

A-S3-2

新发现的人体组织内原虫致病性研究

吴维清;指导教师:朱淮民,彭 恒

第二军医大学 2010 级临床医学五年制

【目的】 研究新发病原体的感染途径和致病性。

【方法】 建立持续的病原体体外培养。筛选合适培养基,患者样本培养,并进行形态学观察;建立动物感染模型。实验小鼠用病原体培养物,经腹腔和经口两种给药方式感染。每天观察小鼠的基本情况,并定期收集小鼠粪便检查;小鼠死亡后解剖,取脏器进行大体观察、病变组织的病理学及免疫组织化学染色观察。取培养物用真核生物小核糖体 RNA 通用引物和棘阿米巴通用引物进行 PCR 扩增。

【结果】 经口感染的小鼠全部存活,一般情况无显著变化。收集小鼠粪便,观察到与培养物中相似原虫。腹腔注射原虫的小鼠很快出现精神不振、活动度低以及食欲下降等表现,并在 2 d 内死亡。死亡小鼠解剖,大体标本观察:肝脏和肺脏色泽暗淡。H-E 染色:小鼠的肺组织有大量的炎症细胞浸润,血管扩张,肺泡间隔因炎性水肿变宽甚至融合,并观察到较多的近似球形寄生物,也有长条不定形状结构。肝脏和肺脏出现小灶性的坏死。免疫组织化学观察:肺组织中观察到较多的黑褐色颗粒,肝脏中黑褐色颗粒少见。棘阿米巴通用引物 PCR 扩增得到的条带经测序显示为一种棘阿米巴(*Acanthamoeba griffini*)。经阅读文献,该棘阿米巴的形态与病变组织中所见长条不定形状结构相似,而球形结构不符合棘阿米巴的形态,该球形物可能未被扩增。

【结论】 该寄生物为原生动物的,可能为混合种类感染,其中有 *A. griffini*,而球形原生动物的分类地位仍不清楚。感染方式可能为经口感染,在某种条件下,可穿过肠壁血管造成其他脏器的病变。新病原体主要对肺脏和肝脏损伤严重,毒力较强,可致小鼠死亡。

关键词: 新发现病原体;致病性;感染途径;病理学;免疫组织化学

A-S3-3

mDC 中 A20 失调促使 HCV 感染慢性化

马宏炜¹,吴亚琼²;指导教师:张海锋,贾战生

1. 第四军医大学 2010 级临床医学

2. 陕西师范大学 2011 级生物科学

【目的】 全世界有 1.7 亿丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)携带者,其中 80% 以上的 HCV 感染会慢性化,由其所致的肝硬化、肝癌发病率逐年升高。针对丙肝,世界公认的方法是干扰素(interferon, IFN)治疗,但其副作用较多,且对部分患者疗效不佳。新近研究表明髓样树突状细胞(myeloid dendritic cells, mDCs)功能失调可能是 HCV 感染慢性化的重要原因,但其具体机制尚不明确。胞内泛素剪辑蛋白 A20,又称肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白 3(tumor necrosis factor alpha-induced protein 3, TNFAIP3),作为新近被发现的免疫负调控分子,可通过负反馈机制调控 TNFR、RIG-1 及 TLR 信号通路诱导的免疫反应,但目前其在 HCV 感染病程中的作用尚不清楚。本实验拟通过检测不同人群中 mDC 中 A20 表达及其对不同刺激的反应,同时分析其与相关免疫促进/抑制分子的关系,揭示 mDC 中 A20 分子在 HCV 慢性感染中的作用,为丙肝治疗提供新靶点。

【方法】 (1)收集健康及丙肝患者外周血并分为 4 组:健康组、未治疗组(HCV 感染时间 >1 年)、治疗组(IFN- α 治疗 1~6 个月)、持续病毒学反应组(丙肝治愈),分离外周血单核细胞并提纯 mDC,用流式细胞术测定 mDC 纯度,用 RT-PCR 法测定各组 A20 mRNA 表达;(2)体外用 poly-IC 和(或)IFN- α 刺激健康组及未治疗组 mDC,用 RT-PCR 法测定 A20 表达;(3)处理同(2),用流式细胞术测定 HLA-DR、CD86、CCR7、IL-10、IL-12 等细胞因子的表达水平,分析 A20 与其相关性。

【结果】 与健康组相比,治疗组 mDC 中 A20 表达显著下降,另两组则无统计学差异。与健康组相比,单用 poly-IC 处理时,未治疗组 A20 水平下降不明显;而单用 IFN- α 或 poly-IC+IFN- α 处理则无上述差异。IFN- α 刺激后各组 mDC 中 A20、IL-12 表达较未处理前下调,HLA-DR、CD86、CCR7 则上调;A20 表达水平与 HLA-DR、CD86、CCR7 及 IL-12 呈负相关,与 IL-10 正相关。

【结论】 HCV 感染后 mDC 失能,其 A20 持续处在正常水平,阻碍免疫反应活化致使感染慢性化;该过程可能与 HLA-DR、免疫共刺激分子 CD86、CCR7 及免疫活化因子 IL-12 表达下调,免疫抑制因子 IL-10 上调有关。相反,IFN- α 可以改善 mDC 功能并下调 A20 表达,增强机体免疫功能、促进 HCV 清除。因此,A20 沉默法可能成为丙肝治疗新策略。

关键词: 泛素剪辑蛋白 A20;丙型肝炎病毒;髓样树突状细胞;干扰素- α

A-S3-4

汉坦病毒胞膜糖蛋白与人溶酶体相关膜蛋白嵌合基因疫苗研制

姜东伯¹,张格飞²,闫阔成³;指导教师:杨琨

1. 第四军医大学 2010 级临床医学五年制

2. 第四军医大学 2011 级临床医学五年制

3. 第四军医大学 2012 级临床医学五年制

【目的】 我国是汉坦病毒所致肾综合征出血热发病情况最为严重的国家,作为传统预防措施的灭活疫苗在预防出血热发生中发挥了巨大的作用,然而仍存在免疫原性低,生产运输保存不便,免疫后机体不能获得长效免疫记忆能力等缺陷。为克服传统灭活疫苗的诸多不足,近年研究多集中在核酸疫苗的探索上。常规 DNA 疫苗表达的蛋白属内源性抗原,抗原提呈细胞(APC)启动 MHC I 类抗原加工途径,向 CD8⁺ T 细胞提呈 MHC I/抗原肽复合物,而 CD4⁺ T 细胞不能被有效活化。溶酶体是外源性抗原加工途径 MHC II 类分子器室(M II C)的重要组成部分。我们课题组利用溶酶体相关膜蛋白(LAMP)胞浆尾的靶向作用(可与内吞体/溶酶体膜结合并翻转其中),将汉坦病毒胞膜糖蛋白(Gn)基因插入 LAMP 分子 luminal domain 和 transmembrane/cytoplasmic tail 之间,使 Gn 直接进入 M II C,从而实现内源性抗原的 MHC I 类加工途径向 MHC II 类加工途径的转化。由此,不仅可同时激活细胞免疫应答和体液免疫应答,还可获得较好的长效免疫记忆能力,保护机体免受汉坦病毒的感染和疾病的发生。

【方法】 构建质粒 pVAX-Gn、pVAX-LAMP、pVAX-LAMP/Gn,转染 293T 细胞鉴定目的蛋白表达;高纯度去内毒素质粒免疫 BALB/c 小鼠,设立灭活疫苗对照组;通过间接 ELISA 和中和试验评价体液免疫应答;采用酶联免疫斑点试验(ELISpot)与细胞杀伤试验共同评价特异性细胞免疫应答;夹心 ELISA 和实时定量 PCR(qRT-PCR)检测攻毒后体内各组织病毒载量评价保护效力。

【结果】 成功构建载体并有效表达目的蛋白;实验组小鼠血清特异性抗体和中和抗体效价都明显高于各对照组,脾淋巴细胞特异性分泌 IFN- γ 和 CTL 杀伤活性亦均高于其他各组,体外结果表明:即使与传统灭活疫苗相比,特异性细胞与体液免疫应答均显著增强;体内攻毒试验显示,实验组小鼠体内无汉坦病毒特异性抗原检出,表明接种该疫苗可保护个体免受病毒感染;增强免疫观察到表位扩展,且仅在 LAMP 重组疫苗免疫小鼠组检测到长效记忆性免疫应答。

【结论】 汉坦病毒胞膜糖蛋白与人溶酶体相关膜蛋白嵌合基因疫苗能够获得良好的特异性免疫应答,同时具有很好的对抗病毒感染的保护效力和长效免疫记忆,这些都提示该新型汉坦病毒基因疫苗未来在临床上的应用前景。

关键词: 汉坦病毒;病毒糖蛋白;基因疫苗;溶酶体相关膜蛋白;靶向提呈