

日本血吸虫信号转导蛋白 *Sjwnt-4* 基因的克隆、表达及功能分析 Cloning, Expression and Characterization of a Gene Encoding Signal Transduction Protein Wnt4 of *Schistosoma japonicum*

陶丽红, 姚利晓, 傅志强, 冯新港, 刘金明, 石耀军, 苑纯秀*, 蔡幼民, 林矫矫*

TAO Li-Hong, YAO Li-Xiao, FU Zhi-Qiang, FENG Xin-Gang, LIU Jin-Ming, SHI Yao-Jun, YUAN Chun-Xiu*, CAI You-Min and LIN Jiao-Jiao*

中国农业科学院上海兽医研究所, 国家防治动物血吸虫病专业实验室, 农业部动物寄生虫学重点开放实验室, 上海 200232
Shanghai Veterinary Research Institute of CAAS, National Laboratory of Animal Schistosomiasis Control, Key Laboratory of Animal Parasitology Ministry of Agriculture, Shanghai 200232, China

摘 要 由 Wnt 基因家族产物与其它相关基因产物构成的 Wnt 信号通路, 是细胞发育和生长调节的一个关键途径, 对动物的发育特别是生殖系统的发育起重要的调节作用。在人类和小鼠中, Wnt4 蛋白是性腺分化过程中主要调节因子, 在胚胎发育中起着关键作用。利用 RACE 技术从日本血吸虫 19d 童虫中首次扩增到一个 Wnt 家族基因, 序列分析表明该基因的完整编码框含 1311bp, 编码 436 个氨基酸, 理论分子量 49.6kD。同源性分析结果表明, 该基因的氨基酸序列具有典型 Wnt 家族蛋白特征, 与日本三角涡虫、人 Wnt4 的氨基酸序列相似性分别达 43%、37%, 推测为血吸虫的 Wnt4 基因, 命名为 *Sjwnt4* (GenBank 登陆号 DQ643829)。实时定量 PCR 分析显示该基因在 14d 童虫、19d 童虫、31d 虫体、44d 雌虫及 44d 雄虫中均有表达, 其中 19d 童虫中的表达量明显高于其它发育阶段, 44d 雌虫中的表达量明显高于雄虫。构建了该基因的原核表达载体 pGEX-4T-2-*Sjwnt4*, 应用大肠杆菌系统进行了表达, 表达蛋白以包涵体形式存在, Western 印迹显示表达产物能被日本血吸虫成虫粗抗原免疫血清所识别。*Sjwnt4* 基因及其表达产物的获得, 为探索 Wnt 信号通路对血吸虫发育、生殖的调节提供了重要基础。

关键词 日本血吸虫, 信号转导, Wnt4, 发育, 差异表达

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)03-0392-06

Abstract Wnt proteins together with their downstream effectors forms a set of important signal pathways. The Wnt signal pathway is important in a wide variety of development processes including cell growth, cell differentiation, cell polarity and apoptosis. Wnt4 is a key regulator of gonadal differentiation in humans and mice, playing a pivotal role in early embryogenesis. With RACE technique based on a EST identified in our lab, a novel gene including a complete open reading frame was cloned and named *Sjwnt4* (GenBank accession No. DQ643829). Sequence analyses showed that *Sjwnt4* had a typical characteristics of Wnt family proteins, sharing 43% similarity to *Dugesia japonica* and 37% to human Wnt4. The ORF of *Sjwnt4* contains 1311 nucleotides, encoding 436 amino acid with 49.6 kD molecular weight. Real-time PCR analysis from the worms of various stages of *S. japonicum* revealed that the mRNA level of *Sjwnt4* is highest in the 19 days schistosomula, followed by 44 days female

Received: November 9, 2006; Accepted: December 31, 2006.

This work was supported by the grants from the National Natural Science Foundation (No. 30600450, No. 30471299 and No. 30671581) and Shanghai Important Key Tackling Project (No. 03DZ19231).

* Corresponding author. Tel: +86-21-54083234; E-mail: caassp@public.sta.net.cn

国家自然科学基金项目(No. 30600450, No. 30471299 和 No. 30671581)和上海市重大科技攻关项目(No. 03DZ19231)资助。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

worms, 14 days schistosomula, 31 days adult worms and 44 days male worms, suggesting a stage-and-gender differential express. The *Sjwnt4* cDNA fragment was subcloned into a modified expression vector pGEX-4T-2 and transformed into *E. coli* BL21 (DE3) cells, and the production of recombinant *Sjwnt4* protein fused to a GST tag was analysed. In the presence of IPTG, the 76kD fusion protein was expressed in included bodies. Western-blotting revealed that the fusion protein could be recognized by the rabbit serum specific to *Schistosoma japonicum* adult worm antigen preparation. The study provides important basis for investigating the regulation mechanism of the Wnt signaling pathway during the development especially gonadal differentiation processes of *Schistosoma japonicum*.

Key words *Schistosoma japonicum*, signal transduction, Wnt4, development, differential express

Wnts 是一类从水螅、昆虫到脊椎动物中都能发现的分泌型糖蛋白,由细胞分泌出来后,与自身或邻近细胞的膜受体结合,激发下游的信号通路,调节核内靶基因的表达,决定细胞的分化命运,在动物发育中起着广泛的调节作用^[1]。Wnt 蛋白异常的时空表达或异常的激活往往与肿瘤的发生有关^[2]。有研究表明,Wnt 信号通路对哺乳动物生殖系统的正常发育起关键的调节作用,它主要参与了缪勒氏管及其派生器官的形成,调控卵泡的发育、排卵及黄体化,另外与正常妊娠的建立以及妊娠过程中乳腺的变化也有关。Wnt4 是 Wnt 家族蛋白成员之一,在小鼠中,Wnt4 对缪勒氏管的形成有关键意义,缺失 Wnt4 的雌、雄小鼠都没有缪勒氏管;Wnt4 突变的雌鼠没有缪勒氏管的派生器官(即输卵管、子宫、子宫颈和阴道上部);而沃尔夫管则继续存在。Wnt4 缺失的雄性动物其睾丸的发育不受影响,但当发育着的雌性性腺中一旦缺失 Wnt4 信号,其结构和功能上都呈现一定的雄性化特征,性腺虽然定位在它们正确的部位,但其外形比正常的卵巢更圆,且像睾丸一样没有包被。此外,突变的性腺可以分泌 MIS(缪勒氏管抑制物质)及睾酮^[3,4]。在人类中,男性的染色体 1p31~p35 片段的二倍体导致了 Wnt4 增多,Wnt4 的过量表达致使 XY 的男性具有了女性的表型^[5]。因此,Wnt4 可能是一种性别表型的决定基因^[5]。对血吸虫生长发育信号转导的研究是了解和认识血吸虫生活特征的有效途径。但是到目前为止,对血吸虫生长发育信号转导系统的研究甚少,以致在开发高效候选疫苗分子和筛选新型药物的方面进展缓慢。对血吸虫 Wnt 基因的研究国内外尚未有研究报道。本研究利用 RACE 技术首次克隆到编码日本血吸虫 Wnt4 蛋白的含 ORF 的 cDNA 序列,分析了该基因在日本血吸虫不同发育阶段虫体中的表达情况,应用大肠杆菌系统进行了表达,并对表达产物进行了抗原性测定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和酶:Trizol、GeneRacer™ Kit 购自 Invitrogen 公司;Ex Taq Hot Start DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I、T4 DNA 连接酶、荧光定量 PCR 检测试剂盒和随机引物购自 TaKaRa 生物工程(大连)有限公司;羊抗鼠 IgG-HRP 购自天根生化科技(北京)有限公司;抗 GST 单抗购自 SIGMA 公司;羊抗兔 IgG-HRP 购自华美生物工程公司;逆转录酶购自 Stratagen 公司;RNA 酶抑制剂购自 Promega 公司;SYBR Green I 和 Calibration 购自 BIO-RAD 公司。

1.1.2 菌种、质粒及实验动物:质粒 pGEX-4T-2、大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3)由本所提供;pUCm-T 载体购自天根生化科技(北京)有限公司。新西兰白兔(雄性,2.5~3.0kg)购自上海罗泾飞达实验动物养殖场。日本血吸虫中国大陆株尾蚴由本所钉螺室提供。

1.2 方法

1.2.1 新西兰白兔分别以腹部贴片法感染 8000、5000、2000 条血吸虫尾蚴,在 14d、19d、31d 和 44d 后剖杀,以肝门静脉灌注法收集虫体,液氮冻存储用。

1.2.2 总 RNA 的提取:取液氮中冻存的日本血吸虫 19d 童虫 200mg,按 Trizol 试剂盒说明书进行总 RNA 的提取。

1.2.3 RACE 的引物设计和扩增:本实验室程国锋等^[6]利用双向电泳结合肽质量指纹图谱技术获得一个 Wnt 家族蛋白的一段肽序列,以此肽序列为询问序列在日本血吸虫 EST 库中(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)搜索到一个日本血吸虫的相应 EST 片段(GenBank accession number AAM89872),长 727bp,不含有完整的 ORF。以该 EST 序列为模板设计合成 RACE 引物(由上海申能博采生物技术有限公司合成)。3' RACE 的两个巢式引物:3GSP1:5'-TAATGCTGTCGTCGAGGATTTAAACG-3';3GSP2:5'-

GGTGTTCGCAAAGTTGTCTGTAAAACA-3'; 5' RACE 的两个巢式引物 5GSP1 5'-GGTGTTCGCAAAGTTGTCTGTAAAACA-3', 5GSP2: 5'-TTGTCGTTTAAATCCTCGA CCACAG-3'。具体步骤按 GeneRacer™ 试剂盒操作手册进行。将 RACE 产物克隆到试剂盒提供的 pCR4-TOPO 载体中, 挑选阳性克隆, 由英俊生物技术有限公司测序。利用 DNASTar 软件查找 3'、5' RACE 产物序列与原 EST 序列的重叠部分, 将三段序列拼接。

1.2.4 含 ORF cDNA 片段的扩增: 根据拼接的 cDNA 序列设计引物(F1 和 F2)进行含 ORF cDNA 片段的扩增。F1: 5'-CCGGGATCCATGAATCTAACT CAGCTAGAA-3'引入酶切位点 *Bam*H I (加下划线); F2: 5'-CGGCTCGAGTTAATTACATGTAGATATAAC-3'引入酶切位点(*Xho* I)(由上海申能博采生物技术有限公司合成)。取 3 μ L 在 3' RACE 中反转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应条件分别为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 然后 94 $^{\circ}$ C、30s, 55 $^{\circ}$ C、30s, 72 $^{\circ}$ C、90s, 共 30 个循环, 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 产物用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行回收, 纯化后连 pUCm-T 载体, 转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 选单个菌落酶切鉴定, 阳性质粒命名为 pUCm-T-*Sjunt4* 并送英俊生物技术有限公司测序。

1.2.5 生物信息学分析: 将测序得到的 cDNA 在 NCBI 上进行相似性比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>); 利用 NCBI 上的 ORF finder 找出新基因的读码框; 利用 DNASTar 软件对氨基酸残基数、组成、蛋白质相对分子量等参数进行分析; 利用 ClustalW 软件对不同物种 Wnt 蛋白进行多重比对; 利用 GeneDoc 软件对对比结果进行编辑; 利用 NetAcet 软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetAcet/>)进行糖基化位点预测。利用 SYFPEITHI 的 MHC II 表型在线预测工具(<http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi/>)进行 T 细胞表位预测。

1.2.6 荧光实时定量 RT-PCR: 试验中选择血吸虫的持家基因 α -微管蛋白(α -tubulin)^{7,8,1}为内参。分别提取 14d 和 19d 童虫、31d 成虫、44d 雄虫和 44d 雌虫总 RNA, 去除基因组 DNA 后利用随机引物合成 cDNA 第一链。*Sjunt4* 荧光定量 PCR 引物 S1: 5'-ACATACAAAATCGTCTGGTCTC-3', S2: 5'-GATGGTAAAGCGCATGTAGTC-3', 扩增片段长度 214bp; α -tubulin 荧光定量 PCR 引物 T1: 5'-CTGATTTCCATTCGTTTG-3', T2: 5'-GTTGTCTACCATGAAGCA-3', 扩增片段长度 213bp。引物由上海生工生物工程有限公司合成。采用荧光染料法进行实时定量 PCR,

反应体系包括: 5 \times R-PCR Buffer 5 μ L, 250mmol/L Mg²⁺ 0.3 μ L, 10mmol/L dNTP 0.75 μ L, 10 μ mol/L 引物 1.0 μ L, 25 \times SYBR Green I 1.0 μ L, 10⁻³ \times Calibration 1.0 μ L, 5u/ μ L Ex Taq HS 0.25 μ L, ddH₂O 14.7 μ L, 模板 cDNA 1.0 μ L, 共 25 μ L。反应参数: 95 $^{\circ}$ C 3min, 95 $^{\circ}$ C 5s, 58 $^{\circ}$ C 30s, 40 个循环, 其中 58 $^{\circ}$ C 30s 结束时间点为荧光信号检测点。每个反应均做 3 孔重复。采用 BIO-RAD 公司 iCycler™ IQ version 3.0 软件进行计算分析, 以 α -tubulin 为内参标准化反应结果, 得出相对于每百万持家基因的目的基因含量。

1.2.7 重组表达质粒的构建: 从测序后确定的重组质粒 pUCm-T-*Sjunt4* 中用限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I 切出 *Sjunt4* 含 ORF 的 cDNA 片段, 将该完整序列定向克隆于原核表达载体 pGEX-4T-2 的多克隆位点区, 构建重组表达质粒 pGEX-4T-2-*Sjunt4*, 并转化表达宿主菌 BL21(DE3)。

1.2.8 在大肠杆菌中的表达 将鉴定好的 pGEX-4T-2-*Sjunt4*/BL21(DE3)接种于液体 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养, OD 值为 0.6 时加终浓度为 1mmol/L 的 IPTG 诱导表达。在 IPTG 诱导后 0h, 0.5h, 1h, 2h, 4h, 6h 分别收集菌体, 应用 SDS-PAGE 分析菌体蛋白, 确定最佳诱导时间。

1.2.9 抗 rSjunt4 鼠血清的制备 重组表达产物以每只每次 20 μ g 免疫 Balb/c 鼠, 每间隔 2 周免疫 1 次, 共免疫 3 次, 第 3 次免疫后两周采血, 分离血清。

1.2.10 Western blotting 检测 将高表达时相菌体蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 转移到硝酸纤维素膜上, 分别用抗 GST 单抗、经 pGEX-4T-2/BL21 大肠杆菌裂解液吸附处理过的日本血吸虫成虫抗原免疫血清和抗 rSjunt4 鼠血清作一抗, 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠、羊抗兔 IgG 为二抗, DAB 作为底物进行显色。

2 结果

2.1 *SjWnt-4* 编码基因的克隆及生物信息学分析

本研究利用 RACE 技术对 EST 片段(GenBank 登录号 AAM89872)进行 3'端和 5'端延伸, 分别经 2 轮 PCR 扩增, 将 PCR 产物测序后拼接得到 2044bp 的 DNA 片段, 进一步利用 PCR 技术克隆获得含完整开放阅读框的编码基因, 其开放阅读框为 1311bp, 编码 436 个氨基酸。利用 NCBI 的 Blast 软件对该序列进行同源性搜索, 结果显示该基因序列与血吸虫其它已知基因无显著同源性, 为血吸虫新基因。氨基酸序列的相似性比较结果显示与 Wnt 家族蛋白具有高度同源性, 其中与 Wnt4 蛋白的同源性最高。

对氨基酸序列进行分析也发现其具有十分典型的 Wnt 家族蛋白特征:整个蛋白序列中散在着 100 多个 Wnt 家族蛋白的保守位点;富含可交连形成二硫键的半胱氨酸残基,约 23~24 个保守的半胱氨酸,其中 50% 位于蛋白的羧基端(图 1);具有三个或四个糖基化位点。我们又选择了分别来自日本三角涡虫(GenBank 登录号 BAD93239.1)、人(GenBank 登录号 NP_110388.2)、小鼠(GenBank 登录号 NP_033549.1)、尤金袋鼠(GenBank 登录号 AAY18780.1)、鸡(GenBank 登录号 JC2451)、线虫(GenBank 登录号 NP_493668.1)、果蝇(GenBank 登

录号 NP_476810.1) 7 个物种的 Wnt4 蛋白进行氨基酸序列的多重比对(图 1)。结果显示,该基因所编码氨基酸序列与同属扁形动物门的日本三角涡虫的 Wnt4 相似性最高达 43%($E = 1e-100$),与人 Wnt4 的相似性为 37%($E = 9e-72$),其余皆在 36%~38% 之间。据此,推测该基因编码的蛋白为日本血吸虫 Wnt4 蛋白,将该基因命名为日本血吸虫 *wnt4* (*Sjwnt4*) (GenBank 登录号 DQ643829)。

对该基因编码的氨基酸序列进行 T 细胞表位的预测结果显示该序列中含有多个可与特定 HLA 分子具较高结合效价的抗原肽段(表 1)。

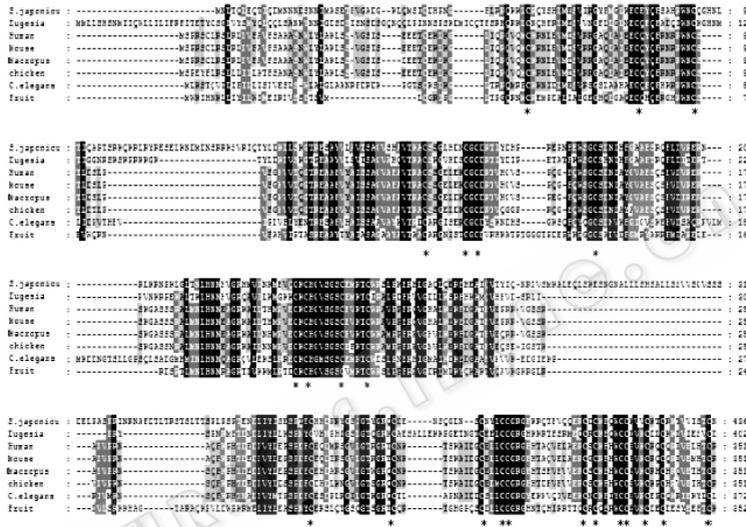


图 1 不同物种 Wnt4 蛋白氨基酸序列的多重比对 (CLUSTALW)

Fig. 1 Amino acid sequence alignment of WNT4 orthologues (CLUSTALW)

Conserved cysteine residues (C) important for secondary structure are marked with an asterisk. Shaded regions indicate residues with shared homology. Numbers indicate residue number.

表 1 *Sjwnt4* 与 HLA 有较高结合效率的潜在的抗原肽

Table 1 The peptide binding to HLA with high efficiency in *Sjwnt4*

Types of HLA	Pos	Amino sequence	Score
HLA-DRB1 * 0101	139	SAYVLA VTSAGVSHA	30
	256	LPKFRHLGAQLQERF	29
	49	QKKLCRQYSHLMESV	28
	306	SALLSSV VSGVSSSD	28
HLA-DRB1 * 0301	25	ETFGADGKLQMSIC	28
	206	RNRLKRNP KLGTLNL	27
	198	RQFLDVRERNRLKRN	26
HLA-DRB1 * 0401	330	RNAFDTLTRSTSLTT	28
	125	QTYLDKLLSKGTRES	26
	139	SAYVLA VTSAGVSHA	26
	151	SHAVTKACSSGLHDN	26
HLA-DRB1 * 1101	330	RNAFDTLTRSTSLTT	30
	250	RTCWRS LPKFRHLGA	26
HLA-DRB1 * 1501	253	WRSLPKFRHLGAQLQ	30
HLA-DRB1 * 0701	151	SHAVTKACSSGLHDN	30
	189	NIHFGAAFSRQFLDV	30
	298	GNA LLSHSALLSSV	30
	273	AIQVTYIQNRLVSMK	28

2.2 *SjWnt4* 基因的期别、性别表达分析

为了了解 *SjWnt4* 基因在日本血吸虫不同发育阶段虫体的表达情况,提取 14d 童虫、19d 童虫、31d 成虫、44d 雄虫和 44d 雌虫虫体总 RNA,选择持家基因 α -tubulin 作为内参,利用荧光定量 PCR 法检测该基因在日本血吸虫几个不同发育阶段虫体的表达情况。实验结果表明,*SjWnt4* 在日本血吸虫童虫、成虫及雌雄虫中均有表达(图 2),其中在 19d 童虫中表达量最高,44d 雌虫中的表达量明显比雄虫高。

2.3 重组原核表达载体 pGEX-4T-2-*Sjwnt4* 的构建

经 PCR、*Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定(图 3)和测序证实 pGEX-4T-2-*Sjwnt4* 重组表达质粒构建成功。

2.4 *Sjwnt4* 基因在大肠杆菌中表达

重组表达质粒 pGEX-4T-2-*Sjwnt4* 在大肠杆菌 BL21(DE3)中获得表达,SDS-PAGE 电泳结果显示,中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

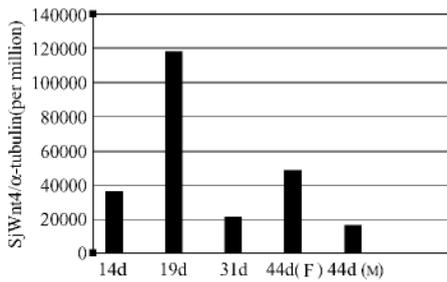


图2 实时定量PCR检测 *SjWnt4* 基因在日本血吸虫不同期别和性别虫体中的表达

Fig. 2 Stage and gender differential expression of *Sjwnt4* in *Schistosoma japonicum* by real-time PCR

14d: 14 days schistosomula; 19d: 19 days schistosomula; 31d: 31 days worms; 44d(M): 44 days male worms; 44d(F): 44 days female worms.

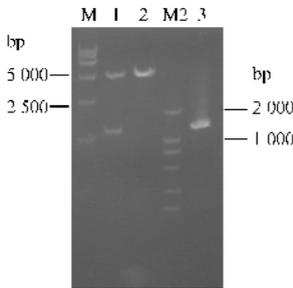


图3 重组质粒 pGEX-4T-2-*Sjwnt4* 双酶切鉴定及 PCR 鉴定
Fig. 3 Identification of the recombinant plasmid pGEX-4T-2-*Sjwnt4*

by PCR and digesting with *Bam*H I and *Xho* I

M1: DNA marker DL15 000; 1: pGEX-4T-2-*Sjwnt4* digested with *Bam*H I and *Xho* I; 2: pGEX-4T-2 digested with *Bam*H I and *Xho* I; M2: DNA marker DL 2 000; 3: product of PCR.

1mmol/L IPTG 诱导 4h 即达到最大表达量; 重组蛋白分子量约为 76kD, 与预期结果相符(*Sjwnt4* 蛋白推测分子量约为 49.6kD, 载体表达蛋白 GST 约 26kD, 故重组蛋白分子量约为 75.6kD)(图 4)。重组蛋白以包涵体形式存在, 可溶于含 8mol/L 尿素的 PBS。

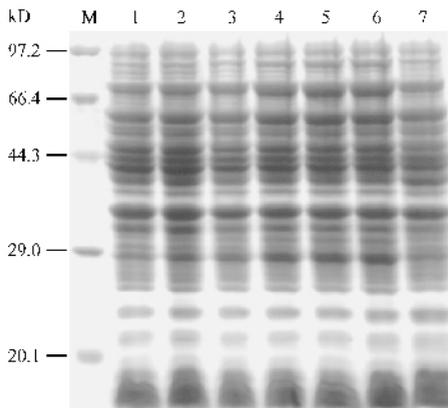


图4 SDS-PAGE 分析 pGEX-4T-2-*Sjwnt4*/BL21(DE3) 不同时相的表达蛋白

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the expression product of pGEX-4T-2-*Sjwnt4*/BL21(DE3) in *E. coli*

M: low-molecular weight protein marker; 1~6: pGEX-4T-2-*Sjwnt4*/BL21(DE3) induced with 1mmol/L IPTG for 0h, 0.5h, 1h, 2h, 4h, 6h; 7: pGEX-4T-2-*Sjwnt4*/BL21(DE3) uninduced with IPTG for 6h.

2.5 表达产物抗原性分析

以重组表达产物进行 SDS-PAGE 电泳, 经电转移至 NC 膜上, 分别用抗 GST 单抗和经 pGEX-4T-2/BL21 大肠杆菌蛋白吸附的日本血吸虫成虫抗原免疫兔血清和抗 rSjwnt4 鼠血清作一抗进行 Western blot, 结果均在 76kD 处有一明显的识别条带(图 5A、图 5B、图 5C 箭头处), 表明重组表达产物为 GST 融合蛋白且具有良好的抗原性。

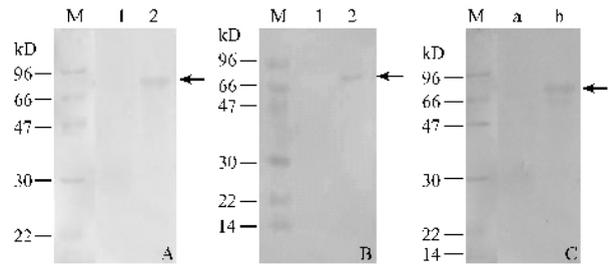


图5 pGEX-4T-2-*Sjwnt4* 重组蛋白的 Western blot 分析
Fig. 5 Western-blotting analysis of *Sjwnt4* expression product

M: marker; 1: expressed product of pGEX-4T-2-*Sjwnt4*/BL21 (DE) uninduced with IPTG; 2: A, B: expressed product of pGEX-4T-2-*Sjwnt4*/BL21(DE) induced with IPTG; A: recombinant proteins were probed with mouse monoclonal anti-GST antibody; B: recombinant proteins were probed with rabbit serum immunized with Sjadult worm antigen preparation; C (a): recombinant proteins were probed with negative mouse serum C (b): recombinant proteins were probed with mouse serum immunized with rSjwnt4.

3 讨论

血吸虫病是一种危害严重的人兽共患病, 在世界范围内有 6 亿人受到威胁, 约 2 亿人受感染^[9,10]。血吸虫成虫在动物体内不增殖, 致病影响不大, 而性成熟的雌虫产生的大量虫卵在宿主肝脏形成肉芽肿是导致发病的主要原因^[11], 同时大量虫卵排出体外又造成血吸虫病的传播和流行^[12]。因此, 控制血吸虫性成熟及生殖已成为防治血吸虫病的重要研究策略。研究血吸虫生长发育、性别发育中的信号转导, 寻找调控发育的关键的酶、信号分子、受体等, 既可深入了解血吸虫的生长发育机制, 又可为寻找疫苗候选抗原分子提供新思路。

本文所克隆的日本血吸虫 *Wnt4* 基因(*Sjwnt4*) 属于 *Wnt* 基因家族的成员之一。由 *Wnt* 基因家族产物与其它相关基因产物所构成的 *Wnt* 信号通路, 是调节细胞发育和生长的一个关键途径, 对动物的发育特别是生殖系统的发育起重要的调节作用。*Wnt* 信号通路广泛地存在于线虫、果蝇、两栖类以及人类等生物, 但是对血吸虫 *Wnt* 基因的研究在国内外尚未有报道, 以往, 对与血吸虫生长、发育、生殖

产卵关系密切的调控物质和能量代谢的复杂的细胞间信号转导体系研究甚少,使得对这一病原的生长发育的机理认识没有新的突破。日本血吸虫 *Wnt4* 基因的成功克隆,不仅为丰富 *Wnt* 基因家族的普遍生物学功能意义作出了贡献,更为开展 *Wnt* 信号通路对血吸虫发育、生殖机制的研究提供了切入点,具有十分重要的价值。

本文的研究结果表明 *Sjwnt4* 基因在日本血吸虫感染宿主后第 14 天童虫、19d 童虫、31d 虫体、44d 雌虫和 44d 雄虫体内均有表达,但 19d 童虫的表达量显著的高于其它各个阶段;与此同时,该基因在 44d 雌虫中的表达量高于 44d 雄虫。从过去的研究已知:日本血吸虫感染宿主后,在第 15~16 天雌雄虫合抱配对,雌雄虫合抱后卵黄腺开始发育,卵黄细胞分化,合成卵黄小滴,第 22 天雌虫体内表达卵壳蛋白;到第 24 天后长期保持排卵状态^[13]。上述 *Sjwnt4* 基因的表达状况分析结果显示,该基因的表达变化与血吸虫性别表型的发育变化密切相关,从一个侧面揭示了 *Wnt4* 基因在血吸虫生殖系统发育中的重要作用。这个结果与该基因在小鼠和小袋鼠中表达的生物学意义有一定的相似性。在小鼠中,*Wnt4* 最初在肾管间充质及未分化的性腺中表达,它在两性未分化的性腺中都表达,但经过性别特异的分化后,在雄性性腺中 *Wnt4* 表达下降,而在雌性性腺中一直维持^[3]。在有袋动物塔马尔沙袋鼠中,*Wnt4* mRNA 在未分化的两性性腺中都有表达,雌性小袋鼠 *Wnt4* mRNA 在卵巢分化过程中表达水平显著上升,约在小袋鼠出生后 9~13d 后到达顶峰,然后当所有的雌性生殖细胞进入减数分裂后开始下降,雄性小袋鼠的 *Wnt4* mRNA 表达水平在输精管形成后立即下降^[14]。因此,如果能通过人为干预,如使用 RNAi 技术抑制血吸虫 *Wnt4* 的表达或者以 *Wnt4* 蛋白为药靶抑制它的活性,从而控制血吸虫性别发育、产卵,对减轻血吸虫病的病理损害及阻断传播将有重要意义。

Western blot 结果表明该重组表达产物具有良好的抗原性。研究证明:宿主 CD4⁺ T 细胞介导的免疫效应在抗血吸虫免疫保护中起关键作用。而 CD4⁺ T 细胞识别的是与宿主 MHC II 分子结合的肽,即所谓的线性 T 细胞表位。本文分析推测的可能与宿主 MHC II 类分子结合的 T 细胞表位的信息,也为研制高效的抗血吸虫病疫苗提供了理论支持。

本研究首次克隆获得血吸虫 *Wnt4* 基因,还克隆得到了日本血吸虫 *Wnt10a* 编码基因(*Sjwnt10a*)

(待另文发表),将为深入研究 *Wnt* 信号通路在血吸虫生长发育特别是生殖器官发育中的作用以及开发高效的抗血吸虫病的疫苗和筛选新型的抗血吸虫药物奠定基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] <http://www.stanford.edu/~musse/wntwindow.html>.
- [2] Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2004, **20**:781-810.
- [3] Vainio S, Heikkila M, Kispert A, et al. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature*, 1999, **397** (6718):405-409.
- [4] Heikkila M, Prunskaitė R, Naillat F, et al. The partial female to male sex reversal in Wnt-4-deficient females involves induced expression of testosterone biosynthetic genes and testosterone production, and depends on androgen action. *Endocrinology*, 2005, **146**(9):4016-4023.
- [5] Jordan BK, Mohammed M, Ching ST, et al. Up-regulation of WNT4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *American Journal of Human Genetics*, 2001, **68**(5):1102-1109.
- [6] Cheng GF, Lin JJ, Feng XG, et al. Proteomics analysis of differentially expressed proteins between the male and female worm of *Schistosoma japonicum* after pairing. *Proteomics*, 2005, **5**:511-521.
- [7] Webster PJ, Seta KA, Chung SC, et al. A cDNA encoding an alpha-tubulin from *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1992, **51**(1):169-170.
- [8] Mei H, LoVerde PT. *Schistosoma mansoni*: the developmental regulation and immunolocalization of antioxidant enzymes. *Experimental Parasitology*, 1997, **86**(1):69-78.
- [9] Fenwick A, Savioli L, Engels D, et al. Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis. *Trends in Parasitology*, 2003, **9**(11):509-515.
- [10] Ross AG, Sleight AC, Li Y, et al. Schistosomiasis in the People's Republic of China: prospects and challenges for the 21st Century. *Clinical Microbiology Reviews*, 2001, **14**(2):270-295.
- [11] Muschamp JW, Fong PP. Effects of the serotonin receptor ligand methiothepin on reproductive behavior of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*: reduction of egg laying and induction of penile erection. *The Journal of Experimental Zoology*, 2001, **289** (3):202-207.
- [12] Popiel I, Basch PF. Reproductive development of female *Schistosoma mansoni* (Digenea: Schistosomatidae) following bisexual pairing of worms and worm segments. *The Journal of Experimental Zoology*, 1984, **232**(1):141-150.
- [13] Zhou SL (周述龙), Lin JY (林建银), Jiang MS (蒋明森). Schistosomiasis. Beijing: Science Press (科学出版社), 2001.
- [14] Yu H, Pask AJ, Shaw G, et al. Differential expression of WNT4 in testicular and ovarian development in a marsupial. *BMC*