维普资讯 http://www.cqvip.com



文章编号:0253－3626(2004)05－0605－03

# 小鼠胃内和皮内接种 BCG 免疫后抗结核细胞免疫的比较

魏 江，卢贤瑜，陈淑惠，刘明方

(重庆医科大学检验系临床免疫学教研室，重庆 400016)

【摘 要】目的：为比较小鼠胃内与皮内接种 BCG 后，机体产生抗结核杆菌的细胞免疫。方法：分别于小鼠胃内、皮内免疫接种 BCG 的第 60、90 天，检测小鼠脾淋巴细胞受到 PPD 刺激后转化率、小鼠脾淋巴细胞受到 PPD 刺激后 IL－2 表达量。结果：淋巴细胞的转化率分别为 31.30%，37.90%(与皮内接种无显著性差异，与未免疫组有显著性差异)；脾淋巴细胞 IL－2 表达量分别为 37.47±5.60(U/ml)，39.41±7.73(U/ml)(与皮内接种无显著性差异，与未免疫组有显著性差异)。结论：胃内接种 BCG 可以产生与皮内接种相近的抗结核细胞免疫。

【关键词】胃内免疫；皮内免疫；BCG；细胞免疫

【中国图书分类法分类号】R52；R392.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－11－28

# Comparison on cellular immunity against Mycobacterium tuberculosis after intragastric and subcutaneous immunization of BCG in mice

*WEI Jiang, et al*

(*Department of Clinical Immunology, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To compare on the cellular immunity against Mycobacterium tuberculosis(MTB) after intragastric and subcutaneous immunization of BCG in mice. *Methods*: The proliferation of T－lymphocyte with the stimulus of the purified protein derivative (PPD) was measured at day 60 and 90 after intragastric and subcutaneous immunization of BCG in mice. The interleukin－2(IL－2) expression of T－lymphocyte in spleen was detected at day 60 and 90 after intragastric and subcutaneous immunization of BCG. *Results*: The ratio of T－lymphocyte proliferation was 31.30% and 37.90% respectively. The production of IL－2 was 37.47±5.60 (U/ml) and 39.41±7.73(U/ml) respectively. There were no statistical significant differences in the cellular immunity between intragastric and subcutaneous routes($P>0.05$). There were statistical significant differences in the cellular immunity between the immunization and no－immunization group($P<0.01$). *Conclusion*: Intragastric and subcutaneous immunization of BCG can induce cellular immunity against Mycobacterium tuberculosis in mice.

【Key words】Intragastric immunization; Subcutaneous immunization; BCG; Cellular immunity

目前结核病的发病率在全球呈上升趋势。中国属全球 22 个结核病高负担国家之一，病人数居世界之二(仅次于印度)。结核病严重威胁着人们的健康，已成为阻碍社会经济发展的问题。传统预防结核病的方法是用 BCG(Bacille Calmette Guerin，卡介苗)皮内接种，使机体产生抗结核杆菌的免疫力。但该种接种方法需专业人员操作，费时耗材以及不适应当今社会人口频繁流动的状况。消化道也是最常见的结核病感染途径之一，所以国外一些学者已开始研究由消化道接种 BCG 来预防结核病[1,2]。为了探讨经消化道接种 BCG 的免疫效果，本文比较了经消化道(胃内)按种和皮内接种 BCG 后，小鼠产生抗结核的细胞免疫情况。

作者介绍：魏 江(1974－ )，男，硕士研究生，主要研究方向：结核免疫及疫苗。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验动物：C57BL/6 小鼠，8～10 周龄，雌雄不论，体重 25±5g，由本校动物实验中心提供；BCG：成都生物制品研究所生产的蓉生卡介苗(批号 20011106－3)。每 1 安瓿用生理盐水(含 3% $NaHCO_3$)0.2ml，溶解为胃内接种物。皮内接种物为每 1 安瓿用 BCG 专用溶解液 1ml 溶解；PPD：成都生物制品研究所生产的 BCG－PPD 浓缩品(批号 2001－1) 1600mg/ml；CTLL－2 细胞株：本校超声研究所提供；小鼠

维普资讯 http://www.cqvip.com



IL-2 标准品:晶美公司产品,批号 067108。

1.2 小鼠的免疫

胃内接种组 20 只,接种前 12h 禁食,每只小鼠用 BCG 灌胃液 0.2ml 灌胃;皮内接种组 20 只,每只小鼠在尾根部皮内注射 BCG 注射液 0.1ml,使其呈皮丘;未免疫对照组 16 只小鼠,随试验组一起喂养。

1.3 淋巴细胞转化试验

1.3.1 脾细胞的制备 于免疫后第 60、90 天,取各组小鼠 10 只,无菌条件下取小鼠的脾脏,用 100 目的不锈钢丝网将脾脏研磨制成单个细胞悬液。用淋巴细胞分离液分离出淋巴细胞,无血清 RPMI1640 液洗涤 2 次,计数,调整细胞浓度,配成 $1\times10^6$/ml 细胞悬液,用台盼蓝拒染法计数活细胞,活细胞率大于 97% 可用。

1.3.2 PPD 最适刺激浓度的选择 于 96 孔培养板内每孔加入免疫后 60 天小鼠脾细胞悬液 100μl($1\times10^6$/ml),并分别加入不同浓度 PPD50μl,使终浓度分别为 40μg/ml、50μg/ml、60μg/ml,(每一剂量重复 3 孔)[3],每孔加含 20% 小牛血清 RPMI1640 液 100μl(并设空白对照 3 孔),置 37℃,5% $CO_2$ 孵箱孵育 72h。在培养结束之前 4h,于每孔加入 MTT10μl(5mg/ml)继续培养。结束时将培养板置于离心机上 1000rpm×10min,弃去上清,每孔加入 100μl DMSO(二甲亚砜)振荡 10min,使结晶物充分溶解。于酶标仪上测 $A_{570nm}$,计算出淋巴细胞转化率。根据转化率,PPD 的最适刺激浓度为 50μg/ml。

1.3.3 淋巴细胞转化试验 于 96 孔培养板上每孔加入免疫后第 60、90 天的小鼠脾淋巴细胞($1\times10^6$/ml)100μl,并加入 PPD(终浓度为 50μg/ml)、含小牛血清 RPMI1640 液 100μl,置 37℃,5%$CO_2$ 孵箱孵育 72h。在培养结束前 4h 每孔加入 MTT 10μl,结束时将培养板置离心机上 1000rpm×10min 离心,弃去上清,每孔加入 100μl DMSO 振荡 10min,使结晶物充分溶解。于酶标仪上测 $A_{570nm}$,计算出淋巴细胞转化率。同一只鼠重复 3 孔。淋巴细胞转化结果以淋转率表示:

淋转率(%)=(实验孔 A 值 - 对照孔 A 值)/对照孔 A 值×100%[4]

1.4 IL-2 活性测定

取免疫后第 60、90 天小鼠脾淋巴细胞($1\times10^6$/ml)100μl/孔,用 PPD(终浓度 50μg/ml)刺激培养(同淋巴细胞转化试验)48h。收集上清液,-20℃冰箱保存备用。取传代培养 2~3 天生长旺盛的 CTLL-2 细胞,用细胞培养液洗涤两次后,配成 $5\times10^5$/ml 悬液。取 100μl/孔加入 96 孔板中,并分别加 100μl 不同稀释度(1:2~1:32)的 IL-2 标准品和待测培养上清液,并设培养液对照孔(每一稀释度 3 孔),每孔加含小牛血清 RPMI1640 液 100μl。置 5%$CO_2$ 孵箱 37℃孵育 48h。培养结束前 4h 每孔加 MTT 10μl。结束时离心去上清,加入 100μl DMSO 使结晶物充分溶解(操作同上),测各孔吸光度值 $A_{570nm}$。按下式计算 IL-2 活性。

IL-2 活性(U/mL)=(样品 IL-2 达到标准品 50% 最大反应的稀释度)/(标准 IL-2 的 50% 最大反应的稀释度)×100[5]

1.5 统计方法

方差分析多个样本均数间的两两比较。

## 2 结 果

2.1 两种途径接种 BCG 后,PPD 刺激小鼠淋巴细胞的转化率情况见表 1。

**表 1 两种途径免疫小鼠淋巴细胞转化率的比较**

| 免疫天数 | 胃内免疫组 | 皮内免疫组 | 未免疫组 |
|---|---|---|---|
| 60 | 31.32%*△ | 34.51%* | 11.44% |
| 90 | 37.94%*△ | 32.05%* | 10.56% |

注:* 免疫组与未免疫组比较,$P<0.01$;△胃内接种与皮内接种比较,$P>0.05$

从表 1 看出,免疫第 60、90 天后胃内接种、皮内接种的小鼠淋巴细胞受到 PPD 刺激的转化率分别为 31.32%、37.94% 和 34.51%、32.05%,与未免疫组(11.44%、10.56%)有显著性差异($P<0.01$)。但胃内接种组与皮内接种组间没有显著性差异($P>0.05$)。

2.2 两种途径接种 BCG 后,小鼠淋巴细胞 IL-2 的表达情况见表 2。

**表 2 两种途径免疫小鼠后淋巴细胞 IL-2 的表达(U/ml)**

| 免疫天数 | 胃内免疫组 | 皮内免疫组 | 未免疫组 |
|---|---|---|---|
| 60 | 37.47±5.60*△ | 41.11±5.98* | 18.20±6.46 |
| 90 | 39.41±7.73*△ | 33.78±5.75* | 17.05±6.13 |

注:* 免疫组与未免疫组比较,$P<0.01$;△胃内免疫与皮内免疫比较,$P>0.05$

从表 2 可见,胃内免疫和皮内免疫第 60、90 天后淋巴细胞受到 PPD 刺激分泌产生的 IL-2 量分别为 37.47±5.60(U/ml)、39.41±7.73(U/ml)和 41.11±5.98(U/ml)、33.78±5.75(U/ml),与未免疫组(18.20±6.46U/ml、17.05±6.13U/ml)有显著性差异($P<0.01$),但胃内接种组与皮内接种组间没有显著性差异($P>0.05$)。

## 3 讨 论

BCG 应用于人类预防结核病已有数十年历史。1921 年 Calmette 最初在对人体进行免疫时,是采用口服液体 BCG,并使接种者获得针对结核分枝杆菌

维普资讯 http://www.cqvip.com



的免疫力。我国 20 世纪 50 年代一直采用口服作为 BCG 主要的接种途径。但由于口服液体 BCG 用量不易掌握,而易附着在咽喉部,常会引起耳炎,腮腺炎,后咽脓肿和弱的结核反应。随着菌液提纯和冻干制品的研制成功,逐渐改为皮内接种和皮上划痕。现在我国主要采取皮内接种。皮内接种通常需要专业人员操作,并需要注射器材和消毒物品。所以,目前国际上有少数研究人员又开始研究通过消化道接种 BCG,试图将 BCG 改为口服丸剂[1],这样既可克服口服 BCG 液体菌苗的缺点,并使结核病的预防更方便和易于推广。

由于结核菌是胞内寄生菌,机体抗结核菌的免疫力主要是细胞免疫。本研究通过对小鼠胃内和皮内接种 BCG 后,比较了两种途径免疫小鼠,体内 T 淋巴细胞受 PPD 刺激后的转化情况及 IL-2 表达的情况,从而了解通过消化道(胃内)接种 BCG 后,机体是否可以产生与皮内接种一样的抗结核特异性细胞免疫。

从表 1 看出,免疫第 60、90 天后胃内接种、皮内接种的小鼠淋巴细胞受到 PPD 刺激的转化率与未免疫组有显著性差异($P<0.01$)。但胃内接种组与皮内接种组间没有显著性差异($P>0.05$)。胃内免疫和皮内免疫第 60、90 天后淋巴细胞受到 PPD 刺激分泌产生的 IL-2 量与未免疫组比较有明显增高,两者间有显著性差异($P<0.01$),但胃内接种组与皮内接种组间没有显著性差异($P>0.05$)。由此看出胃内接种 BCG 后第 2、3 个月,小鼠淋巴细胞受 PPD 刺激后其转化率和 IL-2 的表达均较未免疫组高。说明胃内接种 BCG 与皮内接种 BCG 一样均能使机体获得特异的抗结核的细胞免疫,此结果与国外学者报道一致。

由于结核分枝杆菌是典型的胞内寄生菌,消除这种病菌,主要靠细胞免疫(即 $TH_1$ 免疫应答)。许多学者认为,$TH_1$ 类型免疫应答在防治结核杆菌的感染中起着重要的作用[6,7]。$Th_1$ 细胞以分泌 IFN-γ,IL-2 为主要特征,主要介导细胞免疫应答,促进细胞毒性 T 细胞的杀伤作用,激活巨噬细胞杀伤细胞内的病原体,因此能有效地控制细胞内结核杆菌的生存。

## 参 考 文 献

[1] M. Lagrandie, P. Chavarot, A. M. Balazuc, G. Marchal Immunogenicity and protective capacity of Mycobacterium bovis BCG after oral or intragastric administration in mice[J]. Vaccine, 2000; 18: 1186-1195.

[2] M. W. Ibsen, V. Bakken, R. Jonsson. Immune responses in mice after gastric and subcutaneous immunization with BCG [J]. Scand J Immunol, 1997; 46: 274-280.

[3] 陶 敏. PPD 为丝裂源作淋巴细胞转化试验对结核性胸腹炎的诊断价值[J]. 江苏医药, 1993; 234-236.

[4] Mossman T. Rapid colorimetric assay for celltuar growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay [J]. J Immunol Methods, 1983; 65: 55-63.

[5] 方福德, 周 吕, 于俊阁, 等. 现代医学实验技巧全书[M]. 北京, 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1997; (1): 301-303.

[6] M. Lagranderie, A. M. Balazuc, B. Gicquel, et al. Oral immunization with recombinant Mycobaterium bovis BCG simian immunodeficiency virus nef induces local and systemic Cytotoxic T-lymphocyte response in mice[J]. J Virology, 1997; p: 2303-2309.

[7] Daniel F. Hoft, Robin M. Brown, Robert B. Beishe Mucosal Bacille Calmette-Guerin vaccination of human inhibits delayed-type hypersensitivity to purified derivative but induces mycobateria-specific interferon-γ responses[J]. Clinic infectious diseases, 2000; 30(supple3): S217-222.