

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(4):554-559; 4 April 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

幽门螺杆菌 Lpp20-IL2 核酸疫苗免疫活性

于文, 张艳*, 靖吉芳, 刘志杰

(湖南省南华大学病原生物研究所, 衡阳 421001)

摘要:【目的】观察 pcDNA3.1(+)/Lpp20-IL2 免疫 C57BL/6 小鼠后所产生的体液免疫和细胞免疫应答水平, 为研制高效、新型的幽门螺杆菌核酸疫苗提供实验依据。【方法】构建 pcDNA3.1(+)/Lpp20-IL2 重组载体, 并转染 HeLa 细胞, 用 Western-blot 观察鉴定其在真核细胞得到表达后免疫 C57BL/6 小鼠, ELISA 间接法测定小鼠血清中抗 Lpp20 IgG 抗体水平, ELISA 双抗体夹心法检测脾淋巴细胞培养上清中 IFN- γ 、IL4 水平, MTT 比色法检测脾淋巴细胞增殖反应, 免疫荧光组化法检测 Lpp20 蛋白在小鼠肌肉组织中的表达情况。【结果】成功构建了 pcDNA3.1(+)/Lpp20-IL2 真核表达载体, 且重组质粒能在 HeLa 细胞内有效表达目的蛋白; 小鼠接种 pcDNA3.1(+)/Lpp20-IL2 核酸疫苗后能产生特异性 IgG 抗体, 8 w 后 ELISA 测定血清抗体 A_{450} 值明显升高。核酸疫苗 pcDNA3.1(+)/Lpp20-IL2 免疫组小鼠脾淋巴细胞经特异性抗原刺激后, 培养上清中 IFN- γ 、IL4 含量明显升高。pcDNA3.1(+)/Lpp20-IL2 和 pcDNA3.1(+)/Lpp20 核酸疫苗组小鼠脾淋巴细胞经特异性抗原刺激后, 刺激指数明显高于空质粒组和 PBS 组。Lpp20 蛋白在小鼠肌肉组织中能够有效表达。【结论】幽门螺杆菌 Lpp20-IL2 融合基因核酸疫苗和 Lpp20 单基因核酸疫苗均能刺激机体产生较强细胞免疫应答和体液免疫应答, 且前者能诱导更强的细胞免疫应答。

关键词: 幽门螺杆菌; 脂蛋白 Lpp20; 白细胞介素 2; 核酸疫苗; 免疫活性

中图分类号: R37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 04-0554-06

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) 可引起胃炎、消化性溃疡、胃腺癌以及胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤等^[1-3]。如何预防和根除 *H. pylori* 感染是目前临床治疗的重点。由于 *H. pylori* 在抗生素治疗中耐药性问题的出现, 免疫预防将成为控制该类感染性疾病的最有前景的方法。

国内外在研制 *H. pylori* 疫苗方面取得了一定进展, 目前有全菌疫苗、减毒活疫苗、亚单位疫苗、活载体疫苗和核酸疫苗等, 但是目前 *H. pylori* 核酸疫苗的研究多集中于少数几种与菌株毒力相关的基因, 如 vacA、cagA、ureA、ureB 等, 且使用剂量较大, 在人和大动物中免疫效果尚不及全菌疫苗。为了克服这

些问题, 除了使用改造的疫苗载体外, 使用佐剂提高免疫应答效果也是常常采用的策略之一。

为进一步研究 *H. pylori* 核酸疫苗的免疫活性作用, 本研究拟通过分子生物学技术, 将 Lpp20 基因与免疫调节细胞因子 IL2 基因相结合, 构建重组 pcDNA3.1(+)/Lpp20-IL2 融合基因核酸疫苗, 通过分析免疫后动物体内所产生的体液免疫和细胞免疫应答水平, 以期 Lpp20-IL2 融合基因编码的融合蛋白免疫活性优于 Lpp20 单基因编码的蛋白, 克服需大剂量接种单基因核酸疫苗来达到免疫效果的缺陷, 同时强化细胞免疫, 为 *H. pylori* 新一代核酸疫苗的研制提供实验依据。

基金项目: 湖南省自然科学基金优秀面上项目 (06JJ2093); 湖南省教育厅青年基金 (08B067)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-734-8282907; E-mail: nhzhangyan@yahoo.com.cn

作者简介: 于文 (1980-), 男, 湖南永州人, 硕士研究生, 检验师, 主要从事抗感染免疫研究。E-mail: yuwen800823@tom.com

收稿日期: 2009-09-14; 修回日期: 2009-11-30

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、细胞和质粒: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109、pcDNA3.1 (+) 真核表达载体、HeLa 细胞为本室保存。pGEX-6P-2/Lpp20-IL2、pcDNA3.1 (+)/Lpp20 和 pcDNA3.1 (+)/IL2 重组质粒由本实验组前期构建。

1.1.2 主要试剂和仪器: TfxTM-20 Reagent 转染试剂盒购自 Promega 公司; 蛋白纯化试剂盒购自美国 Genscript 公司; IFN- γ 、IL4 定量检测试剂盒购自晶美生物工程公司 (进口分装); pfuDNA 聚合酶为 Takara 公司产品; T4 连接酶、*Bam*H I、*Eco*R I、*Xho*I 限制性内切酶购自 Fermentas 公司; 兔抗 *H. pylori* 多克隆抗体 (ab20629) 购自 Abcam 公司; rLpp20 蛋白为本实验组前期构建原核载体 pGEX-6P-2/Lpp20 表达纯化^[4]。其它试剂均为国产分析纯。倒置荧光显微镜是日本 Nikon 公司产品, Multiskan MK-3 全自动酶标仪是芬兰雷勃公司产品, 垂直电泳仪和半干转印仪为 Bio-Rad 公司产品。

1.2 pcDNA3.1 (+)/Lpp20-IL2 真核表达载体的构建

*Bam*H I 和 *Xho*I 同时双酶切 pGEX-6P-2/Lpp20-IL2 和 pcDNA3.1 (+), 分别回收酶切后产物, 连接后转化于 *E. coli* JM109, 挑选阳性克隆进行 PCR、酶切鉴定后送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.3 pcDNA3.1 (+)/Lpp20-IL2 重组质粒转染 HeLa 细胞

按照 TfxTM-20 Reagent 转染试剂盒的说明书进行操作。将已转染好的细胞置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 5 h 后, 更换成完全生长培养基 (含 10% 小牛血清、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养基), 每孔 2 mL, 再继续培养 43 h。同时设空质粒对照组。

1.4 免疫印迹检测转染细胞中表达的 Lpp20-IL2 蛋白

收集转染后的细胞, 加入 1 \times SDS 加样缓冲液, 煮沸 10 min 后离心取上清进行 SDS-PAGE, 采用 BIO-RAD 半干转印槽将 PAGE 胶上的蛋白经 15 V, 30 min 转至 NC 膜上, 以兔抗 *H. pylori* 血清为一抗, HRP 标记的山羊抗兔 IgG 为二抗, 进行 Western blot 来鉴定 Lpp20-IL2 重组蛋白。

1.5 核酸疫苗的免疫接种

将 50 只雌性 C57BL/6 小鼠随机分为 5 组, 即

PBS 组、pcDNA3.1 (+) 空质粒、pcDNA3.1 (+)/Lpp20 组、pcDNA3.1 (+)/IL2 组和 pcDNA3.1 (+)/Lpp20-IL2 组, 每组各 10 只; 将大量提取的空质粒和重组质粒分别用无菌 PBS 稀释至 1 μ g/(L; 将质粒 DNA 与无菌 PBS 分别注射于各组小鼠左后腿股四头肌, 100 μ L/次。隔周免疫 1 次, 共免疫 4 次。

1.6 ELISA 法检测免疫小鼠特异性抗 *H. pylori* Lpp20 抗体

检测免疫小鼠血清中特异性抗体采用间接 ELISA 法, 包被抗原为纯化 rLpp20, 用包被液 4 $^{\circ}$ C 包被 96 孔酶标板过夜, 10% BSA-PBS 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h, PBST 洗涤, 加入倍比稀释的不同浓度的待测免疫小鼠血清, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBST 充分洗涤后, 加相应的 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 作为二抗, 37 $^{\circ}$ C 再孵育 1 h, PBST 充分洗涤后加入显色液和终止液。用酶标仪读取 450 nm 波长的 A 值。以实验组 A₄₅₀ 值/空白对照组 A₄₅₀ 值 \geq 2.1 为阳性判断标准。

1.7 ELISA 双抗体夹心法检测 IFN- γ 、IL4 产生水平

根据试剂盒提供的说明书操作。

1.8 MTT 比色法检测免疫小鼠脾淋巴细胞增殖

初次免疫后 10 w 剖杀小鼠, 无菌取脾脏, 经 200 目不锈钢筛网滤过, 制成单个细胞悬液, 加入 5 mL 0.83% NH₄Cl 放置 5 min 溶解红细胞, 550 \times g 离心 5 min 收集淋巴细胞, 用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基重悬细胞。台酚蓝染色, 调整活细胞数为 1 \times 10⁶/mL, 接种于 96 孔板中, 200 μ L/孔; 实验组每孔加入 rLpp20 抗原 2 μ g, 对照组不加入 rLpp20 抗原。将加脾细胞的 96 孔板于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 中培养 68 h 后, 每孔加入 MTT (5 g/L) 20 μ L, 继续培养 4 h 后弃上清, 每孔加入二甲基亚砜 (DMSO) 150 μ L, 震荡溶解 15 min, 570 nm 波长测定各孔的 A 值。根据刺激指数 (SI) 大小来判断增殖程度, SI = 实验组平均 A₅₇₀ 值/对照组平均 A₅₇₀ 值。

1.9 免疫荧光组织化学染色法观察 Lpp20-IL2 基因在小鼠肌肉组织的表达

初次免疫后 10 w 剖杀小鼠, 将小鼠后腿股四头肌与周边组织分离, 小心取约 0.5 cm 中段后腿股四头肌浸泡于 70% 酒精的小瓶中, 做好标记后送交切片室制作石蜡组织切片。将组织切片梯度酒精脱蜡后, 用 95 $^{\circ}$ C 0.01 mol/L 枸橼酸钠缓冲溶液 (pH6.0) 进行复性, 然后滴加 5% BSA 封闭液封闭 20 min, 以兔抗 *H. pylori* 多克隆抗体为一抗, 孵育 3 h; 以 FITC

标记的山羊抗兔 IgG 为二抗, 37°C 暗湿盒内孵育 30 min; PBS (pH 9.2) 洗涤后快速将切片移入暗室, 置荧光显微镜下观察并拍照保存。

1.10 统计学处理

运用 SPSS13.0 软件, 实验数据以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 外周血抗体 IgG、细胞因子水平及 MTT 刺激指数采用 t 检验进行比较。

2 结果

2.1 pcDNA3.1 (+)/Lpp20-IL2 重组质粒的鉴定

重组质粒 pcDNA3.1 (+)/Lpp20-IL2 经 PCR 和双酶切鉴定, 证实重组质粒含有与预期值相符的目的基因片段, 测序结果显示重组质粒含有 993 bp 的目的片段, 经 BLAST 比对发现, 插入序列读码框正确, Lpp20 基因与 *H. pylori* 26695 标准株 Lpp20 基因序列 (ACCESSION: AE000511) 有一密码子第 3 个碱基突变 (510: A-G), 但编码的氨基酸并未改变, 均为亮氨酸; IL2 基因与人 IL2 基因序列 (ACCESSION: NM_000586) 作 BLAST 比较, 结果完全一致。

2.2 pcDNA3.1 (+)/Lpp20-IL2 在 HeLa 细胞中的表达

提取转染细胞总蛋白进行 SDS-PAGE, 转膜, 以兔抗 *H. pylori* 多克隆抗体为一抗, Western blot 分析鉴定表达产物免疫反应性。结果发现重组质粒 pcDNA3.1 (+)/Lpp20-IL2 转染组出现一条免疫反应带, 而空质粒 pcDNA3.1 (+) 转染组未见免疫反应带 (图 1)。

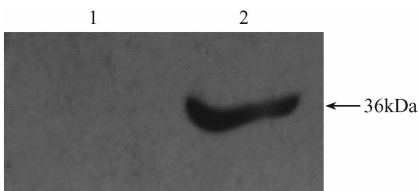


图 1 转染细胞中表达的 Lpp20-IL2 蛋白的 Western blot 鉴定

Fig. 1 Western blot analysis of Lpp20-IL2 expressed in HeLa cells.
1. HeLa cells transfected with pcDNA3.1 (+); 2. HeLa cells transfected with pcDNA3.1 (+)/Lpp20-IL2.

2.3 血清特异性抗体的检测

间接 ELISA 法检测小鼠血清中的特异性 IgG 抗体水平, pcDNA3.1 (+)/Lpp20、pcDNA3.1 (+)/Lpp20-IL2 核酸疫苗组在初次免疫 8 w 后抗体滴度分别达到 1:2048 和 1:4096, 抗体 A 值显著升高, 与空载体对照组相比差异具有显著性 ($P < 0.01$), 结果如图 2 所示。同时 pcDNA3.1 (+)/Lpp20-IL2 免疫组和 pcDNA3.1 (+)/Lpp20 免疫组比较差异具有显著性 ($P < 0.01$), 前者抗体 A 值升高更为显著。

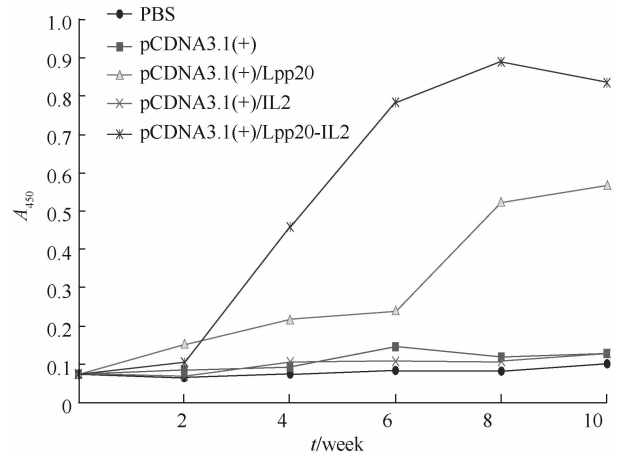


图 2 各免疫组不同时间 IgG 抗体 A 值变化趋势图
Fig. 2 A₄₅₀ of special IgG antibody in sera of immunized mice.

2.4 脾淋巴细胞培养上清 IFN- γ 、IL4 水平的检测

按照说明书建立 IFN- γ 、IL4 标准方程、绘制标准曲线。结果显示 pcDNA3.1 (+)/Lpp20、pcDNA3.1 (+)/Lpp20-IL2 免疫组小鼠脾细胞培养上清中 IFN- γ 和 IL4 的水平明显高于 pcDNA3.1 (+) 组, 差异具有显著性 ($P < 0.01$)。同时 pcDNA3.1 (+)/Lpp20-IL2 免疫组和 pcDNA3.1 (+)/Lpp20 免疫组之间的 IFN- γ 、IL4 水平差异也具有统计学意义 ($P < 0.01$), 前者 IFN- γ 和 IL4 的水平升高更为显著 (表 1)。

2.5 MTT 比色法检测淋巴细胞的增殖

小鼠脾淋巴细胞经纯化的 rLpp20 刺激后, 核酸疫苗 pcDNA3.1 (+)/Lpp20-IL2 免疫组小鼠脾淋巴细胞增殖活性明显增强, 与 pcDNA3.1 (+) 免疫组比较差异具有显著性 ($P < 0.01$), 与 pcDNA3.1

表 1 免疫小鼠脾细胞培养上清中 IFN- γ 、IL4 含量 (pg/mL)

Table 1 IFN- γ and IL4 in cultural supernatant of spleen lymphocytes from immunized mice

Groups	Number of mice	IFN- γ ($\bar{x} \pm s$)	IL4 ($\bar{x} \pm s$)
PBS	10	14.53 \pm 3.58	26.37 \pm 7.80
pcDNA3.1 (+)	10	18.30 \pm 5.32	40.10 \pm 18.54
pcDNA3.1 (+)/Lpp20	10	204.86 \pm 17.02	374.97 \pm 54.92
pcDNA3.1 (+)/IL2	10	40.47 \pm 14.98	156.25 \pm 46.86
pcDNA3.1 (+)/Lpp20-IL2	10	366.79 \pm 61.94	650.86 \pm 120.35

(+) / Lpp20 组比较, 小鼠脾淋巴细胞增殖活性略有增强, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 2)。

表 2 免疫小鼠的脾淋巴细胞增殖反应 (刺激指数)

Table 2 Stimulation index (SI) of spleen cells of different immune mice

Groups	Number of mice	Stimulation index (SI) ($x \pm s$)
PBS	10	1.14 \pm 0.12
pcDNA3.1 (+)	10	1.20 \pm 0.14
pcDNA3.1 (+) / IL2	10	1.36 \pm 0.14
pcDNA3.1 (+) / Lpp20	10	1.91 \pm 0.24
pcDNA3.1 (+) / Lpp20-IL2	10	2.26 \pm 0.35

2.6 pcDNA3.1 (+) / Lpp20-IL2 在小鼠肌肉组织中的表达

对每组 10 只小鼠肌肉组织进行免疫荧光组织化学检测, 结果显示, 免疫空质粒组小鼠组织切片几

乎不见荧光, 而免疫重组质粒 pcDNA3.1 (+) / Lpp20 和 pcDNA3.1 (+) / Lpp20-IL2 组小鼠组织切片可见黄绿色荧光的存在, 组织中由于荧光的存在而使组织轮廓在暗视野下依稀可见 (图 3)。

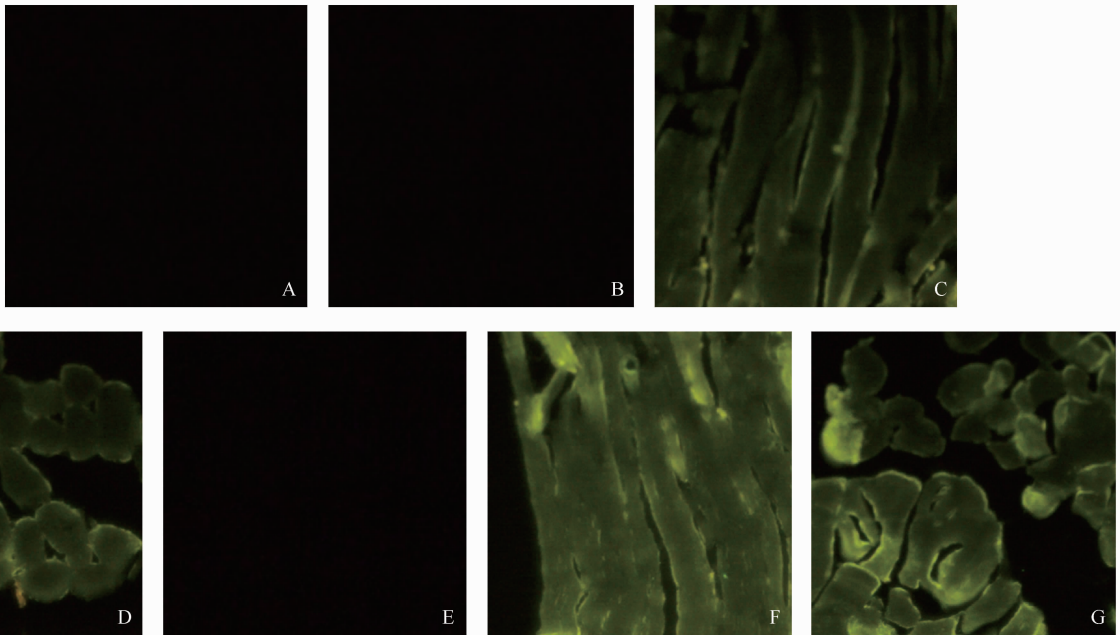


图 3 小鼠肌肉组织 Lpp20、Lpp20-IL2 基因表达的免疫荧光分析 ($\times 100$)

Fig. 3 Immunofluorescence analysis of Lpp20 and Lpp20-IL2 expression in muscular tissue of mice. A: Muscular tissue of mice immunized by PBS; B: Muscular tissue of mice immunized by pcDNA3.1 (+); C, D: Muscular tissue of mice immunized by pcDNA3.1 (+) / Lpp20; E: Muscular tissue of mice immunized by pcDNA3.1 (+) / IL2; F, G: Muscular tissue of mice immunized by pcDNA3.1 (+) / Lpp20-IL2.

3 讨论

DNA 疫苗是近年来从基因治疗研究中衍生而发展起来的, 是一种全新的免疫技术, 以其独特和简便的特性被称为疫苗研究的第三次革命。该疫苗的特点是它以特有的有效的抗原提呈方式以及质量高、运输储存方便、免疫原性强、安全、高效等优势, 成为抗感染、抗肿瘤疫苗研究的热点^[5-6]。

作为革兰阴性细菌, *H. pylori* 能释放外膜小泡 (outer membrane vesicles, OMV), 其中含有 LPS、外膜蛋白和 VacA、Lpp20 脂蛋白等其他抗原。纯化的 OMV 能保护小鼠免受细菌攻击, 受到保护的小鼠体

内始终存在针对 Lpp20 的抗体反应, 且用纯化或天然 Lpp20 免疫小鼠也能产生保护作用, 由此推断 OMV 的保护作用主要由 Lpp20 介导。*H. pylori* 的 Lpp20 蛋白是定位于细菌外膜上的一种高度保守的脂蛋白, 分子质量约为 18KDa^[7]。国内学者张荣光等^[8]利用生物信息学分析了 *H. pylori* 郑州株 Lpp20 基因, 证实 Lpp20 基因有相当高的聚类性和保守性。国内外研究都证实了 Lpp20 具有良好的免疫原性和免疫保护性, 确实是一理想疫苗候选抗原^[9-12]。我们前期的研究^[4]也表明 Lpp20 也许有希望发展成为新的疫苗候选抗原。故本研究中我们将 Lpp20 目的基因插入高效表达载体 pcDNA3.1 (+) 多克隆位

点中来构建 DNA 疫苗,并以 IL2 作为免疫佐剂,构建融合基因核酸疫苗。IL2 作为 DNA 疫苗的一种基因佐剂,其产生的效果还缺乏一致性。它对体液免疫和细胞免疫都有着不同程度的增强作用,但似乎更倾向于增强细胞免疫,诱导免疫应答向 Th1 型转变。IL2 的这种佐剂作用已经得到了广泛的研究和应用,其效果受到肯定^[13-17]。

抗体反应是发挥 *H. pylori* 免疫保护作用的主要免疫反应之一,为观察体液免疫效应水平,我们采用间接 ELISA 法检测实验组与对照组特异性抗体的滴度,在初次免疫后每隔 2 w 收集小鼠血清检测特异性抗体产生情况,结果发现血清特异性抗体随着免疫时间的增加和多次加强免疫而增高,在初次免疫后第 4 w,部分实验组小鼠血清中就可检测到较高滴度的特异性抗体,至第 8 w pcDNA3.1(+)/Lpp20-IL2 免疫组特异性抗体滴度显著升高,达到 1:4096;pcDNA3.1(+)和 PBS 免疫组均无特异性抗体检出,表明 *H. pylori* 核酸疫苗均能够在小鼠体内诱导较强特异性体液免疫应答。本研究结果显示,在抗体反应中,IL2 的协同免疫显著提高了 Lpp20 抗原特异的 IgG 抗体滴度。

细胞介导免疫在 *H. pylori* 保护性免疫机制中也发挥一定的作用,而淋巴细胞增殖反应是测定细胞免疫反应功能的综合性指标,在一定的程度上可以反应机体的特异性细胞免疫功能,本实验中采用 MTT 法发现 Lpp20 单基因核酸疫苗组和 Lpp20-IL2 融合基因核酸疫苗组小鼠脾淋巴细胞经相应特异性抗原刺激后刺激指数均明显高于 PBS 和空质粒对照组。Lpp20-IL2 融合基因核酸疫苗组小鼠脾淋巴细胞经相应特异性抗原刺激后,培养上清中 IFN- γ 、IL4 均显著升高,与空质粒组之间有显著性差异;且与 Lpp20 单基因核酸疫苗组 IFN- γ 、IL4 水平有显著性差异。这进一步表明构建的 DNA 疫苗均能够在小鼠体内诱导较强 Th1 介导的细胞免疫应答,从而证实构建的 DNA 疫苗均能在小鼠体内有效表达且具有较强的免疫活性。

本实验证实 *H. pylori* Lpp20 单基因核酸疫苗和 Lpp20-IL2 融合基因核酸疫苗经肌肉注射均可诱生较强的体液免疫和细胞免疫应答,而 Lpp20-IL2 融合基因核酸疫苗较之前者能诱导更强的细胞免疫应答反应,这在一定程度上为 *H. pylori* 的预防带来了新的希望,为进一步研究 *H. pylori* DNA 疫苗的保护性及其相关蛋白在动物体内的生物学功能,最终建立能完全有效抗 *H. pylori* 感染的动物模型提供实验

依据,为研制人用的高效核酸疫苗打下一定基础。

参考文献

- [1] Peek RM. *Helicobacter pylori* infection and disease: from humans to animal models. *Disease models & mechanisms*, 2008,1(1): 50-55.
- [2] Souza RC, Lima JH. *Helicobacter pylori* and gastroesophageal reflux disease: a review of this intriguing relationship. *Diseases of the esophagus: official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus*, 2009,22(3): 256-263.
- [3] Yamaoka Y, Kato M, Asaka M. Geographic differences in gastric cancer incidence can be explained by differences between *Helicobacter pylori* strains. *Internal medicine*, 2008,47(12): 1077-1083.
- [4] 刘志杰,张艳,黎村艳,等. 幽门螺杆菌 Lpp20 核酸疫苗的构建及其免疫活性的初步研究. 中华微生物学和免疫学杂志 (*Chinese Journal of Microbiology and Immunology*), 2008,28(11): 1035-1039.
- [5] 李学荣,余新炳. 核酸疫苗及其免疫机制研究. 中国人兽共患病杂志 (*Chinese Journal of Zoonoses*), 2000,16(6): 82-86.
- [6] Abdulhaqq SA, Weiner DB. DNA vaccines: developing new strategies to enhance immune responses. *Immunologic research*, 2008,42(1-3): 219-232.
- [7] Keenan J, Oliaro J, Domigan N, et al. Immune response to an 18-kilodalton outer membrane antigen identifies lipoprotein 20 as a *Helicobacter pylori* vaccine candidate. *Infection and immunity*, 2000,68(6): 3337-3343.
- [8] 张荣光,段广才,范清堂,等. 幽门螺杆菌 Lpp20 基因的克隆及序列分析. 中华微生物学和免疫学杂志 (*Chinese Journal of Microbiology and Immunology*), 2003,23(8): 639.
- [9] Cao P, McClain MS, Forsyth MH, et al. Extracellular release of antigenic proteins by *Helicobacter pylori*. *Infection and immunity*, 1998,66(6): 2984-2986.
- [10] Keenan JI, Rijpkema SG, Durrani Z, et al. Differences in immunogenicity and protection in mice and guinea pigs following intranasal immunization with *Helicobacter pylori* outer membrane antigens. *FEMS immunology and medical microbiology*, 2003,36(3): 199-205.
- [11] 李妍,宁云山,龙敏,等. 幽门螺杆菌 NCTC11639 标准株 lpp20 基因的克隆、表达及其抗原性的鉴定. 中华微生物学和免疫学杂志 (*Chinese Journal of Microbiology and Immunology*), 2006,26(5): 417.
- [12] 张荣光,段广才,范清堂,等. 幽门螺杆菌脂蛋白基因的重组表达和免疫活性鉴定. 中国人兽共患病学报 (*Chinese Journal of Zoonoses*), 2007,23(9): 903-906.

- [13] 徐灿,李兆申,杜奕奇,等. 编码 hsp60 和 IL-2 的幽门螺杆菌减毒沙门菌核酸疫苗. 第二军医大学学报 (*Academic Journal of Second Military Medical University*),2005,26(5): 519-523.
- [14] 刘晓娟,朱明昭,宋国兴,等. 白介素 2 基因佐剂协同单纯疱疹病毒 1 型糖蛋白 D 核酸疫苗免疫诱导的特异性免疫应答. 中国医学科学院学报 (*Chinese Medical Sciences Journal*),2005,27(1): 67-72.
- [15] Kumar S, Ahi YS, Salunkhe SS, et al. Effective protection by high efficiency bicistronic DNA vaccine against infectious bursal disease virus expressing VP2 protein and chicken IL-2. *Vaccine*,2009,27(6): 864-869.
- [16] Yang Y, Chen J, Li H, et al. Porcine interleukin-2 gene encapsulated in chitosan nanoparticles enhances immune response of mice to piglet paratyphoid vaccine. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*,2007,30(1): 19-32.
- [17] Shi C, Yuan S, Zhang H, et al. Cell-mediated immune responses and protective efficacy against infection with *Mycobacterium tuberculosis* induced by Hsp65 and hIL-2 fusion protein in mice. *Scandinavian journal of immunology*,2009,69(2): 140-149.

Construction of *Helicobacter pylori* Lpp20-IL2 DNA vaccine and evaluation of its immunocompetence in C57BL/6 mice

Wen Yu, Yan Zhang*, Jifang Jing, Zhijie Liu

(Institute of Pathogenic Biology, University of South China, Hengyang 421001, China)

Abstract: [**Objectives**] To evaluate the humoral and cellular immune responses in C57BL/6 mice induced by pcDNA3.1(+)/Lpp20-IL2 for further development of DNA vaccine against *H. pylori* infection. [**Methods**] The eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+)/Lpp20-IL2 was constructed and then transfected into HeLa cells using liposome. Western blot was used to verify the expression of Lpp20 antigen gene in HeLa cells. Then five groups of 6-week-old C57BL/6 mice were immunized intramuscularly with either of the following vaccines: pcDNA3.1(+)/Lpp20-IL2, pcDNA3.1(+)/Lpp20, pcDNA3.1(+)/IL2, mock plasmid pcDNA3.1(+), or PBS four times at 1-week interval. Six weeks after the last injection, the specific IgG in the sera of C57BL/6 mice and the cytokine content of IFN- γ and IL4 in mice spleen lymphocyte culture medium after stimulation by recombinant Lpp20 (rLpp20) was tested quantitatively by ELISA, respectively. The proliferation of spleen cells was measured by MTT assay. Lpp20-IL2 fusion protein in mouse muscular tissue was detected by immunofluorescence histochemistry. [**Results**] The eukaryotic expression recombinant pcDNA3.1(+)/Lpp20-IL2 was successfully constructed and could be expressed in HeLa cells. The significant specific antibody titers were detected by ELISA in pcDNA3.1(+)/Lpp20-IL2 DNA vaccine groups and the highest titer was 1:4096 after eight weeks. The cytokines content of IFN- γ and IL4 in cultural supernatant of spleen lymphocytes from mice immunized with pcDNA3.1(+)/Lpp20-IL2 increased significantly. After stimulated by corresponding antigen, the stimulation index of pcDNA3.1(+)/Lpp20-IL2 and pcDNA3.1(+)/Lpp20 group were higher than that of control groups ($P < 0.01$). Lpp20-IL2 fusion protein could be expressed in mouse muscular tissue. [**Conclusions**] We have successfully constructed the recombinant eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1(+)/Lpp20-IL2 and the Lpp20-IL2 fusion protein could be effectively expressed in HeLa cells. Both pcDNA3.1(+)/Lpp20-IL2 and pcDNA3.1(+)/Lpp20 DNA vaccines could induce strong cellular immunity and humoral immunity in C57BL/6 mice, and the former could induce more powerful cellular immunologic response.

Keywords: *Helicobacter pylori*; Lpp20; IL2; DNA vaccine; immunogenicity

(本文责编:王晋芳)