

文章编号:1000-7423(2006)-06-0433-04

【论著】

# 日本血吸虫 SjCTPI-Hsp70 DNA 疫苗与 白细胞介素 12 对水牛的联合免疫保护作用研究

喻鑫玲<sup>1</sup>, 何永康<sup>1</sup>, 熊铁<sup>1</sup>, 赵雅琴<sup>1</sup>, 石孟芝<sup>1</sup>, 周杰<sup>1</sup>, 刘宗传<sup>1</sup>,  
罗新松<sup>1</sup>, 付晓<sup>1</sup>, 贺宏斌<sup>1</sup>, DA HARN<sup>2</sup>, 李岳生<sup>1\*</sup>

**【摘要】** 目的 探讨中国大陆株日本血吸虫磷酸丙糖异构酶-热激蛋白(SjCTPI-Hsp70)DNA 疫苗联合佐剂白细胞介素-12(IL-12)质粒 DNA 对水牛的免疫保护作用。方法 实验采用双盲法, 所用疫苗及制剂均在实验结束后解码。将购自非血吸虫病流行区 45 头 8~10 月龄健康水牛随机分为 A 组(SjCTPI-Hsp70+IL-12, 300 μg)、B 组(SjCTPI+IL-12, 300 μg)和 C 组(空质粒 pVAX+IL-12, 300 μg)等 3 组(每组 15 头), 每头牛分别经肩部肌肉注射免疫 3 次, 每次间隔 28 d。末次免疫后 28 d, 每头牛经大腿内侧皮肤感染日本血吸虫尾蚴 1 000 条。解剖前 2 d 及当天分别收集粪便 1 次, 用定量法计数虫卵和毛蚴。攻击感染后 56 d 解剖, 用生理盐水经胸主动脉灌注法收集、计数成虫, 检测每克肝组织虫卵数。**结果** A、B 组减虫率分别为 51.2%和 41.5%( $\chi^2=1.89, P>0.05$ ), 减雌虫率分别为 48.9%和 44.7%( $\chi^2=0.35, P>0.05$ ), 减粪卵率分别为 52.1%和 38.3%( $\chi^2=3.84, P<0.05$ ), 减毛蚴率为 52.1%和 33.2%( $\chi^2=7.30, P<0.01$ )及减肝卵率为 61.5%和 42.0%( $\chi^2=7.61, P<0.01$ )。**结论** 用 SjCTPI-Hsp70+IL-12 免疫水牛可获得一定的免疫保护性作用。

**【关键词】** 日本血吸虫; 磷酸丙糖异构酶-热激蛋白; DNA 疫苗; 白细胞介素 12; 联合免疫; 水牛; 免疫保护

中图分类号:R383.32

文献标识码:A

## Protective Effects of Co-Immunization with SjCTPI-Hsp70 and Interleukin-12 DNA Vaccines against *Schistosoma japonicum* Challenge Infection in Water Buffalo

YU Xin-ling<sup>1</sup>, HE Yong-kang<sup>1</sup>, XIONG Tie<sup>1</sup>, ZHAO Ya-qin<sup>1</sup>, SHI Meng-zhi<sup>1</sup>, ZHOU Jie<sup>1</sup>,  
LIU Zong-chuan<sup>1</sup>, LUO Xin-song<sup>1</sup>, FU Xiao<sup>1</sup>, HE Hong-bin<sup>1</sup>, D.A. HARN<sup>2</sup>, LI Yue-sheng<sup>1\*</sup>

(1 Hunan Institute of Parasitic Disease, Yueyang 414000, China; 2 Harvard School of Public Health, Boston, USA)

**【Abstract】 Objective** To induce protective effect of co-immunization with *Sjaponicum* triose-phosphate isomerase fused to heat shock protein 70 (SjCTPI-Hsp70) plasmid and interleukin-12 (IL-12) DNA vaccines against *Schistosoma japonicum* (Chinese strain) infection in water buffalo. **Methods** Forty-five 8–10 months-old water buffalo from a non-endemic area were divided into three treatment groups each with fifteen buffalo: experimental group A (SjCTPI-Hsp70+IL-12, 300 μg), experimental group B (SjCTPI+IL-12, 300 μg), and control group C (pVAX+IL-12, 300 μg). All buffalo were immunized with a series of 3 intramuscular injections administered once every four weeks. Twenty-eight days post-vaccination, water buffalo were percutaneously challenged with 1 000 *Sjaponicum* cercariae. Fecal examinations were conducted two days prior, one day prior, and on perfusion day, and the number of hatching miracidia and eggs per gram feces were recorded. Fifty-six days post-infection, the buffalo were sacrificed and perfused via the descending aorta. The recovered adult worms and eggs in liver tissue were counted. **Results** Groups A and B showed a worm reduction rate of 51.2% and 41.5% ( $\chi^2=1.89, P>0.05$ ), female worm reduction of 48.9% and 44.7% ( $\chi^2=0.35, P>0.05$ ), fecal egg reduction of 52.1% and 38.3% ( $\chi^2=3.84, P<0.05$ ), a reduction of miracidia-hatching rate by 52.1% and 33.2% ( $\chi^2=7.30, P<0.01$ ), and liver egg reduction of 61.5% and 42.0% ( $\chi^2=7.61, P<0.01$ ), respectively. **Conclusion** Co-immunization with SjCTPI-Hsp70 and IL-12 DNA vaccines induces protective immunity against *Sjaponicum* in water buffalo.

**【Key words】** *Schistosoma japonicum*; SjCTPI-Hsp70; DNA vaccine; IL-12; Co-immunization; Water buffalo; Protective immunity

Supported by Wellcome Trust (ID: GR075816MA)

\* Corresponding author, E-mail: yueshenL@yhaoo.co.uk

基金项目: 英国 Wellcome Trust 资助项目(ID: GR075816MA)

作者单位: 1 湖南省血吸虫病防治所, 岳阳 414000; 2 美国哈佛大学公共卫生学院, 波士顿

\* 通讯作者, E-mail: yueshenL@yhaoo.co.uk

水牛是湖区血吸虫病主要传染源之一,重复感染机会多,频繁化疗费用高、效果差<sup>[1]</sup>。近年来,血吸虫病 DNA 疫苗研究日益受到重视,显示出较好的发展潜力。其中,日本血吸虫磷酸丙糖异构酶(SjCTPI) DNA 疫苗经小鼠及猪实验证实是一种前景较好的疫苗候选分子<sup>[2-4]</sup>。热激蛋白(Hsp)是生物界普遍存在的一类高度保守蛋白质,在生物体正常状态下有一定浓度的表达。当受到不同理化及病理因素刺激时,生物体合成这类蛋白质的能力将大大增加。Hsp70 是 Hsp 家族中最大的一族,生物学功能十分广泛,具有分子伴侣作用并参与抗原提呈过程,可通过与巨噬细胞、树突细胞等表面的 Hsp 受体结合增强免疫效果,现已成为抗寄生虫感染中研究的热点之一<sup>[5]</sup>。Hedstrom 等<sup>[6]</sup>证实曼氏血吸虫的 Hsp70 是感染宿主的一种主要的免疫原。阎玉涛等<sup>[7]</sup>用未感染日本血吸虫的东方田鼠的血清免疫筛选日本血吸虫成虫 cDNA 文库,发现 7 个具有天然抵抗力蛋白分子基因中有 Hsp70 的基因。日本血吸虫 Hsp-抗原肽复合疫苗有可能成为提高疫苗保护力的一个突破点,但目前尚未见有关报道。因此,本文采用磷酸丙糖异构酶-热激蛋白(SjCTPI-Hsp70) DNA 疫苗、磷酸丙糖异构酶(SjCTPI)DNA 疫苗与佐剂白细胞介素-12(IL-12)质粒 DNA 对水牛血吸虫病的保护性免疫作用进行了研究,结果报告如下。

## 材料与方法

### 1 实验现场

实验现场选在血吸虫病非流行区湖南省岳阳县筻口镇新安村铁山水库下游的沙港河畔草滩,面积约 40 000 m<sup>2</sup>,距岳阳市区约 40 km。新安村居民 608 人,水牛 45 头,无外来渔船民,历史上无血吸虫病流行。

### 2 分组

45 头健康水牛,8~10 月龄,体重(145.1±17.7) kg 购自血吸虫病非流行区湖南省邵阳市隆回县。经粪便集卵孵化法检测血吸虫卵,均为阴性。用阿维菌素 40 mg/kg 作肠道驱虫处理。用抽签法分 A 组(SjCTPI-Hsp70+IL-12)、B 组(SjCTPI+IL-12)、C 组(空质粒 pVAX+IL-12)等 3 组(每组 15 头),A、B 组为实验组,C 组为对照组。

### 3 疫苗及制剂

按双盲法实验设计,疫苗及制剂均由与本实验无关的澳大利亚专家编码,再由美方派专人直接送至现场使用。实验结束后由澳大利亚专家解码。

3 种疫苗及制剂 SjCTPI-Hsp70(编号 3,绿色)、SjCTPI(编号 9,蓝色)、空质粒 pVAX(编号 27,红色)仅编号和颜色标记不同。这 3 种疫苗及制剂和 IL-12 质粒 DNA 均由美国哈佛大学公共卫生学院 DA Harn 教授提供。

### 4 免疫方法

经肩部肌肉注射共 3 次,每次间隔 28 d;A 组第 1 次注射 SjCTPI-Hsp70 300 μg,第 2、3 次均同时注射 SjCTPI-Hsp70、IL-12 质粒 DNA 各 300 μg;B 组第 1 次注射 SjCTPI 质粒 DNA 300 μg,第 2、3 次均同时注射 SjCTPI、IL-12 质粒 DNA 各 300 μg;C 组第 1 次注射 pVAX 空质粒 DNA 300 μg,第 2、3 次均同时注射 pVAX 空质粒 DNA、IL-12 质粒 DNA 各 300 μg。

### 5 攻击感染

500 只日本血吸虫阳性钉螺由江苏省血吸虫病防治研究所提供。第 3 次免疫后 28 d,每头水牛经大腿内侧皮肤感染尾蚴 1 000 条。

### 6 粪便虫卵及毛蚴检查

于解剖前 2 d 及当天,分别收集每头牛粪便标本 1 次。用定量孵化法检测虫卵和毛蚴。取 3 次检查结果平均值,计算减粪卵率和减毛蚴率。

减粪卵率(%)=[(对照组平均每克粪便虫卵数-实验组平均每克粪便虫卵数)/对照组平均每克粪便虫卵数]×100%

减毛蚴率(%)=[(对照组平均每克粪便毛蚴数-实验组平均每克粪便毛蚴数)/对照组平均每克粪便毛蚴数]×100%

### 7 解剖和收集成虫

于攻击感染后 56 d 解剖水牛。用生理盐水经胸主动脉灌注,门静脉收集成虫。分离肝及肠,灌冲法收集肝内成虫并检获肠系膜静脉残留成虫。计数雌、雄成虫。计算减虫率及减雌虫率。

减虫率(%)=[(对照组平均检获成虫数-实验组平均检获成虫数)/对照组平均检获成虫数]×100%

减雌虫率(%)=[(对照组平均检获雌虫数-实验组平均检获雌虫数)/对照组平均检获雌虫数]×100%

### 8 肝组织虫卵检查

在每头牛肝脏边缘相同部位,分别取 2 块左肝和 1 块右肝组织(每块约 5 g),称重,以 5% KOH 消化,计数虫卵,计算减肝卵率。

减肝卵率(%)=[(对照组平均每克肝虫卵数-实验组平均每克肝虫卵数)/对照组平均每克肝虫卵数]×100%

## 9 统计分析

用 SAS 9.0 统计软件对数据进行统计分析。

## 结 果

### 1 各组检获成虫数及减虫率、减雌虫率

A、B 组检获成虫数和雌虫数均显著低于 C 组。A、B 组减虫率分别为 51.2%、41.5% ( $\chi^2=1.89, P>0.05$ ), 减雌虫率分别为 48.9%、44.7% ( $\chi^2=0.35, P>0.05$ )。A、B 组间成虫数和雌虫数差异无统计学意义 ( $t=1.947, 0.765, P$  均  $>0.05$ ) (表 1)。

### 2 各组肝组织虫卵数及减肝卵率

A、B 组平均每克肝组织虫卵数均显著低于 C 组。

A、B 组减肝卵率分别为 61.5%、42.0% ( $\chi^2=7.61, P<0.01$ )。A 组每克肝组织虫卵数明显低于 B 组 ( $t=3.489, P<0.01$ ), 与 B 组比较 A 组减肝卵率为 33.5% (表 2)。

### 3 各组粪便虫卵数、毛蚴数及减粪卵率、减毛蚴率

A、B 组平均每克粪便虫卵数和毛蚴数均显著低于 C 组。A、B 组减粪卵率和减毛蚴率分别为 52.1%、38.3% ( $\chi^2=3.84, P<0.05$ ) 和 52.1%、33.2% ( $\chi^2=7.30, P<0.01$ )。A 组平均每克粪便虫卵数和毛蚴数低于 B 组, 与 B 组比较 A 组减粪卵率和减毛蚴率分别为 22.4% 和 28.3% (表 3)。

表 1 3 组水牛检获成虫数比较  
Table 1 Number of adult worms recovered in the three groups

组别 Group	水牛数(头) No. water buffalo	平均成虫数(条) Average No. adult worms( $\bar{x}\pm s$ )	平均雌虫数(条) Average No. female worms( $\bar{x}\pm s$ )	减虫率(%) Worm reduction rate (%)	95% 可信区间 95% confidence interval	减雌虫率(%) Female worm reduction rate (%)	95% 可信区间 95% confidence interval
A	15	143.93±43.32	59.20±20.04	51.2	41.9~59.0	48.9	38.1~57.7
B	13*	172.54±32.67	64.00±11.17	41.5	29.9~51.2	44.7	32.7~54.6
C	15	294.93±66.92	115.73±33.67	-	-	-	-

注: \* 2 头牛分别于攻击感染后 42 d 和 48 d 因中暑死亡。

Note: \* Two buffalo died from heat stroke on the 42th and 48th day post-infection.

表 2 3 组水牛肝组织虫卵数比较  
Table 2 Number of hepatic eggs in the three groups

组别 Group	水牛数(头) No. water buffalo	平均每克肝组织虫卵数 Average No. eggs per gram liver tissue( $\bar{x}\pm s$ )	减肝卵率(%) Egg reduction rate(%)	95% 可信区间 95% Confidence interval
A	15	177.01±44.40	61.5	54.0~67.7
B	13	266.35±87.15	42.0	30.4~51.6
C	15	458.98±99.06	-	-

表 3 3 组水牛粪便虫卵数和毛蚴数比较  
Table 3 Number of eggs and miracidia from stool in the three groups

组别 Group	水牛数(头) No. water buffalo	平均每克粪便虫卵数 Average No. eggs per gram stool ( $\bar{x}\pm s$ )	平均每克粪便毛蚴数 Average No. miracidia per gram stool ( $\bar{x}\pm s$ )	减粪卵率(%) Egg reduction rate (%)	95% 可信区间 95% confidence interval	减毛蚴率(%) Miracidium reduction rate (%)	95% 可信区间 95% confidence interval
A	15	11.40±2.59	8.83±2.56	52.1	41.3~60.9	52.1	39.4~62.2
B	13	14.69±4.73	12.32±4.08	38.3	24.6~49.4	33.2	16.2~46.7
C	15	23.80±6.70	18.44±6.17	-	-	-	-

## 讨 论

DNA 疫苗制备比较方便, 价格较便宜, 能同时诱发体液免疫和细胞免疫, 应用佐剂能增强其免疫效果, 显示其较常规多肽疫苗更多的优点。因血吸虫基因的复杂性、宿主激发抗血吸虫免疫的不完整性及长期生物进化过程中血吸虫在宿主体内产生的多种免疫逃避机制, 故单一的疫苗难以诱导出足够有效的保护

力。抗日本血吸虫 DNA 疫苗动物实验结果表明, 混和或多价疫苗是未来 DNA 疫苗的发展方向<sup>[8,9]</sup>。

热激蛋白 Hsp 作为分子伴侣可结合多种抗原肽形成 Hsp-抗原肽复合物, 激活特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 和记忆性 T 细胞, 引发细胞免疫反应并有效防止免疫逃避, 因而, 日本血吸虫 Hsp-抗原肽复合疫苗可增强其免疫保护作用<sup>[5]</sup>。IL-12 是决定 Th1 型免疫应答的主要细胞因子, 已用于对多种病原

体所致疾病及肿瘤的 DNA 疫苗的研究,以发挥其增强细胞免疫功能的免疫佐剂作用<sup>[10]</sup>。磷酸丙糖异构酶(TPI)是一种重要的糖酵解酶,存在于血吸虫各个生活期的各种组织中<sup>[11]</sup>。朱荫昌等<sup>[4,12]</sup>报道 SjCTPI DNA 疫苗、SjCTPI+IL-12 DNA 疫苗对猪的保护性免疫力,减虫率分别为 48.3%和 46.2%,减雌虫率分别为 53.6%和 59.6%,减肝卵率分别为 49.4%和 65.8%,表明 SjCTPI DNA 疫苗可诱导猪产生较好的免疫保护作用,并有减轻血吸虫肝组织肉芽肿的作用,是一种具有较好潜力的血吸虫病疫苗。

本研究以湖区日本血吸虫病主要传染源之一的水牛为试验对象,首次采用融合日本血吸虫 Hsp70 诱导子的磷酸丙糖异构酶-热激蛋白(SjCTPI-Hsp70)DNA 疫苗与佐剂 IL-12 质粒 DNA 作联合免疫,进行了大规模的水牛实验。结果显示,多价 SjCTPI-Hsp70 DNA 疫苗加佐剂 IL-12 质粒 DNA 的联合免疫对水牛血吸虫病具有明显的保护性免疫作用,其减虫率和减雌虫率分别为 51.2%和 48.9%,虽高于单价 SjCTPI DNA 疫苗加佐剂 IL-12 质粒 DNA 的联合免疫,但两者间差异无统计学意义;而其减肝卵率、减粪卵率和减毛蚴率分别达到 61.5%、52.1%和 52.1%,显著高于单价 SjCTPI DNA 疫苗加佐剂 IL-12 质粒 DNA 的联合免疫,还可能具有抗生殖免疫作用。

本研究严格按照双盲法实验设计进行,避免了主观因素的干扰,取得了较好的保护性免疫效果,为研究抗水牛血吸虫病 DNA 疫苗提供了新的科学依据与途径。因水牛个体大,操作有一定的难度,本结果仅为初步试验,其现场应用价值仍有待进一步研究证实。

**致谢** 本研究设计和资料分析得到澳大利亚昆士兰大学 Don McManus 和 Gail Williams 教授指导,动物实验承蒙湖南省血吸虫病防治所任光辉、黄文通教授的支持与指导,特致谢忱!

### 参 考 文 献

- [1] Lu K, Shi YJ, Li H. The analysis for epidemic situation and development of cattle schistosomiasis in China[J]. Chin J Veter Parasitol, 2005, 13(4): 28-30. (in Chinese)  
(陆珂, 石耀军, 李浩. 我国牛血吸虫病疫情及动态分析[J]. 中国兽医寄生虫病, 2005, 13(4): 28-30.)
- [2] Zhu Y, Si J, Harn DA, et al. The protective immunity produced in infected C57BL/6 mice of a DNA vaccine encoding *Schistosoma japonicum* Chinese strain triose-phosphate isomerase[J]. Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth, 2002, 33: 207-213.
- [3] Zhu Y, Si J, Harn DA, et al. The protective immunity of a DNA vaccine encoding *Schistosoma japonicum* Chinese strain triose-phosphate isomerase in infected BALB/c mice[J]. Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth, 2004, 35: 518-522.
- [4] Zhu Y, Si J, Harn DA, et al. *Schistosoma japonicum* triose-phosphate isomerase plasmid DNA vaccine protects pigs against challenge infection[J]. Parasitology, 2006, 132(Pt 1): 67-71.
- [5] Wang XT, Zhu YC. Advances in research of heat shock protein for schistosome[J]. Chin J Schisto Control, 2005, 17: 234-238. (in Chinese)  
(王晓婷, 朱荫昌. 热休克蛋白及其在血吸虫研究中的进展[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2005, 17: 234-238.)
- [6] Hedstrom R, Culpepper J, Harrison RA, et al. A major immunogen in *Schistosoma mansoni* infections is homologous to the heat-shock protein Hsp70[J]. J Exp Med, 2005, 165: 1430-1435.
- [7] Yan YT, Liu SX, Song GC, et al. Screening and cloning of genes encoding *Schistosoma japonicum* antigens related to the serum antibodies in *Miratus fortis*[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2001, 19: 153-156. (in Chinese)  
(阎玉涛, 刘述先, 宋光承, 等. 东方田鼠天然抗体相关的日本血吸虫抗原基因筛选和克隆[J]. 中国寄生虫学和寄生虫病杂志, 2001, 19: 153-156.)
- [8] Yao LX, Lin JJ. Study on nucleic acid vaccine of *Schistosoma japonicum*[J]. Chin J Veter Parasitol, 2004, 12(4): 33-37. (in Chinese)  
(姚利晓, 林矫矫. 日本血吸虫病核酸疫苗的研究[J]. 中国兽医寄生虫病, 2004, 12(4): 33-37.)
- [9] Wang LX, Yi XY, Cai C. Research progress on co-immunization of DNA vaccines against *Schistosoma japonicum*[J]. China Trop Med, 2004, 4: 287-289. (in Chinese)  
(王林纤, 易新元, 蔡春. 血吸虫 DNA 疫苗联合免疫研究进展[J]. 中国热带医学, 2004, 4: 287-289.)
- [10] Zhu XH, Shi YE, Ning CX, et al. The adjuvant effect of IL-12 on protective immunity of *Schistosoma japonicum* fatty acid binding protein (Sj14FABP)[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2005, 23: 150-154. (in Chinese)  
(朱晓华, 石佑恩, 宁长修, 等. 白细胞介素-12 在日本血吸虫脂肪结合蛋白诱导小鼠保护性免疫力中的佐剂作用[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23: 150-154.)
- [11] Si J, Zhu YC, Harn DA, et al. A study on protective immunity of DNA vaccine encoding *Schistosoma japonicum* Chinese strain triose-phosphate isomerase in infected C57BL/6 mice[J]. Chin J Schisto Control, 2000, 12: 324-329. (in Chinese)  
(司进, 朱荫昌, Harn DA, 等. 日本血吸虫(中国大陆株)磷酸丙糖异构酶 DNA 疫苗的研制及其保护性免疫的研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2000, 12: 324-329.)
- [12] Zhu YC, Si J, Harn DA, et al. Effect of triose-phosphate isomerase DNA vaccine on regulation of hepatic granuloma of schistosomiasis japonica[J]. Chin J Schisto Control, 2003, 15: 323-325. (in Chinese)  
(朱荫昌, 司进, Harn DA, 等. 日本血吸虫磷酸丙糖异构酶(TPI) DNA 疫苗对肝脏虫卵肉芽肿调节作用的研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2003, 15: 323-325.)

(收稿日期: 2006-06-19 编辑: 富秀兰)