ 32.2	1.860	0.122
激发	399.4 $\pm$ 25.4	402.2 $\pm$ 34.9	0.284	0.788	411.3 $\pm$ 38.9	0.875	0.422	383.7 $\pm$ 33.3	2.069	0.093

注^a:与阴性对照组间的比较

表 6 EC 不同剂量组豚鼠全身主动过敏试验结果

组别	过敏反应的豚鼠数(只)	死亡豚鼠数(只)	反应级别	过敏反应结果
高剂量组	0	0	—	阴性
低剂量组	0	0	—	阴性
阳性对照组	6	3	++++	极强阳性
阴性对照组	0	0	—	阴性

注 “—”表示过敏反应阴性(正常);“++++”表示过敏反应极强阳性(死亡)

三、豚鼠全身主动过敏试验结果

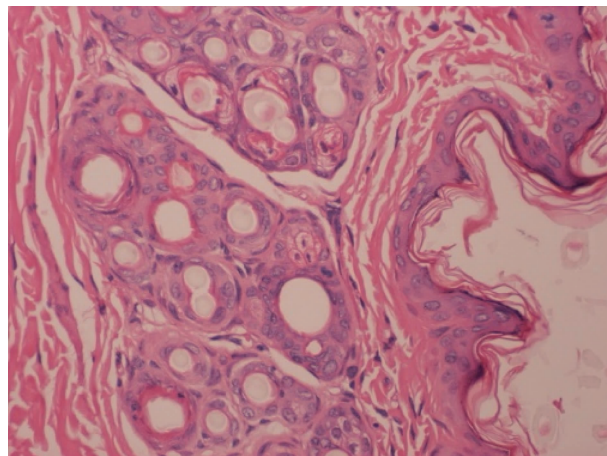
各试验组豚鼠在致敏期间均未见明显异常反应,体质量也均随试验时间延长而增加。高剂量组、低剂量组豚鼠首次致敏、末次致敏、激发时的平均体质量分别为(327.5 ± 24.3) g、(347.2 ± 32.7) g、(402.2 ± 34.9) g; (331.3 ± 26.7) g、(346.2 ± 32.0) g、(411.3 ± 38.9) g,与相应时间的 0.9% NaCl 注射液阴性对照组[(329.5 ± 27.4) g、(348.3 ± 27.0) g、(399.4 ± 25.4) g]比较差异均无统计学意义(P 值均 > 0.05) (表 5)。末次致敏后第 12 天给予激发剂量后,高剂量组、低剂量组与相应时间阴性对照组均无过敏反应发生。而阳性对照组豚鼠均出现明显的过敏反应症状,主要表现为不安宁、竖毛、发抖、搔鼻、喷嚏、咳嗽、呼吸急促、排尿、流泪、呼吸困难、步态不稳、跳跃、痉挛,甚至死亡,死亡时间在给药后 5 min 左右,有过敏反应的存活豚鼠在给药后 30 min 内逐渐恢复正常,其发生过敏反应的豚鼠有 6 只,死亡数为 3 只,过敏反应为极强阳性(表 6)。

四、兔皮内刺激试验结果

兔背部分别单次皮内注射 0.9% NaCl、EC 后,在各观察时间点均未见皮肤红斑、水肿现象。停药 72 h 后解剖,可见兔左、右侧给药局部皮肤色泽均匀、红润,无红斑、水肿、突起、溃疡等异常。镜下检查,兔左、右侧给药局部皮肤各层均未见充血、水肿、变性和炎性浸润等病理变化(图 1,2)。

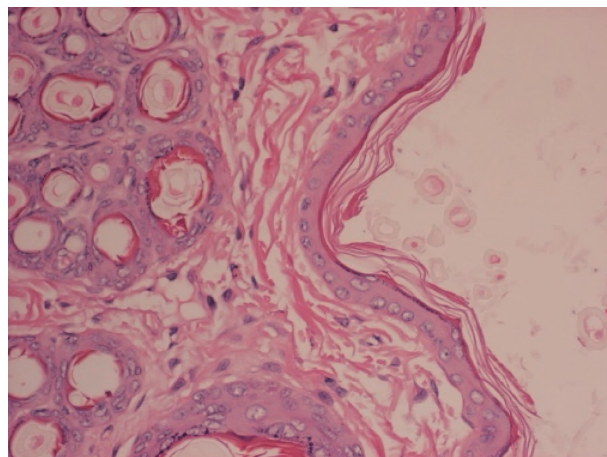
讨 论

结核病作为单病因致死率最高的传染性疾病,由于人口流动、耐药结核分枝杆菌和结核分枝杆菌与人获得性免疫缺陷病毒双重感染等因素,结核病防治工作面临巨大的挑战^[6]。因此,如何早期发现高危人群并给予预防是结核病控制的重要问题,而其中寻找能诊断和确定患者体内是否留有存活结核分枝杆菌应该是实现的关键。目前对于 LTBI 患者的诊断手段主要有 IGRA 及 PPD 皮肤试验,但



皮肤各层未见充血、水肿、变性和炎性浸润等病理变化

图 1 兔皮内注射 0.9% NaCl 注射液后局部皮下组织学切片 (HE $\times 400$)



皮肤组织结构正常,各层未见充血、水肿、变性和炎性浸润等病理变化

图 2 兔皮内注射 EC 后局部皮下组织学切片 (HE $\times 400$)

IGRA 检测费用昂贵、检测技术高等实际问题,难以在结核病高发的发展中国家实施;PPD 皮肤试验不能有效区分卡介苗接种与结核感染,更不能鉴别结核感染者体内有无存活的结核分枝杆菌^[7]。因此,研制一种特异性强、方便使用的结核病诊断试剂对控制我国结核病传染具有重要价值。

结核分枝杆菌生长期间分泌的蛋白对结核病的保护性免疫作用非常重要。迄今为止,大量结核分枝杆菌的抗原被作为结核病疫苗的候选蛋白。据报道,现已用基因工程技术研究了分枝杆菌的多种抗原蛋白,比如 CFP-10、ESAT-6 和 Ag85 家族蛋白^[8-9]。ESAT-6 蛋白诱导机体产生明显的 T 细胞免疫应答和释放高水平 γ -干扰素 (IFN- γ),具有良好的抗原刺激性并能被大多数结核病患者所识别;CFP-10 与 ESAT-6 同属于 ESAT-6 家族,也是免疫优势抗原,能诱导机体产生免疫应答。

根据 Swissprot 和 GenBank 数据库资料分析,ESAT-6 和 CFP-10 基因严格限制于结核分枝杆菌复合群和 4 种非结核分枝杆菌(堪萨斯分枝杆菌、海分枝杆菌、微黄分枝杆菌和苏加分枝杆菌)中,卡介苗和大部分非结核分枝杆菌缺失^[10-12],因此 ESAT-6 和 CFP-10 蛋白不受卡介苗和绝大多数环境分枝杆菌的影响,具有很好的特异性。EC 对结核分枝杆菌 H37Ra 活菌致敏豚鼠的皮肤试验,阳性为 6 只;对卡介苗活菌致敏豚鼠的皮肤试验,阳性为 0 只。迟发型超敏反应试验表明,EC 能够鉴别结核感染与卡介苗免疫。

临床前动物安全性研究表明,采用不同注射方式(单次皮内注射和单次肌肉注射),EC 在每只鼠注射高剂量(53.61 μ g)和等效剂量(0.2 μ g)的条件下,所有小鼠未出现明显的急性中毒反应和显示有急性中毒的靶器官。采用 3 次腹腔注射致敏和 1 次静脉注射激发的模式,豚鼠在致敏期间均未见明显异常反应,体质量随试验时间延长而增长;激发后,注射 EC 高剂量组、低剂量组均无过敏反应发生,表明 EC 对豚鼠无过敏反应。采用单次皮内注射方式,EC 在试验剂量[10 μ g(0.2 ml)/点,每侧 5 个点]条件下,对兔皮内无明显刺激反应。EC 临床前动物试验安全性好,能够鉴别结核感染与卡介苗免疫,有望应用于人群结核感染的诊断与鉴别诊断。

参 考 文 献

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2019. Geneva: World Health Organization, 2019.
- [2] World Health Organization. Global tuberculosis report 2018. Geneva: World Health Organization, 2018.
- [3] World Health Organization. Global strategy and target for tuberculosis prevention, treatment and control after 2015. Geneva: World Health Organization, 2014.
- [4] 高磊, 金奇. 关口前移结核潜伏感染及其控制. 中国防痨杂志, 2018, 40(8): 791-795. doi: 10.3969/j.issn.1000-6621.2018.08.003.
- [5] Li F, Xu M, Zhou LJ, et al. Safety of Recombinant Fusion Protein ESAT6-CFP10 as a Skin Test Reagent for Tuberculosis Diagnosis: an Open-Label, Randomized, Single-Center Phase I Clinical Trial. Clin Vaccine Immunol, 2016, 23(9): 767-773. doi: 10.1128/CVI.00154-16.
- [6] 宫俐, 韩中波. 分子生物学技术在结核病诊断及耐药检测中的应用. 医药前沿, 2018, 8(26): 69-70. doi: 10.3969/j.issn.2095-1752.2018.26.054.
- [7] 葛燕萍, 肖和平. γ 干扰素释放试验与结核菌素皮肤试验辅助检测肺外结核病的比较. 中国防痨杂志, 2014, 36(3): 194-197. doi: 10.3969/j.issn.1000-6621.2014.03.011.
- [8] Lozes E, Huygen K, Content J, et al. Immunogenicity and efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding the components of the secreted antigen 85 complex. Vaccine, 1997, 15(8): 830-833. doi: 10.1016/S0264-410X(96)00274-5.
- [9] Ravn P, Demissie A, Eguale T, et al. Human T cell responses to the ESAT-6 antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis, 1999, 179: 637-645. doi: 10.1086/314640.
- [10] Ah-Ra J, Green K, Jung J, et al. Hong *Mycobacterium tuberculosis* ESAT6 Drives the Activation and Maturation of Bone Marrow-Derived Dendritic Cells via TLR4-Mediated Signaling. Immune Netw, 2019, 19(2): e13. doi: 10.4110/in.2019.19.e13.
- [11] Dillon DC, Alderson MR, Day CH, et al. Molecular and immunological characterization of *Mycobacterium tuberculosis* CFP-10, an immunodiagnostic antigen missing in *Mycobacterium bovis* BCG. J Clin Microbiol, 2000, 38(9): 3285-3290.
- [12] 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(1): 16-22. doi: 10.1111/j.1749-6632.1996.tb52715.x.

(收稿日期: 2020-06-09)

(本文编辑: 范永德)