维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)07-0676-03

多房棘球绦虫混合重组 BCG-EmⅡ/3 和 BCG-Em14-3-3 疫苗免疫小鼠后脾细胞亚群的动态观察

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:动态观察多房棘球绦虫混合重组 BCG-EmⅡ/3 和 BCG-Em14-3-3 疫苗免疫小鼠后脾细胞亚群的变化。方法:将疫苗采用鼻腔内接种免疫 BALB/C 鼠,在免疫后 0、2、4、6、8、10、12、14、16 和 18 周各剖杀 4 只小鼠取脾,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 PBS 对照。结果:疫苗接种组的脾 CD_4^+ 和 CD_8^+T 细胞亚群分别在免疫后 2~12 周和 2~18 周升高,分别在免疫后 6 和 10 周达最高水平。结论:CD_4^+T 细胞亚群数目在多房棘球绦虫混合重组 BCG-EmⅡ/3 和 BCG-Em14-3-3 疫苗免疫早期(2~6 周)显著增加,

【关键词】多房棘球绦虫;重组 BCG-EmⅡ/3 疫苗;重组 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】2006-09-13

Dynamic observation on subsets of splenocytes in mice by immunization with mixed recombinant BCG-EmⅡ/3 and BCG-Em14-3-3 vaccine of echinococcus multilocularis

LI Wengui, et al

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

【Abstract】*Objective*: To dynamically observe changes of subsets of splenocytes in mice by immunization with mixed recombinant BCG-EmⅡ/3 and BCG-Em14-3-3 vaccine of Echinococcus multilocularis(Em). *Methods*: BALB/C mice were intranasally vaccinated with the vaccine and killed to get spleen at 0,2,4,6,8,10,12,14,16 and 18w of immunization respectively. Splenocytes were separated to measure subsets of CD_4^+ and CD_8^+T cells by FACsort, PBS served as control. *Results*: In the groups of immunization, CD_4^+ and CD_8^+subsets increased obviously at 2~12w and 2~18w respectively, which reached the highest level at 6 and 10w respectively. *Conclusion*: The number of CD_4^+ subsets of splenocytes increases remarkably in the early stage (2~6week)by immunization with mixed recombinant BCG-EmⅡ/3 and BCG-Em14-3-3 vaccine.

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

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。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[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]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,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],将该疫苗免疫小鼠后动态观察其脾 CD_4^+和 CD_8^+T 淋巴细胞亚群的变化,从而为研究该

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)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

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

90 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 多房棘球绦虫混合重组 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

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。

1.4 实验分组、疫苗注射部位、途径、剂量及次数

90 只雌性 BALB/c 小鼠随机分为 2 组，每组 45 只。第 1 组为 5×10^5CFU 疫苗悬浮于 10μl PBS 于小鼠鼻腔粘膜单次接种；第 2 组为 10μl PBS 鼻腔粘膜对照。

1.5 脾细胞制备

在疫苗免疫后 0、2、4、6、8、10、12、14、16 和 18 周各剖杀 4 只小鼠，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%。

1.6 脾细胞 CD_4^+ 和 CD_8^+ 亚群制备

吸取 1×10^6 脾细胞至 1.5ml Ep 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。

1.7 脾细胞 CD_4^+ 和 CD_8^+ 亚群检测

应用 FACsort 流式细胞仪于 523nm 波长下测定细胞绿色荧光，每个样本计数 1×10^4 个细胞，分析软件为 ModFitLT。

1.8 统计学处理

各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，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

免疫组小鼠脾细胞 CD_4^+亚群百分比在免疫后 2~14 周升高，在免疫后 6 周达最高水平，与 0 周相比有显著或极显著差别（$P<0.05$ 或 $P<0.05$，表 1）。免疫组小鼠脾细胞 CD_8^+亚群百分比在免疫后 2~18 周升高，在免疫后 10 周达较高水平，与 0 周相比有显著或极显著差别（$P<0.05$ 或 $P<0.05$，表 1）。

表 1 重组 BCG-EmII/3 and BCG-Em14-3-3 疫苗鼻腔内接种免疫小鼠脾细胞亚群动态观察

周别	鼠数	$CD4^+$ 亚群	$CD8^+$ 亚群
0 周	4	0.230 ± 0.022	0.059 ± 0.014
2 周	4	0.261 ± 0.018	0.069 ± 0.015
4 周	4	0.282 ± 0.04	0.068 ± 0.014
6 周	4	0.321 ± 0.017**	0.085 ± 0.008*
8 周	4	0.278 ± 0.003*	0.085 ± 0.008*
10 周	4	0.236 ± 0.009	0.086 ± 0.004**
12 周	4	0.235 ± 0.025	0.084 ± 0.010*
14 周	4	0.234 ± 0.017	0.085 ± 0.012*
16 周	4	0.228 ± 0.019	0.085 ± 0.005*
18 周	4	0.221 ± 0.042	0.081 ± 0.005*

与 0 周比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$

3 讨 论

Playford 等[8]发现重症联合免疫缺陷（SCID）鼠由于缺乏功能性 T、B 细胞而非常容易感染 Em 原头节，当用正常鼠脾淋巴细胞重建其免疫功能时则可抑制 Em 生长；Kizaki 等[9~11]将 Em 原头节腹腔注射 BALB/c 鼠 2 周后发现脾 CD_8^+T 细胞明显增殖，当将 Em 原头节与小鼠脾细胞在体外混合培养时发现 Em 原头节可抑制 ConA 刺激的脾 CD_4^+T 细胞增殖，但不抑制脾 CD_8^+T 细胞数目增加；Bresson 等[12]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[13]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[14,15]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。

多房棘球绦虫混合重组 BCG-EmⅡ/3 和 BCG-Em14-3-3 疫苗经各种途径进入宿主体内后，表达分泌的 EmⅡ/3 和 Em14-3-3 抗原分子经抗原提呈细胞加工处理后，形成多个氨基酸残基组成的抗原肽，该肽与 MHC Ⅰ或Ⅱ类分子连接形成抗原肽-MHC Ⅰ或抗原肽-MHC Ⅱ类分子复合物，经高尔基体运送到 APC 表面，分别与 CD_8^+或 CD_4^+T 细胞受体结合，从而活化 CD_8^+或 CD_4^+T 细胞。CD_4^+T 细胞亚群

维普资讯 http://www.cqvip.com

中 T_H1 细胞活化、增殖和分化后分泌 IL-2、IFN-γ 和 TNF-α 等细胞因子，辅佐细胞免疫应答；CD_4^+T 细胞亚群 T_H2 细胞活化、增殖和分化后分泌 IL-4、IL-5 和 IL-10 等细胞因子，辅佐体液免疫应答；CD_4^+ T 细胞亚群中 T_{DTH} 细胞活化、增殖和分化后分泌淋巴因子，介导迟发性变态反应；活化的 CD_4^+T 细胞还可激活巨噬细胞和 NK 细胞，从而增强它们杀伤泡球蚴的作用。CD_8^+T 细胞亚群中 CTL 细胞活化后，通过直接细胞毒作用或分泌细胞因子而发挥效应，使 CD_8^+T 细胞的作用得以放大；CD_8^+T 细胞亚群 TS 细胞活化后，分泌抑制因子，调节免疫应答。

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 7 周免疫鼠脾细胞在 EmAg 或 ConA 刺激下明显增殖；李富荣等[16]发现泡球蚴感染 BALB/c 鼠后 1~8 周以 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；CD_4^+T 细胞在免疫后 8 周达较高水平，CD_8^+T 细胞在免疫后 25 周达较高水平。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脾细胞亚群的变化。研究发现免疫鼠脾细胞 CD_4^+亚群百分比在免疫后 6 周达最高水平，大约早于 Em 原头节感染 2 周，早于 ELP 蛋白免疫 1 周；CD_8^+亚群百分比在免疫后 10 周达较高水平，大约早于 Em 原头节感染 15 周，提示混合重组 BCG-EmⅡ/3 和 BCG-Em14-3-3 疫苗在免疫早期（2~6 周）可诱导小鼠 CD_4^+T 细胞亚群增加，在免疫中期（8~10 周）可诱导小鼠 CD_8^+ T 细胞亚群升高，表明 CD_4^+和 CD_8^+T 细胞亚群在疫苗诱导的免疫应答过程中起关键作用。

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-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.

[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)：1111-1114.

[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] Playford MC，Ooi HK，Ito M.Lymphocyte engraftment conveys immunity and alters parasite development in SCID mice infected with Echinococcus multilocularis[J].Parasitol Res，1993；79(4)：261-268.

[9] Kizaki T，Kobayashi S，Ogasawara K，et al.Immune suppression induced by protoscoleces of Echinococcus multilocularis in mice. Evidence for the presence of CD_8 dull suppressor cells in spleens of mice intraperitoneally infected with Echinococcus multilocularis [J].J Immunol，1991；147(5)：1659-1666.

[10] Kizaki T，Ishige M，Kobayashi S，et al.Supression 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.

[11] Kizaki T，Ishige M，Bingyan W，et al.Generation of CD_8^+ suppression T cells by protoscoleces of Echinococcus multilocularis in vitro[J].Immunol，1993；79(3)：412-417.

[12] Bresson HS，Liance M，Meyer JP，et al.Cellular immunity in experimental Echinococcus multilocularis infection. Ⅱ squential and comparative phenotypic study of the periparasitic mononuclear cells in resistant and sensitive mice[J].Clin Exp Immunol，1990；82(2)：378-382.

[13] 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 (C57BL/10)to secondary alveolar echinococcosis[J].Clin Exp Immunol，1994；96(2)：245-252.

[14] Manfras BJ，Renter S，Wendland T，et al. Increased activation oligoclonality of peripheral CD_8^+T cells in the chronic human helminth infection alveolar Echinococcosis[J].Infect Immun，2002；70(3)：1168-1174.

[15] Manfras BJ，Renter S，Wendland T，et al.Impeded Th1 CD_4^+ memory T cell generation in chronic-persisting liver infection with Echinococcus multilocularis[J].Int Immunol，2004；16(1)：43-50.

[16] 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.