

变形链球菌防龋基因疫苗 pcDNA3-gtfB 免疫途径筛选的实验研究

杨锦波 刘天佳 庄 姮

摘要 目的:利用含有葡糖基转移酶抗原基因的重组质粒 pcDNA3-gtfB 作为基因疫苗,筛选有效的免疫途径。方法:重组质粒 pcDNA3-gtfB 通过股四头肌注射、鼻腔灌注和颌下腺周注射免疫 Wistar 大鼠,采用 ELISA 法测定血清 IgG、唾液 IgA 的动态变化。结果:经股四头肌注射免疫后产生的血清 IgG 抗体水平明显高于其它两组血清 IgG 抗体水平 ($P < 0.01$),且鼻腔灌注组和颌下腺周注射组间的血清 IgG 抗体水平无显著性差异 ($P > 0.05$)。各组唾液 S-IgA 抗体水平均存在显著差异 ($P < 0.01$),腺周注射组产生的唾液 S-IgA 抗体水平最高 ($P < 0.01$)。结论:基因疫苗通过腺周注射免疫途径能最有效激发特异性唾液 S-IgA 抗体的产生,可望成为一种有效的防龋基因疫苗免疫途径,为下一步抗龋动物实验提供了实验基础。

关键词 龋病 变形链球菌 葡糖基转移酶 基因疫苗

A Study on Screening Effective Immunization Route of Anticaries DNA Vaccine pcDNA3-gtfB

Yang Jinbo, Liu Tianjia, Zhuang Heng

West China College of Stomatology, Sichuan University

Abstract

Objective: Glucosyltransferase-B (GTF-B) of *Streptococcus mutans* has been implicated as a principal virulent factor in the development of dental caries. The objective was to use recombinant plasmid pcDNA-gtfB expressing multiple antigen of glucosyltransferase-B as gene vaccine to immunize rats through different route, and to investigate the immunization effects of immunization routes. **Methods:** A total of 18 Wistar rats were divided into 3 groups, including the quadriceps injection group, the intranasal irrigation group and the submandibular gland-targeted injection group. The serum IgG and salivary IgA were assayed by using ELISA after pcDNA3-gtfB immunization. The serum IgG and salivary IgA in different groups were compared using statistical one-way ANOVA. **Results:** Compared these 3 groups, the serum IgG in the quadriceps injection group was much higher than those of other two groups ($P < 0.01$), while the salivary IgA of the submandibular gland-targeted injection was much higher than those of other two groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** It is indicated pcDNA3-gtfB is good candidate for anticaries gene vaccine, and submandibular gland-targeted injection is an effective immunization route for stimulating salivary IgA.

Key words: anticaries *Streptococcus mutans* glucosyltransferase gene vaccine

基因免疫是指将带有编码抗原蛋白的基因和表达调控序列的质粒 DNA 导入机体组织,质粒 DNA 在组织内扩散,被机体细胞摄取,随后转录表达抗原蛋白,从而引起特异的体液免疫和细胞免疫应答。口腔中龋病的抗体成分主要来源于粘膜免疫系统,如何利于防龋疫苗有效激活粘膜免疫系

统,产生高滴度的特异性 S-IgA 是开发、研制防龋疫苗的关键。本实验用构建的防龋基因疫苗 pcDNA3-gtfB,从不同的免疫途径免疫 Wistar 大鼠,比较血清中特异性 IgG 抗体和唾液中特异性 S-IgA 抗体的滴度,筛选出合理、有效的基因疫苗防龋的免疫途径。

1 材料和方法

1.1 实验动物及主要试剂

Wistar 大鼠 18 只为悉生动物,全雄,4 周龄(由原华西医科大学实验动物中心提供),质粒 pcDNA3-gfB¹、GIFs 抗原(四川大学华西口腔医学院龋病研究室研制),羊抗鼠 IgG HRP、羊抗鼠 IgA-HRP(北京中山生物技术公司)。

1.2 重组质粒 pcDNA3-gfB 的制备

采用 Qiagen plasmid mega kit (Qiagen, 美国) 制备重组质粒 pcDNA3-gfB。将重组质粒 DNA 沉淀溶于 0.1 mol/L pH 7.3 PBS 缓冲液,经紫外分光光度计检测浓度,并稀释为 1 μg/μl。

1.3 动物免疫

Wistar 大鼠共 18 只,随机分为 3 组,每组 6 只。即:股四头肌注射组:双侧股四头肌多点注射,每侧注射浓度为 1 μg/μl 的重组质粒 PBS 液 50 μl;腺周注射组:双侧颌下腺注射,每侧注射浓度为 1 μg/μl 的重组质粒 PBS 液 50 μl;鼻腔灌注组:经鼻腔灌注浓度为 1 μg/μl 重组质粒 PBS 液 100 μl,分两次灌注,间隔 10 min。以上各组共免疫 2 次,1 周 1 次。

首次免疫后第 2 周由 Wistar 大鼠断尾法自尾静脉取血,采血量为 100~200 μl,于台式高速离心机上 20000 r/min 离心 10 min,去除血细胞,收集上清液,加入 0.02% 叠氮钠,-20 保存待测。同时,在采血后采用乙醚吸入麻醉 Wistar 大鼠,随后腹腔注射 0.2% 匹鲁卡品(0.75 mg/100 g),促进唾液分泌,收集大鼠唾液 100~200 μl,于台式高速离心机上 4000 r/min 离心 10 min,收集上清,-20 保存。每 2 周取一次静脉血和唾液,共 12 次,持续 24 周。

1.4 抗 GIFs 血清 IgG 和唾液 S-IgA 的检测²

抗 GIFs 血清 IgG 和唾液 S-IgA 的检测采用 ELISA 法。将标准 GIFs 抗原用 50 mmol/L pH 9.6 的 Na₂CO₃-NaHCO₃ 缓冲液配成浓度为 30 μg/ml 溶液,96 孔酶标板以 100 μl 抗原溶液包被,4 孵育过夜;用含 0.1% Tween 20 pH 7.4 PBS 洗板 3 次,每次 100 μl;用正常羊血清的 pH 9.6 50 mmol/L Na₂CO₃-NaHCO₃ 缓冲液注满凹孔,37 封闭 1 h;含 0.1% Tween 20 pH 7.4 PBS 洗板 3 次;每孔中加入 100 μl 对倍稀释的上述待测血清、唾液标本,37 孵育 2 h;用含 0.1% Tween 20 pH 7.4 PBS 洗板 3 次;每孔加入羊抗鼠 IgG HRP IgA/HRP (1:1000),37 孵育 2 h;再次用 0.1% Tween 20 pH 7.4 PBS 洗板 3 次;每孔加入 100 μl 含 0.04% 邻苯二胺,0.015% H₂O₂ 的磷酸盐-柠檬酸缓冲液(pH 5.0),室温避光反应 30 min;加入 50 μl 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应,于 DG3022 型酶联免疫检测仪(第四军医大学仪器设备公司)上测 A_{492 nm}值。

1.5 统计学分析

本实验采用的统计软件为 SPSS 10.0,不同组间血清 IgG、唾液 S-IgA 的比较采用成组设计的单因素方差分析。

2 结 果

pcDNA3-gfB 免疫 Wistar 大鼠后各组血清 IgG 抗体水平见图 1,统计学分析表明,经股四头肌注射

免疫后产生的血清 IgG 抗体水平明显高于其它两组(P<0.01);且鼻腔灌注组和颌下腺周注射组间的血清 IgG 抗体水平无显著性差异(P>0.05)。各组唾液 S-IgA 抗体水平见图 2,统计学分析结果表明,各组间均存在显著差异(P<0.01);腺周注射组产生的唾液 S-IgA 抗体水平最高(P<0.01)。

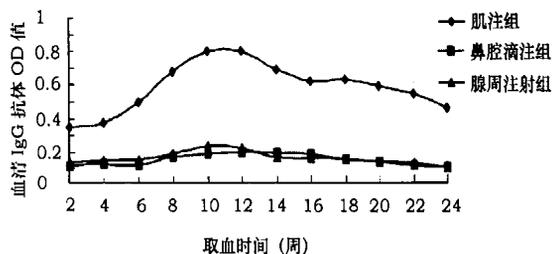


图 1 pcDNA3-gfB 免疫 Wistar 大鼠血清 IgG 抗体 ELISA 结果
Fig 1 ELISA result of serum IgG level

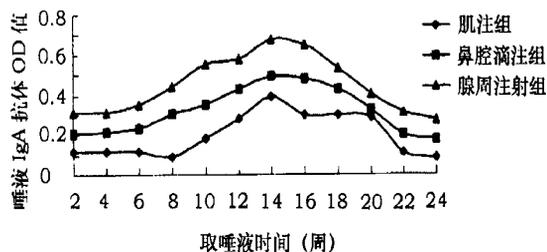


图 2 pcDNA3-gfB 免疫 Wistar 大鼠唾液 IgA 抗体 ELISA 结果
Fig 2 ELISA result of saliva IgA level

3 讨 论

3.1 关于肌注免疫后血清抗体水平

大量实验³证明,肌肉组织具有体积大、免疫容量大、转染率高以及激发全身系统免疫强的特点,肌注免疫已成为基因疫苗的经典接种方式。本动物实验结果也表明通过肌注免疫产生的特异性血清 IgG 抗体明显高于其它接种方式。

大部分研究者认为包括骨骼肌和心肌在内的横纹肌系统是最有效的摄取外源基因表达蛋白抗原的组织。骨骼肌具有一些形态和结构的特殊性,如具有独特的 T 小管和肌浆网,T 小管是肌纤维的肌膜向内凹陷形成的,同一水平的 T 小管在细胞内分支吻合环绕在每一条肌原纤维周围。肌纤维摄取注射的质粒 DNA 的具体机制还不完全清楚,目前普遍公认的假说认为质粒 DNA 是通过肌纤维上的浆膜小体介导的胞饮作用而进入肌纤维的,浆膜小体是肌膜凹陷形成的小泡状细胞,受体蛋白固定在浆膜小体外蛋白并形成丛状,质粒 DNA 与受体蛋白结合后,浆膜小体在开口处闭合并脱离肌膜,

然后质粒 DNA 与受体蛋白在浆膜小体内分离,沿浓度梯度经浆膜小体上的载体运至细胞。关于肌肉组织中抗原递呈机理,目前可能是通过以下 3 种途径⁴: 肌细胞摄取外源质粒 DNA,自身表达抗原蛋白并递呈给 T、B 淋巴细胞; 肌细胞表达并分泌抗原蛋白,或由于肌细胞的损伤,造成局部炎症,导致活化的细胞毒性淋巴细胞对转染细胞产生毒性作用,使肌细胞裂解,抗原蛋白释放,定居于肌肉组织的抗原递呈细胞(APC)将抗原蛋白递呈给 T、B 淋巴细胞; DNA 肌注免疫直接转染 APC(如郎罕细胞,树突状细胞),通过抗原加工,呈递给 T、B 淋巴细胞。以上特点使肌注免疫成为基因疫苗激发血清抗体最有效的免疫途径。

3.2 关于腺周注射免疫后唾液 S-IgA 抗体水平

1999年,Kawabata等⁵成功构建含有编码牙龈卟啉菌的纤毛蛋白(fimbria)基因的真核表达质粒 pcDNA3/fimA,并将该质粒经 BALB/c 小鼠颌下腺周围区域皮下注射免疫,观察颌下腺组织中细胞因子转录情况,经 RT-PCR 证实,小鼠颌下腺单核细胞中有高水平的 IL-4、IL-5、IL-6 mRNA 转录。Kawabata 等将颌下腺区域局部注射方法称为唾液腺靶向免疫(targeted salivary gland),认为经唾液腺靶向免疫注射的质粒 DNA 能大大提高质粒直接转染唾液腺周围的 APC,同时转染的颌下腺浆液细胞合成抗原蛋白能力强,导致诱导粘膜免疫大大增强,合成 S-IgA 抗体水平增高。本实验中颌下腺周围区域皮下注射后诱导的特异性 S-IgA 水平显著高于其它两组,也证实了唾液腺靶向免疫在诱导粘膜免疫中具有明显的优势,可以作为基因疫苗的有效免疫途径作进一步的龋保护实验。

3.3 质粒 DNA 对基因疫苗的影响

近来发现 DNA 本身也是一种免疫佐剂,可有效地激活多种免疫效应细胞⁶。介导这一作用的是一类具有特征性的短核苷酸序列,被称为免疫刺激 DNA 序列(immuno-stimulatory DNA sequence, ISS)。此类 DNA 序列绝大部分是由胞嘧啶核苷酸和鸟嘌呤核苷酸(CpG)为基元(motif)的寡聚体,CpG 在细菌 DNA 中含量较高,而在脊椎动物 DNA 中的比例少得多,而且脊椎动物中 80% 以上的 CpG 被甲基化,脊椎动物 DNA 与细菌 DNA 这两方面的显著差异可能是使 CpG 序列成为免疫刺激信号的

存在基础⁷。

本实验构建的基因疫苗的插入基因为 gtfB,本身即为细菌来源 DNA,带有 CpG 基元的免疫刺激基元,同时载体质粒 pcDNA3 带有氨苄青霉素抗性基因(Amp^r)。此抗性基因含有 5'-AACGTT-3' 两个拷贝,是一种较强活性的 ISS。Sato 等将 50 μg 表达 LacZ 的质粒 pACB-Z(含 Amp^r)接种小鼠,其诱导的抗体水平明显高于接种同样剂量的 pKCB-Z(用不含 5'-AACGTT-3' 的卡那霉素抗性基因 Kna^r 取代 Amp^r)所诱导的抗体水平。这充分显示了利用含 Amp^r 载体所构建基因疫苗具有较强免疫活性^{8,9}。

本实验将防龋基因疫苗 pcDNA3-gtfB 经不同免疫途径免疫大鼠,观察了血清 IgG 和唾液 S-IgA 特异性抗体的动态变化,结果显示通过腺周注射免疫途径能有效激发特异性唾液 S-IgA 抗体的产生,可望成为一种有效的防龋基因疫苗免疫途径,为下一步龋攻击实验提供了一有效的粘膜免疫途径。

参考文献

- 1 杨锦波,刘天佳,周学东.变形链球菌葡糖基转移酶真核表达质粒 pcDNA3-gtfB 的构建.华西口腔医学杂志,2001,19(4):249~252
- 2 Ulmer JB, Liu MA, Montgomery DL, et al. Expression and immunogenicity of mycobacterium tuberculosis antigen 85 by DNA vaccination. *Vaccine*, 1997, 15(8): 792~794
- 3 Yokoyama M, Hassett DE, Zhang J, et al. DNA immunization can stimulate florid local inflammation and the antiviral immunity induced varies depending on injection site. *Vaccine*, 1997, 15(5): 553~560
- 4 郭丽宏综述.基因疫苗免疫效果的影响.国外医学口腔医学分册,1996,26(3):139~141
- 5 Davis HL, Michel ML, Mancini M, et al. Direct gene transfer in skeletal muscle Plasmid DNA-based immunization against the hepatitis B virus surface antigen. *Vaccine*, 1994, 12(16): 1503~1509
- 6 Kawabata S, Terao Y, Fujiwara T, et al. Targeted salivary gland immunization with plasmid DNA elicits specific salivary immunoglobulin A and G antibodies and serum immunoglobulin G antibodies in mice. *Infect Immun*, 1999, 67(11): 5863
- 7 Danko I, Wölff JA. Direct gene transfer into muscle. *Vaccine*, 1994, 12(16): 1499~1502
- 8 Pisetsky DS. The immunologic properties of DNA. *J Immunol*, 1996, 156(2): 421~423
- 9 Yamamoto S, Yamamoto T, Kataoka T, et al. Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN and augment IFN-mediated natural killer activity. *J Immunol*, 1992, 148(12): 4072~4076

(2002-01-10 收稿)

(本文编辑 刘怡)