

## 修饰后日本血吸虫 *Sjc-97* 基因的真核表达及其免疫原性

钱磊<sup>1,2</sup>, 张冬梅<sup>1</sup>, 庄英萍<sup>2</sup>, 邢金花<sup>1,2</sup>, 周爱国<sup>1</sup>, 潘卫庆<sup>1\*</sup>

(1. 第二军医大学基础医学部病原生物学教研室, 上海 200433; 2. 华东理工大学生物工程学院, 上海 200237)

**[摘要]** **目的:** 研究日本血吸虫大陆株副肌球蛋白基因第3区域片段(*Sjc-97f3*)毕氏酵母表达产物的免疫原性。**方法:** 根据毕氏酵母密码子使用频率重新设计 *Sjc-97* 核苷酸序列, 依据不对称 PCR 原理人工合成 *Sjc-97f3*, 并在毕氏酵母中表达。表达产物通过 Ni-NTA 亲和层析和凝胶过滤层析方法纯化, 再分别与 ISA720 和 Al(OH)<sub>3</sub> 佐剂乳化后, 免疫 C57BL/6 和昆明小鼠, 通过尾蚴膜反应和 ELISA 反应检测特异性抗体。**结果:** *Sjc-97f3* 基因在毕氏酵母中获得了高水平分泌表达, 其表达产物能与日本血吸虫免疫血清进行特异性免疫反应。经与佐剂乳化后, 该蛋白具有良好的免疫原性。ELISA 结果显示重组蛋白在小鼠体内可激发明显的抗体反应, 但 2 种佐剂所诱导的抗体水平以 ISA720 佐剂为高; 该抗原在不同品系小鼠中的抗体水平存在显著差异 ( $P < 0.01$ ), 昆明鼠的抗血清滴度远高于 C57BL/6 小鼠。小鼠免疫血清能识别日本血吸虫表面抗原, 产生特异的尾蚴膜反应。**结论:** 密码子优化的 *Sjc-97f3* 在毕氏酵母中获得高效表达, 其产物具有良好的免疫原性。

**[关键词]** 日本血吸虫; 副肌球蛋白; 毕氏酵母; 基因表达; 免疫原性

**[中图分类号]** R 383.24 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)01-0029-05

### Expression and immunogenicity of redesigned *Schistosoma japonicum Sjc-97* gene in *Pichia pastoris*

QIAN Lei<sup>1,2</sup>, ZHANG Dong-Mei<sup>1</sup>, ZHUANG Ying-Ping<sup>2</sup>, XING Jin-Hua<sup>1,2</sup>, ZHOU Ai-Guo<sup>1</sup>, PAN Wei-Qing<sup>1\*</sup> (1. Department of Etiological Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. College of Biotechnology Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To determine the immunogenicity of recombinant *Schistosoma japonicum Sjc-97f3* protein expressed in *Pichia pastoris*. **Methods:** The DNA sequence of *Sjc-97f3* was redesigned by yeast *Pichia* preferential codon usage, synthesized by asymmetric PCR-based method, and expressed in *Pichia pastoris*. The recombinant protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography and gel filtration chromatography. The inbred C57BL/6 strains and outbred KM strains of mice were subcutaneously immunized with the protein formulated by either adjuvant ISA720 or aluminium hydroxide. The specific antibodies were detected by cercarian huellen reaction and ELISA analysis. **Results:** The *Sjc-97* gene was successfully expressed in *Pichia pastoris* and the product reacted with anti Sj-97 serum. It was shown that the protein was highly immunogenic after reaction with adjuvants in mice. Moreover, the antibody level induced by rSjc-97f3-ISA720 was higher than that by rSjc-97f3-aluminium hydroxide. KM mice generated significantly higher level of the antibody compared to C57BL/6 strain of mice ( $P < 0.01$ ). Cercarian huellen reaction indicated that the immune sera recognized the antigen on the surface of parasite. **Conclusion:** The codon-optimised *Sjc-97f3* can be successfully expressed in *Pichia pastoris* and the recombinant protein is highly immunogenic in mice.

**[KEY WORDS]** *Schistosoma japonicum*; paramyosin; *Pichia pastoris*; gene expression; immunogenicity

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(1): 29-33]

血吸虫病是一种人畜共患寄生虫病, 主要流行于亚洲、非洲和拉丁美洲, 目前全球仍有近 2 亿人收到不同程度的感染<sup>[1]</sup>。危害人体的血吸虫有 6 种, 流行于我国的为日本血吸虫。近年来, 对血吸虫病疫苗的研制日益受到重视。日本血吸虫副肌球蛋白(Sj-97)是世界卫生组织推荐优先发展的血吸虫病疫苗候选抗原<sup>[1]</sup>, 该蛋白分布于成虫、尾蚴及童虫的肌肉组织、肺期童虫的体被基层和体表以及尾蚴腹吸盘部位<sup>[2,3]</sup>。本研究选用日本血吸虫大陆株副肌球蛋白(Sjc-97)序列, 采用毕氏酵母(*Pichia pastoris*)密码子重新设计并合成了 *Sjc-97* 第 3 区域片段(*Sjc-*

*97f3*), 并在毕氏酵母中进行表达, 用纯化蛋白进行免疫原性研究。

### 1 材料和方法

1.1 菌株、质粒及其他 大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$  株, 质粒 pBluescript II KS (+) 由本实验室保存; 毕氏酵母 GS115、SMD1168 株, 质粒 pPIC9、pPIC9K 购自 Invitrogen 公司。

**[基金项目]** 世界卫生组织专项基金(IDA 109915)。

**[作者简介]** 钱磊(1974-), 男(汉族), 硕士生。

\* Corresponding author. E-mail: malaria@guomai.sh.cn

各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 MBI Fermentas 公司,高保真 DNA 聚合酶购自 Roche 公司,Taq DNA 聚合酶、胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自上海博彩生物科技有限公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔、羊抗鼠 IgG 购自华美生物工程公司,Montanide ISA720 佐剂购自 SEPPIC 公司。兔抗 Sjc-97 血清由澳大利亚昆士兰医学研究所 McManus DP 教授惠赠。

1.2 实验动物 C57BL/6 和昆明品系小鼠(8 周龄,雌性)购自中国科学院上海实验动物中心,阳性钉螺购自中国疾病预防控制中心上海寄生虫病预防控制所。

1.3 基因片段的设计与改造 综合 PHD 系列程序和 PSIPRED 程序对 Sjc-97 蛋白质空间结构的分析,将蛋白分为 4 个区域,相应引入 3 个限制性内切酶酶切位点;在各片段的 3' 端添加 6 个组氨酸密码子以便于通过 Ni-NTA 柱纯化表达产物,并添加 2 个终止密码子以确保翻译的正常终止;为便于基因克隆与表达,在各片段的 5' 端添加 BamH I、Xho I 酶切位元点及部分  $\alpha$ -factor 信号肽序列,在 3' 端添加 EcoR I、Cla I 酶切位点。本研究对第 3 区域片段(Sjc-97f3)进行合成、表达及免疫学试验。

根据日本血吸虫大陆株副肌球蛋白(Sjc-97)氨基酸序列(GenBank 登记号 AAD29285),选用毕氏酵母偏爱密码子对 Sjc-97 编码序列进行重新设计。利用 OMIGA、DNASTAR 等软件对设计后的序列进行分析,用同义密码子替换以消除各种影响基因转录、翻译的序列,如转录终止序列、内含子剪切序列等。

1.4 Sjc-97f3 的合成与克隆 根据 Sjc-97f3 序列由上海生工生物工程公司合成 8 条长度约 120 个碱基、彼此有约 20 个碱基重复区的寡核苷酸链,通过不对称 PCR 技术<sup>[4]</sup>合成 Sjc-97f3 片段。PCR 产物经 BamH I 和 Cla I 双酶切克隆至载体 pBluescript II KS(+),经 PCR 和酶切鉴定阳性克隆,由上海基康生物技术有限公司测序。目的片段通过 Xho I 和 EcoR I 位点亚克隆至载体 pPIC9,再通过 BamH I 和 EcoR I 位点将其亚克隆至表达载体 pPIC9K。

1.5 毕氏酵母的电穿孔转化、筛选及诱导表达与纯化 将活化的毕氏酵母菌株 GS115 接于 250 ml YPD 培养基(yeast extract peptone dextrose medium),于 30℃ 振荡培养至  $D_{600}=1.5$ ,5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,用 250 ml 预冷的灭菌水洗涂菌体 2 次,离心弃上清;用 20 ml 预冷的 1 mol/L 山梨醇悬浮,离心(条件同上)后,用 1 ml 预冷的 1

mol/L 山梨醇悬浮菌体。取 10  $\mu$ g 经 Sac I 酶切线性化的重组表达质粒,加入 90  $\mu$ l 感受态细胞,于 0.2 cm 转化杯中,在电压 1 500 V、电容 25  $\mu$ F、电阻 200  $\Omega$  条件下,用 Bio-Red GenePulser 电导仪电击转化。电击后立即加入 600  $\mu$ l 预冷的 1 mol/L 山梨醇,取 200  $\mu$ l 涂布 RDB 平板(regeneration dextrose medium),于 30℃ 倒置培养至转化子出现。将各转化子转移至 G418 终浓度分别为 0.25、1.0、1.5、2.0 mg/ml 的 YPD 平板上,挑选在高浓度 YPD-G418 平板上生长的菌落用于表达研究。

将筛选到的克隆接种入液体 MGY 培养基(minimal glycerol medium)中,30℃ 振荡培养至  $D_{600}=2\sim 6$ ,3 000 r/min 离心收集菌体,用 BMMY 培养基(buffered methanol-complex medium)悬浮,使  $D_{600}=1.0$ ,30℃ 振荡培养,每 24 h 补加甲醇使其终浓度为 0.5%,每隔 12 h 取样分析。将各样品高速离心,取上清经 13% SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色分析;Western 印迹检验蛋白表达产物,一抗为兔抗 Sjc-97 血清,二抗为羊抗兔碱性磷酸酶(AP)标记 IgG,用 NBT/BCIP 底物显色。

将培养物上清液在透析袋内透析过夜后,以 3 ml/min 流速过 Ni-NTA 柱,再先后以冲洗缓冲液(50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑,pH 8.0)和洗脱缓冲液(50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mmol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑)洗涤柱床,分部收集。所得产物进一步通过凝胶过滤层析纯化。

1.6 动物免疫实验 将 C57BL/6 和昆明种小鼠分别随机分组,每组 5 只,经后肢皮下注射纯化蛋白 20  $\mu$ g,注射体积 200  $\mu$ l,佐剂选用 ISA720 和 Al(OH)<sub>3</sub>;空白组以磷酸缓冲液(PBS)代替蛋白抗原。分别于第 0、3、6 周注射抗原,初次免疫前及每次免疫 2 周后取血,分离血清。

1.7 尾蚴膜反应 按常规方法于 25℃ 自阳性钉螺中释放尾蚴,尾蚴释放 6 h 内进行尾蚴膜反应检验重组蛋白免疫小鼠产生的血清与尾蚴的结合状况。选取 rSjc-97f3 末次免疫昆明鼠后所得的混合血清与尾蚴反应,阳性对照为尾蚴攻击感染兔所得血清,阴性对照为佐剂对照组混合血清。37℃ 反应过夜,显微镜下观察特异性抗体与尾蚴的反应。

1.8 ELISA 法检测特异性抗体 蛋白抗原稀释至 1  $\mu$ g/ml,每孔 100  $\mu$ l,4℃ 包被过夜;以含 0.1% 吐温-20 的磷酸缓冲液(PBST)洗板 3 次后,加入梯度稀释的待测血清,每孔 100  $\mu$ l,设 3 复孔,37℃ 孵育 1 h;PBST 洗板 3 次后,加入 HRP 标记羊抗鼠 IgG,

每孔 100  $\mu$ l, 37 C 孵育 1 h; PBST 洗板 3 次后, 加入四甲基联苯胺-过氧化氢尿素底物, 每孔 100  $\mu$ l, 室温反应 6 min 后, 每孔加入 50  $\mu$ l 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 以终止反应。经 Bio-Tek ELX800 酶标仪于 450 nm 读取光密度值。

1.9 统计学处理 组间比较采用双样本等方差 *t* 检验。

## 2 结果

2.1 基因序列的设计与改造 *Sjc-97* 基因全长 2 601 bp, 编码 866 个氨基酸, 相对分子质量 97 000。预测结果表明 *Sjc-97* 为非球形蛋白, 二级结构 90% 以上为  $\alpha$ -螺旋结构。我们选择在非  $\alpha$ -螺旋结构区域将全基因拆分为彼此之间有重复区的 4 个基因片段, 利用同义密码子替换在 3 个拆分点设计产生限制性内切酶识别位点, 便于不同片段的组合以及全基因的拼接; 3 个内切酶位点分别为 *Xba* I<sub>715</sub>、*Hind* III<sub>1328</sub> 和 *Drd* I<sub>1954</sub> (图 1)。蛋白质一级结构分析显示, 存在 2 个糖基化位点 (Asn-X-Ser/Thr), 因此以谷氨酰胺密码子替换天冬酰胺密码子, 避免外源蛋白在毕氏酵母中分泌表达时发生过度糖基化。

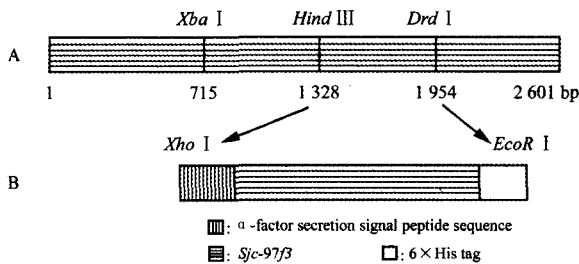


图 1 *Sjc-97f3* 合成基因示意图

Fig 1 Schematic diagram of synthetic *Sjc-97f3*

A: *Sjc-97* entire gene (2 600 bp); B: *Sjc-97f3* gene fragment

2.2 *Sjc-97f3* 的合成与克隆 不对称 PCR 合成产物经 1% 琼脂糖胶电泳后, 在约 750 bp 处可见明显的扩增产物条带, 与理论扩增产物长度吻合。PCR 产物回收后用 *Bam*H I 和 *Cla* I 酶切, 克隆至载体 pBluescript II KS (+)。挑选阳性克隆并抽取质粒 DNA, 用 *Bam*H I 和 *Cla* I 酶切鉴定, 电泳结果显示插入片段大小与预期值相符 (图 2), DNA 测序表明插入片段序列正确, 重组质粒命名为 pKS-r*Sjc-97f3*。

2.3 *Sjc-97f3* 的表达 通过不同浓度 G418 的筛选, 在含 2 mg/ml G418 的 YPD 平板上获得阳性转化子。挑取克隆在 BMMY 培养基中诱导表达, 经 SDS-PAGE 电泳后, 在相对分子质量约 28 000 处

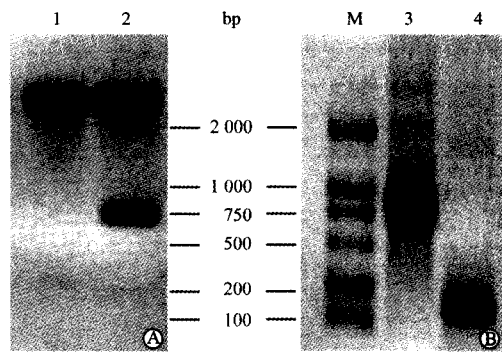


图 2 重组质粒 pKS-r*Sjc-97f3* 酶切及 PCR 鉴定的电泳分析图

Fig 2 Agarose gel electrophoresis analysis of recombinant plasmid pKS-r*Sjc-97f3*

A: Restriction analysis; B: PCR identification; M: Marker; 1: pKS/*Bam*H I + *Cla* I; 2: pKS-r*Sjc-97f3*/*Bam*H I + *Cla* I; 3: PCR products of pKS-r*Sjc-97f3*; 4: PCR products of pKS

有一特异条带, 与预期相对分子质量相符, 该条带在诱导前及对照组中均未出现。该重组蛋白表达量随诱导时间延长而逐步提高, 至 72 h 达最高点。蛋白免疫印迹实验显示与 *Sj-97* 免疫兔血清有强阳性反应 (图 3)。

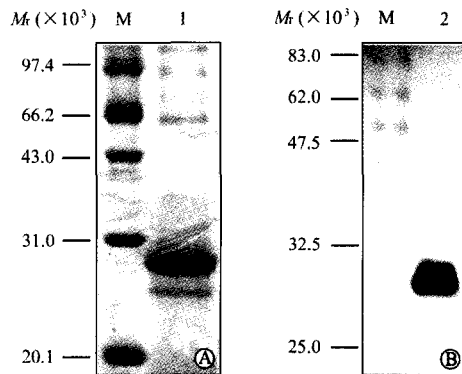


图 3 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析 *Sjc-97f3* 表达产物

Fig 3 SDS-PAGE and Western blot analysis of expressed products of *Sjc-97f3*

M: Marker; 1: Expression of *Sjc-97f3* after induction; 2: Western blot of *Sjc-97f3*

2.4 *Sjc-97f3* 的免疫原性 以纯化获得的纯度在 95% 以上的重组蛋白进行动物免疫实验。见表 1, 2 种小鼠均产生很强的免疫应答反应, 2 种佐剂所诱导的抗体水平以 ISA720 组为高, 比 Al(OH)<sub>3</sub> 佐剂组抗体滴度高出约 1 倍。此外, 不同品系小鼠对 *Sjc-97f3* 抗原的应答反应存在显著差异 ( $P < 0.01$ ), 昆明鼠的抗血清滴度约为 C57BL/6 系小鼠的 3~4 倍。

表 1 ELISA 检测小鼠免疫血清总抗体滴度

Tab 1 Antibody titer of immune sera detected by ELISA

(n=5,  $\bar{x} \pm s, \times 10^4$ )

Group	C57BL/6 strain	KM strain
PBS control	—	—
ISA720 control	—	—
Al(OH) <sub>3</sub> control	—	—
rSjc-97f3+ISA720	47.14±17.57	177.70±21.98**
rSjc-97f3+Al(OH) <sub>3</sub>	28.43±9.00	94.96±52.55**

\*\* P<0.01 vs C57BL/6 mice group

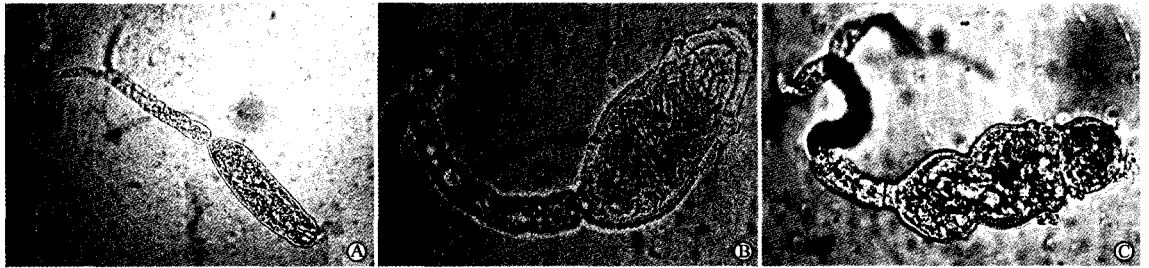


图 4 鼠抗 rSjc-97f3 血清的尾蚴膜反应

Fig 4 Cercarian huellen reaction using anti rSjc-97f3 sera(×400)

A: Sera from adjuvant treated mice; B: Sera from cercaria challenged rabbit; C: Mouse anti rSjc-97f3 sera

### 3 讨论

James<sup>[5]</sup>在研究曼氏血吸虫虫体可溶性抗原免疫动物攻击感染时,发现存在于曼氏血吸虫幼虫和成虫体内的 1 个高相对分子质量抗原成分在保护性免疫中起重要作用。Pearce 等<sup>[6,7]</sup>对可溶性抗原成分进行分析鉴定,最终确定副肌球蛋白是其中的有效抗原成分。但由于天然副肌球蛋白只占虫体蛋白的 0.5%,因此从虫体中提取天然蛋白用于制备疫苗是不可行性的。周生华等<sup>[8]</sup>将日本血吸虫大陆株副肌球蛋白 cDNA 全序列克隆和测序;周金春等<sup>[9]</sup>将日本血吸虫副肌球蛋白基因亚克隆在大肠杆菌中高效表达,经 TALON 柱和离子交换柱分离纯化,获得大量高纯度的蛋白,用于水牛现场试验,对家畜有一定的保护作用。尽管已有多项实验尝试采用大肠杆菌系统表达 Sj-97 蛋白,但至今尚未有真核表达系统产生 Sj-97 蛋白的报道。利用真核系统分泌表达对产生天然构象的重组蛋白具有重要作用。在许多情况下,用于疫苗的抗原构象是其保护性免疫所必需的。本实验采用毕氏酵母系统分泌表达了 Sjc-97f3 蛋白,并在免疫学实验中证实该重组蛋白特异性抗体能识别分布在虫体不同部位的天然蛋白。这一结果将促使我们进一步探讨这些特异性抗体在保护血吸虫感染中的作用。

佐剂是重组蛋白疫苗的重要组成成分,对疫苗

2.5 尾蚴膜反应 图 4 显示了尾蚴膜反应结果,阴性对照组可见尾蚴体表光滑平整,无抗原-抗体复合物存在;阳性对照组尾蚴的头部、尾部和体部可见明显的封套结构;抗 rSjc-97f3 血清与尾蚴反应,在尾蚴的头部、尾部以及体部的某些部位有空泡状反应物,表明免疫后血清可识别尾蚴体表分布的天然副肌球蛋白,意味着重组蛋白保留着其天然抗原表位。

的免疫效果有重要影响<sup>[10~12]</sup>。Al(OH)<sub>3</sub> 佐剂已用于人体疫苗。ISA720 佐剂是一种新型佐剂,包括我国在内的多个国家已批准该佐剂用于人体试验。本实验室研制的疟疾疫苗也采用了这种佐剂,并显示出比 Al(OH)<sub>3</sub> 佐剂更强的应答反应。本研究结果进一步证实了这种佐剂的强效作用,为该抗原进一步免疫原研究,选用佐剂提供了依据。

### [参考文献]

- [1] Bergquist NR, Colley DG. Schistosomiasis vaccines: research to development[J]. *Parasitology Today*,1998,14(3):99-104.
- [2] Gobert GN, Stenzel DJ, Jones MK, et al. *Schistosoma japonicum*: immunolocalization of paramyosin during development [J]. *Parasitology*,1997,114 (Pt 1):45-52.
- [3] Gobert GN. The role of microscopy in the investigation of paramyosin as a vaccine candidate against *Schistosoma japonicum*[J]. *Parasitol Today*,1998,14(3):115-118.
- [4] Pan WQ, Ravot E, Tolle R, et al. Vaccine candidate MSP-1 from *Plasmodium falciparum*: a redesigned 4 917 bp polynucleotide enables synthesis and isolation of full-length protein from *Escherichia coli* and mammalian cells [J]. *Nucleic Acids Research*,1999,27(4):1094-1103.
- [5] James SL. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by a nonliving vaccine is dependent on the method of antigen presentation [J]. *J Immunol*,1985,134(3):1956-1960.
- [6] Pearce EJ, James SL, Dalton J, et al. Immunochemical characterization and purification of Sm-97, a *Schistosoma mansoni*

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

Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> 平衡失调、Th<sub>2</sub> 细胞活性亢进,是哮喘发病的重要基础。BCG 有强大的诱发 Th<sub>0</sub> 向 Th<sub>1</sub> 转化的作用。Ohta 等<sup>[5]</sup>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, Th<sub>2</sub> 分泌的细胞因子 IL-5 与凋亡指数呈负相关,而 Th<sub>1</sub> 分泌的细胞因子 IFN- $\gamma$  等有抑制 Th<sub>2</sub> 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<sup>[1]</sup>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<sup>[2]</sup>研究发现,BCG 能促进 BALB/c 小鼠 Th<sub>2</sub> 细胞分泌 IFN- $\gamma$ , 促进 Th<sub>0</sub> 向 Th<sub>1</sub> 方向转化,抑制 Th<sub>2</sub> 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