

# 日本血吸虫卵黄铁蛋白基因免疫在不同处理小鼠诱导免疫应答的观察

周俊梅, 余新炳, 吴忠道, 郑亦男, 李 焱, 李晖婷

(中山医科大学寄生虫学教研室, 广东 广州 510089)

**摘要:** 【目的】研究日本血吸虫卵黄铁蛋白 DNA 免疫在两种处理小鼠诱导的免疫应答及其保护作用。【方法】免疫小鼠分两大组进行: 实验 I 组小鼠有预感染, 实验 II 组小鼠没有预感染。将构建的携带日本血吸虫卵黄铁蛋白基因的重质粒 pLXSN-Fer1 经左后腿肌肉注射 BALB/c 小鼠, 共免疫 2 次, 间隔 2 周。末次免疫后 5 周以血吸虫尾蚴攻击感染, 6 周后剖杀小鼠, 计数成虫负荷及肝组织虫卵数。设空载质粒免疫组为对照组。【结果】免疫小鼠后在实验 I 组主要诱生 IgG1 和 IgG3, 在实验 II 组主要诱生 IgG2a 和 IgG2b; 实验组产生较高水平的 IgA 和 IFN- $\gamma$  应答。pLXSN-Fer1 免疫小鼠获得一定程度的减虫率(26.47%, 34.08%)和减卵率(40.02%, 36.83%)。【结论】日本血吸虫卵黄铁蛋白在两种不同处理小鼠均能产生一定程度的保护作用, 有可能成为有价值的疫苗候选分子, 值得进一步深入研究。

关键词: 血吸虫, 日本; 卵黄铁蛋白; 基因; MHC II 类

中图分类号: R383.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)05-0345-03

## The Immune Responses to *Shistosoma japonicum* Yolk Ferritin DNA Vaccine in Mice with Different Pretreatment

ZHOU Jun-mei, YU Xin-bing, WU Zhong-dao, ZHENG Yi-nan, LI Yan, LI Hui-ting

(Department of Parasitology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

**Abstract:** 【Objective】To study the immune responses to *Shistosoma japonicum* yolk ferritin DNA vaccination in mice with two approaches of pretreatments and its protecting effects. 【Methods】Set two-series of immunization experiments. Designed beforehand infection in group I, but not in group II. BALB/c mice were vaccinated with pLXSN-Fer1 encoding yolk ferritin gene of Chinese *Shistosoma japonicum* to each quadriceps muscle of left leg. Each group was immunized twice with 2 weeks interval. Mice vaccinated with pLXSN blank vector served as control. Mice were challenged five weeks after final DNA boosting by percutaneous infection with cercariae. Six weeks after infection the mice were perfused, worm burden and eggs in liver were counted. Sera from mice were collected from tail vein at weeks 3, 11, 17 in group I, and weeks 0, 6, 12 in group II, respectively. 【Results】In group I, mice produced predominantly IgG1 and IgG3; whereas in group II, IgG2a and IgG2b antibodies. Mice vaccinated with pLXSN-Fer1 also produced IgA and IFN- $\gamma$ . Immunization with pLXSN-Fer1 in the two groups could achieve significant worm reduction rate (26.47%, 34.08%) and egg reduction rate (40.02%, 36.83%). 【Conclusion】DNA vaccination with pLXSN-Fer1 could induce protective immunity in BALB/c mice significantly. It may serve as a molecule of a potential vaccine and be worth of further research.

**Key words:** *Shistosoma japonicum*; yolk ferritin; gene; MHC class II

收稿日期: 2001-04-06

基金项目: 中山医科大学“211工程”重点学科建设基金(98169)

作者简介: 周俊梅(1969-), 女, 湖南郴州人, 医学博士, 讲师, 现在本校微生物学教研室工作。

在血吸虫致病和流行的因素中,虫卵占首要地位,且迄今未发现虫卵有免疫逃避现象,所以阻止血吸虫性成熟和抑制产卵逐渐成为防治血吸虫病的主要考虑因素,虫卵及雌虫生殖系统的发育已成为药理攻击和/或疫苗研制的靶点<sup>[1]</sup>。1992年, Dietzel等<sup>[2]</sup>在曼氏血吸虫分离到两种编码铁蛋白亚型的基因,即卵黄铁蛋白(Fer1)和体细胞铁蛋白(Fer2)基因。此种分类与在 *Lymnaea stagnalis* 螺体内发现的铁蛋白亚型<sup>[3]</sup>相似,这两个基因在雌、雄虫体的转录水平明显不同,是具有性别、组织特异性的雌虫发育调控基因<sup>[4]</sup>。卵黄铁蛋白在雌虫性成熟及产卵过程中的发育调控作用,使其有可能成为抗卵(抗病)免疫的有效分子。为此,我们构建了携带日本血吸虫卵黄铁蛋白基因的真核表达重组质粒 pLXSN-Fer1<sup>[4]</sup>,在此基础上我们对其免疫原性及免疫不同处理小鼠诱导的免疫应答和保护性进行初步探讨。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

①质粒和菌株:真核表达重组质粒 pLXSN-Fer1 为本室构建, JM109 为本室保存。②细胞和动物: HeLa 细胞为本室冻存。BALB/c 雌性小鼠, 6~8 周龄, 购于本校实验动物中心。尾蚴购自江苏省血吸虫病防治研究所。③试剂: HRP-羊抗鼠 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 及 IFN- $\gamma$  试剂盒购自深圳晶美生物工程公司; HRP-羊抗鼠 IgA 为 Sigma 公司产品。

### 1.2 方 法

1.2.1 pLXSN-Fer1 的表达 见文献[5]。

1.2.2 小鼠免疫程序及攻击感染方案 ①实验分组: 实验 I 组 20 只小鼠随机分为 2 组, 每组 10 只, 即 pL-SjFer1 免疫组和空质粒对照组。每鼠于 0 周

进行预感染, 即经腹部皮肤感染尾蚴(20 $\pm$ 1)条; 4 周用吡喹酮治疗, 用量 300 mg/(kg $\cdot$ d), 每天 1 次持续 2 d; 5 周于左后腿肌肉注射盐酸布比卡因 50  $\mu$ L(0.5 g/L)预处理, 3 d 后同部位注射质粒 DNA 100  $\mu$ L(1 g/L); 7 周同量加强免疫 1 次。实验 II 组分组同实验 I 组, 每鼠于 0 周于左后腿肌肉注射盐酸布比卡因 50  $\mu$ L(0.5 g/L)预处理, 3 d 后同部位注射质粒 DNA 100  $\mu$ L(1 g/L); 2 周同量加强免疫 1 次。②攻击感染: 末次免疫后 5 周, 每鼠经腹部皮肤感染尾蚴(40 $\pm$ 1)条。攻击感染后 6 周, 经左心室门静脉灌注法检获成虫, 并收集肝组织, 分离虫卵, 以每克肝组织虫卵数(EPG)计算减卵率。

1.2.3 小鼠血清抗体分析及细胞因子分析 实验 I 组分别于 3 周, 11 周和 17 周时采血; 实验 II 组分别于 0 周, 6 周和 12 周时采血。采用 ELISA 法测定抗体, 即将鼠血清加入包被了血吸虫成虫可溶性粗抗原(SWAP)的酶标板, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, PBS-T 洗涤 3 次每次 5 min, 分别加入羊抗小鼠 IgG 亚类或 IgA-HRP 试剂, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, PBS-T 洗涤 3 次每次 5 min, 加入底物 OPD 显色, 2 mol/L 硫酸终止反应, 于酶标仪测定吸光值  $A_{450}$ 。双抗体夹心 ELISA 法测定小鼠血清 IFN- $\gamma$ , 结果以 ng/ $\mu$ L 表示。

## 2 结 果

### 2.1 重组质粒 DNA 免疫对小鼠的保护作用

实验 I 组中 pLXSN-Fer1 免疫组与注射空质粒的对照组相比, 减虫率为 26.47% ( $P < 0.05$ ); 减卵率为 40.02%。相应地, 实验 II 组中 pLXSN-Fer1 免疫组与注射空质粒的对照组相比, 减虫率为 34.08% ( $P < 0.05$ ); 减卵率为 36.83% (表 1, 表 2)。

### 2.2 小鼠血清特异性 IgG 亚类检测

表 1 pLXSN-Fer1 免疫小鼠攻击感染后的减虫率

Table 1 Worm burden reduction rate in pLXSN-Fer1 mice immunized with *Schistosoma japonicum* post-challenge infection

Group	Subgroup	$n$ <sup>1)</sup>	$n_{wr}$ <sup>2)</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )	Worm reduction rate(%)	$P$
I	pLXSN-Fer1	9	9.14 $\pm$ 1.95	26.47	< 0.05
	pLXSN	8	12.43 $\pm$ 1.72	—	
II	pLXSN-Fer1	9	8.57 $\pm$ 1.72	34.08	< 0.05
	pLXSN	7	13.00 $\pm$ 2.16	—	

1)  $n$ : the number of mice; 2)  $n_{wr}$ : the number of worms recovered

表2 攻击感染后小鼠每克肝组织虫卵计数

Table 2 Eggs per gram (EPG) of liver in immunized and control mice

Group	Subgroup	$n^{1)}$	$n_{\text{EPG}}^{2)}$	Egg reduction rate(%)
I	pLXSN-Fer1	9	19 663.09±3 968.34	40.02
	pLXSN	8	32 780.96±7 915.27	—
II	pLXSN-Fer1	9	19 062.50±3 997.22	36.83
	pLXSN	7	30 175.35±6 043.90	—

1)  $n$ : the number of mice; 2)  $n_{\text{EPG}}$ : the average number of eggs per gram

经 ELISA 法分析结果, 实验 I 组中有显著性变化的是 IgG3 和 IgG1, 而实验 II 组中有显著性变化的是 IgG2a 和 IgG2b。实验 I 组中, 小鼠免疫组的 IgG3 和 IgG1 的  $A_{450}$  均值在 17 周分别为 0.71 和 0.77; 比免疫前有明显提高。实验 II 组中, 小鼠免疫组的 IgG2a 和 IgG2b 的  $A_{450}$  均值在 6 周分别为 0.65 和 0.95, 12 周分别为 0.67 和 0.67。

### 2.3 小鼠血清 IgA 检测

小鼠免疫组在免疫后和攻击感染后血清 IgA 都显著高于对照组。实验 I 组中, 小鼠免疫组的 IgA 的  $A_{450}$  均值在 11 周和 17 周分别为 0.62 和 0.98; 实验 II 组中, 小鼠免疫组的 IgA 在 6 周和 12 周分别为 0.88 和 1.07。

### 2.4 小鼠血清 IFN- $\gamma$ 检测

实验 I 组中, 小鼠免疫组的 IFN- $\gamma$  均值在 17 周为 3 080.6 ng/L, 较 3 周有明显提高。实验 II 组中, 小鼠免疫组的 IFN- $\gamma$  均值在 12 周为 4 728.9 pg/mL, 较 0 周有明显提高。

## 3 讨论

从 1993 年 Ulmer 等<sup>[7]</sup>证实将基因直接注入机体不仅可以表达蛋白, 还可以诱生免疫应答以来, DNA 免疫已经在针对多种病毒、细菌和寄生虫等感染性病原体的动物模型中获得保护性免疫力。由于血吸虫免疫机制十分复杂, 到目前为止还未发现一种能诱导宿主产生较完全免疫力的分子抗原; 因而, 人们迫切需要了解血吸虫各个抗原分子对机体的作用, 以及了解不同的免疫方式所诱导的保护性效果。我们构建的携带日本血吸虫卵黄铁蛋白基因的重组质粒 pLXSN-Fer1 在 HeLa 细胞中表达, 经 SDS-PAGE 显示其表达蛋白的分子质量约为 21 ku, 与其它种类的铁蛋白分子质量一致。Western blot 结果表明, 蛋白条带可被感染兔血清和小鼠血清特异性识别, 表明该蛋白具有免疫原性, 为进一

步的 DNA 免疫实验奠定了基础。

已知 DNA 免疫能诱导长时间的体液应答, 而体液应答在不同的条件下有不同的抗体表达。IgG2a/IgG2b 和 IgG3 是反映小鼠 Th1, IgG1 和 IgE 是反映小鼠 Th2 类型细胞诱导激活的指标之一<sup>[6,7]</sup>。鉴于将来疫苗的使用将是两类人群, 既继往感染者和未感染者, 所以将实验小鼠分为两大组实验, 实验 I 组有预感染, 实验 II 组没有预感染。本实验从小鼠诱生的 IgG 亚类分析显示, 有预感染的小鼠诱生了 Th1/Th2 混合型免疫应答, 无预感染的小鼠诱生的主要是 Th1 型应答。说明有无预感染可能影响 IgG 亚类的产生。免疫小鼠还诱生了较高水平的 IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$  是主要的 Th1 类细胞因子, 与巨噬细胞的聚集过程密切相关, 是宿主杀灭肺期童虫的一个关键细胞因子<sup>[6,8]</sup>。较高水平的 IFN- $\gamma$  可能是小鼠获得一定程度保护性免疫力的原因之一。在血吸虫感染中, IgA 抗体是代表宿主免疫状态的又一种潜在标志。在针对 Sm28GST 引起的 IgA 应答中, 观察到 IgA 与雌虫排卵量和虫卵活性密切相关, IgA 抗体可以明显降低血吸虫生殖力, 限制其产卵并使死亡卵增加<sup>[9]</sup>。本实验观察到, 免疫小鼠对攻击感染产生一定程度的减卵率, 可能与其诱生的 IgA 抗体有关。

两组实验的免疫小鼠对攻击感染都能产生一定程度的减虫率和减卵率, 这种保护作用在两种处理组间没有明显差别, 初步表明日本血吸虫卵黄铁蛋白基因对小鼠进行 DNA 免疫具有一定的保护作用, 值得进一步深入研究。

### 参考文献:

- [1] Simpson A J, Knight M. Cloning of a major developmentally regulated gene expressed in mature females of *Schistosoma mansoni* [J]. Mol Biochem Parasitol, 1986, 18(1): 25.

(下转第 351 页)

可上调 B 细胞标志和细胞粘附因子 CD23、CD40、CD45 等的表达,下调 CD10 的表达,激活细胞粘附分子 LFA<sub>1</sub>, LFA<sub>3</sub>, ICAM<sub>1</sub> 等的表达<sup>[6]</sup>。② LMP1 能明显改变细胞的生物学行为,促进其的生长、增殖,使其表型倾向更进一步转化<sup>[7]</sup>。③ LMP1 还能诱导或上调某些基因的表达,如抗凋亡基因 A20,原癌基因 *Bcl-2*, 抑癌基因 p53 等。近年来有关 LMP1 作用机制方面的研究日益增多,目前普遍认为 LMP1 是通过肿瘤坏死因子受体相关因子(tumor necrosis factor receptor-associated factors, TRAFs)途径和肿瘤坏死因子受体相关死亡结构域(tumor necrosis factor receptor-associated death domain, TRADD)途径磷酸化抑制蛋白(inhibitor  $\kappa$ B $\alpha$ , I  $\kappa$ B $\alpha$ ), 激活核因子(nuclear factor, NF- $\kappa$ B), 从而对细胞发挥作用的<sup>[8,9]</sup>。LMP1 的作用机制非常复杂,尚待阐明。本研究中穿梭质粒 pGBKT7-LMP1 的构建,使得用酵母双杂交系统筛选与 LMP1 直接作用的蛋白质成为可能,为进一步阐明 LMP1 的信号传导途径提供了基础。

#### 参考文献:

- [1] Zheng X, Yuan F, Hu L, *et al.* Effect of a  $\beta$ -lymphocyte and NPC-derived EBV-LMP1 gene expression on *in vitro* growth and differentiation of human epithelial cells [J]. *Int J Cancer*, 1994, 57(5): 747.
- [2] Hu L F, Chen F, Zhen Q F, *et al.* Differences in the

growth pattern and clinical course of EBV-LMP1 expressing and non-expressing nasopharyngeal carcinomas [J]. *Eur J Cancer*, 1995, 31A(5): 658.

- [3] Cherney B W, Sgadari C, Kanegane C, *et al.* Expression of the Epstein-Barr virus protein LMP1 mediates tumor regression *in vivo* [J]. *Blood*, 1998, 91(7): 2491.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南 [M]. 第2版. 金冬雁, 黎孟枫译. 北京: 科学出版社, 1995. 46, 55~56, 322~323.
- [5] 刘予川, 明文玉, 银巍, 等. PS-2 基因的克隆及其在肝癌中的表达 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2000, 16(1): 1.
- [6] Roberts M L, Cooper N R. Activation of a Ras-MAPK-dependent pathway by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for cellular transformation [J]. *Virology*, 1998, 240(1): 93.
- [7] 张蕾, 刘鸿瑞, 刘彤华, 等. EB 病毒基因 LMP1 和 EBNA2 对支气管上皮细胞的转化 [J]. *中华病理学杂志*, 1999, 28(4): 277.
- [8] Devergne O, McFarland E C, Mosialos G, *et al.* Role of the TRAF binding site and NF-Kappa B activation in Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induced cell gene expression [J]. *J Virol*, 1998, 72(10): 7900.
- [9] Cahir-McFarland E D, Izumi K M, Mosialos G. Epstein-Barr virus transformation: involvement of latent membrane protein 1-mediated activation of NF- $\kappa$ B [J]. *Oncogene*, 1999, 18(49): 6959.

(编辑 张敏瑞)

(上接第 347 页)

- [2] Dietzel J, Hirzmann J, Preis D, *et al.* Ferritin of *Schistosoma mansoni*: sequence comparison and expression in female and male worms [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1992, 50(2): 245.
- [3] VonDarl M, Harrison P M, Bottke W. cDNA cloning and deduced amino acid sequence of two ferritins: soma ferritin and yolk ferritin, from the snail *Lymnaea stagnalis* L [J]. *Eur J Biochem*, 1994, 222(12): 353.
- [4] 周俊梅, 余新炳, 吴忠道, 等. 日本血吸虫卵黄铁蛋白基因的体外扩增及重组逆转录病毒 pLXSN-Fer1 重组质粒的构建 [J]. *中国人兽共患病杂志*, 2000, 16(1): 32.
- [5] Ulmer J B, Donnelly J J, Parker S E, *et al.* Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein [J]. *Science*, 1993, 259(23): 1745.
- [6] Clemens L E, Basch P F. *Schistosoma mansoni*: effect of transferrin and growth factors on development of schisto-

soma *in vitro* [J]. *J Parasitol*, 1989, 75(3): 417.

- [7] Moll H. Immune responses to parasites: the art of distinguishing the good from the bad [J]. *Immune Today*, 1996, 17(4): 551.
- [8] Couson P S, Smythies L E, Betts C, *et al.* Nitric oxide produced in the lungs of mice immunized with the radiation-attenuated schistosome vaccine is not the major agent challenge parasite elimination [J]. *Immunology*, 1998, 93(1): 55.
- [9] Boulanger D, Reid G D F, Sturrock R F, *et al.* Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni* [J]. *Parasite Immunol*, 1991, 13(3): 473.

(编辑 张敏瑞)