

猪口蹄疫病毒 DNA 疫苗与常规灭活苗的比较

黄桂菊, 罗满林, 刘镇明

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:以含有 FMDV VP1 基因和 VP1 基因主要抗原位点 141 ~ 160 及 200 ~ 213 位的氨基酸的真核表达质粒 pcDNA-VP1 和 pcDNA-F 与常规 O 型 FMD 灭活疫苗分别免疫 6 ~ 8 周龄的 BALB/c 小鼠和豚鼠,同时设生理盐水为阴性对照,以肌肉注射,间隔 2 周 3 次免疫的方式进行. 通过脾脏 T 淋巴细胞增殖(MTT)、T 淋巴细胞亚群、中和抗体、抗病毒能力的检测和病理组织学观察等方面比较 DNA 疫苗与常规灭活苗的免疫效果. 结果发现 pcDNA-VP1 和 pcDNA-F 能够诱导细胞免疫和体液免疫反应,pcDNA-F 可使小鼠和豚鼠产生一定程度的抗 FMDV 感染的保护性免疫,但与常规灭活苗比较还存在差异.

关键词:口蹄疫病毒; VP1 基因; 抗原位点; 质粒

中图分类号:S852. 659. 6

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2006)04-0117-03

Comparison of Effects of FMDV DNA Vaccines and Conventional Vaccine

HUANG Gui-ju, LUO Man-lin, LIU Zhen-ming

(College of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract:six to eight-week-old BALB/c mice and guinea pigs were immunized with eukaryotic plasmids and normal FMDV type O vaccine by intramuscular injection, respectively for three times, and immunization interval was two weeks. The F fragment codes for the amino acids at sites 140-160 and 200-213, the major antigenic epitopes of FMDV type O. The immune effects of DNA vaccines were compared with that of conventional vaccine at MTT, T lymphocyte subgroup, neutralizing antibody, resistance to FMDV and histopathology. The results showed that DNA vaccines pcDNA-VP1 and pcDNA-F could induce humoral and cellular immunity. BALB/c mice and guinea pigs immunized with pcDNA-F could were resistant to FMDV, but there were difference with conventional vaccine.

Key words:foot-and-mouth disease virus; VP1 gene; antigenic epitopes; plasmid

口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)广泛存在世界各地,严重影响着养猪业的发展,一直是猪病研究的热点之一. FMD 的防控主要以免疫预防为主. 目前用于 FMD 的疫苗主要有弱毒活疫苗和灭活疫苗 2 种,寻找更为安全、有效、实用的新型疫苗是现在 FMDV 研究的主要方向. DNA 疫苗以其免疫原性好、免疫效果持久、制备简便、安全等优点成为疫苗研究领域的热点之一^[1]. 有关 FMDV DNA 疫苗的研究已有报道^[2-4],本试验比较了自行构建的 FMDV

DNA 疫苗与常规灭活苗进行免疫的效果,探讨 DNA 疫苗与常规灭活苗的差异,为 FMDV DNA 疫苗的研究奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株 DH 5 α 为华南农业大学传染病实验室保存,质粒 pcDNA-VP1 和 pcDNA-F 为华南农业大学传染病实验室构建.

收稿日期:2005-10-09

作者简介:黄桂菊(1978—),女,硕士研究生;通讯作者:罗满林(1957—),男,教授,博士,E-mail:luoml@scau.edu.cn

基金项目:广东省科技计划项目(2002A20403)

1.1.2 试验动物 豚鼠购自广东省军事医学研究所。BALB/c 小鼠购自南方医科大学。

1.1.3 试剂 CD4、CD8a、CD3e 单抗购自 eBioscience 公司, RPMI1640 培养液购自 GIBCO 公司。PBA、MTT、ConA、普鲁卡因、多聚甲醛等购自鼎国公司。

1.2 方法

1.2.1 试验分组及免疫程序 32 只 BALB/c 小鼠随机分成 4 组, 每组 8 只, 16 只豚鼠随机分成 4 组, 每组 4 只。在免疫前 3 d, 后肢肌肉注射普鲁卡因 0.5 mg/mL 50 μ L 预处理。局部麻醉 3 d 后在同一位置免疫试验动物。免疫方案见表 1。

表 1 试验动物的免疫方案

Tab. 1 Immunization protocols for experimental animals

方案 ¹⁾ protocols	剂量 dosage			
	生理盐水 physiological saline/ (μ L·只 ⁻¹)	pcDNA-VP1 质粒 pcDNA-VP1 vector/ vector/ (μ g·只 ⁻¹)	pcDNA-F 质粒 pcDNA-F vector/ vector/ (μ g·只 ⁻¹)	FMD 灭活苗 FMD inactivated vaccine/ (μ L·只 ⁻¹)
一免 first time	100	100	100	50
二免 second time	100	150	150	50
三免 third time	100	200	200	50

1) 一免后第 15 d 进行二免, 第 30 d 进行三免

1.2.2 免疫小鼠脾脏 T 淋巴细胞增殖 (MTT) 试验 参照薛彬^[5]报道的方法于三免后第 28 d 进行。

1.2.3 小鼠 T 淋巴细胞亚群的测定 三免后第 28 d, 小鼠断尾采血 100 μ L; 计数全血有核细胞数。每管约加入 1×10^6 个有核细胞; 加入荧光素标记的细胞表面抗原单克隆抗体 200 μ L, 其中一组试管加入用同样荧光素标记的小鼠 IgG 或 IgM (视抗体组成而定, 但一般为 IgG) 作为对照; 室温避光 30 min,

1 000 r/min 离心 5 min, 轻轻倾斜试管, 将上清液一次迅速甩出, 用吸水纸沾去孔边缘部多余液体; 以冷 PBA 2 mL 混悬, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液; 加入 0.5 mL $w = 1\%$ 多聚甲醛, 置流式细胞仪 (FACS) 测试管, 4 $^{\circ}$ C 避光保存, 待上流式细胞仪检测。

1.2.4 免疫豚鼠血清中和抗体的检测 三免后 2 周豚鼠心脏采血分离血清, 于 56 $^{\circ}$ C 灭活 30 min, 作 2 倍系列稀释, 分别与 100 LD₅₀ 的 FMDV 混合, 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h, 每个稀释度接种 4 只 3~5 日龄的乳鼠, 每只 0.1 mL, 计算出半数致死量。结果以中和指数 (NI) 表示: $NI = -\lg(\text{试验组 } LD_{50} / \text{阴性对照组 } LD_{50})$, 中和指数即反映病毒中和抗体的滴度^[6]。

1.2.5 免疫豚鼠抗病毒能力的检测 三免后的第 21 d, 用 O 型 FMDV 进行攻毒以检测其抗病毒的能力。采用划痕与注射相结合的方式接种病毒, 每只豚鼠后肢跖部注射 0.2 mL 100 ID₅₀ 的病毒, 另将两侧跖部划破, 涂布病毒液。攻毒后继续饲养 2 周观察发病情况, 每天 2 次。

1.2.6 免疫豚鼠病理组织学观察 三免后的第 35 d 剖杀豚鼠, 取心脏组织, 用 $\varphi = 10\%$ 中性福尔马林固定, 石蜡包埋, 切片, 苏木素-伊红染色, 镜检, 选取病变部位拍照。

2 结果

2.1 免疫小鼠脾脏 MTT 试验结果

三免后第 28 d 采取小鼠脾脏, 分离脾淋巴细胞, 以 MTT 法测定其细胞免疫水平, 统计学 t 检验结果显示所有的免疫组与对照组 (生理盐水) 相比差异显著 ($P < 0.05$), 常规疫苗组与 pcDNA-VP1、pcDNA-F 免疫组相比差异显著 ($P < 0.05$), pcDNA-VP1 免疫组与 pcDNA-F 免疫组比较差异不显著 ($P > 0.05$), 以上结果表明 DNA 疫苗组可诱导细胞免疫反应, 但远远低于常规灭活苗 (表 2)。

表 2 免疫小鼠 MTT、中和指数和抗病毒能力检测结果

Tab. 2 The testing results of immunized mice on MTT, the indexes of neutralizing antibodies and protective rates

组别 groups	$D_{570 \text{ nm}}$	中和指数	保护率 ¹⁾
		the indexes of neutralizing antibodies	protective rates
对照组 control group	0.214 $\pm$ 0.019	0.00	0/4
pcDNA-VP1 免疫组 pcDNA-VP1 immunized group	0.276 $\pm$ 0.023	0.72	0/4
pcDNA-F 免疫组 pcDNA-F immunized group	0.295 $\pm$ 0.024	0.93	1/4
常规疫苗组 normal vaccine group	0.368 $\pm$ 0.026	2.38	4/4

1) 保护率 = 保护数 / 试验豚鼠数

2.2 小鼠 T 淋巴细胞亚群的测定

三免后第 28 d 断尾采血, 分离淋巴细胞, 上流式细胞仪测定 CD4⁺、CD8⁺ 细胞百分数, 统计学检验结

果显示 CD4⁺ % : 所有免疫组与对照组 (生理盐水) 相比差异显著 ($P < 0.05$), 常规疫苗组与 pcDNA-VP1、pcDNA-F 免疫组相比差异显著 ($P < 0.05$),

pcDNA-VP1 免疫组与 pcDNA-F 免疫组比较差异不显著($P > 0.05$)。CD8⁺% 结果显示:pcDNA-F 免疫组、常规疫苗组与对照组(生理盐水)相比差异显著($P < 0.05$),常规疫苗组与 pcDNA-VP1 免疫组相比差异显著($P < 0.05$),pcDNA-VP1 免疫组与 pcDNA-F 免疫组比较差异不显著($P > 0.05$)。

2.3 免疫豚鼠血清中和抗体检测结果

三免后 2 周豚鼠心脏采血分离血清,计算血清中和指数,结果见表 2。

2.4 免疫豚鼠抗病毒能力检测结果

三免后的第 21 d,用 O 型 FMDV 进行攻毒,检测其对病毒的抵抗能力,每只注射 0.2 mL100 ID₅₀ 的病毒,结果见表 2:对照组豚鼠全部发病;常规疫苗组都没有发病,攻毒保护率为 4/4;pcDNA-VP1 免疫组全部发病;pcDNA-F 免疫组有 3 只豚鼠发病,但其发病时间推迟 1~2 d、症状减轻,攻毒保护率分别为 0/4 和 1/4。

2.5 免疫豚鼠病理组织学观察结果

对照组(生理盐水):严重的心肌炎,大量的炎性细胞浸润于心肌纤维间,心肌断裂;pcDNA-VP1 免疫组:中度的心肌炎,少量的炎性细胞浸润于心肌纤维之间,心肌细胞轻度坏死;pcDNA-F 免疫组:轻度的心肌炎;常规疫苗组:心肌正常,无心肌炎变化。

3 讨论

关于 FMD 基因疫苗的研究,国内外学者进行了大量研究,但到目前为止都没有取得很理想的效果。本试验用本地区分离的 FMDV 为研究对象,构建了含 VP1 基因和免疫串联片段 F 的 DNA 疫苗 pcDNA-VP1 和 pcDNA-F。免疫豚鼠可以诱导豚鼠产生保护性的中和抗体,免疫 BALB/c 小鼠能够诱导细胞免疫反应,与常规疫苗相比还存在明显差异。对口蹄疫的感染有一定的抑制作用,但与相关报道的 FMD 基因^[3]免疫比较,攻毒保护率仍然偏低。赵凯等^[7]构建的 DNA 疫苗 pCDM-FH,免疫豚鼠和猪可诱导出抗 FMDV 专一性的中和抗体及效应性 T 细胞,攻毒结果能使被免疫豚鼠及猪发病推迟,症状减轻。Li 等^[3]构建的 DNA 疫苗,肌注豚鼠可产生免疫反应,66% 的免疫猪不受攻毒感染。分析原因可能有以下几个方面:质粒没有采用脂质体包裹等方法处理,容易降解;骨骼肌提呈抗原的能力较差;小分子抗原肽

在机体内容易被降解并且不易形成一定的立体构型,且单独使用时因相对分子质量太小而无法有效地诱发机体产生免疫应答,因此其免疫原性较差;本试验所用表达载体 pcDNA3.1(+)要求上游引物含 Kozak 翻译起始序列:(G/A)NNATGG,在 -3 处必须是 G 或 A, +4 处是 G,但为了保证整个阅读框架的正确性和双酶切位点克隆方便,质粒 pcDNA-VP1 和 pcDNA-F 均没有包含 Kozak 序列,因此,可能对表达量有所影响;各研究者所采用的质粒载体表达效率不同,表达的蛋白量不同,从而导致其刺激机体免疫应答及免疫保护作用的差异。与传统疫苗比较,基因疫苗仍然存在着较大的差距,可考虑选择好的表达载体、用基因枪免疫、使用佐剂、增加免疫刺激序列等影响基因免疫效果^[8]的方法进行下一步的探索。

参考文献:

- [1] LEBRON J A, WOLF J J, KAPLANSKI C V, et al. Ensuring the quality, potency and safety of vaccines during preclinical development[J]. *Exper Rev Vaccines*, 2005, 4 (6): 855-866.
- [2] BEARD C, WARD G, RIEDER E, et al. Development of DNA vaccines for foot-and-mouth disease, evaluation of vaccines encoding replication and non-replication nucleic acids in swine[J]. *Biotechnol*, 1999, 73: 243-249.
- [3] LI G J, YAN W Y, XU Q X, et al. Study on the DNA vaccine against foot-and-mouth disease virus using the heavy chain constant region of swine IgG as the carrier for peptide epitopes[J]. *Chin J Biotechnol*, 2001, 17(3): 322-324.
- [4] WONG H T, CHENG S C, CHAN E W, et al. Plasmids encoding foot-and-mouth disease virus VP1 epitopes elicited immune response in mice and swine and protected swine against viral infection[J]. *Virology*, 2000, 278(1): 27-35.
- [5] 薛彬. 免疫毒理学实验技术[M]. 北京:北京医科大学,中国协和医科联合出版社,1995:19-21.
- [6] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京:科学出版社,1997.
- [7] 赵凯,张震宇,卢永干,等. 抗口蹄疫蛋白疫苗与 DNA 疫苗混合物的免疫原性研究[J]. *中国人兽共患病杂志*, 2001, 17(5): 5-8.
- [8] 王世若,王兴龙,韩文瑜. 现代动物免疫学[M]. 长春:吉林科技出版社,1996:154-159.

【责任编辑 柴 焰】