

肝片形吸虫重组谷胱甘肽-S-转移酶对 SD 大鼠的免疫原性分析

闻晓波, 冉旭华*, 王春仁, 宋佰芬, 魏晓曼, 李晓娟, 王密, 苗艳

【摘要】 目的 分析肝片形吸虫重组谷胱甘肽-S-转移酶 (*FhGST*) 对 SD 大鼠的免疫原性。方法 将已构建重组原核表达质粒 pET30a-*FhGST* 转化大肠埃希菌 BL21 (DE3) 宿主菌, 以异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导重组蛋白表达。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析表达产物, 蛋白质印迹 (Western blotting) 分析其免疫反应性。20 只 SD 大鼠随机均分为蛋白免疫组和佐剂对照组, 蛋白免疫组以纯化的重组蛋白皮下注射免疫 SD 大鼠, 抗原免疫剂量为 200 μ g/(只·次), 共免疫 3 次, 每次间隔 3 周。佐剂对照组以 PBS 代替免疫抗原同法注射。免疫前、每次免疫后和末次免疫后 3 周、6 周鼠尾采血, 分离血清。利用间接 ELISA 法检测免疫大鼠血清 IgG 抗体水平的动态变化, 噻唑兰法 (MTT 法) 检测脾淋巴细胞增殖情况。结果 经纯化获得重组 *FhGST* 蛋白, SDS-PAGE 电泳结果显示, 在相对分子质量 M_r 31 300 处出现单一条带。Western blotting 分析结果表明, 纯化重组 *FhGST* 蛋白能识别自然感染肝片形吸虫的山羊阳性血清, 在 M_r 31 300 处可见特异的免疫反应带。重组 *FhGST* 蛋白免疫 SD 大鼠后, 可诱导产生特异性 IgG 抗体, 在免疫后第 9 周, 抗体效价达到顶峰 (1:89 144), 且明显高于佐剂对照组 (1:1 000)。重组蛋白能显著刺激大鼠脾细胞的生长和增殖。结论 重组 *FhGST* 蛋白能诱导 SD 大鼠产生特异性免疫应答, 具有良好的免疫原性。

【关键词】 肝片形吸虫; 谷胱甘肽-S-转移酶; SD 大鼠; 免疫原性

中图分类号: R383.26

文献标识码: A

Immunogenicity Analysis of Recombinant GST Protein of *Fasciola hepatica* in SD Rats

WEN Xiao-bo, RAN Xu-hua*, WANG Chun-ren, SONG Bai-fen, WEI Xiao-man,
LI Xiao-juan, WANG Mi, MIAO Yan

(College of Animal Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

【Abstract】 **Objective** To analyze the immunogenicity of recombinant glutathione S-transferase protein of *Fasciola hepatica* (*FhGST*) in SD rats. **Methods** The recombinant expression plasmid pET30a-*FhGST* was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) cells and induced with IPTG for protein expression. The recombinant protein *FhGST* was analyzed by SDS-PAGE and identified by Western blotting. Twenty SD rats were randomly divided into two groups: immunized group and adjuvant control group. SD rats in immunized group were injected subcutaneously with 200 μ g of purified *FhGST* protein. The adjuvant control group with 10 SD rats received only adjuvants emulsified with PBS. All the rats received three immunizations at 3-week intervals. Serum samples were collected at pre-immunization, the day after each immunization, 3 weeks and 6 weeks after the final immunization. The IgG antibody of rats' sera was examined by indirect ELISA and spleen lymphocyte proliferation (SLP) was tested by MTT. **Results** The molecular weight of purified *FhGST* was about M_r 31 300. The recombinant *FhGST* was recognized by pool sera of goats naturally infected with *F. hepatica*. The recombinant protein induced specific antibody IgG against GST protein in SD rats significantly higher than that of the control, and the antibody titer reached the peak at 9 weeks after the first immunization (GMT 1:89 144). *FhGST* protein significantly enhanced the growth and proliferation of rat splenocytes. **Conclusion** The recombinant *FhGST* protein induces specific immune response in SD rats.

【Key words】 *Fasciola hepatica*; Glutathione S-transferase; SD rat; Immunogenicity

Supported by Young Core Instructor Fund of Heilongjiang Provincial Education Bureau (No. 1251G042) and the Science and Technology Project of Heilongjiang Province (No. GZ11B208)

* Corresponding author, E-mail: ranxuhua@163.com

基金项目: 黑龙江省教育厅青年骨干项目 (No. 1251G042); 黑龙江省科技计划项目 (No. GZ11B208)

作者单位: 黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 大庆 163319

* 通讯作者, E-mail: ranxuhua@163.com。

肝片形吸虫病是由肝片形吸虫 (*Fasciola hepatica*, *Fh*) 寄生引起的人兽共患病。该病遍及世界各地,牛、羊感染率最高^[1],是中国危害最严重的反刍兽寄生虫病之一^[2]。目前,该病尚无安全有效的疫苗,传统疫苗研制受虫体获得的限制,难以大规模生产。药物驱虫易造成药物残留,新型基因工程疫苗的开发是目前防制肝片形吸虫病的一个主要研究方向。谷胱甘肽-S-转移酶 (glutathione S-transferase, GST) 是与细胞解毒及许多生理、生物异源物质排泄有关的一种多功能酶,是蠕虫主要解毒酶之一,能通过其解毒作用和修复机制等多种防御机制逃避宿主免疫应答^[3-5],可作为一种抗肝片形吸虫的候选疫苗抗原。本研究利用基因工程重组 *Fh*GST 蛋白免疫 SD 大鼠,检测其诱导免疫应答的效果,为研制安全、有效的抗肝片形吸虫病疫苗奠定基础。

材料与方法

1 材料

1.1 实验动物、菌株和载体 清洁级健康雌性 SD 大鼠 20 只,体重 180~200 g,购自中国科学院上海实验动物中心。重组原核表达质粒 pET30a-*Fh*GST 由本实验室构建,含该质粒的阳性大肠埃希菌 (*E. coli*) BL21 (DE3) 菌株由本实验室保存,所表达的重组蛋白可与自然感染肝片形吸虫的山羊阳性血清发生特异性反应。自然感染肝片形吸虫的山羊阳性血清和重组谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 蛋白免疫的 SD 大鼠阳性血清由本实验室保存。

1.2 主要试剂、酶和抗体 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗山羊 IgG 和兔抗大鼠 IgG 购自武汉博士德生物工程有限公司,改良 Eagle 培养基 (DMEM) 和 RPMI 1640 培养基购自美国 Invitrogen 公司。

2 方法

2.1 重组菌诱导表达 重组原核表达质粒 pET30a-*Fh*GST 阳性重组菌接种于溶菌肉汤 (LB) 培养基,吸光度 (A_{600} 值) ≈ 1.0 时,加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 1 mmol/L 进行诱导表达。诱导 3 h 后,12 000 \times g 离心 5 min 收集菌体沉淀,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)^[6]。

2.2 重组蛋白的纯化与定量和蛋白质印迹 (Western blotting) 分析 诱导 500 ml 重组菌液,参考黄轶等^[7]的方法,采用透析袋电洗脱法纯化重组蛋白。取 10 μ l 纯化的蛋白溶液,经 SDS-PAGE 检测纯化效果,用自然感染肝片形吸虫的山羊阳性血清进行 Western blot-

ting 分析^[6],并测定纯化目的蛋白的浓度。

2.3 动物免疫实验 20 只 SD 大鼠随机均分为重组蛋白免疫组 (A 组) 和佐剂对照组 (B 组)。A 组注射重组蛋白 *Fh*GST,抗原与佐剂乳化后,背部皮下多点注射免疫大鼠,每次抗原免疫剂量为 200 μ g/只,共免疫 3 次,每次间隔 3 周。其中,前 2 次免疫使用福氏完全佐剂,第 3 次使用福氏不完全佐剂。B 组以 PBS 代替免疫抗原与佐剂乳化,同法免疫大鼠。大鼠于免疫前、每次免疫后和末次免疫后 3 周、6 周尾静脉采血,每组 5 只,分离血清。

2.4 ELISA 检测 采用本实验室建立的间接 ELISA 方法测定抗体效价^[8]。用 100 μ l 纯化的重组蛋白 *Fh*GST (6 mg/ml) 作为抗原包被 ELISA 板,5%脱脂奶粉 4 $^{\circ}$ C 过夜封闭;加入 1:200 倍稀释的待检血清,37 $^{\circ}$ C 作用 1 h;加入兔抗大鼠 HRP-IgG 作用 1 h,3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 显色 15 min,2 mol/L 硫酸终止反应,测定 A_{450} 值。以阴性血清平均 A_{450} 值+3 倍标准差为阳性阈值。

2.5 免疫大鼠脾淋巴细胞增殖试验 (MTT 法) 末次采血后,每组取 5 只大鼠脱颈处死,无菌取脾,制备脾细胞悬液,用含 10% 犊牛血清的 RPMI 1640 培养液调整细胞浓度为 1×10^7 个/ml。于 96 孔细胞培养板中培养细胞,每孔加入 50 μ l 淋巴细胞悬液。实验孔每孔加入 40 μ g/ml 刀豆球蛋白 A (ConA) 50 μ l,对照孔加入等体积的 RPMI 1640 培养液,各设 3 个复孔,置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO_2 培养箱中培养 68 h。加入 5 μ g/ μ l 噻唑蓝 (MTT) 10 μ l/孔,继续培养 4 h;加入 100 μ l 二甲基亚砜 (DMSO) 终止,充分混匀使紫黑色结晶完全溶解后,测定 A_{490} 值,计算淋巴细胞刺激指数 (SI) = 实验孔 A_{490} 值/对照孔 A_{490} 值。

3 统计学分析

采用 SAS 9.0 软件进行统计分析实验数据,检验水平为 0.05。

结 果

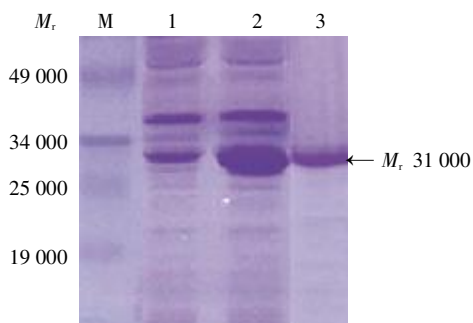
1 重组蛋白 *Fh*GST 的诱导表达与纯化

SDS-PAGE 电泳结果表明,在相对分子质量 (M_r) 约 31 300 处有一蛋白条带,与预测理论值相符。经透析袋电洗脱法纯化的重组蛋白在 M_r 31 300 处出现单一条带 (图 1)。基因蛋白定量仪测定纯化的重组 *Fh*GST 蛋白浓度为 3.45 mg/ml。

2 Western blotting 分析

结果表明,纯化重组 GST 蛋白能识别自然感染肝

片形吸虫的山羊阳性血清，在 M_r 31 300 处可见特异的免疫反应带，而阴性血清对照则未出现反应带（图 2）。

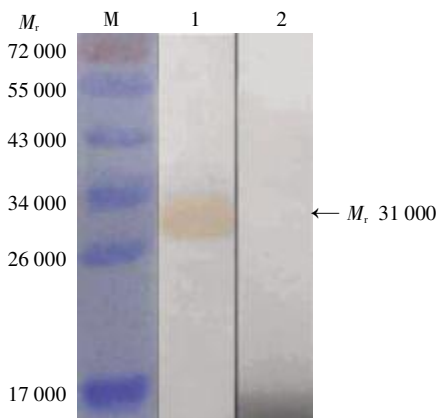


M: 蛋白质标志物; 1: pET30a-*FhGST* 诱导前; 2: pET30a-*FhGST* 诱导后 3 h; 3: 纯化的重组蛋白。

M: Protein marker; 1: pET30a-*FhGST* without induction; 2: pET30a-*FhGST* with IPTG induced for 3 h; 3: Purified recombinant protein *FhGST*.

图 1 重组蛋白 *FhGST* 的诱导表达和纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of expression and purification of the recombinant protein *FhGST*



M: 蛋白质标志物; 1: 感染肝片形吸虫山羊血清; 2: 健康山羊血清。
M: Protein marker; 1: Sera of goat infected with *Fasciola hepatica*; 2: Sera of healthy goat.

图 2 纯化的重组 *FhGST* 蛋白 Western blotting 结果

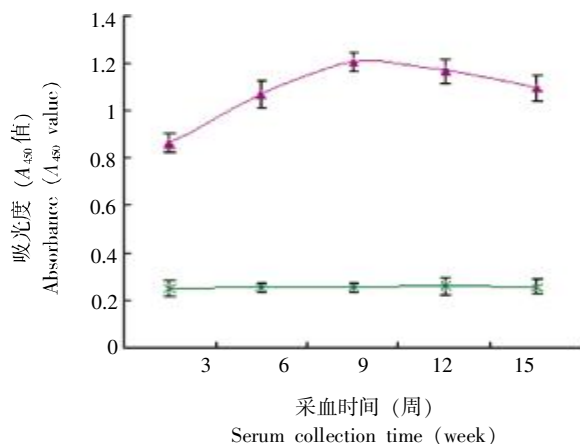
Fig.2 Western blotting analysis of the recombinant *FhGST* protein

3 IgG 抗体消长情况

结果表明，与佐剂对照组（1:1 000）相比，免疫组 IgG 抗体效价从首次免疫后 3 周开始升高 [几何平均效价 (GMT) 1:5 571, 1:3 200~1:6 400]，在末次免疫后（即第 9 周）抗体效价达到顶峰 (GMT 1:89 144, 1:51 200~1:102 400)，末次免疫后 6 周（即第 15 周）抗体效价仍处于较高水平 (GMT 1:38 802, 1:25 600~1:51 200)（图 3）。

4 淋巴细胞转化试验

结果显示，各免疫组平均刺激指数 (2.26 ± 0.07) 明显高于 PBS 对照组 (1.17 ± 0.03) ($P < 0.05$)。



重组蛋白 *FhGST* Recombinant protein *FhGST*
PBS 对照 PBS control

图 3 GST 免疫大鼠血清 IgG 抗体消长曲线

Fig.3 Dynamic curves of IgG in sera in immunized rats

讨 论

分泌排泄抗原是指肝片形吸虫分泌排泄产物 (*Fasciola hepatica* excretory-secretory products, *FhESP*)，其具有抗原特性，能诱导宿主获得保护性免疫。大鼠皮下植入肝片形吸虫成虫可诱发产生部分抵抗力，表明 *FhESP* 具有诱发产生保护性免疫应答的作用^[9]。GST 是 *FhESP* 的重要组分，对寄生虫维持体内环境平衡和保护寄生虫抵抗因免疫应答诱导产生自由基的攻击是必不可少的。GST 作为防治血吸虫病的分子疫苗候选抗原的研究已取得可观的进展。Spithill 等^[10]用自肝片形吸虫分泌排泄物中提取的 GST 免疫动物，取得了较好的抗肝片形吸虫感染的免疫保护效果。来自于肝片形吸虫的 GST 接种绵羊和牛已获得较好的抗虫保护。GST 亦是肝片形吸虫与血吸虫交叉免疫的主要反应成分，感染曼氏血吸虫的小鼠能产生对肝片形吸虫 GST 的交叉反应抗体^[11]，交叉免疫的存在提示了交叉保护力的可能。因此，推测 GST 可作为一种抗肝片形吸虫的候选疫苗抗原。

本研究应用重组 GST 蛋白免疫 SD 大鼠，ELISA 检测结果显示，与佐剂对照组相比，蛋白免疫组从第 3 周开始 IgG 抗体效价升高，且在第 9 周抗体水平升至最高 (1:102 400)，第 12 周开始下降，第 15 周持续减少。说明重组蛋白诱导的体液免疫应答较强，但在大鼠体内发挥作用的时间较短。应用 MTT 法检测大鼠 T 淋巴细胞的转化程度，脾淋巴细胞经 ConA 刺激转化实验反映出，免疫后不同时间蛋白免疫组细胞受非特异刺激后不同的增殖转化强度，一般将 $SI > 1.5$ 判定为有效刺激， SI 值越大，说明所免疫细胞群体的反应能力和免疫功能越强。在本研究中，免疫组大鼠

(下转第 53 页)

情况,因地制宜的制定有效控制策略。当然,钉螺的消长还可能受高程、降水、湿度和温度等其他气候因素及人为灭螺干预措施的影响,因此今后还可以考虑拟合其他一些因素以探讨综合效应对不同区域洲滩螺情的变化影响,从而更好地掌握影响钉螺分布综合因素的规律,为钉螺控制和血吸虫病的预防控制提供理论支持^[16,17]。

参 考 文 献

- [1] 陈名刚. 世界血吸虫病流行情况及防治进展[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2002, 14(2): 81-83.
- [2] 周晓农, 林丹丹, 汪天平, 等. 我国“十二五”期间血吸虫病防治策略与工作重点[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2011, 23(1): 1-4.
- [3] 马巍, 廖文根, 冯顺新, 等. 血吸虫病传播的水文影响机制与风险评估方法[M]. 北京: 中国水利水电出版社, 2011: 20-37.
- [4] Ofoezi IE, Asaolu SO. Water level regulation and control of schistosomiasis transmission: a case study in Oyan Reservoir, Ogun State, Nigeria[J]. Bull World Health Organ, 1997, 75(5): 435-441.
- [5] 郑英杰, 钟久河, 陈秀纶, 等. 水淹对钉螺生存的影响[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2002, 14(1): 46-49.
- [6] 贺宏斌. 湖区实施以传染源控制为主的血吸虫病综合防治措施思考[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2011, 23(6): 710-713.

- [7] 郭家钢. 我国血吸虫病传染源控制策略的地位与作用[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2006, 18(3): 231-233.
- [8] 陈红根, 曾小军, 熊继杰, 等. 鄱阳湖区以传染源控制为主的血吸虫病综合防治策略研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2009, 21(4): 243-249.
- [9] 李源培. 东洞庭湖区水位和气候因素对日本血吸虫中间宿主钉螺分布的影响及其孳生地探测[D]. 复旦大学, 2011.
- [10] 马巍, 廖文根, 匡尚富, 等. 洞庭湖钉螺扩散与水情变化规律[J]. 长江流域资源与环境, 2009, 18(3): 264-269.
- [11] 张志杰, 彭文祥, 陈更新, 等. 湖沼地区钉螺分布动态性的初步证据[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2007, 19(2): 86-90.
- [12] 李源培, 何忠, 何明祯, 等. 湖沼地区水位变化对钉螺消长影响的广义相加模型研究[J]. 中华流行病学杂志, 2010, 31(10): 1148-1154.
- [13] 宁安, 陈年高, 钟久河, 等. 鄱阳湖洲滩钉螺分布与水位变化的关系[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2003, 15(6): 429-433.
- [14] 姜加虎, 黄群. 蚌湖与鄱阳湖水量交换关系的分析[J]. 湖泊科学, 1996, 8(3): 208-214.
- [15] 胡春华, 姜加虎, 朱海虹. 蚌湖与鄱阳湖水位关系及滩地淹露分析[J]. 海洋与湖沼, 1997, 28(6): 617-623.
- [16] 周晓农, 杨坤, 洪青标, 等. 气候变暖对中国血吸虫病传播影响的预测[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2004, 22(5): 262-265.
- [17] 陈朝, 周晓农. 血吸虫病环境因素研究中空间变量的选择与分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(2): 121-124.
- (收稿日期: 2012-06-19 编辑: 张争艳)

(上接第 48 页)

刺激指数均大于 1.5, 且明显高于对照组 ($P < 0.05$), 表明重组蛋白能促进大鼠脾淋巴细胞的生长和增殖。

本研究利用原核表达的肝片形吸虫重组 GST 蛋白免疫 SD 大鼠, 通过间接 ELISA 方法和 MTT 法检测免疫后效果, 实验结果表明, 重组蛋白能够诱导大鼠发生免疫应答产生特异性抗体和致敏淋巴细胞, 但抗体持续时间较短。在今后的研究中或可通过与 DNA 疫苗的联合使用提高其免疫效果^[12]。本研究结果弥补了肝片形吸虫天然 GST 蛋白较难获得的缺点, 并证实了重组蛋白的活性, 为研制方便、有效的抗肝片形吸虫病新型分子疫苗奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Dalton JP, Neill SO, Stack C, et al. *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines[J]. Int J Parasitol, 2003, 33(11): 1173-1181.
- [2] Gajewska A, Smaga-Kozłowska K, Wisniewski M. Pathological changes of liver in infection of *Fasciola hepatica* [J]. Wiad Parazytol, 2005, 51(2): 115-123. (in Polish)
- [3] Brophy PM, Barrett J. Glutathione transferase in helminths [J]. Parasitology, 1990, 100(Pt 2): 345-349.

- [4] Daniel V. Glutathione S-transferases: gene structure and regulation of expression [J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1993, 28(3): 173-207.
- [5] Chemale G, Morphew R, Moxon JV, et al. Proteomic analysis of glutathione transferases from the liver fluke parasite, *Fasciola hepatica* [J]. Proteomics, 2006, 6(23): 6263-6273.
- [6] 冉旭华, 李晓娟, 李树东, 等. 肝片吸虫谷胱甘肽 S-转移酶基因的克隆表达及活性分析 [J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(9): 891-894.
- [7] 黄轶, 华超, 徐江英, 等. 透析袋电洗脱法在蛋白质回收和纯化中的应用 [J]. 南京军医学院学报, 2003, 25(1): 33-34.
- [8] 李晓娟. 肝片形吸虫重组 GST/CatL 蛋白及其 DNA 核酸联合免疫初步研究 [D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2009.
- [9] Muro A, Casanueva P, López-Abán J, et al. Identification of *Fasciola hepatica* recombinant 15-kDa fatty acid-binding protein T-cell epitopes that protect against experimental fascioliasis in rabbits and mice [J]. J Parasitol, 2007, 93(4): 817-823.
- [10] Spithill TW, Piedrafita D, Smooker PM. Immunological approaches for the control of fasciolosis [J]. Int J Parasitol, 1997, 27(10): 1221-1235.
- [11] Muro A, Rodriguez-Medina JR, Hillyer GV. Sequence analysis of a *Fasciola hepatica* glutathione S-transferase cDNA clone[J]. Am J Trop Med Hyg, 1993, 48(3): 457-463.
- [12] 冉旭华, 闻晓波, 王春仁, 等. 肝片形吸虫 GST 真核表达载体构建及重组蛋白活性分析 [J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(11): 1005-1007.
- (收稿日期: 2012-05-02 编辑: 杨频)