维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2007)01-0001-03

细粒棘球绦虫重组 BCG-Eg95 疫苗免疫小鼠后 IgG 及其亚类和 IgE 的动态观察

李文桂,朱佑明,王 鸿

(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:动态观察细粒棘球绦虫重组 BCG-Eg95 疫苗免疫小鼠后 IgG 及其亚类和 IgE 的变化。方法:将疫苗分别采用鼻腔内接种和口服灌胃免疫 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,眼球取血,常规 ELISA 测定血清中 IgG 及其亚类和 IgE 水平,同时设有 PBS 对照。结果:鼻腔内接种组的血清 IgG、IgG2a 和 IgG2b 水平均在免疫后 2~18 周升高,分别在免疫后 10、4 和 6 周达最高水平;血清 IgG1、IgG3 和 IgE 水平均在免疫后 2~18 周降低,分别在免疫后 8、12 和 10~12 周达最低水平。口服免疫组的血清 IgG、IgG2a 和 IgG2b 水平均在免疫后 2~18 周增加,分别在免疫后 14、8 和 8 周达峰值;血清 IgG1、IgG3 和 IgE 水平均在免疫后 2~18 周下降,分别在免疫后 8、6 和 16~18 周达最低水平。结论:细粒棘球绦虫重组 BCG-Eg95 疫苗在免疫早期即可诱导小鼠产生一个 T_H1 型保护性免疫反应。

【关键词】细粒棘球绦虫;重组 BCG-Eg95 疫苗;IgG 及其亚类;IgE

【中国图书分类法分类号】R383.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-09-18

Dynamic observation on IgG, its subclass and IgE in sera of mice immunized by recombinant BCG-Eg95 vaccine of Echinococcus granulosus

LI Wengui, et al

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

【Abstract】*Objective*: To dynamically observe changes of IgG, its subclass and IgE in sera of mice immunized by recombinant BCG-Eg95 vaccine of Echinococcus granulosus (Eg). *Methods*: BALB/C mice were intranasally or orally vaccinated and killed on 0、2、4、6、8、10、12、14、16 and 18w of immunization, with 4 in each killing. Sera were gathered from the eyeball to measure IgG, its subclass and IgE by routine ELISA, with PBS as control. *Results*: In the intranasal group, levels of IgG、IgG2a and IgG2b increased obviously on 2~18w, and reached the highest level on 10、4 and 6w respectively; while levels of IgG1、IgG3 and IgE decreased remarkably on 2~18w, and came to the lowest level on 8、12 and 10~12w respectively. In the oral group, levels of IgG、IgG2a and IgG2b rose remakably on 2~18w, and came to the peak value on 14、8 and 8w respectively; while levels of IgG1、IgG3 and IgE decreased on 2~18w, and reached the lowest level on 8、6 and 16~18w respectively. *Conclusion*: TH1 response could be induced in mice immunized by recombinant BCG-Eg95 vaccine of Echinococcus granulosus in early immunization.

【Key Words】Echinococcus granulosus; Recombinant BCG-Eg95 vaccine; IgG and its subclass; IgE

囊型包虫病(cystic echinococcosis;CE)是由细粒棘球绦虫(Echinococcus granulosus;Eg)的续绦期幼虫寄生在人体肝、肺等脏器引起的一种严重危害人类健康的人畜共患寄生虫病。Barriga 等(1980)发现 Eg 感染犬的血清 IgG 升高,Torcal 等(1996)发现肝包虫病患者血清 IgG 和 IgE 显著增加,郑宏等[1]证实绵羊感染 Eg 原头蚴后 IgG 和 IgG1 明显升高,曹得萍等[2]用异博定和阿苯哒唑联合治疗感染细粒棘球蚴的昆明种小鼠后发现血清 IgE 显著降低,Rigano 等(1995)用阿苯哒唑治疗 CE 患者发现完全治愈的患者血清 IgE 明显降低,而治疗无效的患者 IgE 持续升高。这些资料表明 IgG 及其亚类和

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)资助项目。

维普资讯 http://www.cqvip.com

IgE 在宿主对细粒棘球蚴的免疫应答中可能起重要作用。

当前分子生物学技术的发展为研制理想的 Eg 疫苗提供了新方法，将 Eg 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。Lightowlers 等[4]发现用 Eg95 融合蛋白免疫羊可抵抗 Eg 六钩蚴的攻击，并可获得 96%~100%的保护力，其中 86%的羊得到完全保护，提示 Eg95 分子是一种有较好保护性免疫力的抗原，Cirillo 等[5]认为卡介苗 (Bacille calmette-Guerin；BCG)是一种理想的疫苗载体，Matsuo 等[6]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-Eg95 疫苗的基础上，将该疫苗免疫小鼠后动态观察其血清 IgG 及其亚类和 IgE 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 实验动物

135 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 细粒棘球蚴

由本所用沙鼠传代模型保存。

1.3 细粒棘球绦虫重组 BCG-Eg95 疫苗

由本所保存。

1.4 主要试剂

HRP 标记的羊抗小鼠 IgE、IgG、IgG1、IgG3、IgG2a 和 IgG2b 购自 Southern Biotech 公司，细粒棘球蚴粗抗原由本室制备。

1.5 实验分组、疫苗注射部位、途径、剂量及次数

135 只雌性 BALB/c 小鼠随机分为 3 组，每组 45 只。第 1 组为 5×10^{5}CFU 疫苗悬浮于 10μl PBS 于小鼠鼻腔粘膜单次接种；第 2 组为 5×10^{6}CFU 疫苗悬浮于 1ml PBS 对小鼠口服灌胃，接种前 30min 用 5%碳酸氢钠 60μl 对小鼠进行灌胃，以中和胃酸；第 3 组为 10μl PBS 鼻腔粘膜对照。

1.6 血清收集

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，眼球采血，室温静置 12h，2000r/min 离心 10min，分离血清，-20℃冰箱冻存待查。

1.7 常规 ELISA 法检测 IgG 及其亚类和 IgE 抗体

用 200μl 细粒棘球蚴粗抗原(5μg/ml 于 PBS)包被酶标板，4℃过夜，弃去抗原溶液；用 PBS-Tween-20 洗 3 次，加入 1:20 稀释的小鼠血清 100μl，37℃ 30min；用 PBS-Tween 20 洗 3 次，加入 1:2000 稀释的 HRP 标记羊抗小鼠 IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b、Ig3 或 IgE 100μl，37℃ 30min；PBS-Tween20 洗 3 次，加入 50μl 过氧化物酶底物，37℃ 30min；加入 2mol/L H_2SO_4 50μl 终止反应，492nm 处测光密度值(optical density；OD)。

1.8 统计学处理

各免疫组小鼠不同时间点血清抗体水平采用 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

2.1 IgG、IgG2a 和 IgG2b 检测

鼻腔内(intranasal；IN)接种组小鼠的血清 IgG、IgG2a 和 IgG2b 水平均在免疫后 2~18 周升高，分别在免疫后 10、4 和 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 $P<0.01$，图 1)；口服(per os；PO)免疫组小鼠的血清 IgG、IgG2a 和 IgG2b 水平均在免疫后 2~18 周增加，分别在免疫后 14、8 和 8 周达最高水平，与 0 周相比有显著或极显著差别($P<0.05$ 或 $P<0.01$，图 2)。

2.2 IgG1、IgG3 和 IgE 检测

鼻腔内接种组小鼠的血清 IgG1、IgG3 和 IgE 水

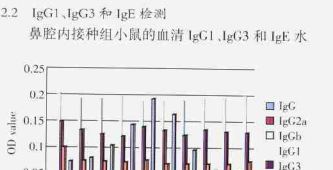


图 1 重组 BCG-Eg95 疫苗鼻腔内接种免疫小鼠后血清 IgE 和 IgG 及其亚类动态观察

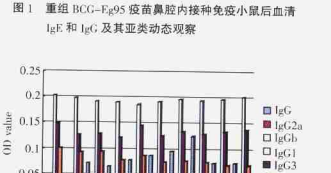


图 2 重组 BCG-Eg95 疫苗口服免疫小鼠后血清 IgE 和 IgG 及其亚类动态观察

维普资讯 http://www.cqvip.com

平均在免疫后 2~18 周显著降低，分别在免疫后 8、12 和 10~12 周达最低水平，与 0 周相比有显著或极显著差别($P<0.05$ 或 $P<0.01$，图 1)。口服免疫组小鼠的血清 IgG1、IgG3 和 IgE 水平均在免疫后 2~18 周下降，分别在免疫后 8、6 和 16~18 周达最低水平，与 0 周相比有显著或极显著差别（$P<0.05$ 或 $P<0.01$，图 2)。

3 讨 论

细粒棘球绦虫重组 BCG-Eg95 疫苗经各种途径进入宿主体内后，表达分泌的 Eg95 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 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，从而活化 CD_4^+T 细胞。CD_4^+T 细胞亚群中 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，同时促进 IgG2a 的合成；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，同时促进 IgG1、IgE 和 IgA 的合成；B 细胞活化后增殖分化形成浆细胞，合成并分泌免疫球蛋白，参与体内的免疫应答[6]。

Haralabidi 等(1995)用 Eg 原头节感染 BALB/c 鼠后发现血清 IgG、IgG1 和 IgG3 水平在感染后 103 天降低，在感染后 129 天明显增加并维持较高水平至感染后 209 天，在感染后 190 天达最高水平；IgG2a 和 IgG2b 在感染后 129 天轻微升高。Riley 等(1986) 发现 BALB/c 鼠初次感染 Eg 原头蚴后 3~8 周 IgE 显著增加，再次感染后 IgE 迅速升高。林仁勇等[7]将 100μg 的 pCD-Eg95 皮下注射 BALB/c 鼠 5 次，发现鼠血清 IgG 在免疫后 4~10 周升高，在免疫后 10 周达较高水平；鼠血清 IgG2a 在免疫后 2~10 周发现增加，在免疫后 6 周达较高水平。丁剑冰等[8]将 50μg Eg95 重组蛋白加弗氏佐剂皮下注射免疫 BALB/c 鼠 4 次后发现第 1 次免疫后 2 周抗 Eg95 的 IgG 升高，免疫后 10 周达最高水平，滴度可达 1∶25600。本文发现鼻腔内接种组小鼠的血清 IgG、IgG2a 和 IgG2b 水平分别在免疫后 10、4 和 6 周达最高水平，大约早于 Eg 原头节感染 17、14 和 12 周，血清出现高水平 IgG 时间与 pCD-Eg95 质粒免疫和 Eg95 重组蛋白免疫大致相当，血清出现高水平 IgG2a 大约早于 pCD-Eg95 质粒免疫 2 周；口服免疫组小鼠的血清 IgG、IgG2a 和 IgG2b 水平分别在免疫后 14、8 和 8 周达最高水平，大约早于 Eg 原头节感染 13、10 和 10 周；血清出现高水平 IgG 晚于 pCD-Eg95 质粒免疫和 Eg95 重组蛋白免疫 4 周，血清出现高水平 IgG2a 大约晚于 pCD-Eg95 质粒免疫 2 周。鼻腔内接种组和口服免疫组小鼠的血清 IgG1、IgG3 和 IgE 水平均在免疫后降低，与 Eg 原头节感染明显相反，提示重组 BCG-Eg95 疫苗在免疫早期即可诱导小鼠产生 1 个 T_H1 型免疫反应。

将重组 BCG-Eg95 疫苗进行鼻腔内接种或口服灌胃等黏膜免疫可诱导宿主产生有效的免疫应答。疫苗鼻腔内接种后侵入鼻黏膜相关淋巴组织 (nasal associated lymphoid tissue;NALT)，疫苗口服灌胃后穿过肠相关淋巴组织 (gut associated lymphoid tissue;GALT)中的微皱折(microfold;M)细胞，侵入其下的集合淋巴结。疫苗在 NALT 和 GALT 淋巴组织中的巨噬细胞中繁殖和增殖，所表达分泌的外源抗原诱导机体产生免疫应答，在局部黏膜处形成特异的 SIgA。由于机体存在共同黏膜免疫系统 (common mucosal immunity system;CMIS)，可使抗原特异性 B 和 T 细胞从 NALT 和 GALT 处迁移至区域淋巴结，进入血循环，到达作用位点，诱导全身免疫应答。疫苗在宿主淋巴组织稳定性好，生存期长，所携带的质粒不易丢失，故能有效刺激机体产生长期免疫应答[9]。疫苗口服灌胃免疫易受胃酸和肠道消化酶的干扰，需要大剂量接种才能诱导有效的免疫应答；而鼻腔内所含的蛋白水解酶较少，小剂量接种即可诱导较强的免疫应答，因此鼻腔内接种的效果优于口服灌胃。本文发现鼻腔内接种组和口服免疫组小鼠的血清 IgG、IgG2a 和 IgG2b 水平均在免疫后 2~18 周升高，但鼻腔内接种组的血清 IgG、IgG2a 和 IgG2b 达到峰值水平均早于口服免疫组，提示重组 BCG-Eg95 疫苗鼻腔内接种所诱导的体液免疫应答优于口服免疫。

参 考 文 献

[1] 郑 宏，徐志新，杨戈雄，等.感染细粒棘球蚴绵羊诱发过敏性休克期间 IgG、IgG1 和 IgE 水平的探讨[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志，2003；21(1)：42-45.

[2] 曹得萍.继发性棘球蚴病小鼠体内细胞因子改变的研究[J].热带医学杂志，2004；4(4)：385-389.

(下转第 26 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

关。因此,我们认为 cFLIP、FADD 可以作为宫颈癌恶性程度及病情进展的预测指标,特别是二者联合检测,可能更有助于临床认识宫颈癌的生物学行为,同时为研究者们提供了新的思路:cFLIP 和/或 FADD 是否可以作为治疗宫颈癌又一个新的靶点,联合 cFLIP、FADD 的基因治疗策略是否更加有效?

PCNA 是一种含 261 个氨基酸,分子量为 35kD 的糖蛋白,其合成与 DNA 复制和细胞增殖直接相关,被认为是反映细胞增殖的良好标记物。近年来很多研究表明肿瘤细胞 PCNA 的表达对于许多恶性肿瘤的生物学行为和患者预后的判断具有重要意义[10,11]。本实验发现,cFLIP、FADD 蛋白表达与 PCNA 标记指数之间有密切的相关性。据此笔者推测,在宫颈癌中,cFLIP 表达升高,可能抑制了 caspase 级联反应,从而抑制了宫颈癌细胞的调亡并促进了肿瘤细胞的增殖;而 FADD 表达的减少,可能导致胞内不能形成正确的 DISC,caspase-8 不能被有效激活,从而使 Fas、TRAIL 等介导的调亡信号转导途径受阻,故出现癌细胞的过度增殖。cFLIP 大量表达的宫颈癌病例中,往往见不到 FADD 的表达,提示 cFLIP 可能存在不依赖 FADD 的作用途径。FADD 的表达规律为何与 cFLIP 相反,它们是否受同一个分子事件/环节的调控,目前尚不清楚,这需要我们进一步的实验研究。

参 考 文 献

[1] 刘志能,唐良苔.cFLIP 与人类疾病[J].重庆医学,2006;35(1):78-81.

[2] Irmler M,Thome M,Hahne M,et al.Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP[J].Nature,1997;388(6638):190-195.

[3] 刘志能,唐良苔.cFLIP 与卵巢癌[J].重庆医学,2005;34(10):1554-1556.

[4] Scaffid C,Schmitz I,Krammer PH,et al.The Role of c-FLIP in Modulation of CD95-induced Apoptosis[J].J Biol Chem,1999;274(3):1541-1548.

[5] Kirchhoff S,Wolfgang WM,Krueger A,et al.TCR-Mediated Up-Regulation of c-FLIPshort Correlates with Resistance Toward CD-95-Mediated Apoptosis by Blocking Death-Inducing Signaling Complex Activity[J].J Immunol,2000;165(11):6293-6300.

[6] Benesch M,Platzbecker U,Ward J,et al.Expression of FLIPlong and FLIPshort in bone marrow mononuclear and CD34+cells in patients with myelodysplastic syndrome:correlation with apoptosis[J].Leukemia,2003;17(12):2460-2466.

[7] Wajant H.Targeting the FLICE Inhibitory Protein(FLIP)in cancer therapy[J].Mol Interv,2003;3(3):124-127.

[8] Dutton A,Young LS,Murray PG.The role of cellular FLICE inhibitory protein (c-FLIP)in the pathogenesis and treatment of cancer[J].Expert Opin Ther Targets,2006;10(1):27-35.

[9] 陈红霞,刘元姣,黎 辉,等.cFLIP 基因在子宫内膜腺癌组织中的表达[J].癌症,2004;23(3):254-258.

[10] Hall PA,Levison DA,Woods Al,et al.Proliferating cell nuclear antigen immunolocalization in paraffin sections:an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasmas[J].J Pathol,1990;162:285-294.

[11] Cheon J,Kim HK,Moon DG,et al.Adenovirus-mediated suicide-gene therapy using the herpes simplex virus thymidine kinase gene in cell and animal models of human prostate cancer:changes in tumour cell proliferative activity[J].Bju Int,2000;85(6):759-766.

(上接第 3 页)

[3] Lightowlers MW,Jensen O,Fernandez E,et al.Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the Eg95 hydatid vaccine in sheep[J].Int J Parasitol,1999;29(4):531-534.

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

[5] 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.

[6] 李文桂,石佑恩,韩家俊.日本血吸虫重组 BCG-Sj26GST 疫苗免疫小鼠后 IgG 抗体反应的动态观察[J].重庆医科大学学报,2001;26(1):4-6.

[7] 林仁勇,丁剑冰,卢晓梅,等.细粒棘球绦虫 Eg95 抗原基因疫苗体外瞬时表达及对小鼠诱导的免疫应答[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2004;24(4):204-208.

[8] 丁剑冰,魏晓丽,马秀敏,等.细粒棘球绦虫 Eg95 重组蛋白诱导小鼠免疫应答的研究[J].新疆医科大学学报,2005;28(4):305-307.

[9] Wu HY,Nkolova EB,Beagly KW,et alInduction of antibody-secreting cells and T-helper and memory cells in murine nasal lymphoid tissue[J].J Immunol,1996;88(4):493-500.