基础研究 文章编号:0253-3626(2010)03-0327-05

细粒棘球绦虫重组 Bb-Eg95-EgA31 疫苗免疫小鼠后 Th1/Th2 型免疫应答的动态观察

周必英,陈雅棠,李文桂,杨梅
(重庆医科大学附属第一医院传染病寄生虫病研究所,重庆 400016)

【摘 要】目的:动态观察细粒棘球绦虫(*Echinococcus granulosus*,Eg)重组双歧杆菌(Bb)-Eg95-EgA31 疫苗免疫小鼠后 Th1/Th2 型免疫应答的变化。方法:将 5×10^8 克隆形成单位(CFU)和 5×10^5CFU 疫苗分别采用口服灌胃和鼻腔内接种免疫 BALB/c 鼠,在免疫后 2、4、6、8、10、12、14、16、18 和 20 周各剖杀 4 只小鼠,收集血清,用 ELISA 法测定血清 IgG 及其亚类和 IgE 水平;无菌取脾,用 ELISA 法检测脾淋巴细胞培养上清液中 IFN-γ、IL-12、TNF-α 和 IL-10 水平。结果:口服免疫组小鼠血清 IgG、IgG2a、IgG2b、IgG1、IgG3 和 IgE 水平分别在免疫后 8~10 周、2~20 周、2~20 周、4~8 周、6~12 周和 10 周显著升高,脾淋巴细胞培养上清液中 IFN-γ、IL-12、TNF-α 和 IL-10 水平分别在免疫后 2~16 周、2~12 周、2~6 周和 4~12 周显著升高;鼻腔内接种组小鼠血清 IgG、IgG2a、IgG2b、IgG1、IgG3 和 IgE 水平分别在免疫后 4~10 周、4~20 周、2~20 周、2~12 周、4~12 周和 10~12 周显著升高,脾淋巴细胞培养上清液中 IFN-γ、IL-12、TNF-α 和 IL-10 水平分别在免疫后 2~8 周、2~12 周、2~8 周和 6~16 周显著升高。结论:细粒棘球绦虫重组 Bb-Eg95-EgA31 疫苗可诱导小鼠产生 1 个 Th1/Th2 混合型免疫应答。口服免疫和鼻腔内接种是两种较好的免疫途径,且前者优于后者。

【关键词】细粒棘球绦虫;重组 Bb-Eg95-EgA31 疫苗;免疫球蛋白;Th1;Th2;细胞因子
【中图图书分类法分类号】R383.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-09-21

Dynamic observation on Th1/Th2 type immune response in mice immunized with recombinant Bb-Eg95-EgA31 vaccine of *Echinococcus granulosus*

ZHOU Bi-ying, et al
(*Institute of Infectious and Parasitic Diseases, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To dynamically observe changes of Th1/Th2 type immune responses in mice immunized with recombinant *Bifidobacteria bifidum* (Bb)-Eg95-EgA31 vaccine of *Echinococcus granulosus* (Eg). *Methods*: BALB/c mice were vaccinated by 5×10^8 colony forming unit (CFU) orally and 5×10^5CFU intranasally respectively. Mice were killed on week 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 and 20 after immunization respectively, sera were collected to measure the levels of IgG, its subclasses and IgE by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); Spleens were removed to determine the levels of IFN-γ, IL-12, TNF-α and IL-10 of splenocyte culture supernatant by ELISA. *Results*: Oral immunization mice showed higher levels of IgG, IgG2a, IgG2b, IgG1, IgG3 and IgE on the 8~10th week, 2~20th week, 2~20th week, 4~8th week, 6~12th week and 10th week respectively, while IFN-γ, IL-12, TNF-α and IL-10 on the 2~16th week, 2~12th week, 2~6th week and 4~12th week post vaccination respectively; Intranasal immunization mice showed higher levels of IgG, IgG2a, IgG2b, IgG1, IgG3 and IgE during the 4~10th week, 4~20th week, 2~20th week, 2~12th week, 4~12th week and 10~12th week respectively, while IFN-γ, IL-12, TNF-α and IL-10 on the 2~8th week, 2~12th week, 2~8th week and 6~16th week

作者介绍:周必英(1974-),女,副教授,博士,研究方向:病原微生物的分子免疫学研究。
通讯作者:李文桂,男,研究员,E-mail:li_wengui@yahoo.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金(编号:30801052 和 30671835)。

formation in human cancer cells[J]. Natl. Cancer Inst, 2002, 94(24): 1863-1877.

[12] Reagan-Shaw S, Ahmad N. Silencing of polo-like kinase (Plk) 1 via siRNA causes induction of apoptosis and impairment of mitosis machinery in human prostate cancer cells: implications for the treatment of prostate cancer[J]. FASEB J, 2005, 19(6): 611-613.

[13] Bu Y, Yang Z, Li Q, Song F. Silencing of polo-like kinase (Plk) 1 via siRNA causes inhibition of growth and induction of apoptosis in human esophageal cancer cells[J]. Oncology, 2008, 74(3-4): 198-206.

[14] Liu X, Erikson R L. Activation of Cdc2/cyclin B and inhibition of centrosome amplification in cells depleted of Plk1 by siRNA [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(13): 8672-8676.

[15] Liu X, Lei M, Erikson R L. Normal cells, but not cancer cells, survive severe Plk1 depletion[J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(6): 2093-2108.

(责任编辑:冉明会)

post vaccination respectively. *Conclusion*: Mixed Th1/Th2 type immune responses may be induced in mice immunized with the recombinant Bb-Eg95-EgA31 vaccine of *Echinococcus granulosus*. Oral and intranasal inoculation are two better immune routes, and the former is better than the latter.

【Key words】*Echinococcus granulosus*; Recombinant Bb-Eg95-EgA31 vaccine; Immunoglobulins; Th1; Th2; Cytokines

细粒棘球蚴病亦称囊型棘球蚴病(Cystic echinococcosis, CE),是由细粒棘球绦虫(*Echinococcus granulosus*, Eg)续绦期幼虫引起的一种严重危害人类健康的人兽共患寄生虫病。疫苗防治该病是当前研究的热点领域,Lightowlers 等[1,2]发现 Eg95 重组蛋白免疫的中间宿主(羊)可获 96%～100%的保护力。傅玉才等[3,4]证明 EgA31 重组蛋白能诱导终宿主(犬)产生特异的免疫应答。本实验在成功构建细粒棘球绦虫重组 Bb-Eg95-EgA31 疫苗的基础上[5,6],将该疫苗免疫小鼠后观察其 Th1/Th2 型免疫应答的动态变化,从而为研究该疫苗的保护性免疫机制提供有价值的材料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 疫苗来源 细粒棘球绦虫重组 Bb-Eg95-EgA31 疫苗由本室构建[5,6]。

1.1.2 实验动物 84 只雌性 BALB/c 小鼠,12～14 周龄,平均体重 20～25 g,购自重庆医科大学实验动物中心。

1.1.3 主要试剂和仪器 细粒棘球蚴粗抗原(EgAg)由本室制备;HRP 标记的羊抗小鼠 IgG、IgG2a、IgG2b、IgG1、IgG3 和 IgE 购自美国 SouthernBiotech 公司;小鼠 IFN-γ、IL-12、TNF-α 和 IL-10 检测试剂盒购自深圳欣博盛生物科技有限公司;刀豆素 A(ConA)和脂多糖(LPS)购自美国 Sigma 公司;RPMI1640 培养基、胎牛血清(FCS)、青霉素和链霉素均购自上海生工有限公司。酶标仪购自英国 Bio-TEK 公司,型号为 Elx800UV。

1.2 方法

1.2.1 实验分组与免疫 将 80 只 BALB/c 小鼠随机分为 2 组。疫苗口服灌胃组 40 只,5×10^8CFU 疫苗悬浮于 100 μl 双歧杆菌液体培养基(MRS)对小鼠口服灌胃;疫苗鼻腔内接种组 40 只,5×10^5CFU 疫苗悬浮于 10 μl MRS 对小鼠鼻腔粘膜单次接种。另设 4 只未免疫小鼠作为正常对照组。

1.2.2 血清收集 在疫苗免疫后 2、4、6、8、10、12、14、16、18 和 20 周各剖杀 4 只小鼠,摘眼球取血,4℃静置 12 h,2 000 r/min 离心 10 min,分离血清,-20℃冻存待查。

1.2.3 血清 IgG 及其亚类和 IgE 抗体检测 采用间接 ELISA 法。用包被液稀释 EgAg,以每孔 200 μl(5 μg/ml)4℃包被过夜;弃包被液,PBST 洗 3 次,加入 100 μl 封闭液 37℃封闭 2 h,甩干,PBST 洗 3 次;加入 1:6 稀释的小鼠血清 100 μl 置 37℃ 1 h,甩干,PBST 洗 3 次;加入 1:500 稀释的 HRP 标记羊抗小鼠 IgG 和 1:2000 稀释的 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 或 IgE 100 μl 置 37℃ 30 min,甩干,PBST 洗 3 次;加入 DAB 底物液 100 μl 置 37℃ 15～20 min; 加入 2 mol/L H_2SO_4 50 μl 终止反应,立即用酶标仪测 490 nm 处 OD 值。

1.2.4 脾细胞制备 处死小鼠后,无菌取脾,研磨,用含 100 ml/L FCS 的 RPMI1640 培养液调整细胞密度为 5×10^9 个/L,活细胞数在 90%以上,加入青霉素 100 U/ml 和链霉素 100 U/ml。

1.2.5 IFN-γ、IL-12 和 IL-10 的诱生和测定 将 5×10^9 个/L 脾细胞加入 24 孔细胞培养板,每份标本设 3 孔,分别加入 1 ml 原液、1 ml 原液+EgAg10mg/l、1 ml 原液+ConA 10 mg/l,37℃ 50 ml/L CO_2 孵箱中培养 48 h,4 000 r/min 离心 5 min,取上清 -20℃冻存待查。IFN-γ、IL-12、和 IL-10 水平检测采用 ELISA,操作步骤按各自试剂盒说明书进行。

1.2.6 TNF-α 的诱生和测定 将 5×10^9 个/L 脾细胞加入 24 孔细胞培养板,每份标本设 3 孔,分别加入 1 ml 原液、1 ml 原液+EgAg10 mg/l、1 ml 原液+LPS10 mg/l,37℃ 50 ml/L CO_2 孵箱中培养 72 h,4 000 r/min 离心 5 min,取上清 -20℃冻存待查。TNF-α 水平检测采用 ELISA,操作步骤按试剂盒说明书进行。

1.2.7 统计学处理 以上结果均采用 SPSS13.0 软件进行分析,计量资料采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较用最小显著差法(LSD 法)。

2 结 果

2.1 血清 IgG 及其亚类和 IgE 变化

口服免疫组小鼠血清 IgG、IgG2a、IgG2b、IgG1、IgG3 和 IgE 水平分别在免疫后 8～10 周、2～20 周、2～20 周、4～8 周、6～12 周和 10 周显著高于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),分别在免疫后 8、2、6、6、8 和 10 周达到最高水平;鼻腔内接种组小鼠血清 IgG、IgG2a、IgG2b、IgG1、IgG3 和 IgE 水平分别在免疫后 4～10 周、4～20 周、2～20 周、2～12 周、4～12 周和 10～12 周显著高于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),分别在免疫后 10、6、10、8、8 和 10 周达到最高水平。见表 1。

2.2 脾细胞培养上清液 IFN-γ 和 IL-12 水平

当原液、EgAg 或 ConA 刺激时,口服免疫组小鼠脾细胞上清液 IFN-γ 水平分别在免疫后 2～8 周、2～16 周和 2～14 周显著高于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.05$),均在免疫后 4 周达到最高水平;鼻腔内接种组小鼠脾细胞上清液 IFN-γ 水平均在免疫后 2～10 周显著高于对照组($P<0.01$),均在免疫后 2 周达到最高水平。口服免疫组小鼠脾细胞上清液

表 1 细粒棘球绦虫重组 Bb-Eg95-EgA31 疫苗免疫小鼠后血清 IgG 及其亚类和 IgE 动态变化($\bar{x}$+s, n=4)

组别	免疫后时间（周）	A 值(OD_{490}nm)					
		IgG	IgG2a	IgG2b	IgG1	IgG3	IgE
正常对照组		0.015 ± 0.001	0.005 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.006 ± 0.003
口服灌胃组	2	0.016 ± 0.004	0.016 ± 0.001**	0.009 ± 0.001**	0.004 ± 0.001	0.006 ± 0.002	0.006 ± 0.004
	4	0.017 ± 0.001	0.015 ± 0.002**	0.011 ± 0.002**	0.005 ± 0.001*	0.007 ± 0.003	0.006 ± 0.003
	6	0.020 ± 0.001	0.015 ± 0.003**	0.017 ± 0.003**	0.007 ± 0.001**	0.012 ± 0.001*	0.006 ± 0.002
	8	0.034 ± 0.010**	0.014 ± 0.002**	0.016 ± 0.002**	0.005 ± 0.001*	0.016 ± 0.006**	0.007 ± 0.002
	10	0.028 ± 0.005**	0.014 ± 0.002**	0.014 ± 0.002**	0.004 ± 0.002	0.008 ± 0.004*	0.012 ± 0.001**
	12	0.019 ± 0.002	0.013 ± 0.001**	0.014 ± 0.001**	0.004 ± 0.001	0.008 ± 0.006*	0.008 ± 0.001
	14	0.018 ± 0.001	0.013 ± 0.001**	0.013 ± 0.001**	0.003 ± 0.002	0.005 ± 0.001	0.007 ± 0.002
	16	0.017 ± 0.001	0.012 ± 0.001**	0.013 ± 0.002**	0.003 ± 0.001	0.005 ± 0.001	0.006 ± 0.002
	18	0.016 ± 0.001	0.012 ± 0.001**	0.012 ± 0.001**	0.002 ± 0.002	0.004 ± 0.002	0.006 ± 0.002
	20	0.015 ± 0.002	0.011 ± 0.001**	0.013 ± 0.002**	0.002 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.006 ± 0.003
鼻腔接种组	2	0.016 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.009 ± 0.001△	0.004 ± 0.001△	0.006 ± 0.004	0.007 ± 0.001
	4	0.021 ± 0.004△	0.009 ± 0.001△△	0.010 ± 0.001△△	0.005 ± 0.001△	0.009 ± 0.001△△	0.008 ± 0.002
	6	0.030 ± 0.010△△	0.018 ± 0.001△△	0.011 ± 0.002△△	0.005 ± 0.001△	0.013 ± 0.002△△	0.008 ± 0.001
	8	0.045 ± 0.004△△	0.018 ± 0.001△△	0.012 ± 0.002△△	0.006 ± 0.002△△	0.019 ± 0.001△△	0.009 ± 0.002
	10	0.047 ± 0.001△△	0.017 ± 0.001△△	0.014 ± 0.002△△	0.006 ± 0.001△△	0.012 ± 0.001△△	0.017 ± 0.005△△
	12	0.019 ± 0.004	0.017 ± 0.002△△	0.012 ± 0.004△△	0.004 ± 0.002△	0.007 ± 0.003△	0.010 ± 0.002△
	14	0.017 ± 0.002	0.016 ± 0.001△△	0.012 ± 0.003△△	0.004 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.009 ± 0.001
	16	0.017 ± 0.001	0.015 ± 0.001△△	0.011 ± 0.004△△	0.004 ± 0.001	0.005 ± 0.002	0.008 ± 0.001
	18	0.016 ± 0.001	0.013 ± 0.003△△	0.011 ± 0.003△△	0.003 ± 0.001	0.005 ± 0.001	0.007 ± 0.001
	20	0.015 ± 0.001	0.012 ± 0.002△△	0.010 ± 0.002△	0.003 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.006 ± 0.002

*P<0.05, **P<0.01, 与对照组比较; △P<0.05, △△P<0.01, 与对照组比较

IL-12 水平分别在免疫后 2～10 周、2～8 周和 2～12 周显著高于对照组(P<0.05 或 P<0.05), 均在免疫后 2 周达到最高水平; 鼻腔内接种组小鼠脾细胞上清液 IL-12 水平分别在 2～10 周、2～8 周和 2～12 周显著高于对照组(P<0.05 或 P<0.05), 均在免疫后 2 周达到最高水平。见表 2。

2.3 *脾细胞培养上清液 TNF-α 和 IL-10 水平*

当原液、EgAg 或 LPS 刺激时, 口服免疫组小鼠脾细胞上清液 TNF-α 水平分别在免疫后 4、4 和 2～6 周显著高于对照组(P<0.05 或 P<0.05), 均在免疫后 4 周达到最高水平; 鼻腔内接种组小鼠脾细胞上清液 TNF-α 水平分别在免疫后 2～4 周、2～6 周和 2～8 周显著高于对照组(P<0.05 或 P<0.05), 均在免疫后 4 周到最高水平。当原液、EgAg 或 ConA 刺激时, 口服免疫组小鼠脾细胞上清液 IL-10 水平分别在免疫后 6～12 周、6～10 周和 4～12 周显著高于对照组(P<0.05 或 P<0.05), 均在免疫后 6 周达到最高水平; 鼻腔内接种组小鼠脾细胞上清液 IL-10 水平均在免疫后 6～16 周显著高于对照组(P<0.05 或 P<0.05), 均在免疫后 8 周达到最高水平。见表 3。

3 讨 论

患者误食 Eg 虫卵是主要感染途径, 虫卵六钩蚴在肠内孵出后经迁移最后定居于宿主肝、肺等脏器, 因此, 研制 1 种 Eg 的黏膜免疫疫苗具有重要意义。重组 Bb 疫苗作为活菌苗具有其独特的优势: 单次接种即可诱导机体产生针对靶抗原的免疫反应, 可定殖肠道, 发挥益生菌和外源基因双重功能, 为人类细粒棘球蚴病的免疫预防提供了新途径。许多研究证实, 口服或鼻内接种免疫是黏膜免疫的主要途径, 能诱导鼻/肠相关淋巴组织(NALT/GALT)系统及黏膜免疫应答, 是 2 种非创伤途径, 易于被患者接受[7]。

体液免疫产生的抗体是评价疫苗免疫原性和保护性的重要指标。本实验表明细粒棘球绦虫重组 Bb-Eg95-EgA31 疫苗口服或鼻腔内接种免疫的小鼠血清 IgG、IgG2a、IgG2b、IgG1、IgG3 和 IgE 水平显著高于未免疫小鼠, 与 Eg95 重组 BCG 疫苗免疫结果略有不同, 但与 Eg95 重组蛋白、Eg95DNA 疫苗和 EgA31 重组蛋白免疫结果类似[8-12], 证明细粒棘球绦虫重组 Bb-Eg95-EgA31 疫苗具有良好的免疫原性, 为进一步开展该疫苗抗 Eg 感染的免疫保护性研究奠定了实验基础。

表 2 细粒棘球绦虫重组 Bb-Eg95-EgA31 疫苗免疫小鼠后脾细胞上清液 IFN-γ 和 IL-12 动态变化($\bar{x} \pm s$, n=4)

组别	免疫后时间（周）	IFN-γ (pg/mL)			IL-12(pg/mL)		
		原液	EgAg	ConA	原液	EgAg	ConA
正常对照组		25.0 ± 5.8	35.0 ± 5.8	45.0 ± 5.8	7.5 ± 2.9	12.5 ± 2.9	15.0 ± 5.8
口服灌胃组	2	450.0 ± 57.7**	550.0 ± 57.7**	750.0 ± 57.7**	35.0 ± 5.8**	45.0 ± 5.8**	55.0 ± 5.8**
	4	550.0 ± 57.7**	700.0 ± 115.5**	900.0 ± 115.5**	31.3 ± 2.5**	37.5 ± 2.9**	45.0 ± 5.8**
	6	85.0 ± 10.0*	115.0 ± 40.4*	150.0 ± 57.7*	22.5 ± 5.0**	32.5 ± 5.0**	42.5 ± 5.0**
	8	80.0 ± 23.1*	102.5 ± 33.0*	137.5 ± 47.9*	17.5 ± 5.0*	27.5 ± 5.0**	37.5 ± 5.0**
	10	75.0 ± 19.2*	95.0 ± 10.0	137.5 ± 14.4*	11.3 ± 2.5	17.5 ± 2.9	25.0 ± 5.8*
	12	70.0 ± 11.6*	95.0 ± 5.8	125.0 ± 28.9*	10.0 ± 4.1	12.5 ± 5.0	22.5 ± 5.0*
	14	67.5 ± 9.6*	90.0 ± 11.6	118.8 ± 23.9*	8.8 ± 4.8	12.5 ± 5.0	21.3 ± 2.5
	16	65.0 ± 10.0*	85.0 ± 5.8	112.5 ± 14.4	6.3 ± 2.5	11.3 ± 2.5	18.8 ± 2.5
	18	32.5 ± 9.6	42.5 ± 9.6	52.5 ± 9.6	5.0 ± 0.0	8.8 ± 2.5	17.5 ± 5.0
	20	30.0 ± 11.6	40.0 ± 11.6	50.0 ± 11.6	5.0 ± 0.0	7.5 ± 2.9	15.0 ± 5.8
鼻腔接种组	2	500.0 ± 115.5△	700.0 ± 115.5△△	900.0 ± 115.5△△	45.0 ± 5.8△△	55.0 ± 5.8△△	70.0 ± 11.6△△
	4	350.0 ± 57.7△△	500.0 ± 115.5△△	700.0 ± 115.5△△	25.0 ± 5.8△△	35.0 ± 5.8△△	45.0 ± 5.8△△
	6	350.0 ± 57.7△△	450.0 ± 57.7△△	650.0 ± 57.7△△	22.5 ± 5.0△△	32.5 ± 5.0△△	42.5 ± 5.0△△
	8	250.0 ± 57.7△△	350.0 ± 57.7△△	550.0 ± 57.7△△	16.3 ± 4.8△	25.0 ± 5.8△	35.0 ± 5.8△△
	10	70.0 ± 11.6	90.0 ± 11.6	112.5 ± 14.4	15.0 ± 5.8△	20.0 ± 11.6	30.0 ± 11.6△
	12	55.0 ± 5.8	75.0 ± 10.0	95.0 ± 10.0	11.3 ± 2.5	17.5 ± 2.9	27.5 ± 5.0△
	14	52.5 ± 9.6	70.0 ± 11.6	90.0 ± 11.6	11.3 ± 2.5	16.3 ± 2.5	22.5 ± 5.0
	16	25.0 ± 5.8	40.0 ± 11. 6	50.0 ± 11.6	10.0 ± 0.0	13.8 ± 2.5	17.5 ± 5.0
	18	23.8 ± 4.8	35.0 ± 5.8	45.0 ± 5.8	8.8 ± 2.5	12.5 ± 2.9	15.0 ± 5.8
	20	21.3 ± 2.5	32.5 ± 5.0	42.5 ± 5.0	7.5 ± 2.9	11.3 ± 2.5	13.8 ± 4.8

*P<0.05，**P<0.01，与对照组比较；△P<0.05，△△P<0.01，与对照组比较

在本实验中疫苗口服或鼻内免疫均可诱导小鼠产生较高水平的特异性抗体，可能由于该疫苗经肠道或鼻黏膜相关淋巴组织不断生长繁殖和表达外源蛋白，表达分泌的 Eg95-EgA31 融合蛋白经抗原提呈细胞（APC）加工处理后，形成抗原肽 -MHC Ⅱ类分子复合物被高尔基体运送至 APC 表面，提呈给 $CD4^+$T 细胞，持续刺激 B 细胞产生特异性抗体，从而引发持久的体液免疫应答。推测升高的 IgG、IgG2a 、IgG2b、IgG1 和 IgG3 可通过经典途径激活补体，并可与中性粒细胞、巨噬细胞和 NK 细胞表面的 Fc 受体结合，发挥调理作用和抗体依赖细胞介导的细胞毒（ADCC）作用，从而杀伤 Eg 原头节；升高的 IgE 可通过活化嗜酸性粒细胞、肥大细胞和嗜碱性粒细胞，释放出主要碱性蛋白、阳离子蛋白和过氧化氢等生物活性物质，在清除病原体中发挥重要作用[13]。

活化的 $CD4^+$T 细胞增殖分化为效应性 Th 细胞，其中 Th1 细胞分泌 IL-2、IFN-γ 和 TNF-α 等，介导细胞免疫应答，同时促进 IgG2a 和 IgG3 的合成；Th2 细胞分泌 IL-4、IL-5 和 IL-10 等，诱导 B 细胞增殖和产生抗体，介导体液免疫应答，同时促进 IgG1、IgE 和 IgA 的合成；此外，嗜酸性粒细胞可分泌 TGF-β 促进 IgG2b 的合成。本实验表明细粒棘球绦虫重组 Bb-Eg95-EgA31 疫苗免疫小鼠后能有效激活 T 淋巴细胞及其亚群，产生较高水平的 Th1（IL-12、IFN-γ 和 TNF-α）和 Th2（IL-10）型细胞因子，与文献[14]报道的结果类似。以上结果说明重组 Bb-Eg95-EgA31 疫苗产生的免疫应答可能是刺激活化 Th1 和 Th2 细胞引发的混合型免疫应答。

不同免疫途径诱导的免疫应答效果有所不同。本实验表明口服免疫组小鼠抗体达到峰值的时间早于鼻腔内接种组，口服免疫小鼠血清 IgG 、IgG2a、IgG2b、IgG1、IgG3 和 IgE 水平分别在免疫后 8、2、6、6、8 和 10 周显著升高并达到峰值，鼻腔内接种免疫小鼠血清 IgG、IgG2a、IgG2b、IgG1、IgG3 和 IgE 水平分别在免疫后 10、6、10、8、8 和 10 周显著升高并达到峰值，提示细粒棘球绦虫重组 Bb-Eg95-EgA31 疫苗口服接种是一种较好的免疫途径，可能与该疫苗不同接种途径传递抗原的效力不同有关。

参 考 文 献

[1] Lightowlers M W, Lawrence S B, Gauci C G, et al. Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen[J]. Parasite Immunol, 1996, 18(9): 457-462.

[2] Lightowlers M W, Jensen O, Fernandez E, et al. Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the EG95 hydatid vaccine in sheep[J]. Int J Parasitol, 1999, 29(4): 531-534.

表 3 细粒棘球绦虫重组 Bb-Eg95-EgA31 疫苗免疫小鼠后脾细胞上清液 TNF-α 和 IL-10 动态变化($\bar{x} \pm s$, n=4)

组别	免疫后时间(周)	TNF-α(pg/mL)			IL-10(pg/mL)		
		原液	EgAg	LPS	原液	EgAg	ConA
正常对照组		155.0 ± 5.8	190.0 ± 11.6	210.0 ± 11.6	15.0 ± 5.8	25.0 ± 5.8	35.0 ± 5.8
口服灌胃组	2	175.0 ± 28.9	225.0 ± 28.9	275.0 ± 28.9*	17.5 ± 2.9	27.5 ± 2.9	37.5 ± 2.9
	4	250.0 ± 57.7**	350.0 ± 57.7**	425.0 ± 28.9**	22.5 ± 5.0	35.0 ± 10.0	45.0 ± 10.0*
	6	175.0 ± 28.9	225.0 ± 28.9	275.0 ± 28.9*	70.0 ± 11.6**	112.5 ± 14.4**	160.0 ± 11.6**
	8	150.0 ± 57.7	195.0 ± 63.5	245.0 ± 63.5	35.0 ± 5.8**	45.0 ± 5.8**	55.0 ± 5.8**
	10	145.0 ± 10.0	190.0 ± 11.6	240.0 ± 11.6	32.5 ± 5.0**	42.5 ± 5.0*	52.5 ± 5.0*
	12	140.0 ± 11.6	180.0 ± 23.1	220.0 ± 34.6	25.0 ± 5.8*	35.0 ± 5.8	45.0 ± 5.8*
	14	138.8 ± 8.5	170.0 ± 24.5	212.5 ± 25.0	22.5 ± 5.0	35.0 ± 5.8	42.5 ± 5.0
	16	137.5 ± 9.6	165.0 ± 17.3	207.5 ± 15.0	17.5 ± 2.9	27.5 ± 2.9	37.5 ± 2.9
	18	135.0 ± 17.3	160.0 ± 11.6	205.0 ± 10.0	15.0 ± 5.8	25.0 ± 5.8	35.0 ± 5.8
	20	130.0 ± 11.6	155.0 ± 10.0	200.0 ± 16.3	12.5 ± 5.0	22.5 ± 5.0	32.5 ± 5.0
鼻腔接种组	2	190.0 ± 11.6△	240.0 ± 11.6△△	290.0 ± 11.6△△	17.5 ± 5.0	27.5 ± 5.0	37.5 ± 5.0
	4	225.0 ± 28.9△△	275.0 ± 28.9△△	325.0 ± 28.9△△	20.0 ± 11.6	30.0 ± 11.6	40.0 ± 11.6
	6	170.0 ± 11.6	220.0 ± 11.6△	270.0 ± 11.6△△	75.0 ± 5.8△△	115.0 ± 5.8△△	170.0 ± 11.6△△
	8	165.0 ± 11.6	195.0 ± 5.8	235.0 ± 5.8△	90.0 ± 11.6△△	140.0 ± 11.6△△	190.0 ± 11.6△△
	10	160.0 ± 11.6	192.5 ± 9.6	232.5 ± 5.0	45.0 ± 5.8△△	55.0 ± 5.8△△	70.0 ± 11.6△△
	12	152.5 ± 8.7	185.0 ± 5.8	225.0 ± 5.8	40.0 ± 11.6△△	50.0 ± 11.6△△	65.0 ± 17.3△△
	14	147.5 ± 8.7	177.5 ± 5.0	222.5 ± 5.0	35.0 ± 5.8△	45.0 ± 5.8△	55.0 ± 5.8△
	16	142.5 ± 8.7	175.0 ± 5.8	215.0 ± 17.3	30.0 ± 11.6△	40.0 ± 11.6△	50.0 ± 11.6△
	18	140.0 ± 11.6	175.0 ± 4.1	207.5 ± 22.2	25.0 ± 5.8	35.0 ± 5.8	45.0 ± 5.8
	20	137.5 ± 8.7	173.8 ± 2.5	202.5 ± 26.3	22.5 ± 5.0	32.5 ± 5.0	42.5 ± 5.0

*P<0.05, **P<0.01, 与对照组比较; △P<0.05, △△P<0.01, 与对照组比较

[3] Fu Y C, Martinez C, Chalar C, et al. A new potent antigen from Echinococcus granulosus associated with muscles and tegument [J]. Mol Biochem Parasitol, 1999, 102(1): 43-52.

[4] Fu Y C, Marchal S, Marchal T, et al. Cellular immune response of lymph nodes from dogs following the intradermal injection of a recombinant antigen corresponding to a 66 kD protein of Echinococcus granulosus [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2000, 74(3-4): 195-208.

[5] 周必英,陈雅棠,李文桂,等.细粒棘球绦虫重组 Bb-Eg95-EgA31 融合基因疫苗构建及鉴定[J].中国人兽共患病学报,2009,25(6): 502-506.

[6] 周必英,陈雅棠,李文桂,等.细粒棘球绦虫重组质粒 pGEX-Eg95-EgA31 的构建及其在大肠埃希菌 BL21(DE3)中的表达[J].中国病原生物学杂志,2009,4(5): 350-354.

[7] MacDonald T T. The mucosal immune system[J]. Parasite Immunol, 2003, 25(5): 235-246.

[8] 李文桂,朱佑明,王 鸿.细粒棘球绦虫重组 BCG-Eg95 疫苗免疫小鼠后 IgG 及其亚类和 IgE 的动态观察[J].重庆医科大学学报, 2007, 32(1): 1-3.

[9] 李文桂,朱佑明.细粒棘球绦虫重组 BCG-Eg95 疫苗诱导的保护力观察[J].免疫学杂志,2007,23(4): 383-385, 389.

[10] 丁剑冰,魏晓丽,马秀敏,等.细粒棘球绦虫 Eg95 重组蛋白诱导小鼠免疫应答的研究[J].新疆医科大学学报,2005,28(4): 305-307.

[11] 林仁勇,丁剑冰,卢晓梅,等.细粒棘球绦虫 Eg95 抗原基因疫苗体外瞬时表达及对小鼠诱导的免疫应答[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2004,22(4): 204-208.

[12] Fraize M, Sarciron M E, Azzouz S, et al. Immunogenicity of two Echinococcus granulosus antigens EgA31 and EgTrp in mice[J]. Parasitol Res, 2005, 96(2): 113-120.

[13] 蒋光琼,李文桂,王 鸿,等.多房棘球绦虫混合重组 BCG-Em Ⅱ/3 和 BCG-Em14-3-3 疫苗诱导的保护力观察[J].重庆医科大学学报,2008,33(7): 780-783.

[14] 李文桂,朱佑明,王 鸿.细粒棘球绦虫重组 BCG-Eg95 疫苗免疫小鼠后脾细胞因子的动态观察[J].免疫学杂志,2009,25(1): 31-33, 38.

(责任编辑:冉明会)