

细粒棘球绦虫铜锌超氧化物歧化酶基因的表达与特征分析

宋星桔¹, 胡丹丹¹, 钟秀琴¹, 阳爱国², 郭莉², 毛光琼², 王凝¹,
闫敏¹, 汪涛¹, 古小彬¹, 杨光友^{1*}

(1. 四川农业大学动物医学院, 成都 611130; 2. 四川省动物疫病预防控制中心, 成都 610041)

摘要: 旨在探讨 Eg-SOD 基因的特征及其在细粒棘球绦虫上的抗氧化作用。通过原核表达得到重组 Eg-SOD, 对其进行酶活性测定、免疫印迹、ELISA 以及免疫荧光定位分析。经原核表达出的重组 Eg-SOD 蛋白为可溶性蛋白, 以羟胺法测定其酶学活性, 可达 $(464.55 \pm 19.99) \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。免疫印迹结果显示, 该蛋白质能够被实验室人工感染细粒棘球绦虫的小鼠阳性血清所识别, 具有较强的反应原性; ELISA 分析显示, 重组 Eg-SOD 对人工感染细粒棘球绦虫的小鼠血清和自然感染包虫病的绵羊血清检出率均为 100%, 而对细颈囊尾蚴的交叉反应为 37.5%, 提示该蛋白质可以作为潜在的诊断候选分子。免疫荧光定位显示该蛋白质广泛分布于成虫和原头蚴的组织间隙, 以及少量分布于表皮。本研究对 Eg-SOD 的特点进行了初步的探讨, 并揭示该蛋白质与虫体的抗氧化损伤有着密切的联系。

关键词: 细粒棘球绦虫; 铜锌超氧化物歧化酶; 荧光定位

中图分类号: S852.734

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)02-0346-08

Prokaryotic Expression and Characterization of Cu/Zn Superoxide Dismutase of *Echinococcus granulosus*

SONG Xing-ju¹, HU Dan-dan¹, ZHONG Xiu-qin¹, YANG Ai-guo², GUO Li², MAO Guang-qiong²,
WANG Ning¹, YAN Min¹, WANG Tao¹, GU Xiao-bin¹, YANG Guang-you^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

2. Sichuan Centers for Animal Disease Control and Preventive, Chengdu 610041, China)

Abstract: The aim of this study was to characterise the Cu/Zn superoxide dismutase of *Echinococcus granulosus* (Eg-SOD), and analyze its role in the parasite antioxidant system. The recombinant Eg-SOD was expressed in *E. coli*, and the enzymatic activity was measured, and analyses including western blotting, ELISA and immunofluorescence localization were also performed. The recombinant Eg-SOD was expressed as soluble protein, and its activity was up to $(464.55 \pm 19.99) \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ measured by hydroxylamine method. As showed by the result of western blot, the recombinant Eg-SOD could be recognized by the serum of mice secondary experimentally infected with *E. granulosus* protoscolexes, and showed a high immunogenicity; ELISA tests showed that recombinant Eg-SOD could recognize all the sera from mice experimentally infected with protoscolexes and from sheep naturally infected with *E. granulosus*, and have 37.5% cross-reactions with sera from sheep infected with *Cysticercus tenuicollis*, which indicates Eg-SOD might be a potential diagnose antigen. The immunolocalization of Eg-SOD showed a wide extent of distribution, mostly in the tissue clearance of adult worms and protoscolexes, and fewer on the tegument.

收稿日期: 2015-06-03

基金项目: 四川省科技支撑计划项目(2015NZ0041)

作者简介: 宋星桔(1991-), 女, 四川资阳人, 硕士, 主要从事动物寄生虫病学研究, E-mail: 18728153735@163.com

* 通信作者: 杨光友, 教授, 博导, 从事动物寄生虫病学研究, E-mail: guangyou1963@aliyun.com

These results provide the fundamental understanding of Eg-SOD, and revealed its capable of antioxidant effect.

Key words: *Echinococcus granulosus*; Cu/Zn superoxide dismutase; immunolocalization

细粒棘球绦虫(*Echinococcus granulosus*)的中绦期幼虫(细粒棘球蚴)寄生于人和动物的肝和肺等器官内,引起人和动物的细粒棘球蚴病(又称为囊型包虫病)。在中国,有 25 个省、市、自治区有包虫病病例的报道,其中以西部牧区发病最为严重^[1-2]。该病给我国畜牧业造成了严重的经济损失,同时也为人类带来了诸多公共卫生安全问题。

细粒棘球绦虫寄生于犬科动物的小肠内,而其幼虫(细粒棘球蚴)则寄生于人和动物的多种组织器官内(主要为肝或肺)导致发生细粒棘球蚴病^[3-4]。细粒棘球蚴包囊能够长期地寄生在宿主器官中,最长可达几十年。在寄生期间,宿主可以通过多种机制释放出大量的自由基,如氧自由基(reactive oxygen species, ROS)、氮自由基以及羟自由基等^[5-7],这些自由基可以作为宿主抵御外来病原体感染的一道屏障,具有杀伤病原体的作用^[8]。而对于寄生虫来说,想要在宿主中维持寄生状态,必须具有能够克服这些自由基杀伤作用的体系。在长期的进化过程中,寄生虫获得了可以中和 ROS 氧化作用的抗氧化(antioxygenation)防御系统,这其中最重要的就是超氧化物歧化酶^[9-10]。它能催化超氧离子(O_2^-)歧化为分子氧(O_2)和过氧化氢(H_2O_2),后者再被其他酶类降解为氧和水,从而抵抗来自宿主的杀灭作用。

目前已有多种寄生虫的 Cu/Zn SOD 已被深入研究。研究者以曼氏血吸虫(*Schistosoma mansoni*) Cu/Zn SOD DNA 疫苗免疫小鼠,发现该疫苗对曼氏血吸虫感染有显著的抵抗作用^[11]。此外,在大片吸虫(*Fasciola gigantica*)、猪带绦虫(*Taenia solium*)和盘尾丝虫(*Onchocerca volvulus*)等虫种的研究表明,Cu/Zn SOD 具有较强的免疫原性^[12-15]。在 Cu/Zn SOD 酶活性的研究上,发现多种抗寄生虫药物,如苯并咪唑类药物,能够对其产生特异性的抑制作用,而不伤害宿主 Cu/Zn SOD 的活性^[16-17]。然而,在细粒棘球绦虫上,对 Cu/Zn SOD 的研究还非常有限^[18]。因此,本研究拟对细粒棘球绦虫 Cu/Zn SOD(Eg-SOD)的抗氧化作用,免疫原性以及它在各时期虫体中的分布情况进行研究,期望通过了解 Eg-SOD 的这些基本特征,为该蛋白质的进一步深

入研究奠定基础,并为包虫病的防控提供基础参考资料。

1 材料与方法

1.1 虫体

细粒棘球蚴包囊采自青海省西宁市屠宰场的绵羊肝或肺,在实验室无菌条件下进行手术分离。用一次性注射器对囊液进行反复抽送后吸出囊液,并分离生发层。囊液经 $3\ 000\ r \cdot \min^{-1}$ 离心 5 min,取沉淀用灭菌生理盐水洗涤 3 次即得细粒棘球蚴原头蚴。

为了获取细粒棘球绦虫成虫,对两只来自非棘球蚴病疫区的犬(约 5 月龄,雌性)提前 1 周投喂吡喹酮(praziquantel)和阿苯达唑(albendazole)。在四川农业大学生物安全二级实验室条件下,分别将约 20 000 个原头蚴饲喂犬,35 d 后剖杀犬只,取其小肠部分,置于 37 °C 温热的生理盐水中,并用木片轻轻刮取其黏膜表面,自然沉降得到残渣,用放大镜从中挑取成虫。

1.2 血清

对 12 只 6~8 周龄雌性 ICR 小鼠进行腹腔接种,每只接种 200 μL 含有约 2 000 个原头蚴的 PBS 混悬液(含 100 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素和 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素)。9 个月,对小鼠进行断尾采血,并剖杀小鼠,在其腹腔中发现了棘球蚴包囊的小鼠血清视为阳性血清;阴性血清为未接种原头蚴的小鼠血清。14 份自然感染细粒棘球蚴的绵羊血清以及健康绵羊血清采自新疆某屠宰场;8 份感染细颈囊尾蚴的绵羊血清来自四川某屠宰场。

1.3 生物信息学分析

从细粒棘球绦虫基因组数据库中下载得到细粒棘球绦虫 Eg-SOD 基因全序列,以 DNASTar 软件推测其对应的氨基酸序列。以在线软件 SignalP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、Transmembrane Prediction server(<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>)和 TargetP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)分别对其信号肽、跨膜区以及亚细胞定位进行分析。以推导出的氨基酸序列找出同源基因,并以 Clustal W2 在线软件(ht-

tp://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)对氨基酸序列进行比对分析。以 DNAMAN 比较同源基因之间的相似性。最后用 MEGA 5.05 软件以邻接法构进行系统进化分析,并构建进化树。

1.4 Eg-SOD 的表达、纯化与酶活性测定

取约 2 000 个原头蚴,以动物组织总 RNA 提取试剂盒(Tiagen,China)提取总 RNA,并以反转录试剂盒(Invitrogen,Carlsbad,CA,USA)将其反转录为 cDNA。设计一对特异性的 PCR 引物(上游:5'-CGGGGTACCATGAAGGCTGTCTGTGTTA-TGC-3',下划线为 *Kpn* I 酶切位点;下游:5'-CCG-CTCGAGGCTTTTAGCGATTCCGATGA-3',下划线为 *Xho* I 酶切位点),从 cDNA 中扩增出 Eg-SOD 基因全长 CDs 区域。经 TA 克隆后,将扩增产物以酶切链接的方式导入 pET32a 载体中;经测序验证连接正确后,将质粒转入大肠杆菌 BL21 中,以 IPTG 诱导重组蛋白质的表达。超声裂解重组菌后,取裂解产物上清,以 Ni^{2+} 亲和层析的方法进行纯化。按超氧化物歧化酶分型测试试剂盒(羟胺法)(南京建成生物工程研究所)的操作步骤对重组 Eg-SOD 蛋白的酶活性进行测定。

1.5 重组蛋白质多克隆抗体的制备

以重组蛋白质对 2 只约 15 周龄的雄性新西兰大白兔进行 3 次皮下免疫,每次免疫间隔 2 周。首次免疫为 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 重组蛋白质与等体积弗氏完全佐剂混合,加强免疫为 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 重组蛋白质与等体积弗氏不完全佐剂混合。免疫结束后第 2 周,对大白兔进行采血,并分离血清。将分离后的血清在 Protein A 亲和层析柱(Bio-Rad,USA)中进行纯化,得到血清中的多克隆抗体。对照组大白兔即把重组蛋白质替换为等体积的 PBS,抗体制备过程与试验组相同。

1.6 免疫印迹

将重组蛋白质和原头蚴裂解液分别进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,再将凝胶分别转移到硝酸纤维素膜上。经 5% 脱脂牛奶封闭后,分别以绵羊和小鼠棘球蚴阳性、阴性血清(均为 1:200 稀释)对重组蛋白质进行孵育;以重组蛋白质高免血清和对照血清(均为 1:1 000 稀释)对原头蚴裂解液进行孵育。经洗涤后,以 HRP 标记的山羊抗小鼠或兔抗绵羊二抗对重组蛋白质进行孵育;再以 HRP 标记的山羊抗兔二抗对原头蚴裂解产物进行孵育。最后在显色底物作用下进行显色观察。

1.7 ELISA

向 96 孔板中加入 $100 \mu\text{L}$ 含有 $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 重组蛋白质的包被液($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸钠溶液 pH 9.6), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 包被过夜。经 5% 脱脂牛奶包被后,向孔中分别加入 12 份小鼠棘球蚴阳性血清和阴性血清(1:200 稀释)进行孵育;然后加入 HRP 标记的山羊抗小鼠二抗进行孵育;洗涤后以可溶性 TMB 显色底物进行显色,并以 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$ 终止显色。在酶标仪紫外波长 450 nm 处测定吸光度值。以相同的抗原和血清反应浓度分别对 14 份细粒棘球蚴绵羊阳性和阴性血清以及 8 份细颈囊尾蚴绵羊血清进行孵育,再以 HRP 标记的兔抗绵羊二抗孵育,并进行显色,测定 OD 值。

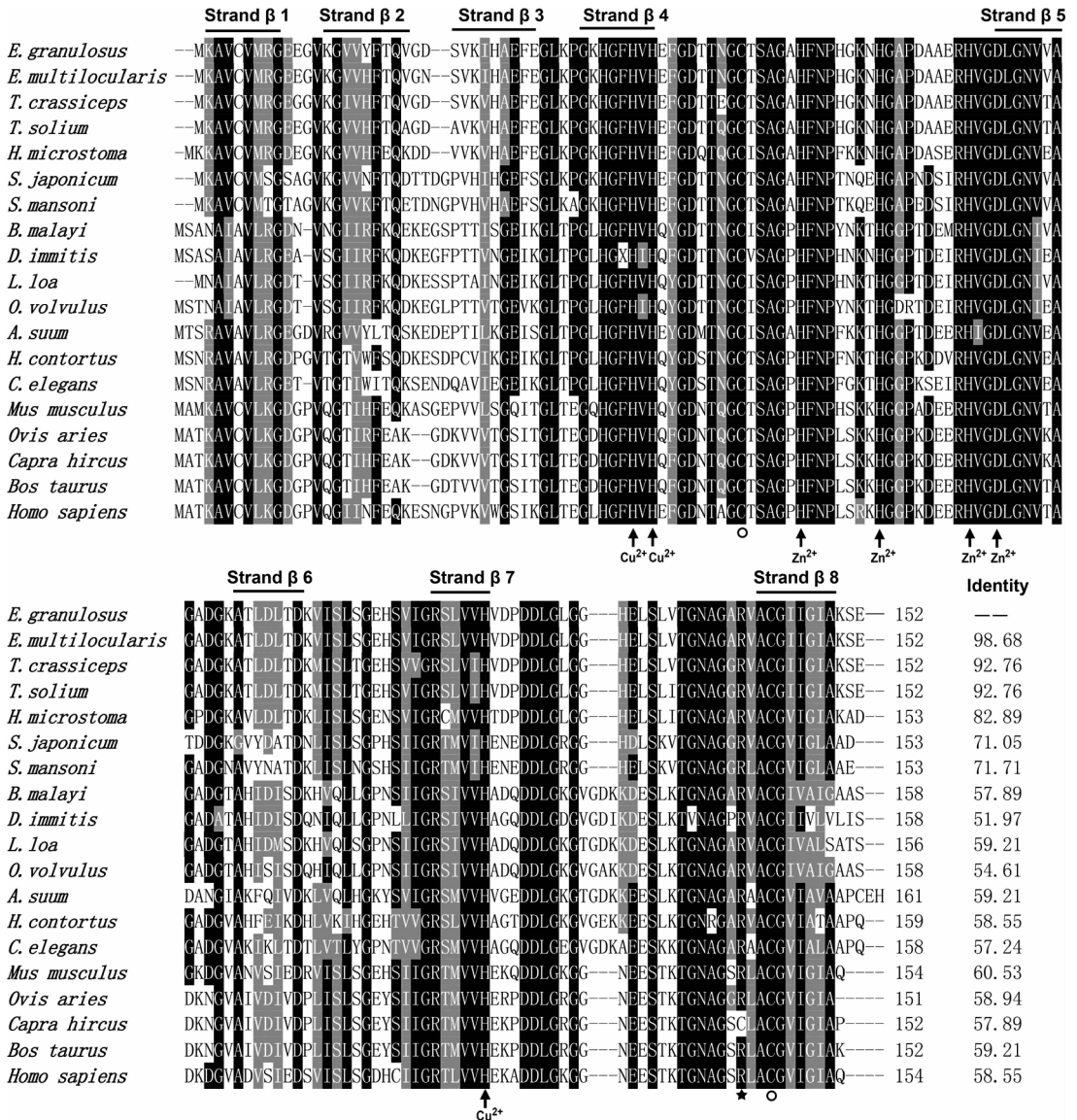
1.8 免疫荧光定位

取新鲜虫体样品(包括原头蚴、生发层和成虫)于 4% 多聚甲醛溶液中固定 36 h;样本经一系列的脱水、透明处理后包埋入石蜡内,并以切片机切片备用。经脱蜡和水化处理,将切片用 3% H_2O_2 处理 10 min,然后置于约 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 的 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 枸橼酸缓冲液中 5~10 min,进行热修复抗原;经洗涤后,分别以多克隆抗体和健康兔 IgG 对切片进行 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜;随后,反复洗涤切片,以 FITC 标记的山羊抗兔荧光二抗(Bethyl Laboratories)对虫体进行显色,并在荧光显微镜下进行观察。

2 结果

2.1 Eg-SOD 基因的生物信息学分析

细粒棘球蚴基因组中 Cu/Zn SOD 基因全长 2 356 bp,含两个较长的内含子和三个外显子,与其他带科绦虫或蠕虫的基因结构相似。该基因 CDs 序列含 459 个碱基,编码 152 个氨基酸,与其他物种 SOD 氨基酸序列之间的保守性较高,与带科绦虫之间的相似性达到 92.76%~98.68%,与其寄生物主(哺乳动物)之间的相似性为 57.89%~59.21%(图 1)。经氨基酸序列预测,SOD 蛋白没有信号肽和跨膜区,其相对分子质量约为 15.6 ku,等电点为 5.95,分布于细胞周质之中。Eg-SOD 二级结构具有典型的 Cu/Zn SOD 酶活性区域,八个折叠区以及两个二硫键形成位点可供形成二聚体。基于动物界 Cu/Zn SOD 基因氨基酸序列的进化分析显示,所有序列主要归为四大分支,即蠕虫分支、昆虫分支、线虫分支以及脊椎动物分支,Eg-SOD 归为蠕虫分支(图 2)。



箭头所示为铜离子或锌离子结合位点; 圆圈为半胱氨酸残基二硫键位点; 星号为精氨酸残基超氧阴离子结合位点; 八个 β 片层结构标注于序列上方

The putative amino acid residues required for coordinating copper and zinc are marked by arrows; circles indicate the cysteine residues which form a disulfide bond; the Arg residue that is necessary to guide the superoxide anion to the active site is labeled by star; the regions of eight β strands are shown above the alignment. GenBank accession numbers; *E. granulosus* EUB63129. 1; *E. multilocularis* CDJ01649. 1; *T. crassiceps* AEL75048. 1; *T. solium* AEL75047. 1; *H. microstoma* CDS31342. 1; *S. japonicum* CAX71093. 1; *S. mansoni* AAA29936. 1; *B. malayi* AAR06638. 1; *D. immitis* AAB61472. 1; *L. loa* EFO15395. 1; *O. volvulus* P24706. 1; *A. suum* ADY46004. 1; *H. contortus* Q27666. 1; *C. elegans* NP_001021957. 1; *Mus musculus* NP_035564. 1; *Ovis aries* NP_001138657. 1; *Capra hircus* NP_001272479. 1; *Bos taurus* NP_777040. 1; *Homo sapiens* NP_000445. 1

图 1 Cu/Zn SOD 序列比对分析

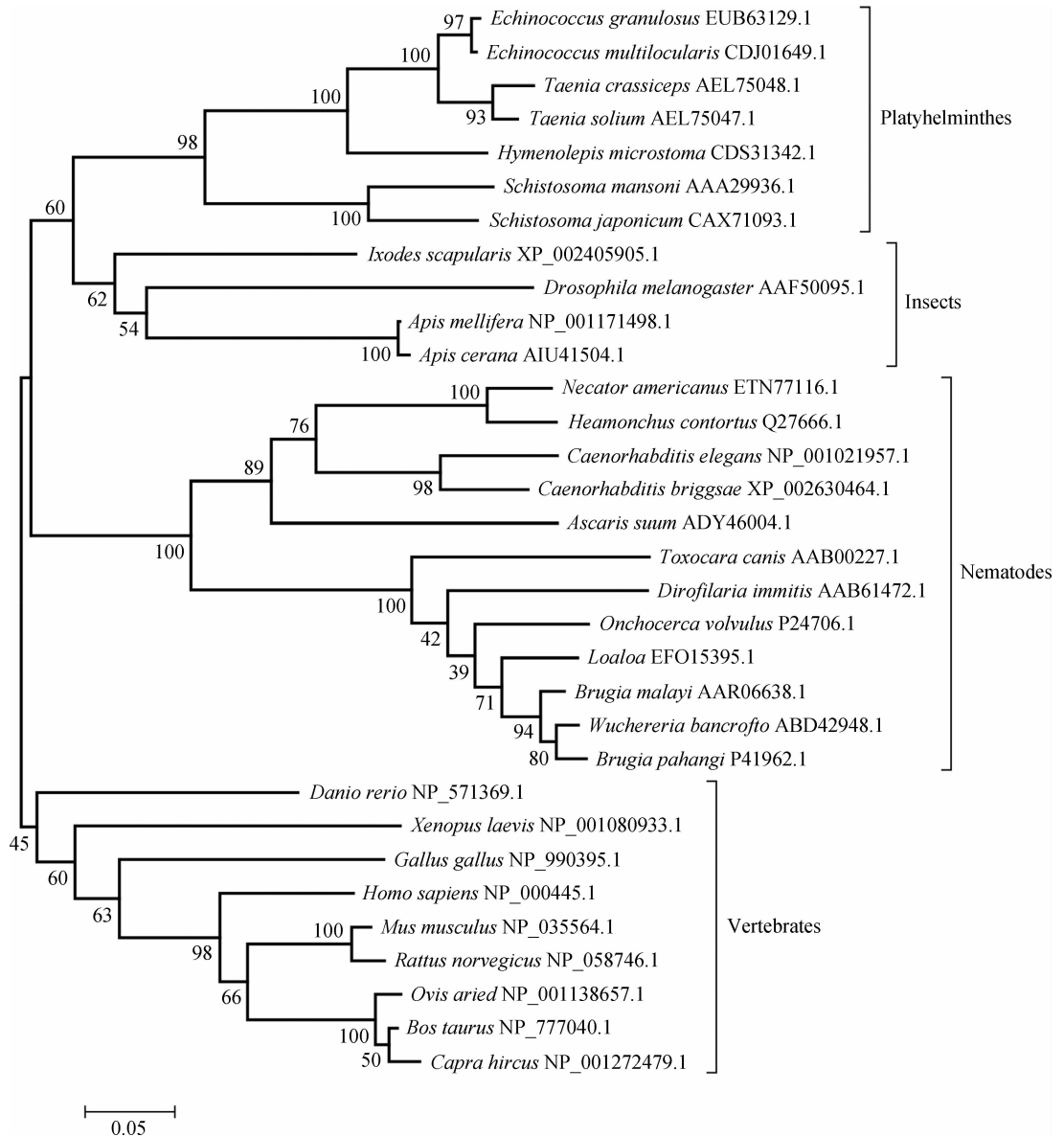
Fig. 1 Sequence alignment of Cu/Zn SOD

2.2 重组 Eg-SOD 的表达及其识别

经凝胶电泳显示, 由特异性引物 PCR 扩增的产物为一条 459 bp 左右的条带, 与基因组数据中的 Eg-SOD 基因大小一致。经测序得到的序列与基因组中的序列相似性达到 100%, 即表明该片段为 Eg-

SOD 基因 CDs 全序列。

经亲和层析后的重组蛋白质在 SDS-PAGE 下显示为单一条带, 大小约为 35 ku, 符合预期大小 (加上 pET32a 载体上的 Trx 标签约 20 ku)。通过与小鼠和绵羊棘球蚴阳性血清进行免疫印迹反应,



物种名称后为该序列的 GenBank 登录号

GenBank accessing numbers were given after the species name

图 2 以 Cu/Zn SOD 氨基酸序列构建的系统进化树 (NJ 树)

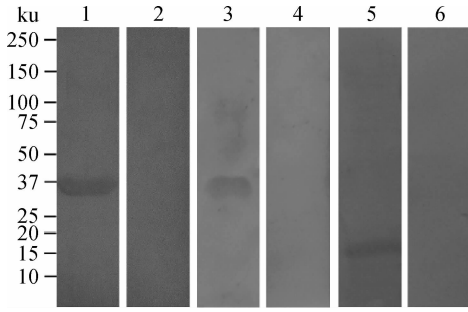
Fig. 2 The phylogenetic (neighbor-joining) tree based on the amino acid sequences of Cu/Zn SOD

发现重组 Eg-SOD 能够被阳性血清特异性的识别 (图 3), 说明 Eg-SOD 具有较好的反应原性。以羟胺法针对 Cu/Zn SOD 酶活性进行测试, 显示 rEg-SOD 具有较强的酶活性, 经 NaN_3 处理后活性依然不减, 达到 $(464.55 \pm 19.99) \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ (表 1), 说明 rEg-SOD 不是 Mn SOD 而是 Cu/Zn SOD。

2.3 ELISA

分别用人工感染细粒棘球蚴的小鼠血清、细粒棘球蚴以及细颈囊尾蚴绵羊血清作 ELISA 分析, 对 rEg-SOD 的诊断价值进行初步评估。经优化抗原

抗体稀释倍数得知, 抗原和血清的稀释倍数均为 1 : 200 时 ELISA 反应效果最佳。12 份小鼠阳性血清的 $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 值为 1.300~2.075 (平均为 1.615), 远远大于阈值 (小鼠阴性 $\bar{x} + 3s = 0.622$), 即阳性检出率为 100% (图 4); 14 份细粒棘球蚴绵羊血清的 OD 值为 0.512~0.910 (平均为 0.642), 大于阈值 (绵羊阴性 $\bar{x} + 3s = 0.104$), 即阳性检出率为 100%; 而对 8 份细颈囊尾蚴绵羊血清的 OD 值为 0.079~0.399 (平均为 0.163), 其中有 3 份大于阈值, 即交叉反应率为 37.5%。

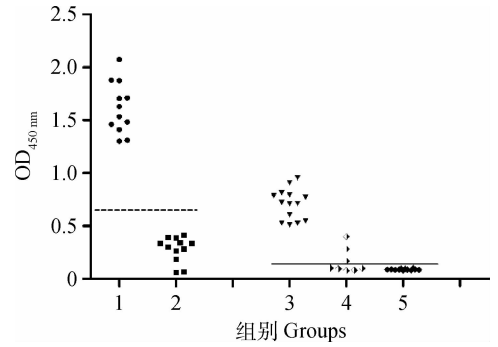


1. 重组 Eg-SOD 与实验室感染细粒棘球绦的小鼠血清孵育;2. 重组 Eg-SOD 与健康小鼠血清孵育;3. 重组 Eg-SOD 与自然感染细粒棘球绦的绵羊血清孵育;4. 重组 Eg-SOD 与健康绵羊血清孵育;5. 原头蚴裂解液与兔重组 Eg-SOD 高免血清孵育;6. 原头蚴裂解液与对照兔血清孵育

1. Recombinant Eg-SOD incubated with serum of mice experimentally infected with *E. granulosus* protoscolices;2. Recombinant Eg-SOD incubated with serum of healthy mice;3. Recombinant Eg-SOD incubated with serum of sheep naturally infected with *E. granulosus*;4. Recombinant Eg-SOD incubated with serum of healthy sheep;5. Lysate of protoscolices incubated with rabbit anti-rEg-SOD serum;6. Lysate of protoscolices incubated with naive rabbit serum

图 3 重组 Eg-SOD 与虫体 Eg-SOD 的免疫印迹分析

Fig. 3 Western blot analysis of the recombinant and native Eg-SOD



1. 实验室人工感染细粒棘球绦的小鼠血清;2. 健康小鼠血清;3. 自然感染细粒棘球绦的绵羊血清;4. 自然感染细粒棘球绦的绵羊血清;5. 健康绵羊血清。虚线和实线分别代表健康小鼠和绵羊阴性血清的平均 OD 值 $\bar{x} + 3s$

图 4 rEg-SOD 蛋白的 ELISA 分析

Fig. 4 Enzyme-linked immunosorbent assay of rEg-SOD

表 1 重组 Eg-SOD 酶活性的测定

Table 1 Enzyme activity analysis of recombinant Eg-SOD

组别 Group	OD _{550 nm} 试验组 Treatment group	OD _{550 nm} 对照组 Control group	反应稀释倍数 Dilution ratio	蛋白质质量浓度/(mg · mL ⁻¹) Protein concentration	比活力/(U · mg ⁻¹) Specific activity
1	0.284	0.707	1 101	2.714 4	485.36
2	0.290	0.713	1 101	2.714 4	481.28
3	0.301	0.686	1 101	2.714 4	455.28
4	0.269	0.582	1 101	2.714 4	436.28
平均值 Average					464.55 ± 19.99

酶活力计算公式:酶活力(U · mg⁻¹)=(对照组 OD 值-试验组 OD 值)÷对照组 OD 值÷50%×反应稀释倍数÷蛋白质浓度
Computational formula:Enzyme activity (U · mg⁻¹)=[OD value (Con)-OD value (Exp)]÷OD value (Con)÷50%×Dilution ratio÷Protein concentration

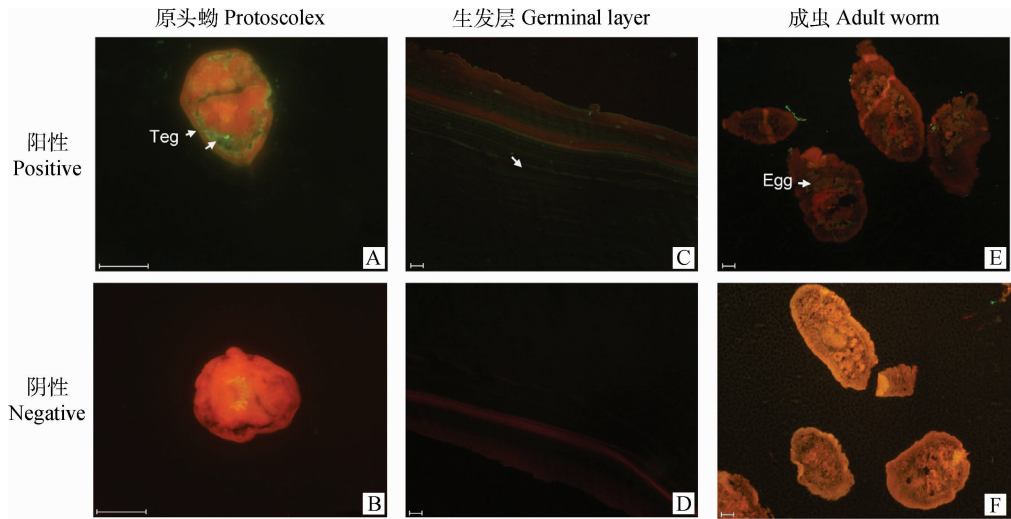
2.4 Eg-SOD 在细粒棘球绦虫各生活史阶段的定位

免疫荧光定位所用多克隆血清经 Western blot 验证,能够特异性的识别虫体中的 Eg-SOD 蛋白(图 3),故可以用作下一步试验。经荧光免疫定位试验显示,Eg-SOD 大量且广泛地存在于虫体的各个生活时期,在原头蚴皮层下部、整个生发层和虫卵卵壳外层有大量表达;在原头蚴皮层外部、成虫皮层外部有少量表达(图 5)。

3 讨论

铜锌超氧化物歧化酶作为超氧自由基清除剂,广泛地分布于各种生物器官之中,清除细胞内的氧

自由基,避免其形成对机体有毒害作用的氧自由基(如过氧化氢,次氯酸盐以及过氧亚硝酸盐等),从而保护机体细胞^[19]。正常情况下,在机体有氧代谢过程中即会产生少量的 ROS,它们会被自身的 SOD 酶及时地还原。在微生物感染过程中,宿主往往通过中性粒细胞、嗜酸性粒细胞或者嗜碱性粒细胞等通过 NADPH 氧化酶等产生氧自由基来对病原微生物进行杀伤^[20]。在寄生虫的寄生过程中,它们能够成功地逃避宿主免疫系统的杀伤,有一部分原因就是因为他们自身具有发达的抗氧化酶系统(如:SOD、谷胱甘肽转移酶、谷胱甘肽还原酶、硫氧还原蛋白等)^[9]。在此体系中 SOD 具有重要的作用,它



A、C、E为阳性,与 rEg-SOD 特异性 IgG 孵育;B、D、F为阴性对照。箭头所示为阳性区域;Teg, 皮层;Egg, 虫卵;标尺=50 μm

EG-SOD on the protoscolex (A,B), geminal layer (C,D) and adult worm (E,F) were immunofluorescently labelled with specific anti-rEG-SOD IgG (A,C and E), and control (B,D and F). Fluorescence-labeled regions were marked with arrows. Teg, Tegument; Bar=50 μm

图5 Eg-SOD蛋白在各时期虫体上的免疫荧光定位

Fig. 5 Immunolocalization of Eg-SOD on the larval and adult stages of *E. granulosus*

能将超氧自由基歧化为水和过氧化氢,后者在过氧化氢酶等的作用下进一步分解为对机体无害的水,从而化解氧化压力。

在本研究中,作者对细粒棘球绦虫的 Cu/Zn SOD 基因结构和蛋白质活性进行了分析。Eg-SOD 基因与其他绦虫的基因在结构和序列上相似度较高, Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 离子结合位点、二硫键结合位点、以及超氧自由基结合位点与其它动物 Cu/Zn SOD 完全保守,提示 Eg-SOD 基因是一个非常保守的基因。对其他寄生虫 Cu/Zn SOD 的研究表明,阿苯达唑和噻苯达唑等苯并咪唑类抗寄生虫药物能够特异性地抑制寄生虫 SOD 酶活性,而不损害宿主 SOD 酶活性^[16]。系统进化树分析显示,绦虫 Cu/Zn SOD 基因能够与其哺乳动物宿主基因明显地区分开来,说明了它们之间存在着较大的差异,这使得寄生虫 Cu/Zn SOD 作为药物靶点成为可能。

G. Salinas 等^[18]曾对细粒棘球绦虫各时期虫体及组分中 SOD 酶活性进行了分析,显示大部分的酶活性来自于 Cu/Zn SOD,而 Mn SOD 只有少部分组织中才有,且活性较低,说明 Cu/Zn SOD 在细粒棘球绦虫抗氧化系统中的重要地位。本研究通过免疫组织化学的方法也发现 Cu/Zn SOD 酶在细粒棘球绦虫各时期虫体和组织中广泛分布,并且在原头蚴和虫卵中的含量也相对较高。G. Salinas 等的研究

也曾指出在原头蚴中的 Cu/Zn SOD 酶活性最高。结合本研究结果,推测当细粒棘球绦虫在寄生于中间宿主体内时经受的氧化压力最强,当某些包囊中的原头蚴不能再承受这种压力以后,就可能会产生细胞凋亡等过程而被杀死,从而产生了不育包囊。

免疫印迹和 ELISA 结果显示 rEg-SOD 具有良好的反应原性,对小鼠阳性血清以及自然感染细粒棘球绦虫的绵羊血清识别率均为 100%,提示其可作为一个候选的诊断抗原。但是,由于阳性血清的种类和数量还比较欠缺,还需要来自更多患病动物或人类的阳性血清对其敏感性进行分析;同时还需要其他动物寄生虫病(如脑多头蚴病等)阳性血清对其特异性进行分析。本研究通过原核表达纯化出具有较高酶活性和反应原性的重组蛋白质,为后续将 rEg-SOD 作为人和动物包虫病诊断抗原的研究奠定了良好的基础。

参考文献 (References):

- [1] WANG Z, WANG X, LIU X. Echinococcosis in China, a review of the epidemiology of *Echinococcus* spp [J]. *Ecohealth*, 2008, 5(2): 115-126.
- [2] YANG Y R, SUN T, LI Z, et al. Community surveys and risk factor analysis of human alveolar and cystic echinococcosis in Ningxia Hui Autonomous Region, China [J]. *Bull World Health Organ*, 2006, 84(9):

- 714-721.
- [3] MORO P, SCHANTZ P M. Echinococcosis: a review [J]. *Int J Infect Dis*, 2009, 13(2): 125-133.
- [4] McMANUS D P, GRAY D J, ZHANG W, et al. Diagnosis, treatment, and management of echinococcosis [J]. *BMJ*, 2012, 344: e3866.
- [5] AMRI M, AISSA S A, BELGUENDOUIZ H, et al. *In vitro* antihydatic action of IFN- γ is dependent on the nitric oxide pathway [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2007, 27(9): 781-787.
- [6] CARDONI R L, ANTUNEZ M I, MORALES C, et al. Release of reactive oxygen species by phagocytic cells in response to live parasites in mice infected with *Trypanosoma cruzi* [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1997, 56(3): 329-334.
- [7] STEERS N J, ROGAN M T, HEATH S. *In-vitro* susceptibility of hydatid cysts of *Echinococcus granulosus* to nitric oxide and the effect of the laminated layer on nitric oxide production [J]. *Parasite Immunol*, 2001, 23(8): 411-417.
- [8] HAHN U K, BENDER R C, BAYNE C J. Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*: role of reactive oxygen species [J]. *J Parasitol*, 2001, 87(2): 292-299.
- [9] CHIUMENTO L, BRUSCHI F. Enzymatic antioxidant systems in helminth parasites [J]. *Parasitol Res*, 2009, 105(3): 593-603.
- [10] SALINAS G. An update on redox biology of parasites [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 19(7): 661-664.
- [11] CARVALHO-QUEIROZ C, COOK R, WANG C C, et al. Cross-reactivity of *Schistosoma mansoni* cytosolic superoxide dismutase, a protective vaccine candidate, with host superoxide dismutase and identification of parasite-specific B epitopes [J]. *Infect Immun*, 2004, 72(5): 2635-2647.
- [12] KIM T S, JUNG Y, NA B K, et al. Molecular cloning and expression of Cu/Zn-containing superoxide dismutase from *Fasciola hepatica* [J]. *Infect Immun*, 2000, 68(7): 3941-3948.
- [13] VACA-PANIAGUA F, TORRES-RIVERA A, PARRA-UNDA R, et al. *Taenia solium*: antioxidant metabolism enzymes as targets for cestocidal drugs and vaccines [J]. *Curr Top Med Chem*, 2008, 8(5): 393-399.
- [14] AJONINA-EKOTI I, NDJONKA D, TANYI M K, et al. Functional characterization and immune recognition of the extracellular superoxide dismutase from the human pathogenic parasite *Onchocerca volvulus* (Ov EC-SOD) [J]. *Acta Trop*, 2012, 124(1): 15-26.
- [15] KHAWSAK P, KANJANAVAS P, KIATSOMCHAI P, et al. Expression and characterization of Cu/Zn superoxide dismutase from *Wuchereria bancrofti* [J]. *Parasitol Res*, 2012, 110(2): 629-636.
- [16] CASTELLANOS-GONZÁLEZ A, JIMÉNEZ L, LANDA A. Cloning, production and characterisation of a recombinant Cu/Zn superoxide dismutase from *Taenia solium* [J]. *Int J Parasitol*, 2002, 32(9): 1175-1182.
- [17] SANCHEZ-MORENO M, ENTRALA E, JANSSEN D, et al. Inhibition of superoxide dismutase from *Ascaris suum* by benzimidazoles and synthesized pyrimidine and glycine derivatives [J]. *Pharmacology*, 1996, 52(1): 61-68.
- [18] SALINAS G, CARDOZO S. *Echinococcus granulosus*: Heterogeneity and differential expression of superoxide dismutases [J]. *Exp Parasitol*, 2000, 94(1): 56-59.
- [19] VAN RAAMSDONK J M, HEKIMI S. Superoxide dismutase is dispensable for normal animal lifespan [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(15): 5785-5790.
- [20] BEAMAN L, BEAMAN B L. The role of oxygen and its derivatives in microbial pathogenesis and host defense [J]. *Annu Rev Microbiol*, 1984, 38: 27-48.

(编辑 白永平)