维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)06-0575-03

多房棘球绦虫混合重组 BCG-EmⅡ/3 和 BCG-Em14-3-3 疫苗诱导小鼠脾脏 T 细胞亚群的变化

唐 君,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,重庆市传染病寄生虫病重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨多房棘球绦虫混合重组 BCG-EmⅡ/3 和 BCG-Em14-3-3 疫苗免疫和 Em 原头节攻击后小鼠脾 CD_4^+ 和 CD_8^+T 淋巴细胞亚群的变化。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 周杀鼠取脾,分离脾细胞,流式细胞仪检测脾 CD_4^+ 和 CD_8^+T 淋巴细胞亚群的百分比,同时设有空载体、BCG 和 PBS 对照。结果:疫苗接种组的脾 CD_4^+T 细胞亚群显著增加,CD_8^+T 细胞亚群无明显变化,CD_4^+/ CD_8^+ 亚群比值明显升高;皮下注射组的 CD_4^+ 和 CD_4^+/ CD_8^+ 亚群比值显著高于鼻腔内接种组。结论:CD_4^+T 细胞亚群在多房棘球绦虫重组 BCG-Em14-3-3 疫苗诱导的小鼠抗 Em 原头节攻击感染的保护性免疫机制中起一定作用。

【关键词】多房棘球绦虫;重组 BCG-EmⅡ/3 疫苗;BCG-Em14-3-3 疫苗;脾细胞亚群

【中国图书分类法分类号】R383.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-12-14

Changes on subsets of T cells in the spleen of mice by immunization with mixed recombinant BCG-EmⅡ/3 and BCG-Em14-3-3 vaccine against Echinococcus multilocularis

TANG Jun, et al

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

【Abstract】*Objective*: To investigate changes in subsets of T cells in the spleen of mice 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 subcutaneously and intranasally vaccinated with mix recombinant BCG vaccines respectively, then challenged with Em protoscolexes on 8w of vaccination and killed on 18w of infection to get spleen. Spleen cells were separated to measure subsets of CD_4^+ and CD_8^+T cells by FACsort, Blank vector, BCG and PBS served as control. *Results*: In the groups of immunization, CD_4^+subset increased significantly, as well as the ratio of CD_4^+/CD_8^+subset, but CD_8^+ subset had no change, CD_4^+ subset and ratio of CD_4^+/CD_8^+subset in the subcutaneous group were higher than these in the intranasal group. *Conclusion*: CD_4^+T cells subset may bear a part in protection induced in mice by mixed recombinant BCG-EmⅡ/3 and BCG-Em14-3-3 vaccine against challenge with Em protoscoleces.

【Key words】Echinococcus multilocularis; Recombinant BCG-EmⅡ/3 vaccine; Recombinant BCG-Em14-3-3 vaccine; Subsets of spleen cells

泡型包虫病(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健康的人畜共患寄生虫病 (Zoonosis)。Bresson 等(1990 年)发现 C57BL/10 鼠抵抗 Em 感染是由于血内 CD_4^+T 细胞增加和 CD_8^+T 细胞减少;Gottstein 等证实 AKR 鼠和 C57BL/6j 鼠容易感染 Em 原头节是由于血内 CD_4^+T 细胞降低;Manfras 等[1]发现有明显症状的 AE 患者外周血单核细胞增殖明显降低,CD_4^+T 细胞亚群明显减少,CD_8^+T 细胞亚群显著增多,这些资料表明 T 淋巴细胞亚群在宿主对泡球蚴的免疫应答中可能起重要作用。

本文在成功构建重组 BCG-EmⅡ/3 和 BCG-Em14-3-3 疫苗的基础上[2-4],将这两种疫苗按 1:1 的

作者介绍:唐 君(1968-),女,大专,护师,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)和教育部重点项目(205131)资助。

维普资讯 http://www.cqvip.com

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脾 CD_4^+和 CD_8^+T 淋巴细胞亚群的变化，从而为研究该疫苗的保护性免疫机制提供有价值的材料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 65 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。

1.1.2 多房棘球绦虫重组 BCG-Em Ⅱ/3 和 BCG-Em14-3-3 疫苗 由本室构建[2-4]，将 rBCG-Em Ⅱ/3 和 rBCG-Em14-3-3 疫苗按 1:1 的浓度比例混匀，组成混合疫苗。

1.1.3 主要试剂 ConA 购自 Sigma 公司，大鼠抗小鼠 CD_4^+和 CD_8^+T 细胞亚群单克隆抗体以及 FITC 标记兔抗大鼠 IgG 抗体购自北京邦定泰克生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 65 只雌性 BALB/c 小鼠随机分为 5 组，每组 13 只。第 1 组为 5×10^6 CFU 疫苗悬浮于 100μl PBS 于小鼠后背部皮下单次注射；第 2 组 5×10^5 CFU 疫苗悬浮于 10μl PBS 于小鼠鼻腔粘膜单次接种；第 3 组为 5×10^6 CFU 的空载体(含 pBCG 质粒的 BCG)皮下注射对照组；第 4 组为 5×10^6 CFU 的 BCG 皮下注射对照组；第 5 组为 100μl PBS 皮下注射对照组。

1.2.2 攻击感染 多房棘球绦虫重组 BCG-Em Ⅱ/3 和重组 BCG-Em14-3-3 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。

1.2.3 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/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%。

1.2.4 脾细胞 CD_4^+和 CD_8^+亚群制备 吸取 1×10^6 脾细胞至 1.5mlEp 管，加入大鼠抗小鼠 CD_4^+或 CD_8^+亚群单抗 50μl，4℃放置 30min；加入 FITC 标记兔抗大鼠 IgG 抗体 50μl，4℃放置 30min；每管加入 1%多聚甲醛 100μl 进行固定，4℃保存。

1.2.5 脾细胞 CD_4^+和 CD_8^+亚群检测 用 FACsort 流式细胞仪于 523nm 波长下测定细胞绿色荧光，每个样本记数 1×10^4 个细胞，分析软件为 ModFitLT。

1.2.6 统计学处理 免疫组小鼠脾细胞内 CD_4^+和 CD_8^+亚群百分比采用 SPSS11.0 软件进行分析，记量资料采用 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 脾细胞 CD_4^+亚群百分比变化

10^6CFU 混合重组 BCG 疫苗皮下注射免疫小鼠脾细胞 CD_4^+亚群百分比为 33.58%，与 PBS 对照组相比显著升高，差别有显著意义($P<0.01$)；10^5 CFU 疫苗鼻腔内接种免疫小鼠后，脾细胞 CD_4^+亚群百分比为 31.05%，明显高于 PBS 对照组($P<0.01$)；皮下注射组的脾细胞 CD_4^+亚群百分比明显高于鼻腔内接种组($P<0.01$)；空载体和 BCG 皮下注射组的脾细胞 CD_4^+亚群百分比分别与 PBS 对照组相比，差别均无显著意义($P>0.05$，表 1)。

表 1 重组 BCG-Em Ⅱ/3 和 BCG-Em14-3-3 疫苗免疫，原头节攻击后小鼠脾细胞亚群检测($n=8$)

组 别	CD_4^+亚群百分比	CD_8^+亚群百分比	CD_4^+/CD_8^+亚群比值
皮下注射组	0.3358 ± 0.0054^{bc}	0.0918 ± 0.0058	3.67 ± 0.26^{b}
鼻腔内接种组	0.3105 ± 0.0107^{b}	0.0900 ± 0.0062	3.47 ± 0.63^{b}
空载体	0.2365 ± 0.0166	0.0911 ± 0.0134	2.62 ± 0.29
BCG	0.244 ± 0.0233^{a}	0.0963 ± 0.0065	2.55 ± 0.35
PBS	0.2163 ± 0.0268	0.0848 ± 0.0184	2.75 ± 1.08

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, compared with PBS control; c: $P<0.01$, compared with intranasal group

2.2 脾细胞 CD_8^+亚群百分比变化

皮下注射组和鼻腔内接种组的脾细胞 CD_8^+亚群百分比与 PBS 对照组相比无明显变化($P>0.05$)；皮下注射组的脾细胞 CD_8^+亚群百分比与鼻腔内接种组比较无显著差别($P>0.05$)；空载体和BCG 皮下注射组的脾细胞 CD_8^+亚群百分比分别与 PBS 对照组相比，差别均无显著意义($P>0.05$，表 1)。

2.3 脾细胞 CD_4^+/CD_8^+亚群比值变化

皮下注射组或鼻腔内接种组的 CD_4^+/CD_8^+亚群比值显著高于 PBS 对照组($P<0.01$)；空载体和 BCG 皮下注射组的 CD_4^+/CD_8^+亚群比值分别与PBS 对照组相比，差别均无显著意义($P>0.05$，表 1)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨 论

当前分子生物学技术的发展为研制理想的 Em 疫苗提供了新方法，将 Em 外源 DNA 引入特定疫苗载体构建重组活疫苗可将保护性抗原传递至宿主免疫系统。王昌源等[5]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[6]证实 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。Crillo 等[7]认为卡介苗(Bacille Calmette-Guerin;BCG)是一种理想的疫苗载体，Matsuo 等[8]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。

李文桂等[9]研究测得正常 BALB/c 鼠脾 CD_4^+T 细胞亚群百分比为24.11%，CD_8^+T 细胞亚群百分比为 5.97%，本文发现 BALB/c 鼠感染 Em 原头节后，CD_4^+ T 细胞亚群百分比为 21.63%，CD_8^+T 细胞亚群百分比为 8.48%，可见 Em 感染可降低小鼠的 CD_4^+T 细胞数目，轻微增加 CD_8^+T 细胞数目。BCG 皮下注射组和空载体对照组 CD_4^+和 CD_8^+T 细胞亚群百分比与感染对照组相比均轻微增加，提示 BCG 免疫对 Em 感染具有一定的免疫调节作用。

Gottstein 等(1990 年)将重组 St-Em/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脾淋巴细胞明显增多；王昌源等[5]用 100μg 的 Em/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 周免疫鼠脾细胞在 EmAg 或 ConA 刺激下明显增殖；Dai 等[9]发现小鼠缺乏功能性 $\alpha\beta^+CD_4^+T$ 细胞亚群时，体内泡球蚴生长迅速，且无肉芽肿形成，脾细胞增殖降低，提示该细胞在抑制泡球蚴生长过程中起关键作用；李富荣等[10,11]证实泡球蚴感染 BALB/c 鼠后 1~8 周后以 CD_4^+T 细胞增多为主，随后 CD_4^+T 细胞开始减少，CD_8^+T 细胞开始增加，20 周后改变明显，CD_4^+/CD_8^+亚群比值迅速倒置；感染泡球蚴 25 周的小鼠脾 CD_4^+T 细胞凋亡明显增加；AE 患者体内 CD_4^+T 细胞明显减少，CD_8^+T 细胞显著增加，CD_4^+/CD_8^+亚群比值倒置，当用阿苯哒唑进行治疗时发现疗程达 1 年的 AE 患者体内 CD_8^+T 细胞继续增加，疗程达 2 年的患者体内 CD_4^+T 细胞开始增加，CD_8^+T 细胞开始下降，CD_4^+/CD_8^+亚群比值升高。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很低，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脾细胞亚群的变化，发现皮下注射组和鼻腔内接种组小鼠脾 CD_4^+T 细胞显著增加，推测疫苗分泌的 EmⅡ/3 或 Em14-3-3 抗原经抗原提呈细胞加工处理后，形成 13~17 个氨基酸残基组成的抗原肽，该肽与 MHC Ⅱ类分子连接形成抗原肽—MHC Ⅱ类分子复合物，经高尔基体运送到 APC 表面，与 CD_4^+T 细胞受体结合，活化 CD_4^+T 细胞。活化的 CD_4^+T 细胞增殖分化，形成效应性 Th 细胞，其中 Th_1 细胞分泌 IL-2 和 IFN-γ，促进 T_{DTH} 和 Tc 细胞的增殖分化和成熟，在细胞介导的疫苗应答中发挥作用；Th_2 细胞分泌 IL-4，IL-5，IL-6 和 IL-10，促进 B 细胞的增殖分化和抗体形成，在抗体介导的疫苗应答中发挥作用；活化的 CD_4^+T 细胞后可激活巨噬细胞和 NK 细胞，从而增强它们杀伤泡球蚴的作用。

参 考 文 献

[1] Manfras BJ, Renter S, Wendland T, et al. Impeded Th1 $CD4^+$ memory T cell generation in chronic-persisting liver infection with echinococcus multilocularis[J]. Int Immunol, 2004; 16(1): 43-50.

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

[3] 王 鸿，李文桂. 多房棘球绦虫重组 BCG-Em14-3-3 疫苗的构建及鉴定[J]. 中国病原微生物学杂志，2006; 1(1): 43-46.

[4] 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.

[5] 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.

[6] 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.

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

[8] 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.

[9] 李文桂，石佑恩. 血吸虫重组 BCG-Sj26GST 疫苗诱导小鼠 T 淋巴细胞亚群变化的研究[J]. 中国人兽共患病杂志，2000; 16(2): 56-58.

(下转第 580 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

是脂质过氧化物的降解产物，可引起膜损伤、酶抑制、溶酶体释放，造成机体多种疾病。我们的研究结果表明，神经元缺血再灌注后，SOD 活力明显下降，MDA 含量明显升高，SS 可升高脑缺血再灌注引起的 SOD 活力的下降，减少脑缺血再灌注引起的 MDA 含量的升高，说明西维来司钠具有抗氧化活性和清除自由基的能力。

缺血性脑血管疾病是中老年人的常见病、多发病，是现今人类死亡率最高的三大疾病之一，也是三大疾病中发展最快、恢复最慢、死亡最多、致残最重的病种。目前关于脑缺血/再灌注损伤的病理生理机制，比较公认的包括能量代谢障碍、氧自由基应激[5,6]、细胞内钙超载、兴奋性氨基酸的兴奋毒性[7-9]、一氧化氮合酶(NOS)的过度激活、神经元细胞凋亡程序启动以及炎症反应等。大量证据表明，炎症反应介导了脑缺血/再灌注损伤，而中性粒细胞的聚集、浸润是炎症反应发生、发展的关键步骤。西维来司钠作为一种特异性的 NE 抑制剂，在有中性粒细胞介导的神经细胞发生缺血/再灌注损伤时可发挥保护作用，而本实验研究的是在无中性粒细胞介导的体外培养的神经细胞发生缺血/再灌注损伤时，西维来司钠仍具有保护作用。本实验结果显示：西维来司钠组对受损神经元有明显的保护作用，并呈现一定的浓度依赖性. 初步表明了西维来司钠能有效防止缺血再灌注对神经元的损伤，保护神经细胞的膜结构，提高细胞生存状态，同时西维来司钠可升高脑缺血再灌注引起的 SOD 活力的下降，减少脑缺血再灌注引起的 MDA 含量的升高，提示其机制可能与抗过氧化作用有关。

长期以来，中外学者研究西维来司钠，总是通过抑制 NE 入手，而本实验证明了在没有 NE 时，西维来司钠对神经细胞发生缺血/再灌注损伤仍具有保护作用。这为进一步深入研究西维来司钠防治缺血性脑血管疾病的作用机制奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Bhardwaj A, Alkayed NJ, Kirsch JR, et al. Mechanisms of ischemicbrain damage[J]. Curr Cardiol Rep, 2003; 5(2): 160-167.

[2] Chen HM, Chen JC, Shyr MH, et al. Neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046) attenuates reperfusion-induced hepatic microcirculatory derangement, energy depletion and lipid peroxidation in rats [J]. Shock, 1999; 12(6): 462-467.

[3] Kotake Y, Yamamoto M, Matsumoto M, et al. Sivelestat, a neutrophil elastase inhibitor, attenuates neutrophil priming after hepatoenteric ischemia in rabbits[J]. Shock, 2005; 23(2): 156-160.

[4] 丁爱石，王福庄. 新生大鼠海马神经元在无血清培养液中的生长特性[J]. 细胞生物学杂志，1993; 15: 88-90.

[5] Kontos HA. Oxygen radicals in cerebral ischemia: the 2001 Willis lecture[J]. Stroke, 2001; 32(11): 2712-2716.

[6] 张 玲，余绍祖，吴国样. 大鼠脑缺血再灌注后 TNF-α、IL-β 及细胞间黏附分子-1mRNA 的表达[J]. 卒中与神经疾病，2001; 8(2): 77-79.

[7] Matsushita Y, Shima K, Nawashiro H, et al. Real-time monitoring of glutamate following fluid percussion brain injury with hypoxia in the rat[J]. J Neurotrauma, 2000; 17(2): 143-153.

[8] Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of Ischemic stroke; an integrated view[J]. Trends Neurosci, 1999; 22(9): 391 -397.

[9] Block F, Schwarz M. Neuroprotection in stroke. A critical overview[J]. Nervenarzt, 1999; 70(2): 101-110.

(上接第 577 页)

[10] Dai WJ, Waldvogel A, Siles LM, et al. Echinococcus multilocularis proliferation in mice and respective parasite 14-3-3 gene expression is mainly controlled by an αβ+ CD_4+T cell mediated immune responses[J]. Immunol, 2004; 112(3): 481-488.

[11] 李富荣，石佑恩，史大中，等. 泡状棘球蚴病宿主淋巴细胞的变化及意义[J]. 中国人兽共患病杂志，2003; 19(3): 91-94.