

猪 IFN- γ 和 IL-4 重组质粒对口蹄疫疫苗的 免疫佐剂效应研究

蒙学莲, 房永祥, 窦永喜, 陈国华, 景志忠*, 才学鹏*
(中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室
甘肃省动物寄生虫病重点实验室, 兰州 730046)

摘要: 为了研究猪 IFN- γ 和 IL-4 对疫苗的免疫佐剂效应, 用 pcDNA3.1/IFN- γ 和 pcDNA3.1/IL-4 的重组质粒与口蹄疫双价疫苗配伍免疫小鼠, 检测小鼠抗口蹄疫抗体水平和 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比值的动态变化, 观察其免疫佐剂效应。结果表明 pcDNA3.1/IFN- γ 和 pcDNA3.1/IL-4 重组质粒都能显著提高小鼠抗口蹄疫抗体水平 ($P < 0.01$), 其中 pcDNA3.1/IFN- γ 提高亚洲 I 型 FMD 抗体水平的佐剂效应较 pcDNA3.1/IL-4 的显著 ($P < 0.01$), 而 pcDNA3.1/IL-4 提高 O 型 FMD 抗体水平的佐剂效应显著高于 pcDNA3.1/IFN- γ ($P < 0.01$), pcDNA3.1 也显示出了一定的佐剂效应; 免疫后不同时间 pcDNA3.1/IFN- γ 和 pcDNA3.1/IL-4 组 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比值显著高于其他组 ($P < 0.01$), 且第 21 天与第 7、45 天的差异极显著 ($P < 0.01$)。

关键词: 重组质粒; 佐剂效应; CD4⁺/CD8⁺ T 细胞; 口蹄疫

中图分类号: S855.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)09-1240-05

Immunological Adjuvant Effect of Recombinant Porcine IFN- γ and IL-4 Plasmid on Foot-and-mouth Disease Vaccine

MENG Xue-lian, FANG Yong-xiang, DOU Yong-xi,
CHEN Guo-hua, JING Zhi-zhong*, CAI Xue-peng*

(Key Laboratory of Veterinary Parasitology of Gansu Province, State Key Laboratory
of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute,
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

Abstract: In order to certify the immunological adjuvant effect of recombinant pcDNA3.1/IFN- γ and pcDNA3.1/IL-4 plasmid, we investigated the changes of antibody levels and the CD4⁺/CD8⁺ relative value induced by a vaccine against foot-and-mouth disease and the mentioned adjuvants. The results showed that the recombinant plasmids significantly increased the level of antibody against foot-and-mouth disease ($P < 0.01$), and the adjuvant effect of pcDNA3.1/IFN- γ was much higher than that of pcDNA3.1/IL-4 concerning the antibody level of Serotype Asia I ($P < 0.01$), whereas the adjuvant effect of pcDNA3.1/IL-4 was more obvious than that of pcDNA3.1/IFN- γ concerning the antibody level of Serotype O ($P < 0.01$). Relative values of CD4⁺/CD8⁺ in groups pcDNA3.1/IFN- γ and pcDNA3.1/IL-4 were statistically significantly higher than that of the other groups ($P < 0.01$), and that on 21 d post immunization was statistically significantly higher than both on 7 and 45 d ($P < 0.01$).

Key words: recombinant plasmid; adjuvant effect; CD4⁺/CD8⁺; foot-and-mouth disease

收稿日期: 2007-10-15

基金项目: 863 项目(2006AA10A203); “十一五”国家支撑子课题(2006BAD31B03)

作者简介: 蒙学莲(1975-), 女, 甘肃省靖远县人, 助理研究员, 博士生, 主要从事分子生物学与免疫学研究

* 通讯作者: 景志忠, 才学鹏

疫苗接种一直是人类预防和控制传染性疫病的主要手段,但是某些疫苗免疫的效果一直不太理想,研究和开发安全高效的疫苗佐剂来增强疫苗效果已成为当前亟待解决的问题。细胞因子是机体内免疫细胞或免疫相关细胞产生的一组具有广泛生物学活性的蛋白类物质,能有效地激活和调节机体免疫能力。曾有人把细胞因子作为佐剂与疫苗联用,结果虽然显示其具有免疫增强作用,但由于其半衰期太短且价格昂贵而未能广泛应用。后来研究发现,将细胞因子基因在体内表达作为佐剂的免疫增强效果优于细胞因子^[1-3]。IFN- γ 和 IL-4 是重要免疫调节因子,具有多种生物学活性^[4]。IFN- γ 是由活化的 T 细胞和 NK 细胞产生的一种 Th1 型细胞因子,具有抗病毒、抗寄生虫及抑制细胞增殖等多种生物学活性,其中最主要的活性是免疫调节作用^[5],可诱导机体免疫反应向 Th1 型转化。IL-4 是由活化的 Th2 型细胞产生的一种细胞因子,可增强 B 细胞和 T 细胞的相互作用,促进体液免疫应答,特别是 IgE 分泌,还可诱导单核-巨噬细胞表达 MHC II 类分子,调节造血细胞的增殖及分化^[6],诱导 CD4⁺ Th 幼稚前体细胞定向分化为 Th2 型细胞。近年来有研究发现,重组的 IL-4 和 IFN- γ 作为疫苗佐剂能特异性地增强疫苗的免疫效果。为了明确 IL-4 和 IFN- γ 免疫增强作用,进而开发新型、安全、高效的疫苗佐剂,本研究通过构建猪 IFN- γ 、IL-4 基因的重组质粒(即 pcDNA3.1/IFN- γ 和 pcDNA3.1/IL-4)作为疫苗的免疫佐剂,在实验动物上开展了这两种重组质粒对猪口蹄疫双价灭活疫苗的免疫增强效果的研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物

4~5 周龄昆明小鼠 50 只(雌雄各半),由兰州生物制品研究所动物室提供。

1.2 试剂

O 型、亚洲 I 型口蹄疫液相阻断 ELISA 检测试剂盒,由国家口蹄疫参考实验室提供;商品口蹄疫双价(O 型和亚洲 I 型)灭活疫苗由中农威特生物股份公司提供;酶标板(丹麦 Nunc 公司);pcDNA3.1/IFN- γ 和 pcDNA3.1/IL-4 重组表达质粒均由本实验室构建。

1.3 疫苗配制、免疫及其抗体检测方法

试验分别设空白对照组(Control)、口蹄疫疫苗组(Vaccine)、口蹄疫疫苗+空载体组(Vaccine+

pcDNA3.1)、口蹄疫疫苗+pcDNA3.1/IL-4 组(Vaccine+pcDNA3.1/IL-4)和口蹄疫疫苗+pcDNA3.1/IFN- γ 组(Vaccine+pcDNA3.1/IFN- γ),每组 10 只小鼠,共 5 组;疫苗按 200 μ L/只加入 100 μ g/只重组质粒或 50 μ L/只稀释液配制,免疫剂量为 250 μ L/只,分别于两后肢股内侧肌肉注射。在免疫前和免疫后第 7、14、28、45、60 和 90 天,分别剪尾采血分离血清,进行口蹄疫抗体 ELISA 检测。

1.4 免疫小鼠 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞的检测

在免疫后第 7、21 和 45 天,每组随机处死 2 只小鼠,取脾脏,分离脾细胞,调节细胞浓度至 1×10^7 /mL。取上述脾细胞悬液 100 μ L 至 1.5 mL 灭菌离心管,后向每管中加入 10 μ L CD4⁺/CD8⁺ 双色标记的抗体,同时设非免疫对照管;室温避光静置 15~20 min,1 600 r/min 离心 8 min,用 PBS 悬浮洗涤细胞沉淀 2 次,用 0.5 mL PBS 悬浮细胞,用流式细胞仪(Coulter-EPICS XL)检测。

1.5 统计学处理

应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学处理,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒佐剂对抗体水平的增强效果

用 O 型、亚洲 I 型口蹄疫液相阻断 ELISA 试剂盒检测 pcDNA3.1/IFN- γ 和 pcDNA3.1/IL-4 重组质粒的免疫增强作用。结果显示,除第 45 天疫苗对照组和 pcDNA3.1/IFN- γ 组的亚洲 I 型抗体水平差异不显著外($P > 0.05$),其余时间段 pcDNA3.1/IFN- γ 和 pcDNA3.1/IL-4 组的亚洲 I 型抗体水平显著高于($P < 0.01$)疫苗对照组和 pcDNA3.1 组;除第 90 天疫苗对照组与 pcDNA3.1/IL-4 组 O 型抗体水平差异不显著外,其余时间段 pcDNA3.1/IFN- γ 和 pcDNA3.1/IL-4 组的 O 型抗体水平均与疫苗对照组和 pcDNA3.1 组的差异极显著($P < 0.01$)(图 1、2)。此外,pcDNA3.1/IFN- γ 增强亚洲 I 型抗体水平的佐剂效应显著高于 pcDNA3.1/IL-4($P < 0.01$),而 pcDNA3.1/IL-4 增强 O 型抗体水平的佐剂效应显著高于 pcDNA3.1/IFN- γ ($P < 0.01$)。

2.2 不同免疫组小鼠 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞的动态变化

各组中不同阶段免疫小鼠 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞的含量差异明显,如图 3、4 和 5 分别为 pcDNA3.1/

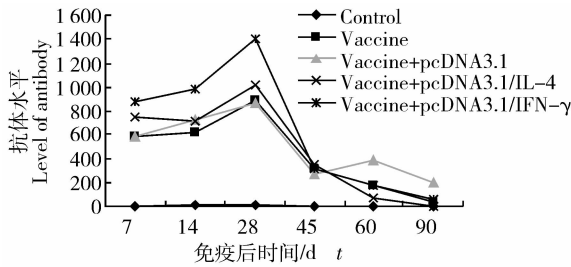


图 1 不同免疫组抗亚洲 I 型 FMD 抗体变化
 Fig. 1 Changes of antibody level against serotype Asia I in different groups after immunization

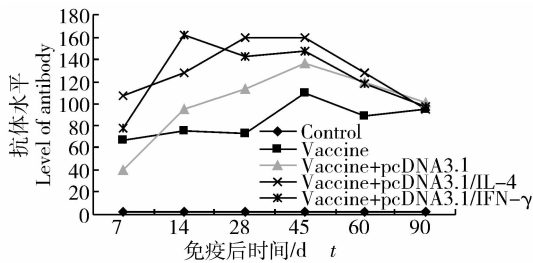


图 2 不同免疫组抗 O 型 FMD 抗体变化
 Fig. 2 Changes of antibody level against serotype O in different groups after immunization

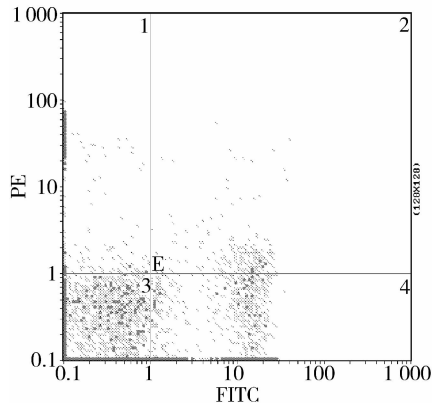


图 3 免疫后第 7 天 Vaccine+pcDNA3.1/IFN-γ 组小鼠脾脏中 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞的散点图
 Fig. 3 The ratio of CD4⁺、CD8⁺ cell in mouse spleen at 7 d after immunization of vaccine+pcDNA3.1/IFN-γ plasmid

IFN-γ 组不同时间段 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的百分含量分布图。CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比值的动态平衡反映了机体免疫调控状态和免疫水平。由图可知, 免疫后不同时间段 pcDNA3.1/IFN-γ 和 pcDNA3.1/IL-4 组 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比值显著高于 ($P < 0.01$) 其他组, 且第 21 天与第 7 天和第 45 天的差异极显著 ($P < 0.01$) (图 6)。这说明重组质粒

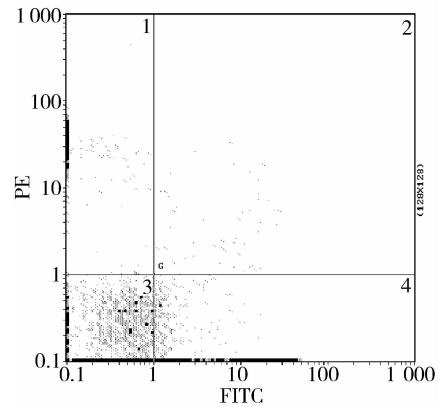


图 4 免疫后第 21 天 Vaccine+pcDNA3.1/IFN-γ 组小鼠脾脏中 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞的散点图
 Fig. 4 The ratio of CD4⁺、CD8⁺ cell in mouse spleen at 21 d after immunization of vaccine+pcDNA3.1/IFN-γ plasmid

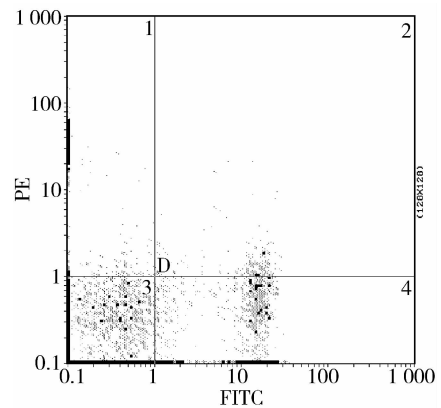


图 5 免疫后第 45 天 Vaccine+pcDNA3.1/IFN-γ 组小鼠脾脏中 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞的散点图
 Fig. 5 The ratio of CD4⁺、CD8⁺ cell in mouse spleen at 45 d after immunization of Vaccine+pcDNA3.1/IFN-γ plasmid

免疫后始终以 CD4⁺ T 淋巴细胞效应为主, 即标志着机体处于保护性免疫应答状态。

3 讨论

3.1 重组质粒佐剂对抗体水平的增强效果

Kim 等以 IL-4、IFN-γ 质粒分别与表达猴免疫缺陷病毒 SIV gap/pol 蛋白的质粒、表达 HIV env/rev 蛋白的质粒共同免疫, 发现 IL-4、IFN-γ 能显著增强抗原特异性 T 细胞介导的免疫反应, 使免疫反应倾向于 Th2 型^[7-8]。Ishii 等同样发现 IL-4 增强 DNA 疫苗的 Th2 型免疫反应, 表现为 IgG1 抗体水平显著升高^[9]。Geissler 等在研究 HCV 核心抗原

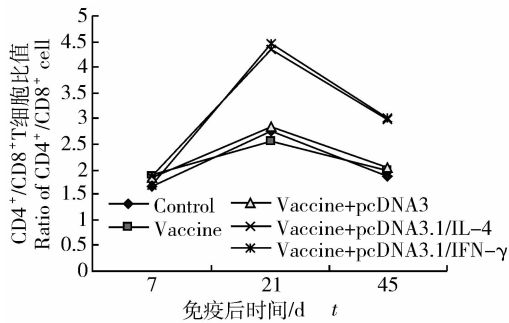


图6 不同免疫组脾脏中 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞的变化
Fig. 6 Changes of CD4⁺/CD8⁺ cell in spleen of different groups after immunization

DNA 疫苗时发现,质粒表达的 IL-4 也能与 IL-2 和 GM-CSF 一样使血清阳转率明显增高,但对 CTL 活性却呈抑制作用,并诱导 Th 细胞向 Th0 型分化^[10]。Song 等同样发现 IL-4 与 CEA 表达质粒共免疫可诱导高水平的 Th2 型免疫反应,但抑制 CTL 活性,因而不能产生抗肿瘤效应^[11]。陈欲晓等为了研究重组 IL-4 真核表达质粒是否增强日本血吸虫组织蛋白酶 B DNA 疫苗对小鼠的免疫保护效果,构建小鼠 IL-4 的真核表达载体 pcDNA3.1,并联合日本血吸虫组织蛋白酶 B 的表达质粒 DNA (VR1012-Sj31)肌注免疫小鼠,末次免疫 3 周后攻击感染,用减虫率及减卵率表示保护力,结果证明重组 IL-4 能提高日本血吸虫组织蛋白酶 B 核酸疫苗的抗血吸虫保护力,具有免疫佐剂的效应^[12]。在针对免疫缺陷鼠的糖尿病、关节炎等疾病的基因治疗中,IL-4 作为分子免疫佐剂也显示了一定的作用,而且能增加免疫治疗的安全性^[13-14]。

Min 等在研究多种细胞因子对艾美耳球虫 DNA 疫苗的佐剂效应时发现, IFN- γ 基因可显著抑制寄生虫的增殖^[15]。Pertmer 等以 IFN- γ 质粒与流感病毒血凝素 HA-DNA 疫苗共同免疫幼鼠和成鼠,发现 IFN- γ 可促进记忆性脾细胞由分泌 IFN- γ 和 IL-5 转向只分泌 IFN- γ ,在幼鼠模型中还观察到以 IgG2a 为主的抗体反应^[16]。Chow 等报道, IFN- γ 质粒与 HBV DNA 疫苗共免疫,可诱导显著的 Th1 型细胞免疫和高的 IgG2a 抗体滴度以及极其显著的 CTL 活性,而明显抑制 Th2 型免疫反应和 IgG1 的产生;此外, IFN- γ 还能增强 CEA DNA 疫苗的抗肿瘤效应。除观察到高水平的 Th1 型免疫反应和 CTL 作用外,血清中 IFN- γ 分泌量显著增高而 IL-4 显著降低,呈现保护性免疫反应,因而

不仅能抗肿瘤,而且能抑制转移性同源 CEA 阳性 P815 瘤细胞的生长^[5]。

本研究结果与上述报道一致。研究显示,pcDNA3.1/IFN- γ 和 pcDNA3.1/IL-4 重组质粒佐剂诱导的抗体水平明显高于空载体组和疫苗对照组,并能使口蹄疫疫苗抗体在较长时间内保持高水平,但两者对不同型抗体水平的增强作用存在一定差异,这充分说明 IL-4 和 IFN- γ 可特异性地增强机体免疫应答,使机体获得有效的保护。

3.2 免疫小鼠的 CD4⁺/CD8⁺ 细胞的动态变化

T 淋巴细胞表面抗原 CD4、CD8 分别是辅助性 T 细胞及杀伤性 T 细胞的表面特异性标志。CD4⁺ 淋巴细胞通过分泌细胞因子来调节机体免疫功能,具有辅助 T 淋巴细胞转变为效应细胞,辅助 B 淋巴细胞生成抗体等作用,起到诱导和辅助细胞和体液免疫的作用,称为辅助 T 细胞(Th)。当免疫应答发生时,静止的 Th 细胞在识别由抗原递呈细胞递呈的抗原后,先后发育为诱导性 T 细胞(Ti)、活化的 Th 细胞及效应 Th 细胞,并使 T 细胞不断增殖分化和成熟。CD8⁺ 淋巴细胞主要参与直接杀伤靶细胞;另有 1 个亚群具有抑制 T 细胞活性,抑制 B 细胞产生抗体和细胞毒素等作用,起到抑制细胞和体液免疫的作用,称为 T 抑制细胞(Ts),对免疫应答有负调节效应。这些细胞亚群相互作用维持着机体正常的免疫功能,CD4⁺/CD8⁺ 比值表示着免疫功能的平衡状态,反映了机体免疫调控状态和免疫水平,两者的相互诱导和制约调节着机体的免疫功能平衡^[17-20]。本研究结果表明,重组质粒免疫后始终以 CD4⁺ T 淋巴细胞效应为主,即标志着机体处于保护性免疫应答状态。免疫后不同时间 pcDNA3.1/IFN- γ 和 pcDNA3.1/IL-4 重组质粒组间 CD4⁺/CD8⁺ 比值差异不显著,但免疫后第 21 天和第 45 天的 CD4⁺/CD8⁺ 比值明显高于第 7 天的,其中第 21 天 CD4⁺/CD8⁺ 最高,且均高于其他组。对照组变化趋势与免疫组相似的原因可能是每次人为操作不完全一致造成的,但对 pcDNA3.1/IFN- γ 和 pcDNA3.1/IL-4 重组质粒的佐剂效应评价结果影响不大。这说明 pcDNA3.1/IFN- γ 和 pcDNA3.1/IL-4 重组质粒的佐剂效应显著,能显著增强口蹄疫疫苗保护性免疫作用,并使免疫期限明显延长。

参考文献:

[1] BAROUCH D H, SANTRA S, STEENBEKE T D, et

- al. Augmentation and suppression of immune responses to a HIV DNA vaccine by plasmid cytokine/ Ig administration[J]. *J Immunol*, 1998, 161(4): 1 875-1 882.
- [2] 房文亮,王永祥,金玉怀,等. IL-15 基因真核表达质粒的构建及其对 CVB3 VP1 基因疫苗的免疫增强作用[J]. *河北医科大学学报*, 2003, 24(3): 129-132.
- [3] 李伟荣,王得新,杨 琪,等. 白细胞介素-2 基因佐剂对单纯疱疹病毒糖蛋白 D DNA 疫苗的免疫增强作用[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2006, 13(2): 98-101.
- [4] 金伯泉. 细胞和分子免疫学[M]. 北京:科学出版社, 2001: 131-239.
- [5] CHOW Y H, CHIANG B L, LEE Y L, et al. Development of Th1 and Th2 populations and the nature of immune responses to Hepatitis B virus DNA vaccines can be modulated by code livery of various cytokine genes[J]. *J Immunol*, 1998, 160: 1 320-1 329.
- [6] MULLER U, STEINHOFF U, REIS L F L, et al. Functional role of interleukine in antiviral defense[J]. *Science*, 1994, 366: 129-135.
- [7] KIM J J, SIMBIRI K A, SIN J I, et al. Cytokine molecular adjuvants modulate immune responses induced by DNA vaccine constructs for HIV-1 and SIV[J]. *J Interferon Cyt Res*, 1999, 19(1): 77-84.
- [8] KIM J J, YANG J S, MANSON K H, et al. Modulation of antigen-specific cellular immune responses to DNA vaccine in rhesus macaques through the use of IL-2, IFN-gamma, or IL-4 gene adjuvant[J]. *Vaccine*, 2001, 19(17-19): 2 496-2 505.
- [9] ISHII K J, WEISS W R, ICHINO M, et al. Activity and safety of DNA plasmids encoding IL-4 and IFN-gamma[J]. *Gene Ther*, 1999, 6(2): 237-244.
- [10] GEISSLER M, GESIEN A, TOKUSHIGE K, et al. Enhancement of cellular and humoral immune responses to hepatitis C virus core protein using DNA-based vaccines augmented with cytokines-expressing plasmids[J]. *J Immunol*, 1997, 158(3): 1 231-1 237.
- [11] SONG K, CHANG Y, PRUDHOMME G J. Regulation of T-helper-1 activity and enhancement of tumor immunity by combined DNA-based vaccination and nonviral cytokine gene transfer[J]. *Gene Ther*, 2000, 7(6): 481-492.
- [12] 陈欲晓,王林纤,唐连飞,等. 重组白细胞介素-4 增强日本血吸虫组织蛋白酶 B 核酸疫苗诱导小鼠的保护力[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2005, 23(2): 65-68.
- [13] KOK S, LEE M, KOH J J, et al. Combined administration of plasmids encoding IL-4 and IL-10 prevents the development of autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice [J]. *Mol Ther*, 2001, 4(4): 313-316.
- [14] CHANG Y, PRUD HOMME G J. Intramuscular administration of expression plasmids encoding interferon-gamma receptor/IgG1 OR il-4/iGg1 chimeric proteins protects from autoimmunity[J]. *Immunol Methods*, 2001, 166(2): 1 324-1 328.
- [15] MIN W, LILLEHOJ H S, BURNSIDE J, et al. Adjuvant effects of IL-1beta, IL-2, IL-8, IL-15, IFN-alpha, IFN-gamma, TGF-beta4 and lymphotactin on DNA vaccination against *Eimeria acervulina* [J]. *Vaccine*, 2001, 20(1-2): 267-274.
- [16] PERTMER T M, ORAN A E, MADORIN C A, et al. Th1 genetic adjuvants modulate immune responses in neonates [J]. *Vaccine*, 2001, 19(13-14): 1 764-1 771.
- [17] RUEDA M C, OSUNA A, DERYCKE P H, et al. Changes in T cell subpopulations in mice during prolonged experimental infection with *Echinococcus granulosus* [J]. *Biosci Rep*, 1995, 15(4): 201.
- [18] SABLITZKI A, EBEL H, MUHLING J, et al. Dysregulation of immune response following neurosurgical operations [J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2000, 1(1): 82.
- [19] CASTELLINO F, GERMAIN R N. Cooperation between CD4(+) and CD8(+) T cells: When, Where, and How [J]. *Annu Rev Immunol*, 2006, 24: 519-540.
- [20] KOPINSKI P, PRZYBYLSKI G, JARZEMSKA A, et al. Interferon gamma (IFN-gamma) level in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid is positively correlated with CD4/CD8 ratio in selected interstitial lung diseases [J]. *Pol Merkur Lekarski*, 2007, 23(133): 15-21.