

142-148

21232(8)

第12卷第2期
1997年6月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol. 12 No. 2
Jun. 1997

狂犬病毒糖蛋白 DNA 疫苗的研制及其免疫效果的观察

李萍 严家新 朱家鸿

(卫生部武汉生物制品研究所, 武汉 430060)

A

摘要 构建了含有狂犬病毒(RV)CVS株糖蛋白(GP)基因的重组质粒 pCMVCVSRG, 将其转染至鼠 NIH3T3 细胞中, 用间接免疫荧光法和 APAAP 法均证实 RVGP 能在真核细胞中表达。分别将含 RV 不同毒株的 GP 基因的质粒(DNA 疫苗)及空白载体质粒(对照组)免疫小鼠, 仅 DNA 疫苗免疫的小鼠产生了中和抗体。以 RV 攻击后, DNA 疫苗免疫组小鼠的存活率与对照组相比, 差异有极显著性意义($P < 0.01$); 不同的启动子(CMV 或 SV40)与不同 GP 基因(来源于 CVS 株或 ERA 株)对 DNA 疫苗的免疫效果无明显影响。在注射 120 d 后, 用 PCR 方法仍可检测出 RVGP 基因。结果表明: 狂犬病 DNA 疫苗能够诱生低水平的中和抗体和记忆性 B 淋巴细胞, 并能保护小鼠抵抗 RV 的攻击。该疫苗能在体内稳定存在。狂犬病 DNA 疫苗的研制为狂犬病免疫开辟了一条新途径, 并可为防治其他疾病的 DNA 疫苗的研制奠定基础。

关键词 狂犬病毒, DNA 疫苗, 质粒表达, 保护性免疫

R373.9, R392-33
研制: 免疫效果

1990 年美国 Wisconsin 大学的 Wolff 与 Vical 生物技术公司的 Felgner 合作建立基因直接注射技术^[1], 又称裸露 DNA 技术。此项技术的问世, 为基因免疫和基因治疗开辟了一条崭新的途径。近年来, 核酸疫苗已成为国际疫苗研究领域最热门的课题之一。其独到之处在于: 直接将编码某种蛋白的外源基因(RNA 或 DNA)注入宿主体内, 使之在体细胞中表达, 这种外源蛋白能被机体的免疫系统识别而激发免疫反应。与传统疫苗不同, DNA 疫苗兼有亚单位疫苗的安全性和减毒活疫苗诱导全面免疫反应的高效力, 还可对变异迅速的病原体提供交叉保护作用^[2]。本工作从狂犬病这一人畜共患疾病入手, 对 DNA 疫苗进行研究并观察其免疫效果, 为狂犬病免疫开辟一条新途径, 同时可为今后研制防治流感、艾滋病、丙肝等疾病的 DNA 疫苗奠定基础。

材料和方法

1 材料

1.1 化学试剂与酶类 限制性核酸内切酶为美国 Promega 公司产品; Taq DNA 聚合酶、 λ DNA/Hind III 及 λ DNA/Hind III + EcoRI 分子量标准、转染试剂 Lipofectin 购自 GibcoBRL 公司; 羊抗鼠 IgG 荧光标记抗体、APAAP 试剂盒由本所免疫研究室提供; 其它化学试剂均为国产 AR 级。

1.2 菌种与质粒 质粒 pRC/CMV 购自美国 Invitrogen 公司; 质粒 pSV2X3CVSRG(含有 SV40 启动子、CVS 株 RVGP 基因、SV40 聚 A 信号)、pSV2X3ERARG(含有 SV40 启动子、ERA 株 RVGP 基因、SV40 聚 A 信号)、*E. coli* NM522 菌株均为武汉生物制品研究所基因工程室保存。

· 收稿日期: 1996-08-06, 修回日期: 1996-10-03

1.3 细胞 NIH3T3 成纤维细胞由中国典型培养物保藏中心提供。

1.4 抗 CVS 株狂犬病毒糖蛋白单克隆抗体 美国疾病控制中心 Dr. Smith T 惠赠。

1.5 病毒 CVS 株 RV 为武汉生物制品研究所基因工程室提供。

1.6 动物 10~12 g 健康雌性昆明小白鼠由武汉生物制品研究所动物中心提供。

2 方法

2.1 真核表达载体 pCMVCVSRG 的构建与鉴定 质粒的提取、酶切、片段回收、连接、转化参照文献^[3]、限制性核酸内切酶酶切鉴定转化子。

2.2 质粒 DNA 的大量制备与浓度、纯度分析 采用碱裂解法^[3],以 5 mol/L LiCl 选择沉淀去除 RNA,酚抽提去除蛋白质,质粒 DNA 悬浮于 2 倍体积无水乙醇中, -20℃ 保存,临用前溶于 0.9% NaCl 溶液中,将 DNA 样品进行紫外波长扫描(240 nm~300 nm),根据 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 分析纯度,OD₂₆₀ 计算 DNA 含量。DNA 浓度调为 1 μg/μL。

2.3 Lipofectin 介导的瞬时转染 参照 GibcoBRL 公司产品说明书进行。

2.4 RV GP 在 NIH 3T3 细胞中的表达的检测 用常规间接免疫荧光法和 APAAP 法进行。

2.5 动物免疫效果观察 免疫方案:10~12 g 昆明雌性小白鼠右腓肠肌注射 0.5% 盐酸布比卡因 50 μL/只,1 d 后在相同部位分别注射重组质粒 pSV2X3CVSRG、pSV2X3ERARG、pCMVCVSRG 100 μg/只,于 0、21、35 d 免疫 3 次,以不含 RVGP 序列的空白载体 pSV2X3、pRC/CMV 免疫小鼠作为阴性对照。

2.5.1 小鼠攻击实验 末次免疫后 14 d,肌肉注射 0.2 mL 4 IMLD₅₀ 剂量的 CVS 株 RV,连续观察 2 周,记录小鼠存活数。

2.5.2 免疫小鼠血清中和抗体测定 分别在 20 d、34 d、48 d 取血,49 d(末次免疫后 14 d)用 4 IMLD₅₀ 剂量的 RV 攻击,攻击后分别在 14、30、60 d 取血,每份血为 4~5 只小鼠的混合血样,常规方法分离血清,56℃ 处理 30 min, -20℃ 保存备用。按文献^[4],采用小鼠中和试验法测定抗体。

2.6 小鼠体内 RVGP 基因的检测 DNA 疫苗免疫 1 次 120 d 后,分别取小鼠注射 DNA 部位肌肉及对侧未注射 DNA 的肌肉,按文献^[5]提取组织 DNA 作为模板。以空载体 pCMV 免疫小鼠肌肉组织 DNA 作阴性对照;以质粒 pCMVCVSRG 作阳性对照,进行 PCR 扩增。PCR 引物设计为:Primer I(-8~17, 25 mer)5'CG-GAATTCAGGTTCTCCTCAGGCTCT3';Primer II(774~798, 25 mer)5'CGCGGATCCTTGCATCGCGACCCAT3'。PCR 参数设置为:94℃ 30 sec,60℃ 1 min,72℃ 1 min 40 sec,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。各取 PCR 产物 10 μL 电泳,拍照。预期 PCR 产物的长度为 806 bp。

结 果

1 真核表达载体 pCMVCVSRG 的构建及鉴定

pCMVCVSRG 的构建图谱见图 1,转化子用 Hind III 酶切初步筛选,将分子量约为 7.2 kb 的重组子进一步用 XbaI + Hind III、SmaI、Bgl II 鉴定,电泳结果图 2 与预期酶切结果一致,证明载体 pRC/CMV 中插入了 RVGP 基因。

质粒 DNA 的纯度鉴定:碱法大量制备的质粒 DNA 经紫外波长扫描(240 nm~300 nm),OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值均为 1.8 左右,表明所得的 DNA 纯度高,无蛋白质、RNA 污染。

2 RV GP 在 NIH 3T3 细胞中的瞬时表达

通过间接免疫荧光法和 APAAP 免疫酶法均能检测出 RV GP 在 pCMVCVSRG 转染的 NIH 3T3 细胞中的瞬时表达,两种方法的结果一致。图 3、4 显示:RV GP 主要定位于胞膜和胞浆,与阴性细胞形成对比,说明 pCMVCVSRG 在 NIH3T3 细胞中可转录、翻译,产生 RV GP,从而证明 pCMVCVSRG 能在真核细胞中表达。

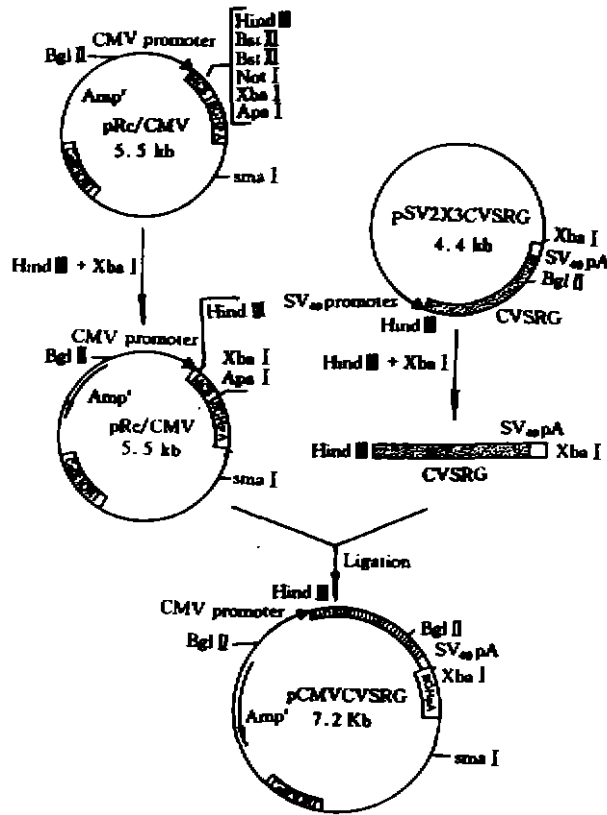


图1 pCMVCVSRG 表达载体的构建

Fig. 1 Construction of expressed plasmid pCMVCVSRG

3 疫苗对小鼠的保护作用

DNA 疫苗全程免疫后 14 d, 用 4 IMLD₅₀剂量的 CVSR 株 RV 攻击, 各组免疫小鼠的存活情况见表 1~3。表 1 显示: pCMVCVSRG 免疫小鼠的存活率为 66%, 对照组 pCMV 为 25%, 二者差异有极显著性意义(P<0.01), 说明 pCMVCVSRG 确实能诱免疫保护作用。从表 2、3 可以得出类似的结论, 即含有 RV GP 基因(不论此基因来自 ERA 株或 CVSR 株)的真核表达载体(不论启动子为 SV40 或 CMV)均可使免疫小鼠抵抗 RV 的攻击。这三种 DNA 疫苗组的存活率在统计学上无显著性差异(P>0.05)。

表 1 病毒攻击后 pCMVCVSRG 免疫小鼠的存活情况

Table 1 Survival condition of mice immuned with pCMVCVSRG after CVSR challenge

质粒 Plasmid	存活数 No. survived	死亡数 No. dead	存活率(%) Survival rate
pCMVCVSRG	29	15	66
pCMV	5	15	25

$\chi^2 = 9.24 > \chi^2_{0.01} = 6.63 \quad P < 0.01$

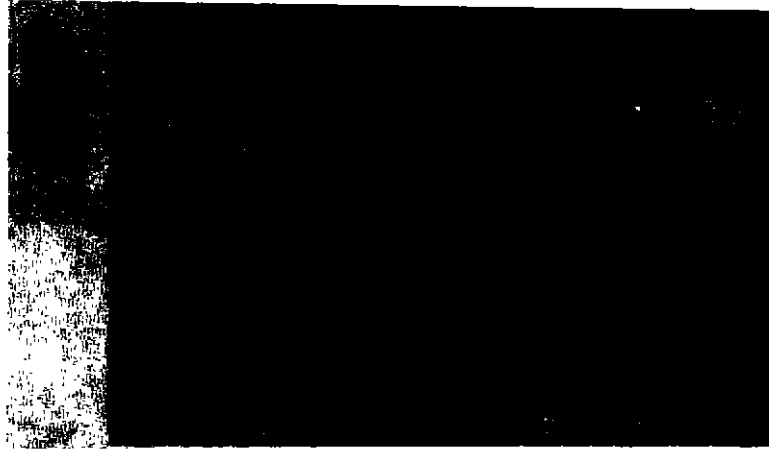


图 2 质粒 pCMVCVSRG 的酶切鉴定结果

Fig. 2 Restriction enzyme digestion result of the recombinant plasmid

1: λ DNA/Hind III marker 2: pRC/CMV/Hind III 3: pSV2X3CVSRG/Hind III + XbaI
4: pCMVCVSRG/Hind III + XbaI 5: pCMVCVSRG/SmaI 6: pCMVCVSRG/Bgl II

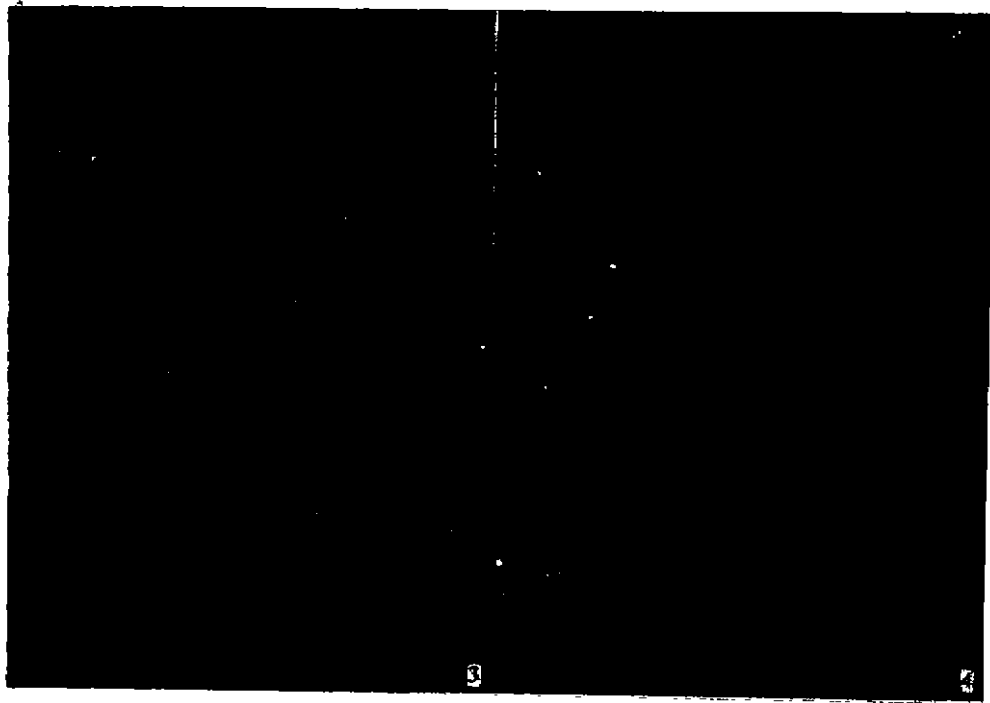


图 3 间接免疫荧光法测定 NIH 3T3 细胞中 RVGP 的表达 (400 \times)

Fig. 3 Indirect immunofluorescence of pCMVCVSRG-transfected NIH3T3 cells

图 4 APAAP 法检测 NIH3T3 细胞中 RVGP 的表达 (400 \times)

Fig. 4 APAAP of pCMVCVSRG-transfected NIH 3T3 cells

表2 病毒攻击后 pSV2X3CVSRG 免疫小鼠的存活情况

Table 2 Survival condition of mice immunized with pSV2X3CVSRG after CVS challenge

质粒 Plasmid	存活数 No. survived	死亡数 No. dead	存活率(%) Survival rate
pSV2X3CVSRG	27	19	59
pSV2X3	5	18	22

$$\chi^2 = 8.42 > \chi_{0.01}^2 = 6.63 \quad P < 0.01$$

表3 病毒攻击后 pSV2X3ERARG 免疫小鼠的存活情况

Table 3 Survival condition of mice immunized with pSV2X3ERARG after CVS challenge

质粒 Plasmid	存活数 No. survived	死亡数 No. dead	存活率(%) Survival rate
pSV2X3ERARG	24	15	62
pSV2X3	5	15	25

$$\chi^2 = 7.06 > \chi_{0.01}^2 = 6.63 \quad P < 0.01$$

4 免疫小鼠血清中和抗体的测定

DNA 疫苗免疫后,不同的时间采血,测定其中和抗体,结果见表4。小鼠接种狂犬病 DNA 疫苗 2 次,血清中测不出中和抗体,第三次接种后,pSV2X3CVSRG 组、pCMVCVSRG 组出现了低水平的中和抗体,效价分别为 1:12, 1:20, 而 pSV2X3ERARG 组仍无中和抗体产生。在 RV 攻击下,三组 DNA 疫苗免疫小鼠血清中和抗体效价很快上升,大约增加 2~3 个数量级,并能维持 2 个月以上,与对照组形成对比。

表4 小鼠血清中和抗体测定(实际中和毒力为 32 LD₅₀)Table 4 Neutralizing antibody titres in mice vaccinated with RV GP DNA vaccine and challenged with 32 LD₅₀ CVS

质粒 Plasmid	免疫后(d) Post-vaccination (d)			攻击后(d) Postchallenge (d)		
	20	34	48	14	30	60
pSV2X3CVSRG	<1:5	<1:5	1:12	640	508	236
pSV2X3ERARG	<1:5	<1:5	<1:5	441	320	233
pCMVCVSRG	<1:5	<1:5	1:20	1280	538	320
pCMV	<1:5	<1:5	<1:5	320	202	80

5 DNA 疫苗在体内的稳定性

PCR 扩增结果见图 5,注射部位肌肉组织出现 806 bp RV GP 基因上游区特异性条带,说明注射的质粒 DNA 能在肌肉组织中长期存在。

讨论

国外几家实验室相继报道^[2,6,7-10]用含有流感病毒血凝素(HA)、流感病毒核蛋白(NP)、HIVgp160、HBsAg 编码核酸序列的真核表达质粒肌肉注射动物后,能诱生高水平的特异性抗体和细胞毒(CTL)反应。另外还有报道表明^[11,12]:DNA 疫苗免疫小鼠后,即使血清中未测出中和抗体,也仍然能够保护动物抵抗随后致死剂量的病毒攻击。我们的结果支持了这种观点。

美国 Wistar 研究所的 Xiang 等^[13]对狂犬病 DNA 疫苗进行了深入研究。他们将狂犬病



图 5 PCR 检测肌肉组织中的 RVGP 基因(注射 120 d 后)

Fig. 5 Detection of RV GP DNA by PCR analysis in muscle with pCMVCVSRG plasmid(at 120 days postinjection)

1、 λ DNA/Hind III + EcoR I marker 2:pCMVCVSRG(positive control) 3:pCMVCVSRG - injected tissue
4:pCMVCVSRG - uninjected tissue 5:pCMV - injected tissue(negative control)

DNA 疫苗免疫小鼠,可诱生 RV 中和抗体、抗 RVGP 特异性 CTL 和分泌淋巴因子的 T_H 细胞,用 5 IMLD₅₀ 毒株攻击,免疫小鼠获得了 100% 的保护,而空载体免疫的对照组全部死亡。

我们的研究表明:含 RV GP 基因的质粒 DNA 确实能对小鼠提供针对 RV 的保护作用;该 DNA 疫苗可能诱生记忆性 B 淋巴细胞,后者在 RV 的攻击下很快动员,产生特异性中和抗体,发挥免疫效应;本实验采用的 CMV 启动子与 SV40 启动子对 DNA 疫苗免疫效果的影响无显著性差异,与 Xiang 的报道相同;CVS 株与 ERA 株来源的 RV GP 基因诱生的免疫保护效果亦无本质区别;DNA 疫苗能在体内长期存在,也与国外报道吻合^[1,5,6,14]。

本实验中 DNA 疫苗免疫保护效果与 Xiang 等人报道相比,还有一定差距,分析推测:其一,可能是真核表达载体中缺乏有效的增强子序列,如 pCMV 中没有 IntroA,致使 DNA 疫苗的表达效率不高;其二,长期低水平表达的 RV GP 可能持续被低水平清除,从而使免疫应答不足。因此,今后的工作重点应该是构建高效真核表达载体,与 RV GP DNA 疫苗同时注射能增强免疫应答的细胞因子(如 IL-2)cDNA,以提高疫苗的效果。同时,还应建立评估特异性细胞免疫功能的细胞介质的细胞毒试验,全面探讨 DNA 疫苗的作用机理。DNA 疫苗的最大优点是可对变异迅速的病原体提供交叉保护作用,为研制预防艾滋病等疾病的疫苗带来了希望。但研究艾滋病尚无理想的动物模型,而狂犬病是一种人畜共患疾病,对常用实验动物均可致病,有现成的廉价、方便的动物模型。在狂犬病 DNA 疫苗研究中积累的经验将有助于研制预防艾滋病等严重威胁人类疾病的疫苗。

参 考 文 献

- 1 Wolff JA, Malone RW, Williams P *et al*. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. Science, 1990, 247:1465~1468
- 2 Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE *et al*. Heterologous protective immunity to influenza A by intramuscular injection of DNA encoding a conserved viral protein. Science, 1993, 259:1745~1749
- 3 Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T *et al*. Molecular Cloning, A laboratory manual 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 4 朱家湾,温玲,沙健.中国狂犬病毒疫苗株(5sG)糖蛋白基因在痘苗病毒中的表达及免疫效果观察.中国实验和临床病毒

- 学杂志 1995, 9(3): 195~197
- 5 Lew D, Parker SE, Latimer T *et al.* Cancer gene therapy using plasmid DNA: Pharmacokinetic study of DNA following injection in mice. *Human Gene Therapy*. 1995, 6: 553~555
 - 6 Robinson HL, Hunt LA, Webster RG *et al.* Protection against a lethal challenge by immunization with a hemagglutinin expressing plasmid DNA. *Vaccine*. 1993, 11: 957
 - 7 严家新. 裸露 DNA 疫苗——疫苗发展的一条新途径. *生命的化学*, 1994, 14(4): 38~40
 - 8 李萍, 严家新. DNA 疫苗的研究进展. *国外医学(预防、诊断、治疗用生物制品分册)*, 1995, 18(3): 100~104
 - 9 Wang B, Ugen KE, Srikantan V *et al.* Gene inoculation generates immune responses against immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 4156~4160
 - 10 Davis HL, Michel ML, Mancini M *et al.* Direct gene transfer in skeletal muscle: plasmid DNA-based immunization against the hepatitis B virus surface antigen. *Vaccine*, 1994, 12(16): 1503~1509
 - 11 Webster RG, Fynan EF, Santoro JC *et al.* Protection of ferrets against influenza challenge with a DNA vaccine to the haemagglutinin. *Vaccine*, 1994, 12(16): 1495~1498
 - 12 Cox GJM, Zamb TJ, Babiub LA *et al.* Bovine Herpesvirus 1: Immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. *J Virol*, 1993, 67: 5664~5667
 - 13 Xiong ZQ, Spitalnik S, Tran M *et al.* Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. *Virology*, 1994, 199: 132~140
 - 14 Wolff JA, Ludtke JA, Acsadi G *et al.* Long term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Genet*, 1992, 1: 363~369

Research on DNA Vaccine Carrying the Rabies Virus Glycoprotein Gene and its Immune Protection Effects

Li Ping Yan Jiaxin Zhu Jiahong

(Department of Genetic Engineering, Wuhan Institute of Biological Products, Wuhan 430060)

The plasmid pCMVCVSRG containing the full-length cDNA of G protein of rabies virus CVS strain was constructed and transiently transfected into NIH 3T3 cell. The expression of G protein in transfected NIH 3T3 was confirmed by indirect immunofluorescent (IIF) and alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase (APAAP) methods. The mice were inoculated with pCMVCVSRG, pSV2X3CVSRG, pSV2X3ERARG, pCMV, pSV2X3, respectively. Only mice immunized with the G gene-containing vectors developed neutralizing antibody to rabies virus. After rabies virus challenge, the survival rates of DNA vaccine inoculated group have very significant difference comparing with negative control group ($p < 0.01$). The immune responses to the DNA vaccines containing different promoters (from CMV or SV40) and different G protein genes (from CVS strain or ERA strain) were compared and it was found to be similar in magnitude. The specific glycoprotein gene was detectable by PCR at least 120 days postinjection. Our data shows that rabies DNA vaccine can induce low level rabies virus-neutralizing antibody, memory B lymphocyte and result in protection against a subsequent challenge of rabies virus in mice. Our research works also provide a new approach to develop immunization of rabies virus.

Key words Rabies virus, DNA vaccine, Plasmid expression, Protective immunity