

文章编号: 1000-7423(2010)-02-0115-05

【论著】

大肠埃希菌肠毒素 B 亚基对弓形虫速殖子 SAG1-ROP2 复合基因免疫效果的影响

赵红, 何深一*, 李婷, 赵广会, 周怀瑜, 赵群力

【摘要】 目的 研究大肠埃希菌不耐热肠毒素 B 亚基(LTB)对弓形虫速殖子 SAG1-ROP2 复合基因免疫效果的影响。方法 构建重组真核表达质粒 pcDNA3.1-SAG1-ROP2 和 pEASY-E1-LTB。BALB/c 小鼠 88 只, 随机均分为 4 组, 分别用 PBS(A 组)、pcDNA3.1 空质粒(B 组)、pcDNA3.1-SAG1-ROP2 质粒(C 组), 以及 pcDNA3.1-SAG1-ROP2 质粒和 pEASY-E1-LTB 质粒(D 组)进行滴鼻免疫, 每种质粒 20 $\mu\text{g}/(\text{只}\cdot\text{次})$ 。每组小鼠随机抽取 15 只, 每周免疫 1 次, 共 4 次, 末次免疫后 2 周, 测定其血清 IgG 和 IgA 抗体水平, 气管和小肠黏膜冲洗液分泌型 IgA(sIgA)水平, 以及脾细胞培养上清中 γ 干扰素 (IFN- γ)和白细胞介素 4(IL-4)水平; 每组中余 7 只小鼠, 每周免疫 1 次, 共 3 次, 末次免疫后 4 周, 弓形虫速殖子腹腔接种感染 ($1\times 10^7/\text{鼠}$), 观察比较各组生存时间。结果 成功构建 pEASY-E1-LTB 重组表达质粒。D 组小鼠血清 IgG (0.626 \pm 0.100) 和 IgA 抗体水平 (1.086 \pm 0.138), 气管和小肠黏膜冲洗液 sIgA 水平 (0.886 \pm 0.164), 以及细胞因子 IFN- γ [(2 017 \pm 266) pg/ml] 和 IL-4 水平 [(203 \pm 31) pg/ml] 均显著高于其他各组 (均 $P<0.05$)。感染弓形虫速殖子后, A、B、C 和 D 组小鼠的生存时间中位数分别为 3、4、6 和 10 d, D 组的生存时间长于其他各组(均 $P<0.05$)。结论 LTB 能明显增强弓形虫速殖子 SAG1-ROP2 复合基因的免疫效果。

【关键词】 刚地弓形虫; 复合基因疫苗; 大肠埃希菌; 不耐热肠毒素; 黏膜免疫

中图分类号: R382.5 文献标识码: A

Effect of *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxin B Subunit on SAG1-ROP2 Compound Gene Vaccine of *Toxoplasma gondii* Tachyzoite

ZHAO Hong, HE Shen-yi*, LI Ting, ZHAO Guang-hui, ZHOU Huai-yu, ZHAO Qun-li

(Department of Parasitology, Shandong University School of Medicine, Jinan 250012, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit (LTB) as a genetic adjuvant in enhancing the immune response induced by *Toxoplasma gondii* tachyzoite compound gene vaccine. **Methods** The eukaryotic expression plasmids of pcDNA3.1-SAG1-ROP2 and pEASY-E1-LTB were constructed. Eighty-eight BALB/c mice were randomly divided into four groups: PBS (group A), pcDNA3.1(B), pcDNA3.1-SAG1-ROP2 (C) and pcDNA3.1-SAG1-ROP2+pEASY-E1-LTB (D). Fifteen mice in each group were randomly selected, and intranasally immunized weekly with 20 μg plasmid or 20 μl PBS, respectively. Each mouse received four immunizations with the same dose of antigen. Two weeks after the final immunization, the antibodies and cytokines were detected, including the specific IgG and IgA antibodies in serum, sIgA in mucosa douche, IFN- γ and IL-4 in splenocyte culture supernatant. The remaining mice in each group were immunized three times weekly with 20 μg plasmid or 20 μl PBS, respectively, and challenged by *T. gondii* tachyzoites at four weeks after the final vaccination (1×10^3 per mouse). The survival time of mice was recorded. **Results** The recombinant plasmids pEASY-E1-LTB were constructed. The specific IgG (0.626 \pm 0.100) and IgA antibodies (1.086 \pm 0.138) in serum, sIgA (0.886 \pm 0.164) in mucosa douche, cytokines IFN- γ [(2 017 \pm 266) pg/ml] and IL-4 [(203 \pm 31) pg/ml] in splenocyte culture supernatant in group D were all higher than those in other groups ($P<0.05$). After challenged with *T. gondii* tachyzoites, the median survival time of mice in groups A, B, C, and D were 3, 4, 6, and 10 d, respectively. The survival time of mice in group D was longest ($P<0.05$). **Conclusion** *E. coli* heat-labile enterotoxin can enhance the immune response induced by the compound gene vaccine of *T. gondii* tachyzoites.

【Key words】 *Toxoplasma gondii*; Compound gene vaccine; *Escherichia coli*; Heat-labile enterotoxin; Mucosal immunity

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30371257) and the Scientific Research Grant for Returned Scholars, Ministry of Education (No. 2003 [406])

* Corresponding author, E-mail: shenyihe2007@163.com

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30371257); 教育部留学回国人员科研启动基金 (教外司留 2003 [406] 号)

作者单位: 山东大学医学院寄生虫学教研室, 济南 250012

* 通讯作者, E-mail: shenyihe2007@163.com

弓形虫是一种广泛寄生于人和动物有核细胞内的寄生原虫^[1]。孕妇孕期首次感染弓形虫后可导致流产、胎儿发育畸形和早产等。弓形虫病也是最常见的机会性寄生虫病之一，是免疫功能严重低下患者的主要死亡原因^[2]。迄今尚无治疗弓形虫病的特效药物，因此研制安全有效的疫苗极为迫切。大量的动物实验表明，DNA 疫苗不仅可以预防，还可以治疗病原生物体的感染，但 DNA 疫苗诱导体液免疫和细胞免疫的效率相对较低，尤其是在大型动物中，影响了它的实际应用^[3]。免疫佐剂是指能增强机体针对抗原的免疫应答能力或改变免疫反应类型的物质，利用细菌及其代谢产物作为黏膜免疫佐剂具有很好的发展前景，研究较多的是霍乱毒素(CT)和大肠埃希菌(*E. coli*)不耐热肠毒素(LT)，且 LT 的增强免疫效果比 CT 更为理想。LT 的 B 亚基(LTB)是其免疫原性部位，具有良好的抗原性，在免疫学上有重要意义。用 LTB 佐剂辅助将刺激机体产生更强的免疫应答，使机体获得对抗病原体的保护免疫^[4-6]。

本研究采用刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)速殖子期表面抗原 SAG1 与棒状体蛋白 ROP2 基因定向连接并构建在同一真核表达载体 pcDNA3.1 上，将重组真核质粒黏膜免疫小鼠；同时以 LTB 作为免疫佐剂，观察多基因疫苗与佐剂结合的免疫效果。

材料与方 法

1 实验动物

SPF 级 88 只 BALB/c 雌性小鼠，6 周龄，体重(20±2) g，购自山东大学实验动物中心。

2 虫株、菌种和质粒

刚地弓形虫 RH 株速殖子、*E. coli* DH5α、克隆载体 pUC18 和真核表达载体 pcDNA3.1 均为本室保存。真核表达载体 pEASY-E1 购自北京 TransGen 生物技术有限公司。*E. coli* 44815 株购自卫生部中国药品生物制品检定所，培养基为 LB 琼脂。

3 主要试剂

限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III 和 *Sal* I，*Taq* DNA 聚合酶，DNA 标志物以及 TA 克隆试剂盒均购自宝生物(大连)工程有限公司。*T₄* DNA 连接酶购自上海生工公司。PCR 试剂盒和凝胶回收试剂盒购自北京 TransGen 公司。质粒提取试剂盒购自美国 Omega 公司。辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG (HRP-IgG) 购自北京中山生物技术有限公司。羊抗鼠 IgA 抗血清购自美国 Sigma 公司，并自行添加生物素标记。HRP 标记

亲和素购自北京华美生物工程有限公司。小鼠细胞因子 γ 干扰素(IFN- γ)和白细胞介素 4(IL-4)ELISA 检测试剂盒购自深圳晶美生物工程有限公司。其它试剂均为国产分析纯。

4 质粒的构建、提取和纯化

4.1 构建 pcDNA3.1-SAG1-ROP2 质粒 参照文献[7, 8]的方法，构建质粒 pcDNA3.1-SAG1-ROP2，并进行酶切和 PCR 鉴定。

4.2 构建 pEASY-E1-LTB 质粒 采用常规的苯酚-氯仿法提取 *E. coli* 44815 株的 DNA，根据 LTB (登录号为 AF242418)序列设计引物，上、下游引物序列分别为 5'-CGCGGATCCATGAATAAAGT-3' 和 5'-CCGG-TACCCTAGTTTTCCATACT-3'。PCR 反应体系：模板 2 μ l(2 ng/ μ l)，上、下游引物各 1 μ l(10 nmol/ml)、*Taq* DNA 聚合酶反应缓冲液 12.5 μ l，加双氧水至 50 μ l。反应条件：94 $^{\circ}$ C 5 min；94 $^{\circ}$ C 30 s，55 $^{\circ}$ C 30 s，72 $^{\circ}$ C 30 s，35 个循环；72 $^{\circ}$ C 7 min。1.6%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。按试剂盒说明书操作，构建质粒 pEASY-E1 的 T/A 克隆。将质粒 pEASY-E1 和 LTB 基因扩增产物按摩尔比 5:1 建立连接体系，转化 *E. coli* DH5 α 获得重组表达载体，以 T7 启动子为上游引物，同 LTB 下游引物对该质粒进行 PCR 鉴定。

4.3 质粒 DNA 的大量提取与纯化 收集、扩增菌体^[9]，用质粒提取试剂盒大量提取质粒。

5 小鼠免疫

BALB/c 小鼠 88 只，按随机数字表法均分为 4 组，分别为 PBS 对照组(A 组)、空质粒对照组(B 组)、pcDNA3.1-SAG1-ROP2 组(C 组)和 pcDNA3.1-SAG1-ROP2+pEASY-E1-LTB 组(D 组)。接种采用鼻黏膜免疫方式。将各种质粒分别用 PBS 缓冲液稀释至 1 μ g/ μ l，B 组和 C 组分别接种 pcDNA3.1(-)和 pcDNA3.1-SAG1-ROP2，D 组接种 pcDNA3.1-SAG1-ROP2+pEASY-E1-LTB，每种质粒 20 μ l/(只·次)，A 组每次每只接种等体积 PBS。每组小鼠随机抽取 15 只，每周免疫 1 次，共 4 次，于末次免疫 2 周后眼眶内采血，分离血清；处死小鼠，制备脾淋巴细胞悬液，以 0.5 ml 含 0.25% 蛋白酶抑制剂的 PBS 溶液分别冲洗气管和小肠黏膜，收集冲洗液(约 0.5 ml)，分别用于血清 IgG 和 IgA 抗体、分泌型 IgA (sIgA)抗体、脾细胞上清液 IFN- γ 和 IL-4 细胞因子测定。每组余 7 只，每周免疫 1 次，共 3 次，于末次免疫后 4 周，用弓形虫 RH 株速殖子(1×10^3 /鼠)腹腔接种感染，观察各组小鼠的生存时间。

6 ELISA 检测小鼠血清 IgG

弓形虫速殖子裂解液用碳酸盐缓冲液稀释至 12.5 μg/ml, 包被 96 孔板 50 μl/孔。待测小鼠血清和二抗羊抗鼠 HRP-IgG 分别按 1:100 和 1:1 000 稀释, 均为 50 μl/孔。邻苯二胺 (OPD) 显色 20 min 后, 加入终止液 50 μl/孔, 测定吸光度 (A_{492} 值)。

7 生物素-亲和素酶联免疫吸附试验 (ABC-ELISA) 检测血清 IgA 和黏膜冲洗液 sIgA

弓形虫速殖子裂解液包被 96 孔酶标板 50 μl/孔, 分别加入小鼠血清或黏膜冲洗液 100 μl/孔, 37 °C 放置 1 h 后加入生物素标记的羊抗鼠 IgA 抗血清 (1:2 000) 100 μl/孔, 37 °C 1 h, 洗涤 3 次, 加入 HRP 标记的亲合素 (1:2 000) 100 μl/孔, OPD 底物显色 20 min 后, 加入终止液 50 μl/孔, 测定 A_{492} 值。

8 脾淋巴细胞培养上清中细胞因子 IFN-γ 和 IL-4 的测定

脾淋巴细胞悬液用台盼蓝染色计数活细胞应在 95% 以上。96 孔板中加入脾细胞悬液 5×10^5 /孔, 以及弓形虫可溶性速殖子抗原 (STAg, 10 μg/ml) 或伴刀豆球蛋白 A (ConA, 5 μg/ml) 50 μl/孔, 37 °C 培养 24 h, 收集细胞上清液, 1:2 稀释, 按试剂盒说明书检测 IFN-γ 和 IL-4 水平。

9 统计学分析

用 SPSS 11.5 软件对数据进行统计学分析。各组间抗体和细胞因子水平比较用单因素方差分析, 生存时间比较用 Kaplan-Meier 生存曲线法。

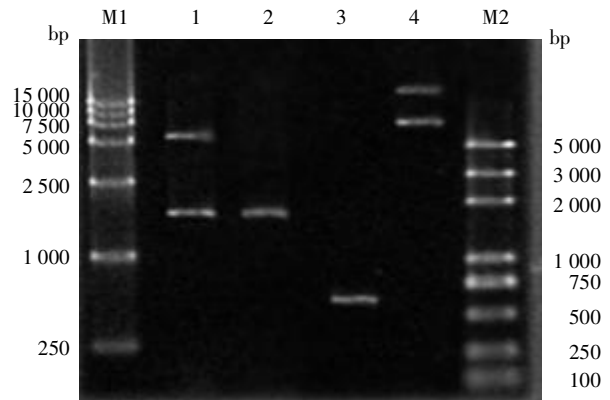
结 果

1 重组质粒 pcDNA3.1-SAG1-ROP2 和 pEASY-E1-LTB 的鉴定

重组质粒 pcDNA3.1-SAG1-ROP2 经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切以及 PCR 扩增鉴定, 目的片段均约为 1 800 bp, 与理论值相符。重组质粒 pEASY-E1-LTB 的 PCR 扩增产物的片段大小约为 520 bp (图 1)。

2 小鼠血清 IgG 和 IgA 以及黏膜冲洗液的 sIgA 水平

末次免疫后 2 周, D 组小鼠血清中 IgG 和 IgA 抗体水平以及气管和小肠黏膜冲洗液的 sIgA 抗体水平均显著高于其他各组 (均 $P < 0.01$), A_{492} 值分别为 (0.626±0.100)、(1.086±0.138) 和 (0.886±0.164), C 组的 IgG、IgA 和 sIgA 抗体水平亦显著高于 A 组和 B 组 (均 $P < 0.01$)。A 组和 B 组间差异无统计学意义 (均 $P < 0.01$) (表 1)。



M1: DNA 标志物 (DL 15000), 1: pcDNA3.1-SAG1-ROP2 双酶切, 2: pcDNA3.1-SAG1-ROP2 PCR 产物, 3: pEASY-E1-LTB PCR 产物, 4: pEASY-E1-LTB 重组质粒, M2: DNA 标志物 (DL 2000)。

M1: DNA marker (DL 15000), 1: pcDNA3.1-SAG1-ROP2 digested by *EcoR* I and *Hind* III, 2: PCR product of pcDNA3.1-SAG1-ROP2, 3: PCR product of pEASY-E1-LTB, 4: Recombinant pEASY-E1-LTB, M2: DNA marker (DL 2000)。

图 1 重组质粒 pcDNA3.1-SAG1-ROP2 和 pEASY-E1-LTB 的酶切和 PCR 鉴定

Fig.1 Identification of pcDNA3.1-SAG1-ROP2 and pEASY-E1-LTB by restriction endonuclease digestion and PCR analysis

表 1 小鼠血清抗体 IgG 和 IgA 以及黏膜冲洗液的 sIgA 水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Specific anti-*T. gondii* IgG and IgA antibodies in the sera and sIgA in the mucosa douche of mice ($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	A_{492} 值 A_{492} value		
	IgG	IgA	sIgA
A 组 Group A (PBS)	0.091±0.016	0.275±0.033	0.128±0.014
B 组 Group B [pcDNA3.1 (-)]	0.136±0.028	0.259±0.016	0.260±0.026
C 组 Group C (pcDNA3.1-SAG1-ROP2)	0.390±0.060*	0.671±0.055*	0.503±0.088*
D 组 Group D (pcDNA3.1-SAG1-ROP2 +pEASY-E1-LTB)	0.626±0.100*#	1.086±0.138*#	0.886±0.164*#

注: * 与 A 组和 B 组比较, 均 $P < 0.01$; # 与 C 组比较, $P < 0.01$ 。

Note: * Compared with groups A and B, $P < 0.01$; # Compared with group C, $P < 0.01$.

3 小鼠脾细胞培养上清中细胞因子测定

末次免疫后 2 周, D 组小鼠脾细胞培养上清中 IFN-γ 和 IL-4 水平均显著高于其他各组 (均 $P < 0.05$), 分别为 (2 017±266) 和 (203±31) pg/ml, C 组的 IFN-γ 水平显著高于 A 组和 B 组 (均 $P < 0.01$)。A、B 和 C 组的 IL-4 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 2)。

4 小鼠感染弓形虫速殖子后生存时间

各组小鼠均在感染后 13 d 内死亡。A、B、C 和 D 组小鼠的生存时间中位数分别为 3、4、6 和 10 d。D 组小鼠的生存时间长于其他各组 (均 $P < 0.05$), C 组的生存时间长于 A 组和 B 组 (均 $P < 0.05$), A 组和 B

组间差异无统计学意义($P>0.05$)(图 2)。

表 2 小鼠脾细胞上清中 IFN- γ 和 IL-4 水平 ($\bar{x}\pm s$)
Table 2 Level of IFN- γ and IL-4 in splenocyte culture supernatants from immunized mice ($\bar{x}\pm s$)

组别 Group	IFN- γ (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)
A 组 Group A (PBS)	38 \pm 3	34 \pm 5
B 组 Group B [pcDNA3.1 (-)]	39 \pm 2	36 \pm 7
C 组 Group C (pcDNA3.1-SAG1-ROP2)	1 271 \pm 82 [#]	46 \pm 9
D 组 Group D (pcDNA3.1-SAG1-ROP2 +pEASY-E1-LTB)	2 017 \pm 266 [*]	203 \pm 31 [*]

注: * 与其他各组比较,均 $P<0.01$; # 与 A 组和 B 组比较,均 $P<0.01$ 。
Note: * Compared with other groups, $P<0.01$; # Compared with groups A and B, $P<0.01$.

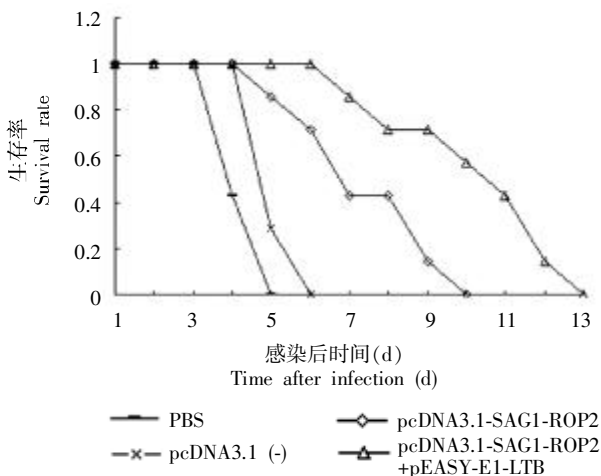


图 2 小鼠感染弓形虫速殖子后生存率曲线
Fig.2 Survival curves of mice challenged with *T. gondii* tachyzoites

讨 论

黏膜免疫在防御病原体从胃肠道侵入方面具有非常重要的地位。黏膜免疫不仅能促机体产生各黏膜系统的局部免疫反应,还能引起全身性的免疫反应。因此本研究采用黏膜免疫增强小鼠对弓形虫速殖子的免疫力。由于多数抗原经黏膜免疫后,免疫原性降低,且易被降解,常规免疫剂量通常无法刺激机体产生较强的免疫应答反应^[10]。因此研制有效的黏膜免疫疫苗,除确立有效的抗原成分外,还需选择合适的免疫佐剂。LT 是由产肠毒素 *E. coli* 分泌并存在于菌体周质中的一种外毒素,由 A、B 两种亚单位组成,其中 B 亚单位既有较强的免疫原性,又有较强的黏膜佐剂效应,且毒力小、安全性高,是最有潜力的黏膜免疫

佐剂之一。口服和鼻内接种 LT 均可诱导黏膜和全身性的免疫应答,且其诱导的黏膜免疫不局限于抗原沉积部位,在其他黏膜效应部位也有免疫应答产生,符合共同黏膜免疫系统理论^[11-14]。

本研究采用弓形虫速殖子表面抗原 SAG1 与 ROP2 基因定向连接并构建在同一真核表达载体,通过滴鼻免疫小鼠,LTB 作为免疫佐剂增强其免疫效果。真核表达载体 pcDNA3.1 含有人巨细胞病毒(CMV)高效启动子/增强子序列、牛生长激素基因(BGH)多聚腺苷酸等结构,其构建的 DNA 疫苗在黏膜免疫中具有良好的免疫效果^[15,16]。真核表达载体 pEASY-E1 利用 TA 克隆技术,克隆 PCR 产物于 T7 启动子,是外源基因在哺乳动物细胞内高效表达的良好载体。结果显示,弓形虫速殖子复合基因疫苗 pcDNA3.1-SAG1-ROP2 质粒和 pEASY-E1-LTB 质粒共同免疫较复合基因疫苗单独免疫具有更好的免疫效果,其不仅能刺激机体产生较强的系统免疫应答,而且还可诱导机体产生较强的局部黏膜免疫应答。弓形虫速殖子感染免疫中 CD₈⁺ T 细胞的细胞毒作用以及 T 辅助细胞 1(Th1) 型细胞因子(IFN- γ) 的作用占重要地位。后者可以活化巨噬细胞产生 α 肿瘤坏死因子(TNF- α),诱导产生 NO 效应并消耗速殖子赖以存活的细胞内色氨酸而起到杀灭速殖子的作用^[17-21]。此外,黏膜免疫中产生的 sIgA 不仅可聚集病原体,使之易于通过肠道蠕动或纤毛运动清除,而且还可以加强无炎性反应伴随的免疫进程;与 T 细胞结合的 sIgA 还能促进 IL-4、IL-10 和 β 转化生长因子(TGF- β)等细胞因子生成,保护黏膜屏障的完整^[22]。

参 考 文 献

- [1] Sibley LD. *Toxoplasma gondii*: Perfecting an Intracellular Life Style[M]. Traffic, 2003, 4(9): 581-586.
- [2] Kasper LH, Buzoni-Gatel D. Some opportunistic parasitic infections in AIDS: candidiasis, pneumocystosis, cryptosporidiosis, toxoplasmosis[J]. Parasitol Today, 1998, 14(4): 150-156.
- [3] Scheerlinck JY. Genetic adjuvants for DNA vaccines[J]. Vaccine, 2001, 19(17-19): 2647-1256.
- [4] Marcel M, Timothy J, Cynthia AL, et al. Modulation of humoral and cellular immune response in Abeta immunotherapy by the adjuvants monophosphoryl lipid A(MPL), cholera toxin B subunit (CTB) and *E. coli* enterotoxin LT (R192G)[J]. Vaccine, 2005, 23(44): 5149-5159.
- [5] Feng Q, Yang J, Luo P, et al. LT(K63/R72), a new mutant of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, exhibits characteristics more similar to LT (K63) than LT (R72) [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2005, 37(2): 126-132.
- [6] Toshiyasau S, Keiko S, Michio K, et al. A mutant of *Escherichia coli* enterotoxin inducing a specific Th1-type of T cells to varicella-zoster vaccine enhances the production IL-12 by IFN- γ stimulated macrophages[J]. Vaccine, 2006, 24(18): 3719-3726.
- [7] Yang TT, He SY, Jiang H, et al. Construction of monovalent and compound nucleic acid vaccines against *Toxoplasma gondii* with gene encoding p30[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2005, 23(1): 14-17. (in Chinese)

- (杨婷婷, 何深一, 蒋华, 等. 弓形虫主要表面抗原 p30 单价及复合基因疫苗的构建[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(1): 14-17.)
- [8] Yang TT, He SY, Zhang JQ, *et al.* Observation on the efficiency of the monovalent SAG1 and compound SAG1-ROP2 DNA vaccine against *Toxoplasma gondii* infections[J]. Chin J Zoonoses, 2005, 21(5): 410-413. (in Chinese)
(杨婷婷, 何深一, 张加勤, 等. 弓形虫 SAG1 单基因疫苗与 SAG1-ROP2 复合基因疫苗的免疫效果观察[J]. 中国人兽共患病杂志, 2005, 21(5): 410-413.)
- [9] Lu SD. Current Protocols for Molecular Biology[M]. 3rd ed. Beijing: Peking Union Medical College Press, 1999: 115-116. (in Chinese)
(卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第 3 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999: 115-116.)
- [10] Challacombe S, Tomasi TB Jr. Systemic tolerance and secretory immunity after oral immunization[J]. J Exp Med, 1980, 152(6): 1459-1472.
- [11] Li WJ, Zou QM. Review of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) heat-labile enterotoxin (LT) as mucosal immunoadjuvant[J]. J Immunol, 2000, 16(4): 85-87. (in Chinese)
(李文建, 邹全明. 粘膜免疫佐剂: 肠产毒性大肠杆菌不耐热肠毒素(LT)研究进展[J]. 免疫学杂志, 2000, 16(4): 85-87.)
- [12] Richard W, Bruno G, Weltzin R, *et al.* Parenteral adjuvant activities of *Escherichia coli* heat-labile toxin and its B subunit for immunization of mice against gastric *Helicobacter pylori* infection[J]. Infect Immun, 2000, 68(5): 2775-2782.
- [13] Ogra PL, Faden H, Welliver RC, *et al.* Vaccination strategies for mucosal immune responses[J]. Clin Micro Rev, 2001, 14(2): 430-445.
- [14] Holmgren J, Czerkinsky C, Eriksson K, *et al.* Mucosal immunisation and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges[J]. Vaccine, 2003, 21(Suppl 2): S89-S95.
- [15] Zhang YL, Cao LY, Cai ZJ, *et al.* Studies on pcDNA3-MIC3 nucleic acid vaccine of *Toxoplasma gondii* GJS strain [J]. Chin J Vet Sci, 2009, 29(10): 1299-1302. (in Chinese)
(张燕丽, 曹丽艳, 蔡志杰, 等. 弓形虫 GJS 株 pcDNA3-MIC3 核酸疫苗的研究[J]. 中国兽医学报, 2009, 29(10): 1299-1302.)
- [16] Wang HX, He SY, Yao Y, *et al.* *Toxoplasma gondii*: protective effect of an intranasal SAG1 and MIC4 DNA vaccine in mice [J]. Exp Parasitol, 2009, 122(3): 226-232.
- [17] Alberto F, Alexandro R, Sergio O, *et al.* Protective effect of a naked DNA vaccine cocktail against lethal toxoplasmosis in mice [J]. Vaccine, 2003, 21(13-14): 1327-1335.
- [18] Li XR, Wang YH, Zhao XZ, *et al.* Update on host cell invasion by *Toxoplasma gondii*[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2007, 25(2): 154-157. (in Chinese)
(李学瑞, 王艳华, 赵象忠, 等. 弓形虫侵入宿主细胞的研究进展[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007, 25(2): 154-157.)
- [19] Brecht S, Carruthers VB, Ferguson DJ, *et al.* The *Toxoplasma* micronemal protein MIC4 is an adhesin composed of six conserved apple domains[J]. J Biol Chem, 2001, 276(6): 4119-4127.
- [20] McCluskie MJ, Davis HL. Novel strategies using DNA for the induction of mucosal immunity[J]. Crit Rev Immunol, 1999, 19(4): 303-329.
- [21] Roman M, Elena MO, Goodman JS, *et al.* Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants[J]. Nature Med, 1997, 3(8): 849-854.
- [22] Wang XD, Huang ZH. The role of the secretory IgA in intestinal immune system[J]. Int J Dig Dis, 2006, 26(5): 339-341. (in Chinese)
(王晓东, 黄志华. sIgA 在肠道免疫中的作用[J]. 国际消化病杂志, 2006, 26(5): 339-341.)

(收稿日期: 2009-09-01 编辑: 瞿麟平)

文章编号: 1000-7423(2010)-02-0119-02

【病例报告】

儿童重度感染尖吻蝮蛇舌状虫 1 例

叶芳¹, 姚敏华¹, 顾伟忠¹, 毛亚飞², 杨秀珍¹, 朱传雷¹

中图分类号: R53

文献标识码: D

蛇舌状虫病是罕见的人兽共患病, 2009 年我院收治 1 例重度蛇舌状虫感染患儿, 中医中药治疗随访至今, 报告如下。

1 临床资料

患儿, 女, 3 岁 4 个月, 浙江省桐庐县人。2009 年 2 月 24 日因高热 3 d, 以“上呼吸道感染, 败血症?”入院。体检: 腋温 37.8 °C, 体重 15 kg, 精神差, 面色苍白, 咽稍充血, 两肺呼吸音粗, 腹胀, 腹肌紧张, 肝肋下 4 cm。入院第 2 天起出现腹胀, 呈进行性加重, 腹围最高达 56 cm。实验室检查: 血红蛋白 62~80 g/L, 白细胞(17.0~20.5)×10⁹/L, 嗜酸粒细胞 5.7%~9.1%, 嗜酸粒细胞绝对值 (0.58~1.15)×10⁹/L, 嗜碱粒细胞 0.2%~1.3%, 嗜碱粒细胞绝对值 (0.03~0.36)×10⁹/L。入院第 7 天, 胸部 CT 示两肺多发小结节, 上纵膈淋巴结肿大; 腹部 B 超提示中腹部和右下腹有多个形态异常的淋巴结, 内见多个粗大的钙化点回声; 腹部磁共振检查(MRI)显示腹壁、肝

脏和肠壁弥漫性结节状病灶, 肠系膜上广泛淋巴结肿大, 腹腔积液。排除结核、肿瘤和细菌病毒感染等疾病后, 考虑可能为寄生虫感染。但家属未提供相关流行病学史, 入院第 10 天将其血清送至浙江省防疫站检测血吸虫、卫氏并殖吸虫和华支睾吸虫等寄生虫抗体(深圳康百得生物科技有限公司的诊断试剂), 均显示为阴性, 且嗜酸粒细胞计数正常。

入院后给予阿奇霉素、哌拉西林钠他唑巴坦钠、亚胺培南西司他丁钠、万古霉素和阿莫西林钠舒巴坦钠等抗生素控制感染及对症支持治疗, 临床症状加重。为明确诊断, 入院第 13 天在全麻下行腹腔镜活检, 腹腔内见大量黄色液体, 腹壁和肠壁上密布粟米状肉芽组织, 切取肉芽组织送检。病理报告显示, 肉芽组织内见寄生虫虫体, 且其周围有大量炎性细胞浸润, 以嗜酸粒细胞为主, 考虑为腹壁和肠壁寄生虫肉芽肿性炎, 符合舌状虫感染(图 1)。反复追问家属, 得知患儿发病前 3 个月, 曾将蕲蛇腹腔内的活寄生虫一条剪半用两胶囊包裹后服用, 其中一胶囊被吐出。随后, 将其血液送至中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 以蛇舌状虫抗原所制备的试剂检测抗体结果为阳性。结合患儿病史、病理报告、抗体检

作者单位: 1 浙江大学医学院附属儿童医院, 杭州 310003;

2 浙江大学医学院病原生物学教研室, 杭州 310031