17(1):51 - 55 February 2002

# 腹腔注射重组腺病毒诱导的免疫反应

吴娟,李嘉琦,孙茂盛,戴长柏 (中国医学科学院 中国协和医科大学 医学生物学研究所, 昆明 650118)

# The Immune Response Induced by Recombinant Adenovirus with Administration of Interaperitonea Injection

WU Juan, LI Jia-qi, SUN Mao-sheng, DAI Chang-bai

(Institute of Medical Biology Chinese Academy of Medical Sciences Peking Union Medical College, Kunming 650118, China)

Abstract: In order to investigate the immunity of the recombinant adenoviruses inoculated to the animals, structural gene from RNA of HAV was cloned by RT-PCR and inserted into the shuttle plasmid (pXCX<sub>2</sub>Not I). A replication-defective adenovirus was rescued in 293 packing cells via homologous recombination of both plasmid pXCX<sub>2</sub>-CMV-HAV and pJM17 containing Ad5 genome with deletions of E1 region by calcium phosphate technique. A series of methods were employed to identify the generated recombinant ademovirus (rAdHAV). The titer of rAdHAV stocks was up to  $1 \times 10^9 \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ . The Kunming mice were administrated with rAdHAV by intraperitonea injection(i. p.). Anti-HAV IgG and HAV neutralizing antibodies were induced. In conclusion, a recombinant replication-defective adenovirus is an efficient delivery system to develop recombinant virus vaccine.

Key words: Recombinant adenovirus; Intraperitonea infection(i.p.); Imune response

搞要:为研究重组腺病毒接种实验动物后的免疫反应性,利用 RT-PCR 方法,从 HAV的 RNA 中克隆了结构蛋白基因插入穿梭质粒 pXCX<sub>2</sub>Not I,通过磷酸钙-DNA 共沉淀技术,将复制缺陷型腺病毒载体与线形化的 pXCX<sub>2</sub>-CMV-HAV共转染 293 细胞。一系列检测方法证明产生了重组腺病毒 rAdHAV。纯化后的 rAdHAV 滴度为  $1 \times 10^9 \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ ,腹腔注射免疫昆明种小白鼠后,可诱导产生抗 HAV IgG 和 HAV 中和抗体。复制缺陷型腺病毒可作为发展基因工程病毒疫苗载体的有效系统。

关键词: 重组腺病毒; 腹腔注射; 免疫反应

中图分类号:R373.9 文章标识码:A 文章编号: 1003-5125(2002)01-0051-05

腺病毒(adenovirus, Ad)被认为是发展重组病毒疫苗的有效载体<sup>[1]</sup>。复制缺陷型 Ad 由于不能在感染动物体内复制, 从而更增加了该系统作为病毒疫苗载体的安全性和有效性<sup>[2]</sup>。以复制缺陷型 Ad 介导表达的 HIV-1 的 Env 抗原<sup>[2]</sup>、狂犬病毒糖蛋白<sup>[3]</sup>以及麻疹病毒的血凝素和融合蛋白<sup>[4]</sup>等都在啮齿类动物中诱导产生了特异性免疫反应。HAV 只有一个血清型, 抗原表位主要位于结构蛋白 VP3 + VP1 上<sup>[5]</sup>。因此, 我们克隆了 HAV-吕 8(L8)株的 VP3 + VP1 基因, 构建了复制缺陷型重组腺病毒

rAdHAV,观察和分析了外源基因表达和动物免疫结果,试图探讨复制缺陷型 Ad 作为基因工程病毒疫苗载体的可能性和有效性。

# 1 材料与方法

## 1.1 质粒、细胞、病毒和实验动物

真核表达质粒  $pCMV_2 \triangle Bam H I、 穿梭质粒 pXCX_2Not I、E1 区缺失的腺病毒载体质粒 <math>pJM17^{[5]}$  由意大利 ICGEB 惠增。Ad5 转化的人胚肾细胞 (293 细胞), MA104 细胞由本室保存。人二倍体细

收稿日期:2001-06-25,修回日期:2001-08-27

作者简介:吴娟(1970-),女,白族,博士,研究方向为分子病毒学。E-mail:juanwu@21cn.com

胞 KMB17、HAV-1.8 为本所甲肝室提供。昆明种小白鼠由本所实验动物中心提供。

#### 1.2 主要试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、反转录试剂 盒、Klenow酶、DNA 分子量标准(DL2000)购自大连宝生物公司。柱式胶回收试剂盒购自上海华舜公司。MEM 培养基、DMEM 培养基为 Sigma 公司产品。蛋白质分子量标准、羊抗人(lgG)-FITC、羊抗人(lgG)-HRP 购自华美公司。猴抗 HAV 血清、甲型肝炎 lgG 抗体酶标诊断试剂盒、甲型肝炎总抗体酶标诊断试剂盒由本所甲肝室提供。

#### 1.3 引物

25064( + ):5'-CG <u>GAATTCT</u>CGAGTCTACAAT-*Eco* R 1

GATGA-3'

initiator codon

25065( - ):5'-GC TCATGATCAGGATGCTATA-

Xba 1 stop codon TGACTCTCAAATC-3'

2081( - );5'-AGAGGTCAATCTGTTATAACAA-TAC-3'

#### 1.4 重组腺病毒(rAd)的产生

取  $100\mu$ L HAV-L8 病毒液,用酚/氯仿各抽提 2 次,乙醇沉淀分离病毒 RNA 为模板,以反转录试剂 盒扩增目的基因,引物用 25064(+)和 25065(-), PCR 反应条件为 94C,1min; 53C,1min; 72C,1.5min,进行 30 个循环。扩增产物经 Klenow 酶平端 化后,克隆到通用质粒 pBS-SK 上,进行序列测定。

用 EcoR 1/Xba 1 酶切质粒 pBS-SK-HAV, 回收约 1.7kb 的 DNA 条带, 插入到经相同内切酶酶切的表达质粒 pCMV<sub>2</sub> △ Bam H 1 中, 产生质粒 pCMV-HAV。以 Spe 1/Nhe 1 酶切 pCMV-HAV. 回收约2.5kb 的 DNA 片段, 克隆到经 Xba 1 酶切的穿梭质粒 pXCX<sub>2</sub>Not 1 中, 产生重组穿梭质粒 pXCX<sub>2</sub>-CMV-HAV。

将纯化的 Ad 载体质粒 pJM17 与经 Not 1 线性化的 pXCX<sub>2</sub>-CMV-HAV 按 1:10 摩尔比混合,利用磷酸钙-DNA 共沉淀技术共转染 293 细胞<sup>[7]</sup>,产生rAd。

#### 1.5 rAdHAV 的鉴定及滴度测定

提取 rAd 感染的 293 细胞与正常 293 细胞的细胞总 RNA<sup>[7]</sup>, 分别以 25064(+)和 25065(-);

25064(+)和2081(-)为引物进行 RT-PCR 反应, PCR 反应条件同前,鉴定重组子;以含目的基因的 rAd 分别感染 MA104 细胞和293 细胞,分别进行免疫荧光检测和 western blot 测定,以筛选出 rAd-HAV。通过两轮蚀斑纯化后,用有限稀释法测定 rAdHAV的滴度。

#### 1.6 免疫动物实验及免疫结果检测

rAdHAV 经腹腔注射免疫 15 只抗 HAV 阴性的 3-4 周龄雌性昆明种小白鼠,免疫剂量为每只小鼠 1×108 pfu,于免疫后第 2、4、6、8、10、12 周随机抽取 5 只作单侧眼球采血,并分离血清,用甲型肝炎总抗体酶标诊断试剂盒(竞争 ELISA)检测实验动物体内抗 HAV lgG 的变化情况。取抗 HAV lgG 滴度最高的免疫血清,分别作 1:2、1:4、1:8、1:16 系列稀释后与 HAV-L8 (10<sup>5.0-5.5</sup> TClD<sub>50</sub>/mL)混合后于37℃保温 1h,感染 KMB17 细胞,16d 后收获细胞,用 10% Triton X-100 裂解细胞,以甲型肝炎 lgM 抗体酶标诊断试剂盒测定 rAdHAV 的中和性。

# 2 结果

### 2.1 HAV-l.8 结构蛋白 vp3 + vp1 基因的克隆

用 RT-PCR 方法, 从 HAV-L8 的 RNA 中扩增 出约 1.7kb 的预期 DNA 条带(图 1), 序列测定证明 为 HAV-L8 的 vp3 + vp1 基因(测序结果略)。 (GenBank Accession No. AF394945)

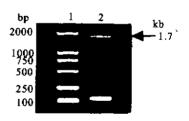


图 1 RT-PCR 扩增 HAV-L8 的 vp3 + vpl 基因

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of vp3 + vp1 from HAV-L8 amplifed by RT-PCR

1, Marks; 2, Band of vp3 + vp1 from HAV-L8 amplified by RT-PCR.

#### 2.2 rAd 的产生

将测序证明正确的 vp3 + vp1 基因克隆到表达质粒  $pCMV_2 \triangle Bam H 1$  的 CMV 启动子之下,产生完整目的表达盒 CMV-HAV-polyA。将完整目的表达盒连接到穿梭质粒  $pXCX_2Not 1$  中,获得外源表达盒两侧有部分 Ad-DNA 序列的重组穿梭质粒  $pX-CX_2-CMV-HAV$  (图 2)。用 pJM17 与线性化  $pX-CX_2-CMV-HAV$  (图 2)。用 pJM17 与线性化  $pX-CX_2-CMV-HAV$  (图 2)。用 pJM17 与线性化  $pX-CX_2-CMV-HAV$  (图 2)。

 $CX_2$ -CMV-HAV 共转染 293 细胞,通过胞内同源重组,产生 rAd(图 2)

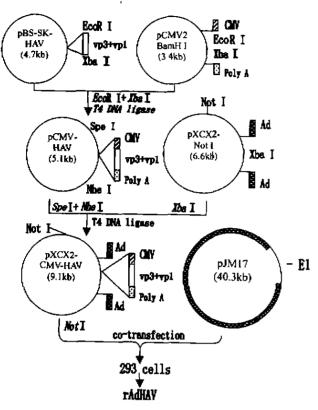


图 2 重组腺病毒构建图

Fig. 2 Construction map of recombinant adenovirus

#### 2.3 rAdHAV 的鉴定及滴度测定

共转染后,提取 rAd 感染的 293 细胞总 RNA 分别用两对引物进行 RT-PCR 鉴定,扩增出约 1.7kb和 610bp 的预期 DNA 条带,对照细胞中没有扩增出任何 DNA 条带(图 3)。

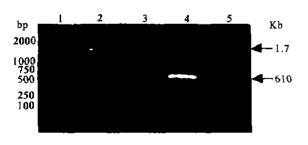


图 3 RT-PCR 鉴定 rAd

Fig. 3 Analysis of rAd with RT-PCR

1, Marks; 2, Amplified DNA band from RNA of MA104 cells infected by Ad (primer: 25064 and 25065); 3, Normal MA104 cells (control) (primer: 25064, 25065); 4, Amplified DNA band from RNA of MA104 cells infected by Ad (primer: 25064 and 2081); 5. Normal MA104 cells (control) (primer: 25064 and 2081)

用 rAd 感染 MA104 细胞, 24h 后, 用丙酮固定 细胞, 以猴抗 HAV IgG 作一抗, 羊抗人(IgG)-FITC 作二抗进行免疫荧光检测, 在感染细胞的细胞质中可见特异性荧光灶, 对照细胞中未检测到特异性免疫荧光(图 4)。



图 4 免疫荧光鉴定 rAd

Fig. 4 Determination of rAd with immunofluorescence assay Arrow shows positive MA104 cells.

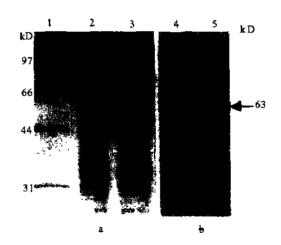


图 5 SDS-PAGE(a)和蛋白印迹(b)

Fig. 5 Analysis of SDS-PAGE(a) and western blot(b)

1, Protein marks; 2, Proteins from 293 cells infected by rAd; 3, Proteins from normal 293 cells; 4, 293 cells infected by rAd; 5, Normal 293 cells.

提取 rAd 感染的 293 细胞的总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色后, 在 63kD 处出现明显表达的蛋白条带(图 5a), 其大小与根据 vp3 + vp1 基因的分子量推算的蛋白大小相一致。将 SDS-PAGE 凝胶上的蛋白条带转移到 NC 膜上, 以猴抗HAV [gG 作一抗, 羊抗人(IgG)-HRP 为二抗进行 western blot 检测, 在 63kD 处有特异性杂交带。对

照细胞未出现任何杂交带(图 5b)。以上结果表明,在本实验中获得了复制缺陷型重组腺病毒 rAd-HAV,插入 Ad 基因组中的外源目的基因不仅能被正常转录,而且也能被表达成目的蛋白。纯化后的rAdHAV 滴度测定为 1×10°TCID<sub>50</sub>/mL。

## 2.4 免疫动物结果

抗 HAV 阴性的昆明种小白鼠腹腔注射 rAd-HAV 后, 用竞争 ELISA 法检测免疫血清中的抗 HAV IgG 水平, 第 4 周开始出现抗 HAV IgG, 第 6-8 周抗 HAV IgG 达到最高水平, 为 1:4, 在整个实验观察期间, 均能检测到抗 HAV IgG 存在(表 1)。

表 1 rAdHAV 诱导昆明种小白颜产生抗 HAV IgG 的滴度测定 Table 1 The determination of titer of anti-HV IgG induced by rAdHAV

<del></del>	血清稀释度				
	1:1	1 2	1:4	1.8	
2周	-•	-	_	_	
4周	+	+	-	-	
6周	+	+	+	-	
8周	+	+	+	-	
10周	+	+	-	-	
12周	+	-	_	_	

<sup>\*</sup> Means A490nm of parallel wells; + is positive; - is negative

取抗 HAV IgG 滴度最高的抗血清进行中和实验,rAdHAV 诱导昆明种小白鼠产生的 HAV 中和抗体滴度最高为 1:8(表 2)。

表 2 rAdHAV 诱导昆明种小白鼠产生的 HAV 中和抗体水平测定 Table 2 The determination of HAV neutralizing antibody induced by rAdHAV

	-	血滑	稀 释 度	
	1:2	1:4	1:8	1:16
6周	+ "	+	+	_
8周	+	+	+	

<sup>\*</sup> Means Agonum of parallel wells; + is positive; - is negative

# 3 讨论

研究表明, HAV 的 VP3 和 VP1 蛋白一起构成了 HAV 的表面抗原决定簇, 与 HAV 的中和有关<sup>[5]</sup>。本实验将 HAV-L8 的 vp3 + vp1 基因插入到 Ad DNA中,在 CMV 强启动子的控制下,实现了外

源基因在哺乳动物细胞中的高效表达。所表达的蛋白质能与猴抗 HAV IgG 发生特异性抗原抗体反应。与国内外一些学者在大杆菌或昆虫细胞中表达 HAV 结构蛋白的结果相似<sup>[9,10]</sup>。表明所表达的 HAV 结构蛋白具有 HAV 自然感染过程中所具有的抗原性。

Ad 是基因治疗、重组病毒疫苗载体[1,2~4] 及哺 乳动物细胞中高效表达外源基因的常用工具[8,10]。 E1 区缺失的复制缺陷型 Ad 由于不能在非许可性 细胞中增殖,故不会造成病毒在自然界的扩散,因而 有更理想的发展成为基因工程病毒疫苗载体的安全 性, 所以这类载体的应用也日益广泛起来。利用复 制缺陷型 Ad 作为疫苗载体, 不仅稳定性好, 可以口 服,而且在免疫新生动物时不会受到母体免疫对其 B细胞反应的影响,从而可有效激发机体产生特异 性免疫反应<sup>[3,11]</sup>。虽然啮齿类动物细胞对人 Ad 载 体的复制是半许可性的,但是,插入到 Ad DNA 中 的外源基因在啮齿类动物体内的表达量就足以刺激 机体产生特异性免疫反应<sup>[12]</sup>。本实验以 rAdHAV 经腹腔注射免疫昆明种小白鼠后, 诱导产生了抗 HAV IgG, 抗体阳转时间为免疫后第4周, 与张淑雅 等[13]报道的皮下接种甲肝减毒活疫苗(H2 减毒株) 后抗体阳转的时间(2-5 周)一致。腹腔注射 rAd-HAV 后也诱导实验动物产生了 HAV 中和抗体、说 明利用 rAd 作为病毒疫苗来预防疾病, 具有良好的 应用前景。

实验中 rAdHAV 诱导小鼠产生抗 HAV IgG 滴度偏低(1:4)的原因可能是由于 HAV 的抗原表位具有极强的构象依赖性,线性表位的免疫原性较弱。我们实验室曾经利用笔者所用的这套 Ad 系统表达过轮状病毒的外壳蛋白 vp4 基因,在小鼠体内诱导产生了较高水平的特异性抗体,国外一些学者以复制缺陷型 rAd 免疫啮齿类动物,均诱导产生了高水平的特异性抗体<sup>[2,4,14]</sup>。表明外源基因产生的特异性体液免疫反应的强弱取决于外源基因自身编码产物的免疫原性强弱,与 Ad 载体本身无明显相关性。利用痘苗病毒作载体表达 HAV 基因组的全部ORF,在家兔体内诱导产生了高滴度的抗 HAV IgG<sup>[15]</sup>。如果借助复制缺陷型 Ad 载体包装容量大的优势表达 HAV 的全部 ORF,应该也能产诱生高水平的抗 HAV IgG。

#### 参考文献

[1] Imler J L. Adenovirus vectors as recombinant viral vaccines[J].

- Vaccine, 1995, 13; 1143 1151.
- [2] Christine B B, Alan A, Sally A, et al. Replication-deficient recombinant adenoviruses expressing the human immunodeficiency virus Env antigen can induce both humoral and CTL immune responses in mice[J]. J Gen Virol, 1999, 80: 2621 – 2628.
- [3] 李文辉、张云,王树蕙、等,小鼠对表达狂犬病毒 3aG 株糖蛋白 的复制缺陷型腺病毒的免疫应答[J]. 中华实验和临床病毒学杂志、2001, 15:61-65.
- [4] Anthony R, Dharshini J, John L, et al. Oral or parenteral administration of replication-deficient adenoviruses expressing the measles virus haemagglutinin and fusion proteins protective immune responses in rodents[J]. J Gen Viral, 1998, 79: 1027 1031.
- [5] 成军,扬守纯.现代肝炎病毒分子生物学[M].北京:人民军医出版社,1997,11-24.
- [6] McGrory W J, Bautista D S, Graham F L. A simple technique for the rescue of early region I mutations into infections human adenovirus type 5[1]. Virology, 1988, 163:614-617.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd ed [ M ]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [8] 孙茂盛, 咎云红, 马雁冰, 等. 重组腺病毒表达轮状病毒 SA11 毒株 vp4 蛋白及其糖基化[J]. 中国医学科学院学报, 2000, 22;

- 52 56
- [9] 贾希瑜,从勉尔,李景丽,等.甲型肝炎病毒结构蛋白在大肠杆菌中的表达[J].病毒学报,1989,4:312-317.
- [10] Harmon S A, Johnston J M, Ziegelhoffer T, et al. Expression of hepatitis A virus capsid sequences in insect cells[J]. Virus Res, 1988, 10:273 – 280.
- [11] Wang Y J. Xiang Z Q. Pasquini S, et al. The use of an Eldeleted replication-defective adenovirus recombinant expressing the rabies virus glycoprotein for early vaccination of mice against rabies virus[J]. J Virol. 1997, 71:3677 3683.
- [12] Prevec L, Schneider M, Rosenthal K, et al. Use of human adenovurus-based vectors for antigen expression in animals[1]. Gen Virol, 1989, 70:429 434.
- [13] 张椒雅,毛江森,黄海鹰,等.甲型肝炎减毒活疫苗(H2 减毒株)在人体接种的安全性观察[]].中华医学杂志,1990,70:682-684.
- [14] Brian F, Carug P R. Keith N P, et al. A recombinant human adenovirus expressing the Simian immunodeficiency virus Gag antigen can induced long-lived immune responseses in mice[J]. J Gen Virol, 1997, 78:991-997.
- [15] 高峰, 刘崇柏, 伊瑶, 等. 用重组電苗病毒作载体表达甲型肝炎病毒抗原[J]. 病毒学报, 1989, 5:303 311.