

· 基础研究 ·

牙周炎基因疫苗佐剂 IL-15 对 SD 大鼠肠系膜淋巴结 B 细胞增殖的影响

田 源^{1,2}, 高晓佩², 曾凤娇^{2,3}, 于 航^{2,3}, 刘建国^{2,3}, 白国辉^{2,3*}¹遵义医科大学附属口腔医院牙体牙髓科, 贵州 遵义 563000; ²贵州省普通高等学校口腔疾病研究特色重点实验室, 贵州 遵义 563000; ³遵义医科大学口腔医学院, 贵州 遵义 563000

[摘要] 目的: 观察牙周炎疫苗佐剂白细胞介素-15(interleukin-15, IL-15)对SD大鼠肠系膜淋巴结B淋巴细胞增殖的影响, 初步探讨用IL-15提高基因疫苗免疫效应的可能性。方法: 将牙周炎基因疫苗pVAX1-HA2-FimA/IL-15(A组)、pVAX1-HA2-FimA(B组)和生理盐水(C组)鼻滴免疫SD大鼠, 采用磁珠分选法分离纯化肠系膜淋巴结B细胞, CCK-8法检测B细胞的数量, RT-qPCR法检测CKs2基因相对表达量变化, ELISA法检测培养液中特异性IgA的表达水平。结果: A组B细胞增殖水平高于B组和C组($P < 0.05$); A组B淋巴细胞CKs2 mRNA相对表达量稍高于B组, 但差异无统计学意义($P > 0.05$)。A组B淋巴细胞分泌的特异性IgA水平均高于B、C组($P < 0.05$)。结论: IL-15是一种有效的基因疫苗佐剂, 使用本课题组构建的牙周炎基因疫苗能够促进B细胞增殖, 进而提高特异性IgA抗体的表达水平。

[关键词] 牙周炎基因疫苗; 免疫佐剂; B淋巴细胞; 白细胞介素-15

[中图分类号] R781.4

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)10-1456-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20201010

Effects of periodontitis gene vaccine adjuvant IL - 15 on the proliferation of mesenteric lymph node B cells in SD rats

TIAN Yuan^{1,2}, GAO Xiaopei², ZENG Fengjiao^{2,3}, YU Hang^{2,3}, LIU Jianguo^{2,3}, BAI Guohui^{2,3*}¹Department of Dental Endodontics, the Affiliated Dental Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000; ²Key Laboratory of Oral Disease of Higher Schools in Guizhou Province, Zunyi 563000; ³School of Stomatology, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of periodontitis vaccine adjuvant interleukin - 15 (IL - 15) on the proliferation of B lymphocytes in the mesenteric lymph nodes of SD rats, and explore the possibility of using IL-15 to improve the immune effect of gene vaccine. **Methods:** SD rats were immunized with nasal spray of the periodontitis gene vaccine pVAX1-HA2-FimA/IL-15 (group A), pVAX1-HA2-FimA (group B), and normal saline (group C). Then mesenteric lymph node B cells were isolated and purified by magnetic bead sorting method, the number of B cells was detected by CCK8 method, the relative expression level of CKs2 gene was detected by RT-qPCR, and the expression level of specific IgA in culture medium was detected by ELISA. **Results:** The proliferation level of B lymphocytes in group A was higher than those in group B and group C ($P < 0.05$). The relative expression level of CKs2 mRNA of B lymphocytes in group A was higher than that in group B, but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). The level of specific IgA secreted by B lymphocytes in group A was higher than those in groups B and C ($P < 0.05$). **Conclusion:** IL-15 is an effective gene vaccine adjuvant to promote the proliferation of B cells and increase the expression level of specific IgA antibodies in the periodontitis gene vaccine constructed by our team.

[Key words] periodontitis gene vaccine; immune adjuvant; B lymphocyte cell; IL-15

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(10): 1456-1459]

[基金项目] 国家自然科学基金(81560186); 贵州省科技计划项目(黔科合基础[2019]1333号); 遵义市科技计划课题[遵市科合HZ字(2019)21号]; 贵州省高等学校口腔疾病研究特色重点实验室开放课题(SKLODR-2016-04)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: baiguohui1228@126.com

第三代基因疫苗能够诱导机体的细胞免疫与体液免疫^[1]。有关研究报告,基因疫苗已在多种疾病动物模型进行了效果效价观测^[2-3],但截至目前,研究阶段的基因疫苗产生的免疫反应和检测指标均未通过FDA对疫苗的认可标准。一般的基因疫苗设计中包括载体、抗原基因和佐剂,现阶段对完善疫苗设计的热点集中在如何提高疫苗的效价,进而加强其免疫原性^[4]。白细胞介素-15(interleukin-15, IL-15)是一种免疫调节细胞因子,许多学者将其作为抗肿瘤与抗病毒的基因疫苗佐剂进行了研究并得到预期的效果^[5-6]。大量研究表明,IL-15是具有强大治疗潜能和免疫调节功能的多功能分子,其中促进B细胞的增殖和B细胞归巢、增强T细胞免疫应答、调节组织修复和激活自然杀伤(NK)细胞等生物学潜能对基因疫苗在机体内发挥免疫学作用非常有利^[7]。

本研究中的牙周炎基因疫苗以HA2和FimA作为抗原基因,以细胞因子IL-15为疫苗佐剂,前期研究观察到其抗原基因及细胞因子可在真核细胞中正确表达,免疫SD大鼠后能够成功诱导共同黏膜免疫系统产生免疫应答反应,在唾液中产生特异性IgA抗体。本实验观察疫苗佐剂IL-15对SD大鼠肠系膜淋巴结B淋巴细胞增殖的影响,初步探讨用IL-15提高基因疫苗免疫效应的可能性。

1 材料和方法

1.1 材料

牙周炎基因疫苗:pVAX1-HA2-FimA和pVAX1-HA2-FimA/IL-15(本课题组构建保存)。RPMI 1640完全培养基、青链霉素(北京索莱宝公司),胎牛血清(江苏恩莫阿赛生物技术有限公司);FimA蛋白和HA2蛋白(课题组前期分离提纯);FimA抗体、HA2抗体、二抗(Abcam公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组

18只4~6周龄健康雄性SD大鼠购于重庆市实验动物质检中心,许可证号:SCXK(渝)2017-0005,随机分为3组:A组(实验组):鼻黏膜pVAX1-HA2-FimA/IL-15滴注;B组(阴性对照组):鼻黏膜pVAX1-HA2-FimA滴注;C组(空白对照组):鼻黏膜生理盐水滴注。本研究经校动物实验伦理委员会批准,批准号:遵医伦审[2015]2-029号。

1.2.2 动物免疫及样本采集

100 μg/次鼻腔黏膜滴注免疫各组大鼠,1周加

强免疫1次,共免疫3次。首次免疫后第3周处死实验大鼠,取肠系膜淋巴结,制备淋巴细胞悬液。

1.2.3 大鼠B淋巴细胞的培养与培养

用RPMI 1640完全培养基(含10%胎牛血清、1%青霉素链霉素混悬液)将细胞密度调整为 1.5×10^6 个/mL,取1 mL细胞悬液加入24孔细胞培养板,取100 μL细胞悬液加入96孔培养板,将实验组、阴性对照组、空白对照组细胞悬液分为两部分,分别加入纯化的FimA蛋白和HA2蛋白,使细胞悬液抗原终浓度均为1 μg/mL,将上述B淋巴细胞置于37℃、5% CO₂的培养箱中48 h。

1.2.4 CCK-8法检测B细胞的增殖

采用磁珠分选法分离纯化肠系膜淋巴结B细胞,流式细胞术检测CD45R磁珠分选后获得的B淋巴细胞阳性率,台盼蓝染色法检测细胞活性,显微镜下计数,将细胞密度调整为 1.5×10^6 个/mL,将各组细胞悬液分为两部分,取100 μL细胞悬液加入96孔培养板,加入FimA或HA2蛋白(1 μg/mL),置于37℃、5% CO₂的培养箱中48 h。加入CCK-8溶液(10 μL/孔),细胞培养箱中培养6 h后酶标仪测定450 nm处的吸光度值。

1.2.5 RT-qPCR法检测CKs2 mRNA的相对表达量

引物由上海生工有限公司设计合成(表1),提取培养48 h各组的细胞悬液总RNA,逆转录为cDNA,25 μL反应体系,退火温度58℃,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算目的基因相对表达量。

表1 内参和CKs2引物

| Table 1 Primers of internal reference and CKs2 | |
|--|---------------------------|
| 引物名称 | 引物序列(5'→3') |
| β-actin-F | TCAGGTCATCACTATCGGCAAT |
| β-actin-R | AAAGAAAGGGTGTAACACGCA |
| CKs2-F | AAGAGGAGTGGAGGAGACTTGCTG |
| CKs2-R | AATATGCGGTTCCGGCTCATGGATC |

1.2.6 ELISA法检测细胞培养上清液中特异性IgA的表达水平

HA2和FimA蛋白包板,将各组细胞悬液离心后取上清作为样本,顺序加入100 μL样本、一抗、二抗、显色液和终止液,测定吸光度值(450~570 nm)。

1.3 统计学方法

实验数据用SPSS18.0进行统计分析。所有数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组之间比较采用单因素方差分析,两组之间比较若方差齐用LSD检验,若不齐用Tamhane检验, $P < 0.05$ 表示差异有统

计学意义。

2 结果

2.1 B淋巴细胞的活细胞比率

大鼠肠系膜淋巴细胞悬液经 CD45R 免疫磁珠分选后, A 组 B 淋巴细胞阳性率 92.7%, B 组 90.4%, C 组 94.2%。红色区域表示被 Anti-Rat CD5R-FITC 标记 B 淋巴细胞发出荧光, 该结果提示正确分选到大

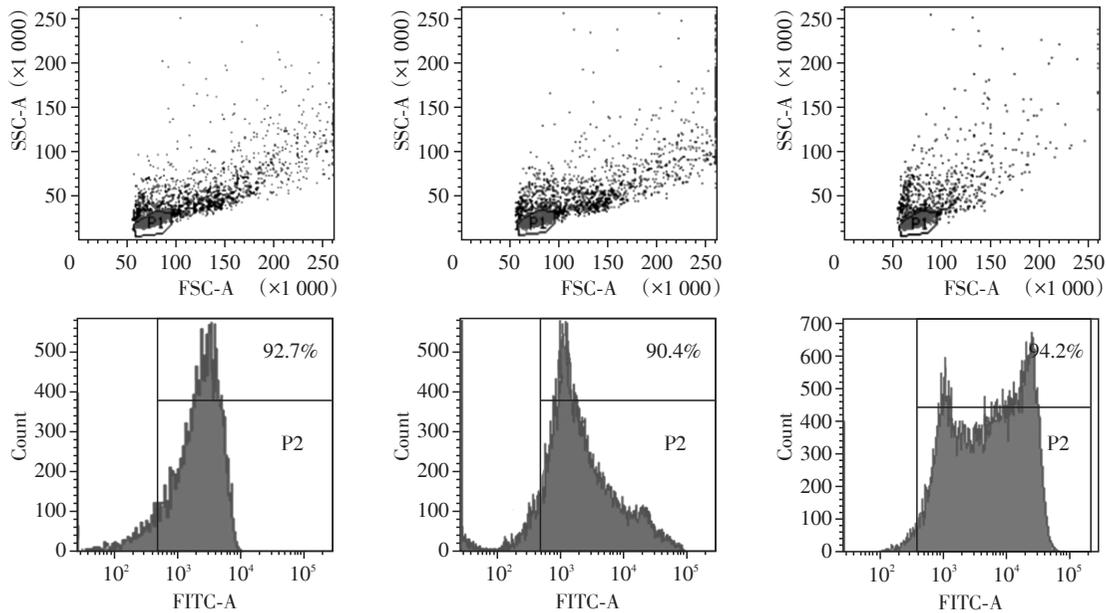


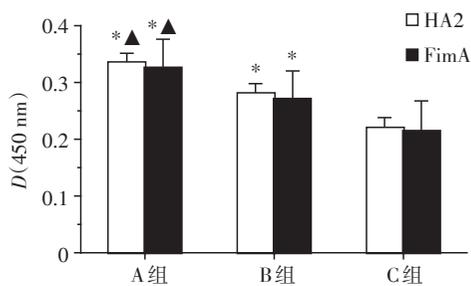
图1 肠系膜B淋巴细胞阳性率

Figure 1 Positive rate of mesenteric B lymphocytes

鼠肠系膜淋巴结 B 淋巴细胞(图 1)。

2.2 B 细胞增殖水平

A 组增殖水平 $D(450\text{ nm})$ 值高于 B 组与 C 组, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); B 组增殖水平 $D(450\text{ nm})$ 值高于 C 组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 2)。



与生理盐水组(C组)比较, * $P < 0.05$; 与阴性对照组(B组)比较, ^ $P < 0.05$ ($n=6$)。

图2 大鼠肠系膜淋巴结 B 淋巴细胞增殖水平

Figure 2 B lymphocyte proliferation level in rat mesenteric lymph nodes

2.3 CKs2 基因相对表达量比较

经 HA2 或 FimA 蛋白处理后, A 组和 B 组的 SD 大鼠肠系膜淋巴结 B 淋巴细胞 CKs2 mRNA 相对表

达量均高于 C 组, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), A 组 CKs2 mRNA 相对表达量高于 B 组, 差异也无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 2)。

表2 CKs2 mRNA 相对表达量

Table 2 Relative expression of CKs2 mRNA

($2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

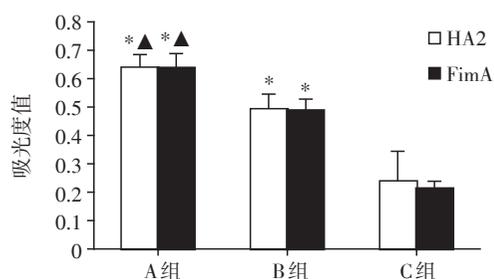
| 分组 | HA2 | FimA |
|-----|-------------|-------------|
| A 组 | 1.73 ± 0.12 | 1.55 ± 0.08 |
| B 组 | 1.57 ± 0.08 | 1.51 ± 0.11 |
| C 组 | 1.00 | 1.00 |
| P 值 | > 0.05 | > 0.05 |

2.4 特异性 IgA 抗体表达水平

A 组 B 淋巴细胞分泌的特异性 IgA 水平均高于 B 组和 C 组, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); B 组 B 淋巴细胞分泌特异性 IgA 水平高于 C 组, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 3)。

3 讨论

基因疫苗的设计包括载体、抗原基因和佐剂的选择, 现阶段对疫苗的研究工作中, 如何提高其效价成为疫苗研发的瓶颈。IL-15 的免疫调节功能包括促进 B 细胞的增殖和归巢、增强 T 细胞免疫应答



与生理盐水组(C组)比较,* $P < 0.05$;与阴性对照组(B组)比较, $^{\Delta}P < 0.05(n=6)$ 。

图3 肠系膜淋巴结B淋巴细胞培养上清液特异性IgA抗体水平

Figure 3 Level of specific IgA in mesenteric lymph node B lymphocyte culture supernatant

等,这些生物学功能使其可以作为提高基因疫苗在机体内发挥免疫学作用的候选基因。

在机体免疫应答过程中,IL-15通过调节T细胞促进B细胞向IgA⁺B细胞的分化,黏膜相关淋巴组织中的Thy-1 T细胞能够诱导B细胞分化为IgA⁺B细胞^[8-10]。研究发现,IL-15促进B细胞的增殖,可能与促进B细胞的成熟和发育作用有关^[11-12],因此,本文推测这些调节机制可以提高牙周炎基因疫苗的免疫原性。

在共同黏膜免疫应答中,IgA发挥最主要作用,有研究指出,其占黏膜相关淋巴组织产生的所有抗体的80%^[13]。由固有层浆细胞产生的是血清IgA,二聚体由J链连接,当其通过黏膜或浆膜上皮细胞向外分泌后,可以与上皮细胞产生的分泌片结合形成完整的IgA,分泌至膜表面发挥免疫功能^[14]。

从本实验的结果可以观察到,IL-15在体外实验中促进了B细胞的增殖,鼻滴免疫基因疫苗pVAX1-HA2-FimA/IL-15的SD大鼠肠系膜淋巴结B细胞培养上清液中特异性IgA抗体的表达水平高于pVAX1-HA2-FimA组,证明本课题组构建的牙周炎基因疫苗中,IL-15是一种有效的基因疫苗佐剂,在本课题组构建的牙周炎基因疫苗中能够促进B细胞增殖,进而提高特异性IgA抗体的表达水平。

[参考文献]

[1] 秦妍,管晓燕,白国辉. 基因疫苗黏膜免疫及其机制的研究进展[J]. 贵州医药,2016,40(4):426-428

[2] HANNAMAN D, DUPUY L C, ELLEFSEN B, et al. A phase 1 clinical trial of a DNA vaccine for Venezuelan equine encephalitis delivered by intramuscular or intra-

dermal electroporation[J]. Vaccine,2016,34(31):3607-3612

[3] SAADE F, PETROVSKY N. Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines[J]. Expert Rev Vaccines, 2012, 11(2):189-209

[4] SCHAID D J, HARALAMBIEVA I H, LARRABEE B R, et al. Heritability of vaccine-induced measles neutralizing antibody titers[J]. Vaccine,2017,35(10):1390-1394

[5] PATIDAR M, YADAV N, DALAI S K. Interleukin 15: A key cytokine for immunotherapy [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2016, 31:49-59

[6] 夏丹丹,席晓薇. IL-15联合HPV基因疫苗治疗宫颈癌的前景[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2019,39(3):436-441

[7] 高晓佩. 牙周病基因疫苗pVAX1-HA2-FimA/IL-15对肠系膜淋巴结B细胞增殖影响的研究[D]. 遵义:遵义医学院,2018

[8] LIN L, FANG Z, LIN H, et al. Depletion of Cks1 and Cks2 expression compromises cell proliferation and enhance chemotherapy-induced apoptosis in HepG2 cells[J]. Oncol Rep, 2016, 35(1):26-32

[9] PAGLIARI D, CIANCI R, FROSALI S, et al. The role of IL-15 in gastrointestinal diseases: a bridge between innate and adaptive immune response[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2013, 24(5):455-466

[10] EHRHARDT R O, STROBER W. The role of SIgA + B cells in oral immunity[J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 754(1):138-142

[11] CHUNG M T, LIU C, HYUN J S, et al. CD90(Thy-1)-positive selection enhances osteogenic capacity of human adipose-derived stromal cells[J]. Tissue Eng Part A, 2013, 19(7-8):989-997

[12] HOVEST L G, MARWAN W, BAUER K, et al. Tumor growth inhibition with bispecific antibody fragments in a syngeneic mouse melanoma model: the role of targeted T-cell costimulation via CD28 [J]. Int J Cancer, 2015, 80(1):138-144

[13] DEDERA D A, URASHIMA M, CHAUHAN D, et al. Interleukin-6 is required for pristane-induced plasma cell hyperplasia in mice[J]. Br J Haematol, 2015, 94(1):53-61

[14] HARDING A, ROBINSON S, CREAM S J, et al. Can better management of periodontal disease delay the onset and progression of Alzheimer's disease? [J]. J Alzheimers Dis, 2017, 58(2):337

[收稿日期] 2019-05-10