维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)01-0009-04

多房棘球绦虫重组 BCG-Em14-3-3 疫苗诱导小鼠脾细胞因子变化的研究

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:探讨多房棘球绦虫重组 BCG-Em14-3-3 疫苗免疫和 Em 原头节攻击后小鼠脾细胞因子的变化。方法:将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 周杀鼠取脾,分离脾细胞,用 EmAg 或 ConA 刺激培养,收集脾细胞培养上清液,用试剂盒检测脾细胞培养上清液的 IL-2、IFN-γ、TNF-α 和 IL-4 水平,同时设有空载体、BCG 和 PBS 对照。结果:疫苗接种组的 IFN-γ 和 TNF-α 水平升高,IL-4 水平降低;鼻腔内接种组的 TNF-α 水平高于皮下注射组。结论:多房棘球绦虫重组 BCG-Em14-3-3 疫苗诱导小鼠产生一个 T_H1 型反应,从而对抗 Em 原头节攻击感染。

【关键词】多房棘球绦虫;重组 BCG-Em14-3-3 疫苗;细胞因子

【中国图书分类法分类号】R383.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-05-22

Study on the changes of splenocyte cytokines in mice induced by recombinant BCG-Em14-3-3 vaccine against echinococcus multilocularis

LI Wen-gui, et al

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

【Abstract】*Objective*: To investigate the changes of splenocyte cytokines in mice induced by recombinant BCG-Em14-3-3 vaccine of Echinococcus multilocularis (Em) and challenge with Em protoscoleces. *Methods*: BALB/c mice were subcutaneously and intranasally vaccinated respectively, then challenged with Em protoscoleces at 8th week of vaccination and killed at 18th week of infection to get spleen. Splenocytes were separated to culture by stimulation with EmAg or ConA. The supernatants were collected to measure IL-2、IFN-γ、TNF-α and IL-4 by ELISA Kits, and blank vector, BCG and PBS served as control. *Results*: In the groups of immunization, levels of IFN-γ and TNF-α increased, but that of IL-4 decreased. The level of TNF-α in the intranasal group was higher than that in the subcutaneous group. *Conclusion*: T_H1 response is induced in mice by rBCG-Em14-3-3 vaccine which is against the challenge of Em protoscoleces.

【Key words】 Echinococcus multilocularis; Recombinant BCG-Em14-3-3 vaccine; Cytokines

小泡棘球蚴病(Alveolar echinococcosis, AE)是由多房棘球绦虫(Echinococcus multilocularis, 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,研制疫苗是防治该病的有效途径之一。本研究在成功构建 Em 重组 BCG-Em14-3-3 疫苗的基础上[1,2],将该疫苗免疫小鼠,原头节攻击后观察其脾细胞上清液 IL-2、IFN-γ、TNF-α 和 IL-4 等细胞因子的变化,从而为研究该疫苗的保护性免疫机制提供有价值的材料。

作者介绍:李文桂(1967-),男,研究员,博士,
主要研究方向:病原微生物的分子免疫学研究。

基金项目:国家自然科学基金(30671835,30500423 和 30200239)、教育部重点项目(205131)、重庆市教委科研基金(KJ050313)、重庆市科委科研基金(03-43-8)和重庆市卫生局科研基金(03-2-099)。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组

选用 12~14 周龄、体重 20~25g 的雌性 BALB/c 小鼠 65 只(重庆医科大学实验动物中心提供),随机分为 5 组,每组 13 只。①皮下注射组:5×10^6CFU 疫苗悬浮于 100μl PBS,于小鼠后背部皮下单次注射;②鼻腔接种组:5×10^5 CFU 疫苗悬浮于 10μl PBS,于小鼠鼻腔粘膜单次接种;③

维普资讯 http://www.cqvip.com

空载体对照组:5×10^6CFU 的空载体(含 pBCG 质粒的 BCG)皮下注射对照组;④BCG 对照组:5×10^6CFU 的 BCG 皮下注射对照组;⑤PBS 对照组:100μl PBS 皮下注射对照组。

1.2 主要试剂

Em 重组 BCG-Em14-3-3 疫苗,由重庆医科大学附属第一医院传染病寄生虫病研究所构建[1,2]。ConA 和 PHA 购自 Sigma 公司。小鼠 IL-2、IFN-γ、TNF-α 和 IL-4 检测试剂盒购自深圳晶美生物工程公司。RPMI1640 培养基、胎牛血清、青霉素和链霉素购自上海生工公司。

1.3 接种和攻击感染

疫苗接种免疫 8 周后用 50 个泡球蚴原头节腹腔内注射进行攻击。

1.4 脾细胞制备

攻击感染后 18 周剖杀各组小鼠,75%酒精消毒,无菌取脾脏,匀浆,200 目尼龙网过滤;灭菌双蒸水溶解红细胞后,用含 10%灭活小牛血清的 RPMI1640 培养液调整细胞浓度为 5×10^6 个/ml,加入青霉素 100U/ml 和链霉素 100U/ml;经台盼蓝染色试验发现脾细胞存活率为 93%~97%。

1.5 IL-2、IFN-γ 和 IL-4 的诱生和活性测定

将 5×10^6 个/ml 脾细胞悬液加入 24 孔细胞培养板,每份标本设 3 孔,分别加入原液、EmAg 5μg/ml 和 ConA 10μg/ml 各 1ml,37℃ 5% CO_2 培养 48h,2 000r/min 离心 20min,收集上清液,-20℃冰箱冻存待查。用小鼠 IL-2、IFN-γ 和 IL-4 试剂盒分别检测上清液中 IL-2、IFN-γ 和 IL-4 的活性。测定方法按各自试剂盒的说明书进行操作。

1.6 TNF-α 的诱生和活性测定

将 5×10^6 个/ml 脾细胞悬液加入 24 孔细胞培养板,每份标本设 3 孔,分别加入原液、EmAg 5μg/ml 和 PHA 10μg/ml 各 1ml,37℃ 5% CO_2 培养 72h;2 000r/min 离心 20min,收集上清液,-20℃冰箱冻存待查。用 TNF-α 试剂盒检测上清液 TNF-α 活性,测定方法按试剂盒的说明书进行操作。

1.7 统计学处理

各免疫组小鼠脾细胞产生的 4 种细胞因子水平采用 SPSS11.0 软件进行分析,组间比较用单因素方差分析,进一步两两比较采用 *SNK-q* 检验。

2 结 果

2.1 IL-2 检测

各免疫组小鼠的脾细胞上清液 IL-2 水平均未测出(表 1)。

2.2 IFN-γ 检测

当不用任何刺激物时,各免疫组小鼠的脾细胞上清液 IFN-γ 水平与 PBS 对照组相比明显升高,差别有显著意义(q=2.75、2.66,P<0.05);当用 EmAg 刺激时,各免疫组的 IFN-γ 水平类似不用刺激物的结果(q=2.75、2.67,P<0.05),当用 ConA 刺激时,各免疫组的 IFN-γ 水平类似不用刺激物的结果(q=2.73、2.62,P<0.05)。每个 EmAg 刺激组的 IFN-γ 水平显著高于相应的原液组(q=4.65、4.74、4.42,P<0.01),每个 ConA 刺激组的 IFN-γ 水平显著高于相应的原液组(q=3.87、3.80、3.67,P<0.01);每个 ConA 刺激组 IFN-γ 水平显著高于相应的 EmAg 刺激组(q=5.63、5.79、5.44,P<0.01,表 2)。

2.3 TNF-α 检测

当不用任何刺激物时,各免疫组小鼠的脾细胞上清液 TNF-α 水平与 PBS 对照组相比明显升高,差别有极显著意义(q=8.82、7.75,P<0.01);鼻腔内接

表 1 重组 BCG-Em14-3-3 疫苗免疫,Em 原头节攻击后小鼠 IL-2 检测($\bar{x}\pm s$,n=8)

组别	IL-2(pg/ml)		
	原液	EmAg 刺激	ConA 刺激
疫苗皮下注射组	0	0	0
疫苗鼻腔内接种组	0	0	0
PBS 对照组	25.0±1.9	37.5±8.0	45.0±0.0

表 2 重组 BCG-Em14-3-3 疫苗免疫,Em 原头节攻击后小鼠 IFN-γ 检测($\bar{x}\pm s$,n=8)

组别	IFN-γ(pg/ml)		
	原液	EmAg 刺激	ConA 刺激
疫苗皮下注射组	32.5±2.7*	47.5±2.5*	75.0±10.7*
疫苗鼻腔内接种组	33.2±2.4*	49.3±3.1*	79.3±12.6*
PBS 对照组	30.0±0	40.0±10.7	67.5±18.7

与 PBS 对照组比较 *P<0.05

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 3 重组 BCG-Em14-3-3 疫苗免疫,Em 原头节攻击后小鼠 TNF-α 检测($\bar{x} \pm s$, n=8)

组别	TNF-α (pg/ml)		
	原液	EmAg 刺激	PHA 刺激
疫苗皮下注射组	40.0 ± 0.0**	50.0 ± 10.7*	60.0 ± 0*
疫苗鼻腔内接种组	125.0 ± 0.0**△△	195.0 ± 32.1**△△	220.0 ± 5.3**△△
空载体对照组	15.5 ± 4.1	30.0 ± 5.3	75.0 ± 10.7
BCG 对照组	12.5 ± 11.1	35.0 ± 4.6	65.0 ± 14.1
PBS 对照组	10.0 ± 0.0	25.0 ± 23.8	50.0 ± 10.7

与 PBS 对照组比较, *P<0.05, **P<0.01;与疫苗皮下注射组比较, △△P<0.01

表 4 重组 BCG-Em14-3-3 疫苗免疫,Em 原头节攻击后小鼠 IL-4 检测($\bar{x} \pm s$, n=8)

组别	IL-4 (pg/ml)		
	原液	EmAg 刺激	ConA 刺激
疫苗皮下注射组	10.0 ± 0.0*	30.0 ± 9.7*	45.0 ± 7.4*
疫苗鼻腔内接种组	9.2 ± 3.5*	28.3 ± 7.8*	42.6 ± 6.8*
PBS 对照组	12.5 ± 2.7	35.0 ± 6.7	50.0 ± 5.4

与 PBS 对照组比较,*P<0.05

种组小鼠的脾细胞上清液 TNF-α 水平显著高于皮下注射组(q=18.22、17.46、16.65, P<0.01)。当用 EmAg 刺激时,各免疫组的 TNF-α 水平类似不用刺激物的结果(q=4.75、4.66, P<0.01),当用 ConA 刺激时,各免疫组的 TNF-α 水平类似不用刺激物的结果(q=4.63、4.58, P<0.01)。每个 EmAg 刺激组的 TNF-α 水平显著高于相应的原液组(q=4.22、4.19、4.77, P<0.01),每个 ConA 刺激组的 TNF-α 水平显著高于相应的原液组(q=4.66、4.54、4.47, P<0.01);每个 ConA 刺激组 TNF-α 水平显著高于相应的 EmAg 刺激组(q=4.22、4.63、4.55, P<0.01);空载体对照组的 TNF-α 水平与 PBS 对照组相比无显著差别(q=1.56、1.44、1.47, P>0.05),BCG 对照组的 TNF-α 水平与 PBS 对照组相比无显著差别(q=1.02、1.13、1.22, P>0.05,表 3)。

2.4 IL-4 检测

当不用任何刺激物时,各免疫组小鼠的脾细胞上清液 IL-4 水平与 PBS 对照组相比明显降低,差别有显著意义(q=2.66、2.71, P<0.05)。当用 EmAg 刺激时,各免疫组的 IL-4 水平类似不用刺激物的结果(q=2.63、2.76, P<0.05),当用 ConA 刺激时,各免疫组的 IL-4 水平类似不用刺激物的结果(q=2.73、2.72, P<0.05)。每个 EmAg 刺激组的 IL-4 水平显著高于相应的原液组(q=4.12、4.02、4.11, P<0.01),每个 ConA 刺激组的 IL-4 水平显著高于相应的原液组(q=4.36、4.58、4.12, P<0.01)。每个 ConA 刺激组 IL-4 水平显著高于相应的 EmAg 刺激组(q=4.15、4.13、4.19, P<0.01,表 4)。

3 讨 论

Kizaki 等[3]发现 Em 原头节可在体外抑制 ConA 刺激的小鼠脾细胞产生 IL-2;Emery 等[4]证实 A/J 鼠抵抗 Em 感染是由于小鼠脾细胞产生大量 IL-2 和 TNF-α,而 BALB/c 鼠容易感染是由于小鼠脾细胞产生大量 IL-4;Bresson 等[5]发现 AE 患者肝包囊肉芽肿内 TNF-α mRNA 表达较强;Wellinghausen 等[6]证实 AE 患者血清很少检测到 IL-4,这些资料表明 IL-2、IFN-γ、TNF-α 和 IL-4 等细胞因子在宿主对泡球蚴的免疫应答中可能起重要作用。

魏晓丽等[7]发现昆明种小鼠腹腔接种 Em 原头节 1 ~ 100 d 内血清 IL-2、IFN-γ 和 TNF-α 均显著升高,IL-2 和 IFN-γ 在感染后 80 d 达较高水平,TNF-α 在感染后 100 d 达峰值;IL-2、IFN-γ 和 TNF-α 水平在感染后 100 d 均降低,IL-2 和 IFN-γ 在感染后 140 d 均迅速降低,TNF-α 在感染后 140 d 缓慢下降;IL-4 水平在感染后 1 ~ 80 d内较低,在感染后 100 d 达峰值,然后维持较高水平至观察结束,提示 Em 感染早期以 T_H1 细胞介导的细胞免疫为主,Em 感染中晚期以 T_H2 细胞介导的体

维普资讯 http://www.cqvip.com

液免疫为主。研究发现 BALB/c 鼠感染 Em 原头节 18 周(126 d)后,IFN-γ 和 TNF-α 水平降低,IL-4 水平增加,产生一个 T_H2 型免疫反应,类似上述结果。BCG 皮下注射组和空载体对照组 TNF-α 水平与 PBS 对照组相比轻微增加,提示 BCG 可刺激 Em 感染鼠的脾细胞分泌 TNF-α,发挥杀伤 Em 原头节的效应。

李富荣等[8,9]发现 AE 患者血清 IL-2、IFN-γ、TNF-α 和 IL-4 水平明显升高,经阿苯哒唑治疗 12 月后 IL-2 和 IFN-γ 水平无明显变化,TNF-α 和 IL-4 水平显著降低。实验发现疫苗皮下注射组和鼻腔内接种组小鼠的脾细胞上清液 IFN-γ 和 TNF-α 明显增加,IL-4 水平显著降低,提示疫苗免疫可诱导 Em 感染鼠产生一个 T_H1 型保护性免疫反应,T_H1 细胞分泌的 IFN-γ 可激活巨噬细胞等效应细胞,促进其释放 NO,杀伤 Em 原头节;T_H1 细胞分泌的 IFN-γ 还可抑制 T_H2 细胞分泌 IL-4,从而减弱 T_H2 型反应;T_H1 细胞分泌的 TNF-α 可促进单核细胞分泌 TNF-α 和 IL-1,促进 T_H1 细胞分泌 IL-2 和 IFN-γ;T_H2 细胞分泌的 IL-4 水平降低,解除了对 T_H1 细胞的抑制效应,使 T_H1 细胞分泌较多的 IL-2、IFN-γ 和 TNF-α;各种免疫细胞和细胞因子之间相互促进和相互调节,形成免疫调节网络,加强宿主 T_H1 反应,提高宿主抗泡球蚴感染的保护力。

实验还显示每个 EmAg 或 ConA 刺激组的细胞因子水平显著高于相应的原液组,每个 ConA 刺激组的细胞因子水平显著高于相应的 EmAg 刺激组,可能是由于重组 Em14-3-3 抗原仅诱导其特异的 CD_4^+T 细胞增殖,因此丝裂原诱导的细胞因子水平可高于特异抗原诱导的水平。

参 考 文 献

[1] 李文桂,王 鸿,朱佑明.多房棘球绦虫重组 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):1111-1114.

[2] 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.

[3] Kizaki T,Ishige M, Kobayashi S, et al. Suppression of T cell proliferation by CD_8^+ T cells induced in the presence of protoscolices of Echinococcus multilocularis in vitro [J]. Infect Immun,1993;61(2):525-533.

[4] Emery I,Liance M,Leclerc C. Secondary Echinococcus multilocularis infection in A/J mice:delayed metacestode development is associated with T_H1 cytokine production[J]. Parasite Immunol,1997;19(11):493-503.

[5] Bresson HS,Petitjean O,Monnot JB,et al. Cellular localization of interleukin-1 beta,interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha mRNA in a parasitic granulomatous disease of the liver,alveolar echinococcosis[J]. Eur Cytokine Netw,1994;5(5):461-468.

[6] Wellinghausen N,Gebert P,Kern P. Interleukin-4,IL-10 and IL-12 profile in serum of patients with alveolar echinococcosis[J]. Acta Trop,1999;73(2):165-174.

[7] 魏晓丽,丁剑冰,许 晏,等.小鼠感染泡球蚴后细胞因子水平的变化[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2004;22(6):361-364.

[8] 李富荣,石佑恩,史大中,等.泡球蚴病患者血清中 T_H1/T_H2 型细胞因子水平的观察[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2002;20(6):376-377.

[9] 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 T_H1/T_H2 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:关蕴良)

(上接第 5 页)

理是否激活了细胞分化过程中的下游信号转导因子,我们正在做进一步探讨。

参 考 文 献

[1] 王亚平,祝彼得.当归多糖的化学与药理学研究[M].第 4 册.北京:军事医学科学出版社,1996.365-374.

[2] Wang SL,Wang YP. Study on effect of angelica polysaccharide on modulation of human CFU-GM [J]. Acta Anatomica Sinica,2001;32(3):241-245.

[3] Zheng M,Wang YP. Experimental study on effect of angelica polysaccharide in inhibitory proliferation and inducing differentiation of K562 Cells[J]. Chin J Inte Trad West Med,2002;22(1):54-57.

[4] Wang SL,Wang YP. Experimental study of the effect of Angelica polysaccharide on proliferation and differentiation of human CFU-GM and HL-60 cells[J]. J Chongqing Med Univ,2003;28(3):257-260.

[5] 刘志杰,钱新华,李西平,等.丁酸盐不同给药方式诱导 K562 细胞向红系分化的比较研究[J].第一军医大学学报,2001;21(12):890-893.

[6] 赵春红,侯 明.天然药物诱导分化研究现状[J]. 白血病淋巴瘤,2006;15(1):69-71.

[7] 李兴玉,丁慧芳.当归多糖对肿瘤细胞系的抑制效应[J]. 中国中西医结合杂志,1994;13(特集):135-137.

[8] Sachs L.The molecular regulators of normal and leukaemic blood cells[J]. Proc R Soc Lond B Biol Sci,1987;231(1 264):289-312.

[9] 王振义.诱导分化治疗中的问题[J]. 中国肿瘤,2002;11(1):3-4.

(责任编辑:谭东勤)