

文章编号: 1000-7423(2005)-06-0401-03

【论著】

# 植物多糖对日本血吸虫 DNA 疫苗 pVIVO2-IL12-Sj23 增效作用的研究

冯清<sup>1</sup>, 胡俊峰<sup>2</sup>, 陈涵<sup>2</sup>, 楼建林<sup>2</sup>, 甘燕<sup>3</sup>, 胡媛<sup>3</sup>, 石佑恩<sup>3</sup>

**【摘要】** 目的 以提取天然香菇菌多糖和茶叶多糖混合物为佐剂, 探讨混合型植物多糖对血吸虫疫苗的保护性免疫增效作用。方法 构建日本血吸虫重组质粒 pVIVO2-IL12-Sj23。BALB/c 小鼠随机分为 3 组, 每组 10 只。A 组每鼠股四头肌注射生理盐水 100  $\mu$ l 为对照, B 组每鼠注射 pVIVO2-IL12-Sj23 100  $\mu$ g, C 组每鼠注射 pVIVO2-IL12-Sj23 100  $\mu$ g 加等量多糖混合物。小鼠接种后第 4 周以日本血吸虫尾蚴 40 $\pm$ 2 条经皮肤攻击感染, 感染后 6 周剖杀, 计算减虫率及每克肝组织减卵率, 同时用 ELISA 测定血清中特异性抗体水平。结果 C 组减虫率和每克肝组织减卵率分别为 64.3% 和 79.9%, B 组则分别为 45.5% 和 58.3%, B、C 两组的差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。B、C 两组 IgG 水平均较 A 组显著升高 ( $P<0.05$ ), 但 B、C 两组 IgG 抗体水平的差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。结论 以天然香菇菌多糖和茶叶多糖混合物为佐剂, 对日本血吸虫重组质粒 pVIVO2-IL12-Sj23 的免疫效果有一定的增效作用。

**【关键词】** 血吸虫病; pVIVO2-IL12-Sj23 疫苗; 茶叶多糖; 香菇菌多糖; 佐剂

中图分类号: R383.24

文献标识码: A

## Studies on Effect Enhancement of the *Schistosoma japonicum* DNA Vaccine pVIVO2-IL12-Sj23 by Vegetal Polysaccharides

FENG Qing\*, HU Jun-feng, CHEN Han, LOU Jian-lin, GAN Yan, HU Yuan, SHI You-en

(Department of Chemistry, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

**【Abstract】** Objective To enhance the immunogenicity of the recombinant pVIVO2-IL12-Sj23 vaccine of *Schistosoma japonicum* by using mixed vegetal polysaccharides as adjuvant. Methods The plasmid pVIVO2-IL12-Sj23 was constructed. 3 groups of BALB/C mice were injected intramuscularly with normal saline (Group A), pVIVO2-IL12-Sj23 plasmid DNA (B), and pVIVO2-IL12-Sj23 plus mixed vegetal polysaccharides (C) respectively, and challenged with *S. japonicum* cercariae on the 4th week after immunization. Mice were killed to calculate the worm reduction rate and egg reduction rate in liver tissue on the 6th week after infection. Before and 4 weeks after immunization blood samples were collected. Results The worm reduction rate and egg reduction rate were 64.3% and 79.9%, respectively in group C, 45.5% and 58.4%, respectively in group B, showing a remarkable difference between them ( $P<0.05$ ). ELISA analysis showed a significantly higher level of IgG specific for Sj23 4 weeks after vaccination in groups B and C ( $P<0.05$ ). However, there was no significant difference in IgG level between groups C and B ( $P>0.05$ ). Conclusion When mixed vegetal polysaccharides are used as adjuvant, the effect of the vaccine pVIVO2-IL12-Sj23 can be considerably enhanced.

**【Key words】** *Schistosoma japonicum*; pVIVO2-IL12-Sj23 vaccine; Tea polysaccharide; Lentinan; Adjuvant

Supported by the Key Program of Science and Technology, Hubei Province (2001AA301C31 and 2003AA301D13)

\* Corresponding author, E-mail: westwind@public.wh.hb.cn

血吸虫病是一个严重的公共卫生问题, 血吸虫疫苗的研究已有半个多世纪, 现在已经发展到核酸疫苗, 包括混合或多价 DNA 疫苗, 但疫苗候选分子诱

导的保护力较弱, 很少超过 50% 减虫率。为此, 要继续寻找新的疫苗抗原分子, 同时注意研究筛选可用于人体的疫苗佐剂, 进一步提高其保护力<sup>[1]</sup>。多年来, 人们不断的探索希望能找出有效安全的佐剂, 可是实际上并不如意。近年来研究发现, 以植物多糖形式存在的活性成分以其具有明显的免疫调节作用和无毒副作用等特点吸引了广大研究者的注意<sup>[2-3]</sup>。本文将从茶叶和香菇中提取的多糖进行动物实验, 证明混合型植

基金项目: 湖北省重点科技攻关项目(批准号: 2001AA301C31 和 2003AA301D13)

作者单位: 1 华中科技大学化学系; 2 华中科技大学同济医学院临床医学七年制生; 3 华中科技大学同济医学院寄生虫学教研室, 武汉 430030

\* 通讯作者, E-mail: westwind@public.wh.hb.cn

物多糖对日本血吸虫疫苗 pVIVO2-IL12-Sj23 有较好的增效作用。在此基础上初步探讨了混合型植物多糖佐剂对血吸虫疫苗的增效机制。

### 材料与方法

#### 1 仪器与试剂

普通茶叶(湖北宜昌产)和新鲜香菇(湖北东西湖产)购于农贸市场。血吸虫重组 pVIVO2-IL12-Sj23 疫苗及 ELISA 试剂由华中科技大学同济医学院寄生虫学教研室研制并提供。

红外光谱 (IR)用 Shimadzu FT-IR 3000 (KBr 压片, 单位:  $\text{cm}^{-1}$ ) 红外光谱仪(日本岛津); 紫外可见光谱(UV-vis)用 756MC 紫外-可见光谱仪(上海精密科学仪器有限公司分析仪器总厂), FM-5J 冰点渗透压计(上海医科大学仪器厂)测分子量(MW)。

#### 2 多糖(佐剂)的提取

2.1 茶叶多糖的提取 取茶叶 100 g, 加 16 倍蒸馏水浸泡过夜。浸泡液恒温水浴上回流 2.5 h, 抽滤, 滤液保留待用。滤渣继续加 16 倍水回流 2 h, 抽滤。合并两次滤液, 浓缩至 400 ml, 活性炭脱色, 滤液中加 75%乙醇, 于冰箱中醇析过夜, 抽滤, 得灰褐色泥状沉淀。加氯仿 80 ml、正丁醇 20 ml 混匀, 静置 3 h, 离心, 取上层。冰箱内醇析过夜。取滤渣, 分别用无水乙醇、乙醚、丙酮反复洗涤, 得沉渣置 30~40 °C烘箱烘干, 称重, 得茶叶多糖 10.05 g。产率为 10.05%。

2.2 香菇菌多糖的提取 方法同上, 产率为 1.67%。

#### 3 动物实验

3.1 实验动物分组及接种 雌性 12~14 周龄的 BALB/c 小鼠 30 只, 购自湖北省疾病预防控制中心, 每只体重  $20 \pm 1.2$  g, 随机分 3 组, 每组 10 只。A 组, 每鼠 100  $\mu$ l 生理盐水为对照组; B 组, 每鼠 100  $\mu$ g pVIVO2-IL12-Sj23 血吸虫 DNA 疫苗; C 组, 每鼠 100  $\mu$ g pVIVO2-IL12-Sj23 与等量多糖佐剂(茶叶多糖和香菇菌多糖以 1:1 比例混合)的混合物。上述试剂均以 PBS (pH 7.4 0.02 mol/L)配制, 参照文献<sup>[4]</sup>接种于小鼠股四头肌。

3.2 攻击感染 接种后第 4 周, 以日本血吸虫大陆株尾蚴  $40 \pm 2$  条/只经小鼠腹部皮肤攻击感染。

3.3 检测抗体水平 于免疫前及免疫后 4 周经小鼠尾静脉采血, 分离血清, 置 -20 °C 冰箱冻存, 用于 ELISA 测定各实验组小鼠免疫前、后的血清 IgG 水平。

3.4 计算减虫率和减卵率 攻击感染后第 6 周, 处

死小鼠, 收集 3 组小鼠的成虫数和每克肝组织虫卵数, 分别计算减虫(卵)率。减虫率= $[(1 - \text{免疫组检获成虫数} / \text{对照组检获成虫数}) \times 100\%]$ ; 减卵率= $[(1 - \text{免疫组检获平均每克肝组织虫卵数} / \text{对照组检获平均每克肝组织虫卵数}) \times 100\%]$ 。

#### 4 统计学分析

数据用 SAS 8.1 统计软件处理, 经单因素方差分析进行比较。

### 结果

#### 1 多糖(佐剂)的鉴定

茶叶多糖和香菇菌多糖的 IR、UV-vis 及分子量数据见表 1。

表 1 茶叶多糖和香菇菌多糖的 IR、UV-VIS 和分子量  
Table 1 Data of IR, UV-VIS and molecular weight of tea polysaccharide and lentinan

物质 Substance	红外光谱 IR( $\text{cm}^{-1}$ )	紫外-可见光谱 UV-vis(nm)	分子量 MW
茶叶多糖 Tea polysaccharide	3398 (O-H), 1157, 1029, 842(C-O),	197	$5.81 \times 10^4$
香菇菌多糖 Lentinan	3405 (O-H), 1116, 861 (C-O)	197	$3.01 \times 10^4$

#### 2 减虫率和减卵率

pVIVO2-IL12-Sj23 组减虫率和减卵率分别为 45.5%、58.4%, 加入混合多糖佐剂组减虫率和减卵率分别达到 64.3%、79.9%; 佐剂疫苗组(C 组)较单用疫苗组(B 组)减虫率和减卵率差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 即混合型植物多糖能显著的增长疫苗 pVIVO2-IL12-Sj23 的减虫率和减卵率, 对疫苗有明显的增效作用, 并且使用混合多糖后使平均每对成虫的产卵量也有明显下降(从 10 699 降至 4 705)(表 2)。

#### 3 免疫前后血清特异性 IgG 抗体水平

免疫后 4 周检测小鼠体内 IgG 抗体水平, C 组和 B 组明显高于 A 组 ( $P < 0.05$ ), 但 C 组和 B 组 IgG 抗体滴度水平的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )(表 3)。

### 讨论

目前血吸虫疫苗的研究已深入到 DNA 疫苗和重组 BCG 疫苗, 这些新型疫苗接种易感动物均产生了部分保护力。但其诱导的免疫效果不理想, 因此研究高效低毒的人用型佐剂不失为血吸虫疫苗预防的有效途径<sup>[6-7]</sup>。

表 2 BALB/c 小鼠平均检获成虫、减虫率和平均检获虫卵及减卵率  
Table 2 The mean burden, worm reduction rate and egg reduction rate in liver tissue of mice

组别 Group	鼠数 No. mice	平均检获成虫数 No. worms	减虫率(%) <sup>*</sup> Worm reduction rate(%) <sup>*</sup>	平均每克肝组织虫卵数 Eggs per gram liver	减卵率(%) <sup>**</sup> Egg reduction rate(%) <sup>**</sup>	平均每对成虫产卵量 Eggs per worm pair
A	10	23.5±4.8		44 560±7 378		10 699
B	10	12.8±2.9	45.5	18 560±7 674	58.4	9 484
C	10	8.4±2.8	64.3	8 960±1 649	79.9	4 705

注: \* 减虫率: C 组与 B 组比较, P<0.05; \*\* 减卵率: C 组与 B 组比较, P<0.05。  
Note: \* Worm reduction rate: Group C vs group B, P<0.05; \*\* Egg reduction rate: Group C vs group B, P<0.05.

表 3 免疫前后血清特异性 IgG 抗体水平  
Table 3 Specific IgG antibody level in sera of mice before and after immunization

组别 Group	鼠数 No. mice	免疫前平均 A 值 <sup>*</sup> A value before immunization <sup>*</sup>	免疫 4 周后平均 A 值 <sup>**</sup> A value 4 weeks after immunization <sup>**</sup>
A	10	0.2445±0.114	0.321±0.089
B	10	0.280±0.059	0.524±0.085
C	10	0.330±0.108	0.536±0.087

注: \* 免疫前, B 组和 C 组与 A 组比较及 C 组与 B 组比较, P>0.05; \*\* 免疫后, C 组与 B 组比较, P>0.05, B 组和 C 组与 A 组比较; P<0.05。  
Note: \* Before immunization, group B vs group A, group C vs group A, and group C vs group B, P>0.05; \*\* After immunization, group C vs group B, P>0.05, group B vs group A and group C vs group A, P<0.05.

随着科学技术的发展和人们生活水平的提高,人们对医药的追求越来越趋向回归自然,天然药物的研究开发已为国内外有关专家所重视。根据中医理论和现代科学技术分析,多糖类药物能刺激机体 T 细胞、B 细胞等的成熟分化繁殖,还能促进白细胞介素-1(IL-1)、肿瘤坏死因子(TNF)和干扰素(IFN)等细胞因子的激活。且上述机体免疫系统功能的上调,对机体细胞无直接细胞毒作用。由于其在自然界中资源丰富,价格低廉;吸引了广大研究者的注意<sup>[2]</sup>。本实验用茶叶多糖和香菇菌多糖混合型多糖为佐剂,结果显示:与文献报道的植物多糖佐剂相比<sup>[2]</sup>,混合型多糖对血吸虫疫苗 pVIVO2-IL12-Sj23 有更好的增效作用,减虫率和减卵率均超过 50% (分别达到 64.3%、

79.9%), 即混合型植物多糖对日本血吸虫疫苗 pVI-VO2-IL12-Sj23 有较好的增效作用。免疫后 4 周检测小鼠体内 IgG 抗体滴度水平, C 组和 B 组明显高于对照组(P<0.05), 表明 C 组和 B 组都产生了体液免疫应答;结合佐剂疫苗组与疫苗组相比减虫率和减卵率差异有统计学意义(P<0.05)。提示混合型植物多糖对日本血吸虫疫苗 pVIVO2-IL12-Sj23 有明显的增效作用,其免疫机制有细胞免疫应答的参与。该机制有待于进一步研究。而上述多糖来源于常见植物,成本低,安全性高,有望开发成为新型疫苗佐剂而应用于临床。

参 考 文 献

[ 1 ] Singh M, O'Hagan DT. Advances in vaccine adjuvants[J]. Nat Biotechnol, 1999, 17: 1075-1081.  
[ 2 ] 田明礼, 易新元, 曾宪芳, 等. 佐剂 FCA 与 QuilA 对 rGST-Sj23 的免疫增强作用的比较[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2001, 14: 210-212.  
[ 3 ] Soltysik S. Structure/function studies of QS21 adjuvant assessment of triterpene aldehyde and glucuronic acid roles in adjuvant function[J]. Vaccine, 1995, 13: 1403-1410.  
[ 4 ] O'Hagan DT. Recent advance in vaccine adjuvants for systemic and mucosal administration [J]. J Pharm Pharmacol, 1998, 50: 1.  
[ 5 ] Ulrich JT, Myers KR. Monophosphoryl lipid A as an adjuvant. Past experiences and new directions[J]. Pharm Biotechnol, 1995, 6: 495.  
[ 6 ] Keefer MC, Wolff M, Gorse GJ, et al. Safety and immunogenicity of Env 2-3, a human immunodeficiency virus type 1 candidate vaccine, in combination with a novel adjuvant, MTPPE/MF59[J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 1997, 13: 1163.  
[ 7 ] Gupta RK, Rost BE, Relyveld E, et al. Adjuvant properties of aluminum and calcium compounds[J]. Pharm Biotechnol, 1995, 6: 229-248.

(收稿日期:2005-03-30 编辑:富秀兰)