维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)03－0308－03

轮状病毒 DNA 疫苗经不同途径接种诱导体内免疫应答研究

张 静[1], 王宁遂[2], 邓 兵[2], 朱 静[2]

(1.重庆医科大学儿科学院心内科;2.重庆医科大学儿科研究所,重庆 400014)

【摘 要】目的:通过研究不同途径接种轮状病毒 DNA 疫苗所诱导的体内免疫应答,寻找其适合的免疫途径。方法:轮状病毒基因疫苗 pcDNA1/VP7 经肌肉注射及鼻粘膜两种途径免疫 BALB/c 小鼠,利用 ELISA 方法对其诱导产生的体液免疫应答进行测定。结果:经肌肉注射及鼻粘膜两种途径接种轮状病毒 DNA 疫苗后,均在 BALB/c 小鼠体内诱导产生了病毒特异性 IgG 增高($P<0.05$),而病毒特异性 IgA 与对照组相比无显著性差异。结论:肌肉注射及鼻粘膜两种途径均能作为轮状病毒 DNA 疫苗的候选接种途径。

【关键词】轮状病毒;DNA 疫苗;粘膜免疫

【中国图书分类法分类号】R373;R364.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－10－28

Induction of immune responses against rotavirus by intramuscular and intranasal immunization with rotavirus DNA vaccine

ZHANG Jing, et al

(*Department of Cardiology, College of Pediatrics, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To search for the efficient immune routes for rotavirus DNA vaccine by evaluating efficacy in inducing immune responses to rotavirus. *Methods*: In this study BALB/c mice were immunized by intramuscular and intranasal routes with rotavirus DNA vaccine, pcDNA 1/VP7, then rotavirus specific systemic immunity was measured. *Results*: Serum rotavirus specific IgG but not IgA titers of mice immunized by both routes were significantly higher than that of the unimmunized controls. *Conclusion*: Both intramuscular and intranasal routes are candidates for rotavirus DNA vaccine.

【Key words】Rotavirus; DNA vaccine; Mucosal immunization

轮状病毒是引起全世界婴幼儿严重胃肠炎的主要病原,估计全球每年发生 140000000 病例,导致发展中国家 600,000 到 870,000 例死亡[1]。居全球儿童死亡病因的第二位。在我国的发病率高达 30%～40%,严重威胁我国婴幼儿身体健康和生存质量,同时造成社会经济和医疗资源的巨大损失。由于目前尚无特效治疗方法,且改善卫生,水源等条件对控制轮状病毒流行收效甚微,故疫苗被认为是控制轮状病毒感染的最大希望[2]。近年来,DNA 疫苗的出现,为解决这一难题提供了新的契机。本文对轮状病毒 DNA 疫苗经不同免疫途径诱导体内产生的免疫应答进行了研究,报告如下。

1 材料与方法

作者介绍:张 静(1973－),女,讲师,博士,
主要研究方向:轮状病毒感染的预防。

1.1 实验动物

BALB/c 小鼠,健康雌性,6～8 周龄,体重 18～20g,随机分组,由重庆医科大学动物实验中心提供。

1.2 质粒 pcDNA1/EDIM7

由 Anthony HC. Choi(Division of Infectious Diseases, Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio OH, USA)惠赠[3],根据《分子克隆》操作规程提取、纯化质粒 DNA。

1.3 动物免疫

BALB/c 小鼠随机分组,4～6 只/组,戊巴比妥钠麻醉(30～45mg/kg)后,分别免疫(0,2,4 周各免疫一次)。

第 1 组:质粒 pcDNA1/VP7(50μg)＋鼻内免疫(i.n)

第 2 组:质粒 pcDNA1/VP7(100μg)＋肌肉注射(i.m)

第 3 组:空质粒载体(50μg)＋鼻内免疫(i.n)

阴性对照组:小鼠未经免疫

1.4 血清 IgG, IgA 检测

小鼠在第二次加强免疫完成后四周,取尾静脉血,1000～2000r/min 离心,吸取血清,置－20℃保存待测。

包被:轮状病毒抗原用碳酸缓冲液(pH9.6)稀释,包被

维普资讯 http://www.cqvip.com

96 孔酶标板,4℃湿盒内过夜→PBS－T(pH7.4)洗板四次→封闭:PBS－T－B液 37℃孵育 1h→洗板 4 次→加样:血清样品用 PBS－T－B液稀释 20 倍后加入酶标板中(双复孔),37℃孵育 1h—洗板 4 次→二抗:Biotin 标记的山羊抗小鼠 IgG,IgA(Southern Biotechnology Associates, Inc.)以 1∶5000 稀释后加入酶标板中,37℃孵育 2h→洗板 4 次→HRP－streptavdin(Vector):用 PBS－T－B稀释至 3μg/ml 加入酶标板中,37℃孵育 1h→洗板 4 次→显色反应:加入 TBM 底物显色液(Sigma),37℃孵育 15～30min→终止反应:加入终止液(0.5M H_2SO_4)→OD 值检测:全自动酶标仪(Tecan A－5082 Austria)在 450nm 波长下测定 A_{450}。

1.5 统计学处理

血清轮状病毒特异性 IgG,IgA 滴度用各自 A_{450} $\bar{x} \pm s$ 表示,各组均数与对照比较采用完全随机设计方差分析(SAS 6.12),$P<0.05$ 有统计学意义。

2 结 果

2.1 血清轮状病毒特异性 IgG 滴度测定

小鼠免疫后 4 周,质粒 DNA 肌注组和滴鼻组血清轮状病毒特异性 IgG 均较阴性对照组有明显增高($P<0.05$),而空质粒载体滴鼻组血清轮状病毒特异性 IgG 与阴性对照组相比无显著性差异($P>0.05$)。见表 1,图 1。

2.2 血清轮状病毒特异性 IgA 滴度测定

质粒 DNA 无论经鼻内还是肌注接种小鼠后,均未能诱导血清轮状病毒特异性 IgA 水平的升高(见表 2)。

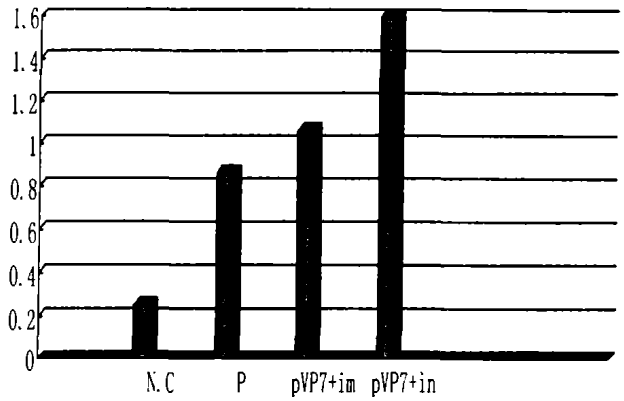


图 1 小鼠免疫后 4 周血清特异性抗轮状病毒 IgG 滴度(A_{450})直方图

表 1 小鼠免疫后 4 周血清特异性抗轮状病毒 IgG 滴度(A_{450})

免疫原	免疫剂量	免疫途径	血清 IgG 光密度值($\bar{x} \pm s$)	P
pcDNA1/VP7	100μg	i.m	1.062±0.243*	<0.05
pcDNA1/VP7	50μg	i.n	1.594±0.693*	<0.05
pcDNA1	50μg	i.n	0.861±0.368*	>0.05
Negative control			0.246±0.092	

注:* 与 negative control(阴性对照组)比较 $P<0.05$

表 2 小鼠免疫后 4 周血清特异性抗轮状病毒 IgA 滴度(A_{450})

免疫原	免疫剂量	免疫途径	血清 IgG 光密度值($\bar{x} \pm s$)	P
pcDNA1/VP7	100μg	i.m	0.297±0.085	>0.05
pcDNA1/VP7	50μg	i.n	0.269±0.076	>0.05
pcDNA1	50μg	i.n	0.286±0.097	>0.05
Negative control			0.158±0.109	

注:* 与阴性对照组比较 $P<0.05$

3 讨 论

轮状病毒腹泻是全球重大的医学和社会经济问题,WHO 腹泻病疫苗指导委员会强调将轮状病毒疫苗的研制作为其第一重点。

针对轮状病毒可能的免疫保护机制,研究者们开发了一系列疫苗,包括灭活疫苗,减毒活疫苗,基因工程疫苗等。然而,由于以上疫苗制备工艺复杂,成本较高,免疫效力不肯定,故需研究更加完善的疫苗。DNA 疫苗由于具有能够有效地诱导全面免疫反应,性质稳定、操作性强、可多价免疫,成本低廉等特点,引起了研究者的极大兴趣。此外,Ulmer 等发现小鼠肌肉注射编码甲型流感病毒核蛋白(NP)的质粒载体后,可有效保护小鼠抵抗另一亚型流感病毒的攻击[4],提示 DNA 疫苗还具有广泛的交叉保护作用,这对于那些流行型别经常发生变化的病原体的预防具有极其重要的意义。

DNA 疫苗可经多种途径进行免疫,Fynan EF[5]等在对其免疫途径进行比较的研究中发现,在各种

维普资讯 http://www.cqvip.com

免疫途径中,就所需免疫的 DNA 量及所产生的免疫应答而言,基因枪可谓是最有效的途径,然而需要特殊仪器,成本较高,不利于推广。目前 DNA 疫苗最常采用的接种途径是经肌肉注射。但其免疫机理尚不清楚。有学者认为肌细胞参与了抗原提呈[6],另一部分学者则认为抗原提呈由专职提呈细胞完成,而无肌细胞的介入[7]。综合最近的研究结果提示其机制可能为 DNA 疫苗在肌细胞内表达抗原,再被分泌或自被损伤的细胞释放到组织间隙,进而被抗原提呈细胞(APC)捕获,加工,提呈给 T 细胞,诱导免疫应答的产生。由于肌细胞一般不表达 MHCII 分子及激活 T 细胞所必需的一些共刺激分子,因此不能进行抗原提呈,抗原必须从肌细胞转移至专职 APC 才能刺激 T 细胞的增殖,分化[8]。但肌细胞可能作为抗原储存库,保持长期持续低量抗原刺激,有利于免疫应答的放大和免疫记忆的形成。除肌细胞内表达抗原外,APC 也可能直接摄取质粒 DNA,表达抗原,以内源性抗原的加工,提呈方式诱导细胞和体液免疫应答。其中,树突状细胞(dendritic cell,DC)可能是参与 DNA 免疫最重要的抗原提呈细胞[9]。

随着对免疫研究的深入,人们逐渐认识到粘膜免疫的重要性,特别对防御粘膜局部感染及起源于粘膜的全身感染尤为重要。Sasaki S et al[10] 在对 HIV DNA 疫苗鼻内免疫的研究中发现此途径不仅能够诱导体液免疫反应,而且能够很好地诱导细胞免疫反应及粘膜免疫反应,研究结果显示呼吸道、胃肠道及生殖道均产生了 HIV 特异性分泌型 IgA (SIgA)。引起这一结果的机制可能是由于共同膜免疫系统的存在,在鼻部淋巴组织中被转染了 DNA 的抗原递呈细胞通过淋巴管和/或血流播散到远处的淋巴组织如胃肠道及脾脏诱导产生免疫应答。由于鼻相关淋巴组织(NALT)具有生理环境温和,抗原摄取量大,诱发免疫反应阈值低等优点,使鼻粘膜成为最有前途的粘膜免疫途径之一。本研究中,轮状病毒 DNA 疫苗经鼻粘膜接种 BALB/c 小鼠,诱导产生了血清特异性 IgG 增高。而鼻粘膜表面在结构上具有与小肠系膜下集合淋巴结(Peyer's patches)组织学上相似的淋巴组织,其是否能够诱导产生肠道特异性粘膜免疫应答(特异性 SIgA)还有待于进一步研究。

虽然目前关于轮状病毒的免疫机制还不十分清楚,但已有的众多研究提示,轮状病毒特异性体液免疫对轮状病毒感染提供免疫保护中起重要作用[11]。本研究选择肌肉注射及鼻内接种 DNA 疫苗,均诱导产生病毒特异性血清 IgG 升高,提示以上两种途径均能作为轮状病毒 DNA 疫苗的侯选接种途径。

参 考 文 献

[1] Green KY, Sears JF, Taniguchi K, et al. Prediction of human rotavirus serotype by nucleotide sequence analysis of the VP7 protein gene[J]. J Virol, 1988; 62(5): 1819 - 1823.

[2] Kirkwood CD, Gentsch JR, Hoshino Y, et al. Genetic and Antigenic Characterization of a Serotype P[6]G9 Human Rotavirus Strain Isolated in the United States[J]. Virology, 1999; 256(1): 45 - 53.

[3] Choi AH, Basu M, Rea MN, et al. Particle - bombardment - mediated DNA vaccination with rotavirus VP4 or VP7 induces high levels of serum rotavirus IgG but fails to protect mice against challenge[J]. Virology, 1998; 250(1): 230 - 240.

[4] Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein[J]. Science, 1993; 259(5102): 1745 - 1749.

[5] Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, et al. DNA vaccine: protection immunizations by parental, mucosal, and gene - gun inoculations[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993; 90(24): 11478 - 11482.

[6] Conry KM, Widera G, LoBuglio AF, et al. Selected strategies to augment polynucleotide immunization[J]. Gene Ther, 1996; 273(5): 352 - 354.

[7] Hohlfeld R, Engel AG. The immunobiology of muscle [J]. Immun Today, 1994; 15(6): 269 - 274.

[8] Doe B, Selby M, Barnett S, et al. Induction ef cytotoxic T lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone marrow - derived cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996; 93(16): 8578 - 8583.

[9] Klinman DM, SeEchler JMG, Conover J, et al. Contribution of cells at the site of DNA vaccination to the generation of antigen, specific immunity and memory[J]. J Immunol, 1998; 160(5): 2388 - 2392.

[10] Sasaki S, Hamajima K, Fukushima J, et al. Comparison of intranasal and intramuscular immunization against human immunodeficiency virus type 1 with a DNA - monophosphoryl lipid A adjuvant vaccine[J]. Infect Immun, 1998; 66(2): 823 - 826.

[11] Jiang BM, Gentsch JR, and Glass RI. The role of serum antibodies in the protection against rotavirus disease: an overview[J]. Clin Infect Dis, 2002; 34: 1351 - 1361.