

## 【研究简报】

文章编号: 1000-7423(2011)-03-0319-03

## 日本血吸虫表位肽-DNA 颗粒性疫苗对小鼠免疫应答的影响

汪雪峰<sup>1\*</sup>, 张荣波<sup>1</sup>, 胡友莹<sup>1</sup>, 杜久伟<sup>1</sup>, 陈晓军<sup>2</sup>, 徐志鹏<sup>2</sup>, 苏川<sup>2</sup>

**【摘要】** 采用已构建的日本血吸虫 Sj22.6 抗原 CTL、Th 和 B 细胞表位肽-DNA 颗粒性疫苗 (PDDV) 及其混合疫苗免疫 C57BL/6 小鼠。36 只小鼠随机均分 6 组, 即 18K 对照组([K]<sub>18</sub>-空质粒 PDDV)、PBS 对照组、C 组(C-PDDV)、T 组(T-PDDV)、B 组(B-PDDV)和 C-T-B 组 (C-PDDV、T-PDDV 和 B-PDDV 等量混合), 每鼠分别在第 0、3 和 6 周麻醉下经尾脊部皮下注射 100 μl PDDV (含 10 μg DNA 和 28 μg 肽), 对照组注射等量的空质粒 DNA 和 [K]<sub>18</sub> 肽或 PBS。末次免疫后 7 d, 脱颈处死, 制备脾细胞悬液, 经日本血吸虫成虫抗原(SWA)刺激后根据 <sup>3</sup>H 标记的胸腺嘧啶核苷 (<sup>3</sup>H-TdR)检测脾细胞增殖反应, ELISA 法检测脾细胞培养上清中 γ 干扰素 (IFN-γ) 和白细胞介素-4 (IL-4) 的含量。ELISA 结果显示, T 组小鼠脾细胞中 IFN-γ 的含量 [(76.0±11.2) pg/ml], 高于 PBS [(13.0±2.1) pg/ml] 和 18K 对照组 [(14.0±3.2) pg/ml] ( $P<0.01$ ), T 组和 C-T-B 组小鼠脾细胞中 IL-4 的水平分别为 (152.0±21.1) 和 (86.0±12.2) pg/ml, 高于其他组 ( $P<0.01$  或  $P<0.05$ )。T 组小鼠脾细胞经 SWA 刺激后, 增殖反应明显高于 PBS 和 18K 对照组 ( $P<0.01$ ); 而 C-T-B 组小鼠脾细胞的增殖反应与 PBS 和 18K 对照组相比, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。说明 T-PDDV 和 C-T-B 混合 PDDV 诱导的免疫应答强于单价的 C-PDDV 和 B-PDDV。

**【关键词】** 日本血吸虫; 颗粒性肽-DNA 混合疫苗; 小鼠; 免疫应答

中图分类号: R383.24 文献标识码: B

## Effect of Epitope-based Peptide-DNA Dual Vaccines against *Schistosoma japonicum* in Mice

WANG Xue-feng<sup>1\*</sup>, ZHANG Rong-bo<sup>1</sup>, HU You-ying<sup>1</sup>, DU Jiu-wei<sup>1</sup>,  
CHEN Xiao-jun<sup>2</sup>, XU Zhi-peng<sup>2</sup>, SU Chuan<sup>2</sup>

(1 Department of Pathogen Biology and Immunology, School of Medicine, Anhui University of Science and Technology, Huainan 232001, China; 2 Department of Pathogen Biology and Immunology, Jiangsu Key Laboratory of Pathogen Biology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

**【Abstract】** A C-T-B PDDV mixture of the three constructed epitope-based peptide-DNA dual vaccines (PDDV) containing the CTL (C), Th (T) and B-cell (B) epitopes from Sj22.6 tegument (C-PDDV, T-PDDV and B-PDDV) with a 1:1:1 ratio was prepared. Thirty-six mice were randomly divided into six groups averagely named as 18K group, PBS group, C-PDDV group, T-PDDV group, B-PDDV group, and C-T-B PDDV group. All the mice received three immunizations at 2-week intervals with the same dose of antigen (10 μg DNA+28 μg peptide). One week after the last immunization, the mice were sacrificed, the spleens were removed and splenocytes were collected. Splenocyte proliferation was assayed by [<sup>3</sup>H] TdR incorporation after stimulation with soluble worm antigen (SWA). Levels of IFN-γ and IL-4 in the splenocyte culture supernatants were determined by ELISA. The results showed that IFN-γ content in T-PDDV group [(76.0±11.2) pg/ml] was higher than that of PBS [(13.0±2.1) pg/ml] and 18K control groups [(14.0±3.2) pg/ml] ( $P<0.01$ ). IL-4 level in T-PDDV [(152.0±21.1) pg/ml] and C-T-B mixture groups [(86.0±12.2) pg/ml] was higher than others ( $P<0.01$  and  $P<0.05$ ). The splenocytes from T-PDDV group showed a significant increase in proliferation compared with PBS and 18K control groups after stimulation by SWA ( $P<0.01$ ). However, there was no significant difference in splenocyte proliferation among C-T-B, PBS and 18K control groups ( $P>0.05$ ). These findings indicate that T-PDDV and C-T-B PDDV mixture induces stronger immune response than that of C-PDDV or B-PDDV.

**【Key words】** *Schistosoma japonicum*; Peptide-DNA dual vaccine; Mouse; Immune response

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30801046) and a Fund for Master and Doctor of Anhui University of Science and Technology (No. 2010YB004)

\* Corresponding author, E-mail: wangxxff1023@yahoo.com.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30801046); 安徽理工大学硕博基金资助项目 (No. 2010YB004)

作者单位: 1 安徽理工大学医学院病原生物学教研室, 淮南 232001; 2 南京医科大学病原生物学系, 江苏省病原生物学重点实验室, 南京 210029

\* 通讯作者, E-mail: wangxxff1023@yahoo.com.cn

血吸虫病是严重危害人类健康的寄生虫病之一，流行于 76 个国家和地区，目前估计有 2.07 亿人感染<sup>[1]</sup>。血吸虫病疫苗被认为是控制血吸虫病的主要手段，本室已成功构建了含有日本血吸虫相对分子质量( $M_r$ )22 600 表膜抗原(Sj22.6) CTL、Th 和 B 细胞表位的多聚赖氨酸序列抗原肽，通过多聚赖氨酸的正电荷与带有负电荷的相应表位核酸序列的质粒结合，形成直径数十纳米相应表位肽-DNA 的颗粒性疫苗 (peptide-DNA dual vaccine, PDDV)，分别命名为 C-PDDV<sup>[2]</sup>、T-PDDV<sup>[3]</sup>和 B-PDDV<sup>[2]</sup>，并将以上 3 种 PDDV 等量混合构成 C-T-B 混合 PDDV<sup>[2]</sup>，在小鼠实验中，除 T-PDDV 能诱导部分免疫保护作用外，C-PDDV 和 B-PDDV 均未诱导出相应的保护力。为进一步阐明其作用机制，本文用上述单价 C-PDDV、T-PDDV 和 B-PDDV 以及 C-T-B 混合 PDDV 免疫 C57BL/6 小鼠，体外经日本血吸虫成虫抗原(SWA) 刺激后，检测小鼠脾细胞的增殖反应及培养上清中  $\gamma$  干扰素(IFN- $\gamma$ )和白细胞介素-4(IL-4)的含量，为阐明疫苗的抗感染机制提供实验依据。

## 1 材料与与方法

1.1 质粒和菌株 感受态菌株 DH5 $\alpha$  为本室保存，表达载体 PUMVC1-mGM-CSF 质粒由第三军医大学免疫学系吴玉章教授惠赠。C-PDDV、T-PDDV 和 B-PDDV 由本室构建保存。

1.2 实验动物和主要试剂 雌性 6~8 周龄 C57BL/6 小鼠(SPF 级)购自中国科学院上海实验动物中心。无内毒素的质粒抽提试剂盒 (Endofree plasmid maxi kits) 购自德国 Qiagen 公司。RPMI 1640 和胎牛血清(FCS)购自美国 Gibco 公司。青链霉素和 Hank's 平衡盐溶液购自美国 Hyclone 公司。小鼠 IL-4 和 IFN- $\gamma$  细胞因子检测试剂盒购自美国 eBioscience 公司。

1.3 PDDV 的制备和质量鉴定 按文献[2-4]的方法制备阳离子肽-DNA 混合物，将 100  $\mu$ l 不同浓度的阳离子肽溶液(溶于 0.15 mol/L NaCl 中)逐滴加入 100  $\mu$ l 含 200  $\mu$ g/ml DNA 水溶液中，滴定速度为 5  $\mu$ l/min，等电性中和阳离子肽-DNA 混合物。滴定完毕后制备产物继续混旋 30 min，静置 30 min。制备好的 PDDV 经沉淀试验、电泳阻滞试验、人脱氧核糖核酸酶 I (DNase I) 保护性试验和电镜观察鉴定制备质量。

1.4 动物分组 将 36 只 C57BL/6 小鼠随机均分为 6 组，即 18K 对照组 ([K]<sub>18</sub>空质粒 PDDV)、PBS 对照组、C 组(C-PDDV)、T 组(T-PDDV)、B 组(B-PDDV)和 C-T-B 组(C-PDDV、T-PDDV 和 B-PDDV 等量混合)，每鼠分别在第 0、3 和 6 周麻醉下经尾脊部皮下注射 100  $\mu$ l PDDV (含 10  $\mu$ g DNA 和 28  $\mu$ g 肽)，C-T-B 多价表位是分别将 33.3  $\mu$ l C-PDDV、T-PDDV、B-PDDV 按 1:1:1 的比例混合后注射，对照组注射等量的空质粒和 [K]<sub>18</sub> 肽或 PBS。

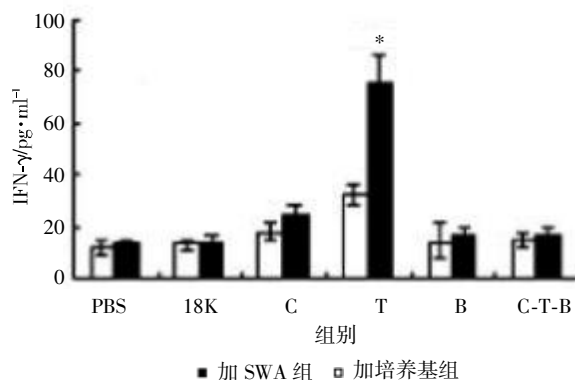
1.5 脾细胞增殖反应和细胞因子检测 末次免疫后 7 d，将所有小鼠脱颈处死，无菌取脾，制备脾细胞悬液，用含 10%胎牛血清 (FCS)的完全 RPMI 1640 培养液调整细胞浓度为 2.5 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml，加入 50  $\mu$ g/ml SWA 刺激后，于 37  $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 72 h，培养结束前 12~16 h 加 <sup>3</sup>H 标记的胸腺嘧啶核苷 (<sup>3</sup>H-TdR) 0.5  $\mu$ Ci/孔，用液闪计数器测定每分钟放射性活性 (cpm)值。同时，将刺激培养 72 h 的小鼠脾细胞 800 $\times$ g 离心 10 min 后，收

集细胞培养上清，ELISA 法检测上清中 IFN- $\gamma$  和 IL-4 的含量，均设加等量培养基的对照组。

1.6 统计学分析 应用 SPSS11.0 软件进行统计学分析。两组均数之间的比较采用 *t* 检验。

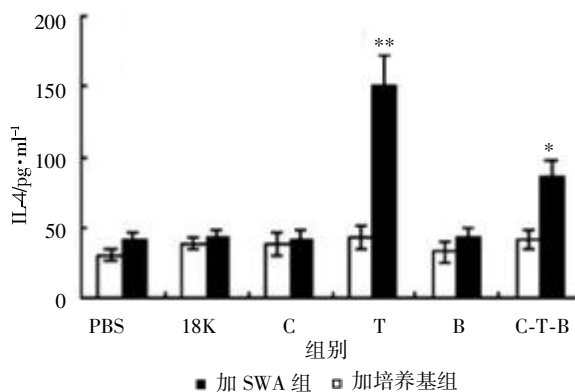
## 2 结果

2.1 细胞因子检测 脾细胞经 SWA 刺激后，C 组、T 组、B 组和 C-T-B 组小鼠脾细胞上清中 IFN- $\gamma$  含量分别为 (24.0 $\pm$ 4.5)、(76.0 $\pm$ 11.2)、(17.0 $\pm$ 3.1)和(16.0 $\pm$ 2.9) pg/ml，T 组诱导产生的 IFN- $\gamma$  水平高于 PBS 组 [(13.0 $\pm$ 2.1) pg/ml] 和 18K 组 [(14.0 $\pm$ 3.2) pg/ml] ( $P$ <0.01)(图 1)。C 组、T 组、B 组和 C-T-B 组小鼠脾细胞上清中 IL-4 水平分别为(41.0 $\pm$ 7.1)、(152.0 $\pm$ 21.1)、(42.0 $\pm$ 8.2)和(86.0 $\pm$ 12.2) pg/ml，T 组和 C-T-B 组产生的 IL-4 水平高于 PBS 组 [(41.2 $\pm$ 5.1) pg/ml] ( $P$ <0.01) 和 18K 组 [(42.0 $\pm$ 6.3) pg/ml] ( $P$ <0.05)(图 2)。而各免疫组小鼠脾细胞未经 SWA 刺激组 IFN- $\gamma$  和 IL-4 的含量均较低。



注：与对照组相比，\*  $P$ <0.01。

图 1 各组小鼠脾细胞分泌 IFN- $\gamma$  含量



注：与对照组相比，\*  $P$ <0.05，\*\*  $P$ <0.01。

图 2 各组小鼠脾细胞分泌 IL-4 含量

## 2.2 淋巴细胞增殖试验

脾细胞经 SWA 刺激后，C 组、T 组、B 组和 C-T-B 组的 cpm 值分别为 (2 240.0 $\pm$ 453.6)、(8 760.0 $\pm$ 724.3)、(2 870.0 $\pm$ 530.5) 和 (3 160.5 $\pm$ 694.1)，T 组脾细胞增殖反应较强，与 PBS 组(2 100.0 $\pm$ 395.0)和 18K 组(2 340.0 $\pm$ 353.8)相比，差异有统计学意义( $P$ <0.01)，C-T-B 组脾细胞增殖反应与 PBS 组及 18K 组