

## ◇ 基础医学研究 ◇

## 日本血吸虫重组 SjTsp2/Sj29 ku 蛋白疫苗对小鼠免疫效果的研究

雷 娜<sup>1,2</sup>, 刘 森<sup>1</sup>, 任翠平<sup>1</sup>, 刁玉洁<sup>1</sup>, 杨 菲<sup>1</sup>, 程海燕<sup>1</sup>, 沈际佳<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨日本血吸虫重组 Tsp2/Sj29 ku 表膜蛋白疫苗对小鼠的抗病免疫效果。方法 pet32a/SjTsp2/Sj29 ku 重组菌经异丙基硫代-β-D-半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达, 制备纯化的重组蛋白。29 只 6 周龄雌性昆明鼠随机分为蛋白疫苗组、硫氧还蛋白组和空白对照组, 前两组各 10 只, 空白对照组 9 只。蛋白疫苗组, 第一次免疫每鼠经背部皮下多点注射用等体积弗氏完全佐剂乳化的 50 μg SjTsp2/Sj29 ku 重组表膜蛋白, 第 12、24 天每鼠皮下多点再次注射用等体积弗氏不完全佐剂乳化的 50 μg 该重组蛋白。硫氧还蛋白组的免疫方法同蛋白疫苗组。空白对照组用生理盐水代替蛋白, 免疫方法同前。末次免疫后第 10 天, 每鼠经腹部皮肤感染日本血吸虫尾蚴 (30 ± 2) 条。于感染 45 d 后剖杀全部实验小鼠, 计算减虫率和减卵率。眼眶取血, 分离血清, 间接性 ELISA 法检测 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 和 IgM 抗体亚型, 同时检测血清细胞因子 γ 干扰素 (IFN-γ)、白介素 4 (IL-4) 水平。结果 pet32a/SjTsp2/Sj29 ku 菌经 IPTG 诱导可大量表达, 经变性、复性获得纯化的日本血吸虫 Tsp2/Sj29 ku 重组表膜蛋白。蛋白疫苗组与空白对照组比较, 减虫率和减卵率显著升高 ( $P < 0.05$ )。硫氧还蛋白组与空白对照组之间比较, 减虫率和减卵率差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。蛋白疫苗组小鼠血清中 IgG1、IgG2a、IgG2b 显著高于空白对照组 ( $P < 0.05$ ), 而 IgG3 和 IgM 较空白对照组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。蛋白疫苗组小鼠血清 IFN-γ、IL-4 细胞因子显著高于空白对照组 ( $P < 0.01$ )。结论 日本血吸虫 Tsp2/Sj29 ku 重组表膜蛋白疫苗对小鼠抗感染有一定的保护性; 该重组蛋白免疫引起的是 Th1/Th2 混合型免疫反应。

**关键词** 日本血吸虫; 表膜蛋白; 蛋白疫苗

中图分类号 R 383.24

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)10-1357-05

血吸虫病 (schistosomiasis) 是世界上危害最严重的寄生虫病之一。目前仍在亚洲、非洲和南美洲

的 76 个国家流行, 有 6 亿人受到威胁, 2 亿人受感染, 全世界每年约有数十万人死于该病<sup>[1]</sup>。我国尚有 454 个血吸虫病流行县 (市、区), 共有 31 303 个流行村, 估计患者 28 万余例<sup>[2]</sup>。血吸虫疫苗的研制是防治血吸虫病的一种不可或缺的措施。迄今为止在基因工程疫苗 (包括核酸疫苗) 研究中, 已筛选出 10 多个亚单位候选抗原。WHO/TDR 确认了优先研究的 6 种候选分子抗原分别是副肌球蛋白、SmGST28、磷酸甘油醛异构酶、IrV-5、Sm23 和 SmFABP<sup>[3]</sup>。既往研究<sup>[4]</sup>表明, 以小鼠作为模型, 评价对谷胱甘肽 S 转移酶、磷酸丙糖异构酶等抗原免疫保护性效果仍不够理想。血吸虫虫体与宿主免疫系统直接接触相互作用, 其表膜蛋白更易刺激机体产生相对应的免疫反应, 提示血吸虫体表的表膜蛋白可以作为疫苗和药物靶点, 故认为表膜相关抗原研究在血吸虫病疫苗发展和免疫诊断方面起重要作用<sup>[5]</sup>。该研究选取日本血吸虫四跨膜蛋白第二亲水基团蛋白 (SjTsp2) 与 Sj29 ku 表膜蛋白胞外区 (Sj29), 通过基因 SOEing PCR 技术, 用疏水性多肽 (Gly4)<sub>3</sub> 作为连接肽将二者进行连接, 构建融合基因 pet32a/SjTsp2/Sj29 ku 表达质粒<sup>[5]</sup>, 通过诱导表达, 大量制备重组表膜蛋白, 探讨其对小鼠抗血吸虫病的保护性免疫效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 6 周龄雌性昆明鼠, 购自安徽医科大学实验动物中心。日本血吸虫尾蚴、日本血吸虫感染性钉螺购自南京市疾病预防控制中心。

**1.1.2 菌株** *E. coli* BL21/pet32a/SjTsp2/Sj29 ku 菌株由本课题组构建并保存。

**1.1.3 主要试剂** 异丙基硫代-β-D-半乳糖苷 (IPTG)、甘氨酸、Tris 购自美国 Sigma 公司; 琼脂、琼脂糖、胰蛋白胨、酵母提取物购自英国 Oxoid 公司; SDS、APS、考马斯亮蓝、丽春红、丙烯酰胺、N,N'-亚甲双丙烯酰胺购自上海生工生物工程有限公司; 小鼠抗体亚型检测鉴定试剂盒购自美国 SIGMA-ALDRICH 公司; 白介素 4 (interleukin-4, IL-4)、γ 干

2014-02-28 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 30972569); 安徽省大学生创新训练项目 (编号: AH201310366044)

作者单位: <sup>1</sup>安徽医科大学基础医学院病原生物学教研室, 合肥 230032

<sup>2</sup>安徽医学高等专科学校, 合肥 230022

作者简介: 雷 娜, 女, 硕士研究生;

沈际佳, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: shenjijia@hotmail.com

扰素 (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) ELISA 试剂盒购自美国 eBioscience 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 pet32a/SjTsp2/Sj29 ku 重组菌鉴定** 37 °C 培养过夜 pet32a/SjTsp2/Sj29 ku 菌液 8 000 r/min 离心 2 min, 弃上清液, 收集菌体。按 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒操作说明进行质粒提取, 送上海生工生物工程有限公司测序鉴定。

**1.2.2 SjTsp2/Sj29 ku 重组蛋白的制备** 将 pet32a/SjTsp2/Sj29 ku 菌种在含有氨苄的 LB 固体培养基上划线, 37 °C 培养过夜。挑取单个菌落放入含有氨苄的 LB 液体培养基中, 37 °C、210 r/min 振荡培养约 15 h, 再按 1:50 比例置入 100 ml 含有氨苄的 LB 液体培养基中, 继续培养至吸光度值 ( $A_{600}$ ) 在 0.7~0.9, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L 诱导表达, 收集诱导表达 0、1、3、5 h 的菌液, 4 °C、4 000 r/min 离心, 弃上清液, 收集沉淀。剩余菌液 4 °C、4 000 r/min 离心, 弃上清液, 收集沉淀, 用 PBS 重悬, 反复冻融 3 次后, 置入冰浴中在 350 W 功率下超声破碎, 超声 5 s, 间歇 10 s, 10 min 1 个循环, 每个循环间歇 5 min, 共 8 个循环。将超声破碎后的产物于 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 留上清液、沉淀。用 PBS 重悬培养 0、1、3、5 h 的细菌沉淀以及超声破碎后上清液及沉淀, 各取 20  $\mu$ l, 分别加入等量的蛋白上样缓冲液 (2  $\times$  缓冲液) 重悬后, 进行 SDS-PAGE 电泳。同法 5 h 诱导大量细菌表达, 离心后菌体沉淀分别用 PBS、2 mmol/L 的尿素洗涤沉淀, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 留沉淀。加入 6 mmol/L 尿素 (pH=7.9) 的变性液, 4 °C 振荡 12~14 h, 4 °C、2 000 r/min 离心 30 min, 收集上清液, 上清液通过 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤。准备 His-tag 层吸术进行纯化。纯化: ① 先用 7.5 ml 含 6 mol/L 尿素的结合缓冲液过柱平衡; ② 缓慢倒入上清液; ③ 再用 14.5 ml 含 6 mol/L 尿素的结合缓冲液过柱; ④ 15 ml 洗涤缓冲液洗去杂蛋白质; ⑤ 用 5 ml 含 6 mol/L 尿素的洗脱液洗脱目的蛋白, 即为纯化的 SjTsp2/Sj29 ku 重组蛋白。目的蛋白装入透析袋分别以 4、2、0 mol/L 尿素 4 °C 逐步透析, 透析完成后收集透析袋中蛋白溶液, 用 PEG 20000 浓缩后, 用 One Drop 仪器测定蛋白浓度, -20 °C 贮存备用。

**1.2.3 小鼠免疫保护性试验** 29 只 6 周龄雌性昆明鼠随机分为蛋白疫苗组、硫氧还蛋白组和空白对照组, 前两组各 10 只, 空白对照组 9 只。蛋白疫苗组, 第一次免疫每鼠经背部皮下多点注射用等体积

弗氏完全佐剂乳化的 50  $\mu$ g SjTsp2/Sj29 ku 重组表膜蛋白, 第 12、24 天每鼠皮下多点再次注射用等体积弗氏不完全佐剂乳化的 50  $\mu$ g 该重组蛋白。硫氧还蛋白组的免疫方法同蛋白疫苗组。空白对照组用生理盐水代替蛋白, 免疫方法同前。末次免疫后第 10 天, 每鼠经腹部皮肤感染日本血吸虫尾蚴 (30  $\pm$  2) 条, 于感染 45 d 后剖杀全部实验小鼠, 眼眶取血, 以肝门静脉灌注法收集虫体并计数。收集肝, 称重后加入 5 ml PBS, 用均质器按 10 000 r/min 均质匀浆 1 min, 加入 5 ml 10% NaOH, 水浴消化 1 h, 充分混匀后取 200  $\mu$ l 于显微镜下计数虫卵数, 每份样本计数 4 次取平均值, 计算每克肝虫卵数。减虫 (卵) 率 (%) = [对照组平均虫体 (卵) 数 - 试验组平均虫体 (卵) 数] / 对照组平均虫体 (卵) 数  $\times$  100%。

**1.2.4 血清抗体亚型检测** 间接 ELISA 法检测各组小鼠血清抗体 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 和 IgM 亚型。将重组蛋白 SjTsp2/Sj29 ku 为检测抗原, 用 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释, 调整蛋白浓度为 5  $\mu$ g/ml, 以 100  $\mu$ l/孔包被酶标板, 4 °C 过夜, PBST 洗涤酶标反应孔 4 次。5% 的脱脂牛奶封闭, 300  $\mu$ l/孔, 4 °C 过夜, PBST 洗涤酶标反应板 4 次, 加 1:1 000~1:12 800 倍比稀释各组小鼠血清, 100  $\mu$ l/孔, 37 °C 湿盒温育 1 h, 同上洗涤 4 次, 羊抗鼠各亚类抗体均为 1:1 000 稀释, 100  $\mu$ l/孔, 37 °C 湿盒温育 1 h, 同上洗涤 4 次。抗羊 IgG 酶标抗体 1:40 000 稀释, 100  $\mu$ l/孔, 37 °C 湿盒温育 1 h, 同上洗涤 4 次, 加 TMB 底物反应液 A 和 B (50  $\mu$ l/孔), 显色 10 min, 每孔加 50  $\mu$ l 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应, 测定 A<sub>450</sub> 值。

**1.2.5 细胞因子 IL-4、IFN- $\gamma$  检测** 取每组各小鼠血清, 用于细胞因子检测。严格参照说明书步骤操作。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 进行统计分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 计量数据两组间直接比较, 符合正态分布时, 采用 *t* 检验, 不符合正态分布时, 采用非参数检验。

## 2 结果

**2.1 pet32a/SjTsp2/Sj29 ku 重组基因测序鉴定** 测序结果共 660 个碱基, 经 BLAST 比对未发现实意突变。共编码 219 个氨基酸, 连接肽之前为 SjTsp2 蛋白, 其后为 Sj29 ku 蛋白胞外区蛋白。

**2.2 pet32a/SjTsp2/Sj29 ku 融合蛋白的表达及 SDS-PAGE 分析** 收集加入 IPTG 前和加入 IPTG 后 1、3 和 5 h 1 ml 菌液沉淀以及 5 h 后反复冻融后

超声粉碎的上清液和沉淀,加入等量的 2 × 蛋白上样缓冲液重悬后,进行 SDS-PAGE 电泳,见图 1。从泳道可见,约 43 ku 处可见清晰的 SjTsp2/Sj29 ku 蛋白条带。

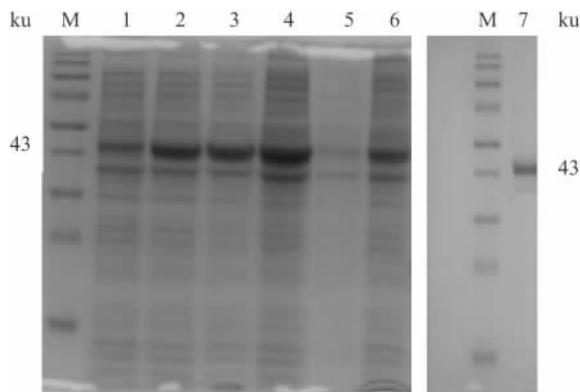


图 1 表达产物的 SDS-PAGE 分析

M:Marker;1:未诱导的重组菌;2:诱导 1 h 的表达产物;3:诱导 3 h 的表达产物;4:诱导 5 h 的表达产物;5:超声破碎后上清液;6:超声破碎后沉淀;7:纯化后的 SjTsp2/Sj29 ku 融合蛋白

**2.3 重组蛋白的免疫保护作用** 经肝门静脉灌注法收集虫体,得到各组平均每鼠检获的成虫数。经非参数检验, SjTsp2/Sj29 ku 重组蛋白疫苗组小鼠检获的成虫数明显低于空白对照组,减虫率为 23.95%,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。硫氧还蛋白组与空白对照组比较,减虫率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 1。

表 1 每组平均检获的成虫比较

组别	n	攻击尾吻 (条)	中位数和四分位数		减虫率 (%)	P 值
			中位数	四分位数 间距		
蛋白疫苗	10	30 ± 2	10.0	(9.8, 12.5)	23.95	<0.05
硫氧还蛋白	10	30 ± 2	14.0	(12.0, 16.0)	2.79	>0.05
空白对照	9	30 ± 2	14.0	(11.0, 18.5)	-	-

各组小鼠肝脏虫卵数, SjTsp2/Sj29 ku 重组蛋白疫苗组小鼠检获虫卵数明显低于空白对照组,减卵率为 55.57%,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。硫氧还蛋白组与空白对照组比较,减卵率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 2。

表 2 各组肝脏虫卵数比较

组别	n	中位数和四分位数间距		减卵率 (%)	P 值
		中位数	四分位数 间距		
蛋白疫苗	10	21 715.5	(14 612.0, 40 749.0)	55.57	<0.05
硫氧还蛋白	10	40 418.5	(28 381.5, 68 112.0)	20.09	>0.05
空白对照	9	43 816.5	(27 520.0, 5 678.3)	-	-

**2.4 抗体亚型 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 和 IgM**

检测 蛋白疫苗组的 IgG3、IgM 抗体水平与空白对照组相比升高,但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。而蛋白免疫组 IgG1、IgG2a 和 IgG2b 的抗体水平升高则明显高于空白对照组,差异有统计学意义 (IgG1 和 IgG2b  $P < 0.01$ ,  $F = 18.31$ ; IgG2a  $P < 0.05$ ,  $F = 5.51$ )。见表 3。

**2.5 小鼠血清细胞因子检测** 蛋白疫苗组小鼠血清 IFN- $\gamma$  和 IL-4 的水平明显高于空白对照组,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ,  $F = 15.12$ );硫氧还蛋白组与空白对照组之间比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ,  $F = 0.37$ )。见表 4。

**3 讨论**

日本血吸虫疫苗研究已有 60 多年的历史,大体经历了死疫苗、减毒活疫苗、分子疫苗和 DNA 疫苗这几个研究阶段<sup>[6]</sup>。与单一的疫苗相比,重组疫苗具有重组疫苗的共性而且能诱生较强而持久的特异性免疫应答,从而达到增强宿主抗血吸虫感染抑制血吸虫病病程进展的效果<sup>[7]</sup>。Cardoso et al<sup>[8]</sup>通过共聚焦显微镜确定 Sm29 蛋白为体表分子,通过大量实验得到重组 Sm29 ku 蛋白 51% 减虫率、60% 减卵率和 50% 减肉芽肿。Yuan et al<sup>[9]</sup>研究人员扩增了一段 SjTsp2 膜外大环区,亚克隆至 pET32a 质粒中表达了 Trx-TSP2 融合蛋白,得出 56% 的减虫率、53% 的肝脏减卵率和 52% 的粪减卵率;王素娟等<sup>[10]</sup>应用 PCR 技术构建重组抗原 rSj06868,获得 31.63% 的减虫率和 55.63% 的肝脏减卵率;刘秉春等<sup>[11]</sup>用日本血吸虫 DNA 疫苗 VR1012-SjGST-32 与重组蛋白疫苗 rSjGST-32 联合免疫小鼠,获得 42.3% 的减虫率。以上血吸虫分子疫苗的研究中运用不同的方法构建了各种重组蛋白抗原,得到了一定的免疫保护效果,但是得到的减虫率和减卵率有波动,保护效果不够稳定。

本研究中利用由日本血吸虫的两种表膜蛋白 SjTsp2 和 Sj29 ku 构建的重组 SjTsp2/Sj29 ku 表膜蛋白分子,免疫小鼠,诱导产生了 23.95% 的减虫率和 55.57% 的肝脏减卵率,获得了一定的保护效果。为了探讨免疫反应机制,本研究运用 ELISA 方法检测血清中的特异性 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM 抗体水平以及细胞因子 IL-4、IFN- $\gamma$  水平。结果显示实验组的 IgG1、IgG2a、IgG2b、IFN- $\gamma$  和 IL-4 与空白对照组对比,有显著增加。

宿主对血吸虫的免疫应答阶段,有多种免疫效应细胞和免疫效应分子参与,产生抗感染的免疫效

表3 感染后各组小鼠血清 IgG 亚类和 IgM 抗体水平( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM
蛋白疫苗	10	2.00 ± 0.91 **	0.84 ± 0.76*	1.44 ± 0.85 **	0.51 ± 0.42	1.47 ± 0.68
硫氧还蛋白	10	0.64 ± 0.25	0.29 ± 0.13	0.46 ± 0.32	0.52 ± 0.22	1.14 ± 0.50
空白对照	9	0.41 ± 0.58	0.22 ± 0.33	0.36 ± 0.76	0.38 ± 0.38	1.11 ± 0.96

与空白对照组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

表4 各组小鼠血清 IFN- $\gamma$  和 IL-4 含量(pg/ml  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	IFN- $\gamma$	IL-4
蛋白疫苗	10	24.95 ± 21.97 **	17.26 ± 4.81 **
硫氧还蛋白	10	6.93 ± 1.87	10.98 ± 2.70
空白对照	9	6.82 ± 1.87	11.49 ± 3.22

与空白对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

应(保护性免疫)。这些效应包括由 T 细胞介导的特异性免疫和 B 细胞介导的抗体效应。T 细胞介导的免疫反应类型决定了血吸虫病的进展<sup>[12]</sup>。细胞免疫中根据 Th 型细胞分泌细胞因子的不同,主要分为两大功能群:Th1 型细胞和 Th2 型细胞。Th1 主要分泌 IL-2 和 IFN- $\gamma$ ,促进 IgG2a 和 IgG2b 等亚类的产生,而 Th2 则分泌 IL-4、IL-5 和 IL-10,促进 IgG1、IgE 和 IgA 的合成<sup>[13-14]</sup>。

实验结果提示 Sjtsp2/Sj29 ku 重组抗原增强了特异性抗体 IgG2a、IgG2b 和 IFN- $\gamma$  的产生,此类抗体和细胞因子的免疫机制属于 Th1 免疫应答;同时该重组抗原也增强了 IgG1 和 IL-4 的产生,此类抗体和细胞因子的免疫机制属于 Th2 免疫应答,由此说明了重组 Sjtsp2/Sj29 ku 抗原对小鼠诱发了 Th1/Th2 混合型的免疫反应,从而起到了一定的免疫保护效果。因此这种疫苗的构建方式在血吸虫疫苗研究领域具有潜在的应用价值,为探讨日本血吸虫感染的保护性免疫机制提供有益的实验研究依据。

### 参考文献

[1] 柳建发,廖奇.血吸虫病疫苗研究的回顾与展望[J].宁波大学学报,2012,25(4):111-4.  
 [2] 郑浩,张利娟,朱蓉,等.2011年全国血吸虫病疫情通报[J].中国血吸虫病防治杂志,2012,23(6):559-603.  
 [3] 汪礼文,唐小牛,姚湧,等.日本血吸虫 P14 钙结合蛋白样蛋

白基因真核表达载体的构建、表达和鉴定[J].安徽医科大学学报,2011,46(4):321-3.  
 [4] 郭凡吉,王艳,李晔,等.日本血吸虫重组抗原 SjPGAM-SjEnol 的保护性免疫效果评价[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2010,28(4):246-51.  
 [5] 刘森,朱海玉,彭强,等.日本血吸虫双表膜抗原融合基因原核表达质粒的构建及表达[J].中国生物制品学杂志,2010,23(2):146-9.  
 [6] 李文桂,陈雅棠.日本血吸虫 Sj28GST 疫苗研究进展[J].中国地方病学杂志,2010,29(6):703-5.  
 [7] 冯其梅,张树菊,汪世平.日本血吸虫 DNA 疫苗联合免疫的研究进展[J].中国人兽共患病学报,2012,28(7):728-34.  
 [8] Cardoso F C, Macedo G C, Gava E, et al. *Schistosoma mansoni* tegument protein Sm29 is able to induce a Th1-type of immune response and protection against parasite infection [J]. PLoS Negl Trop Dis 2008, 2 (10): e308.  
 [9] Yuan C, Fu Y J, Li J, et al. *Schistosoma japonicum*: efficient and rapid purification of the tetraspanin extracellular loop 2, a potential protective antigen against schistosomiasis in mammalian [J]. Exp Parasitol, 2010, 12(6):456-61.  
 [10] 王素娟,刘金明,邢荣鹤,等.日本血吸虫基因重组抗原 rSj06868 对小鼠的免疫保护效果[J].中国动物传染病学报,2011,19(2):51-6.  
 [11] 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.  
 [12] Burke M L, Jones M K, Gobert G N, et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis [J]. Parasite Immunol 2009, 31(4):163-76.  
 [13] 张宁,李文桂.日本血吸虫重组两歧双歧杆菌 pGEX-Sj14-3-3 疫苗免疫 BALB/c 小鼠的血清抗体动态观察[J].中国地方病学杂志,2012,31(3):301-4.  
 [14] 王瑜,王波,梁松,等.ICOSL 敲基因小鼠日本血吸虫病模型的免疫应答及其免疫病理[J].中国人兽共患病学报,2012,28(8):769-74.

## Investigation of the anti-schistosomiasis effect of Sjtsp2/Sj29 ku surface membrane protein from *Schistosoma japonicum*

Lei Na<sup>1,2</sup>, Liu Miao<sup>1</sup>, Ren Cuiping<sup>1</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Microbiology and Parasitology, Anhui Medical University Hefei 230032;

<sup>2</sup>Anhui Medical College, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To investigate the anti-schistosomiasis effect of Tsp2/Sj29 ku protein from *Schistosoma*

## PEDF 对人肺腺癌 A549 细胞增殖与凋亡的影响

娄志霞<sup>1</sup> 束军<sup>1</sup> 金程<sup>1</sup> 沈继龙<sup>2</sup>

**摘要** 目的 探讨不同浓度色素上皮衍生因子(PEDF)作用不同时间对体外培养的人肺腺癌 A549 细胞增殖和凋亡的影响。方法 用不同浓度(0、80、160、320、640 nmol/L)的重组人 PEDF 蛋白对体外培养的人肺腺癌细胞株 A549 进行干预,在处理 24、48、72 h 后,分别用 MTT 法检测 PEDF 对 A549 细胞增殖的抑制率并比较;在作用 48 h 后,以流式细胞仪检测技术计算、分析 A549 细胞凋亡率。结果 不同浓度

PEDF(0、80、160、320、640 nmol/L)干预 A549 细胞相同作用时间(24、48、72 h)情况下,随着 PEDF 浓度的增加,PEDF 对 A549 细胞的增殖抑制率递增( $P < 0.05$ );相同 PEDF 浓度(80、160、320、640 nmol/L)情况下,除了 80、160 nmol/L PEDF 作用 24 h 和 48 h 的细胞增殖抑制率间差异无统计学意义外,随着 PEDF 作用时间的延长,PEDF 对 A549 细胞的增殖抑制率也基本呈递增趋势( $P < 0.05$ )。上述不同浓度的 PEDF 处理 A549 细胞 48 h 细胞凋亡率随着 PEDF 浓度的升高呈递增趋势( $P < 0.05$ )。结论 PEDF 在体外能抑制人肺腺癌细胞株 A549 的增殖并诱导其凋亡。PEDF 抑制细胞增殖作用可能和 PEDF 浓度及作用时间有关,PEDF 诱导细胞凋亡作用的强弱也与 PEDF 浓度有一定关系。

**关键词** 色素上皮衍生因子;肺腺癌;A549;细胞增殖;细胞凋亡

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)10-1361-04

2014-05-26 接收

基金项目:安徽省自然科学基金面上项目(编号:1308085MH141);安徽高等学校省级自然科学研究重点项目(编号:KJ2011A173);安徽医科大学科研基金资助项目(编号:2010xkj115);安徽医科大学第四附属医院引进人才科研启动基金资助项目

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学第四附属医院呼吸内科,合肥 230022

<sup>2</sup>安徽病原生物学省级实验室和人兽共患病安徽省重点实验室,安徽医科大学基础医学院病原生物学教研室,合肥 230032

作者简介:娄志霞,女,硕士研究生;

束军,男,医学博士,硕士生导师,责任作者,E-mail:J. Shu@126.com

色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)是 Tombram-Tink et al<sup>[1]</sup>首次在视网膜上皮细胞培养液中发现的一种分泌型糖蛋白,具有

*japonicum*. **Methods** The recombinant protein pet32a/SjTsp2/Sj29 ku induced and expressed by IPTG was purified. Twenty nine female 6-week old mice were randomly divided into 3 groups (Protein vaccine Group, Thioredoxin Group and Control Group). In Protein vaccine Group ( $n = 10$ ), each mouse was immunized subcutaneously with 50  $\mu$ g SjTsp2/Sj29 ku plus equal volume Freund's complete adjuvant in 0 day. 12 and 24 days later, each mouse was re-immunized subcutaneously with 50  $\mu$ g SjTsp2/Sj29 ku plus equal volume Freund's incomplete adjuvant. In Thioredoxin Group ( $n = 10$ ) and Control Group ( $n = 9$ ), each mouse was immunized with thioredoxin and saline respectively. Ten days after last immunization, each mouse was challenged with  $30 \pm 2$  cercaria of *Schistosoma japonicum*. On the 45th day post-infection, the mice were executed. The worm and egg reduction rates were calculated. The sera was collected from orbital blood. The levels of IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 and IgM antibodies in mouse sera were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The level of IFN- $\gamma$  and IL-4 was also detected by ELISA. **Results** Pet32a/SjTsp2/Sj29 ku was obtained as expected. The worm reduction rates and egg reduction rates in Protein vaccine Group were 23.95% ( $P < 0.05$ ) and 55.57% ( $P < 0.05$ ) respectively, compared with the Control Group. There was no statistical significance ( $P > 0.05$ ) between Thioredoxin Group and Control Group in worm reduction rates and egg reduction rates. In Protein vaccine Group, IgG1, IgG2a and IgG2b were remarkably higher than that of Control Group, while IgG3 and IgM did not remarkably change. In comparison with the Control Group, the levels of IFN- $\gamma$  and IL-4 of the mice in Protein vaccine Group were obviously augmented ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The mice, which have been immunized with Tsp2/Sj29 ku show a partial immune protection; the protein vaccine of SjTsp2/Sj29 ku could induce the mixed immune responses of Th1 and Th2.

**Key words** *Schistosoma japonicum*; surface membrane protein; protein vaccine