

我们已经建立伯氏疟原虫转染方法并能有效地对伯氏疟原虫进行基因转染。

从转染的疟原虫中已扩增到 GFP 基因及由 PbMSP1 1.4 kb 和 Pf 330 bp 组成的杂合片段,这表明转染质粒确已插入伯氏疟原虫基因组。但我们采用 PbMSP1 内源性序列的引物(Tb')与 Tf 进行 PCR 扩增,结果未能产生扩增条带。这可能是由于重组质粒没有整合入 PbMSP1 中,而是通过同源重组插入 Pb DHFR-TS 基因或随机插入染色体中。

[参考文献]

[1] Waters AP, Thomas AW, van Dijk MR, et al. Transfection of malaria parasites[J]. *Methods*, 1997, 13(2):134-147.

[2] Ménard R, Janse C. Gene targeting in malaria parasites[J]. *Methods*, 1997, 13(2):148-157.

[3] O'Donnell RA, Saul A, Cowman AF, et al. Functional conservation of the malaria vaccine antigen MSP-1₁₉ across distantly

related *Plasmodium* species[J]. *Nat Med*, 2000, 6(1):91-95.

[4] O'Donnell RA, de Koning-Ward TF, Burt RA, et al. Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-1₁₉ are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria[J]. *J Exp Med*, 2001, 193(12):1403-1412.

[5] Sultan AA, Thathy V, Nussenzweig V, et al. Green fluorescent protein as a marker in *Plasmodium berghei* transformation[J]. *Infect Immun*, 1999, 67(5):2602-2606.

[6] Wu Y, Sifri CD, Lei HH, et al. Transfection of *Plasmodium falciparum* within human red blood cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(4):973-977.

[7] Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)[J]. *Gene*, 1996, 173(1 Spec No):33-38.

[8] de Koning-Ward TF, Thomas AW, Waters AP, et al. Stable expression of green fluorescent protein in blood and mosquito stages of *Plasmodium berghei* [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1998, 97(1-2):247-252.

[收稿日期] 2003-11-27 [修回日期] 2003-12-16
[本文编辑] 尹 茶

• 研究简报 •

卡介苗对哮喘小鼠淋巴细胞凋亡的影响

Effect of BCG on lymphocytes apoptosis in athmatic BALB/c mice

余衍亮¹, 孙秀明¹, 李翠莉¹, 雷亿群¹, 黎露刚²

(1. 解放军第 414 医院呼吸内科, 南京 210015; 2. 南京军医科学院预防医学教研室, 南京 210049)

[关键词] 卡介苗; 哮喘; 淋巴细胞; 凋亡

[中图分类号] R 562.25 [文献标识码] B [文章编号] 0258-879X(2004)01-0028-01

变应性哮喘的主要特征是嗜酸粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞在肺内募集导致的气道慢性炎症,其中 CD4⁺辅助细胞在哮喘气道炎症的发生发展中起关键作用。研究^[1,2]证明,卡介苗(BCG)有明显的防治哮喘的作用。本研究就哮喘小鼠淋巴细胞的凋亡与 BCG 之间的关系进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 10 周龄 BALB/c 小鼠 30 只,雌雄不限,体质量(10±2)g,南京大学动物部提供。722 型分光光度仪(上海光学分析仪器厂);自制小鼠雾化吸入箱;卵蛋白干粉(OVA,美国 Sigma 公司);BCG(上海生物制药厂);荧光显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 哮喘模型制作 30 只小鼠随机分为 3 组(每组 10 只),分别为阴性对照组(N)、阳性对照组(C)、BCG(B)组。N 组小鼠腹腔注射生理盐水 0.1 ml,14 d 后用 37℃生理盐水雾化吸入,共 3 d,1 次/d,每次 30 min;C 组小鼠腹腔注射 10% OVA 0.1 ml,14 d 后以 1%OVA 超声雾化吸入(通过雾化吸入箱 15 min 后再放入小鼠持续雾化 30 min 激发),连续 3 d,观察小鼠反应,以烦躁不安、呼吸急促、腹肌抽搐、两便失禁

为阳性反应;B 组哮喘模型制作同 C 组,但每次雾化吸入前 30 min 每只分别腹腔注射 BCG 0.04 mg。

1.3 淋巴细胞凋亡率及 DNA 损伤率的检测 激发 3 次后用 25%乌拉坦 0.15 ml 肌注麻醉并处死小鼠,取外周血 1 ml,以淋巴细胞分离液分离淋巴细胞,用 Comet 法查淋巴细胞凋亡率^[3](即呈彗星状的凋亡淋巴细胞在 100 个淋巴细胞中所占的百分率),用二甲苯胺法^[4]计量 DNA 损伤率(即裂解的 DNA 与完整的 DNA 和裂解的 DNA 之和的比值);同时游离气管,横切环状软骨,置入连接注射器的硅胶管,分 3 次分别缓慢注入 37℃去钙、镁离子的 Hank 平衡液 0.7、0.6、0.5 ml,每次灌注后立即抽吸,收集支气管肺泡灌洗液(BALF)1 ml,离心后沉淀物加入淋巴细胞分离液提取淋巴细胞,测淋巴细胞凋亡率及 DNA 损伤率。

1.4 统计学处理 用 SPSS 统计软件。

(下转第 33 页)

[作者简介] 余衍亮(1962-),男(汉族),主治医师。
E-mail:yutong32@sina.com

antigen monospecifically recognized by antibodies from mice protectively immunized with a nonliving vaccine [J]. *J Immunol*, 1986, 137(11):3593-3600.

[7] Sher A, Pearce E, Hieny S, et al. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by a nonliving vaccine. IV. Fractionation and antigenic properties of a soluble adult worm immunoprophylactic activity [J]. *J Immunol*, 1986, 136(10):3878-3883.

[8] 周生华, 刘述先, 宋光承, 等. 日本血吸虫副肌球蛋白全基因克隆、测序及体内表达[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1999, 17(14):196-199.

Zhou SH, Liu SX, Song GC, et al. Cloning, sequencing and expression of the full-length gene encoding paramyosin of *Schistosoma japonicum* in vivo [J]. *Zhongguo Jishengchongxue Yu Jishengchongbing Zazhi (Chin J Parasitol Parasit Dis)*, 1999, 17(4):196-199.

[9] 周金春, 易新元, Kalinna BH, 等. 重组日本血吸虫副肌球蛋白

的表达与纯化[J]. 湖南医科大学学报, 2000, 25(2):106-108.

Zhou JC, Yi XY, Kalinna BH, et al. Expression and purification of recombinant *Schistosoma japonicum* paramyosin [J]. *Hunan Yike Daxue Xuebao (Acad J Hunan Med Univ)*, 2000, 25(2):106-108.

[10] James SL, Salzman C, Pearce EJ. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by a non-living vaccine. VI. Antigen recognition by non-responder mouse strains [J]. *Parasite Immunol*, 1988, 10(1):71-83.

[11] Scalzo AA, Elliott SL, Cox J, et al. Induction of protective cytotoxic T cells to murine cytomegalovirus by using a nonapeptide and a human-compatible adjuvant (Montanide ISA720) [J]. *J Virol*, 1995, 69(2):1306-1309.

[12] Cox JC, Coulter AR. Adjuvants-a classification and review of their modes of action [J]. *Vaccine*, 1997, 15(3):248-256.

[收稿日期] 2003-09-19 [修回日期] 2003-12-03
[本文编辑] 尹 茶

(上接第 28 页)

2 结果

实验中 C 组小鼠出现以烦躁不安、呼吸急促、腹肌抽搐、

两便失禁为典型哮喘症状者 30 只(次),且逐渐加重;B 组出现哮喘症状的小鼠 18 只(次),症状比 C 组轻,两组相比有显著差别($P < 0.01$);N 组无哮喘症状。B 组和 N 组淋巴细胞凋亡率和 DNA 损伤率明显高于 C 组($P < 0.01$),表 1)。

表 1 外周血和 BALF 中淋巴细胞凋亡率及 DNA 损伤率结果分析

($n=10, \bar{x} \pm s, \%$)

组别	外周血		BALF	
	淋巴细胞凋亡率	DNA 损伤率	淋巴细胞凋亡率	DNA 损伤率
N	5.00 ± 0.99**	9.17 ± 0.18**	3.23 ± 0.63**	5.50 ± 1.55**
C	2.15 ± 0.44	7.22 ± 0.66	1.08 ± 0.69	3.82 ± 0.56
B	4.02 ± 0.30**	9.36 ± 0.15**	2.70 ± 0.82**	5.80 ± 0.87**

** $P < 0.01$ 与 C 组比较

3 讨论

Th₁/Th₂ 平衡失调、Th₂ 细胞活性亢进,是哮喘发病的重要基础。BCG 有强大的诱发 Th₀ 向 Th₁ 转化的作用。Ohta 等^[5]指出,哮喘发作时,淋巴细胞及嗜酸粒细胞的凋亡指数明显下降, Th₂ 分泌的细胞因子 IL-5 与凋亡指数呈负相关,而 Th₁ 分泌的细胞因子 IFN- γ 等有抑制 Th₂ 细胞活性及降低其分泌细胞因子的作用。炎性细胞在气道的浸润是哮喘的发病基础,加快淋巴细胞及嗜酸粒细胞等炎性细胞的凋亡率,可以防治哮喘或促进哮喘症状的好转。

Wang 等^[1]研究证实,BCG 能明显抑制嗜酸粒细胞、淋巴细胞等向支气管及肺组织中浸润,抑制 IL-4、IL-5、IgE 的合成,达到良好的防治哮喘的效果。Kumar 等^[2]研究发现,BCG 能促进 BALB/c 小鼠 Th₂ 细胞分泌 IFN- γ , 促进 Th₀ 向 Th₁ 方向转化,抑制 Th₂ 及其细胞因子的生产,达到确切的防治哮喘的效果。

本研究显示,BCG 能使哮喘模型小鼠外周血及 BALF 中的淋巴细胞凋亡率和 DNA 损伤率明显升高($P < 0.01$),哮喘症状明显减轻,提示 BCG 通过促进炎症细胞的凋亡而

发挥了良好的防治哮喘的作用。

[参考文献]

[1] Wang CC, Rook WA. Inhibition of an established allergic response to ovalbumin in BALB/c mice by killed *Mycobacterium vaccae* [J]. *Immunology*, 1998, 93(1):307-313.

[2] Kumar M, Behera AK, Matsuse H, et al. Recombinant BCG vaccine generates a TH1-like response and inhibits IgE synthesis in BALB/c mice [J]. *J Immunol*, 1999, 97(1):515-521.

[3] Klaude O, Eriksson S, Nygren J, et al. The comet assay: mechanisms and technical considerations [J]. *Mut Res*, 1996, 363(1):89-96.

[4] 张世馥, 林彭年. 细胞器及细胞间质的分离技术 [A]. 见: 张均田 主编. 现代药理实验方法 [M]. 北京: 北京医科大学·中国协和医科大学联合出版社, 1998. 277-294.

[5] Ohta K, Yamashita N. Apoptosis of eosinophils and lymphocytes in allergic inflammation [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1999, 104(1):14-21.

[收稿日期] 2003-07-14 [修回日期] 2003 11 27
[本文编辑] 孙 岩