

[文章编号] 1000-4718(2009)12-2463-03

透明质酸酶在弓形虫重组融合抗原 ROP2-P30 基因免疫中的免疫增强作用*

李文姝¹, 孟锐锋¹, 张丽芳¹, 朱珊丽¹, 闵太善²(¹温州医学院微生物学免疫学教研室, 浙江温州 325032 ²复旦大学生化与分子生物学实验室, 上海 200433)

[摘要] 目的: 研究透明质酸酶在弓形虫重组融合抗原 ROP2-P30 基因免疫中的免疫增强作用, 初步探讨透明质酸酶在提高质粒 DNA 分子免疫效应中的应用潜能。方法: 弓形虫重组质粒 p α ROP2-P30 联合透明质酸酶以及单独的重组质粒 p α ROP2-P30 肌肉注射免疫 BALB/c 雌性小鼠, 生理盐水和空质粒载体 p α DNA3.1 作阴性对照免疫, 免疫 3 次, 间隔 3 周。免疫结束后, 以纯化的弓形虫重组蛋白 ROP2-P30 (rROP2-P30) 为检测抗原, 检测各免疫组小鼠血清中特异性抗体的形成; cell counting kit-8 (CCK-8) 检测免疫鼠脾细胞的增殖活性; 硝酸还原酶法检测免疫鼠脾细胞培养上清中 NO 的含量。结果: p α ROP2-P30+透明质酸酶免疫组特异性抗体生成水平显著高于其它免疫组 (均 $P < 0.01$); p α ROP2-P30+透明质酸酶免疫组小鼠脾细胞受特异性抗原 rROP2-P30 刺激后, 其淋巴细胞的增殖明显高于单独的质粒 p α ROP2-P30 免疫组 ($P < 0.01$); p α ROP2-P30+透明质酸酶免疫组脾细胞培养上清中免疫活性分子 NO 的含量也显著升高 (均 $P < 0.01$)。结论: 透明质酸酶在提高弓形虫 DNA 免疫效应方面显示了免疫增强作用, 具有发展成为基因免疫的免疫佐剂的潜能。

[关键词] 透明质酸酶; 弓形虫; 免疫增强

[KEY WORDS] Hyaluronidase; *Toxoplasma*; Immunoenhancement

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

DNA 免疫由于其制备的方便性常被用来作为抗原的递送系统, 这种免疫方式能够诱导 Th1 型的免疫反应和 CD8⁺ 的细胞毒性 T 淋巴细胞免疫反应^[1, 2], 因而对于细胞内感染的病原体, 如弓形虫感染来说是合适的疫苗选择方案, 另一方面, 哺乳动物的肌细胞有效吸收质粒 DNA 分子则决定着 DNA 免疫效应的发挥。蛋白水解酶-透明质酸酶 (hyaluronidase, HAase), 作为天然生物酶, 在临床上被用作药物渗透剂, 促进皮下组织的通透性, 利于外来物质的有效进入^[3]。鉴于此, 本研究拟利用透明质酸酶的通透性, 协助提高质粒 DNA 分子在肌肉组织中的扩散和吸收, 以本室构建成功的弓形虫重组真核表达质粒 p α DNA3.1/ROP2-P30 (p α ROP2-P30) 作为免疫原, 透明质酸酶作为基因免疫的增强剂, 与重组质粒 p α ROP2-P30 同时进入体内, 探讨透明质酸酶在基因免疫中作为免疫增强剂的应用价值。

材料和方法

1 主要试剂和仪器

重组原核表达质粒 pET28b/ROP2-P30、重组真核表达质粒 p α ROP2-P30 均由本实验室构建, 见参考文献^[4, 5], Ni-NTA 离子螯合亲和层析凝胶、无内毒素大剂量质粒抽提纯化试剂盒 (上海吉泰新绎生物技术有限公司, Qiagen 产品), RPMI-1640 培养基、新生小牛血清 (NCS)、刀豆蛋白 A (con-

canavalin A, ConA) 透明质酸酶 (Sigma), HRP (辣根过氧化物酶) 标记山羊抗鼠 IgG (杭州联科生物技术有限公司), cell counting kit-8 (CCK-8 日本同仁化学研究所), NO 检测试剂盒 (晶美生物工程有限公司), 增强型 BCA 蛋白定量试剂盒 (碧云天生物技术有限公司), ELx800 酶标自动检测仪 (Bio-Tek 公司)。

2 动物

BALB/c 雌性小鼠, 6 周龄, 18 g \pm 2 g 购自中国科学院上海实验动物中心, 由温州医学院标准化实验动物中心饲养。

3 重组蛋白 ROP2-P30 (rROP2-P30) 的纯化

重组质粒 pET28b/ROP2-P30 在原核体系中表达详见参考文献^[4]。表达产物通过 Ni-NTA 离子螯合亲和层析柱, 按产品说明书进行纯化, BCA 蛋白定量试剂盒测定纯化后的蛋白浓度。

4 重组质粒 p α ROP2-P30 的大剂量制备

本室制备的真核表达重组质粒 p α ROP2-P30 以无内毒素大剂量质粒抽提纯化试剂盒进行大量抽提, -70 °C 保存备用。

5 动物免疫

实验小鼠随机分成 4 组, 每组 10 只, 即生理盐水对照组、质粒 p α DNA3.1 免疫组、重组质粒 p α ROP2-P30 免疫组、质粒 p α ROP2-P30+透明质酸酶免疫组 (即 p α ROP2-P30+HAase)。首次免疫提前 24 h 各实验组小鼠腿部肌肉注射 0.5% 利多卡因 100 μ L 以松弛肌肉, p α DNA3.1 组及 p α ROP2-

[收稿日期] 2008-12-04 [修回日期] 2009-09-24

* [基金项目] 浙江省自然科学基金资助项目 (No Y205567); 浙江省医药卫生科学研究基金资助项目 (No 2007B137)

Tel: 0577-86689910 E-mail: ws161@163.com

- P30组均以每只小鼠 100 μg的剂量进行腿部肌肉注射免疫, pcROP2- P30+ HAase组每只小鼠以 pcROP2- P30 100 μg+ 10U HAase混合剂量进行免疫, 免疫共进行 3次, 每次间隔 3周, 生理盐水对照组注射相应体积的无菌生理盐水作对照免疫。

6 免疫鼠血清中特异性抗体的检测

最后免疫结束后 2周, 各实验组取 5只小鼠眼眶放血收集血清, 血清以 0.3% Tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 做 1:500 稀释。纯化 rROP2- P30以 2.5 μg/well包被 96孔聚苯乙烯酶标反应板, 酶标板前 3孔以 PBST代替重组蛋白包被作空白调零, 5% 脱脂奶粉 (PBST 配制) 封闭 1 h PBST 洗涤数次, 加入已稀释的免疫鼠血清, 100 μL/well 每份样品均设 3个复孔, 37 °C 孵育 1 h。PBST 洗涤 5遍, 加入 HRP- 山羊抗鼠 IgG (1:5 000 稀释), 100 μL/well 37 °C 孵育 1 h。以邻苯二胺 (OPD) 为底物进行显色, 15 min 后加 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 在 490 nm 下测量吸光度值。

7 免疫鼠脾淋巴细胞增殖试验

最后免疫结束后 3周, 各实验组取 5只小鼠无菌操作取脾脏, 以 15% NCS 的 RPMI-1640 制备成单个细胞悬液, 0.87% NH₄Cl 溶液 2 mL 以溶解红细胞, PBS 洗涤 2次, 调整细胞浓度至 2 × 10⁹ cells/L。制备好的脾细胞悬液按 500 μL/well 分别加到 24孔细胞培养板中, 每份标本设置培养液刺激组、ConA 刺激组、rROP2- P30刺激组, 细胞反应板的前 3孔加入 500 μL 的 RPMI-1640 培养液作为空白对照, 每组均设 3复孔。样本加入后先在 37 °C、5% CO₂ 下培养 24 h 然后 ConA 刺激组加入 ConA 使其终浓度为 10 mg/L, rROP2- P30刺激组加入纯化的 rROP2- P30使其终浓度为 25 mg/L, 继续培养 68 h 后, 每孔加入 50 μL CCK-8 试剂继续培养 3 h 取出培养板, 于酶标自动检测仪 450 nm 处测 A 值。

8 免疫鼠脾细胞培养上清中 NO 分子的测定

上述制备好的各免疫组小鼠脾细胞悬液以 500 μL/well 的量分别加到 24孔细胞培养板中, 37 °C、5% CO₂ 先培养 24 h 后, 加入纯化的 rROP2- P30使其终浓度为 25 mg/L, 继续培养 68 h 后, 收集细胞培养上清液, 检测其中 NO 的含量, 具体操作按“硝酸还原酶法 NO 检测试剂盒”说明书进行, 结果于酶标自动检测仪 530 nm 波长处, 分别读取各待测样本管和标准管吸光度 (A) 值, 按下式计算标本的 NO 含量: NO (μmol/L) = 测定管 A 值 / 标准管 A 值 × 100 μmol/L。

9 统计学处理

数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组间差异比较采用单因素方差分析。

结 果

1 免疫小鼠血清中特异性抗体的形成比较

纯化 rROP2- P30作检测抗原, pcROP2- P30+ HAase 组和 pcROP2- P30组均产生了显著的特异性抗体 IgG, 比较 pcDNA3.1 对照组特异性抗体产生均有显著差异 ($P < 0.01$), pcROP2- P30+ HAase 组比较 pcROP2- P30组抗体生成水平有所提高, 2组间差异显著 ($P < 0.05$), 而生理盐水对照组和 pcDNA3.1 对照组仅能检测到微弱的痕量抗体, 见图 1。

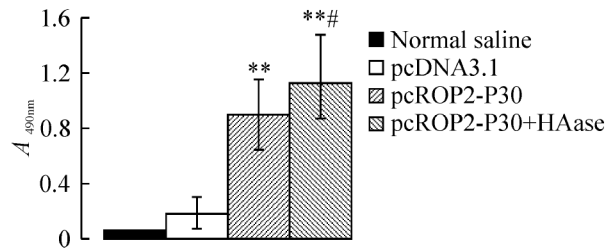


Fig 1 Detection of specific IgG antibody in serum from immunized mice using ELISA. IgG antibody specific response to rROP2- P30 was measured at $\lambda = 490$ nm. A value normal saline 0.06 ± 0.01; pcDNA3.1: 0.59 ± 0.26; pcROP2- P30 0.92 ± 0.20; pcROP2- P30+ HAase 1.14 ± 0.22. # $P < 0.05$ vs pcROP2- P30 group; ** $P < 0.01$ vs pcDNA3.1 group

图 1 ELISA 法检测免疫鼠血清中特异性抗体 IgG

2 免疫小鼠脾淋巴细胞增殖试验分析比较

各免疫组小鼠脾细胞以细胞培养液作阴性对照刺激时均不表现增殖现象, 而以 ConA 作非特异性阳性对照刺激时, 各免疫组小鼠脾细胞均出现明显的增殖, 而各组间的增殖无显著差异, 说明所选实验小鼠淋巴细胞增殖能力正常。当以特异性蛋白 rROP2- P30作刺激物时, pcROP2- P30+ HAase 组和 pcROP2- P30组小鼠脾淋巴细胞出现显著增殖, 且 pcROP2- P30+ HAase 组增殖能力显著高于 pcROP2- P30组 ($P < 0.01$), 而生理盐水对照组和 pcDNA3.1 对照组受 rROP2- P30刺激后均没有增殖表现, 见图 2。

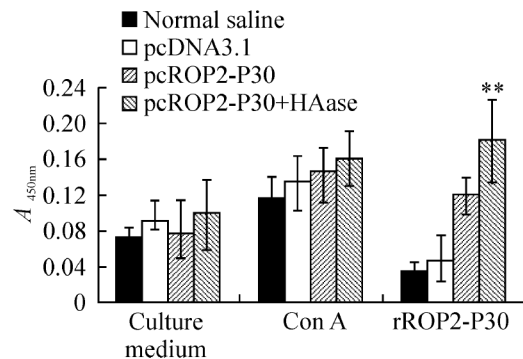


Fig 2 Analysis of proliferative response of splenocytes from immunized mice. Splenocytes from mice immunized with normal saline, pcDNA3.1, pcROP2- P30 or pcROP2- P30+ HAase were harvested 3 weeks after the last immunization, stimulated 71 h respectively with culture medium, ConA, or rROP2- P30 and then proliferation was measured at $\lambda = 450$ nm. ** $P < 0.01$ vs any other group stimulated with rROP2- P30

图 2 免疫鼠脾淋巴细胞增殖试验分析

3 免疫小鼠脾细胞培养上清中 NO 的含量测定

免疫鼠脾细胞经特异性 rROP2- P30刺激后, pcROP2- P30+ HAase 组和 pcROP2- P30组脾细胞培养上清中 NO 含量均高于生理盐水和 pcDNA3.1 对照组, 且 pcROP2- P30+ HAase 组 NO 的含量显著高于 pcROP2- P30组 ($P < 0.01$), 见图 3。

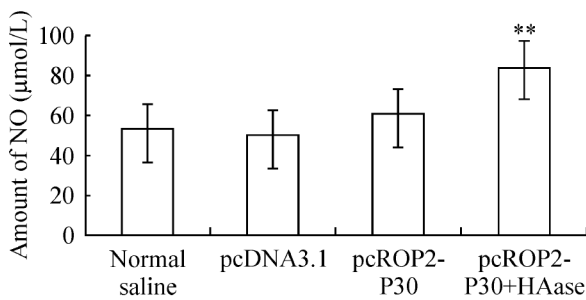


Fig 3 NO production in culture supernatant of splenocytes from immunized mice. Splenocytes from mice immunized with normal saline, pcDNA3.1, pcROP2-P30 or pcROP2-P30+HAase were harvested 3 weeks after the last immunization, stimulated 71 h with rROP2-P30 and then supernatants were harvested and detected for the presence of NO using the method of nitrate reductase. ** $P < 0.01$ vs any other group.

图 3 免疫鼠脾淋巴细胞培养上清中 NO 的含量

讨 论

本实验旨在研究透明质酸酶在预防弓形虫病基因免疫中的免疫增强作用,以寻找能够提高质粒 DNA 分子免疫效应的简单而有效的方法。前期工作我们应用基因工程技术,将弓形虫感染的 2 个关键抗原分子棒状体蛋白 2(ROP2)和膜表面蛋白 1(P30)融合在一起,制备了重组真核表达质粒 pcROP2-P30。利用基因免疫的方式作为抗原的递送系统。为了提高肌肉细胞对质粒 DNA 分子的吸收,本实验选择了能够增加细胞通透性的天然生物酶-透明质酸酶,探讨其作为基因免疫增强剂的应用潜能。

多方面的研究证实,一些物理的和化学的方法均能成功促进外源基因进入宿主细胞,如显微注射、电穿孔方法、基因枪、脂质体等^[6],这些改进基因发送系统的方法,是使进入细胞的质粒 DNA 分子的绝对数量增加从而提高质粒 DNA 分子的免疫效应。透明质酸酶是一种天然蛋白水解酶,能特异性地分解细胞外基质成分-透明质酸(hyaluronic acid, HA),暂时性地降低细胞间质的黏性,增加细胞膜的通透性,促使皮下输液、局部积贮的渗出液或血液快速扩散而利于吸收,同时防止皮下及肌肉注射后的组织破坏^[7],是一种较为理想的促药物扩散剂。有临床研究报告,在应用丝裂霉素行膀胱灌注的同时,加用 3 000 U 的透明质酸酶,取得了良好的效果,膀胱肿瘤的复发率仅为 12%,明显低于单纯丝裂霉素组的 29%,并且该方法效果明显,副作用少而轻^[8]。

本研究以提高外源基因在体内的表达为目的,以 pcROP2-P30 联合透明质酸酶进行基因免疫后,在免疫小鼠血清中产生了针对 rROP2-P30 的特异性抗体 IgG,比较未联合透明质酸酶的 pcROP2-P30 免疫组,其特异性抗体生成量显著升高 ($P < 0.05$),实验结果提示:质粒 DNA 分子协同透

明质酸酶混合进行免疫,比质粒 DNA 分子单独免疫有利于抗体的产生。另外,本研究检测了各免疫组脾淋巴细胞的增殖反应,免疫小鼠的脾细胞以特异性蛋白 rROP2-P30 作体外刺激时,pcROP2-P30 联合透明质酸酶免疫组增殖结果显著高于单纯的 pcROP2-P30 组 ($P < 0.01$),实验表明:透明质酸酶在质粒免疫的小鼠脾淋巴细胞增殖方面也显示了免疫促进作用。NO 是机体抗寄生虫感染的重要防御性介质之一,实验中我们也检测了各免疫鼠脾细胞培养上清中 NO 含量的变化情况。免疫鼠脾细胞经特异性抗原刺激后,pcROP2-P30+HAase 组脾细胞培养上清中 NO 含量升高显著 ($P < 0.01$),说明活化增殖的免疫活性细胞释放免疫效应分子 NO 的能力也显著增强。

通过本实验我们认为:天然生物酶-透明质酸酶作为协同刺激因子,在弓形虫基因免疫的特异性抗体的形成、脾淋巴细胞的增殖、脾淋巴细胞中 NO 活性分子的释放均显示了免疫增强作用,可能在 DNA 免疫策略中具有发展成为免疫佐剂的潜能,其深入的作用机制尚在继续研究中。

[参 考 文 献]

- [1] Ishii K, Hisaeda H, Duan XF, et al. The involvement of immunoproteasomes in induction of MHC class I-restricted immunity targeting Toxoplasma SAG1 [J]. *Microbes Infect* 2006, 8(4): 1045-1053.
- [2] Dlugoska H, Gatkowska J, Kur J, et al. The vaccines against toxoplasmosis-current status of the studies [J]. *Wiad Parazytol* 2007, 53(3): 195-201.
- [3] Clough TM, Paul AS. Daycase arthroscopic knee surgery performed under local anaesthesia with hyaluronidase technical note [J]. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2002, 10(5): 313-315.
- [4] 李文姝, 陆惠民, 闵太善, 等. 弓形虫棒状体蛋白 2 和膜表面蛋白 1 融合基因的克隆与表达 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2006, 23(6): 415-418.
- [5] 钟晓芝, 李文姝, 张丽芳, 等. 弓形虫 ROP2-P30 重组真核表达质粒的构建及其免疫效应的初步分析 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2009, 4(7): 505-508.
- [6] Dennig J, Duncan E. Gene transfer into eukaryotic cells using activated polyamidoamine dendrimers [J]. *J Biotechnol* 2002, 90(3-4): 339-347.
- [7] Gross C, Kietzmann M. Use of hyaluronic acid cleaving enzymes for absorption acceleration: results of an *in vitro* study with xylazine and ketamine [J]. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 2006, 113(7): 270-274.
- [8] 侯俊清, 黄志红, 李铁强. 丝裂霉素加透明质酸酶膀胱灌注预防膀胱癌电切术后复发 [J]. *第四军医大学学报*, 2006, 26(13): 1247-1248.