

# 基因枪与肌肉注射猪繁殖与呼吸综合征病毒 ORF5 基因疫苗诱导小鼠体液及细胞免疫的比较研究

陈希文<sup>1,2,3</sup>, 程安春<sup>1,2\*</sup>, 汪铭书<sup>1,2</sup>, 刘菲<sup>2</sup>, 希尼尼根<sup>1</sup>,  
豆文波<sup>1,2</sup>, 刘伍梅<sup>1,2</sup>, 李雪梅<sup>1,2</sup>, 张平英<sup>1,2</sup>

(1. 四川农业大学动物科技学院, 雅安 625014; 2. 动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 雅安 625014;

3. 绵阳师范学院动物应用技术研究, 分子生物学与生物制药重点实验室, 绵阳 621000)

**摘要:** 猪繁殖与呼吸综合征病毒 ORF5 基因疫苗 (pcDNA-PRRSV-ORF5) 以不同免疫途径 (基因枪和肌肉注射) 免疫 BALB/c 小鼠, 以 PBS 和空载质粒 pcDNA3.1 (+) 为对照, 采用流式细胞仪 (FACS)、淋巴细胞增殖试验 (MTT 法) 及间接 ELISA 试验分别对小鼠外周血中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞数、T 淋巴细胞的转化功能及小鼠血清中特异性 PRRSV 血清抗体 IgG 动态变化进行了检测。结果表明, pcDNA-PRRSV-ORF5 基因疫苗接种小鼠后外周血对 ConA 有明显的反应性, 试验组与对照组比较差异极显著 ( $P < 0.01$ ) 或显著 ( $P < 0.05$ ), CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞数在免疫后 7 d 高于对照组 ( $P < 0.01$ ), CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞在免疫后 28 d 高于对照组, 不同途径基因疫苗接种小鼠后均诱导小鼠产生 PRRSV 特异性 IgG。在诱导细胞免疫方面, 基因枪和肌肉注射各组间无明显差异; 在诱导体液免疫方面, 基因枪法优于肌肉注射。研究表明制备的 pcDNA-PRRSV-ORF5 基因疫苗免疫小鼠能够诱导其机体产生良好的体液和细胞免疫应答, 基因枪法较肌肉注射更能诱导体液免疫应答的产生。

**关键词:** 猪繁殖与呼吸综合征病毒 ORF5 基因疫苗; 小鼠; 体液免疫; 细胞免疫

中图分类号: S858.285.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)08-0812-07

猪繁殖与呼吸综合征 (Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 又称蓝耳病, 是由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 引起的, 以成年母猪繁殖障碍和仔猪呼吸道疾病为主要症状以及感染猪的免疫抑制为特征的猪的主要传染病之一。此病 1987 年首次发现于美国, 加拿大、德国、西班牙、英国、墨西哥、哥伦比亚、智利、菲律宾、韩国、日本、中国等国家相继报道了该病, 在世界范围内造成严重的经济损失<sup>[1]</sup>。由于空气传播、持续感染、亚临床感染、免疫抑制和继发感染等因素, 使 PRRS 的防疫工作面临困难。基因工程疫苗和基因疫苗的出现给 PRRS 的防治带来了新的希望。基因疫苗 (Nucleic acid vaccine) 由编码能引起保护性免疫反

应的病原体抗原的基因片段和载体构建而成, 进入机体的基因疫苗不与宿主染色体整合, 但它能够表达蛋白, 进而诱发各种免疫应答, 包括体液免疫应答和细胞免疫应答。与常规基因重组疫苗相比, 基因疫苗具有易于构建和制备、稳定性高等特点, 能通过不同途径诱导机体产生体液和细胞免疫<sup>[2]</sup>。本研究旨在应用本实验室制备的 pcDNA-PRRSV-ORF5 基因疫苗以基因枪和肌肉注射途径免疫小鼠, 比较不同免疫途径对小鼠体液及细胞免疫的发生规律的影响, 为 PRRSV 基因疫苗的临床应用提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞、毒株、质粒及疫苗 Marc-145 细胞、猪繁殖与呼吸综合征病毒四川 2 株 (PRRSV-SC2), 由动物疫病与人类健康四川省重点实验室保存; pcDNA3.1 (+) 质粒为 Invitrogen 产品; pcDNA-PRRSV-ORF5 核酸疫苗, 含 ORF5 基因 (ORF5 编码的 GP5 蛋白是病毒的糖基化囊膜蛋白, 是

收稿日期: 2004-06-21

基金项目: 四川省生物技术项目 (01NG018-03); 国家科技攻关重大项目 (2004BA901A03); 四川省重点建设学科项目 (SZD0418)

作者简介: 陈希文 (1977-), 男, 四川宜宾人, 硕士生, 从事动物传染病病原与生物制品学研究

\* 通讯作者: 程安春, Tel: 0835-2882844; Fax: 0835-2882754;

E-mail: chenganchun@vip.163.com 或 Anchun@sicau.edu.cn

PRRSV 最重要的免疫原蛋白), 由本实验室制备。

1.1.2 试验小鼠 150 只, 为纯系 3 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 每只 18~22 g, 血清中 PRRS 抗体阴性(购自四川大学实验动物中心)。

1.1.3 主要试剂 培养基 RPMI1640 (GIBCO BRL 公司产品), 按说明书用双蒸水配制, 过滤除菌, 临用前加双抗。刀豆蛋白 A (ConA) (sigma 公司产品), 用 RPMI1640 培养液配成 1 mg/mL, 过滤除菌。MTT (sigma 公司产品), 临用前用 PBS 配成 5 mg/mL, 过滤除菌。淋巴细胞分层液(上海华精生物高科技有限公司产品), FITC 标记抗小鼠 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 单克隆抗体(批号: 119451, Bio Legend 公司产品), 兔抗鼠酶标抗体(上海生物工程公司)。

1.1.4 主要仪器 流式细胞仪(Flowrescence Activated Cell Sorter, FACS, ELITE ESP, Coulter 公司); 基因枪(PDS 1000/He System 型, BIO-RAD 产品); 高速冷冻离心机 (AllegraTM21R 型); 酶联免疫检测仪 (ELx800 型, Bio-tek 公司); 台式水平离心机 (BECKMAN COULTERTM 公司, 美国)。

## 1.2 方法

1.2.1 基因疫苗的免疫 将 150 只 BALB/c 小鼠随机分成 6 组, 25 只/组。其中, A 组基因枪注射 pcDNA-PRRSV-ORF5 6 μg/只; B 组肌肉注射 pcDNA-PRRSV-ORF5 200 μg/只; C 组肌肉注射 pcDNA-PRRSV-ORF5 100 μg/只; D 组肌肉注射 pcDNA-PRRSV-ORF5 50 μg/只; E 组肌肉注射空载体质粒 pcDNA3.1(+ ) 200 μg/只作为对照; F 组肌肉注射 PBS 200 μL/只作为对照。上述各组均分别免疫 2 次, 间隔 15 d。在免疫前, 给需要肌肉注射的 BALB/c 小鼠左右肢股四头肌按 100 μL/只注射 0.5% 盐酸普鲁卡因注射液进行预处理, 使肌肉处于再生状态, 以提高 DNA 的摄取率, 3 d 后在相同部位进行 DNA 免疫。

1.2.2 血样的采集 在第 1 次免疫后第 7、15、28、41、55、70 天各时间点从各组随机取 3 只小鼠用摘眼球法取抗凝血和凝血 2 份, 在第 85、100、115、130、150 天各时间点从各组随机取 3 只小鼠从尾静脉取凝血。抗凝血用于分离淋巴细胞作淋巴细胞转化试验和分析 T 细胞亚群 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 数量变化关系; 凝血分离血清置 -20 ℃ 冻存储用, 作间接 ELISA 检测血清抗体 IgG。

### 1.2.3 淋巴细胞转化试验

1.2.3.1 外周血淋巴细胞的分离: 参照文献[3]进行, 即取抗凝血 0.5 mL, 加 Hank's 液 0.5 mL, 混匀, 轻轻加在 1 mL 淋巴细胞分层液面上。2 000 r/min 离心 15 min。收集中间层淋巴细胞, 以 Hank's 液离心洗涤细胞沉淀 2 次, 再以完全 RPMI1640 培养基(含青霉素 200 U/mL, 链霉素 200 μg/mL, 小牛血清 10%, HEPES 20 mmol/L), 将细胞稀释成  $1 \times 10^7$  /mL, 制成单细胞悬液。

1.2.3.2 淋巴细胞的诱导培养: 参照文献[4]进行, 即取 100 μL 单细胞悬液于 96 孔培养板内, 其中 ConA 终浓度为 25 μg/mL, 并设阴性对照。每个样本设 3 个重复孔, 置 5% CO<sub>2</sub>, 37 ℃ 培养 68 h 后加入 MTT, 10 μL/孔 (5 mg/mL), 继续培养 4 h。最后每孔加 100 μL 10% SDS-0.04 mol/L HCl (即酸化的 SDS) 终止反应, 再继续作用 2 h。

1.2.3.3 检测及数据处理: 在酶联免疫检测仪上测定 OD<sub>490nm</sub> 的值, 所得数据用 SPSS10.0 和 Sigma-Plot 9.0 进行统计学处理。

### 1.2.4 T 淋巴细胞亚类数量的检测

1.2.4.1 外周血淋巴细胞的预处理: 取抗凝血 0.1 mL, 加 8 mL 红细胞裂解液, 室温作用 10 min, 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加 5 mL PBS, 混悬, 1 500 r/min 离心 10 min, 重复 2 次。

1.2.4.2 T 淋巴细胞的荧光标记 FITC 标记抗小鼠单克隆抗体 (0.1 mg/mL), 稀释 10 倍 (0.01 mg/mL)。每管取细胞悬液 0.5 mL, 分别稀释单抗 10 μL (0.1 μg), 4 ℃ 作用 1 h, 再加 PBS 缓冲液 1 mL 低速混匀, 离心 5 min, 离心力 200 g, 弃上清, 将管底细胞用 1 mL PBS 悬浮, 检测。

1.2.4.3 FACS 检测及数据处理: FACS 检测 3 000 个细胞, 所得数据用 SPSS10.0 和 SigmaPlot 9.0 进行统计学处理。

### 1.2.5 小鼠血清 IgG 的检测

1.2.5.1 ELISA 抗原的制备: 参照文献[5], 用单层 Marc-145 细胞, 增殖 PRRSV-SC2 分离株, 当细胞出现 70% 以上病变时收获病毒, 反复冻融 3 次, 10 000 r/min 离心 1 h, 取上清液经 50 000 r/min 离心 5 h, 沉淀用少许超纯水溶解后经蔗糖密度梯度离心纯化, 将制备好的纯化病毒抗原分装, -20 ℃ 保存备用。

1.2.5.2 小鼠血清抗体 IgG 检测: 采用间接 ELISA 法进行, 用 0.05 mol/L pH9.5 的 NaHCO<sub>3</sub> 缓冲液将 ELISA 抗原稀释至 5 μg/mL, 加于酶标板

上, 100  $\mu$ L/孔, 4  $^{\circ}$ C 过夜; 用 PBST (含 0.3% Tween20 和 0.5 mol/L NaCl 的 PBS, pH7.4) 洗板 3 次, 每次 3 min; 加入 100  $\mu$ L/孔的封闭液 (含 10% 马血清的 PBST) 于 37  $^{\circ}$ C 2 h; 再用 PBST 洗板后, 分别加入待检血清 100  $\mu$ L/孔, 37  $^{\circ}$ C 30min, 再洗涤; 加入兔抗鼠酶标抗体, 37  $^{\circ}$ C 30 min; 洗板后, 加入二氧基联苯胺 100  $\mu$ L/孔, 反应 10 min; 最后加入 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50  $\mu$ L 终止反应, 在酶联免疫检测仪上测定 OD<sub>490nm</sub> 的值。所得数据用 SPSS10.0 和 SigmaPlot 9.0 进行统计学处理。

## 2 结果

### 2.1 疫苗接种后对小鼠临床症状的影响

小鼠经两种途径接种 pcDNA-PRRSV-ORF5 基因疫苗后, 精神、食欲均未发现异常反应, 每次采样时对各组小鼠器官进行剖检, 未发现肉眼可见的形态学病变。

### 2.2 疫苗以不同途径免疫小鼠后小鼠外周血 T 淋巴细胞转化试验结果

以不同途径用 pcDNA-PRRSV-ORF5 基因疫苗免疫小鼠后, A、B、C、D 4 组的 OD<sub>490</sub> 值从第 7 天起就明显高于 E、F 组, 在第 41 天时达到最大值, 与 E、F 组比较差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 然后逐渐下降。A、B、C、D 4 组间无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 但在整个试验过程中, B 组略高于 A、C、D 组。E、F 两组一直比较平稳, E 组略高于 F 组 ( $P > 0.05$ ), 结果见图 1。

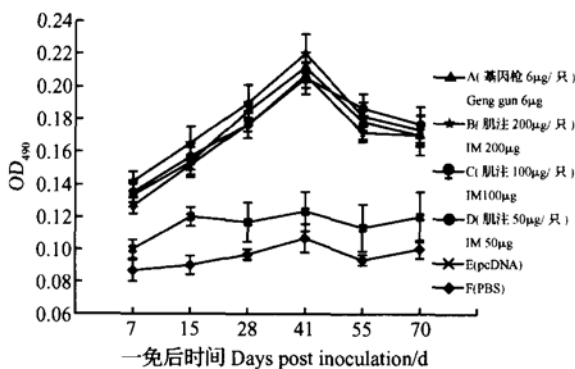


图 1 不同途径免疫小鼠后 T 淋巴细胞增殖试验  
Fig. 1 OD<sub>490</sub> value of T lymphocyte proliferation test after different inoculation routes in BALB/c mice

### 2.3 基因疫苗免疫小鼠后 T 淋巴细胞亚群数量的动态变化

#### 2.3.1 pcDNA-PRRSV-ORF5 基因疫苗以不同途径免疫小鼠后 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞数量的动态变化

A、B、C、D 4 组的外周血 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞数从免疫后第 7 天起就高于 E、F 组, A 组在免疫后第 28 天达最大值 ( $P < 0.01$ ), 然后下降。B、C、D 3 组外周血 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞数在免疫后第 55 天达最大值 ( $P < 0.01$ ), 然后下降。A、B、C、D 4 组间的外周血 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞数无明显规律, A 组在第 15~28 天高于 B、C、D 组 ( $P > 0.05$ ), B、C、D 组在第 55 天时又高于 A 组 ( $P < 0.05$ ), 结果见图 2。

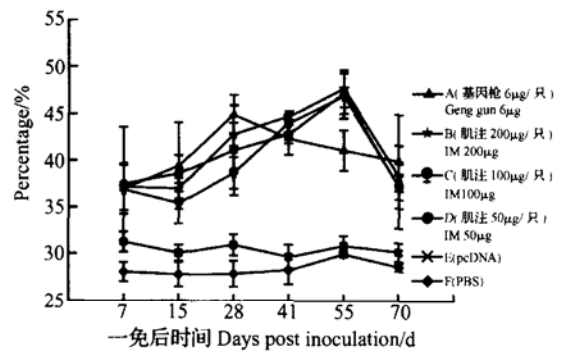


图 2 不同途径免疫小鼠后外周血 CD4<sup>+</sup> T 细胞动态变化  
Fig. 2 Influence of different inoculation routes on the CD4<sup>+</sup> in the peripheral blood of BALB/c mice

#### 2.3.2 pcDNA-PRRSV-ORF5 基因疫苗以不同途径免疫小鼠后 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞数量的动态变化

A、B、C、D、E、F 各组外周血 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞数从免疫后 7 d 起, 都逐渐下降, 在第 15 天时最低, 然后逐渐上升, 之后又有不同程度的下降。在第 41 天时免疫组 A、B、C、D 极显著高于对照 E、F 组 ( $P < 0.01$ ), 但之后又迅速和对照组靠近, 结果见图 3。

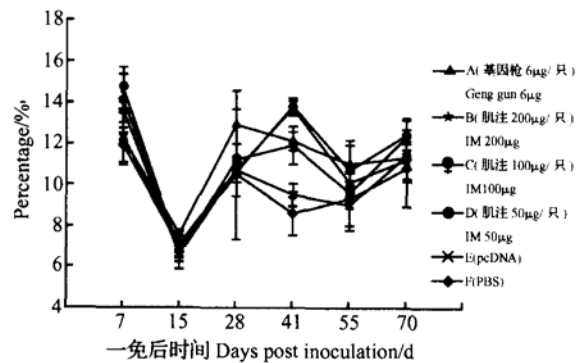


图 3 不同途径免疫小鼠后外周血 CD8<sup>+</sup> T 细胞动态变化

Fig. 3 Influence of different inoculation routes on the CD8<sup>+</sup> in the peripheral blood of BALB/c mice

## 2.4 疫苗以不同途径免疫小鼠后血清抗体 IgG 的动态变化

以不同途径用 pcDNA-PRRSV-ORF5 基因疫苗免疫小鼠后, 疫苗组 A、B、C、D 4 组的 OD<sub>490</sub> 值从第 7 天起, 就明显高于空载体和空白对照 E、F 组, 基因枪组 A 在第一次免疫后抗体水平就迅速上升, 在第 41 天时达到最大值 (1.472 0), 并且一直高于肌肉注射组, 差异显著 ( $P > 0.05$ ) 或极显著 ( $P < 0.01$ )。肌肉注射组 B、C、D 3 组在第二次免疫后抗体水平迅速上升, 并且 OD<sub>490</sub> 值一直是 B > C > D, 组间差异显著 ( $P > 0.05$ ) 或极显著 ( $P < 0.01$ ), 结果见图 4。

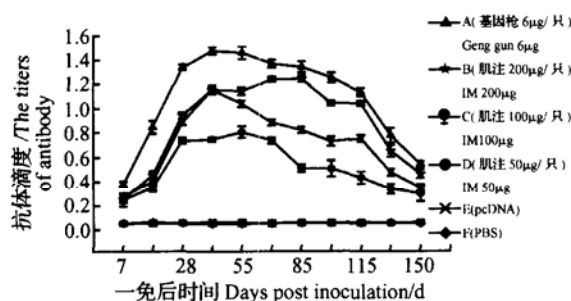


图 4 不同途径免疫小鼠后小鼠血清抗体的动态变化  
Fig. 4 Dynamic changes of antibody responses after different inoculation routes in BALB/c mice

## 3 讨论

### 3.1 PRRSV ORF5 基因疫苗

基因疫苗作为一种崭新的疫苗, 其优势已在多种动物试验中得以证实<sup>[6]</sup>, 基因疫苗的化学组成是双链环状质粒, 以不同途径接种动物后, 能在细胞内表达其编码蛋白, 并以自然的方式被加工修饰形成天然的空间结构, 从而保持最大的抗原性。PRRSV ORF5 基因编码的 GP5 蛋白是病毒的主要结构蛋白之一, 现已证实, GP5 蛋白是一种多功能蛋白, 参与细胞免疫与体液免疫, 可诱导细胞凋亡<sup>[7]</sup>。研究表明, GP5 蛋白单克隆抗体具有很强的病毒中和能力, PRRSV 感染的康复猪血清中针对 GP5 的抗体滴度与中和病毒的能力呈显著相关性<sup>[8]</sup>。Pirzadeh 等<sup>[9]</sup>以 PRRSV ORF5 真核表达质粒肌肉注射免疫小鼠和猪, 结果能够诱导小鼠和猪产生病毒特异性中和抗体, 并且中和抗体的产生比自然感染提前了 1 个月。本研究以四川分离株 (PRRSV-SC2) 的 ORF5 基因和含有 CMV 早期启动子的表达载体 pcDNA3.1(+ ) 构建的 pcDNA-PRRSV-ORF5 基因

疫苗, 经不同途径和不同免疫剂量免疫 BALB/c 小鼠后, 成功地诱导了体液免疫应答和细胞免疫应答。

### 3.2 pcDNA-PRRSV-ORF5 基因疫苗免疫小鼠后外周血 T 淋巴细胞转化效果

机体免疫应答的最终免疫效应与细胞水平的 T、B 淋巴细胞的免疫功能表现以及多种免疫活性细胞的相互作用密切相关。在抗原及有丝分裂原 ConA 和 LPS 的刺激下, 淋巴细胞转化为淋巴母细胞的效率是考察机体免疫功能状态的重要指标之一<sup>[10]</sup>, ConA 诱导 T 淋巴细胞增殖, LPS 诱导 B 淋巴细胞增殖。由图 1 可以看出, pcDNA-PRRSV-ORF5 基因疫苗免疫小鼠后, 在不同时间小鼠外周血淋巴细胞对 ConA 反应性增强, 说明基因疫苗诱发了机体细胞免疫反应。同时发现不带 ORF5 基因的空白 pcDNA3.1(+ ) 质粒免疫后, 小鼠的外周血淋巴细胞也对 ConA 的反应也有所增强。ConA 诱导 T 淋巴细胞增殖反应是非特异性的, 质粒 DNA 含有以非甲基化的 CpG 为核心的免疫刺激序列 (ISS), 能增强免疫效应, 因此, 基因疫苗所用的质粒本身具有诱导机体分泌细胞因子的免疫佐剂作用。

### 3.3 小鼠接种 pcDNA-PRRSV-ORF5 基因疫苗后 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞数的动态变化

CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞是免疫应答的中心细胞<sup>[11]</sup>。一般情况下, 病毒感染后由于病毒的复制可以导致 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞数量减少, 因此 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞的变化代表着疾病的进程, 并可以确定由病毒感染导致的免疫缺陷程度。外周血 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞的比例与患病猪疾病的严重性有直接的关系, CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞比例越小, 患病猪越有可能发生严重感染。因此, CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞数量的改变, 对于疾病的早期诊断、预后和寻求更为合理的免疫防治措施提供了新的强有力的依据<sup>[12]</sup>。本研究表明, 在接种 pcDNA-PRRSV-ORF5 基因疫苗后, 小鼠的 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞数都明显多于对照组, 各组分别在第 28 天和第 55 天差异极显著 ( $P < 0.01$ )。有报道 SPF 仔猪在接种 PRRSV 病毒后, CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞数显著下降, 持续至少 2 周, 本研究用 pcDNA-PRRSV-ORF5 基因疫苗免疫小鼠后 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞数直到第 70 天还明显高于对照组, 表明构建的 pcDNA-PRRSV-ORF5 基因疫苗没有出现 PRRSV 全病毒感染那样引起机体的免疫抑制, 而是能够诱导机体产生由 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞介导的免疫应答。

### 3.4 小鼠接种 pcDNA-PRRSV-ORF5 基因疫苗后 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞数的动态变化

CD8<sup>+</sup> 限制性细胞毒性 T 细胞 (CTL) 的主要功能为识别和杀伤病毒性感染细胞, 可识别与宿主细胞 MHC I 类分子相关的多肽抗原, 导致 CTL 活化、增殖并分化为具有杀伤能力的效应 CTL (TC)<sup>[13]</sup>。从图 3 可以看出, 小鼠在接种 pcDNA-PRRSV-ORF5 基因疫苗后, CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞数在第一次接种后逐渐下降, 到第 15 天降至最低, 对照组也在下降, 此期间试验组和对照组间无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 然后逐渐上升, 在第 41 天时, A、B、C、D 各试验组都超过对照组, 差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 然后试验组和对照组都逐渐下降, 到第 70 天时, 虽然各试验组都高于对照组, 但已经无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。以上结果表明, pcDNA-PRRSV-ORF5 基因疫苗接种小鼠后诱导机体产生了一定的由 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞介导的细胞免疫应答 (CTL), 但时间较短, 大约 2 周左右。同时, 从上述数据可以看出, 在接种后第 15 天时, 试验组和对照组的 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞数都有所下降, 可能是接种疫苗应激所致, 也表明机体可能在此时期防御能力稍有下降, 是容易遭受感染的时期, 同时也提示疫苗接种早期可能是动物 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞介导的细胞免疫功能低下期, 应加强防护。

CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞介导的免疫反应是基因疫苗发挥免疫保护作用的重要方面<sup>[14, 15]</sup>, 从本研究的 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞数变化情况看, 各免疫组 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞数从免疫后的第 7 天到第 70 天都明显高于对照组, 而 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞数仅在免疫后第 41 天左右和对照组的差异显著, 并且维持的时间较短, 表明 pcDNA-PRRSV-ORF5 基因疫苗接种后可能主要为 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞介导的细胞免疫。

### 3.5 小鼠接种 pcDNA-PRRSV-ORF5 基因疫苗后小鼠血清抗体 IgG 的动态变化

基因疫苗经不同途径和不同免疫剂量免疫 BALB/c 小鼠后, 都能诱导小鼠产生病毒特异性抗体, 各疫苗免疫组与空载体和空白对照组相比, 差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 其中基因枪免疫组诱导产生抗体的速度最快, 并且抗体水平最高, 表明基因枪免疫更能诱导抗体的产生, 小剂量肌肉注射组产生的抗体水平最低, 且肌肉注射基因疫苗诱导的体液免疫具有一定的剂量依赖性, 这与 Alexia 和 Ray 等<sup>[16, 17]</sup>

报道的结果基本一致。基因枪免疫法可诱导很强的免疫应答可能与以下几种因素有关系: (1) 基因枪的免疫方法与其他免疫途径不同, 它利用高压, 将包裹金属颗粒的基因疫苗直接打入细胞中, 与肌肉注射法相比, 没有被机体内环境核酸酶降解的过程, 减少了基因疫苗的损失。(2) 从皮肤组织的结构特点看, 皮肤细胞具备了很多有利于诱导免疫反应的特点。首先, 皮肤细胞附近有丰富的树突状细胞和巨噬细胞, 可有效完成抗原递呈, 并激发免疫应答; 其次, 皮肤朗氏细胞可将抗原从皮肤运输到附近淋巴细胞, 有利于免疫应答的迅速产生; 第三, 皮肤组织细胞中含有丰富的表达 MHC 分子的 Th 细胞, 可产生多种细胞因子并诱导免疫系统的激活。皮肤组织的这些特征可能保证了即使在剂量很低的情况下, 基因疫苗也能有效激发机体的免疫应答。与皮肤细胞相比, 肌细胞只能表达低水平的 MHC II 类细胞, 抗原递呈能力相对远不如皮肤细胞。基因枪传送基因疫苗的优点和皮肤细胞强大的免疫诱导功能可能是本研究中基因枪免疫诱导产生高水平抗体的一个原因。

### 3.6 免疫途径对基因疫苗接种免疫效果的影响

DNA 疫苗的免疫途径有多种, 如肌肉、黏膜、静脉及基因枪等。据研究, 肌肉注射能诱导 Th1 和 Th2 辅助的免疫反应, 是一种比较好的免疫方法。从本研究结果看, 基因枪和肌肉注射法对细胞免疫的影响差异不显著, 但在体液免疫方面, 基因枪法优于肌肉注射法。与黄祖瑚等<sup>[18]</sup>的报道相符。Nathalie 等<sup>[19]</sup>用犬瘟热病毒的核酸疫苗免疫 BALB/c 小鼠发现, 肌肉注射免疫主要诱导 Th1 类细胞免疫应答, 而基因枪主要诱导以 Th2 为主的免疫应答。Feltquate 等<sup>[20]</sup>的试验也得到同样的结果, 他们用流感病毒红血球凝集素 (H1) 核酸疫苗通过基因枪和肌肉注射免疫小鼠发现, 基因枪免疫明显诱导了以 Th2 为主的抗 H1 IgG1 抗体, 而肌肉注射产生了以 Th1 为主的抗 H1 IgG2a 抗体。CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞主要是辅助性 T 淋巴细胞 (Th) 细胞, Th 可分为 Th0、Th1、Th2, 受到抗原刺激后 Th0 向 Th1 或 Th2 分化, Th1 细胞与细胞毒性 T 细胞和迟发型超敏反应细胞 (DTH) 增殖、分化、成熟有关, 因此 Th1 细胞可促进细胞介导的免疫应答。Th2 细胞则与 B 淋巴细胞增殖、成熟和促进抗体生成有关, 故可增强抗体介导的免疫应答。基因枪免疫法可能是诱导 Th 细胞向 Th2 分化, 从而诱导较高的

体液免疫应答。

在本研究中, 基因枪法免疫时所用基因疫苗量仅为肌肉注射法用量的 1/8~ 1/33, 可见基因枪法是一种高效免疫方法, 但基因枪法免疫需有特殊装置(如基因枪等), 制备子弹时所需的金颗粒价格也比较昂贵。肌肉注射法简便易行, 但免疫剂量较大, 因此, 在选择免疫方法时应视具体情况而定。总之, 本研究结果表明, 不同途径和不同剂量的 pcDNA-PRRSV-ORF5 基因疫苗均可诱导小鼠产生良好的体液免疫和细胞免疫应答, 基因枪免疫法更能诱导病毒特异性抗体的产生, 是一种很有潜力的新途径。同时本研究在免疫途径和免疫剂量方面的比较和探讨为研制 PRRSV ORF5 基因疫苗以及其临床应用提供了有意义的基础数据和资料。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Goyal S M. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus[ J]. J Vet Diagn Invest, 1993, 5: 656~ 664.
- [ 2 ] Yankauckas M A, Morrow J E, Parker S E, et al. Long-term anti-nucleoprotein cellular and humoral immunity is induced by intramuscular injection of plasmid DNA containing NP gene[ J]. DNA Cell Biol, 1993, 12: 771~ 776.
- [ 3 ] 金伯泉. 细胞和分子免疫学实验技术[ M]. 西安: 第四军医大学出版社, 2002. 61~ 65.
- [ 4 ] 刘 民, 马 华, 李柏青, 等. 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 (3): 146~ 149.
- [ 5 ] Takikawa N, Kobayashi S, Ide S, et al. Detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome ( PRRS) virus in swine sera by enzyme-linked immunosorbent assay[ J]. J Vet Med Sci, 1996, 58(4): 355~ 357.
- [ 6 ] 刘海鹏, 赵玉军. 核酸疫苗的研究和应用[ J]. 中国兽医杂志, 2001, 37(9): 34~ 37.
- [ 7 ] Aurora F, Paloma S, Jose M, et al. Characterization of regions in the GP5 protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus required to induce apoptotic cell death[ J]. Virus Research, 2002, 83 (1-2): 103~ 118.
- [ 8 ] Gonin P, Pirzadeh B, Gagnon C A, et al. Seroneutralization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus correlates with antibody responses to the GP5 major envelope glycoprotein[ J]. J Vet Diagn Invest, 1999, 11(1): 20~ 26.
- [ 9 ] Pirzadeh B, Dea S. Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[ J]. J Gen Virol, 1998, 79: 989~ 999.
- [ 10 ] 刘玉斌. 动物免疫学实验技术[ M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1989. 226~ 330.
- [ 11 ] 龚非力. 医学免疫学[ M]. 北京: 科学出版社, 2000. 6.
- [ 12 ] Shimizu M, Yanada S, Kawashima K, et al. Changes of lymphocyte subpopulations in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome( PRRS) virus[ J]. Vet Immunol Immunopathol, 1996, 50: 19~ 27.
- [ 13 ] Coben J. Naked DNA points way to vaccines[ J]. Science, 1993, 259: 1 691~ 1 697.
- [ 14 ] Doolan D L, Sedegah M, Hedstrom R C, et al. Circumventing genetic restriction of protection against malaria with multigene DNA immunization: CD8<sup>+</sup> T cell, interferon  $\lambda$  and nitric oxide dependent immunity [ J]. Journal of Experimental Medicine, 1996, 183: 1 739~ 1 746.
- [ 15 ] Manickan E, Rouse R, Yu Z, et al. Genetic immunization against herpes simplex virus. Protection is mediated by CD4<sup>+</sup> T lymphocytes[ J]. Journal of Immunology, 1995, 155: 259~ 265.
- [ 16 ] Alexia A B, David F, Barbara A, et al. Immune responses induced by gene gun or intramuscular injection of DNA vaccines that express immunogenic regions of the serine repeat antigen from plasmodium falciparum[ J]. Infection and Immunity, 1999, 67(10): 5 163~ 5 169.
- [ 17 ] Ray N B, Ewalt L C, Lodmell D L, et al. Nanogram quantities of plasmid DNA encoding the rabies virus glycoprotein protect mice against lethal rabies infection[ J]. Vaccine, 1997, 15(8): 892~ 895.
- [ 18 ] 黄祖瑚, 卢 山, 刘 宁, 等. 乙型肝炎病毒核心抗原基因疫苗对小鼠的体液和细胞免疫原性观察[ J]. 中华医学杂志, 1999, 79(6): 456~ 459.
- [ 19 ] Nathalie S, Alicia C, Agnes V, et al. Canine distemper virus DNA vaccination induces humoral and cellular immunity and protects against a lethal intracerebral challenge[ J]. J Virol, 1998, 72(11): 8 472~ 8 476.
- [ 20 ] 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): 2 278~ 2 284.



### Comparative Studies on the Humoral and Cellular Immune Responses of BALB/ c Mice Immunized with pcDNA-PRRSV-ORF5 DNA Vaccine by Routes of Gene Gun Bombardment and Intramuscular Injection

CHEN Xīwen<sup>1,2,3</sup>, CHENG An-chun<sup>1,2\*</sup>, WANG Ming-shu<sup>1,2</sup>, LIU Fei<sup>2</sup>,  
XINI Nīgen<sup>1</sup>, DOU Wen-bo<sup>1,2</sup>, LIU Wu-mei<sup>1,2</sup>, LI Xu-ei<sup>1,2</sup>, ZHANG Ping-ying<sup>1,2</sup>  
(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China; 2. Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Yaan 625014, China; 3. Key Laboratory for Molecular Biology and Biopharmaceuticals, Institute of Applied Animal Technology, Mianyang Normal University, Mianyang, Sichuan 621000, China)

**Abstract:** BALB/c mice were immunized with pcDNA-PRRSV-ORF5 DNA vaccine by different routes of gene gun bombardment and intramuscular injection, with PBS and pcDNA3.1(+) as controls. Fluorescence activated cell sorter(FACS) was used to detect the number of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. T lymphocyte proliferation test(MTT) and indirect ELISA methods were employed respectively to detect the proliferation of peripheral T lymphocyte and anti-PRRSV antibody. Peripheral T lymphocytes responses to ConA of the experiment group and the control group were significantly different ( $P < 0.01$ ). In contrast with the control group, the number of CD4<sup>+</sup> T lymphocyte 7 days after vaccination and CD8<sup>+</sup> T lymphocyte 28 days after vaccination of the experiment group were significantly higher. The titers of specific IgG of the experiment group were higher than that of the control group. The results demonstrated that pcDNA-PRRSV-ORF5 DNA vaccine could induce good humoral and cellular immune response in mice. The titers of specific IgG of the group vaccinated by gene gun bombardment were higher than that by intramuscular injection.

**Key words:** porcine reproductive and respiratory syndrome virus ORF5 DNA vaccine; humoral immune response; cellular immune response; mice

\* Corresponding author

## 会 讯

1. 第8届“遗传学在家畜生产中的应用”世界大会将于2006年8月13~18日在巴西MG Belo Horizonte召开。联系方式及网址如下:

Fax: + 55-33-3494-6025

E-mail: secretariat@wcalp8.org.br

Http://www.wcalp8.org.br

2. 2005年动物废弃物管理专题研讨会将于2005年10月5~7日在美国北卡罗来那的Rayleigh召开。联系人: Gerald B. Havenstein 博士(北卡罗来那州立大学)

Tel: + 1-919-515-5555

Fax: + 1-919-513-1762

E-mail: Gerald.Havenstein@ncsu.edu

Http://www.cals.ncsu.edu/waste\_mgt/.

3. 第6届主题为“保护动物遗传资源——动物所有者和看守者的权利”的珍稀物种全球大会将于2005年10月10~14日在南非Bloemfontien召开。

联系人: Antionette Kotzé 博士

E-mail: elsabe@idpil.agric.za

Http://www.rbi.it/bloemfontien.htm

# 犬新孢子虫 NcSRS2 基因真核表达质粒的构建

赵占中, 刘群\*, 汪明

(中国农业大学动物医学院, 北京 100094)

**摘要:** 根据犬新孢子虫 NcSRS2 基因序列, 设计了 1 对含有 Kozak 序列 *Pst* I 和 *Xba* I 酶切位点的引物, 以含有 NcSRS2 基因的质粒 P43 为模板, 经 PCR 扩增获得 NcSRS2 ORF 基因片段, 用 *Pst* I 和 *Xba* I 双酶切该片段, 回收得到含有以上 2 个酶切位点黏端的 NcSRS2 ORF 基因, 将此基因片段克隆至相同酶切回收后的 pcDNA3.1(+ ) 真核表达载体中, 获得重组质粒 pcNCSRS2。经 PCR 鉴定、限制性内切酶分析和克隆片段序列测定、比较, 证实了重组质粒的正确性。

**关键词:** 犬新孢子虫; 聚合酶链反应; NcSRS2 基因; 真核表达载体 pcDNA3.1(+ )

**中图分类号:** S852.72<sup>+</sup> 3

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0366-6964(2005)08-0819-04

犬新孢子虫是多种哺乳动物共患的一种寄生原虫, 属于顶复门、孢子虫纲、球虫亚纲、真球虫目。Dubey 等<sup>[1]</sup>首次从一只下肢瘫痪的犬体内分离到该虫体, 并且将其命名为犬新孢子虫 (*Neospora caninum*)。犬新孢子虫是一种细胞内专性寄生虫, 其中间宿主的范围很广, 能寄生于多种哺乳动物的多种有核细胞内, 在中间宿主体内呈现两种形态: 速殖子和包囊形式的缓殖子。*N. caninum* 的生活史尚未完全清楚, McAllister 等<sup>[2]</sup>和 Lindsay 等<sup>[3]</sup>研究证明犬可以作为新孢子虫的终末宿主。其生活史过程中出现的几种形态和某些生物学特征与粪地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 极为相似, 因此它的分类地位在很长一段时间里一直是人们讨论的问题, 现在它的分类地位已经得到公认。犬新孢子虫对多种哺乳动物都可以造成危害, 主要引起母畜流产或死胎, 以及新生动物的运动障碍和神经系统疾病, 其中对牛的危害最为严重, 牛新孢子虫病(病原为犬新孢子虫)已经在多个国家和地区暴发和流行, 给养牛业造成了相当严重的经济损失<sup>[4]</sup>。

细胞内寄生原虫的表面蛋白主要是用来介导虫体黏附和入侵宿主细胞。早期研究表明犬新孢子虫与宿主细胞膜的物理性接触是由一种受体-配体系

统介导的, 该系统极有可能建立在蛋白-蛋白相互作用的基础上<sup>[5]</sup>。近年来, 在犬新孢子虫分子生物学研究中发现了一些有价值的蛋白分子, 其中 NcSRS2 基因编码的犬新孢子虫表面蛋白 NcSRS2 可在致密颗粒和棒状体内以及速殖子的表面发现<sup>[5-8]</sup>, 它可以介导虫体黏附和入侵宿主细胞<sup>[7-9]</sup>。研究发现它是 ELISA 试验中一种有效的抗原成分<sup>[10,11]</sup>和研制新孢子虫疫苗的一种潜在候选抗原<sup>[12,13]</sup>。本研究中利用真核表达载体 pcDNA3.1(+ ) 可以在哺乳动物细胞中表达的特性, 构建了新孢子虫 NcSRS2 基因真核表达质粒, 目的在于将体外表达的蛋白作为诊断抗原或免疫原, 为进一步建立特异性新孢子虫病 ELISA 诊断试剂盒、研制新孢子虫抗 NcSRS2 单克隆抗体以及 NcSRS2 基因疫苗的探索研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒和载体

含有 NcSRS2 基因的质粒 P43 由日本动物原虫病研究所惠赠; 真核表达载体 pcDNA3.1(+ ) 购自 Invitrogen 公司。

### 1.2 菌株及细胞系

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由中国农业大学动物医学院寄生虫学实验室保存, 感受态细胞为本实验室制备。

### 1.3 工具酶与主要试剂

核酸内切酶 *Pst* I、*Xba* I、T<sub>4</sub>DNA 连接酶、Taq<sup>TM</sup> DNA 聚合酶、dNTP 购自宝生物工程(大连)有限公司; DNA 快速纯化回收试剂盒、PCR 产物回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自北京博大泰克生物

收稿日期: 2004-05-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371080); 北京市自然科学基金资助项目(6042016)

作者简介: 赵占中(1979-), 男, 山东聊城人, 硕士生, 主要从事兽医寄生虫学研究

\* 通讯作者: 刘群, 女, 教授, 博士生导师, 主要从事兽医寄生虫学研究和教学工作, E-mail: qunliu@cau.edu.cn, Tel: 010-62732807