



旋毛虫核激素受体 NHR-23 克隆表达和特性分析

李 娜,冯佳俊,张玉恒,徐立新,陆明敏,宋小凯,李祥瑞,严若峰*

(南京农业大学动物医学院,南京 210095)

摘 要: 本文旨在评估旋毛虫核激素受体-23(NHR-23)的生物学特性及其疫苗开发潜力。通过克隆表达得到纯化的重组 TsNHR-23 蛋白(rTsNHR-23), Western blot 分析其反应原性, qPCR 分析 *TsNHR-23* 基因在旋毛虫不同发育阶段的转录水平。体外试验利用抗 rTsNHR-23 多克隆抗体分析对肌肉幼虫蜕皮的抑制,并探究该蛋白对小鼠巨噬细胞炎性细胞因子分泌的影响。将 PLGA 纳米颗粒包被的 rTsNHR-23 蛋白免疫 ICR 小鼠,通过检测小鼠血清中 IgG 抗体水平的变化、细胞因子 IGF-1、IL-6 和 TGF- β 的变化并计算减虫率,评估 rTsNHR-23 蛋白的免疫保护效果。结果表明, *TsNHR-23* 基因在旋毛虫的不同发育阶段均存在转录,且在肌肉幼虫阶段的转录水平最高。抗 rTsNHR-23 的多克隆抗体能够显著降低肌肉幼虫的蜕皮率,也可有效抑制蜕皮进程的发展。rTsNHR-23 蛋白能够显著提高小鼠巨噬细胞 IL-1 β 、IL-6、IL-10 的转录水平。免疫保护试验显示 rTs-NHR-23 蛋白免疫小鼠后,与对照组相比,小鼠血清中 IgG 抗体水平极显著升高,首次免疫后 IGF-1 显著下降,IL-6 及 TGF- β 升高;二次免疫后,IGF-1 部分回升,TGF- β 则显著下调。攻虫后,与对照组相比,小鼠体内旋毛虫成虫数量、平均每条雌虫产生的新生幼虫数量以及肌肉幼虫数量均显著下降。综上所述,旋毛虫重组 NHR-23 蛋白对肌肉幼虫的蜕皮具有显著抑制作用,将该蛋白免疫小鼠后,荷虫量显著下降,具有作为疫苗候选抗原的潜力。

关键词: 旋毛虫;核激素受体;巨噬细胞;免疫保护

中图分类号: S852.731;R383.15

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)02-1034-12

Cloning, Expression and Characterization of *Trichinella spiralis* Nuclear Hormone Receptor NHR-23

LI Yuan, FENG Jiajun, ZHANG Yuheng, XU Lixin, LU Mingmin, SONG Xiaokai,

LI Xiangrui, YAN Ruofeng*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: This study aims to evaluate the biological characteristics of *Trichinella spiralis* nuclear hormone receptor-23 (NHR-23) and its potential for vaccine development. The recombinant TsNHR-23 protein (rTsNHR-23) was obtained via cloning and expression, followed by purification. Its immunoreactivity was assessed via Western blot, while transcriptional levels of the *TsNHR-23* gene across different developmental stages of *T. spiralis* were analyzed using qPCR. *In vitro* experiments were conducted to analyze the inhibitory effect of anti-rTsNHR-23 polyclonal antibody on the molting of muscle larvae and to explore the effect of this protein on the function of mouse macrophages. The immune-protective efficacy of PLGA nanoparticle-encapsulated rTsNHR-23 was tested by immunizing ICR mice and analyzing parasite burden. The *TsNHR-23* gene was transcribed across all developmental stages of *T. spiralis*, with the highest expression observed in muscle larvae

收稿日期: 2025-05-27

基金项目: 江苏省社会发展计划(BE2022848)

作者简介: 李 娜,主要从事寄生虫分子与免疫研究, E-mail: ly981015@126.com

* 通信作者: 严若峰,主要从事兽医寄生虫分子与免疫学研究, E-mail: yanruofeng@njau.edu.cn

(ML) stage. Anti-rTsNHR-23 antibodies significantly reduced larval molting rates and inhibited molting progression. The rTsNHR-23 protein significantly enhanced the transcription levels of IL-1 β , IL-6, and IL-10 in mouse macrophages. Immune protection experiments demonstrated that mice immunized with the rTs-NHR-23 protein exhibited a highly significant increase in serum IgG antibody levels compared to the control group. After the first immunization, IGF-1 levels markedly decreased, while IL-6 and TGF- β levels increased. Following the second immunization, IGF-1 partially rebounded, whereas TGF- β showed significant downregulation. Post-challenge infection, compared to the control group, the immunized mice displayed significant reductions in the number of *T. spiralis* adult worms, the average number of newborn larvae produced per female worm, and the muscle larval burden. rTsNHR-23 exhibits potent inhibitory effects on ML molting, modulates macrophage functions, and significantly reduces parasitic load in immunized hosts, demonstrating promising potential as a candidate vaccine against *T. spiralis*.

Keywords: *T. spiralis*; nuclear hormone receptor; macrophage; immune protection

* **Corresponding author:** YAN Ruofeng, E-mail: yanruofeng@njau.edu.cn

旋毛虫病是由旋毛形线虫引起的食源性寄生虫病^[1],对人类健康构成严重威胁。其幼虫通过未煮熟的肉类(尤其猪肉)传播,临床表现为全身发热、腹痛、腹泻、恶心、呕吐以及肌痛等非特异性症状,重症可并发心肌炎与脑炎^[2]。全球每年约1万例病例,亚洲、欧洲和北美高发^[3],中国西南及东北地区因饮食习惯成为重灾区^[4]。旋毛虫宿主广泛(猪、野生动物等),加之肉类检疫不足及生食文化,使其持续威胁全球公共卫生安全^[5]。目前旋毛虫感染仍缺乏有效的疫苗,早期驱虫药物(如阿苯达唑)是治疗的首要选择^[6],但延迟治疗易致慢性感染和器官损伤^[7],因此,开发针对家畜和人类旋毛虫感染的有效疫苗是控制该病的关键策略。传统旋毛虫疫苗抗原主要来源于全虫粗提物或排泄分泌产物,其代表形式为减毒活疫苗和灭活疫苗(即第一代疫苗)^[8]。随着基因工程技术的发展,已在啮齿动物和猪模型中进行了第二代和第三代疫苗来评估其保护作用,例如重组蛋白疫苗、DNA疫苗和合成肽疫苗^[9-11]。因此,加强兽用疫苗研究,以阻断旋毛虫病从动物向人类的传播链,显得尤为迫切^[12]。

核激素受体(nuclear hormone receptor, NHR)是一类配体激活的转录因子,具有保守的DNA结合域(DBD)和配体结合域(LBD)^[13],通过结合DNA调控基因表达,参与发育、生殖和代谢等关键生理过程^[14],其家族包括类固醇激素受体(如雌激素受体)、甲状腺激素受体及孤儿受体^[15]。寄生虫的NHRs基因数量远超哺乳动物^[16](如秀丽隐杆线虫含284种^[17]),这些受体在寄生虫生命史中发挥重

要作用:例如DAF-12通过感知胆固醇衍生物调控秀丽隐杆线虫滞育期^[18],SmFtz-F1响应宿主脂质信号促进血吸虫幼虫成熟^[19]。由于寄生虫NHRs与宿主进化距离远且功能特异^[20],它们成为抗寄生虫药物研发的潜在靶点。其中,NHR-23(属NR1F类)是线虫蜕皮过程的关键调控因子,直接激活胶原蛋白和几丁质酶等基因,RNAi沉默NHR-23会导致蜕皮缺陷,阻碍发育^[21]。因此,深入研究NHR-23的作用机制不仅有助于揭示寄生虫发育调控的分子基础,也为开发靶向特定生命阶段的新型抗寄生虫药物提供了重要方向。

核激素受体在寄生虫关键生命阶段的保守性与特异性,使其成为突破现有抗药性瓶颈、靶向感染阶段的新型药物靶点,但作用机制和物种差异仍需进一步解析。本文对旋毛虫核激素受体-23(NHR-23)进行克隆表达,分析TsNHR-23基因在旋毛虫不同发育阶段的转录水平变化,研究rTsNHR-23蛋白对旋毛虫肌肉幼虫蜕皮的影响,将rTsNHR-23蛋白免疫ICR小鼠,分析小鼠体内特异性抗体和细胞因子的变化并计算减虫率,评估该蛋白的免疫保护效果,探究前期是否具有疫苗候选抗原的潜力。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 实验动物和虫种 健康6周龄SPF级雌性SD大鼠(约200 g)购自江苏青龙山生物科技有限公司,许可证号:SCXK(苏)2024-0001,健康的

6 周龄 SPF 级雌性 ICR 小鼠 (25 g 左右) 购自南京安诺康生物科技有限公司, 许可证号: SCXK(苏) 2020-0009。于南京农业大学实验动物中心屏障环境动物房饲养, 试验通过南京农业大学实验动物福利与伦理委员会的审查与批准, 大鼠饲养的审核编号为 NJAU. No20240409072, 小鼠饲养的审核编号为 NJAU. No20240718141。中国河南猪旋毛虫虫种, 国际虫种编号为 ISSS534, 由本实验室传代保存于 SD 大鼠体内。

1.1.2 菌种、载体和细胞 大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3) 菌种、载体 pET-32a(+)、RAW264.7 均为本实验室保存。

1.1.3 主要试剂和材料 胃蛋白酶购自上海源叶生物科技有限公司; RNA isolater Total RNA Extraction Reagent、DNA 回收试剂盒购自南京诺唯赞公司; RevertAid RT 反转录试剂盒、预染蛋白 marker 购自 Thermo Fisher 公司; PrimeSTAR Max DNA Polymerase、DNA marker、10 $\times$ Loading Buffer、限制性内切酶 (*Sac* I、*Xho* I)、T4 DNA Ligase 购自 TaKaRa 公司; 质粒提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; IPTG、咪唑购自翼飞雪生物科技有限公司; 超滤管购自美国默克密理博公司; 去内毒素试剂盒购自金斯瑞生物科技股份有限公司; BCA 蛋白浓度检测试剂盒购自碧云天生物技术公司; His-Tag Monoclonal antibody、HRP-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG、HRP-conjugated Goat Anti-Mouse IgG 购自武汉三鹰生物技术有限公司; ECL 发光试剂盒购自上海天能生命科学有限公司; 引物合成和测序服务由擎科生物公司提供; 弗氏完全佐剂和不完全佐剂、溴酚蓝、Tween-20、考马斯亮蓝均购自 Sigma 公司; DMEM 培养基、RPMI 1640 培养基、青链霉素双抗、胎牛血清购自 Gibco 公司; HiScript III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)、SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒购自艾科瑞公司; 聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA, 相对分子质量为 40~75 ku)、聚乙烯醇 (PVA, 相对分子质量为 31~50 ku) 购自 Sigma 公司; 二氯甲烷购自沪试公司; 小鼠胰岛素样生长因子 1 (IGF-1)、小鼠白细胞介素 6 (IL-6)、小转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) ELISA 试剂盒购自南京金益柏公司。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pET-32a-TsNHR-23 的构建 收集旋毛虫肌肉幼虫, 用 RNA isolater Total

RNA Extraction Reagent 试剂提取虫体 RNA, 后反转录为 cDNA。根据 NCBI 中 TsNHR-23 基因的序列 (XM_003371268.1), 上游添加酶切位点 *Sac* I, 下游添加酶切位点 *Xho* I, 利用 Primer 5.0 软件设计特异性引物如下, 下划线部分代表酶切位点, TsNHR-23 F/R: 5'-CGAGCTCATGGACA-ATATAATGAAGCATACGT-3'/5'-CCTCGAGTCATCCATCAACTGAAAACAATTCC-3'。以肌肉幼虫 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 将回收产物与 pET-32a(+) 载体用 *Sac* I 和 *Xho* I 双酶切处理, T4 DNA Ligase 连接双酶切后的回收产物, 转化至大肠杆菌 DH5 α 中, 挑取单菌落扩大培养, 将 PCR 鉴定为阳性的菌液提取质粒, 经双酶切认证和测序正确的阳性质粒命名为 pET-32a-TsNHR-23。

1.2.2 重组 TsNHR-23 蛋白的表达和纯化 将重组质粒 pET-32a-TsNHR-23 转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 中, 挑取单克隆扩大培养, 直至菌液的 OD_{600 nm} 值为 0.4~0.6 左右, 加入浓度为 1 mmol $\cdot$ L⁻¹ 的 IPTG 诱导表达, 电泳分析时相表达和分布情况。用镍柱纯化蛋白, 超滤管浓缩, 并用试剂盒去除蛋白的内毒素, BCA 法测定蛋白的浓度。

1.2.3 抗重组 TsNHR-23 蛋白多克隆抗体的制备 将 400 μ g 重组蛋白与等体积的弗氏完全佐剂混合, 通过注射器用乳化接头充分乳化, SD 大鼠多点皮下注射首次免疫。14 d 后, 将 400 μ g 重组蛋白与等体积的弗氏不完全佐剂混合, 进行二次免疫。7 d 和 14 d 后, 重复二次免疫操作进行加强免疫。第四次免疫一周后, 乙醚麻醉大鼠, 腹主动脉采血, 静置 1 h 后 2 500 $\times$ g 条件下离心 20 min, 吸出上清并分装保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中, 得到抗重组 TsNHR-23 蛋白的大鼠血清。

1.2.4 旋毛虫感染血清的制备 10 000 条旋毛虫肌肉幼虫灌胃大鼠, 35 d 后, 乙醚麻醉大鼠, 腹主动脉采血, 收集血清, 得到旋毛虫感染的大鼠血清。

1.2.5 重组蛋白的 Western blot 分析 电泳后将凝胶转印到 PVDF 膜上, 37 $^{\circ}$ C 下 5% 脱脂牛奶中封闭 1 h, TBST Buffer 洗膜 3 次, 每次 5 min。用 TBST 以 1:100 的比例稀释旋毛虫感染血清作一抗, 未感染旋毛虫大鼠血清作阴性对照, 将 PVDF 膜置于一抗中, 4 $^{\circ}$ C 摇床上过夜孵育。倒去一抗, TBST Buffer 洗膜 5 次, 每次 5 min。用 TBST 以 1:5 000 的比例稀释山羊抗大鼠 IgG 作二抗, 将 PVDF 膜置于二抗中, 37 $^{\circ}$ C 摇床上避光孵育 1 h。弃

去液体, TBST Buffer 洗膜 5 次, 每次 5 min。将超敏 ECL 显色液 A 液与 B 液混匀, 滴加在膜上, 用全自动发光成像系统显影并拍照留存。

1.2.6 *TsNHR-23* 基因在旋毛虫不同发育阶段的转录差异 7 000 条旋毛虫肌肉幼虫灌胃大鼠, 灌胃 5 d 后禁食 1 d, 取小肠剪成 1.5 cm 左右的肠段, 铺在三层纱布上, 置于无菌 PBS 中, 37 °C 下孵育 4 h, 收集成虫。于 RPMI-1640 培养基(含 1% 青链霉素双抗和 10% 胎牛血清)中孵育 24 h, 经 200 目筛网过滤分离成虫与幼虫后, 滤液 600×g 离心 10 min 收集幼虫, 沉淀即为旋毛虫新生幼虫。提取虫体 RNA, 反转录为 cDNA, 设计 3 对特异性引物, 以肌肉幼虫 cDNA 为模板, 筛选目的基因及内参基因的最优引物并优化引物浓度。以 3 个阶段虫体 cDNA 为模板, 使用筛选出的最优引物, 通过 qPCR 法检测 *TsNHR-23* 基因在旋毛虫不同发育阶段的转录水平。

1.2.7 抗 rTsNHR-23 多克隆抗体对肌肉幼虫的影响 收集旋毛虫肌肉幼虫, 用无菌的 PBS 清洗 10 次, 加入含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素的 RPMI 1640 培养基重悬虫体, 调整虫体悬液的浓度

为 2 000 条·mL⁻¹, 按每孔 1 mL 接种于 6 孔细胞培养板中。试验组分别加入不同稀释比(1:50、1:200、1:800)的抗 rTs-NHR-23 重组蛋白的大鼠血清, 同时设置 3 组对照, 分别为抗 pET-32a 空载体蛋白的大鼠血清、正常大鼠血清及 PBS 对照组, 每组设置三个重复, 于 37 °C 培养箱中孵育。用显微镜观察特定时间点(0、8、24、48、72 h)的运动及蜕皮情况并计数。

1.2.8 重组 TsNHR23 蛋白对小鼠巨噬细胞炎症细胞因子的检测 调整传代培养的 RAW264.7 细胞浓度为 1×10⁶ 个·mL⁻¹, 每孔 1 mL 接种到 12 孔细胞培养板中, 加入 rTs-NHR-23, 调整浓度为 5、10、20、40 μg·mL⁻¹, 设置无菌 PBS 组和 pET-32a(+) 对照组, 每组至少 3 个重复。在 37 °C 培养箱中孵育 6 h。弃去上清, 用 PBS 洗涤 3 次。加入 600 μL RNA isolater Total RNA Extraction Reagent, 将细胞吹打转移至 1.5 mL RNase-free 离心管中。反复吹打使细胞裂解充分, 冰上静置 5 min 后提取细胞 RNA, 随后反转录为 cDNA。使用 Primer Premier 5 软件设计引物, 如表 1 所示。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of fluorescence quantitative PCR

目的基因 Target gene	引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence
<i>GAPDH</i>	-F	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG
	-R	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG
<i>IL-1β</i>	-F	GCAACTGTTCTCCTGAACTCAACT
	-R	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
<i>IL-6</i>	-F	TCTCTGGGAAATCGTGGAATGA
	-R	GGTACTCCAGAAGACCAGAGGA
<i>IL-10</i>	-F	GACAACATACTGCTAACCGACTCC
	-R	TCCTTGATTCTCTGGGCCATGC

1.2.9 纳米颗粒 PLGA 包被重组 TsNHR-23 蛋白 取 4 mg 重组 NHR-23 蛋白(1 mg·mL⁻¹)。在通风橱中, 将 5% PLGA 溶液涡旋振荡, 逐滴加入 2 mL 5% PVA 溶液, 涡旋 2 min 后冰浴超声(40 W, 5 s 开/5 s 关, 5 min)。缓慢滴加蛋白/质粒溶液, 涡旋混合后重复超声 3 min。继续滴加 2 mL 5% PVA, 涡旋 2 min 后冰浴超声 6 min。敞

口振荡 3 h 挥发二氯甲烷。4 °C 40 000 r·min⁻¹ 超离 40 min, 收集上清备用。沉淀用 4 mL 超纯水重悬, -80 °C 预冻 2 h 后冻干 24 h, 得粉末-20 °C 保存。取少量粉末干燥后送 SEM 观察。包被效率是指包被进 PLGA 纳米材料的抗原(DNA) 占总抗原(DNA) 的百分比。通过间接法计算包被效率, 公式如下:

$$\text{包被效率}(\%) = \frac{\text{重组蛋白总质量} - \text{上清的体积} \times \text{上清中重组蛋白浓度}}{\text{重组蛋白总质量}} \times 100\%$$

1.2.10 小鼠试验分组与免疫程序 将 36 只 ICR 小鼠随机分成 3 组, 分别为 PBS-PLGA、pET-

32a-PLGA、rTs-NHR-23-PLGA, 采用背部皮下多点注射对小鼠进行免疫。试验的第 0 天(首次免疫

当天)、第 14 天(首免后 14 d)和第 28 天(二免后 14 d),采集小鼠眼眶后静脉血分离血清。试验的第 28 天,每只小鼠给予 200 条旋毛虫肌肉幼虫灌胃。

1.2.11 小鼠血清中特异性抗体总 IgG 的变化检测 将重组 rTs-NHR-23 蛋白以 $100 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ 加入 ELISA 板, 4°C 过夜包被。PBST 振荡清洗 3 次(每次 5 min),随后加入 5% BSA $200 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$, 37°C 封闭 1 h,洗涤 3 次。加入 1:100 稀释的待测血清 $100 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$, 37°C 孵育 1 h 后洗涤。加入 1:20 000 稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgG 二抗 $100 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$, 37°C 孵育 1 h,洗涤 5 次。每孔加入 TMB 显色液 $100 \mu\text{L}$ 避光反应 15~20 min,最后加 $50 \mu\text{L}$ 2M 硫酸终止,立即测定 $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 值。

1.2.12 小鼠血清中细胞因子的检测 ELISA 法检测小鼠血清 IGF-1、IL-6、TGF- β 的变化,将标准品稀释为 24、16、8、4、2 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (各浓度双孔 $50 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$)。样品孔加 $40 \mu\text{L}$ 稀释液+ $10 \mu\text{L}$ 血清(5 倍稀释),设空白孔, 37°C 孵育 30 min。每孔用 $100 \mu\text{L}$ 20 倍稀释洗涤液洗涤 5 次,加酶标试剂 $50 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$, 37°C 孵育 30 min。再次洗涤后加显色液 A/B 各 $50 \mu\text{L}$ 避光显色 15~20 min,终止后立即测定 $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 值。

1.2.13 旋毛虫的收集与计数 攻虫后 6 d 即试验的第 34 天,小鼠禁食 1 d,从每一组别中随机选取 6 只收集成虫和新生幼虫。攻虫后 35 d 即试验的第 63 天,从每一组别中剩余小鼠中随机选取 6 只,收集肌肉幼虫。收集到的虫体置于显微镜下观察并计数,每个样本重复计数 3 次。

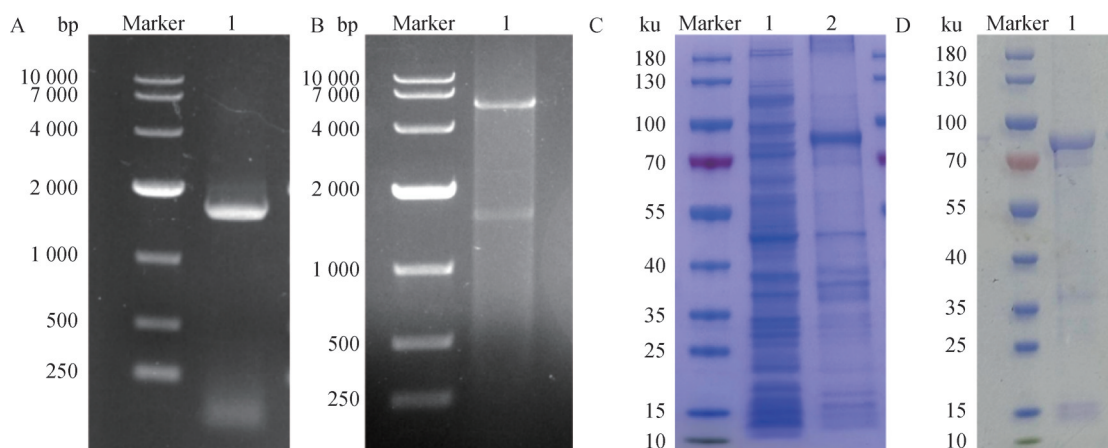
1.3 数据处理与分析

使用 IBM SPSS Statistics 27 软件处理试验数据,One-way ANOVA 法进行方差分析和显著性检验,使用 GraphPad Prism 10 软件进行作图。

2 结果

2.1 *TsNHR-23* 基因的克隆和表达

PCR 扩增 *TsNHR-23* 基因电泳结果如图 1A 所示,在 1 534 bp 处有单一条带,条带大小与预期一致。重组表达质粒 pET-32a(+)-NHR-23 经 *Sac* I 和 *Xho* I 双酶切后,在 5 900 bp 和 1 534 bp 处各有一个条带,如图 1B 所示,分别为载体和 *NHR-23* 基因片段。重组 TsNHR-23 蛋白主要分布在包涵体,如图 1C 所示。大量诱导表达及纯化后得到较纯的 rTsNHR-23,如图 1D 所示。



A. PCR 扩增(Marker. DL10000 DNA 相对分子质量标准;1. *TsNHR-23* 基因);B. pET-32a(+)-NHR-23 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切(Marker. DL10000 DNA 相对分子质量标准;1. 酶切产物);C. rTs-NHR-23 分布情况的 SDS-PAGE 分析(Marker. 蛋白相对分子质量标准;1. rTs-NHR-23 在上清中的分布;2. rTs-NHR-23 在包涵体中的分布);D. rTs-NHR-23 纯化后(Marker. 蛋白相对分子质量标准;1. rTs-NHR-23)

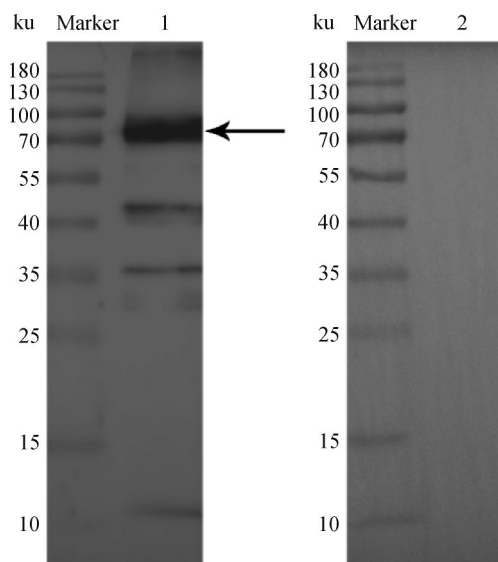
A. PCR amplification (Marker. DL10000 DNA molecular weight marker; 1. *TsNHR-23* gene); B. Double digestion of pET-32a(+)-NHR-23 with *Bam*H I and *Xho* I (Marker. DL10000 DNA molecular weight marker; 1. Digested product); C. SDS-PAGE analysis of rTs-NHR-23 distribution (Marker. Protein molecular weight marker; 1. Distribution of rTs-NHR-23 in supernatant; 2. Distribution of rTs-NHR-23 in inclusion bodies); D. Purified rTs-NHR-23 (Marker. Protein molecular weight marker; 1. rTs-NHR-23)

图 1 *TsNHR-23* 基因的克隆和表达

Fig. 1 *TsNHR-23* gene cloning and expression

2.2 rTs-NHR-23 蛋白的 Western blot 分析

通过 Western blot 方法验证 rTs-NHR-23 是否具有免疫原性,结果如图 2 所示。旋毛虫感染的大鼠血清能够识别 rTs-NHR-23,在 70~100 ku 处出现目的条带,而相对应的阴性血清未能识别出目的条带,证实了 rTs-NHR-23 的免疫反应性。



Marker. 蛋白相对分子质量标准;1. 旋毛虫感染的大鼠血清识别纯化的 rTs-NHR-23;2. 未感染的大鼠血清作为阴性对照

Marker. Protein molecular weight marker; 1. Purified rTs-NHR-23 recognized by *T. spiralis* infection rat serum; 2. Naive rat serum as negative control

图 2 rTs-NHR-23 蛋白的 Western blot 分析

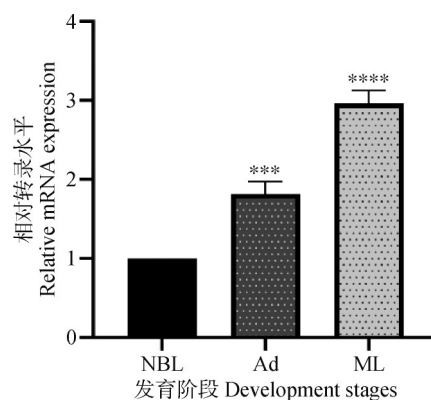
Fig. 2 *T. spiralis* infection rat serum recognition rTs-NHR-23

2.3 TsNHR-23 基因在旋毛虫不同发育阶段的转录差异

qPCR 检测数据(图 3)表明,旋毛虫不同发育时期中 *TsNHR-23* 基因的转录水平呈现显著波动。以新生幼虫为参照组,肌肉幼虫阶段 *TsNHR-23* 基因的转录水平最高(为新生幼虫的 2.96 倍),成虫阶段次之(为新生幼虫的 1.81 倍)。

2.4 抗 rTs-NHR-23 多克隆抗体对肌肉幼虫蜕皮的影响

将不同稀释比的抗 rTs-NHR-23 多克隆抗体与肌肉幼虫体外共培养,评估不同时间点(0、8、24、48、72 h)虫体蜕皮进程的动态变化,结果如图 4 所示,48~72 h 阶段运动活性呈逐渐降低趋势。0 和 8 h 未观察到蜕皮现象,24、48 和 72 h 正在蜕皮的虫体逐渐增多。对各组蜕皮的肌肉幼虫计数并计算



NBL. 新生幼虫;Ad. 成虫;ML. 肌肉幼虫。所有数据使用单因素方差析进行分析,与 NBL 组比较,*. $P < 0.05$,**. $P < 0.01$,***. $P < 0.001$,****. $P < 0.0001$

NBL. Newborn larvae; Ad. Adult; ML. Muscle larvae. All data were analyzed using one-way ANOVA. Compared with the NBL group, *. $P < 0.05$, **. $P < 0.01$, ***. $P < 0.001$, ****. $P < 0.0001$

图 3 *TsNHR-23* 基因在旋毛虫不同发育阶段转录水平的变化

Fig. 3 Transcriptional changes of *TsNHR-23* gene in different developmental stages of *Trichinella spiralis*

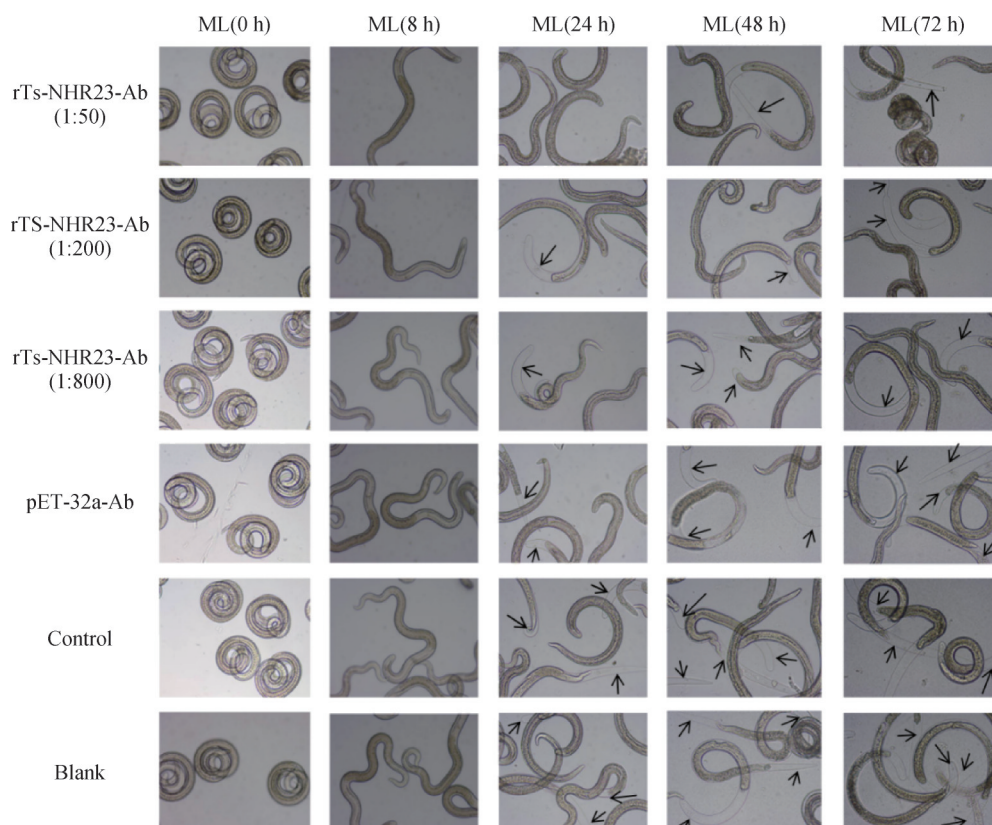
蜕皮率,结果如图 5 所示。Control 组(正常大鼠血清组)与 pET-32a-Ab 组的蜕皮率在所有时间点与 Blank 组基本无差异($P > 0.05$)。在 24 h 时间节点,各组蜕皮率较低,1:50 和 1:200 稀释比的 rTs-NHR-23-Ab 能显著抑制蜕皮的发生($P < 0.05$),而 1:800 稀释组与 Blank 组无显著差异。至 48 h 时,3 个对照组的蜕皮率增高明显,此时不同稀释比的抗 rTs-NHR-23-Ab 多克隆抗体均显示出极显著抑制效应($P < 0.0001$)。72 h 时,虽然各试验组的蜕皮率均呈上升趋势,但 1:50 稀释组仍维持极显著抑制作用($P < 0.0001$),1:200 和 1:800 稀释组也显示出高度显著性抑制效果($P < 0.001$)。

2.5 rTs-NHR-23 对小鼠巨噬细胞炎性细胞因子分泌的影响

qPCR 结果如图 6 所示,与对照组相比,不同浓度(5、10、20、40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)的 rTs-NHR-23 蛋白均显著提高了 RAW264.7 细胞中 IL-1 β 、IL-6、IL-10 的转录水平。

2.6 PLGA 纳米颗粒的包被及包被率的计算

通过扫描电子显微镜拍摄的 PLGA 纳米颗粒包被的重组蛋白如图 7 所示,所有制备的纳米颗粒均为圆球形,且表面有小的凸起。间接法计算得出

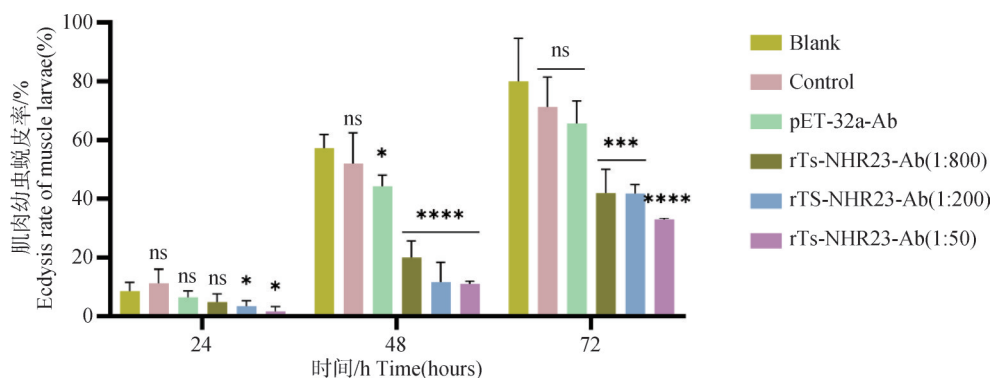


于10倍镜下观察,旋毛虫尾部出现透明鞘结构(黑色箭头)则认为蜕皮发生

Under 10 $\times$ magnification, the presence of a transparent sheath at the posterior end of *Trichinella spiralis* (indicated by black arrow) is identified as ecdysis

图4 抗rTs-NHR-23多克隆抗体对肌肉幼虫蜕皮的影响

Fig. 4 Effects of rTs-NHR-23-Ab on the ecdysis of *Trichinella spiralis* muscle larvae



0 h和8 h未观察到蜕皮,数据未显示。每组有3个样本,每个样本检测3次($n=3$)。所有数据均使用单因素方差进行分析,与Blank组比较,ns. 无显著性,*, $P<0.05$, ***, $P<0.001$, ****, $P<0.0001$

Each group had three replications and each replication was conducted once ($n=3$). Values were estimated using one-way. Compared with the Blank group, ns. no significance; *, $P<0.05$, ***, $P<0.001$, ****, $P<0.0001$

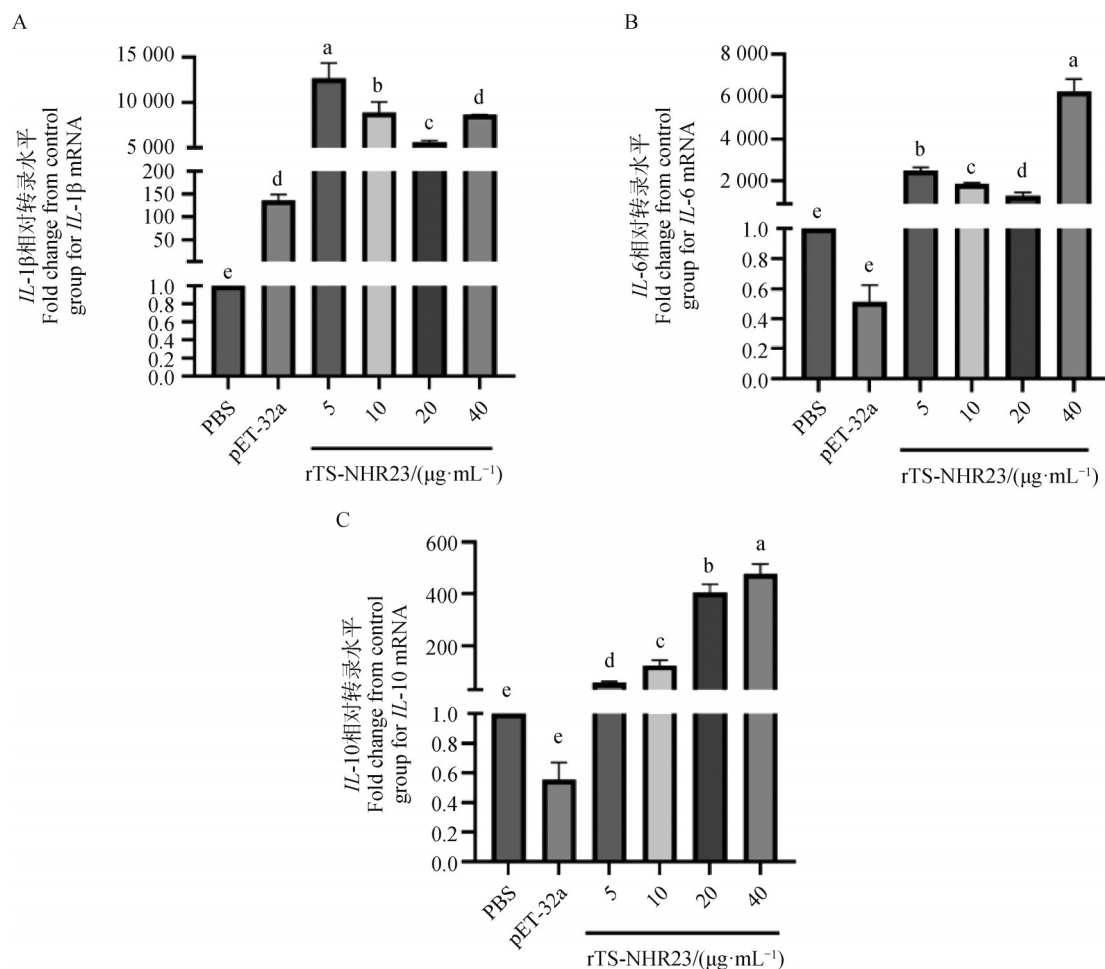
图5 抗rTs-NHR-23多克隆抗体对肌肉幼虫蜕皮率的影响

Fig. 5 Effects of rTs-NHR-23-Ab on the ecdysis rate of *Trichinella spiralis* muscle larvae

rTs-NHR-23-PLGA 和 pET-32a-PLGA 的包被效率分别为72.1%和77.6%。

2.7 小鼠血清中特异性抗体总IgG的变化检测

通过ELISA方法检测小鼠血清中IgG抗体水平的变化,结果如图8所示。免疫前(第0天)试验



A. rTs-NHR-23 对 RAW264.7 *IL-1 β* 转录水平的影响; B. rTs-NHR-23 对 RAW264.7 *IL-6* 转录水平的影响; C. rTs-NHR-23 对 RAW264.7 *IL-10* 转录水平的影响。字母相同表示差异不显著 ($P>0.05$), 字母不相同表示差异显著 ($P<0.05$)

A. Effect of rTs-NHR-23 on transcriptional levels of *IL-1 β* in RAW264.7 cells; B. Effect of rTs-NHR-23 on transcriptional levels of *IL-6* in RAW264.7 cells; C. Effect of rTs-NHR-23 on transcriptional levels of *IL-10* in RAW264.7 cells. Bars sharing the same letter indicate no significant difference ($P>0.05$), whereas different letters denote statistically significant differences ($P<0.05$)

图 6 rTs-NHR-23 对 RAW264.7 细胞细胞因子 mRNA 水平的影响

Fig. 6 Effect of rTs-NHR-23 on cytokine mRNA levels in RAW264.7 cells

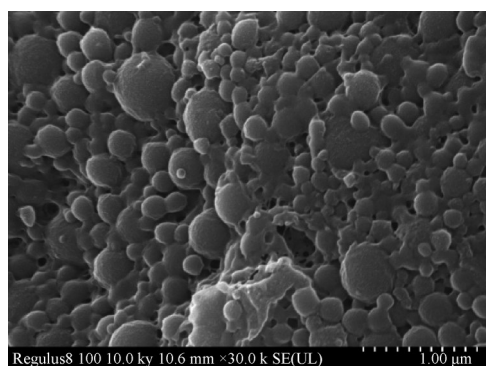
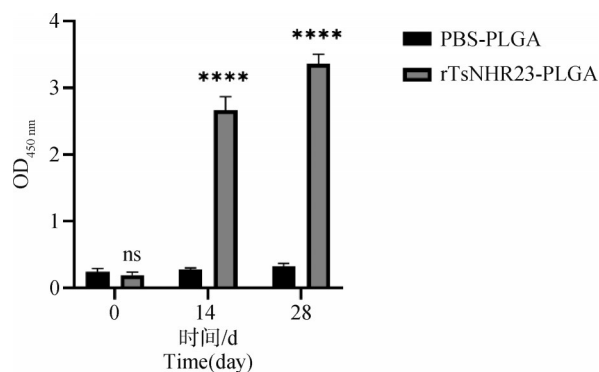


图 7 PLGA 包被的 rTs-NHR-23 扫描电镜观察

Fig. 7 Scanning electron microscopy observation of PLGA nanospheres loaded with recombinant rTs-NHR-23



ns. $P>0.05$; ****. $P<0.0001$

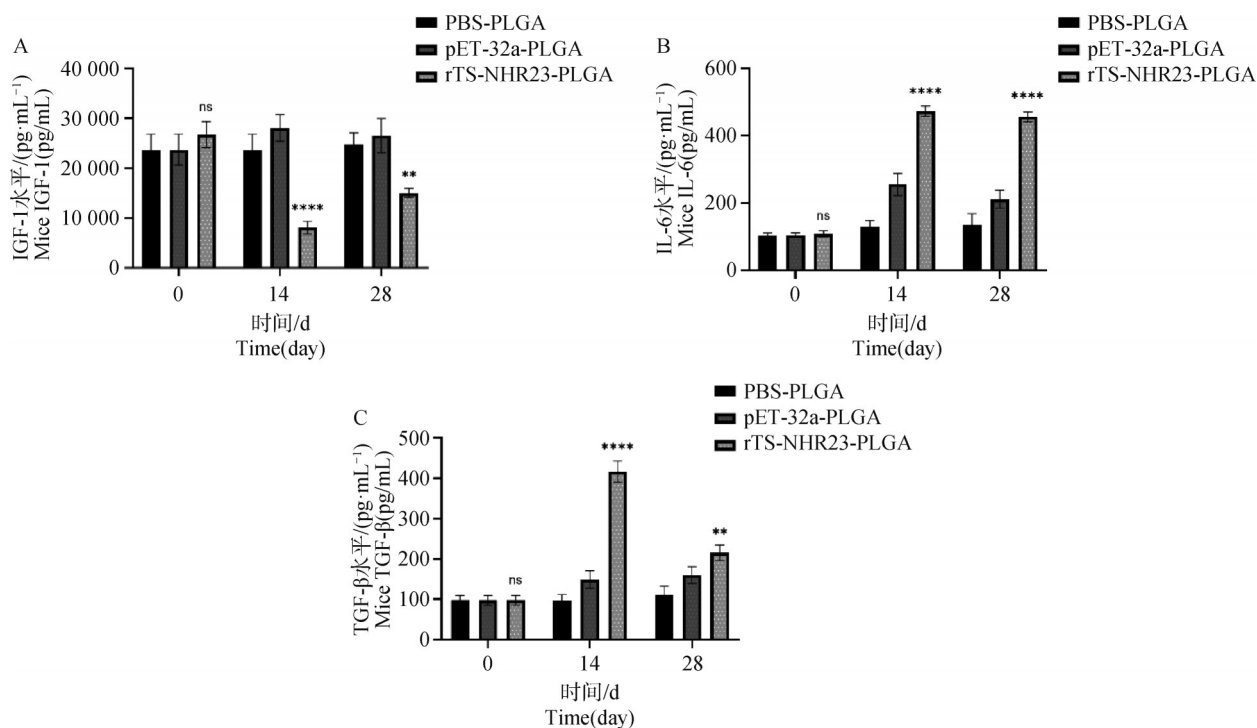
图 8 小鼠血清中特异性 IgG 抗体的检测

Fig. 8 Detection of specific IgG antibody in mice serum

组与对照组小鼠血清中 IgG 抗体水平基本无差异。首次免疫后两周(第 14 天),与对照组相比,rTs-NHR-23-PLGA 试验组小鼠血清中 IgG 抗体水平极显著升高($P<0.0001$),二次免疫后两周(第 28 天),所有试验组小鼠血清中 IgG 抗体水平均维持在较高的抗体滴度,显著高于对照组($P<0.0001$)。

2.8 小鼠血清中细胞因子的检测

小鼠血清中细胞因子的检测结果如图 9 所示。



每组 5 个样本,重复检测 3 次。使用单因素方差法分析,与 pET-32a-PLGA 组比较,ns. 无显著性, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$

Each group had three replications and each replication was conducted once ($n=3$). Values were estimated using one-way. Compared with the with pET-32a-PLGA controls, ns. no significance; ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$

图 9 小鼠血清中 IGF-1(A)、IL-6(B)、TGF-β(C) 细胞因子水平

Fig. 9 Levels of cytokine IGF-1(A), IL-6(B), TGF-β(C) in mice sera

2.9 旋毛虫的收集与计数

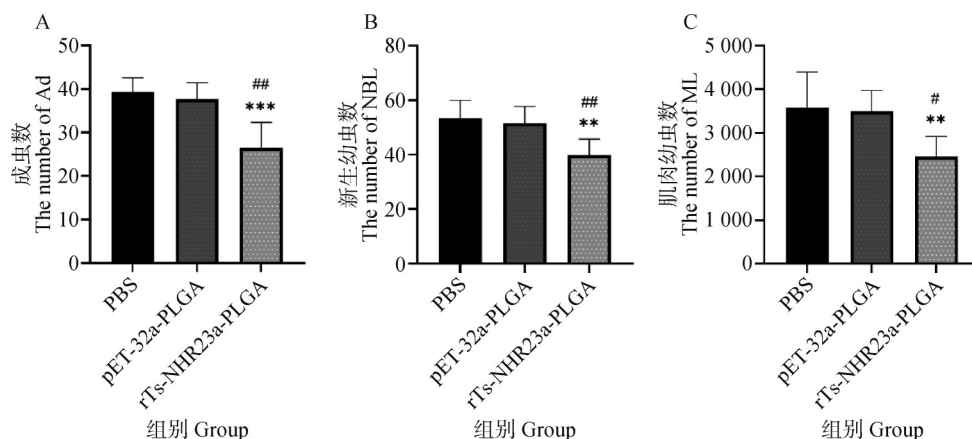
旋毛虫重组 NHR-23 蛋白的免疫保护效果如图 10 所示。所有小鼠经口感染 200 条肌肉幼虫,感染后 7 天肠道成虫数量显示:PBS-PLGA 空白组(39.2 条±1.5 条)、pET-32a-PLGA 对照组(37.7 条±1.7 条)与 rTs-NHR-23-PLGA 组(26.5 条±2.6 条)间存在显著差异,试验组较空白组虫负荷降低 32.43% ($P<0.05$)。体外培养 24 h 后平均每条雌虫产生的新生幼虫数量显示:rTs-NHR-23-PLGA 组(39.8 条±2.6 条/雌虫)较空白组(53.5 条±2.9 条)下降 25.53%,且显著优于对照组(51.6 条±

首次免疫后,与 PBS-PLGA 空白组和 pET-32a-PLGA 对照组相比,rTs-NHR-23-PLGA 组小鼠血清中细胞因子 IGF-1 的分泌水平显著下降,二次免疫后有所上调但仍显著低于对照组。对于细胞因子 IL-6 分泌水平,首次免疫后和二次免疫后 rTs-NHR-23-PLGA 组均显著高于对照组。首次免疫后,TGF-β 分泌水平显著高于对照组,二次免疫后下调明显。

2.7 条)。感染 35 天后肌肉幼虫数量显示,rTs-NHR-23-PLGA 组(2 453.4 条±208.8 条)较空白组(3 573.2 条±366.6 条)减少 31.34%,统计学差异显著($P<0.01$),较对照组(3 500.0 条±210.8 条)减少 29.90% ($P<0.05$)。数据表明重组 NHR-23 蛋白可显著抑制旋毛虫不同发育阶段虫体的数量。

3 讨论

纯化后的旋毛虫重组 NHR-23 蛋白能够被旋毛虫感染的大鼠血清识别,这一结果表明,NHR-23 蛋



A. 各组中旋毛虫成虫数量;B. 各组中成虫产生的新生幼虫的数量;C. 各组中旋毛虫肌肉幼虫数量。每组有5个样本,每个样本检测三次($n=5$)。所有数据均使用单因素方差分析进行分析,与PBS组比较,显著性差异以*表示(**, $P<0.01$, ***, $P<0.001$);与pET-32a-PLGA组比较,显著性差异以#表示(#, $P<0.05$, ##, $P<0.01$)

A. Number of *T. spiralis* adult worm; B. Number of *T. spiralis* newborn larvae produced by adult worm collected; C. Number of *T. spiralis* muscle larvae. Each group had five replications and each replication was conducted three times ($n=5$). Values were estimated using one-way. PBS-PLGA controls is denoted by * (**, $P<0.01$, ***, $P<0.001$), while # indicates significant differences compared to pET-32a-PLGA groups (#, $P<0.05$, ##, $P<0.01$)

图10 各组中旋毛虫数量

Fig. 10 Number of *T. spiralis* muscle larvae

白在重组表达后仍保留了天然抗原的关键表位或构象,在旋毛虫感染中可能是宿主免疫系统识别的重要靶标。*NHR-23*基因在旋毛虫成虫、新生幼虫、肌肉幼虫体内均有转录,且在肌肉幼虫阶段转录水平最高,这表明*NHR-23*基因在旋毛虫整个生命周期中均扮演着十分重要的角色,同时提示其可能是寄生虫适应宿主肌肉环境、维持慢性感染的核心调控因子。此前,本实验室Aleem^[22]发现,抗重组旋毛虫MAPRC2蛋白多抗能够以剂量依赖性方式降低肌肉幼虫在宿主中的传染性和存活率。在此基础上,本文延续这种方法,将抗rTs-NHR-23多克隆抗体与肌肉幼虫共培养,结果显示rTs-NHR-23-Ab不仅显著降低旋毛虫肌肉幼虫的蜕皮率,也可有效延缓其蜕皮起始时间并抑制蜕皮进程的加速发展,基于此,rTs-NHR-23蛋白可能在旋毛虫的生长发育中具有重要作用,有望成为新的疫苗候选分子。

巨噬细胞在炎症中具有双重作用,既能促进炎症反应以清除病原体和损伤组织,也能调节炎症反应以避免过度损伤和促进组织修复^[23],被认为是关键的免疫效应细胞^[24]。通过qPCR检测发现,旋毛虫重组*NHR-23*蛋白能显著调控RAW264.7细胞的炎症相关因子转录水平,IL-1 β 、IL-6是促炎细胞因子,IL-1 β 、IL-6的显著上调表明该蛋白能激活巨

噬细胞的经典促炎反应,增强吞噬和杀伤功能,直接抑制寄生虫的早期扩散^[25-26],而IL-10是抗炎细胞因子^[27],IL-10的显著上调表明能够通过平衡炎症反应,减少宿主因免疫过度激活导致的病理损伤,这种促炎与抗炎因子的共存可能反映了免疫系统的动态平衡^[28]。

通过PLGA纳米材料包被重组*NHR-23*蛋白,包被率高,包被效果良好,为后续动物试验的开展提供了基础。与传统佐剂相比,PLGA可保护重组蛋白或质粒免受酶解或体液环境的降解,延长其在体内的循环时间,这种缓释特性能持续释放抗原,模拟病原体长期刺激,从而增强免疫记忆(如抗体滴度和T细胞反应),提升免疫保护效果。首次免疫后14 d,试验组的小鼠血清中IgG抗体水平显著高于PBS空白对照组,说明重组*NHR-23*蛋白作为抗原激活了B细胞,诱导了初次免疫应答,但抗体水平未达到峰值,二次免疫后14 d,IgG抗体水平显著上调,体现了免疫记忆效应,此时IgG抗体维持在较高的水平。

免疫小鼠后,试验组小鼠血清中IGF-1的转录水平显著下调,IL-6和TGF- β 显著上调。胰岛素样生长因子(IGF-1),与IGF-1受体结合而发挥多种生理功能^[29-30],是生长发育的核心调控因子,受生长

激素(GH)的调控并介导GH的多种作用^[31],免疫后小鼠血清中IGF-1的分泌水平显著下调,可能是因为注射的激素受体与相应的DNA元件相结合抑制了IGF-1基因的转录活性。IL-6是一种维持生物体内平衡的炎性细胞因子^[32],试验组小鼠血清中IL-6的分泌水平均高于对照组,这是宿主防御反应的表现。TGF- β 是一种具有多种功能的细胞因子^[33],具有免疫抑制的特性^[34],可以独立调节细胞的增殖和分化,从而控制宿主激活Th1和Th2型免疫反应,免疫后,上调了试验组小鼠血清中TGF- β 的转录水平,说明旋毛虫重组NHR-23蛋白激活了TGF- β 信号通路,保护宿主不会受到过度炎症反应带来的伤害。旋毛虫减虫率方面,与空白对照组相比,试验组收集到的肌肉幼虫数量显著降低,表明NHR-23基因在旋毛虫生长发育、繁殖和入侵宿主的过程中发挥重要作用。

综上所述,旋毛虫重组NHR-23蛋白对宿主免疫细胞炎性细胞因子的分泌具有调节作用,能够显著抑制肌肉幼虫的蜕皮。PLGA纳米颗粒包被的重组NHR-23蛋白免疫小鼠后,肌肉幼虫荷虫量显著下降,具有作为候选疫苗的潜力。

4 结 论

本研究证实,旋毛虫核激素受体NHR-23在旋毛虫成虫、新生幼虫、肌肉幼虫体内均有转录和分布,不同稀释比的抗重组NHR-23蛋白多抗均能显著降低肌肉幼虫的蜕皮率,延缓蜕皮进程的发展。纳米材料包被的重组NHR-23蛋白能够显著提高小鼠血清中IgG抗体的水平,能有效调控Th1/Th2型细胞因子平衡,旋毛虫的减虫率较高,具有作为疫苗候选抗原的潜力。

参考文献(References):

- [1] WILSON N O, HALL R L, MONTGOMERY S P, et al. Trichinellosis surveillance-United States, 2008-2012[J]. *MMWR Surveill Summ*, 2015, 64(1):1-8.
- [2] RAWLA P, SHARMA S. *Trichinella spiralis* infection [DB]. StatPearls Publishing Copyright © 2025, StatPearls Publishing LLC, 2025.
- [3] MURRELL K D, POZIO E. Worldwide occurrence and impact of human trichinellosis, 1986-2009 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17(12):2194-2202.
- [4] WANG Z Q, CUI J, SHEN L J. The epidemiology of animal trichinellosis in China[J]. *Vet J*, 2007, 173(2):391-398.
- [5] ROSCA E C, TUDOR R, CORNEA A, et al. Central nervous system involvement in trichinellosis: A systematic review [J]. *Diagnostics (Basel)*, 2021, 11(6):945.
- [6] GOTTSTEIN B, POZIO E, NOCKLER K. Epidemiology, diagnosis, treatment, and control of trichinellosis [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2009, 22(1):127-145.
- [7] POZIO E, SACCHINI D, SACCHI L, et al. Failure of mebendazole in the treatment of humans with *Trichinella spiralis* infection at the stage of encapsulating larvae [J]. *Clin Infect Dis*, 2001, 32(4):638-642.
- [8] SANDER V A, SÁNCHEZ LÓPEZ E F, MENDOZA MORALES L, et al. Use of veterinary vaccines for livestock as a strategy to control foodborne parasitic diseases [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10:288.
- [9] HABIELA M, SEAGO J, PEREZ-MARTIN E, et al. Laboratory animal models to study foot-and-mouth disease: a review with emphasis on natural and vaccine-induced immunity [J]. *J Gen Virol*, 2014, 95(Pt 11):2329-2345.
- [10] XU D, TANG B, YANG Y, et al. Vaccination with a DNase II recombinant protein against *Trichinella spiralis* infection in pigs [J]. *Vet Parasitol*, 2021, 297:109069.
- [11] FENG S, WU X, WANG X, et al. Vaccination of mice with an antigenic serine protease-like protein elicits a protective immune response against *Trichinella spiralis* infection [J]. *J Parasitol*, 2013, 99(3):426-432.
- [12] ZHANG N, LI W, FU B. Vaccines against *Trichinella spiralis*: Progress, challenges and future prospects [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2018, 65(6):1447-1458.
- [13] WU W, LOVERDE T. Nuclear hormone receptors in parasitic helminths [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2011, 334(1-2):56-66.
- [14] GRONEMEYER H, GUSTAFSSON J A, LAUDET V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, 3(11):950-964.
- [15] TAO L J, SEO D E, JACKSON B, et al. Nuclear

- hormone receptors and their ligands: Metabolites in control of transcription[J]. *Cells*, 2020, 9(12):2606.
- [16] ANTEBI A. Nuclear hormone receptors in *C. elegans* [DB/OL]//*WormBook*. The *C. elegans* research community. *WormBook*, 2006: 1-13. [2025-12-08] https://www.wormbook.org/chapters/www_nuclearhormonerecep/nuclearhormonerecep.html
- [17] SLUDER A E, MATHEWS S W, HOUGH D, et al. The nuclear receptor superfamily has undergone extensive proliferation and diversification in nematodes [J]. *Genome Res*, 1999, 9(2):103-120.
- [18] WANG Z, STOLTZFUS J, YOU Y J, et al. The nuclear receptor DAF-12 regulates nutrient metabolism and reproductive growth in nematodes [J]. *PLoS Genet*, 2015, 11(3):e1005027.
- [19] DE MENDONÇA R L, BOUTON D, BERTIN B, et al. A functionally conserved member of the FTZ-F1 nuclear receptor family from *Schistosoma mansoni* [J]. *Eur J Biochem*, 2002, 269(22):5700-5711.
- [20] WANG M, WU L, WENG R, et al. Therapeutic potential of helminths in autoimmune diseases: helminth-derived immune-regulators and immune balance [J]. *Parasitol Res*, 2017, 116(8):2065-2074.
- [21] KOUNS N A, NAKIELNA J, BEHENSKY F, et al. NHR-23 dependent collagen and hedgehog-related genes required for molting [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 413(4):515-520.
- [22] ALEEM M T. 旋毛虫孕酮受体在虫体繁殖中的作用 [D]. 南京:南京农业大学, 2022.
- ALEEM M T. Role of progesterone receptor in the reproduction of *Trichinella spiralis* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2022. (in Chinese).
- [23] MATIN M A, HOSSEN M J, AHMED M S, et al. Chapter 4-The role of macrophages in inflammation// CHO J Y. Recent Advancements in Microbial Diversity[M]. Academic Press, 2022:53-71.
- [24] ZHANG X, GONCALVES R, MOSSER D M. The isolation and characterization of murine macrophages [J]. *Curr Protoc Immunol*, 2008, Chapter 14: 14.1.1-14.1.14.
- [25] MUHSIN M, AJENDRA J, GENTIL K, et al. IL-6 is required for protective immune responses against early filarial infection [J]. *Int J Parasitol*, 2018, 48(12): 925-935.
- [26] LOPEZ-CASTEJON G, BROUGH D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2011, 22(4):189-195.
- [27] CARLINI V, NOONAN D M, ABDALALEM E, et al. The multifaceted nature of IL-10: regulation, role in immunological homeostasis and its relevance to cancer, COVID-19 and post-COVID conditions [J]. *Front Immunol*, 2023, 14:1161067.
- [28] MURRAY J, ALLEN J E, BISWAS S K, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines [J]. *Immunity*, 2014, 41(1):14-20.
- [29] JÓZEFIAK A, LARSKA M, POMORSKA-MÓL M, et al. The IGF-1 signaling pathway in viral infections [J]. *Viruses*, 2021, 13(8):1488.
- [30] FORBES B E, BLYTH A J, WIT J M. Disorders of IGFs and IGF-1R signaling pathways [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2020 518:111035.
- [31] WANG J, ZHU Q, CAO D, et al. Bone marrow-derived IGF-1 orchestrates maintenance and regeneration of the adult skeleton [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, 120(1):e2203779120.
- [32] TANAKA T, NARAZAKI M, KISHIMOTO T. Interleukin (IL-6) Immunotherapy [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018. 10(8).
- [33] DENG Z, FAN T, XIAO C, et al. TGF- β signaling in health, disease, and therapeutics [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024. 9(1):61.
- [34] LARSON C, ORONSKY B, CARTER C A, et al. TGF-beta: a master immune regulator [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2020, 24(5):427-438.

(编辑 白永平)