

基因枪轰击小鹅瘟病毒 VP3 基因疫苗诱导鹅体内体液免疫的机制^①

黎 敏^② 卢 菲^{②*} 韩新锋^② 朱德康^{②*} 车 茜 程安春^{③*} 汪铭书^{③*} 刘晓东 陈孝跃^{*}

(四川农业大学动物医学院禽病防治研究中心 雅安 625014)

(* 动物疫病与人类健康四川省重点实验室 雅安 625014)

摘 要 将小鹅瘟病毒 VP3 基因疫苗(pcDNA-GPV-VP3)分别以每只 1 μ g、3 μ g 和 6 μ g 的基因枪轰击免疫 30 日龄四川白鹅,用免疫组织化学法检测 pcDNA-GPV-VP3 在鹅体内各组织器官表达情况;用间接 ELISA 检测免疫鹅血清中 GPV 抗体滴度。结果:①各剂量免疫组 1d 时能在免疫部位皮肤,3d 时能在心脏/十二指肠/空肠/盲肠/肝脏,7d 时在回肠/直肠检测到 pcDNA-GPV-VP3 的表达;7d 表达最多;表达可持续至 35~63d;表达产物的数量和表达持续时间总体规律为 6 μ g 组 > 3 μ g 组 > 1 μ g 组。②免疫后第 7d 血清抗体开始升高,21d 达到最大值,免疫后第 14~217d 极显著($P < 0.01$)高于 PBS 和空白质粒对照;体液免疫效果存在一定的剂量依赖。研究表明,pcDNA-GPV-VP3 基因枪轰击免疫雏鹅后能在免疫部位皮肤、心肌、肝脏和各肠段中表达并能够诱导雏鹅产生良好的体液免疫。

关键词 pcDNA-GPV-VP3, 基因枪轰击, 雏鹅, 表达, 抗体

0 引 言

鹅细小病毒(goose parvovirus, GPV)感染引起的小鹅瘟(goose plague, GP)是危害养鹅业的主要传染病之一。目前 GP 的防治可通过对种鹅免疫 GPV 弱毒疫苗而使下一代雏鹅获得主动免疫保护或直接对雏鹅注射特异血清提供被动免疫保护^[1],但这样的传统方法存在一些缺陷,如弱毒疫苗可以诱导机体产生持久的体液免疫,但不能诱导机体产生强大抗病毒的细胞免疫应答,从而降低了抵抗病原侵袭的能力^[2];传统疫苗免疫无法区别自然感染和人工免疫产生的特异抗体,等等,这些都对有效控制 GP 的危害造成一定的困难,而新型的基因疫苗为解决该难题提供了一种选择途径。基因疫苗是将含病原保护性抗原蛋白基因的真核表达载体直接导入机体,达到预防特定传染病的目的^[3-6],具有制作简单、价格低廉等优点^[7]并有可能通过配合适当的检测方法而将自然感染和人工免疫产生的特异抗体相区别开^[8-9],从而能更好地综合防治传染病。VP3 为 GPV 的主要结构蛋白,约占病毒总蛋白量的 80%,含有

GPV 主要抗原决定簇成分,是 GPV 主要保护性抗原,能诱导机体产生具有中和作用的抗体,是用于构建 GPV 基因疫苗的理想基因^[10]。基因疫苗通过一定免疫途径进入机体能否顺利表达并诱导机体产生体液免疫是其能否发挥免疫保护作用的关键,目前尚缺乏小鹅瘟病毒 VP3 基因疫苗(pcDNA-GPV-VP3)在鹅体内的表达和诱导机体体液免疫的研究,因此,本研究将 pcDNA-GPV-VP3 以不同剂量的基因枪轰击免疫 30 日龄四川白鹅后,以免疫组织化学方法检测 pcDNA-GPV-VP3 在鹅体内的表达规律,以间接酶联免疫吸附法(ELISA)检测免疫鹅血清中 GPV 抗体滴度,以期为进一步研究和阐明 pcDNA-GPV-VP3 免疫发生机理、免疫持续期等提供基础数据,为小鹅瘟病毒 VP3 基因疫苗的临床应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 基因疫苗和对照质粒

pcDNA3.1 (+) 质粒, Invitrogen 产品; pcDNA-GPV-VP3, 为 GPV 的 VP3 基因正向插入 pcDNA3.1

① 教育部“长江学者和创新团队发展计划”创新团队项目(IRT0848)、现代农业产业技术体系建设专项资金(nycytx-45-12)和四川省重大基础研究项目(2008J00003/2008JY0100)资助。

② 前四位作者对本文贡献相同,并列为第一作者。黎敏,女,1982 年生,硕士;卢菲,女,1981 年生,硕士;韩新锋,男,1979 年生,博士;朱德康,男,1974 年生,博士;四人的研究方向均为:禽病学。

③ 程安春和汪铭书共为通讯作者, E-mail: chenganchun@vip.163.com; mshwang@163.com (收稿日期:2007-12-13)

(+)多克隆位点中的真核表达质粒,由本实验室构建^[11]。

1.1.2 实验动物

30 日龄四川白鹅,由四川农业大学家禽繁殖育种实验场提供,GPV 抗体阴性;2~3 kg 公兔,由四川农业大学实验动物室提供。

1.1.3 主要仪器和试剂

基因枪(PDS 1000/He System 型, Bio-Rad); 低压蛋白质纯化系统(Biologic LP 型, Bio-Rad); 显微镜及数码显微照相系统(2400 型, Leica Nikon); 酶联免疫检测仪(ELx800 型, Bio-tek)和洗板机(ELx50 型, Bio-tek); 酶标反应板(Coming); DEAE-SephadexA-50 (Amersham Pharmacia)、完全弗氏佐剂(Sigma), APES 粘片剂(武汉博士德生物工程公司), 购自成都博瑞克公司; UltraSensitive™超敏浓缩试剂盒, 购自福州迈新生物技术开发有限公司; Horstradish peroxidase (HRP) conjugation 试剂盒(Alpha diagnostic international inc.), 购自晶美生物工程公司; TMB(Amresco), 购自成都天泰生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 动物的分组及免疫接种

将 425 只 30 日龄四川白鹅随机分为 5 组, 85 只/组。第一组为大剂量免疫组, 每只基因枪轰击 pcDNA-GPV-VP3 6 μ g; 第二组为中剂量免疫组, 每只基因枪轰击 pcDNA- GPV-VP3 3 μ g; 第三组为小剂量免疫组, 每只基因枪轰击 pcDNA- GPV-VP3 1 μ g; 第四组为空载体对照组, 每只基因枪轰击空载体 pcDNA3.1(+) 3 μ g; 第五组为空白对照组, 每只注射 PBS 100 μ L。

1.2.2 样品的采集和处理

于免疫后第 1h、12h、1d、3d、7d、21d、35d、63d、105d 和 217d 每组分别随机宰杀 5 只鹅, 取心、肝、脾、肺、肾、法氏囊、胸腺、哈氏腺、十二指肠、空肠、回肠、直肠、盲肠、胰腺、大脑及注射部位皮肤, 4% 多聚甲醛液固定, 修块, 水洗; 常规病理石蜡包埋后将组织块切成 4 μ m, 用于免疫组化检测组织器官中的 VP3 抗原表达情况。

于免疫后第 3d、7d、14d、21d、28d、35d、49d、63d、77d、105d、133d、161d、189d 和 217d 每组随机选取 5 只鹅, 颈静脉采血并分离血清, 用于 ELISA 检测血清中 GPV 抗体滴度。

1.2.3 间接免疫组织化学法检测 pcDNA-GPV-VP3 在各组织器官中的表达和分布

1.2.3.1 兔抗 GPV IgG 的制备

参照 Alexandrov M^[12]报道的方法采用超速离心纯化 GPV, 按常规方法免疫兔子, 四免后 14 天, 兔抗 GPV 血清的琼扩效价为 1:64, 收集血清, 用硫酸铵从血清中粗提 IgG, 再参照文献[13]经 DEAE-SephadexA-50 离子交换层析纯化, SDS-PAGE 电泳分析为纯化的 IgG 后, 浓缩, 测得纯化 IgG 的琼扩效价为 1:16, 将纯化 IgG 除菌和分装, -20℃ 保存备用。

1.2.3.2 间接免疫组化法检测

参照文献[13, 14]方法进行间接免疫组化法检测。按光学显微镜视野下观察到的特定细胞经染色后棕黄色显色的有无、数量、种类及深浅来判定。没有出现棕黄色的判断为阴性, 即未检测到 pcDNA-GPV-VP3 表达; 出现棕黄色的判断为阳性, 即 pcDNA-GPV-VP3 表达。

1.2.4 ELISA 检测血清中 GPV 抗体滴度

1.2.4.1 HRP 酶标兔抗鹅 IgG 的制备

参照文献[13]用硫酸铵粗提鹅血清中 IgG, 以 DEAE-sephadexA 离子交换层析纯化, 常规方法免疫兔子; 当琼脂扩散试验检测血清抗体效价高于 1:32 时, 收集兔血清, 用硫酸铵粗提、DEAE- SephadexA-50 离子交换层析纯化兔抗鹅 IgG; 参照 ADI 公司的说明书进行兔抗鹅 IgG 的 HRP 标记。

1.2.4.2 间接 ELISA 检测血清抗体滴度

参照文献[15], 采用间接 ELISA 方法测定。以超速离心纯化的 GPV 为包被抗原, 加入稀释的待检血清, 最后加入 HRP 酶标兔抗鹅 IgG, TMB 显色后于波长 450 nm 下测定其 OD 值, 所得数据用 SPSS10.0 进行统计学分析。

2 结果

2.1 pcDNA-GPV-VP3 在雏鹅体内各组织器官内的表达时相和分布

空载体和生理盐水对照组各组织器官中所有时间点均未检测到棕黄色阳性颗粒。不同剂量的 pcDNA-GPV- VP3 免疫组在组织器官中的表达情况均是可在免疫部位、心脏、肝脏、十二指肠、空肠、盲肠、直肠和回肠中检测到表达的阳性信号。

2.1.1 免疫后不同时间各组织器官中 pcDNA-GPV-VP3 表达产物的分布情况

1d 时各实验组均在免疫部位皮肤中最先检测到棕黄色阳性颗粒, 其中 1~3d 为表达的高峰期, 随后数量开始下降, 但可持续表达至 35d; 免疫后 3d 小肠中检测到阳性颗粒, 7d 时达到最多, 21d 后数量

逐渐下降;免疫后 3d 心肌细胞中检测到阳性颗粒,7d 时达到最多,但数量要比免疫部位和肠道少;在肝中有零星表达。脾、肺、肾、胸腺、胰腺、脑、法氏囊

和哈氏腺在各时间点均未检测到棕黄色阳性表达颗粒。(见表 1 和图 1)

表 1 pcDNA-GPV-VP3 表达产物在雏鹅体内各组织器官中的表达和分布情况

时间	免疫剂量	组织															
		心脏	肝脏	脾脏	肺脏	肾脏	胸腺	十二指肠	空肠	盲肠	直肠	回肠	法氏囊	免疫部位皮肤	胰腺	大脑	哈氏腺
1h	1μg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3μg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6μg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12h	1μg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3μg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6μg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1d	1μg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	3μg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-
	6μg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-
3d	1μg	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	++	-	-	-
	3μg	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	++	-	-	-
	6μg	+	+	-	-	-	-	++	+	+	-	-	-	++	-	-	-
7d	1μg	++	+	-	-	-	-	++	++	++	+	+++	-	+	-	-	-
	3μg	++	+	-	-	-	-	+++	+++	+++	++	+++	-	++	-	-	-
	6μg	++	+	-	-	-	-	+++	+++	+++	++	+++	-	+	-	-	-
21d	1μg	+	-	-	-	-	-	+	+	++	+	+	-	+	-	-	-
	3μg	+	-	-	-	-	-	++	++	++	+	+++	-	+	-	-	-
	6μg	+	+	-	-	-	-	+	++	+++	+	+++	-	+	-	-	-
35d	1μg	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-
	3μg	+	-	-	-	-	-	-	+	++	-	++	-	+	-	-	-
	6μg	+	-	-	-	-	-	+	+	++	-	++	-	+	-	-	-
63d	1μg	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3μg	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6μg	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
105d	1μg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3μg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6μg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
217d	1μg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3μg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6μg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

免疫部位:早期观察到在接种部位有炎症反应,部分细胞坏死,真皮内炎症细胞增多,1d 时皮肤内细胞浆和细胞间出现棕黄色阳性颗粒并一直持续至 35d。

心脏:3d 时可以检测到表达阳性,7d 时表达量最高,之后表达量下降,表达可持续至 63d。

肝脏:6 μ g 组于 3 ~ 21d、3 μ g 组于 3 ~ 7d、1 μ g 组于 7d 可以检测到少量的棕黄色阳性细胞。

十二指肠:3d 时各剂量组肠绒毛上皮细胞检测

到棕黄色的颗粒;7d 时检测到大量的棕黄色的颗粒,阳性主要出现在肠腺细胞、上皮细胞。其中 1 μ g 和 3 μ g 组阳性持续至 21d,而 6 μ g 组阳性可持续至 63d。

空肠:3d 时各剂量组肠绒毛上皮细胞检测到棕黄色的颗粒;7d 时检测到大量棕黄色的颗粒;35d 时有少量的弥散性棕黄色颗粒分布。

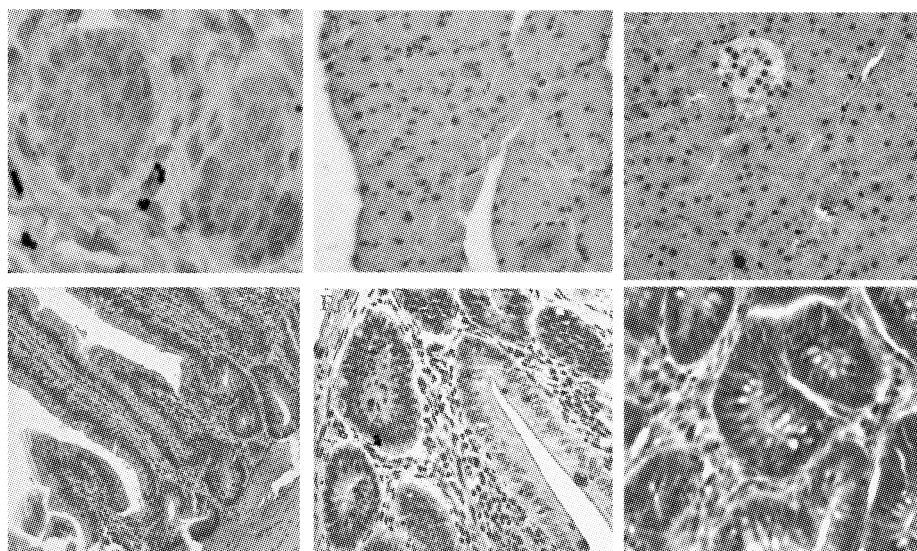
回肠:7d 时各剂量组均检测到大量的棕黄色颗粒,阳性可持续至 35d,其中 3 μ g 和 6 μ g 组的在 7 ~

35d 一直表达较高,而 $1\mu\text{g}$ 组除 7d 时表达量较大外,其余时间只见零星表达。

盲肠:3d 时各剂量组均检测到阳性;7d 时盲肠的肠道上皮细胞和肠腺细胞中都出现较高的阳性表

达颗粒,表达可持续至 35d。

直肠:7~21d,直肠绒毛上皮细胞中有少量棕黄色颗粒分布。



A. 皮肤($3\mu\text{g}$, 7d, ISH $\times 400$); B. 心肌($6\mu\text{g}$, 3d, ISH $\times 400$); C. 肝脏($1\mu\text{g}$, 7d, ISH $\times 400$); D. 回肠($6\mu\text{g}$, 7d, ISH $\times 400$); E. 盲肠($6\mu\text{g}$, 7d, ISH $\times 400$); F. 十二指肠($6\mu\text{g}$, 7d, ISH $\times 400$)

图 1 pcDNA-GPV-VP3 表达产物在雏鹅体内各组织器官中的分布

2.1.2 不同免疫剂量的 pcDNA-GPV-VP3 在组织器官中表达产物的分布规律

不同免疫剂量的 pcDNA-GPV-VP3 基因枪轰击免疫雏鹅后,各组织器官中检测到阳性棕黄色表达颗粒的数量和表达持续时间与免疫剂量有一定的正比关系,表现出一定的剂量依赖性,不同剂量免疫组各组织器官中出现棕黄色阳性颗粒的数目和阳性持续时间呈现的总体规律为 $6\mu\text{g}$ 组 $> 3\mu\text{g}$ 组 $> 1\mu\text{g}$ 组。

2.2 pcDNA-GPV-VP3 免疫雏鹅后血清抗体的动态变化

pcDNA-GPV-VP3 免疫后,雏鹅血清中 GPV 抗体从第 7d 开始明显高于 PBS 和空白质粒对照组,21d 达到最大值。 $1\mu\text{g}$ 、 $3\mu\text{g}$ 和 $6\mu\text{g}$ 三个免疫剂量鹅 14~217d 极显著 ($P < 0.01$) 高于 PBS 和空白质粒对照鹅; $6\mu\text{g}$ 组 63~77d、133d~189d 显著 ($P < 0.05$) 或极显著 ($P < 0.01$) 高于 $3\mu\text{g}$ 组,14~189d 显著 ($P < 0.05$) 或极显著 ($P < 0.01$) 高于 $1\mu\text{g}$ 组; $3\mu\text{g}$ 组 21d、63d 和 133~189d 显著 ($P < 0.05$) 或极显著 ($P < 0.01$) 高于 $1\mu\text{g}$ 组(见图 2)。

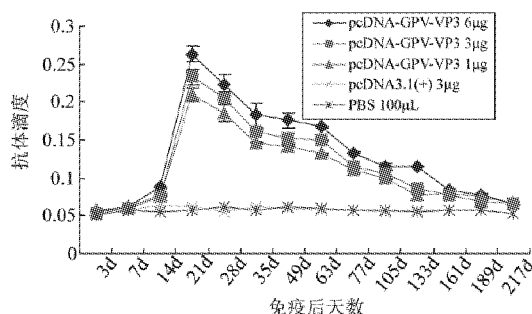


图 2 pcDNA-GPV-VP3 免疫雏鹅后血清中 GPV 抗体的动态变化

3 讨论

3.1 关于 pcDNA-GPV-VP3 在雏鹅体内各组织器官内的表达、分布和意义

本实验将 pcDNA-GPV-VP3 基因枪轰击免疫 30 日龄四川白鹅后,能在免疫部位皮肤、心脏、肝脏和各肠段的细胞中检测到 VP3 抗原的表达,但仅占 FQ-PCR 所检测 pcDNA-GPV-VP3 阳性组织器官的 25%^[16];相似的结果出现在 G Acsadi 等的研究中,G Acsadi 等检测真核表达质粒在大鼠脑、心、肝、脾、肾、肺、骨骼肌、子宫等不同组织中的表达情况,结果

仅在心肌和骨骼肌细胞中检测到质粒 DNA 的表达,其中心肌中的质粒表达持续 2 个星期^[17]。表达和分布不成正比的原因可能是基因疫苗在某些组织中转染率太低而不能被检测到。有资料^[18]显示,DNA 进入 APC 细胞后能够通过淋巴管和血管移至距离其较远的部位,但由于一些生化因素(如酶)和天然屏障作用,会使 DNA 的吸收率、吸收速率和转染率大大降低,造成表达量低。

接种部位的组织结构和接种途径对基因疫苗在动物体内的分布速度及机体内分布表达量与时间有重要影响。Kang^[19]等将质粒 DNA 局部直接涂抹皮肤和静脉注射免疫小鼠,结果皮肤涂抹组各组织中的含量比静脉注射组高,质粒 DNA 能长时间表达蛋白引起免疫反应,证明皮肤是优于静脉的一种安全、高效、可靠的免疫部位。本研究中将 pcDNA-GPV-VP3 基因枪轰击免疫雏鹅,免疫部位皮肤在 1d 时首先检测到棕黄色阳性颗粒,随后在其他组织器官出现阳性表达产物,证明基因枪轰击用以免疫基因疫苗这一途径是有效的。实验中还观察到免疫部位有炎症反应,有部分细胞坏死,真皮内炎症细胞增多的现象,这些损伤有可能会增强免疫反应,因为基因疫苗注入后在体内引起早期机械性损伤,有些炎性细胞浸润可以提高肌细胞对外源 DNA 的免疫表达效率^[20]。

实验还证明基因疫苗能在心肌和骨骼肌中表达,这是因为横纹肌细胞摄取质粒能力较强,其具有的 T 管-胞膜内折这一特征性组织结构在质粒 DNA 的摄取中起着十分重要的作用^[21],本实验中在心肌内能检测到阳性颗粒,再一次验证了这点。

本研究中,免疫部位皮肤、心脏、肝脏和各肠段的细胞中检测到 pcDNA-GPV-VP3 表达的 VP3 抗原,这和周春宇^[14]、黄昌奇^[22]用免疫学方法检测 GPV 病毒分布的结果既有相似之处,也有不同之处。周春宇等用间接免疫酶组织化学方法检测 GPV 强毒在雏鹅体内的分布,结果肝、肾和肠道中的阳性检出率最高;黄昌奇等用 dot-ELISA 检测了 GPV 弱毒在雏鹅体内的分布,GPV 出现的顺序是心、肝、脾、肺、肾;pcDNA-GPV-VP3 和 GPV 的抗原物质都是在心、肠道中分布最多。本研究结果说明 pcDNA-GPV-VP3 在动物体内表达的抗原分布和自然感染相似,这为 pcDNA-GPV-VP3 发挥免疫作用提供了基础。

本研究中,肠道、心脏、肝脏和免疫部位皮肤中 pcDNA-GPV-VP3 从接种 1~3d 开始有表达,并且随着时间增加,其表达量也增加,7d 时检测到的 pcDNA-

GPV-VP3 表达产物 VP3 最多,21d 后数量逐渐下降。实验结果提示质粒转移到体内后,要经过一段时间完成抗原加工、提呈,最终表达出有免疫作用的抗原,随后表达量开始下降,这有可能与体内基因疫苗大幅度降解有关,pcDNA-GPV-VP3 在器官内数量的大量降低势必会导致表达抗原 VP3 量的下降,直至量小到不能被免疫组化方法检测到。

本实验以 1 μ g、3 μ g 和 6 μ g 三个剂量 pcDNA-GPV-VP3 基因枪轰击免疫后鹅体内表达的组织器官相同;在各组织器官中各时段表达呈现的总体规律为 6 μ g 组 > 3 μ g 组 > 1 μ g 组,1~3d 各剂量组的免疫部位皮肤、心肌、肝脏和肠道开始检测到阳性的出现,持续时间 7~63d 不等,其中大剂量组部分器官检测到阳性的时间早于小剂量组且数量明显多于小剂量组,说明 pcDNA-GPV-VP3 的免疫剂量与其在组织中的表达量存在一定正相关性,免疫剂量越大,相应的其在组织中的表达量也越大,但非等比例递增。

3.2 关于 pcDNA-GPV-VP3 免疫雏鹅后血清抗体的动态变化及免疫发生机制

抗体系统是主要的抗原特异性系统之一,它通过中和病毒颗粒、通过补体介导的细胞毒作用或抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用来控制病毒感染。抗体与细胞表面病毒糖蛋白结合后,还能下调感染细胞内病毒基因的表达^[23]。其中 IgG 作为抗体系统的主要成分,以高浓度遍布全身,是全身性体液免疫反应的主要效应分子。从图 2 可以看出,pcDNA-GPV-VP3 经不同免疫剂量基因枪免疫雏鹅后,能诱导机体产生抗 GPV 特异性抗体,与 PBS 和与空载体对照组相比差异极显著($P < 0.01$),而 PBS 和空载体质粒对照组的血清抗体 IgG 都无明显变化,说明 pcDNA-GPV-VP3 能够诱导雏鹅产生良好的体液免疫;pcDNA-GPV-VP3 经基因枪免疫后第 3d 开始检测到 GPV 特异性抗体,并且持续到 217d,表明 pcDNA-GPV-VP3 可以诱导雏鹅产生长时间的体液免疫应答;基因枪轰击 6 μ g 组显著($P < 0.05$)或极显著($P < 0.01$)高于 3 μ g 组和 1 μ g 组,3 μ g 组显著($P < 0.05$)或极显著高于 1 μ g 组,表明基因疫苗诱导的体液免疫具有一定的剂量依赖性,6 μ g 组 > 3 μ g 组 > 1 μ g 组。

基因疫苗是将编码某种抗原蛋白的外源基因直接导入机体细胞内,通过宿主细胞的转录系统合成抗原蛋白,转录合成的抗原蛋白可诱发机体产生保护性中和抗体,从而达到预防特定传染病的目的^[3-6]。在基因疫苗免疫中,基因枪轰击法比肌肉注射法诱导更强的免疫应答,小剂量疫苗可诱导产生

高滴度的抗体,而肌肉注射则需要大剂量的基因疫苗^[24-25]。基因枪将吸附了 DNA 疫苗的金微粒直接轰击皮肤,简单快捷,3min 后 DNA 就可以从金微粒上解离转入到树突状细胞等细胞中^[26],可以克服皮内组织细胞转染效能低的缺点,同时具有靶向作用的成熟树突状细胞也可以提高基因疫苗的免疫效果^[27-28],因此基因枪轰击是将基因疫苗导入动物机体皮肤的有效方法之一。由于皮肤中富含能加强免疫反应的免疫活性细胞,这类细胞可以进行高效抗原递呈加工和分泌细胞因子,所以基因疫苗通过皮肤免疫后能迅速引起较强的体液和细胞免疫应答。Fynan^[29]等将含有甲型流感病毒血凝素基因的基因疫苗免疫小鼠,比较几种免疫途径的免疫保护效果,结果基因枪介导的 DNA 导入方法效率最高,是肌肉注射的 500 倍。Alexia 等^[30]在疟原虫丝氨酸重复抗原基因疫苗的研究中发现,用基因枪单次免疫可诱导高水平的抗体,加强免疫可诱导更强烈的免疫应答,而肌肉注射多次接种,其免疫效果还达不到基因枪免疫单次免疫效果,且免疫后两个月二者诱导的抗体水平差异显著。本研究采用基因枪轰击免疫 pcDNA-GPV-VP3,结果也诱导雏鹅产生了高滴度的抗 GPV 抗体,进一步表明基因枪轰击是良好的基因疫苗免疫途径。基因枪免疫法可诱导很强的免疫应答可能与以下几种因素有关系:(1) 基因枪利用高压将包裹金属颗粒的基因疫苗直接打入细胞中,与肌肉注射法相比,没有被机体内环境中核酸酶降解的过程,减少了基因疫苗的损失;(2) 从皮肤组织的结构特点看,皮肤细胞具备了很多有利于诱导免疫反应的特点:皮肤细胞附近有很多丰富的树突状细胞和巨噬细胞,可有效完成抗原提呈,并激发免疫应答;皮肤朗氏细胞可将抗原从皮肤运输到附近淋巴细胞的功能,有利于免疫应答的迅速产生;皮肤组织细胞中含有丰富的表达 MHC 分子的 Th 细胞,可产生多种细胞因子并诱导免疫系统的激活。皮肤组织的这些特征可能保证了即使在剂量很低的情况下,也能有效激发机体的免疫应答反应。

实验结果显示,pcDNA-GPV-VP3 基因枪轰击免疫后,1d 时各剂量免疫组均能免疫鹅体内检测到 pcDNA-GPV-VP3 的表达,而 7d 后血清中 GPV 抗体才开始升高;表达的免疫原蛋白在 7d 时达最大,而血清中 GPV 抗体 21d 达到最大值,提示 GPV 抗体的产生依赖于 pcDNA-GPV-VP3 表达的免疫原蛋白的产生。免疫 35~63d 后检测不到免疫原蛋白的表达,而血清中 GPV 抗体 217d 仍极显著($P < 0.01$)高

于 PBS 和空白质粒对照组,表明随着 pcDNA-GPV-VP3 在机体内逐渐降解势必会导致表达抗原 VP3 量的下降,直至量小到不能被免疫组化方法检测到或消失,但表达产物刺激机体产生的 GPV 抗体将持续相当一段时间,从而使基因疫苗免疫后发挥免疫保护作用。当然 pcDNA-GPV-VP3 的免疫保护效果还需进一步进行中和抗体的检测和攻毒保护实验加以确认。

4 结 论

本文的实验用基因枪轰击不同剂量 pcDNA-GPV-VP3 免疫 30 日龄雏鹅,对 VP3 蛋白抗原及其诱导的抗体检测结果表明,小鹅瘟病毒 VP3 基因疫苗具有良好的免疫原性。用基因枪分别轰击免疫 1 μ g、3 μ g 和 6 μ g 的 pcDNA-GPV-VP3,均可在雏鹅的心肌、肝脏、各肠段和轰击免疫部位的皮肤中得到良好表达,表达抗原在体内的分布模式与小鹅瘟病毒自然感染相似。pcDNA-GPV-VP3 免疫雏鹅后能够诱导雏鹅产生良好的体液免疫,其抗体滴度有一定的剂量依赖性。

参考文献

- [1] Richard E G (chief editor). Diseases of Poultry. 11th edition. Ames :Iowa State University Press,2003. 367-374
- [2] 程安春,汪铭书,富军等.小鹅瘟 GPV-CHa15 弱毒株培育及其特性研究.中国兽医杂志,2005,41 (11):13-17
- [3] Tsukamoto K, Sato T, Saito S, et al. Dual-viral vector approach induced strong and long-lasting protective immunity against very virulent infectious bursal disease virus. *Virology*, 2000, 269:257-267
- [4] Chang H C, Lin T L, Wu C C. DNA vaccination with plasmids containing various fragments of large segment genome of infectious bursal disease virus. *Vaccine*, 2003, 21: 507-513
- [5] Gupta P K, Rai A, Rai N, et al. Cloning of canine parvovirus VP2 gene and its use as DNA vaccine in dogs. *Current Science*, 2005, 88(5):778-782
- [6] Tiacher B K, Schumacher D, Beer M, et al. A DNA vaccine containing an infection Marker's disease in chickens. *Gene Virol*, 2002,83(10):2367-2376
- [7] Hartikka J, Sawdey M, Jensen F C, et al. An improved plasmid DNA expression vector for direct infection into skeletal muscle. *Human Gene Therapy*, 1996,7:1205-1209
- [8] Kweon C H, Ko Y J, Kim W, et al. Development of a foot-and-mouth disease NSP ELISA and its comparison with differential diagnostic methods. *Vaccine*, 2003,21:1409-1414
- [9] Kowalczyk D W, Ertl H C. Immune responses to DNA vaccines. *Cell Mol Life Sci*,1999,55.751-770
- [10] Zadori Z, Stefancsik R, Rauch T, et al. Analysis of the complete nucleotide sequences of goose and muscovy duck parvoviruses indicates common ancestral origin with adeno-associated virus 2. *Virology*, 1995,212(2):562-573
- [11] 韩新锋,程安春,汪铭书等.小鹅瘟病毒 VP3 基因疫苗

- 的构建及其诱导小鼠中和鹅中和抗体初报. 高技术通讯, 2008, 18(5): 543-549
- [12] Alexandrov M, Alexandrova R, Alexandrov, et al. Fluorescent and electron-microscopy immunoassays employing polyclonal and monoclonal antibodies for detection of goose parvovirus infection. *Virol Methods*, 1999, 79(1): 21-32
- [13] 蔡文琴, 王伯坛. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术. 成都: 四川科学技术出版社, 1994
- [14] 周春宇, 程安春, 汪铭书等. 检测鹅细小病毒的间接免疫酶组织化学法的建立. 中国兽医杂志, 2006, 42(8): 19-21
- [15] 齐雪峰, 程安春, 汪铭书等. 鸭瘟病毒抗体间接 ELISA 检测试剂盒的研制. 中国兽医科学, 2007, 37(08): 690-694
- [16] 黎敏, 程安春, 汪铭书等. 基因枪轰击不同剂量小鹅瘟病毒 VP3 基因疫苗在鹅体内的动态分布. 畜牧兽医学报, 2007, 38(11): 1204-1210
- [17] Acsadi G, Dickson G, Love D R, et al. Direct gene transfer and expression into rat heart. *New Biol*, 1991, 3(1): 71-81
- [18] Jukka H, Michael S, Francine C, et al. An improved plasmid DNA Expression vector for direct injection into skeletal muscle. *Human Gene Therapy*, 1996(7): 1205-1217
- [19] Kang M J, Kim C K, Kim M Y, et al. Skin permeation, biodistribution, and expression of topically applied plasmid DNA. *Gene Med*, 2004, 6: 1238-1246
- [20] 孙乃恩, 孙东旭编著. 分子遗传学. 南京: 南京大学出版社, 1996. 271-274
- [21] Davis H L, Michel M L, Hashida M, et al. Direct gene transfer in skeletal muscle: plasmid DNA-based immunization against the hepatitis B virus surface antigen. *Vaccine*, 1994, 12(16): 1503-1509
- [22] 黄昌奇, 程安春, 汪铭书等. 小鹅瘟的研究—弱毒在雏鹅和成年鹅体内分布和排泄. 四川农业大学学报, 1997, 15(10): 102-106
- [23] Song K D, Lillehoj H S, Choi K D, et al. A DNA vaccine encoding a conserved Eimeria protein induces protective immunity against live Eimeria acervulina challenge. *Vaccine*, 2000, 19, 243-252
- [24] Jefferey S B, Anabel S, Ilva, et al. DNA immunization: Induction of higher avidity antibody and effect of route on T cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci*, 1997, 94: 14626-14631
- [25] Feltquate D M, Heaney S, Webster R G, et al. Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. *The J Immunol*, 1997, 158(5): 2278-2284
- [26] Tang D C, Devit M, Johnston S A, et al. Genetic immunization in a single method for eliciting an immune response. *Nature*, 1992, 365: 152-154
- [27] Michele A, Kutzler, David B, et al. Developing DNA vaccines that call to dendritic cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 2004, 114: 1241-1244
- [28] Dhabhar F S. Stress, leukocyte trafficking and the augmentation of skin immune function. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 992(5): 205-207
- [29] Fynan E F, Webster R G, Fuller R G, et al. DNA vaccines; protective immunizations by parenteral, mucosal and gene-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 9: 11478-11482
- [30] Alexia A B, David F, Barbara A, et al. Immune responses induced by gene gun or intramuscular injection of DNA vaccines that express immunogenic regions of the serine repeat antigen from plasmodium falciparum. *Infection and Immunity*, 1999, 67(10): 5163-5169

Immune mechanisms induced by goose parvovirus VP3 gene vaccine in goslings vaccinated by gene gun bombardment

Li Min, Lu Fei*, Han Xinfeng, Zhu Dekang*, Che Qian,
Cheng Anchun*, Wang Mingshu*, Liu Xiaodong, Chen Xiaoyue*

(Avian Disease Research Center, College of Veterinary Medicine of Sichuan Agriculture University, Yaan 625014)

(* Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Yaan 625014)

Abstract

The goose parvovirus VP3 gene vaccine (pcDNA-GPV-VP3) was delivered into 30 day-old goslings by gene gun bombardment with different immunization doses of 1 μ g, 3 μ g and 6 μ g. Different tissue samples were collected at 1h, 12h, 1d, 3d, 7d, 21d, 35d, 63d, 105d, 217d post immunization (PI), and the dynamic expression of the vaccine in goslings was studied by indirect immunohistochemistry and the specific anti-GPV antibodies in the gosling sera were studied by the indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The results showed that the expression could be detected in the immunized skin of all the experimental groups at 1d PI, in the heart, duodenum, jejunum, cecum and liver at 3d PI, in ileum and rectum at 7d PI. The expression reached the peak at 7d PI and was still detected from 35th to 63rd day PI. In the different immunized groups, expression quantities and persistence showed that, the group with the dose of 6 μ g was superior to the other groups of 3 μ g and 1 μ g, and the group of 1 μ g was inferior. The antibodies measured by ELISA began to ascend at 7d PI and peaked at 21d PI, and the antibody titers were higher significantly ($P < 0.01$) than the PBS and plasmid control from 14th to 217th days PI. The humoral immune effects showed some dose-dependent correlations. The results indicated that, gene gun bombardment with pcDNA-GPV-VP3 could induce expression of the plasmids and elicit humoral immune responses in the immunized skin, cardiac muscle, liver and each intestine segment, and the valuable information for the immune mechanisms of pcDNA-GPV-VP3 could be provided.

Key words: pcDNA-GPV-VP3, gene-gun bombardment, geese, expression, antibody