

CpG ODN 增强 rHBsAg 免疫小鼠抗体产生及淋巴细胞增殖效应

Effect of CpG ODN on Anti-HBs and Lymphocyte Proliferation of Splenocytes in Mice Immunized with rHBsAg

石艳春/SHI Yan-chun¹, 郑源强/ZHENG Yuan-qiang², 梁 浩/LIANG Hao³, 杨贵贞/YANG Gui-zhen³

1. 内蒙古大学哺乳动物生殖生物学及生物技术教育部重点实验室, 呼和浩特 010021
2. 华北煤炭医学院生物科学系, 河北唐山 063000
3. 吉林大学医学部基础医学院免疫学教研室, 长春 130021

1. Key laboratory of for Mammal Reproduction Biology and Biotechnology, Inner Mongolia University, Huhhot 010021, China
2. Department of Bioscience, North China Coal Medical College, Tangshan 063000, Hebei Province, China
3. Department of Immunology, School of Basic Medicine, Jilin University, Changchun 130021, China

[摘要] 目的: 探讨合成含 CpG 基序的寡核苷酸 (CpG ODN) 对重组乙型肝炎表面抗原 (rHBsAg) 增强小鼠特异性抗体产生及淋巴细胞增殖反应的效应。方法: 采用 Balb/c 小鼠作为免疫实验动物, 经后腿胫骨前肌免疫 2 次, ELISA 法检测血清乙型肝炎表面抗体 (抗-HBs) 效价; ³H-TdR 掺入法测定淋巴细胞增殖反应。结果: 加 CpG ODN 组的抗-HBs 效价较 rHBsAg 组明显增高, 且维持时间长; 淋巴细胞增殖反应显著增强。结论: CpG ODN 对小鼠抗-HBs 产生具有明显的增强作用, 且可以有效刺激小鼠淋巴细胞的增殖反应。

[关键词] 疫苗, CpG ODN, 乙型肝炎表面抗原, 佐剂

[中图分类号] R392.11

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857(2005)11-0027-03

Abstract : To investigate effects of synthetic oligodeoxynucleotide containing CpG motif (CpG ODN) on specific antibody production and lymphocyte proliferation to recombinant hepatitis B surface antigen (rHBsAg). Methods: Balb/c mice received into back leg tibialis anterior (TA) muscle for two times; Detection of anti-HBs titer in serum by ELISA; The lymphocyte proliferations are tested by ³H-TdR incorporation. Results: The anti-HBs titer of plus CpG ODN group is higher than that of rHBsAg group obviously, and the antibody persistent time is also longer. Nevertheless, the proliferation of splenocytes of the group plus CpG ODN is much stronger. Conclusion: CpG ODN has enhanced efficacy for anti-HBs production and stimulated the splenocytes proliferation in mice.

Key Words : vaccine, CpG ODN, HBsAg, adjuvant

CLC Number : R392.11

Document Code : A

Article ID : 1000-7857(2005)11-0027-03

近年来研究发现^[1], 普遍存在于细菌的 DNA 中非甲基化的 CpG 基序, 在体内外均有强烈的免疫刺激效应。另有研究报道, 合成的含 CpG 基序的寡核苷酸 (CpG ODN) 能够模拟细菌 DNA 中 CpG 基序的免疫刺激特性^[2]。含 CpG 的 ODN 与 DNA 疫苗或蛋白类抗原合用可增强抗体及细胞介导的免疫应答^[3], 具有潜在的佐剂效应。据此, 本实验选用了人工合成的对小鼠具有最佳刺激序列的 CpG ODN 作为免疫佐剂, 以 rHBsAg 作为抗原免疫 Balb/c 小鼠, 检测其抗体产生效价及淋巴细胞增殖反应。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

CpG ODN 1826 (5'-TCCATGACGTTCTGACGTT-3') 由上海生工生物工程公司合成, 用全连硫代磷酸化修饰, PECE 纯化; rHBsAg 由中国生物制品总公司长春生物制品研究所惠赠; HRP 标记的羊抗小鼠 IgG-HRP, 购自鼎国生物技术的发展中心; 抗-HBs ELISA 检测试剂盒为华美生物工程公司产品; ³H-TdR 购自中国原子能科学研究院同位素研究所; ConA, 为 Sigma 产品。

1.2 实验动物

收稿日期: 2005-09-01

基金项目: 内蒙古自然科学基金项目 (200508010905)

作者简介: 石艳春, 女, 呼和浩特市赛罕区大学西路 235 号内蒙古大学实验动物研究中心生物学博士后流动站, 副教授, 主要从事分子免疫学方面的研究; E-mail: ycschi5388@yahoo.com.cn

杨贵贞, 女, 长春市吉林大学医学部基础医学院, 教授, 主要从事免疫生物工程研究; E-mail: guizhengyangbi@yahoo.com.cn

Balb/c 小鼠, 雌性, 6~8 周龄, 购自中国医学科学院实验动物研究所。

1.3 实验动物的免疫接种

将 Balb/c 鼠随机分为 3 组, 每组 5 只。rHBsAg 组分别肌注 2 μg /只特异性抗原; CpG 组则除注射 2 μg /只抗原外, 再注入 10 μg /只 CpG ODN。对照组以生理盐水代之。各组均在初次免疫后第 4 周加强免疫 1 次, 注射部位及剂量同初次免疫。

1.4 抗-HBs IgG 的检测

加强免疫后第 2 周(动态观察还在第 4 周、第 6 周、第 8 周、第 10 周和第 12 周), 经眶静脉采血, 分离血清, 参照 ELISA 试剂盒说明书检测抗-HBs IgG 效价。

1.5 淋巴细胞增殖反应的测定(^3H -TdR 掺入法)

采用 ^3H -TDR 掺入法, 分别于加强免疫后 2 周拉颈处死小鼠, 无菌取脾制成单细胞悬液, 以含 10% FBS IMDM 培养液调细胞浓度为 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 。100 μl /孔加入 96 孔平底培养板。分别用终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 ConA 和 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ rHBsAg 刺激, 进行非特异性和特异性淋巴细胞增殖试验; 对照孔以营养液代替, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中培养。非特异性与特异性增殖试验分别于培养后 40 小时、64 小时每孔掺入 0.5 μl ^3H -TdR 继续培养 6~8 小时, 多头细胞收集器收集细胞于玻璃纤维滤膜上, 烤箱烤干后, 将滤纸片放入闪烁液中, 在 β 液闪烁计数器上测定 cpm 值, 结果以三复孔平均 cpm 值表示。

2 结果

2.1 抗-HBs IgG 的检测

小鼠在加强免疫后第 2 周检测血清抗-HBs IgG 效价, 结果如图 1 所示, rHBsAg 加 CpG 组较 rHBsAg 组抗体效价增高 32 倍。

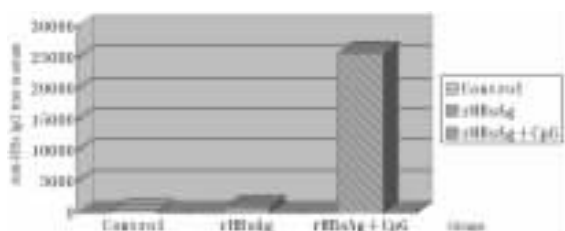


图 1 Balb/c 小鼠加强免疫后 2 周血清抗-HBs IgG 效价

Fig.1 The anti-HBs IgG titer of Balb/c mice in serum after boosting two weeks

2.2 抗-HBs 效价动态观察

为了进一步观察免疫小鼠抗-HBs 效价的持续时间, 本试验分别在加强免疫后第 5 天, 第 2、4、6、8、10、12 周分别对血清中抗-HBs 进行了检测。结果如图 2 所示, 抗-HBs 效价在加强免疫后第 4~6 周达到高峰; rHBsAg 加 CpG ODN 组较 rHBsAg 组抗体效价增高 64 倍。对照组均低于 1:100。虽然各试验组在 6 周后的抗-HBs 效价均有所下降, 但 rHBsAg 加 CpG ODN 组的抗体效价仍高于 rHBsAg 组。

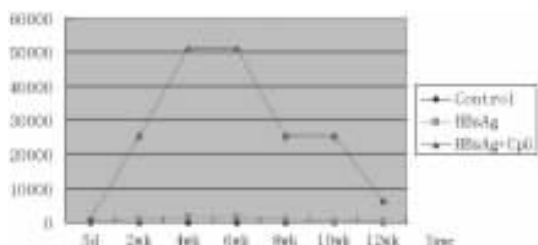


图 2 Balb/c 小鼠抗-HBs IgG 效价动态观察(n=5)

Fig.2 Kinatics of anti-HBs IgG in Balb/c mice (n=5)

2.3 脾淋巴细胞非特异性增殖反应

分别于加强免疫后第 5 天和 2 周拉颈处死小鼠, 无菌取脾, 经 ConA 诱导进行非特异性淋巴细胞增殖试验。结果表明, 加强免疫后第 5 天, 加 CpG ODN 的 rHBsAg 与不加 CpG ODN 的组比较, 自发或经 ConA 诱导的淋巴细胞增殖反应均明显增高 ($P < 0.0001$), 而且各组与对照组比较差异显著 ($P < 0.0001$)。结果见表 1。

表 1 Balb/c 鼠加强免疫后第 5 天脾细胞非特异性增殖反应

Table 1 Balb/c murine spleen cells non-specific proliferation reaction after boosting 5 days

Groups	^3H -TdR incorporation	cpm($\bar{X} \pm SD$)
	spontaneous	ConA
Control	768.666 $\pm$ 5.840	18 062.555 $\pm$ 595.991
rHBsAg	845.222 $\pm$ 23.772	27 694.555 $\pm$ 485.022***
rHBsAg+ CpG ODN	1 008.666 $\pm$ 12.706	41 098.000 $\pm$ 312.774...***

Notes: ...CpG group compared with non-CpG group ($P < 0.01$)

***Every group compared with control group ($P < 0.01$)

加强免疫后 2 周, 自发的淋巴细胞增殖反应 CpG ODN 加 rHBsAg 组与单纯 rHBsAg 组、各组与对照组之间比较, 淋巴细胞增殖反应显著增高 ($P < 0.001$), 结果见表 2。

表 2 Balb/c 鼠加强免疫后 2 周脾细胞非特异性增殖反应

Table 2 Balb/c murine spleen cells non-specific proliferation ration after boosting 2 weeks

Groups	^3H -TdR incorporation	cpm($\bar{X} \pm SD$)
	spontaneous	ConA
Control	172.333 $\pm$ 4.163	16 584.222 $\pm$ 2 818.247
rHBsAg	234.222 $\pm$ 2.545	22 053.555 $\pm$ 509.835*
rHBsAg+ CpG ODN	489.222 $\pm$ 48.631	35 692.666 $\pm$ 286.566**

Notes: *CpG group compared with non-CpG group ($P < 0.01$)

*Every group compared with control group ($P < 0.01$)

2.4 脾淋巴细胞特异性增殖反应

分别于加强免疫后第 5 天和 2 周拉颈处死小鼠, 无菌取脾, 经特异抗原诱导进行特异性淋巴细胞增殖反应。由表 3 和表 4 可见, 2 个时间, 加 CpG ODN 组与不加 CpG ODN 组之间比较, 以及各组与对照组之间比较均有显著差异 ($P < 0.001$)。

表 3 Balb/c 鼠加强免疫后第 5 天脾细胞特异性增殖反应

Table 3 Specific proliferation reaction of Balb/c murine spleen cells after boosting 5 days

Groups	^3H -TdR incorporation	cpm($\bar{X} \pm SD$)
	spontaneous	rHBsAg
Control	1 388.444 $\pm$ 7.010	1 238.666 $\pm$ 23.211
rHBsAg	2 003.777 $\pm$ 29.597	3 611.666 $\pm$ 56.721***
rHBsAg+ CpG ODN	2 570.777 $\pm$ 50.348	7 811.888 $\pm$ 40.321...***

Notes: *CpG group compared with non-CpG group ($P < 0.01$)

***Every group compared with control group ($P < 0.05$)

表 4 Balb/c 鼠加强免疫后 2 周脾细胞特异性增殖反应

Table 4 Specific proliferation of Balb/c murine spleen cells after boosting 2 weeks

Groups	^3H -TdR incorporation	cpm($\bar{X} \pm SD$)
	spontaneous	rHBsAg
Control	419.222 $\pm$ 6.058	437.333 $\pm$ 40.583
rHBsAg	432.777 $\pm$ 18.512	4 429.000 $\pm$ 311.567***
rHBsAg+ CpG ODN	704.888 $\pm$ 20.581	4 963.333 $\pm$ 114.356...***

Notes: ...CpG group compared with non-CpG group ($P < 0.01$)

***Every group compared with control group ($P < 0.05$)

3 讨论

研究发现^[4,5],细菌 DNA 中普遍存在着可被脊椎动物识别的非甲基化 CpG 基序。该基序是由中央的胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤,5'端为 2 个嘌呤(CpA 最佳),3'端为 2 个嘧啶(TpC 或 TpT 最佳)组成的六聚体。而人工合成的含 CpG 基序的寡脱氧核苷酸(CpG ODN),具有模拟细菌 DNA CpG 基序的免疫刺激效应。本试验选用了小鼠最佳刺激序列 CpG ODN 1826(5'-TCCATGACGTTCTT-GACGTT-3')^[6]作为刺激剂。从试验结果可以看出,加 CpG ODN 组小鼠的抗-HBs IgG 效价明显高于单独抗原免疫组,而且,动态观察也表明抗体维持时间较长;淋巴细胞增殖实验结果显示,加强免疫后第 5 天和第 2 周,加 CpG ODN 组小鼠脾脏淋巴细胞经 ConA 及 rHBsAg 刺激的非特异性及特异性增殖活性均较单纯注射抗原组明显增高。这表明,CpG ODN 不仅可以刺激 B 淋巴细胞增殖,产生高滴度的特异性抗-HBs,同时也能刺激 T 淋巴细胞增殖。被激活的 T 淋巴细胞中的 CD8⁺ T 细胞及特异性细胞毒性 T 细胞(CTL)等,在针对细胞内感染的病原体如病毒、胞内感染菌及原虫等的彻底清除方面起着抗体无法替代的作用^[7]。疫苗的应用在预防传染病方面发挥了重要作用,佐剂可以增强疫苗的免疫效应,但目前所应用的疫苗佐剂仍然是氢氧化铝,后者主要诱导以抗体产生为主的体液免疫应答,而要彻底清除细胞内感染的病原体,细胞介导的免疫(CMI)是必需的^[8]。细菌 DNA 中的 CpG 基序及合成的 CpG ODN,除了诱导特异性抗体的产生,更主要的是诱导强而有效的 CMI,从而为预防细胞内病原体的感染提供了一种新型的免疫佐剂。至于 CpG ODN 增强免疫效应的机理尚需进一步研究探讨。

参考文献(References)

- [1] Krieg A M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects [J]. *Annual Rev, Immunol*, 2002, 20: 709~760
- [2] Klinman D M, Conover J, Coban C. Repeated administration of synthetic oligodeoxynucleotides expressing CpG motifs provides long-term protection against bacterial infection [J]. *Infection and Immunity*, 1999, 67(11): 5 658~5 663
- [3] Gurnathan S, Wu C Y, Freidag B L, et al. DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity [J]. *Current Opinion in Immunology*, 2000, 12: 442~447
- [4] Krieg AM, Davis HL. Enhancing vaccines with immune stimulatory CpG DNA [J]. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 2001; 3(1): 15~24
- [5] Krieg A M, Matson S, Waldschmidt T J, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation [J]. *Nature*, 1995, 374(6 522): 546~549
- [6] Weeratna R D, McCluskie M J, Xu Y, et al. CpG DNA induces stronger immune responses with less toxicity than other adjuvants [J]. *Vaccine*, 2000, 18(1): 1 755~1 726
- [7] Kaech S M, E J Wherry, R Ahmed. Effector and memory T cell differentiation: implications for vaccine development [J]. *Nature Review Immunology*, 2002, 2: 251~262
- [8] Abbas A K, Lichtman A H. Cellular and Molecular Immunology (Fifth Edition)[M]. Beijing: Peking University Medical Press. 2004. 298

(责任编辑 李慧政)

·封面文字说明·

“神舟 6 号”圆满完成载人航天飞行任务

北京时间 10 月 12 日上午 9 时,“神舟 6 号”飞船由“长征 2F”火箭搭载,从酒泉卫星发射中心发射升空。这是我国在成功发射“神舟 5 号”载人飞船两年之后,再次成功发射载人飞船。费俊龙和聂海胜成为第二批进入太空的中国航天员。本期封面图片为费俊龙、聂海胜航天飞行返回着陆后受到搜救人员和媒体记者欢迎的场面,由赵建伟摄影并供稿。

“神舟”系列飞船由轨道舱、航天员隔间和服务舱组成,设计上部分地借鉴了俄罗斯“联盟号”飞船的设计,而后经过大量的修改和创新,能够适应我国的航天计划。与“神舟 5 号”相比,“神舟 6 号”携带了一些更为先进的设备,比如食品加热器和太空厕所。此外,还有睡袋和飞船黑匣子也在此次载人航天任务中接受了测试。“神舟 6 号”黑匣子的数据处理速度快于“神舟 5 号”黑匣子,并且存储空间更大、体积更小。

进入轨道后的“神舟 6 号”运行在距地面 343 km 的太空中。按照计划,费俊龙和聂海胜在太空飞行了将近 5 天,其间进行了一系列试验,包括对飞船健全程度的测试、细胞学的试验、对地球的观测和对人体生理机能的测试等。进入轨道 9 h 后,费俊龙解开身上的安全带,飘离座椅,开始在轨道舱中移动。这标志着我国的载人航天又向前迈进了一步。在执行“神舟 5 号”的整个飞行任务时,我国首位宇航员杨利伟在 21.5 h 的轨道飞行中未曾脱离座椅。费俊龙和聂海胜在轨道舱中进行的一些试验是我国宇航员首次进行的需要两人合作的试验,而这种合作性的试验对我国未来的载人航天具有重要意义。

费、聂两人在太空中的饮食也比“神舟 5 号”时有了明显的改善。“神舟 6 号”共携带了 40 kg 的食品,品种丰富,包括米饭、牛肉、蔬菜、咖啡、绿茶和果汁等,保证了两名宇航员每日 3 餐的需要。10 月 13 日,聂海胜还在太空中度过了他的 41 岁生日。当他的女儿在地面为他唱起生日歌时,聂海胜禁不住流出了感动的泪水。10 月 14 日,“神舟 6 号”飞船的推进器点火,进行了一次轨道机动。这是因为飞船已经偏离了原本 343 km 高的轨道。轨道机动使飞船重新回到了正常轨道上。10 月 17 日凌晨 4 时 32 分,载有两名航天员的“神舟 6 号”返回舱成功着陆在内蒙古草原上。两名航天员着陆时健康状况良好,出舱后微笑着向搜救人员和摄影记者

挥手致意。“神舟 6 号”整个太空之旅,共飞行了 115 h 32 min,里程为 3.25×10⁶ km,创下了我国太空飞行的新纪录。

我国发展航天技术已有半个世纪的历史。1955 年,我国现代太空计划之父——钱学森——在美国待了 20 年后回到祖国,开始领导新中国的航天技术研究。1956 年,经过谈判,苏联同意与我国交流火箭和核技术,1958 年向我国运送了 2 枚 R-2 型导弹,1960 年双方的合作结束。1960 年 9 月,我国用自行研制的燃料发射了 1 枚仿制的 R-2 型导弹;11 月,发射了 1 枚 R-2 的改进型导弹。1966 年,我国启动了“曙光 1 号”项目,计划在 1973 年送 2 名航天员上天。1968 年,钱学森组织成立太空飞行医疗研究所,为我国的载人航天任务做准备。1969 年,我国发射了第一枚自行研制的三级火箭——“长征 1 号”。1970 年,我国发射了第一颗人造地球卫星——“东方红号”,1 年后又发射了第一颗通讯卫星——“时间 1 号”。1978 年,我国宣布载人航天计划和空间站建设计划,但在 1980 年又决定计划延期。1984 年,美国总统里根曾提供机会,请一名中国的航天员搭乘美国的航天飞机上天,但被我国婉拒。

2003 年 10 月 15 日,“神舟 5 号”载人航天飞船搭载着我国第一名航天员杨利伟顺利升空并安全返回,使我国成为世界上第 3 个具有载人航天能力的国家。

另据媒体报道,我国还将在 2007 年发射“神舟 7 号”太空飞船;“神舟 8 号”则将有可能与一架飞行器进行太空对接。此外,我国最近还公布了建设载人空间站和在 2010 年前发射无人月球探测器的计划,并将在 2006 年招考第一批女航天员。

(本刊记者 黄永明)

