

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790( 2006 )16-1462-04

# 小鼠 IFN- $\gamma$ 基因佐剂对分泌型柯萨奇病毒 B3 VP1 核酸疫苗免疫作用的影响

揣 侠, 高志云, 房文亮, 金玉怀, 张永红, 谢立新, 王永祥 ( 河北医科大学病原生物学教研室, 河北 石家庄 050017 )

## Effect of mouse IFN- $\gamma$ gene adjuvant on immunogenic enhancement of secreting coxsackievirus B3 VP1 DNA vaccine

CHUAI Xia, GAO Zhi-Yun, FANG Wen-Liang, JIN Yu-Huai, ZHANG Yong-Hong, XIE Li-Xin, WANG Yong-Xiang

Department of Pathogenic Biology, School of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

**【Abstract】** AIM : To construct the eukaryotic expression plasmid pcDNA3/mIFN- $\gamma$  and observe its effect on secreting coxsackievirus B3( CVB3 ) VP1 gene vaccine. **METHODS** : mIFN- $\gamma$  cDNA amplified by RT-PCR was inserted in eukaryotic expression vector pcDNA3 and then detected after being transfected into cos-7 cells with DEAE-Dextran ; Balb/c mice were inoculated in quadriceps muscle at 2-week interval for 6 weeks with pcDNA3/sVP1 , pcDNA3/sVP1 + pcDNA3/mIFN- $\gamma$  , respectively. The levels of serum antibodies were detected 13 d after each inoculation. The mice were challenged by 500 TCID<sub>50</sub> CVB3 2 weeks after the last immunization. **RESULTS** : Recombinant pcDNA3/mIFN- $\gamma$  plasmid had been constructed and transcribed and expressed. The neutralizing antibody could be induced by pcDNA3/sVP1 and pcDNA3/sVP1 + pcDNA3/mIFN- $\gamma$  ; The antibody titers increased with the times of inoculation. But there was no difference in the antibody titers and the survival rate between the 2 groups. Co-administration of pcDNA3/mIFN- $\gamma$  and pcDNA3/sVP1 plasmid to Balb/c mice , decreased the titers of virus and reduced the histopathological changes compared with control groups. **CONCLUSION** : mIFN- $\gamma$  can enhance the immune protection of secreting CVB3 DNA vaccine.

**【Keywords】** interferon type II ; enterovirus B , human ; vaccines , DNA ; adjuvants , immunologic ; neutralizing antibody ; mice

**【摘要】**目的 : 构建小鼠 IFN- $\gamma$  真核表达质粒, 观察其对分泌型柯萨奇病毒 B3( CVB3 )核酸疫苗的影响. 方法 : 以 RT-PCR 扩增小鼠 IFN- $\gamma$  基因, 构建真核表达重组质粒 pcDNA3/mIFN- $\gamma$ , 检测其在 cos-7 细胞内的表达, 将分泌型 pcDNA3/sVP1, pcDNA3/sVP1 + pcDNA3/mIFN- $\gamma$  肌注免疫小鼠, 每 2 wk 注射 1 次, 共 3 次, 每次免疫后 13 d 取血测血清抗体水平. 末次免疫后 2 wk, 以 500 TCID<sub>50</sub> 的 CVB3 腹腔内感染, 观察小鼠的存活情况. 结果 : 成功构建了 pcDNA3/mIFN- $\gamma$  并能有效表达, pcDNA3/sVP1 组和 pcDNA3/sVP1 + pcDNA3/mIFN- $\gamma$  组均能诱导小鼠产生中和抗体, 抗体滴度随免疫次数的增加而提高, 但两组小鼠抗体滴度和生存率无显著性差异. 混合质粒注射组血清的病毒滴度明显低于 pcDNA3/sVP1 组, 且心肌病理损伤明显减轻. 结论 : IFN- $\gamma$  作为基因佐剂, 在一定程度上增强了分泌型 CVB3 VP1 基因疫苗的免疫保护作用.

**【关键词】** 干扰素 II 型, 肠道病毒 B 型, 人, 疫苗, DNA, 佐剂, 免疫, 中和抗体, 小鼠

**【中图分类号】** R373 **【文献标识码】** A

## 0 引言

柯萨奇病毒 B 组( coxsackievirus B, CVB )是引起人类病毒性心肌炎的主要病原体. 目前尚无有效的特异性预防措施, 而基因疫苗则为预防 CVB3 感染提供了可能性. 研究者多选择编码 CVB3 主要的衣壳蛋白 VP1 基因构建基因疫苗, 该疫苗能诱导小鼠产生中和抗体, 但抗体效价低<sup>[1-2]</sup>. 我们将 IL-2 信号肽与 CVB3 VP1 基因进行拼接, 构建成分泌型 CVB3 VP1 基因疫苗, 免疫小鼠产生的抗体效价显著高于非分泌型基因疫苗, 但不能完全保护动物抵抗致死量的病毒的攻击<sup>[3]</sup>. 近来的研究表明, 编码细胞因子基因的质粒可增强某些 DNA 疫苗的免疫效应<sup>[4-5]</sup>. IFN- $\gamma$  是一种具有重要的免疫调节作用的细胞因子, 本研究将 IFN- $\gamma$  真核表达质粒与分泌型 CVB3 VP1 基因疫苗共同注射免疫 Balb/c 小鼠, 观察其对小鼠免疫功能的影响及对 CVB3 攻击的保护作用.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞株、菌株、病毒株及实验动物 大肠杆菌

收稿日期 2006-03-03 ; 接受日期 2006-04-15

基金项目 河北省自然科学基金资助项目( 2004000631 )

通讯作者 : 王永祥. Tel : ( 0311 ) 86265606 Email : wangyongxiang1@ yahoo.com.cn

作者简介 揣 侠, 助教, 硕士生( 导师王永祥 ). Tel : ( 0311 ) 86265606

Email : chuaxiahb@126.com

DH5 $\alpha$  真核表达载体 pcDNA3 柯萨奇病毒 B3 Nancy 株, cos-7 细胞及 HeLa 细胞由本室保存。Balb/c 小鼠 雄性 4~6 wk 龄, 购自北京肿瘤研究所; pcDNA3/sVP1 质粒本室构建。

1.1.2 主要试剂和工具酶 各种限制性内切酶、AMV 逆转录酶、T4 DNA 连接酶等均购自 Promega 公司, mIFN- $\gamma$  ELISA 检测试剂盒为上海森雄公司产品。

## 1.2 方法

1.2.1 mIFN- $\gamma$  真核表达质粒的构建 根据小鼠 IFN- $\gamma$  (mIFN- $\gamma$ ) 基因序列及 pcDNA3 序列, 并通过 Webcutter 对全序列进行酶切位点分析后设计引物, 由大连宝生物工程有限公司合成。其序列为: 上游引物 5' CACGGATCCACAATGAACGCTACACAC3' (含 BamH I 位点); 下游引物 5' CCGGAATTCTCAGCAGCGACTCCT3' (含 EcoR I 位点)。取健康 6 wk 龄的雄性 Balb/c 小鼠, 无菌条件下, 以毛玻璃片将组织磨碎制成单细胞悬液; 用 Tris-NH<sub>4</sub>Cl 法溶解红细胞, 加入含 10  $\mu$ g/mL ConA 的完全 RPMI1640 培养基诱导 3 d 后, 弃去培养液, 按异硫氰酸胍一步法提取激活的脾细胞的总 RNA, 用 RT-PCR 法扩增, 反应循环参数: 94 $^{\circ}$ C, 1 min; 56 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 1 min; 30 个循环。扩增产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定。胶回收法纯化 mIFN- $\gamma$  基因片段, 与 pGEM-T 载体连接, 按常规方法转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 挑取阳性克隆, 提取质粒鉴定后回收纯化, 送大连宝生物工程有限公司测序。将正确序列的 mIFN- $\gamma$  BamH I, EcoR I 双酶切片段与经过同样酶切的真核表达载体 pcDNA3 连接, 构建真核表达质粒 pcDNA3/mIFN- $\gamma$ , 转化感受态 DH5 $\alpha$ , 筛选阳性克隆, 提取质粒 BamH I, EcoR I 双酶切鉴定。

1.2.2 真核细胞转染及检测 将 pcDNA3/mIFN- $\gamma$  用 DEAE-Dextran 法转染 cos-7 细胞, 同时设空载体对照、转染试剂 DEAE-Dextran 对照和空白对照。48 h 后, 提取各组细胞的总 RNA, 用无 RNA 酶的胰 DNA 酶 I 处理后, 用 RT-PCR 法检测 mIFN- $\gamma$  mRNA 的表达。ELISA 法检测各组细胞上清中 mIFN- $\gamma$  的分泌, 操作方法按试剂盒说明书进行。

1.2.3 重组质粒免疫小鼠 雄性 4~6 wk 龄 Balb/c 小鼠 100 只, 随机分成 5 组, 分别为生理盐水组、空载体 pcDNA3 组、pcDNA3/mIFN- $\gamma$  组、pcDNA3/sVP1 组和 pcDNA3/mIFN- $\gamma$  与 pcDNA3/sVP1 混合注射组, 每组 20 只。碱裂解法大量抽提上述质粒并以生理盐水进行稀释。接种部位为小鼠大腿股四头肌, 接种前 20 min 注射 250 g/L 蔗糖 100  $\mu$ L, 然后在同一部位接种

质粒 100  $\mu$ g, 体积为 100  $\mu$ L, 每 2 wk 加强 1 次, 共 3 次, 每次免疫后的第 13 日断尾采血, 分离血清并采用微量中和试验的方法测定中和抗体滴度。

1.2.4 病毒攻击实验 第 3 次免疫后 2 wk, 以 500 TCID<sub>50</sub> CVB3 的病毒液 0.2 mL 腹腔注射于小鼠, 观察并记录 5 组小鼠的存活情况至感染后 21 d。

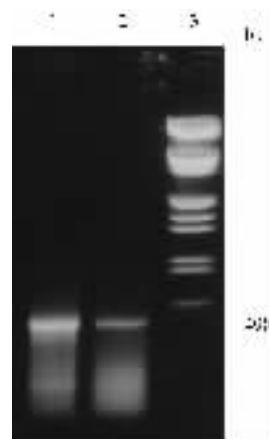
1.2.5 小鼠血中病毒滴度的测定 小鼠接种病毒第 7 日, 无菌断尾取血, 分离血清, 将血清用 RPMI 1640 细胞维持液(含青、链霉素各 1  $\times$  10<sup>5</sup> U/L, 20 g/L FCS)连续 2 倍比稀释, 由 1:2 ~ 1:256 接种 HeLa 细胞, 观察细胞病变, 按 Reed-Muench 法计算病毒滴度。

1.2.6 小鼠心脏组织的病理学检查 取不同处理组的小鼠心脏, 制备石蜡切片, 经 HE 染色后, 于光镜下观察组织病理学改变。

统计学处理: 利用 SPSS10.0 软件进行分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 中和试验采用方差分析, 血中病毒滴度的测定用方差分析和 SNK-*q* 检验, 动物生存率采用 Kaplan-Meier 法进行生存分析。

## 2 结果

2.1 mIFN- $\gamma$  cDNA 的扩增 经 ConA 活化的小鼠脾细胞经 RT-PCR 扩增, 10 g/L 琼脂糖凝胶结果显示, 在 490 bp 处可见特异性条带(图 1)。



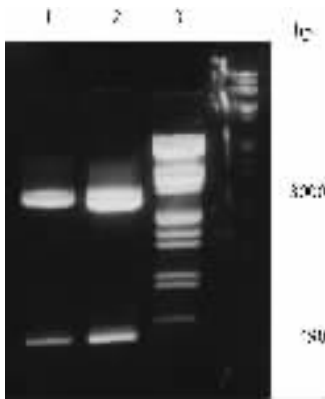
1, 2: mIFN- $\gamma$  片段(490 bp); 3:  $\lambda$ DNA/EcoR I + Hind III marker.

图 1 mIFN- $\gamma$  PCR 扩增产物

2.2 pGEM-T/mIFN- $\gamma$  重组质粒 BamH I, EcoR I 双酶切, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定可见 3.0 kb 及 490 bp 的特异性条带(图 2)。测序结果与 GenBank 中 mIFN- $\gamma$  序列完全一致。

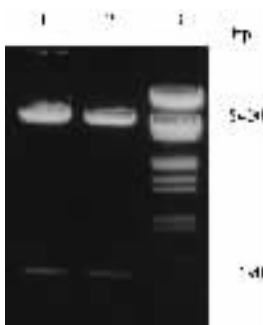
2.3 真核表达质粒 pcDNA3/mIFN- $\gamma$  的构建 测序正确的 pGEM-T/mIFN- $\gamma$  和真核表达载体 pcDNA3 用 BamH I, EcoR I 双酶切后构建成 pcDNA3/mIFN- $\gamma$

真核表达载体 ,DH5 $\alpha$  转化扩增后 ,提取质粒双酶切鉴定 ,可见约 490 bp 和 5400 bp 2 条电泳条带(图 3) ,表明已正确构建 pcDNA3/mIFN- $\gamma$  真核表达载体。



1 2 : BamH I + EcoR I 酶切 pGEM-T/mIFN- $\gamma$  ; 3 :  $\lambda$ DNA/EcoR I + Hind III marker.

图2 pGEM-T/mIFN- $\gamma$  酶切电泳结果



1 , 2 : BamH I + EcoR I 酶切 pcDNA3/mIFN- $\gamma$  ; 3 :  $\lambda$ DNA/EcoR I + Hind III marker.

图3 pcDNA3/mIFN- $\gamma$  酶切电泳结果

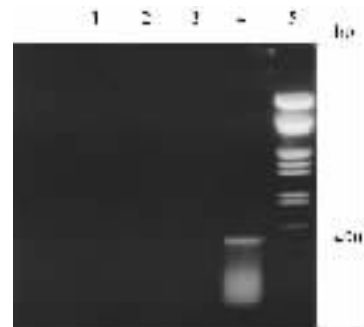
## 2.4 mIFN- $\gamma$ 在真核细胞中的表达

2.4.1 mIFN- $\gamma$  在 cos-7 细胞中的表达 收集转染后的 cos-7 细胞 ,提取总 RNA ,用原引物行 RT-PCR 结果显示 ,pcDNA3/mIFN- $\gamma$  转染组可检测出 mIFN- $\gamma$  mRNA 的表达 ,而其余 3 个对照组未见表达(图 4)。

2.4.2 培养上清中 mIFN- $\gamma$  的分泌 ELISA 结果表明 ,pcDNA3/mIFN- $\gamma$  转染组可检测到 mIFN- $\gamma$  分泌 ,表达量为 1.04 mg/L ,水平显著超出标准曲线 ,故计算结果为估计值 ,仅供参考。空载体对照、转染试剂 DEAE-Dextran 对照组分别为 0.0016 和 0.0021 mg/L ,提示 pcDNA3/mIFN- $\gamma$  成功转染了 cos-7 细胞并表达分泌。

2.5 血清中和抗体水平 各组小鼠 3 次免疫期间中和抗体滴度见表 1。从结果可以看出盐水对照、pcDNA3 和 pcDNA3/mIFN- $\gamma$  均不能诱导小鼠产生抗体 ,

而 pcDNA3/sVP1 和 pcDNA3/sVP1 + pcDNA3/mIFN- $\gamma$  则能诱导小鼠产生抗体 ,抗体滴度随免疫次数的增加而有所提高 ,但 pcDNA3/sVP1 + pcDNA3/mIFN- $\gamma$  组同 pcDNA3/sVP1 组相比抗体滴度并没有显著增高 ( $P > 0.05$ )。



1 2 , 3 : 对照组 ; 4 : mIFN- $\gamma$  mRNA ; 5 :  $\lambda$ DNA/EcoR I + Hind III marker.

图4 RT-PCR 检测 mIFN- $\gamma$  mRNA 在 cos-7 细胞中的表达

表 1 各次免疫后各组中和抗体平均效价 ( $n = 20$  ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	各次免疫后的抗体滴度		
	第 1 次	第 2 次	第 3 次
pcDNA3/sVP1	10.00 $\pm$ 1.57	23.78 $\pm$ 1.72 <sup>a</sup>	28.28 $\pm$ 1.52 <sup>a</sup>
pcDNA3/sVP1 + pcDNA3/mIFN- $\gamma$	9.66 $\pm$ 1.61	24.62 $\pm$ 1.74 <sup>a</sup>	29.28 $\pm$ 1.42 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 第一次。

2.6 小鼠生存率 各组 21 d 生存率分别为 : pcDNA3/sVP1 + pcDNA3/mIFN- $\gamma$  组 35% , pcDNA3/sVP1 组 30% , pcDNA3/mIFN- $\gamma$  组 15% , pcDNA3 组 10% , 生理盐水组 5%。pcDNA3/sVP1 + pcDNA3/mIFN- $\gamma$  组 21 d 生存率稍高于其他几组 ,但用 Kaplan-Meier 法进行生存分析 ,各组间均无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。

2.7 血中病毒滴度 各组小鼠血中病毒滴度见表 2 ;可见 pcDNA3/sVP1 和 pcDNA3/sVP1 + pcDNA3/mIFN- $\gamma$  组病毒滴度较 3 个对照组均有不同程度的降低 ,以 pcDNA3/sVP1 + pcDNA3/mIFN- $\gamma$  组最低 ,用单因素方差分析及两两比较的 SNK- $q$  检验对各组病毒滴度的几何均数进行比较 ,pcDNA3/sVP1 组和 pcDNA3/sVP1 + pcDNA3/mIFN- $\gamma$  组和 3 个对照组之间均有显著性差异 ( $P < 0.05$ ) ,且 pcDNA3/sVP1 + pcDNA3/mIFN- $\gamma$  组病毒滴度明显低于 pcDNA3/sVP1 组 ( $P < 0.05$ ) ,表明 IFN- $\gamma$  能够有效地辅助 sVP1 清除体内的病毒 ,抑制病毒的复制 ,降低体内的病毒滴度。

表2 不同组小鼠血中病毒滴度 ( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

组别	病毒滴度
对照	5.48 ± 0.63
pcDNA3	5.10 ± 0.45
pcDNA3/IFN- $\gamma$	4.70 ± 0.41
pcDNA3/sVP1	3.62 ± 0.30 <sup>a</sup>
pcDNA3/sVP1 + pcDNA3/IFN- $\gamma$	2.94 ± 0.46 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照, pcDNA3 和 pcDNA3/IFN- $\gamma$ ; <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs pcDNA3/sVP1.

**2.8 小鼠心肌组织的病理学观察** 各免疫组小鼠心肌组织 HE 染色显示,生理盐水对照组、pcDNA3 组、pcDNA3/mIFN- $\gamma$  组均能见明显的心肌病理损伤,表现为心肌细胞呈不同程度的坏死,嗜酸性增强,大量的淋巴细胞浸润,而 pcDNA3/sVP1 组和 pcDNA3/sVP1 + pcDNA3/mIFN- $\gamma$  组无明显的病变及炎性细胞的浸润。

### 3 讨论

病毒性心肌炎的发生与病毒对心肌细胞的直接损伤及免疫病理损伤有关,中和抗体在中和外来病毒,阻止病毒的入侵和感染方面发挥重要的作用。为了提高中和抗体的表达水平,我们以分泌型 CVB3 VP1 作为目的基因,构建了分泌型 VP1 重组真核表达质粒,肌注小鼠后比非分泌型 VP1 基因诱导了较高水平的中和抗体应答<sup>[3]</sup>。主要是借助于 hIL-2 信号肽可以把合成的蛋白质分泌入血后,或被循环系统的抗原提呈细胞(APCs)作为外源性抗原识别摄取,或随血液循环到淋巴结并被那里的 APCs 所吞噬,之后有效地加工提呈。但尽管该疫苗刺激机体产生了较高水平的中和抗体而免疫保护作用却不是理想,为此,我们选择了干扰素  $\gamma$  作为佐剂来增强其免疫效应。

IFN- $\gamma$  是具有多种生物学功能的细胞因子,主要表现为直接抗病毒作用和免疫调节作用。一些研究者已成功将 IFN- $\gamma$  基因作为基因佐剂来增强核酸疫苗的免疫效果<sup>[6]</sup>。近年来 IFN- $\gamma$  也用于柯萨奇病毒性心肌炎的防治<sup>[7-8]</sup>,其作用主要是直接抑制病毒复制,这种直接作用主要是产生一些与病毒相互作用的

产物或促进受染细胞的凋亡,也可以引起多种细胞表达 MHC-II 类分子,从而提高抗原提呈能力;另外,它可以刺激细胞免疫反应,激活巨噬细胞、NK 细胞,增强 CTL 杀伤活性,清除胞内感染的病毒。本研究也发现它可以作为基因佐剂对 pcDNA3/sVP1 基因疫苗有一定免疫增强作用。不能有效保护小鼠对抗致死量病毒感染推测可能是因为 mIFN- $\gamma$  作为 Th1 型细胞因子,主要增强细胞免疫反应,不能有效诱导高滴度的中和抗体的产生,阻止 CVB3 感染以及继发的一切病变。

总之,本研究成功构建了 pcDNA3/mIFN- $\gamma$  重组真核表达质粒,它虽然不能增强 sVP1 基因所激发的特异性中和抗体应答,从而抵抗致死量病毒的攻击,但可以抑制病毒复制,降低小鼠体内的病毒滴度,但具体的免疫机制尚需进一步的实验来证实。

### 【参考文献】

- [1] Henke A, Zell R, Stelzner A, et al. DNA vaccine-mediated immune responses in Coxsackie virus B3 infected mice [J]. *Antiviral Res*, 2001, 49(1): 49-54.
- [2] 倪志宇,王永祥,金玉怀,等. 柯萨奇病毒 B 组 3 型 VP1 基因真核表达重组质粒的构建及免疫效果 [J]. *河北医科大学学报*, 2002, 23(3): 133-136.
- [3] 方艳辉,金玉怀,王永祥,等. 人 IL-2 信号肽基因增强柯萨奇病毒 B3 型 VP1 DNA 疫苗诱导的中和抗体应答 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2004, 24(3): 202-205.
- [4] Ramsay AJ, Dent SJ, Strugnell RA, et al. Genetic vaccination strategies for enhanced cellular, humoral and mucosal immunity [J]. *J Immunol Rev*, 1999, 171: 27-24.
- [5] Lillehoj HS, Ding X, Quiroz MA, et al. Resistance to intestinal coccidiosis following DNA immunization with the cloned 3-1E Eimeria gene plus IL-2, IL-15, and IFN-gamma [J]. *Avian Dis*, 2005, 49(1): 112-117.
- [6] Henke A, Zell R, Martin U, et al. Direct-interferon- $\gamma$  mediated protection caused by a recombinant Coxsackievirus B3 [J]. *Virology*, 2003, 315(2): 335-344.
- [7] Jarasch N, Martin U, Kamphausen E, et al. Interferon-gamma-induced activation of nitric oxide-mediated antiviral activity of macrophages caused by a recombinant coxsackievirus B3 [J]. *Viral Immunol*, 2005, 18(2): 355-364.
- [8] Osorio Y, Ghiasi H. Comparison of adjuvant efficacy of herpes simplex virus type 1 recombinant viruses expressing Th1 and Th2 cytokine genes [J]. *J Virol*, 2003, 77(10): 5774-5783.

编辑 许福明