

周期型马来丝虫 CPI 基因真核表达载体的构建和免疫学研究

张赛楠, 方政*, 陆施娟, 王慧, 徐邦生

【摘要】 目的 构建周期型马来丝虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂(*BmCPI*)基因真核表达载体 pcDNA3.1-*BmCPI*, 并观察其在小鼠体内的免疫应答反应。方法 以周期型马来丝虫总 RNA 为模板, 逆转录 PCR (RT-PCR)扩增目的基因片段。与 pGEM-T Easy 克隆载体连接, 筛选出阳性克隆, 经 PCR 和双酶切鉴定后, 亚克隆至真核表达质粒 pcDNA3.1, 构建 pcDNA3.1-*BmCPI* 表达载体。将 48 只小鼠随机分为 4 组, 每组 12 只, 分别为健康对照组、空质粒组、pcDNA3.1-*BmCPI* 组和 pcDNA3.1-*BmCPI*/CpG 组, 分别注射 PBS 100 μ l、空质粒 pcDNA3.1 100 μ g、重组质粒 pcDNA3.1-*BmCPI* 100 μ g 和重组质粒 pcDNA3.1-*BmCPI* 100 μ g+佐剂 CpG 30 μ g, 采用左后腿胫前肌注射免疫。每 2 周 1 次, 共 3 次, 于末次免疫后第 4 周, 用 RT-PCR 方法检测小鼠注射部位肌肉组织内目的基因转录情况。于末次免疫后第 4 和第 6 周, 用噻唑蓝(MTT)法检测小鼠 T 淋巴细胞刺激增殖水平。于末次免疫后第 2、4 和 6 周, 用 ELISA 法检测小鼠血清 γ 干扰素 (IFN- γ)和白介素-4 (IL-4)水平。结果 成功构建了 pcDNA3.1-*BmCPI* 真核表达载体, 基因片段大小为 621 bp。该真核表达载体免疫小鼠后, 从小鼠肌肉组织扩增出目的基因。末次免疫后第 4 和第 6 周, 2 个免疫组小鼠淋巴细胞刺激增殖指数均显著高于健康对照组和空质粒组 (53.789 \pm 1.937、59.735 \pm 4.139 和 61.975 \pm 1.029)(均 $P<0.05$), 2 个免疫组间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。于末次免疫后第 2、4 和 6 周, pcDNA3.1-*BmCPI* 组和 pcDNA3.1-*BmCPI*/CpG 组小鼠血清 IFN- γ 水平随时间延长逐渐升高, 分别为 69.544 \pm 3.145 和 106.069 \pm 7.518、120.019 \pm 5.968 和 136.229 \pm 7.198、149.109 \pm 2.700 和 178.429 \pm 1.126, 均显著高于健康对照组和空质粒组 (28.264 \pm 1.129、35.179 \pm 1.029 和 40.110 \pm 1.176)(均 $P<0.05$), 其中末次免疫后第 2 和第 6 周, pcDNA3.1-*BmCPI*/CpG 组 IFN- γ 水平显著高于 pcDNA3.1-*BmCPI* 组 (均 $P<0.05$)。于末次免疫后第 4 和第 6 周, 2 个免疫组的 IL-4 水平均显著高于健康对照组和空质粒组(均 $P<0.05$), 2 个免疫组间差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。结论 pcDNA3.1-*BmCPI* 真核表达载体能在小鼠体内转录, 并可诱导免疫应答。

【关键词】 马来丝虫; 半胱氨酸蛋白酶抑制剂; 真核表达载体; 免疫

中图分类号: R383.161

文献标识码: A

Construction of Eukaryotic Recombinant Plasmid of Periodic *Brugia malayi* CPI Gene and its Immunity

ZHANG Sai-nan, FANG Zheng*, LU Shi-juan, WANG Hui, XU Bang-sheng

(Department of Parasitology, College of Medicine, Nantong University, Nantong 226001, China)

【Abstract】 **Objective** To observe the immune responses elicited in BALB/c mice by DNA vaccine encoding cysteine protease inhibitor (CPI) of periodic *Brugia malayi* cloned in vector pcDNA3.1. **Methods** Specific primers were designed on the basis of known sequences of CPI gene from periodic *B. malayi*. The desired gene fragment was amplified by PCR from cDNA, inserted into cloning vector, pGEM-T, and sub-cloned into pcDNA3.1 to construct pcDNA3.1-*BmCPI*. Forty-eight mice were randomly divided into 4 groups, i.e. normal control group, pcDNA3.1(+) group, pcDNA3.1-*BmCPI* group, and pcDNA3.1-*BmCPI*/CpG group injected with PBS 100 μ l, pcDNA3.1 100 μ g, pcDNA3.1-*BmCPI* 100 μ g and pcDNA3.1-*BmCPI* 100 μ g+CpG 30 μ g, respectively on left hind leg of each mouse. All mice received three immunizations with 2-week interval. At the 4th week after the last immunization the muscle around injection spot was collected, in which the level of *BmCPI* mRNA was detected by RT-PCR. The stimulation index (SI) of spleen lymphocytes was measured by MTT method and the levels of secreted IL-4 and IFN- γ in serum were detected by ELISA. **Results** The recombinant plasmid pcDNA3.1-*BmCPI* was constructed and the length of the gene fragment was 621 bp. The results

基金项目: 南通市应用研究计划项目 (No. K2009027); 江苏省高校研究生科研创新计划项目 (No. 2001635)

作者单位: 南通大学医学院寄生虫学教研室, 南通 226001

* 通讯作者, E-mail: fznt@163.com

showed that *BmCPI* gene in the muscle of the immunized mice was detected by PCR. At the 4th and 6th weeks after immunization, the SI of the two immunized groups was significantly higher than normal control group and pcDNA3.1(+) group (53.789 ± 1.937 , 59.735 ± 4.139 , and 61.975 ± 1.029) ($P < 0.05$). No significant difference existed between pcDNA3.1-*BmCPI* group and pcDNA3.1-*BmCPI*/CpG group ($P > 0.05$). Serum IFN- γ in pcDNA3.1-*BmCPI* group and pcDNA3.1-*BmCPI*/CpG group increased from the 2nd to the 6th week after the last immunization with the value of 69.544 ± 3.145 and 106.069 ± 7.518 , 120.019 ± 5.968 and 136.229 ± 7.198 , 149.109 ± 2.700 and 178.429 ± 1.126 , respectively. The levels of IFN- γ in serum from the immunized mice were significantly higher than those of normal control group and pcDNA3.1(+) group (28.264 ± 1.129 , 35.179 ± 1.029 , and 40.110 ± 1.176 , respectively) ($P < 0.05$). There was a significant difference between the two immunized groups at the 2nd and the 6th weeks after the last immunization ($P < 0.05$). The level of IL-4 in serum from the immunized mice was significantly higher than those of normal control group and pcDNA3.1(+) group at the 4th and the 6th weeks after the last immunization ($P < 0.05$). No significant difference was noted in IL-4 level between pcDNA3.1-*BmCPI* group and pcDNA3.1-*BmCPI*/CpG group ($P > 0.05$). **Conclusion** The recombinant eukaryotic plasmid pcDNA3.1-*BmCPI* was transcribed *in vivo* and elicited immune responses in mice.

【Key words】 *Brugia malayi*; Cysteine protease inhibitor; Eukaryotic recombinant plasmid; Immunity

Supported by the Fund for the Applied Research Program of Nantong (No. K2009027) and the Research Innovation Fund of Jiangsu Province (No. 2001635)

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

中国已于 2006 年达到消除丝虫病标准，但由于全球气候变暖，传播媒介广泛存在，尤其是沿海经济发达地区，外来务工者中仍可能存在微丝蚴阳性者，中国沿海地区丝虫病外源输入的可能性及流行的危险因素依然存在^[1,2]。在世界范围内，淋巴丝虫病仍在多国流行。筛选有效的具有保护性的抗原并进行组合，选择有效的免疫途径和方法，以获得最佳免疫保护效应是目前疫苗研究的一个重要内容^[3-5]。半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (cysteine protease inhibitor, CPI) 广泛分布于植物、病毒、细菌、原生动物和哺乳动物体内，是半胱氨酸蛋白酶竞争性的内源抑制剂超家族^[6]，参与了多种生理和病理的过程，如蛋白质的分解代谢、感染和免疫、肿瘤的侵袭和转移等。寄生虫的 CPI 还具有免疫调节的特性，包括调节人类主要组织相容性复合体 II 类分子 (MHC-II) 限制的抗原提呈，通过调节细胞因子分泌、抑制 T 细胞生长分化和巨噬细胞功能和上调 IFN- γ 活化的巨噬细胞合成 NO 的量，在抗寄生虫感染研究中具有较好的应用前景。本实验通过构建周期型马来丝虫 (*Brugia malayi*) CPI 核酸疫苗，观察其在小鼠体内的细胞免疫应答反应。

材料与方法

1 材料

1.1 虫体和实验动物来源 周期型马来丝虫取自大连医科大学提供的阳性爪哇沙鼠模型，分离后用生理盐水 -70 °C 保存。48 只清洁级 BALB/c 小鼠，雌性，6~7 周龄，体重 (20 ± 2) g，购自南通大学实验动物中心。

1.2 主要试剂 *Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Bam*H I、*T₄* DNA 连接酶均购自日本 Takara

公司。质粒小量抽提纯化试剂盒和 DNA 纯化胶回收试剂盒购自上海生工生物工程有限公司。胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司。细胞因子检测试剂盒购自上海晶美生物工程有限公司。盐酸布比卡因注射液 (批号为 100902) 购自南通新鑫药业有限公司。载体 pGEM-T Easy、噻唑蓝 (MTT) 和质粒大量抽提试剂盒购自美国 Promega 公司。真核表达载体 pcDNA3.1(+) 由江苏省寄生虫病防治研究所惠赠。大肠埃希菌 (*E. coli*) DH5 α 由本室保存。

2 方法

2.1 目的基因的扩增 按照文献 [7] 的方法，进行周期型马来丝虫 *BmCPI* 基因片段的克隆与鉴定，成功构建重组质粒 pGEM-T-*BmCPI*，并测序鉴定。

2.2 目的基因真核表达载体的构建、鉴定和纯化 将纯化的 pcDNA3.1(+) 质粒和重组质粒 pGEM-T-*BmCPI* 用 *Nhe* I 和 *Bam*H I 双酶切，1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离，胶回收试剂盒回收酶切产物，将酶切后的 pcDNA3.1 载体和 *BmCPI* 基因片段进行连接后，转化感受态 *E. coli* DH5 α ，筛选阳性克隆，抽提质粒 DNA，进行 PCR 扩增和双酶切鉴定，鉴定阳性重组质粒 pcDNA3.1-*BmCPI*。

按照质粒大量抽提试剂盒说明书，大量提取纯化重组质粒 pcDNA3.1-*BmCPI*。用紫外分光光度计测定纯化产物吸光度 (A_{260} 和 A_{280} 值)，计算 A_{260}/A_{280} ，推算其浓度和纯度。稀释至 1 mg/ml，-20 °C 保存备用。

2.3 免疫佐剂的制备 按照文献 [8] 的方法，制备免疫佐剂含非甲基化胞嘧啶和鸟嘌呤的寡聚脱氧核糖核苷酸 CpG ODN (CpG1826)，序列为 5'-TCCATGACGTT-

CCTGACGTT-3'，全链经硫代磷酸骨架修饰，增强其核酸酶抗性，配制成 1 mg/ml。由上海英骏生物技术有限公司合成。

2.4 实验动物分组 将 48 只小鼠随机分为 4 组，每组 12 只，分别为健康对照组、空质粒组、pcDNA3.1-*BmCPI* 组和 pcDNA3.1-*BmCPI*/CpG 组，分别注射 PBS 100 μl、空质粒 pcDNA3.1 100 μg、重组质粒 pcDNA3.1-*BmCPI* 100 μg 和重组质粒 pcDNA3.1-*BmCPI* 100 μg+佐剂 CpG 30 μg，采用左后腿胫前肌注射免疫，每 2 周 1 次，共 3 次。每次接种前 24 h，于接种部位注射 0.5 mg/ml 盐酸布比卡因 50 μl 进行预处理。

2.5 逆转录 PCR(RT-PCR)检验目的基因体内转录情况 于末次免疫后第 4 周，每组取 1 只小鼠的免疫部位约 0.5 cm³ 肌肉组织，按组织 RNA 抽提法，利用 Trizol 提取 RNA，逆转录合成 cDNA，按文献 [7] 的方法，PCR 扩增目的基因片段，扩增产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定。

2.6 T 淋巴细胞特异性增殖试验(MTT 法) 于末次免疫后第 4 和第 6 周，每组分别剖杀 4 只小鼠，取脾制备淋巴细胞悬液，取台盼蓝染色计数活细胞大于 95% 的淋巴细胞悬液，稀释细胞浓度至 2×10⁶ 个/ml。于 96 孔板加入细胞悬液 100 μl/孔，每鼠细胞加 6 个孔，其中 3 孔加入伴刀豆球蛋白 A (ConA) 5 μl/孔，另 3 孔作为对照孔，加入生理盐水 5 μl/孔，37 °C 培养 72 h。培养结束前 4 h，加入 MTT 10 μl/孔，混匀，继续培养 4 h。用分光光度计测定 A₅₇₀ 值，计算各组淋巴细胞刺激指数 (SI)，SI=加 ConA 孔 A₅₇₀ 平均值/对照孔 A₅₇₀ 平均值。

2.7 血清中细胞因子白细胞介素-4 (IL-4)和 γ 干扰素 (IFN-γ)测定 于末次免疫后第 2、4 和 6 周，小鼠眼眶取血，制备血清。待测血清样品和有关试剂置室温下平衡 20 min。血清样品 1:2 稀释后，按照试剂盒说明书检测 IL-4 和 IFN-γ 含量。

3 统计学分析

用 SPSS 11.5 统计软件对样本数据进行统计学分析，采用 *t* 检验，检验水准 α=0.05。

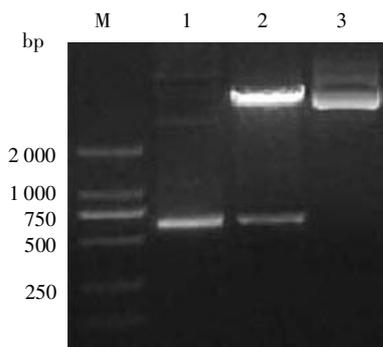
结 果

1 真核表达载体 pcDNA3.1-*BmCPI* 的鉴定

真核表达载体 pcDNA3.1-*BmCPI*，经纯化回收后进行 PCR 扩增，扩增产物片段大小约为 621 bp，与预期片段大小相符。用 *Nhe* I 和 *Bam*H I 双酶切后，获得相同大小的片段(图 1)。

2 目的基因体内转录情况

电泳结果显示，pcDNA3.1-*BmCPI* 组和 pcDNA3.1-*BmCPI*/CpG 组小鼠免疫部位肌肉组织 RNA 均可逆转录扩增出特异性条带，大小与周期型马来丝虫 *BmCPI* 基因片段 PCR 扩增产物一致，表明重组质粒 pcDNA3.1-*BmCPI* 能在小鼠肌肉内转录(图 2)。

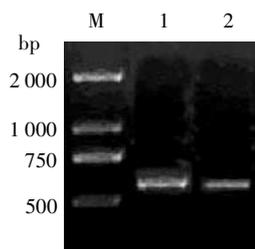


M: DNA 标志物(DL2000); 1: PCR 扩增产物; 2: 双酶切产物; 3: pcDNA3.1(+)质粒。

M: DNA marker (DL2000); 1: PCR product; 2: Digestion product by *Nhe* I and *Bam*H I; 3: pcDNA3.1(+) plasmid.

图 1 重组质粒 pcDNA3.1-*BmCPI* PCR 和双酶切鉴定

Fig. 1 PCR and enzyme digestion identification of recombinant pcDNA3.1-*BmCPI*



M: DNA 标志物(DL2000); 1: 重组质粒免疫小鼠注射部位肌肉 RT-PCR 产物; 2: 马来丝虫 *BmCPI* 基因 PCR 扩增产物。

M: DNA marker (DL2000); 1: RT-PCR amplification product of the muscle tissue of the immunized mice; 2: PCR product of *BmCPI* gene.

图 2 RT-PCR 检测重组质粒免疫小鼠肌肉内 *BmCPI* 基因

Fig. 2 *BmCPI* gene detection in muscle tissue of mice vaccinated with recombinant plasmid by RT-PCR

3 免疫小鼠 T 淋巴细胞增殖反应

pcDNA3.1-*BmCPI* 组和 pcDNA3.1-*BmCPI*/CpG 组小鼠于末次免疫后第 4 周，SI 分别为 1.226±0.468 和 1.298±0.129，末次免疫后第 6 周，SI 分别为 1.198±0.063 和 1.466±0.635，均显著高于健康对照组和空质粒组(均 *P*<0.05)。2 个免疫组间差异均无统计学意义(均 *P*>0.05)(表 1)。

4 免疫小鼠血清 IFN-γ 和 IL-4 水平

于末次免疫后第 2、4 和 6 周，pcDNA3.1-*BmCPI* 组和 pcDNA3.1-*BmCPI*/CpG 组小鼠血清 IFN-γ 水平

表 1 小鼠 T 淋巴细胞刺激增殖指数 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Stimulation index of T lymphocytes in mice ($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	第 4 周 4th week	第 6 周 6th week
健康对照组 Control group	1.002±0.010	1.003±0.018
空质粒组 pcDNA3.1(+) group	1.012±0.021	1.019±0.027
pcDNA3.1-BmCPI 组 pcDNA3.1-BmCPI group	1.226±0.468*	1.298±0.129*
pcDNA3.1-BmCPI/CpG 组 pcDNA3.1-BmCPI/CpG group	1.198±0.063*	1.466±0.635*

注:与健康对照组和空质粒组相比, * $P < 0.05$ 。
Note: vs normal control group and pcDNA3.1(+)
group, * $P < 0.05$.

随时间延长逐渐升高, 分别为 69.544 ± 3.145 和 106.069 ± 7.518 、 120.019 ± 5.968 和 136.229 ± 7.198 、 149.109 ± 2.700 和 178.429 ± 1.126 , 均显著高于健康对照组和空质粒组 (均 $P < 0.05$), 其中末次免疫后第 2 和第 6 周, pcDNA3.1-BmCPI/CpG 组 IFN- γ 水平显著高于 pcDNA3.1-BmCPI 组 (均 $P < 0.05$) (表 2)。

表 2 小鼠血清中细胞因子 IFN- γ 水平 ($\bar{x} \pm s$)/pg·ml⁻¹
Table 2 IFN- γ level in serum of mice ($\bar{x} \pm s$)/pg·ml⁻¹

组别 Group	第 2 周 2nd week	第 4 周 4th week	第 6 周 6th week
健康对照组 Control group	49.575±5.986	51.237±3.526	48.729±0.126
空质粒组 pcDNA3.1(+) group	53.789±1.937	59.735±4.139	61.975±1.029
pcDNA3.1-BmCPI 组 pcDNA3.1-BmCPI group	69.544±3.145*	120.019±5.968*	149.109±2.700*
pcDNA3.1-BmCPI/CpG 组 pcDNA3.1-BmCPI/CpG group	106.069±7.518*#	136.229±7.198*	178.429±1.126*#

注:与健康对照组和空质粒组相比, * $P < 0.05$; 与 pcDNA3.1-BmCPI 组相比, # $P < 0.05$ 。
Note: vs normal control group and pcDNA3.1(+)
group, * $P < 0.05$;
vs pcDNA3.1-BmCPI group, # $P < 0.05$

于末次免疫后第 2、4 和 6 周, pcDNA3.1-BmCPI 组和 pcDNA3.1-BmCPI/CpG 组小鼠血清 IL-4 水平随时间延长逐渐升高, 分别为 35.998 ± 6.505 和 35.117 ± 1.025 、 69.779 ± 11.309 和 58.109 ± 5.779 、 96.119 ± 6.360 和 82.409 ± 3.550 , 其中第 4 和第 6 周 2 个免疫组的 IL-4 水平显著高于健康对照组和空质粒组 (均 $P < 0.05$), 2 个免疫组间差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (表 3)。

讨 论

寄生虫 CPI 具有调节某些细胞因子生成, 并诱导抗炎反应的能力。丝虫 CPI 可增加 IL-10 的生成, 参与引起宿主 T 细胞从具有免疫保护的 Th1 型免疫应答向无保护性的 Th2 型免疫应答转变。棉鼠丝虫属

表 3 小鼠血清中细胞因子 IL-4 水平 ($\bar{x} \pm s$)/pg·ml⁻¹
Table 3 IL-4 level in serum of mice ($\bar{x} \pm s$)/pg·ml⁻¹

组别 Group	第 2 周 2nd week	第 4 周 4th week	第 6 周 6th week
健康对照组 Control group	26.979±4.179	28.643±6.109	26.179±7.361
空质粒组 pcDNA3.1(+) group	28.264±1.129	35.179±1.029	40.110±1.176
pcDNA3.1-BmCPI 组 pcDNA3.1-BmCPI group	35.998±6.505	69.779±11.309*	96.119±6.360*
pcDNA3.1-BmCPI/CpG 组 pcDNA3.1-BmCPI/CpG group	35.117±1.025	58.109±5.779*	82.409±3.550*

注:与健康对照组和空质粒组相比, * $P < 0.05$ 。
Note: vs normal control group and pcDNA3.1(+)
group, * $P < 0.05$.

Litomosoides sigmodontis 的 CPI 在小鼠体内能显著降低抗原特异的脾细胞增生, 并有长期持续性效应。在魏氏双瓣线虫 (*Dipetalonema viteae*) CPI 和 IFN- γ 联合运用于小鼠巨噬细胞时, 不仅生成大量 NO, 而且棘唇线虫微丝蚴的活力被明显抑制^[9,10]。在长期的进化过程中, 寄生虫最终得以在宿主中生存、繁衍, 其必然存在一系列适应寄生的机制。已发现一些寄生虫 CPI 能抑制抗原提呈、调节细胞因子分泌和上调 NO 合成, 因此 CPI 及其衍生物作为免疫调节剂在抗寄生虫感染中具有较好的应用前景^[11]。本实验以周期型马来丝虫 CPI 为研究对象, 构建核酸疫苗, 为今后组合构建马来丝虫复合多价基因工程疫苗打下基础。

基因疫苗作用的基本原理就是指将编码外源性抗原的基因插入到含真核表达系统的载体上, 然后直接导入人或动物体内, 使其在宿主细胞中表达抗原蛋白, 该抗原蛋白可直接诱导机体产生免疫应答^[12]。本实验采用传统的肌肉注射疫苗的方法, 肌细胞摄取外源基因的时间长于其他组织细胞, 且肌肉组织具有安全、体积大、接种容量大的优点。在注射 DNA 疫苗前 24 h 用麻醉剂盐酸布比卡因对拟免疫部位进行预处理, 以有效提高肌肉对 DNA 的吸收。通过对疫苗组小鼠免疫部位肌肉进行总 RNA 提取, 进行 RT-PCR 验证, 得到与目的基因片段大小一致的条带, 证明此真核重组 DNA 疫苗能在真核细胞内表达。MTT 法证实, 免疫组小鼠脾淋巴细胞体外经 ConA 刺激后刺激增殖指数明显升高, 表明此 DNA 疫苗可诱导小鼠细胞免疫反应。

根据小鼠 Th 细胞克隆在活化过程中产生的细胞因子类型的不同, 将其分为 Th1 和 Th2 两个功能亚群。Th1 细胞主要分泌 IFN- γ , 激活细胞免疫; 而 Th2 细胞主要分泌 IL-4 和 IL-10, 促进抗体的合成。两种细胞通过其分泌的细胞因子抑制对方的活化, 从而在免疫应答的各个阶段发挥重要的调节功能。本实

验中 2 个免疫组小鼠血清 IFN- γ 水平于末次免疫后第 2 周即与健康对照组和空质粒组之间差异有统计学意义, 而 IL-4 水平于末次免疫后第 4 周才显著升高, 说明 pcDNA3.1-BmCPI 核酸疫苗可以诱导细胞免疫, 且初期以 Th1 型为主。

细菌 DNA 中存在结构特征为 5'-嘌呤-嘌呤-CG-嘧啶-嘧啶-3' 的非甲基化 CpG 二核苷酸序列。CpG ODN 能激活高等动物的免疫系统, 活化 B 淋巴细胞、巨噬细胞、树突状细胞和自然杀伤细胞等免疫活性细胞, 诱导产生大量的多种细胞因子, 如 IL-1、IL-6、IL-12、IL-18、TNF- α 、IFN- α 和 IFN- γ 等, 增强机体的特异性和非特异性免疫反应^[13,14]。CpG ODN 作为一种新型的免疫佐剂, 与疫苗同时注射可增强机体的免疫反应强度^[15]。本实验中, pcDNA3.1-BmCPI/CpG 组于末次免疫后第 2 和第 6 周血清 IFN- γ 水平显著高于后者, 说明免疫佐剂 CpG ODN 有一定增强小鼠免疫应答的作用。本实验成功构建了 pcDNA3.1-BmCPI 核酸疫苗, 体外实验证实其可诱导小鼠产生细胞免疫应答反应, 但其免疫保护作用还需进一步的研究探讨。

参 考 文 献

[1] Zhang XC, Huang SY, Deng ZH, *et al.* Follow-up survey on the imported cases of lymphatic filariasis in Guangdong Province [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2008, 26(6): 409-411. (in Chinese)
(张贤昌, 黄少玉, 邓卓晖, 等. 广东省输入性丝虫病病例调查[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2008, 26(6): 409-411.)

[2] Fu B, Li GL, Hu YX, *et al.* Investigation on the impact of imported cases on filariasis elimination program in Shandong Province [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2003, 21(2): 96-98. (in Chinese)
(傅斌, 李桂玲, 胡颖新, 等. 输入性传染源对山东省消除丝虫病影响的调查 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2003, 21(2): 96-98.)

[3] Chen Y, Fang Z, Huang WQ, *et al.* Construction of eukaryotic expression plasmids with paramyosin gene of periodic *Brugia malayi* [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2007, 25(3): 250-252. (in Chinese)
(陈阳, 方政, 黄为群, 等. 周期型马来丝虫副肌球蛋白基因真核表达重组质粒构建 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007, 25(3): 250-252.)

[4] Xie DF, Fang Z, Huang WQ, *et al.* Cloning and eukaryotic expression of the gene encoding myosin from *Brugia malayi* [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2008, 26(6): 482-484. (in Chinese)
(谢东方, 方政, 黄为群, 等. 马来丝虫肌球蛋白部分编码基因 Bm-M55 的克隆与真核表达 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2008, 26(6): 482-484.)

[5] Xie DF, Fang Z, Tong HY, *et al.* Cloning, sequencing of G3PD gene from *Brugia malayi* and prediction of B cell epitopes in its amino acid sequence [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2009, 27(3): 226-228. (in Chinese)
(谢东方, 方政, 童海燕, 等. 马来丝虫 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因克隆、序列分析及编码产物 B 细胞表位预测 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2009, 27(3): 226-228.)

[6] Abrahamson M, Alvarez-Fernandez M, Nathanson CM. Cystatins [J]. Biochem Soc Symp, 2003, (70): 179-199.

[7] Tong HY, Fang Z, Zhang SN, *et al.* Cloning, sequencing of CPI gene from periodic *Brugia malayi* and prediction of B cell epitopes in its amino acid sequence [J]. Chin J Endemiol, 2010, 29(5): 515-518. (in Chinese)
(童海燕, 方政, 张赛楠, 等. 周期型马来丝虫 CPI 基因克隆和序列分析及编码产物 B 细胞表位预测 [J]. 中国地方病学杂志, 2010, 29(5): 515-518.)

[8] McCluskie MJ, Davis HL. CpG DNA as mucosal adjuvant [J]. Vaccine, 1999, 18(3-4): 231-237.

[9] Hartmann S, Kyewski B, Sonnenburg B, *et al.* A filarial cysteine protease inhibitor down-regulates T cell proliferation and enhances interleukin-10 production [J]. Eur Immunol, 1997, 27(9): 2253-2260.

[10] Pfaff AW, Schulz-Key H, Soboslay PT, *et al.* *Litomosoides sigmodontis* cystatin acts as an immunomodulator during experimental filariasis [J]. Int Parasitol, 2002, 32(2): 171-178.

[11] Schierack P, Lucius R, Sonnenburg B, *et al.* Parasite-specific immunomodulatory functions of filarial cystatin [J]. Infect Immun, 2003, 71(5): 2422-2429.

[12] Lin DS. Comparison of three non-radioactive assays for measurement of cell-mediated immunity [J]. Bio Formosa, 2006, 41(2): 59-66.

[13] Klinman DM. Adjuvant activity of CPG oligodeoxynucleotides [J]. Int Rev Immunol, 2006, 25(3-4): 135-154.

[14] Cooper CL, Davis HL, Angel JB, *et al.* CPG 7909 adjuvant improves hepatitis B virus vaccine seroprotection in antiretroviral-treated HIV-infected adults [J]. AIDS, 2005, 19(14): 1473-1479.

[15] Somroop S, Tongtawe P, Chairis U, *et al.* Traffic of antibody-secreting cells after immunization with a liposome-associated, CPG ODN-adjuvanted oral cholera vaccine [J]. Asian Pac J Allergy Immunol, 2006, 24(4): 229-238.

(收稿日期: 2011-05-10 编辑: 瞿麟平)