

抗日本血吸虫 pVAX1/SjHGPRT·SDISP 多价疫苗对昆明小鼠的保护作用及其机制探讨*

罗四维¹ 汪世平²

(1 永州职业技术学院基础医学系 湖南 永州 425000 2 中南大学湘雅医学系寄生虫学系 湖南 长沙 410078)

摘要 目的 探讨抗日本血吸虫生殖产卵编码基因多价疫苗 pVAX1/SjHGPRT·SDISP 对昆明小鼠的保护作用及其机制。方法 选取昆明小鼠 30 只,分别使用 pVAX1/SjHGPRT·SDISP、pVAX1 以及生理盐水,每只小鼠 100 μ g 或等量经左腿股四头肌注射。处理 2 周后,采集动物模型血样检测 IgG、IL-2、IL-4、IL-10 以及 INF- γ 表达量。处理 4 周后,以 20 \pm 1 条尾蚴贴腹感染,感染 6 周后检测减虫率、减卵率。结果 尾蚴攻击动物后 6 周 pVAX1/SjHGPRT·SDISP 免疫组的肝脏减虫率为 42.2%,子宫与肝脏减卵率分别为 68.04% 以及 72.96%。与对照组比较,差异有显著性。pVAX1/SjHGPRT·SDISP 免疫组虫体内 IgG、IL-4 以及 INF- γ 表达量明显升高,与对照组比较差异有显著性($P < 0.05$)。结论:pVAX1/SjHGPRT·SDISP 多价疫苗具有较好的免疫保护作用,且该类作用的机制与 IgG、IL-4 以及 INF- γ 的表达升高存在关联。

关键词 血吸虫;多价疫苗 pVAX1/SjHGPRT·SDISP 机制

中图分类号:Q95-3 R383.24 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)18-3413-04

Immunoprotection and Mechanism Exploration of Multivalent DNA Vaccine pVAX1/SjHGPRT·SDISP Against Schistosoma Japonicum*

LUO Si-wei¹, WANG Shi-ping²

(1 Basic medicine department, Yongzhou vocational technical college, Yongzhou Hunan province, 425000, China;

2 Department of Parasitology, Xiangya school of medicine, central south university, Changsha 410078, China)

ABSTRACT Objective: To explore the protection of multivalent DNA vaccine pVAX1/SjHGPRT·SDISP in Kunming mice and its mechanism. **Methods:** A total of 30 Kunming mice were selected and treated by pVAX1/SjHGPRT·SDISP, pVAX1 and normal saline respectively. Each mouse was injected with 100 μ g or equivalent amount through quadriceps of left legs. Two weeks later after the injection, the serum of the mice was selected to detect the expression level of IgG, IL-2, IL-4, IL-10, INF- γ . After 4 weeks of the injection, the mice were infected by the procercoid through abdominal wall. After the infection for 6 weeks, the worm reduction rate and the egg reduction rate were investigated. **Results:** The worm reduction rate of the pVAX1/SjHGPRT·SDISP was 42.2%. The egg reduction rates of the pVAX1/SjHGPRT·SDISP in uterus and liver were 68.04% and 72.96%, respectively, which were significantly different from the control group ($P < 0.05$). The expression level of IgG, IL-4 and INF- γ in pVAX1/SjHGPRT·SDISP immune group is significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The pVAX1/SjHGPRT·SDISP showed good immunoprotection, which was correlated with the increased expression level of IgG, IL-4, INF- γ .

Key words: Schistosoma japonicum; Multivalent DNA vaccine; pVAX1/SjHGPRT·SDISP; Mechanism

Chinese Library Classification: Q95-3, R383.24 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)18-3413-04

前言

血吸虫是一种对包括人体在内的多种宿主健康产生严重影响的人畜共患寄生虫病,在我国以及东南亚地区广泛的流行。以人体为宿主的血吸虫主要包括三个种类,分别是日本血吸虫、曼氏血吸虫、埃及血吸虫,在我国分布的是日本血吸虫。该类寄生虫与其他两种比较起来,具有宿主种类多、成虫寿命长、感染后伴随免疫力降低、病情严重、防治难度大的特点。并且,钉螺作为其中间宿主,不容易被消灭与控制^[1-3]。因此,我国的血吸虫防治工作一直面临着较大的压力与紧迫的形势。为了

积极有效的控制和消灭血吸虫病,我们采取了多种配合手段。其中,根据血吸虫自身的抗原特性,研发相关疫苗的相关工作被理解成为及有发展前景的工作领域。就血吸虫疫苗的研发过程,大致经历了死疫苗、减毒活疫苗、基因工程疫苗和核酸疫苗等多个阶段。就目前的发展趋势来看,核酸疫苗领域的迅猛进展预示着该领域的良好发展前景^[4-5]。研究已经明确,核酸疫苗能够借助真核质粒表达载体与保护性抗原编码基因的连接,在活体内表达,并产生能够介导机体产生特异性免疫应答的抗原抗体反应。核酸疫苗在宿主体内合成的蛋白能够通过正确的折叠与糖基化过程,使得其自身的空间结构更加接近天然蛋白分

* 基金项目 国家重点基础研究发展(973)计划(No. 2007CB513108) 国家科技支撑计划(No. 2009BAI78B05);

湖南省血吸虫病免疫与传播控制重点实验室、湖南省重点学科建设专项经费(No. 07-985-2)

作者简介 罗四维(1979-)女,湖南永州人,硕士研究生,从事病原生物及免疫学教学

(收稿日期 2011-05-18 接受日期 2011-06-12)

子,在宿主体内长期表达。其多效性、长效性、较好的安全性以及全面诱导免疫应答的能力,被誉为第三次疫苗革命^[6]。在前期的研究基础上,我们已经明确 pVAX1/SjHGPRToSDISP 的构建方法已经成熟,且采用肌肉注射的途径用 pVAX1/SjHGPRToSDISP 免疫小鼠能够在动物体内形成相应的表达。本次研究是前期研究的深入,旨在观察目的核酸疫苗能否对动物模型产生保护作用,并探讨该类保护机制可能的存在于哪些方面。

1 材料与方 法

1.1 质粒、菌株、实验动物

pcDNA3.0/SjSDISP、宿主菌 *E.coli* DH5 α 均由湖南省血吸虫病免疫与传播控制重点实验室保存。真核表达载体 pVAX1 由军事医学科学院基础研究所于继云研究员惠赠。阳性钉螺购自江苏省血吸虫病防治研究所,清洁级昆明小鼠,雌性,体重 18~25g,购自中南大学实验动物学部。

1.2 动物免疫

30 只昆明小鼠分为 3 组, A 组为 pVAX1/SjHGPRToSDISP 多价疫苗免疫组, B 组为 pVAX1 对照组, C 组为生理盐水对照组。每组注射相应质粒 100 μ g/100 μ L,生理盐水组注射生理盐水 100 μ L。注射部位为左后腿股四头肌,注射前于同一部位注射盐酸布比卡因 50 μ L(75 μ g/mL)。

1.3 抗体与细胞因子检测

实验动物接受相应免疫处理后 2 周,收集动物的血清样本,并 1:100 PBS 稀释。采用 ELISA 方法评价实验动物 IgG 表达水平。选用 PharMingen OptEIA™ Elisa 试剂盒检测样本中 IL-2, IL-4, IL-10、INF- γ 。所有检测均严格按照试剂盒具体操

作步骤进行。

1.4 减虫率与减卵率观察方法

免疫处理后实验动物,于后经腹部皮肤攻击感染日本血吸虫尾蚴 20 \pm 1 条。感染后第 42d 收获各组小鼠 24h 粪便,处死小鼠,采用心脏灌注法收集血吸虫成虫,并计算减虫率,精确称取 0.5g 肝脏,剪碎,加 5mL 5%KOH 溶液 37 $^{\circ}$ C 消化 5-6h,充分混匀后取 500 μ L 悬液,涂片 10 张,镜检计数全部虫卵数,计算每克肝虫卵数(LEPG)。每雌子宫虫卵数按如下进行:将成虫置于灭菌生理盐水中洗涤,并立即分开雌雄合抱的成虫,然后将雌虫放在载玻片上,覆以盖玻片,轻轻按压后置低倍显微镜下计数整个子宫内虫卵数。计算公式:

$$\text{减虫率}(\%) = (1 - \text{实验组检获成虫均数} / \text{对照组检获成虫均数}) \times 100\%$$

$$\text{减卵率}(\%) = (1 - \text{实验组检获虫卵均数} / \text{对照组检获虫卵均数}) \times 100\%$$

1.5 统计方法

数据采用均数 \pm 标准差表示,用 SPSS10.0 统计软件对数据进行 One-way ANOVA 分析, P<0.05 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 多价疫苗保护效果观察

尾蚴攻击动物后 6 周,可见生理盐水以及 pVAX1 空白质粒对照组的小鼠肝脏呈暗褐色,虫卵结节细密, pVAX1/SjHGPRToSDISP 免疫组的小鼠肝脏色泽较鲜红,虫卵结节较少(图 1)。各组具体减虫率(表 1),其中 pVAX1/SjHGPRToSDISP 与对照组比较差异有显著性(P<0.05)。

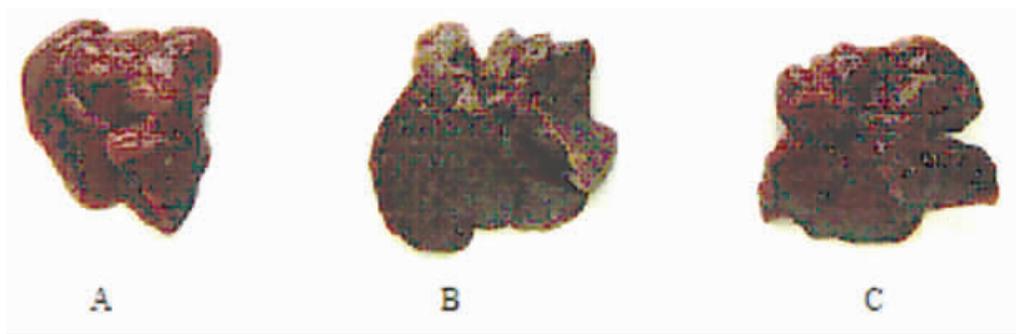


图 1 不同组别小鼠肝脏虫卵结节比较
A pVAX1/SjHGPRToSDISP 免疫组 B 生理盐水组 C pVAX1 空白质粒组

Fig. 1 The mean worm burden of the different groups

A: pVAX1/SjHGPRToSDISP group B: NS group C: pVAX1 group

表 1 不同组别减虫率比较

Table 1 The rate of worm reduction of different groups

| Groups | Mice number | Infected Procercooids | Mean of worm burden | Worm reduction rate (%) | P value |
|---------------|-------------|-----------------------|---------------------|-------------------------|---------|
| SjHGPRToSDISP | 10 | 20 \pm 1 | 9.625 \pm 4.069 | 42.20% | P<0.05 |
| pVAX1 | 10 | 20 \pm 1 | 13.250 \pm 3.919 | 20.10% | / |
| NS | 10 | 20 \pm 1 | 16.600 \pm 4.115 | / | / |

尾蚴攻击动物后 6 周,实验组的每雌子宫虫卵数和每克肝脏虫卵数分别为 68.04%和 72.96%,与对照组比较差异有显著

性,具体结果(表 2,3)。

表 2 各组子宫减卵率比较

Table 2 The rate of egg reduction in uterus of different groups

| Groups | Mice number | Infected Procercooids | Egg number in uterus | Egg reduction rate per female(%) | P value |
|----------------|-------------|-----------------------|----------------------|----------------------------------|---------|
| SjHGPRTtoSDISP | 10 | 20± 1 | 65.947 ± 20.837 | 68.04% | P<0.05 |
| pVAX1 | 10 | 20± 1 | 126.812 ± 35.548 | 38.10% | / |
| NS | 10 | 20± 1 | 204.875 ± 65.328 | / | / |

表 3 各组肝减卵率比较

Table 3 The rate of egg reduction in liver of different groups

| Groups | Mice number | Infected Procercooids | Egg number in livers | Egg reduction rate per female(%) | P value |
|----------------|-------------|-----------------------|----------------------|----------------------------------|---------|
| SjHGPRTtoSDISP | 10 | 20± 1 | 47.000 ± 28.217 | 72.96% | P<0.05 |
| pVAX1 | 10 | 20± 1 | 111.300± 27.845 | 35.96% | / |
| NS | 10 | 20± 1 | 173.800± 51.376 | / | / |

2.2 IgG 以及细胞因子检测

实验动物接受相应免疫处理后 2 周 检测各组 IgG 以及细胞因子结果显示 pVAX1/SjHGPRTtoSDISP 处理组 IgG、IL-4 以

及 INF-γ 表达量明显升高 ,与对照组比较差异有显著性(P<0.05)(图 2,3)。

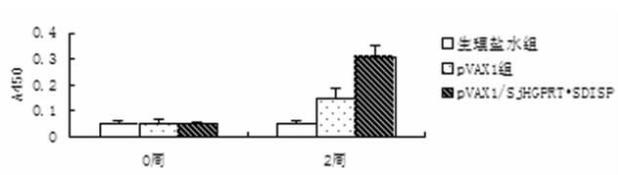


图 2 各组 IgG 表达量比较

Fig.2 The IgG expression level of differnt groups

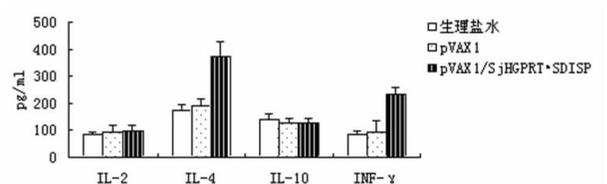


图 3 各组细胞因子表达量比较

Fig.3 The cytokines of differnt groups

3 讨论

血吸虫对人类健康带来的危害已经引起了大家的高度重视 ,怎样最大可能的降低发病率、提高人类对这一病种的防范与治疗能力是众多学者共同关注的问题。在众多的策略当中 ,采用疫苗对血吸虫进行有效的控制以及阻断其传播是一项公认的有效策略 ,且是减慢病情发展的一种重要措施。

核酸疫苗是近年来发展迅速的新型疫苗 ,主要包括 DNA 以及 RNA 两种。该类疫苗主要由编码引发保护性反应抗原基因片段以及载体共同构建而成 ,并通过直接注入宿主体内刺激机体的细胞与体液免疫发挥预防与治疗的作用。该类疫苗有许多突出的优点 ,比如能够诱导更有效的免疫应答、生产简便、稳定性好、使用安全等^[7-8]。但是 ,如何能够进一步地提升疫苗刺激所产生的免疫反应 ,怎样防止低水平的长期刺激可能带来的免疫耐受 ,外源性 DNA 是否会激活原癌基因等问题都是伴随这核酸疫苗的产生而来的相关问题。同时 ,我们知道血吸虫携带基因的复杂性以及虫体在长期生物进化过程中形成的免疫逃避等因素均会对我们的疫苗研发过程、疫苗效果的取得产生多种影响。

研发多价疫苗的初衷正是为了更大程度的发挥核酸疫苗的功效 ,同时发挥多价抗原分子的协同杀伤作用。通过将不同抗原分子序列的碱基通过特定的方式连接 ,并由共同的载体承载并在宿主体内表达而产生的多价疫苗是否能够达到我们预

期的目的呢?

本次研究选用的两个序列均为前期研究发现 ,并且已经摸索获得较好的构建方式得到。其中 ,HGPRT 在血吸虫的核酸循环以及后续的生长发育过程中具有举足轻重的作用 ,琥珀酸脱氢酶铁硫蛋白(SDISP)的功能明确其在细胞的能量代谢过程中发挥重要的作用。两种候选疫苗的联合是否能够产生较好的免疫效果呢?本次研究结果显示 pVAX1/SjHGPRTtoSDISP 免疫组小鼠肝脏的血吸虫结节明显减少 ,其减虫率达到了 42.20%。每雌子宫虫卵数和每克肝脏虫卵数分别为 68.04%和 72.96%。该部分的研究强烈提示一个信息 pVAX1/SjHGPRTtoSDISP 多价疫苗是能够很好的发挥抗击血吸虫侵袭的作用。那么 ,此类效果的取得其机制源于什么呢?血吸虫的体内抗击过程主要与机体的免疫系统有关。IgG 以及相应的多种细胞因子均存在辅助发挥作用的可能。本次研究 ,选择 IgG 以及多种细胞因子的表达情况为观察重点 ,结果也提示我们 ,多价疫苗的注入能够很好的激活体内 IgG、IL-4 以及 INF-γ 的高表达。从体液免疫的角度为多价疫苗作用机制提供了可供参考的方向。

本研究从在体水平发现 pVAX1/SjHGPRTtoSDISP 能够发挥很好的抵御血吸虫尾蚴侵袭 ,表现较好的减卵率与减虫率。良好疗效的发生与 IgG、IL-4 以及 INF-γ 的表达升高存在着较好的关联性。

参考文献(References)

- [1] Yuan Y, Xu XJ, Dong HF, et al. Transmission control of schistosomiasis japonica: implementation and evaluation of different snail control interventions [J]. Acta Trop, 2005, 96 (2):191-197
- [2] Chen H, Nara T, Zeng X, et al. Vaccination of domestic pig with recombinant paramyosin against schistosoma japonicum in China [J]. Vaccine, 2000, 18 (20): 2142-2146
- [3] Donald P, McManus, Darren J. Gray. Schistosomiasis in the People's Republic of China: the Era of the Three Gorges Dam [J]. Clin Microbiol Rev, 2010, 23 (2): 442-466
- [4] Patrick Driguez, Denise L Doolan, Alex Loukas, et al. Schistosomiasis vaccine discovery using immunomics [J]. Parasit Vector, 2010, 3:4
- [5] McManus DP, Loukas A. Current status of vaccines for schistosomiasis [J]. Clin Microbiol Rev, 2008, 21 (1): 225-242
- [6] Knox DP, Redmond DL. Parasite vaccines-recent progress and problems associated with their development [J]. Parasitology, 2006, 133 Suppl: s1-8
- [7] McManus DP, Bertley PB. A vaccine against Asian schistosomiasis [J]. Parasitol Int, 2004, 53 (2): 163-173
- [8] Da dara AA, Li YS, Xiong T, et al. DNA-based vaccines protect against zoonotic schistosomiasis in water buffalo [J]. Vaccine, 2008, 26 (29-30): 3167-3125

·重要信息·

《分子影像学》第二版已正式出版发行

卜丽红¹ 戴薇薇²

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院医学影像科 150001 2 人民卫生出版社医药教育出版中心第四编辑室)

由哈尔滨医科大学附属第四医院申宝忠教授主编的《分子影像学》第二版(ISBN 978-7-117-13344-9/R·13345)一书已于2010年9月14日由人民卫生出版社出版发行。《分子影像学》是国内第一分子影像学大型专著。对于分子影像学的基本概念、基本原理、基本方法和应用概况都有精彩而详细的论述,充分体现了国际分子影像学的最新进展。

《分子影像学》第二版由著名医学影像学家、中国工程院院士刘玉清教授和美国分子影像学专家、美国医学科学院院士 Sanjiv Sam Gambhir 教授亲自作序。编委会包括美国哈佛大学、斯坦福大学等国外知名院校7名专家作为国外编委,国内多家知名大学、研究中心学术带头人13名作为国内编委,还包括国内外共40名专家参与编写。

全书共计130余万字,收录图片378幅,共分基础篇和应用篇。

基础篇共分10章,主要介绍了分子影像学的发展简史,分子成像的相关概念、基本原理、基本技术和设备等,内容较第一版更为精准、完善,覆盖面更加宽泛。着重针对探针合成这一当前分子成像研究的技术瓶颈,纳入了材料学、生物学和化学等相关技术内容。

应用篇共分7章,着重介绍了分子影像学技术的最新进展和应用情况,并详细介绍了分子成像在肿瘤、中枢神经系统和心血管系统疾病诊断中的应用情况,重点阐述了分子成像在监测基因治疗、活体细胞示踪以及新药研发等方面的最新研究进展,并就分子影像学向临床转化所面临的问题进行了深入剖析。

本书内容系统详实,深入浅出,图文并茂,可读性强。可供医学影像学专业、临床专业学生使用,并可为临床各学科研究生、临床医师及其他相关生命科学的研究人员提供参考。

《分子影像学》精装本定价260元,全国各大书店有售。