维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)07-0682-04

有机硒增强 BCG 细胞免疫效果的初步探讨

李 惠,卢贤瑜,王利娴,阳 强

(重庆医科大学临床免疫学教研室,临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨酵母硒(Yeast-based selenium,Se)对卡介苗(BCG)免疫效果的影响。方法:将小鼠分为 4 组:A 组 BCG 皮内接种 + 喂硒、B 组 BCG 皮内接种、C 组单纯喂硒、D 组对照组(control)。于接种 4 周、8 周后取单个脾淋巴细胞,通过检测淋巴细胞增殖指数(Stimulation idex,SI)、IL-2、IFN-γ、细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)杀伤活力及淋巴细胞颗粒酶 B 及穿孔素的表达量来评价机体抗结核的细胞免疫能力。结果:6 项指标 A 与 B 组均高于对照组,差异有统计学意义 ($P<0.05$);A 组的 SI、IL-2、IFN-γ、CTL 杀伤活力,免疫 4 周后分别为 2.61 ± 0.24、(172.56 ± 9.34)pg/ml、(131.89 ± 3.32)pg/ml、(43.91 ± 3.21)%(8 周值分别为 2.32 ± 0.31、(138.04 ± 9.67)pg/ml、(129.17 ± 2.41)pg/ml、(39.92 ± 6.45)%,均显著高于 B 组(4 周值:(1.62 ± 0.14)、(134.06 ± 9.60)pg/ml、(105.89 ± 4.62)pg/ml、(30.46 ± 7.97)%;8 周值:1.61 ± 0.19、(101.42 ± 7.76)pg/ml、(102.00 ± 5.41)pg/ml、(28.14 ± 5.70)%),$P<0.05$。结论:BCG 与硒酵母有免疫协同作用,能诱导机体产生较强的抗结核的细胞免疫应答反应。

【关键词】BCG;有机硒;细胞免疫

【中国图书分类法分类号】R392.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-12-27

Initial discussion about the promoted cellular immunologic effects of BCG by organic selenium

LI Hui,et al

(*Department of Clinical Immunology,Key Laboratory of Clinical Medical Diagnosis,Ministry of Education, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To discuss the influence of organic selenium on the immune effect of Bacille Calmette-Guerin (BCG). *Methods*:C57BL6/J mice were randomized into 4 groups:"BCG+Se"mice group were intracutaneously inoculated with BCG and orally fed with yeast-based selenium(Se);BCG mice group were immunized with BCG intracutaneously;Se mice group were immunized with normal sodium and fed orally with Se; control mice group were immunized with normal sodium and fed orally water without Se. The mice were sacrificed after 4weeks or 8weeks to isolate the spleen mononuclear cells.T lympholeukocyte proliferation testing (stimulation index,SI),cytotoxic T lympholeukocyte (CTL)function testing as well as levels of IL-2 and IFN-γ and mRNA levels of granzyme B and perforin were employed to assess the effect of vaccine for Mycobacterium tuberculosis.They were determined by MTT assay,ELISA assay and RT-PCR,respectively. *Results*:The levels of 6 detected items in "BCG+Se"group and BCG group were significantly different from those in the control group ($P<0.05$).And the SI,IL-2,IFN-γ and CTL cytotoxic activity in group"BCG+Se"(4weeks:2.61 ± 0.24,(172.56 ± 9.34)pg/ml,(131.89 ± 3.32)pg/ml,(43.91 ± 3.21)%; 8weeks:2.32 ± 0.31,(138.04 ± 9.67)pg/ml,(129.17 ± 2.41)pg/ml,(39.92 ± 6.45)%)were significantly higher than that of group BCG(4weeks:(1.62 ± 0.14),(134.06 ± 9.60)pg/ml,(105.89 ± 4.62)pg/ml,(30.46 ± 7.97)%;8weeks:1.61 ± 0.19,(101.42 ± 7.76)pg/ml,(102.00 ± 5.41)pg/ml,(28.14 ± 5.70)%($P<0.05$)).*Conclusion*:The results suggest that there exists an immunologic synergy between organic selenium and BCG and that selenium could promote the cellular immunologic responses in BCG immunized mice.

【Key words】BCG;Organic selenium;Cellular immunity

结核病是当今危害人类健康的一重大疾病。其再燃与结核分枝杆菌的多重耐药、HIV 的传播及 BCG 的免疫效果不佳等因素有关。BCG 为减毒活疫苗,能长期存在宿主体内,使机体保持持久的带菌免疫状态。但由于多种因素的影响,其保护性免疫效果不理想。近年来不断有新型结核疫苗的报道,但其免疫效果均不及 BCG。因此,BCG 的改进是抗

作者介绍:李 惠(1975-),女,硕士生,
主要研究方向:结核免疫及疫苗。

基金项目:重庆医科大学科技创新资助项目(CX200204)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

结核疫苗理论设计的最佳选择[1]。大量实验证明适量的硒能提高机体的基础免疫功能。有机硒易吸收,其吸收率是无机硒的 20 倍,而且毒性弱,无机硒毒性强,故应用中有机硒将取代无机硒。据报道:维生素 E 与硒能促进水泡涤虫亚单位疫苗的免疫效果[2],适量的硒能增加人体抗白喉杆菌的体液免疫力[3],每日补充适量的硒联合脊髓灰质炎活疫苗可加强机体清除病毒能力[4]。因此,本研究旨在探讨有机硒与 BCG 联合使用能否发挥免疫协同作用,增强机体抗结核特异性细胞免疫应答能力。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

SPF 级雌性 C57BL6/J 小鼠,6~8 周龄, 购于重庆医科大学实验动物中心。硒酵母片(牡丹江灵泰药业)。RT-PCR 试剂(Takara)。DNA Marker、Trizol Reagent(上海生工)。G418(merck 公司)。小鼠 INF-γ、IL-2 ELISA 检测试剂盒(深圳晶美)。引物:小鼠内参(actin)P1:5'-GGG AAT GGG TCA GAA GGA CTC-3';P2:5'-AGA AGG AAG GCT GGA AAA GAG C-3'(665bp)。颗粒酶 B P3:5'-CTG CTA CTG CTG ACC TTG TCT CT-3'。P4:5'-AGC TCT AGT CCT CTT GGC CTT AC -3'(357bp)。及穿孔素引物[5](380bp)均由 Takara 公司合成。

1.2 小鼠分组及免疫

将 C57BL6/J 小鼠随机分为 4 组,A、B、C 组各 12 只,D 组 10 只。BCG+ Se 组 (A 组)、BCG 组 (B 组) 分别以 4×10^6CFU BCG 皮内接种小鼠,A 组于接种前 1 周开始每日以 1μg/ 只给小鼠喂酵母硒,连续 5 周,而 B 组喂无硒水。Se 组(C 组)接种生理盐水(NS)及喂硒;对照组(D 组)接种 NS 及喂无硒水。

1.3 脾淋巴细胞转化率测定

于免疫接种 4 周和 8 周后,每组分别取小鼠 6 只,处死,无菌取脾,研磨成匀浆,制成单个核细胞,台盼蓝负染,活力达 95%以上,调细胞浓度为 4×10^6/ml。于 96 孔培养板每孔加细胞悬液 100μl,完全 1640 培养液 100μl 及加入 PBS 稀释的 PPD10μl (终浓度 10μg/ml) 与 conA10μl (终浓度 5μg/ml)的混合液,同时做 PBS 和培养液对照孔,均三复孔。37℃、CO_2 培养箱培养 72h。于培养结束前 4h, 每孔加 5mg/ml MTT 10μl。4h 后去上清,以 150μl 二甲亚砜溶解 MTT-甲,570nm 测定 OD 值,结果以 SI 来表示。SI=(PPD 孔 OD 值—培养液对照孔 OD 值)/(PBS 孔 OD 值—培养液对照孔 OD 值)

1.4 ELISA 测定培养上清液 IFN-γ、IL-2

分别取 PPD 与 conA 预刺激 72h 和 24h 的细胞培养上清液, 用 IFN-γ、IL-2 ELISA 试剂盒测定 IFN-γ、IL-2,样品与标准品同时检测,以换算相应浓度。

1.5 CTL 杀伤活力测定

于 PPD 与 conA 预刺激 72h 的脾淋巴细胞内,加入本实验室制备的能表达结核杆菌分泌蛋白 Ag85B 的靶细胞[6],使效靶比为 50:1,为实验孔,不加靶细胞为效应细胞对照孔,同时设靶细胞对照孔,均三复孔。24h 后 MTT 法测定其杀伤率。杀伤率(%)=[1—(实验孔 OD 值—效应细胞对照孔 OD 值)/靶细胞对照孔 OD 值]×100%

1.6 RT-PCR 半定量颗粒酶 B 和穿孔素 mRNA 的转录水平

抽提预刺激 24h 的脾淋巴细胞的总 RNA 并逆转成 cDNA。PCR 以 Takara 试剂盒说明书操作,反应条件:94℃预变性 2min。94℃变性 30s、(内参 actin 57℃,颗粒酶 B 55℃,穿孔素 52℃) 退火 30s、72℃延伸 30s,30cycles。72℃再延伸 1min。产物经凝胶电泳、呈像。扫描光密度值,以 quantity one 软件分析。灰度值比值 = 目的基因光密度值 / 内参光密度值。

1.7 统计方法

采用 SPSS 11.5 软件包,方差分析和 q 检验。BCG 与 Se 两因素方差分析用析因方差分析。

2 结 果

2.1 脾淋巴细胞刺激指数

免疫后 4 周和 8 周脾淋巴细胞刺激指数见表 1。BCG+Se 组、BCG 组 SI 值均高于对照组,有显著性差异 ($P<0.01$);Se 组 8 周值显著性高于对照组 8 周值,差异有统计学意义($P<0.05$);BCG+Se 组 4 周与 8 周值均明显高于 BCG 组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。随免疫时间的延长 BCG+Se 组、BCG 组 SI 呈下降趋势,但前后两个时间段相比,无显著差异($P>0.05$)。析因方差分析显示,BCG 与硒有免疫协同作用($P<0.05$)。

表 1 四组脾淋巴细胞刺激指数(SI)比较($\bar{x}\pm s$)

Group	n	4 周	8 周
BCG+Se*#	6	2.61±0.24	2.32±0.31
BCG*	6	1.62±0.14	1.61±0.19
Se	6	0.95±0.20	0.99±0.08*
Control	5	0.65±0.13	0.67±0.04

注:*:与对照组相比,$P<0.05$;#:与 BCG 相比,$P<0.05$

2.2 脾淋巴细胞上清液 IL-2 产量

免疫后 4 周和 8 周脾淋巴细胞上清液 IL-2 产量见表 2。BCG+Se 组与 BCG 组 IL-2 产量显著高于对照组,$P<0.01$;BCG+Se 组 4 周与 8 周值均显著性高于 BCG 组,$P<0.01$。两组随免疫时间的延长 IL-2

维普资讯 http://www.cqvip.com

的分泌量均呈下降趋势，前后两个时间段相比差异均有统计学意义($P<0.01$)。析因方差分析显示，BCG与Se有免疫协同作用($P<0.05$)。

表 2 四组脾淋巴细胞上清液 IL-2 产量比较($\bar{x}\pm s$，pg/ml)

Group	n	4 周	8 周
BCG+Se*#	6	172.56±9.34	138.04±9.67&
BCG*	6	134.06±9.60	101.42±7.76&
Se	6	31.18±2.11	28.38±2.78
Control	5	29.00±1.65	28.28±1.38

注：*：与对照组相比，$P<0.01$；#：与 BCG 相比，$P<0.01$；&：4 周与 8 周相比，$P<0.01$

2.3 脾淋巴细胞上清液 IFN-γ 产量

免疫后 4 周和 8 周脾淋巴细胞上清液 IFN-r 产量见表 3。3 组均高于对照组，差异有统计学意义($P<0.01$)；BCG+Se 组 4 周与 8 周 IFN-γ 产量显著性高于 BCG 组，$P<0.01$。随免疫时间的延长 IFN-γ 产量呈下降趋势，但前后两个时间段相比差异均无统计学意义（$P>0.05$）。析因方差分析显示 BCG 与 Se 有协同作用($P<0.05$)。

表 3 四组脾淋巴细胞上清液 IFN-γ 产量比较($\bar{x}\pm s$，pg/ml)

Group	n	4 周	8 周
BCG+Se*#	6	131.89±3.32	129.17±2.41
BCG*	6	105.89±4.62	102.00±5.41
Se*	6	42.72±2.89	40.44±3.64
Control	5	23.87±5.37	26.80±4.97

注：*：与对照组相比，$P<0.01$；#：与 BCG 相比，$P<0.05$

2.4 脾淋巴细胞 CTL 杀伤活力

从表 4 可见，BCG+Se 组与 BCG 组免疫 4 周和 8 周后 CTL 杀伤活力高于对照组，差异有统计学意义（$P<0.01$）；BCG+Se 组 4 周与 8 周 CTL 杀伤率显著性高于 BCG 组，$P<0.05$。随着免疫时间的延长均呈下降趋势，但前后两个时间段相比差异均无统计学意义（$P>0.05$）。析因方差分析显示免疫 4 周后 BCG 与 Se 有协同作用($P<0.05$)，而免疫 8 周后显示无协同作用($P>0.05$)。

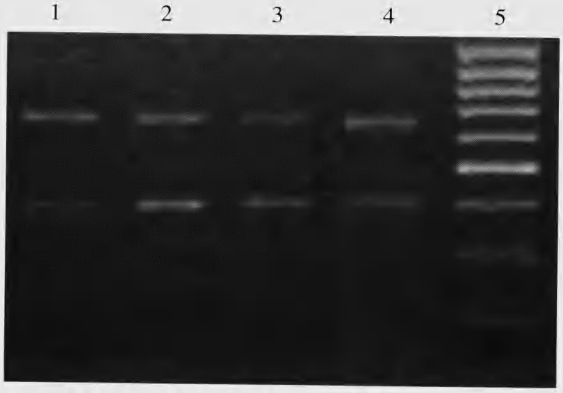
表 4 四组脾淋巴细胞 CTL 杀伤活力比较($\bar{x}\pm s$，%)

Group	n	4 周	8 周
BCG+Se*#	6	131.89±3.32	129.17±2.41
BCG*	6	105.89±4.62	102.00±5.41
Se	6	42.72±2.89	40.44±3.64
Control	5	23.87±5.37	26.80±4.97

注：*：与对照组相比，$P<0.01$；#：与 BCG 相比，$P<0.05$

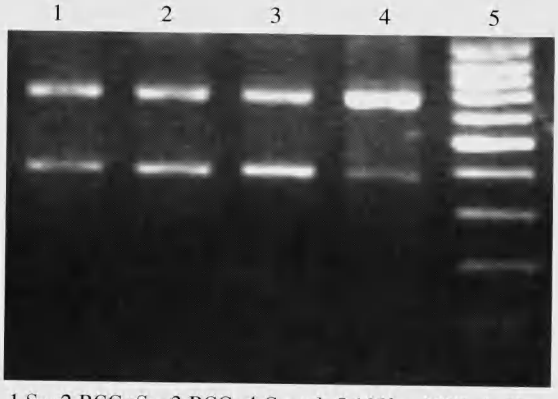
2.5 脾淋巴细胞颗粒酶 B 和穿孔素的表达

免疫后 8 周，颗粒酶 B 的灰度值比值 A、B、C、D 组分别为 1.56±0.47，1.10±0.24，0.56±0.17，0.53±0.18。BCG+Se 组与 BCG 组颗粒酶 B 表达的平均灰度值高于对照组，差异有统计学意义（分别为 $P<0.05$、$P<0.01$）；BCG+Se 组略高于 BCG 组，两者相比无显著差异($P>0.05$)。见图 5。穿孔素的灰度值比值分别为 0.84±0.16，0.68±0.14，0.29±0.12，0.20±0.07，BCG+Se 与 BCG 组显著高于对照组，$P<0.01$；BCG+Se 组略高于 BCG 组，两者相比无显著差异（$P>0.05$）。见图 6。



1.Se；2.BCG+Se；3.BCG；4.Contol；5.100bp DNA ladder

图 5 各组淋巴细胞颗粒酶 BmRNA 表达水平



1.Se；2.BCG+Se；3.BCG；4.Contol；5.100bp DNA ladder

图 6 各组淋巴细胞穿孔素的 mRNA 表达水平

3 讨 论

硒作为免疫增强剂，与疫苗联合使用能增强免疫系统的特异性免疫应答[2-4]。而硒与 BCG 的联合应用未见报道。众所周知，结核菌是胞内寄生菌，机体抗结核免疫以细胞免疫为主。因此，本实验通过淋巴细胞刺激指数、IL-2 与 IFN-γ 的分泌水平、

维普资讯 http://www.cqvip.com

CTL 杀伤率、颗粒酶与穿孔素 mRNA 表达水平 6 个指标来分析有机硒与 BCG 相互作用。

硒组 8 周的 T 淋巴细胞的刺激指数、4 周和 8 周的 IFN-γ 数值高于对照组，差异有统计学意义。4 周和 8 周的 IL-2 及 4 周 SI 值也略高于对照组，说明了硒通过活化细胞因子及促进 T 淋巴细胞增殖来增强机体的基础免疫力。本实验设计在免疫前 1 周就给小鼠喂硒，使机体免疫系统处于激活状态。预活化的细胞因子促使针对结核抗原肽的应答反应级联放大。硒与 BCG 的协同作用，使得促 Th1 型细胞增殖分化的细胞因子 IL-2 与 IFN-γ 产量增高，引起抗原特异性细胞应答增强。同时 IFN-γ 可激活巨噬细胞，参与结核病的肉芽肿免疫反应。可见 BCG+Se 组淋巴细胞 SI 值显著高于 BCG 组与 IL-2、IFN-γ 的增高是密不可分的。

CD8+T 淋巴细胞是人类抗结核的重要免疫细胞之一[7]，其介导的细胞毒效应能有效防止结核菌在宿主体内播散。而 CTL 杀伤实验是反映 CD8+细胞毒 T 淋巴细胞作用的直观功能性实验。本实验采用 MTT 法测定 CTL 杀伤活性，结果表明 BCG+Se 组特异性的 CTL 杀伤活性明显高于 BCG 组，差异有统计学意义，且两者有免疫协同作用。另据报道，CD8+细胞毒 T 淋巴细胞在受感染时能上调颗粒酶 A、B、穿孔素等的表达[5]，这些效应分子直接杀伤胞内结核菌，介导感染细胞发生程序性死亡[8]。本研究结果显示，与对照组相比，BCG+Se 组与 BCG 单用组都能刺激机体产生多量的颗粒酶 B 与穿孔素，以 BCG+Se 组为著。

同时值得一提的是，随着免疫时间推移，BCG+Se 组和 BCG 组的 6 个指标都有下降，这可能与 BCG 在小鼠肺脏和脾脏内的定植减少而导致机体抗结核免疫相对减弱有关[9]。因此，一定数量的活菌能长期存留在机体内是诱导免疫系统产生较强免疫力的重要条件。当机体再次受到相同结核菌的刺激时，免疫记忆细胞可在抗结核免疫中发挥重要作用。

我们依据人与鼠的药物换算系数选择了硒酵母的几个口服浓度，并通过预实验确定了每日 1μg/只的酵母硒剂量。研究显示口服硒能与 BCG 发挥免疫协同作用，使机体产生较强的抗结核细胞免疫应答，这可能与硒可防止 BCG 诱导的免疫细胞损伤[10]有关。本研究提示硒与 BCG 的联合应用可增强抗结核能力，为改良 BCG 免疫提供了新思路。

参 考 文 献

[1] Dietrich G, Viret JF, Hess J. Mycobacterium bovis BCG-based vaccines against tuberculosis: novel developments[J]. Vaccine, 2003; 21(7-8): 667-670.

[2] Kandil OM, Abou-Zeina HA. Effect of parenteral vitamin E and selenium supplementation on immune status of dogs vaccinated with subunit and somatic antigens against Taenia hydatigena[J]. Egypt Soc Parasitol, 2005; 35(2): 537-550.

[3] Hawkes wc, Kelley DS, Taylor PC. The effects of dietary selenium on the immune system in healthy men[J]. Biol Trace Elem Res, 2001; 81(3): 189-213.

[4] Broome CS, McArdle F, Kyle JA, et al. An increase in selenium intake improves immune function and poliovirus handling in adults with marginal selenium status[J]. Am J Clin Nutr, 2004; 80(1): 154-162.

[5] Canaday DH, Wilkinson RJ, Li Q, et al. CD4+ and CD8+T cells kill intracellular Mycobac terium tuberculosis by a perforin and Fas/Fas ligand-independent mechanism[J]. J Immunol, 2001; 167(5): 2734-2742.

[6] 李 惠，卢贤瑜，王利娴，等. 携带结核杆菌 Ag85B 靶细胞的构建、鉴定与应用[J]. 中国人畜共患病学报，2007; 23(3): 214-217.

[7] Sud D, Bigbee C, Flynn JL, et al. Contribution of CD8+ T cells to control of Mycobacterium tuberculosis infection [J]. J Immunol, 2006; 176(7): 4296-4314.

[8] Worku S, Hoft DF. Differential effects of control and antigen-specific T cells on intracellular Mycobacterial growth[J]. Infect Immun, 2003; 71(4): 1763-1773.

[9] 卢贤瑜，魏 江. 小鼠胃内接种 BCG 后细菌的定植及抗结核细胞免疫功能的探讨[J]. 中国免疫学杂志，2005; 21(4): 304-307.

[10] Wang H, Wei W, Zhang SY, et al. Melatonin-selenium nanoparticles protects liver against immunological injury induced by Bacil lus Calmette-Guérin and lipopolysaccharide[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2005; 26(6): 745-752.