第19卷2期 中国病毒学 19（2）：105—109
2004年4月 VIROLOGICA SINICA April 2004

编码流感病毒血凝素基因和 *CD40L* 的核酸疫苗抗小鼠流感研究*

邹丽容[1]，方 芳[1]，陈 则[1,2**]

（1. 湖南师范大学生命科学学院，湖南长沙 410081；2. 中国科学院武汉病毒研究所，湖北武汉 430071）

Plasmid Encoding CD40 Ligand Enhances Immune Response to Influenza DNA Vaccine*

ZOU Li-rong[1], FANG Fang[1], CHEN Ze[1,2**]

(1. The College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China; 2. Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Scineces, Wuhan 430071, China)

Abstract: *CD40L* gene can act as a genetic adjuvant. The objective of this study was to test the effectiveness of *CD40L*-expressing plasmid on the immune response to influenza A/PR/8 virus hemagglutinin (*HA*) DNA vaccine. To achieve this, we constructed plasmid DNA encoding murine *CD40L* and coimmunnized the plasmid with *HA* DNA to the BALB/c mice muscle by electroporation. Each DNA at a dose of 30 μg was administered twice at a 3-week interval. One week after the second vaccination, the mice were challenged with a lethal dose of influenza A/PR/8 virus. We found that, after lethal influenza virus challenge, *CD40L* and *HA* DNA-coimmunized mice exhibited higher induction of specific IgG (in particular IgG2a) against *HA* as well as lower body weight loss than those of *HA* DNA immunized alone. We concluded that *CD40L* gene had adjuvant effects on influenza DNA vaccine.

Key words: *CD40L*; DNA vaccine; Influenza; Hemagglutinin

摘要： 为了检测表达 *CD40L* 的质粒能否作为核酸疫苗佐剂提高 A/PR8/34 流感病毒血凝素（*HA*）DNA 疫苗的免疫应答，构建了表达鼠 *CD40L* 的质粒，并将它与 A 型流感病毒的 *HA* DNA 疫苗用电击的方法共同免疫 BALB/C 小鼠（各 30μg），免疫两次，间隔三周，第二次免疫后 1 周，用致死量流感病毒 A/PR8/34 攻击。发现与单独免疫 30μg *HA* 相比，血清中抗 HA 的 IgG 抗体量明显提高，且以 IgG2a 抗体提高为主，小鼠体重减轻非常少且体重恢复加快。实验结果显示，*CD40L* 能作为流感病毒核酸疫苗佐剂，提高小鼠抗流感病毒攻击的能力。

关键词： *CD40L*；DNA 疫苗；流感病毒；血凝素

中图分类号： R373 **文献标识码：** A **文章编号：** 1003-5152(2004)02-0105-05

流感 DNA 疫苗能够在不同的动物模型中诱导抗流感病毒的保护性免疫应答，已有实验证明当核酸疫苗与细胞因子共同免疫时，能进一步提高保护性免疫应答，这些细胞因子包括白介素-1(IL-1)～白介素-8(IL-8)，白介素-12(IL-12)，干扰素(interferon)，巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)，肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor)等[1~5]。CD40L 是肿瘤坏死因子超家族的成员之一，含有 261 个氨基酸，为 II 型跨膜糖蛋白，定位于 Xq^{24} 上，其相对分子量（Mr）为 39.0 kDa[6,7]。*CD40L* 基因已经作为许多病毒 DNA 疫苗的免疫佐剂，包括艾滋病[8]、单纯疱疹病毒[9]、呼

收稿日期：2003-10-10，修回日期：2003-12-15
* 基金项目：国家“863”计划（2001AA213051）；自然科学基金（30170043/C01010801）；国家教育部优秀青年教师基金（20001685）
作者简介：邹丽容（1975-），女，湖南邵阳籍，在读博士，主要研究方向为流感病毒核酸疫苗。
** 通讯作者：陈则（1964-），男，上海籍，教授，博士生导师，主要研究方向为流感病毒核酸疫苗。
Corresponding author. Tel/Fax: 0731-8872781; E-mail: chenze@mail.hunnu.edu.cn

吸道综合病毒[10]和EB病毒[11]等，表明 *CD40L* 能作为一种较好的DNA疫苗佐剂提高DNA疫苗诱导的抗原特异性免疫应答。然而 *CD40L* 在流感病毒DNA疫苗中的作用还有待于进一步证明。

在目前的实验中，我们构建了表达鼠 *CD40L* 基因的质粒，并在BALB/c小鼠中检测了它对流感病毒 A/PR/8/34(H1N1) *HA* DNA疫苗的免疫佐剂效果。结果表明，与单独免疫 *HA* DNA疫苗相比，共同免疫 *HA* 和 *CD40L* DNA疫苗提高了抗HA的IgG抗体应答，致死量流感病毒 A/PR/8/34 攻击后，小鼠体重丢失显著减少。

1 材料和方法

1.1 质粒构建和纯化

质粒 pCAGGSP7/*HA* 由我们以前构建[12]。*HA* 基因从 A/PR/8/34（PR8，H1N1）病毒株中克隆得到，质粒 pCAGGSP7 来源于由 Niwa *et al* 构建的 pCAGGS[13]，将多克隆位点 *Kpn*1，*Xho*1，*Cla*1，*Eco*RⅤ，*Sma*1，*Not*1 和 *Sac*1 插入 pCAGGS 的 *Eco*R1 位点得到 pCAGGSP7。质粒 pCAGGS 含鸡的β-肌动蛋白启动子成分和SV40的复制起始部位（Ori）。

鼠的 *CD40L* 基因通过 PCR 从小鼠脾脏细胞的 cDNA 文库（Clontech 公司）扩增，正向引物为 5′ TTC CTC GAG CAT GAT AGA AAC ATA CAG-3′，反向引物为 5′TGA CCC GGG GTA TAG GGA AGA CTG CCA-3′。然后通过 *Xho*1 和 *Sma*1 两个酶切位点正向插入表达载体 pCAGGSP7 中。编码 *HA* 和 *CD40L* 的质粒在大肠杆菌 XL1-blue 中扩增，用QIAGEN纯化试剂盒（QIAGEN, Chatsworth, CA）纯化。*CD40L* 核苷酸序列经 377 DNA 测序仪（Applied Biosystem）测序证实。测序反应按说明书进行操作。

1.2 免疫和攻击

4～6周SPF级BALB/c小鼠购自湖北医学科学院实验动物中心，在湖南师范大学生命科学院SPF级动物房饲养至6～8周龄。然后将小鼠分成3组，每组10只，各组分别免疫30 μg HA、30 μg HA+30 μg *CD40L*，没有免疫组小鼠为对照组。轻度麻醉后，在小鼠两条腿的股四头肌用 26 号针头的注射器注射质粒，在肌肉注射针孔的两侧插入电击仪(Electro Square Porator T820M；BTX，San Diego，CA)的两根电极，相距0.5cm，然后电击（电压100v，电击时间 50ms，电击正负各三次，间隔 1s）[14]，免疫二次，间隔三周。第二次免疫后一周用 $40\times LD_{50}$ 的致死量 A/PR8/34(H1N1) 病毒滴鼻攻击小鼠。这种感染能够引起病毒在小鼠肺部快速、广泛的复制，使非免疫组小鼠 6～8d 内全部死亡，病毒攻击后 3～21d 内定期观察小鼠的体重变化和死亡。

1.3 样本采集

第一次免疫后3周，加强免疫前，用断尾法从小鼠尾部取血，第二次免疫后 10d（病毒攻击后 3d），每组小鼠取出 5 只用氯仿麻醉，1mL 一次性注射器从心脏取血。收集血清检测 IgG、IgG1 和 IgG2a 抗体。每组余下的 5 只小鼠用于进一步观察。

1.4 抗体检测

抗 HA 的 IgG、IgG1 和 IgG2a 抗体量用 ELISA 法测定。ELISA 在聚苯乙烯酶标板上进行，其步骤是依次加入如下试剂：包被液(75μL 10mg/mL 溶解在 PBS 中的 HA 蛋白)；75μL 封闭液（PBS 中含 1%的 BSA 和 0.01%的叠氮钠）；75μL 按 2 倍稀释的血清；75μL 按 10000 稀释的生物素标记的山羊抗老鼠 IgG 抗体(γ-chain specific)、IgG1 抗体(γ1-chain specific)和 IgG2a 抗体(γ2a-chain specific) (Southern Biotechnology Associates, Inc. USA)；75μL 250 倍稀释的碱性磷酸酶标记的链菌蛋白；75μL 0.01g/mL 的 PNPP 溶液。最后通过酶标仪(Labsystems Muliskan Ascent, Thermo Bioanalysis Company, Finland)的波长 414～405nm 读数。

1.5 统计学

实验组间的数据进行评定用 Student's t-test；$p<0.05$ 定为统计学上的显著差异；存活率是否有意义用 Fisher's exact test 比较实验组和对照组来确定。

2 实验结果

2.1 鼠的 *CD40L* 基因的克隆

鼠的 *CD40L* 基因从小鼠脾脏细胞的 cDNA 文库中通过 PCR 的方法克隆得到，*CD40L* 基因插入 pCAGGSP7 中得到 pCAGGSP7/*CD40L*，其具体方法见材料和方法中。质粒 pCAGGS 的启动子为鸡的β-肌动蛋白。

2.2 *CD40L* 能够提高小鼠抗致死量流感病毒的攻击

小鼠分成3组，每组 10 只，各组分别免疫 30 μg *HA*、30μg *HA*+30 μg *CD40L*，没有免疫组小鼠为对照组。用电击法共免疫小鼠两次，间隔三周，第二次免疫后一周，用致死量流感病毒攻击，3d 后，一半用来取血，剩下的一半用来观察死亡率和小鼠体重变化以用来评价 *CD40L* 作为免疫佐剂在抗流感病毒肺部急性感染中的效果，如图 1 所示，与单独免

疫 *HA* 相比，共同免疫 *HA* 和 *CD40L* 组小鼠体重丢失明显减少且体重恢复加速。虽然在我们以前的实验中已得到证明，30μg*HA* 已经能够完全提供保护[15]，但是病毒攻击后，小鼠的体重下降较多，但在目前的实验中，共同免疫 *HA* 和 *CD40L* 后，小鼠的体重减轻很少，且体重恢复很快，而体重丢失是 A 型流感病毒感染小鼠后一个非常明显的临床症状。

2.3 共同免疫 *HA* 和 *CD40L* DNA 疫苗提高了 IgG 抗体的产生

如上所述，小鼠分别两次免疫 30 μg *HA*，30 μg *HA* 加上 30 μg *CD40L*，间隔三周，初免后三周从小鼠尾部取血，第二次免疫后一周，用致死量流感病毒 A/PR8 攻击，病毒攻击后 3d，其中一半小鼠心脏取血，用 ELISA 法测血清中的 IgG 抗体。我们发现与单独免疫 *HA* 相比，无论是初免还是加强免疫后，共同免疫 *HA* 和 *CD40L* 明显的提高了抗 *HA* 的 IgG 抗体产生（Fig.2），且加强免疫后的抗体水平高于初免后的抗体水平。

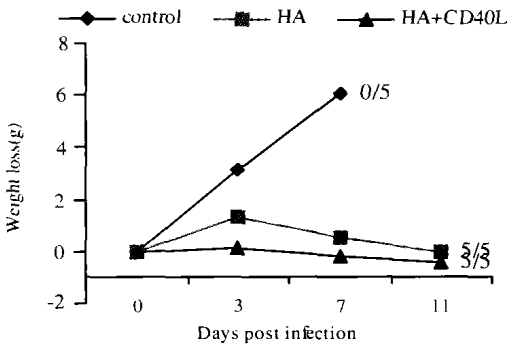

图 1 病毒攻击后小鼠体重丢失和感染后恢复

Fig. 1 Weight loss and recovery after virus challenge.

Mice were immunized twice, 3 weeks apart with 30ug *HA* or 30ug *HA* plus 30ug *CD40L* by electroporation, one week after the second immunization, mice infected intranasally with 50 $\times LD_{50}$ of influenza A/PR/8/34 virus. Body weight was monitored from day 0 to day 14. Shown are the average values of body weights of living mice. This infection caused death in 7 days in unvaccinated mice, the mice in *HA* DNA-vaccinated and covaccinated group group exhibited a 100% survival rate.

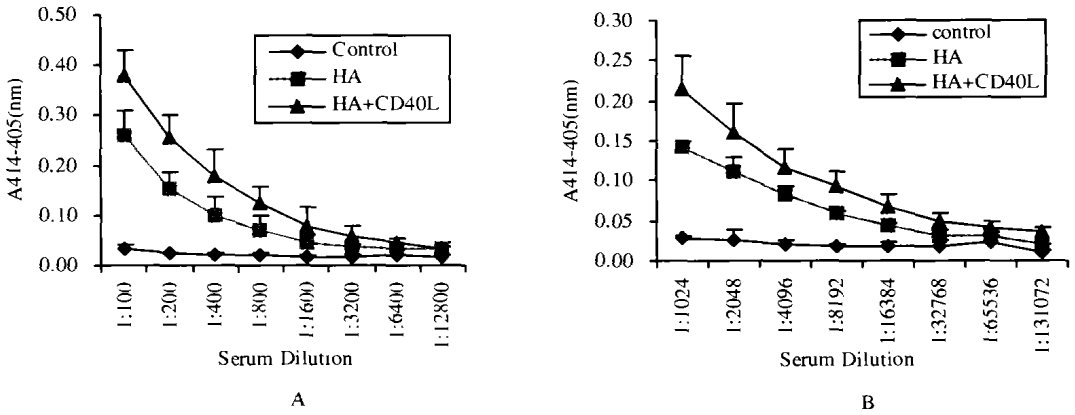

图 2 病毒特异性的血清 IgG 滴定

Fig. 2 Virus-specific serum IgG titers

A: HA –specific serum IgG titers, 3 weeks after the first immunization; B: *HA* -specific serum IgG titers, 10d after the second immunization.. The mean O.D(±SD) of the ELISA for serial dilutions of the antisera from each group of mice displayed with respect to each dilution (n=5 per group). The antibody response after co-injection of plasmid *HA* along with *CD40L* (top curve) was consistently higher than HA and control groups at all dilutions.

2.4 *CD40L* 与 *HA* 共同免疫后 IgG 亚型抗体的变化

为了检测 *CD40L* 质粒是否影响 IgG 亚型抗体的产生，加强免疫后我们检测了抗 HA 的特异性血清 IgG 中 IgG1 和 IgG2a 的相对数量，如图 3 所示，共同免疫 *HA* 和 *CD40L* 后，稍微提高了抗 HA 特异性的 IgG1 抗体，但 IgG2a 抗体显著提高，表明 *CD40L* 偏向于 Th1 型免疫应答。

3 讨论

本文的目的是检测 *CD40L* 在流感 DNA 疫苗中的免疫佐剂作用，我们的实验结果表明，与单独免疫 *HA* DNA 相比，*CD40L* 与 *HA* DNA 疫苗共同免疫后，诱导出了更高的 IgG 抗体，且以 IgG2a 为主，用致死量流感病毒 A/PR8/34 攻击后，不但能对小鼠提供 100%的保护，且体重丢失明显减少。

我们知道，*CD40L* 主要表达在激活的 T 细胞，尤其是 $CD4^+$T 细胞，亦可以在嗜碱性细胞和肥大细胞以及 NK 细胞和单核细胞等上表达。它能够与

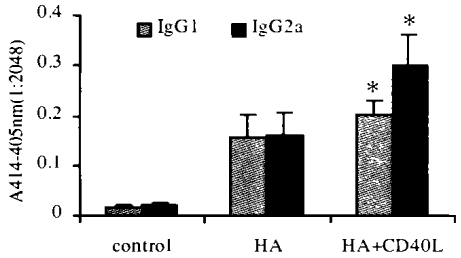

图3 共同免疫 *HA* 和 *CD40L* 后小鼠中 IgG 亚型抗体的水平

Fig.3 Levels of IgG subclasses in mice immunized with DNA vaccine

Groups of ten BALB/c mice were inoculated twice at 3-week intervals with 30ug *HA*, 30ug *HA* plus 30ug *CD40L*, respectively. Five mice of each group were bled on day 10 after the second DNA immunization. Equally pooled sera were diluted 1 to 2048 and then tested for optical density of IgG1 and IgG2a. Values and bars represent mean and SD of isotype-specific optical density. *Significant at $p<0.05$, using the Student t test.

表达在抗原呈递细胞上的 *CD40* 相互作用，诱导一些附加细胞的表达，激活免疫应答，导致 B 细胞的分化、增值和抗体的同型转换[16]。这种相互作用对于抗外源基因的T细胞依赖的保护性免疫应答是非常关键的。许多的研究已表明 *CD40L* 质粒能够增强抗原特异性的细胞和/或体液免疫应答[17, 18]。在我们的实验中，共同免疫编码 *CD40L* 和 A 型流感病毒表面抗原 *HA* 的质粒提高了抗 HA 的 IgG 抗体产生，无论是初免还是加强免疫后。对于这里体液免疫的提高有两种可能的解析，首先抗原特异性的 B 淋巴细胞被 DNA 免疫激活后在它的表面表达更多的 *CD40*；第二，表达的 *CD40L* 上调了抗原特异性的 $CD4^+$T 淋巴细胞的应答，然后又反过来激活抗原特异性的 B 淋巴细胞。共同免疫 *HA* 和 *CD40L* 能够诱导高水平的 IgG 免疫应答，血清 IgG 抗体主要参与了小鼠抗流感感染，能够降低肺部病毒滴度和肺部并发症。流感病毒攻击后，*HA* 和 *CD40L* 诱导的 IgG 抗体能够中和病毒，加速感染后小鼠的恢复过程。

诱导 Th1 型还是 Th2 型的免疫应答是由很多的因素决定的，包括应用 DNA 疫苗的模型和抗原本身的特征[19]，但是，Th1 和 Th2 型免疫应答之间的平衡也与 DNA 疫苗中细胞因子的加入有关，包括巨噬细胞集落刺激因子（*GM-CSF*），白介素 12（*IL-12*）和共刺激分子如 *B7.2*[20~23]。我们的结果表明，共同免疫 *CD40L* 能显著的提高 IgG2a 抗体的产生，但是 IgG1 抗体的提高不明显。这个结果与 Ihata A *et al*[8]的实验结果一致。总体来说，在小鼠模型中 Th1 型免疫应答以产生 IgG2a 为主，而 Th2 型免疫应答则以产生 IgG1 为主。在我们的试验中，加上 *CD40L* 后 IgG 亚型偏向于 IgG2a 为主。

总的来说，我们的结果表明 *CD40L* 基因通过电击免疫的方式能够增强流感病毒表面抗原 *HA* 的免疫应答，它可以作为一种较好的流感病毒核酸疫苗佐剂。虽然单独的 *HA* 免疫能够提供小鼠抗流感病毒攻击[15]，但是共同免疫 *CD40L* 后，能够帮助小鼠降低体重丢失，且加速小鼠感染的恢复，这在临床应用中是非常重要的，尤其对于老人和小孩。动物感染流感病毒后，常出现的一个明显的临床症状就是体重减轻，症状越明显体重减轻越显著。体重减轻的程度和病毒感染的临床症状成正比。*CD40L* 和 *HA* 共同免疫后，小鼠体重丢失明显减少，从另一个侧面证明了 *CD40L* 具有良好的免疫佐剂作用。但是这种佐剂提高抗体的能力是有限的，我们期望能通过将多个 *CD40L* 与 *HA* 融合起来，进一步提高它的免疫佐剂效果，Ross TM[24, 25]等将多个 *C3d* 与 *HA* 融合不但能提高核酸疫苗抗同型病毒攻击的能力，而且还能提高核酸疫苗抗异型病毒攻击的能力。还有许多的因素，包括 DNA 的剂量，免疫途径等都能够影响由共同免疫 *CD40L* 诱导的免疫应答，这些因素都值得我们进行进一步的探讨。

参考文献

[1] Min W, Lillehoj H S, Burnside J, *et al*. Adjuvant effects of IL-1beta, IL-2, IL-8, IL-15, IFN-alpha, IFN-gamma TGF-beta4 and lymphotactin on DNA vaccination against Eimeria acervulina[J]. Vaccine, 2001,20(1-2): 267-274.

[2] Ramsay J. Kohonen-Corish M. Interleukin-5 expressed by a recombinant virus vector enhances specific mucosal IgA responses in vivo[J]. Eur J Immunol, 1993, 23: 3141–3145.

[3] O'Neill E, Martinez I, Villinger F, *et al*. Protection by SIV VLP DNA prime/protein boost following mucosal SIV challenge is markedly enhanced by IL-12/GM-CSF co-administration[J]. J Med Primatol, 2002,31(4-5): 217-227.

[4] Grossman M E, Brown M P, Brenner M K. Antimumor response induced by transgenic expression of CD40 ligand[J]. Hum Gene Ther, 1997, 8: 1935-1943.

[5] Kimm J J, Nottingham L K, Wilson D M, *et al*. Engineering DNA vaccine codelivery of co-stimulatory molecule genes[J]. Vaccine, 1998,16: 1828-1835.

[6] Armitage R J, Fanslow W C, Strockbine L, *et al*. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40[J]. Nature, 1992, 357: 80-82.

[7] Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, *et al*. The CD40 antigen and its ligand[J]. Annu Rev Immunol, 1994, 12: 881-922.

[8] Ihata A, Watabe S, Sasaki S, *et al*. Immunomodulatory effect of a plasmid expressing CD40 ligand on DNA vaccination against human immunodeficiency virus type-1[J]. Immunology, 1999, 98(3): 436-442.

[9] Sin J I, Kim J J, Zhang D, *et al*. Modulation of cellular responses by plasmid CD40L: CD40L plasmid vectors enhance antigen-specific helper T cell type 1 CD4+ T cell-mediated protective immunity against herpes simplex virus type 2 in vivo[J]. Hum Gene Ther, 2001, 12(9): 1091-1102.

[10] Harcourt J L, Brown M P, Anderson L J, *et al*. CD40 ligand (CD154) improves the durability of respiratory syncytial virus DNA vaccination in BALB/c mice[J]. Vaccine, 2003, 21(21-22): 2964-2979.

[11] Imadome K I, Shirakata M, Shimizu N, *et al*. CD40 ligand is a critical effector of Epstein-Barr virus in host cell survival and transformation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(13): 7836-7840.

[12] Chen Z, Sahashi Y, Matsuo K, *et al*. Comparison of the ability of viral protein-expressing plasmid DNAs to protect against influenza[J]. Vaccine, 1998, 16(16): 1544-1549.

[13] Niwa H, Yamamuta K, Miyazaki J. Efficient selection for high-expression transfectants with a noval eukaryotic vector[J]. Gene, 1991, 108(2): 193-199.

[14] Aihara H, Miyazaki J. Gene transfer into muscle by electroporation in in vivo [see comments] [J]. Nat Biotechnol, 1998, 16: 867-870.

[15] Chen Z, Sahashi Y, Matsuo K, *et al*. Comparison of the ability of viral protein-expressing plasmid DNAs to protect against influenza[J]. Vaccine, 1998, 16(16): 1544-1549.

[16] Singh J, Garber E, Van-Vlijmen H, *et al*. The role of polar interactions in the molecular recognition of CD40L with its receptor CD40[J]. Protein Sci, 1998, 7(5): 1124-1135.

[17] Mendoza R B, Cantweu M J, Kipps T J. Immunostimulatory effects of plasmid expressing CD40 ligand(CD154) on gene immunization[J]. J Immunol, 1997, 159: 5777-5781.

[18] Burger J A, Mendoza R B, Kipps T J. Plasmids encoding granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and CD154 enhance the immune response to genetic vaccines[J]. Vaccine, 2001, 19(15-16): 2181-2189.

[19] Feltquate D M, Heaney S, Webster R G, *et al*. Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization[J]. J Immunol, 1997, 158(5): 2278-2284.

[20] Xiang Z, Ertl H C. Manipulation of the immune response to a plasmid-encoded viral antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines[J]. Immunity, 1995,2(2): 129-135.

[21] Iwasaki A, Stiernholm B J, Chan A K, *et al*. Enhanced CTL responses mediated by plasmid DNA immunogens encoding costimulatory molecules and cytokines[J]. J Immunol, 1998,158 (10): 4591-4601.

[22] Tsuji T, Hamajima K, Fukushima J, *et al*. Enhancement of cell-mediated immunity against HIV-1 induced by coinnoculation of plasmid-encoded HIV-1 antigen with plasmid expressing IL-12[J]. J Immunol, 1997,158(8): 4008-4013.

[23] Rankin J A, Reynolds H Y. Pulmonary host defenses: humoral immune components, In: Gallin JI, Fauci AS, editors. Advances in host defense mechanisms[M]. vol. 4, New York: Raven; 1985. p115-140.

[24] Mitchell J A, Green T D, Bright R A, *et al*. Induction of heterosubtypic immunity to influenza A virus using a DNA vaccine expressing hemagglutinin-C3d fusion proteins[J]. Vaccine, 2003,21(9-10): 902-914.

[25] Ross T M, Xu Y, Bright RA, *et al*. C3d enhancement of antibodies to hemagglutinin accelerates protection against influenza virus challenge[J]. Nat Immunol, 2000, 1(2): 127-131.

欧洲分子生物学组织（EMBO）课程通知

欧洲分子生物学（European Molecular Biology Organization, EMBO）于 2004 年 9 月 13~26 日在中国武汉举办关于蛋白质组学和人类疾病的课程。合办单位有中国科学院武汉病毒研究所和华中科技大学同济医学院。课程包括理论部分（第一周）和实验室操作部分（第二周）。理论部分包括：人类重要病毒性疾病，蛋白质网络和蛋白质功能研究。实验部分包括蛋白质组学技术，显微观察与操作以及 DNA 和蛋白质芯片。学习班理论课程公开，实验操作课程仅限 20 名学员。详细信息请参阅网站：http://hennig-online.net/wolfgang/EMBOcourseWuhan.html 和 http://www-db.embl-heidelberg.de/jss/servlet/de.embl.bk.embo.EmboSeminarlist。

（中国科学院武汉病毒研究所　石正丽）