

日本血吸虫 Mr 23 000 抗原与白细胞介素-12 多价 DNA 疫苗诱导小鼠保护性免疫的研究

卜玲毅, 石佑恩, 甘燕, 朱晓华, 宁长修, 朱红刚

【摘要】 目的 研究能共同表达日本血吸虫 Mr 23 000 膜抗原(Sj23)与白细胞介素-12(IL-12)的多价 DNA 疫苗 PV-IL12-Sj23 诱导 BALB/c 小鼠免疫保护作用。方法 在多价 DNA 疫苗 PV-IL12-Sj23 和 PV-IL12 的基础上,构建空白质粒 PV 和仅表达 Sj23 的质粒 PV-Sj23。50 只 BALB/c 小鼠分为 5 组,每组 10 只,分别注射多价 DNA 疫苗 PV-IL12-Sj23、表达 Sj23 的质粒 PV-Sj23、表达 IL-12 质粒 PV-IL12、空白质粒 PV 和生理盐水,100 μg/只,免疫 1 次。4 周后每只鼠攻击感染 40±2 条尾蚴,42 d 后剖杀,计数成虫及肝内虫卵数。结果 成功地构建了空白质粒 PV 和只表达 Sj23 的质粒 PV-Sj23 及多价 DNA 疫苗 PV-IL12-Sj23。PV-IL12-Sj23 组和 PV-Sj23 组分别获得了 45.5%和 27.2%的减虫率,两组比较差异有显著性($P<0.05$),减卵率分别为 58.4%和 33.9%。结论 多价 DNA 疫苗 PV-IL12-Sj23 可诱导 BALB/c 小鼠产生较显著的抗血吸虫免疫保护作用,且保护性效果比单价 DNA 疫苗 PV-Sj23 好。

【关键词】 日本血吸虫;膜抗原;白细胞介素-12;多价 DNA 疫苗;免疫保护

中图分类号:R383.24 文献标识码:A

Protective immunity Induced by Multivalent DNA Vaccine of *Schistosoma japonicum* Mr23×10³ Membrane Antigen and IL-12 in Mice

BU Ling-yi, SHI You-en, GAN Yan, ZHU Xiao-hua, NING Chang-xiu, ZHU Hong-gang

(Department of Parasitology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan430030, China)

【Abstract】 Objective To develop multivalent DNA vaccine PV-IL12-Sj23 which co-expresses Sj23 and cytokine IL-12, and investigate its protective efficacy in BALB/c mice against challenge infection. **Methods** On the basis of the reconstructed plasmid PV-IL12-Sj23 and plasmid PV-IL12, blank plasmid PV and plasmid PV-Sj23 only expressing Sj23 were constructed. Fifty BALB/c male mice were divided into five groups, which were immunized intramuscularly with multivalent DNA vaccine PV-IL12-Sj23, plasmid PV-Sj23 expressing Sj23, plasmid PV-IL12 expressing cytokine IL-12, blank plasmid PV and saline, respectively. Each mouse was immunized with 100 μg DNA only once. All the mice were challenged with 40 cercariae at week 4, killed and perfused for collection of worms at week10. The number of recovered worms and eggs in the liver were counted. **Results** Blank plasmid PV and plasmid PV-Sj23 expressing Sj23 were successfully constructed. The worm reduction rate in PV-IL12-Sj23 group and PV-Sj23 group was 45.5% and 27.2% ($P<0.05$) respectively. The number of eggs in liver tissue was reduced by 58.4% and 33.9% respectively. **Conclusion** Multivalent DNA vaccine PV-IL12-Sj23 can induce protective immunity against *Schistosoma japonicum* in BALB/c mice significantly, with a better protective efficacy than the monovalent DNA vaccine PV-Sj23.

【Key words】 *Schistosoma japonicum*; Membrane antigen; IL-12; Multivalent DNA vaccine Immunoprotection

血吸虫病是一种严重危害人类健康的寄生虫病,据世界卫生组织(WHO)估计 1995 年全球有 75 个国家和地区有血吸虫病流行,受威胁的人口约 6.25 亿,血吸病患者 1.93 亿^[1]。我国日本血吸虫病流行区受威胁人口达 1 亿。日本血吸虫寿命长、危害大、动物宿主多,单一的药物治不能阻断传播。WHO 提出以加速研制血吸虫疫苗作为综合防治的措施之一。国内外学者对血吸虫核酸疫苗的研究取得可喜的成绩,构建

了表达血吸虫不同的抗原基因的核酸疫苗,并进行相应的一系列保护性免疫研究^[2-5]。白细胞介素-12(IL-12)具有较强的免疫佐剂作用,可促进 Th1 细胞增殖,增强其细胞免疫,因而有可能成为提高 DNA 疫苗细胞免疫功能的良好佐剂^[6]。本研究构建了空白质粒 PV 和只含有 Sj23 基因的质粒 PV-Sj23,以此作为对照观察 PV-IL12-Sj23 在 BALB/c 小鼠中的免疫保护性作用。

材料与方法

1 质粒和菌株

真核表达载体 pVIVO2-mIL12/mcs (以下简称

作者单位:华中科技大学同济医学院寄生虫学教研室,武汉 430030
现工作单位:中国协和医科大学基础医学研究所病原生物学系,
北京 100005

PV-IL12)和宿主菌 *E.coli* GT110 购自美国 Invivogen 公司。真核表达载体 pVIVO2-mIL12/Sj23(以下简称 PV-IL12-Sj23)本室构建^[7]。

2 主要试剂

限制性内切酶、高保真 DNA 聚合酶(Pyrobest™ DNA Polymerase)、DNA 连接试剂盒、DNA 分子量标志物(日本 TaKaRa 公司),小量质粒抽提试剂盒和凝胶回收试剂盒(美国 Omega 公司),大量质粒抽提试剂盒(美国 Promega 公司),其他试剂为进口或国产分析纯。

3 构建 PV 空白对照质粒和 PV-Sj23 重组质粒的引物序列及建立 PCR 反应体系

目的是构建不含有鼠 IL-12 基因序列的重组质粒 PV-Sj23 和空白对照质粒 PV。根据 PV-IL12 的序列,设计一对引物。这对引物 5'端始于 PV-IL12 的 4 098 位,在 4 133 位上有 *Not* I 识别位点;3'终止于 PV-IL12 的 5 302 位(mIL-12 表达基因前),并且 3'端含有 *Avr* II 识别位点,片段大小为 1 212 bp。上游引物(P1):5'CACTAGTTCGCCAGAGCGCGGAG3',下游引物(P2):5'GGCCTAGGAGCGTGATTGACCCATGAT TGCTTT G3'。以上引物由上海生工生物工程公司合成。PCR 的反应体系按 Pyrobest™ DNA Polymerase 试剂盒的说明操作,反应总体积为 50 μl,PCR 反应条件:95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 1 min,55 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 5 min,32 个循环,最后一个循环 72 °C 延伸 10 min。

4 PV-Sj23 和 PV 质粒的构建和鉴定

分别取适量的质粒 PV-IL12、PV-IL12-Sj23 和 PCR 产物以 *Not*I 和 *Avr*II 酶切,按胶回收试剂盒说明操作,回收双酶切大片段,酶切回收的质粒 PV-IL12、PV-IL12-Sj23 大片段(均不含有 IL-12 的基因)。定量后将回收的质粒大片段分别与回收的 PCR 产物连接并转化到 *E.coli* GT110,挑取菌落 LB(含潮霉素 B)中培养,提取质粒 DNA,用 *Not*I 和 *Avr*II 双酶切分析,同时也用 *Not*I 和 *Avr*II 双酶切质粒 PV-IL12、PV-IL12-Sj23 做对照,电泳检测是否确实将 PCR 片段与载体酶切回收的质粒 PV-IL12、PV-IL12-Sj23 大片段重组。

5 重组质粒的大量制备

按美国 Promega 公司的大量提取质粒 DNA 试剂盒的说明,大量制备质粒 PV-IL12、PV-IL12-Sj23、PV、PV-Sj23,溶于无菌生理盐水中,在核酸蛋白仪上

测定浓度。

6 免疫方案

50 只 8 周龄的雄性 BALB/c 小鼠(购自武汉生物制品研究所)随机分到 4 个实验组和 1 个对照组,经股四头肌肌肉注射 0.75% 盐酸布比卡因,35 μl/只。1d 后在相同部位根据分组分别注射 PV-IL12、PV-IL12-Sj23、PV 或 PV-Sj23 质粒 DNA,100 μg/只,免疫 1 次,对照组注射生理盐水。

7 攻击感染和免疫效果的观察

免疫后 4 周,每鼠经腹部皮肤人工感染 40±2 条日本血吸虫尾蚴。攻击感染后 6 周剖杀,肝门静脉灌注收集成虫并计数。称取肝组织(右叶)1 g,加入 5% 的 KOH 20 ml,于 37 °C 孵箱中消化 12 h(过夜),虫卵计数,算出虫卵数/g 肝组织(EPG)。减虫率和肝组织减卵率的计算公式为:减虫率(%)=[(对照组平均检获成虫数-免疫组平均检获成虫数)/对照组平均检获成虫数]×100%;减卵率(%)=[(对照组平均 EPG-免疫组平均 EPG)/对照组平均 EPG]×100%。

8 统计方法

用 SAS(10.0 版本)软件包对数据进行 *t* 检验分析。

结 果

1 质粒 PV-Sj23 和 PV 的构建

1.1 PCR 产物 特异引物 P1 和 P2,以质粒 PV-IL12 为模板,成功地获得预期的目的条带,其大小约 1 200 bp,与本研究预期设计的 1 212 bp 一致(图 1)。

1.2 质粒 PV-Sj23 和 PV 的鉴定 从图 2 可见,当用 *Avr* II 和 *Not* I 双酶切质粒 PV-IL12 (Lane 2) 和 PV-IL12-Sj23 (Lane 4) 时,切下的小片段因含有 mIL-12 基因(1 651 bp)约 2 900 bp,而质粒 PV-Sj23 (Lane 5) 和 PV (Lane 3) 双酶切时,切下的小片段约 1 200 bp,证实成功得到不含 mIL-12 基因的质粒 PV-Sj23 和 PV。*Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切质粒 PV-Sj23 (Lane 7) 和 PV (Lane 6),质粒 PV-Sj23 获得 Sj23 特异片段,而 PV 未切下任何片段,再次证实质粒 PV-Sj23 和 PV 构建成功。

2 保护性作用

2.1 减虫率 各组平均检获成虫数和减卵率见表 1。PV-Sj23 和 PV-IL12-Sj23 组的减虫率分别为 27.23% 和 45.53%,两组的平均检获成虫数差异有显著性($P<0.05$),并且这两组分别与对照组、PV 的平均检获成虫数相比差异有显著性。

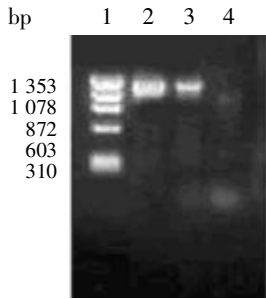
讨 论

血吸虫 Mr 23 000 膜抗原存在于血吸虫尾蚴、童虫、晚期童虫和成虫等各期的表膜上。血吸虫 Mr 23 000 膜抗原也是 WHO 认可的 6 种血吸虫疫苗候选分子之一^[7,8], 针对日本血吸虫 Mr 23 000 膜抗原(Sj23)的核酸疫苗研究的报道较多。李柳哲等^[9]报道 Sj23 的核酸疫苗在 BALB/c 可诱导 33%的保护力。任建功等^[10]用 Sj23 的 DNA 疫苗在 C57BL/6 小鼠可诱导产生 26.9%的减虫率, 与 IL-12 质粒 DNA 一起免疫则可产生 35.4%的减虫率。朱荫昌等^[11]以鼠 IL-12 的质粒 DNA 与 Sj23 DNA 疫苗共同免疫猪, 可显著增加 Sj23 DNA 疫苗的保护性作用(减虫率从 29.2%增加到 58.6%)。表明 IL-12 作为细胞因子佐剂, 可有效地增强血吸虫核酸疫苗的免疫保护性作用。

本研究选用的真核表达载体 pVIVO2 是美国 Invivogen 公司新一代的具有两个翻译单位的多基因载体, 可以在 1 个载体上同时表达 2 个目的基因。该载体上有 SV40 和 CMV 增强子。载体 pVIVO2 还有人的 FerL 和 FerH 启动子, 它们的作用是消除 2 个表达体系翻译时互相干扰的危险。IL-12 是在各种免疫佐剂的免疫调节活性中起关键作用的细胞因子, 其独特的最重要的生物学活性是具有调节 Th1 与 Th2 细胞之间的平衡^[12]。IL-12 由 P35 和 P40 2 个亚单位组成, 但游离的 P40 与 IL-12 的作用相反。

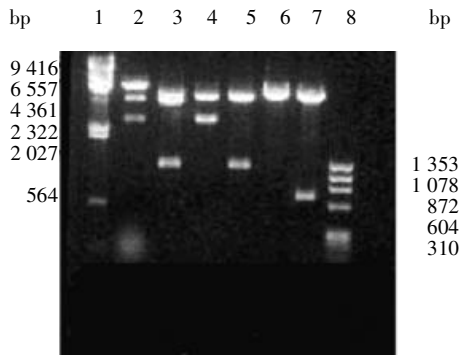
美国 Invivogen 公司用 2 个牛弹性蛋白结构域 (motifs) 来连接 IL-12 的 2 个亚单位, 以 1 个多肽的形式表达活性的 IL-12。确保 2 个链能等量的表达 2 个亚单位, 从而防止游离 P40 干扰 IL-12 的活性。故本研究从 Invivogen 公司订购连有鼠的 IL-12 基因的 pVIVO2 质粒 (pVIVO2-mIL12/mcs, PV-IL12), 该载体上的一个多克隆位点 (mcs) 上连接着鼠的 IL-12 基因, 另一个 mcs 是空的。在此基础上, 本研究在另一个 mcs 成功地连接了日本血吸虫的 Sj23 基因, 获得能共同表达 IL-12 和 Sj23 真核表达载体 PV-IL12-Sj23, 并改造质粒 PV-IL12 和 PV-IL12-Sj23, 得到空白质粒 PV 和只含有 Sj23 基因的质粒 PV-Sj23。

在构建空白质粒 PV 和只含有 Sj23 基因的 PV-Sj23 时, 质粒 PV-IL12 仅在 mIL-12 基因 3'端有一个酶切位点 *Avr* II, 但在 5'端没有适宜的酶切位点, 因此设计 1 对特异引物 P1 和 P2, P1 是在质粒 PV-IL12 的 mIL-12 基因前选到一合适的酶切位点 *Not*I(4 133 位), 并且在其稍前的 4 098 位开始找到合适的 25 bp 的序列。P2 则是在 mIL-12 基因(5 302 位)前, 并加上酶切位点 *Avr*II。这对引物得到片段大小为 1 212 bp,



1: Φ x174-HaeIII DNA 分子量标准物 2,3: PCR 产物 4: 对照。
1: Φ x174-HaeIII digest DNA marker 2,3: PCR product 4: Control

图 1 PCR 扩增产物
Fig. 1 PCR product



1: λ DNA/ *Hind* III DNA 分子量标准物, 2: PV-IL12 双酶切(*Avr* II+*Not* I), 3: PV 双酶切(*Avr* II+*Not* I), 4: PV-IL12-Sj23 双酶切(*Avr* II+*Not* I), 5: PV-Sj23 双酶切(*Avr* II+*Not* I), 6: PV 双酶切(*Bam*H I +*Eco*R I), 7: PV-Sj23 双酶切(*Bam*H I +*Eco*R I), 8: Φ x174-HaeIII DNA 分子量标志物。1: λ DNA/ *Hind* III marker, 2: PV-IL12 digested with *Avr* II+*Not* I, 3: PV digested with *Avr* II+*Not* I, 4: PV-IL12-Sj23 digested with *Avr* II+*Not* I, 5: PV-Sj23 digested with *Avr* II+*Not* I, 6: PV digested with *Bam*H I +*Eco*R I, 7: PV-Sj23 digested with *Bam*H I +*Eco*R I, 8: Φ x174-HaeIII digest DNA marker.

图 2 酶切鉴定重组质粒 PV 和 PV-Sj23

Fig.2 Identification of recombinant plasmids PV and PV-Sj23 digested with *Avr* II+*Not* I

2.2 减卵率 各组实验鼠平均每克肝组织内虫卵数及减卵率见表 2。PV-Sj23 和 PV-IL12-Sj23 组的减卵率分别为 33.9%和 58.4%, 两组的 EPG 差异有显著性($P < 0.01$), 并且这两组分别与对照组、PV 和 PV-IL12 的平均每克肝组织虫卵数相比差异有显著性。

表 1 各组检获成虫数和减虫率的比较

Table 1 Comparison of the number of recovered adult worms and worm reduction rate among the five groups

组别 Group	鼠数 No.mice	平均检获成虫数($\bar{x}\pm s$) Average no. of worms($\bar{x}\pm s$)	减虫率(%) Worm reduction rate(%)	P值 P value			
				Control	PV	PV-IL12	PV-Sj23
对照 Control	10	23.5±4.81					
PV	10	22.4±5.89	4.68	>0.05			
PV-IL12	10	19.3±5.03	17.87	>0.05	>0.05		
PV-Sj23	10	17.1±4.75	27.23	<0.01	<0.05	>0.05	
PV-IL12-Sj23	10	12.8±2.86	45.53	<0.01	<0.01	<0.01	<0.05

表 2 各组实验鼠平均每克肝组织内虫卵数及减卵率

Table 2 Comparison of the number of eggs per gram liver tissue of mice and egg reduction rate among the five groups

组别 Group	鼠数 No.mice	平均每克肝组织虫卵数($\bar{x}\pm s$) Average no. of eggs per gram liver tissue($\bar{x}\pm s$)	减卵率(%) Egg reduction rate(%)	P值 P value			
				Control	PV	PV-IL12	PV-Sj23
对照 Control	10	44 560±7 378					
PV	10	47 766±10 813		>0.05			
PV-IL12	10	42 900±9 554	3.72	>0.05	>0.05		
PV-Sj23	10	29 440±11 398	33.93	<0.01	<0.01	<0.05	
PV-IL12-Sj23	10	18 560±7 646	58.35	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

分别与 *AvrII* 和 *NotI* 双酶切质粒 PV-IL12 和 PV-IL12-Sj23 得到的大片段连接,从而获得空白质粒 PV 和只含有 Sj23 基因的 PV-Sj23,为多价 DNA 疫苗的研究提供相应的空白对照和单价 DNA 疫苗的对照。

多价 DNA 疫苗 PV-IL12-Sj23 和单价 DNA 疫苗 PV-Sj23 免疫 BALB/c 小鼠,对日本血吸虫尾蚴攻击感染多价 DNA 疫苗 PV-IL12-Sj23 获得比单价 DNA 疫苗 PV-Sj23 高的保护性作用,进一步说明 IL-12 可增强血吸虫核酸疫苗的免疫保护性作用。IL-12 对 DNA 疫苗免疫佐剂作用,均是用 IL-12 的真核表达载体与所研究的 DNA 疫苗混合免疫动物^[13,14]。有学者用分别表达小鼠 IL-12 的 2 个亚单位的 DNA 疫苗与所研究的 DNA 疫苗混合免疫动物^[12],这需分别制备和注射至少 2 种以上的质粒 DNA,比较烦琐,并且费时、费力。而多价 DNA 疫苗 PV-IL12-Sj23 可以减少制备和注射的过程,简化操作程序,是一种有发展前景的血吸虫核酸疫苗。

参 考 文 献

- [1] Chitsulo L, Engels D, Montresor A, et al. The global status of schistosomiasis and its control[J]. Acta Trop, 2000,77:41-51.
- [2] Wayne GJ, Mazzer DR, McManus DP. DNA Immunization by intramuscular injection or gene gun induces specific IgG antibodies against a *Schistosoma japonicum* 22kDa antigen, Sj22, when fused to the murine IgK-chain secretory leader sequence[J]. Parasite Immunol, 1999,21:53-56.
- [3] Wayne GJ, Alarcon JB, Qiu L, et al. Genetic immunization of mice with DNA encoding the 23kDa transmembrane surface protein of *Schistosoma japonicum* (Sj23) induces antigen-specific immunoglobulin

- G antibodies[J]. Parasite Immunol, 1999, 21:377-381.
- [4] Dupre L, Poulain-Godefroy O, Ban E, et al. Intradermal immunization of rats with plasmid DNA encoding *Schistosoma mansoni* 28kDa glutathione S-transferase[J]. Parasit Immunol, 1997, 19:505-513.
- [5] Zhang YY, Taylor MG, Gregoriadis G, et al. Immunogenicity of plasmid DNA encoding the 62 kDa fragment of *Schistosoma japonicum* myosin[J]. Vaccine, 2000,18:2102-2109.
- [6] Sin JI, Kim JJ, Arnold RL. IL-12 gene as a DNA vaccine adjuvant in a herpes mouse model: IL-12 enhances Th1-type CD4+ T cell-mediated protective immunity against *Herpes simplex virus-2* challenge[J]. J Immunol, 1999,162:2912-21.
- [7] Bergquist NR. Schistosomiasis vaccine development: progress and prospects[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1998,93 Suppl 1:95-101.
- [8] Bergquist NR, Colley DG. Schistosomiasis vaccine: Research to development[J]. Parasitol Today, 1998,14:99-104.
- [9] 李柳哲, 石佑恩. 日本血吸虫表膜蛋白 23kDa 的 DNA 疫苗的研制及其诱导小鼠的保护性作用[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 1999, 11:71-74.
- [10] 任建功, 朱荫昌, Harn DA, 等. 日本血吸虫中国大陆株 23 kDa 膜蛋白的 DNA 疫苗诱导 C57BL/6 小鼠保护性免疫的研究[J]. 中国寄生虫与寄生虫病杂志, 2001, 19: 336-339.
- [11] 朱荫昌, 任建功, Harn DA, 等. 日本血吸虫中国大陆株 23 kDa 膜蛋白核酸疫苗对猪免疫保护作用的研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2002, 14: 3-7.
- [12] Germann T, Bongartz M, Dlugonska H, et al. Interleukin-12 profoundly up-regulates the synthesis of antigen-specific complement-fixing IgG2a, IgG2b and IgG3 antibody subclasses in vivo[J]. Eur J Immunol, 1995, 25:823-829.
- [13] Hanlon L, Argyle D, Bain D, et al. Feline leukemia virus DNA vaccine efficacy is enhanced by co-administration with interleukin-12 (IL-12) and IL-18 expression vectors[J]. J Virol, 2001,75:8424-8433.
- [14] Suh YS, HA SJ, Lee CH, et al. Enhancement of VP1-specific immune responses and protection against EMCV-K challenge by co-delivery of IL-12 DNA with VP1 DNA vaccine[J]. Vaccine, 2001,19:1891-1898.

(收稿日期:2004-07-14 编辑:庄兆农)