

网络出版时间:2016-4-19 11:04:48 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160419.1104.002.html>

◇基础医学研究◇

日本血吸虫 SJIR-2 纳米微球核酸疫苗的免疫保护性研究

王正印¹, 潘丽红^{2,3}, 汪学龙¹

摘要 目的 研究日本血吸虫胰岛素受体-2(SJIR-2)纳米微球核酸疫苗对小鼠攻击感染的免疫保护效果。方法 构建 pEGFP-SJIR-2 重组质粒,双酶切鉴定并测序,大量提取 pEGFP-SJIR-2 质粒,用壳聚糖(CHS)修饰的聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)微球包裹,用包裹后的 SJIR-2 纳米微球免疫小鼠。将 40 只雌性 BALB/c 小鼠随机分为 4 组($n=10$),分别注射 PBS、空 pEGFP 质粒、CHS-PLGA 微球和 CHS-PLGA-pEGFP-SJIR-2 微球各 100 μg 免疫小鼠,末次免疫 2 周后,用日本血吸虫尾蚴攻击感染小鼠,每次免疫及感染尾蚴前收集各组小鼠血清,ELISA 法检测各组小鼠血清内免疫球蛋白(IgG)水平的变化。小鼠感染尾蚴 42 d 后全部剖杀,收集成虫和虫卵并计算减虫率和减卵率。结果 成功构建了 pEGFP-SJIR-2 重组质粒,与 PBS 组比较,CHS-PLGA-pEGFP-SJIR-2 组的成虫数和虫卵数差异有统计学意义($P<0.01$)。CHS-PLGA-pEGFP-SJIR-2 组的减虫率和减卵率分别为 37.36% 和 46.82%,和 PBS 组相比,CHS-PLGA-pEGFP-SJIR-2 组小鼠血清内 IgG 水平比明显增高($P<0.01$),而 pEGFP 组和 CHS-PLGA 组成虫数和虫卵数与 PBS 组比较差异无统计学意义。结论 SJIR-2 纳米微球核酸疫苗对感染血吸虫的 BALB/c 小鼠有一定的免疫保护效果,对其潜在的候选抗原疫苗的价值尚需深入研究。

关键词 日本血吸虫;SJIR-2 基因;核酸疫苗;聚乳酸-羟基乙酸共聚物

中图分类号 R 383.24

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)05-0611-04

血吸虫病仍是 21 世纪严重危害发展中国家人民健康的寄生虫病。多年来,控制血吸虫病主要以化疗为主,但如何降低血吸虫病的再感染率及提高

易感人群的免疫保护力等问题仍未得到解决^[1]。研制血吸虫病疫苗成了血吸虫病研究方面的热点^[2-3]。目前为止已筛选出 10 多个亚单位候选抗原分子^[4]。国内虽也有学者在血吸虫疫苗的研究方面取得了一定的成绩,但至今都没有理想的血吸虫疫苗问世。如马茜茜等^[5]构建的 pET28a(+)-SjBAD 重组疫苗可获得 30.82% 的减虫率和 42.52% 的减卵率。为筛选出更具保护力的血吸虫疫苗候选抗原分子,该实验采用微球包裹技术,用 CHS 修饰的 PLGA 微球将 pEGFP-SJIR-2 质粒包裹起来作为疫苗免疫小鼠,观察其免疫指标,探讨该疫苗在防治血吸虫病中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料 日本血吸虫、真核表达载体 pEGFP 均来自安徽医科大学病原生物学教研室。含尾蚴的阳性钉螺购自江苏省血吸虫病防治研究所。

1.2 主要试剂 TRIzol 试剂和 Lipo2000(美国 Invitrogen 公司);逆转录试剂盒(美国 Fermentas 公司);rTaq mix(日本 TaKaRa 公司);Xma I、Pst I 和 T4 连接酶(北京 NEB 公司);质粒小量提取试剂盒(美国 Axygen 公司);质粒大量提取试剂盒(北京康为世纪公司);DNA 胶回收试剂盒(德国 QIAGEN 公司);HRP 标记山羊抗鼠 IgG(北京全式金公司);ELISA 试剂盒(武汉华美生物公司)。

1.3 RT-PCR 根据 TRIzol 试剂说明书提取日本血吸虫的总 RNA,按照逆转录试剂盒步骤将 RNA 逆转录成 cDNA,以 cDNA 为模板,SJIR-2 基因扩增引物 F:5'-GCTGCAGTATGCTAAATATATTGGCTCACATG-3', R:5'-CCCCGGGATAAGCTAAATCTC-CATTTGTAATTGTT-3'进行 PCR 反应。取 5 μl PCR 产物,用含 EB 的 1% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 扩增结果;按 DNA 胶回收试剂盒的说明进行目的片段的回收和纯化。

1.4 PCR 产物和载体 pEGFP 的酶切及纯化 取 PCR 产物和 pEGFP 载体各 10 μl ,用限制性内切酶 Xma I 和 Pst I 进行双酶切反应,按照 DNA 胶回收

2016-01-18 接收

基金项目:安徽高校省级自然科学研究项目(编号:KJ2013A183)

作者单位:¹安徽医科大学病原生物学教研室,合肥 230032

²安庆医药高等专科学校微生物与寄生虫学教研室,安庆 246052

³浙江医学高等专科学校微生物与寄生虫学教研室,杭州 310053

作者简介:王正印,男,硕士研究生;

汪学龙,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:wangxl1964@163.com;

潘丽红,女,教授,责任作者,E-mail:panlh1114@126.com

试剂盒说明书进行酶切片段的回收和纯化。

1.5 SJIR-2 基因与 pEGFP 的重组与鉴定 将双酶切后胶回收的 SJIR-2 基因和 pEGFP 载体按摩尔比 3~10:1 的比例用 1 μl T4 连接酶于 16 °C 过夜进行连接反应,将连接产物转化大肠杆菌 DH5α,从培养 12~16 h 的卡那抗性培养平板上挑取若干单克隆分别放入 3 ml 含卡那霉素的 LB 液体培养基中 37 °C,200 r/min 振荡过夜,按照质粒小量提取试剂盒的步骤提取质粒。采用双内切酶切法、PCR 法鉴定重组基因,把双酶切、PCR 鉴定正确的重组质粒送公司测序,并进行 Blast 比对分析。

1.6 pEGFP-SJIR-2 质粒的大量提取及 PLGA 包裹质粒微球的制备 按照质粒大量提取试剂盒的步骤提取大量质粒,寄给无锡纳生生物科技有限公司,由公司制备实验所需的 PLGA 纳米微球。

1.7 免疫动物 将 40 只 5~6 周的雌性 SPF 级 BALB/c 小鼠(18~20 g)随机分为 PBS 组、pEGFP 组、CHS-PLGA 组和 CHS-PLGA-pEGFP-SJIR-2 组,每组 10 只,分别在 4 组小鼠左后肢股四头肌注射 100 μg PBS、pEGFP、CHS-PLGA 和 CHS-PLGA-pEGFP-SJIR-2,每组小鼠免疫 3 次,每次间隔 2 周,每次免疫前进行尾静脉采血,分离血清,ELISA 法检测各组小鼠血清内 IgG 水平的变化。

1.8 攻击感染 末次免疫 2 周后,每只小鼠经腹壁感染(40±1)条日本血吸虫尾蚴,42 d 后剖杀全部小鼠,以门静脉灌注法收集成虫并计数,称取肝脏后加入 5% 的 NaOH 消化 2 h,置于显微镜下进行虫卵计数计算每克肝的虫卵数,按以下公式计算减虫率和减卵率。减虫率(%)=(对照组平均虫体数-实验组平均虫体数)/对照组平均虫体数×100%;减卵率(%)=(对照组平均虫卵数-实验组平均虫卵数)/对照组平均虫卵数×100%。

1.9 统计学处理 将数据录入 Excel 表中,采用 GraphPad Prism 6.01 进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用 ANOVA 分析,组间两两比较用 Dunnett's 法,以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 目的基因 SJIR-2 PCR 扩增结果 提取日本血吸虫的总 RNA,逆转录成 cDNA,以 cDNA 为模板,用 SJIR-2 基因扩增引物 SJIR-2-F、SJIR-2-R,得到目的基因片段 1 575 bp,电泳结果与预期一致。见图 1。

2.2 重组质粒 pEGFP-SJIR-2 的鉴定 经过限制

性内切酶 Xma I 和 Pst I 双酶切可以得到 2 个片段,即 1 575 bp 目的基因片段和约 4 700 bp 的载体 pEGFP 片段(图 1),经上海生物工程试剂公司测序,测序结果经 Blast 比对与 SJIR-2 基因序列同源性为 100%。

2.3 PLGA 纳米微球的制备及粒径分布与分散性的检测 按照质粒大量提取试剂盒说明提取大量 pEGFP-SJIR-2 质粒并寄给无锡纳生生物科技有限公司,由公司制备实验所需的 PLGA 纳米微球,取适量的 CHS-PLGA-pEGFP-SJIR-2 纳米微球,利用激光粒度分析仪检测微球的粒径分布和多分散性,测得微球的平均粒径大小为 232.5 nm,多分散指数为 0.395,分散性较好。见图 2。

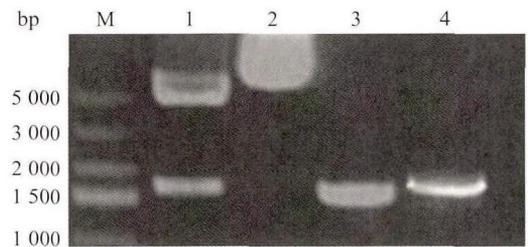


图 1 SJIR-2 的 PCR 扩增结果及 pEGFP-SJIR-2 重组质粒的鉴定结果

M:DL5000 DNA Marker;1:双酶切验证;2:pEGFP-SJIR-2 重组质粒;3:PCR 验证;4:PCR 扩增产物

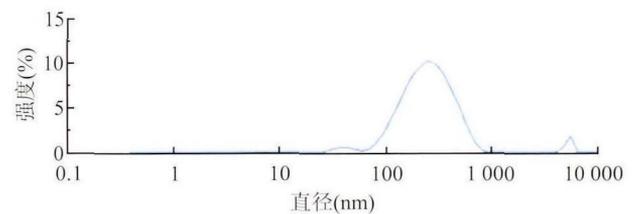


图 2 CHS-PLGA-pEGFP-SJIR-2 纳米微球的粒径分布

2.4 小鼠体内 IgG 动力学检测 与 PBS 组比较,每次免疫前和感染前 pEGFP 组和 CHS-PLGA 组 IgG 抗体水平变化不明显,CHS-PLGA-pEGFP-SJIR-2 组随着免疫次数的增加 IgG 抗体水平明显增高,与 PBS 组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 3。

2.5 PLGA 纳米微球核酸疫苗对小鼠的免疫保护效果 4 组小鼠感染血吸虫尾蚴后,CHS-PLGA-pEGFP-SJIR-2 组平均获虫数和每克肝卵数与 PBS 组、pEGFP 组和 CHS-PLGA 组差异有统计学意义($P < 0.01$),该疫苗可诱导 BALB/c 小鼠产生 37.36% 的减虫率($F = 49.89, P < 0.01$)和 46.82% 的减卵率($F = 223.1, P < 0.01$),见表 1。

表1 PLGA 纳米微球核酸疫苗免疫保护实验的减虫率和减卵率($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	攻击尾蚴数(条)	平均获虫数(条)	减虫率(%)	平均每克肝卵数	减卵率(%)
PBS组	40 ± 1	27.30 ± 2.83	-	78 831.90 ± 5 192.89	-
pEGFP组	40 ± 1	26.70 ± 2.11	-	78 224.40 ± 3 464.39	-
CHS-PLGA组	40 ± 1	26.10 ± 2.03	-	77 167.20 ± 3 375.72	-
CHS-PLGA-pEGFP-SJIR-2组	40 ± 1	17.10 ± 1.45 **	37.36	41 929.50 ± 2 876.20 **	46.82

与PBS组比较:** $P < 0.01$

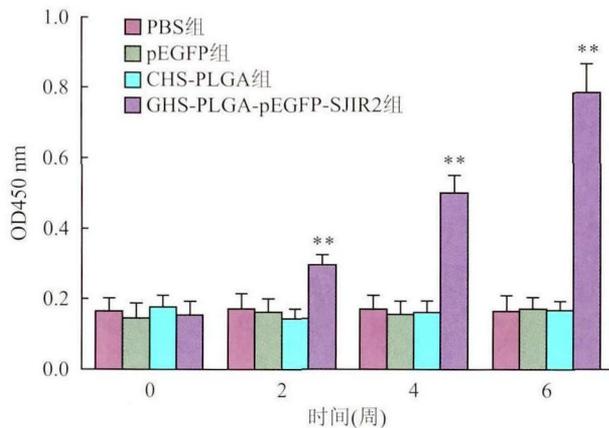


图3 小鼠体内IgG的动力学检测
与PBS组比较:** $P < 0.01$

3 讨论

和其他材料相比,纳米载体可以使药物的包埋率增加,由于药物包埋在纳米材料中使得药物在血液中缓慢释放,延长了药物的半衰期,从而改善生物利用率和提高治疗效果,是目前制备疫苗的最佳辅助材料之一。PLGA是一种可生物降解高分子聚合物,在20世纪70年代即被用作外科缝线及体内埋植材料,其生物相容性好,无免疫反应性。PLGA在体内缓慢降解为乳酸、乙醇酸,最后转化为水和二氧化碳,安全性也较高,近年来,已被美国食品药品监督管理局(FDA)批准应用于制药行业^[6]。CHS也有良好的生物相容性、可降解性和组织黏附性,并有助于大分子穿过组织黏膜表面,是良好的非病毒基因载体。同时利用CHS修饰的PLGA纳米微球在温和条件下凝集(或浓缩)DNA分子可以减少有机溶剂以及乳液分散时的剪切力对DNA稳定性和完整性的破坏,国内有很多学者成功制备了PLGA阳离子纳米微球,如杨恩芸等^[7]制备出粒径为142 nm的CHS/PLGA(PTX)阳离子纳米微球;邹家龙等^[8]采用复乳法成功制备了用不同浓度CHS修饰的PLGA(OVA)阳离子纳米微球;马方奎等^[9]采用乳化溶剂挥发技术和共价交联技术合成了壳聚糖聚乳酸

羟基乙酸(壳聚糖PLGA)的3种纳米载体等等。

研究^[10]表明血吸虫胰岛素受体和人类胰岛素受体在配体区域有相同的结合机制,在酪氨酸激酶区域有一样的下游信号转导加工。血吸虫胰岛素受体虽然和人类胰岛素受体相似也是由2个 α 亚基和两个 β 亚基组成, α 亚基位于细胞外,其上有胰岛素结合位点, β 亚基位于细胞内,其上有酪氨酸激酶区,负责信号转导。但是在血吸虫胰岛素受体的酪氨酸激酶区有一段由102个氨基酸组成的插入序列,该段序列有螺旋结构,有很特异的抗原性,这是人类胰岛素受体所并不具备的,并且研究^[10]还显示血吸虫胰岛素受体和人类胰岛素受体从 α 亚基的配体区到 β 亚基的酪氨酸激酶区整个三维结构的相似度只有17.3%~44.6%,所以,使用血吸虫胰岛素受体疫苗可以避免宿主自身免疫的发生。另外,血吸虫除了能应答自身内在的内分泌激素外,也能接受宿主激素信号调控增殖、发育和交配^[11]。在血吸虫童虫和成虫表面表达的膜蛋白是疫苗和药物研制合理的目标^[12],而胰岛素受体就是膜蛋白,可以作为疫苗的候选抗原分子。本实验成功构建了pEGFP-SJIR-2重组质粒,通过乳化技术用CHS修饰的PLGA纳米微球包裹pEGFP-SJIR-2重组质粒,制备成缓释微球,用该纳米微球核酸疫苗免疫小鼠,结果显示这种纳米微球核酸疫苗可以使小鼠产生较高的抗体水平,可获得37.36%的减虫率和46.82%的减卵率,对小鼠有一定的免疫保护效果,但是在以后的应用中还有待更进一步的研究。

参考文献

- [1] 罗四维,周勤. 血吸虫疫苗的研究进展[J]. 微量元素与健康研究,2011,28(4):49-54.
- [2] 刘秉春,崔新洁,罗新松,等. 核酸疫苗初免-蛋白疫苗加强的免疫策略提高日本血吸虫核酸疫苗免疫效果[J]. 生物工程学报,2013,29(6):814-22.
- [3] Ye Q, Dong H F, Greveling C G, et al. *In vitro* cultivation of *Schistosoma japonicum*-parasites and cells[J]. Biotechnol Adv, 2013,31(8):1722-37.
- [4] 雷娜,刘森,任翠萍,等. 日本血吸虫重组SjTsp2/Sj29 ku蛋白疫苗对小鼠免疫效果的研究[J]. 安徽医科大学学报,

- 2014,49(10):1357-61.
- [5] 马茜茜,洪 扬,韩宏晓,等.日本血吸虫促凋亡基因 SjBAD 的初步研究[J].中国血吸虫病防治杂志,2015,27(2):139-45.
- [6] Shive M S,Anderson J M. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres[J]. Adv Drug Deliv Rev, 1997, 28(1):5-24.
- [7] 杨恩芸,王晓君,戴 甜,等.壳聚糖修饰的紫杉醇纳米粒的制备[J].华西药理学杂志,2014,29(3):237-40.
- [8] 邹家龙,罗顺德,韩瑞玲,等.壳聚糖表面修饰 PLGA 纳米粒对小鼠骨髓系树突细胞交叉递呈的影响[J].中国医院药理学杂志,2013,33(3):192-5.
- [9] 马方奎,包子娟,陈西广.壳聚糖聚乳酸羟基乙酸纳米粒子作为抗肿瘤药物载体的研究[J].中国海洋大学学报(自然科学版),2014,44(7):58-63.
- [10] You H, Zhang W, Jones M K, et al. Cloning and characterisation of *Schistosoma japonicum* insulin receptors[J]. PLoS One,2010,5(3):e9868.
- [11] *Schistosoma japonicum* Genome Sequencing and Functional Analysis Consortium. The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host-parasite interplay [J]. Nature,2009,460(7253):345-51.
- [12] Loukas A, Tran M, Pearson M S. Schistosome membrane proteins as vaccines[J]. Int J Parasitol, 2007,37(3-4):257-63.

Immuno-protection of SJIR-2 DNA vaccine with microspheres adjuvant in mice challenged with *Schistosoma japonicum*

Wang Zhengyin¹, Pan Lihong^{2,3}, Wang Xuelong¹

(¹Dept of Parasitology, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²Dept of Microbiology and Parasitology, Anqing Medical and Pharmaceutical College, Anqing 246052;

³Dept of Microbiology and Parasitology, Zhejiang Medical College, Hangzhou 310053)

Abstract Objective To research the immuno-protection of SJIR-2 DNA vaccine with nanometer microspheres against *Schistosoma japonicum* infection in mice. **Methods** To construct eukaryotic expression plasmid pEGFP-SJIR-2, identified by double digestion and sequenced delivery. The recombinant plasmid pEGFP-SJIR-2 was extracted and was encapsulated into PLGA nanometer microspheres which were modified by CHS. 40 female BALB/c mice were randomly divided into 4 groups ($n = 10$), each group of mice were injected with PBS, empty pEGFP plasmid, CHS-PLGA nanometer microspheres and CHS-PLGA-pEGFP-SJIR-2 nanometer microspheres 100 μg , respectively. Two weeks after the last immunization, each mouse was infected by cercaria of *Schistosoma japonicum*, sera of mice in each group were collected before each immunization and challenge infection. ELISA was used to detect the change of IgG in each group of micesera. 42 days later, all mice were sacrificed. The adult worms and eggs were collected and counted, and the worm and egg reduction rates were calculated as well. **Results** The recombinant plasmid pEGFP-SJIR-2 was successfully constructed, and there was significant difference in the numbers of worm and egg between CHS-PLGA-pEGFP-SJIR-2 group and PBS group ($P < 0.01$). The worm and egg reduction rates in CHS-PLGA-pEGFP-SJIR-2 group were 37.36% and 46.82% respectively. The IgG levels in mice sera of CHS-PLGA-pEGFP-SJIR-2 group were remarkably higher ($P < 0.01$) compared with PBS group. On the contrary, there was no significant difference between both pEGFP plasmid group and CHS-PLGA group in the numbers of worm and egg compared with PBS group. **Conclusion** SJIR-2 nanometer microspheres nucleic acid vaccine has some immuno-protection against *Schistosoma japonicum* infection in BALB/c mice, while it is worth further studying for its potential value to be a candidate antigen molecule of *Schistosoma japonicum* vaccine.

Key words *Schistosoma japonicum*; SJIR-2 gene; nucleic acid vaccine; poly(lactic-co-glycolic acid)