

微小隐孢子虫 CP15 /60 -DNA 滴鼻免疫小鼠 诱导的粘膜与系统免疫反应

何宏轩* 张西臣 尹继刚 李建华 杨 举

(解放军军需大学 动物科技系, 长春 130062)

摘 要 为了观察微小隐孢子虫表面蛋白基因的重组质粒 pDNA 3-15/60 诱导机体产生的免疫应答情况, 用重组质粒经鼻粘膜接种 BALB/c 小鼠, 采用淋巴细胞转化实验、流式细胞仪、ELISA 和免疫组化染色法检测了其诱导的系统和粘膜免疫反应, 并在免疫后经口接种微小隐孢子虫卵囊。结果为免疫小鼠淋巴细胞增殖反应二免后 SI 均大于 2 ($P < 0.01$); 免疫后, CD⁺T 细胞增加了 $(32.42 \pm 2.19)\%$ ($P > 0.05$), CD⁺T 细胞增加了 $(26.73 \pm 3.33)\%$ ($P < 0.05$); 小肠粘膜 IgA 分泌型浆细胞数增加了 94.3 ± 6.3 ; 血清中 IgG 和小肠液中 IgA 滴度分别提高了 0.68 ± 0.06 和 0.77 ± 0.05 ($P < 0.01$); 实验组小鼠排出卵囊减少了 2.2 倍, 排卵时间缩短了 4.5 d ($P < 0.05$)。研究表明重组质粒诱导机体产生多种免疫反应, 并且产生了保护力。

关键词 隐孢子虫; 粘膜免疫; 系统免疫; CP15/60-DNA; 核酸疫苗

中图分类号 R382.3

Mucosal and Systemic Immune Response Induced in BALB/c Mice by Intranasal Immunization with CP15/60-DNA

He Hongxuan Zhang Xichen Yin Jigang Li Jianhua Yang Ju

(Faculty of Animal Science, the Quartermaster University of PLA, Changchun 130062, China)

Abstract To study the immune response induced by pDNA 3-15/60 plasmid expressing surface protein CP15/60 gene of *Cryptosporidium parvum* sporozoites, the three week old of BALB/c line mice were inoculated intranasally with the recombinant plasmid, and the animals were then infected with *C. parvum* oocysts by mouth. The mucosal and systemic immune response were valued by the lymphocyte transformation test, FACS, indirect ELISA and immunohistochemical staining method during experimental period. The results showed that the stimulation index (SI) of lymphocyte were more than 2 after the second immunization ($P < 0.01$); the number of CD⁺ and CD⁺ T cell increased $(32.42 \pm 2.19)\%$ ($P > 0.05$) and $(26.73 \pm 3.33)\%$ ($P < 0.05$) respectively; the IgA antibody secreting cells in the lamina propria of small intestinal mucosa in the experiment groups increased 94.3 ± 6.3 ; the titers of specific antibody IgG in serum and IgA in small intestinal fluid increased 0.68 ± 0.06 and 0.77 ± 0.05 ($P < 0.01$), individually. In addition, Oocysts number of immunized mice were 2.2 times of control groups ($P < 0.05$) and the shedding time shorted 4.5 days compared with the control. The above results suggested that the CP15/60-DNA can induce several kinds of immune

收稿日期: 2001-12-10

吉林省杰出青年基金资助项目

* 何宏轩, 博士, 研究方向为人兽共患寄生虫病的分子生物学和免疫学。吉林省长春市

responses in BALB/c mice and play important roles against *C. parvum* infection.

Key words *Cryptosporidium parvum*; mucosal immunity; systemic immunity; CP15/60-DNA; nucleic acid vaccine

隐孢子虫病是一种重要的人畜共患肠道寄生性原虫病,仅次于人和动物的肠道轮状病毒病。该病可引起腹泻和隐性感染,加速 MD 肿瘤的发生,与人的爱滋病有着密切的联系^[1]。DNA 疫苗是 90 年代发展起来的一项新型疫苗。目前有针对多种病原体的 DNA 疫苗,并在多种实验动物中取得了有效结果^[2]。因为隐孢子虫病目前尚无有效的防治方法,国内外尚无开展该病核酸疫苗的系统研究^[3],基于本室已经成功克隆微小隐孢子孢子表面蛋白基因 CP15/60^[4],并且构建了真核表达的重组质粒 pDNA 3-15/60^[5],所以本研究旨在观察用重组质粒 pDNA 3-15/60 诱导 BALB/c 小鼠产生的免疫应答,为研究高效的隐孢子虫核酸疫苗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

微小隐孢子虫 (*Cryptosporidium parvum*) 卵囊,来源于自然感染隐孢子虫的犍牛,经黑白花奶牛犍牛继代;BALB/c 小鼠,体重 18~22 g,3 周龄,购自长春生物制品所;HRP 酶标羊抗鼠 IgA 抗体(美国 BRL 公司);pDNA 3-15/60 质粒(含 *C. parvum* 孢子表面蛋白 CP15/60 基因)为本室构建。[5-³H]TdR 购自中国原子能科学研究院同位素研究所;抗 CD₄CD₈MAb 购自北京大学医学部;羊抗鼠 IgG-HRP,购自华美生物工程公司;流式细胞仪(FACS),美国 Becton-Dickinson 公司生产;DG30022A 型酶联免疫检测仪,国营华东电子管厂制造;FJ-2101 双道液体闪烁计数器,西安电子仪器厂制造。

1.2 方法

1.2.1 动物免疫 BALB/c 小鼠 30 只,随机分成 2 组,实验组用 pDNA 3-15/60 质粒和司本甘油溶液(司本 4%,甘油 1%)以 1:5 比例混合,按 100 μg/100 μL 剂量于小鼠鼻腔粘膜滴注,间隔 3 周加强免疫 2 次,共 3 次,对照组以 PBS 用同样方法接种。分别于每次接种前和最后一次接种后 2 周剖杀 3 只,取静脉血、脾脏、小肠和小肠液进行免疫学实验。

1.2.2 淋巴细胞转化实验 以³H-胸腺嘧啶核苷掺入法检测淋巴细胞增殖反应。具体方法是无菌采取小鼠静脉血 0.5~1.5 mL,按每毫升血加入肝素 125 U 抗凝,吸取 0.1 mL 抗凝血注入含 1 mL RPMI 1640 培养液的培养瓶内,加刀豆蛋白 A (ConA),使终浓度为 2.5 μg·mL⁻¹。于 CO₂ 培养箱中在 37℃ 5% CO₂ 条件下培养 48 h 后加 25 μCi/mL ³H-TdR 20 μL,继续培养 24 h,液闪测定。

1.2.3 CD₄⁺/CD₈⁺ T 淋巴细胞计数 取脾细胞悬液 0.1 mL,加 5 mL PBS,1 500 r·min⁻¹ 离心 5 min。将细胞洗 2 次,在 0.5 mL PBS 悬液中分别加入 FITC 标记的 CD₈⁺ 抗体和 PE 标记的 CD₄⁺ 抗体各 20 μL,置 4℃ 30 min,取出后经荧光洗液洗 2 遍后,加入 0.5 mL 荧光保存液,用流式细胞仪检测。

1.2.4 小肠粘膜 IgA 抗体生成细胞的检测^[6,7] 取小肠固定于 10% 甲醛溶液中,用免疫组化染色法对肠粘膜固有层中 IgA 分泌型浆细胞进行定性和定量测定。IgA 分泌型浆细胞定量采取染色后光镜(400×)下观察 20 个视野,计数每 5 个视野中阳性细胞数。

1.2.5 小鼠血清 IgG 和肠液 sIgA 测定 以原核表达的 CP15/60 重组蛋白作为包被抗原,按常规间接 ELISA 方法步骤进行。以小鼠阳性血清和阴性血清作为对照。具体操作为:用重组的 CP15/60 蛋白 $1 \mu\text{g}$ 包被酶标板, 37°C 4 h, 然后 4°C 冰箱过夜, 次日用 200 倍稀释的被检血清或 100 倍稀释的小肠液 37°C 作用 2 h, 接着用 3 200 倍稀释的羊抗鼠 IgG-HRP 或 1 000 倍稀释的羊抗鼠 IgA-HRP 作用 2 h, 最后用 OPD- H_2O_2 避光处理 20 min, 用酶标仪检测。

1.2.6 保护性实验 免疫后 2 周每只小鼠经口接种 10^6 个卵囊, 攻虫后检测卵囊排出情况。即每日采粪便 1 g, 用饱和硫酸锌浮集法收集卵囊, 将卵囊溶于 6 mL 水中, 搅匀, 用血细胞计数器计数。

1.3 统计学处理

将各组测定值计算均数、标准差, 进行显著性检验(t 检验)。

2 结果

2.1 免疫小鼠淋巴细胞转化

各组小鼠分别于接种前和攻虫后采取眼静脉血进行淋巴细胞转化实验。由表 1 可以看出实验组免疫前和首免的 SI 值小于 2, 以后不同时间的 SI 大于 2, 而对照组不同时间 SI 均小于 2 ($P < 0.01$)。

表 1 免疫小鼠淋巴细胞转化反应

分组	免疫次数	ConA ⁺ (cpm)	ConA ⁻ (cpm)	刺激指数 (SI)	分组	免疫次数	ConA ⁺ (cpm)	ConA ⁻ (cpm)	刺激指数 (SI)
实验组	免疫前	365 ± 42	298 ± 35	1.2	对照组	免疫前	306 ± 25	268 ± 39	1.2
	第 1 次	429 ± 45	356 ± 36	1.2		第 1 次	246 ± 23	234 ± 27	1.0
	第 2 次	1 190 ± 15	506 ± 85	2.4		第 2 次	343 ± 23	268 ± 34	1.3
	第 3 次	1 680 ± 123	662 ± 76	2.5		第 3 次	316 ± 28	302 ± 31	1.0
	攻虫	2 698 ± 102	808 ± 102	3.3		攻虫	687 ± 58	396 ± 29	1.7

2.2 CD₄⁺/CD₈⁺ T 淋巴细胞数量

以流式细胞仪计数 2×10^4 个细胞中的 CD₄⁺/CD₈⁺ T 淋巴细胞个数为原始数据, 经方差分析 CD₄⁺ 变量显示实验组增加了 32.42 ± 2.19 , 与对照组相比, 差异无显著意义 ($P > 0.05$); CD₈⁺ 变量显示, 实验组增加了 26.73 ± 3.33 , 与对照组相比, 差异显著 ($P < 0.05$), 说明 pcDNA 3-15/60 能够提高免疫小鼠的 T 淋巴细胞数量, 增强免疫小鼠的细胞免疫水平(表 2)。

表 2 免疫小鼠 CD₄⁺/CD₈⁺ T 淋巴细胞(%) 和小肠粘膜 IgA 分泌型浆细胞数变化

分组	免疫次数	CD ₄ ⁺	CD ₈ ⁺	分泌 IgA 细胞数	分组	免疫次数	CD ₄ ⁺	CD ₈ ⁺	分泌 IgA 细胞数
实验组	免疫前	9.94 ± 0.68	8.35 ± 1.06	2.3 ± 0.5	对照组	免疫前	10.03 ± 0.69	9.36 ± 1.25	0
	第 1 次	11.65 ± 0.35	10.26 ± 1.08	23.0 ± 2.4		第 1 次	9.64 ± 1.36	10.22 ± 1.23	5.2 ± 2.3
	第 2 次	16.06 ± 2.15	12.26 ± 2.02	46.6 ± 3.2		第 2 次	11.20 ± 2.68	8.36 ± 1.52	3.4 ± 1.6
	第 3 次	30.12 ± 3.06	26.36 ± 2.12	83.4 ± 1.6		第 3 次	10.69 ± 1.09	9.37 ± 0.86	1.5 ± 2.6
	攻虫	42.36 ± 2.87	35.08 ± 4.39	96.6 ± 6.8		攻虫	16.03 ± 2.04	15.28 ± 1.49	38.6 ± 4.60

2.3 小肠粘膜固有层中 IgA 分泌型浆细胞的消长

免疫组化染色, 实验组小肠粘膜固有层中 IgA 分泌型浆细胞呈棕色, 大小不一, 呈多形

性,有的可见核偏在一侧或呈车轮状结构,其消长见表 2。IgA 分泌型浆细胞在接种前基本见不到,免疫后逐渐上升,攻虫后达到高峰,增加了 94.3 ± 6.3 。对照小鼠仅偶见极少量 IgA 阳性细胞。2 组比较 $P < 0.01$ 。

2.4 血清中 IgG 和小肠液中 IgA 的消长

实验组血清中 IgG 和小肠液中 IgA 滴度在首次接种前变化不大,二免后逐渐上升,攻虫后最高,分别提高了 0.68 ± 0.06 和 0.77 ± 0.05 。对照组小鼠小肠液中 IgA 滴度变化不明显,一直处于较低水平,攻虫后略有升高。2 组比较 $P < 0.01$ (表 3)。

表 3 免疫小鼠特异性抗体滴度变化情况

分 组		免疫前	第 1 次	第 2 次	第 3 次	攻虫
实验组	IgG	0.18 ± 0.06	0.21 ± 0.05	0.50 ± 0.06	0.72 ± 0.05	0.84 ± 0.05
	IgA	0.05 ± 0.02	0.19 ± 0.04	0.38 ± 0.05	0.68 ± 0.10	0.82 ± 0.07
对照组	IgG	0.17 ± 0.03	0.16 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.33 ± 0.02
	IgA	0.07 ± 0.02	0.10 ± 0.04	0.07 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.34 ± 0.03

2.5 动物保护性实验

小鼠粪便中卵囊排出情况(图 1)显示,最后一次免疫后 2 周每只小鼠用 10^6 卵囊攻虫,实验组与对照组相比排出卵囊减少了 2.2 倍,排卵时间缩短了 4.5 d ($P < 0.05$)。

3 讨 论

3.1 关于免疫接种途径

本研究对实验组和对照组的免疫指标进行了检测,发现产生了系统和粘膜免疫应答,表明经鼻免疫可有效诱导系统和粘膜免疫,证实了共同粘膜免疫系统的存在,同时说明鼻粘膜是一个敏感有效、简便安全的免疫途径。由于鼻粘膜相关淋巴组织中地址素(addressin)和粘附分子的表达同时具有粘膜淋巴组织和外周淋巴结的特性,使滴鼻免疫后效应细胞有效的归巢到不同粘膜部位和外周免疫部位,从而同时诱导明显的粘膜和系统免疫反应^[2]。动物保护实验表明实验组受到了一定的保护,小鼠卵囊的排出数量和排出周期都缩短。并且在攻虫后小肠的抗体水平升高,进一步证实粘膜免疫和系统免疫在抗隐孢子虫中的作用。

3.2 关于重组质粒诱导机体产生的免疫应答

由实验结果可以看出,实验组淋巴细胞转化反应加强,CD4⁺T 淋巴细胞数量随着接种次数的增加而增高,这些表明核酸疫苗诱导机体产生了细胞免疫。实验组小鼠小肠粘膜固有层中的 IgA 分泌型浆细胞随着接种次数的增加递增,小肠液中 IgA 的滴度增加,表明核酸疫苗诱导机体产生了粘膜免疫,在抗隐孢子虫感染中起着重要作用。实验组小鼠血清中的 IgG 滴度随着接种次数增加而递增,表明该疫苗诱导机体产生了特异性体液免疫。这正是核酸疫苗的特点所在,结果与叙翠莉等的报道结果一致^[8]。

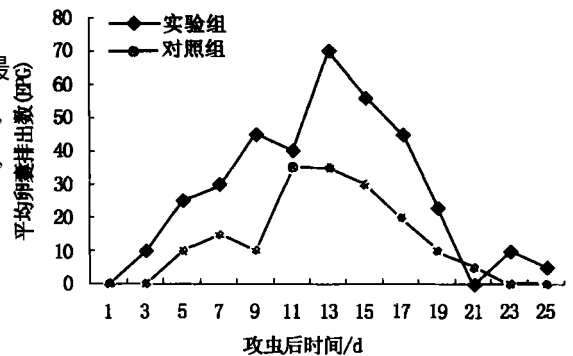


图 1 免疫小鼠对 *C. parvum* 攻击的保护作用

3.3 关于产生粘膜免疫的机制

小鼠在首次免疫接种前,肠粘膜固有层中没有见到 IgA 分泌型浆细胞,小肠液中 IgA 滴度变化也很小。我们认为这段时期为 IgA 抗体反应的感应阶段。在粘膜免疫反应中淋巴集结起着至关重要的作用。淋巴集结仅以一层特化的上皮与肠腔相隔,这种上皮缺乏肠道上皮中常见的杯状细胞,但含有一种特殊的微褶皱细胞(microfold cell),它通过胞饮方式吸收抗原物质,在抗原刺激下淋巴集结中的B细胞大量增殖,成生发中心,完成 IgA 反应的感应阶段。在二免后 IgA 分泌型浆细胞迅速增多,这是由于经致敏的 IgA 前体B细胞由输出淋巴管迁出淋巴集结,循淋巴回流,经胸导管进入血液循环,在血液循环中的 IgA 生成细胞最后特异性地回到肠壁,成为固有层中的浆细胞。此过程称为肠道淋巴细胞的再循环,这种再循环的基础是肠道粘膜组织的 IgA 生成细胞与肠道组织具有特异的亲和力,而来自周围淋巴结的淋巴细胞不具有这种亲和力。这一过程称为反应阶段。致敏的B细胞必须迁出淋巴集结才能分化为成熟的浆细胞,它的再循环过程也是它的分裂成熟过程。由固有层中浆细胞分泌的 IgA 弥散至粘膜上皮细胞内,与上皮细胞合成的分泌成分结合,形成分泌型 IgA (S IgA),转移至上皮细胞表面,经出胞作用被分粘膜固泌到肠液中,这段时期为粘膜免疫反应的效应阶段。我们发现小肠液中的 IgA 与肠有层中的 IgA 分泌型浆细胞消长趋势相同。这是因为抗体由浆细胞分泌,且由细胞内分泌至肠腔中需要一段时间。攻淋巴集结中的B细胞大量增殖虫后我们观察到 IgA 和 IgA 分泌型浆细胞明显上升的趋势,这是由于虫体抗原刺激淋巴集结中的B细胞大量增殖,同时刺激肠道粘膜组织的 IgA 生成细胞分泌大量 IgA^[2]。

4 结 论

- 1) 重组质粒 pDNA 3-15/60 经鼻粘膜接种 BALB/c 小鼠能够诱导机体产生系统和粘膜免疫应答。
- 2) 重组质粒 pDNA 3-15/60 经鼻粘膜接种后能够使小鼠对 *C. parvum* 卵囊感染产生一定抵抗力。

参 考 文 献

- 1 蒋金书 动物原虫病学 北京: 中国农业大学出版社, 2000 245~ 257
- 2 王世若, 王兴龙, 韩文瑜 现代动物免疫学 长春: 吉林科学技术出版社, 2001 155~ 163
- 3 Jenkins M C, Fayer R. Cloning and expression of cDNA encoding an antigenic of *Cryptosporidium parvum*. Mol Biochem Parasitol, 1995, 71: 149~ 152
- 4 何宏轩, 张西臣, 欧阳红生, 等 小球隐孢子虫孢子表面蛋白 CP15/60 基因的克隆和序列分析 中国预防兽医学报, 2002, 24(3): 182~ 184
- 5 何宏轩, 张西臣, 欧阳红生, 等 微小隐孢子虫 CP15/60 基因在 HeLa 细胞中的表达 中国生物制品学杂志, 2002, 15(5): 266~ 268
- 6 尹继刚, 李德昌, 张西臣, 等 小球隐孢子虫诱导的小鼠肠粘膜免疫应答 中国兽医学报, 1998, 18(3): 254~ 256
- 7 田欣田, 董文德, 邱震东 现代病理学实验技术 北京: 北京农业大学出版社, 1990 146~ 151
- 8 叙翠莉, 高杰英, 彭虹, 等 双价痢疾菌苗滴鼻免疫小鼠诱导粘膜与系统免疫反应 中国免疫学杂志, 2001, 17(10): 521~ 524