

前 S2 抗原基因对乙型肝炎 DNA 疫苗免疫应答的影响

赫 兢, 辛绍杰, 毛远丽, 貌盼勇, 沈宏辉, 杨健洋, 徐 军, 孔 维

赫兢, 辛绍杰, 毛远丽, 貌盼勇, 沈宏辉, 杨健洋, 徐军, 孔维, 中国人民解放军第302医院传染病研究所病毒室 北京市 100039
项目负责人: 貌盼勇, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所病毒室. maopy@yahoo.com.cn
电话: 010-66933316 传真: 010-63831874
收稿日期: 2004-05-29 接受日期: 2004-06-10

摘要

目的: 探讨前S2抗原基因对乙型肝炎DNA疫苗免疫应答的影响。

方法: 采用常规PCR法从 adr 亚型全基因DNA序列中分别扩增HBV S和前S2+S基因片段, 重组到VR1012载体中, 转染COS-7细胞并免疫BALB/C小鼠。采用蛋白印迹、ELISA, ELISPOT等方法检测其在COS-7细胞内的表达及小鼠的体液及细胞免疫。

结果: 转染的COS-7细胞表达相应的目的蛋白, 且前S2+S转染的细胞表达明显高于S转染的细胞的表达; 免疫接种小鼠后2 wk产生HBsAb及HBsAg特异性CTL, 前S2+S抗原免疫产生的HBsAb及HBsAg特异性CTL均强于S抗原免疫。

结论: 前S2抗原基因可增强乙型肝炎DNA疫苗刺激的免疫应答。

赫兢, 辛绍杰, 毛远丽, 貌盼勇, 沈宏辉, 杨健洋, 徐军, 孔维. 前S2抗原基因对乙型肝炎DNA疫苗免疫应答的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(9): 2196-2198

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2196.asp>

0 引言

慢性乙型肝炎严重危害人类健康, 目前尚无特效治疗手段. 乙肝慢性化的主要原因是HBV感染机体后缺乏有效的特异性细胞免疫应答^[1]. DNA疫苗可同时诱发持久的特异性细胞免疫及体液免疫, 是治疗慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)的希望之星, 也是近年来传染病研究领域的热点^[2-3]. DNA疫苗要作为临床治疗CHB的工具尚需解决许多难题, 主要是证实其安全性及有效性. 我们采用FDA已批准用于临床试验的VR1012载体构建乙型肝炎(hepatitis B, HB) DNA疫苗, 并通过加入前S2抗原基因片段, 观察其在小鼠中对DNA疫苗免疫应答的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 载体、质粒和引物 真核细胞表达载体VR1012,

全长4 913 bp, 含卡那霉素抗性基因, 由于晓方教授惠赠. 人HBV全序列DNA质粒(adr 亚型)G683-1由成军教授惠赠. PCR引物由赛百胜公司合成: 含 Pst I酶切位点的上游引物S2-5(包含前S2): 5' -AAA CTG CAG CAT CCT CAG GCC ATG-3'; S5(不包含前S2): 5' -AAA CTG CAG CCG AAC ATG GAG AAC-3'; 含 Bam H I酶切位点的共用下游引物S3: 5' -CGC GGA TCC TCA AAT GTA TAC CCA AAG-3'.

1.1.2 菌株、细胞及试剂 受体菌DH5 α (钙化菌)购自博大泰克公司. COS-7细胞由302医院传染病研究所病毒室冷冻保存. 工具酶: Pst I, Bam H I, Taq酶, T4 DNA连接酶及pGEM-T Easy试剂盒、质粒提取试剂盒、DNA纯化试剂盒均购自Promage公司; 质粒大量提取试剂盒购自QIAGEN公司; 其余生化试剂均购自华美生物制剂公司; 转染试剂sofast购自厦门太阳马生物技术公司; 抗HBsAg mAb、碱性磷酸酶标记的羊抗鼠IgG(蛋白印迹检验用), 检测HBsAg及HBsAb的ELISA试剂盒均为北京科卫试剂厂产品. 包被抗体及检测抗体(ELISPOT用)购自Peprotech Inc公司.

1.1.3 抗原肽 根据文献报道, 设计合成HBV S抗原3条主要抗原决定簇表位多肽, 分别长9-12个氨基酸, 由吉林大学生命科学院合成并纯化。

1.1.4 实验动物 BALB/C小鼠购自军事医学科学院, ♀, 6-8周龄, 18-25 g, SPF级。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建及DNA疫苗的制备 以G683-1质粒为模板, 分别以S2-5, S5, S3为引物, 采用常规PCR法扩增获得目的基因, 即HBV中蛋白及小蛋白编码基因, 将其插入pGEM-T Easy载体后转化感受态DH5 α , 扩增后, 提取质粒, 经 Pst I, Bam H I双酶切, 同时双酶切载体VR1012, 将双酶切后获得的片段与载体重组, 构建2个重组质粒, 分别为: VR1012-S, 简称为VR-S; VR1012-前S2+S, 简称为VR-S2. 由博美公司测序后使用大提试剂盒提取质粒, 制备DNA疫苗。

1.2.2 实验分组 传代COS-7细胞20瓶分4组, 每组5瓶, 分别用VR-S2, VR-S, VR1012空载体转染(阴性对照), 另1组作空白对照. 20只BALB/C小鼠随机分为4组, 每组5只, 分别为VR-S及VR-S2免疫组、VR1012空载体免疫组、正常对照组。

1.2.3 真核细胞表达 COS-7细胞复苏, 2次传代后以 10^{10} 细胞/L的浓度加入细胞培养瓶, 严格按转染试剂说明书操作: 无菌条件下10 μ g质粒溶于600 μ L无血清

及抗生素的DMEM中, 10 μ L sofast 转染试剂溶于 600 μ L 无血清及抗生素的DMEM中; 将质粒复合物滴加到转染试剂复合物中, 边滴加边混匀; 室温放置 20 min 后, 将 DNA-转染试剂复合物滴加到细胞培养瓶中; 37 $^{\circ}$ C CO₂ 孵箱中放置 48 h 后收集细胞, 加 PBS 200 μ L, 冻融 3 次后取上清; 使用双抗体夹心法 ELISA 试剂盒进行 HBsAg 检测, 并作蛋白印迹检验。

1.2.4 免疫接种 质粒 100 μ g 溶于 100 μ L 生理盐水, 胫骨前肌 im(每条腿 50 μ L), 于 0, 1, 3wk 分别注射 3 次, 每次注射前 1 d 割尾取血 150 μ L, 分离血清. 首次免疫后 28 d 采血后处死小鼠, 取脾制单细胞悬液。

1.2.5 小鼠体液免疫检测 使用双抗原夹心法 ELISA 试剂盒检测小鼠血清 HBsAb, 测 A 值比较。

1.2.6 小鼠细胞免疫检测 采用 ELISPOT 方法: 包被抗体溶于 PBS, 10 g/L, 100 μ L/孔, 室温过夜; PBST 150 μ L 洗 4 次, 50 g/L 脱脂奶粉封闭后, PBST 150 μ L 洗 4 次; 脾细胞 10¹⁰/L, 100 μ L/孔, 加抗原肽 0.2 μ g/孔, PMA 0.5 ng/孔作阳性对照, DMEM 作阴性对照, 37 $^{\circ}$ C CO₂ 孵箱放置 20 h; PBST 150 μ L 洗 4 次, 检测抗体溶于 PBS, 5 g/L, 100 μ L/孔, 4 $^{\circ}$ C 摇床 80 r/min 过夜; PBST 150 μ L 洗 4 次, 碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG 1:200 稀释, 100 μ L/孔, 摇床 60 r/min 室温 1 h; PBST 150 μ L 洗 4 次、PBS 150 μ L 洗 2 次, NBT/BCIP 显色 15 min; 无菌蒸馏水冲洗终止显色, 室温避光过夜凉干, 显微镜下阳性细胞计数。

统计学处理 试验数据使用 state7.0 软件进行统计学处理。

2 结果

2.1 HBV 前 S2-S 抗原及 S 抗原 DNA 疫苗的构建 获得 2 个重组质粒: 引物 S2-5 位于 1 373-1387 bp, S5 位于 1 544-1 558 bp, S3 位于 2 213-2 230 bp, 故前 S2+S 抗原基因片段长度 858 bp, S 抗原基因片段长度 687 bp. 经限制性核酸内切酶 *Pst* I, *Bam*H I 双切后, 琼脂糖凝胶电泳分析, 酶切片段大小与预期一致(图 1). 博亚公司测序后序列与模板序列完全一致。

2.2 真核细胞目的蛋白表达 糖基化 HBsAg 大小为 27 ku, 蛋白印迹法检验 VR-S2 及 VR-S 转染真核细胞后可见阳性条带, 阴性对照未见阳性条带(图 2)。

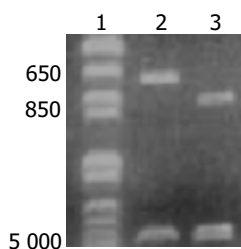


图 1 重组质粒 VR-S 及 VR-S2 琼脂糖凝胶电泳分析; 1: DNA Marker (bp); 2: VR-S, 上为插入片段, 687 bp, 下为载体, 4 913 bp; 3: VR-S2, 上为插入片段, 858 bp, 下为载体, 4 913 bp。

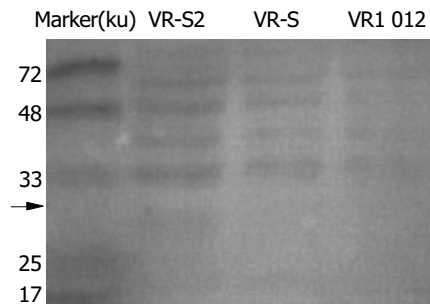


图 2 重组质粒 VR-S2 及 VR-S 转染真核细胞后蛋白印迹检验. 一→所指为阳性条带, 位于 33-25 ku 之间。

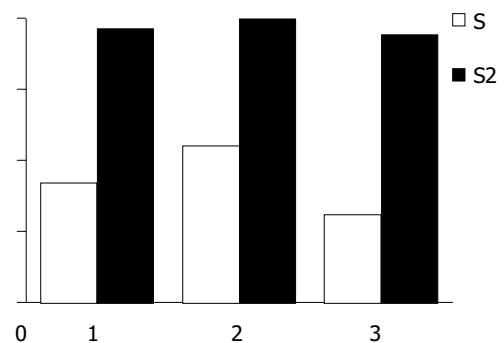


图 3 重组质粒 VR-S2 及 VR-S 真核细胞表达、诱导小鼠产生 HBsAb 及 CTL 的比较. 1: HbsAg; 2: HbsAb; 3: CTL。

2.3 真核细胞表达强度分析 ELISA 法检测空白对照、阴性对照、VR-S 及 VR-S2 转染组, A_{450} 均值分别为 0.045, 0.106, 1.583, 2.981. 对 VR-S 及 VR-S2 两组数值进行 *t* 检验, $P < 0.01$, VR-S2 转染真核细胞表达强度明显高于 VR-S。

2.4 小鼠体液免疫检测 免疫接种后第 2 wk 血清可检测到 HBsAb, 28 d 后 ELISA 法检测空白对照、阴性对照、VR-S 及 VR-S2 免疫组, A_{450} 均值分别为 0.013, 0.089, 0.908, 1.879. 对 VR-S 及 VR-S2 两组数值进行 *t* 检验, $P < 0.01$, VR-S2 免疫小鼠产生抗体明显强于 VR-S。

2.5 小鼠细胞免疫检测 ELISPOT 检测小鼠脾单细胞悬液, 显微镜观察空白对照、阴性对照、VR-S 及 VR-S2 免疫组每孔阳性细胞数均值分别为 2, 2, 38, 87. 对 VR-S 及 VR-S2 两组数值进行 *t* 检验, $P < 0.01$, VR-S2 免疫小鼠产生 HBsAg 特异性细胞毒 T 淋巴细胞(CTL) 数明显高于 VR-S。

3 讨论

DNA 疫苗可以诱导长期的细胞和体液免疫, 打破免疫耐受, 是治疗病毒、胞内菌、某些寄生虫感染及肿瘤^[4]的有力工具, 在爱滋病、流感、疟疾等传染病的治疗方面已进行了大量的临床试验并取得了很大进展^[5]. 在慢性病毒性肝炎的治疗方面也进行了大量研究^[6-9], 但治疗慢性乙肝的 DNA 疫苗的临床试验罕见报道, 主要是疫苗的安全性及有效性难以证实. 我们采用了已被 FDA 批准用于临床的, 在国外爱滋病临床试验中已证

实了安全性的载体 VR1012, 插入 HBV S、前 S2+S 基因片段后, 蛋白印迹法检测转染的真核细胞可见与 HBsAg 大小相等的蛋白条带, ELISA 法检测可见 HBsAg 阳性表达, 接种小鼠可产生 HBsAb 及 HBsAg 特异性 CTL, 说明重组质粒在真核细胞内可以表达. 并可作为 HB DNA 疫苗进行深入研究.

外源 DNA 引入宿主细胞后, 抗原持续表达, 其中微量抗生素对人体有潜在毒性, 故 FDA 禁止氨基糖甙类抗生素抗性的载体用于人体试验, 推荐使用卡那霉素或新霉素抗性的表达载体. 但因卡那霉素抗性的载体不含氨基糖甙类抗生素抗性基因中的 CpG 免疫刺激元件而免疫原性相对较弱. 本研究所用载体为卡那霉素抗性, 虽然可用于临床研究, 但免疫原性相对较弱. 有报道不同的载体构建的重组质粒转染真核细胞后表达强度不同^[10], 联合使用细胞因子^[11-12]也可增强 HB DNA 疫苗的免疫原性, 为增强本研究所用重组质粒的免疫原性, 我们在连接片段中加入 HBV 前 S2 基因. 已证实前 S 蛋白有很高的免疫原性, 可强化对同存的 S 蛋白的免疫应答, 而 HBV 是通过 Pre-S2 蛋白与单体人血清白蛋白结合, 稳定在血循环中, 逃避抗病毒免疫应答的. Schirmbeck *et al*^[13]曾报道前 S2 抗原在诱导体液免疫的过程中起主导作用, 依赖 CD4⁺T 细胞产生 IgG 抗体, 同时诱导 L^d 或 K^b 限制的 CTL 反应. 本结果显示, 与 VR-S 相比, VR-S2 转染真核细胞可使 HBsAg 表达更强, 免疫小鼠可产生更强的 HBsAb 及 HBsAg 特异性 CTL, 具有更强的免疫原性. 真核细胞表达的增强可能是引起小鼠免疫反应增强的直接原因, 故连接前 S2 + S 基因的 HB DNA 疫苗的免疫应答增强, 用于临床研究更具优势. 蛋白印迹法检测可见 VR-S2 及 VR-S 转染真核细胞后表达的蛋白大小相同, 均为 27 ku. 理论上 VR-S2 转染后应表达 HBV 中蛋白, 大小为 33 ku, 但在本试验中未见, 推测有以下原因: VR-S2 转染真核细胞后, 表达的 HBV 中蛋白被细胞蛋白酶水解为前 S2 抗原及小蛋白, 由于使用抗 HBsAg 单克隆抗体, 蛋白印迹法不能检出, 但前 S2 抗原本身增强了细胞的表达; 也可能 HBV 中蛋白的表达强化了同存的 S 蛋白的免疫应答, 但中蛋白表达量较少, 蛋白印迹法难以检出; 因为有各自的起始密码

子, 乙肝病毒在肝细胞内可以同时表达大、中、小蛋白, 各占 20%, 5-10%, 70%, 但 HB DNA 疫苗为重组质粒, 表达系统与乙肝病毒不同, 前 S2-S 抗原基因可能是在转录环节上调节小蛋白的表达, 而不表达中蛋白. 以上原因仅为推测, 尚待试验证明.

4 参考文献

- 1 Volchkova EV, Pak SG, Malov VA, Umbetova KT. Changes in the levels of acute phase proteins in viral hepatitis. *Ter Arkh* 2000;72:18-21
- 2 Michel ML, Loirat D. DNA vaccines for prophylactic or therapeutic immunization against hepatitis B. *Intervirology* 2001;44:78-87
- 3 Schirmbeck R, Reimann J. Revealing the potential of DNA-based vaccination: lessons learned from the hepatitis B virus surface antigen. *Biol Chem* 2001;382:543-552
- 4 Tian G, Yi JL, Xiong P. Antitumor immunopreventive effect in mice induced by DNA vaccine encoding a fusion protein of alpha-fetoprotein and CTLA4. *World J Gastroenterol* 2004;10:200-204
- 5 Tang LL, Liu KZ. Recent advances in DNA vaccine of hepatitis virus. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002;1:228-231
- 6 Jin J, Yang JY, Liu J, Kong YY, Wang Y, Li GD. DNA immunization with fusion genes encoding different regions of hepatitis C virus E2 fused to the gene for hepatitis B surface antigen elicits immune responses to both HCV and HBV. *World J Gastroenterol* 2002;8:505-510
- 7 Beckebaum S, Cicinnati VR, Gerken G. DNA-based immunotherapy: potential for treatment of chronic viral hepatitis. *Rev Med Virol* 2002;12:297-319
- 8 Huang ZH, Zhuang H, Lu S, Guo RH, Xu GM, Cai J, Zhu WF. Humoral and cellular immunogenicity of DNA vaccine based on hepatitis B core gene in rhesus monkeys. *World J Gastroenterol* 2001;7:102-106
- 9 Zhao LS, Qin S, Zhou TY, Tang H, Liu L, Lei BJ. DNA-based vaccination induces humoral and cellular immune responses against hepatitis B virus surface antigen in mice without activation of C-myc. *World J Gastroenterol* 2000;6:239-243
- 10 Qin S, Tang H, Zhao LS, He F, Lin Y, Liu L, He XM. Cloning of HBsAg- encoded genes in different vectors and their expression in eukaryotic cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:1111-1113
- 11 Du DW, Jia ZS, Li GY, Zhou YY. HBV DNA vaccine with adjuvant cytokines induced specific immune responses against HBV infection. *World J Gastroenterol* 2003;9:108-111
- 12 Kwissa M, Kroger A, Hauser H, Reimann J, Schirmbeck R. Cytokine-facilitated priming of CD8⁺ T cell responses by DNA vaccination. *J Mol Med* 2003;81:91-101
- 13 Schirmbeck R, Zheng X, Roggendorf M, Geissler M, Chisari FV, Reimann J, Lu M. Targeting Murine Immune Responses to Selected T Cell- or antibody-Defined Determinants of the Hepatitis B Surface Antigen by Plasmid DNA Vaccines Encoding Chimeric Antigen. *J Immunol* 2001;166:1405-1413