

血吸虫病疫苗研究的回顾与展望

柳建发, 廖 奇

(宁波大学 医学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 血吸虫病是一种严重的人兽共患病。目前的化疗和疫苗研究为彻底消灭该病提供了一种综合方法。通过对血吸虫病疫苗研究的回顾与展望, 以期为进一步的临床应用寻找新的突破点。

关键词: 血吸虫病; 疫苗研究; 综述

中图分类号: R532.21

文献标识码: A

文章编号: 1001-5132 (2012) 04-0111-04

血吸虫病是一种严重危害人体健康的人兽共患寄生虫病, 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。近年来, 在我国南方 12 个省的 449 个血吸虫流行县中, 仍有 90 个县的疫情尚未得到控制, 将近 50 万人转化为慢性血吸虫病人。

吡喹酮虽能杀灭人体内的成虫, 却无法逆转虫卵对肝脏的破坏, 也不能降低再次感染的几率, 而且还面临着化疗成本高、血吸虫虫株出现抗药性等问题。鉴于历史上许多感染性疾病的治疗和控制均依赖于高效疫苗的成功研制及其合理应用, 启发人们寻求研制安全有效的抗血吸虫病疫苗。

血吸虫病疫苗的研究已有 80 多年的历史, 主要集中在蛋白质疫苗、核酸疫苗和血吸虫混合疫苗等几个方面。总体来讲, 大致经历了死疫苗、减毒活疫苗、基因工程重组疫苗、抗独特性抗体疫苗、DNA 疫苗、复合肽疫苗、载体与佐剂的应用等几个阶段。发展有效的抗日本血吸虫疫苗正处在一个重要的阶段, 到目前为止进展仍相对缓慢。疫苗研制的目标是预防感染或减少患病宿主排卵。血吸虫在终宿主组织中并不增殖, 一次感染后宿主体内的成虫负荷减少, 病理损害自发性减轻, 血吸虫感染的这两个主要特性是研究血吸虫病疫苗的基础。发展日本血吸虫疫苗的主要困难在于: (1) 日本血吸虫病程多变, 单独一种疫苗不可能针对多

个疾病阶段均产生有效的保护力。(2) 日本血吸虫和大多数寄生虫一样, 具有多种免疫逃避手段, 尽管致弱尾蚴和童虫疫苗虽能诱导出一个相对较高的保护性水平, 但由于虫体未被杀死, 用其免疫人体具有一定的危险性。然而, 最近在寻找重要的日本血吸虫抗原取得进展以及重组 DNA 技术的应用都为进一步的疫苗研究激发了新的突破点^[1]。笔者谨就血吸虫病疫苗的最新研究成果进行综述并提出展望。

1 蛋白质疫苗研究

蛋白质疫苗是血吸虫疫苗的一个主要类型。蛋白质疫苗的抗原包括酶性抗原、肌相关蛋白、膜相关蛋白、钙相关蛋白、线粒体相关蛋白、信号蛋白、卵相关蛋白等。其候选抗原分子表现为副肌球蛋白、谷胱甘肽转移酶(GST)、钙离子激活蛋白激酶、磷酸丙酮异构酶、虫膜蛋白、信号蛋白 14-3-3、脂肪酸结合蛋白、重组蛋白和表位肽、磷酸甘油醛脱氢酶等。

2 DNA 疫苗的研究

传统疫苗的发展因成本高、免疫源性以及安全隐患受到限制。因此, DNA 疫苗成为近年来的研究重点。为提高 DNA 疫苗的免疫保护力, 候选抗原的筛选、质粒载体的优化、基因佐剂的选用、多价疫苗的构建、不同种疫苗的交叉免疫、改善免疫方

式和免疫途径等被认为是血吸虫 DNA 疫苗的优化策略^[2]。在血吸虫 DNA 疫苗的研究中,国外学者对曼氏血吸虫病的研究较多,而国内学者则主要研究日本血吸虫病的疫苗^[3]。

2.1 日本血吸虫 26 kDa 谷胱甘肽 S-转移酶 DNA 疫苗研究

有学者分别将 pCD-Sj26、pBK-Sj26 及 pBK-CMV 肌注 BALB/c 小鼠,免疫 3 次后,用日本血吸虫尾蚴攻击感染免疫小鼠。结果发现, pCD-Sj26 和 pBK-Sj26 免疫鼠减虫率分别为 37.19%和 44.44%,肝组织减卵率为 73.80%和 47.20%,每对成虫产卵减少 56.88%和 15.67%。表明日本血吸虫 Sj26 DNA 疫苗免疫小鼠后能诱生一定水平的抗血吸虫抗体,同时可减轻宿主肝组织血吸虫虫卵所致的病理损害作用^[4]。

2.2 日本血吸虫 97 kDa DNA 疫苗与致弱尾蚴疫苗诱导免疫应答特征比较

国外研究者以 Sj97 DNA 核酸疫苗经后腿胫前肌免疫 C57BL/6 小鼠共 2 次,每次间隔 3 周,末次免疫后 3 周攻击感染日本血吸虫尾蚴;UVC 疫苗接种同种小鼠后 5 周攻击感染上述等量尾蚴,均于攻击感染后 7 周计数虫负荷及肝卵负荷,并设空质粒对照及感染对照组。用 ELISA 分析免疫鼠攻击感染前后血清特异性 IgG、IgA 及亚型抗体水平,以及脾淋巴细胞体外诱生的细胞因子水平。得到 Sjc97 DNA 疫苗及 UVC 疫苗免疫小鼠均诱生出以 Th1 型免疫应答为主的 IL-2、IFN- γ 及特异性抗 AWA、SEA IgG2a、IgG2b 亚型及 IgA 抗体,攻击感染后 7 周,两疫苗组小鼠 Th2 型免疫应答虽有所增强,但仍以 Th1 型免疫应答占优势;而空质粒对照组和感染对照组小鼠则以 Th2 型免疫应答为主。核酸疫苗与紫外线致弱尾蚴疫苗均能诱导产生抗感染免疫保护力,致弱尾蚴疫苗的免疫保护力高于 Sjc97 DNA^[5]。

2.3 日本血吸虫 Sj23 DNA 疫苗的增效研究

以探讨缺失肿瘤转移有关基因 ME491 同源序列的日本血吸虫 Mr23000 膜蛋白基因(Sj23 DNA)突变体疫苗的免疫效果为目的,将 Sj23 DNA 中与人黑素瘤细胞膜上的 ME491 同源序列进行基因缺失突变,再将突变基因转染真核细胞人胚肾 HEK293 细胞,通过间接荧光抗体实验(IFAT)检测

其表达情况。免疫后 4 周用尾蚴攻击感染(每只(40 $\pm$ 2)条)。第 42 天剖杀,结果 pcDNA3-Sj23 突变体疫苗在真核细胞 HEK293 中瞬时表达。pcDNA3-Sj23 突变体在小鼠注射部位骨骼肌细胞上出现较强荧光,空白对照组未见特异性荧光。pcDNA3-Sj23 突变体获得 40.3%减虫率和 42.8%减卵率,pcDNA3-Sj23 获得 33.1%减虫率和 28.9%减卵率^[6-7]。

2.4 日本血吸虫 DNA 多价疫苗 pVIVO₂SjFABP-23 的构建及其保护性免疫

研究者主要以构建日本血吸虫多价 DNA 疫苗 pVIVO₂SjFABP-23 为目的,观察其在小鼠抗血吸虫感染中的免疫保护作用。方法是根据 SjFABP 和 Sj23 的基因序列合成两对特异性引物,利用重组 PCR 技术将日本血吸虫 SjFABP 和 Sj23 的基因片段进行拼接,得到融合基因 SjFABP-23,再将该片段重组于 p GEM-T 载体中,进行 PCR 扩增及 DNA 序列测定,PCR 扩增出一条约为 1.1 kb 的目的片段。结果免疫小鼠获得 52.14%减虫率($P<0.05$)和 60.93%的减卵率($P<0.01$)。CR 成功扩增 SjFABP-23 的基因片段,血吸虫 DNA 多价疫苗 pVIVO₂SjFABP-23 构建成功,该疫苗在小鼠抗血吸虫感染中具有一定的免疫保护作用^[8-9]。

3 分子疫苗的研究

目前,血吸虫疫苗的研究是对血吸虫病防治策略的一个重要补充,现已发现许多具有一定保护力的分子疫苗。

3.1 日本血吸虫天然分子疫苗的结构与功能分析

为了进一步了解分子抗原的结构和功能特性,采用高效液相离子交换法对电泳纯 SIEA28 kDa 抗原组分进一步分离纯化,对获得的色谱纯 SIEA28 kDa 抗原分子进行薄层等电聚焦分析,测定其等电点。结果证明,电泳纯 SIEA28 kDa 抗原分子经高效液相离子交换法纯化后,280 nm、220 nm 波长色谱图均为一个两侧对称、光滑的高峰曲线^[10]。

3.2 抗日本血吸虫病分子疫苗(SIEA28 kDa)氨基酸组成的分析

研究者采用邻苯二甲醛(OPA)柱前衍生反相高效液相色谱法测定 SIEA28 kDa 抗原组分样品中氨基酸成分,并在 Expasy 中进行数据的分析与比较。结果显示: SIEA28 kDa 分子抗原主要由 13 种氨基

酸组成. SIEA28 kDa 分子可能不是 6 种 Score 值较高的血吸虫蛋白质分子中的任何 1 种, 但与它们在氨基酸组成上具有较高的相似性, 而与 GST 相似性较低^[11].

4 童虫活细胞疫苗

研究者采用日本血吸虫肝期童虫的活细胞和虫体组织碎片, 在未加佐剂条件下分别接种昆明小鼠, 感染后第 42 天解剖小鼠, 与对照组比较检测和分析虫体发育数、虫体大小、鼠肝病变及其组织内虫卵肉芽肿大小、血清中特异性抗体水平和 IgG2a/IgG1 亚类比值. 结果发现, 虫体发育数分别下降了 67.6% 和 46.3%; 肝组织中虫卵数在细胞接种组合虫体碎片接种组中分别减少 95.4% 和 64.8%; 在细胞接种鼠组肝表面卵结节和虫卵肉芽肿及雄虫长度均显著小于其他两组者特异性, 但总抗体水平低于虫体接种组. 该研究的机制可能主要为 Th1 介导细胞免疫应答^[12].

5 疫苗候选分子的研究

5.1 日本血吸虫疫苗候选分子 Calpain 的原位表达

国外研究者采用重组纯化的 Calpain 抗原免疫大鼠, 制备抗 Calpain 血清, 从感染鼠灌流分离的日本血吸虫成虫被切片, 用羊抗大鼠 IgG 抗体作为二抗进行免疫组织化学分析, 观察 Calpain 特异性抗体. 研究结果显示重组 Calpain 抗原免疫大鼠后, 产生了一个极高的抗 Calpain 特异性抗体, 而且大多数表达在成虫真皮层. 日本血吸虫钙离子激活的中性蛋白激酶主要分布在成虫肌肉和真皮层, 提示 Calpain 可能是日本血吸虫的一个疫苗候选分子^[13-14].

5.2 日本血吸虫疫苗候选分子的基因克隆、表达及特性鉴定

采用日本血吸虫成虫抗原的兔血清从日本血吸虫中国大陆株成虫 cDNA 库筛选出 Sj22.6 基因克隆; 用根据曼氏血吸虫 23 kDa 膜抗原(Sm23)的编码基因设计的引物, 以 PCR 法从日本血吸虫成虫 cDNA 库扩增出 Sj23 基因; 用根据日本血吸虫菲律宾株的磷酸丙糖异构酶(SjTPI)基因设计的引物, 以 RT-PCR 从日本血吸虫中国大陆株成虫 mRNA 扩增出 SjTPI 基因, 并测得了上述 3 个基因的核苷酸序列. 用 rSj22.6 免疫家兔和小鼠, 均可

诱导明显升高的 IgG 抗体, 其可特异地识别 rSj22.6, 还可识别成虫抗原中天然的相应分子, 但不能识别虫卵抗原中的任何成份. 用 rSj22.6 对昆明鼠以及 BALB/c 小鼠分别作免疫攻击实验, 前者可产生 38.93% 的减虫率, 后者可产生 32.1%~35.27% 的减虫率和 28.4% 的总体减卵率. Sj22.6/Sj26GST 融合蛋白可诱导 BALB/c 小鼠产生 34.9% 的减虫率和 45.1% 总体减卵率. 用 rSj62 对 BALB/c 小鼠的免疫攻击试验显示, 其可诱导 40.1% 减虫率及 49.2% 总体减卵率. 为了获得更多新的 Sj 疫苗候选分子, 用多克隆抗体从 Sj 成虫 cDNA 库中筛选得 36 个阳性克隆, 通过 PCR 银染测序法测得 8 个克隆的部分序列, 其中有 3 个克隆的基因片段在 Genebank 中尚未发现, 为新的 Sj 基因^[15-16].

6 混合疫苗

混合疫苗综合了蛋白质疫苗和 DNA 疫苗的优点, 将蛋白疫苗与 DNA 疫苗进行联合免疫, 也取得了较好的效果.

7 展望

寻找新的有效的候选疫苗抗原基因或通过优化组合新抗原分子以提高免疫保护都是疫苗研究的热点. 国内已研究出疫苗的候选抗原分子达 30 多种, 而且 DNA 疫苗和分子疫苗、联合疫苗的出现、复合疫苗或鸡尾酒疫苗的应用, 给人类抗血吸虫感染带来了新的希望. 基因组学、蛋白质组学的快速发展及其在血吸虫病疫苗研制领域的应用, 将使血吸虫病的疫苗研究拥有更大的发展空间. 采用联合免疫方案, 针对血吸虫不同发育阶段、不同部位的抗原表位, 诱导不同免疫杀虫机制, 可能会克服单个抗原分子诱导的免疫保护水平较低的问题, 这将成为血吸虫病疫苗研究发展的趋势. 总之, 对日本血吸虫疫苗的研究已取得了较大进展. 流行病学调查发现日本血吸虫疫苗的研究对血吸虫病的控制是一种非常有效的手段, 有助于理解联合疫苗在实验室使用的实际过程和在人体使用的前景.

参考文献:

- [1] Zhu Y H, Han Q X, Ren W, et al. Construction and

- identification of a mutant of Sj23 DNA vaccine against schistosomiasis[J]. Chin J Schisto Control, 2006, 18: 334-336.
- [2] Zhu Yinchang, Ren Jiangong, Akram Da'dara, et al. The protective effect of a Schistosoma japonicum Chinese strain 23 kDa plasmid DNA vaccine in pigs is enhanced with IL-12[J]. Vaccine, 2004, 23:78-83.
- [3] Scott J C, McManus D P. Characterization and expression of cDNA encoding the 80 kDa large subunit of Schistosoma japonicum calpain[J]. Parasitol Int, 2000, 48:205.
- [4] Tan Hongzhuan, Yang Meixia, Wu Zhingang, et al. Rapid screening method for Schistosoma japonicum infection using questionnaires in flood area of the People's Republic of China[J]. Acta Tropica, 2004, 90(1):1-9.
- [5] McManus D P. A vaccine against Asian schistosomiasis: The story unfolds. Int[J]. J for Parasitology, 2000, 30:265-271.
- [6] Gryseels B. Schistosomiasis vaccine: A devils'advocate view[J]. Parasitology Today, 2000, 16(2):46-48.
- [7] Robert Berquist, Maged Al-Sherbiny, Rashida Barakat. Blueprint for schistosomiasis vaccine development[J]. Acta Tropica, 2002, 82:183-192.
- [8] Karl-Horst Bichler, Henry Botto, Mete Cek, et al. EAU guidelines for the management of urogenital schistosomiasis [J]. European Urology, 2006, 49:998-1003.
- [9] Jeffrey M Bethony. Can schistosomiasis really be consigned to history without a vaccine?[J]. Vaccine, 2008, 26:3373-3376.
- [10] Sergio C Oliveira, Cristina T Fonseca, Fernanda C Cardoso, et al. Recent advances in vaccine research against schistosomiasis in Brazil[J]. Acta Tropica, 2008, 108:256-262.
- [11] Gryseels B. Schistosomiasis vaccines: The devils' advocate's final plea[J]. Parasitology Today, 2000, 16(8): 357.
- [12] Chacon N, Losada S, Bermudez H. Immunogenicity of polymerizable synthetic peptides derived from a vaccine candidate against schistosomiasis: The asparaginyl endopeptidase (Sm32)[J]. Immunology Letters, 2003, 88: 199-210.
- [13] Julie S Solomon, Christian P Nixon, Stephen T McGarvey. Expression, purification, and human antibody response to a 67 kDa vaccine candidate for schistosomiasis japonicum[J]. Protein Expression and Purification, 2004, 36:226-231.
- [14] Luis G C Pacheco, Eder Zucconi, Vitor L T Mati. Oral administration of a live attenuated Salmonella vaccine strain expressing 14 kDa Schistosoma mansoni fatty acid-binding protein induced protection against experimental schistosomiasis[J]. Acta Tropica, 2005, 95: 132-142.
- [15] Alex Loukas, Mai Tran, Mark S Pearson. Schistosome membrane proteins as vaccines[J]. International J for Parasitology, 2007, 37:257-263.
- [16] Afzal A Siddiqui, Troy Phjillips, Hugues Charest, et al. Enhancement of Sm-p80 induced protective immunity against Schistosoma mansoni through co-delivery of interleukin-2 and interleukin-12 in a DNA vaccine formulation[J]. Vaccine, 2003, 21:2882-2889.

Research on Anti-schistosomiasis Vaccine: Review and Prospect

LIU Jian-fa, LIAO Qi

(School of Medicine, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Schistosomiasis is characterized as a zoonosis that has been causing major health problems worldwide. Until now anti-schistosomiasis chemotherapy and vaccine treatment have been proven to be an effective way to eradicate this disease. In this paper, the research progress on anti-schistosomiasis vaccine is summarized. In addition, the author also presents some view points aiming to serve the purpose of seeking new breakthroughs in clinical applications of the vaccine.

Key words: schistosomiasis; vaccine research; review

(责任编辑 史小丽)