

文章编号: 1000-7423(2007)-03-0217-05

【实验研究】

弓形虫 GRA4 和 SAG2 基因重组 BCG 疫苗免疫保护性的比较研究

李俊华², 吴少庭^{1*}, 翁亚彪², 甘燕¹, 刘洪波³, 刘茂玲³,
张仁利¹, 高世同¹, 黄达娜¹, 耿艺介¹

【摘要】 目的 比较弓形虫致密颗粒蛋白 4(GRA4)基因和表面抗原 2(SAG2)基因的重组卡介苗(BCG)对小鼠的免疫保护效果。方法 108 只 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠随机分成 6 组: PBS 组、BCG 空白菌组、BCG-空白载体组、BCG-SAG2 组、BCG-GRA4 组和 BCG-SAG2+GRA4 组, 每组 18 只。每鼠分别注射对应液体/疫苗 100 μ l, 共 2 次, 间隔 2 周。接种前尾静脉采血, 接种后 4、6、8 周每组分别剖杀 3 只, 取脾和眼眶血检测细胞因子、IgG 与 IgM 抗体, T 淋巴细胞亚群计数, 淋巴细胞转化率等。末次免疫后 3 周, 每组剩余小鼠分别腹腔接种 RH 株弓形虫速殖子 50 个进行攻击感染, 观察各组小鼠存活时间。结果 弓形虫 SAG2 和 GRA4 重组 BCG 疫苗均能诱导小鼠产生免疫应答。第 4 周时, BCG-GRA4+SAG2 免疫组小鼠的 CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ 的比值最高, 为 14.06% \pm 1.17%。第 6 周时, BCG-GRA4+SAG2 免疫组小鼠的 IgG 抗体水平最高, 为 0.18 \pm 0.02。第 8 周时, BCG-SAG2 免疫组小鼠的 IgM 抗体水平最高, 为 0.82 \pm 0.05; 弓形虫速殖子攻击后, BCG-SAG2 组平均存活 8.61 d, PBS 对照组平均存活 7.33 d, 3 个免疫组小鼠比其他 3 组的平均存活时间长 1 d。结论 弓形虫重组 BCG 疫苗具有一定的免疫保护性。

【关键词】 弓形虫; 致密颗粒蛋白 4 (GRA4); 表面抗原 2 (SAG2); 重组疫苗; 卡介苗 (BCG); 免疫效果

中图分类号: R382.5, R392.11

文献标识码: A

Study on Immuno-effect with GRA4 or SAG2 Gene Recombinant BCG Vaccine of *Toxoplasma gondii*

LI Jun-hua², WU Shao-ting^{1*}, WENG Ya-biao², GAN Yan¹, LIU Hong-bo³,
LIU Mao-ling³, ZHANG Ren-li¹, GAO Shi-tong¹, HUANG Da-na¹, GENG Yi-jie¹

(1 Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518020, China; 2 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 3 Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

【Abstract】 **Objective** To compare the immuno-protection induced by the recombinant BCG vaccine of *Toxoplasma gondii* GRA4 gene (rBCG-GRA4) and SAG2 gene (rBCG-SAG2) in BALB/c mice. **Methods** 108 SPF BALB/c mice were divided into 6 groups: PBS, BCG, rBCG, rBCG-GRA4, rBCG-SAG2 and rBCG-GRA4+SAG2, each with 18 mice. Each mouse was injected by 100 μ l corresponding materials for 2 times. Blood was taken from tail vein before inoculation. 4, 6 and 8 weeks after inoculation, spleen was moved and blood was taken from orbit vein of 3 mice from each group for the detection of cytokines, IgG and IgM antibodies, T lymphocyte subgroups and transformation efficiency. 3 weeks after the last inoculation, 9 mice from each group were challenged intraperitoneally with 50 tachyzoites of *T.gondii* RH strain and their survival time was observed. **Results** rBCG vaccine of *T.gondii* induced immune response. The value of CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ of group BCG-GRA4+SAG2 was the highest (14.06 \pm 1.17) in the 4th week; the IgG titer in the BCG-GRA4+SAG2 group was the highest (0.18 \pm 0.02) in the 6th week and the IgM titer in the BCG-SAG2 group was the highest (0.82 \pm 0.05) in the 8th week. The average survival time of the mice in BCG-SAG2 group was about 8.61 days after challenged with tachyzoites, and that of the PBS control group, 7.33 days. The average survival time in the 3 immunized groups was one day longer than that of the control. **Conclusion** The rBCG vaccine of *T.gondii* shows certain immuno-protection in mice.

基金项目: 深圳市科技局基金项目 (No. 15.1997)

作者单位: 1 深圳市疾病预防控制中心, 深圳 518020; 2 华南农业大学兽医学院, 广州 510642; 3 华中科技大学同济医学院, 武汉 430030

* 通讯作者, E-mail: wshaoting@263.net

【Key words】 *Toxoplasma gondii*; Dense granule protein 4 (GRA4); Surface antigen 2 (SAG2); Recombinant vaccine; Bacillie Calmette-Guérin; Immuno-protection

Supported by the Shenzhen City Science and Technology Bureau (No. 15.1997)

* Corresponding author, E-mail: wshaoting@263.net

弓形虫是一种细胞内寄生原虫,可感染人及 200 多种动物,广泛分布于世界各地,该病是一种严重威胁人畜健康的疾病。弓形虫病与优生优育关系密切,孕妇感染后不论有无临床症状,都会直接影响胎儿的发育,严重时可致胎儿畸形甚至死亡^[1]。现已证实,弓形虫病与艾滋病、恶性肿瘤关系密切^[2,3]。鉴于应用疫苗可防治多种疾病的经验,研制廉价、安全、有效的弓形虫疫苗不失为一种有效的、并具潜力的防治措施。本文用弓形虫 GRA4 基因和 SAG2 基因的重组 BCG 疫苗免疫 BALB/c 小鼠,比较研究其诱导的免疫应答及其对小鼠的免疫保护性效果。

材料与方 法

1 虫种和实验动物

弓形虫 RH 株为深圳市疾病预防控制中心分子生物室保种。108 只 6~8 周龄(22 g 左右)雌性 SPF 级 BALB/c 小鼠购自广东中医药大学。

2 免疫用重组疫苗

含有穿梭表达质粒 ps3000-GRA4 或 ps3000-SAG2 的重组 BCG 疫苗均为作者在深圳市疾病预防控制中心分子生物学室构建保种。

3 主要试剂

RPMI1640 培养基、犊牛血清(new-born calf serum)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)均购自美国 GIBCO 公司; M7H9 培养基(硫酸铵 0.5 g, 磷酸二氢钾 1.0 g, 磷酸氢二钠 2.5 g, 柠檬酸钠 0.1 g, L-谷氨酸 0.5 g)、ADC enrichment(牛血清白蛋白 5.0 g, 葡萄糖 2.0 g, 过氧化氢酶 0.3 mg, 蒸馏水 100 ml)、M7H10 培养基(硫酸铵 0.5 g, 磷酸二氢钾 1.5 g, 磷酸氢二钠 1.5 g, 柠檬酸钠 0.4 g, L-谷氨酸 0.5 g, 孔雀石绿 250.0 g, 琼脂 15.0 g)、OADC enrichment(氯化钠 8.5 g, 牛血清白蛋白 50.0 g, 葡萄糖 20.0 g, 过氧化氢酶 0.03 g, 十八烯酸 0.6 ml)均购自美国 DIFCO 公司; 氨苄青霉素(amp)、卡那霉素(kana)购自上海生工生物工程技术服务有限公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (HRP-IgG)、羊抗兔 HRP-IgM 购自美国 Pierce 公司; 弓形虫 ELISA 检测试剂盒购自深圳康百得生物科技公司; CD3e-FITC、CD4-PE、CD8a-PE 单克隆抗体

购自美国 eBioscience 公司; 白细胞介素 10 (IL-10)、 γ 干扰素 (IFN- γ) 检测试剂盒购自上海晶美生物有限公司。

4 SAG2 基因和 GRA4 基因重组 BCG 疫苗的制备

取 SAG2 基因和 GRA4 基因重组 BCG 疫苗的丙三醇保种液 500 μ l 分别接种到 50 ml M7H9-kana 培养基中,约培养 4 周,离心收集菌体,用高压消毒的 PBS 溶液稀释菌体,使其吸光度(A_{600} 值)达到 1.0 左右(当 $A_{600}=1.0$ 时,菌液浓度约 10^8 CFU/ml),在此菌液浓度的基础上再稀释 10 万倍,用 M7H10-kana 平板进行菌落计数。Leander 等^[4]用重组卡介苗免疫接种小鼠平均 10^6 CFU/只。

5 免疫接种

108 只小鼠随机分为 6 组,每组 18 只,分别为 PBS 组、BCG 空白菌组、BCG-空白载体组、BCG-SAG2 组、BCG-GRA4 组和 BCG-SAG2+GRA4 组。用于免疫指标检测和攻击试验各组均 9 只。各鼠均注射对应物质/疫苗 100 μ l,其中 BCG-SAG2+GRA4 组小鼠注射 BCG-SAG2 和 BCG-GRA4 各 50 μ l。间隔 2 周再加强免疫 1 次,共 2 次。

6 免疫指标的检测

每组各 9 只小鼠,接种前尾静脉采血,接种后 4、6、8 周每次剖杀 3 只小鼠,分别取脾组织和眼眶采血(1~2 ml/只)。^①分离脾脏制备淋巴细胞,用 IL-10、IFN- γ 检测试剂盒进行细胞因子检测;用流式细胞仪计数各组小鼠在免疫后 4、6 和 8 周的 T 淋巴细胞亚群,比较各组 $CD_3^+CD_4^+/CD_3^+CD_8^+$ 比值的差异;通过 T 淋巴细胞增殖试验,分析免疫后 4、6、8 周的试验数据进行,比较各组淋巴细胞刺激指数(刺激指数 $SI=$ 加伴刀豆球蛋白 A (ConA) 刺激 A_{570} 的平均值/不加 ConA 刺激 A_{570} 的平均值)。^②用弓形虫 ELISA 试剂盒分别检测免疫前和免疫后 2、4、6 和 8 周小鼠血清中 IgG 和 IgM 抗体水平, PBS 对照组、BCG-空白菌组和 BCG-空白载体组作为阴性对照,若其他试验组的 A_{570} 值大于阴性对照的 2.1 倍判为阳性,当阴性对照的 A_{450} 值小于 0.05 时,以 0.05 计算,血清作 1:100 稀释。

7 攻击试验

在末次免疫后 3 周, 各组每鼠腹腔接种 RH 株弓形虫速殖子 50 个, 进行攻击试验。攻击感染后观察小鼠的生长状况, 包括精神、进食饮水和皮毛的色泽及生存时间等。

8 统计学分析

实验数据通过 SPSS15.0 版数据统计分析软件多重比较, 进行统计学分析。

结 果

1 重组 BCG 疫苗菌落计数的结果

根据 M7H10-kana 平板上长出的菌落数, 获得各试验组菌液浓度, BCG 空白菌组为 1×10^6 CFU/ml, BCG-空白载体组为 8×10^6 CFU/ml, BCG-GRA4 组为 9×10^6 CFU/ml。由此推算各试验组小鼠接种菌落数, BCG 空白菌组为 1×10^5 CFU/只, BCG-空白载体组为 8×10^5 CFU/只, BCG-SAG2 组为 7×10^5 CFU/只, BCG-GRA4 组为 9×10^5 CFU/只, BCG-GRA4+SAG2 组为 8×10^5 CFU/只。

2 重组 BCG 疫苗的免疫效果

2.1 T 淋巴细胞亚群计数 $CD_3^+CD_4^+/CD_3^+CD_8^+$ 的比值, PBS 对照组和 BCG-空白载体组免疫后 4、6 和 8 周无显著变化, 其他各组在免疫后 4 周最高, 然后呈逐渐

降低趋势。免疫后 4 周, 除 BCG-空白载体组外, 其他各组均显著高于 PBS 对照组, BCG-SAG2+GRA4 组最高, 为 $14.06\% \pm 1.17\%$ 。免疫后 6、8 周时, 各组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 1)。

2.2 小鼠血清 IgG 抗体水平 ELISA 检测结果显示, 免疫前和免疫后 2、4 周, 免疫组 (BCG-SAG2 组、BCG-GRA4 组和 BCG-SAG2+GRA4 组) 与阴性对照组 (PBS 对照组、BCG-空白菌组和 BCG-空白载体组) 的 IgG 抗体水平的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。表明免疫组尚未产生 IgG 抗体; 免疫后 6、8 周, 3 个免疫组 IgG 抗体水平显著升高 ($P < 0.05$), 其中 BCG-GRA4 组最高, 为 0.20 ± 0.02 (表 2)。

2.3 血清 IgM 抗体水平 ELISA 检测结果显示, 免疫前和免疫后 2、4 周, 免疫组 (BCG-SAG2 组、BCG-GRA4 组和 BCG-SAG2+GRA4 组) 与阴性对照组 (PBS 对照组、BCG-空白菌组和 BCG-空白载体组) 的 IgG 抗体水平的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。表明免疫组小鼠体内尚未产生 IgM 抗体; 在免疫后 6、8 周, 3 个免疫组小鼠体内产生较高水平的 IgM 抗体, 与阴性对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), BCG-SAG2+GRA4 组的 IgM 抗体水平最高, 为 1.63 ± 0.05 (表 3)。

2.4 淋巴细胞增殖反应试验 淋巴细胞刺激指数各组小鼠分别于免疫 4、6、8 周后经 ConA 刺激, PBS 对照组无显著变化, 其他 5 组随免疫时间的延长逐渐升高。免疫后 4 和 6 周, 除 BCG-GRA4 组外, 其他 4 个

表 1 不同免疫时间小鼠 T 淋巴细胞亚群计数 ($CD_3^+CD_4^+/CD_3^+CD_8^+$, %)
 Table 1 Flow cytometric analysis of T lymphocyte subsets in mice during immunization ($CD_3^+CD_4^+/CD_3^+CD_8^+$, %)

组别 Group	T 淋巴细胞亚群计数 T lymphocyte subsets		
	第 4 周 Week 4	第 6 周 Week 6	第 8 周 Week 8
PBS 对照组 Group PBS	4.53±0.31	2.68±0.10	2.28±0.19
BCG 空白菌组 Group nBCG	8.96±0.79*	2.70±0.08	2.69±0.04
BCG 空白载体组 Group rBCG	2.84±0.04	2.90±0.14	3.49±0.02**
BCG-SAG2 组 Group rBCG-SAG2	9.26±0.62*	2.68±0.34	3.35±0.48**
BCG-GRA4 组 Group rBCG-GRA4	7.10±0.59*	3.20±0.16#	3.13±0.49**
BCG-SAG2+GRA4 组 Group rBCG-SAG2+GRA4	14.06±1.17*	3.17±0.03#	3.13±0.24**

注: *、#、** 差异有统计学意义, $P < 0.05$ 。Note: Significant difference was represented with symbol *, # and ** respectively, $P < 0.05$ 。

表 2 不同免疫时间小鼠血清 IgG 抗体水平 (A_{450} 值)
 Table 2 IgG level in mice during immunization (A_{450} value)

组别 Group	小鼠血清 IgG 抗体水平 IgG level in serum of mice				
	免疫前 Before immune	第 2 周 Week 2	第 4 周 Week 4	第 6 周 Week 6	第 8 周 Week 8
PBS 对照组 Group PBS	0.03±0	0.03±0	0.03±0	0.03±0	0.03±0
BCG 空白菌组 Group nBCG	0.03±0.01	0.03±0.01	0.06±0*	0.04±0.03	0.04±0
BCG 空白载体组 Group rBCG	0.03±0	0.04±0	0.04±0	0.04±0	0.04±0
BCG-SAG2 组 Group rBCG-SAG2	0.03±0	0.03±0	0.04±0	0.06±0#	0.09±0*
BCG-GRA4 组 Group rBCG-GRA4	0.03±0	0.03±0	0.03±0	0.12±0.02#	0.20±0.02**
BCG-SAG2+GRA4 组 Group rBCG-SAG2+GRA4	0.03±0.01	0.03±0	0.05±0*	0.18±0.02#	0.17±0.01**

注: *、#、** 差异有统计学意义, $P < 0.05$ 。Note: Significant difference was represented with symbol *, # and ** respectively, $P < 0.05$ 。

表 3 不同免疫时间小鼠血清 IgM 抗体水平 (A_{450} 值)
Table 3 IgM level in mice during immunization (A_{450} value)

组别 Group	小鼠血清 IgG 抗体水平 IgG level in serum of mice				
	免疫前 Before immune	第 2 周 Week 2	第 4 周 Week 4	第 6 周 Week 6	第 8 周 Week 8
PBS 对照组 Group PBS	0.17±0	0.21±0.01	0.18±0.00	0.14±0.01	0.21±0.01
BCG 空白菌组 Group nBCG	0.17±0.01	0.20±0	0.18±0.15	0.27±0.02	0.27±0.04
BCG 空白载体组 Group rBCG	0.17±0	0.21±0	0.28±0.01	0.17±0	0.22±0.03
BCG-SAG2 组 Group rBCG-SAG2	0.17±0	0.21±0	0.32±0*	0.68±0.08*	0.82±0.05**
BCG-GRA4 组 Group rBCG-GRA4	0.17±0	0.20±0.01	0.22±0.01*	0.46±0.03*	0.43±0.03**
BCG-SAG2+GRA4 组 Group rBCG-SAG2+GRA4	0.17±0.01	0.21±0	0.43±0.01*	2.42±0.05*	1.63±0.05**

注: *、#、** 差异有统计学意义, $P<0.05$ 。 Note: Significant difference was represented with symbol *, # and ** respectively, $P<0.05$.

试验组与 PBS 对照组相比, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); 免疫后 8 周, 5 个试验组的淋巴细胞刺激指数与 PBS 对照组相比, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 其中 BCG-SAG2+GRA4 组最高, 为 $1.34±0.01$ (表 4)。

2.5 IL-10 水平比较 免疫后 4 周, 各组小鼠淋巴细胞产生 IL-10 水平差异无统计学意义 ($P>0.05$), 免疫后 6 周, BCG 空白载体组 IL-10 水平最高, 为 $(531.59±55.90)$ pg/ml; 免疫后 8 周, 除 BCG-SAG2+GRA 组, 其他各组 IL-10 水平与 PBS 对照组相比, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), BCG-空白载体组 IL-10 水平最高, 为 $(520.61±42.94)$ pg/ml (表 5)。

2.6 IFN- γ 水平比较 免疫后 4 周, BCG-空白载体组 IFN- γ 水平最高, 为 $(750.57±16.36)$ pg/ml, 免疫后 6 周, 各组 IFN- γ 水平与 PBS 对照组相比, 差异有统

计学意义 ($P<0.05$), BCG 空白载体组 IFN- γ 水平最高, 为 $(1614.48±12.97)$ pg/ml。免疫后 8 周, 除 BCG 空白菌组, 其他各组 IFN- γ 水平与 PBS 对照组相比, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), BCG-SAG2 组 IFN- γ 水平最高, 为 $(863.17±11.64)$ pg/ml (表 6)。

3 攻击试验结果

各组小鼠于弓形虫速殖子攻击感染后 2 d, 被毛紊乱无光泽, 进食量及饮水减少, 随着时间延长, 则停止进食饮水。BCG-SAG2 组小鼠存活时间最长, 平均存活 $(8.61±0.58)$ d, 其次, BCG-GRA4/SAG2 组为 $(8.52±0.77)$ d, BCG-GRA4 组为 $(8.33±1.01)$ d; PBS 对照组、BCG 空白载体组和 BCG 空白载体组分别存活 $(7.33±0.13)$ d、 $(7.62±0.33)$ d 和 $(7.36±0.30)$ d。

表 4 不同免疫时间小鼠淋巴细胞增殖反应试验结果 (MTT 法, A_{450} 值)
Table 4 Lymphopoiesis test in mice during immunization (MTT method, A_{450} value)

组别 Group	淋巴细胞增殖反应试验 Lymphopoiesis test		
	第 4 周 Week 4	第 6 周 Week 6	第 8 周 Week 8
PBS 对照组 Group PBS	0.85±0.04*	0.80±0.10	0.81±0.04
BCG 空白菌组 Group nBCG	1.04±0.01	1.07±0.05#	1.29±0.14**
BCG 空白载体组 Group rBCG	1.17±0	1.12±0#	1.21±0.03**
BCG-SAG2 组 Group rBCG-SAG2	1.08±0	1.07±0.03#	1.25±0.04**
BCG-GRA4 组 Group rBCG-GRA4	0.96±0*	0.98±0.06	1.25±0.01**
BCG-SAG2+GRA4 组 Group rBCG-SAG2+GRA4	1.16±0.01	1.23±0.02#	1.34±0.01**

注: *、#、** 差异有统计学意义, $P<0.05$ 。 Note: Significant difference was represented with symbol *, # and ** respectively, $P<0.05$.

表 5 不同免疫时间小鼠细胞因子 IL-10 水平 (pg/ml)
Table 5 IL-10 level in mice during immunization (pg/ml)

组别 Group	不同免疫时间细胞因子 IL-10 水平 IL-10 level during immunization		
	第 4 周 Week 4	第 6 周 Week 6	第 8 周 Week 8
PBS 对照组 Group PBS	0	415.81±37.89	177.09±13.29
BCG 空白菌组 Group nBCG	0	284.76±46.80#	451.23±31.006**
BCG 空白载体组 Group rBCG	0	531.59±55.90	520.61±42.94**
BCG-SAG2 组 Group rBCG-SAG2	0	150.46±0.76#	452.75±23.08**
BCG-GRA4 组 Group rBCG-GRA4	0	159.39±26.03#	377.35±2.50**
BCG-SAG2+GRA4 组 Group rBCG-SAG2+GRA4	0	291.45±42.56#	217.71±8.17

注: #、** 差异有统计学意义, $P<0.05$ 。 Note: Significant difference was represented with symbol # and ** respectively, $P<0.05$.

表 6 不同免疫时间细胞因子 IFN- γ 水平 (pg/ml)
Table 6 IFN- γ level in mice during immunization (pg/ml)

组别 Group	不同免疫时间细胞因子 IFN- γ 水平 IFN- γ level in mice during immunization		
	第 4 周 Week 4	第 6 周 Week 6	第 8 周 Week 8
PBS 对照组 Group PBS	0	275.42 \pm 25.13	358.40 \pm 57.46
BCG 空白菌组 Group nBCG	0	752.09 \pm 17.68*	266.76 \pm 2.82
BCG 空白载体组 Group rBCG	750.57 \pm 16.36*	1 614.48 \pm 12.97*	781.68 \pm 19.02**
BCG-SAG2 组 Group rBCG-SAG2	59.47 \pm 5.92	705.50 \pm 0.88*	863.17 \pm 11.64**
BCG-GRA4 组 Group rBCG-GRA4	35.46 \pm 4.93	702.31 \pm 27.59*	636.38 \pm 32.34**
BCG-SAG2+GRA4 组 Group rBCG-SAG2+GRA4	26.37 \pm 4.10	783.33 \pm 26.60*	507.01 \pm 22.90**

注: *、#、** 差异有统计学意义, $P < 0.05$ 。Note: Significant difference was represented with symbol *, # and ** respectively, $P < 0.05$.

3 个弓形虫重组疫苗免疫组比 3 个对照组平均存活时间
长 1 d, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

讨 论

活载体疫苗是以病毒和细菌为载体的疫苗。BCG 既是全世界应用最广泛的疫苗, 也是目前所知最强的免疫佐剂之一, 因此, 将 BCG 作为工程菌的活载体疫苗近年来受到国内外专家的重视。Young 等^[5]将 IL-2 的重组 BCG 疫苗与正常的 BCG 疫苗分别免疫小鼠, 6 周后 IL-2 的重组 BCG 疫苗组的脾细胞产生了很强的针对特异性抗原的增殖反应和大量的 γ -干扰素, 还伴随产生低水平的 IgG1, 正常的 BCG 疫苗组只产生高水平的 IgG1, 而其他无明显改变, 说明一些细胞因子免疫增强剂的掺入可以增强 BCG 的免疫原性。Takachika 等^[6]用 HIV 的重组 BCG 疫苗(rBCG-V3J1) 通过鼻腔免疫小鼠, 每周 1 次, 共免疫 3 次, 免疫后 4 周血清中产生了高滴度针对 HIV-V3J1 的特异性的 IgG 抗体, 至少能维持 12 月。Kenji 等^[7]将 HIV-1 Env V3 抗原的重组 BCG 疫苗(rBCG Env V3), 免疫恒河猴, 主要产生了针对 HIV-1 的中和抗体。用非致病性的 SHIV-MN 和高致病性 SHIV-89.6PD 分别攻击恒河猴, 结果前组猴体内血浆中的病毒载量显著减少, 后者没有效果。Varaldo 等^[8]用曼氏血吸虫的 Sm14 抗原与偶发分支杆菌的 β -内酰胺酶融合重组 BCG 疫苗(rBCG-Sm14), 免疫小鼠产生了针对 Sm14 的细胞免疫应答, 用曼氏血吸虫的尾蚴攻击, 结果比用大肠埃希菌表达的 Sm14 蛋白免疫的小鼠组的虫体荷载量减少了 48%。关于弓形虫重组 BCG 疫苗的研究国内外很少报道, 鉴于以上重组 BCG 疫苗的优点, 本实验构建了弓形虫重组 BCG 疫苗, 结果显示, 弓形虫重组 BCG 疫苗组诱导小鼠产生了很高的免疫应答水平, 同时通过淋巴细胞转化率的检测结果可以说明 BCG 疫苗发挥了较强的自身免疫佐剂作用。

林绮萍等^[9]用真核表达重组质粒 pVAC-GRA4 免疫小鼠, 用 RH 株弓形虫速殖子(10 个/只)攻击感染, 小鼠平均存活时间 13 d。本试验的研究结果显示, 弓形虫重组疫苗免疫组对小鼠抗弓形虫攻击感染有部分的免疫保护性, 要提高重组 BCG 疫苗对小鼠产生完全保护, 还有待于进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Stray-Pedersen B, Jenum PA. Toxoplasmosis and pregnancy[J]. Tidsskr Nor Laegeforen, 1994, 114: 1823-1826.
- [2] Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS[J]. Clin Infect Dis, 1992, 15: 211-222.
- [3] Ramadan NI, Abdel LMM, Abdel AHE. Diagnosis of toxoplasmosis in children with malignancy[J]. J Egypt Soc Parasitol, 2000, 30: 523-536.
- [4] Leander G, Mischo K, Joachim F, et al. Cell-mediated immunity induced by recombinant *Mycobacterium bovis* bacille calmette-guérin strains against an intracellular bacterial pathogen: importance of antigen secretion or membrane-targeted antigen display as lipoprotein for vaccine efficacy[J]. J Immunol, 2002, 168: 1869-1876.
- [5] Young SL, O'Donnell MA, Buchan GS. IL-2-secreting recombinant bacillus Calmette Guerin can overcome a Type 2 immune response and corticosteroid-induced immunosuppression to elicit a Type 1 immune response[J]. Int Immunol, 2002, 14: 793-800.
- [6] Takachika H, Hironobu G, Kenji S, et al. HIV mucosal vaccine: nasal immunization with rBCG-V3J1 induces a long term V3J1 peptide-specific neutralizing immunity in Th1-and Th2-deficient conditions[J]. J Immunol, 2001, 167: 5862-5867.
- [7] Kenji S, Dayaraj C, Yasushi A, et al. Vaccination of rhesus macaques with recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus calmette-guérin env v3 elicits neutralizing antibody-mediated protection against simian-human immunodeficiency virus with a homologous but not a heterologous V3[J]. Motif J Virol, 2005, 79: 1452-1462.
- [8] Varaldo PB, Leite LCC, Dias WO, et al. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the Sm14 antigen of *Schistosoma mansoni* protects mice from cercarial challenge[J]. Infect Immun, 2004, 6: 3336-3343.
- [9] Lin QP, Wu ST, Weng YB, et al. Study on immuno-response of recombinant plasmid pVAC containing GRA4 gene from *Toxoplasma gondii* in mice[J]. Chin J Parasit Dis Control, 2005, 18: 180-183. (in Chinese)
(林绮萍, 吴少庭, 翁亚彪, 等. 弓形虫 GRA4 基因真核表达重组质粒 DNA 免疫小鼠的研究[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2005, 18: 180-183.)

(收稿日期: 2006-06-09 编辑: 盛慧锋)