

幽门螺杆菌重组腺病毒双价疫苗的构建及免疫学评价*

刘秀丽 刘纯杰 陶好霞 李淑琴 李 勤 张兆山**

(北京生物工程研究所, 北京 100071)

摘要 幽门螺杆菌 (Hp) 是导致胃炎、消化道溃疡和胃癌的主要病原菌。利用基因重组技术, 成功将 Hp 的 ure B 和 hsp A 基因融合。将 ure B-hsp A 融合基因成功构建到腺病毒载体上。检测结果表明, 该重组腺病毒具有侵染真核细胞能力, 且能在真核细胞中表达目标抗原。以血清中 IgG 和新鲜粪便中 sIgA, 评价其免疫效果, 结果显示, 该重组腺病毒载体双价疫苗能在小鼠体内激发体液免疫和黏膜免疫反应。

关键词 幽门螺杆菌, 重组腺病毒, 尿素酶 B, 热休克蛋白 A

学科分类号 R573.6, Q754

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 是导致慢性胃炎、消化道溃疡及胃癌、胃黏膜相关性淋巴组织 (MALT) 淋巴瘤等胃部疾病发生的主要致病细菌。流行病学资料显示, Hp 感染呈全球分布, 在发展中国家人群中, Hp 感染率高达 70% ~ 80%, 即便在发达国家, Hp 的感染率也达 50% 左右^[1~3]。在感染者中, 约 20% 将发展成胃病。调查表明, 90% 的胃炎和 70% 的胃溃疡是由 Hp 引起的。由于 Hp 寄生部位的特殊性, 蛋白亚单位疫苗需要在佐剂的辅助下才能产生良好的黏膜免疫反应, 而目前主要使用的黏膜佐剂霍乱毒素 (CT) 不能应用于人类, 大肠杆菌热不稳定肠毒素 (LT) 也由于引起腹泻而受到限制^[4]。因此研究减毒的佐剂, 或使用细菌和病毒为载体的基因工程疫苗来诱导黏膜免疫将是一种比较理想的选择。

腺病毒 (adenovirus, Ad) 为一群分布广泛的呼吸道病毒, 是目前基因治疗和基因工程疫苗研究中重要的转基因载体。Ad 可将大片段外源基因 (达 7 kb) 携带进入机体细胞, 既克服了裸 DNA 疫苗转染效率低的缺陷, 又有利于构建多价联合疫苗^[5]。Ad 感染性强, 能有效地把外源基因转运到各种靶细胞中, 能感染分化后的非分裂细胞。在 Ad 生活周期中, 其基因不整合到宿主细胞中, 无插入突变或激活癌基因的危险, 外源基因能游离地表达^[6]。因此, 本研究以腺病毒作为载体, 构建携带有 ure B-hsp A 融合抗原基因双价疫苗。通过免疫小鼠, 以血清中抗 Ure B-Hsp A 的 IgG 抗体和新鲜粪便中抗 Ure B-Hsp A 的 sIgA 抗体, 评价携带有 ure B-hsp A 融合抗原基因的重组腺病毒载体疫

苗的免疫原性。

1 材料方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒与细胞株: 菌株为 *E. coli* DH10B 和 *E. coli* BJ5183 (Sm^r), 质粒为 pAdtrack-CMV (kan^r) 和 pADEasy-1 (Amp^r)。菌株和质粒均由 John-Hopkins 大学何童川博士惠赠。质粒 pLZ-UH1 (含 ure B-hsp A 融合基因), 由本室构建。HEK-293 细胞由放射医学研究所吴祖泽院士赠送。

1.1.2 试剂和溶液: 限制性内切酶 *Pme* I 和 *Pac* I 购自 Biolab 公司。限制性内切酶 *Bgl* II 和 *Xba* I, T4 DNA 连接酶, 购自宝生物大连有限公司。

脂质体 (lipofectamine) 购自 Invitrogen 公司。胰蛋白酶、DMEM 培养基、加强型小牛血清购自 Hyclone 公司。细胞培养板和酶联免疫 96 孔板购自丹麦 NUNC 公司。T-75 细胞培养瓶购自美国 COSTAR 公司。

抗体: 羊抗鼠-HPR 酶标抗体、羊抗鼠 IgA-HPR 酶标抗体购自 Sigma 公司。

实验小鼠: 雌性 BALB/c (SPF) 购于军事医学科学院实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 将 ure B-hsp A 基因克隆至真核质粒 pAdtrack-CMV: 在 ure B 基因上游引入 *Bgl* II 酶切

* 国家高技术“863”计划资助项目 (2001AA215161)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-63834140, Fax: 010-63833521

E-mail: zhangzs@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2004-02-24, 接受日期: 2004-03-28

位点, 在 hsp A 基因下游加入 *Xba*I 酶切位点和终止密码子. 以 ure B-hsp A 融合质粒 pLZ-UH1 为模板, PCR 扩增 ure B-hsp A 基因. 引物如下: P_1 为 5' ga agatctATGAAAAAGATTAGCAG 3', P_2 为 5' gctctagaTTAGTGTGTTTTTGTGATC 3', 用 *Bgl* II 和 *Xba*I 双酶切 ure B-hsp A 基因片段和质粒 pAdtrack-CMV. 酶切产物用凝胶回收试剂盒割胶回收, 连接, 转化大肠杆菌 DH10 B, 挑选阳性克隆, 经过抽提质粒、酶切分析鉴定. 将此重组质粒命名为 pLZ-UH2. 测定重组质粒 pLZ-UH2 中融合抗原基因 ure B-hsp A 的序列.

1.2.2 构建携带 ure B-hsp A 融合抗原基因的重组腺病毒骨架质粒: 制备 DH10B、BJ5183 电击感受态细胞, 分装成 40 μ l/份备用. 用限制性内切酶 *Pme* I 在 37℃ 酶切重组质粒 pLZ-UH2 和 pAdtrack-CMV, 用 PCR 回收试剂盒回收酶切后的 pLZ-UH2 和 pAdtrack-CMV. 将线性化质粒 pLZ-UH2 和 pAdtrack-CMV 与带有腺病毒骨架的质粒 pAdEasy-1 电击共转化大肠杆菌 BJ5183.

根据抗性基因来筛选阳性克隆. pLZ-UH2 和 pAdtrack-CMV 质粒具有 Kan 抗性, 大肠杆菌 BJ5183 具有 Sm 抗性, pAdEasy-1 具有 Ap 抗性. 在重组过程中, pLZ-UH2 质粒上的 Kan 抗性取代了 pAdEasy-1 上的 Ap 抗性. 因此重组菌株具有 Sm 和 Kan 抗性而不具有 Ap 抗性.

通过 PCR 鉴定所得到重组质粒是否携带 ure B-hsp A 基因. 将含有 Ure B-Hsp A 目标抗原基因的重组质粒命名为 pLZ-UH3, 将其不含有 ure B-hsp A 基因的重组质粒命名为 pLZ-UH3'. 分别将质粒 pLZ-UH3 和 pLZ-UH3' 转化大肠杆菌 DH10B, 得到的转化菌分别命名为 LZ-AdUH 和 LZ-AdUH'.

培养菌株 LZ-AdUH 和 LZ-AdUH', 利用 QIAGEN-25 小柱纯化质粒 pLZ-UH3 和 pLZ-UH3'. 在用限制性内切酶 *Pac* I 酶切去掉环状质粒 pLZ-UH3 和 pLZ-UH3' 上的复制子和卡那霉素抗性基因, 由此即可生成重组腺病毒骨架^[7].

1.2.3 组装重组腺病毒: 将 HEK-293 细胞接种到细胞培养液, 在二氧化碳孵箱中 37℃ 培养. 当汇片生长至 50% ~ 70%, 用 5 μ l 脂质体和 4 μ g 质粒骨架转染 HEK-293 细胞. 在孵箱中连续培养 7 ~ 10 天. 定期在荧光显微镜下观察是否产生荧光.

在转染后 7 ~ 10 天用细胞刮收集细胞, 1 000 r/min 离心 5 min, 加入 2 ml 灭菌 PBS, 反复冻融 4 次, 10 000 r/min 离心 10 min. 上清可储存

于 -20℃. 取上清液接种至正常 HEK-293 细胞培养液中, 富集病毒.

1.2.4 PCR 检测鉴定重组腺病毒: 从感染重组腺病毒的 HEK-293 细胞中回收重组病毒, PCR 检测重组病毒中是否携带有 ure B-hsp A 融合抗原基因.

1.2.5 ELISA 法检测重组腺病毒 ure B-hsp A 基因的表达: 用构建好的重组腺病毒感染 HeLa 细胞. 3 天后收集细胞, 用 PBS 洗涤. 10% 的 Triton X-100 裂解细胞. 用 ELISA 方法检测是否存在 ure B-hsp A 融合抗原基因所表达的蛋白质.

1.2.6 重组腺病毒滴度的检测: 通过梯度稀释和荧光方法, 分别检测在第一次病毒形成时 (转染后 7 ~ 10 天) 病毒的滴度、经过第一轮富集后 (侵袭细胞后 3 天) 病毒的滴度, 和经过第三轮富集后 (侵袭细胞后 3 天) 病毒的滴度.

1.2.7 免疫实验动物: 6 ~ 7 周龄 BALB/c 小鼠随机分成 2 个处理组 (LZ-AVUH 实验组和 3 个 LZ-AVUH 对照组), 每个低剂量处理为 10^7 pfu/ml, 每组有 6 只小鼠.

用微量注射器取 20 μ l 重组腺病毒悬液, 将病毒悬液缓慢滴注在小鼠鼻孔边, 病毒悬液随小鼠吸气时进入呼吸道. 慢慢滴注, 以防小鼠打喷嚏或窒息挣扎. 共免疫 3 次: 分别在第一次免疫后的 14 天和 28 天加强免疫 2 次. 分别在每次免疫后第 7 天眼眶采血, 制备血清. 并分别在每次免疫后第 7 天收集新鲜粪便, 加入 PBS-EDTA, 4℃ 放置 4 h, 10 000 r/min 离心, 收集上清, -20℃ 储存备用. 在最后一次免疫后第 14 天收集新鲜粪便, 并用如上方法制备粪便上清液; 眼球采血, 制备血清^[8].

用 ELISA 方法检测 IgG 抗体水平, 将抗血清做不同倍数稀释, ELISA 反应后测定 A_{492} 值, 将样品 A_{492} 值与对照组 A_{492} 值相比 (P/N 比值), 取 P/N 值 = 2 时的稀释倍数为该样品抗体效价. 用 ELISA 方法检测 sIgA 的抗体水平, 将处理后的粪便液和肠液以 1:5 稀释, ELISA 反应后测定 A_{492} 值^[9].

2 结 果

2.1 重组腺病毒骨架质粒的构建

重组质粒 pLZ-UH2 经酶切分析鉴定, 表明已成功将 Hp ure B-hsp A 融合抗原基因克隆至质粒 pAdtrack-CMV. 序列分析结果表明, 所获得的重组质粒 pLZ-UH2 含有目标抗原基因 ure B-hsp A 2 058 bp, 根据核苷酸序列推导, 共编码 686 个氨基酸. 根据抗性基因筛选阳性克隆, PCR 鉴定,

结果表明, 已成功构建了携带有 ure B-hsp A 融合抗原基因的重组腺病毒骨架质粒 pLZ-UH3. 通过筛选得到了 2 个携带有 ure B-hsp A 目标抗原基因的重组质粒 pLZ-UH3 (图 1). 用限制性内切酶 *Pac* I 酶切环状质粒 pLZ-UH3 和 pLZ-UH3 , 通过电泳可以得到 2 个片段, 一个片段为病毒骨架 (约

36 kb), 另一个片段包括 pAdtrack-CMV 上的复制子和卡那霉素抗性基因 (约为 3 kb). 在大片段中, pLZ-UH3 与 pLZ-UH3 差别在于 pLZ-UH3 含有目的基因 ure B-hsp A. 此大片段即为得到的携带 ure B-hsp A 融合抗原基因的重组腺病毒骨架质粒.

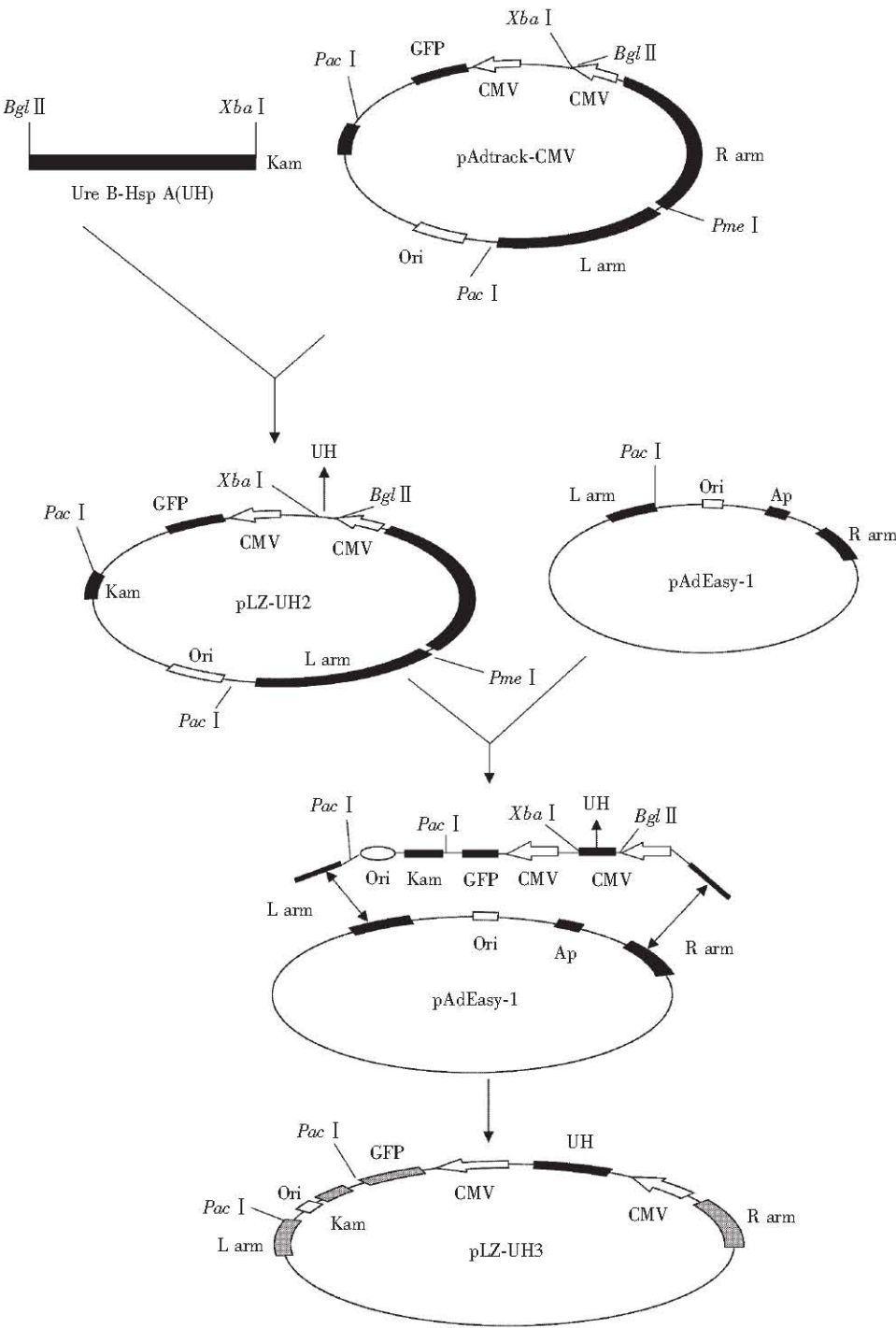


Fig. 1 Construction of recombinant adenoviral backbone plasmid

2.2 重组病毒的组装

HEK-293 细胞经重组腺病毒骨架转染, 培养 1 天后即可在荧光显微镜下观测到荧光. 随着培养时间的延长, 带有荧光的细胞数逐渐增加, 荧光亮度也随之增强. 培养 5 ~ 7 天后, 在视野中可观察到

彗星状荧光带, 并伴有细胞裂解现象. 重组腺病毒骨架分别在转染 HEK-293 细胞后 1、3、5、7 和 9 天, 可观察到 HEK-293 细胞产生荧光、荧光强度以及细胞裂解的变化 (图 2).

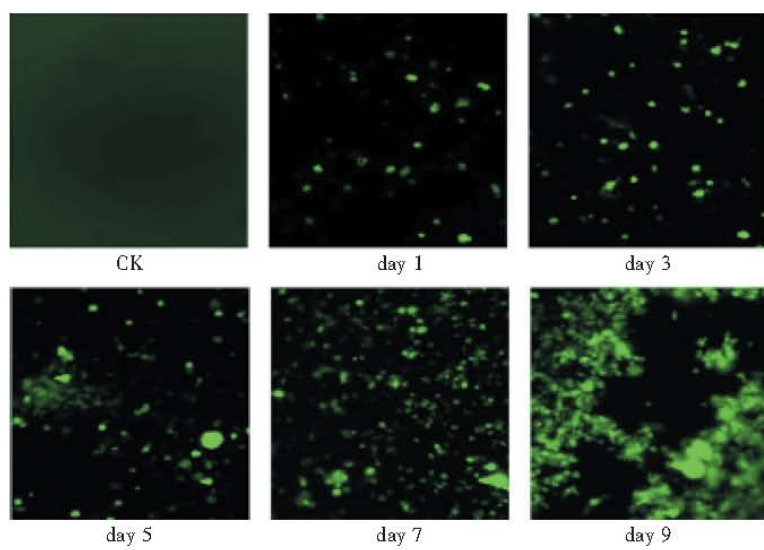


Fig. 2 Production of recombinant virus in HEK-293

2.3 重组腺病毒的鉴定

从侵染重组腺病毒的 HEK-293 细胞中回收重组病毒, PCR 检测, 在病毒中可扩增到 ure B-hsp A 基因 (图 3). PCR 检测的结果表明, 我们已成功地将融合抗原基因 ure B-hsp A 构建到腺病毒中.

品孔的 A_{492} 值 (P) 为 0.204, 阴性对照孔 A_{492} 值 (N) 为 0.087; P/N 值 > 2 , 呈现阳性, 表明 ure B-hsp A 融合抗原基因在 HeLa 细胞表达了蛋白质. 综合以上结果, 表明我们已经得到具有侵染和表达能力的、携带有 ure B-hsp A 融合抗原基因的重组腺病毒. 我们将带有 ure B-hsp A 基因的病毒命名为 LZ-AVUH, 将不带有 ure B-hsp A 基因的病毒命名为 LZ-AVUH⁻.

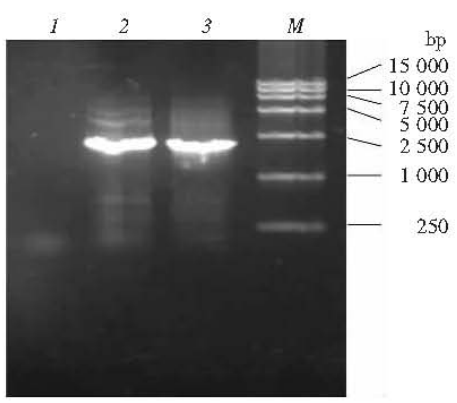


Fig. 3 PCR identification of ure B-hsp A gene in recombinant virus LZ-AVUH

M: DL 15 000; 1: Negative control (LZ-AVUH⁻); 2: LZ-AVUH; 3: Positive control (pLZ-UH2).

2.5 重组腺病毒 LZ-AVUH 滴度检测

以腺病毒作为基因工程疫苗的载体, 通常要求病毒的滴度必须达到一定的高度, 才能起到有效的免疫效果. 本研究所构建的重组腺病毒 LZ-AVUH 通过梯度稀释和细胞培养, 在荧光显微镜下计数荧光点数. 结果表明: 在第一次病毒形成时病毒滴度可以达到 $10^7 \sim 10^8$ /ml; 经过第一轮富集后滴度可以达到 $10^9 \sim 10^{10}$ /ml; 经过第三轮富集后滴度就可以达到 $10^{10} \sim 10^{11}$ /ml. 该病毒滴度已能满足实际应用的要求.

2.6 IgG 和 sIgA 抗体的检测

通过 ELISA 方法检测结果表明: 重组腺病毒株 LZ-AVUH 使小鼠体内产生抗 Ure B-Hsp A 的 IgG 抗体. 从免疫次数分析, 第一次免疫后 7 天, 小鼠

2.4 重组腺病毒 ure B-hsp A 基因的表达

用 ELISA 方法检测 HEK-293 细胞裂解液, 样

体内就能产生抗 Ure B-Hsp A 的 IgG 抗体, 但效价很低. 在第一次加强免疫后 7 天, 小鼠体内产生大量的抗 Ure B-Hsp A IgG 抗体, 免疫效价有了很大提高. 在第二次加强免疫后 7 天, 血清抗 Ure B-Hsp A 的 IgG 抗体滴度基本保持在二次免疫时的水平; 在三次免疫后的 14 天, 血清 IgG 抗体滴度基本持平, 抗体效价最高可达 1:2 000 (图 4). 对制备的新鲜粪便 sIgA 进行 1:50 稀释, 测定 A_{492} 值显示产生了特异性抗体黏膜 sIgA (表 1). 说明重组病毒能够激发机体 UreB-HspA 的特异性体液和黏膜抗体反应.

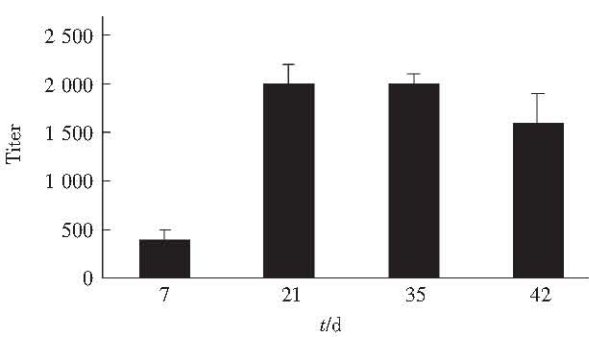


Fig. 4 The titers of antibody IgG raised against UreB-HspA in BALB/c mice immunized by intranasal administration

Table 1 ELISA detection of sIgA in BALB/c immunized by intranasal administration

Sample	A_{492}			
	7 day	21 day	35 day	42 day
Negative control	0.030 ± 0.013	0.040 ± 0.011	0.050 ± 0.019	0.050 ± 0.014
Immunized mice	0.029 ± 0.012	0.200 ± 0.024	0.183 ± 0.033	0.163 ± 0.041

3 讨 论

由于腺病毒感染力强, 能有效地把外源基因转运到各种靶细胞中, 因而 Ad 广泛应用于有关基因治疗的研究中, 作为转基因的重要介导载体, 野生型病毒能包装的最大外源 DNA 约为 2 kb, 但是将 Ad 系统中 E1 和 E3 区缺失, 即可插入大约 7 kb 的外源基因, 这对于构建多价联合疫苗非常有利. 借助于原核细胞内的高效重组机制快速构建携带有目标基因的质粒骨架, 同时通过各质粒本身所具有的抗生素抗性进行有效筛选, 因而能快速有效地得到重组腺病毒骨架. 在真核细胞的协助下, 腺病毒骨架可以直接组装成具有侵染能力的重组腺病毒, 并可在细胞中大量复制, 从而避免了在真核细胞中筛选重组病毒的繁琐工作. 同时也借助于质粒中所携带的绿色荧光蛋白报告基因, 直接便利地观察转染、侵染效率, 以及测定重组腺病毒的滴度^[10]. 通过 HEK-293 细胞组装成携带有目标抗原基因的重组腺病毒, 并在 HEK-293 细胞侵染和 HeLa 细胞中 ure B-hsp A 基因表达的实验结果表明, 重组腺病毒 LZ-AVUH 具有侵染和表达能力.

从免疫加强的次数来看: 首免后 7 天内, 小鼠体内就能产生抗 Ure B-Hsp A 的 IgG 和 sIgA 抗体, 但效价很低; 在第一次加强免疫后, 就可使机体产生大量抗体; 在第二次加强免疫后 14 天内, 抗体

水平基本维持原水平或略下降. 由于腺病毒本身被机体定位为外来物, 它可引发宿主免疫反应. 尽管在构建载体时已经考虑到这一点, 并将载体上的非结构早期基因 E1 区去除^[11], 但病毒本身仍有大部分的结构蛋白, 可引起机体产生免疫反应^[12]. 因此, 高剂量的腺病毒在引起高的侵染率同时, 也导致机体的强烈免疫反应, 结果导致病毒在加强免疫中的作用不明显.

本研究得到了一株具有免疫源性的、抗 Ure B-Hsp A 的重组腺病毒载体疫苗, 为在动物模型中评价重组腺病毒 LZ-AVUH 疫苗的免疫保护性奠定了坚实的基础.

参 考 文 献

1 NIH Consensus Conferences. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in Peptic Ulcer Disease. JAMA, 1994, **272** (1): 65 ~ 69

2 Parsonnet J, Hansen S, Rodriguez L, et al. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. N Engl J Med, 1994, **330** (8): 1267 ~ 1271

3 Mitchell H M, Li Y Y, Hu P J, et al. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in southern China: indentification of early childhood as the critical period for acquisition. J Infect Dis, 1992, **166** (1): 149 ~ 153

4 Martchetti M, Rossi M, Giannelli V, et al. Protection against *Helicobacter pylori* in mice by intragastric vaccination with *H. pylori* antigens is achieved using a non-toxic mutant of *E. coli* heat-labile enterotoxin (LT) as adjuvant. Vaccine, 1998, **16** (1): 33 ~ 37

5 Bett A J, Haddara W P, Prevee L, et al. An efficient and flexible system for construction of adenovirus vector with insertion or deletion

- in early region 1 and 3. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, **91** (19): 8802 ~ 8809
- 6 Kochanek S, Clemens P R, Mitani K, *et al.* A new adenoviral vector: replacement of all viral coding sequence with 28 kb of DNA independently expressing both full length dystrophin and β -galactosidase. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, **93** (12): 5731 ~ 5738
 - 7 He T C, Zhou S, da Costa L T, *et al.* A simplified system for generating recombinant adenoviruses. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, **95** (5): 2509 ~ 2514
 - 8 Zhang B, Li S Q, Chen G J, *et al.* Expression of colonization factor antigen I of enterotoxigenic *Escherichia coli* in *Shigella flexneri* 2a t32. Acta Biochim Biophys Sin, 2001, **33** (3): 277 ~ 280
 - 9 Zheng J P, Wang L C, Wang P, *et al.* Co-expression of CFA/I and CS6 of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in *Shigella flexneri* 2a t32 derivative strain FWL01. Acta Biochim Biophys Sin, 2003, **35** (11): 1005 ~ 1010
 - 10 Zeng M, Smith S K, Siegel F, *et al.* AdEasy system made easier by selecting the viral backbone plasmid preceding homologous recombination. Biotechniques. 2001, **31** (2): 260 ~ 262
 - 11 Jones N, Shenk T. Isolation of deletion and substitution mutants of adenovirus type 5. Cell, 1978, **13** (1): 181 ~ 188
 - 12 Liber A, He C Y, Meuse L, *et al.* Inhibition of NF-kappaB activation in combination with bel-Z expression allows for persistence of first generation adenovirus vectors in the mouse liver. J Virol, 1998, **72** (11): 9267

Construction of Adenovirus-mediated Vaccine of *Helicobacter pylori* and Immune Test in Balb/c Mice*

LIU Xiu-Li, LIU Chun-Jie, TAO Hao-Xia, LI Shu-Qin, LI Ji, ZHANG Zhao-Shan**

(Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China)

Abstract *Helicobacter pylori* is one of the most common infectious pathogenic agents in human being which causes gastritis, peptic ulcer disease, gastric adenocarcinoma and malignant tumour of the stomach. ure B and hsp A gene were cloned and fused into a shuttle vector pADTrack-CMV. The resultant plasmid was linearized by digesting with restriction endonuclease *Pme* I, and subsequently were contrasformed into *E. coli*. BJ5183 with an adenoviral backbone plasmid PAdEasy-1. The linearized recombinant plasmid was transfected into adenovirus packaging cell lines HEK-293. The recombinant adenoviruses were typically generated within 7 to 12 days. The recombinant adenoviruses titer was monitored by GFP expression. ELISA was used to test whether adenoviruses efficiently express the Ure B-Hsp A antigen protein in HEK-293. To determine the immunogenicity of the recombinant adenovirus, the delayed type serum IgG, secreted IgA, in the immunized mice were tested. The results showed that both humoral and mucosal immune response in mice were induced.

Key words *Helicobacter pylori*, recombinant adenoviruses, urease B, heat-shock-protein A

* This work was supported by a grant from The State 863 High Technology R&D Project of China (2001AA215161).

** Corresponding author. Tel: 86-10-63834140, Fax: 86-10-63833521, E-mail: zhangzs@nic.bmi.ac.cn

Received: February 24, 2004 Accepted: March 28, 2004