

HBV 包膜-核心蛋白融合基因 DNA 疫苗 诱导小鼠持久的细胞免疫应答*

赵平¹⁾ 姜春鹏²⁾ 赵兰娟¹⁾ 温新宇¹⁾ 戚中田^{1)**}

(¹⁾第二军医大学微生物学教研室, 上海 200433; ²⁾东北农业大学生物工程系, 哈尔滨 150030)

摘要 构建编码 HBV 包膜-核心蛋白融合基因的 DNA 疫苗 pSC、pSSIS2C 和编码 HBV 包膜蛋白或核心蛋白基因的 DNA 疫苗 pHBs、pHBc, 分别肌肉注射免疫 BALB/c 小鼠, 检测小鼠的血清抗体、T 细胞增殖和细胞毒性 T 淋巴细胞反应, 比较融合基因 DNA 疫苗与单基因 DNA 疫苗诱导免疫应答的强度, 发现融合基因 DNA 疫苗诱导抗体的效率明显不及单基因 DNA 疫苗, 但其能诱导更强、更持久的细胞免疫应答, 表明 HBV 包膜-核心蛋白融合基因 DNA 疫苗对于治疗慢性乙型肝炎可能比单基因 DNA 疫苗更为有效。

关键词 乙型肝炎病毒, 融合基因, DNA 疫苗, 免疫应答

学科分类号 R512.620.5

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 慢性感染是当前非常严峻的社会卫生问题, 其主要原因为感染者对 HBV 抗原产生的免疫应答, 尤其是细胞免疫应答的强度不足^[1,2]。因此, 增强慢性乙型肝炎患者体内 HBV 抗原特异性 T 淋巴细胞应答对于清除病毒至关重要。对慢性乙肝患者和 HBV 转基因小鼠的研究均表明接种疫苗可促进 HBV 抗原特异性 T 细胞免疫应答, 提示该法可望用于治疗乙型肝炎^[3,4]。

DNA 疫苗是编码病原微生物抗原的真核细胞重组表达质粒, 以肌肉注射等途径接种于体内后能在细胞内表达抗原, 进而诱导免疫应答。编码 HBV 包膜大、中、主要蛋白或核心蛋白的 DNA 疫苗均能在小鼠等动物体内诱导细胞免疫应答, 是治疗慢性 HBV 感染的一个新方向^[5]。为了进一步提高 HBV DNA 疫苗的免疫效率, 使之能诱导更广泛的抗 HBV 细胞免疫应答, 我们构建了几种不同结构的编码 HBV 包膜蛋白和核心蛋白融合基因的 DNA 疫苗, 通过对小鼠的研究发现其诱导细胞免疫应答的效率明显高于编码包膜蛋白或核心蛋白基因的 DNA 疫苗, 提示这种融合基因的 DNA 疫苗对于治疗 HBV 感染更具应用价值。

1 材料和方法

1.1 材料

编码 HBV adr 亚型全基因组的质粒 pADR-1 由中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所李载平教授馈赠; 增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 真核

表达质粒载体 pEGFPN1 为 Clontech 公司产品; pMD18-T 载体为 TaKaRa 公司产品; 真核表达质粒载体 pcDNA3.1(+) 为 Invitrogen 公司产品; 非放射性细胞增殖检测试剂和细胞杀伤检测试剂为 Promega 公司产品; BALB/c 小鼠购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司; 大肠杆菌重组 HBV 核心抗原 (HBcAg) 由军事医学科学院刘荷中博士馈赠; HBV 感染者血浆来源的 HBV 表面抗原 (HBsAg)、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗小鼠 IgG1 和 IgG2a 购自卫生部上海生物制品研究所; 抗-HBsAg、抗-HBcAg ELISA 试剂为华美生物工程公司产品; HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG、G418、丝裂霉素 C 为 Sigma 公司产品。

1.2 HBV 抗原真核重组表达质粒的构建

1.2.1 HBsAg DNA 疫苗的构建: 根据 HBV adr 亚型基因组的核苷酸序列设计引物, 上游引物: gctagccaccatggagaaacacaac, 下游引物: gaattctcaggatccaatgtatacccaagac。在上游引物中引入 *Nhe*I 酶切位点、下游引物中引入 *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切位点, *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切位点之间为终止密码 tga。以质粒 pADR-1 为模板, PCR 扩增 HBsAg 基因, PCR 产物与 pMD18-T 载体连接, 再以 *Nhe*I、*Eco*RI 酶切出 HBsAg 基因, 插入质粒载体 pcDNA3.1(+) 的 *Nhe*I、*Eco*RI 酶切位点之

* 国家自然科学基金资助项目 (39980038) 和上海科技发展基金资助项目 (004319206)。

** 通讯联系人。

Tel: 021-25070265, E-mail: qizt@smmu.edu.cn

收稿日期: 2001-10-26, 接受日期: 2001-12-24

间, 得到重组表达质粒 pHBs.

1.2.2 HBsAg-EGFP 融合蛋白表达质粒的构建: 合成引物, 上游引物: ggaagcttccaccatggagaacacacac, 下游引物: gcggatccagaatgtataccacccgac, 其中不含终止密码子. 上、下游引物中分别引入 *Hind* III、*Bam* HI 酶切位点. PCR 扩增 HBsAg 基因, 产物以 *Hind* III、*Bam* HI 酶切后插入真核表达质粒 pEGFPN1 的 *Hind* III、*Bam* HI 酶切位点之间, 得到 HBsAg-EGFP 融合蛋白表达质粒 pHBs-EGFP.

1.2.3 HBcAg DNA 疫苗的构建: 合成引物, 上游引物: ggatccaccatggacattgaccgta, 下游引物: gaattctaacattgagattcccga. 上、下游引物中分别引入 *Bam* HI、*Eco* RI 酶切位点. PCR 扩增 HBcAg 基因, 产物与 pMD18-T 载体连接, 再以 *Bam* HI、*Eco* RI 酶切出 HBcAg 基因并插入 pcDNA3.1 (+) 的 *Bam* HI、*Eco* RI 酶切位点之间, 得到重组表达质粒 pHBc.

1.2.4 HBcAg-EGFP 融合蛋白表达质粒的构建: 合成引物, 上游引物: ggaagcttgccaccatggacattgaccg; 下游引物: ccggatccagacattgagattcccga, 其中不含终止密码子. 上、下游引物中分别加入 *Hind* III、*Bam* HI 酶切位点. PCR 扩增 HBcAg 基因, 产物以 *Hind* III、*Bam* HI 酶切之后插入真核表达质粒 pEGFPN1 的 *Hind* III、*Bam* HI 酶切位点之间, 得到 HBcAg-EGFP 融合蛋白表达质粒 pHBc-EGFP.

1.2.5 HBsAg-HBcAg 融合蛋白 DNA 疫苗的构建: 以 *Bam* HI、*Eco* RI 酶切 pHBs 使之线性化, pHBc 以 *Bam* HI、*Eco* RI 酶切 HBc 基因, 再将 HBc 基因与线性化的 pHBs 连接, 得到 HBsAg-HBcAg 融合蛋白 DNA 疫苗 pSC.

1.2.6 S-preS1-preS2-HBcAg 融合蛋白 DNA 疫苗的构建: 合成 preS1preS2 基因引物, 上游引物: ggatccatgggaggttggtcttc, 下游引物: ggatccgttcggtgcagggtcc, 上、下游引物中均引入 *Bam* HI 酶切位点. PCR 扩增 preS1preS2 基因, 产物以 *Bam* HI 酶切, 再与经 *Bam* HI 酶切线性化并用碱性磷酸酶去磷酸化处理的 pSC 连接, 因 preS2 基因内有一个 *Xho* I 酶切位点, 所以重组质粒可用 *Xho* I 酶切鉴定 preS1preS2 基因的插入方向, 得到 S-preS1-preS2-HBcAg 融合基因 DNA 疫苗 pSS1S2C.

1.2.7 上述所有 PCR 扩增的 HBV 基因均于上海 Sangon 生物工程公司进行 DNA 测序.

1.3 重组质粒转染 COS7 细胞及其表达产物的检测

1.3.1 质粒转染 COS7 细胞: 提取质粒 pHBs、pHBc、pSC、pSS1S2C 和 pcDNA3.1, 用 Lipofectamine 分别转染 COS 7 细胞, 48 h 后检测 HBV 抗原的表达.

1.3.2 ELISA 检测 COS7 细胞培养上清中的 HBsAg: 用 HBsAg ELISA 试剂检测 pHBs、pSC、pSS1S2C 和 pcDNA3.1 转染的 COS7 细胞培养上清, 每检测孔加上清 50 μ l 和 HRP 标记的山羊抗人 IgG 工作液 50 μ l, 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 四甲基联苯胺 (TMB) /H₂O₂ 显色 10 min, 2 mol/L 硫酸终止反应后测 A₄₅₀.

1.3.3 免疫组化检测重组质粒的表达产物: 将 pHBs、pHBc、pSC、pSS1S2C 和 pcDNA3.1 转染的 COS 7 细胞种植于左旋多聚赖氨酸处理的玻片, 分别以 1:25 稀释的抗-HBs IgG 阳性人血清、1:50 稀释的抗-HBc IgG 阳性人血清为一抗, 碱性磷酸酶标记的山羊抗人 IgG 为二抗, 用 5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸/氯蓝四唑 (BCIP/NBT) 底物呈色.

1.3.4 稳定表达 HBV 抗原与 EGFP 融合蛋白的 SP2/0 细胞株的建立: 用 Lipofectamine 分别将 pHBs-EGFP、pHBc-EGFP 和 pEGFPN1 转染 SP2/0 细胞, 3 d 后改用含 700 mg/L G418 的完全 DMEM 培养, G418 抗性细胞克隆形成以后, 转移 3~5 个 EGFP 阳性细胞克隆扩大培养, G418 浓度维持为 300 mg/L, 细胞汇合成片后, 反复冻融以裂解细胞, 裂解液分别用 HBsAg ELISA 试剂和 HBcAg ELISA 试剂检测 HBsAg 和 HBcAg.

1.4 DNA 免疫接种

碱裂解法大量制备质粒 pHBs、pHBc、pSC、pSS1S2C 及 pcDNA3.1, 溶解于 0.01 mol/L PBS. 双侧胫骨前肌注射接种雌性 6 周龄 BALB/c 小鼠, 剂量 100 μ g/次, 三周一次, 共注射两次. 每种质粒分别接种 12 只小鼠, 6 只用于检测体液免疫应答 (体液免疫组), 另 6 只用于检测细胞免疫应答 (细胞免疫组).

1.5 体液免疫应答的检测

1.5.1 ELISA 检测小鼠血清抗-HBs IgG 和抗-HBc IgG: 分别在末次免疫后第 1、5、9、13、23、33、43 周采集各体液免疫组小鼠血清, 从 1:25 开始连续倍比稀释, 检测抗体为 1:10 000 稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG, 以 TMB/H₂O₂ 显色. 各实验组小鼠血清 A₄₅₀/A₆₃₀ 大于 pcDNA3.1 免疫组血清的 2.1 倍确定为抗体阳性.

1.5.2 ELISA 检测小鼠血清抗-HBs 和-HBc IgG2a 和 IgG1: 末次免疫后一周的小鼠血清 1:100 稀释, 二抗分别为 1:200 稀释的 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG2a 和 IgG1, 其余方法同检测抗体总 IgG, 计算 IgG2a/IgG1 比值。

1.6 细胞免疫应答的检测

1.6.1 小鼠 T 细胞增殖反应的检测: 细胞免疫组小鼠于末次免疫后第 22 周、45 周各处死 3 只, 无菌分离小鼠脾脏, 低渗裂解红细胞后得到的单细胞悬浮于含 10% FBS 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 2-ME 的 RPMI1640, 调整细胞浓度至 5×10^5 个/ml, 每孔 100 μl 接种至 96 孔细胞培养板, 每孔加入人血浆来源的 HBsAg 或大肠杆菌重组 HBcAg, 补充 RPMI1640 至 200 μl , 抗原终浓度为 10 mg/L, 对照孔不加抗原, 实验孔和对照孔均设 3 孔。培养板于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养 72 h 后, 每孔加 MTS 20 μl , 继续培养 1 h, 酶联仪上测 A_{590} 值, 计算刺激指数 (SI), $SI = A_{590}$ (抗原刺激孔平均) / A_{590} (对照孔平均)。

1.6.2 小鼠细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 效应的检测: 稳定表达 EGFP、HBsAg-EGFP 融合蛋白和 HBcAg-EGFP 融合蛋白的 SP2/0 细胞培养液中加入丝裂霉素 C 至终浓度 25 mg/L, 培养 2 h, 2 000 r/min 离心 5 min, 培养 2 h, 离心, 细胞沉淀以 RPMI1640 悬浮, 离心, 再以 RPMI1640 悬浮, 调整细胞浓度至 10^7 个/ml, 作为刺激细胞。制备免疫小鼠的脾细胞悬液, 调整浓度至 5×10^7 个/ml, 脾细胞和刺激细胞各 1 ml 加入 60 mm 细胞培养皿, 补加 RPMI1640 2 ml, 培养 24 h 后加重重组人 IL-2 至终浓度 20 U/ml, 继续培养 4 d, RPMI1640 洗涤以去除悬浮细胞, 贴壁细胞转移至试管, 2 000 r/min 离心 5 min。细胞沉淀以 RPMI1640 悬浮, 计数, 调整浓度至 10^7 个/ml, 作为效应细胞。以乳酸脱氢酶释放法检测细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 反应, 效应细胞加入 96 孔细胞培养板, 每孔 100 μl , 再加入稳定表达 HBV 抗原-EGFP 融合蛋白或 EGFP 的 SP2/0 细胞为靶细胞, 效应细胞/靶细胞数目之比为 50:1, 补充 RPMI1640 至 200 μl , 为实验组 (E); 另设效应细胞自然释放组 (ES)、靶细胞自然释放组 (TS) 和靶细胞最大释放组 (TM), 每组设 3 孔, 培养 4 h, 其中靶细胞最大释放组在结束培养前 45 min 加裂解液 20 μl 。各组的每孔取 50 μl 转移至另一 96 孔酶标板, 每孔加底物液 50 μl , 室温避光放置

30 min 后, 每孔加终止液 50 μl , 在酶联仪上测 A_{490} 值, 计算杀伤率, 杀伤率 = $(A_E - A_{ES} - A_{TS}) / (A_{TM} - A_{TS}) \times 100\%$ 。

1.7 统计学分析

小鼠血清抗体的 IgG2a/IgG1 值、脾细胞增殖的刺激指数 (SI)、CTL 杀伤率先做方差齐性检验, 符合条件则做方差分析, $P = 0.05$ 。

2 结 果

2.1 HBV 抗原重组表达质粒的结构

DNA 测序证明所有扩增的 HBV 抗原基因均与其原始序列一致。

构建的 6 种重组质粒的转录调控区结构如图 1。(P 为 CMV 启动子和增强子序列, BGH pA 为牛生长激素转录终止的 polyA 序列, SV pA 为 SV40 转录终止的 polyA 序列。)

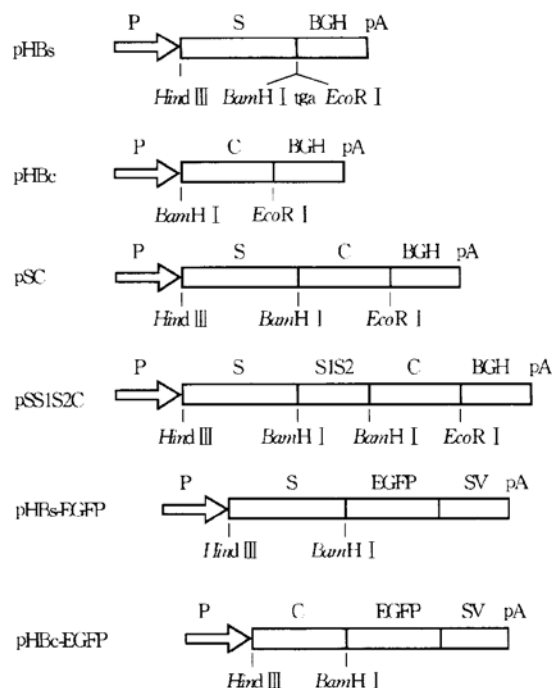


Fig 1 The structure of recombinant HBV antigen expression plasmids

2.2 重组质粒的细胞表达产物检测

2.2.1 免疫组化检测结果表明: 用抗-HBs 阳性人血清能检测到 pHBs、pSC 和 pSS1S2C 转染 COS7 细胞内的蓝紫色阳性信号 (图 2), 用抗-HBc 阳性人血清能检测到 pHBc、pSC 和 pSS1S2C 转染 COS7 细胞内的蓝紫色阳性信号 (结果未示)。

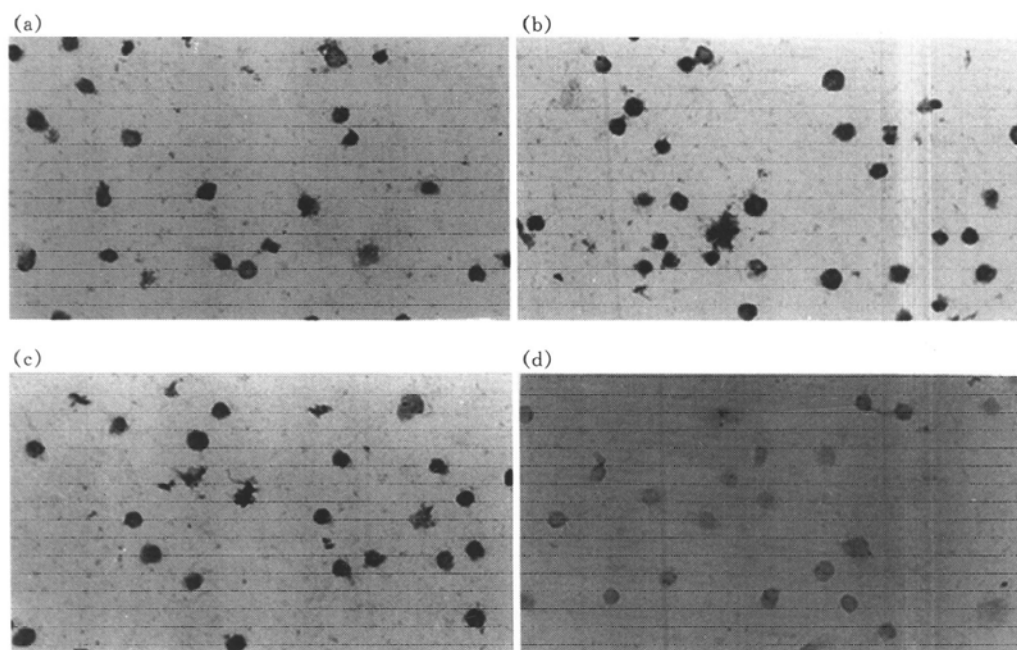


Fig. 2 Immunohistochemical staining of HBsAg in COS7 cells transfected with recombinant plasmid (20 ×)

(a) transfected with pHBs; (b) transfected with pSC; (c) transfected with pSS1S2C; (d) transfected with mock plasmid pcDNA3.1.

2.2.2 重组质粒转染 COS7 细胞培养上清的 ELISA 检测结果表明: 仅 pHBs 表达的 HBsAg 为分泌型蛋白, pSC、pSS1S2C 表达的融合抗原为胞浆蛋白 (表 1)。

Table 1 HBsAg detected by ELISA in culture medium of COS7 cell transfected with recombinant plasmid

plasmid	pcDNA3.1	pHBs	pSC	pSS1S2C
A_{450}	0.037	0.396	0.049	0.042

2.2.3 筛选得到的 G418 抗性 SP2/0 细胞经克隆后, 在荧光显微镜下观察, 所有细胞胞浆内均有绿色荧光分布, ELISA 能检测到细胞裂解液中的 HBV 抗原 (表 2 和表 3)。

Table 2 HBsAg detected by ELISA in cell lysate of SP2/0 transfected with recombinant plasmid

plasmid	pEGFPN1	pHBs-EGFP	pHBc-EGFP
A_{450}	0.057	0.411	0.063

Table 3 HBcAg detected by ELISA in cell lysate of SP2/0 transfected with recombinant plasmid

plasmid	pEGFPN1	pHBs-EGFP	pHBc-EGFP
A_{450}	0.063	0.058	0.503

2.3 小鼠体液免疫应答的检测

2.3.1 在末次免疫后第 1、5、9、13、23、33、43 周采集小鼠血清检测抗-HBs IgG, pHBs 免疫组阳性率最高达 83.3% (5/6, 图 3), 最高抗体滴度 1:1600, 而 pSC 及 pSS1S2C 免疫组阳性率最高为 50% (3/6), 最高抗体滴度为 1:400. 抗体水平的消长情况见图 4。

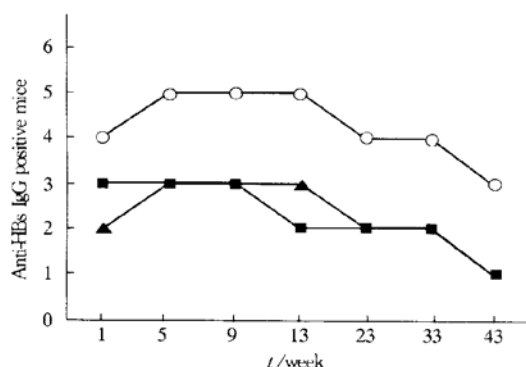


Fig. 3 Anti-HBs response in mice induced by DNA vaccines

○—○: pHBs immunized group; ■—■: pSC immunized group;
▲—▲: pSS1S2C immunized group.

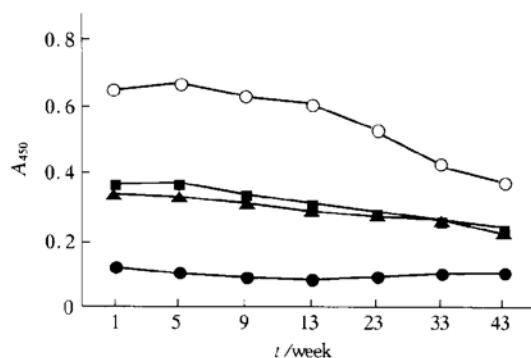


Fig. 4 Anti-HBs IgG induced by DNA vaccines in mice

○—○: pHBs group; ■—■: pSC group; ▲—▲: pSS1S2C group; ●—●: pcDNA3.1 group. 1: 100 dilution.

2.3.2 检测小鼠血清抗-HBc IgG, pHBc 免疫组阳性率最高均达到 100% (6/6)、pSC 及 pSS1S2C 免疫组阳性率最高均为 66.7% (4/6, 图 5), 最高抗体滴度分别为 1:3200、1:800 和 1:800。抗体水平消长情况见图 6。

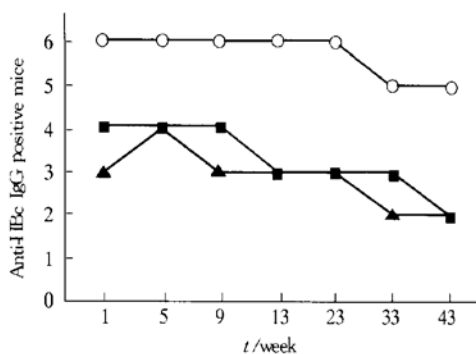


Fig. 5 The number of anti-HBc positive mice induced by DNA vaccines

○—○: pHBc immunized group; ■—■: pSC immunized group; ▲—▲: pSS1S2C immunized group.

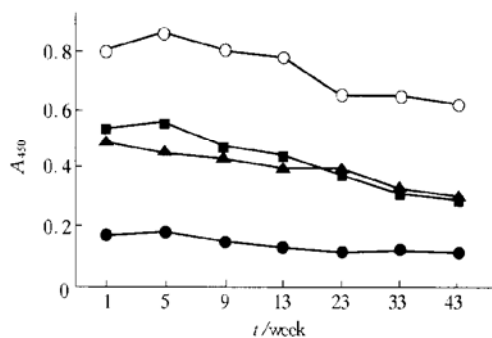


Fig. 6 Anti-HBc IgG induced by DNA vaccines in mice

○—○: pHBc group; ■—■: pSC group; ▲—▲: pSS1S2C group; ●—●: pcDNA3.1 group. 1: 200 dilution.

2.3.3 各组小鼠血清抗-HBs、抗-HBc 的 IgG2a/IgG1 比值见表 4 和表 5。可见融合基因 DNA 疫苗 pSC 及 pSS1S2C 所诱生 IgG 抗体的 IgG2a/IgG1 比值均明显高于单基因 DNA 疫苗 ($P < 0.05$), 但融合基因组之间无显著性差异 ($P > 0.1$), 提示融合基因的 DNA 疫苗可诱导更强的 Th1 型免疫应答。

Table 4 Ratios of anti-HBs IgG2a/IgG1 in mice immunized with different DNA vaccines

group	pHBs	pSC	pSS1S2C
	1.38 ± 0.10	1.60 ± 0.09	1.61 ± 0.13

Table 5 Ratios of anti-HBc IgG2a/IgG1 in mice immunized with different DNA vaccines

group	pHBc	pSC	pSS1S2C
	1.31 ± 0.13	1.66 ± 0.12	1.60 ± 0.14

2.4 小鼠细胞免疫应答的检测

2.4.1 在第 22 周、45 周检测小鼠 T 细胞增殖反应, 由表 6 和表 7 可见融合基因 DNA 疫苗免疫组小鼠的脾细胞刺激指数 SI 值明显高于单基因 DNA 疫苗免疫组, 表明融合基因 DNA 疫苗免疫组小鼠的 T 细胞增殖反应明显强于单基因 DNA 疫苗免疫组 ($P < 0.05$), 但融合基因 DNA 疫苗免疫组之间无显著性差异 ($P > 0.5$)。

Table 6 The T lymphocyte proliferative response of immunized mice stimulated by HBsAg

group	pHBs	pSC	pSS1S2C
SI (week 22)	1.50 ± 0.12	1.90 ± 0.16	1.88 ± 0.12
SI (week 45)	1.26 ± 0.11	1.59 ± 0.15	1.54 ± 0.13

Table 7 The T lymphocyte proliferative response of immunized mice stimulated by HBcAg

group	pHBc	pSC	pSS1S2C
SI (week 22)	1.66 ± 0.12	1.95 ± 0.13	1.91 ± 0.13
SI (week 45)	1.30 ± 0.13	1.60 ± 0.12	1.64 ± 0.13

2.4.2 在第 22 周、45 周检测小鼠脾细胞对表达 HBsAg 或 HBcAg 的 SP2/0 细胞的杀伤反应, 表 8 和表 9 表明融合基因 DNA 疫苗免疫小鼠的 CTL 杀伤率明显高于单基因 DNA 疫苗, 但融合基因 DNA 疫苗免疫组之间无显著性差异 ($P > 0.5$)。

Table 8 HBsAg specific CTL response of mice immunized by DNA vaccine

group	pHBs	pSC	pSS1S2C	mock control
lysis percentage ¹⁾	53.97% ± 5.85%	71.55% ± 9.28%	72.63% ± 7.92%	4.10% ± 1.06%
<i>P</i> *		< 0.05	< 0.01	< 0.01
lysis percentage ²⁾	33.73% ± 5.58%	54.78% ± 7.34%	58.20% ± 11.4%	2.98% ± 0.93%
<i>P</i> *		< 0.01	< 0.01	< 0.01

* compared with single gene DNA vaccine pHBs immunized group. *n* = 3, ¹⁾ week 22; ²⁾ week 45.

Table 9 HBcAg specific CTL response of mice immunized by DNA vaccine

group	pHBc	pSC	pSS1S2C	mock control
lysis percentage ¹⁾	56.95% ± 6.63%	75.95% ± 5.92%	75.68% ± 8.33%	4.48% ± 1.09%
<i>P</i> *		< 0.01	< 0.05	< 0.01
lysis percentage ²⁾	32.98% ± 5.36%	53.98% ± 8.42%	57.13% ± 8.42%	3.10% ± 0.83%
<i>P</i> *		< 0.01	< 0.01	< 0.01

* compared with single gene DNA vaccine pHBc immunized group. *n* = 3, ¹⁾ week 22; ²⁾ week 45.

3 讨 论

HBV 包膜蛋白、核心蛋白特异性 CTL 和 Th 免疫应答对于急性 HBV 感染者清除病毒起关键作用, 以 HBV 包膜蛋白、核心蛋白刺激急性自限性 HBV 感染者的外周血淋巴细胞, 表现出强的杀伤或增殖活性^[6], 在 DNA 疫苗的设计中将这两个抗原联合, 有可能激活针对更广泛 HBV 抗原表位的细胞免疫应答, 为此, 我们构建了两种编码融合抗原的 DNA 疫苗 pSC 和 pSS1S2C. 在 pSS1S2C 中, 之所以将 preS1、preS2 抗原基因置于表面抗原基因与核心抗原基因之间, 是因为融合蛋白借助于 HBsAg 的信号肽进入内质网, 有助于细胞免疫应答的诱导, 而且很多研究结果已经证明, 编码 HBV 包膜大蛋白天然序列的 DNA 疫苗, 诱导细胞和体液免疫应答的效率明显不及编码分泌型 HBsAg 的 DNA 疫苗^[7].

ELISA 检测质粒转染细胞的培养上清表明除 pHBs 外, 其他质粒表达的 HBV 核心蛋白或包膜-核心融合蛋白均为胞浆蛋白. DNA 疫苗诱导抗体依赖于宿主细胞表达的抗原被抗原提呈细胞 (APC) 的摄取、加工和被初始型 B 细胞的识别、结合^[8]. 因此, 抗原自身的免疫原性和抗原能否被细胞主动分泌均影响抗体的产生, 但是即使抗原不能被主动分泌, 由于注射局部的非特异性炎症或 CTL 效应也可导致表达抗原的细胞发生损伤, 致使抗原被动释放, 从而引发体液免疫应答^[9, 10]. 同其他一些报道类似, 编码核心蛋白的 pHBc 诱生抗体的效率超过编码包膜蛋白的 pHBs, 推测其原因可能与核心蛋白能形成颗粒结构, 是与体液免疫的强免疫原有关^[11]. 表达胞浆蛋白的 pSC 和

pSS1S2C 在小鼠诱生抗体的效率明显不及 pHBs 和 pHBc, 是否因融合蛋白与内质网的结合影响抗原从受损伤的细胞内释放, 或者融合蛋白的折叠对于抗原中的 B 细胞表位起了空间位阻作用, 从而致使一些表位不能被 B 细胞识别及结合, 仍有待阐明.

与诱导抗体免疫的效果相反, 融合抗原 DNA 疫苗 pSC 和 pSS1S2C 诱导的细胞免疫应答明显强于编码单抗原的 DNA 疫苗 pHBs 和 pHBc, 在未检测到抗体的小鼠也能检测到细胞免疫应答, 表明细胞免疫应答的诱导并不必然伴随体液免疫应答. 在 HBV 表面抗原和核心抗原中均有多个 Th 和 CTL 抗原表位. Th 应答主要依赖于抗原被 APC 摄取、加工以及与 MHC II 类分子共同提呈到有相应受体 CD4⁺ T 细胞, 刺激其活化和分泌 IL-2 等细胞因子, 这些细胞因子再以自分泌方式进一步促进其增殖和增强其生物活性^[8]. 因此, 在不影响抗原加工、提呈的前提下, 在抗原中增加 Th 表位有利于多克隆抗原特异性静息性 CD4⁺ T 细胞的激活. DNA 疫苗诱导 CTL 的主要途径是 DNA 疫苗直接在体内转染专职 APC, DNA 疫苗在专职 APC 内表达的抗原经过蛋白酶体的加工, 形成的表位肽与 MHC I 分子结合, 再共同提呈到 CTL 前体细胞^[12], 后者在 Th 细胞分泌的细胞因子的辅助刺激下, 才能更有效地分裂、增殖和发挥细胞毒活性. 由于 Th 免疫应答对于 CTL 应答的协同促进作用, 所以 HBV 融合抗原 DNA 疫苗诱导的 CTL 应答与单基因 DNA 疫苗相比, 明显有所增强. 与 DNA 疫苗诱导的 CTL 应答强度一致, 融合抗原 DNA 疫苗诱导抗体的 IgG2a/IgG1 比值也明显高于单抗原 DNA 疫苗, 可能是由于 Th 细胞分泌的高

水平 IL-2、IFN- γ 等 Th1 型细胞因子作用于 B 细胞的结果。

本实验构建了 EGFP-HBV 抗原融合基因表达质粒, 以建立稳定表达 HBV 抗原的 SP2/0 细胞模型, 此不仅在筛选过程中可直接于荧光显微镜下挑选阳性细胞克隆, 而且在细胞扩增过程中能方便地观察抗原表达情况, 确保用高表达率的靶细胞检测 CTL 应答。

本研究构建 HBV 包膜蛋白-核心蛋白融合基因 DNA 疫苗进行免疫实验, 国内外尚未见类似报道, 由于融合基因 DNA 疫苗诱导的细胞免疫应答不仅能识别更多的 HBV 抗原表位, 而且免疫应答的强度更高、持续时间更久, 因此, 对于治疗慢性乙型肝炎可能比编码单抗原的 DNA 疫苗更有效。

致谢 本研究得到复旦大学医学院卫生部分子病毒实验室闻玉梅院士、武力博士和军事医学科学院基础医学研究所刘荷中博士的指导和帮助, 在此表示衷心感谢!

参 考 文 献

- 1 Chisari F V. Cytotoxic T cells and viral hepatitis. *J Clin Invest*, 1997, **99** (7): 1472~ 1477
- 2 Bocher W O, Galun E, Marcus H, *et al*. Reduced hepatitis B virus surface antigen-specific Th1 helper cell frequency of chronic HBV carriers is associated with a failure to produce antigen-specific antibodies in the trimera mouse. *Hepatology*, 2000, **31** (2): 480~ 487
- 3 Couillin I, Pol S, Mancini M, *et al*. Specific vaccine therapy in chronic hepatitis B: induction of T cell proliferative responses specific for envelope antigens. *J Infect Dis*, 1999, **180** (1): 15~ 26
- 4 Oka Y, Akbar S M F, Horiike N, *et al*. Mechanism and therapeutic potential of DNA-based immunization against the envelope proteins of hepatitis B virus in normal and transgenic mice. *Immunology*, 2001, **103** (1): 90~ 97
- 5 Geissler M, Tokushige K, Chante C C, *et al*. Cellular and humoral immune response to hepatitis B virus structural proteins in mice after DNA-based immunization. *Gastroenterology*, 1997, **112** (4): 1307~ 1313
- 6 Rehmann B, Chang K M, Mchutchinson J, *et al*. Differential cytotoxic T-lymphocyte responses to hepatitis B and C viruses in chronically infected patients. *J Virol*, 1996, **70** (10): 7092~ 7102
- 7 Geissler M, Bruss V, Michalak S, *et al*. Intercellular retention of hepatitis B virus surface proteins reduces interleukin-2 augmentation after genetic immunizations. *J Virol*, 1999, **73** (5): 4284~ 4292
- 8 Whitton J L, Rodriguez F, Zhang J, *et al*. DNA immunization: mechanistic studies. *Vaccine*, 1999, **17** (13~ 14): 1612~ 1619
- 9 Davis H L, Millan C L, Watkins S C. Immune-mediated destruction of transfected muscle fibers after direct gene transfer with antigen-expressing plasmid DNA. *Gene Ther*, 1997, **4** (3): 181~ 188
- 10 Yokoyama M, Hassett D E, Zhang J, *et al*. DNA immunization can stimulate florid local inflammation, and the antiviral immunity induced varies depending on injection site. *Vaccine*, 1997, **15** (5): 553~ 560
- 11 Pumpens P, Grens E. Hepatitis B core particles as a universal display model: a structure-function basis for development. *FEBS Lett*, 1999, **442** (1): 1~ 6
- 12 Condon C, Watkins S C, Celluzzi C M, *et al*. DNA-based immunization by *in vivo* transfection of dendritic cells. *Nat Med*, 1996, **2** (10): 1122~ 1128

Strong and Durable Cellular Immune Responses in Mice Induced by Hepatitis B Virus Envelope and Core Fusion Gene DNA Vaccine*

ZHAO Ping¹⁾, JIANG Chun-Peng²⁾, ZHAO Lan-Juan¹⁾, WEN Xin-Yu¹⁾, QI Zhong-Tian^{1)**}

¹⁾ Department of Microbiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;

²⁾ Department of Bio-engineering, Agriculture University of Northeast China, Harbin 150030, China)

Abstract Four kinds of hepatitis B virus (HBV) DNA vaccines were constructed, two of which encode HBV envelope and core fusion gene, and the others encode HBV envelope or core gene. These DNA vaccines were intramuscularly vaccinated into BALB/c mice respectively. The serum antibodies, T lymphocyte proliferative response and cytotoxic T lymphocyte response of mice were detected. The results showed that the fusion gene DNA vaccines induced weaker antibody, but stronger and longer cellular immune responses than single gene DNA vaccines did, which indicated that the envelope and core fusion gene DNA vaccine may be more useful than single gene DNA vaccine for therapy of hepatitis B.

Key words hepatitis B virus, fusion gene, DNA vaccine, immune responses

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (39980038) and Science and Technology Development Foundation of Shanghai (004319206).

** Corresponding author. Tel: 86-21-25070267, E-mail: qizt@smmu.edu.cn

Received: October 26, 2001 Accepted: December 24, 2001