

动物及兽医生物技术

胸腺五肽和法氏囊活性五肽的融合表达及其对禽流感灭活疫苗的佐剂效应

王臣¹, 郭香玲¹, 李小康¹, 吴庭才¹, 李德元², 陈溥言²

1 河南科技大学动物科技学院 兽医肿瘤免疫学重点实验室, 河南 洛阳 471003

2 南京农业大学动物医学院 农业部动物细菌学重点实验室, 江苏 南京 210095

王臣, 郭香玲, 李小康, 等. 胸腺五肽和法氏囊活性五肽的融合表达及其对禽流感灭活疫苗的佐剂效应. 生物工程学报, 2015, 31(5): 648-658.

Wang C, Guo XL, Li XK, et al. Expression and adjuvant effects of the fusion peptide TBP5. Chin J Biotech, 2015, 31(5): 648-658.

摘要: 胸腺五肽 (Thymopentin, TP5) 和法氏囊活性五肽 (Bursopentin, BP5) 均具有重要的免疫学功能, 但二者在基因水平上的联合应用尚未见报道。为研究 TP5 和 BP5 形成的重组融合肽 TP5-BP5 (TBP5) 是否具有免疫佐剂活性, 根据大肠杆菌偏嗜密码子设计并合成重组融合肽 TBP5 编码序列, 将其克隆至 pET-32a 表达载体中, 重组表达载体在大肠杆菌 BL21 中诱导表达, 并采用 MTT 法检测其表达产物的体外活性。同时以 TBP5 联合 H9N2 型禽流感病毒 (Avian influenza virus, AIV) 灭活疫苗免疫小鼠, 检测免疫后小鼠的 HI 抗体、HA 抗体效价和细胞因子 (IL-4 和 IFN- γ) 的分泌水平, 并通过动物免疫保护试验来评价其对小鼠的免疫保护作用。结果显示, TBP5 在大肠杆菌中获得表达; TBP5 能显著促进小鼠胸腺 T 淋巴细胞和脾脏 B 淋巴细胞的增殖, 并能增强机体免疫后 HI 抗体和 HA 抗体效价、提高细胞因子 IL-4 和 IFN- γ 的分泌水平, 表明 TBP5 既能增强机体体液免疫应答, 又能增强细胞免疫应答。动物免疫保护试验结果显示 TBP5 有助于小鼠肺脏中 H9N2 型 AIV 病毒的清除。结果表明, 重组融合肽 TBP5 具有良好的免疫佐剂的潜能, 为进一步研究开发新型疫苗佐剂奠定了基础。

关键词: 胸腺五肽, 法氏囊活性五肽, 融合表达, 免疫佐剂

Received: September 28, 2014; **Accepted:** December 8, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31101792, 31201928), Foundation for University Key Teacher by Higher Education of Henan Province (No. 2012GGJS-077).

Corresponding author: Chen Wang. Tel: +86-379-65507210; Fax: +86-379-64282341; E-mail: wangchen2001@126.com

国家自然科学基金 (Nos. 31101792, 31201928), 河南省高校青年骨干教师项目 (No. 2012GGJS-077) 资助。

网络出版时间: 2015-02-03

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20150203.1610.001.html>

Expression and adjuvant effects of the fusion peptide TBP5

Chen Wang¹, Xiangling Guo¹, Xiaokang Li¹, Tingcai Wu¹, Deyuan Li², and Puyan Chen²

¹ Key Laboratory of Veterinary Oncological Immunology, College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, Henan, China

² Key Laboratory of Animal Bacteriology of China's Department of Agriculture, College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

Abstract: Thymopentin (TP5) and bursopentin (BP5) are both immunopotentiators. To explore whether the TP5-BP5 fusion peptide (TBP5) has adjuvant activity or not, we cloned the TBP5 gene and confirmed that the TBP5 gene in a recombinant prokaryotic expression plasmid was successfully expressed in *Escherichia coli* BL21. TBP5 significantly promoted the proliferation of thymic and splenic lymphocytes of mice. The potential adjuvant activity of the TBP5 was examined in mice by coinjecting TBP5 and H9N2 avian influenza virus (AIV) inactivated vaccine. HI antibody titers, HA antibodies and cytokines levels (IL-4 and IFN- γ) were determined. We found that TBP5 markedly elevated serum HI titers and HA antibody levels, induced the secretion of both IL-4 and IFN- γ cytokines. Furthermore, virus challenge experiments confirmed that TBP5 contributed to inhibition replication of the virus [H9N2 AIV (A/chicken/Jiangsu/NJ07/05)] from mouse lungs. Altogether, these findings suggest that TBP5 may be an effective adjuvant for avian vaccine and that this study provides a reference for further research on new vaccine adjuvants.

Keywords: thymopentin, bursopentin, fusion expression, adjuvant

胸腺是机体免疫系统中重要的中枢免疫器官,是T细胞分化成熟的场所,能分泌多种具有激素样活性的多肽^[1]。胸腺五肽(Thymopentin, TP5)是胸腺生成素II第32-36位氨基酸残基片段,能诱导T细胞分化,并促进T细胞亚群的发育、分化^[2]。作为一种免疫增强剂,TP5在临床上主要用于自身免疫性疾病、慢性肝炎、免疫缺陷病、免疫功能低下、外科手术严重感染及肿瘤等的辅助治疗^[3]。法氏囊(Bursa of fabricus, BF)是禽类独有的中枢体液免疫器官,相当于哺乳动物的骨髓^[4]。BF中存在许多生物活性物质,尤其是一些具有免疫调节作用的小肽,能促进禽类淋巴细胞的分化发育及免疫器官的成熟^[5-9]。法氏囊活性五肽(Bursopentin, BP5)是从法氏囊中分离所得的一种新的活性小肽,氨基酸序列为CKDVY,能促进T细胞和B细胞的增殖,提高机体体液和细胞免疫,还能

平衡Th1和Th2类型的免疫反应^[10-11],且这种免疫平衡作用是一般免疫增强剂所不具备的。虽然免疫活性因子TP5和BP5均能够增强机体的免疫应答,但TP5主要是诱导机体的细胞免疫应答,而BP5则主要调节机体的体液免疫应答。近年来,有关TP5和BP5生物学功能的报道甚多,然而二者在基因水平上的联合应用目前未见报道,本研究根据大肠杆菌偏嗜密码子设计并合成重组融合肽TP5-BP5(TBP5)编码序列,构建高效表达TBP5的基因工程菌株,在大肠杆菌中进行融合蛋白的表达,并探讨重组融合肽TBP5的免疫佐剂效应,为新型疫苗佐剂的研究开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株及毒株

TBP5基因及上下游引物,均由华大基因科

技股份有限公司化学合成；表达载体 pET-32a (+)、*Escherichia coli* DH5 α 菌株、*E. coli* BL21 (DE3) 菌株均为河南科技大学动物科技学院本实验室所保存。禽流感疫苗 (H9N2 亚型, SDS696 株) 购自乾元浩生物股份有限公司；H9N2 亚型禽流感病毒株 A/chicken/Jiangsu/NJ07/05 (H9N2) 和 pET32a-HA (H9N2) 质粒, 由南京农业大学郑其升博士惠赠。

1.2 主要试剂及工具酶

DTT、ConA、溴酚蓝、琼脂糖、考马斯亮蓝 R-250、淋巴细胞分离液、MTT、胎牛血清 (FBS) 均购自郑州久是生物技术有限责任公司；100 bp DNA marker、PageRuler Plus Prestained Protein Ladder、IPTG、dNTPs、Nucleic acid stain (核酸染料)、质粒快速提取试剂盒、Trizol 试剂、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体、TMB 底物显色液均购自郑州鼎国生物技术有限责任公司；小鼠细胞因子含量测定 ELISA 试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司；小量琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、限制性核酸内切酶 *EcoR* I、*Xho* I、*Hind* III, T4 DNA 连接酶、*Taq* 酶均购自 TaKaRa 公司；Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG, 购自 Invitrogen 公司。TP5 和 BP5 标准品均由上海科肽生物科技有限公司合成。

1.3 实验动物

90 只 BALB/c 小鼠 (4-6 周龄, 20 \pm 2 g), 购自河南省实验动物研究中心。

1.4 重组融合肽 TBP5 的克隆与表达

根据大肠杆菌的偏嗜密码子设计重组融合肽 TBP5 串联融合基因, 并针对该融合肽基因设计引物 F1、F2 和 F3 (表 1), 分别在 F1 加上 *EcoR* I

酶切位点、F3 中加上终止密码子和 *Xho* I 酶切位点, 然后通过柔性 Linker (G-G-G-G-S) 基因将 TP5 和 BP5 基因串联形成重组融合肽 TBP5 基因 (图 1)。利用 F1、F2 和 F3 引物进行重叠 PCR 方法 (SOE-PCR) 扩增, 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物, 并回收重组融合肽 TBP5 基因。TBP5 基因片段和质粒载体 pET-32a 均用 *EcoR* I 和 *Xho* I 进行双酶切后再回收, 并用 T4 DNA 连接酶进行连接, 连接产物转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。利用质粒快速提取试剂盒提取重组质粒 pET32a-TBP5, 用 *Hind* III 进行缺失酶鉴定, 并送往华大基因科技股份有限公司测序。将测序正确的重组质粒 pET32a-TBP5 转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 中进行诱导表达, 利用 SDS-PAGE 分析其表达情况。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of primers

Primer name	Primer sequence (5'-3')
F1	CCGGAATTCGTAAGGACGTATAAC GCAAAGATGTCTATAGGAAGGATGT GTACCGTAAAGACGTCTATCGCAAG
F2	GGTGCTGCCGCCGCCCGCTACACA TCTTCCGATAAACATCCTTGCGATA GACGTCTTT
F3	TGTACGGCGCGCGGCAGCACCC CGAACCTGAAACATGGCACCCCGA ACCTGAAACATGGCCTCGAGTAA

The restriction enzyme sites are marked with underlined.

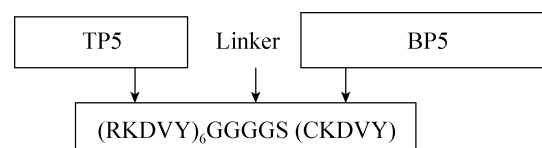


图 1 重组融合肽 TBP5 的设计图

Fig. 1 Design of the fusion peptide TBP5.

1.5 重组融合肽 TBP5 的体外活性测定

无菌采取 4-6 周龄 BALB/c 小鼠 (20±2) g 的胸腺、脾脏, 将其置于 200 目不锈钢细胞筛网上用注射器针芯轻轻研压制成细胞悬液, 加入 Hank's 液中, 500 r/min 离心 5 min, 除去红细胞; 取上清 500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 以 Hank's 液洗涤沉淀 2 次; 用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基将两种淋巴细胞密度均调整为约 5×10^6 cells/mL。其中胸腺淋巴细胞加入 ConA 至终浓度为 5 μ g/mL, 脾脏淋巴细胞加入 PMA 至终浓度为 300 ng/mL, 分别分装到 96 孔板中, 100 μ L/孔, 并设 3 个复孔, 置于 CO₂ 培养箱中 37 $^{\circ}$ C 培养 6 h; 将不同浓度 (0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4 μ g/mL) 的重组融合肽 TBP5 (经蛋白质 Ni 柱亲和层析纯化) 加入淋巴细胞中, 100 μ L/孔, 并设对照组 (PBS、1.0 μ g/mL 大肠杆菌硫氧还蛋白 (Thioredoxin, TRX)、1.0 μ g/mL TP5、1.0 μ g/mL BP5), 继续培养 72 h, 标准 MTT 法检测重组融合肽 TBP5 对胸腺和脾脏淋巴细胞增殖的影响。相对细胞增殖率 (%) = (实验组 OD₅₇₀/对照组 OD₅₇₀) \times 100%。

1.6 动物的分组与免疫

将 90 只 4-6 周龄 BALB/c 小鼠随机分为 5 组, 每组 18 只, 第 1 组作空白对照组 (100 μ L PBS); 第 2-5 组分别为禽流感灭活疫苗组 (H9N2 亚型 SDS696 株, 10^7 TCID₅₀/0.1 mL)、H9N2 AIV 灭活疫苗 (10^7 TCID₅₀/0.1 mL) + TP5 组 (10 μ g)、H9N2 AIV 灭活疫苗 (10^7 TCID₅₀/0.1 mL) + BP5 组 (10 μ g)、H9N2 AIV 灭活疫苗 (10^7 TCID₅₀/0.1 mL) + 重组融合肽 TBP5 组 (10 μ g)。采取肌肉注射 (i.m.) 方式进行两次免疫, 每次免疫间隔 2 周, 即所有组分别于 0、14 d 进行首免和二免。

1.7 血清中 HI 抗体效价的测定

首免后 0、7、14、21 d, 从免疫小鼠中每组随机抽取 5 只小鼠进行眼眶静脉丛取血, 并分离血清, 56 $^{\circ}$ C 灭活 30 min, 采用标准 HI 试验检测小鼠血清中 HI 抗体效价^[12]。检测 H9N2 型禽流感病毒 (A/chicken/Jiangsu/NJ07/05) 的血凝效价, 并将其配制成 4 单位 H9N2 型 AIV 抗原。用 PBS 进行系列倍比稀释后加入 96 孔微量板中, 每孔加 50 μ L 4 单位 H9N2 型 AIV 抗原, 轻轻混匀, 室温下孵育 1 h 后, 每孔加入 50 μ L 0.5% 鸡红细胞悬液, 室温下静置 1 h, 观察各组血凝情况, 以可抑制血凝的最高血清稀释度为待检血清中 HI 抗体效价。

1.8 血清中 HA 抗体的测定

于首免后 7、21 d 分离小鼠血清, 并采用 ELISA 方法检测小鼠血清中的 H9N2 HA 抗体^[11,13]。以 10 μ g/mL 在大肠杆菌中表达的重组 H9N2 HA 蛋白^[14]包被 96 孔微量板, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 次日弃孔内液, 用 PBS/0.1% Tween-20 (PBST) 洗板 3 次 (每次静置 3 min), 以 1% BSA 于 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h, 弃孔内液, 用 PBST 洗板 3 次。用含 1% BSA 的 PBS 将小鼠血清稀释为 $1:10^1-1:10^5$, 第 1 孔作为空白对照, 第 2 孔加 100 μ L PBS, 第 3 孔开始加 $1:20$ 稀释的小鼠血清 100 μ L, 于 37 $^{\circ}$ C 放置 2 h, 弃孔内液, PBST 洗板 3 次, 除第 1 孔外, 每孔加 $1:2000$ 稀释的 HRP 酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 弃孔内液, PBST 洗板 3 次, 除第 1 孔外, 每孔加 100 μ L TMB 显色液, 室温避光反应 20 min, 每孔加 100 μ L 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 测 OD₄₅₀。

1.9 血清中 IL-4 和 IFN- γ 的测定

于首免后 7、21 d 分离小鼠血清, 采用小鼠

细胞因子含量测定 ELISA 试剂盒检测血清中 IL-4 和 IFN- γ 的含量, 具体操作按照试剂盒说明书进行。每次分析时, 使用对照的重组细胞因子标准品绘制标准曲线, 通过标准曲线来计算血清中细胞因子的含量。

1.10 动物免疫保护试验

二免 2 周后 (即首免后 28 d), 经滴鼻途径对各实验组小鼠 (18 只/组) 攻击 H9N2 型禽流感病毒毒株 A/chicken/Jiangsu/NJ07/05 (H9N2) 100 μ L (2.5×10^6 TCID₅₀/0.1 mL), 设 PBS 对照组, 攻毒后各组小鼠隔离饲养。于攻毒后 3、5、7 d 分别从各组随机抽取 5 只小鼠分离其肺脏, 应用 SYBR Green 荧光定量 PCR 方法采用 Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG 检测各小鼠肺脏中病毒的滴度, 具体操作按照试剂盒说明书进行。根据 H9N2 型禽流感病毒毒株 A/chicken/Jiangsu/NJ07/05 (H9N2) 的基因序列 (GenBank Accession No. AY364228) 设计引物, 引物序列为 HA-F :5'-CTACTGTTGGGAG GAAGAGAATGGT-3'; HA-R :5'-TGGGCGTCTT GAATAGGGTAA-3'。

1.11 数据分析

采用 SPSS 软件对实验数据进行统计学分析, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为显著差异, 有统计学意义。

2 结果

2.1 重组融合肽 TBP5 的表达

用引物 F1、F2 和 F3 对融合肽 TBP5 的基因进行 SOE-PCR 扩增, 经双酶切、连接并转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 提取重组质粒并用 *Hind* III 进行缺失酶鉴定, 结果显示重组质粒没

有被 *Hind* III 切出相应条带 (图 2A), 表明重组质粒已经缺失 *Hind* III 酶切位点。重组质粒测序结果显示, 重组融合肽 TBP5 基因全部插入 pET-32a 载体中, 且 TBP5 基因与设计完全相符, 表明重组表达载体构建成功, 将重组质粒命名为 pET32a-TBP5。将重组质粒 pET32a-TBP5 转入 *E. coli* BL21 (DE3) 中进行诱导表达, 表达产物经 SDS-PAGE 分析后, 可见重组表达载体 pET32a-TBP5 诱导后表达约 27.0 kDa 大小的目的蛋白条带, 纯化后条带更为清晰, 与预期分子量大小一致, 表明重组融合肽 TBP5 基因在大肠杆菌中获得了表达 (图 2B)。

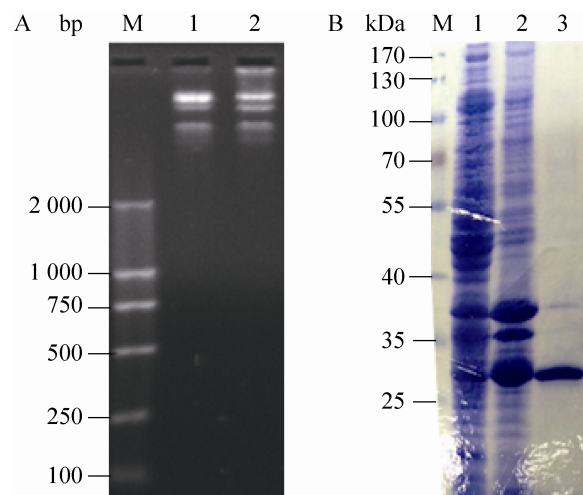


图 2 重组质粒 pET32a-TBP5 的鉴定及重组融合肽 TBP5 在大肠杆菌中的表达

Fig. 2 (A) Identification of the recombinant plasmid pET32a-TBP5. M: 100-bp DNA marker; 1: the recombinant plasmid pET32a-TBP5 after *Hind* III enzyme digestion; 2: the recombinant plasmid pET32a-TBP5. (B) The expression of fusion peptide TBP5 in *E. coli*. M: Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder; 1: uninduced recombinant BL21 (DE3)/pET32a-TBP5; 2: induced recombinant BL21 (DE3)/pET32a-TBP5; 3: purified recombinant BL21 (DE3)/pET32a-TBP5.

2.2 重组融合肽 TBP5 的体外活性

将 TBP5 重组菌的表达产物经蛋白质 Ni 柱亲和层析纯化和分光光度计定量后,通过 MTT 法测定重组融合肽 TBP5 对小鼠胸腺和脾脏淋巴细胞增殖的影响,结果显示,与 PBS 组相比,不同浓度 (0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 TBP5 均可促进胸腺淋巴细胞和脾脏淋巴细胞的增殖。与 TP5、BP5 相比, TBP5 刺激胸腺和脾脏淋巴细胞增殖活性更强,且其浓度为 0.4、0.8、6.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时差异显著 ($P<0.05$),浓度为 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 3.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时差异极显著 ($P<0.01$) (图 3A 和 3B)。表明重组融合肽 TBP5 能够促进小鼠胸腺 T 淋巴细胞和脾脏 B 淋巴细胞的增殖。

2.3 免疫小鼠血清中的 HI 抗体效价

分别于首免后 0、7、14、21 d 采集各组小鼠血清进行 HI 抗体检测,如图 4 所示,除 PBS 对照组外,各免疫组小鼠首免后 7 d 均可检测到 HI 抗体,且首免后 14、21 d 时各免疫组小鼠 HI 抗体效价均显著上升,但 HI 抗体效价存在组

间差异。结果显示,首免后 7、14、21 d 时,疫苗+BP5 组和疫苗+TP5 组小鼠血清中 HI 抗体效价均高于单独疫苗组,且疫苗+BP5 组 HI 抗体效价高于疫苗+TP5 组,但差异并不显著 ($P>0.05$),而疫苗+TBP5 组小鼠血清中 HI 抗体效价则显著高于疫苗+BP5 组 ($P<0.05$)。表明重组融合肽 TBP5 能够显著增强免疫后小鼠的 HI 抗体水平。

2.4 血清中抗体 HA 效价

于首免后 7、21 d 分离小鼠血清进行 HA 抗体检测,结果如图 5 所示,首免后 7 d 和 21 d 时,疫苗+BP5 组和疫苗+TP5 组小鼠血清中 HA 抗体效价均显著高于单独疫苗组 ($P<0.05$),且疫苗+BP5 组 HA 抗体效价稍高于疫苗+TP5 组,而疫苗+TBP5 组小鼠的 HA 抗体效价则显著高于疫苗+BP5 组 ($P<0.05$),且首免后 21 d 时较首免后 7 d 时各组 HA 抗体水平均进一步提高。表明重组融合肽 TBP5 显著提高免疫 H9N2 型 AIV 疫苗后小鼠的 HA 抗体分泌水平。

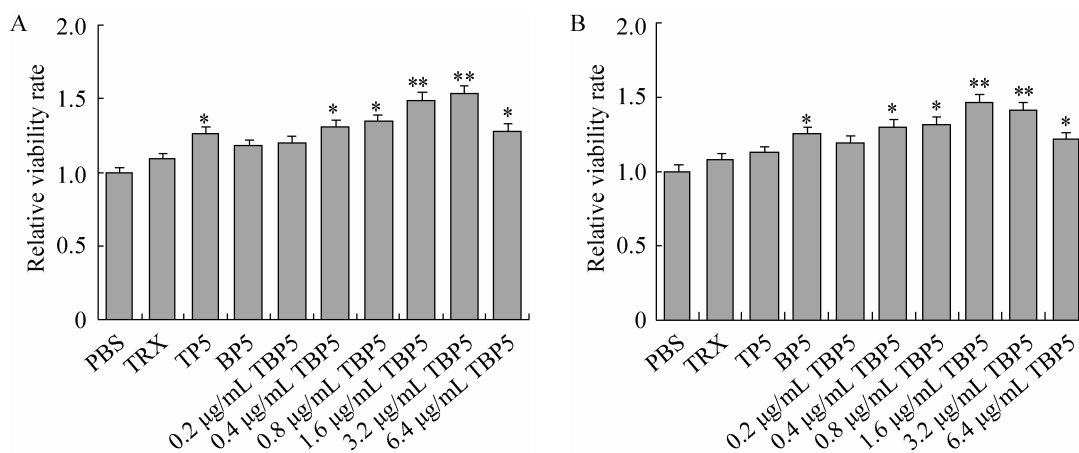


图 3 重组融合肽 TBP5 对小鼠淋巴细胞增殖活性的影响

Fig. 3 The effects of fusion peptide TBP5 on the proliferation of thymic lymphocytes (A) or splenic lymphocytes (B) from immunized mice. The data presented are $\bar{x} \pm s$ of five replicates. * $P<0.05$ and ** $P<0.01$, compared with mice immunized with PBS.

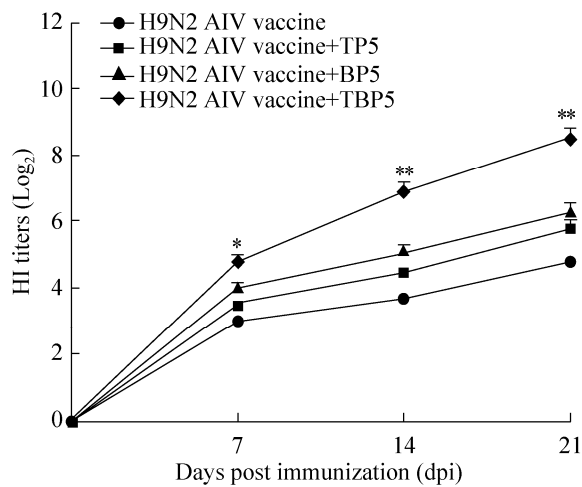


图4 血清中抗体 HI 效价检测

Fig. 4 HI antibody titers in the immunized mice. Mouse sera ($n=5$) were collected at 0, 7, 14 and 21 d post-immunization, and the serum HI titers were analyzed by HI assay. The data presented are $\bar{x} \pm s$ of five replicates. * $P<0.05$ and ** $P<0.01$, compared with mice immunized with H9N2 AIV vaccine.

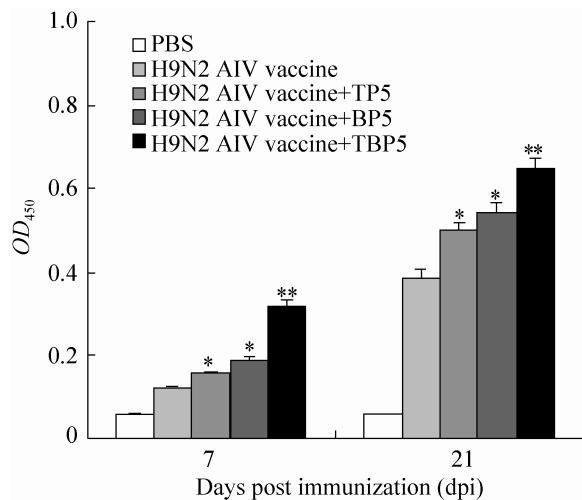


图5 血清中抗体 HA 效价分析

Fig. 5 HA antibody titers in the immunized mice. Mouse sera ($n=5$) were collected at 7 and 21 d post-immunization for HA antibody detection by ELISA. Data shown are representative of five separate experiments. * $P<0.05$ and ** $P<0.01$, compared with mice immunized with H9N2 AIV vaccine.

2.5 免疫小鼠血清中 IL-4 和 IFN- γ 水平

于首免后 7、21 d 分离小鼠血清,采用小鼠

细胞因子含量测定 ELISA 试剂盒检测血清中 IL-4 和 IFN- γ 的含量,以分析 TBP5 对 H9N2 型 AIV 疫苗免疫后小鼠的细胞免疫水平的影响。从图 6 可以看出,首免后 7 d 和 21 d 时,单独疫苗组的 IL-4 和 IFN- γ 的分泌量均高于 PBS 组;疫苗+TP5 组和疫苗+BP5 组的 IL-4 和 IFN- γ 的分泌量与单独疫苗组相比均显著升高 ($P<0.05$),且疫苗+TP5 组 IL-4 和 IFN- γ 的分泌量略高于疫苗+BP5 组;而疫苗+TBP5 组 IL-4 和 IFN- γ 的分泌量显著高于疫苗+TP5 组 ($P<0.05$)。表明重组融合肽 TBP5 能够提高免疫后小鼠体内细胞因子 IL-4 和 IFN- γ 的分泌水平。

2.6 免疫小鼠的免疫保护试验

由于 H9N2 型禽流感病毒毒株 A/chicken/Jiangsu/NJ07/05 (H9N2) 不能使小鼠出现明显的临床症状和导致死亡,为有效评价各实验组小鼠免疫保护力的差异,于二免 2 周后,对小鼠攻击 A/chicken/Jiangsu/NJ07/05 (H9N2) $100 \mu\text{L}$ (2.5×10^6 TCID₅₀/0.1 mL),同时设 PBS 对照组,在攻毒后 3、5、7 d 从各组随机抽取 5 只小鼠采集其肺脏,采用 SYBR Green 荧光定量 PCR 方法检测肺脏中病毒滴度。结果显示(图 7),攻毒后 3、5、7 d,疫苗+TP5 组和疫苗+BP5 组小鼠肺脏中病毒滴度均显著低于单独疫苗组 ($P<0.05$),而疫苗+TBP5 组病毒滴度与疫苗+TP5 组和疫苗+BP5 组相比显著下降 ($P<0.05$),且攻毒后 7 d 时各实验组小鼠肺脏中病毒滴度明显低于攻毒后 3 d 和 5 d 时病毒滴度 ($P<0.05$),其中疫苗+TBP5 组在攻毒后 7 d 时几乎检测不到小鼠肺脏中的病毒粒子。表明重组融合肽 TBP5 能够有效抑制 H9N2 型 AIV 在小鼠肺脏中的复制,促进小鼠肺脏中病毒的清除,从而对小鼠起到免疫保护的效果。

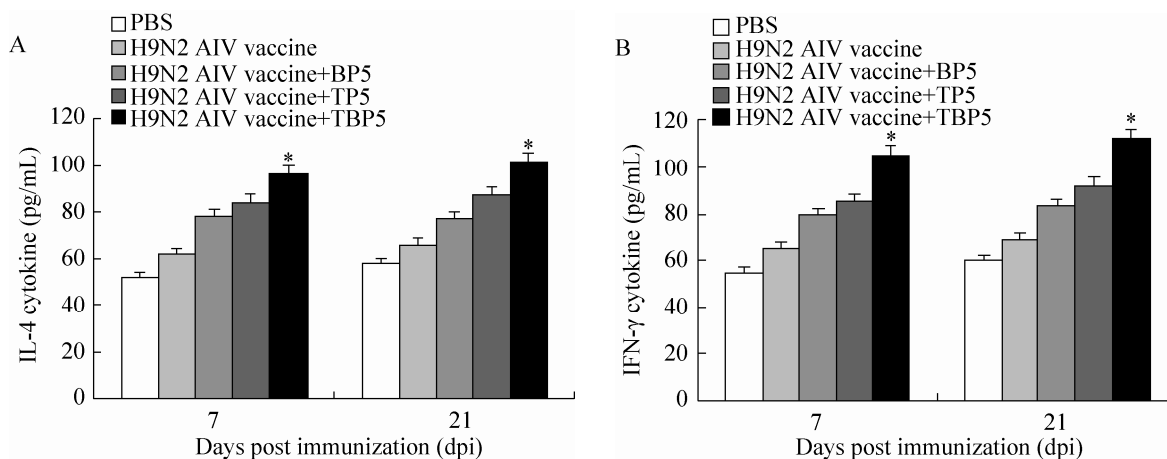


图 6 血清中 IL-4 和 IFN- γ 的分泌量

Fig. 6 The effect of TBP5 on IL-4 and IFN- γ cytokine production in the sera of immunized mice. Mouse sera ($n=5$) were collected at 7 and 21 d post-immunization, and the IL-4 (A) and IFN- γ (B) were measured by using a sandwich ELISA and a commercial ELISA kit. Data shown are representative of five separate experiments. * $P<0.05$, compared with mice immunized with H9N2 AIV vaccine.

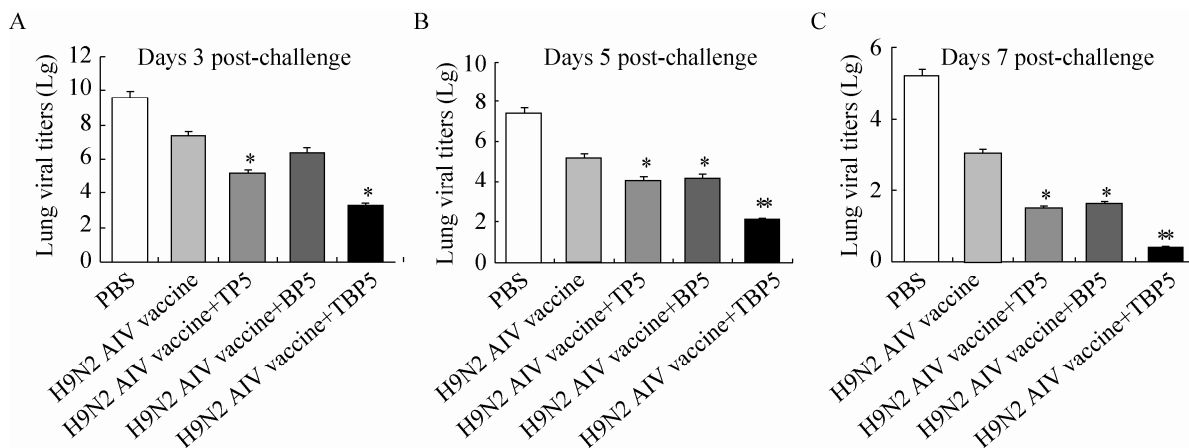


图 7 小鼠肺脏中 AIV 病毒滴度

Fig. 7 AIV titers in the lung of the immunized mice. Lung samples from immunized mice in each group ($n=5$) were collected at 3, 5 and 7 d post-challenge with 2.5×10^6 TCID₅₀ H9N2 avian influenza virus A/chicken/Jiangsu/NJ07/05 (H9N2). Each lung sample was diluted to 1 mL with PBS. Lung viral copies are represented as copies (Lg) per mL. The data presented are $\bar{x} \pm s$ of five replicates. * $P<0.05$ and ** $P<0.01$, compared with mice immunized with H9N2 AIV vaccine.

3 讨论

疫苗对控制人类和动物传染性疾病的流行具有至关重要的作用，而合适的佐剂则能增强

疫苗的免疫原性、提高机体免疫应答水平，使疫苗更有效地发挥免疫保护作用^[15-16]。然而，大多数与抗原联合使用的佐剂有诸多副作用，只有很少一部分在临床上得以应用。因此，新

型疫苗佐剂的开发亟待研究。近年来,大量的研究证实多肽具有免疫佐剂活性,如胸腺素 T α 1、囊素 BS、囊素样肽 BLP 等^[13,17-18]。然而多肽免疫佐剂在临床应用中也存在一些问题:生物活性肽大多是小分子蛋白,分子量小,在生物体内半衰期很短,导致对机体产生的免疫期较短;另外,虽然临床上一些多肽联合使用时效果很好,但多肽的生产成本极高,极大地制约了多肽免疫佐剂在临床上的应用。通过基因工程技术将两种多肽连接制备重组融合肽既可以提高多肽的半衰期,延长免疫期,同时融合肽理论上具有两种多肽的活性,这样可降低多肽免疫佐剂的生产成本。

胸腺五肽 TP5 具有与胸腺生成素 II 相似的生物学活性,能够诱导 T 细胞分化、增殖和成熟,促进 T 淋巴细胞亚群发育并活化,双向调节失衡的免疫系统^[2],而且还具有抗肿瘤和抗氧化功能^[19],因而在临床上得以广泛应用。法氏囊活性五肽 BP5 是从鸡法氏囊中分离获得的一种新的免疫活性肽,能够调节体液免疫和细胞免疫反应,具有免疫佐剂的潜能。由于 TP5 和 BP5 均可增强机体的免疫应答,表现出免疫佐剂活性,然而二者融合而形成的重组融合肽 TBP5 是否也具有免疫增强作用呢?针对这一设想,本研究根据大肠杆菌偏嗜密码子在 TP5 和 BP5 之间设计一段 Linker (G-G-G-G-S) 通过 SOE-PCR 方法合成了重组融合肽 TP5-BP5 (TBP5) 基因,并将其克隆至 pET32a 表达载体中,成功构建出重组质粒 pET32a-TBP5,对诱导表达产物进行 SDS-PAGE 发现,重组融合肽 TBP5 表达产物分子量大小约为 27.0 kDa,与预期的分子量大小一致,表明重组融合肽 TBP5 基因在 *E. coli* BL21 中获得表达。

为检测原核表达的重组融合肽 TBP5 是否具有体外免疫活性,本试验以不同浓度 (0.2-6.4 μ g/mL) 的 TBP5 刺激小鼠胸腺和脾脏淋巴细胞,试验结果显示,TBP5 能够显著促进小鼠胸腺 T 淋巴细胞和脾脏 B 淋巴细胞的增殖,表明 TBP5 具有较强的体外免疫活性。为进一步探讨重组融合肽 TBP5 的免疫佐剂特性,以 TBP5 联合 H9N2 型 AIV 灭活疫苗免疫小鼠,检测免疫后小鼠血清中 HI 抗体、HA 抗体水平及细胞因子 IL-4、IFN- γ 的分泌情况,结果显示,疫苗+TBP5 组免疫后小鼠的 HI 抗体效价和 HA 抗体分泌水平显著高于疫苗+BP5 组 ($P<0.05$),疫苗+TBP5 组免疫后小鼠体内细胞因子 IL-4 和 IFN- γ 的分泌水平显著高于疫苗+TP5 组,表明重组融合肽 TBP5 既可提高 H9N2 型 AIV 疫苗免疫后机体的体液免疫水平,又可提高机体的细胞免疫水平。

为进一步分析重组融合肽 TBP5 对动物攻毒后的免疫保护性作用,本研究在二免 2 周后对小鼠进行动物免疫保护试验。由于本试验选用的 H9N2 亚型禽流感病毒毒株 A/chicken/Jiangsu/NJ07/05 (H9N2) 不能使小鼠出现明显的流感临床症状和导致死亡,而且,我们之前的研究发现以 2.5×10^6 TCID₅₀ 的剂量感染小鼠后该病毒主要分布在其肝脏、脾脏和肺脏,其中肺脏中的带毒量最多。因此,为有效评价 TBP5 诱导的免疫保护作用,本研究采用荧光定量 PCR 方法检测不同免疫组小鼠肺脏中病毒拷贝数来分析 TBP5 对小鼠的免疫保护效果^[20-21],结果显示攻毒后 3 d TBP5 明显有助于小鼠肺脏中病毒的清除,攻毒后 7 d 时疫苗+TBP5 组几乎检测不到小鼠肺脏中的病毒粒子。表明重组融合肽 TBP5 能够有效抑制 H9N2 型 AIV 在小鼠肺脏中的复

制,促进小鼠肺脏中病毒的清除,结果进一步提示,TBP5可能通过介导细胞和体液免疫反应发挥免疫保护作用。

总之,本研究成功构建了重组融合肽TP5-BP5(TBP5)基因工程菌株,并在大肠杆菌中获得了表达;重组的融合肽TBP5能显著促进小鼠胸腺T淋巴细胞和脾脏B淋巴细胞的增殖,有效提高机体体液和细胞免疫应答,动物免疫保护试验结果显示TBP5有助于小鼠肺脏中H9N2型AIV病毒的清除。本研究提示,重组融合肽TBP5具有良好的免疫佐剂潜能,为进一步开发新型疫苗佐剂奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Ren X, Liao HM, Yang HM, et al. Review on thymic hormones and domestic production status and existing problems of thymopolypeptides preparations. *Chin J Biochem Pharm*, 2012, 33(2): 204–206 (in Chinese).
任雪, 廖海明, 杨洪森, 等. 胸腺激素概况及我国胸腺素制剂的生产现状及存在问题. *中国生化药物杂志*, 2012, 33(2): 204–206.
- [2] Gao DM. Expression, purification and activities of T α 1-TP5 fusion peptide[D]. Ji'nan: Shandong University, 2009 (in Chinese).
高德民. 胸腺融合肽 T α 1-TP5 的表达、纯化和活性研究[D]. 济南: 山东大学, 2009.
- [3] Li J. Preparation, *in vitro* and *in vitro* immunomodulatory and synergistic anti-tumor activities of thymosin α 1-thymopentin fusion peptide and its binding character to TLR2[D]. Ji'nan: Shandong University, 2013 (in Chinese).
李娟. 胸腺素 α 1-胸腺五肽融合肽的制备、体内外免疫调节与辅助抗肿瘤作用及与 TLR2 结合性质研究[D]. 济南: 山东大学, 2013.
- [4] Zhang HL, Qian JF, Hao QZ, et al. The research advance on Bursin. *J Agri Univ Hebei*, 2002, 25(Z1): 243–245 (in Chinese).
张焕铃, 钱建飞, 郝勤宗, 等. 法氏囊活性肽的研究进展. *河北农业大学学报*, 2002, 25(Z1): 243–245.
- [5] Audhya T, Kroon D, Heavner G, et al. Tripeptide structure of bursin, a selective B-cell-differentiating hormone of the bursa of Fabricius. *Science*, 1986, 231(4741): 997–999.
- [6] Feng XL, Su XD, Wang FQ, et al. Isolation and potential immunological characterization of TPSGLVY, a novel bursal septpeptide isolated from the bursa of Fabricius. *Peptides*, 2010, 31(8): 1562–1568.
- [7] Feng XL, Liu QT, Cao RB, et al. Identification and characterization of a novel immunomodulatory bursal-derived pentapeptide-II (BPP-II). *J Biol Chem*, 2012, 287(6): 3798–3807.
- [8] Feng XL, Liu QT, Cao RB, et al. A bursal pentapeptide (BPP-I), a novel bursal-derived peptide, exhibits antiproliferation of tumor cell and immunomodulator activity. *Amino Acids*, 2012, 42(6): 2215–2222.
- [9] Liu XD, Feng XL, Zhou B, et al. Isolation, modulatory functions on murine B cell development and antigen-specific immune responses of BP11, a novel peptide from the chicken bursa of Fabricius. *Peptides*, 2012, 35(1): 107–113.
- [10] Li DY, Geng ZR, Zhu HF, et al. Immunomodulatory activities of a new pentapeptide (Bursopentin) from the chicken bursa of Fabricius. *Amino Acids*, 2011, 40(2): 505–515.
- [11] Li DY, Xue MY, Wang C, et al. Bursopentine as a novel immunoadjuvant enhances both humoral and cell-mediated immune responses to inactivated H9N2 avian influenza virus in chickens. *Clin Vaccine Immunol*, 2011, 18(9): 1497–1502.
- [12] Haan L, Verweij WR, Holtrop M, et al. Nasal or intramuscular immunization of mice with influenza subunit antigen and the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile toxin induces IgA- or IgG-mediated protective mucosal immunity. *Vaccine*, 2001, 19(20/22): 2898–2907.

- [13] Wang C, Wen WY, Su CX, et al. Bursin as an adjuvant is a potent enhancer of immune response in mice immunized with the JEV subunit vaccine. *Vet Immunol Immunopathol*, 2008, 122(3/4): 265–274.
- [14] Zheng QS, Liu HL, Zhang XY, et al. Prokaryotic expression and the establishment of a putative indirect ELISA assay for the HA gene of avian influenza virus H9N2 subtype. *Virologica Sinica*, 2005, 20(3): 293–297 (in Chinese).
郑其升, 刘华雷, 张晓勇, 等. H9N2 亚型 AIV HA 基因的原核表达及间接 ELISA 方法的建立. *中国病毒学*, 2005, 20(3): 293–297.
- [15] Tan W, Xie LJ, Xie ZX. Research updates of vaccines against avian influenza virus. *J South Agri*, 2014, 45(8): 1492–1497 (in Chinese).
谭伟, 谢丽基, 谢芝勋. 禽流感病毒疫苗研究进展. *南方农业学报*, 2014, 45(8): 1492–1497.
- [16] Zhou Y, Geng XC, Wang JF, et al. Recent development in vaccine adjuvant research. *Chin J New Drugs*, 2013, 22(1): 34–42 (in Chinese).
周洋, 耿兴超, 汪巨峰, 等. 疫苗佐剂最新研究进展. *中国新药杂志*, 2013, 22(1): 34–42.
- [17] Li WY, Lu HM, Guo Q, et al. Effects of thymosin alpha1 on immune effector molecules of mouse. *J Sichuan Univ: Med Ed*, 2014, 45(3): 400–404 (in Chinese).
李炜晔, 陆慧敏, 郭强, 等. 胸腺肽 $\alpha 1$ 对小鼠机体免疫系统的影响. *四川大学学报: 医学版*, 2014, 45(3): 400–404.
- [18] Cai MH, Zhu F, Wu HC, et al. A new recombinant hybrid polypeptide and its immunologic adjuvant activity for inactivated infectious bursal disease vaccine. *Biotechnol Lett*, 2014, 36(7): 1431–1437.
- [19] Chang H. The antitumor and antioxidant effects of thymopentin (TP5) [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2007 (in Chinese).
常惠. 胸腺五肽抗肿瘤和抗氧化作用的研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2007.
- [20] Wang C. Studies on immune regulation mechanism of Bursin-like peptide in mammals[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2008 (in Chinese).
王臣. 囊素样肽在哺乳动物中免疫调节机制研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2008.
- [21] Wang C, Li XK, Wu TC, et al. Bursin-like peptide (BLP) enhances H9N2 influenza vaccine induced humoral and cell mediated immune responses. *Cell Immunol*, 2014, 292(1/2): 57–64.

(本文责编 陈宏宇)