

壳聚糖对口蹄疫 DNA 疫苗黏膜免疫的影响

张馨玉¹ 金华利² 杨若耶² 肖冲² 朱开春¹ 张富春¹ 王宾^{1,2}

(1. 新疆大学 生命科学与技术学院/新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830046;

2. 中国农业大学 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094)

摘要 以寻求有效 DNA 疫苗黏膜免疫途径为目的,利用带有负电荷的具有黏膜粘附性多糖-壳聚糖来包裹口蹄疫 DNA 疫苗 pcD-VP1 形成纳米级颗粒,用此颗粒经滴鼻、口服、直肠和生殖道 4 种黏膜免疫小鼠,检测小鼠的针对口蹄疫的体液和细胞免疫水平。结果显示:壳聚糖/pcD-VP1 滴鼻免疫小鼠,抗体的高峰来临比只免疫 pcD-VP1 提前 2 周,直肠免疫处理中也呈现如此效果;经口服和生殖道途径的免疫,均没有呈现比 pcD-VP1 免疫组更好的抗体水平。但壳聚糖/pcD-VP1 在生殖道和直肠免疫途径里均比 pcD-VP1 免疫组 P. P. 结的 T 细胞增殖水平高。所以,除口服途径以外,在滴鼻、直肠和生殖道免疫中,壳聚糖对质粒的包裹均一定程度上提高了 DNA 疫苗黏膜免疫的效果。

关键词 黏膜免疫;壳聚糖;DNA 疫苗

中图分类号 R 392.11

文章编号 1007-4333(2005)05-0021-05

文献标识码 A

Effects of chitosan on the FMDV-DNA mucosal immunization

Zhang Xinyu¹, Jin Huali², Yang Ruoye², Xiao Chong², Zhu Kaichun¹, Zhang Fuchun¹, Wang Bin^{1,2}

(1. Key Laboratory for Bioresources and Bioengineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China;

2. State Key Laboratory for Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract The aim of our investigation was to improve the effectiveness of DNA vaccines against foot-mouth disease virus (FMDV) infection on mucosal immunization. We use chitosan—a cational polymer as mucosal immunization agent. To see if chitosan-DNA vaccine could effectively prevent development of foot-mouth disease virus (FMDV), FMDV DNA vaccine pcD-VP1 were used at this research. Chitosan-pcD-VP1 (chi-pcD-VP1) vaccine were prepared by complexing chitosan with pcD-VP1 DNA and administrated to Kunmingbai mice nasally, orally, rectally and vaginally with 150 μg DNA at 14 days intervals, 50 μg DNA each time one Mice. The result shows that vaginal IgA of intranasal and intrarectum immunized chitosan-DNA mice were advance highest level about 2 weeks. P. P. T cell proliferation shows significant enhanced at rectum and vaginal vaccinated chitosan-DNA groups.

Key words mucosal immunization; chitosan; DNA vaccin

口蹄疫是畜牧业的烈性传染病,现已经开发出各种疫苗,其中 DNA 疫苗以安全、稳定、可同时激发体液和细胞免疫等众多优点成为研究的热点^[1]。

口蹄疫病毒主要通过消化道及呼吸道的黏膜感染动物。经肌肉注射的疫苗很难激起黏膜部位的 IgA 抗体,只有黏膜免疫才能够较好地激起机体黏膜系统的免疫水平,但是由于黏膜系统对外来物质的清除及降解作用致使疫苗不能有效进入机体,从

而制约了黏膜免疫的发展^[2]。为了解决此难题,研究者利用各种物质包裹疫苗以防止降解和增进吸收,例如重组微生物载体、化学共聚体微囊等^[3]。

壳聚糖是带正电荷的类似纤维素的多糖,它可以包裹质粒 DNA,形成对 DNA 的保护^[4]并具有良好的黏膜粘附性质^[5]。20 世纪 90 年代就已有许多研究证明壳聚糖确可在体外将质粒 DNA 带入细胞内,使其在细胞内表达^[6-7],已经证明壳聚糖包裹

收稿日期: 2005-04-22

基金项目: 国家高技术研究发展计划资助项目(2001A A213111); 国家自然科学基金资助项目(30271220)

作者简介: 张馨玉, 硕士研究生; 王宾, 教授, 通讯作者, 主要从事分子免疫学研究, E-mail: bwang3 @cau. edu. cn

DNA 疫苗通过滴鼻途径可很好地提高免疫效果^[8-9]。

黏膜免疫途径包括经由口腔黏膜、呼吸道黏膜、消化道黏膜、生殖道黏膜等多种途径进行免疫^[10]。本研究旨在研究何种黏膜免疫途径可使壳聚糖包裹的 DNA 疫苗能够最有效地在预防口蹄疫类疾病中发挥作用。

1 材料与方法

1.1 材料

辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgA 为 Promega 公司产品(美国);酶标板为 NUNC 公司生产(美国),生化试剂购自北京化学试剂公司;口蹄疫 DNA 疫苗 pcD-VP1 由本实验室构建^[11];口蹄疫灭活疫苗(后简称 146S)购自中国农业科学院兰州兽医研究所;三级昆明雌性白小鼠(6~8周)由北京协和医科大学动物中心提供;壳聚糖购自大连新蝶壳聚糖公司,脱乙酰度 > 80%(质量分数)。

1.2 方法

1)壳聚糖/pcD-VP1 颗粒物的制备。根据文献[4,12]方法稍做改动。将脱乙酰度大于 80%的壳聚糖溶解于 NaAc 溶液中(0.01 mol/L NaAc pH5.7)制备成 0.07%(质量分数)壳聚糖溶液。pcD-VP1 质粒用无水乙醇重沉后溶于 Na₂SO₄ 溶液(0.02 mol/L)中制成 0.01%(质量分数)质粒溶液。2 种溶液分别加热至 55℃,1:1 混合均匀,室温静置 30 min,成为壳聚糖/pcD-VP1 颗粒复合物。

2)壳聚糖/pcD-VP1 颗粒包裹效果的检测。根据文献[12]用 1%(质量分数)的琼脂糖凝胶电泳检测包裹效果。通过扫描电子显微镜(SEM)观察上述包裹后颗粒大小及状态^[10]。此工作完成于新疆大学理化测试中心。

3)小鼠免疫。将上述壳聚糖/pcD-VP1 颗粒(chi-pcD-VP1)经过口服、滴鼻、直肠和生殖道免疫昆明白小鼠,50 μg 质粒/只,裸 DNA 免疫组(pcD-VP1)和未免疫小鼠为对照(6只/组)。分别在初免后 14 和 28 d 加强免疫,对照未免疫。在初免后第 7、14、21、28 和 35 天用 100 μL PBS 冲洗小鼠生殖道 15 次以上,将得到的洗液立即用做抗体检测。在初次免疫后第 35 天处死小鼠,取小鼠小肠用 2 mL PBS 清洗,洗液用于 ELISA 法检测小肠 IgA 和脾脏及 P. P. (Peyer's patches)结 T 细胞增殖。

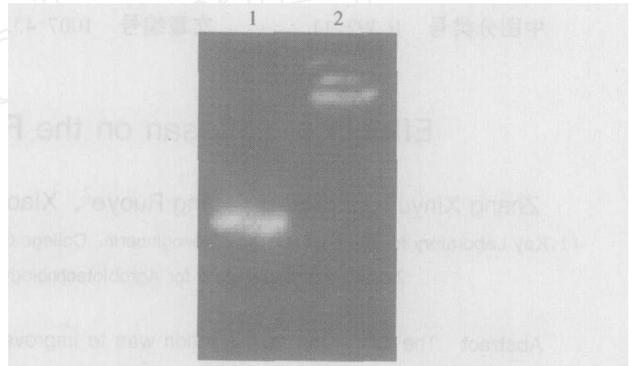
4)IgA 抗体检测。ELISA 法检测小鼠生殖道洗液及小肠洗液 IgA 抗体含量参照文献[11]。

5)T 细胞扩增。免疫后 35 d 处死小鼠,无菌取脾及小鼠小肠 P. P. 结制成单个细胞悬液,参照文献[11]进行 T 细胞增殖试验。

2 结果

2.1 壳聚糖/pcD-VP1 纳米颗粒复合物的包裹效果

经上述过程^[4]用壳聚糖包裹口蹄疫 DNA 疫苗质粒 pcD-VP1 后,为检测包裹效果,经 1%(质量分数)琼脂糖电泳检测(图 1)。在裸质粒 pcD-VP1 泳道,质粒显示出明显的条带,而在壳聚糖/pcD-VP1 组胶上看不出条带,质粒存留在加样孔中。说明壳聚糖已经包裹了质粒,使其不能通过琼脂糖胶的孔径。



1. 裸 pcD-VP1; 2. 壳聚糖/pcD-VP1

图 1 壳聚糖包裹 pcD-VP1 效果检测

Fig. 1 1% agarose test chitosan/pcD-VP1

当琼脂糖胶电泳检测结果表明壳聚糖将 pcD-VP1 质粒有效包裹后,利用扫描电子显微镜观察包裹后颗粒的大小及包裹状态(图 2)。在扫描电子显微镜放大 80 000 倍下,观察到壳聚糖已将 pcD-VP1 质粒包裹形成直径 100 nm 左右的圆球形颗粒。

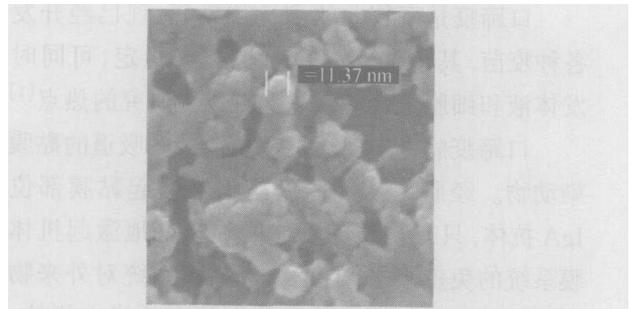


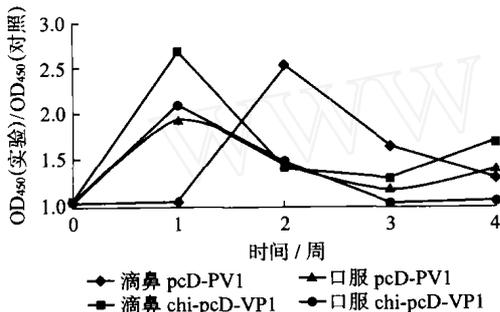
图 2 壳聚糖包裹 pcD-VP1 电镜观察(×80 000)

Fig. 2 Scanning Electron Microscopy of chitosan/pcD-VP1 (×80 000)

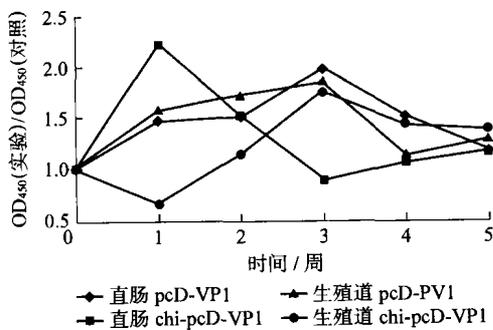
2.2 IgA 抗体的检测

为了解壳聚糖/pcD-VP1 纳米颗粒的免疫效

果,用其经由滴鼻、口服、直肠和生殖道途径免疫了昆明白小鼠。首先检测它的黏膜系统的体液免疫效果,主要是通过 IgA 抗体水平来体现的。小鼠免疫后 7、14、21、28 和 35 d 检测生殖道洗液 IgA,由于检测是在每周分别完成,会产生不同周检测操作的误差,所以以空白对照组小鼠的生殖道洗液 IgA OD 值为基础,以实验组 OD₄₅₀与对照组 OD₄₅₀的比值反映生殖道洗液 IgA 的含量,结果见图 3。在滴鼻和直肠免疫实验中,生殖道洗液 IgA 检测显示,壳聚糖包裹组免疫产生 IgA 抗体水平最高峰比对照组提前 2 周左右。在口服免疫实验中,壳聚糖/pcD-VP1 纳米颗粒与裸 DNA 组小鼠生殖道 IgA 没有太大差异(图 3(a))。生殖道免疫实验中,壳聚糖/pcD-VP1 纳米颗粒抗体低于裸 DNA 组。



(a) 经滴鼻和口服免疫



(b) 经直肠和生殖道免疫

图 3 小鼠经 DNA 疫苗 pcD-VP1 和 pcD-VP1-CHI 免疫后生殖道 IgA 抗体水平

Fig. 3 Vaginal IgA of mice which vaccinated pcD-VP1 and chi-pcD-VP1 through nasal, oral, rectal, vaginal

图 4 显示,在滴鼻免疫实验中,壳聚糖/pcD-VP1 纳米颗粒免疫小鼠使小鼠小肠抗口蹄疫的特异性 IgA 抗体显著增高,而在口服免疫途径中壳聚糖/pcD-VP1 纳米颗粒组和裸 DNA 组之间小肠 IgA 抗体水平没有显著差异,在直肠及生殖道免疫实验中也是如此,壳聚糖/pcD-VP1 纳米颗粒组的

小肠 IgA 抗体水平并不高于裸 DNA 组。

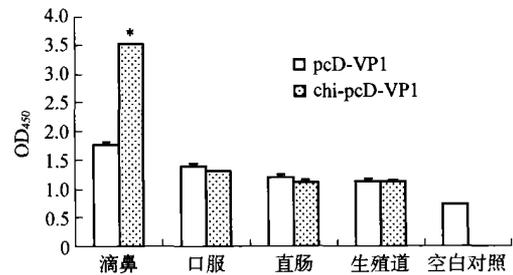


图 4 小鼠经 DNA 疫苗 pcD-VP1 和 CHI-pcD-VP1 免疫后小肠洗液 IgA 抗体水平 (* P < 0.05)

Fig. 4 Small intestine IgA of intranasal, oral, intrarectum and intravaginal vaccinated mice (* P < 0.05)

2.3 T 细胞增殖结果

为了解壳聚糖包裹 DNA 疫苗是否对细胞免疫也有影响,在初次免疫 5 周后取小鼠的脾脏和小肠 P. P. 结做 T 细胞增殖实验,结果见图 5。在滴鼻和口服实验中壳聚糖/pcD-VP1 纳米颗粒组脾脏 T 细胞增殖较裸 DNA 组稍有提高,但不具有显著差异(图 5(a))。在直肠和生殖道免疫实验中,壳聚糖/pcD-VP1 纳米颗粒组与裸 DNA 对照组脾脏 T 细胞增殖结果也没有显著差异,各组 T 细胞增殖水平均好于空白对照组;但是,小肠 P. P. 结进行的 T 细胞增殖实验结果显示,壳聚糖包裹组小鼠 P. P. 结 T 细胞的活性高于裸 DNA 组且 T 检验结果表明,二者间有显著性差异(图 5(b))。

3 讨论

1) 本研究为寻找壳聚糖包裹 DNA 疫苗黏膜免疫的最佳途径,用壳聚糖包裹了口蹄疫 DNA 疫苗经过滴鼻、口服、直肠、生殖道 4 种黏膜免疫途径对小鼠进行免疫,检测了免疫后小鼠体液和细胞免疫指标。

包裹结果显示,壳聚糖对口蹄疫 DNA 疫苗 pcD-VP1 包裹效果比较好,形成大小约 100 nm 的颗粒(图 1, 2)。

抗体结果显示,在滴鼻免疫途径中壳聚糖/pcD-VP1 纳米颗粒组不仅使生殖道特异性 IgA 抗体的最高峰产生时间比 pcD-VP1 组提前了 2 周左右(图 3),并且在免疫 5 周时检测小肠的 IgA 抗体仍然保持较高水平(图 4)。在 T 细胞增殖的检测中,壳聚糖/pcD-VP1 纳米颗粒组滴鼻途径的脾脏 T 细胞增殖效果好于 pcD-VP1 组,P. P. 结的 T 细胞增殖结果由于污染未能得到,但是仍可以期待滴鼻免疫途

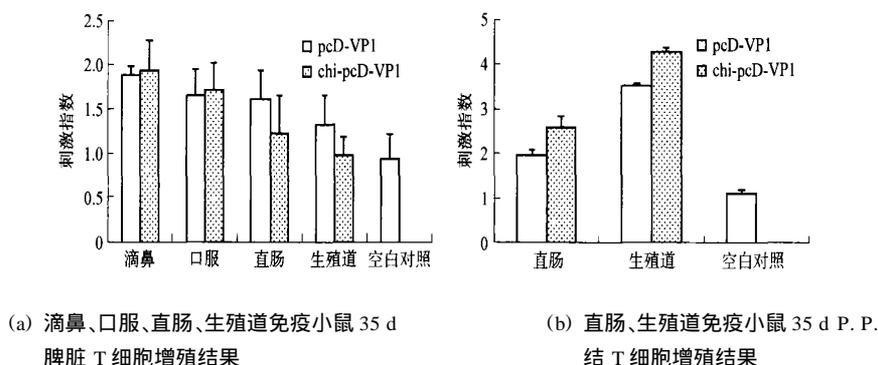


图5 小鼠免疫后35 d T细胞增殖结果(* $P < 0.05$)

Fig. 5 T cell proliferation of mice vaccinated 35 day(* $P < 0.05$)

径能够产生较好的 P. P. 结 T 细胞增殖效果。

在直肠免疫途径中,壳聚糖/pcD-VP1 组生殖道部位抗体也显示类似滴鼻免疫途径结果。并且,壳聚糖/pcD-VP1 提高了 P. P. 结 T 细胞增殖水平(图 5(b))。这显示在此免疫途径中,壳聚糖包裹后的 DNA 疫苗不仅提高了体液免疫水平,还提高了细胞免疫水平。

在口服和生殖道免疫途径中,壳聚糖/pcD-VP1 纳米颗粒组生殖道和小肠的 IgA 都低于裸 DNA 对照组(图 3, 4)。壳聚糖溶于酸的性质使它对于消化系统的酸液没有太好的抵御效果,而较好的黏膜表面黏附性使其更容易被消化道的酸降解^[13],这可能是造成在口服组,有了壳聚糖的包裹抗体反而较低的原因。生殖道的反复免疫与取样造成部分生殖道免疫组试验的小鼠出现生殖道部位感染,这使得生殖道 IgA 可能出现不可靠的结果。

2) 这些结果初步显示,在壳聚糖包裹 DNA 疫苗进行的免疫中,滴鼻免疫途径可能是提高黏膜免疫效果最有效的免疫途径。Hopkins 等^[14]对伤寒沙门氏菌重组基因工程疫苗采用口腔、鼻腔、阴道和直肠 4 种黏膜途径免疫激发小鼠的机体免疫,结果证明 4 种免疫途径鼻腔免疫是机体产生保护性免疫的最有效的免疫途径。在裸 DNA 疫苗的这 4 种黏膜免疫中,滴鼻免疫可能是最有效的。徐薇等的试验也证明了用壳聚糖 DNA 疫苗滴鼻免疫小鼠,使小鼠产生了较高抗体,并且产生 CTL 活性,并且,攻毒试验也证明具有保护作用^[8]。结果在此与前人是一致的。

笔者认为,其他免疫途径中直肠免疫方式也有可能成为比较有效的免疫途径。Kleanthous 等将幽门螺杆菌疫苗通过直肠途径免疫小鼠得到与口腔、

鼻腔不同,但也同样有效的免疫结果^[15]。

对于口蹄疫这类快速经过黏膜系统传染和发病的烈性传染病,提高疫苗在黏膜免疫的效果并且迅速起效是这类疫苗的关键点之一。本实验中,壳聚糖的包裹使口蹄疫 DNA 疫苗经过滴鼻和直肠免疫途径免疫的小鼠生殖道特异性 IgA 抗体的最高水平提前 2 周左右到来,这可能对突发性的烈性传染性病毒的预防起着不可忽视的作用。口蹄疫等病毒多通过口鼻黏膜感染动物,裸 DNA 疫苗组或壳聚糖/pcD-VP1 纳米颗粒疫苗组与空白对照组一样,免疫后 1~5 周小鼠唾液中均未检测到 IgA 抗体,这可能显示 DNA 疫苗激发口腔产生抗体的作用仍然不好,因此壳聚糖/DNA 用于黏膜免疫还需要进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Shedlock D, Weiner D. DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity[J]. J Leuk Bio, 2000, 68: 793~806
- [2] Eriksson K, Holmgren J. Recent advances in mucosal vaccines and adjuvants[J]. Immunotherapy, 2002, 14: 666~672
- [3] 刘晓峰,张霞,胡家露. 黏膜免疫的研究进展[J]. 中国实用内科杂志, 2003, 23(10): 626~627
- [4] Roy K, Mao H, Leon S, et al. Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy[J]. Nature Medicine, 1999, 5(4): 387~391
- [5] Soane R, Frier M, Perkins A, et al. Evaluation of the clearance characteristics of bioadhesive systems in humans [J]. Int J Pharm, 1999, 178: 55~65
- [6] Leong K W, Mao H Q, Truong-Le V L, et al. DNA-polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles

- [J]. *J Control Rel*, 1998, 53:183~193
- [7] Gerrit Borchard. Chitosans for gene delivery [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, 52:145~150
- [8] Xu W, Shen Y, Jiang Z, et al. Intranasal delivery of chitosan-DNA vaccine generates mucosal SIgA and anti-CVB3 protection[J]. *Vaccine*, 2004, 22: 3603~3612
- [9] Illum L, Jabbar Gill I, Hinchcliffe M, et al. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines[J]. *Adv Drug Del Rev*, 2001, 51: 81~96
- [10] 王克恭. 粘膜免疫与粘膜接种[J]. *内蒙古畜牧科学*, 2000, 21(2):18~19
- [11] Jin H, Li Y, Ma Z, et al. Effect of chemical adjuvants on DNA vaccination [J]. *Vaccine*, 2004, 22: 2925~2935
- [12] 金华利, 张富春, 张爱莲, 等. 纳米颗粒介导质粒 DNA 转染体外真核细胞 [J]. *中国生物工程杂志*, 2003, 10:71~76
- [13] 倪红, 杨艳燕, 陈怀新. 甲壳质/壳聚糖及其衍生物在生物领域中的应用 [J]. *湖北大学学报(自然科学版)*, 2001, 23: 77~81
- [14] Hopkins S, Kraehenbuhl J P, Schodel F, et al. A recombinant salmonella typhimurium vaccine induces local immunity by four different routes of immunization [J]. *Infect Immun*, 1995, 63:3279~3286
- [15] Kleanthous H, Myers G A, Georgakopoulos K M, et al. Rectal and intranasal immunizations with recombinant urease induce distinct local and serum immune responses in mice and protect against *Helicobacter pylori* infection [J]. *Infect Immune*, 1998, 66:2879~2886

实验室介绍

中国农业大学国家动物海绵状脑病实验室

研究动物传染性海绵状脑病 (TSE) 这一危害动物和人类的重大传染病, 对于保障国家政治、经济、社会稳定具有重大战略意义。该病的病原是朊病毒。探讨动物朊病毒的转化的机制、与宿主的互作、种间屏障突破和免疫耐受机制, 不仅有助于阐明动物海绵状脑病发生的分子机制, 而且可为持续控制该类疫病的发生提供重要的理论依据和技术储备。因此, 它是各国政府和科学家们重要的研究热点。

中国农业大学国家动物海绵状脑病实验室创建于 2001 年, 是国家对动物海绵状脑病检测和研究的重点实验室, 其中包括 P3 实验室 (生物安全 - 3 级) 和 2 个基础实验室; 实验室现有专职工作人员 7 名和硕士、博士研究生 22 名; 目前承担国家级、部级有关研究项目 16 项; 获国家、省市级科技成果奖 2 项, 获国家专利 2 项; 在国内外重要学术刊物上发表学术论文 80 余篇, 其中多篇被 SCI 等国内外权威数据库收录; 实验室成立以来, 与国内外同行保持着广泛的交流合作关系。

实验室主要研究方向为: 1) 明确 TSE 病原在机体内的转运机理, 确定病原潜伏感染、传播途径和检测部位, 为此类疾病的监测提供科学依据; 2) 研究 TSE 宿主基因型与病原致病的关系及其抗病相关性, 为揭示动物传染性海绵状脑病潜伏感染机理提供依据, 以及为持久抗病动物育种奠定理论基础; 3) TSE 诊断试剂盒的研制。

实验室主要研究内容包括: TSE 感染性实验、TSE 诊断技术研究、朊病毒的结构与功能; 牛源组织为原料的疯牛病感染因子检测。

本实验室负责黑龙江省、内蒙古自治区、辽宁省、吉林省和北京市 5 省 (区) 市的 TSE 检测工作。近几年对上述地区的牛脑组织样本, 用病理组织学、免疫组织化学和免疫印迹方法持续开展了检测, 积累了有价值的资料。

(动物医学院 赵德明供稿)