

文章编号:1000-7423(2005)-02-0065-04

【论著】

# 重组白细胞介素-4 增强日本血吸虫组织蛋白酶 B 核酸疫苗诱导小鼠的保护力

陈欲晓<sup>1\*</sup>, 王林纤<sup>2</sup>, 唐连飞<sup>3</sup>, 张顺科<sup>2</sup>, 章洁<sup>2</sup>, 曾宪芳<sup>2</sup>, 易新元<sup>2</sup>

**【摘要】 目的** 探讨重组白细胞介素-4(IL-4)真核表达质粒增强日本血吸虫组织蛋白酶 B DNA 疫苗对小鼠的免疫保护效果。 **方法** 将小鼠 IL-4 基因克隆至真核表达载体 pcDNA3.1 以构建小鼠重组 IL-4 表达质粒, 并联合日本血吸虫组织蛋白酶 B 的表达质粒 DNA (VR1012-Sj31)肌注免疫小鼠, 设重组 IL-4 表达质粒、组织蛋白酶 B 表达质粒和 2 种空载体质粒对照组。免疫组化检测 IL-4 和组织蛋白酶 B 在小鼠肌细胞内的表达, 末次免疫 3 周后攻击感染, 用减虫率及减卵率表示保护力。 **结果** 重组 IL-4 和组织蛋白酶 B DNA 均在小鼠肌细胞表达, 重组 IL-4 和组织蛋白酶 B DNA 联合免疫小鼠, 产生 43.2% 的减虫率和 76.6% 的减卵率, 与组织蛋白酶 B DNA 单独免疫相比差异有显著性 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。 **结论** 重组 IL-4 能提高日本血吸虫组织蛋白酶 B 核酸疫苗的抗血吸虫保护力作用, 具有佐剂的免疫效应。

**【关键词】** 日本血吸虫; 核酸疫苗; 组织蛋白酶类; 重组白细胞介素-4; 免疫保护

中图分类号:R383.24

文献标识码:A

## Boost Effect of Recombinant IL-4 on Protection of *Schistosoma japonicum* Cathepsin B DNA Vaccine in Mice Against the Parasite

CHEN Yu-xiao\*, WANG Lin-xian, TANG Lian-fei,

ZHANG Shun-ke, ZHANG Jie, ZENG Xian-fang, YI Xin-yuan

(Department of Immunology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the enhancement effect of IL-4 expression plasmid on cathepsin B DNA vaccine of *Schistosoma japonicum* (Sj) in mice. **Methods** The recombinant IL-4 plasmid constructed by cloning PCR amplified product of murine IL-4 gene into eukaryotic expression vector pcDNA3.1 was co-injected intramuscularly with Sj cathepsin B expression plasmid DNA to mice as the test group. The other three groups of mice were set up as control including IL-4 expression plasmid, Sj cathepsin B expression plasmid and two vacant vector plasmids. The expression of IL-4 and cathepsin B was visualized by immunohistochemistry. Challenge infection in mice was carried out 3 weeks after the last vaccination and immune protection was assessed by worm and egg reduction rates. **Results** The recombinant mL-4 plasmid and cathepsin B DNA vaccine were expressed in muscular cells of the vaccinated mice. Immunization with cathepsin B DNA plus recombinant mL-4 plasmid yielded a 43.2 % of worm reduction rate and a 76.6% of egg reduction rate, showing a significant difference ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ) compared with that of cathepsin B DNA vaccine alone. **Conclusion** As an adjuvant, IL-4 DNA can improve the protective effect of cathepsin B DNA vaccine in mice against *S. japonicum* infection.

**【Key words】** *Schistosoma japonicum*; DNA vaccine; Cathepsins; Recombinant IL-4; Immunoprotection

Supported by the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) (ID980268)

\* Corresponding author, E-mail: yuxiaochen008@yahoo.com.cn

血吸虫感染宿主后, 通过其组织蛋白酶来降解宿主的血红蛋白, 这是其摄取营养的主要途径<sup>[1]</sup>。本研究将日本血吸虫 (*Schistosoma japonicum*, Sj) 组织蛋白酶 B (Sj31) 基因克隆至真核表达载体 (VR1012), 成

功构建了日本血吸虫组织蛋白酶 B 的核酸疫苗 (VR1012-Sj31), 经小鼠肌肉注射免疫获得 59.3%~69.0% 的肝组织减卵率, 57.6%~62.1% 的肠组织减卵率, 显示其抗血吸虫生殖作用, 但减虫率较低<sup>[2]</sup>。

核酸疫苗有易于制备、性状稳定、造价低廉、作用持久等优势, 并能诱导宿主产生抗日本血吸虫的细胞免疫和体液免疫<sup>[3,4]</sup>。由于日本血吸虫组织蛋白酶 B 核酸疫苗表现出的减虫效果欠佳, 本研究构建 IL-4 的真核表达质粒, 联合日本血吸虫组织蛋白酶 B

**基金项目:** 世界卫生组织/热带病研究与培训规划署 (WHO/TDR) 资助项目 (ID980268)

**作者单位:** 1 中南大学湘雅医学院免疫学教研室, 长沙 410078;

2 中南大学湘雅医学院寄生虫学教研室, 长沙 410078

\* 通讯作者, E-mail: yuxiaochen008@yahoo.com.cn

DNA疫苗免疫小鼠,旨在观察重组 IL-4 增强日本血吸虫组织蛋白酶 B 核酸疫苗的保护效应。

### 材料与方 法

#### 1 实验动物

6 周雌性昆明小鼠由中南大学湘雅医学院动物学 部提供。

#### 2 细菌及试剂

大肠埃希菌菌株 ER2502、小鼠 IL-4 质粒、pcD- NA3.1 真核表达载体、日本血吸虫组织蛋白酶 B 重组 表达质粒(VR1012-Sj31)为本室保存。内切酶 *EcoRI* 和 *Xba I*、T4 DNA 连接酶、β-琼脂糖酶 I (β-Agarase I)、 三磷酸脱氧核苷酸(dNTP)为美国 New England Bio- labs 公司产品。

#### 3 PCR 扩增和亚克隆

合成小鼠 IL-4 基因引物(大连宝生物工程有限公 司),正引物 5'-CGGAATTCATGGGTCTCAACC- CCAGCTA3'-含 *EcoRI* 酶切位点,反引物 5'-GCTC- TAGACTACGAGTAATCCATTTGCATGAT-3'含 *Xba I* 酶切位点,扩增 IL-4,参数为 94 °C 4 min 后,94 °C 45 s,66 °C 45 s,72 °C 1 min,共 30 个循环,最后 72 °C 延伸 7 min。*EcoR I* 和 *Xba I* 对 PCR 产物和 pcD- NA3.1 分别双酶切,低熔点胶电泳和回收 DNA,β-琼 脂糖酶 I 消化,T4 DNA 连接酶连接,转化受体菌 ER2502,筛选重组克隆。提取阳性重组菌质粒 DNA, *EcoR I* 和 *Xba I* 双酶切及 PCR 鉴定。

#### 4 质粒的大量制备

用碱裂解法大量制备 pcDNA3.1、VR1012、pcD- NA3.1-IL-4 和 VR1012-Sj31,最终溶于无菌生理盐 水,至终浓度为 1 mg/ml 或 2 mg/ml,置-20 °C 备用。

#### 5 动物免疫和攻击感染

48 只小鼠随机分为 4 组(每组 12 只),经股四头肌 注射各种 DNA 100 μg/次,共免疫 3 次。A 组为 pcDNA3.1-IL-4 加 VR1012-Sj31 联合免疫组,B 组为 VR1012-Sj31 单独免疫组,C 组为 pcDNA3.1-IL-4 单 独免疫组,D 组为空载体 VR 1012 加空载体 pcD NA3.1 对照组。于免疫前 1 天每鼠股四头肌注射 0.5 mg/ml 盐酸布比卡因 50 μl。末次免疫后 2 周,处 死每组 4~5 只小鼠,取其 DNA 肌注部位股四头肌做 组织切片,苏木素-伊红(HE) 染色和免疫酶组织化学 鉴定质粒 DNA 在小鼠肌细胞的表达。剩余小鼠每组

7~8 只,继续实验,于末次免疫后 3 周经皮肤攻击感 染日本血吸虫尾蚴 40±1 条,感染后 6 周剖杀小鼠冲虫, 取鼠肝组织,处理后,计算减虫率及减卵率,各组间均数 比较使用 SPSS 统计软件进行分析。

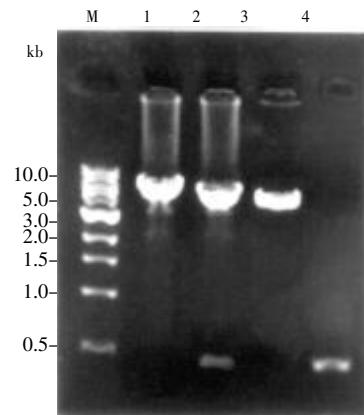
#### 6 酶免疫组织化学方法

日本血吸虫组织蛋白酶 B 小鼠抗血清 (1:100 稀 释)由本室制备,IL-4 单克隆抗体 (1:50 稀释)为美国 Pharmingen 公司产品,辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG(1:2 000 稀释)为美国 New England Biolabs 公司产 品,其余试剂为立陶宛 Molecular Biology Institute, MBI 公司产品。

## 结 果

#### 1 重组质粒的鉴定

抽提阳性重组菌质粒经 *EcoRI* 和 *Xba I* 双酶切 后,检测到插入子,其大小约 422 bp,与 IL-4 基因的 理论值一致。抽提重组菌质粒为模板进行 PCR,扩增片 段大小也与酶切后插入子片段大小相符(图 1)。



M: 标志物, 1: pcDNA3.1-IL-4 经 *EcoR I* 酶切, 2: pcDNA3.1-IL-4 经 *EcoR I*/*Xba I* 双酶切, 3: pcDNA3.1 经 *EcoR I* 酶切, 4: 重组 IL-4 质粒的 PCR 产物。

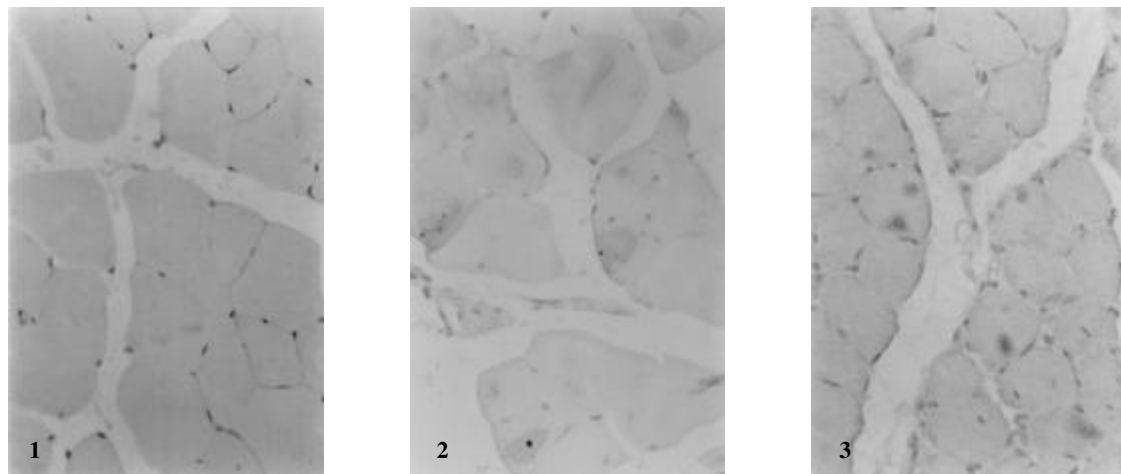
M: Marker, 1: pcDNA3.1-IL-4 digested with *EcoR I*, 2: pcDNA3.1-IL-4 digested with *EcoR I*/*Xba I*, 3: pcDNA3.1 vector digested with *EcoR I*, 4: PCR product of recombinant IL-4 plasmid.

图 1 重组 IL-4 质粒的酶切和 PCR 鉴定

Fig.1 Double digestion and PCR identification of pcDNA3.1-IL-4

#### 2 HE 染色和免疫组织化学鉴定

HE 染色显示小鼠股四头肌组织切片部位正确。 酶免疫组织化学结果可见 A、B、C 组均有特异性深棕 色产物,圆形或卵圆形存在于肌细胞胞浆,大小不等; 肌细胞胞核靠边,呈蓝色。磷酸盐缓冲液(PBS)阴性对 照、正常小鼠血清对照、2 种空载体对照组(D 组)均未 见深棕色产物(图 2)。



1:阴性对照, 2:pcDNA3.1-IL-4 的表达, 3:VR1012-Sj31 的表达。

1:Negative control, 2:Expression of pcDNA3.1-IL-4, 3:Expression of VR1012-Sj31.

图 2 小鼠肌组织免疫组织化学染色(×400)

Fig.2 Murine muscular tissue stained by immunohistochemistry(×400)

### 3 免疫保护性效果

结果显示, 联合免疫组 A 组减虫率为 43.2 % , 与单独免疫组 B、C 组和空载体对照组 D 组比较差异有极显著性( $P<0.01$ )。A 组减卵率为 76.6 % , 与 C 组、D 组比较差异有极显著性( $P<0.01$ ); 与 B 组比较, 差异有显著性( $P<0.05$ ) (表 1)。

### 讨 论

对于 I 型辅助 T 细胞 (Th1) 和 II 型辅助 T 细胞 (Th2) 应答在血吸虫病中的保护性作用一直存在不同观点。一些研究表明, Th1 型应答利于抗血吸虫病, 另一些研究则显示 Th2 型细胞因子应答能使宿主获得免疫抵抗力<sup>[5,6]</sup>。最近有报道显示抗血吸虫疫苗诱导的免疫效应不应为 Th1 或 Th2 应答偏离, 而需要适度激活

Th1、Th2 的 2 型调节应答<sup>[7]</sup>。

IL-4 为 Th2 型应答的重要诱导因子和重要细胞因子, 且能诱导 IgE 的产生。早期对人群流行病学调查发现, 在血吸虫病保护性免疫中, IgE 抗体增高与再感染抵抗力显著相关, 具有抗再感染能力的人群 IgE 平均水平为易感人群的 6~8 倍, 表明 IgE 有很强的抗血吸虫作用<sup>[8-10]</sup>。血吸虫病儿童患者经吡喹酮治疗后 6 周和 18 周, 其 IgE 水平较非治疗组均有显著增高<sup>[11]</sup>。有研究用曼氏血吸虫虫卵和成虫脂质提取物成分与埃及血吸虫感染人群血清反应来检测抗体类型, 发现糖蛋白脂质特异性 IgE 抗体具抵抗再感染作用<sup>[12]</sup>。曼氏血吸虫 (*Schistosoma masoni*, Sm) Mr 22 600 膜蛋白是较早确定的疫苗候选分子, 研究显示它主要刺激特异性 IgE 的产生, 而该抗原在日本血吸虫中有 4 个 IgE 结合

表 1 VR1012-Sj31 联合 pcDNA3.1-IL-4 免疫小鼠的减虫率和减卵率

Table 1 Worm and egg reduction in mice vaccinated with VR1012-Sj31 plus pcDNA3.1-IL-4

组 别 Group	实验鼠数 No. mice perfused (n)	平均检获虫数 No. worms recovered( $\bar{x} \pm s$ )	减虫率 Worm reduction rate vs D (%)	平均检获虫卵数 No.eggs/gram liver recovered( $\times 10^4$ ) ( $\bar{x} \pm s$ )	减卵率 Worm reduction rate vs D (%)
VR1012-Sj31+ pcDNA3.1-IL-4 联合组(A)	7	18.25±4.89 <sup>①</sup>	43.20%	0.64±0.02 <sup>③④</sup>	76.64%
VR1012-Sj31 组织 蛋白酶 B 质粒组(B)	8	27.75±5.85 <sup>②</sup>	13.63%	1.00±0.29 <sup>③</sup>	63.35%
pcDNA3.1-IL-4 重组 IL-4 质粒组(C)	8	29.75±4.83	7.41%	2.39±0.44 <sup>⑤</sup>	12.77%
VR1012+pcDNA3.1 空载体对照组(D)	7	32.13±3.56	-	2.74±0.35	-

注: ①: 与 B、C 和 D 组比较  $P<0.01$ , ②: 与 C 和 D 组比较  $P>0.05$ , ③: 与 C、D 组比较  $P<0.001$ , ④: 与 B 组比较  $P<0.05$ , ⑤: 与 D 组比较  $P>0.05$ 。

Note: ①: vs groups B, C and D  $P<0.01$ , ②: vs groups C and D  $P>0.05$ , ③: vs groups C and D  $P<0.001$ , ④: vs group B  $P<0.05$ , ⑤: vs group D  $P>0.05$ 。

表位<sup>[13]</sup>。感染 Sm 后再经吡喹酮治愈的狒狒,攻击感染 1 000 条 Sm 尾蚴,获得 59%~80% 的减虫率,检测攻击感染时和攻击感染后 6 周这些狒狒血清抗体和外周血细胞因子变化,发现只有针对可溶性成虫抗原的特异性 IgE 抗体与这种获得性免疫力有关<sup>[14]</sup>。

研究显示 IL-4 也能加强宿主的抗血吸虫抵抗力。Rodrigues 等<sup>[15]</sup>和 Marquet 等<sup>[16,17]</sup>发现人类对 Sm 感染的抵抗力由染色体 5q31-q33 区 SM1 基因序列控制,该基因序列编码产生的细胞因子能调节 Th 细胞,还发现抵抗人群的 Th 细胞产生的 IL-4 较易感人群高 10~1 000 倍,提示 IL-4 与人群对 Sm 的抵抗力有关。Fallon 等<sup>[18]</sup>研究表明年轻恒河猴对血吸虫易感是因为初次感染后 IL-4 水平低于成年恒河猴所致。

有关 IL-4 DNA 作为核酸疫苗佐剂的报道较少,且结果亦不同。有研究用 Sm Mr 23 000 膜抗原真核表达重组体(Sm 23-pcDNA) 与 IL-4 编码质粒联合免疫小鼠,结果 IL-4 编码质粒能显著减少 Sm23-pc DNA 诱导产生的抗 Sm Mr 23 000 膜抗原的 IgG2a 水平,而不影响抗 Sm23-pc IgG1 诱导产生的抗 Sm Mr 23 000 膜抗原 IgG1 的产生<sup>[19]</sup>。还有研究用候选疫苗分子钙激活中性蛋白酶的大亚基 Sm-p80 DNA 与 IL-4 真核表达质粒联合免疫小鼠,结果小鼠 IgG1 和 IgG3 水平略有提高,小鼠 IgG2a 和 IgG2b 水平则略有下降<sup>[20]</sup>。

本研究构建了小鼠 IL-4 基因表达质粒,并联合日本血吸虫组织蛋白酶 B 核酸疫苗经肌注免疫小鼠,结果显示小鼠重组 IL-4 及日本血吸虫组织蛋白酶 B 均成功地小鼠肌肉细胞表达,且 IL-4 DNA 可作为佐剂提高日本血吸虫组织蛋白酶 B 核酸疫苗的减虫率及减卵率。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Brindley PJ, Kalina BH, Dalton JP, *et al.* Proteolytic degradation of host hemoglobin by schistosomes[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1997, 89:1-9.
- [ 2 ] 易新元,曾宪忠,曾宪芳,等. 日本血吸虫组织蛋白酶 B DNA 疫苗抗生殖免疫的研究[J]. *中国人兽共患病杂志*,2000,16(1):45-47.
- [ 3 ] Verity CK, McManus DP, Brindley PJ. Vaccine efficacy of recombinant cathepsin D aspartic protease from *Schistosoma japonicum* [J]. *Parasit Immunol*,2001, 23:153-162.
- [ 4 ] Verity CK, McManus DP, Brindley PJ. Cellular responses to *Schistosoma japonicum* cathepsin D aspartic protease[J]. *Parasit Immunol*, 2002, 24:363-367.
- [ 5 ] La Flamme AC, MacDonald AS, Huxtable CR, *et al.* Lack of C3 affects Th2 response development and the sequelae of chemotherapy in schistosomiasis[J]. *J Immunol*,2003,170: 470-476.
- [ 6 ] Caldas IR, Correa-Oliveira R, Colosimo E, *et al.* Susceptibility and resistance to *Schistosoma mansoni* reinfection: parallel cellular and isotopic immunologic assessment[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2000, 62:57-64.
- [ 7 ] Hoffmann KF, James SL, Cheever AW, *et al.* Studies with double cytokine-deficient mice reveal that highly polarized Th1- and Th2-type cytokine and antibody responses contribute equally to vaccine-induced immunity to *Schistosoma mansoni*[J]. *J Immunol*,1999, 163:927-938.
- [ 8 ] Hagan P, Blumenthal UJ, Dunn D, *et al.* Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*[J]. *Nature*, 1991, 349: 243-245.
- [ 9 ] Hagi H, Huldt G, Loftenius A, *et al.* Antibody responses in schistosomiasis haematobium in Somalia. Relation to age and infection intensity[J]. *Ann Trop Med Parasitol*,1990, 84:171-179.
- [10] Rihet P, Demeure CE, Bourgois A, *et al.* Evidence for an association between human resistance to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels[J]. *Eur J Immunol*, 1991, 21:2679-2686.
- [11] Mutapi F, Hagan P, Woolhouse ME, *et al.* Chemotherapy-induced, age-related changes in antischistosome antibody responses [J]. *Parasit Immunol*, 2003, 25: 87-97.
- [12] van Der Kleij D, Tielens AG, Yazdanbakhsh M. Recognition of schistosome glycolipids by immunoglobulin E: possible role in immunity[J]. *Inf Immun*, 1999, 67:5946-5950.
- [13] Santiago ML, Hafalla JC, Kurtis JD, *et al.* Identification of the *Schistosoma japonicum* 22.6kDa antigen as a major target of the human IgE response: similarity of IgE-binding epitopes to allergen peptides[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 1998, 117: 94-104.
- [14] Nyindo M, Kariuki TM, Mola PW, *et al.* Role of adult worm antigen - specific immunoglobulin E in acquired immunity to *Schistosoma mansoni* infection in baboons[J]. *Infect Immun*, 1999, 67: 636-642.
- [15] Rodrigues V Jr, Piper K, Couissinier-Paris P, *et al.* Genetic control of schistosome infections by the SM1 locus of the 5q31-q33 region is linked to differentiation of type 2 helper T lymphocytes [J]. *Inf Immun*, 1999, 67:4689-4692.
- [16] Marquet S, Abel L, Hillaire D, *et al.* Full results of the genome-wide scan which localises a locus controlling the intensity of infection by *Schistosoma mansoni* on chromosome 5q31-q33[J]. *Eur J Hum Genet*, 1999, 7:88-97.
- [17] Marquet S, Abel L, Hillaire D, *et al.* Genetic localization of a locus controlling the intensity of infection by *Schistosoma mansoni* on chromosome 5q31-q33[J]. *Nat Genet*, 1996, 14:181-184.
- [18] Fallon PG, Gibbons J, Vervenne RA, *et al.* Juvenile Rhesus monkeys have lower type 2 cytokine responses than adults after primary infection with *Schistosoma mansoni*[J]. *J Inf Dis*, 2003, 187: 939-945
- [19] Da'dara AA, Skelly PJ, Wang MM, *et al.* Immunization with plasmid DNA encoding the integral membrane protein, Sm23, elicits a protective immune response against schistosome infection in mice[J]. *Vaccine*, 2001, 20: 359-369.
- [20] Siddiqui AA, Phillips T, Charest H, *et al.* Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* via DNA priming and boosting with the large subunit of calpain (Sm-p80): adjuvant effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-4[J]. *Inf Immun*, 2003, 71:3844-3851.

(收稿日期: 2004-07-02 编辑: 伯韦)