

CpG DNA 重组质粒对猪囊尾蚴抗原的免疫佐剂效应研究

景志忠, 蒙学莲, 王佩雅, 窦永喜, 李辉, 骆学农, 郑亚东, 才学鹏

【提要】用 CpG 基序寡核苷酸的重组质粒(CpG DNA)与猪囊尾蚴抗原制备疫苗免疫小鼠, 检测小鼠抗囊尾蚴总抗体和 IgG2a 抗体亚类以及体外诱导免疫脾细胞分泌白介素-4(IL-4)和干扰素- γ (IFN- γ)的含量, 观察其免疫佐剂效应。发现 CpG DNA 重组质粒中无论插入 CpG 基序多或少都能增强小鼠抗囊尾蚴总抗体和 IgG2a 抗体亚类含量, 都具有免疫佐剂效应, 但其免疫强度有差别, 其中 CpG2 的佐剂效应最强; 此外, CpG DNA 重组质粒能与铝胶、206 佐剂配伍发挥免疫增强协同作用。

【关键词】CpG DNA; 佐剂效应; Th1 型; 协同作用

中图分类号: R532.333

文献标识码: B

Adjuvant Effect of CpG DNA Recombinant Plasmid on Antigen of *Cysticercus cellulosae*

JING Zhi-zhong, MENG Xue-lian, WANG Pei-ya, DOU Yong-xi,
LI Hui, LUO Xue-nong, ZHENG Ya-dong, CAI Xue-peng

(Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences; Gansu Provincial Key Laboratory of Animal Parasitology, Lanzhou 730046, China)

【Abstract】 In order to prove the adjuvant effect of CpG DNA recombinant plasmid, the total antibodies and their IgG2a subtype induced by antigen of *Cysticercus cellulosae*, and content of IL-4 and IFN- γ secreted from splenic cell of mouse immunized were measured. The recombinant plasmids showed an adjuvant effect, and CpG2 was the best adjuvant among the plasmids. It is proved that the CpG DNA possesses a synergistic effect with Al(OH)₃ and 206 adjuvant, and is an effective Th1 type adjuvant in mice.

【Key words】 CpG DNA; Adjuvant effect; Th1 type; Synergistic effect

目前, 国内外已有用人工合成且进行硫代修饰的含 CpG 基序的寡核苷酸序列(CpG ODN)或从其他低等生物中提取含 CpG 基序的基因组 DNA, 作为疫苗新型佐剂, 证明免疫增强效果好, 具有替代传统佐剂的优势, 但人工合成的 CpG ODN 很容易被降解, 而硫代修饰的序列费用太高; 低等生物的基因组 DNA 虽含有未甲基化的 CpG 基序, 但有可能引入有害基因或物质到机体, 盲目性较大^[1,2]。因此, 本研究通过构建含 CpG 基序序列的重组质粒即 CpG DNA 作为疫苗的免疫佐剂, 首先开展猪囊尾蚴抗原疫苗的免疫增强试验, 以明确其免疫佐剂效应, 现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 4~5 周龄昆明小鼠 30 只 (雌雄各半), 由兰州生物制品研究所动物室提供。

1.2 试剂 猪囊尾蚴小鼠抗体 ELISA 检测试剂盒(本实验室配

制), RPMI1640 培养基 (美国 Invitrogen 公司生产), 小鼠白介素-4(IL-4)和干扰素- γ (IFN- γ)的 ELISA 检测试剂盒(美国 Bioscience 公司), 酶标板(丹麦 Nunc 公司)。

1.3 抗原与佐剂 猪囊尾蚴抗原 (本实验室制备), 206 佐剂 (法国 Seppic 公司提供), 铝胶(Al)(兰州生物制品所惠赠), 3 种 CpG DNA 重组质粒(简称 CpG1、CpG2 和 CpG3, 均由本实验室研制)。

1.4 CpG DNA 佐剂效应及其配伍形式试验 共分 11 组, 分别设空白对照组、抗原+空载体组、抗原+CpG1 组、抗原+CpG2 组、抗原+CpG3 组、抗原+Al+CpG1 组、抗原+Al+CpG2 组、抗原+Al+CpG3 组、抗原+206+CpG1 组、抗原+206+CpG2 组、抗原+206+CpG3 组。先将纯化的囊尾蚴抗原稀释到 2 mg/ml, 按 200 μ g/只的剂量与等体积的佐剂配合, 其中每份疫苗各含 206 佐剂 100 μ l, 铝胶 0.135 mg, CpG DNA 佐剂质粒 100 μ g。在免疫前和免疫后第 15、30、60、90 和 120 d, 分别剪尾采血分离血清, 进行猪囊尾蚴抗体 ELISA 检测。

1.5 CpG DNA 重组质粒的最佳剂量及其毒性试验 共分 6 组, 分别设空白对照组、抗原+Al 组、抗原+206 组、抗原+CpG2-20 μ g 组、抗原+CpG2-100 μ g 组和抗原+CpG2-200 μ g 组, 其中每头份疫苗各含抗原 400 μ g, 206 佐剂 200 μ l, 铝胶

基金项目: 国家高科技研究“863”项目(2003AA241111)和甘肃省农业生物技术研究与开发项目(GNSW2003-2)

作者单位: 中国农业科学院兰州兽医研究所, 甘肃省动物寄生虫病重点实验室, 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 兰州 730046

0.27 mg, CpG2 分别按 20、100 和 200 μg 添加, 接种剂量为 400 μl /只; 小鼠随机分组, 每组 5 只, 均为雌性; 在免疫前和免疫后 19、30、60 和 90 d 分别剪尾采血, 分离血清进行猪囊尾蚴总抗体和 IgG2a 含量 ELISA 检测, 以确定 CpG DNA 佐剂的最佳剂量及其毒性。

1.6 CpG DNA 重组质粒增强抗体产生与分泌细胞因子的关系试验 以筛选的最佳 CpG DNA 为试验佐剂, 共分 4 组, 小鼠随机组群, 8 只/组, 雌雄各半。分别设空白对照组、单一抗原组、206 佐剂组和 CpG DNA 佐剂组; 疫苗配制方法同前, 在第 1 次免疫后, 第 25 天和 63 天各加强免疫 1 次; 在免疫前和免疫后第 15、34、75 和 85 天分别剪尾采血, 分离血清进行猪囊尾蚴抗体 ELISA 检测。同时在上述试验第 3 次免疫后 7 d, 每组随机处死小鼠 3 只, 取脾脏, 分离脾细胞, 在细胞培养板上每孔加 100 μl , 3 个重复孔, 加 2 板; 分别用囊尾蚴抗原 100 μg 刺激, 37 $^{\circ}\text{C}$, CO_2 培养箱中培养 24 h 后, 分别用小鼠 IL-4 和 IFN- γ 的 ELISA 检测试剂盒检测其含量^[3,4]。

2 结果

2.1 最佳单一 CpG DNA 重组质粒佐剂的选择 3 种 CpG DNA 重组质粒增强囊尾蚴抗原产生抗体能力强弱顺序是: CpG2 的最强, 其次是 CpG3 和 CpG1, 但都明显高于空载体

组, 排除了载体的影响作用。

2.2 CpG DNA 重组质粒的配伍试验及最佳配伍形式 3 种 CpG DNA 与铝胶配伍增强囊尾蚴抗原产生抗体能力的顺序是 CpG2 最强, 其次是 CpG3, 最低是 CpG1。3 种 CpG DNA 与 206 佐剂配伍增强囊尾蚴抗原产生抗体能力的顺序仍是 CpG2 最强, 其次是 CpG1, 最低是 CpG3。同时 CpG2 无论作为单一或联合佐剂与囊尾蚴抗原共同免疫小鼠, 其免疫增强能力都最强, 在免疫 120 d 后仍具有较高的抗体水平, 其配伍效应的关系是 CpG2 与 206 佐剂配伍效果最强, 其次是与铝胶佐剂, 单一 CpG2 佐剂较联合配伍的效果差。

2.3 CpG DNA 重组质粒的剂量及其毒性试验结果 3 种剂量的 CpG2 单一佐剂的免疫增强能力均较铝胶、206 佐剂强, 其中 20 μg 剂量组最高, 其次是 200 μg 和 100 μg 剂量组。而在 CpG2 诱导 IgG2a 产生能力方面, 200 μg 剂量组最高, 其次是 100 μg 剂量组, 20 μg 剂量组最低。另外, 在 200 μg 剂量免疫时小鼠也未出现任何不良反应(图 1)。

2.4 CpG DNA 重组质粒增强抗体产生与分泌细胞因子的关系试验结果 通过 3 次免疫, CpG DNA 重组质粒诱导的小鼠抗囊尾蚴抗原的抗体水平与 206 佐剂相当, 两者明显高于无佐剂抗原组。而 CpG DNA 重组质粒诱导免疫脾细胞产生的 IL-4 含量较 206 佐剂低, 但诱导的 IFN- γ 含量较 206 佐剂高(图 2)。

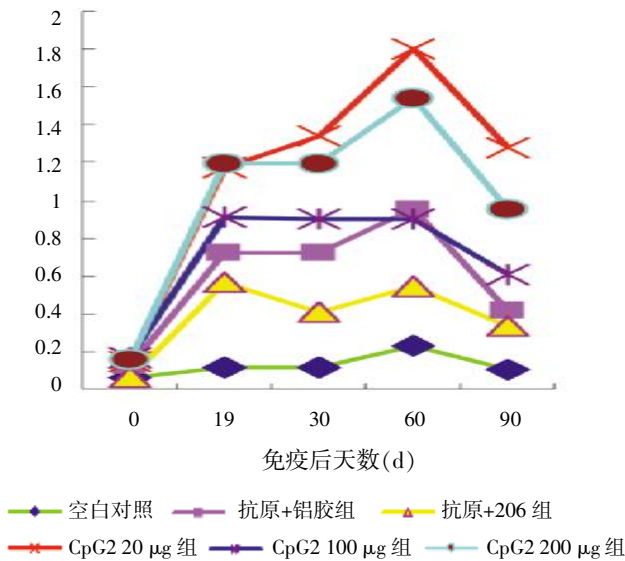


图 1 CpG2 不同剂量间的免疫增强效果

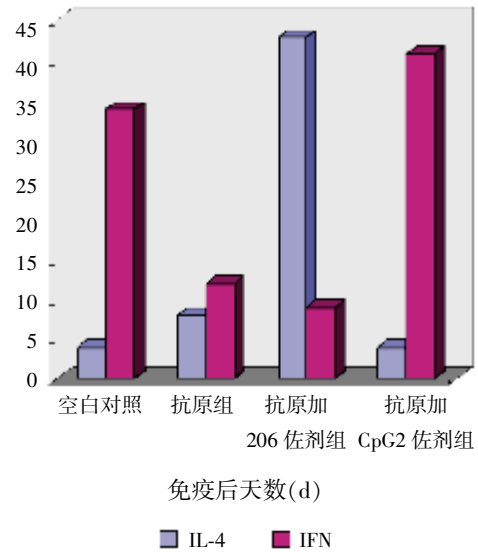


图 2 CpG DNA 对囊尾蚴抗原诱导机体产生 IL-4 和 IFN- γ 的能力

3 讨论

本实验室筛选和构建的 CpG DNA 重组质粒与猪囊尾蚴抗原制备疫苗免疫小鼠发现, 无论插入 CpG 基序多或少都能增强抗囊尾蚴抗体的水平, 但其强度有差别, 其中 CpG2 佐剂效应最好, 与本实验室以前报道的 CpG ODN 结果相一致^[5]。Yoshitsugu 等^[3]报道用多 CpG 基序构建的 DNA 质粒能够显著增强 HIV-1 DNA 疫苗的细胞免疫和体液免疫效果, 而且发现 CpG 基序越多其免疫增强效果越好。李江凌等^[6]在抗猪囊尾蚴疫苗以及许洪林等^[7]在抗 HBsAg 疫苗中都证实这一结论。另外试验发现 3 种 CpG DNA 重组质粒均可与铝胶、206 佐剂配伍发挥协同作用, 其中 CpG2 无论作为单一或联合佐剂其免疫

增强能力都较高, 其配伍效果与 206 佐剂最强, 其次是铝胶佐剂, 说明其与其他佐剂配伍能发挥免疫增强协同作用。

Rankin 等^[4]报道 CpG ODN 具有较好的安全性, 使用剂量低, 无毒副作用。剂量和毒副作用试验发现 >20 μg /只的 CpG DNA 重组质粒就能达到较好的免疫佐剂效应, 其免疫增强能力优于常规佐剂, 在 200 μg 免疫剂量时未发现任何不良反应。通过检测各免疫佐剂剂量组所诱导产生的 IgG2a 抗体亚型的含量发现: 随着免疫剂量的变化, 其诱导产生的免疫反应类型即发生改变, 低剂量时主要以体液免疫为主, 高剂量时 IgG2a 的含量增加即细胞免疫反应随之增强, 在 200 μg 剂量时既表现为较高的体液免疫又表现为较高的细胞免疫。已有资料表明,

CpG 基序主要诱导 T 淋巴细胞 1 型(Th1)免疫反应即细胞免疫反应,以诱导产生 IgG2a 为主。但机体免疫反应类型的改变是否与剂量有关,未见报道,需进一步研究证实。

大量试验证实 CpG ODN 是一种有效的 Th1 型免疫佐剂,可直接促进树突状细胞(DC)、巨噬细胞和脾细胞等专职抗原呈递细胞的成熟和活化,分泌 IL-12、IL-18 和 IFN- γ 等 Th1 型细胞因子,从而增强抗原诱导特异性的 CTL 应答。目前认为 IFN- γ 和 IL-4 含量的高低是衡量 Th1 和 Th2 型免疫反应的重要指标,本试验通过免疫脾细胞分泌 IFN- γ 和 IL-4 细胞因子的检测以验证 CpG DNA 重组质粒所诱导免疫反应的特点^[3,4]。从抗猪囊尾蚴抗体水平看,CpG DNA 重组质粒作为佐剂诱导的抗体与 206 佐剂相当,而从诱导脾细胞分泌的细胞因子的水平看,CpG DNA 诱导分泌的 IFN- γ 高而 IL-4 低,正好与 206 佐剂相反,即本试验进一步证实了 CpG DNA 重组质粒的 Th1 型佐剂效活性。

参 考 文 献

[1] JING ZZ, Cai XP. Progress of studies and applications of immunostimulatory activity of CpG DNA[J]. Chin J Vet Med, 2004, 40(9): 43-46. (in Chinese)
(景志忠, 才学鹏. CpG DNA 免疫刺激活性研究进展[J]. 中国兽医杂志, 2004, 40(9): 43-46.)

[2] Heather LD, Risini W, Thomas JW, *et al.* CpG DNA is a potent

enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen[J]. J Immunol, 1998, 160: 870-876.

[3] Yoshitsugu K, Ke-Qin X, Takaaki O, *et al.* Adjuvant effect of multi-CpG motif on an HIV-1 DNA vaccine[J]. Vaccine, 2002, 20: 2875-2878.

[4] Rankin R, Pontarollo R, Gomis S, *et al.* CpG-containing oligodeoxynucleotides augment and switch the immune responses of cattle to bovine herpes virus-1 glycoprotein D[J]. Vaccine, 2002, 20: 3014-3022

[5] JING ZZ, Wang PY, Meng XL, *et al.* Experimental studies on CpG ODN enhancing immune response of the cysticercosis cellulosa vaccine to animals[J]. Chin J Vet Sci Technol, 2004, 34(2): 3-6. (in Chinese)
(景志忠, 王佩雅, 蒙学莲, 等. CpG ODN 增强猪囊尾蚴病疫苗免疫反应的试验研究[J]. 中国兽医科技, 2004, 34(2): 3-6.)

[6] Li JL, Gao R, Wu M, *et al.* The effect of transgenic expression of porcine IL-6 gene and CpG sequences on immune response of mice inoculated with gene vaccine of cysticercosis cellulosae [J]. Bull High Technol, 2002, 6: 1-5. (in Chinese)
(李江凌, 高荣, 武梅, 等. CpG 序列和猪白细胞介素-6 基因转染表达对猪囊尾蚴基因疫苗免疫影响的研究[J]. 高技术通讯, 2002, 6: 1-5.)

[7] Xu HL, Wang SF, Guo F, *et al.* The pilot studies of CpG ODN as an adjuvant of vaccine for human[J]. National Med J China, 2002, 82: 553-556. (in Chinese)
(许洪林, 王世峰, 郭斐, 等. CpG 寡脱氧核糖酸作为人用疫苗佐剂的初步研究[J]. 中华医学杂志, 2002, 82: 553-556.)

(收稿日期:2005-01-05 编辑:伯韦)

【消息】

关于召开“全国寄生虫种质资源共享与利用学术交流会”通知

由中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所主办和中国农业科学院兰州兽医研究所承办的“全国寄生虫种质资源标准化整理、整合和共享学术交流会及相关技术培训会议”,将于2006年8月在兰州召开。

1. 会议主题:①种质资源共享理论与实践;②寄生虫病原鉴定新方法与新技术;③寄生虫样本/标本的采集、固定及保存技术;④媒介昆虫(蚊子)的采集及标本的制作;⑤常见寄生虫标本的染色方法;⑥寄生虫生物材料(遗传资源、血清或抗体、制备物如抗原等)采集和保藏;⑦各类寄生虫病数据库的构建与共享;⑧其他与寄生虫种质资源共享与利用有关内容。

2. 出席对象:①特邀作专题报告的国内相关领域著名专家和学者;②各省(自治区、直辖市)高等医药院校、科研院所、医疗、防治机构及检疫部门等从事人体、兽医、植物等寄生虫学研究和寄生虫种质资源分类整理的专家、学者、科技人员和师生。凡投稿后被录用准备在会议上交流者。

3. 征文要求:凡未在国内外学术刊物或会议上发表过的与本次会议主题有关论文均可投稿。论文符合国家和各单位保密规定,文责自负。论文经评审后发录用通知。请于2006年6月15日前将论文电子版寄或发给中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所陈韶红同志收。

4. 时间与地点:2006年8月4日至6日(8月3日报到)在兰州举办。会议资料费:300元/人(含资料费、证书费)。食宿代为安排,费用自理。

5. 论文证书和继续教育学分:本次会议征集的论文经会议组委会专家审评录用者,将编印成论文集,将发给论文证书。本次会议授予中华预防医学会I类继续教育学分4分。

6. 联系人和联系方式:中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所 陈韶红;地址:上海市瑞金二路207号;邮编:200025;电话:021-64377008-1207;传真:021-64332670;E-mail:chensh637@yahoo.com

中国疾病预防控制中心
寄生虫病预防控制所