维普资讯 http://www.cqvip.com

2000, 25(3)
225-227
重庆医科大学学报2000年第25卷第3期（Acta Universitatis Scientiae Medicinae Chongqing）

文章编号：0253-3626(2000)03-0225-03

血吸虫重组 BCG-Sj26GST 疫苗对小鼠肝脏虫卵肉芽肿形成过程中 TNF-α mRNA 表达的影响

李文桂[1]，石佑思[2]，蒋 霞[3]，甘 燕[2]

（1. 重庆医科大学临床学院传染病寄生虫病研究所 400016；2. 同济医科大学寄生虫学教研室 430030；
3. 武汉市卫生防疫站消毒科 430022）

摘 要：目的 检测血吸虫重组BCG-Sj26GST疫苗对小鼠肝虫卵肉芽肿细胞内TNF-mRNA表达的影响。**方法** 用10^6CFU疫苗皮下注射和腹腔注射分别免疫BALB/C鼠，免疫后8W用日本血吸虫尾蚴进行攻击感染，感染后6W剖杀小鼠，分离肝脏，运用原位杂交技术检测TNF-α mRNA表达。**结果** 疫苗免疫、尾蚴攻击后小鼠肝虫卵肉芽肿细胞内TNF-α mRNA表达显著加强。**结论** 血吸虫重组BCG-Sj26GST疫苗能促进宿主Th1反应，加强宿主抗血吸虫感染的保护性免疫力。

关键词： 血吸虫疫苗；TNF-α；肝脏；原位杂交

中国图书分类法分类号： R383.24；R392.11 **文献标识码：** A **收稿日期：** 1999-09-29

Effects of recombinant BCG-Sj26GST vaccine of schistome on the expression of TNF - α mRNA during the formation of egg granulomas in the liver of mice

LI Wen-gui, et al

Institute for Infectious and Parasitic Diseases, College of Clinical Medicine

Abstract : Objective To detect the effects of recombinant BCG-Sj26GST vaccine of schistosome on the expression of TNF-α mRNA in cells of egg granulomas in the liver of mice. **Methods** BALB/C mice were immunized subcutaneously and intraperitoneally by 10^6 CFU vaccine respectively,challenged with Sj cercariae on 8w of immunization and killed on 6w of infection to separate the liver to detect the expression of TNF-α mRNA by the technique of in situ hybridization. **Results** The expression of TNF-α mRNA in egg granulomas in the liver of mice increased obviously by the immunization with the vaccine against challenge with Sj cercariae. **Conclusion** Recombinant BCG-Sj26GST vaccine of the schistosome may promote host's Th1 response and enhance its protective immunity against schistosomiasis

Key Words : Vaccine of schistome; TNF-α; Liver; In situ hybridization

血吸虫病是一种严重危害人类健康的寄生虫病，其主要病变是虫卵肉芽肿的形成。肿瘤坏死因子α（Tumour necrosis factor；TNF-α）在日本血吸虫虫卵肉芽肿的形成中起着十分重要的作用。Joseph等[1]将TNF-α多克隆抗体多次注射急性曼氏血吸虫（Schistosoma mansoni；Sm）感染鼠，发现虫卵肉芽肿显著减小；当将重组TNF-α多次注射慢性Sm感染鼠则恢复肝肉芽肿大小，同时增加肝肉芽肿反应，诱导肉芽肿内巨噬细胞产生TNF-α，增加血清内TNF-α水平，Amiri等[2]发现SCID小鼠由于缺乏功能性B或T细胞，感染Sm后不能形成虫卵肉芽肿，当给感染Sm的SCID小鼠注射重组TNF-α时则可诱导虫卵周围形成肉芽肿，提示TNF-α能促进虫卵肉芽肿的形成。Hagan等[3]发现TNF-α能诱导早期虫卵肉芽肿的形成，并能促进雌虫产卵。James等[4]发现TNF-α对Sm童虫具有杀伤作用。

研究血吸虫疫苗是防治该病的有效途径之一，皇甫永穆等[5]通过大肠杆菌-分枝杆菌穿梭载体将编码Sj26GST抗原的DNA片段导入卡介苗(Bacillus Calmette-Guerin；BCG)构建了血吸虫重组BCG-Sj26GST疫苗，作者等[6]用该疫苗皮下注射接种BALB/C鼠，初步实验结果表明该疫苗可诱导宿主产生较好的保护性免疫力。在此基础上，本文研究血吸虫重组BCG-Sj26GST疫苗免疫对小鼠肝脏虫卵

作者介绍：李文桂（1967- ），男，主治医师，博士

维普资讯 http://www.cqvip.com

肉芽肿形成过程中TNF-α mRNA 表达的影响，从而为阐明该疫苗的作用机制提供有意义的资料。

1　材料和方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物：雌性12～14 周龄的BALB/C鼠，每只体重20g 左右，购自卫生部武汉生物制品研究所，随机分为3组，每组10 只。

1.1.2　血吸虫重组BCG-Sj26GST疫苗：由同济医科大学分子生物学教研室提供。

1.1.3　主要试剂和试剂盒：地高辛标记探针检测试剂盒购自武汉博士德公司，TNF-α 基因探针购自北京中山生物技术有限公司，蛋白酶K和 DEPC 购自华美生物公司。

1.2　方法

1.2.1　实验分组、疫苗注射部位、途径、剂量及次数：第1、2 组分别为10^6 克隆形成单位(Colony-forming unit; CFU)疫苗皮下注射和腹腔注射组，第3组为10^6 CFU BCG 皮下注射对照组，10^6 CFU 疫苗或BCG悬浮于100 μ l PBS 于小鼠后背部皮肤或腹腔行单次注射。

1.2.2　攻击感染：疫苗免疫后8W用日本血吸虫大陆株正常尾蚴经腹部皮肤感染各组小鼠，每只感染40±2条尾蚴。

1.2.3　肝脏标本取材：攻击感染后6W 剖杀小鼠，分离肝脏，取肝右叶1cm×0.5cm,用含DEPC的PBS冲洗干净，4%多聚甲醛固定1～2h，15% PBS蔗糖液4 ℃浸泡过夜，置液氮冻存备用。

1.2.4　肝脏冰冻切片检测TNF-α 表达的原位杂交步骤，参照姜泊等[7]的方法进行，略有改进。肝脏冰冻切片10 μ m；切片加入蛋白酶K，37℃ 10min；三蒸水洗3次；切片室气干燥；加入10～20 μ l含地高辛标记的TNF-α 基因探针的杂交液，37℃杂交16～24 h；用37℃的2×SSC洗涤2次，5min/次；再用37℃的0.1×SSC洗涤一次，10min/次；滴加封闭液，室温20min，不洗；滴加小鼠抗地高辛IgG 37℃ 1h；用0.5M TBS 洗3次，2min/次；滴加生物素化羊抗小鼠IgG37℃ 45min；用0.5M TBS洗 3次，2min/次；滴加SABC-AP 37℃ 45min；用0.5M TBS洗4次，5min/次；将BCIP/NBT显色剂加在切片上置于湿盒中，避光显色10～30min；水洗终止反应；梯度酒精脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。

1.2.5　阴性对照

探针阴性对照，除杂交液中不含探针外其余成分相同。

抗体阴性对照，免疫检测时不加生物素化羊抗小鼠IgG、其余步骤相同。

1.2.6　图像分析及统计处理　采用HPIAS-1000高清晰度彩色病理图像测量系统，在200×视野下，每组选取10个典型肉芽肿组织，每个肉芽肿中再随机选取20个肉芽肿细胞。测定细胞内杂交颗粒的平均光密度值，用SAS软件进行t检验。

2　结　果

疫苗皮下注射组，肝脏虫卵肉芽肿细胞内有许多TNF-α mRNA表达颗粒，呈较深的紫蓝色，有较大的片状颗粒（A）；疫苗腹腔注射组肝脏虫卵肉芽肿细胞内也有较多的TNF-α mRNA表达颗粒，呈较深的紫蓝色，但没有较大的片状颗粒（B）；而BCG皮下注射对照组肝脏虫卵 肉芽肿细胞内只有较少的表达颗粒，呈浅蓝色（C）。

图像分析结果见表，疫苗皮下或腹腔注射组肝虫卵肉芽肿细胞内TNF-α mRNA表达明显升高，与BCG对照相比，差别有极显著意义（P 均<0.01），而疫苗皮下注射与腹腔注射组相比，TNF-α mRNA表达无明显差异（P>0.05）。



A　　B　　C

图　镜下各组肝脏虫卵肉芽肿细胞

A　疫苗皮下注射组

B　疫苗腹腔注射组

C　BCG 皮下注射组

表　疫苗免疫，尾蚴攻击后小鼠虫卵肉芽肿细胞内TNF-α mRNA表达

组别	细胞数	平均光密度值	P
皮下注射组	200	0.05888±0.01774	1.38×10^{-4}
腹腔注射组	200	0.05859±0.03213	8.5×10^{-4}
BCG对照组	200	0.04458±0.03965	-

3　讨　论

日本血吸虫尾蚴攻击感染后，在宿主体内经过22～23d(感染后3～4W)发育成熟，第24d成虫开始排卵，虫卵自产生至发育成熟需10～11d(感染后5～6W)，此时肉芽肿开始形成，感染后7～9W肉芽肿

维普资讯 http://www.cqvip.com

形成达高峰，随后肉芽肿发生纤维化[8]。徐玉会等[9]发现感染后5～6W虫卵肉芽肿的细胞成分以嗜酸性粒细胞为主，伴有少量巨噬细胞及浆细胞，感染后7～9w，嗜酸性粒细胞减少，巨噬细胞增多，大多呈典型的类上皮细胞外观，以虫卵为中心向外呈放射状排列，成纤维细胞逐渐增多，并围绕类上皮细胞呈同心圆状排列。

Boros[10]用小鼠肺肉芽肿模型发现在肉芽肿生长的4～6d(感染后8～9W)有TNF-α mRNA产生，Chunsue等[11]进一步研究表明在肉芽肿生长的8～16 d(感染后9～10W) TNF-α mRNA表达达到峰值，贺永文等[12]用SABC技术动态观察感染日本血吸虫的昆明种鼠不同时期肝内TNF-α含量及分布，发现攻击感染8～12W TNF-α含量明显增加，主要分布在虫卵肉芽肿及其周围，上述资料表明在血吸虫感染后6W没有或很少有TNF-α mRNA表达或TNF-α产生。本文显示日本血吸虫感染后6W对照组小鼠肝脏虫卵肉芽肿细胞内TNF-α mRNA表达颗粒较少，我们认为在日本血吸虫感染后6W时，小鼠肝脏虫卵肉芽肿刚开始形成，此时肉芽肿细胞以嗜酸性粒细胞为主，巨噬细胞和淋巴细胞只有少量，而TNF-α是由巨噬细胞和Th1细胞产生的，因此，TNF-α mRNA表达较低，TNF-α产生较少，这与上述结果相一致。

Wynn等[13]用Sm照射减毒活疫苗免疫C57BL/6鼠，再用尾蚴攻击感染后6W发现肺肉芽肿细胞表达TNF-α，IFN-α，IL-1和一氧化氮合成酶mRNA增加，提示疫苗诱导的保护力是Th1细胞因子依赖的细胞介导的免疫反应。本文显示血吸虫重组BCG-Sj26GST疫苗免疫，尾蚴攻击后6W肝肉芽肿细胞表达TNF-α mRNA显著增强，而尾蚴攻击感染对照组表达较少，表明疫苗免疫可使肉芽肿细胞内TNF-α mRNA提前表达。作者[14]发现疫苗免疫，尾蚴攻击后肝虫卵肉芽肿炎性细胞浸润以淋巴细胞和嗜酸性粒细胞为主，可见少量巨噬细胞和浆细胞，我们结合本文推测TNF-α mRNA表达增强可能是由于浸润的Th1淋巴细胞所致，疫苗免疫可提高宿主细胞免疫功能，加强宿主免疫应答，IL-1分泌升高，促进Th1分泌IL-2和IFN-α，IL-1，IL-2和IFN-γ又促进浸润的单核巨噬细胞和Th1细胞分泌TNF-α，TNF-α则促进单核巨噬细胞产生IL-1和TNF-α，各种免疫细胞与细胞因子之间相互促进和相互调节，形成免疫调节网络，加强宿主Th1反应，提高宿主抗血吸虫感染的保护力，这与Sm减毒活疫苗诱导的保护力相符合。

参 考 文 献

[1] Joseph AL,Boros DL. Tumour necrosis factor plays a role in Schistosoma mansoni egg-induced granulomatous inflammation[J] .J Immunol,1993;151(10):5461-5471.

[2] Amiri P,Locksley RM, Parslow TG,et al.Tumour necrosis factor α restores granulomas and induces parasite egg-laying in Schistosome-infected SCID mice[J]. Nature,1992;356:604-607.

[3] Hagan P. Molecular basis of concomitant immunity[J]. Parasite Immunol.1993;15(10):553-558.

[4] James SL,Cook KW, Lazdins JK .Activation of human monocyte-derived macrophages to kill schistosomula of Schistosoma mansoni in vitro[J]. J Immunol,1990;145:2686-2690.

[5] HuangFu YM,Zhang DJ,Chen JZ,et al.Construction of shuttle expression plasmid and stable expression of foreign gene in mycobacteria and E. Coli[J]. J Tongji Med Uni ,1995;15(3):138-142.

[6] 李文柱，石佑恩，汪燕鸣，等. 血吸虫重组BCG-Sj26GST疫苗接种后保护力的观察[J]. 同济医科大学学报，1999;28(1):13-16.

[7] 姜 泊. 分子生物学常用实验方法[M]. 第一版，北京：人民军医出版社，1996;128-152.

[8] 毛守白. 血吸虫生物学与血吸虫病的防治[M]. 第一版，北京：人民卫生出版社，1990;8-220.

[9] 徐玉会，武忠弼. 日本血吸虫卵肉芽肿形成中细胞成分及其相互关系的动态观察[J]. 同济医科大学学报，1990;19(5):300-302.

[10] Boros DL.The role of cytokines in the formation of the schistosome egg granuloma[J] .Immunobiol,1994;191:441-450.

[11] Chensue SW,Terebuh PD,Warmington KS,et al. Role of IL-4 and IFN-γ in schistosoma mansoni egg-induced hypersensitivity granuloma formation orchestration,relative contribution and relationship to macrophage function[J]. J immumol,1992;148(3):900-906.

[12] 贺永文，刘 薇，罗端德. TNF-α与日本血吸虫虫卵肉芽肿及肝纤维化关系的初步研究[J]. 中国寄生虫病防治杂志，1996;9(4):274-277.

[13] Wynn TA, Oswald IP, Eltoum IA ,et al. Elevated expression of Th1 cytokines and nitric oxide synthase in the lungs of vaccinated mice aftert challenge infection with Schistosoma mansoni[J]. J Immunol,1994;153:5200-5208.

[14] 李文柱. 日本血吸虫重组BCG-Sj26GST疫苗保护力及其免疫机制研究[D]. 同济医科大学博士学位论文，1999;10-21.