

# 日本血吸虫副肌球蛋白全基因核酸疫苗 在小鼠诱生的保护性免疫力\*

周生华 刘述先 宋光承 徐裕信 孙文字

中国预防医学科学院寄生虫病研究所\*\* 上海 200025

**提要 目的:** 研究日本血吸虫大陆株副肌球蛋白全基因核酸疫苗免疫 C<sub>57</sub>BL/6 及 BALB/c 小鼠诱生的保护性免疫力。**方法:** 将构建的日本血吸虫大陆株副肌球蛋白全基因核酸疫苗 (pCMV-SjC97) 经后腿胫前肌免疫 C<sub>57</sub>BL/6 及 BALB/c 小鼠, 共免疫 3 次, 每次间隔 3 wk。末次免疫后 3 wk 以血吸虫尾蚴攻击感染, 6 wk 后计数成虫负荷及肝、脾、肠组织虫卵数。设不含 SjC97 编码基因的空载体质粒免疫组为对照组。**结果:** pCMV-SjC97 免疫 C<sub>57</sub>BL/6 小鼠主要诱生 IgG2a 和 IgG2b 亚类, 而免疫 BALB/c 小鼠除诱生 IgG2a 和 IgG2b 亚类外, 还诱生 IgG1。pCMV-SjC97 免疫 C<sub>57</sub>BL/6 小鼠诱生较明显的减虫率 (35.5% ~ 41.1%) 和减卵率 (肝、脾及肠组织减卵率分别为 44.5% ~ 59.6%、56.7% ~ 82.4% 及 57.9%), 而对 BALB/c 小鼠未诱生保护性。**结论:** pCMV-SjC97 核酸疫苗能对 C<sub>57</sub>BL/6 小鼠诱生较明显保护性免疫力, 而对 BALB/c 小鼠未诱生免疫保护力。

**关键词** 日本血吸虫 副肌球蛋白 核酸疫苗 保护性免疫力

核酸疫苗作为近年发现的新型疫苗, 因其具有传统疫苗所不具备的优点, 如制备简单, 使用安全, 且能诱生较强而持久的体液免疫应答和细胞免疫应答等, 备受世界各国疫苗学、肿瘤学等领域重视<sup>[1~3]</sup>。迄今在微生物、肿瘤等领域的研究显示, 核酸疫苗免疫能诱生较好的保护性免疫应答<sup>[3]</sup>。日本血吸虫副肌球蛋白是日本血吸虫病最有希望的候选疫苗抗原之一, 也是世界卫生组织优选的防治血吸虫病疫苗候选抗原之一<sup>[4,5]</sup>。

澳大利亚 M d M anus 等报道了日本血吸虫菲律宾株副肌球蛋白核酸疫苗的研究结果, 构建了包含部分或全长副肌球蛋白编码基因的核酸疫苗, 免疫 BALB/c 小鼠, 能诱生以 IgG1、IgG2a 及 IgG2b 为特征的 Th1/Th2 混合型免疫应答, 但对血吸虫尾蚴的攻击感染无保护性<sup>[5]</sup>。为了探讨核酸疫苗对防治日本血吸虫病的应用价值, 我们曾将日本血吸虫大陆株副肌球蛋白 (SjC97) 编码区全基因克隆、测序, 构建了其编码区全基因核酸疫苗 (pCMV-SjC97)<sup>[6]</sup>。初步结果显示, pCMV-SjC97 经后腿胫前肌免疫 C<sub>57</sub>BL/6 小鼠, 能诱生较强的免疫应答。IgG 亚类分析, pCMV-SjC97 在 C<sub>57</sub>BL/6 小鼠只选择性诱生 IgG2a 和 IgG2b 亚类<sup>[7]</sup>。本文继续研究该核酸疫苗在小鼠诱生的免疫应答和免疫保护性。

## 材料与方 法

**动物** C<sub>57</sub>BL/6 (H-2b) 及 BALB/c (H-2d) 雌性小鼠 6~ 8 wk, 购于中国科学院上海实验动物中心。

**SjC97 编码基因的克隆、质粒表达载体构建及**

**质粒 DNA 大量制备** 见文献<sup>[7]</sup>。

**pCMV-SjC97 免疫小鼠及日本血吸虫大陆株尾蚴攻击感染方案** 见文献<sup>[7]</sup>。

**pCMV-SjC97 免疫诱生特异性抗体分析** 采用 ELISA 法测定抗体, 即将鼠血清 (各组内鼠血清等量混合) 加入已包被血吸虫成虫可溶性粗抗原 (SWAP) 的检测孔, 37 湿盒 × 2 h, PBS-T 洗涤 3 次 × 5 min, 分别加入羊抗鼠 IgG 或 IgG 亚类-HRP 试剂, 37 湿盒 × 1 h, PBS-T 洗涤 3 次 × 5 min, 加入底物 OPD 显色, 2 mol/L 硫酸终止反应, 测定吸光值 A<sub>492nm</sub>。

**细胞因子分析** 第 3 次免疫后 3 wk, 每组随机取 4~ 5 只小鼠用于细胞因子分析。脾淋巴细胞制备及体外特异性抗原刺激均同文献<sup>[8]</sup>。淋巴细胞培养至 96 h, 分别收集细胞培养上清。ELISA 法 (美国 Endogen 公司试剂盒) 测定培养上清 L-2, IFN- $\gamma$ , L-4 及 L-5 含量, 结果以 pg/ml 表示。

**减虫 (卵) 率计算** 尾蚴感染 6 wk 后, 用门静脉灌注法检获成虫, 并收集肝、脾、肠组织, 按本实验室方法分离虫卵<sup>[4]</sup>, 以每克组织虫卵数 (EPG) 计算减卵率:

$$\text{减虫率 (\%)} = \frac{\text{对照组回收虫均数} - \text{免疫组回收虫均数}}{\text{对照组回收虫均数}} \times 100\%$$

$$\text{减卵率 (\%)} = \frac{\text{对照组平均 EPG} - \text{免疫组平均 EPG}}{\text{对照组平均 EPG}} \times 100\%$$

**统计学方法** t 检验。

\* 中国博士后基金资助项目, 并得到国家 863 高技术计划及 TMRC/NH Grant (IP50A D) 部分资助

\*\* 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心

## 结 果

**pCMV-SjC97 免疫 C<sub>57</sub>BL/6 和 BALB/c 小鼠诱生特异性抗体的分析** IgG1 及 IgG2a/IgG2b 是反映小鼠 Th2 (体液免疫应答) 或 Th1 (细胞免疫应答) 类型细胞诱导激活的指标之一<sup>[9,10]</sup>。经 ELISA 法分析结果, 末次免疫后 3 wk, C<sub>57</sub>BL/6 小鼠和

BALB/c 小鼠免疫组血清 1:100 稀释, A<sub>492nm</sub> 值分别为 0.8 ± 0.03 和 0.687 ± 0.01。抗体 IgG 亚类分析的结果表明 pCMV-SjC97 免疫 C<sub>57</sub>BL/6 小鼠只诱生 IgG2a 和 IgG2b, 多次测定均未测及 IgG1, 而免疫 BALB/c 小鼠除诱生 IgG2a 和 IgG2b, 尚诱生了 IgG1。

**细胞因子分析** 细胞因子分析结果见表 1。

表 1 pCMV-SjC97 免疫 C<sub>57</sub>BL/6 小鼠脾淋巴细胞释放细胞因子分析 (每组 n=4)  
Table 1 Measurement of cytokines releasing from splenocytes harvested from pCMV-SjC97 immunized C<sub>57</sub>BL/6 mice (n=4)

疫苗 Immunogen	细胞因子含量 Cytokine production ( $\bar{X} \pm SD$ ) (pg/ml)			
	IFN- $\gamma$	L-2	L-4	L-5
SjC97 核酸疫苗 pCMV-SjC97 (200 $\mu$ g/mouse)	1 868 ± 9.2*	109.5 ± 10.6**	< 20	< 20
pCMV 空载体 pCMV blank vector (200 $\mu$ g/mouse)	85.9 ± 0.44	< 20	< 20	< 20

与对照组比较 Compared with control group a  $P < 0.001$ , b  $P < 0.001$

由表 1 可见, pCMV-SjC97 免疫 C<sub>57</sub>BL/6 小鼠脾淋巴细胞, 体外经特异性抗原刺激只诱生 Th1 型细胞免疫应答的细胞因子 L-2 及 IFN- $\gamma$ , 未测到 Th2 型细胞免疫应答的细胞因子 L-4 及 L-5。

**pCMV-SjC97 免疫后的虫负荷和卵负荷**  
pCMV-SjC97 免疫后的虫负荷和卵负荷见表 2 及表 3。第 1 次免疫攻击试验, 只选择 C<sub>57</sub>BL/6 小鼠作为研究模型。每组于攻击前 (末次免疫后 3 wk) 随机取出 4~5 只小鼠用于细胞因子分析。pCMV-SjC97 免疫组与注射空载体的对照组相比较, 减虫率为 41.1% ( $P < 0.05$ ); 肝组织与脾组织的减卵率分别

为 59.6% 和 82.4% ( $P < 0.05$ )。第 2 次免疫攻击试验, 除重复验证 pCMV-SjC97 免疫 C<sub>57</sub>BL/6 小鼠所诱生的免疫保护性外, 尚比较了 pCMV-SjC97 免疫 BALB/c 小鼠的保护性。根据第 1 次试验结果, 考虑到小鼠对大剂量 pCMV-SjC97 免疫的耐受程度, 将其剂量降低为每次每只小鼠注射 100  $\mu$ g。结果显示, 与注射空载体的对照组小鼠相比较, pCMV-SjC97 免疫 C<sub>57</sub>BL/6 小鼠获得了明显的减虫率和减卵率, 说明 pCMV-SjC97 免疫 C<sub>57</sub>BL/6 小鼠能够诱生免疫保护性。但免疫 BALB/c 小鼠未诱生免疫保护性 (表 2, 表 3)。

表 2 pCMV-SjC97 免疫小鼠攻击感染后的虫负荷  
Table 2 Wom burden in mice vaccinated with pCMV-SjC97 Post-challenge infection Schistosoma japonicum

小鼠 Mouse strain	组别 Group	免疫剂量 Dose of inoculation ( $\mu$ g)	小鼠数 No. of mice	检虫数 ( $\bar{X} \pm SD$ ) No. of worms detected ( $\bar{X} \pm SD$ )	减虫率 (%) Wom reduction rate (%)	P
C <sub>57</sub> BL/6	SjC97 核酸疫苗	pCMV-SjC97	20	11.23 ± 2.55	38.36	< 0.05
	Sj97 蛋白	Sj97 protein	11	14.64 ± 2.29	18.67	
	pCMV 空载体	pCMV blank vector	24	18.22 ± 2.39	-	
BALB/c	SjC97 核酸疫苗	pCMV-SjC97	8	16.13 ± 2.17	12.8	> 0.05
	Sj97 蛋白	Sj97 protein	7	16.64 ± 2.29	12.76	
	pCMV 空载体	pCMV blank vector	15	18.50 ± 1.35	-	

## 讨 论

核酸疫苗以其独特的优点而成为当今世界疫苗学领域 (微生物, 肿瘤, 自身免疫性疾病等) 的研究热点<sup>[1]</sup>, 核酸疫苗的发现也为血吸虫等抗原成份复杂的复细胞寄生虫疫苗的研究和开发带来了曙光。

pCMV-SjC97 免疫 C<sub>57</sub>BL/6 (H-2b) 和 BALB/c (H-2d) 小鼠诱生的免疫应答 (抗体 IgG) 较相似, 但 IgG 亚类分析显示该核酸疫苗免疫 C<sub>57</sub>BL/6 小鼠只诱生 IgG2a 和 IgG2b 亚类, 未测到 IgG1 及 IgG3 亚类, 而在 BALB/c 小鼠除诱生 IgG2a 及 IgG2b 外, 还诱生了 IgG1。进一步分析 pCMV-SjC97 免疫 C<sub>57</sub>BL/6

表 3 攻击感染 6 wk 后小鼠每克组织虫卵计数  
Table 3 Eggs per gram (EPG) of tissue in immunized and control mice 6 wk post challenge infection

小鼠 Mouse strain	组别 Group	总重量(g) Total weight			平均重量 Average weight			平均虫卵总数 Average of total No. eggs			平均每克组织虫卵数 Average of EPG			减卵率(%) Egg reduction rate (%)		
		肝 Liver	脾 Spleen	肠 Intestine	肝 Liver	脾 Spleen	肠 Intestine	肝 Liver	脾 Spleen	肠 Intestine	肝 Liver	脾 Spleen	肠 Intestine	肝 Liver	脾 Spleen	肠 Intestine
		C57BL/6	SjC97 核酸疫苗 pCMV-SjC97	34.03	4.49	7.29	2.61	0.34	0.56	98 560 ±5 643	2 880 ±144	11 280 ±366	2 901 ±166	641 ±32	1 547 ±50	44.5
	Sj97 蛋白 Sj97 protein	32.55	4.89	4.86	4.17	0.44	0.44	134 280 ±5 243	4 613 ±244	15 453 ±161	4 125 ±161	943 ±50	3 179 ±33	21.1	36.3	13.5
	pCMV 空载体 pCMV blank vector	45.88	7.17	7.22	3.05	0.48	0.48	240 000 ±6 954	10 622 ±509	26 539 ±640	5 231 ±152	1 481 ±71	3 676 ±89	-	-	-
BALB/c	SjC97 核酸疫苗 pCMV-SjC97	13.00	2.76	2.88	1.63	0.35	0.36	29 367 ±404	1 880 ±160	11 360 ±166	2 259 ±31	681 ±58	3 944 ±58	9.6	21.6	20.0
	Sj97 蛋白 Sj97 protein	17.38	3.59	3.59	2.48	0.51	0.51	4 600 ±6 500	2 288 ±156	12 915 ±175	2 647 ±377	637 ±43	3 598 ±49	0	26.7	27.1
	pCMV 空载体 pCMV blank vector	18.54	4.25	4.63	1.92	0.43	0.46	46 350 ±4 717	3 692 ±178	22 836 ±164	2 500 ±254	869 ±42	4 932 ±35	-	-	-

小鼠脾细胞体外经特异性抗原刺激诱生的细胞因子，结果显示其诱生了较高水平的 IFN- $\gamma$  和 IL-2。表明 pCMV-SjC97 在 C57BL/6 小鼠诱生了典型的 Th1 类型的免疫应答<sup>[9,10]</sup>。而根据 IgG 亚类结果，提示该核酸疫苗在 BALB/c 小鼠诱生的免疫应答为 Th1/Th2 混合型免疫应答<sup>[5,9]</sup>，这与 M dmanus 等的研究结果基本一致<sup>[5]</sup>。血吸虫尾蚴攻击感染后，在 C57BL/6 小鼠获得了较明显的减虫率和减卵率（与注射空载体的对照组比较， $P < 0.05$ ）。而在 BALB/c 小鼠的减虫率和减卵率均不明显。Western blot 分析显示，pCMV-SjC97 免疫的 C57BL/6 和 BALB/c 小鼠血清均可识别 SWAP 中的 97 kDa 蛋白，表现为 95 kDa 和 78 kDa，与文献结果一致<sup>[11]</sup>。此外，研究了抗体依赖的巨噬细胞 (M $\Phi$ ) 对血吸虫大陆株童虫的杀伤作用 (ADCC)，显示 pCMV-SjC97 免疫的 C57BL/6 小鼠血清对血吸虫童虫的杀伤率明显高于 BALB/c 小鼠免疫血清 ( $P < 0.05$ )，已证实 ADCC 是日本血吸虫获得性抵抗力（尤其在小鼠模型）的一个主要成份，而 M $\Phi$  是 ADCC 主要效应细胞之一<sup>[9,12]</sup>。结合上述结果，推测 pCMV-SjC97 免疫 C57BL/6 小鼠后所诱生的抗体可在体内通过 ADCC 杀伤血吸虫童虫，这可能是 pCMV-SjC97 免疫 C57BL/6 小鼠能够诱生保护性免疫力的原因之一<sup>[9]</sup>。上述结果提示，核酸疫苗的免疫保护性的获得可能与实验动物的遗传背景、诱生的免疫应答效应因子的特性等因素有关。虽然核酸疫苗诱生免疫应答的机制尚不清楚，但目前推测有下列几种方式：注射至肌肉等局部组织的质粒 DNA，能够低水平、但持续

较长时间表达产生外源目的蛋白，并被聚集到注射部位的抗原提呈细胞 (APC) 所摄取，从而诱生免疫应答；质粒 DNA 直接转染了 APC（如郎罕氏细胞等），APC 再将摄取的外源质粒 DNA 带入局部淋巴结，并编码外源目的蛋白以诱生免疫应答<sup>[13]</sup>。我们观察到，pCMV-SjC97 免疫小鼠后 24~96 h 或更长时间，局部肌肉组织出现明显的红肿、充血等炎症反应，而注射空载体的对照组则无。取免疫后不同时间的小鼠局部肌肉组织经冰冻切片并免疫荧光法分析，发现经 pCMV-SjC97 免疫后 24 h 局部肌肉组织即可有副肌球蛋白表达，这种炎症反应将可能导致单核巨噬细胞、皮肤的郎罕氏细胞等细胞聚集到注射部位以摄取外源 DNA 或表达的外源蛋白。因此得出如下结论：我们所构建的日本血吸虫大陆株副肌球蛋白全基因核酸疫苗无论在 C57BL/6 (H-2b) 小鼠和 BALB/c (H-2d) 小鼠均能诱生免疫应答，并且在前者诱生典型的 Th1 类型免疫应答，在后者为 Th1/Th2 混合型免疫应答；pCMV-SjC97 所诱生的抗体能够识别日本血吸虫大陆株成虫可溶性抗原成份中的 97 kDa 蛋白，该抗体能在体外通过 ADCC 杀伤日本血吸虫大陆株童虫；pCMV-SjC97 能在 C57BL/6 小鼠诱生保护性免疫力，这种免疫力的获得可能与 pCMV-SjC97 免疫后诱生的抗体 IgG 能通过 ADCC 杀伤日本血吸虫童虫，及诱生的 IFN- $\gamma$  等 Th1 类型细胞因子对血吸虫虫卵肉芽肿形成的直接或间接的抑制作用有关<sup>[9]</sup>。因此，pCMV-SjC97 免疫既能降低免疫小鼠 (C57BL/6) 体内的虫负荷，达到抗感染的效果，又

能降低小鼠肝、脾、肠组织的卵负荷，达到抗病疫苗的效果。我们的研究结果为在家畜类大动物（如牛、猪等）进一步评价该核酸疫苗的免疫保护效果奠定了基础。

参 考 文 献

1 Tighe H, Corr M, Roman M, et al Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint *Immunol Today* 1998; 19: 89- 97

2 Simmonds RS, Shearer MH, Kennedy RC DNA vaccines—from principle to practice *Parasitol Today* 1997; 13: 328- 331

3 McGregor RR First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and response *J Infect Dis* 1998; 178: 92- 100

4 Liu SX, Song GC, Xu YX, et al Progress in the development of a vaccine against schistosomiasis in China *Int J Infect Dis* 1998; 2: 176- 180

5 Wayne GJ, Yang W, Scott JC, et al DNA-based vaccination using *Schistosoma japonicum* (Asian blood-fluke) genes *Vaccine* 1997; 15: 846- 848

6 周生华, 刘述先, 宋光承, 等 日本血吸虫副肌球蛋白全基因克隆、测序及表达 *中国寄生虫学与寄生虫病杂志* 1999; 17: 196

- 199

7 周生华, 刘述先, 宋光承, 等 日本血吸虫大陆株副肌球蛋白全基因核酸疫苗诱导免疫应答的研究 *中华医学杂志* 1999; 79: 848- 851

8 周生华, 刘述先, 宋光承, 等 日本血吸虫谷胱甘肽-S-转移酶诱导的保护性免疫应答特征的研究 *中国寄生虫学与寄生虫病杂志* 1999; 17: 74- 77

9 Capron A. Schistosomiasis: forty year swar on the worm. *Parasitol Today* 1998; 14: 379- 384

10 Moll H. Immune responses to parasites: the art of distinguishing the good from the bad *Immunol Today* 1996; 17: 551- 552

11 James SL, Salzman C, Pearce EJ. Induction of productive immunity against *Schistosoma mansoni* by a nonliving vaccine. IV. Antigen recognition by non-responder mouse strains *Parasite Immunol* 1988; 10: 71- 83

12 陶伊文, 刘述先 小鼠感染后不同时间血清对日本血吸虫童虫细胞介导的细胞毒作用 *中国寄生虫学与寄生虫病杂志* 1991; 9: 182- 185

13 Porgador A, Irvine KR, Iwasaki A, et al Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8<sup>+</sup> T cells after gene gun immunization *J Exp Med* 1998; 188: 1075- 1082

1999年3月10日收稿 1999年7月26日修回  
(编辑: 富秀兰)

## INDUCTION OF PROTECTIVE IMMUNITY IN MICE AGAINST SCHISTOSOMA JAPONICUM BY NUCLEIC ACID VACCINE ENCODING THE FULL-LENGTH PARAMYOSIN\*

ZHOU Shenghua, LIU Shuxian, SONG Guangcheng, XU Yuxin, SUN Wenyu

*Institute of Parasitic Diseases, Chinese Academy of Preventive Medicine\*\* , Shanghai 200025*

### ABSTRACT

**AM:** To investigate the immune efficacy of nucleic acid vaccination in mice against full-length paramyosin of Chinese *Schistosoma japonicum*. **METHODS:** C57BL/6 and BALB/c mice were vaccinated intramuscularly with the nucleic acid vaccine (pCMV-SjC97) encoding the full-length gene of paramyosin of Chinese *S. japonicum*. Each group was immunized three times at weeks 0, 3 and 6. Mice vaccinated with pCMV blank vector served as negative control. Mice were challenged three weeks after final DNA boosting by percutaneous infection with cercariae. Six weeks after infection the mice were perfused, worm burden and eggs in the livers, spleens and intestines were counted. Sera from vaccinated mice were collected from the tail vein at weeks 0, 3, 6 and 9, respectively. **RESULTS:** C57BL/6 mice vaccinated with pCMV-SjC97 produced predominantly IgG2a and IgG2b; whereas in BALB/c mice, IgG1, IgG2a and IgG2b antibodies. Immunization with the pCMV-SjC97 in C57BL/6 mice could confer significant worm reduction rate (35.5% - 41.4%,  $P < 0.05$ ) and egg reduction rate (liver: 44.5% - 59.6%,  $P < 0.05$ ; spleen: 56.7% - 82.4%,  $P < 0.05$ ; intestines: 57.9%,  $P < 0.05$ ), but not in BALB/c mice. **CONCLUSION:** The nucleic acid vaccine, pCMV-SjC97, could induce protective immunity in C57BL/6 mice significantly.

**Key words:** *Schistosoma japonicum*, paramyosin, nucleic acid vaccine, protective immunity

\* Supported by Chinese Postdoctoral Science Foundation, and partially by National 863 Bio-Tech Program and by TMRC of NIH Grant, USA (IP50A D)

\*\* WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis