

乙型肝炎DNA疫苗接种局部肌肉组织
树突状细胞浸润及其诱导的细胞免疫
的研究

中国医科大学附属盛京医院
感染科博士研究生

翟永贞

导师：冯国和

DNA疫苗

◆ **DNA疫苗**：是编码目的抗原的重组真核表达载体----质粒**DNA**

- 免疫效果安全、有效、持久、广泛。
- 可以选择各亚型共有的核心蛋白保守DNA序列作基因疫苗，产生跨株系的交叉免疫保护反应。
- 组成多价基因疫苗，一种基因疫苗可免疫多种疾病。
- 具有减毒活疫苗的免疫原性，但不存在毒力回升的危险。
- 制备简单，容易大量生产，且成本低。易于贮存和运输。
- 与自然感染时相相似，利于构象型抗原表位的免疫识别。
- 基因疫苗不仅可用于预防，还可用于治疗。

乙脑病毒JEV
(单股正链RNA)



多蛋白前体

非结构蛋白



JE DNA疫苗

prME

pJME



E

pJE

JE DNA疫苗

- 制备**JE DNA**疫苗选取的基因区段的主要集中在**prM**、**E**以及**NS1**等蛋白编码基因。其中含**E**蛋白基因重组质粒被认为是最有效的**DNA**疫苗，经皮内和肌肉注射可分别获**91%**和**89%**的保护率。
- 质粒编码的**prM-E**蛋白基因所致的免疫保护效果有相加/协同作用。
- 肌肉组织目的抗原的表达与中和抗体的消长规律呈一致性改变，为**JE DNA**免疫提供了更直接的证据。
- **E**蛋白编码基因的重组质粒所诱导的保护性免疫还具有交叉保护作用。

JE DNA疫苗存在问题

```
graph TD; A[JE DNA疫苗存在问题] --> B[安全性问题]; A --> C[免疫原性低]; A --> D[抗体产生时间滞后 维持时间短];
```

安全性问题

免疫原性低

抗体产生时间滞后
维持时间短

JE DNA疫苗的优化策略

如何提高免疫原性？



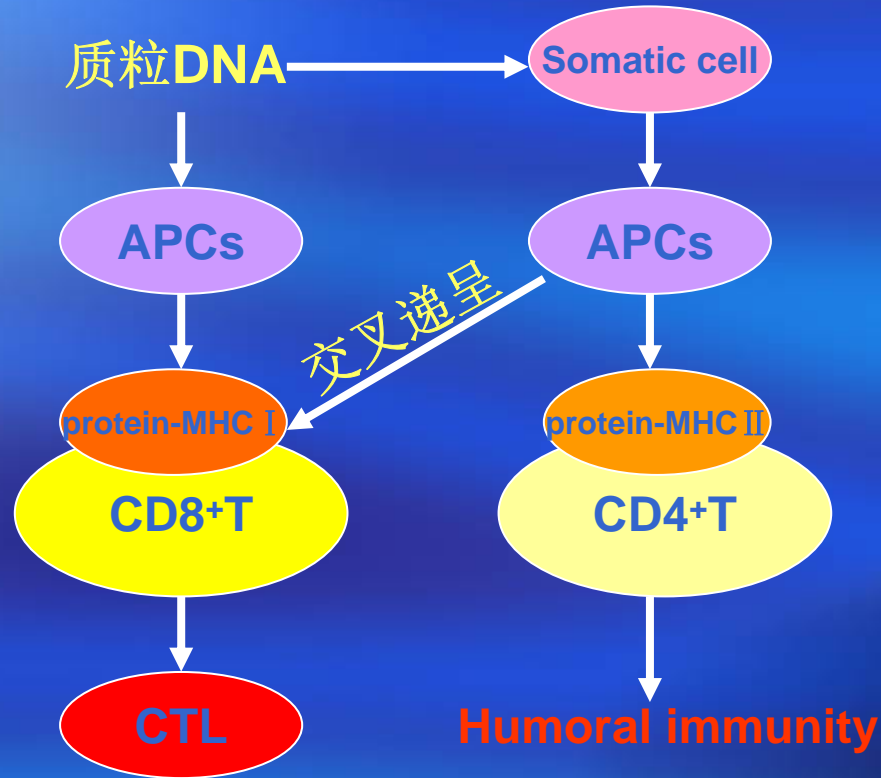
```
graph TD; A([如何提高免疫原性?]) --> B([目的基因和质粒载体的优化]); A --> C([抗原提呈细胞的运输]); A --> D([免疫佐剂]);
```

目的基因和
质粒载体的优化

抗原提呈细胞的运输

免疫佐剂

APCs是DNA疫苗免疫应答的关键环节



实验内容

- 本研究将pJME肌注免疫Balb/c小鼠，从接种局部肌肉组织浸润细胞组成的研究入手，应用HE染色、免疫组化、流式细胞仪和LDH释放法，探究接种局部DCs类别与成熟程度及其最终诱导的细胞免疫反应，为阐述DNA疫苗激活机体产生的抗原递呈机制提供更直接的组织学依据。

实验结果

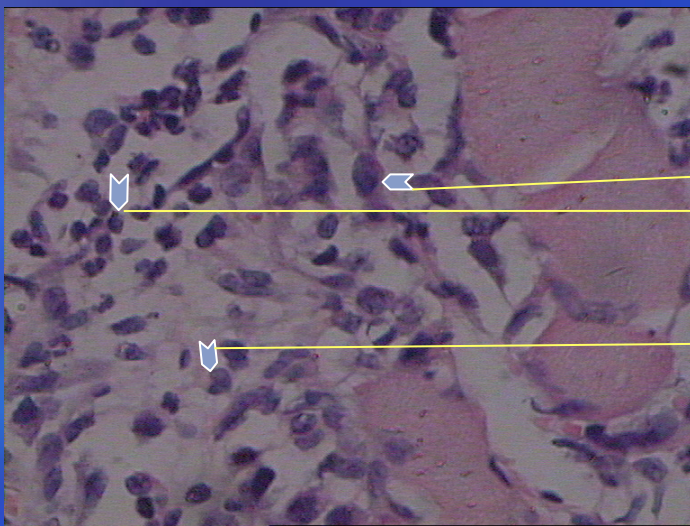
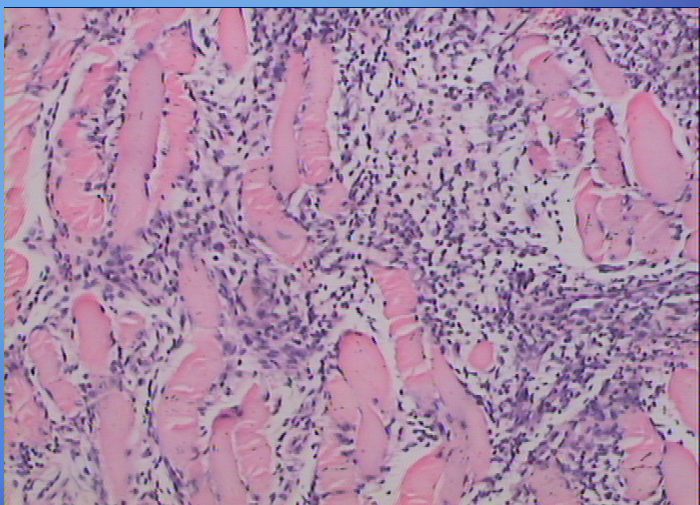
接种局部肌肉组织浸润细胞HE染色和免疫组化分析

组别	浸润细胞簇 分级	CD11c+细胞 百分比分级	CD11b+细胞 百分比分级
pJME	3+*	2.0+*	2.0+*
灭活疫苗	1.75+	1.25+	1.25+
空载体	0.5+	0.5+	0.5+

注：*表示与对照组比较 $P < 0.05$

图1 pJME局部肌肉组织细胞浸润 HE×100

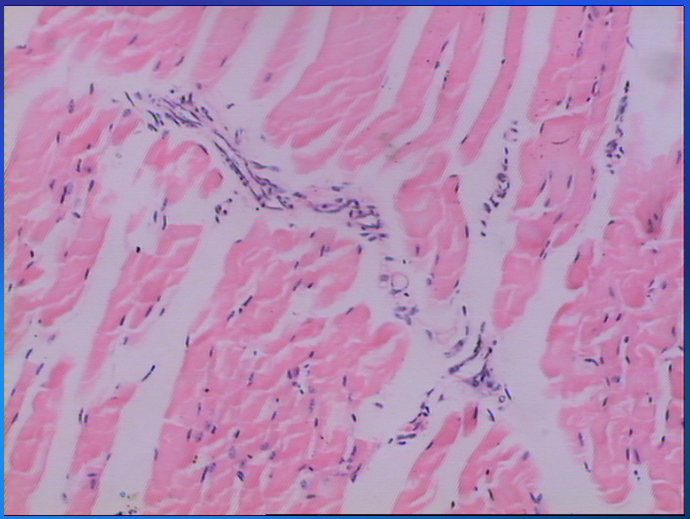
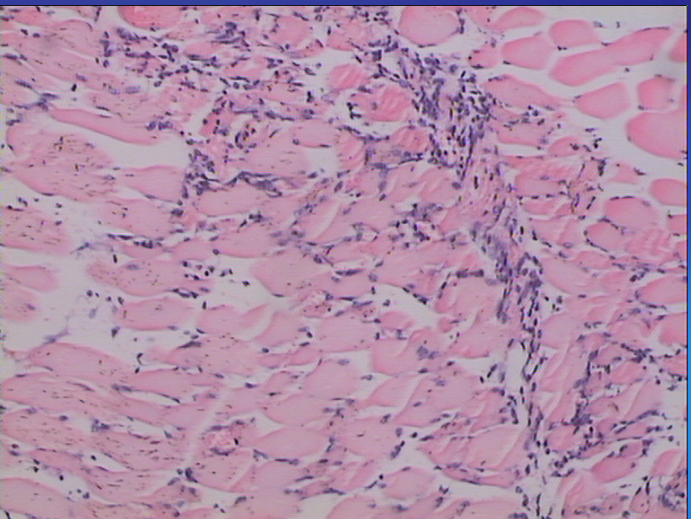
图2 pJME局部肌肉组织细胞浸润 HE×400



- 1 巨噬细胞样细胞
- 2 淋巴细胞
- 3 粒细胞

图3 灭活疫苗局部肌肉组织细胞浸润 HE×100

图4 空载体局部肌肉组织细胞浸润 HE×100



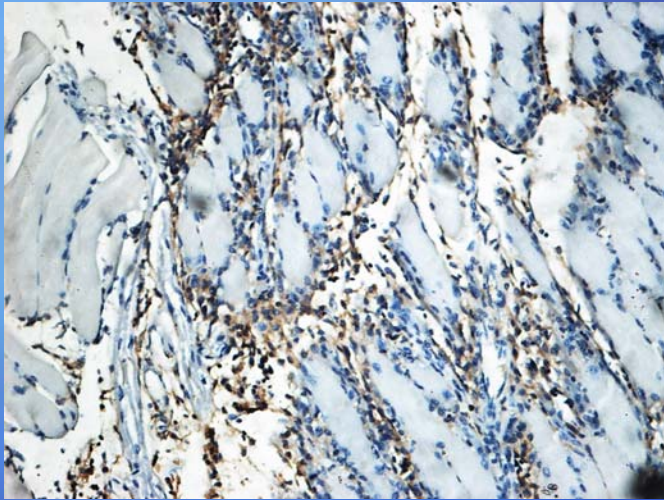


图5 pJME局部肌肉组织CD11b+细胞浸润 ×100

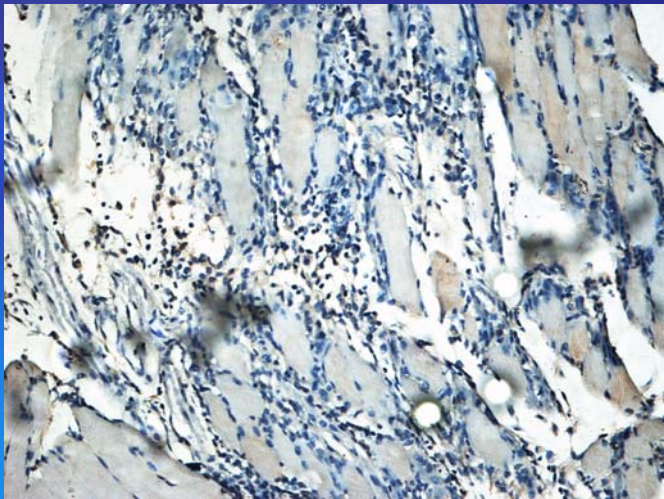


图6 pJME局部肌肉组织CD11c+细胞浸润 ×100

图7 JE灭活疫苗局部肌肉组织CD11b+细胞浸润
×100

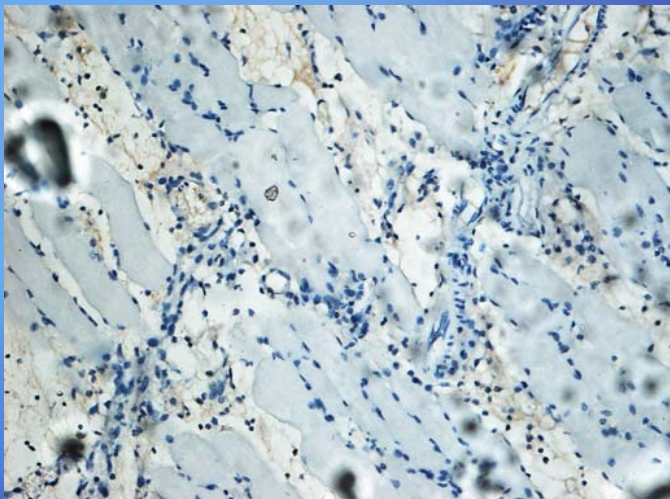


图8 JE灭活疫苗局部肌肉组织CD11c+细胞浸润
×100

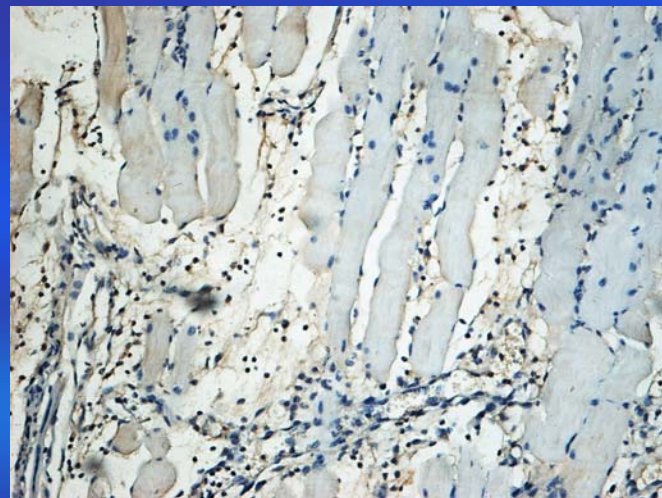


图9 空载体局部肌肉组织CD11b+细胞浸润
×100

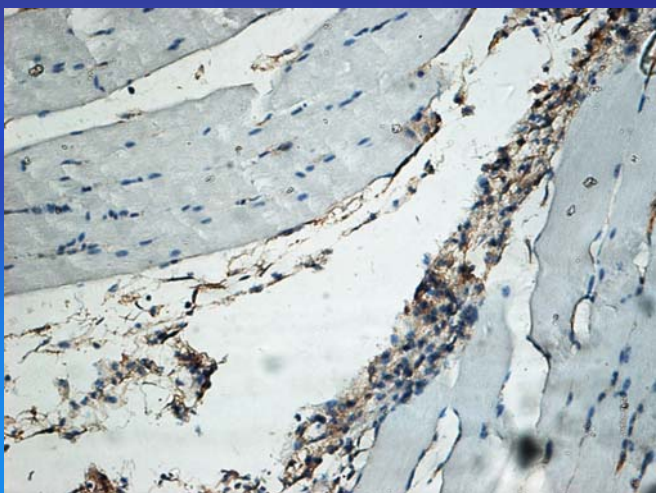
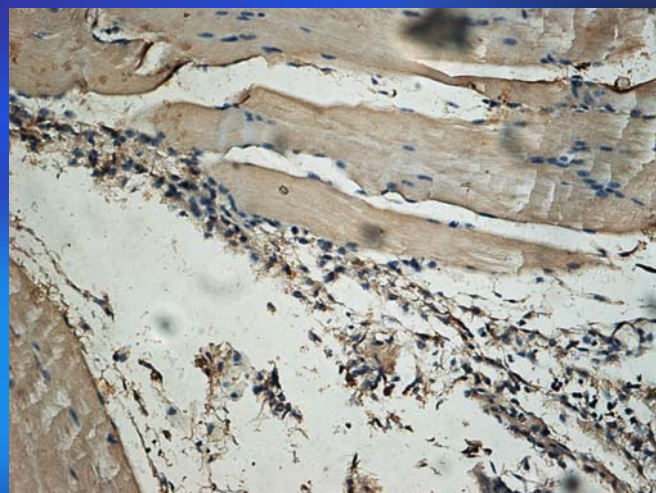


图10 空载体局部肌肉组织CD11c+细胞浸润
×100



实验结果

CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞亚群测定 (n=4, $\bar{x} \pm s$)

组别	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
pJME	30.91 \pm 0.72*	14.62 \pm 0.25*	1.66 \pm 0.77
灭活疫苗	23.73 \pm 0.17	10.80 \pm 0.39	2.20 \pm 0.67
空载体	23.78 \pm 0.21	11.97 \pm 0.06	1.98 \pm 0.01

注：*表示与对照组比较P<0.05

实验结果

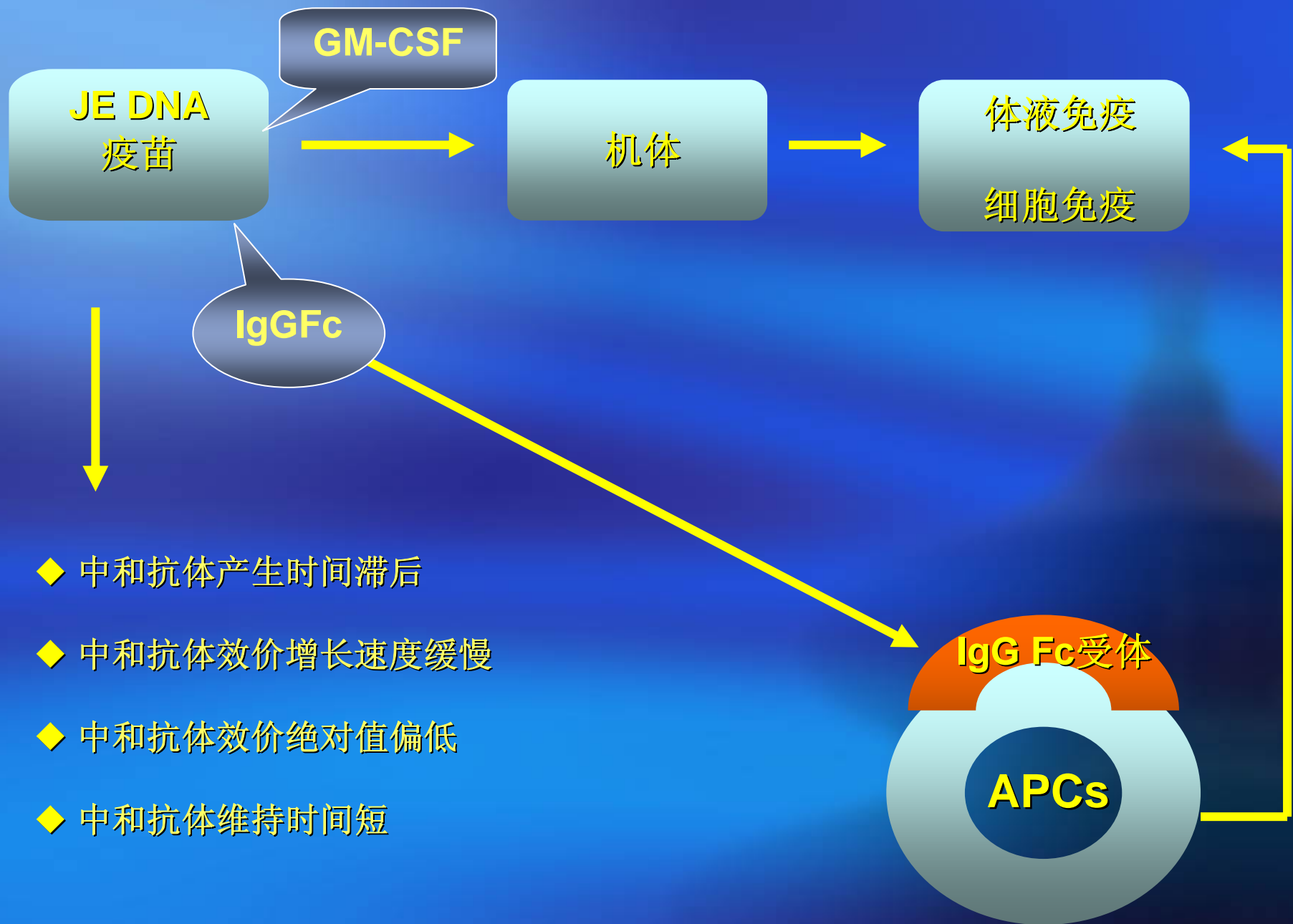
JEV特异性CTL活性

组别	Specific lysis (%)
pJME	29.1
灭活疫苗	23.9
空载体	6.0

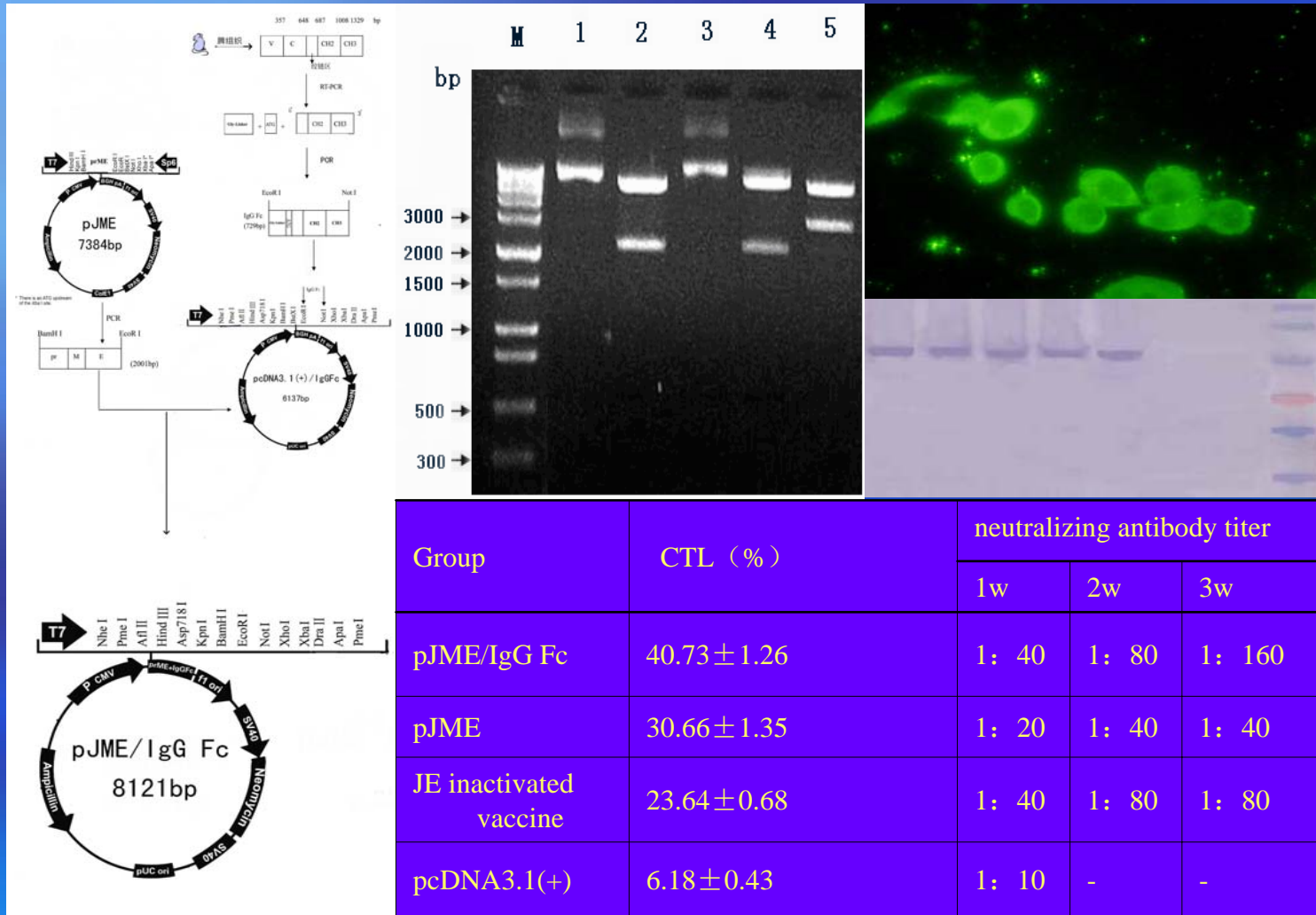
实验结论

- pJME诱导接种局部肌肉组织多种免疫活性细胞的参与，其中髓样树突状细胞数量显著多于对照组，呈非成熟状态，并且最终诱导较强的细胞免疫反应。
- 接种局部多种免疫活性细胞参与pJME诱导的免疫反应，非成熟髓样DCs在pJME肌注组诱导的细胞免疫中起到重要作用。

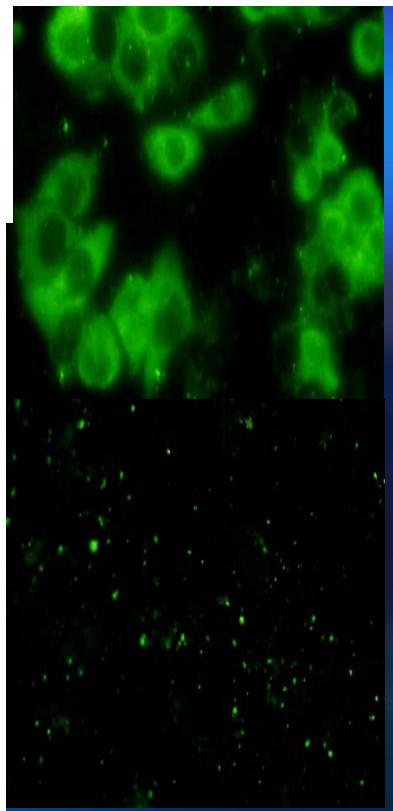
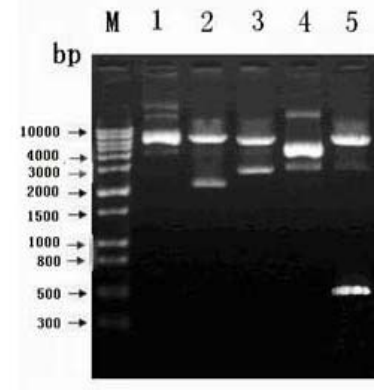
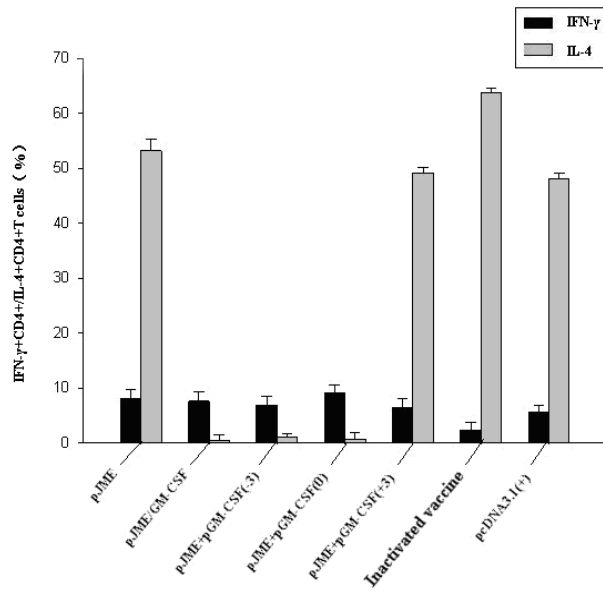
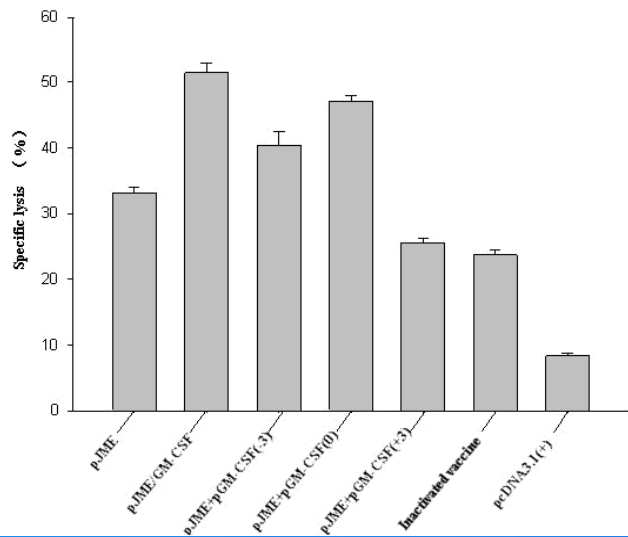
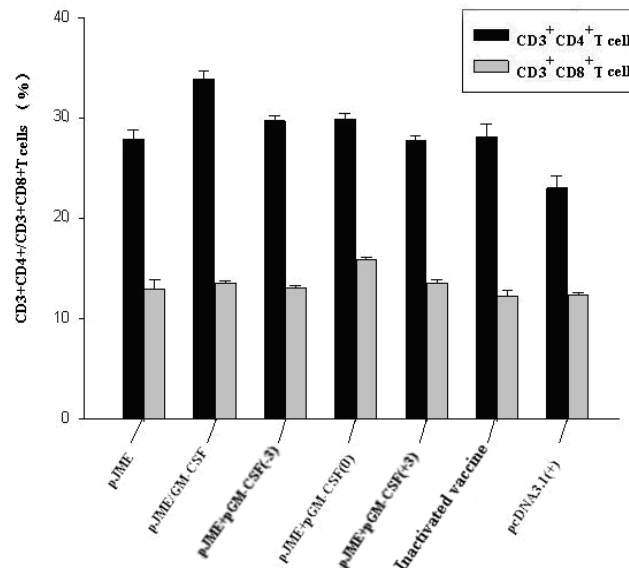
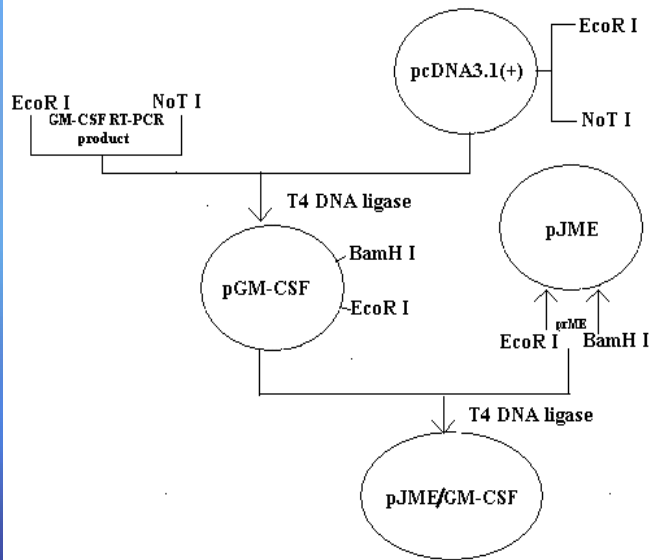
JE DNA疫苗靶向及增强效应研究



JEV prME基因与IgG Fc受体编码基因联合构建的DNA免疫



GM-CSF编码基因对乙型肝炎DNA疫苗细胞免疫增强效应的影响



谢谢！