

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
52(11):1392-1399; 4 November 2012
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

IL-2 与 IL-7 基因对犬细小病毒 VP2 DNA 疫苗在小鼠的免疫增强作用

陈慧慧¹, 仲飞^{1*}, 李秀锦^{2*}, 王璐¹, 孙岩¹, 能昌爱², 张考¹, 李文艳¹, 温洁霞¹

¹河北农业大学动物科技学院基础兽医部, 农业部动物疫病病原生物学华北科学观测实验站, 河北省兽用生物制品工程技术研究中心, 保定 071001

²燕山大学环境与化学工程学院生物工程系, 秦皇岛 066004

摘要: 【目的】探讨犬白细胞介素-2(cIL-2)与犬 IL-7(cIL-7)基因对犬细小病毒(CPV)VP2 蛋白 DNA 疫苗免疫增强的协同作用。【方法】利用含内部核蛋白体进入位点(IRES)的真核表达载体构建 cIL-2 和 cIL-7 双基因表达载体。然后利用本实验室构建的 CPV VP2、cIL-2 和 cIL-7 表达载体及本文构建的双基因表达载体,以不同组合对小鼠进行免疫,即 VP2 单免疫,VP2 + cIL-2、VP2 + cIL-7 和 VP2 + cIL-2/cIL-7 共免疫。通过 ELISA 方法检测免疫后不同时间小鼠血清 VP2 的抗体水平,并分析中和抗体的效价,通过细胞增殖实验检测免疫后小鼠脾脏淋巴细胞的增殖反应,并用 ELISA 方法测定小鼠淋巴细胞 γ 干扰素的表达水平。【结果】本实验构建的双基因表达载体结构正确,并能够介导 cIL-2 与 cIL-7 基因在真核细胞中进行同步分泌表达。小鼠免疫结果表明,VP2 + cIL-2/cIL-7 共免疫组小鼠血清的抗体滴度和中和抗体效价均显著高于 VP2 + cIL-2 和 VP2 + cIL-7 共免疫组 ($P < 0.05$)。VP2 + cIL-2/cIL-7 共免疫组小鼠的淋巴细胞刺激指数比其它免疫组略有升高但尚未达到显著水平,然而 γ 干扰素的表达水平显著高于其它免疫组 ($P < 0.05$)。【结论】cIL-2 和 cIL-7 基因对 CPV VP2 DNA 疫苗免疫原性的增强作用具有明显的协同效应。

关键词: 白细胞介素-2, 白细胞介素-7, 生物佐剂, 犬细小病毒, VP2 DNA 疫苗

中图分类号: R37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2012)11-1392-08

犬细小病毒病是由犬细小病毒 (Canine parvovirus, CPV) 引起的一种以出血性肠炎和心肌炎为特征的急性传染病^[1],是危害我国养犬业最为严重的传染病之一。目前对该病尚无有效的治疗药物,主要通过接种弱毒疫苗进行预防。但由于接种弱毒疫苗后易出现亚临床感染或弱毒苗毒力返强等现象,使人们在该病的预防上受到极大困扰。近年

来,DNA 疫苗受到国内外学者的广泛关注,因为它既可以诱导体液免疫应答又可以诱导细胞免疫应答。Gupta 等用含 CPV VP2 基因的表达载体免疫犬获得了较好的保护性免疫反应^[2]。然而 DNA 疫苗的免疫水平相对较低,选择适当的 DNA 疫苗佐剂来加强 DNA 疫苗的免疫原性具有非常重要的意义。近些年有关细胞因子类生物佐剂促进 DNA 疫苗免

基金项目:国家自然科学基金(30771586);河北省自然科学基金(C2008000244)

* 通信作者。Tel: +86-312-7528473; E-mail: feizhong2000@yahoo.com; lixiujin9824@yahoo.com.cn

作者简介:陈慧慧(1986-),女,河北石家庄人,硕士研究生,主要从事分子病毒学与分子免疫学方面的研究。E-mail: flying7700@163.com

收稿日期:2012-05-08;修回日期:2012-05-27

疫原性的研究受到人们的广泛关注。细胞因子表达载体作为 DNA 疫苗佐剂具有释放缓慢、作用时间持久的特点,可明显增强病毒或细菌 DNA 疫苗的免疫效果^[3]。本实验室曾用犬的 IL-12、GM-CSF、IL-2、IL-7 等细胞因子基因和大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚基(LTB)基因作为生物佐剂,在小鼠体内分析了它们对 CPV VP2 DNA 疫苗的免疫增强作用,结果显示上述细胞因子基因和 LTB 基因对 VP2 DNA 疫苗的免疫原性有明显的增强作用。已知在动物体内,IL-2 和 IL-7 在调节机体免疫反应中存在协同作用,但作为免疫佐剂在增强 DNA 疫苗免疫原性中是否也存在着协同作用尚不清楚。为此本文尝试了利用 cIL-2 与 cIL-7 双基因表达载体作为免疫佐剂,在小鼠体内分析了 cIL-2 和 cIL-7 基因对 CPV VP2 DNA 疫苗免疫增强的协同作用。结果显示 cIL-2 与 cIL-7 双基因表达载体可明显提高 CPV VP2 DNA 疫苗的免疫效果,并且表现明显的协同作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌种、毒株和细胞系: pMD18-T 载体购自大连宝生物(TaKaRa)工程有限公司; pcDNA-CD5sp-VP2 质粒为 CPV VP2 基因真核表达载体, pcDNA-cIL2/H 质粒和 pcDNA-cIL2 质粒分别为与 His 标签融合的和非融合的 cIL-2 基因表达载体, pcDNA-cIL7/H 质粒和 pcDNA-cIL7 质粒分别为与 His 标签融合的和非融合的 cIL-7 基因表达载体, pcDNA3.1A-IRES 质粒为含内部核蛋白体进入位点(IRES)的表达载体^[4],上述重组质粒载体均由本室构建;大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*) DH5 α 菌株为本实验室保存菌种;犬细小病毒 CPV-2a 型毒株由中国农业大学刘维全博士惠赠;人胚胎肾细胞 HEK293T 由中科院微生物所惠赠;6-8 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自河北省实验动物中心。

1.1.2 主要试剂和仪器: 限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶和 Pfu DNA 聚合酶均购自美国 Promega 公司; Con A、MTT 为 Sigma 产品;蛋白胨和酵母提取物为英国 Oxoid 公司产品;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;质粒小抽提试剂盒购自美国 Promega 公司;NBT/BCIP 显色剂、预染蛋白质分子量 Marker 为 Bio-Rad 公司产品;

DMEM 培养基为美国 GIBCO 公司产品;胎牛血清为 Hyclone 公司产品;兔抗 His 标签多克隆抗体和碱性磷酸酶标记羊抗兔 IgG 抗体为 Santa Cruz 公司产品; γ -干扰素测定试剂盒(Mouse IFN- γ Enzyme Immunoassay Kit)为 Boster Biological Technology 公司产品;其它试剂均为进口或国产分析纯。S1000 型 PCR 仪为美国 Bio-Rad 公司产品;ELx800 型酶标仪为美国 BioTek 公司产品;超净工作台为北京东联哈尔仪器制造有限公司产品;MCO-15AC 型 CO₂ 培养箱为日本三洋公司产品;3K15 型高速台式离心机为美国 SIGMA 公司产品。

1.2 含犬 IL-2 和 IL-7 双基因表达载体的构建

依据 GenBank 犬 IL-2 (cIL-2) 基因的序列 (No. D30710) 和犬 IL-7 (cIL-7) 基因的序列 (No. DQ845341), 分别设计 2 对用于扩增 cIL-2 和 cIL-7 的引物,并由上海生工生物工程技术有限公司合成。

以含有 cIL-2 基因的质粒 (pcDNA-cIL2/H) 为模板,利用合成的 2 对 cIL-2 特异引物,通过 PCR 方法分别扩增含有终止密码子的 cIL-2 基因片段和融合 His 标签的 cIL-2 基因片段;再以含有 cIL-7 基因的载体 (pcDNA-cIL7/H) 为模板,利用合成的 2 对 cIL-7 特异引物,通过 PCR 方法分别扩增含有和不含终止密码子的 cIL-7 基因片段。

将上述两种 cIL-2 基因片段(带终止密码子的和融合有 His 标签的)通过 *Nhe* I 和 *Bam*H I 位点插入到 pcDNA3.1A-IRES 载体中 IRES 的上游,分别构建成非融合和与 His 标签融合的 cIL-2 基因表达载体 pcDNA-cIL2-IRES 和 pcDNA-cIL2/H-IRES。然后再将上述两种 cIL-7 基因片段(带终止密码子的和不带终止密码子的)通过 *Xho* I 和 *Age* I 位点分别插入到 pcDNA-cIL2-IRES 载体和 pcDNA-cIL2/H-IRES 中 IRES 的下游,分别构建成不与 His 标签融合的 cIL-2/cIL-7 双基因表达载体 pcDNA-cIL2-IRES-cIL7 和与 His 标签融合的 cIL-2/cIL-7 双基因表达载体 pcDNA-cIL2/H-IRES-cIL7/H。

1.3 细胞的转染及表达产物的鉴定

细胞的转染采用磷酸钙共沉淀法。首先将 HEK293T 细胞传代于 T25 细胞瓶,当细胞满度达到 80% 时,用 10 μ g 与 His 标签融合的重组表达载体转染细胞,转染 48-72 h 后收集培养基待下一步重组蛋白的鉴定。同时用相应的空载体转染

HEK293T 细胞作为阴性对照。

采用 Western blot 鉴定表达产物。首先用三氯乙酸沉淀法浓缩表达培养基的样品,然后通过 SDS-PAGE 凝胶电泳和转膜,再用兔抗-His 多克隆抗体(一抗)和碱性磷酸酶标记羊抗兔 IgG(二抗)先后分别杂交,最后通过显色剂(NBT/BCIP)显色鉴定重组蛋白是否表达。

1.4 动物免疫试验

将 48 只 BALB/c 雌性小鼠(6-8 周龄)随机分为 8 组(每组 6 只)。采用肌肉注射免疫小鼠,连续免疫 2 次,间隔 3 周。在免疫前 2 天及免疫后第 15 天和第 40 天通过眼球采血,分离血清,测定不同免疫时期小鼠血清的抗体水平。免疫 40 天后采用颈椎脱臼法将小鼠处死,采集脾脏,分离淋巴细胞,分别测定淋巴细胞增殖指数和 IFN- γ 表达水平。每只小鼠每次免疫注射的质粒及其用量见表 1。

表 1 实验小鼠的分组及免疫使用的质粒

Groups	Plasmids used for immunization	Immunizing doses (μg)
Negative control	pcDNA3.1A-IRES plasmid	100
cIL-2 group	pcDNA-cIL2 plasmid	100
cIL-7 group	pcDNA-cIL7 plasmid	100
cIL-2/cIL-7 group	pcDNA-cIL2-IRES-cIL7 plasmid	100
VP2 immunization group	pcDNA-CD5sp-VP2 plasmid	100
VP2 + cIL-2co-immunization group	pcDNA-CD5sp-VP2 + pcDNA-cIL2 plasmid	100 + 100
VP2 + cIL-7co-immunization group	pcDNA-CD5sp-VP2 + pcDNA-cIL7 plasmid	100 + 100
VP2 + cIL-2/cIL-7co-immunization group	pcDNA-CD5sp-VP2 + pcDNA-cIL2-IRES-cIL7 plasmid	100 + 50

1.5 抗体滴度检测

抗体滴度的检测采用 ELISA 方法。用 100 mmol/L (pH9.6) 碳酸钠缓冲液 10 倍稀释本实验室制备的 CPV 病毒液 ($5 \times 10^{-6.5}$ TCID₅₀/mL), 取 100 μL 病毒稀释液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下包被 96 孔板过夜, 次日用 3% 明胶 100 μL 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下封闭 1 h, 加入倍比稀释的免疫小鼠血清和非免疫小鼠阴性血清 (1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560, 1:5120, 1:10240) 100 μL , 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育 1 h, 每孔再加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG (IgG1 或 IgG2a) 抗体 (1000 倍稀释) 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 1 h, 加入新鲜配

制的 TMB 底物溶液 100 μL , 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应。当多数孔出现蓝色时 (约 15-20 min), 加入 50 μL 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 用酶标仪读取 OD₄₅₀ 值。

1.6 中和抗体实验

中和抗体效价的测定采用固定病毒-稀释血清法。将小鼠血清 56 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 30 min, 然后按 1:2-1:256 的稀释度做倍比稀释。稀释好的血清分别加入 96 孔板中, 每孔 50 μL , 每个稀释度平行做 4 孔, 同时用免疫前的小鼠血清作为阴性对照。将病毒滴度为 200 TCID₅₀ 的 CPV 病毒液 50 μL 加入上述各孔中, 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 培养箱中孵育 45-60 min。当 F81 细胞满度达 90% 时用胰酶消化, 然后用 DMEM 培养基悬浮细胞并调整其密度为 2×10^6 细胞/mL。以每孔 100 μL 的量将细胞悬液加入上述已制备好的血清-病毒混合液中, 在相同条件下继续培养细胞。当培养 36-48 h 后阴性对照孔的 CPE 达 95% 以上, 其它多数孔出现 CPE 时, 统计 CPE 孔的比例, 按 Reed-Muench 法计算血清中和抗体的效价。

1.7 淋巴细胞增殖实验

淋巴细胞增殖实验采用 MTT 法。用小鼠淋巴细胞分离液分离脾脏淋巴细胞, 用 RPMI-1640 完全培养基悬浮细胞, 调节细胞密度为 2×10^6 细胞/mL。将细胞种于 96 孔板中, 每孔加入 50 μL (约 10^5 细胞) 细胞悬浮液, 再加入 Con A 至终浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 对照孔加 RPMI-1640 完全培养基。每个样品做 3 个重复。置 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 培养箱孵育 48 h。在每孔中加入 20 μL MTT (5 mg/mL), 继续培养 4 h。将细胞转入 1.5 mL 离心管中, 离心, 去上清, 细胞用 PBS 洗一次。每管加入 150 μL 二甲基亚砷溶剂, 使紫黑色结晶充分溶解, 将上清转入 96 孔板中, 在 1 h 内用酶标仪测定 OD₄₉₀ 值。

1.8 γ -干扰素 (IFN- γ) 的测定

小鼠 IFN- γ 的测定采用夹心 ELISA 法。采用市售的小鼠 IFN- γ ELISA 试剂盒分析免疫小鼠淋巴细胞经 Con A 刺激后 IFN- γ 的表达水平, 具体操作按试剂盒说明进行。

2 结果

2.1 cIL-2 和 cIL-7 双基因表达载体的构建

首先利用 *Nhe* I 和 *Bam*H I 位点将 cIL-2 编码基

因插入到 pcDNA3.1A-IRES 载体中,分别构建成 cIL-2 基因非融合表达载体 pcDNA-cIL2-IRES 和与 His 标签融合的表达载体 pcDNA-cIL2/H-IRES(图 1-A)。

通过 *Nhe* I 和 *Bam*H I 酶切鉴定,两载体均能切出预期的 467 bp 的 cIL-2 基因片段(图 1-B),表明 cIL-2 基因已克隆到 pcDNA3.1A-IRES 载体上。

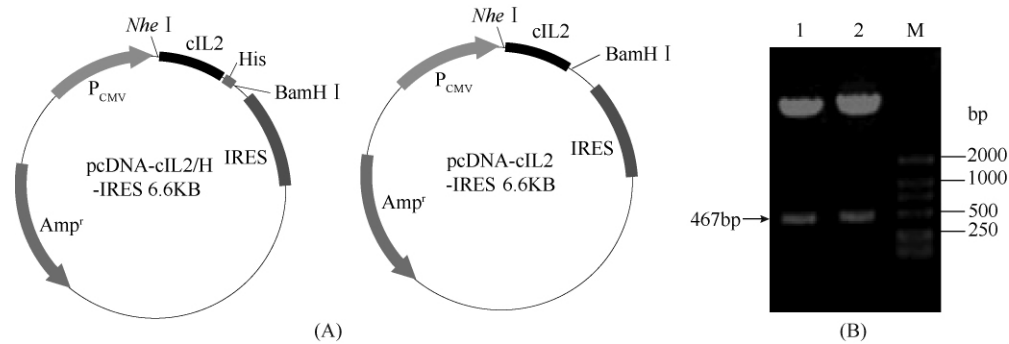


图 1 cIL-2 表达载体的结构及其酶切鉴定

Fig. 1 Structure and restriction analysis of cIL-2 expression vectors. A: The cIL-2 gene expression vectors. Amp^r, ampicillin resistance gene; CMV, human cytomegalovirus (CMV) promoter; cIL-2, canine interleukin-2; His, 6 × histidine tag; IRES, internal ribosome entry site. B: Restriction analysis of cIL-2 gene expression vectors. Lane 1, pcDNA-cIL2/H-IRES digested by *Nhe* I and *Bam*H I; Lane 2, pcDNA-cIL2-IRES digested by *Nhe* I and *Bam*H I; M, DL 2000 DNA Marker.

然后利用 *Xho* I 和 *Age* I 位点将含有终止密码子的 cIL-7 和不含终止密码子的 cIL-7 编码基因分别插入到上述构建的 pcDNA-cIL2-IRES 和 pcDNA-cIL2/H-IRES 载体中,构建成与 His-标签融合和非融合的 cIL-2/cIL-7 的双基因表达载体 pcDNA-cIL2/

H-IRES-cIL7/H 和 pcDNA-cIL2-IRES-cIL7(图 2-A)。重组质粒分别用 *Xho* I 和 *Age* I 酶切,均得到预期的 477 bp 的 cIL-7 基因片段(图 2-B),表明已将 cIL-7 基因分别克隆到相应的载体上。

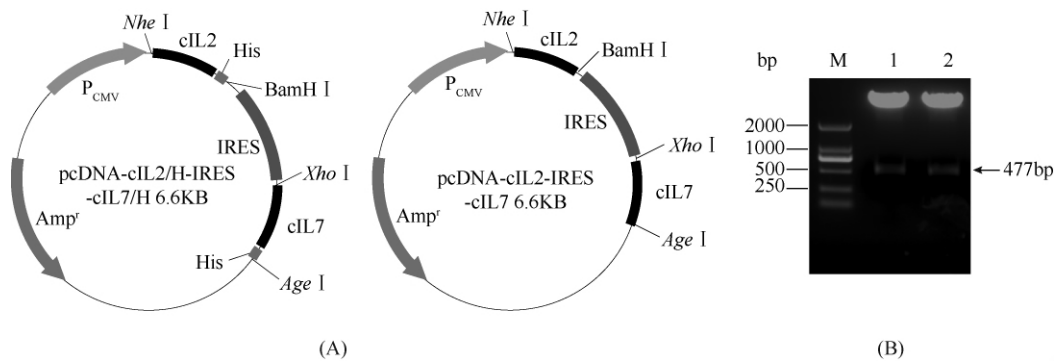


图 2 cIL-2/cIL-7 双基因表达载体的结构及其酶切鉴定

Fig. 2 Structure and restriction analysis of cIL-2/cIL-7 dicistronic expression vectors. A: Structures of cIL-2/cIL-7 dicistronic expression vectors. Amp^r, ampicillin resistance gene; CMV, human cytomegalovirus (CMV) promoter; cIL-2, canine interleukin-2; cIL-7, canine interleukin-7; His, 6 × histidine tag; IRES, internal ribosome entry site. B: Restriction analysis of cIL-2/cIL-7 gene expression vectors. Lane 1, pcDNA-cIL2/H-IRES-cIL7/H digested by *Xho* I and *Age* I; Lane 2, pcDNA-cIL2-IRES-cIL7 digested by *Xho* I and *Age* I; M, DL 2000 DNA Marker.

2.2 重组 cIL-2/cIL-7 在 HEK293T 细胞中的分泌表达

为证实本实验所构建的 cIL-2/cIL-7 双基因表达载体能否介导 cIL-2 基因和 cIL-7 基因在真核细胞进行分泌性表达,采用磷酸钙共沉淀法将 pcDNA-cIL2/H-IRES-cIL7/H 表达载体转染 HEK293T 细

胞,同时以 pcDNA-cIL2/H 表达载体和 pcDNA-cIL7/H 表达载体作为阳性对照,用 pcDNA3.1A-IRES 空载体作为阴性对照分别转染 HEK293T 细胞。转染后 48 h 收集细胞培养基。通过 Western blot 检测培养基中的表达产物。结果显示除转染空载体外,转染其它载体的细胞培养基中均检测出与 His 标签融

合的重组蛋白,由此证明 cIL-2 基因和 cIL-7 基因能够在 HEK293T 细胞中进行分泌性表达(图 3)。

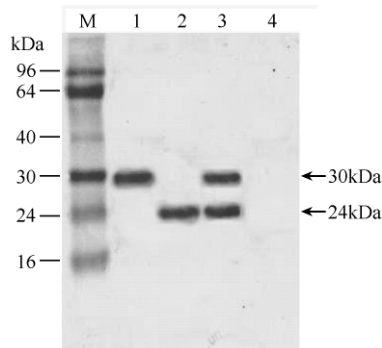


图 3 重组 cIL-2 和 cIL-7 的 Western blot 检测

Fig. 3 Detection of the recombinant cIL-2 and cIL-7 expression by Western blot. M, prestained protein marker; Lane 1, the sample from pcDNA-cIL2/H-transfected cells; Lane 2, the sample from pcDNA-cIL7/H-transfected cells; Lane 3, the sample from pcDNA-cIL2/H-IRES-cIL7/H-transfected cells; Lane 4, the sample from pcDNA3.1A-IRES-transfected cells.

2.3 cIL-2/cIL-7 基因表达载体对 CPV VP2 DNA 疫苗免疫效果的影响

为了解 cIL-2 基因和 cIL-7 基因在增强 DNA 疫苗免疫原性中是否存在协同效应,按照设计的免疫组合、共免疫质粒种类、质粒用量(cIL-2/cIL-7 双基因表达载体的用量为 cIL-2 或 cIL-7 表达载体用量的 50%)及免疫方法对小鼠进行免疫。在免疫后在不同时间分析小鼠体液和细胞免疫的应答水平。

2.3.1 体液免疫应答反应:图 4-A 显示免疫后第 0、15 和 40 天小鼠血清 IgG1 亚型抗体滴度的分析结果。由图可见,免疫第 15 天后各实验组小鼠血清的 IgG1 型抗体水平均较低,免疫第 40 天时,抗体水平显著升高,VP2 + cIL-2/cIL-7 基因共免疫组 IgG1 型抗体滴度明显高于 VP2 + cIL-2 基因共免疫组 ($P < 0.01$) 和 VP2 + cIL-7 基因共免疫组 ($P < 0.05$)。

图 4-B 为免疫后相同时期小鼠血清 IgG2a 亚型抗体滴度的分析结果。在免疫第 15 天时,VP2 + cIL-2/cIL-7 基因共免疫组的 IgG2a 亚型抗体滴度达 1:4266,显著高于 VP2 + cIL-2 基因共免疫组 (1:2453) 和 VP2 + cIL-7 基因共免疫组 (1:2880) ($P < 0.05$)。免疫第 40 天时,各免疫组小鼠的 IgG2a 型抗体水平均大幅度上升,VP2 + cIL-2/cIL-7 基因共免疫组达到 1:8533,是 VP2 + cIL-2 基因共免疫组的 1.66 倍 ($P < 0.01$),是 VP2 + cIL-7 基因共免疫组的 1.43 倍 ($P < 0.05$)。

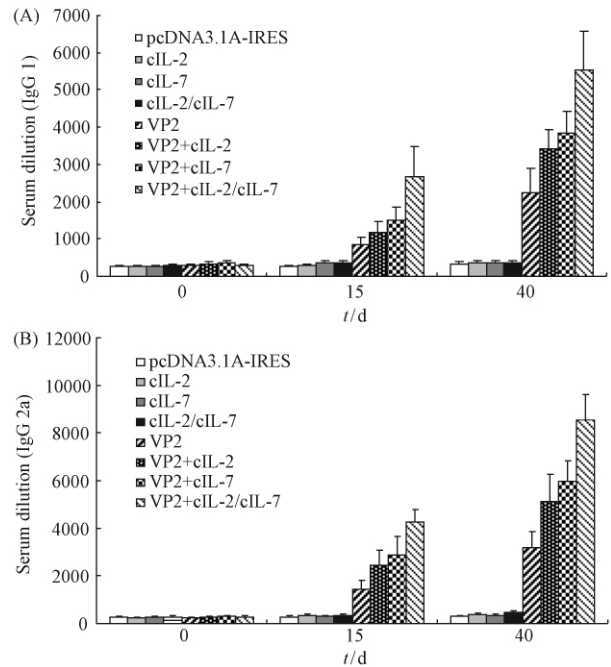


图 4 免疫小鼠血清中 IgG1 和 IgG2a 抗体水平的检测结果
Fig. 4 The antibody titers of IgG1 and IgG2a subtypes in mouse sera. A: The IgG1 antibody levels at the different times; B: The IgG2a antibody levels at the different times.

此外,免疫第 15 天和第 40 天时,各免疫组小鼠的血清 IgG2a 亚型抗体水平均明显高于 IgG1 亚型抗体水平,这说明 cIL-2/cIL-7 基因对 CPV VP2 DNA 疫苗的促进作用偏向于 Th1 介导的体液免疫应答反应。

为了解免疫小鼠血清中和抗体的水平,本实验利用固定病毒一稀释血清法分析了小鼠血清中和抗体的效价(图 5)。由图可见,免疫后第 15 天时,各免疫组中和抗体的效价均有不同程度的升高,其中以 VP2 + cIL-2/cIL-7 共免疫组升高幅度最大,明显高于 VP2 单免疫组和 VP2 + cIL-2 及 VP2 + cIL-7 共免疫组 ($P < 0.05$)。第 40 天时,各组中和抗体的效价大幅提高,VP2 + cIL-2/cIL-7 共免疫组中和抗体效价达 49.99 ± 4.45 ,明显高于 VP2 + cIL-2 (37.19 ± 4.78) 及 VP2 + cIL-7 (39.09 ± 3.57) 共免疫组 ($P < 0.05$)。以上结果说明 cIL-2 和 cIL-7 基因可显著提高 VP2 DNA 疫苗诱导小鼠中和抗体的产生。可见,cIL-2 和 cIL-7 基因不仅能协同提高 VP2 DNA 疫苗免疫小鼠血清抗体的滴度,而且对血清中和抗体效价的提高也有协同增强作用。

2.3.2 细胞免疫应答反应:图 6 为淋巴细胞增殖分

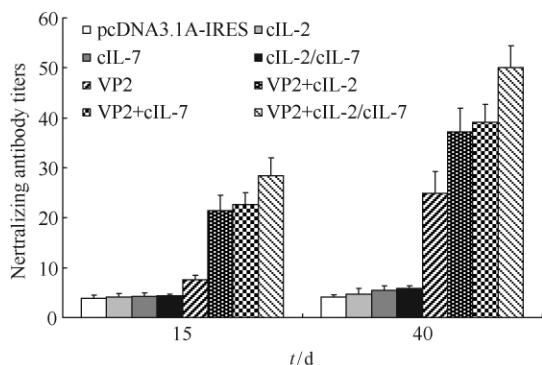


图5 免疫小鼠血清中和抗体的效价测定

Fig. 5 The titers of neutralizing antibodies in the mouse sera.

析结果, 数据显示 VP2 + cIL-2、VP2 + cIL-7 和 VP2 + cIL-2/cIL-7 共免疫组的小鼠淋巴细胞增殖反应均高于 VP2 单免疫组, VP2 + cIL-2/cIL-7 基因共免疫组的淋巴细胞刺激指数与 VP2 + cIL-2 和 VP2 + cIL-7 共免疫组相比均有所升高, 但未达到差异显著水平。这说明 cIL-2 和 cIL-7 基因对免疫小鼠淋巴细胞的增殖反应有一定的协同促进作用。

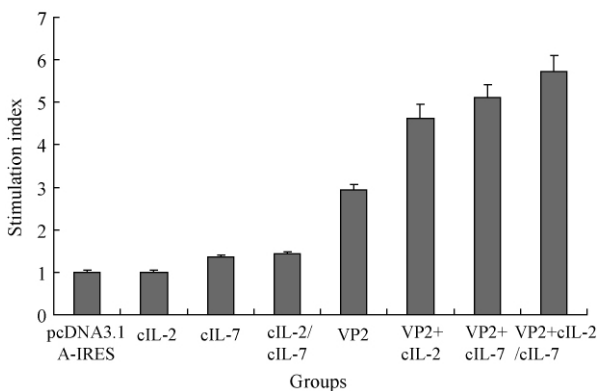


图6 免疫小鼠淋巴细胞的增殖试验

Fig. 6 The lymphocyte proliferation assay for the immunized mice.

为进一步评价免疫小鼠的细胞免疫应答反应, 通过 ELISA 法分析了免疫小鼠淋巴细胞 IFN- γ 的表达水平(图 7)。结果显示, VP2 + cIL-2/cIL-7 共免疫组小鼠淋巴细胞 γ 干扰素的表达水平显著高于 VP2 + cIL-2 共免疫组和 VP2 + cIL-7 共免疫组 ($P < 0.05$)。这一结果进一步说明 cIL-2 和 cIL-7 基因对免疫小鼠的细胞免疫应答具有明显的协同作用。

3 讨论

IL-2 是由 T 淋巴细胞产生的一种细胞因子, 具

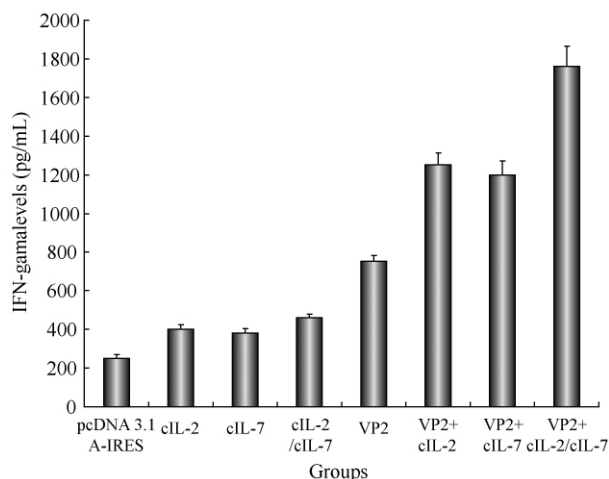


图7 小鼠淋巴细胞培养液 IFN- γ 的含量分析

Fig. 7 Analysis of IFN- γ contents in the medium of lymphocytes.

有刺激淋巴细胞增殖分化和增强自然杀伤细胞活性等功能^[5]。IL-7 是由胸腺基质细胞和骨髓基质细胞产生的一种糖蛋白细胞因子, 具有刺激未成熟 T、B 细胞的分化, 促进细胞毒性淋巴细胞增殖和杀伤活性的能力^[6-7]。研究证明 IL-2 和 IL-7 在动物体内存在着相互作用, 如 IL-7 对“淋巴因子激活杀伤细胞”增殖的促进作用依赖于 IL-2^[8-9], IL-7 对机体特异性和非特异性免疫应答的增强作用与 IL-2 紧密相关^[10]。

IL-2 作为生物佐剂已被广泛应用于 DNA 疫苗和亚单位疫苗的研究^[11-13]。IL-7 是一种潜在的细胞因子生物佐剂, 本实验室通过用 cIL-7 作为 CPV VP2 的免疫佐剂免疫小鼠, 证实 cIL-7 对免疫小鼠的体液免疫和细胞免疫都有明显的促进作用。为了解 cIL-7 与 cIL-2 在增强 DNA 疫苗免疫原性中是否有协同作用, 本实验利用 CPV VP2 DNA 疫苗对其进行初步分析。研究显示利用 VP2 基因表达载体与半数量 cIL-2/cIL-7 双基因表达载体共免疫小鼠, 小鼠的体液免疫和细胞免疫均高于与 cIL-2 或 cIL-7 表达载体共免疫的小鼠, 表明 cIL-2 和 cIL-7 基因在增强 DNA 疫苗免疫原性中存在明显的协同作用。

为使 cIL-2 和 cIL-7 在免疫动物体内同步表达, 本文利用 IRES 序列, 构建了在 CMV 启动子驱动下的 cIL-2 和 cIL-7 双基因表达载体 pcDNA-cIL2-IRES-cIL7。IRES 存在于双基因开放阅读框之间, 在转录的 mRNA 分子中, IRES 具有不依赖于 mRNA 5' 帽子结构的起始翻译功能^[14], 可以引导核糖体与此结合并起始其下游 cIL-7 的翻译, 从而使 cIL-7 基

因与 IRES 上游的 cIL-2 基因同步表达。利用双基因表达载体不仅能使两种基因在同一细胞进行同步表达,还能减少需要多种质粒进行动物免疫时的质粒用量,以减少由于质粒用量过大对机体造成的副作用。

已知动物的 Th1 淋巴细胞主要促进 IgG2a 亚类抗体的产生,Th2 淋巴细胞促进 IgG1 亚类抗体的合成。因此检测免疫动物 IgG1 亚型和 IgG2a 亚型抗体的表达,不仅可以监测机体的抗体水平及免疫反应类型的趋向,同时可以间接检测辅助 T 淋巴细胞的应答情况^[15]。本实验结果表明,VP2 + cIL-2/cIL-7 共免疫组小鼠血清的 IgG1 亚型和 IgG2a 亚型抗体水平均显著高于 cIL-2 和 cIL-7 单独作为免疫佐剂的免疫组,且 IgG2a 亚型抗体水平又高于 IgG1 亚型,所以 cIL-2/cIL-7 基因对 CPV VP2 DNA 疫苗的促进作用偏向于 Th1。中和抗体水平反映疫苗对机体免疫的保护作用,是评价疫苗效能的重要指标^[16]。结果显示,cIL-2 和 cIL-7 基因在增强免疫小鼠血清中和抗体水平时也存在着协同效应。

淋巴细胞增殖指数和 IFN- γ 表达水平的检测结果表明,与 VP2 + cIL-2 和 VP2 + cIL-7 共免疫组相比,VP2 + cIL-2/cIL-7 共免疫组淋巴细胞的刺激指数和 IFN- γ 的表达水平均有所提高,说明 cIL-2 与 cIL-7 基因对 VP2 DNA 疫苗的细胞免疫增强作用也存在着协同作用。

本文在小鼠体内初步分析了 cIL-2 和 cIL-7 基因对 CPV VP2 DNA 疫苗的免疫效果的影响,证明 cIL-2 和 cIL-7 基因对 VP2 DNA 疫苗的免疫效果存在明显的协同增强作用,这为复合细胞因子基因作为 DNA 疫苗佐剂的研究和应用提供了初步的实验依据,有关 cIL-2 和 cIL-7 基因在犬体内是否对 VP2 DNA 疫苗具有类似的免疫协同增强作用还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Thomson GW, Gagnon AN. Canine gastroenteritis associated with a parvovirus-like agent. *Canadian Veterinary Journal*, 1978, 19 (12): 346-350.
- [2] Gupta PK, Rai A, Rai N, Raut AA, Chauhan S. Cloning of canine parvovirus VP2 gene and its use as DNA vaccine in dogs. *Current Science*, 2005, 88 (5): 778-782.
- [3] Pan CH, Chen HW, Tao MH. Modulation of immune responses to DNA vaccines by codelivery of cytokine genes. *Journal of the Formosan Medical Association*, 1999, 98 (11): 722-729.
- [4] 王微,李秀锦,仲飞,王幸兴,韩冬梅,靳慧君,潘素敏,李巍.犬细小病毒 VP2 蛋白在真核细胞的分泌表达及特性研究. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2009, 49 (5): 90-94.
- [5] Belz GT, Masson F. Interleukin-2 tickles T cell memory. *Immunity*, 2010, 32 (1): 7-9.
- [6] Moore TA, Freedon-Jeffrey UV, Murray R, Zlotnik A. Inhibition of gamma delta T cell development and early thymocyte maturation in IL-7-1-mice. *The Journal of Immunology*, 1996, 157 (6): 2366-2373.
- [7] Damia G, Komschlies KL, Faltynek CR, Ruscetti FW, Wiltout RH. Administration of recombinant human interleukin-7 alters the frequency and number of myeloid progenitor cells in the bone marrow and spleen of mice. *Blood Journal*, 1992, 79 (5): 1121-1129.
- [8] Morrissey PJ, Goodwin RG, Nordan RP, Anderson D, Grabstein KH, Cosman D, Sims J, Lupton S, Acres B, Reed SG. Recombinant interleukin 7, pre-B cell growth factor, has costimulatory activity on purified mature T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 1989, 169 (3): 707-716.
- [9] Okazaki H, Ito M, Sudo T, Hattori M, kano S, Katsura Y, Minato N. IL-7 promotes thymocyte proliferation and maintains immunocompetent thymocytes bearing alpha beta or gamma delta T-cell receptors in vitro: synergism with IL-2. *The Journal of Immunology*, 1989, 143 (9): 2917-2922.
- [10] Leong KH, Ramshaw IA, Ramsay AJ. interleukin-7 Enhances Cell-Mediated Immune Responses In vivo in an Interleukin-2-Dependent Manner. *Viral Immunology*, 1997, 10 (1): 1-9.
- [11] 王臣,赵战勤,张春杰,刘一尘,丁轲,李银聚,程相朝,陈溥言.禽 IL-2 与传染性法氏囊 VP2 整合蛋白免疫学特性. *生物工程学报(Chinese Journal of Biotechnology)*, 2010, 26 (4): 476-482.
- [12] 江文正,金宁一,李子健,张立树,张洪勇. HIV-1 结构蛋白 gag-gp120 与白细胞介素 2 联合基因免疫. *中国病毒学(Virologica Sinica)*, 2004, 19 (1): 10-13.
- [13] 希尼尼根,程安春,汪铭书,陈希文,豆文波,李雪梅,刘伍梅,张平英,刘菲,陈孝跃.猪 IL-2 真核表达质粒构建及对 PRRSV-ORF5 基因疫苗免疫佐剂作用的研究. *畜牧兽医学报(Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences)*, 2007, 38 (9): 1003-1008.

- [14] Martinez-Salas E. Internal ribosome entry site biology and its use in expression vectors. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, 10 (5) : 458-464.
- [15] Snapper CM, Mond JJ. Towards a comprehensive view of immunoglobulin class switching. *Immunology Today*, 1993, 14 (1) : 15-17.
- [16] Takada A, Ebihara H, Jones S, Feldmann H, Kawaoka Y. Protective efficacy of neutralizing antibodies against Ebola virus infection. *Vaccine*, 2007, 25 (6) : 993-999.

Effects of canine IL-2 and IL-7 genes on enhancing immunogenicity of canine parvovirus VP2 gene vaccine in mice

Huihui Chen¹, Fei Zhong^{1*}, Xiujin Li^{2*}, Lu Wang¹, Yan Sun¹, Changai Neng², Kao Zhang¹, Wenyan Li¹, Jiexia Wen¹

¹Department of Basic Veterinary Medicine, College of Animal Science and Technology, Agricultural University of Hebei, North China Research Center of Animal Epidemic Pathogen Biology, Ministry of Agriculture of China, Hebei Engineering and Technology Research Center of Veterinary Biological Products, Baoding 071001, China

²Department of Biotechnology, College of Environmental and Chemical Engineering, Yanshan University, Qinhuangdao 066004, China

Abstract: [Objective] To investigate the effects of canine interleukin-2 (cIL-2) and cIL-7 genes on enhancing the immunogenicity of canine parvovirus (CPV) VP2 DNA vaccine. [Methods] The bicistronic vectors of cIL-2 and cIL-7 genes were constructed using the eukaryotic expression vector containing internal ribosome entry site (IRES). The cIL-2/cIL-7 dicistronic vector plus previously constructed vectors, including CPV VP2 DNA vaccine vector, cIL-2 vector and cIL-7 vector, were used to co-immunize mice with different combinations, consisting of VP2 alone, VP2 + cIL-2, VP2 + cIL-7 and VP2 + cIL-2/cIL-7. The VP2-specific antibody levels in immunized mice were measured by ELISA at different time post-immunization. The proliferation indices and interferon- γ expression were measured by lymphocyte proliferation assay and ELISA, respectively. [Results] The cIL-2/cIL-7 bicistronic vector was correct and could mediate cIL-2 and cIL-7 gene expression in eukaryotic cells. Immunization results revealed that the antibody titers and the neutralizing antibody levels of the mice co-immunized with VP2 + cIL-7/cIL-2 vectors were significantly higher than that with either VP2 + cIL-2 vectors or VP2 + cIL-7 vectors ($P < 0.05$). The lymphocyte proliferation indices of VP2 + cIL-7/cIL-2 vector-immunized mice were also higher than that of other two groups although not statistically significant. However, the IFN- γ expression levels of VP2 + cIL-7/cIL-2 vector-immunized mice were significantly higher than other immunized mice ($P < 0.05$). [Conclusion] The cIL-2 and cIL-7 genes showed the significant synergic effects on enhancing the immunogenicity of CPV VP2 DNA vaccine.

Keywords: interleukin-2, interleukin-7, biological adjuvant, canine parvovirus, VP2 DNA vaccine

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30771586) and by the Natural Science Foundation of Hebei Province (C2008000244)

* Corresponding author. Tel: +86-312-7528473; E-mail: feizhong2000@yahoo.com; lixiujin9824@yahoo.com.cn

Received: 8 May 2012 / Revised: 27 May 2012