

CT/99mTc-GSA SPECT fusion images correlates well with post-operative liver function parameters[J]. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2010, 17: 673-681.

[22] Wilmar de Graaf, Roelof J, Bennink, et al. Nuclear Imaging Techniques for the Assessment of Hepatic Function in Liver Surgery and Transplantation[J]. J Nucl Med, 2010, 51: 742-752.

[23] Schindl MJ, Redhead DN, Fearon KC, et al. Edinburgh Liver Surgery and Transplantation Experimental Research Group (eLISTER). The value of residual liver volume as a predictor of

hepatic dysfunction and infection after major liver resection[J]. Gut, 2005, 54: 289-296.

[24] Zheng-Gui Du, Bo Li, Yong-Gang Wei, et al. A new scoring system for assessment of liver function after successful hepatectomy in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2011, 10(3): 265-269.

(收稿日期: 2011-10-15)

• 综 述 •

猪带绦虫 cC1 疫苗研制现状*

李文柱[△]综述, 陈雅棠 审校

(重庆医科大学附属第一医院传染病寄生虫病研究所 400016)

关键词: 有钩绦虫; 囊尾蚴; 疫苗; 综述; cC1

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 10. 037

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)10-1227-02

猪囊尾蚴病(cysticercosis cellulosae)又称猪囊虫病(bladder disease),是国家卫生部规划防治的重点寄生虫病之一。

猪囊尾蚴病常用吡喹酮、阿苯达唑和甲苯达唑等药物化疗,但长期使用化疗药物具有一定不良反应,且易产生抗药性,这就需要研究更有效的防治措施。Molinari 等^[1]用 120 μg 猪带绦虫(taenia solium, Ts)囊尾蚴抗原皮下注射免疫仔猪,在免疫后 7 d 进行加强,在加强后 15 d 口服 8.4 × 10³ 个 Ts 虫卵进行攻击,在攻击后 99 d 剖杀发现免疫组减蚴率为 85.1%,完全保护力达 33.3%(2/6),提示 Ts 囊尾蚴抗原可诱导宿主产生有效保护力。方文等^[2]发现囊虫病猪肝、脑、骨骼肌和心肌等组织中白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-8、肿瘤坏死因子 α(tumour necrosis factor α, TNF-α)和可溶性白细胞介素 2 受体(soluble interleukin 2 receptor, SIL-2R)在感染后 40~80 d 升高,在感染后 40 d 达较高水平。叶红和王丽^[3]研究表明脑囊虫病者外周血 CD3⁺ T 细胞数目减少,该细胞可分泌高水平 IL-4、IL-10,以及低水平 IL-2、γ 干扰素(interferon γ, IFN-γ);经丙硫咪唑治疗后 CD3⁺ T 细胞接近正常,并可分泌高水平 IL-2、IFN-γ,以及低水平 IL-4、IL-10,表明免疫细胞和细胞因子在猪囊虫病免疫发病机制中具有重要作用。国内外学者对 Ts cC1 疫苗进行了深入研究,本文从 cC1 起源、DNA 疫苗和蛋白质疫苗三方面综述如下。

1 cC1 起源

1997 年孙树汉等^[4]对 Ts 囊尾蚴 cDNA 文库进行免疫学筛选时发现了一个具有免疫保护作用的抗原,命名为 cC1 抗原。由于该抗原基因序列具有 4 个膜联蛋白家族保守序列,故将其归属于膜联蛋白家族,命名为膜联蛋白 32。王庆敏等^[5]发现 cC1 抗原位于 Ts 囊尾蚴囊壁,头部和肌肉组织含量较少,推测是一种分泌蛋白。进一步研究表明, cC1 抗原可抑制磷脂酶 A2 活性,具有抗血栓和抗凝血功能,可能参与寄生虫与宿主之间信号传导。杨湘越等^[6]克隆了 cC1 抗原的一个

cDNA 片段,其长度为 1 350 bp,其中开放阅读框为 1 014 bp,可编码 347 个氨基酸蛋白质,理论相对分子质量为 38 × 10³。Zhang 等^[7]发现 cC1 抗原的主要二级结构是 α-螺旋,当其与 Ca²⁺ 结合时可提高热稳定性。

2 cC1 DNA 疫苗

2.1 pCD-cC1 Wolff 等(1990 年)将编码功能蛋白的质粒 DNA 肌注小鼠,发现质粒 DNA 可在局部肌肉组织表达。这种 DNA 既是载体,又是抗原来源,故称为 DNA 疫苗,从而为疫苗发展开拓了一条崭新途径。吴丹等^[8]以 pUC-cC1 为模板进行 PCR 扩增 1.35 kb cC1 基因,插入 pCDNA3.1,构建 pCD-cC1。将 50 μg 重组质粒肌注免疫昆明种小鼠,在第 1 次免疫后 2 周进行加强,发现免疫鼠血清 IgG 在第 1 次免疫后 3~8 周升高,在第 1 次免疫后 8 周达较高水平;IgG2a 在第 1 次免疫后 3~10 周升高,在第 1 次免疫后 4 周达较高水平。随后将 100 μg 重组质粒肌注免疫仔猪,在第 1 次免疫后 2 周进行加强,在加强后 1 周用 2 × 10⁴ 个 Ts 虫卵灌胃进行攻击,在攻击后 90 d 剖杀发现免疫组减蚴率为 73.0%,提示 pCD-cC1 可诱导宿主产生一定保护力。

Wang 等^[9]采用脂质体转染法将 pCD-cC1 转染 COS7 真核细胞,37 °C 培养 6~72 h 经酶联反应吸附试验证实该细胞表达 cC1 蛋白。然后将 100 μg 重组质粒肌注免疫 BALB/c 小鼠,在免疫后 2、4 周加强 2 次,在末次免疫后 1 周发现免疫鼠脾细胞明显增殖,可分泌高水平 IL-2,但不分泌 IL-4;末次免疫后 8 周鼠血清可与猪囊尾蚴囊壁细胞起反应。随后用 500 μg 重组质粒肌注免疫仔猪,在第 1 次免疫后 2 周进行加强,在加强后 1 周用 2 × 10⁴ 个 Ts 虫卵灌胃进行攻击,在攻击后 90 d 剖杀发现免疫组减蚴率为 73.3%;免疫组猪囊尾蚴细胞凋亡数明显增加,提示 Th1 应答可能参与 pCD-cC1 诱导的保护性免疫反应。

吴丹等^[10]用 100 μg pCD-cC1 肌注免疫 BALB/c 小鼠,在

* 基金项目:国家自然科学基金委员会资助项目(30801052、30671835、30500423、30200239)。△ 通讯作者, Tel: 13883202226; E-mail: cqliwengui@163.com。

第 1 次免疫后 10 d 用重组质粒 pCD-cC1 加强第 1 次, 在第 1 次免疫后 20 d 用 20 μg 重组抗原 cC1-GST 和 20 μg 弗氏完全佐剂 (freund's complete adjuvant, FCA) 皮下注射加强第 2 次, 在加强后 1 周发现免疫鼠血清 IgG、IgG1、IgG2a 明显升高, 脾细胞显著增殖, 并可分泌高水平 IFN- γ 和 IL-4, 提示用重组质粒 pCD-cC1 和重组抗原 cC1-GST 进行联合免疫可诱导 Th1、Th2 混合型免疫应答。

Li 等^[11] 将 100 μg pCD-cC1 肌注免疫 C57BL/6 鼠, 在免疫后 2、4 周加强 2 次, 在末次免疫后 2 周发现免疫鼠血清 IgG 在第 1 次免疫后 2~10 周升高, 在第 1 次免疫后 6 周达较高水平, 脾细胞明显增殖, 血清蛋白组学分析发现血清中有 14 种蛋白上调, 15 种蛋白下调; 而 cC1 抗原对照组血清中仅有 9 种蛋白上调, 10 种蛋白下调。

2.2 pCD-IL-4/cC1 IL-4 主要是由 Th2 细胞产生的细胞因子, 其可激活 B 细胞产生 IgG1、IgE 抗体, 在体液免疫应答中有重要作用。推测将 IL-4 编码基因与 cC1 抗原编码基因进行融合后表达的融合蛋白可能会增强宿主免疫应答。吴丹等^[12] 以 pUC-IL-4 和 pUC-cC1 为模板进行 PCR 分别扩增 0.4 kb IL-4 编码基因和 1.0 kb cC1 编码基因, 通过双酶切连接 IL-4-cC1 基因, 将其导入 pCDNA3.1, 成功构建 pCD-IL-4/cC1 质粒, 但未进行保护力实验。

3 cC1 蛋白质疫苗

Guo 等^[13] 用 200 μg 重组抗原 cC1-GST 加 0.2 mL FCA 皮下注射免疫仔猪, 在免疫后 6 周用 2×10^4 个 Ts 虫卵灌胃进行攻击, 在攻击后 8 周剖杀发现免疫组减蛹率为 85.0%, 提示 cC1-GST 有一定免疫原性。然后用 cC1-GST 加 FCA 皮下注射免疫仔猪, 在第 1 次免疫后 2、4 周用 cC1-GST 加弗氏不完全佐剂 (freund's incomplete adjuvant, FIA) 加强 2 次, 在末次免疫后 6、12 周或 20 周进行攻击, 在攻击后 8 周剖杀发现末次免疫后 6、12 周或 20 周进行攻击的免疫组减蛹率分别为 93.0%、84.0%、61.0%, 表明用 cC1-GST 免疫 3 次, 在末次免疫后 6 周进行攻击是一个较好的免疫程序。随后用 pCD-cC1 免疫仔猪, 在第 1 次免疫后 2、4 周用 cC1-GST 加强 2 次, 在末次免疫后 6、12 周或 20 周进行攻击, 在攻击后 8 周发现末次免疫后 6、12 周或 20 周进行攻击的免疫组减蛹率分别为 85.0%、77.0%、72.0%, 说明先用 pCD-cC1 免疫, 再用 cC1-GST 进行加强可诱导宿主产生一定保护力。最后用 pCD-cC1 免疫仔猪, 在免疫后 2、4 周用 cC1-GST 加强 2 次, 在末次免疫后 6 周发现免疫组血清 IgG、IgG1、IgG2a 明显升高, 脾细胞显著增殖。在末次免疫后 6 周进行攻击, 在攻击后 8 周剖杀发现免疫组减蛹率达 79.0%, 提示用重组质粒 pCD-cC1 加重重组抗原 cC1-GST 进行联合免疫可产生较好免疫效果。

4 结 语

现有研究表明, 大部分 Ts cC1 疫苗具有一定免疫原性, 可诱导宿主产生一定保护力, 但还存在下述问题: 疫苗与宿主之间相互作用机制的研究尚不深入, 人用佐剂研究尚不理想, 保护性抗原分离和基因克隆以及优势抗原筛选与组合尚不完善, 疫苗效果标准化和规范化评价体系尚未建立, 疫苗免疫途径、剂量、次数、间隔以及末次免疫后 Ts 虫卵攻击时间尚未摸索清楚, 新型 Ts 疫苗研制尚缺乏创新思维^[14-15]。

作者认为多抗原组合、多抗原表位组合或多基因联合将是猪囊虫病疫苗研究方向。由于猪囊虫病抗原成分复杂, 各种抗原在体内诱导的免疫应答有所不同, 所以, 将多种抗原分子联合制成多价疫苗可起协同作用; 将多个抗原位点连在一起或在注入 DNA 疫苗或重组抗原同时注入细胞因子质粒 DNA 或细胞因子重组表达产物可能会诱导较强免疫应答; 在同一载体 2 个启动子下分别插入抗原基因和细胞因子基因构建核酸疫苗, 使其表达独立进行, 可避免两个基因串联所造成相互干扰。相信随着这些问题的阐明, 将对 cC1 疫苗用于猪囊虫病的免疫预防充满信心。

参考文献:

- [1] Molinari JL, Meza R, Suarez B, et al. Taenia Solium, immunity in hogs to the cysticercus[J]. Exp Parasitol, 1983, 55(4): 340-357.
- [2] 方文, 包怀恩, 肖靓靓, 等. 感染猪囊尾蚴的家猪组织中不同时间 IL-6、IL-8、TNF- α 和 SIL-2R 含量变化[J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(6): 556-559.
- [3] 叶红, 王丽. 脑囊虫病治疗前后 Th1/Th2 细胞因子的检测[J]. 中国人兽共患病杂志, 2005, 21(4): 361-363.
- [4] 孙树汉, 王俊霞, 陈蕊雯, 等. 囊虫病诊断用抗原编码 cDNA 的分子克隆[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1997, 15(1): 15-20.
- [5] 王庆敏, 胡振林, 王中川, 等. 猪囊尾蚴 Annexin32 的组织定位[J]. 第二军医大学学报, 2002, 23(8): 830-832.
- [6] 杨湘越, 兰小鹏, 颜宏利, 等. 毕赤酵母重组猪囊尾蚴抗原 cC1 的特征性研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(3): 241-243, 253.
- [7] Zhang Y, Wang KH, Guo YJ, et al. Annexin B1 from Taenia solium metacestodes is a newly characterized member of the annexin family[J]. Biol Chem, 2007, 388(6): 601-610.
- [8] 吴丹, 郭赢军, 林懿, 等. 猪囊尾蚴抗原 DNA 疫苗诱导的免疫保护反应[J]. 第二军医大学学报, 2000, 21(6): 508-510.
- [9] Wang QM, Sun SH, Hu ZL, et al. Immune response and protection elicited by DNA immunization against Taenia cysticercosis[J]. Vaccine, 2003, 21(15): 1672-1680.
- [10] 吴丹, 王庆敏, 陈蕊雯, 等. 猪囊尾蚴抗原 cC1 DNA 疫苗和蛋白质疫苗联合诱导小鼠免疫应答[J]. 第二军医大学学报, 2004, 25(1): 34-36.
- [11] Li DA, He Y, Guo YJ, et al. Comparative proteomics analysis to annexin B1 DNA and protein vaccination in mice[J]. Vaccine, 2007, 25(9): 932-938.
- [12] 吴丹, 郭赢军, 孙树汉, 等. 猪囊尾蚴抗原与猪白细胞介素-4 基因融合 DNA 疫苗载体的构建[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1999, 17(3): 172-174.
- [13] Guo YJ, Sun SH, Zhang Y, et al. Protection of pigs against Taenia solium cysticercosis using recombinant antigen or in combination with DNA vaccine[J]. Vaccine, 2004, 22(29/30): 3841-3847.
- [14] 李文桂, 陈雅棠. 血吸虫 31×10^3 组织蛋白酶疫苗的研究现状[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(4): 351-353.
- [15] 尹静波, 黄永富. 炎性细胞因子在支气管哮喘发病机制中的作用[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(10): 1087-1089.

(收稿日期: 2011-10-12)