

口咽胃肠道环境对 Der p2-rBCG 行为的影响

史皆然, 师长宏, 吴昌归, 张金山

史皆然, 吴昌归, 第四军医大学西京医院呼吸内科 陕西省西安市 710032
师长宏, 第四军医大学基础部微生物学教研室 陕西省西安市 710032
张金山, 第四军医大学基础部组织胚胎学教研室 陕西省西安市 710032
史皆然, 男, 1966-09-21 生, 山东省蓬莱市人, 汉族, 2003 年第四军医大学
医学博士毕业, 副主任医师, 副教授, 主要从事过敏性哮喘发病机理的研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30370626

项目负责人: 史皆然, 710033, 陕西省西安市长乐西路 127 号, 第四军医
大学西京医院呼吸内科。sjr196698@163.net
电话: 029-83375237 传真: 029-83374512
收稿日期: 2004-12-27 接受日期: 2005-01-13

Influence of oral cavity and gastrointestinal tract environment on Der p2-rBCG biological behavior

Jie-Ran Shi, Chang-Hong Shi, Chang-Gui Wu, Jin-Shan Zhang

Jie-Ran Shi, Chang-Gui Wu, Department of Respiratory Diseases, Xijing
Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi
Province, China

Chang-Hong Shi, Department of Microbiology, the Fourth Military
Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Jin-Shan Zhang, Department of Histology and Embryology, the Fourth
Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No.
30370626

Correspondence to: Jie-Ran Shi, Department of Respiratory Diseases,
Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032,
Shaanxi Province, China. sjr196698@163.net

Received: 2004-12-27 Accepted: 2005-01-13

Abstract

AIM: To investigate the influence of oral cavity and gastrointestinal tract environment on the biological behavior of recombinant *Bacillus Calmette-Guerin* (rBCG) that expresses with allergen Der p2 after oral inoculation.

METHODS: Four groups of 6 to 8 week old Balb/c mice were vaccinated orally with 100 μ L of 10^9 CFU with natural BCG or three kinds of rBCGs. The BCG CFU was counted in several tissue (oral pharyngeal lymphoid tissues (OLT), gut associated lymphoid tissues (GALT), spleen, lung and liver) and feces from the inoculated Balb/c mice at different time after inoculation. The DNA and mRNA of Der p2 gene in various tissue were identified by PCR and RT-PCR, respectively.

RESULTS: All three kinds of rBCGs were observed in mucosal-associated lymphoid tissues, indicating that they could penetrate the mucosa of oral cavity and gastrointestinal tract. The Der p2 gene was expressed by rBCG in above tissues.

CONCLUSION: It is suggested that the oral cavity and gastrointestinal tract environment does not interrupt rBCG expressed Der p2 from inducing immune response after oral inoculation.

Key Words: Oral cavity; Gastrointestinal tract; Der P2-rBCG; Biological behavior

Shi JR, Shi CH, Wu CG, Zhang JS. Influence of oral cavity and gastrointestinal tract environment on Der p2-rBCG biological behavior. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(5):600-603

摘要

目的: 观察口服接种过敏原基因(Der p2)重组(r)BCG 口咽胃肠道环境对 Der p2-rBCG 行为的影响。

方法: 以野生 BCG 为对照, 给予 Balb/c 小鼠口服接种三种方式(分泌、胞壁和胞内)表达 Der p2 的 rBCG 1×10^9 CFU, 连续 5 d, 计数不同时间粪便、口咽淋巴组织(OLT)、消化道相关淋巴组织(GALT)以及肝脏、脾脏和肺脏中 BCG 的细菌数;用 PCR 和内参照 RT-PCR 法测定由 rBCG 携带入各组织中的 Der p2 存在和表达状况。

结果: 三种 rBCG 均可通过口咽和胃肠道黏膜, 进入黏膜相关淋巴组织;各淋巴组织中的 rBCG 仍能表达其所携带的外源基因, 并在各淋巴组织中表达外源蛋白。

结论: rBCG 口服免疫后口咽胃肠道环境对 rBCG 生物学行为所产生的影响并不妨碍诱导理想的免疫应答。

关键词: 口咽; 胃肠道; Der p2-rBCG; 生物学行为

史皆然, 师长宏, 吴昌归, 张金山. 口咽胃肠道环境对 Der p2-rBCG 行为的影响. *世界华人消化杂志* 2005;13(5):600-603
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/600.asp>

0 引言

采用 BCG 或 rBCG 调节宿主的非特异性和特异性免疫应答, 用于相关疾病的防治是国内外研究热点^[1]. 我们以往的研究显示, ip 接种可表达过敏原的重组 BCG 能诱导 Balb/c 小鼠产生过敏原特异性的 Th1 优势应答, 对过敏性疾病防治有利. 然而, 分支杆菌抗原和其菌体成分的特殊性, 使得重复注射接种会引起宿主强烈的不良反应, 给强化免疫带来困难. 口咽胃肠道作

为机体开放的门户, 拥有数量和面积巨大的免疫组织, 因而免疫学潜能极大; 口服接种 rBCG 较注射免疫在许多方面具有优势. 鉴于此, 我们采用口服途径免疫 Der p2-rBCG 于 Balb/c 小鼠, 通过检测口咽消化道不同部位相关淋巴组织和主要脏器中 rBCG 的数量, 以及 rBCG 在各组织中表达 Der p2 的情况, 以评价口咽胃肠道环境对 Der p2-rBCG 行为的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 BCG D2-PB302S 甲 10 株 (Pasteur 1173 属) 由第四军医大学基础部微生物教研室保存; 分泌型 (SEC)、胞壁型 (CW) 和胞内型 (IC) Der p2 重组 BCG 为作者构建^[2-3]. SPF 级雌性 6-8 周龄 BALB/c 小鼠 32 只, 由第四军医大学实验动物中心提供, 分为 4 组. 动物免疫前夜禁水, 次日晨分别给予 100 μ L ($\times 10^{13}$ CFU/L) 用 100 mL/L 甘油混悬的胞内、胞壁和胞外分泌三种方式表达 Der p2 的 rBCG 和 BCG 口服接种, 随后再给予 30 g/L NaHCO₃ 50 μ L, 连续 5 d. 分别接种 BCG 或 rBCG 于 200 mL 7H9 (含 ADC) 于 37℃ 培养至 $A = 1.2A_{600U}$, 以大肠杆菌为参照, 用比浊法进行定量. 将适量培养物原液用 100 mL/L 甘油洗涤 2 次, 根据所测定的细菌密度, 按接种要求将各组培养物用 100 mL/L 甘油稀释成 10^{13} CFU/L. 分别于末次免疫后 2, 14, 28 和 56 d 处死小鼠, 无菌分离每只小鼠的口咽淋巴组织 (OLT, 包括下颌下腺、腺体周淋巴结和颈淋巴结)、消化道相关淋巴组织 (GALT, 包括派伊尔结、肠系膜淋巴结)、脾脏、双肺和肝脏, 一部分进行组织学检查, 另一部分放于无菌的离心管中, 称重后加入生理盐水 5 mL/g. 匀浆后备用.

1.2 方法 分别于首次免疫后 1, 6, 8, 10, 14, 28 和 56 d 收集各组小鼠粪便, 用 2 g/L 孔雀绿和 30 g/L NaOH 处理, 再用 20 mL/L HCl 中和, 14 470 g 离心后, 用生理盐水 1 000 μ L 稀释沉淀, 取 200 μ L 涂布于 7H11 琼脂平板. 涂皿的平板于 37℃ 培养 18 d 后计数 BCG 的 CFU. 另取匀浆组织液 200 μ L, 涂布于 7H11 琼脂平板. 于 37℃ 培养 18 d 后计数 BCG 的 CFU. 将上述涂皿后剩余的 OLT, GALT 和脾脏组织匀浆物液分成 2 份, 参照文献和 Trizol RNA 提取操作指南抽提总 DNA 和 mRNA. 所得总 DNA 用 RNase 消化; 以所得 mRNA 作模板, 按 AMV-RTase 说明, 以 OligodT₁₈ 为引物进行反转录. 参照 Taq 酶说明以总 DNA 和反转录产物为模板, 用 Der p2 的正反向引物行 PCR, 反转录系统用 β -actin 作内参照. 产物于 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色 (10 mg/L). RT-PCR 电泳图像用 Dual wavelength Flying spot Scanner CS 9000 型薄层扫描仪 (岛津公司, 日本) 扫描后于计算机上分

析扩增后 Der p2 和 β -actin DNA 的荧光强度, 计算 D/ β 之比.

2 结果

2.1 粪便和组织中 BCG 细菌计数 各组小鼠口服免疫后次日即开始在粪便中出现, 5 次免疫后达到高峰, 随后开始下降, 随时间延长粪便中 BCG 数量递减, 至首次免疫后 14 d 各组小鼠粪便中 BCG 消失 (表 1). 无论 BCG 还是三种 rBCG 以活菌形式从粪便种排出, 一方面说明消化道环境对 BCG 的生存影响不大; 另一方面提示, 从口腔到直肠整个消化道黏膜都接触到了活的 BCG 或 rBCG, 这就有可能使 BCG 或 rBCG 与消化道的免疫组织相互作用, 使得经消化道免疫成为可能. 小鼠口服免疫后次日即可在多种组织中检测到 BCG 或 rBCG, 14 d 达高峰, 随后开始下降, 至 56 d 后淋巴结、脾、肺和肝脏中已检测不到 BCG 或 rBCG (表 2). 这说明消化系统和肺脏均获得了 BCG 或 rBCG 免疫刺激作用.

表1 不同时间粪便中 BCG 计数 ($\times 10^4$ CFU)

Day	BCG	Der p2-rBCG		
		SEC	CW	IC
1	2.36 \pm 0.78	3.15 \pm 1.32	2.67 \pm 0.83	4.03 \pm 1.56
6	511.33 \pm 131.25	752.41 \pm 237.34	681.53 \pm 178.43	558.76 \pm 145.91
8	37.23 \pm 27.95	1.61 \pm 42.15	79.13 \pm 55.59	77.44 \pm 37.53
10	6.66 \pm 5.89	7.97 \pm 6.05	8.63 \pm 5.72	5.51 \pm 5.38
14	0	0	0	0
28	0	0	0	0
56	0	0	0	0

2.2 Der p2 在接种动物组织中的表达 以三种重组 BCG 免疫 14 d 小鼠的 OLT, GALT 所抽提的 DNA 为模板, 用 Der p2 的正反向引物行 PCR, 均扩增得到了约 390 bp 的 Der p2 基因 (图 1), 说明在这些组织中含有携带 Der p2 基因的 BCG, 即各种 BCG 均能穿过黏膜上皮, 进入口咽-消化道相关淋巴组织; 此外, 在脾脏和肝

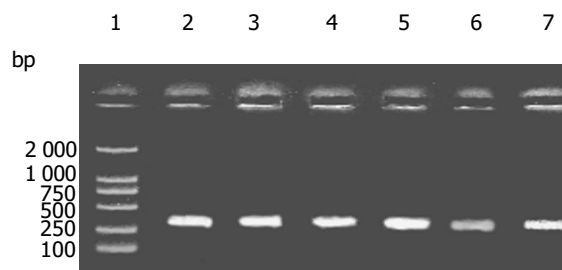


图1 口服三种重组 BCG 免疫 14 d 后 BALB/c 小鼠 OLT、GALT 和中 rBCG 中外源基因的鉴定. 1: Marker; 分别以 2 和 3: rBCG-SEC 组 OLT 和 GALT、4 和 5: rBCG-CW 组 OLT 和 GALT、6 和 7: rBCG-IC 组 OLT 和 GALT 的 DNA 为模板经用 Der p2 引物行 PCR 扩增得到约 390 bp 的 Der p2 基因.

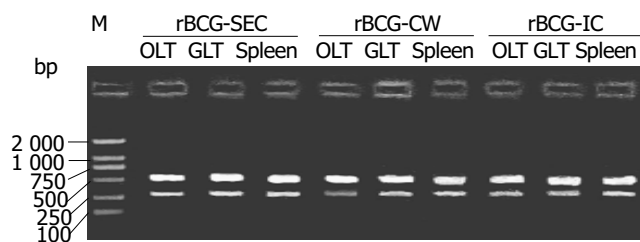


图2 口服三种重组BCG免疫14 d后BALB/c小鼠OLT、GALT和脾脏组织中rBCG外源基因的表达。M: Marker; 分别以rBCG-SEC组、rBCG-CW组和rBCG-IC组小鼠之OLT、GALT和脾脏的RNA为模板经RT-PCR, 均得到约390 bp的Der p2基因和540 bp的 β -actin基因。

脏组织中也扩增出Der p2基因, 进一步提示各种BCG完全能够通过血行途径进入全身各系统, 达到刺激全身免疫的作用。提取各组动物三种淋巴组织(OLT, GALT和脾脏)的mRNA, 经RT-PCR均可扩增得到Der p2基因(图2), 说明携带Der p2的BCG在各组织中处于存活状态, 外源基因稳定地存在于BCG体内, 并且能够表达, 这对于诱导外源抗原特异性的免疫应答至关重要。rBCG在各组织中外源基因的表达量有所不同(图3), 一方面与rBCG在各组织中的含量有关, 另一方面在不同组织中受到免疫系统作用的强度也有所不同。

3 讨论

BCG作为分支杆菌的代表, 是迄今为止最安全、最稳定的疫苗之一, 因其在分子遗传学和免疫学上的许多优点而倍受重视。1990年代以来, 国内外许多学者发现, 以BCG作为载体制备外源基因重组疫苗, 既可诱发以特异性细胞毒T细胞活化为主的细胞免疫, 又

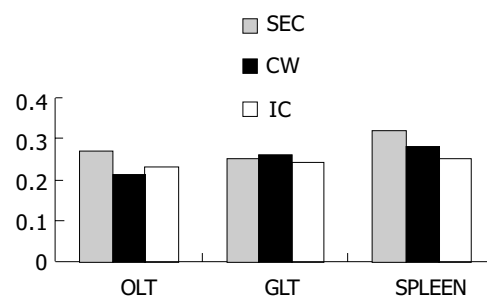


图3 不同rBCG携带入各组织中的Der p2表达定量。结果为Der p2和 β -actin RT-PCR产物荧光亮度之比。

可以诱发以特异性抗体产生为主的体液免疫。根据不同的调节目的, rBCG成为各种相关疾病防治研究的重要手段, 并因此而成为热点^[1-3]。已有的研究显示其被广泛用于病毒、细菌和寄生虫感染的防治、肿瘤治疗、以及自身免疫性疾病防治等方面的研究, 取得了令人振奋的结果^[4-8]。既往我们尝试利用过敏原重组的BCG防治哮喘, 研究发现, 采用ip接种屋尘螨过敏原(Der p2)-rBCG可明显抑制Der p2诱导的Th2应答, 提示rBCG在过敏性疾病防治方面具有巨大的开发价值。

近年来, 绝大多数研究所采用的接种方式多为注射(静脉、皮下、腹腔、鼻黏膜等), 这些免疫途径所诱导的免疫应答各有不同, 为相关疾病的有效治疗提供了较多的选择^[9]。然而, 分支杆菌抗原和其菌体成分的特殊性, 使得接种后所获得的免疫保护时间较短, 而短期内重复注射具有强烈的不良反应, 给强化免疫带来困难。鉴于BCG在调节免疫方面的优点和近年所取得的成果, 如何高效、特异地诱导重要疾病抗原的保护性免疫备受关注。消化道黏膜

表2 不同组织中BCG计数($\times 10^4$ CFU)

		OLT	GALT	Lung	Spleen	Liver
BCG	2	10.35 \pm 3.01	9.52 \pm 2.13	4.76 \pm 1.38	8.07 \pm 2.19	3.58 \pm 0.77
	14	74.25 \pm 8.75	85.39 \pm 14.76	63.45 \pm 8.59	95.86 \pm 15.73	43.18 \pm 5.43
	28	32.12 \pm 6.33	29.54 \pm 9.36	5.85 \pm 2.39	42.49 \pm 10.27	12.34 \pm 4.26
	56	0	0	0	0	0
rBCG-SEC	2	13.26 \pm 2.43	8.87 \pm 1.95	6.48 \pm 1.92	11.23 \pm 3.53	5.77 \pm 1.12
	14	94.16 \pm 12.35	71.67 \pm 11.22	49.37 \pm 6.58	93.46 \pm 10.13	53.39 \pm 9.84
	28	26.92 \pm 4.65	33.23 \pm 8.19	8.35 \pm 3.27	34.91 \pm 8.94	10.16 \pm 3.75
	56	0	0	0	0	0
rBCG-CW	2	8.52 \pm 2.84	10.36 \pm 2.17	7.35 \pm 2.61	9.42 \pm 3.13	5.93 \pm 1.09
	14	76.18 \pm 9.64	83.57 \pm 11.63	57.39 \pm 6.95	86.49 \pm 11.92	46.34 \pm 4.53
	28	36.65 \pm 8.74	28.18 \pm 7.83	9.69 \pm 3.12	44.67 \pm 13.85	9.64 \pm 3.78
	56	0	0	0	0	0
rBCG-IC	2	6.95 \pm 2.67	7.56 \pm 1.43	5.15 \pm 1.62	6.56 \pm 1.38	5.18 \pm 1.07
	14	73.16 \pm 8.37	81.66 \pm 10.34	54.39 \pm 6.26	81.32 \pm 12.62	47.52 \pm 4.61
	28	26.25 \pm 4.83	25.44 \pm 6.51	7.68 \pm 2.42	37.33 \pm 9.18	10.54 \pm 3.16
	56	0	0	0	0	0

面积巨大(约 400 m^2 , 200 倍于皮肤表面), 解剖学结构、免疫细胞和免疫应答分子机制与外周免疫系统迥然不同. 免疫细胞的数量比其他免疫器官的总和还要多, 因而是最大的免疫器官. 有人已经观察到 rBCG 经消化道接种诱导了强烈的局部和全身抗原特异性细胞免疫应答, 具有对结核^[10]和人类免疫缺陷病毒(HIV)感染的防治作用^[11]. 这表明, 口服摄入后, BCG 本身的一些特性(抗酸、胞壁脂质含量高)使其能够穿过消化道全长, 抵抗不利因素如胃酸和酶的降解. 更重要的是, 有研究发现经消化道黏膜免疫可以抑制由纯蛋白衍生物(PPD)引起的迟发变态反应(DTH), 从而明显减少重复接种引起的不良反应^[12]. 本研究表明: 三种 rBCG 均可通过口咽和胃肠道黏膜, 进入黏膜相关淋巴组织, 甚至在全身播散. 存在于小鼠淋巴组织和各脏器中的 rBCG 仍然能持续表达其所携带的外源基因, 从而提供持久的免疫刺激和佐剂作用, 对于诱导特异性 T 细胞应答具有重要意义. 因此, 有理由相信 rBCG 口服免疫后口咽胃肠道环境对其生物学行为的影响并不妨碍诱导理想的免疫应答.

4 参考文献

- Scanga CB, Le Gros G. Development of an asthma vaccine: research into BCG. *Drugs* 2000;59:1217-1221
- Shi JR, Li Y, Qi HW, Li BH, Fan XL. Construction and identification of the E. coli-BCG shuttle vector expressing lipoprotein Der p2 on cell wall of mycobacterium vaccae. *Xibao Yu Fenzi Mianyixue Zazhi* 2003;19:132-135
- 史皆然, 李元, 戚好文, 李别虎, 范雄林. 利用 Hsp 基因调控元件构建胞内表达的 E. coli-BCG 穿梭载体. *中华微生物学和免疫学杂志* 2003;23:629-632
- Winter N, Lagranderie M, Gangloff S, Leclerc C, Gheorghiu M, Gicquel B. Recombinant BCG strains expressing the SIVmac251nef gene induce proliferative and CTL responses against nef synthetic peptides in mice. *Vaccine* 1995;13:471-478
- Nascimento IP, Dias WO, Mazzantini RP, Miyaji EN, Gamberini M, Quintilio W, Gebara VC, Cardoso DF, Ho PL, Raw I, Winter N, Gicquel B, Rappuoli R, Leite LC. Recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing pertussis toxin subunit S1 induces protection against an intracerebral challenge with live Bordetella pertussis in mice. *Infect Immun* 2001;69:1976-1982
- Kremer L, Riveau G, Baulard A, Capron A, Loch C. Neutralizing antibody responses elicited in mice immunized with recombinant bacillus Calmette-Guerin producing the Schistosoma mansoni glutathione S-transferase. *J Immunol* 1996;156:4309-4317
- Yamada H, Matsumoto S, Matsumoto T, Yamada T, Yamashita U. Murine IL-2 secreting recombinant Bacillus Calmette-Guerin augments macrophage-mediated cytotoxicity against murine bladder cancer MBT-2. *J Urol* 2000;164:526-531
- Yasutomi Y, Koenig S, Haun SS, Stover CK, Jackson RK, Conard P, Conley AJ, Emini EA, Fuerst TR, Letvin NL. Immunization with recombinant BCG-SIV elicits SIV-specific cytotoxic T lymphocytes in rhesus monkeys. *J Immunol* 1993;150:3101-3107
- Grode L, Kursar M, Fensterle J, Kaufmann SH, Hess J. Cell-mediated immunity induced by recombinant mycobacterium bovis Calmette-Guerin strains against an intracellular bacterial pathogen: importance of antigen secretion or membrane-targeted antigen display as lipoprotein for vaccine efficacy. *J Immunol* 2002;168:1869-1876
- Aldwell FE, Tucker IG, de Lisle GW, Buddle BM. Oral delivery of Mycobacterium bovis BCG in a lipid formulation induces resistance to pulmonary tuberculosis in mice. *Infect Immun* 2003;71:101-108
- Kawahara M, Hashimoto A, Toida I, Honda M. Oral recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin expressing HIV-1 antigens as a freeze-dried vaccine induces long-term, HIV-specific mucosal and systemic immunity. *Clin Immunol* 2002;105:326-331
- Hoft DF, Brown RM, Belshe RB. Mucosal Bacilli Calmette-Guérin vaccination of humans inhibits delayed-type hypersensitivity to purified protein derivative but induces mycobacteria-specific interferon- γ responses. *Clin Infect Dis* 2000;30(Suppl 3):S217-222

编辑 潘伯荣 审读 张海宁