维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)07-0780-04

多房棘球绦虫混合重组 BCG-EmⅡ/3 和 BCG-Em14-3-3 疫苗诱导的保护力观察

蒋光琼,李文桂,王 鸿,朱佑明

(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:探讨多房棘球绦虫(Echinococcus multilocularis,Em)混合重组 BCG-EmⅡ/3 和 BCG-Em14-3-3 疫苗免疫小鼠后对 Em 原头节攻击感染的保护性作用。方法:将混合重组 BCG 疫苗采用皮下注射和鼻腔内接种分别免疫 BALB/c 鼠,免疫后 8 周用多房棘球绦虫原头节进行攻击感染,感染后 18 周剖杀小鼠,计算减蚴率,测定血清中 IgG 及其亚类和 IgE 水平,同时设有空载体、BCG 和 PBS 对照。结果:混合疫苗接种组的减蚴率为 45.29%~76.47%,血清 IgG、IgG2a、IgG2b 和 IgE 水平明显升高,IgG1 和 IgG3 显著降低。结论:多房棘球绦虫混合重组 BCG-EmⅡ/3 和 BCG-Em14-3-3 疫苗鼻腔内接种是一种较好的途径,IgG、IgG2a、IgG2b 和 IgE 在疫苗诱导的保护力中起重要作用。

【关键词】多房棘球绦虫;重组 BCG-EmⅡ/3 疫苗;重组 BCG-Em14-3-3 疫苗;保护力

【中国图书分类法分类号】R383.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-30

Observation on protection by immunization with mix recombinant BCG-EmⅡ/3 and BCG-Em14-3-3 vaccine of *echinococcus multilocularis*

JIANG Guang-qiong,et al

(*Institute of Infectious and Parasitic Diseases,the First Affiliated Hospital,Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To investigate protection by immunization with mix recombinant BCG-EmⅡ/3 and BCG-Em14-3-3 vaccine of *echinococcus multilocularis*(Em) and against challenge with Em protoscoleces. *Methods*:BALB/c mice were vaccinated by mix recombinant BCG vaccines subcutaneously and intranasally respectively,challenged with Em protoscoleces 8w after vaccination and killed 18w after infection to count rate of reduced alveolar echinococcus weight and to examine the level of IgE,IgG and its subclasses. Blank vector,BCG and PBS served as control. *Results*:In the groups of immunization.The rate of reduced alveolar echinococcus weight was 45.29%~76.47%,the level of IgG,IgG2a,IgG2b and IgE increased apparently,that of IgG1 and IgG3 decreased remarkably. *Conclusion*:Intranasal vaccination with mix recombinant BCG-EmⅡ/3 and BCG-Em14-3-3 vaccine may be a good route,IgG,IgG2a,IgG2b and IgE may play an important role in protection induced by this vaccine.

【Key words】*Echinococcus multilocularis*;Recombinant BCG-EmⅡ/3 vaccine;Recombinant BCG-Em14-3-3 vaccine;Protection

泡型棘球蚴病(Alveolar echinococcosis;AE)是由 Em 的续绦期幼虫寄生在人体肝脏引起的一种严重危害人类健康的人畜共患寄生虫病,疫苗防治是当前研究的热点领域。王昌源[1]发现 EmⅡ/3 重组抗原(ELP 蛋白)是一种有较好保护性免疫力的抗原分子,Siles 等[2]发现 Em14-3-3 抗原位于 Em 原头蚴的生发层,其过度表达与原头蚴的进行性、侵入性和无限制生长特性有关,提示它是一种有希望的疫苗分子。Cirillo 等[3]认为卡介苗(*Bacille calmette-Guerin*;BCG)是一种理想的疫苗载体,Matsuo 等[4]在 BCG 中成功构建了外源抗原分泌系统,这为发展 BCG 成为多价疫苗载体打下了坚实的基础。本文在成功构建重组 BCG-EmⅡ/3 和 BCG-Em14-3-3 疫苗的基础上[5~7],将这两种疫苗按 1:1 的浓度比例混匀,组成混合疫苗后免疫小鼠,原头节攻击后观察其诱导的保护力和抗体水平,从而为研究混合重

作者介绍:蒋光琼(1965-),女,护师,
研究方向:病原微生物的分子免疫学。
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(30671835、30500423 和 30200239)资助项目。

维普资讯 http://www.cqvip.com

组 BCG 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 实验动物

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

1.2 多房棘球绦虫重组 BCG-EmⅡ/3 和 BCG-Em14-3-3 疫苗

由本室构建[5-7]，将 rBCG-EmⅡ/3 和 rBCG-Em14-3-3 疫苗按 1∶1 的浓度比例混匀，组成混合疫苗。

1.3 主要试剂

HRP 标记的羊抗小鼠 IgE、IgG、IgG1、IgG3、IgG2a 和 IgG2b 购自 Southern Biotech 公司，泡球蚴粗抗原由本室制备。

1.4 实验分组

117 只雌性 BALB/c 小鼠随机分为 9 组，每组 13 只。第 1 组为 5×10^6CFU 混合疫苗悬浮于 100μl PBS 于小鼠后背部皮下单次注射；第 2 组为 5×10^5CFU 混合疫苗悬浮于 10μl PBS 于小鼠鼻腔粘膜单次接种；第 3 组为 5×10^6CFU 重组 BCG-EmⅡ/3 疫苗皮下注射对照组；第 4 组为 5×10^5CFU 重组 BCG-EmⅡ/3 疫苗鼻腔内接种对照组；第 5 组为 5×10^6CFU 重组 BCG-Em14-3-3 疫苗皮下注射对照组；第 6 组为 5×10^5CFU 重组 BCG-Em14-3-3 疫苗鼻腔内接种对照组；第 7 组为 5×10^6CFU 的空载体(含 pBCG 质粒的 BCG)皮下注射对照组；第 8 组为 5×10^6CFU 的 BCG 皮下注射对照组；第 9 组为 100μl PBS 皮下注射对照。

1.5 攻击感染

各组小鼠在疫苗免疫 8 周后用 50 个泡球蚴原头节腹腔内注射进行攻击。

1.6 血清收集

混合疫苗鼻腔内接种组在接种疫苗前和接种疫苗后 8 周从尾静脉采血，原头节攻击感染后 18 周从眼球采血，室温静置 12h，2 000r/min 离心 10min，分离血清，-20℃冰箱冻存待查。

1.7 减蚴率计算

攻击感染后 18 周剖杀各组小鼠切开小鼠腹部，仔细分离泡球蚴组织，称重，计算减蚴率。其公式为减蚴率(%)=(1-免疫组检获泡球蚴重量/对照组检获泡球蚴重量)×100%。

1.8 IgG 及其亚类和 IgE 抗体检测

常规 ELISA 法。用 200μl 泡球蚴粗抗原(5μg/ml 于 PBS)包被酶标板，4℃过夜，弃去抗原溶液；用 PBS-Tween-20 洗 3 次，加入 1∶20 稀释的小鼠血清 100μl，37℃ 30min；用 PBS-Tween-20 洗 3 次，加入 1∶2 000 稀释的 HRP 标记羊抗小鼠 IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b、Ig3 或 IgE 100μl，37℃ 30min；PBS-Tween-20 洗 3 次，加入 50μl 过氧化物酶底物，37℃ 30min；加入 2mol/L H_2SO_4 50μl 终止反应，用英国 Bio-TEK 公司生产的酶标仪(型号 Elx800UV)测 490nm 处的吸光度(A_{490})值。以 P/N≥2.0 为阳性临界值。

1.9 统计学处理

混合疫苗鼻腔内接种组小鼠不同时间血清 1∶20 稀释时 IgG 及其亚类和 IgE 抗体的 OD 值采用 SPSS11.0 软件进行分析，计量资料采用 t 检验($\bar{x}\pm s$)，检测结果采用方差分析，组间两两比较用 SNK 法。

2 结 果

2.1 减蚴率

10^6CFU 混合重组 BCG 疫苗皮下注射组的减蚴率显著高于 PBS 对照组($P<0.05$)，但明显低于 BCG-EmⅡ/3 或 BCG-Em14-3-3 疫苗皮下注射组($P<0.05$)；10^5CFU 混合重组 BCG 疫苗鼻腔内接种组的减蚴率显著高于 PBS 对照组($P<0.01$)；也明显高于 BCG-Em14-3-3 疫苗鼻腔内接种组($P<0.05$)；混合疫苗鼻腔内接种组的减蚴率显著高于皮下注射组

表 1 混合重组 BCG-EmⅡ/3 和 BCG-Em14-3-3 疫苗免疫和原头节攻击后小鼠减蚴率检测

组别	鼠数	检获包囊重量(g，$\bar{x}\pm s$)	减蚴率(%)
混合疫苗皮下注射组	8	0.93±0.39	45.29*
混合疫苗鼻腔内接种组	8	0.40±0.37	76.47**△△
BCG-EmⅡ/3 疫苗皮下注射组	8	0.625±0.68	63.23*△
BCG-EmⅡ/3 疫苗鼻腔内接种组	8	0.43±0.35	74.70**
BCG-Em14-3-3 疫苗皮下注射组	8	0.30±0.19	82.35**△
BCG-Em14-3-3 疫苗鼻腔内接种组	8	0.69±0.28	59.41*
空载体对照组	8	1.49±0.48	12.35
BCG 对照组	8	1.51±0.39	11.18
PBS 对照组	8	1.7±1.28	–

与 PBS 组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$，与皮下注射组比较，△△$P<0.01$

维普资讯 http://www.cqvip.com

($P<0.01$)；空载体和 BCG 皮下注射组的减蚴率分别与 PBS 对照组相比，差别均无显著意义($P>0.05$，表 1)。

2.2 IgG 及其亚类和 IgE 检测

混合疫苗鼻腔内接种组小鼠血清 IgG、IgG2a 和 IgG2b 在疫苗接种后 8 周以及疫苗免疫和原头节攻击后 18 周与 0 周相比均显著增加，统计学分析发现差异有显著或极显著意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，疫苗免疫和原头节攻击后 18 周小鼠血清 IgG2a 与疫苗接种后 8 周相比明显升高($P<0.01$)；小鼠血清 IgG1 在疫苗接种后 8 周与 0 周相比均显著降低，统计学分析发现差异有极显著意义($P<0.01$)，疫苗免疫和原头节攻击后 18 周小鼠血清 IgG1 水平与疫苗接种后 8 周相比明显增加($P<0.01$)；小鼠血清 IgG3 在疫苗接种后 8 周与 0 周相比明显降低($P<0.01$)，IgG3 在疫苗免疫和原头节攻击后 18 周与 0 周相比轻微降低($P>0.05$)，疫苗免疫和原头节攻击后 18 周小鼠血清 IgG3 水平与疫苗接种后 8 周相比轻微增加($P>0.05$)；小鼠血清 IgE 水平在疫苗接种后 8 周较 0 周显著升高，统计学分析发现差异有极显著意义($P<0.01$)，疫苗免疫和原头节攻击后 18 周小鼠血清 IgE 水平分别与疫苗接种后 8 周和 0 周相比明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$，表 2)。

3 讨 论

Reuben 等[8,9]用 10 ~ 10^7CFU 的 BCG 腹腔内注射免疫棉鼠(Sigmodon hispidus)，然后用一个 Em 育囊腹腔内注射进行攻击，发现 10CFU 的 BCG 免疫组不产生保护力，10^2CFU 的 BCG 免疫组可产生部分保护力，而 10^3 ~ 10^7CFU 的 BCG 免疫组可产生完全保护力，推测 BCG 可激活腹腔巨噬细胞，从而杀伤 Em 的原头节。本研究发现空载体和 BCG 皮下注射组可诱导 11.18% ~ 12.35%的减蚴率，表明 BCG 对 Em 原头节具有一定的杀伤作用。本研究用混合重组 BCG 疫苗皮下注射或鼻腔内接种免疫小鼠后，可诱导 45.29% ~ 76.47%的减蚴率，提示该疫苗可诱导小鼠产生一定的保护力，从而对抗 Em 原头节的攻击。鼻腔内接种组的减蚴率明显高于皮下注射组，表明疫苗鼻腔内接种是一种较好的免疫途径。

温浩等[10]发现 94%的 AE 患者血清 IgG 升高，抗体亚类分析显示 84%患者 IgG4 升高，58%患者 IgG1 增加，但 IgG2 和 IgG3 降低；Gottstein 等[11,12]证实 C57BL/6j 鼠在感染泡球蚴 90d 后 IgG1 升高，但 IgG2a 降低；当将重组 St-EmⅡ/3-10 疫苗采用皮下注射和口服免疫分别接种 C57BL/6j 鼠和犬时发现免疫鼠和犬的血清抗 EmⅡ/3-10 特异性抗体显著升高，但免疫犬的特异性抗体水平高于免疫鼠；王昌源等[1]用 100μg 的 EmⅡ/3 重组抗原(ELP 蛋白)皮下注射免疫 BALB/c 鼠 3 次后发现首次免疫后 2 周鼠血清 IgG1 明显增加，当加用弗氏佐剂时鼠血清 IgG2b 轻微增加。由于小鼠 MHC 分子的多样性和多房棘球绦虫抗原结构的复杂性，小鼠将针对抗原的多个表位产生免疫反应，使得单一抗原成分(EmⅡ/3 或 Em14-3-3)诱导宿主产生的保护性免疫应答效果往往较低，因此，本文将重组 BCG-EmⅡ/3 和 BCG-Em14-3-3 疫苗按 1∶1 的浓度比例混匀，组成混合疫苗后免疫小鼠，原头节攻击后观察其诱导的抗体水平，发现小鼠血清 IgG、IgG2a 和 IgG2b 在疫苗接种后 8 周显著增加，提示 IgG、IgG2a 和 IgG2b 可能参与疫苗诱导的保护性免疫反应；小鼠血清 IgG1 和 IgG3 在疫苗接种后 8 周明显降低，表明 IgG1 和 IgG3 可能与泡球蚴病的易感性有关。

Vuitton 等[13]发现 30 例 AE 患者血清 IgE 升高，李富荣等[14]证实 35 例 AE 患者经阿苯哒唑治疗后血清 IgE 明显下降。本文用混合重组 BCG 疫苗鼻腔

表 2 混合重组 BCG-EmⅡ/3 和 BCG-Em14-3-3 疫苗鼻腔内接种和原头节攻击后小鼠血清 Ig 检测($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	接种前 0 周	接种后 8 周	攻击后 18 周
IgG	8	0.034 ± 0.010	0.081 ± 0.018**	0.092 ± 0.003**
IgG2a	8	0.012 ± 0.004	0.018 ± 0.002*	0.026 ± 0.004**△△
IgG2b	8	0.014 ± 0.006	0.021 ± 0.003**	0.021 ± 0.004*
IgG1	8	0.192 ± 0.008	0.039 ± 0.006**	0.205 ± 0.034△△
IgG3	8	0.175 ± 0.031	0.141 ± 0.010**	0.158 ± 0.024
IgE	8	0.024 ± 0.003	0.143 ± 0.003**	0.020 ± 0.003*△△

与接种前 0 周比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$；与接种后 8 周比较，△$P<0.05$，△△$P<0.01$

维普资讯 http://www.cqvip.com

内接种小鼠 8 周后发现小鼠血清 IgE 水平在疫苗接种后 8 周显著升高,在疫苗免疫和原头节攻击后 18 周显著降低,与上述结果不同。推测升高的 IgE 可通过激活小鼠体内的肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、巨噬细胞和血小板,释放主要碱性蛋白、阳离子蛋白和过氧化氢等生物活性物质,发挥非特异性杀伤 Em 原头节的效应;IgE 还可通过抗体依赖的补体介导的细胞毒作用,发挥特异性杀伤 Em 原头节的效应,但 IgE 可通过肥大细胞介导的 I 型变态反应对宿主组织造成损伤作用。

参 考 文 献

[1] 王昌源,陈雅棠,余登高,等.多房棘球绦虫 ELP 重组蛋白疫苗免疫 BALB/c 小鼠引起的免疫应答[J].免疫学杂志,2003;19(4):285-288,292.

[2] Siles-Lucas M,Felleisen RS,Hemphill A,et al. Stage-specific expression of the 14-3-3 gene in *Echinococcus multiloculris*[J]. Mol Biochem Parasitol,1998;91(2):281-293.

[3] Cirillo JD,Stover CK,Bloom BR,et al. Bacterial vaccine vectors and *Bacillus calmette-Guerin*[J]. Clin Infect Dis,1995;20(4):1001-1009.

[4] Matsuo K,Yamaguchi R,Yamazaki A,et al. Establishment of a foreign antigen secretion system in Mycobacteria[J]. Infect Immun,1990;58(12):4049-4054.

[5] 李文桂,王 鸿,朱佑明.多房棘球绦虫重组 BCG-Em Ⅱ/3 疫苗构建及其表达效率[J]. 中国地方病学杂志,2006;25(5):490-493.

[6] 李文桂,王 鸿,朱佑明. 多房棘球绦虫 pBCG-Em14-3-3 重组质粒的构建及其在 BCG 中的表达[J]. 中国人兽共患病学报,2006;22(12):1125-1128.

[7] 王 鸿,李文桂.多房棘球绦虫 Em14-3-3 抗原编码基因在 BCG 中的表达[J]. 重庆医科大学学报,2006;31(3):299-301.

[8] Reuben JM,Tanner CE,Rau ME. Immunoprophylaxis with BCG of experimental Echinococcus multilocularis infections[J]. Infect Immun,1978;21(1):135-139.

[9] Reuben JM,Tanner CE,Portelance V. Protection of cotton rats against experimental Echinococcus multilocularis infections with BCG cell walls[J]. Infect Immun,1979;23(3):582-586.

[10] Wen H,Craig PS. Immunoglobulin G,subclasses in human cystic and alveolar Echinococcosis[J]. Am J Trop Med Hyg,1994;51(6):741-748.

[11] Gottstein B,Wunderlin E,Tanner I. Echinococcus multilocularis:parasite-specific humoral and cellular immune response subsets in mouse strains susceptible(AKR,C57BL/6j) or resistant(C57B1/10) to secondary alveolar echinococcosis[J]. Clin Exp Immunol,1994;96(2):245-252.

[12] Gottstein B,Muller N,Cryz SJJ,et al. Humoral and cellular immune response in mice and dogs induced by a recombinant *Echinococcus multilocularis* antigen produced by a Salmonella typhimurium vaccine strain[J]. Parasite Immunol,1990;12(2):163-174.

[13] Vuitton DA,Bresson-Hadni S,Lenys D,et al. IgE-dependent humoral immune response in *Echinococcus multilocularis* infection: circulating and basophil-bound specific IgE against echinococcus antigens with alveolar echinococcosis[J]. Clin Exp Immunol,1988;71(2):247-252.

[14] 李富荣,石佑恩,史大中,等.阿苯哒唑治疗泡球蚴病患者血清中 Th1/Th2 型细胞因子的变化及临床意义[J]. 中国人兽共患病杂志,2003;19(2):71-73.

(责任编辑:谭乐勤)

(上接第 779 页)

细胞反应显示融合细胞刺激 T 细胞增殖能力明显高于仅与肾癌 786-O 细胞混合培养的 DC 组和单纯 DC 组,进一步证明了融合细胞强大的刺激 T 淋巴细胞增殖能力。融合瘤苗高表达共刺激分子、强烈刺激 T 细胞增殖能力,和在联合免疫缺陷鼠体内不成瘤的这些特点,使其在基于 DC 的抗肿瘤免疫策略中具有重要的研究价值。

参 考 文 献

[1] Takeda A,Homma S,Okamoto T,et al.Immature dendritic cell/tumor cell fusions induce potent antitumour immunity[J]. Eur J Clin Invest,2003;33(10):897-904.

[2] Koido S,Hara E,Homma S,et al. Dendritic cells fused with allogeneic colorectal cancer cell line present multiple colorectal cancer-specific antigens and induce antitumor immunity against autologous tumor cells[J]. Clin Cancer Res,2005;11(21):7891-7900.

[3] You Z,Hester J,Rollins L,et al. A retrogen strategy for presentation of an intracellular tumor antigen as an exogenous antigen by dendritic cells induces potent antitumor T helper and CTL responses[J]. Cancer Res,2001;61(1):197-205.

[4] Groux H,Fournier N,Cottrez F. Role of dendritic cells in the generation of regulatory T cells[J]. Semin Immunol,2004;16(2):99-106.

[5] Koido S,Ohana M,Liu C,et al. Dendritic cells fused with human cancer cells: morphology, antigen expression, and T cell stimulation[J]. Clin Immunol,2004;113(3):261-269.

[6] Kim GY,Chae HJ,Kim KH,et al. Dendritic cell-tumor fusion vaccine prevents tumor growth in vivo[J]. Biosci Biotechnol Biochem,2007;71(1):215-221.

(责任编辑:关蕴良)