维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)08-0796-03

多房棘球绦虫重组 BCG-EmⅡ/3 疫苗对小鼠脾细胞凋亡的影响

杨 梅,李文桂

(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:检测多房棘球绦虫重组 BCG-EmⅡ/3 疫苗对原头蚴攻击小鼠脾细胞凋亡的影响。方法:用重组 BCG-EmⅡ/3 疫苗分别通过皮下注射和鼻腔粘膜接种免疫 BALB/C 小鼠 8 周后,用 50 个多房棘球绦虫原头蚴腹腔注射进行攻击,攻击感染后 18 周剖杀小鼠,分离脾细胞,用 ConA 刺激培养 16~18h,然后用 Annexin V-FITC 染色法检测脾细胞凋亡。结果:小鼠脾细胞原液组和 ConA 刺激组细胞凋亡发生率均显著低于 PBS 对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);每个 ConA 刺激组脾细胞凋亡发生率显著高于相应的原液组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);鼻腔粘膜接种组脾细胞凋亡率显著低于皮下注射组($P<0.01$)。结论:多房棘球绦虫重组 BCG-EmⅡ/3 疫苗可抑制感染小鼠脾细胞发生凋亡,增加 CD_4^+T 细胞亚群的数量,加强宿主抗多房棘球绦虫感染的保护性免疫反应。

【关键词】多房棘球绦虫;重组 BCG-EmⅡ/3 疫苗;脾细胞;凋亡

【中国图书分类法分类号】R383.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-11-23

Effects of recombinant BCG-EmⅡ/3 vaccine on apoptosis of splenocytes in mice challenged with Echinococcus multilocularis

YANG Mei, et al

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

【Abstract】*Objective*: To detect the effects of recombinant BCG-EmⅡ/3 vaccine on apoptosis of splenocytes in mice challenged with protoscoleces of Echinococcus multilocularis. *Methods*: BALB/C mice were immunized with rBCG-EmⅡ/3 vaccine by subcutaneous injection or intranasal inoculation. After 8 weeks of immunization, all the mice were challenged with 50 protoscoleces of Echinococcus multilocularis by intraperitoneal injection. On the 18th week after infection, mice were killed to separate splenocytes and stimulated with ConA for 16~18h, then apoptosis of splenocytes was detected by Annexin V-FITC staining methods. *Results*: Apoptotic rate of splenocytes in all groups with or without ConA stimulation was obviously lower than that of PBS group ($P<0.05$ or $P<0.01$); Apoptotic rate of splenocytes in each group with ConA stimulation was greatly higher than that in the group without ConA stimulation ($P<0.05$ or $P<0.01$). Apoptotic rate in intranasal inoculation group was also lower than that in subcutaneous injection group ($P<0.01$). *Conclusions*: rBCG-EmⅡ/3 vaccine may inhibit apoptosis of splenocytes in mice challenged with Echinococcus multilocularis, increase the number of $CD4^+$ T lymphocyte subsets, and enhance host's protection against the challenge with protoscoleces of Echinococcus multilocularis.

【Key words】 Echinococcus multilocularis; rBCG-EmⅡ/3 vaccine; Splenocytes; Apoptosis

细胞凋亡(Apoptosis),又称程序性细胞死亡(Programmed cell death, PCD),是一类主动的、生理性的,涉及一系列基因的激活、表达以及调控作用的,不同于细胞坏死的死亡过程,广泛存在于自然界生物体的发育过程中。在正常情况下,机体通过凋亡清除衰老或异常的细胞,并控制细胞的数量,调节组织器官的大小、形状,以维持正常的生理平衡,同时也是宿主防御的重要手段之一。细胞凋亡与寄生虫感染的关系是当今令人感兴趣的研究领域,寄生虫感染过程中,虫体或宿主细胞(主要是淋巴细胞)有凋亡现象。被寄生的宿主体内发生一系

作者介绍:杨 梅(1982-),女,硕士研究生,
主要研究方向:分子生物学和分子免疫学的研究。

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

列反应启动凋亡级联反应来抵御寄生虫，同时可能限制过强的 Th1 型炎症反应进行自身保护性调节，许多寄生虫则利用调节宿主细胞凋亡来避免损伤。现已证明，某些寄生虫感染诱导宿主细胞凋亡在疾病的发生机制中起着重要的作用，如引起 CD_4^+ T 细胞的缺失，诱导宿主的免疫功能低下等[1,2]。凋亡在寄生虫和宿主相互作用中具有重要意义，一方面，凋亡可阻止寄生虫感染而造成的邻近细胞、组织甚至宿主个体的死亡，对宿主具有保护作用；另一方面，寄生虫也会因抑制宿主发生凋亡达到维持感染和虫荷的目的。本文用多房棘球绦虫重组 BCG-Em Ⅱ/3 疫苗免疫 BALB/c 小鼠，8 周后用原头蚴攻击感染观察对脾细胞凋亡的影响，从而为阐明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 疫苗来源 重组 BCG-Em Ⅱ/3 疫苗[3]由本室构建和保存；BCG 疫苗由重庆市疾病预防和控制中心赠送。

1.1.2 实验动物 纯系 BALB/c 小鼠，雌性，购自重庆医科大学实验动物中心，每只体重 20～25g 左右，12～14 周龄，共 65 只。

1.1.3 主要试剂 ConA 购自 Sigma 公司；RPMI-1640 培养基、10%BSA、青霉素和链霉素购自上海生工公司；Annexin V-FITC 试剂盒(LHK601-100)购自北京晶美公司。

1.2 实验分组及动物免疫 65 只雌性 BALB/c 小鼠随机分为 5 组，每组 13 只。Ⅰ组：rBCG-Em Ⅱ/3 皮下注射组；Ⅱ组：rBCG-Em Ⅱ/3 鼻腔粘膜接种组；Ⅲ组：空载体(含 pBCG 质粒的 BCG)皮下注射组；Ⅳ组：BCG 皮下注射组；Ⅴ组：100μl PBS 皮下注射组。Ⅰ、Ⅲ和Ⅳ组：5×10^6CFU 疫苗悬浮于 100μl PBS 于小鼠后背部皮下单次注射；Ⅱ组：5×10^5CFU 疫苗悬浮于 10μl PBS 于小鼠鼻腔粘膜单次接种。至室验结束时，每组各有 5 只小鼠死亡。

1.3 攻击感染 疫苗免疫小鼠 8 周后，用 50 个多房棘球绦虫原头蚴腹腔注射进行攻击感染。

1.4 脾细胞制备 原头蚴攻击感染后 18 周剖杀各组小鼠 8 只，75%乙醇消毒 3min，无菌取脾，匀浆，用 1ml 0.85%生理盐水冲洗，200 目尼龙网过滤，滤液置 10ml 离心管；加 4.5ml 双蒸水使渗透压降至 0.15%溶解红细胞，10s，再加 1.4ml 3.6%生理盐水恢复等渗；用 0.85%生理盐水洗 2 次，2500r/min 离心 5min，加入 10ml0.85%生理盐水混匀，计数细胞，用含 10%BSA 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。

1.5 脾细胞培养 将分离的小鼠脾细胞加入 24 孔细胞培养板，每个标本设 2 孔，分别加入原液、10μg/ml ConA 各 1ml，37℃、5%CO_2 培养 16～18h。

1.6 Annexin V-FITC 染色法检测脾细胞凋亡 收集培养 16～18h 的 5×10^6/ml 脾细胞于 1.5mlEp 管，用 4℃预冷的 PBS 洗细胞 2 次，每次振荡悬浮，2500r/min 离心 5min；用 250μl 结合缓冲液重新悬浮细胞，调节其浓度至 1×10^6/ml；取 100μl 的细胞悬浮于 5ml 流式管中，加入 Annexin V-FITC 5μl 和 20μg/ml 碘化丙锭溶液 10μl 混匀，室温避光孵育 15min；加 400μl PBS，流式细胞仪记录在波长 495nm 紫外光激发下产生的 525nm 绿色荧光，用 CellQuest 软件分析细胞凋亡。

1.7 统计分析 各组小鼠脾细胞凋亡发生率百分比采用 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

用 Annexin V-FITC 试剂盒检测的小鼠脾细胞凋亡结果见表 1。Ⅰ～Ⅳ组中，小鼠脾细胞原液组或 ConA 刺激培养组细胞凋亡发生率均显著低于 PBS 对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，每个 ConA 刺激组脾细胞凋亡发生率显著高于相应的原液组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；Ⅱ组鼻腔粘膜接种组脾细胞凋亡率显著低于Ⅰ组皮下注射组($P<0.01$)(见表 1)。

表 1 重组BCG-Em Ⅱ/3 疫苗免疫，原头节攻击后小鼠脾细胞凋亡发生率的检测($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	脾细胞凋亡发生率(%)	
		原液	ConA 刺激
Ⅰ	8	8.31 ± 1.18**	12.35 ± 1.38**
Ⅱ	8	2.91 ± 0.76*	4.05 ± 1.23**
Ⅲ	8	16.06 ± 0.53*	19.34 ± 0.49**
Ⅳ	8	15.80 ± 0.64*	18.83 ± 1.51**
Ⅴ	8	16.92 ± 1.27	20.82 ± 0.61

与对照组Ⅴ组相比，*$P<0.05$，**$P<0.01$

3 讨 论

磷脂酰丝氨酸(Phosphatidylserine，PS)是细胞膜的重要组成成分，正常时位于胞质膜内侧，细胞凋亡早期细胞膜上的这种磷脂分布的不对称性被破坏而使 PS 暴露在细胞膜外[4]，PS 是吞噬细胞识别凋亡细胞最具特征的标志。本实验选用的试剂盒中 Annexin-V 来源于人的膜联蛋白家族，是一种分子量为 35~36ku 的 Ca^{2+}依赖性磷脂结合蛋白，最初发

维普资讯 http://www.cqvip.com

现是一种具有很强的抗凝血特性的血管蛋白，Annexin-V 能与细胞外膜上的 PS 高亲和力特异性结合，被广泛用于细胞凋亡和活化血小板的检测[5-7]，因此，该蛋白可以充当一敏感的探针检测暴露在细胞外测的 PS。将 Annexin-V 进行荧光素(FITC、PE)或生物素标记，以标记了的 Annexin-V 作为荧光探针，利用流式细胞仪或荧光显微镜可检测细胞凋亡的发生。标记 FITC 的凋亡细胞在波长为 495nm 紫外光激发下产生 525nm 的绿色荧光，经计算机处理形成 DNA 二维图。碘化丙啶(Propidine iodide，PI)是一种核酸染料，它不能透过完整的细胞膜，但 PI 能够透过凋亡中晚期的细胞和坏死细胞的细胞膜而使细胞核红染，标记 PI 的凋亡细胞和坏死细胞在波长为 340nm 的紫外光激发下产生 620nm 的红色荧光，经计算机处理形成 DNA 二维图。因此，将 Annexin-V 与 PI 染色法联合使用，不仅可以区分凋亡细胞和坏死细胞，还可以将凋亡早晚期的细胞区分开来，是研究细胞凋亡的一种较理想的方法。

寄生虫感染后，宿主细胞凋亡是调节寄生虫诱导的宿主免疫反应的重要因素。其机制可能通过以下 3 种：(1)粒酶 B 介导的通路；(2)Fas(CD95)配体/受体结合触发的死亡通路；(3) 线粒体释放细胞色素 C 人细胞质所介导的通路。目前研究最多的是 Fas/FasL 通路。王文实等[1,2]发现在日本血吸虫感染的慢性阶段，宿主免疫功能的降低是由于 $CD4^+$/$CD8^+$比值下降所致，而 $CD4^+$/$CD8^+$比值下降的主要原因就是 $CD4^+$ T 细胞凋亡所致，这可能与相关蛋白 Fas、FasL 的表达有关。Helmby[8]等发现，在疟疾感染的急性阶段，脾脏的 T 细胞、B 细胞和巨噬细胞数明显减少，而凋亡的细胞数明显增高，并且脾脏的 Fas 和 FasL 也明显增高，认为脾脏的 T 细胞、B 细胞和巨噬细胞数减少是由 Fas 和 FasL 介导的细胞凋亡所致。李富荣等[9]证实感染泡球蚴的小鼠体内 $CD4^+$T 细胞发生凋亡，$CD4^+$/$CD8^+$比例倒置，使宿主处于免疫抑制状态。本文发现当小鼠脾细胞用 ConA 刺激培养时，每个 ConA 刺激组脾细胞凋亡率显著高于相应的原液组，提示 $CD4^+$ T 细胞在体外被抗原刺激下，表现为凋亡数量增加，其结果是 Th1 类型细胞凋亡[10]。

本研究发现鼻腔粘膜接种组脾细胞凋亡显著低于皮下注射组，可能原因为：一是疫苗不同接种途径的免疫效果不同，主要与机体内转染(DNA 摄入和表达）的效力和转染细胞将抗原递呈给免疫系统的效力有关；二是疫苗皮下免疫剂量低，导致宿主体内疫苗数量少从而产生的效果不显著。同时本试验发现重组 BCG 疫苗皮下和鼻腔粘膜两种接种方式引起的细胞凋亡发生率均显著低于 PBS 对照组，提示多房棘球绦虫重组 BCG 疫苗可抑制脾细胞发生凋亡，我们推测重组 BCG-EmⅡ/3 疫苗可诱导宿主产生高水平的 IL-2、IFN-γ 等细胞因子介导细胞免疫应答以及抗 EmⅡ/3 的抗体反应，抑制鼠 $CD4^+$T 细胞发生凋亡，使 $CD4^+$T 细胞数量增加，从而加强宿主抗泡球蚴感染的保护性免疫反应。

参 考 文 献

[1] 王文实，李雍龙. 日本血吸虫感染过程中宿主细胞 CD_4^+、CD_8^+T 细胞凋亡相关基因转录水平的研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志，2001；13(1)：14-17.

[2] 王文实，李雍龙. 感染日本血吸虫小鼠 CD_4^+、$CD8^+$T 细胞中 Fas 及 FasL 表达的研究[J]. 中国寄生虫病防治杂志，2001；14(1)：33-35.

[3] 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[J]. 中国地方病学杂志，2006；25(5)：490-493.

[4] Vermes I，Haanen C，Steffens-Nakken H，et al. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V[J]. J Immunol，1995；184(1)：39-51.

[5] Tzima E，Walker JH.Platelet annexin V：the ins and outs [J]. Platelets，2000；11(5)：245-251.

[6] Vidal C，Spaulding C，Picard F，et al. Flow cytometry detection of platelet procoagulation activity and microparticles in patients with unstable angina treated by percutaneous coronary angioplasty and stent implantation[J]. Thromb Haemost，2001；86(3)：784-790.

[7] Leo L，Di Paola J，Judd BA，et al. Role of the adapter protein SLP-76 in GPVI-dependent platelet procoagulant responses to collagen[J]. Blood，2002；100(8)：2839-2844.

[8] Helmby H，Jonsson G，Troye-Blomberg M.Cellular changes and apoptosis in the spleens and peripheral blood of mice infected with bloodstage Plasmodium chabaudi chabaudi AS[J]. Infect Immun，2000；68(3)：1485-1490.

[9] 李富荣，石佑恩，史大中，等. 泡球蚴感染过程中宿主 CD_4^+ 细胞凋亡和凋亡相关基因转录水平的研究[J]. 中国人兽共患病杂志，2003；19(4)：59-62，65.

[10] Das G，Vohra H，Saha B，et al. Apoptosis of Th1 like cells in experimental tuberculosis[J]. Clin Exp Immunol，1999；115(4)：324-328.