

结核病 DNA 疫苗研究进展

薛玉芹,方 强

[关键词] 结核病;DNA 疫苗;综述

[中图分类号] R 378.91

[文献标志码] A

DOI:10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2016.03.043

结核病(TB)是由结核分枝杆菌(Mtb)引起的以呼吸道为主的一种传染性疾病,严重危害人类健康。随着医学科学技术的发展,人类对抗 TB 已取得了一定的成果,包括有效的治疗药物及疫苗的研发。但同时由于 Mtb 耐药的严重性、人类免疫缺陷性病毒(HIV)与 Mtb 的双重感染及流动人口的日益增多、吸毒等,加上不少国家对 TB 的忽视,TB 在全球范围内呈回升趋势。世界卫生组织发布的《2012 年全球结核病控制报告》^[1]指出,虽然目前死于 TB 的人和患病的人都呈下降趋势,但每年仍有数百万 TB 新发病例,2011 年全球新增 TB 患者 870 万人,死于 TB 的人数为 140 万人,其中新增 TB 患者中有 3.7% 患有耐多药 TB,全球 TB 负担仍然十分严重。

至今,卡介苗(BCG)仍是被批准使用的预防 TB 的唯一疫苗,其保护力不稳定,差异大,究其原因可能受 BCG 菌株差异、感染 Mtb 菌株的差异性、Mtb 的内源性复燃和外源性再感染以及接种人群和临床试验方法的差异性等的影[2]。随着免疫学和分子生物学的迅速发展,新型的 TB 疫苗已得到广泛研究,如活疫苗、亚单位疫苗(DNA 疫苗、重组蛋白疫苗等)和灭活疫苗等,其中 DNA 疫苗以其安全、经济、有效等优点,成为近年来 TB 疫苗研究的热点之一,本文就 TB DNA 疫苗的研究进展作一综述。

1 DNA 疫苗的概念及免疫机制

1.1 DNA 疫苗的概念 DNA 疫苗是指把能引起机体保护性免疫反应的病原体抗原编码的外源基因和真核表达载体连接,通过某种方法导入机体,通过宿主细胞的转录翻译成抗原蛋白,诱导机体产生对该抗原的体液免疫和细胞免疫反应,以达到预防和/或治疗疾病的目的。WOLFF 等^[3]研究发现小鼠的骨骼肌细胞能捕获不加以任何处理的外源基因并在一定时间内表达,并能诱发小鼠产生相应的细胞与体液免疫反应,从而开辟了核酸疫苗学的新天地。DNA 疫苗按其应用目的可分为预防性疫苗和治疗性疫苗。

1.2 DNA 疫苗的免疫机制 目前认为,TB DNA 疫苗被直

接导入宿主体内后,在细胞内表达 Mtb 蛋白抗原,加工形成多肽抗原,与宿主细胞 MHC-I 类和 MHC-II 类分子结合,递呈给宿主的免疫识别系统,引起特异性细胞和体液免疫应答,特别是细胞毒性细胞应答反应。组织细胞摄入质粒 DNA 后,在细胞核内转录成 mRNA,再在细胞质内翻译成抗原蛋白分子。一部分内源性抗原蛋白结合到泛肽上,被蛋白酶降解为多肽,通过肽转运结构(TAP)转运至内质网,形成多肽-MHC-I 类分子聚合物,最后到达细胞膜表面,借助 TCR 受体被 CD8⁺ 细胞识别,诱发 CD8⁺ CTL T 细胞应答;同时,部分抗原从抗原提呈细胞(APC)的细胞膜进入,通过 MHC-II 递呈途径,被 APC 溶酶体降解为多肽,最后形成成熟的 MHC 异聚体,在细胞膜表面,被 CD4⁺ T 细胞识别,引起细胞免疫和体液免疫应答。其中,还有一部分抗原多肽递呈给 B 细胞,激活 B 细胞,部分转化为浆细胞,产生特异性抗体,引发体液免疫^[4-6]。

2 TB DNA 疫苗的种类

2.1 TB 预防性 DNA 疫苗 疫苗的最初目的是为了预防疾病的发生,DNA 疫苗也是如此。TB DNA 疫苗的研究目的也是由于 BCG 保护力不稳定,而作为第二代疫苗的重组蛋白亚单位疫苗诱发细胞免疫应答的能力较弱,对 TB 的预防并不理想,需要研发能够全面诱发体液免疫和细胞免疫的新型疫苗来预防 TB 的发生。近年来,随着对结核菌致病机制认识的深入,预防性 DNA 疫苗的研制目标不仅限于针对正常人群抗结核杆菌感染的预防,更重要的是要研发针对潜伏期感染的疫苗,达到抑制、清除潜伏感染的细菌,防止 TB 复发也是其重要的目标^[7]。目前,已有多种 TB 预防性 DNA 疫苗在动物实验中获得了较理想的效果。

2.2 TB 治疗性 DNA 疫苗 由于化疗药的不良反应和耐药结核菌株的流行等,TB 的免疫治疗引起了学者的广泛关注。治疗性疫苗是指接种于已感染病原体的个体,发挥主动免疫,成为近年来控制传染性疾病的[8]。TB 治疗性疫苗的目的是诱导和增强细胞介导的免疫反应,杀死细胞内寄生的 Mtb,DNA 疫苗在细胞内生成内生性抗原,不仅能诱导体液免疫和 TH1 型细胞免疫应答,还能诱导特异性的 CTL 应答,能将低效的抑菌反应转换成高效的杀菌作用。日本科学家^[9]将白细胞介素(IL)-6 相关基因连接到腺病毒载体,构建 IL-6 相关 DNA 疫苗,采用该疫苗治疗小鼠后,发现其肺部 Mtb 数目明显低于 BCG 东京株,且能激发 CTL 活性,具有显著的治疗效果。目前在 TB 疫苗研制中备受关注的 Ag85 分

[收稿日期] 2013-12-25

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30600518/C030112)

[作者单位] 蚌埠医学院 病原生物学教研室,感染与免疫安徽省重点实验室,安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 薛玉芹(1985-),女,硕士研究生。

[通信作者] 方 强,博士,硕士研究生导师,教授。E-mail:fq333@sohu.com

泌性抗原,梁艳等^[10-11]证明 Ag85A、Ag85A/ESAT6 嵌合型 DNA 疫苗与药物联合使用能显著提高药物对耐药 Mtb 感染的治疗效果。其中, Mtb 早期表达的蛋白, 适应宿主体内的免疫环境, 成为免疫系统的诱导蛋白, 因此在潜伏感染期首次表达的蛋白(休眠期蛋白)是治疗性疫苗表达的重要抗原, 但目前研究甚少, 主要包括休眠相关基因热休克蛋白(HSP) X、休眠相关蛋白(Dormancy-related, DosR)等。有研究^[12-13]证明, HSP65 与 IL-12 编码基因融合表达构建的 DNA 疫苗, 在治疗 TB 小鼠的实验中, 能显著提高 TH1 细胞免疫反应, 减少 Mtb 的数目。

3 结核 DNA 疫苗研究的主要疫苗候选基因

3.1 DosR 编码基因 DosR 是由 Rv3407 基因编码, 是 Mtb 从潜伏期转化到再活化状态时产生的特异性蛋白, 对潜伏期人群有明显的保护作用^[14], 是治疗性疫苗的重要抗原。有研究^[15-17]发现, Rv3407 能诱导 Mtb 潜伏期的特异性记忆 T 细胞分泌干扰素(IFN), 构建的 PVAX1-Rv3407 DNA 疫苗, 通过宿主细胞的转录系统表达蛋白抗原, 能诱导宿主产生细胞免疫和体液免疫应答, 对 Mtb 的潜伏期感染状态, 产生高效的 T 细胞免疫。研究^[18]报道, Mtb 休眠期抗原 Rv2660c 和 Ag85B、ESAT6 融合制备的疫苗具备有效预防潜伏期感染结核菌的复活。

3.2 HSP 编码基因 HSP 又称“分子伴侣”, 属于胞质蛋白, 是被免疫系统识别的重要抗原, 其编码基因是研究最早的 DNA 疫苗候选分子之一, 近年来被用来研究 DNA 疫苗的主要是 HSP65、HSP70 编码基因。二者质粒 DNA 疫苗既可用于作预防性疫苗又可作为治疗性疫苗。ANDEREN 等^[19-20]构建了 HSP65 与人 IL-2 融合基因的 DNA 疫苗, 研究发现其能诱导产生大量的 IFN- γ 和 IL-2 和特异性的 IgG2a 抗体, 在用于治疗 TB 小鼠模型时, 能明显降低 Mtb 的数目, 提高 TH1 型细胞免疫反应。胡方靖等^[21]构建 pHsp65GM 真核表达质粒并研究其 DNA 疫苗的免疫原性和对感染 Mtb 小鼠的免疫保护效果, 研究表明, pHsp65GM DNA 疫苗能诱导小鼠产生特异性的 IgG, 脾淋巴细胞增殖和分泌 IFN- γ , 且脾、肺载菌量均低于对照组。HSP70 具有基因佐剂作用, 有多个 T 细胞和 B 细胞表位, 免疫原性比 Hsp65 更强, 可诱发特异性 Th1 反应。LOWRIE 等^[22]研究发现, 用 HSP-70 DNA 疫苗治疗感染 Mtb 的小鼠, 其 HSP-70DNA 疫苗可诱导 IFN- γ 的产生和特异性的 CTL 活性, 小鼠脾、肺菌落数显著低于对照组。史小玲等^[23]把 Hsp70/CD80 嵌合 DNA 疫苗接种于用 H37Rv 强毒株攻击后的小鼠, 研究表明该疫苗具有良好的免疫治疗作用。

3.3 Ag85 复合物编码基因 Ag85 复合物是 Mtb 和 BCG 主要的分泌性蛋白, 由 Ag85A、Ag85B、Ag85C 三个组分构成。在 Ag85 编码基因构建的 DNA 疫苗中, Ag85A 和 Ag85B 效果为佳, Ag85C 基因重组的 DNA 疫苗效果不及 Ag85A 和 Ag85B^[24]。Ag85A 和 Ag85B 含有数个 T 细胞抗原决定簇, 可诱导感染鼠产生 IV 型超敏反应(DTH)和保护性免疫。HA 等^[25]将 Ag85A DNA 疫苗及 IL-12 用于感染 TB 小鼠的治疗,

发现该疫苗和药物联合治疗能显著减少小鼠 TB 的复发。此外, 国内研制的 Ag85A DNA 疫苗, 正在进行中试工艺研究中^[26]。

3.4 MPT64 编码基因 MPT64 编码基因位于 RD2 区, 在某些 BCG 菌株缺失, 编码的分泌性 MPT64 蛋白是重要的 T 细胞抗原和 B 细胞抗原, 能诱导 Mtb 感染的豚鼠发生很强的 DTH 反应。KAMATH 等^[27]首次将 MPT64 DNA 疫苗经肌肉注射免疫小鼠, 在间隔免疫过程中血清特异性抗体滴度逐渐升高, 可诱导脾细胞产生 IFN- γ 和特异性的 CTL 活性。梁艳等^[11,28]比较 Mtb MPT64、ESAT6、Ag85A 和 Ag85B 4 种 DNA 疫苗的免疫原性发现, 4 组 DNA 疫苗肌肉注射后均可在体内表达, MPT64DNA 疫苗诱导的抗体水平最高。但与 IL-12 或 IFN- γ 质粒 DNA 同时免疫时, 抗体水平无明显增加, 证明 MPT64DNA 疫苗与细胞因子共刺激后, 细胞因子可降低小鼠对其疫苗的抗原特异性抗体反应, 而转为以诱导细胞免疫为主。

3.5 PstS 编码基因 Mtb 磷酸盐特异转运系统(phosphate-specific transport system, PstS) 包括 3 个磷酸盐结合蛋白, 分别称为 PstS-1(也称为蛋白抗原 b)、PstS-2、PstS-3, PstS 基因所构建的 DAN 疫苗免疫小鼠后可产生特异性的抗体和诱导 TH1 型细胞免疫应答, 产生 IL-12 及 IFN- γ 等, 其中 PstS-1 DNA 疫苗免疫不能激发细胞免疫应答, PstS-3 DNA 免疫可产生较高水平的免疫应答, 接受 H37Rv 强毒株攻击后, 脾、肺菌数量明显减少, PstS-2 DNA 免疫产生的免疫水平介于中间^[29]。

3.6 RD1 区优势抗原 ESAT6、CFP10 编码基因 BCG 缺失的 RD1 区, 仅存在于致病性分枝杆菌和一些非典型分枝杆菌。RD1 区同一操纵子的 ORFs Rv3875 和 Rv3874 分别编码的 ESAT6 和 CFP10, 是 RD1 区核心抗原, 可诱导 T 细胞, PBMC、NK 及 TB 患者 PBMCs 产生强烈的 IFN- γ ^[30], 具有良好的抗原性, 而全部 BCG 都缺失这两种蛋白, 使其成为当今 TB 疫苗研制的热点候选分子。有研究^[31-32]表明, ESAT6 和 CFP10 可使感染 Mtb 的小鼠体内记忆效应 T 细胞增殖及在感染早期即可产生高水平的 IFN- γ 。张海等^[33]构建的 Mtb ESAT6-CFP10 融合 DNA 疫苗免疫小鼠后, 能诱导产生较强的细胞免疫应答, 产生的 IFN- γ 与对照组 BCG 相比无明显差异, 可产生较好的免疫效果。WANG 等^[34]将泛素和 ESAT6 基因融合, 研究发现, 该 DNA 疫苗显著增加了细胞免疫应答, 提供了较好的保护作用。

4 提高 TB DNA 疫苗免疫效力的策略

众多研究表明, TB DNA 疫苗免疫效力不高, 单一 Mtb 抗原的 DNA 疫苗的保护效果一般不及 BCG, 严重制约着 DNA 疫苗的发展。增强 DNA 保护效应的方法除了选择更为有效的保护性抗原和多种抗原联合免疫或采用 Prime-Boost 免疫策略^[35](即初次用 DNA 疫苗免疫, 再次用 BCG、抗原蛋白或抗结核药物加强免疫)等方法外, 表达载体与佐剂的选择以及免疫途径也至关重要。

4.1 DNA 疫苗载体的选择及优化 自 TB DNA 疫苗研究以来,质粒作为其研究载体仍然占重要地位。人们通过优先选择具备基因特异性的强启动子、功能性剪接体和受体位点的内含子、特异有效的非甲基化 CpG 序列以及影响真核生物表达的 Kozak 序列等的质粒^[36-39],构建优化质粒载体的 DNA 疫苗。近年来,随着载体应用研究的深入,病毒载体以其可在宿主体内长期、稳定的表达目的基因的优势,成为 DNA 疫苗表达载体研究的热点。最新研究^[40-41]报道的一种 ESAT6 新型 DNA 疫苗,可表达 ESAT6T 细胞表位的减毒流感病毒 A/New Caledonia/20/99 株活疫苗可诱导 ESAT6 的高水平的抗血清抗体滴度,表明病毒样颗粒作为展示表位载体的有效性和可操作性。目前,病毒性载体的研究主要以腺病毒和痘病毒为主。

慢病毒载体具备能感染分裂期细胞和非分裂期细胞,携带的外源基因表达水平高,容纳外源目的基因的片段大等优点。其中腺病毒具有强有力的免疫原性和佐剂作用,可诱发 CD8⁺ T 细胞的细胞免疫反应^[42]和特异性的记忆免疫反应,有研究者^[43]认为第 5 型腺病毒用于结核疫苗的研究具有广泛性,但 5 型腺病毒在人群中有高度流行性,感染后的人体易产生中和抗体,削弱流行区的疫苗效率,而 35 型是非流行株,用途较为广泛;痘病毒具有接种一次,就能获得长期免疫效果的优点。目前,已有众多实验研究表明用该两种病毒载体构建的 TB DNA 疫苗的优势性和有效性,如 ESAT6 的重组腺病毒 DNA 疫苗,用于感染小鼠的免疫治疗,发现其肺部的细菌数和病灶的炎症反应程度减少^[44];以痘病毒为载体的重组 Ag85A DNA 疫苗目前已进入临床二期试验^[45]。

此外,病原体与感染宿主在密码子使用偏嗜性方面的差异可能导致外源性蛋白表达偏低,从而导致 DNA 疫苗的诱发免疫效应偏低,这已成为 DNA 疫苗发展的重要瓶颈之一。随着生物技术手段的发展,密码子优化技术为研制有效的 TB DNA 疫苗提供了新思路。密码子优化是指在不改变所编码蛋白的氨基酸序列的前提下,利用序列定点突变或全基因合成的方法,改变保护性抗原基因的稀有密码子,使之更适合在真核宿主细胞内高效表达,刺激宿主产生更强的免疫应答和保护力。在 TB 疫苗研究中,LAKEY 等^[46]将 Mtb85A、85B 及超氧化物歧化酶(SOD)在大肠埃希菌中使用率低的密码子进行优化,发现 85B 蛋白表达量增加约 54 倍,85A 和 SOD 蛋白表达量提高 4~6 倍。KO 等^[47]对 MtbAg85B 抗原基因优化,构建人源化的 Ag85BDNA 疫苗,体内外试验均提示,优化后的 Ag85B 蛋白表达量显著提高,且优化后 hAg85BDNA 疫苗可诱导小鼠产生更强的 Th1 和 CTL 免疫反应,产生更好的保护效应。本实验室将 CFPI0 和 ESAT6 基因进行优化,构建 CFPI0/PVAX1 和 ESAT6/PVAX1 重组 DNA 疫苗,通过与优化前比较,观察其免疫效应及保护力是否有所提高。这将是一个有意义的尝试,目前该研究正在进行之中。

4.2 免疫佐剂 TB DNA 疫苗的使用可以不联合佐剂,但合适的佐剂在某种程度上可解决其免疫原性低的问题,提高其

免疫效应和保护力,减少疫苗的免疫剂量和免疫次数。佐剂从最初的铝盐佐剂、弗氏佐剂,到各种新型佐剂已取得了迅速的发展,目前临床上批准用于人体的佐剂主要是铝佐剂和 MF59 两种。其次,细胞因子 IL-2、IL-12、IL-18 等可促进 TH1 反应,在 TB DNA 疫苗的发展中也发挥了重要作用。SHI 等^[48]将 Hsp65 基因与人 IL-2 融合构建 DNA 疫苗,研究显示对感染 Mtb 的小鼠具有很好的保护效果。李晖等^[49]将 Mtb8.4/hIL-12 嵌合 DNA 疫苗免疫小鼠,与 BCG 和 Mtb8.4 疫苗相比免疫作用增强。结核菌 DNA 中未甲基化的 CpG 序列一方面可诱导 B 细胞的增殖分化,同时还可激活 T 细胞、巨噬细胞等分泌细胞因子,诱发以 TH1 为主的体液免疫和细胞免疫应答。

此外,泛素、单磷脂脂(MLA)、IC31 以及一些新型的复合佐剂如 CAF01、TBD 等可诱导有效的细胞免疫应答和免疫保护效应^[50-53]。目前作为免疫佐剂热门研究领域的 Toll 样受体(TLR)激动剂,可介导即时的非特异性的抗病原体反应,并能通过相应的信号通路和免疫调节网络调节特异性免疫反应,发挥佐剂作用,在疫苗研究中已有所研究^[54-55]。随着纳米技术在生物医学中的发展,纳米材料以其具有易于加工修饰、促进功能分子入胞、保护 DNA 和蛋白质等降解,延长在血液的循环时间等优点,作为载体或佐剂在增强抗原免疫原性方面具有巨大的潜力,目前已有相关纳米粒子作为佐剂在 DNA 疫苗中的一些研究^[56-59]。

4.3 免疫途径 DNA 疫苗的免疫途径有多种,不同的免疫途径可影响抗原的吸收和表达,诱导的免疫强度和免疫机制也不同^[60]。早期 DNA 疫苗采用的常规肌肉注射法,其骨骼肌细胞摄取 DNA 后,可长时间持续表达,且肌肉接种诱发的免疫以 TH1 型为主,激活 CTL、TH1 细胞及产生 IgG2a 为主的 B 细胞^[61],但质粒 DNA 注射后,由于肌束膜的影响,仅有 1%~2% 的肌纤维被转染,大部分 DNA 未能进入细胞内,只留在细胞间隙被降解,摄取量极低。所以,有研究者通过肌肉注射联合体内电转染技术来提高质粒 DNA 的摄取量,增强免疫应答反应。体内电转染(又称体内电穿孔、电转化、电脉冲)是通过脉冲电流增加靶细胞的渗透性,使 DNA 易透过细胞膜,而不损害靶细胞,解决质粒 DNA 在灵长类动物体内转染效率低的问题。有研究^[62]将质粒 DNA 疫苗经肌肉注射后立即施加方型波电脉冲,发现肌肉注射 10 μg DNA 疫苗加电转染,能诱导出与不加电转染接种 100 μg DNA 疫苗相似或更强的抗体免疫应答,表明使用电转染技术可减少 DNA 疫苗的剂量和成本。

此外,新的免疫途径如基因枪法、黏膜免疫途径法、口服纳米乳或微针阵列经皮免疫途径等目前处于大量试验阶段,对未来 DNA 疫苗的发展具有巨大的潜力。

5 结语

TB DNA 疫苗是 20 世纪 90 年代发展起来的新型疫苗,近年来已经取得了可喜的进展,其可作为预防性疫苗,也可作为治疗性疫苗,被认为在 TB 防治中占有巨大的优势。但

同时也存在着一些问题:一是目前 TB DNA 疫苗的研究主要局限于小鼠和豚鼠模型,很少用灵长类动物模型,所以要想在临床试验中取得突破,还有很长的一段路要走;二是疫苗的安全问题,疫苗应用中不良反应的报道越来越多,主要包括免疫抑制、超敏反应及自身免疫等。因此,在日后的 DNA 疫苗研究进程中,我们要继续探求合适的保护抗原和载体,摸索最适宜的免疫策略、途径以及免疫剂量,充分利用佐剂的作用,将研发的新型疫苗免疫多种动物模型,进一步研究其保护性免疫机制,建立有效的体内和体外疫苗评价模型,同时建立量化的免疫毒理学评价指标^[63]。我们相信,随着 DNA 疫苗的免疫学机制和免疫策略的深入研究,人类定能克服困难,逐个攻破难题,研制出安全有效、经济合理的 DNA 疫苗用于 TB 的预防和治疗。

[参 考 文 献]

- [1] Global tuberculosis Control WHO Report (2012) [R]. Geneva: WHO, 2012.
- [2] 吴雪琼. 新型结核病疫苗的研究现状与发展趋势 [J]. 中国防痨杂志, 2012, 34 (3) : 133.
- [3] WOLFF JA, WILLIAMS P, ACSADI G, et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo* [J]. Science, 1990, 247 (4949 pt 1) : 1465.
- [4] FLYNN JL, GOLDSTEIN MM, TRIEBOLD KJ, et al. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89 (24) : 12013.
- [5] VAN PINXTEREN LA, CASSIDY JP, SMEDEGAARD BH, et al. Control of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection is dependent on CD8 T cells [J]. Eur J Immunol, 2000, 30 (12) : 3689.
- [6] HOHN H, KORTSIK C, ZEHBE I, et al. MHC class II tetramer guided detection of *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD4⁺ T cells in peripheral blood from patients with pulmonary tuberculosis [J]. Scand J Immunol, 2007, 65 (5) : 467.
- [7] KAUFMANN SHE. Novel tuberculosis vaccination strategies based on understanding the immune response (Foresight) [J]. J Intern Med, 2010, 267 (4) : 337.
- [8] 闻玉梅. 治疗性疫苗研究现状与前景 [J]. 生物产业技术, 2009: 1.
- [9] OKADA M, KITA Y, KANAMARU N, et al. Novel therapeutic vaccination (granulysin DNA, adenoviral vector/IL-6 related genes) against tuberculosis [J/OL]. [http://www.fasebj.org/cgi/content/meetin-gabstract/22/2/Meeting Abstracts/491](http://www.fasebj.org/cgi/content/meetin-gabstract/22/2/Meeting%20Abstracts/491).
- [10] 梁艳, 吴雪琼, 李忠明, 等. 结核分枝杆菌 Ag85A/ESAT-6 嵌合型质粒 DNA 疫苗和抗结核药物联合治疗小鼠耐药结核病的效果研究 [J]. 中国防痨杂志, 2007, 29 (5) : 382.
- [11] 梁艳, 吴雪琼, 李忠明, 等. 结核分枝杆菌 Ag85A DNA 疫苗抗结核作用的研究 [J]. 中国防痨杂志, 2012, 34 (3) : 181.
- [12] OKADA M, KITA Y, NAKAJIMA T, et al. Novel prophylactic and therapeutic vaccine against tuberculosis [J]. Vaccine, 2009, 27 (25/26) : 3267.
- [13] CHANGHONG S, HAI Z, LIMEI W, et al. Therapeutic efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding heat shock protein 65 of *Mycobacterium tuberculosis* and the human interleukin 2 fusion gene [J]. Tuberculosis, 2009, 89 (1) : 54.
- [14] SCHUCK SD, MUELLER H, KUNITZ F, et al. Identification of T-cell antigens specific for latent *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. PLoS One, 2009, 4 (5) : e5590.
- [15] MUELLER H, DETJEN AK, SCHUCK SD, et al. *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD4⁺, IFN- γ ⁺, and TNF α ⁺ multifunctional memory T cells coexpress GM-CSF [J]. Cytokine, 2008, 43 (2) : 143.
- [16] KAUFMANN SH. Recent findings in immunology give tuberculosis vaccines a new boost [J]. Trends Immunol. 2005, 26 (12) : 660.
- [17] KHERA A, SINGH R, SHAKILA H, et al. Elicitation of efficient, protective immune responses by using DNA vaccines against tuberculosis [J]. Vaccine, 2005, 23 (48/49) : 5655.
- [18] AAGAARD C, HOANG T, DIETRICH J, et al. A multistage tuberculosis vaccine that confers efficient protection before and after exposure [J]. Nat Med, 2011, 17 (2) : 189.
- [19] ANDERSEN P, ROSENKRANDS I, STRYHN A. Use of one or more polypeptides or their fragments, which are expressed during the latent stage of the mycobacterial infection, and/or nucleicacids encoding the polypeptides, for a therapeutic vaccine against tuberculosis: WO, 2004006952-A2; US, 2004057963-A1; AU, 2003242504-A1; EP, 1523331-A2; AU, 2003242504-A8 [P/OL].
- [20] CHANGHONG S, HAI Z, LIMEI W, et al. Therapeutic efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding heat shock protein 65 of *Mycobacterium tuberculosis* and the human interleukin 2 fusion gene [J]. Tuberculosis, 2009, 89 (1) : 54.
- [21] 胡方靖, 武军驻. pHsp65GM 的构建及其对结核分枝杆菌感染小鼠的保护 [J]. 免疫学杂志, 2011, 27 (8) : 666.
- [22] LOWRIE DB, TASCONE RE, BONATO VL, et al. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination [J]. Nature, 1999, 400 (6741) : 269.
- [23] 史小玲, 李晖, 钟森, 等. Hsp70/CD80 嵌合 DNA 疫苗对结核杆菌的治疗作用 [J]. 中华传染病杂志, 2004, 22 (1) : 30.
- [24] MALIN AS, HUYGEN K, CONTENT J, et al. Vaccinia expression of *Mycobacterium tuberculosis*-secreted proteins: tissue plasminogen activator signal sequence enhances expression and immunogenicity of *M. tuberculosis* Ag85 [J]. Microbes Infect, 2000, 2 (14) : 1677.
- [25] HA SJ, JEON BY, KIM SC, et al. Therapeutic effect of DNA vaccines combined with chemotherapy in a latent infection model after aerosol infection of mice with *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Gene Ther, 2003, 10 (18) : 1592.
- [26] LIANG Y, WU X, ZHANG J, et al. The treatment of mice infected with multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* using DNA vaccines or in combination with rifampin [J]. Vaccine, 2008, 26 (35) : 4536.
- [27] KAMATH AT, FENG CG, MACDONALD M, et al. Differential protective efficacy of DNA vaccine expressing secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Infect Immunol, 1999, 67 (4) : 1702.

- [28] 吴雪琼,郑越,徐燕杰,等. 不同剂量结核病 DNA 疫苗及细胞因子联合免疫的研究[J]. 中国免疫学杂志,2006,22(10):883.
- [29] TANGHE A, LEFEVRE P, DENIS O, *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of tuberculosis DNA vaccines encoding putative phosphate transport receptors[J]. *Immunol*,1999,162(2):1113.
- [30] KUMAR M, MEENAKSHI N, SUNDARAMURTHI JC, *et al.* Immune response to *Mycobacterium tuberculosis* specific antigen ESAT-6 among south Indian[J]. *Tuberculosis (Edinb)*,2010,90(1):60.
- [31] ZHANG H, PENG P, MIAO S, *et al.* Recombinant *Mycobacterium smegmatis* expressing an ESAT6-CFP10 fusion protein induces anti-mycobacterial immune responses and protects against *Mycobacterium tuberculosis* challenge in mice [J]. *Scand J Immunol*,2010,72(4):349.
- [32] WOODWORTH JS, FORTUNE SM, BEHAR SM. Bacterial protein secretion is required for priming of CD8⁺ T cells specific for the *Mycobacterium tuberculosis* antigen CFP10 [J]. *Infect Immun*,2008,76(9):4199.
- [33] 张海,师长宏,王丽梅,等. 表达结核分枝杆菌 ESAT6-CFP10 融合蛋白 DNA 疫苗免疫原性[J]. 第四军医大学学报,2007,28(6):489.
- [34] WANG QM, KANG L, WANG XH. Improved cellular response elicited by a ubiquitin-fused Esat6 DNA vaccine against *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Microbiol Immunol*,2009,53(7):384.
- [35] HUYGEN K. On the use of DNA Vaccines for the prophylaxis of mycobacterial diseases[J]. *Infect Immun*,2003,71(4):1613.
- [36] JATHOUL AP, HOLEY JL, GARMORY HS. Efficacy of DNA vaccines expressing the type F botulinum toxin Hc fragment using different promoters[J]. *Vaccine*,2004,22(29/30):3942.
- [37] CHINSANGARAM J, BEARD C, MASON PW, *et al.* Antibody response in mice inoculated with DNA expressing foot -and -mouth disease virus capsid proteins[J]. *J Virol*,1998,72(5):4454.
- [38] COBAN C, ISHII KJ, GURSEL M, *et al.* Effect of plasmid backbone modification by different human CpG motifs on the immunogenicity of DNA vaccine vectors[J]. *J Leukoc Biol*,2005,78(3):647.
- [39] KOZAK M. Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6[J]. *EMBO J*,1997,16(9):2482.
- [40] KRAMMER F, SCHINKO T, MESSNER P, *et al.* Influenza virus-like particles as an antigen-carrier platform for the ESAT-6 epitope of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *J Virol Methods*,2010,167(1):17.
- [41] KANG SM, SONG JM, QUAN FS, *et al.* Influenza vaccines based on virus-like particles[J]. *Virus Res*,2009,143(2):140.
- [42] BANGARI DS, MITTAL SK. Development of nonhuman adenoviruses as vaccine vectors [J]. *Vaccine*,2006,24(7):849.
- [43] MU J, JEYANATHAN M, SMALL CL, *et al.* Immunization with a bivalent adenovirus-vectored tuberculosis vaccine provides markedly improved protection over its monovalent counterpart against pulmonary tuberculosis [J]. *Mol Ther*,2009,17(6):1093.
- [44] ZABOLOTNYKH NV, VINOGRADOVA TI, STUKOVA MA, *et al.* The effectiveness of influenza vectors expressing the protective mycobacterial antigen ESAT-6 in the complex therapy of generalized tuberculosis in mice[J]. *Probl Tuberk Bolezn Legk*,2008,(12):30.
- [45] SCRIBA TJ, TAMERIS M, MANSOOR N, *et al.* Modified vaccinia Ankara-expressing Ag85A, a novel tuberculosis vaccine, is safe in adolescents and children, and induces polyfunctional CD4⁺ T cells [J]. *Eur J Immunol*,2010,40(1):279.
- [46] LAKEY DL, VOLADRI RK, EDWARDS KM, *et al.* Enhanced production of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* antigens in *Escherichia coli* by replacement of low-usage codons [J]. *Infect Immun*,2000,68(1):233.
- [47] KO HJ, KO SY, KIM YJ, *et al.* Optimization of codon usage enhances the immunogenicity of a DNA vaccine encoding mycobacterial antigen Ag85B[J]. *Infect Immun*,2005,73(9):5666.
- [48] CHONGHONG S, HAI Z, LIMEI W, *et al.* Therapeutic efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding heat shock protein 65 of *Mycobacterium tuberculosis* and the human interleukin2 fusion gene [J]. *Tuberculosis (Edinb)*,2009,89(1):54.
- [49] 李晖,李榕,钟森. 结核病 Mtb8.4 /hIL-12 嵌合基因疫苗免疫保护效果研究[J]. 免疫学杂志,2007,23(2):139.
- [50] 王庆敏,殷明,章建程,等. 泛素-结核抗原融合基因 DNA 疫苗诱导小鼠较强的细胞免疫应答[J]. 第二军医大学学报,2007,28(3):261.
- [51] AGGER EM, ROSENKRANDS I, OLSEN AW, *et al.* Protective immunity totuberculosis with Ag85B-E SAT-6 in a synthetic cationic adjuvant system IC31 [J]. *Vaccine*,2006,24(26):5452.
- [52] GARCON N, CHOMEZ P, VAN MECHELEN M. Adjuvant Systems in vaccines: concepts, achievements and perspectives [J]. *Expert Rev Vaccines*,2007,6(5):723.
- [53] AGGER EM, ROSEN KRANDS I, HANSEN J, *et al.* Cationic liposomes formulated with synthetic mycobacterial cordfactor (CAF01): a versatile adjuvant for vaccines with different immunological requirements [J]. *PLoS One*,2008,3(9):e3116.
- [54] TRIOZZI PL, ALDRICH W, PONNAZHAGAN S. Regulation of the activity of an adeno-associated virus vector cancer vaccine administered with synthetic Toll-like receptor agonists [J]. *Vaccine*,2010,28(50):7837.
- [55] VENUGOPAL PG, NUTMAN TB, SEMNANI RT. Activation and regulation of toll-like receptor (TLRs) by helminth parasites[J]. *Immunol Res*,2009,43(1/3):252.
- [56] 许利耕,陈春英. 纳米材料作为重大疾病疫苗载体或佐剂的研究进展[J]. 科学通报,2012,57(25):2341.
- [57] XU L, LIU Y, CHEN Z, *et al.* Surface-engineered gold nanorods: Promising DNA vaccine adjuvant for HIV-1 treatment [J]. *Nano Lett*,2012,12(4):2003.

- [58] POWELL TJ, PALATH N, DEROME ME, *et al.* Synthetic nanoparticle vaccines produced by layer-by-layer assembly of artificial biofilms induce potent protective T-cell and antibody responses *in vivo* [J]. *Vaccine*, 2011, 29(3):558.
- [59] 蒋青桃, 冯旰珠, 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*, 2011, 31(5):620.
- [60] DA'DARA AA, SKELLY PJ, FATAKDAWALA M, *et al.* Comparative efficacy of the *Schistosoma mansoni* nucleic acid vaccine, Sm23, following microseeding or gene gun delivery [J]. *Parasite Immunol*,

2002, 24(4):179.

- [61] XU XM, SONG GX, SI JY. Advance in research on DNA vaccine [J]. *Prog Microbiol Immunol*, 2002, 30(1):65.
- [62] 宋丹, 张颖, 黄嘉璐, 等. 电转染技术结合初免后加强免疫策略增强结核杆菌核酸疫苗免疫原性的研究 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2006, 26(2):127.
- [63] 都伟欣, 董娜, 陈保文, 等. 结核新疫苗的免疫毒理学评价方法研究 [J]. *中国防痨杂志*, 2012, 34(3):138.

(本文编辑 姚仁斌)

[文章编号] 1000-2200(2016)03-0413-03

· 综 述 ·

医患关系管理的研究进展

彭 静 综述, 张武丽, 张 静, 唐启寿 审校

[关键词] 医患关系管理; 医疗纠纷; 综述

[中图分类号] R 197.3

[文献标志码] A

DOI: 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2016.03.044

医疗纠纷的加剧和医患关系的恶化是医院面临的首要问题, 严重影响着医院运行的正常秩序和社会的安定和谐。加强对医患关系的有效管理逐渐成为国家、社会、医院亟待解决的问题。本文通过对国内外医患关系管理的制度、系统以及评价指标等进行综述, 发现和梳理医患关系管理的现状和存在的问题, 为医患关系管理的进一步政策研究提供参考。

1 医患关系管理的内容

1.1 医患关系管理的概念 对于医患关系管理的概念尚未形成权威的认识, 研究者多借用客户关系管理理论进行阐述^[1], 认为是医疗机构及政府部门以患者为中心^[2], 在了解患者对医疗服务的满意程度和意见基础上, 应用现代化管理理论有目标、有计划、有制度、有监督的持续改进医疗服务质量和水平^[3]。旨在改善医务人员与患者之间关系, 满足患者最大化的利益, 促进医患关系和谐发展, 实现医院经济效益和社会效益的管理机制^[1]。

1.2 患者权利与义务管理 医患矛盾根本上是由于医患双方权利受到侵害, 特别是患者权利没有得到应有的尊重与保护^[4]。西方各国对患者的权利与义务很早就进行立法规定^[5]。美国各州设立“患者权利宪章”并对权利做出规定^[6], 同时建立了“患者权利保护人”制度^[7]。王晓波^[4]指出患者权利保护是构建和谐医患关系的核心问题, 建议在患

者获得优质服务权、避免过度医疗、监督建议批评权等方面上加强立法。研究^[8]表明, 我国患者缺乏维护权利的意识, 医院缺乏规范患者权利与义务的制度。然而患者义务意识的缺失以及过度强调自身权利, 也容易导致医患关系的紧张^[9]。在以后研究中借鉴西方国家对患者的权利与义务进行法制化管理。

1.3 医生权利与义务管理 西方国家长期关注医生的职业精神^[10]。SWICK^[11]较全面地对职业精神进行概括。2002 年美国发布《新千年医师职业精神: 医师宪章》。国内长期以来医生执业环境恶劣^[12], 通过对恶性伤医事件追踪发现轻刑化的趋势明显以及判决结果不透明^[13], 医生的权利没有得到很好的维护。国家应确保医生的人生安全和权利得到保障, 患者与社会积极肯定医务人员的利益和价值。虽然国内法律对医生的权利与义务做出了相应的规定, 但没有明确规定医生过失豁免权以及报酬权的价值, 容易引起医生义务的行为化与患者追求权利结果化之间的冲突^[14]。有些医务人员追求自身利益、医德医风不正也是导致医患关系紧张的重要原因之一, 然而学者对于加强医德医风的评估与测量却没有很多研究。

1.4 投诉管理 英国 1996 年实施国民医疗保健体制, 设有患者宣传联络部门处理投诉问题^[15]。国外调查显示患者在接受解释和道歉后会感到满意, 有利于处理投诉^[16]。并且国外发现调解在处理投诉问题中能使双方在医疗纠纷解决中都能获益^[17], 而国内目前还没有重视。国内医疗投诉在消费者投诉中占据前列, 并逐渐增长^[18]。医疗投诉集中在服务质量及态度上^[19], 而且患者对投诉管理的知晓度和处理结果的满意度都不高^[20]。原因是医院缺乏统一投诉部门、规范的处理流程以及专业的投诉处理人员^[21]。加强对医疗纠纷的投诉管理是改善医患关系的突破口, 而国内投诉管理的体系不够成熟, 医院不够重视并缺乏规范的投诉处理

[收稿日期] 2015-05-21

[基金项目] 安徽高校省级人文社会科学研究重点项目 (SK2014A313); 蚌埠医学院人文重点研究基地项目 (BYFK14137); 蚌埠医学院研究生科研创新计划项目 (Byyxcx1526)

[作者单位] 蚌埠医学院 护理系, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 彭 静 (1988 -), 女, 硕士研究生。

[通信作者] 张武丽, 高级政工师。E-mail: zw1318318@123.com