

HBs 和 HCVc 基因双顺反子质粒 在 BALB/c 小鼠体内的分布*

廖国阳, 孙明波, 张新文, 陈俊英, 姜述德

(中国医学科学院/中国协和医科大学 医学生物学研究所, 云南 昆明 650118)

摘要: 采用注射含双顺反子质粒后, PCR 法扩增不同组织中 HBsAg 和 HCVc 基因, 同时检测 HBV 和 HCV 抗体应答水平. 研究注射基因免疫用双顺反子质粒在小鼠组织中的分布. pcDNA3.0BApc154S₂S 1 次注射 BALB/c 小鼠后, 24 h 内主要分布于血液、肝、脾、骨髓、淋巴结、注射部位肌肉、肺和肾等含血液丰富的组织中. 注射后 2 d 主要在骨髓、血液和注射部位肌肉中存在. 7 d 后仅在注射部位肌肉中能检测出来, 并可持续到第 9 周. 组织切片镜检质粒注射初期肌肉细胞轻度浊肿, 随后肌膜细胞轻度增生, 未见其它明显的组织病理学变化. 质粒多次免疫 BALB/c 小鼠未见明显的临床症状和病理组织学变化. 质粒在小鼠体内不同组织存在时间不一致.

关键词: DNA 疫苗; 双顺反子质粒; 组织分布

中图分类号: Q 789; R 373.21 文献标识码: A 文章编号: 0258-7971(2006)03-0267-04

基因免疫是将编码目的蛋白的基因插入真核表达载体构建重组质粒, 转染细菌、从细菌培养物中提取质粒, 注入体内, 被宿主细胞所摄取, 通过宿主的转录、翻译系统合成蛋白, 并诱导机体产生对该蛋白特异性的免疫应答, 又称为核酸免疫、DNA 疫苗或裸 DNA 疫苗^[1,2].

基因免疫既能诱导宿主产生持久的体液免疫又能诱导细胞免疫应答, 使疫苗学家感到震惊^[3]. 它在病毒感染、变态反应和癌症等疾病的预防和治疗上有着广泛的应用前景. 目前已发现 DNA 疫苗对许多病毒、细菌、寄生虫和肿瘤有预防和治疗作用, 并可调节自身免疫应答^[4]. 许多病原体和肿瘤的 DNA 疫苗已进行了人体临床试验, 对 DNA 疫苗在动物及人体的安全性和有效性上已积累了丰富经验^[4,5]. 然而对基因免疫安全性人们还有些担心, 本文就 pcDNA3.0BApc154S₂S 注射 BALB/c 小鼠后质粒在体内的分布及安全性进行研究.

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒 DH5 α *E. coli* 由中国药品检定所细胞室保存, 质粒 pcDNA3.0 由中国预防医学科学院病毒学研究所肝炎室内惠赠.

1.2 病毒及基因 pcDNA3.0BApc154S₂S 由本实验室构建.

1.3 试剂及免疫检测试剂 *Taq* DNA 聚合酶购自 Pharmacia; 大肠杆菌表达的重组 HCV C44 蛋白, 由中国预防科学院病毒所肝炎室惠赠. HBV S 蛋白购自中国预防科学院病毒所中试车间.

1.4 质粒的扩增、提取和纯化 按文献^[6]操作.

1.5 免疫小鼠 4~6 周龄 BALB/c 小鼠(中国科学院上海实验动物中心). 将 pcDNA3.0BApc154S₂S 和 pcDNA3.0BA 质粒, 用生理盐水稀释至 1 μ g/ μ L, 每组 34 只小鼠; 用微量注射器, 针头垂直肌纤维方向每只小鼠注射 100 μ g, 即每侧腓长

* 收稿日期: 2006-01-15

基金项目: 云南省自然科学基金资助项目(2001C0072M; 2004C0070M).

作者简介: 廖国阳(1962-), 男, 云南人, 博士, 副研究员, 主要从事病毒生物学方面的研究.

通讯作者: 姜述德(1936-), 男, 山东人, 研究员, 博士生导师, 主要从事病毒疫苗方面的研究.

肌肉注射 50 μg 。

1.6 质粒在组织中分布的检测 第 1 次注射后 10, 20, 30 min; 1, 1.5, 2, 3 h; 1, 4, 7, 14, 28 d 以及 3 次免疫后 2, 4, 6 月每处处死 2 只小鼠, 取注射部位肌肉, 1 份用 10% 福尔马林固定, 石蜡包埋, 切片 5 μm ; 另一份肌肉及血液、心、肝、脾、肺、肾、脑、淋巴结等组织经液氮反复冻融, 蛋白酶 K 消化, 酚氯仿抽提, 乙醇沉淀, 溶解于 TE (pH 8.0) 中, 以 HBV PS₂ 与 NS 引物扩增 preS₂S。

2 结果

2.1 体液免疫应答 pcDNA3.0BApc154S₂S 和

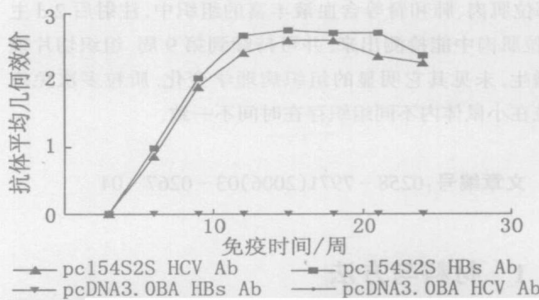


图 1 HBV S₂S 与 HCV pc154 基因联合免疫的抗体应答

Fig. 1 The antibody responses of DNA immunization with pcDNA3.0BApc154S₂S in BALB/c mice

2.3 pcDNA3.0BApc154S₂S 在小鼠体内组织中的分布及存在时间 注射后不同时间杀死小鼠, PCR 扩增 HBV S₂S。注射后 24 h 内, 质粒主要分布于含血液丰富的组织如血液、肝、脾、骨髓、淋巴结、注射部位肌肉、肺和肾等组织中。注射后 2d 主要在骨髓、血液和注射部位肌肉中存在, 7d 后仅在注射部位肌肉中能检测出来, 并可持续到第 9 周, 结果见图 3。这表明质粒在体内分布是不均的, 存在一定时间后被清除。

2.4 组织病理学观察 注射后不同时间杀死小鼠, 取注射部位肌肉, 病理组织切片镜检质粒注射初期肌肉细胞轻度浊肿, 随后肌膜细胞轻度增生, 4 周肌细胞恢复正常, 结果见图 4。

3 讨论

pcDNA3.0BApc154S₂S 质粒 DNA 反复注射后,

pcDNA3.0BA 于第 1 次免疫后第 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 周尾动脉采血测定血中抗 HBs 及 HCV 抗体效价, 计算 8 只鼠的平均几何效价, 抗体应答的动态变化见图 1。

2.2 CD₄⁺, CD₈⁺ 细胞检测 pcDNA3.0BApc154S₂S 免疫 BALB/c 小鼠后第 6 周和第 12 周处死小鼠用 FACS 测定脾淋巴细胞中 CD₄⁺ 和 CD₈⁺ 细胞比例, 结果见图 2。这表明 pcDNA3.0BApc154S₂S 不仅能诱导宿主 CD₄⁺ T 细胞介导的体液免疫应答, 而且还能诱导 CD₈⁺ 细胞免疫应答。

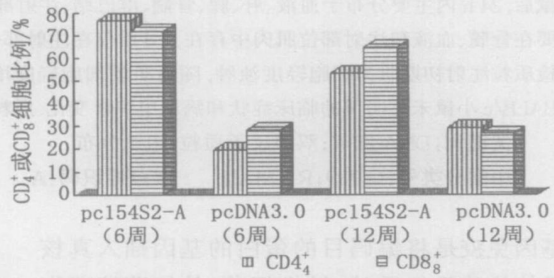
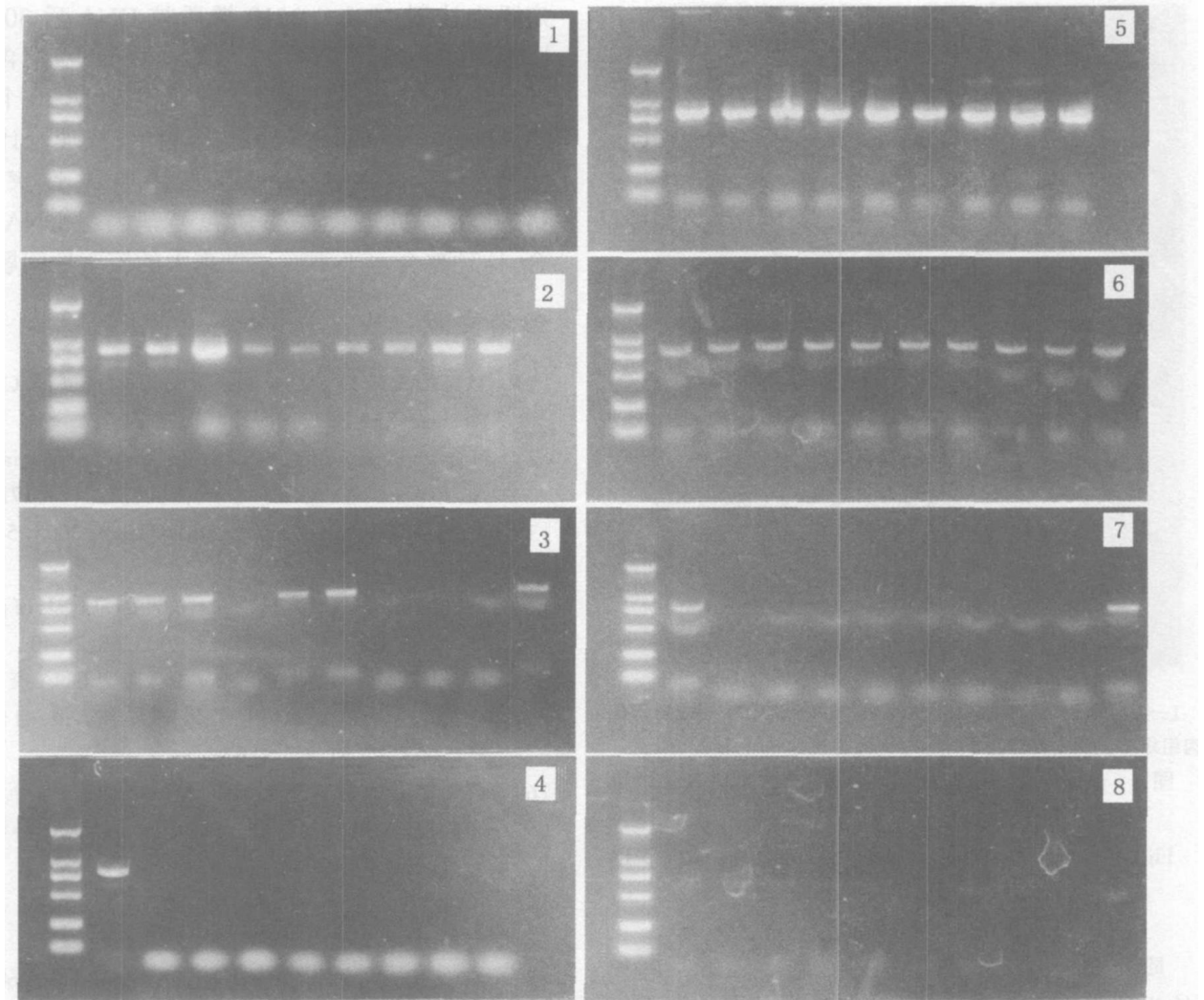


图 2 pcDNA3.0BApc154S₂S 免疫 BALB/c H-2d 小鼠后脾细胞中 CD₄⁺ 和 CD₈⁺ 细胞的变化

Fig. 2 CD₄⁺ and CD₈⁺ cells to HBsAg and HCV core after DNA immunization with pcDNA3.0BApc154S₂S in BALB/c mice

仅在注射部位肌肉中长期存在, 而其它部位的质粒迅速被清除, 不产生肌肉毒性和病理组织的损伤。

DNA 疫苗正在病毒感染者、癌症病人以及健康自愿者中进行有效性和安全性的临床试验, DNA 疫苗的适用范围不仅是生命受威胁的病人, 而且更为重要的是它可用于健康成人及儿童的免疫预防。因此 DNA 疫苗的安全性问题必须认真对待, 除了考虑与传统疫苗相似的一些问题如质粒本身的毒性作用外, 还应弄清这种新型疫苗在理论上提出的一些新问题, 如外源蛋白基因在体内表达的毒性、外源蛋白在体内持续表达是否会引起人们未预料到的后果, 像自身免疫性疾病和质粒 DNA 整合到宿主染色体 DNA 上导致细胞的转化等^[7, 8]。



1: pcDNA3.0BA 侵染各组织阴性对照; 2: pcDNA3.0BApc154S₂S 侵染各组织阳性对照;
3~ 8: 分别为小鼠肌肉注射 pcDNA3.0BApc154S₂S 后 3, 24, 96 h 和 1, 8, 9, 24 周在各组织中的分布;
Lane1 DL2000: DNA marker; lane2~ 10: 肌肉、淋巴结、脾、肝、肺、心、脑、肾和骨髓(从左至右)

图 3 pcDNA3.0BApc154S₂S 免疫 H-2^dBALB/c 小鼠质粒在体内的分布

Fig. 3 Tissue distribution of pcDNA3.0BApc154S₂S in BALB/c mice amplifying pre S₂S gene by PCR

本研究发现质粒肌肉注射后, 极短时间内迅速分布到全身, 以后仅在注射部位肌肉中长期存在, 而其它部位的质粒迅速被清除, 不产生肌肉毒性和病理组织的损伤. 质粒注射 24 h 内在包括血液在内的全身含血管较丰富的组织中都有存在, 注射后 2 d 主要在骨髓、血液和注射部位肌肉中存在, 7 d 后仅在注射部位肌肉中能够检测出来, 并可持续存在到第 9 周. 肌肉注射质粒后, 质粒分布到全身组织已被许多研究者所证实. 将编码疟原虫环孢子

的 VCL-2510 质粒 DNA 肌肉注射小鼠和兔子, 其结果与本文的结果相一致. 给小鼠和兔子静脉注射 VCL-2510 质粒 DNA 在除脑和性腺外的受检组织中均检出了较肌肉注射低的质粒 DNA^[9], 质粒 DNA 清除速度快, 注射后 6 周在 6 只动物中仅 1 只检出质粒 DNA. 将含口蹄疫病毒抗原表位质粒注射小鼠^[10], 质粒在小鼠血中降解速度为: 10 min, 降解 20.9%; 1 h, 降解 34.1%; 1 d, 降解 86.8%; 1 周, 降解 97.8%.



1~7: 分别为质粒注射后 2, 96 h 和 2, 4, 8, 12, 24 周注射部位肌肉组织病理变化(120×); 8: 正常小鼠腓长肌对照(120×)

图 4 pcDNA3.0Bapc154S₂S 肌肉注射 BALB/c 小鼠后病理组织学变化

Fig. 4 Pathological changes of injected side with pcDNA3.0Bapc154S₂S

质粒在全身大多数组织存在对于理解基因免疫的机理具有重要的意义。目前认为基因免疫不仅是注射部位局部肌肉的作用, 因为肌肉缺乏 MHC II 类分子, MHC I 亦只有微弱的表达, 因此单纯肌细胞表达难于解释基因免疫诱导如此强大的体液及细胞免疫应答^[11]。多数研究者认为基因免疫是全身反应^[7, 12], 质粒在全身绝大多数组织中出现时可被摄取, 表达出的抗原直接刺激 APC 细胞或 B 细胞诱导广泛的免疫应答。我们观察了质粒注射局部肌肉的病理组织学变化, 发现质粒注射后短期内注射部位肌肉有轻度的水肿和肌膜细胞的增生, 以后肌肉组织恢复正常, 即使质粒在注射部位长期存在和体液免疫与细胞免疫被诱导出来, 肌肉也不产生免疫病理损伤。

目前未检测出质粒 DNA 与肌细胞染色体的整合^[3, 7, 13]。小鼠用 100 μg 质粒 DNA 肌肉反复免疫 6 次, 6 周后采用灵敏度为 1/150 000 的方法检测, 仅在接种处发现质粒 DNA, 12 周和 16 周时均未发现质粒 DNA 与基因整合的现象^[13]。采用能检测出一个拷贝质粒 DNA 的高灵敏度的 PCR 来测

定肌肉注射 VCL-2510 裸质粒 DNA 后 30, 60 d 肌组织纯化出的基因组 DNA, 质粒 DNA 的含量 ≤ 30 个拷贝 150 000 个基因组^[14]。但即使 30 个拷贝的质粒 DNA 全都整合在基因组上, 按理论计算突变率不足哺乳动物细胞基因自发性突变的 113 000。因此即使发生质粒与基因组 DNA 的整合, 这种整合水平不应该带来大的安全性问题。

参考文献:

- [1] TUTEJA R. DNA vaccines: a ray of hope[J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1999, 34(1): 1-24.
- [2] Nogales Espert A. A view to the future of vaccines[J]. An R Acad Nac Med (Madr), 2005, 122(1): 171-184.
- [3] CUI Z. DNA vaccine[J]. Adv Genet, 2005, 54: 257-289.
- [4] LIU M A, ULMER J B. Human clinical trials of plasmid DNA vaccines[J]. Adv Genet, 2005, 55: 25-40.
- [5] 周东霞, 王杨, 孙明, 等. HIV-1 C 亚型 DNA 疫苗诱导小鼠免疫反应的研究[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2005, 27(5): 451-456.
- [6] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1992.
- [7] BAROUCH D H. Rational design of gene based vaccines[J]. J Pathol, 2006, 208(2): 283-289.
- [8] WOLFF J A, BUDKER V. The mechanism of naked DNA uptake and expression[J]. Adv Genet, 2005, 54: 3-20.
- [9] DONNELLY J J, WAHREN B, LIU M A. DNA vaccines: progress and challenges[J]. J Immunol, 2005, 175(2): 633-639.
- [10] SUEZANNE E P. Plasmid DNA Malaria vaccine: Tissue distribution and safety studies in mice and rabbits[J]. Human Gene therapy, 1999, 10: 741-758.
- [11] ZHANG H Y, SUN S H, GUO Y J, et al. Tissue distribution of a plasmid DNA containing epitopes of foot and mouth disease virus in mice[J]. Vaccine, 2005, 23(48-49): 5 632-5 640.
- [12] RAJCANI J, MOSKO T, REZUCHOVA I. Current developments in viral DNA vaccines: shall they solve the unsolved? [J]. Rev Med Virol, 2005, 15(5): 303-325.
- [13] ALPAR H O, PAPANICOLAOU I, BRAMWELL V W. Strategies for DNA vaccine delivery[J]. Expert Opin Drug Deliv, 2005, 2(5): 829-842.

mRNA. Inhibition of RXR α transcriptional activity by TPA was observed by CAT assay. TPA inhibits proliferation, induces apoptosis of SMMC7721 cells. Expression level of TR3 mRNA in SMMC7721 was induced by TPA. TPA repressed expression level of RXR α protein and inhibited RXR α transcriptional activity. And apoptosis has some relation with TR3 and RXR α .

Key words: TPA; apoptosis; RXR α ; TR3

* * * * *

(上接第 270 页)

[14] TERRIE M. Plasmid DNA Malaria vaccine: the potential for genomic integration after intramuscular injection[J]. Human Gene Ther, 1999, 10: 759-768. preclinical safety evaluation of nucleic acid medicines [J]. Hum Exp Toxicol (England), 2000, 19(5): 267-276.

[15] HAWORTH R, PILLING A M. The PCR assay in the

Tissue distribution in BALB/c of bicistronic plasmids HCV with core and HBV preS₂S

LIAO Guoyang, SUN Mingbo, ZHANG Xirwen, CHEN Juirying, JIANG Shurde
(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union of Medical College, Kunming 650118, China)

Abstract: DNA immunization can induce humoral and cellular immune responses to against a range of viral pathogens. The results show HCV core and HBV preS₂S can induce strong immune responses in DNA immunization. After muscular administration was performed, pc154S₂S plasmid DNA was detected initially in all highly vascularized tissues. Two days later, they mainly stayed at spleen, blood and injected muscles; Seven days later, the pc154S₂S only can be found in the injected muscles, it can be kept for nine weeks. Intramuscular injections of plasmid has no clinical symptom and histopathological damages in the injection sites.

Key words: DNA immunization; bicistronic plasmid; tissue distribution