

# 增加 CpG 基元的汉坦病毒核蛋白基因疫苗的免疫作用\*

郑兰艳<sup>1</sup>, 于月新<sup>2</sup>, 张姝娜<sup>3</sup>, 牟玲<sup>3</sup>, 罗恩杰<sup>1\*\*</sup>

(1. 中国医科大学基础医学院病原生物教研室, 辽宁沈阳 110001; 2. 中国人民解放军 202 医院妇产科, 辽宁沈阳 110003; 3. 沈阳市传染病院中心实验室, 辽宁沈阳 110006)

## Studies on the Immune Responses Induced by the CpG-enhanced Plasmid

### DNA Vector Encoding Hantavirus Nucleocapsid Protein

ZHENG Lan-yan<sup>1</sup>, YU Yue-xin<sup>2</sup>, Zhang Shu-na<sup>3</sup>, MOU ling<sup>2</sup>, LUO En-jie<sup>1\*\*</sup>

(1. Department of Microbiology & Parasitology, China Medical University, Shenyang 110001, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, NO. 202 hospital, Shenyang Military Area, Shenyang 110003, China; 3. Department of laboratory medicine, The Municipal Hospital of Infectious disease, Shenyang 110006, China)

**Abstract:** Bacterial and synthetic DNA containing CpG dinucleotides in specific sequence contexts are being tested as immune adjuvants in many disease settings. To study the immune responses induced by the CpG-enhanced plasmid DNA vector encoding hantavirus nucleocapsid protein. BALB/c mice were immunized three times by intramuscular inoculations of the recombinant eukaryotic expression vector pcDNA3.1 + S (ISS) at 2-wk intervals. To evaluate the humoral and cellular immune responses, antigen-specific lymphocyte proliferation and antibody production were assayed by MTT method and ELISA, respectively. In addition, the level of interleukin-4 and interferon- $\gamma$  in the splenic lymphocytic cultured supernatant were detected with ELISA kit at various times. We found that the group immunized with pcDNA3.1 + S (ISS) had more Ab response against NP compared with the control group over the period, specially at 35d and 42d, after the primary immunization. The antibody mean titre of the group immunized with pcDNA3.1 + S (ISS) was increased to about 1:90 at 42d, significantly higher than that of the group immunized with pcDNA3.1 + S alone, in which the mean titre was about 1:70. The stimulation index of the groups immunized with pcDNA3.1 + S (ISS), pcDNA3.1 + S and pcDNA3.1 were 1.67, 1.43 and 0.797, respectively. The recombinant plasmid pcDNA3.1 + S (ISS) markedly increased the production of IFN- $\gamma$  but had no influence on the production of IL-4 compared with pcDNA3.1 + S alone. These data indicated that CpG-enhanced plasmid induced augmented immune responses and could be used to vaccinate against pathogens requiring a strong cellular response for protection.

**Key words:** Hantavirus; DNA vaccine; Nucleocapsid protein; CpG motif

**摘要:** 以往的研究表明非甲基化胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸为基元构成的特定结构是一种很有希望的候选疫苗佐剂。为了研究增加 CpG 基元的汉坦病毒核蛋白基因疫苗的免疫作用, 在本实验中, 将重组真核表达质粒 pcDNA3.1 + S (ISS) 直接肌注免疫 BALB/c 小鼠, 分别用 ELISA 法检测血清特异性抗体的变化, MTT 法检测 T 细胞增殖反应, 以及用 ELISA kit 检测免疫鼠脾细胞上清液中细胞因子 IL-4 和 IFN- $\gamma$  的动态变化, 从而了解免疫鼠的体液免疫反应和细胞免疫反应。结果显示 pcDNA3.1 + S (ISS) 接种组的小鼠血清抗体水平、T 细胞增殖反应以及细胞因子 IFN- $\gamma$  的产生水平较对照组 pcDNA3.1 + S 和空载体 pcDNA3.1 + 接种组的要高。而细胞因子 IL-4 较对照组却无明显变化。由此可见, 增加 CpG 基元的质粒能够增强其所诱导的免疫反应, 可用于那些需要借助强有力细胞免疫

收稿日期: 2004-08-25, 修回日期: 2004-09-20

\* 基金项目: 辽宁省教育厅 2002 年高等学校科学研究项目资助 (NO. 202013130); 沈阳市科委课题 (沈科发 [2001] 38 号)

作者简介: 郑兰艳 (1970-) 女, 辽宁沈阳籍, 讲师, 博士, 从事病毒基因免疫研究。

\*\* 通讯作者: 罗恩杰 (1956-) 男, 辽宁沈阳籍, 教授, 博士, 从事疟疾、出血热基因免疫研究。

Corresponding author. Tel: 86-24-23256666, ext 5315; E-mail: enjie359@126.com

来清除病原体的疫苗研制中。

关键词:汉坦病毒;核酸疫苗;核蛋白;CpG 基元

中图分类号:R373

文献标识码:A

文章编号:1003-5125(2005)01-0024-04

肾综合征出血热(HFRS)是以发热、出血及肾损害为特征的一类全球性的自然疫源性疾 病,目前尚无有效的治疗方法,因此,本病的免疫预防越来越引起人们的重视。国内外学者对汉坦病毒核蛋白的基因免疫做了大量的研究工作,但目前免疫检测结果 表明,基因免疫刺激机体产生的抗体滴度较低。近年来研究发现,CpG 为基元的免疫刺激序列(Immunostimulatory Sequence,ISS)是以非甲基化胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸为基元构成的特定结构。目前认为载体中的 CpG 序列和单独的 CpG 寡核苷酸序列一样,都可作为佐剂刺激机体产生免疫应答,免疫增强效果显著,可达到与福氏完全佐剂相似的效果,且具有耐受性好、稳定、制造成本低的优点,是一种很有希望的候选疫苗佐剂<sup>[1~3]</sup>。为了提高基因免疫的效果,本研究在前期研究工作的基础上<sup>[4]</sup>,拟选用增加了 CpG 基元的汉坦病毒核蛋白基因疫苗来免疫动物,观察 CpG 基元对汉坦病毒核蛋白 S 基因疫苗的免疫调节作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

*EcoR*、*Sal*、*Pst* 等限制性内切酶、DNA 连接试剂盒、DNA 琼脂糖胶上回收试剂盒均从 Takara 公司购进。RPMI1640 由 sigma 公司购进。IL-4 和 IFN- $\gamma$  ELISA 检测试剂盒由深圳晶美生物公司购进。真核表达载体 pcDNA3.1+ 由 Invitrogen 公司购进;质粒 pcDNA3.1+S 质粒为含汉坦病毒(76-118 株)S 片段全编码区基因的真核表达载体由本室构建并保存;pTARGET-hanS(ISS)为含汉坦病毒(76-118 株)S 片段全编码区基因并通过 PCR 方法增加了 CpG 基元的真核表达载体,由本室构建并保存;大肠杆菌 TG1 为本室保存的宿主菌。其他常用试剂由本实验室自备。

### 1.2 重组质粒 pcDNA3.1+S(ISS)的构建和鉴定

用 *EcoR*/*Sal* 酶切已成功构建并可在体外表达的 pTARGET-hanS(ISS),将 S 基因片段定向克隆入 *EcoR*/*Xho* 酶切后的 pcDNA3.1+,构建 pcDNA3.1+S(ISS)真核表达载体,*Pst* 酶切鉴定。

### 1.3 质粒的大量制备及纯化

按分子克隆手册<sup>[5]</sup>所述方法提纯质粒 pcD-

NA3.1+、pcDNA3.1+S、pcDNA3.1+S(ISS)三种质粒,用灭菌的 PBS 溶解,用分光光度计测定 A260/A280 比值以确定核酸样品的纯度,其比值应介于 1.8~2.0 之间,A260 确定样品的浓度,用灭菌的 PBS 调整浓度至 1.0mg/mL,作为 DNA 免疫的注射样品,贮于-20 备用。

### 1.4 实验动物的 DNA 免疫

本校实验动物学部提供的 6~8wk 龄的 BALB/c 小鼠,随机分成 3 组(18 只/组),第一组注射空白质粒 pcDNA3.1+,第二组注射重组质粒 pcDNA3.1+S,第三组注射 pcDNA3.1+S(ISS),每次免疫前先在实验动物股四头肌按 100 $\mu$ L/只注射 0.25% 的盐酸布比卡因注射液,3d 后在相同部位进行 DNA 接种,每只小鼠每次注射 100 $\mu$ L 的质粒 DNA,间隔 2 周加强免疫一次,共免疫 3 次。

### 1.5 细胞因子的动态变化

分别在第一次免疫后 5d,10d,17d,35d,42d,每组处死 3 只小鼠,检测免疫鼠脾细胞在体外用 NP 刺激后,IL-4 和 IFN- $\gamma$  的分泌情况。常规方法分离脾细胞,脾细胞浓度调整至 1 $\times 10^7$ ,悬浮于含 10% FCS 的 RPMI1640 培养基中,于 24 孔细胞培养板每孔加入脾细胞悬液 0.5mL,NP10 $\mu$ L(终浓度为 10 $\mu$ g/mL),同时设空白对照孔,ConA 刺激孔,均设 3 个复孔,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养 48h 后,1500r/min 离心 10min,收集脾细胞上清液,用 ELISA kits 检测 IL-4 和 IFN- $\gamma$ 。

### 1.6 淋巴细胞增殖反应

脾细胞取自初次免疫后 42d(即末次免疫后 2wk)的免疫鼠,脾细胞悬液的制备同上,用 RPMI1640 将脾细胞浓度调整至 2 $\times 10^6$ ,每孔 100 $\mu$ L 接种于 96 孔细胞培养板上,以重组的核蛋白刺激免疫小鼠的脾细胞,同时做不加抗原的阴性对照孔和加 ConA 的阳性对照孔,(抗原和 ConA 的浓度均为 10 $\mu$ g/mL),参照刘民等<sup>[6]</sup>所述的 MTT 法检测脾细胞的增殖反应,计算刺激指数(SI)。

### 1.7 免疫鼠血清的抗 NP 抗体的测定

分别在免疫前和免疫后 5d,10d,17d,35d 和 42d 经尾静脉采血,每次每实验组随机取 6 只鼠采尾血,收集血清用于 NP 特异性抗体的检测。以重组的 NP 抗原作为包被物,辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体为二抗,参照 Chen 等<sup>[7]</sup>人描述的

ELISA 方法测定免疫鼠的特异性抗体。以被检标本复孔(3孔)OD值与免疫前血清(阴性对照)的比值 2.1 者为阳性。为了检测血清中抗体的滴度,将初次免疫后 42d 的所有免疫鼠眼球取血后处死(每组 6 只),留置血清,以 10 倍稀释为起点,再做系列稀释,以检测血清抗体滴度。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒 pcDNA3.1 + S (ISS) 真核表达载体的构建及鉴定

pcDNA3.1 + S (ISS) 经 *Pst* 酶切后在 5000 和 1700 处可见两条带,电泳分析结果与预期结果完全相同,表明 S 基因片段被正向地插入到真核表达载体 pcDNA3.1 + 中,即重组质粒 pcDNA3.1 + S (ISS) 已成功构建,见图 1。

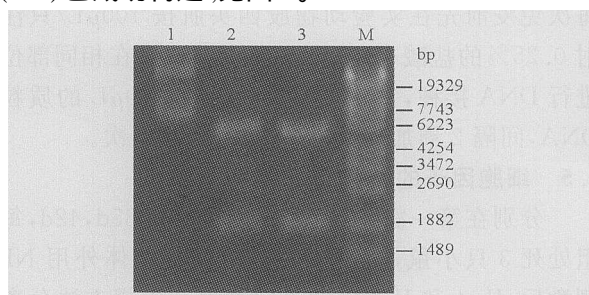


图 1 重组质粒 pcDNA3.1 + S (ISS) 真核表达载体的酶切鉴定结果

Fig. 1 Identification of recombinant vector by restriction endonuclease analysis

Lane 1, pcDNA3.1 + S plasmid; 2, *Pst*I digest pcDNA3.1 + S; 3, *Pst*I digest pcDNA3.1 + S (ISS); M, DNA Marker.

### 2.2 体外细胞因子的产生变化

在初次免疫后的第 5d,各实验组的 IFN- $\gamma$  处于较高水平,而后随着时间的推移,IFN- $\gamma$  的水平逐渐下降。而每次加强免疫后 IFN- $\gamma$  的产生有所回升。pcDNA3.1 + S (ISS) 接种组的尽管在前 10d 处于较低水平,但经加强免疫后 IFN- $\gamma$  的水平上升很快,明显地超过了 pcDNA3.1 + S 和 pcDNA3.1 + 接种组 IFN- $\gamma$  的水平,结果见图 2。尽管 IL-4 的产生在初次免疫后第 10d 下降到较低水平,但每一次的加强接种均可刺激 IL-4 的产生,从而使其维持在较高水平。pcDNA3.1 + S (ISS) 免疫鼠的 IL-4 的产生除了在初次免疫后 5d 获得了较高水平外,其他时间与 pcDNA3.1 + S 单独接种组的相差不大,结果见图 3。

### 2.3 脾细胞的增殖反应

我们通过在体外用 NP 重组抗原再次刺激免疫鼠的脾细胞来测定 T 细胞的增殖反应,从而了解其

细胞免疫水平。对照组空载体 pcDNA3.1 + 接种组鼠的脾细胞的增殖指数为较低的 0.797,阳性对照 ConA 刺激组的增殖指数为 2.1,而实验组 pcDNA3.1 + S 接种组、pcDNA3.1 + S (ISS) 免疫组的增殖指数分别为较高的 1.43 和 1.67。pcDNA3.1 + S (ISS) 接种组的增殖指数较 pcDNA3.1 + S 接种组明显升高,结果见图 4。

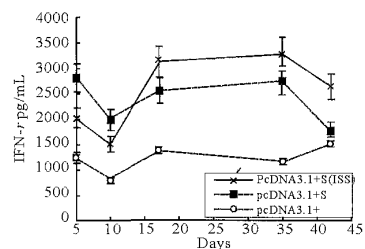


图 2 细胞因子 IFN- $\gamma$  产生的动态变化

Fig. 2 Induction of IFN- $\gamma$  cytokine responses after re-stimulation with NP *in vitro* after primary immunization.

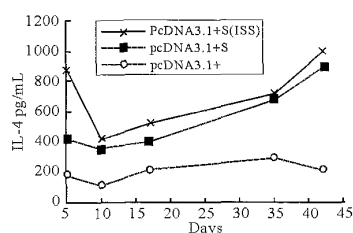


图 3 细胞因子 IL-4 产生的动态变化

Fig. 3 Induction of IL-4 cytokine responses after re-stimulation with NP *in vitro* after primary immunization

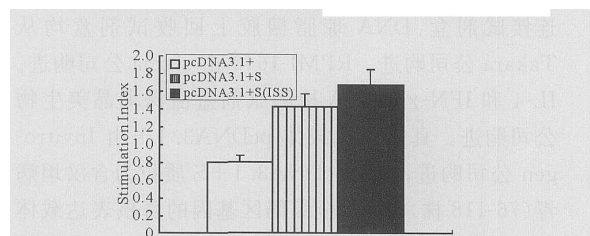


图 4 免疫鼠脾细胞的增殖反应

Fig. 4 The proliferation levels of splenocytes derived from immunized mice

### 2.4 免疫小鼠血清特异性抗体的检测

在初次免疫后 17d,各免疫组的小鼠血清抗体水平明显增加,在初次免疫后 35d,即末次免疫后 7d,血清抗体达到较高水平,随后进入平台期并维持一定时间。接种 pcDNA3.1 + S (ISS) 免疫鼠的血清抗体水平较接种 pcDNA3.1 + S 免疫鼠的血清抗体水平升高较为明显,结果见图 5。初次免疫后 42d 的 pcDNA3.1 + S (ISS) 免疫鼠的血清抗体滴度为 190,pcDNA3.1 + S 接种组的血清抗体滴度为 170,结果见图 6。

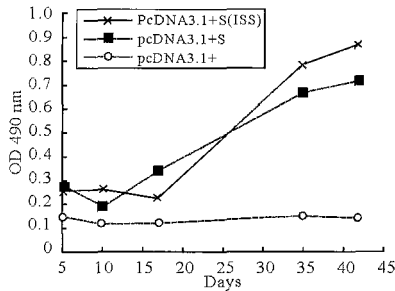


图5 免疫鼠血清特异性抗体的检测结果

Fig. 5 Detecting anti-NP IgG antibodies in serum of the immunized mice

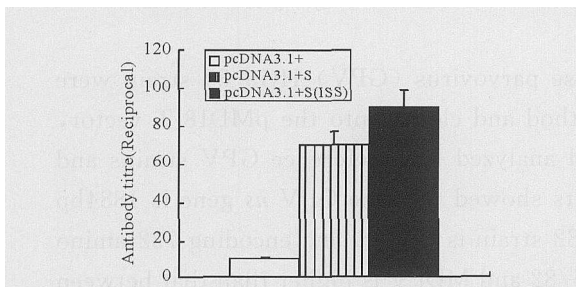


图6 初次免疫后 42d 的免疫鼠血清中抗体的滴度

Fig. 6 The titre of anti-NP IgG at 42d after the primary immunization

### 3 讨论

当前基因免疫研究的热点问题是如何提高它的免疫效果<sup>[8]</sup>。Cp G 能同时诱导 B 细胞增生和 Th1 依赖性免疫反应增强,是汉坦病毒基因疫苗的理想佐剂。在本课题中所选用的质粒 p TARGET-hanS (ISS) 是我们通过设计 PCR 引物,将 Cp G 加入到真核细胞表达载体 p TARGET<sup>TM</sup> 所构建的真核表达载体,它含有最适作用于啮齿类的 Cp G 基元即 AACGTT 作为 ISS。该载体的成功构建已通过测序和体外瞬间表达等得到了证实<sup>[4]</sup>。由于真核表达载体的选择不同,可致基因免疫效果不同。因此,在本实验中我们将带有增加了 Cp G 基元的 S 基因片段克隆入真核表达载体 pcDNA3.1+,构建了 pcDNA3.1+S (ISS),进行动物接种,这主要是为了便于实验组之间的比较。结果显示:增加 Cp G 基元的重组质粒 pcDNA3.1+S (ISS) 的接种对鼠的健康情况未见不良影响,但却显著地增强了血清总的抗体水平以及细胞因子 IFN- 的产生。随着免疫次数的增加和时间的推移,小鼠血清抗体水平明显增加,在初次免疫后 35d,即末次免疫后 7d,血清抗体达到

较高水平随后进入平台期并维持一定时间。在细胞因子的测定中,IL-4 的产生与抗体的动态变化基本相对应,即在加强免疫后可持续维持在较高水平。pcDNA3.1+S (ISS) 免疫鼠的 IL-4 的产生水平除了在初次免疫后 5d 获得了较高水平外,其他时间与 pcDNA3.1+S 免疫鼠的相差不大。pcDNA3.1+S (ISS) 免疫鼠初次免疫后 5d 高水平的 IL-4 的获得是否存在实验偏差还有待进一步探讨。接种 pcDNA3.1+S (ISS) 质粒的免疫鼠在整个免疫过程中,IFN- 的产生普遍要比 pcDNA3.1+S 接种组的要高。IFN- 的产生水平尽管在初次免疫后 10d 下降到较低水平,但经加强免疫后 IFN- 的水平又回升到较高水平。由此可见 Cp G 基元可显著提高基因疫苗的 Th1 类免疫反应,这对于需要借助细胞免疫来清除细胞内汉坦病毒的感染有着深刻的意义<sup>[9]</sup>。

### 参考文献

- [1] Klinman D M, Conner J, Coban C. Repeated administration of synthetic oligodeoxynucleotides expressing Cp G motifs provides long-term protection against bacterial infection [J]. *Infect Immun*, 1999, 67: 5 658-5 663
- [2] Zhang Y, Palmer G H, Abbott J R, et al. Cp G ODN 2006 and IL-12 are comparable for priming Th1 lymphocyte and IgG responses in cattle immunized with a rickettsial outer membrane protein in alum[J]. *Vaccine*, 2003, 21: 3 307-3 318.
- [3] Jones D E, Palmer J M, Burt A D, et al. Bacterial motif DNA as an adjuvant for the breakdown of immune self-tolerance to pyruvate dehydrogenase complex [J]. *Hepatology*, 2002, 36 (3): 679-686.
- [4] 郑兰艳,罗恩杰,李新鸣,等.插入 Cp G 序列的汉坦病毒 S 基因真核表达载体的构建及表达[J]. *中国病毒学*, 2004, 19: 73-75.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. et al. *Molecular cloning: A laboratory Manual*[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1987. 97-118.
- [6] 刘民,马华,李柏青. MTT 法检测小鼠淋巴细胞增殖性反应探讨[J]. *中国实验动物学杂志*, 1999, 9: 146-149.
- [7] Chen Y L, Wang S N, Yang W J, et al. Expression and immunogenicity of Mycoplasma hyopneumoniae heat shock protein antigen P42 by DNA vaccination[J]. *Infect Immun*, 2003, 71: 1 155-1 160.
- [8] Leitner W W, Restifo N P. DNA vaccines and apoptosis: to kill or not to kill[J]. *J Clin Invest*, 2003, 112: 22-24.
- [9] Park J M, Cho S Y, Hwang Y K, et al. Identification of H-2K (b)-restricted T-cell epitopes within the nucleocapsid protein of Hantaan virus and establishment of cytotoxic T-cell clones [J]. *J Med Virol*, 2000, 60: 189-199.