

# 乙肝病毒前 S/S 抗原的重组表达质粒对 HBV 转基因小鼠的免疫治疗效应

周陶友, 陈敏, 赵连三, 王松, 陈守春, 何芳, 刘丽, 唐红

周陶友, 陈敏, 赵连三, 何芳, 刘丽, 唐红, 四川大学华西医院感染性疾病中心, 人类疾病生物治疗国家重点实验室 四川省成都市 610041

王松, 深圳东湖医院内科 广东省深圳市 518000

陈守春, 成都地奥集团药物研究所 四川省成都市 610041

国家自然科学基金项目, No. 39070670

通讯作者: 赵连三, 610041, 四川省成都市外南国学巷 37 号, 四川大学华西

医院感染性疾病中心, 人类疾病生物治疗国家重点实验室. zlsan@126.com

电话: 028-81822603 传真: 028-85422113

收稿日期: 2005-01-17 接受日期: 2005-02-02

## Immune therapeutical effect induced by inoculation with recombinant plasmid encoding preS/S antigen in HBV DNA transgenic mice

Tao-You Zhou, Min Chen, Lian-San Zhao, Song Wang, Shou-Chun Chen, Fang He, Li Liu, Hong Tang

Tao-You Zhou, Min Chen, Lian-San Zhao, Fang He, Li Liu, Hong Tang, the Center of Infectious Diseases, National Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Song Wang, Department of Internal Medicine, Shenzhen East Lake Hospital, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China

Shou-Chun Chen, Institute of Materia Medica, Chengdu Diao Group, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Supported by National Science Foundation of China, No. 39070670

Correspondence to: Lian-San Zhao, the Center of Infectious Diseases, National Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. zlsan@126.com

Received: 2005-01-17 Accepted: 2005-02-02

### Abstract

**AIM:** To evaluate the effects of recombinant plasmids pcDNA3.1-S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>S and pcDNA3.1-S<sub>2</sub>S encoding hepatitis B virus (HBV) envelope S/preS<sub>1</sub> or S/preS<sub>2</sub> antigens on the inhibition of HBV DNA replication and antigen expression in HBV transgenic mice.

**METHODS:** Plasmids pcDNA3.1-S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>S and pcDNA3.1-S<sub>2</sub>S were constructed. 100 μg of each plasmid was injected muscularly to inoculate C<sub>57</sub>BL/6 HBV DNA transgenic mice. The inoculation was boosted 2 and 4 weeks later. Serum samples were collected to measure anti-HBs, anti-HBc and HBV DNA. The liver tissue biopsies were performed to detect HBsAg and preS<sub>2</sub> antigen.

**RESULTS:** Four, 8 and 12 weeks after inoculation, the positive rates of anti-HBs in pcDNA3.1-S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>S group were

50%, 67% and 100%, respectively, which were higher than those in pcDNA3.1-S<sub>2</sub>S group (16.7%, 33%, 67%) ( $P < 0.05$ ). The positive rates of anti-preS<sub>2</sub> were lower than 16.7% in both groups. The numbers of HbsAg or preS<sub>2</sub> antigen positive hepatocytes were also decreased significantly in both groups. The serum HBV DNA titers at 8, 12 weeks were lower than those before and 4 weeks after the first inoculation. No change was observed in the control mice, which were inoculated with the empty plasmid vector.

**CONCLUSION:** The data showed that pcDNA3.1-S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>S and pcDNA3.1-S<sub>2</sub>S inoculation might inhibit replication of HBV DNA and expression of HbsAg and preS<sub>2</sub> antigen in mice. The preS<sub>1</sub> insert may enhance the effect of pcDNA3.1-S<sub>2</sub>S. It is suggested that pcDNA3.1-S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>S and pcDNA3.1-S<sub>2</sub>S can be DNA vaccine candidates for the treatment of chronic HBV infection.

**Key Words:** PreS antigen; Therapeutic DNA vaccine; Transgenic mice

Zhou TY, Chen M, Zhao LS, Wang S, Chen SC, He F, Liu L, Tang H. Immune therapeutical effect induced by inoculation with recombinant plasmid encoding preS/S antigen in HBV DNA transgenic mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(7):844-847

### 摘要

**目的:** 观察重组表达质粒 pcDNA3.1-S<sub>2</sub>S 和 pcDNA3.1-S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>S 对 HBV DNA 复制和抗原表达的抑制效果。

**方法:** 以能表达乙肝表面抗原主蛋白 S(HBsAg) 的重组真核表达质粒为骨架, 构建了分别含有 HBV 前 S1 抗原和 / 或前 S2 抗原编码基因的 pcDNA3.1-S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>S, pcDNA3.1-S<sub>2</sub>S, 并各以 100 μg 肌肉接种 C<sub>57</sub>BL/6 HBV DNA 转基因小鼠, 2, 4 wk 后各加强免疫 1 次。然后动态检测小鼠血清 HBV DNA 水平的变化、抗-HBs 和前 S<sub>2</sub> 抗体的诱生, 以及肝组织内 HBsAg、前 S<sub>2</sub> 抗原的消长情况。

**结果:** 小鼠肝组织内 HBsAg, 前 S<sub>2</sub> 抗原呈逐渐减弱的趋势, 8 wk 后各有 1/3 的小鼠已不能检出。pcDNA3.1-S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>S 组接种后 4, 8, 12 wk 抗-HBs 阳转率分别为 50%、67%、100%, 明显高于 pcDNA3.1-S<sub>2</sub>S 组 (17%、33%、50%) ( $P < 0.05$ ); 而前 S<sub>2</sub> 抗体阳转率均低于 17%。接

种后 8 wk, 12 wk, pcDNA3.1-S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>S 组和 pcDNA3.1-S<sub>2</sub>S 组小鼠血清 HBVDNA 水平明显下降, 均低于自身接种前、接种后 4 wk 以及同期对照组 ( $P < 0.05$ ).

**结论:** 重组表达质粒 pcDNA3.1-S<sub>2</sub>S 和 pcDNA3.1-S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>S 接种, 能够抑制转基因小鼠体内的 HBV 复制, 而重组质粒中 S<sub>1</sub> 基因的共表达使抑制作用得到增强.

**关键词:** 前 S 抗原; 治疗性 DNA 疫苗; 转基因小鼠

周陶友, 陈敏, 赵连三, 王松, 陈守春, 何芳, 刘丽, 唐红. 乙肝病毒前 S/S 抗原的重组表达质粒对 HBV 转基因小鼠的免疫治疗效应. 世界华人消化杂志 2005; 13(7): 844-847

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/844.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒 (HBV) 前 S 抗原在 HBV 感染后的免疫清除方面发挥重要的作用<sup>[1-2]</sup>. 为进一步了解含有 HBV 前 S 抗原的乙肝基因疫苗对 HBV 慢性携带者是否具有治疗效应, 我们以能表达乙肝表面抗原主蛋白 S (HBsAg) 的重组真核表达质粒为骨架, 构建了分别含有 HBV 前 S<sub>1</sub> 抗原和 / 或前 S<sub>2</sub> 抗原编码基因的 pcDNA3.1-S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>S, pcDNA3.1-S<sub>2</sub>S, 作为候选乙肝基因疫苗对 HBV 转基因小鼠分组进行接种, 观察所诱生的免疫应答反应, 及其对小鼠体内 HBV 复制和抗原表达的影响.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 质粒载体 pcDNA3.1 (美国 Invitrogen 公司); Pyrobest DNA 聚合酶、限制性内切酶、DNA ligation kits (日本 Takara 公司); 质粒抽提试剂盒、DNA 胶回收试剂盒 (德国 Qiagen 公司). 兔抗-HBs 单克隆抗体 (美国 DAKO 公司); 乙肝病毒 HBsAg 和抗-HBs 检测试剂盒 (上海科华生物工程公司); 乙肝病毒前 S<sub>2</sub> 抗体以及前 S<sub>2</sub> 抗体检测试剂盒 (北京大学肝炎试剂中心). HBV DNA 荧光定量 PCR 检测试剂盒 (广州中山达安基因诊断中心). 通过常规酚 / 氯仿法, 从 1 例慢性乙肝患者的血清标本中提取 HBV DNA. 采用一对引物 P1 (GCGGGTACCATGCAGTGGAACTCCACAACATTCCAC), P2 (GGGGCGGCCGCTTAAATGTATACCCAAAGACAAAAGAA) 扩增 HBV 外膜中蛋白的编码基因 S<sub>2</sub>S; 采用另一对引物 P3 (GACGGTACCATGGGAGGTTGGTCTTCCAAACCTCGA) 和 P2, 扩增产生 HBV 外膜大蛋白的编码基因 S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>S. 将 S<sub>2</sub>S 和 S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>S 经 *Kpn* I, *Not* I 双酶切后定向插入质粒载体 pcDNA3.1 中, 获得重组质粒 pcDNA3.1-S<sub>2</sub>S 和 pcDNA3.1-S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>S, 并交上海基康生物工程公司测序. 然后分别转染 SP2/0 细胞, 通过 ELISA 法确认有 HBsAg 表达后, 即作为乙肝基因疫苗备用. HBV 全基因转基因 C<sub>57</sub>BL/6 小鼠 (第二军医大学转基因动物中心), 为 SPF 级, 3 月龄,

能在体内稳定表达 HBsAg 抗原和复制 HBV DNA, 并稳定传代. 将 HBV 转基因鼠 18 只分成对照组和两个实验组 (S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>S 和 S<sub>2</sub>S 组), 每组 6 只, 雌雄各半.

**1.2 方法** 实验组小鼠 im pcDNA3.1-S<sub>2</sub>S 或 pcDNA3.1-S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>S, 每只 100 μg; 对照组接种空载质粒 pcDNA3.1, 每只 100 μg. 首次免疫 2, 4 wk 后, 用等剂量加强免疫 1 次. 初次接种前和接种后 4, 8, 12 wk, 分别活检小鼠肝组织标本. 方法是: 采用 10 g/L 戊巴比妥钠按 50 μg/g ip 麻醉小鼠, 剖腹手术切取 0.5 cm × 0.5 cm 大小的肝组织, 随后关闭腹腔, 将小鼠放回笼中继续饲养. 肝组织标本离体后立即置 40 g/L 中性甲醛液中固定并常规石蜡包埋. 为保证实验结果的可比性, 作者将全部小鼠所采集的肝组织标本制作成组织芯片, 采用免疫组织化学 SABC 法检测肝组织 HBsAg, 前 S<sub>2</sub> 抗原. 首次免疫前及 4, 8, 12 wk 眼静脉采血, 分离血清置 -80℃ 保存待检. 为避免批间误差, 所有 4 次血清同时检测, 每份标本均作 1:5, 1:10, 1:25, 1:50, 1:100 稀释. 血清抗 HBs 和前 S<sub>2</sub> 抗体检测方法及其结果判断均按试剂盒说明书. 采用荧光定量 PCR 法, 对所有血清进行 HBV DNA 检测, 模板抽提及荧光检测过程均按说明书.

**统计学处理** 应用 PEMS 3.1 统计软件, 其中抗体检出率采用组内合并后进行两个样本比较的秩和检验, 而 HBV DNA 含量采用对数的标准差 *t* 检验.

## 2 结果

**2.1 重组表达质粒的构建和鉴定** 从血清 HBV 基因组模板中, 分别扩增出约 870 bp, 1.2 kb 的清晰单一条带 (图 1), 分子质量分别与 S<sub>2</sub>S、S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>S 基因片段大小相符. 对重组质粒 pcDNA3.1-S<sub>2</sub>S 和 pcDNA3.1-S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>S 的测序结果表明: S<sub>1</sub> 长 357 bp, S<sub>2</sub> 长 165 bp, S 基因长 681 bp, 符合预期的设计; 将 S 基因核苷酸序列带入 GenBank 中检索, 显示属于基因型 B / 血清亚型 adw2.

**2.2 转基因小鼠肝组织中 HBV 抗原表达** 接种上述疫苗前, 所有转基因小鼠的肝组织均能同时表达 HBsAg、前 S<sub>2</sub> 抗原, 二者主要分布于细胞浆内. 其中

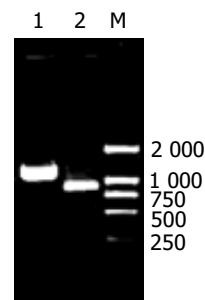


图 1 PCR 扩增 HBV S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>S、S<sub>2</sub>S 片段电泳图. M: DNA marker DL-2000; 1, 2: S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>S, S<sub>2</sub>S 的 PCR 扩增产物.

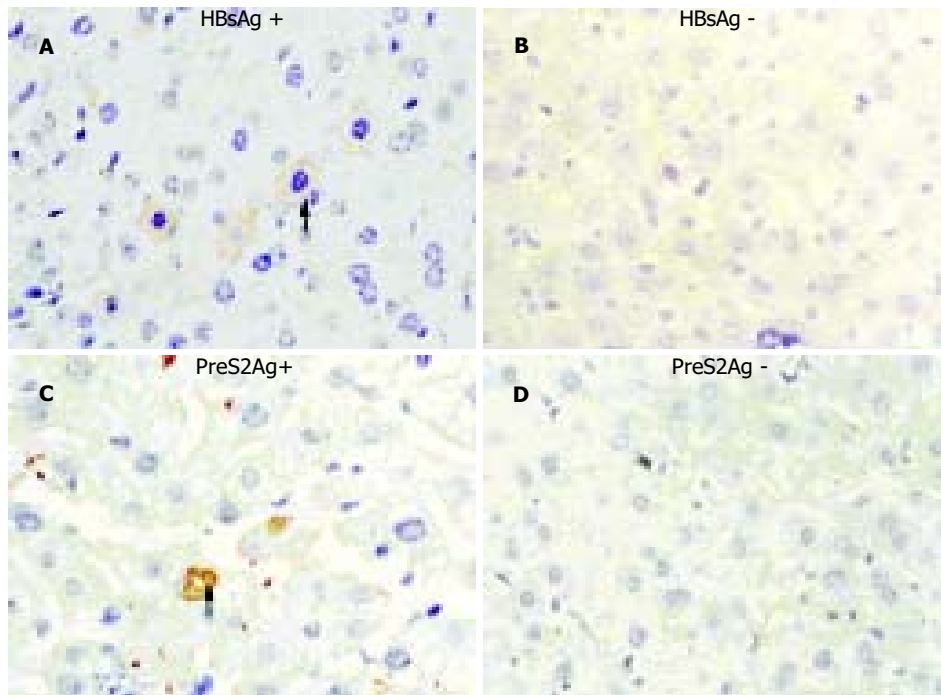


图2 pcDNA3.1-S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>S, pcDNA3.1-S<sub>2</sub>S 接种前后小鼠肝组织中 HBsAg 和前 S<sub>2</sub> 抗原(PreS2Ag)的变化(40 × 10, DAB 显色).

HBsAg 的表达强度相对更强. 随着接种次数的增多, 肝组织内 HBsAg 和前 S<sub>2</sub> 抗原的表达呈逐渐减弱的趋势, 同时未见明显的炎症坏死征象(图 2); 接种后 8wk, 在 1/3 小鼠肝组织内表达的 HBsAg 和前 S<sub>2</sub> 抗原已低于可检出的水平. 而同期对照组小鼠接种前后肝组织 HBsAg, 前 S<sub>2</sub> 抗原的表达情况未见明显改变.

2.3 外周血抗-HBs 和前 S<sub>2</sub> 抗体的诱生 疫苗接种后 4, 8, 12 wk, S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>S 组小鼠抗-HBs 检出率分别达到 50% (3/6), 67% (4/6), 100% (6/6); S<sub>2</sub>S 组则分别为 17% (1/6), 33% (2/6), 50% (3/6), 二者相比较总体差异具有显著性 ( $P < 0.05$ ). 但两组抗-HBs 滴度水平接近 (1:50). 对照组小鼠血清抗-HBs 检测全部阴性. 实验组小鼠的血清前 S<sub>2</sub> 抗体检测表明: 接种后 4 wk, S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>S 组和 S<sub>2</sub>S 组前 S<sub>2</sub> 抗体检出率均为 16.7% (1/6), 抗体水平分别为 1:2 和 1:5, 以后全部转阴性.

2.4 接种前后血清 HBV DNA 水平的变化 接种后 8-12 wk, 实验组小鼠血清 HBV DNA 滴度较 0 wk 和 4 wk 时呈明显下降 ( $P < 0.05$ ). 其中, S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>S 组第 12 wk 时 HBV DNA 滴度又低于 S<sub>2</sub>S 组 ( $P < 0.05$ ), 且 S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>S 组有一只小鼠血清 HBV DNA 自第 8 wk 起即降至可检测水平以下

表1 HBV 转基因小鼠接种后的血清 HBV DNA 滴度(对数值 mean±SD)

分组	0wk	4wk	8wk	12wk
S <sub>1</sub> S <sub>2</sub> S 组	8.27 ± 0.11	8.07 ± 0.22	7.04 ± 0.69 <sup>a</sup>	6.52 ± 0.36 <sup>a</sup>
S <sub>2</sub> S 组	8.22 ± 0.19	8.03 ± 0.18	7.21 ± 0.12 <sup>a</sup>	7.03 ± 0.23 <sup>a</sup>
对照组	8.35 ± 0.22	8.18 ± 0.59	8.02 ± 0.57	8.27 ± 0.45

<sup>a</sup>  $P < 0.05$  vs 0 wk, 4 wk 及对照组.

( $< 1 \times 10^6$  copies/L) 并保持到第 12 wk. 而对照组小鼠的血清 HBV DNA 始终保持在  $5 \times 10^5$  的相对稳定水平(表 1).

### 3 讨论

慢性 HBV 感染是严重危害人类身体健康的主要传染病之一, 迄今尚无特效的治疗药物和手段. 患者的特异性细胞免疫应答能力低下, 乃至对 HBV 的免疫耐受状态, 是 HBV 难以清除、导致感染持续状态的重要原因. 作者在既往的基因疫苗动物实验中<sup>[3-5]</sup>, 应用编码 HBV 前 S/S 抗原的真核表达质粒作为候选的乙肝基因疫苗免疫正常 BALB/c 小鼠, 诱导高滴度的抗-HBs 和前 S<sub>2</sub> 抗体产生, 并持续存在 3 mo 以上; 同时诱生一定水平的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 活性, 提示乙肝基因疫苗可诱导抗 HBV 感染的特异性体液免疫应答和细胞免疫应答. 近年的研究表明<sup>[6-7]</sup>, 乙肝基因疫苗接种 HBV 转基因小鼠后, 同样能够激发机体的特异性免疫应答, 从而提示乙肝基因疫苗接种有望打破 HBV 慢性感染者机体的免疫耐受状态, 促进乙肝病毒的清除. 国内外某些学者曾进行相关的研究, 如刘红 *et al*<sup>[8]</sup> 采用 pcDNA-S<sub>2</sub>S 诱导乙肝转基因小鼠产生抗-HBs; Roh *et al*<sup>[9]</sup> 将重组痘苗病毒 vvHBV (表达 HBsAg) 免疫乙肝转基因小鼠, 诱导出抗-HBs 和 CTL 活性; 但是, 上述学者的研究均未对疫苗接种后的治疗效应进行观察. 本文作者构建了 pcDNA3.1-S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>S 和 pcDNA3.1-S<sub>2</sub>S, 他们分别能表达乙肝外壳抗原的 S、前 S<sub>1</sub> 和/或前 S<sub>2</sub>, 作为候选乙肝基因疫苗对 HBV 转基因小鼠分组进行接种, 验证其能否抑制慢性感染者体内的 HBV 复制. HBV 转基因小鼠的染色体整合有 HBV 全基因组,

可在体内实现 HBV 基因组的复制和抗原表达. 由于免疫耐受, 转基因小鼠不能自然产生抗-HBs 和前 S<sub>2</sub> 抗体, 因而模拟了 HBV 慢性感染持续状态, 是用于研究抗 HBV 感染药物及乙肝治疗性疫苗的较好动物模型.

实验结果表明, 两种乙肝基因疫苗 pcDNA3. 1-S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>S、pcDNA3. 1-S<sub>2</sub>S 均能有效地抑制 HBV DNA 复制. 在接种 8 wk 后, 实验组 HBV DNA 开始降低, 同时肝细胞内 HBsAg 和前 S<sub>2</sub> 抗原表达明显受到抑制, 部分肝组织中 HBsAg、前 S<sub>2</sub> 抗原表达接近消失; 而在此过程中, 肝组织中未见明显的炎症反应, 提示肝细胞内病毒的清除有可能通过非细胞裂解机制进行<sup>[10-11]</sup>. 与此同时, HBV 转基因小鼠血清中检出抗-HBs, 抗-前 S<sub>2</sub>, 显示免疫耐受被打破的迹象. 上述结果表明: 乙肝基因疫苗的接种有助于解除小鼠对 HBsAg 和前 S<sub>2</sub> 抗原的长期免疫耐受状态, 可望发挥治疗性疫苗的效应, 用以清除体内慢性乙肝病毒感染. HBV 基因组的前 S<sub>1</sub> 区和前 S<sub>2</sub> 区都包含 HBV 与肝细胞膜的亲和区, 与 HBV 感染、复制及感染后的免疫清除密切相关. 其中, 前 S<sub>1</sub> 含有多个 T 细胞抗原表位, 而前 S<sub>2</sub> 抗原分子质量小, 抗原表位少但免疫原性强<sup>[12]</sup>. 我们观察到, pcDNA3. 1-S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>S, pcDNA3. 1-S<sub>2</sub>S 两个实验组在转基因小鼠的免疫效果存在差异. 实验结果显示: 接种 pcDNA3. 1-S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>S 后, HBV 转基因小鼠的血清 HBV DNA 下降幅度超过 pcDNA3. 1-S<sub>2</sub>S 接种组. 8 wk 时, pcDNA3. 1-S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>S 组甚至有 1 份标本完全转阴 (低于检测下限). 而且 pcDNA3. 1-S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>S 组血清抗-HBs 阳转率比 pcDNA3. 1-S<sub>2</sub>S 明显提高, 显示 S<sub>1</sub> 基因表达的参与能够使乙肝基因疫苗质粒在抑制 HBV DNA 复制和清除病毒的作用得到增强.

#### 4 参考文献

- Hong HJ, Ryu CJ, Hur H, Kim S, Oh HK, Oh MS, Park SY. In vivo neutralization of hepatitis B virus infection by an anti-preS1 humanized antibody in chimpanzees. *Virology* 2004; 318:134-141
- Chen X, Li M, Le X, Ma WM, Zhou BP. Recombinant hepatitis B core antigen carrying preS1 epitopes induce immune response against chronic HBV infection. *Vaccine* 2004;22: 439-446
- 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
- 秦山, 赵连三, 范红, 何芳, 雷学忠, 刘丽. 乙肝核酸疫苗 NV-HB/s 接种小鼠的免疫反应. *华西医科大学学报* 2002;33:497-500
- 赵连三, 范红, 秦山, 刘丽, 唐红, 雷秉钧. 口服接种乙型肝炎病毒核酸疫苗诱导小鼠体液免疫应答的初步研究. *中华内科杂志* 2001;40:628-629
- Livingston BD, Newman M, Crimi C, McKinney D, Chesnut R, Sette A. Optimization of epitope processing enhances immunogenicity of multiepitope DNA vaccines. *Vaccine* 2001; 19:4652-4660
- Oka Y, Akbar SM, Horiike N, Joko K, Onji M. Mechanism and therapeutic potential of DNA-based immunization against the envelope proteins of hepatitis B virus in normal and transgenic mice. *Immunology* 2001;103:90-97
- 刘红, 姚玉成, 葛军辉, 李建秀, 苏娟, 张钦宏, 胡以平. HBVpreS2-S 基因诱发的体液免疫引起乙肝转基因小鼠肝组织损伤. *第二军医大学学报* 2003;24:159-163
- Roh S, Kim K. Overcoming tolerance in hepatitis B virus transgenic mice: a possible involvement of regulatory T cells. *Microbiol Immunol* 2003;47:453-460
- Webster GJ, Reignat S, Maini MK, Whalley SA, Ogg GS, King A, Brown D, Amlot PL, Williams R, Vergani D, Dusheiko GM, Bertoletti A. Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamic of cellular immune mechanisms. *Hepatology* 2000;32:1117-1124
- Maini MK, Reignat S, Boni C, Ogg GS, King AS, Malacarne F, Webster GJ, Bertoletti A. T cell receptor usage of virus-specific CD8 cells and recognition of viral mutations during acute and persistent hepatitis B virus infection. *Eur J Immunol* 2000; 30:3067-3078
- Sominskaya I, Paulij W, Jansons J, Sobotta D, Dreilina D, Sunnen C, Meisel H, Gerlich WH, Pumpens P. Fine-mapping of the B-cell epitope domain at the N-terminus of the preS2 region of the hepatitis B surface antigen. *J Immunol Methods* 2002;260:251-261

编辑 潘伯荣 审读 张海宁