

· 基础论著 ·

IL-15 表达质粒联合 HPV 基因疫苗诱导 特异性淋巴细胞增殖的实验研究

孙欣 孙丽君 高顺强

【摘要】 目的 探讨 IL-15 真核表达质粒对 HPV16 E7 基因疫苗所诱导的小鼠特异性淋巴细胞增殖的影响。**方法** 利用基因重组技术构建含 IL-15 的真核表达质粒 pcDNA3.1-IL-15。将该质粒与 HPV16 E7 基因疫苗通过肌肉注射方式免疫雌性 BALB/c 小鼠。基因免疫后,制备脾淋巴细胞悬液,在体外经 E7 蛋白再刺激后用 MTT 法检测其 T 淋巴细胞增殖情况。流式细胞仪检测脾淋巴细胞亚群。**结果** pcDNA3.1-IL-15 与 pcDNA3.1-E7 共同注射,可以增强特异性 T 细胞增殖反应, A_{570} 差值为 1.313,与对照组比较差异均有显著性($P < 0.05$)。实验组脾 $CD4^+$ 淋巴细胞数量和 $CD4^+/CD8^+$ 比值均高于对照组($P < 0.05$)。**结论** IL-15 真核表达质粒可以提高 HPV16 E7 基因疫苗免疫原性。IL-15 基因是一种优良的 HPV16 E7 基因疫苗的基因佐剂。

【关键词】 白细胞介素 15;免疫佐剂;人类乳头瘤病毒;基因疫苗

A study of co-injection of HPV DNA vaccine with IL-15 expression plasmid inducing specific lymphoproliferation SUN Xin*, SUN Li-jun, GAO Shun-qiang.

*Beijing Youan Hospital of Capital Medical University, Beijing 100069, China

Corresponding author: SUN Xin, Email:sun_nus@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of IL-15 eukaryotic expression plasmid on the specific lymphoproliferation responses that induced by HPV16 E7 vaccine in mice. **Methods** An eukaryotic expression plasmid encoding IL-15 gene coding region was constructed and named as pcDNA3.1-IL-15. Female BALB/c mice were injected intramuscularly with pcDNA3.1-IL-15 and HPV16 E7 gene vaccine. After the last immunization, single-cell suspensions of splenocytes were prepared from mice and were restimulated with HPV16 E7 protein. Then, T cell proliferation assay was tested by MTT method, the number of $CD4^+$ and $CD8^+$ splenocytes lymphocyte were analyzed by FACS assay. **Results** Coadministration of pcDNA 3.1-IL-15 with pcDNA3.1-E7 can enhance specific T cell proliferation (The disparity vale of A_{570} is 1.31), it is statistically significant compared with that of control group ($P < 0.05$).

作者单位: 100069 北京,首都医科大学附属北京佑安医院性病艾滋病临床诊疗中心(孙欣、孙丽君);河北医科大学第四医院皮肤性病科(高顺强)

通讯作者: 孙欣 Email:sun_nus@163.com

The number of CD4⁺ T-lymphocyte and the value of CD4⁺/CD8⁺ in experimental group were significantly higher than control group ($P < 0.05$). **Conclusions** The eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1-IL-15 can enhance the immunogenicity of HPV16 E7 DNA vaccine. IL-15 is a good gene adjuvant of HPV16 E7 DNA vaccine.

【Key words】 Interleukin-15; Adjuvants; Human papilloma virus; DNA vaccine

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)是一种小 DNA 病毒^[1],其感染与生殖器肿瘤关系密切,严重影响人类的健康。由于 HPV 目前尚不能体外大量培养,难于研制传统疫苗,因此 HPV 疫苗的研究只有借助于基因工程技术来完成^[2]。但基因疫苗抗原性较弱,易使免疫系统对其产生免疫耐受。近期研究表明,IL-15 是一种优良的基因疫苗佐剂,它可以作用在免疫反应的某个环节,增强基因疫苗的效果^[3]。本实验构建了 IL-15 真核表达质粒,与 HPV16 E7 基因疫苗共同注射于 BALB/c 小鼠,观察了其对该疫苗所诱导的特异性 T 细胞增殖反应的影响。

材料与方法

一、材料

pcDNA3.1、pcDNA3.1-E7 由河北医科大学李艳佳博士惠赠,pGEM-T-IL-15 由河北医科大学微生物教研室房文亮老师惠赠。BALB/c 纯系小鼠购自中国医学科学院实验动物研究所。限制性核酸内切酶、连接酶、RNA 酶均购于 Promega 公司,E7(第11~20个氨基酸)多肽由北京赛百盛公司合成。Sliver Beads 胶回收试剂盒、小鼠 IFN- γ ELISA 试剂盒购于上海生工生物工程公司。

二、方法

1. pcDNA3.1-IL-15 的构建:用限制性内切酶 *EcoR* I、*Bam*H I 对 pGEM-T-IL-15 和 pcDNA3.1 质粒分别进行双酶切,并对酶切产物用 Sliver Beads 胶回收试剂盒回收和纯化,将载体片段与目的基因片段以 1:3 的摩尔比混合,加 T4 DNA 连接酶 16℃ 保温过夜。

2. 质粒的转化:取连接后混合物,转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,取转化菌液 100 μ l 均匀涂布于 LB 平板上(含 60 μ g/ml Ampicillin),37℃ 倒置培养过。

3. 阳性克隆的选择:从转化平皿中挑取若干转化子接种于 3 ml LB 液体培养基中(含 Ampicillin),37℃ 200 r/min 培养过夜,用碱裂解法进行质粒 DNA 的小量抽提,阳性克隆的鉴定采用酶切鉴定法。

4. 质粒的大量提取及纯化:质粒 pcDNA 3.1-IL-15、pcDNA3.1-E7 及 pcDNA3.1 的大量提取及纯化参见文献^[3],质粒纯化后,加入 500 μ l 生理盐水,测 A_{260} 、 A_{280} 确定 DNA 浓度与纯度,纯度不够时,再次纯化。

5. 动物免疫:纯系 BALB/c 小鼠,雌性,6 周龄。接种部位:股四头肌。首先在接种部位注射 25% 高渗蔗糖 100 μ l,15 min 后再接种质粒。30 只小鼠随机分

成以下 3 组:(1) E7 + IL-15 组:接种 pcDNA 3.1-IL-15 与 pcDNA3.1-E7,每只各 100 μg ;(2) E7 + 空质粒组:接种 pcDNA3.1 与 pcDNA3.1-E7,每只各 100 μg ;(3) E7 组:接种 pcDNA3.1-E7,每只 100 μg 。以上各组均每 2 周加强免疫 1 次,共加强 3 次,末次免疫后 1 周做免疫指标检测。

6. 脾脏 T 细胞亚群的检测:无菌取脾,制备单个脾细胞悬液,取浓度为 1×10^6 个/ml 脾细胞悬液 1 ml,用 PBS 液洗 2 遍,加入 FTTC 标记的抗-CD4 抗体和抗-CD8 抗体各 20 μl ,混匀后置 4℃ 避光 30 min,用荧光洗液洗 2 遍。加入 0.5 ml 荧光保存液,用流式细胞仪分析 T 细胞亚群。

7. T 细胞增殖实验:无菌取脾,制备单个脾细胞悬液,于培养瓶中 37℃ 培养 2 h,收集未贴壁细胞,台盼蓝染色计数活细胞并调整细胞数为 5×10^6 个/ml。加入 96 孔板,100 μl /孔,并加入浓度为 2 $\mu\text{g/L}$ 的 E7 蛋白 5 μl ,加 RPMI 1640 作为对照,每个标本设 5 个复孔,置 37℃、5% CO_2 培养箱中培养 3 d。每孔加 5 g/L 的 MTT 10 μl ,继续培养 6 h。加 10% SDS 液 100 μl ,继续培养 12 h,酶联免疫比色仪在波长 570 nm 测定 A 值。

三、统计学处理

所有数据结果均输入计算机建立数据库,应用 SPSS 11.0 软件进行处理,组间比较采用成组设计的单因素方差分析,处理组间的两两比较用 q 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

结 果

一、真核表达质粒 pcDNA3.1-IL-15 的酶切鉴定

pcDNA3.1-IL-15 经 *Bam* H I、*Eco*R I 双酶切,对产物进行凝胶电泳分析,可见连接产物为 5.9 kb 的质粒,酶切后可以得到与 pGEM-T-IL-15 双酶切片段相同的 500 bp 的特异性条带及与 pcDNA3.1 双酶切片段相同的 5.4 kb 的载体条带,酶切结果(图 1)。

二、pcDNA3.1-E7 的鉴定

对 pcDNA3.1-E7 进行 *Bam*H I、*Eco*R I 双酶切,产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳分析:酶切后可以得到 300 bp 的特异性条带及与 pcDNA3.1 双酶切片段相同的 5.4 kb 的载体条带,酶切分析(图 2)。

三、脾脏 T 细胞亚群的检测

各组小鼠脾细胞中 T 细胞亚群发生明显变化,CD4⁺、CD8⁺ T 细胞数目及比值见表 1。E7 + IL-15 组与 E7 + 空质粒组和 E7 组相比,其脾脏 CD4⁺ T 细胞数量和 CD4⁺/CD8⁺ 比值均显著增高,CD8⁺ T 细胞数量显著降低($P < 0.05$)。

四、T 细胞增殖实验

E7 组 + IL-15、E7 + 空质粒组、E7 组 A_{570} 的差值均值分别为 1.31、0.73、0.64 (见表 1)。成组设计单因素方差分析,三组间差别显著($F = 370.92, P < 0.05$),进一步两两比较,发现 E7 + IL-15 组小鼠脾淋巴细胞的增殖能力高于其他两组($P < 0.05$)。

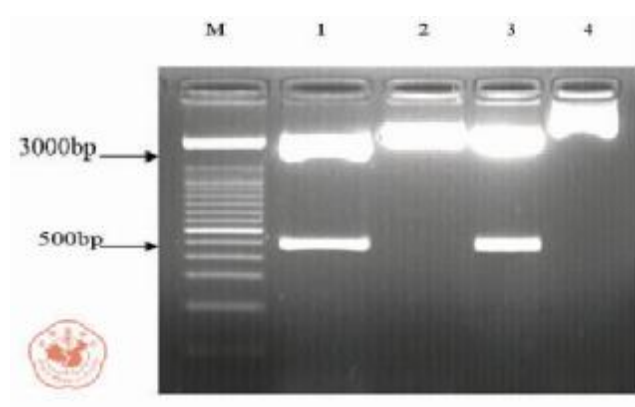


图 1 重组质粒 pcDNA3.1-IL-15 的酶切鉴定

M: marker; 1: pGEM-T-IL-15 digested with EcoR I and BamH I; 2: pcDNA3.1 digested with EcoR I and BamH I; 3: pcDNA3.1-IL-15 digested with EcoR I and BamH I; 4: pcDNA3.1-IL-15

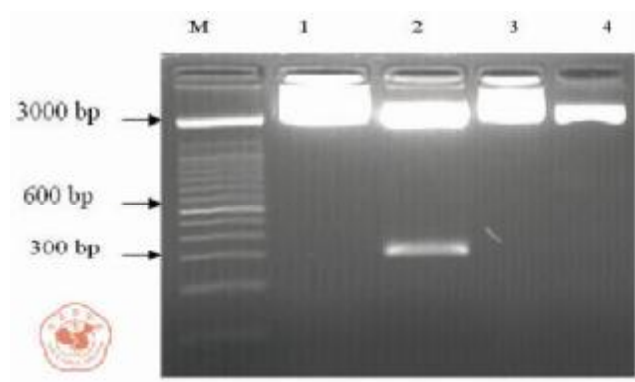


图 2 pcDNA3.1-E7 的酶切鉴定

M: marker; 1: pcDNA3.1-E7 digested with EcoR I and BamH I; 2: pcDNA3.1-E7; 3: pcDNA3.1 digested with EcoR I and BamH I; 4: pcDNA3.1

表 1 免疫小鼠脾 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞数及 E7 蛋白刺激后的增殖情况($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	CD4 ⁺ T	CD8 ⁺ T	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	A ₅₇₀ 差值
1	10	29.38 ± 2.72	17.20 ± 2.14	1.48 ± 0.22	1.31 ± 0.03
2	10	25.08 ± 2.48	17.04 ± 1.47	1.62 ± 0.18	0.73 ± 0.03
3	10	23.88 ± 2.62	14.86 ± 2.10	1.72 ± 0.23	0.64 ± 0.04

讨 论

虽然 HPV 基因疫苗免疫小鼠等哺乳动物时显示出良好的免疫原性,但是当该疫苗应用于灵长目动物时,免疫应答降低;在人体中应用该疫苗,其诱发的免疫应答水平更低,且用量要大到毫克水平。因此,如何进一步增强基因疫苗的免疫原性,提高免疫效果,是当今 HPV 基因疫苗研究的核心问题^[4]。

细胞因子能够调节机体的免疫应答,可以作为一种免疫佐剂来增强疫苗的免疫原性,提高免疫效果。但是其实际应用很少,主要是因为它的表达和纯化费用很高,并且需要多次注射才能取得较好的效果。研究发现,注射细胞因子的表达质粒后,细胞因子能够在体内长期表达。因此利用细胞因子基因作为基因疫苗的佐剂就可以克服上述困难,从而取得了比细胞因子蛋白直接注射更好的效果^[5]。

IL-15 是 1994 年由 Grabstein 等^[6]从肾脏表皮细胞系 CV-1/EBNA 中克隆出来的一种细胞因子,可利用 IL-2R 的一些成分完成黏附和信号转导。作为一种新型的 T 细胞生长因子,IL-15 共享 IL-2 活性和受体组成,可以产生多种生物学效应。IL-15 能够增强 NK 细胞的细胞毒活性,刺激 NK 细胞产生细胞因子。IL-15 具有诱导 CTL 和淋巴因子激活的杀伤细胞(lymphokine-activated killer cell, LAK)产生的功能,调节 T 细胞内基因表达等作用,在肿瘤的生物治疗方面有广阔的应用前景^[7,8]。

研究发现,细胞免疫对控制 HPV 感染及其相关肿瘤有重要的作用。有效的 HPV 治疗性基因疫苗必须能够产生特异性细胞免疫应答。CD4⁺ T 细胞在细胞免疫中发挥重要的调控作用,CD4⁺ T 计数和 CD4⁺/CD8⁺ 比值是反应细胞免疫水平的重要指标。本实验中,小鼠经过三次免疫后,E7 + IL-15 组脾脏 CD4⁺ T 细胞数量显著增高,CD4⁺/CD8⁺ 比值均显著降低,说明 pcDNA3.1-IL-15 与 pcDNA3.1-E7 共同注射后可以提高小鼠的细胞免疫水平。

测定淋巴细胞增殖反应是检测细胞免疫功能的有效方法。通过测定淋巴细胞的增殖情况可以反映特异性细胞免疫应答情况^[9]。用 HPV16 E7 蛋白体外刺激脾淋巴细胞,E7 + IL-15 组出现了更强的淋巴细胞增殖,与 E7 + 空质粒组及 E7 组比较,差异显著,这表明 pcDNA3.1-IL-15 与 pcDNA3.1-E7 共同注射能够增强 pcDNA3.1-E7 疫苗的免疫原性,诱导更加强烈的特异性细胞免疫应答。

本实验中,IL-15 基因与 HPV 基因疫苗联合免疫可以提高小鼠的细胞免疫水平,诱导更强的特异性淋巴细胞增殖。因此我们认为,IL-15 真核表达质粒可以提高 HPV16 E7 基因疫苗免疫原性,IL-15 是一种优良的 HPV16 E7 基因疫苗的基因佐剂,这种联合免疫是一种有前途的免疫方案,为人类 HPV 疫苗的研发拓宽了思路。

参 考 文 献

- 1 Higgins GD, Uzelin DM, Phillips GE, et al. Presence and distribution of HPV sense and antisense RNA transcripts in genital cancers. *J Gen Virol*, 1991, 72: 885-895.
- 2 Sangkon OH, Berzofsky JA, Burke DS, et al. Coadministration of HIV vaccine vectors with vaccinia viruses expressing IL-15 but not IL-2 induces long-lasting cellular immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 3392-3397.
- 3 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T(金冬雁,黎孟枫,等译). 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京: 北京科学出版社, 1995. 24-28.
- 4 Loza MJ, Zamai L, Azzoni L, et al. Expression of type 1 (interferon gamma) and type 2 (interleukin-13, interleukin-5) cytokines at distinct stages of natural killer cell differentiation from progenitor cells. *Blood*, 2002, 99: 1273-1281.
- 5 Liu DW, Tsao YP, Kung JT, et al. Recombinant adeno-associated virus expressing human papillomavirus type 16 E7 peptide with

- heat shock protein DNA as a potential vaccine for cervical cancer. J Virol, 2000, 74: 2888-2894.
- 6 张涛,徐葛林. DNA 疫苗的基因佐剂. 国外医学:预防、诊断、治疗用生物制品分册,2002,25:21-23.
 - 7 Shanmugham LN, Petrarca C, Frydas S, et al. IL-15 an immunoregulatory and anti-cancer cytokine. Recent advances. J Exp Clin Cancer Res,2006, 25: 529-536.
 - 8 Waldmann TA. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. Nat Rev Immunol,2006, 6: 595-601.
 - 9 丁勇,伍欣星,张炜,等. 重组人乳头瘤病毒核酸疫苗诱导特异性淋巴细胞增殖. 中国病毒学,2002,17:304-307.

(收稿日期:2007-07-22)

(本文编辑:王琦)