

· 论 著 ·

猪囊尾蚴抗原 cC1 DNA 疫苗和蛋白质疫苗联合诱导小鼠免疫应答

吴丹, 王庆敏, 陈蕊雯, 朱维佳, 陈祖欢, 孙树汉*

(第二军医大学基础医学部医学遗传学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 观察 cC1 DNA 疫苗和蛋白质疫苗联合免疫对诱导 BALB/c 小鼠免疫应答的影响。**方法:** 雌性 BALB/c 小鼠随机分为 4 组: A 组(DNA 疫苗组), 质粒 DNA 以 10 d 间隔免疫 3 次; B 组(联合免疫组), 质粒 DNA 以 10 d 间隔免疫 2 次后以 GST-cC1 融合蛋白加强免疫 1 次; C 组(蛋白质疫苗组), 分别在第 0、3 周免疫接种融合蛋白; D 组(pcDNA3 对照组), 以 10 d 间隔, 3 次免疫接种质粒 pcDNA3。ELISA 法检测血清样品中的特异性抗体水平以及实验小鼠脾脏淋巴细胞分泌 IFN- γ 和 IL-4 水平, 以 MTT 法行脾脏淋巴细胞增殖实验。**结果:** C 组可诱导相对较强的小鼠免疫应答, 其特异性 IgG 和 IgG1 以及脾脏淋巴细胞分泌 IL-4 水平均高于其他各组 ($P < 0.05$), 免疫的类型以 Th2 应答为主。B 组诱导的特异性抗体水平和淋巴细胞分泌细胞因子水平均明显高于 A 组 ($P < 0.05$), B 组和 A 组诱导的免疫应答类型均以 Th1 应答为主。**结论:** 以 DNA priming-protein boost 的策略可有效诱导较 DNA 疫苗单独使用更高的特异性抗体应答, 且以 Th1 型免疫应答为主。

[关键词] 猪囊尾蚴; cC1 DNA 疫苗; 蛋白质疫苗; 免疫应答

[中图分类号] R 392.1

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X(2004)01-0034-03

Immune response to combined DNA vaccine and protein vaccine against *T. solium* cysticercosis in mice

WU Dan, WANG Qing-Min, CHEN Rui-Wen, ZHU Wei-Jia, CHEN Zu-Huan, SUN Shu-Han* (Department of Medical Genetics, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the immune responses induced by co-immunizing with cC1 DNA vaccine and protein vaccine in mice. **Methods:** Female BALB/c mice were divided into 4 groups randomly. In group A (DNA vaccine group), 3 successive immunizations with plasmid DNA were performed at 10 d intervals. In group B (co-immunization group), mice were primed with DNA vaccine and boosted twice with DNA and fusion protein respectively. In group C (protein vaccine group), each mouse was immunized with fusion protein GST-cC1 at week 0 and week 3. In group D (pcDNA3 control group), mice were immunized with control plasmid 3 times at 10 d intervals. Specific antibodies in serum and cytokines including IFN- γ and IL-4 (secreted by splenocytes) were tested by ELISA. Th cell proliferation was determined by MTT method. **Results:** The mice in group C produced higher level of specific IgG, IgG1 and IL-4 (secreted by splenocytes) than those in other groups ($P < 0.05$), and the main immune response was polarized to Th2 type. In group B, the level of specific antibody and cytokines were significantly higher than those in group A ($P < 0.05$). The main immune response in group B and A were Th1 type. **Conclusion:** Compared with DNA vaccine immunization alone, the DNA prime-protein boost vaccine combination can induce stronger specific immune response towards a Th1 type.

[KEY WORDS] *Cysticercus cellulosae*; cC1 DNA vaccine; protein vaccine; immune response

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(1): 34-36]

基因免疫是 20 世纪 90 年代发展起来的一项新的疫苗免疫技术, 迄今为止, 其在多种感染性疾病的防治中已显示出其他形式疫苗无法比拟的优势, 其中针对乙肝、艾滋病、流感、疟疾等感染性疾病的 DNA 疫苗已进入临床研究, 显示出巨大的应用潜能。为提高 DNA 疫苗的免疫效果, 目前已发展了多种增强其免疫应答的策略。不同类型疫苗的联合交替免疫策略, 如先以 DNA 疫苗免疫, 再以蛋白质疫苗加强的“DNA prime-protein boost”策略被认为可在较大程度上提高 DNA 疫苗的效用^[1]。为进一步提高猪囊尾蚴保护性抗原 cC1 DNA 疫苗诱导的机体免疫应答水平, 本研究采用了 cC1 DNA 疫苗和

蛋白质疫苗联合免疫接种 BALB/c 小鼠, 观察其体液和细胞免疫应答水平。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌种、融合蛋白和动物 质粒 pcDNA3-cC1 由本室构建^[2]; GST-cC1 融合蛋白由本教研室陈蕊雯提供^[3]。大肠杆菌 DH10B 为本室保存。雌性 BALB/c 小鼠 40 只, 4~6 周龄, 购自本校实验动物

[基金项目] 国家高新技术发展规划(“863”计划)课题 (2001AA213111)。

[作者简介] 吴丹(1972-), 女(汉族), 硕士, 讲师。

* Corresponding author. E-mail: shsun@smmu.edu.cn

中心。

1.2 主要生化试剂 HRP-羊抗小鼠 IgG 购自华美公司; HRP-羊抗小鼠 IgG2a、HRP-羊抗小鼠 IgG1、细胞因子 (IFN- γ 和 IL-4) ELISA 检测试剂盒购于晶美公司; 完全弗氏佐剂、MTT、ConA 购自华舜公司。

1.3 DNA 疫苗的制备 碱裂解法大量制备重组质粒 pcDNA3-cC1 以及对照质粒 pcDNA3, 以 PEG8000 沉淀纯化后溶于 PBS 中, 测 D_{260}/D_{280} , 调整浓度至 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

1.4 小鼠分组与免疫 雌性 BALB/c 小鼠 40 只, 分为 4 组, 每组 10 只。A 组 (DNA 疫苗组): 每只小鼠双侧胫骨前肌分别注射 25% 葡萄糖溶液 $50 \mu\text{l}$, 20 min 后分别在原注射处注射疫苗质粒 $100 \mu\text{g}$, 10 d 间隔加强免疫 2 次; B 组 (cC1 DNA+cC1 蛋白联合免疫组): 以 10 d 间隔注射接种质粒 DNA 2 次后 GST-cC1 融合蛋白 $20 \mu\text{g}$, 加完全弗氏佐剂 $20 \mu\text{g}$, 背部皮下多点加强免疫 1 次; C 组 (蛋白质疫苗组): 分别在第 0、3 周于小鼠背部皮下多点注射接种融合蛋白 $20 \mu\text{g}$ 加完全弗氏佐剂 $20 \mu\text{g}$; D 组 (pcDNA3 对照组): 每只小鼠注射质粒 pcDNA3 $100 \mu\text{g}$, 以 10 d 间隔, 注射接种 3 次。

1.5 小鼠血清抗 cC1 IgG、IgG2a 和 IgG1 检测 全部小鼠于末次免疫后 2 周眼眶取血, ELISA 法分别检测血清样品中的抗 cC1 IgG、IgG2a 和 IgG1。

1.6 脾脏淋巴细胞增殖实验 常规方法分离小鼠脾脏淋巴细胞, 细胞计数, 调整细胞浓度至 $5 \times 10^6/\text{ml}$, 分别加入 ConA (终浓度 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$) 和 GST-cC1 (终浓度 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$), 吸取 $100 \mu\text{l}$ 该细胞于 96 孔培养板中, 同时设 RPMI 1640 自身对照, 每个样品设 3 个复孔, 于 37°C 、5% CO_2 培养箱中孵育 72 h, 加入 $10 \mu\text{l}$ MTT ($5 \text{mg}/\text{ml}$), 孵育 4 h, 生成蓝色的甲臜, 加入 $50 \mu\text{l}$ 10% SDS-0.04 mol/L HCl 溶解, 检测 D_{570} 。刺激指数 (SI) = 实验组 D_{570} /RPMI 1640 对照组 D_{570} 。

1.7 淋巴细胞分泌细胞因子的检测 在分离的脾脏淋巴细胞中分别加入 ConA (终浓度 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$) 和 GST-cC1 (终浓度 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$), 加 $200 \mu\text{l}$ 细胞于 96 孔培养板中, 同时设 RPMI 1640 自身对照, 37°C 、5% CO_2 培养箱中孵育 3 d, 小心吸出上清, 以 ELISA 试剂盒分别检测上清中的 IFN- γ 和 IL-4 的水平。

1.8 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 联合免疫对小鼠特异性免疫应答的影响 C 组 (蛋白质疫苗组) 可诱导相对较高的特异性 IgG 和 IgG1 应答 ($P < 0.05$), B 组 (联合免疫组) 诱导的特异性 IgG、IgG1 和 IgG2a 应答均明显高于 A 组 (DNA 疫苗组, $P < 0.05$, 图 1)。

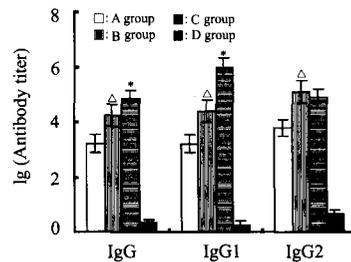


图 1 免疫小鼠的特异性抗体水平

Fig 1 Specific antibody level in immunized mice

* $P < 0.05$ vs B or A group; $\Delta P < 0.05$ vs A group

2.2 免疫小鼠脾淋巴细胞增殖反应 在特异性抗原刺激下, 免疫小鼠脾细胞的增殖反应体现了免疫动物 CD4^+ T 细胞的活化状态。C 组诱导的 SI 为 1.403 ± 0.133 , 明显高于 B 组 1.281 ± 0.115 ($P < 0.01$), 而 B 组的 SI 值明显高于 A 组 1.061 ± 0.084 ($P < 0.05$), D 组的 SI 值为 0.876 ± 0.086 与 A 组无明显差异。

2.3 脾细胞分泌的细胞因子检测 脾细胞与抗原共孵育 72 h 后离心吸取上清, ELISA 检测结果显示: C 组的 IL-4 的水平明显高于其他各组, B 组较 A 组的 IFN- γ 和 IL-4 水平有明显提高 ($P < 0.05$, 表 1)。A 组和 B 组均有效诱导了小鼠以 Th1 型为主的免疫应答, C 组诱导的免疫应答则以 Th2 型为主。

表 1 免疫小鼠脾脏淋巴细胞分泌的细胞因子水平

Tab 1 Cytokines levels released from spleen cells of immunized mice

($n = 10, \bar{x} \pm s, \times 10^3, \rho_{\text{B}}/\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$)

Group	IFN- γ	IL-4
A	0.702 ± 0.022	0.331 ± 0.019
B	$1.566 \pm 0.082^*$	$0.679 \pm 0.027^*$
C	0.750 ± 0.043	$1.331 \pm 0.055^\Delta$
D	0.105 ± 0.009	0.087 ± 0.006

* $P < 0.05$ vs A group; $\Delta P < 0.05$ vs A, B or D group

3 讨论

在对实验动物以及人类囊尾蚴感染的研究中发现, IL-2、IFN- γ 水平明显升高的 Th1 应答可有效

降低机体对该病的易感性^[4,5],这就提示抗囊尾蚴疫苗免疫个体获得的保护效果直接与疫苗接种后诱导的机体细胞免疫应答的强弱相关。本实验结果显示:由本实验室构建的 cC1 DNA 疫苗可全面诱导小鼠的细胞及体液免疫应答,但应答水平相对较低,这可能与小鼠接种部位肌细胞对 DNA 疫苗的摄取以及抗原 cC1 的表达有关。“DNA prime-protein boost”策略可有效增强机体特异性免疫应答,在本实验中主要体现了针对 cC1 的特异性抗体和 Th1 应答的增强,如有效提高了机体 IgG2a 的合成以及 IFN- γ 的分泌,这对提高免疫个体的抗虫保护必定会起到积极的作用。单独使用 GST-cC1 融合蛋白免疫诱导的特异性抗体和细胞因子分泌水平平均高于其他各组,诱导的类型则以 IgG1 合成和 IL-4 分泌水平明显升高的 Th2 应答为主。这说明抗原 cC1 以不同的形式(DNA 疫苗或蛋白质疫苗)免疫动物可诱导宿主不同类型的免疫应答(Th1 型或 Th2 型)。DNA 疫苗可有效诱导机体的细胞免疫应答,而“DNA prime-protein boost”策略则可以进一步增强这种 Th1 应答效应,这在对其他一些疾病的疫苗研究中也都得到了证实^[6,7]。但有人认为该种形式的联合免疫只增强机体的体液免疫应答,而对细胞免疫应答无明显增强作用^[8],这可能与抗原自身以及不同形式疫苗的免疫接种途径、方式和用量均有一定关系。

不同疫苗形式的联合应用较为复杂,接种的顺序、疫苗的用量、免疫间隔的时间等因素均会影响免疫应答的强弱,甚至 Th 应答的类型,不同的抗原也可能会有差异,其机制仍有待进一步的研究和探讨。

[参考文献]

[1] Ramsay AJ, Kent SJ, Strugnell RA, et al. Genetic vaccination

strategies for enhanced cellular, humoral and mucosal immunity[J]. *Immunol Rev*, 1999, 171: 27-44.

[2] 吴丹,郭瀛军,林懿,等.猪囊尾蚴抗原 DNA 疫苗诱导的免疫保护效应[J].第二军医大学学报,2000,21(6):508-510.
Wu D, Guo YJ, Lin Y, et al. Protective immunity induced by DNA vaccine of *Cysticercus cellulosae* antigen[J]. *Di-er Junyi Daxue Xuebao (Acad J Sec Mil Med Univ)*, 2000, 21(6): 508-510.

[3] 陈蕊雯,林懿,孙树汉.猪囊尾蚴抗原 cC1 在大肠杆菌中的克隆及高效表达[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2000,18(1):37-39.
Chen RW, Lin Y, Sun SH. Cloning and expression of *Cysticercus cellulosae* antigen cC1 in *E. coli*[J]. *Zhongguo Jishengcongbing Yu Jishengcongbing Zazhi (Chin J Parasitol Parasit Dis)*, 2000, 18(1): 37-39.

[4] Alvarez JI, Londono DP, Alvarez AL, et al. Granuloma formation and parasite disintegration in porcine cysticercosis: comparison with human neurocysticercosis[J]. *J Comp Pathol*, 2002, 127(2-3): 186-193.

[5] Terrazas LI, Cruz M, Rodriguez-Sosa M, et al. Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*[J]. *Parasitol Res*, 1999, 85(2): 135-141.

[6] Sin JI, Bagarazzi M, Pachuk C, et al. DNA priming-protein boosting enhances both antigen-specific antibody and Th1-type cellular immune responses in a murine herpes simplex virus-2 gD vaccine model[J]. *DNA Cell Biol*, 1999, 18(10): 771-779.

[7] Nyika A, Barbet AF, Burr ridge MJ, et al. DNA vaccination with map1 gene followed by protein boost augments protection against challenge with *Cowdria ruminantium*, the agent of heartwater[J]. *Vaccine*, 2002, 20(7-8): 1215-1225.

[8] Scheerlinck JP, Casey G, McWaters P, et al. The immune response to a DNA vaccine can be modulated by co-delivery of cytokine genes using a DNA prime-protein boost strategy[J]. *Vaccine*, 2001, 19(28-29): 4053-4060.

[收稿日期] 2003-07-18 [修回日期] 2003-12-09

[本文编辑] 尹茶

我校 5 项医疗成果获第五届“上海市临床医疗成果奖”

日前,第五届“上海市临床医疗成果奖”揭晓,经“第五届上海市临床医疗成果奖评审委员会”遴选,共评出获奖项目 25 项,其中一等奖 1 项、二等奖 8 项、三等奖 16 项。我校上报的 5 项成果全部获奖,获奖数量和奖励等级居全市前列,创学校历年获上海市医疗成果奖之最。具体获奖项目如下:

二等奖:

- 长海医院神经外科刘建民教授《血管内支架在脑血管病治疗中的应用研究》
- 长海医院消化内科李兆申教授《胃食管反流病诊治研究》
- 长征医院骨科肖建如副教授《颈椎骨肿瘤外科治疗的临床研究》

三等奖:

- 长征医院妇产科刘彦教授《腹腔镜微创手术在妇科领域的应用和拓展》
- 长征医院眼科魏锐利教授《眼眶肿瘤手术与眼功能保全的临床研究》