

鼠疫 DNA 疫苗 pVAX1/F1-V 安全性初步研究

郭习勤^{1,2}, 王 栋², 王希良², 蒋会婷¹, 黄顺军², 韩 岳², 何维明¹

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

2 军事医学科学院 微生物流行病学研究所, 北京 100071)

[摘 要] 为了研究鼠疫 DNA 疫苗 pVAX1/F1-V 质粒的安全性, 试验运用 SDS-PAGE 电泳和琼脂糖电泳等方法检测了鼠疫 DNA 疫苗 pVAX1/F1-V 质粒的纯度, 并以小鼠为动物模型进行了质粒 pVAX1/F1-V 的急性毒性和长期毒性试验, 用 PCR 方法检测外源基因在小鼠组织中的分布情况, 用 ELISA、ELISPOT 方法检测了其自身的免疫反应。结果表明, 提取的质粒 pVAX1/F1-V 未检测到核酸及菌体蛋白污染; 注射初期质粒 pVAX1/F1-V 主要分布于注射部位的肌肉组织, 其他组织有散在分布; 小鼠接种 4 周后, 质粒 pVAX1/F1-V 仅分布于注射部位。小鼠注射 pVAX1/F1-V 质粒后未产生明显的毒副反应及自身免疫损伤, 也未检测到自身抗体。初步证明鼠疫 DNA 疫苗 pVAX1/F1-V 安全性良好, 为鼠疫菌新型 DNA 疫苗的应用奠定了基础。

[关键词] 鼠疫耶尔森氏菌; 毒性试验; DNA 疫苗; 安全性

[中图分类号] R516.803; R392-33

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)05-0031-04

鼠疫耶尔森氏菌是肺型及腺型鼠疫的病原体, 在历史上曾经引起 3 次世界性的鼠疫大流行。现在由于监控措施得当及抗生素的应用, 鼠疫的发病率与病死率大大降低。但近十几年来, 鼠疫的发病率有明显上升趋势, 而且多重耐药性鼠疫耶尔森氏菌的出现也给鼠疫的治疗带来了困难, 因此鼠疫已被世界卫生组织列为重新抬头的疾病^[1]。鼠疫耶尔森氏菌灭活苗和弱毒苗曾被批准用于人体免疫接种, 但后来因反应强烈、对肺鼠疫无效等原因而停用^[2], 故现在世界上还没有可应用于临床的鼠疫疫苗。

鼠疫耶尔森氏菌的免疫保护性抗原主要由两种成分组成, 一种是鼠疫荚膜蛋白抗原 F1 蛋白, 其毒性弱而抗原性强, 并含有多个抗原决定簇, 在体内具有抗细胞吞噬的作用, 可诱导机体产生荚膜抗体。有研究^[3]表明, 当动物或人感染鼠疫菌后, F1 可以在体内大量表达而起到保护性抗原的作用。另一种是鼠疫表面抗原 V 蛋白, 是鼠疫耶尔森氏菌在低 Ca²⁺ 环境下分泌的一种蛋白, 该蛋白毒性弱而抗原性强, 除具有抗吞噬作用外, 还能促进鼠疫耶尔森氏菌在单核细胞内的繁殖, 在 III 型分泌系统中起着重要的调节作用^[4]。F1 和 V 抗原是鼠疫耶尔森氏菌的重要保护性抗原, 具有属间保守性, 且二者在免疫原性和免疫保护性上具有叠加效应^[5]。以 F1 和 V 蛋白抗

原为材料的鼠疫重组亚单位苗和 DNA 疫苗是鼠疫新型疫苗研究的重点。Anderson 等^[6]已经通过小鼠动物模型证明了 F1-V, F1, V 等亚单位疫苗的有效性, 其中以 F1-V 融合蛋白效果较好; Haim 等^[7]研究表明, 鼠疫 DNA 疫苗也有一定的保护效果。

军事医学科学院微生物流行病学研究所免疫室以从 EV76 株鼠疫耶尔森菌质粒中扩增出 F1 和 V 抗原基因为材料, 构建了质粒 pVAX1/F1-V, 小鼠免疫试验证明其具有较好的保护效果^[8], 但并未对其安全性进行检测。为此, 本试验研究了质粒 pVAX1/F1-V 急性毒性和长期毒性, 并探讨了其在小鼠组织中的分布情况及其能否诱导特异性自身免疫反应, 以期了解鼠疫 DNA 疫苗 pVAX1/F1-V 在小鼠模型中的安全性, 从而为鼠疫 DNA 疫苗 pVAX1/F1-V 的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试 剂

Taq DNA 聚合酶, 质粒 DNA 提取试剂盒, 基因组 DNA 提取试剂盒, 限制性内切酶 *Not* I, *Eco*R I 和 *Hind* III 等均购自大连宝生物公司; ELISA 试剂盒购自美国 BETHYL 公司; 酶联免疫斑点实验 (Enzyme- Linked ImmunoSpot Assay, ELISPOT)

[收稿日期] 2005-11-03

[作者简介] 郭习勤(1979-), 女, 河南淮阳人, 在读硕士, 主要从事基因工程疫苗的研究。

[通讯作者] 何维明(1944-), 陕西临潼人, 教授, 硕士生导师, 主要从事动物疫病防治研究。

试剂盒购自 DIACLONE 公司;琼脂糖、SDS 等其他常用试剂由军事医学科学院试剂处提供。

1.2 菌种、重组蛋白和质粒

DH5 α 菌、重组蛋白 pET11c/F1-V 和质粒 pVAX1/F1-V 均由军事医学科学院微生物流行病学研究所免疫室提供;6 周龄雌性 Balb/c 小鼠,清洁级,由军事医学科学院动物中心提供。

1.3 重组质粒 pVAX1/F1-V 的提取与纯化

用质粒 DNA 提取试剂盒提取重组质粒 pVAX1/F1-V,醋酸钠沉淀法纯化浓缩,最后用 PBS 溶解配制成所需浓度。

1.4 重组质粒 pVAX1/F1-V 的检测

双酶切鉴定质粒中是否有外源基因插入,并通过 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测有无其他核酸成分污染,SDS-PAGE 蛋白电泳考马斯亮蓝染色检测残留菌体蛋白。

1.5 重组质粒 pVAX1/F1-V 的急性毒性及长期毒性检测^[9]

1.5.1 急性毒性 取 6 周龄雌性 Balb/c 小鼠 40 只,分为 4 组,每组 5 雄 5 雌,分静脉注射和肌肉注射质粒 pVAX1/F1-V(注射质粒前先注射 250 g/L 蔗糖 100 μ L),剂量分别为 0,50,100,300 μ g/只。接种后观察饮食、临床表现并检测体重增加情况等,两周后剖检。

1.5.2 长期毒性 将质粒 pVAX1/F1-V 以 200 μ g/(只·次)的剂量肌肉注射免疫 6 周龄的 Balb/c 雌性小鼠 10 只,注射质粒前先注射 250 g/L 蔗糖 100 μ L,隔周 1 次,共免 6 次。其间大体观察临床表现、体重及饮食情况等。最后 1 次免疫后 7 d,摘眼球采血,分离血清;剖检,取脾脏制备脾细胞,采集脏器并称重测脏器指数。

1.6 抗质粒 pVAX1/F1-V 抗体检测

检测 1.5.2 分离血清中的抗质粒 pVAX1/F1-V 抗体。酶联板包被质粒 pVAX1/F1-V 100 μ L(10 μ g/mL pH 7.2 PBS 稀释),4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜;30 g/L 脱脂奶粉室温封闭 1 h;血清用 PBS(含 10 g/L 脱脂奶粉、1 g/L Triton-100)1:10 稀释后每孔加 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后用含 9 g/L NaCl、0.5 g/L Tween-20 的 PBS 洗 3 遍;每孔加入 100 μ L 1:10 000 倍稀释的过氧化物酶标记兔抗鼠 IgG,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后用含 9 g/L NaCl、0.5 g/L Tween-20 的 PBS 洗 3 遍;室温放置 30 min 后,100 μ L TMB 显色 10~30 min,显色后用 1 mol/L 的 H₂SO₄ 终止反应,酶标仪 450 nm 波长测定吸光度并利用 SPSS

13.0 软件进行分析。

1.7 抗自身抗体检测

1.7.1 脾细胞抗 DNA 和抗肌细胞抗体检测 脾细胞悬液用含 100 g/L FCS 的 RPMI1640 液调整细胞浓度为 10⁶/mL,96 孔板分别用 10 μ g/mL 的肌球蛋白、OVA、DH5 α 基因组 DNA、牛胸腺双链 DNA 包被;加入 100 μ L 脾细胞后,37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 孵箱中孵育 5 h;PBST 洗 3 遍,加入碱性磷酸酶标记的兔抗鼠 IgG,4 $^{\circ}$ C 过夜;BCIP/NTB 显色,1 h 后用水冲洗终止显色,于 40 $\times$ 、100 $\times$ 显微镜下计数。

1.7.2 血清抗 DNA 和抗肌细胞抗体检测 如上包被抗原,加入 100 μ L 稀释的血清,37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 孵箱中孵育 1 h, PBST 洗 3 遍,加酶标兔抗鼠 IgG,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵育 1 h, PBST 洗 3 遍。TMB 显色 10~30 min,1 mol/L H₂SO₄ 终止反应,酶标仪 450 nm 波长测定吸光度并利用 SPSS 13.0 软件进行分析。

1.8 组织分布检测^[4]

取 6 周龄雌性 Balb/c 小鼠 21 只,试验组 15 只,对照组 6 只,试验组肌肉注射质粒 pVAX1/F1-V 200 μ g/只(注射质粒前先肌肉注射 250 g/L 蔗糖 100 μ L/只),对照组肌肉注射 PBS 200 μ L/只。分别于注射后 2,14,28 d 处死试验组小鼠 5 只,对照组 2 只,采集抗凝血、心、肝、脾、肺、肾、脑、注射部位肌肉、淋巴结、生殖腺,提取其基因组 DNA。并以所提基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 F1-V 基因片段,扩增时的引物和扩增条件与质粒 pVAX1/F1-V 构建时相同。

1.9 统计学分析

用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 评价显著性。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pVAX1/F1-V 的双酶切鉴定

提取质粒的电泳结果呈单条带,双酶切出现插入的 1 500 bp F1-V 片段和 981 bp 的 V 片段(图 1)。SDS-PAGE 蛋白电泳及考马斯亮蓝染色未出现任何条带(图 2),表明所提质粒未受其他核酸及菌体蛋白污染。

2.2 急性毒性检测

试验期间各组动物外观、行为及饮食情况等未见异常,无死亡且体重均有增加,剖检未发现明显病变,与对照组相比差异不显著($P > 0.05$)。

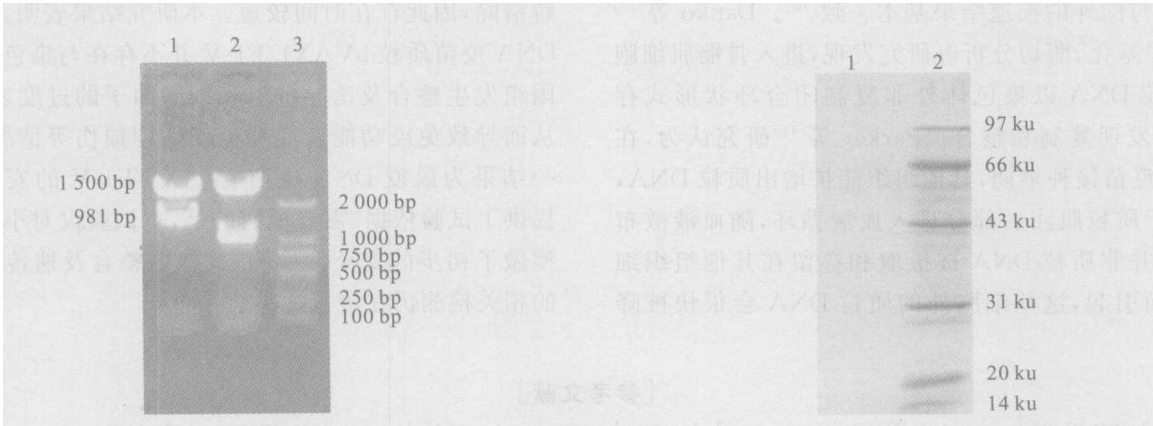


图 1 重组质粒 pVAX1/F1-V 的双酶切电泳图谱
1. *Hind* III 和 *Not* I 酶切结果;2. *Eco*R I 和 *Not* I 酶切结果;
3. DL2000 标准分子量

图 2 质粒 pVAX1/F1-V 残留蛋白 SDS-PAGE 电泳检测
1. 质粒 pVAX1/F1-V 提取样;2. 低分子量标准蛋白

Fig. 1 Restriction enzyme digestion
of plasmid pVAX1/F1-V
1. Digested with *Hind* III and *Not* I ;
2. Digested with *Eco*R I and *Not* I ;3. DNA marker DL2000

Fig. 2 SDS-PAGE of plasmid pVAX1/F1-V
1. Plasmid pVAX1/F1-V;2. Standard
protein low molecular weight marker

2.3 长期毒性检测

试验期间未发现异常临床表现,剖检各主要器官均未发现明显病理变化,脏器重量及脏器指数与对照组无显著性差异($P>0.05$)。高剂量组偶见肾脏轻微出血,个别注射部位肌肉出现脓肿。对照组病理变化与试验组类似,未发现与质粒相关的特征性病变。

2.4 抗质粒 DNA 及抗自身抗体检测

试验组均未出现明显的阳性结果,与对照组相

比无显著差异($P>0.05$)。

2.5 质粒 pVAX1/F1-V DNA 在小鼠组织分布的 PCR 检测

所有的阴性对照组均未出现特异性扩增条带。由表 1 可知,注射后的第 2 和 14 天,在所有试验组小鼠的注射部位肌肉及肝、脾等部分其他组织中,均能检测到 F1-V 基因片段。注射后 28 d,只可在部分试验组小鼠的注射部位肌肉和抗凝血中检测到 F1-V 基因的存在。

表 1 质粒 DNA 在试验组小鼠组织中的分布情况(阳性例数/检测例数)

Table 1 Persistence and distribution of plasmid in injected sites and main organs

时间/d Time	心 Heart	肺 Lung	肝 Liver	脾 Spleen	肾 Kidney	生殖腺 Gonads	脑 Brain	肌肉 Muscle
2	2/5	3/5	2/5	3/5	2/5	2/5	0/5	5/5
14	0/5	1/5	1/5	2/5	0/5	0/5	0/5	3/5
28	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5

3 讨 论

目前,DNA 疫苗的免疫机制尚不清楚,DNA 疫苗携带的外源基因存在整合到宿主基因组的可能性,肌肉注射可能会使肌细胞和脾细胞中潜在的抗原特异性 T 细胞,发生自身免疫性肌炎和肾小球肾炎。另外,目前尚不清楚质粒 DNA 的抗性基因对机体是否有影响。因此,必须对 DNA 疫苗的安全性进行检测。本研究结果显示,重复大量肌肉注射质粒 pVAX1/F1-V DNA 疫苗,不会引起明显毒性反应,动物生存率、解剖检查、体重、器官重量及脏器系数、病理组织学、抗核抗体等指标均无明显异常。个别实

验鼠与 PBS 对照鼠稍有差异,但未见有明显的剂量反应关系,且未见与接种 DNA 疫苗相对应的病理学改变,因此作者认为这是偶发现象,与免疫接种质粒 pVAX1/F1-V 无关。这与国外其他裸 DNA 疫苗的安全性试验结果^[10-11]基本一致,初步证明了鼠疫 DNA 疫苗 pVAX1/F1-V 的安全性。

质粒 DNA 在体内的分布和存留时间的检测,是评价 DNA 疫苗遗传毒性的重要内容,本试验用 PCR 法检测了鼠疫 DNA 疫苗 pVAX1/F1-V 肌肉注射后,质粒 DNA 在小鼠体内的分布情况。结果显示,质粒 DNA 主要分布于注射部位的肌肉组织中,可存留 4 周;其他组织也有散在分布,但存在时间较

短,这与国外的报道结果基本一致^[12]。Danko 等^[10]通过甲基化、酶切分析等研究发现,进入骨骼肌细胞的质粒 DNA 以染色体外非复制闭合环状形式存在,未发现复制和整合。Parker 等^[11]研究认为,在 DNA 疫苗接种早期,其他组织能扩增出质粒 DNA,是由于质粒肌注后部分进入血液循环,随血液散布所致,并非质粒 DNA 被摄取和存留在其他组织细胞中而引起,这些细胞外的质粒 DNA 会很快被降

解清除,因此存在时间较短。本研究结果表明,鼠疫 DNA 疫苗质粒 pVAX1/F1-V 并不存在与染色体基因组发生整合及诱导抗原和细胞因子的过度表达,从而导致免疫功能紊乱和免疫病理损伤等情况,这一结果为鼠疫 DNA 疫苗 pVAX1/F1-V 的安全性提供了试验依据。需要说明的是,本试验仅对小鼠模型做了初步的安全性检测,其他因整合及遗传毒性的相关检测仍在进行之中。

[参考文献]

- [1] Titball R W, Williamson E D. Vaccination against bubonic and pneumonic plague[J]. *Vaccine*, 2001, 19(30): 4175-4184.
- [2] Titball R W, Hill J, Lawton D G, et al. *Yersinia pestis* and plague[J]. *Biochem Soc Trans*, 2003, 31(1): 104-107.
- [3] Friedlander A M, Welkos S L, Worsham P L, et al. Relationship between virulence and immunity as revealed in recent studies of the F1 capsule of *Yersinia pestis*[J]. *Clin Infect Dis*, 1995, 21(S2): 178-181.
- [4] Price S B, Cowan C, Perry R D. The *Yersinia pestis* V antigen is a regulatory protein necessary for Ca^{2+} -dependent growth and maximal expression of low- Ca^{2+} response virulence genes[J]. *J Bacteriol*, 1991, 173: 2649-2657.
- [5] Williamson E D, Eley S M, Griffin K F, et al. A new improved sub-unit vaccine for plague; the basis of protection[J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1995, 12: 223-230.
- [6] Anderson G W, Heath D G, Bolt C R, et al. Short and long term efficacy of single dose sub-unit vaccines against *Yersinia pestis* in mice[J]. *Am J Hyg Trop Med*, 1998, 58: 793-799.
- [7] Haim Grosfeld, Sara Cohen, Tamar Bino, et al. Effective protective immunity to *Yersinia pestis* infection conferred by DNA vaccine coding for derivatives of the F1 capsular antigen[J]. *Infection and Immunity*, 2003, 71(1): 374-383.
- [8] 韩岳, 王希良, 何凤田, 等. 鼠疫耶尔森菌重组质粒 pVAX1/F1-V 的构建及其免疫效果研究[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2005, 25(10): 812-816.
- [9] 莫国玉, 陈光明, 黄芝瑛, 等. 治疗型 HBVDNA 疫苗在小鼠组织中的分布和长期毒性研究[J]. *解放军医学杂志*, 2003, 28(6): 504-507.
- [10] Danko I, Wolff J A. Direct gene transfer into muscle[J]. *Vaccine*, 1994, 12(16): 1499.
- [11] Parker S E, Monteith D, Horton H, et al. Safety of a GM2CSF adjuvant plasmid DNA malaria vaccine[J]. *Gene Ther*, 2001, 8(13): 1011-1021.
- [12] Parker S E, Borellini F, Wenk M L, et al. Plasmid DNA malaria vaccine; tissue distribution and safety studies in mice and rabbits[J]. *Hum Gene Ther*, 1999, 10(5): 741-750.

A preliminary study on safety of plague DNA vaccine in mice

GUO Xi-qin^{1,2}, WANG Dong², WANG Xi-liang², JIANG Hui-ting¹,
HUANG Shun-jun², HAN Yue², HE Wei-ming¹

(1 College of Animal Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China)

Abstract: To evaluate the safety of the DNA vaccine pVAX1/F1-V against plague, the purity of plasmid DNA pVAX1/F1-V was detected by SDS-PAGE and gelose electrophoresis method; plasmid DNA was detected by PCR in tissues of BALB/c mice immunized with the plasmids intramuscular injection. Then, long term toxicity and acute toxicity study were conducted on mice mode, antinuclear antibodies and self-immunoreaction were analyzed by ELISA and ELISPOT method. Results showed that plasmid DNA was pure and can be detected primarily in the muscle at the site of injection, where it remained for 4 weeks. Repeated intramuscular injections of DNA vaccine pVAX1/F1-V showed no adverse effects on behaviors, weight, and no evidence of autoimmune mediated pathology and antinuclear antibodies were observed in the mice. These results suggested that the DNA vaccine pVAX1/F1-V was safe and well tolerated.

Key words: *Y. pestis*; toxicity test; DNA vaccine; safety