

紫外线减毒弓形虫 ZS1 株滋养体在小鼠体内的 细胞免疫反应*

吕芳丽 郑焕钦 郭虹 陈观今

中山医科大学寄生虫学研究所 广州 510089

提要 目的: 探讨紫外线减毒弓形虫 ZS1 株在小鼠体内的免疫保护性和细胞免疫反应。方法: 用波长为 2537 Å 的紫外线照射弓形虫 ZS1 株滋养体, 照射高度为 5 cm, 照射时间 60 min。小鼠于免疫后 45 d 用同株滋养体攻击感染, 攻击后 4 d 剖杀, 与单免疫组、单感染组及正常对照组小鼠比较其脾 T 淋巴细胞增殖反应及其亚群的变化。结果: 小鼠接种紫外线减毒弓形虫 ZS1 株滋养体后能正常存活, 于接种后 49 d 各组织未查见滋养体、包囊或假包囊; 免疫组攻击感染后存活时间较单感染组延长; 体外特异抗原刺激后, 可诱导免疫组及免疫攻击组强的脾 T 淋巴细胞增殖反应; 免疫攻击组 CD4⁺ T 细胞明显下降, CD4⁺/CD8⁺ 比率倒置; 免疫组、免疫攻击组及感染组的 NK 细胞活性均明显增强。结论: 紫外线减毒弓形虫 ZS1 株滋养体疫苗能够诱导免疫小鼠产生一定的抗攻击感染保护力, 其中 CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞可能发挥着重要作用。

关键词 弓形虫 紫外线减毒 脾淋巴细胞增殖 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞 NK 细胞

弓形虫病可通过母婴垂直传播, 造成流产、早产、死胎、胎儿畸形及智力障碍等^[1]。弓形虫感染已成为器官移植、医源性免疫抑制和艾滋病的严重并发症, 其中约 10% ~ 33% 艾滋病患者死于弓形虫病脑炎^[2,3]。家畜弓形虫病造成的流产也给畜牧业带来巨大经济损失^[4]。因此, 研制有效的抗弓形虫感染疫苗, 已成为一个迫切的问题。紫外线减毒血吸虫疫苗保护性免疫在家畜身上的成功实验^[5,6], 为紫外线减毒弓形虫疫苗的研究提供了依据。本文采用紫外线减毒弓形虫 ZS1 株滋养体接种小鼠, 探讨其保护性免疫作用机制。

材料与方 法

弓形虫抗原的制备 将本室保种的新鲜无污染的弓形虫 ZS1 株滋养体接种昆明系小鼠, 于发病时收集腹水。用生理盐水洗涤 3 次, 3 000 g 离心 10 min, 制成 100 mg/ml 的成虫悬液, - 20 °C 反复冻融后超声粉碎, - 20 °C 保存备用。

免疫方法

紫外线减毒方法 用 10 ml 生理盐水收集新鲜弓形虫 ZS1 株滋养体, 分装于直径为 3 cm 的玻璃皿中, 垂直放于波长为 2537 Å 的紫外灯下 5 cm 处, 照射时间 60 min, 期间数次混匀虫体悬液。

实验分组 昆明系小鼠, 5 wk 龄, 体重 20 g, 分 4 组。组 1 (免疫组): 5 只, 每鼠经腹腔注射紫外线照射虫体悬液 0.2 ml 1 次。组 2 (免疫攻击组): 5 只, 免疫如组 1, 45 d 后进行攻击感染, 每鼠经腹腔注射未照射弓形虫 ZS1 株虫体悬液 0.5 ml。组 3 (感染组) 5 只, 未免疫, 与组 2 攻击感染的时间及感染量

相同, 每鼠经腹腔注射未照射 ZS1 株弓形虫虫体悬液 0.5 ml。组 4 (正常对照组): 5 只鼠, 不进行免疫或感染。

细胞免疫效应检测

脾细胞的制备 无菌操作取小鼠脾脏, 用 RPM I 1640 培养液制备成单个细胞悬液, 1 500 g 离心 10 min, 弃上清。每管加入 5 ml pH 7.2 的 Tris-NH₄Cl 溶液混匀以溶解红细胞, 作用 5 min。用 RPM I 1640 液洗涤 2 次, 最后用含 10% NCS (新生小牛血清) 的 RPM I 1640 溶液调整细胞浓度至 5 × 10⁶/ml。

淋巴细胞转化试验 于 24 孔培养板中每孔加入上述脾细胞悬液 1 ml, 每个样本设空白对照孔、ConA 刺激孔及弓形虫 ZS1 株抗原刺激孔, 均设 3 复孔。ConA 的终浓度为 10 μg/ml, ZS1 抗原的终浓度为 20 μg/ml。置 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养 72 h, 培养结束前 4 h 加入 MTT (四甲基偶氮唑盐, 终浓度为 50 μg/ml), 继续培养 4 h。取出培养板, 每孔加入 0.04 mol/L 盐酸异丙醇 900 μl, 用加样器轻轻反复吹打至甲 (formazan) 充分溶解, 于分光光度仪分别测量 OD_{630nm} 及 OD_{570nm} 值。

CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞亚群的测定 采用荧光抗体染色法, 试剂盒购自北京医科大学免疫学教研室。

NK 细胞活性测定 效应细胞: 用含 10% NCS 的 RPM I 1640 培养液调整脾细胞浓度至 5 × 10⁶/

* 中国博士后科学基金资助项目
广东省博士后科学基金资助项目

ml 靶细胞: 无菌传代 24~ 48 h 的 Yac-1 细胞, 用 RPM I 1640 液洗 3 次, 最后用不含 NCS 的 RPM I 1640 液调细胞浓度至 $10^5/\text{ml}$ 效应细胞和靶细胞的比例为 100 : 1。

结 果

小鼠病原学检查及存活时间比较

免疫组小鼠于接种后 49 d 剖杀见其脾脏大小与正常鼠的相仿, 在观察的 49 d 内正常存活, 组织匀浆后压片病原学检查, 在其脑、脾、肝和肌肉组织中未见滋养体、假包囊或包囊; 攻击感染鼠攻击后 4 d 剖杀见脾脏明显增大, 与感染鼠的大小相仿。感染组小鼠与免疫攻击组小鼠同时进行弓形虫感染, 平均存活时间分别为 90.0 ± 6.5 h 和 126.0 ± 9.6 h, 免疫攻击组的存活时间明显较单感染组的为长。

淋巴细胞转化试验 淋巴细胞转化试验的结果

表 2 各组 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞亚群的变化
Table 2 Changes in CD4⁺, CD8⁺ T cell subgroups and CD4⁺/CD8⁺ ratio of different groups

组别	Group	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
免疫组	Immunized group	38.5	22.4	1.72
免疫攻击组	Challenged group	12.5	27.8	0.45*
感染组	Infected group	18.8	19.6	0.96*
正常对照组	Normal control	37.5	23.9	1.36

* 与对照组相比较 Compared with control group $P < 0.01$

表 3 各组 NK 细胞杀伤活性变化
Table 3 Changes in splenic NK cell activity of different groups

组别	Group	杀伤活性 (%) A activity (%)
免疫组	Immunized group	55.0*
免疫攻击组	Challenged group	41.7*
感染组	Infected group	62.5*
正常对照组	Normal control	22.2

* 与对照组相比较 Compared with control group $P < 0.01$

与正常对照组相比较, 3 组的 NK 细胞杀伤活性均明显增强。其中, 感染组的杀伤活性最高, 其次为免疫组, 再次为免疫攻击组。

讨 论

弓形虫 DNA 疫苗或亚单位疫苗均只含有某种病原的部分片断, 只能提供有限的保护性; 而活的减毒疫苗能够刺激机体产生抗体, 诱导细胞毒性 T 细胞 (CTL) 活性, CTL 细胞不仅可识别和杀伤已感染的细胞, 而且可作用于株与株之间具有微小差

以 OD_{570 nm} 值表示, 各刺激孔的 OD 值分别减去空白刺激孔 OD 值即代表淋巴细胞增殖能力 (表 1)。

表 1 各组脾淋巴细胞转化反应
Table 1 The splenic lymphocyte transfer reaction of different groups

组别	Group	刀豆蛋白 A ConA	弓形虫抗原 Ag of <i>T. gondii</i>
免疫组	Immunized group	38.0*	11.0*
免疫攻击组	Challenged group	139.0*	34.0*
感染组	Infected group	- 45.0*	- 93.0*
正常对照组	Normal control	16.0	4.5

* 与对照组比较 Compared with control group $P < 0.01$

由表 1 可见经非特异性 (ConA) 和特异性 (ZS1 株弓形虫抗原) 刺激, 免疫攻击组的淋巴细胞增殖能力均增强; 其次为免疫组, 感染组的淋巴细胞增殖能力完全被抑制, 呈负值。

CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞亚群的变化 见表 2。
NK 细胞杀伤活性测定 见表 3。

异的病原, 因此活的减毒疫苗可能是最有效的^[7]。紫外线减毒日本血吸虫疫苗在动物中均获得了稳定的抗血吸虫免疫力^[5,6], 进行紫外线减毒弓形虫疫苗的研究同样有其实际意义。

本研究结果显示强毒弓形虫 ZS1 株经一定量的紫外线照射减毒后接种小鼠, 在观察的 49 d 内小鼠正常存活, 在小鼠的脑、脾、肝和肌肉组织均未查见滋养体、假包囊或包囊, 可见经紫外线照射的滋养体虽可使细胞感染但失去了增殖能力^[8]。同时结果显示接受照射滋养体免疫的小鼠攻击感染后的平均存活时间明显较单感染组的延长, 可见免疫鼠具有一定的抗攻击感染抵抗力。Chhabra 使用⁶⁰Co 2 万拉德 (rad) 一次性高辐射剂量灭活弓形虫速殖子接种小鼠, 其免疫力能抵抗一个有限度的强毒攻击量^[9]。Seah 将弓形虫株经 10 千伦琴 (kr) X 光照射, 能使免疫小鼠对致死攻击产生 100% 保护, 存活小鼠检查未发现包囊; 计浩等采用紫外线全暴露垂直连续照射弓形虫 NT 强毒株, 通过细胞致弱培养筛选出抗辐射变异虫株 NT A - II 系, 对猪、兔和小鼠的

毒力均明显减弱,用含虫数 $10^5/m^1$ 弱毒虫株每头猪接种 1 m, 6 个月免疫保护力为 100%^[10]。本实验所见攻击感染鼠存活时间较短,未能观察到远期免疫效果,可能是由于攻击感染所用的虫株为强毒株,且所用虫量过大所致。一般认为,在保护性免疫试验中,以选用中等毒力虫株为宜^[11]。本实验观察到攻击感染鼠与感染鼠的脾脏均明显增大,经非特异性(ConA)和特异性(弓形虫 ZS1 株抗原)刺激后,免疫攻击组的淋巴细胞增殖能力明显增强;其次为免疫组,而单感染鼠呈显著抑制。免疫攻击组和感染组的 $CD4^+$ T 细胞比例明显降低, $CD4^+/CD8^+$ 比值倒置。 $CD8^+$ T 细胞比例增高,推测可能是由于 CTL 杀伤功能增强所致。李宝良等^[12]报道,在症状明显的弓形虫病患者,由于 $CD8^+$ 阳性细胞的增加, $CD4^+/CD8^+$ 比率往往倒置 (0.7 ± 0.3),在急性弓形虫病这种变化可持续 8wk 以上;慢性患者则正常 (1.7 ± 0.5)。本实验免疫和感染后各组的 NK 细胞杀伤活性均明显增强。NK 细胞在体外对弓形虫滋养体具有明显的细胞毒作用,并可产生 IFN- γ ,以增强免疫效应细胞的活性和抗弓形虫感染^[13]。

参 考 文 献

1 程彦斌 弓形虫病实验诊断研究的进展 国外医学寄生虫病分

册 1996; 23 205- 208
 2 于恩庶主编 弓形虫病学 福州: 福建科学技术出版社, 1992 197
 3 Luft BJ, Hafner R. Toxoplasmic encephalitis A DS 1990; 4 593- 595
 4 Zenner L, Darcy F, Cesbron-Delauw MF, et al Rat model of congenital toxoplasmosis: rate of transmission of three *Toxoplasma gondii* strains to fetuses and protective effect of a chronic infection Infect Immun 1993; 61 360- 363
 5 Shi YE, Jiang CF, Han JJ, et al *Schistosoma japonicum*: an ultraviolet-attenuated cercarial vaccine applicable in the field for water buffaloes Exp Parasitol 1990; 71 100- 106
 6 Shi YE, Jiang CF, Han JJ, et al Immunization of pigs against infection with *Schistosoma japonicum* using ultraviolet attenuated cercariae Parasitology 1993; 106 459- 462
 7 Taubes G. Salvation in a snippet of DNA? Science 1997; 278 (5344) 1711- 1714
 8 Grimwood BG. Infective *Toxoplasma gondii* trophozoites attenuated by ultraviolet irradiation Infect Immun 1980; 28 532- 535
 9 Chhabra MB, Mahajan RC, Ganguly NK. Effects of ⁶⁰Co irradiation on virulent *Toxoplasma gondii* and its use in experimental immunization Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med 1979; 35(5) 433- 440
 10 计浩, 吴叙苏, 吕立新, 等 弓形虫紫外线弱毒虫株的培育及免疫研究 中国人兽共患病杂志 1991; 7(5) 4- 6
 11 沈继龙, 徐秉银. 弓形体抗原的免疫化学研究 中国人兽共患病杂志 1990; 6(4) 14- 18
 12 李宝良, 阎惠平. 国外弓形体病研究的最新进展 中国人兽共患病杂志 1987; 3(4) 39- 41
 13 吴少廷, 吕芳丽, 石佑恩. 感染弓形虫小鼠早期细胞免疫的探讨. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 1996; 14 54- 57
 1998 年 9 月 25 日收稿 1999 年 6 月 7 日修回 (编辑: 庄兆农)

CELLULAR IMMUNE RESPONSE IN MICE VACCINATED WITH
 UV-ATTENUATED TOXOPLASMA GONDII ZS1 STRAIN TROPHOZOITES*

LU Fangli, ZHENG Huanqin, GUO Hong, CHEN Guanjin

Department of Parasitology, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089

ABSTRACT

AM: To explore the protective effect and cellular immune response of uv-attenuated ZS1 strain trophozoites of *Toxoplasma gondii* in mice **METHODS:** The ZS1 strain trophozoites of *T. gondii* were irradiated by uv-light with 2537A° wave length for 60 minutes. Mice were divided into 4 groups. Group 1 was vaccinated alone, group 2 was challenged with normal ZS1 trophozoites on d45 after vaccination, group 3 was infected alone, and group 4 was normal control. The changes in splenic T cell proliferation, level of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell, and NK cell activity were compared. **RESULTS:** Group 1 mice survived normally, no trophozoite, pseudo-cyst or cyst was detected in the tissues on d49 after vaccination. Group 2 mice survived longer than those of group 3. The T lymphocyte proliferation in response to soluble antigen of *T. gondii* was significantly enhanced in group 2, and suppressed in group 3. The level of $CD4^+$ T cell in group 2 was decreased, resulting in a reverse of $CD4^+/CD8^+$ ratio. The NK cell activities in groups 1, 2 and 3 were all significantly increased. **CONCLUSION:** The uv-attenuated vaccine of *T. gondii* ZS1 strain could induce certain protective immunity against challenge infection, in which $CD8^+$ T cell and NK cell might play an important role.

Key words: *Toxoplasma gondii*, uv-attenuated, splenic lymphocyte proliferation, $CD4^+/CD8^+$ T cell, NK cell

* Supported by Chinese Postdoctoral Scientific Foundation and Postdoctoral Scientific Foundation of Guangdong Province