

含 A β_{1-15} 的嵌合型 HBcAg 颗粒抗原的制备及其免疫原性分析

冯改丰¹, 靳辉¹, 王唯析¹, 钱亦华¹, 王全颖², 杨广笑²

(1. 西安交通大学医学院人体解剖与组织胚胎学系, 西安 710061; 2. 西安华广生物工程公司, 西安 710025)

[摘要] 目的: 原核表达并纯化含 β -淀粉样肽 (β -amyloid peptide, A β) 氨基段 15 肽 (A β_{1-15}) 和删除 c/e1 表位的截断型 HBcAg 的融合蛋白, 观察其形成的病毒样颗粒, 检测其免疫原性, 为阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 基因工程疫苗的研究提供基础。**方法:** 将合成的 A β_{1-15} 基因连接于 HBcAg 的 1~71 的 3' 端, 再将 HBcAg 的 88~144 位氨基酸的基因片段连接于 A β_{1-15} 的基因的 3' 端, 构建重组质粒 pUC/c-A β_{15} -c, 将重组基因亚克隆于原核表达载体 pET-28a(+) 中, 构建表达质粒 pET/c-A β_{15} -c。异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG) 诱导、SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色检测重组基因的表达。表达的融合蛋白 (命名为 CA15C) 纯化后, 透射电镜观察病毒样颗粒的形成。以病毒颗粒抗原 CA15C 腹腔注射免疫昆明小鼠, 间接 ELISA 法检测小鼠血清中抗-A β 抗体的滴度。**结果:** 经酶切鉴定、DNA 序列测定证实, 目的基因重组于表达质粒之中, 与理论设计相符。诱导表达后, 在细菌裂解液的上清和沉淀中均可见表达蛋白 CA15C, 以沉淀中为多, 约占细菌沉淀总蛋白的 40%。电镜下可见纯化后的 CA15C 形成直径约 30 nm 的病毒样颗粒。昆明小鼠经 CA15C 免疫 5 次后, 其血清中抗-A β 抗体的滴度可达 1:10000, 且检测不到抗-HBc 抗体。**结论:** 原核表达制备的含 A β_{1-15} 和 HBcAg 的融合蛋白 CA15C, 可形成病毒样颗粒, 有较强的免疫原性。

[关键词] β -淀粉样肽 (A β); HBcAg; 融合蛋白; 病毒样颗粒; 基因工程疫苗

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2012.03.014

Prokaryotic expression and immunogenicity of the chimeric HBcAg containing A β_{1-15}

FENG Gaifeng¹, JIN Hui¹, WANG Weixi¹, QIAN Yihua¹, WANG Quanying², YANG Guangxiao²

(1. Department of Human Anatomy and Histo/Embryology, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061;

2. Xi'an Huaguang Biotechnology Company, Xi'an 710025, China)

ABSTRACT

Objective: To construct a recombinant prokaryotic expression plasmid pET/c-A β_{15} -c, and evaluate the immunogenicity of its encoded fusion protein as expressed in *E. coli*.

Methods: The gene fragment HBc₈₈₋₁₄₄ was amplified by PCR and subcloned to pUC19. The synthetic, double-strand A β_{1-15} gene was inserted downstream of HBc₁₋₇₁ in pGEMEX/c₁₋₇₁. After restriction enzyme digestion, c₁₋₇₁-A β_{15} was spliced to HBc₈₈₋₁₄₄, yielding the recombinant gene c-A β_{15} -c; that gene was subcloned into pET-28a(+). The fusion protein (CA15C) expressed in the transformed *E. coli* BL21 was induced with isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and analyzed by SDS-PAGE. The virus-like particle (VLP) formed by fusion protein CA15C was observed with

收稿日期 (Date of reception): 2011-04-28

作者简介 (Biography): 冯改丰, 博士, 副教授, 主要从事神经退行性疾病免疫防治的基础研究。

通信作者 (Corresponding author): 冯改丰, Email: fenggaifeng@163.com

基金项目 (Foundation items): 中央高校基本科研业务费专项资金 (xjj20100034, xjj20100174)。This work was supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (xjj20100034, xjj20100174).

transmission electric microscope (TEM). Four Kunming (KM) mice were given intraperitoneal injections of CA15C, and the anti-A β antibody elicited was detected by indirect ELISA.

Results: The sequence of the recombinant gene was confirmed by restriction enzyme digestion and DNA sequencing. After IPTG induction, the fusion protein was expressed, mainly in the sediment from the bacterial lysate. The expression level was 40% of total protein in the sediment. The CA15C could form VLP. After 5 rounds of immunization, the titer of anti-A β antibody in the sera of KM mice reached 1:10000, while the anti-HBc antibody was undetectable.

Conclusion: Recombinant c-A β_{15} -c gene can be expressed in *E.coli*. The expressed protein can form VLPs and has a strong immunogenicity.

KEY WORDS

β -amyloid peptide (A β); HBcAg; fusion protein; virus-like particle (VLP); genetic engineering vaccine

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种病因不明、缺乏有效治疗方法的中枢神经系统退行性变性疾病, 以含有 42 个氨基酸的全长的 β -淀粉样肽 (β -amyloid peptide, A β) 为抗原, 免疫可清除脑内已产生的老年斑, 阻止记忆力的缺失^[1-2]。由于全长的 A β 含有 T 细胞表位, 免疫可能会引起严重的脑膜脑炎等不良反应而限制了其进一步的临床研究和应用^[3]。研究^[4]表明, A β 的 B 细胞表位位于其氨基段, 仅用氨基段的疫苗不会引起针对 A β 的细胞免疫, 更为安全, 因而受到关注^[5]。但单纯以氨基段为抗原, 其免疫原性差, 不能产生足够的抗体滴度。

乙型肝炎病毒核心抗原 HBcAg 具有很强的抗原性和免疫原性, 其主要免疫优势区 (major immunodominant region, MIR) 位于第 80 个氨基酸附近, 为 c/e1 表位, 外源性抗原表位插入该区构成的融合蛋白不影响 HBcAg 的聚合能力, 却能介导针对外源表位的强烈的免疫应答^[6], 因而 HBcAg 是外源性短肽抗原融合的常用载体。本研究中笔者将 2 个 A β_{1-15} 基因以赖氨酸为连接子进行串联, 插入于 HBcAg 基因的 MIR 部位 (将 c/e1 表位基因置换), 构建融合基因 c-A β_{15} -c, 观察其原核表达及表达蛋白形成的颗粒及其免疫原性, 为后期的 AD 基因工程疫苗的进一步研究和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 (*E. coli*) BL21(DE3)、质粒 pUC19、HBcAg 及小鼠抗-HBc 单抗 (mAb) 等由西安华广生物工程公司提供。dNTP 和质粒 pGEM-T Easy 购于美国 Promega 公司。限制性内切酶 *EcoR* I, *Xho* I, *Sal* I 和 *BamH* I, Taq DNA 聚合酶, T4 DNA 连接

酶购于美国 Fermentas MBI 公司。抗 A β N 端抗体 (6E10) 购于美国 Santa Cruz 公司。山羊抗小鼠 IgG-HRP 购于北京中杉金桥生物技术有限公司。A β_{1-40} 肽购于上海强耀生物科技有限公司。含 HBcAg, A β_{1-42} 基因的质粒 pGEMEX/c-A β_{15} -c、含 HBc₁₋₇₁ 的质粒 pGEMEX/HBc₁₋₇₁ 由本实验室构建^[7]。pET-28 a (+) 购于德国 Novagen 公司。Ni-NTA agrose 亲和层析柱购于德国 Qiagen 公司。

1.2 方法

1.2.1 原核表达质粒 pET/c-A β_{15} -c 的构建

由赖氨酸连接的 2 个 A β_{1-15} 的双链序列 (2A β_{1-15}) 由上海捷瑞生物工程公司合成, 分别在氨基端和羧基端加上 *Xho* I 和 *BamH* I 酶切位点; 以 *Xho* I 和 *BamH* I 双酶切, 将 2A β_{15} 插入本实验室构建保存的质粒 pGEMEX/HBc₁₋₇₁ 中, 构建质粒 pGEMEX/HBc₇₁-A β_{15} ; 以质粒 pGEMEX/c-A β_{15} -c 中的 HBcAg 基因为模板, 设计扩增 HBc₈₈₋₁₄₄ 片段的引物 F: 5'-CGGATCCGGTGGAG-TCAACACTAATATGGGC-3' (下划线处为 *BamH* I 的酶切位点), R: 5'-CGTCGACCGGAAGTGTGATAG-GATAGG-3' (下划线处为 *Sal* I 酶切位点)。PCR 产物经 *BamH* I 和 *Sal* I 酶切, 胶回收后插入 pUC19 的多克隆位点, 构建质粒 pUC/HBc₈₈。

EcoR I 和 *BamH* I 双酶切 pUC/HBc₈₈ 和 pGEMEX/HBc₇₁-A β_{15} , 将 pGEMEX/HBc₇₁-A β_{15} 的小片段 (HBc₇₁-A β_{15}) 插入 pUC/HBc₈₈ 相应位置, 获得重组质粒 pUC/c-A β_{15} -c (图 1)。

EcoR I 和 *Sal* I 双酶切质粒 pUC/c-A β_{15} -c 和 pET-28a(+), 将 c-A β_{15} -c 插入 pET-28a(+), 构建表达质粒 pET/c-A β_{15} -c。

1.2.2 融合基因 c-A β_{15} -c 的原核诱导表达

将含有表达质粒 pET/c-A β_{15} -c 的菌液 BL21(DE3) 接种于 200 mL 含卡那霉素的 LB 培养液

中, 同样接种含空质粒 pET28 的菌液作为对照。于 30 °C 振荡培养至培养液的 $A_{600\text{nm}}$ 值达 0.4~0.6 时, 加入异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG) 诱导表达, 继续振荡培养 8 h。

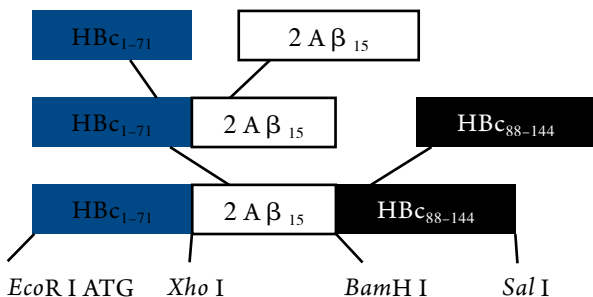


图1 融合基因 c-A β_{15} -c 制备示意图。融合基因的氨基端为 *EcoRI* 酶切位点, 羧基端为 *SalI* 酶切位点, 中间 A β_{1-15} 两端分别为 *XhoI* 和 *BamHI* 的酶切位点。

Figure 1 Schematic presentation of the recombinant gene c-A β_{15} -c. N-terminus of recombinant gene is *EcoRI*, C-terminus of recombinant gene is *SalI*, 2A β_{1-15} is between *XhoI* and *BamHI*.

1.2.3 表达蛋白的分离和考马斯亮蓝染色

将诱导表达后的培养液于 4 °C 离心, 弃上清, 沉淀用裂解缓冲液 (50 mmol/L Tris HCl, pH8.0, 100 mmol/L NaCl 及 10 mmol/L EDTA) 洗涤、重悬, 冻融 3 次后, 超声破碎裂解细菌。4 °C 离心, 分别收集上清和沉淀, 进行 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色。采用凝胶成像分析系统判定融合蛋白 (命名为 CA15C) 的表达水平。

1.2.4 融合蛋白 CA15C 的纯化

将含有融合蛋白 CA15C 的细菌裂解液, 用饱和硫酸铵溶液 (pH 7.4) 盐析并用 0.1 mol/L PBS (pH 7.4) 透析除盐后, Ni-NTA agrose 亲和层析纯化, -20 °C 保存。

1.2.5 融合蛋白 CA15C 的 Western 印迹检测

纯化后的表达蛋白经 SDS-PAGE, 根据蛋白 Marker 及目的蛋白的大小, 切取相应部位的胶块, 剪切相同大小的 NC 膜, 转膜 2.5 h。用 5% 脱脂奶 37 °C 封闭 2 h, 加入 1:300 的抗 A β N 端抗体 (6E10), 37 °C 下静置 2 h, PBST 洗涤, 加入 1:1000 的 HRP-羊抗鼠 IgG, 37 °C 下静置 1 h, 洗涤后加入发光液, 进行化学发光、显影和定影。

1.2.6 融合蛋白 CA15C 的电镜观察

取纯化后的融合蛋白 CA15C 10 μ L, 滴加于 200 目铜网上孵育 5 min, 1% 磷钨酸负染 5 min, HITACHI H-600 透射电镜下观察病毒样颗粒 (virus-like particle, VLP) 的形成。

1.2.7 融合蛋白 CA15C 免疫原性的检测

实验选用雌性昆明小鼠 4 只, 6~8 周龄, 质量 20~22 g, 由西安交通大学医学院实验动物中心提供。

免疫方案: 间隔 1 周腹腔注射免疫 1 次, 100 μ L/ 只。第 1 次免疫用等体积的弗氏完全佐剂与融合蛋白 (10 μ g) 的乳化混合物, 第 2 次免疫用弗氏不完全佐剂与融合蛋白 (10 μ g) 的乳化混合物; 此后免疫时仅用融合蛋白 (10 μ g) 而不加佐剂。共免疫 5 次, 在初次免疫前和第 3, 4, 5 次免疫后 1 周, 剪鼠尾采血分离血清。间接 ELISA 检测血清中抗体滴度: 分别用 A β_{1-40} 肽及 HBCAg 包被酶标板, 依次加不同稀释度的动物血清及 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG (1:5000), 以 TMB 显色, 终止反应后, 用酶标仪测定 $A_{450\text{nm}}$, 以免疫前血清作阴性对照, P/N>2.1 者判为阳性。

2 结果

2.1 重组质粒 pUC/c-A β_{15} -c 的鉴定及测序

2.1.1 酶切鉴定

重组质粒 pUC/c-A β_{15} -c 理论上大小为 3.3 kb, 分别经不同的酶切后, 可切下不同大小的基因片段。用 *EcoRI*+*SalI* 双酶切, 可切下全长 c-A β_{15} -c 片段 (约 523 bp); 用 *BamHI*+*XhoI* 双酶切, 可切下 2A β_{15} 片段 (约 110 bp)。10 g/L 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 酶切片段的大小与理论值相一致 (图 2)。

2.1.2 DNA 测序

重组质粒 pUC/c-A β_{15} -c 由北京奥科生物技术有限责任公司进行 DNA 序列测定, 结果与理论设计完全相符。测序结果见图 3。

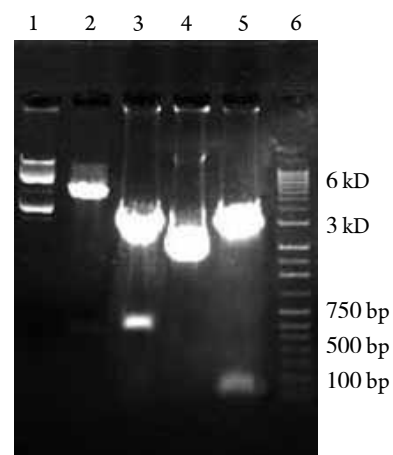


图2 重组质粒 pUC/c-A β_{15} -c 和 pET/c-A β_{15} -c 的酶切鉴定。1: pET/c-A β_{15} -c; 2: pET/c-A β_{15} -c/*EcoRI*+*SalI*; 3: pUC/c-A β_{15} -c/*EcoRI*+*SalI*; 4: pUC/c-A β_{15} -c; 5: pUC/c-A β_{15} -c/*XhoI*+*BamHI*; 6: HBI 1.0 kb+DNA ladder。

Figure 2 Restrictive enzyme digestion analysis of recombinant plasmid pUC/c-A β_{15} -c and pET/c-A β_{15} -c. 1: pET/c-A β_{15} -c; 2: pET/c-A β_{15} -c/*EcoRI*+*SalI*; 3: pUC/c-A β_{15} -c/*EcoRI*+*SalI*; 4: pUC/c-A β_{15} -c; 5: pUC/c-A β_{15} -c/*XhoI*+*BamHI*; 6: HBI 1.0 kb+DNA ladder.

2.2 表达质粒 pET/c-A β_{15-c} 的酶切鉴定

分别用 *EcoR* I+*Sal* I 双酶切质粒 pUC/c-A β_{15-c} 和 pET-28a(+), 琼脂糖凝胶电泳回收含有 c-A β_{15-c} 基因 (约 523 bp) 的片段和 pET-28a(+) 的载体大片段, 用 T4 DNA 连接酶连接, 即得到原核表达质粒。理论上推算, 载体 pET/c-A β_{15-c} 大小为 5.9 kb, 经 *EcoR* I + *Sal* I 双酶切后, 可切下含有

c-A β_{15-c} 基因 (约 523 bp) 的片段。琼脂糖凝胶电泳显示与理论推断值相符 (图 2)。

2.3 重组质粒 pET/c-A β_{15-c} 的表达

以重组质粒 pET/c-A β_{15-c} 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 由 IPTG 诱导表达。表达产物经超声破碎后进行 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色, 可见

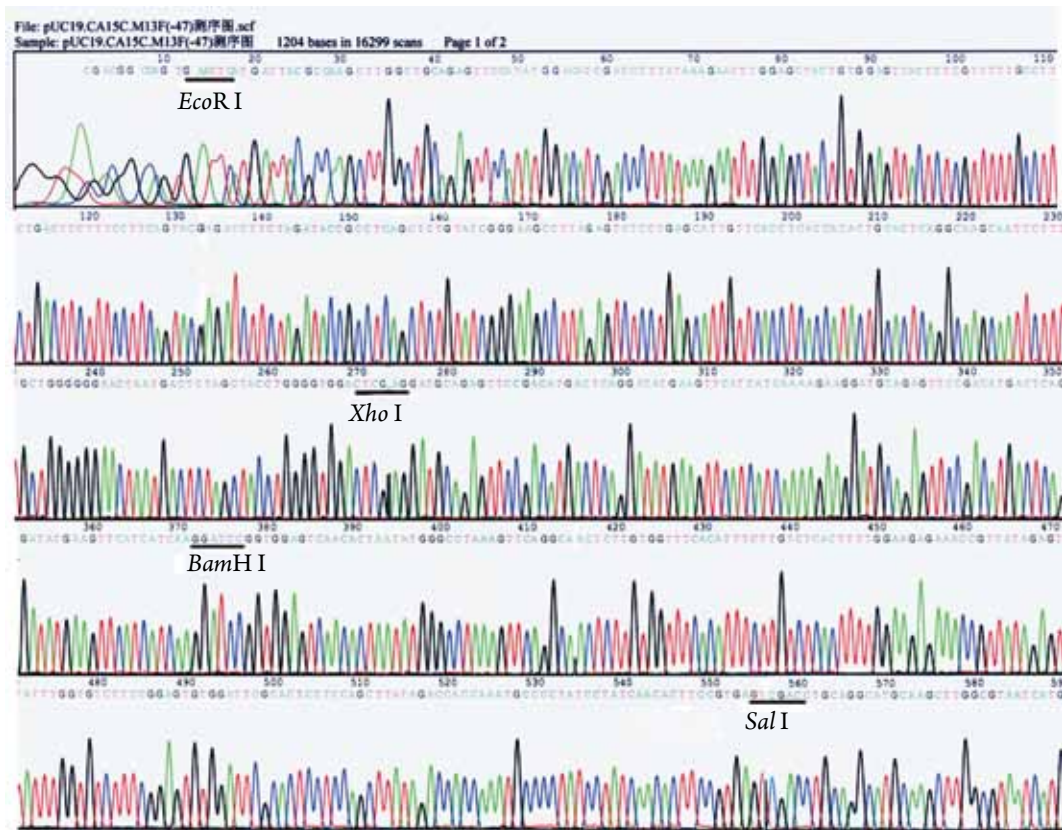


图 3 重组质粒 pUC/c-A β_{15-c} 的部分测序图。EcoRI 和 Xho I 酶切位点之间为 HBC₁₋₇₁ 基因序列, Xho I 和 BamH I 的酶切位点之间为 2A β_{1-15} 基因序列, Xho I 和 SalI 酶切位点之间为 HBC₈₈₋₁₄₄ 基因序列。

Figure 3 Partial sequencing result of the recombinant plasmid pUC/c-A β_{15-c} . HBC₁₋₇₁ is between *EcoR* I and *Xho* I, 2A β_{1-15} is between *Xho* I and *BamH* I, HBC₈₈₋₁₄₄ is between *Xho* I and *Sal* I.

在上清和沉淀中均出现分子质量为 20 kD 的 1 条新的蛋白条带 (图 4), 与融合蛋白 CA15C 的理论值 (21561) 相符, 而沉淀中的蛋白含量高于上清, 表明 CA15C 主要以包涵体的形式存在于细菌的沉淀中。经凝胶光密度扫描分析, CA15C 约占细菌裂解上清总蛋白含量的 13%, 占细菌裂解沉淀总蛋白含量的 40%。

2.4 融合蛋白 CA15C 的 Western 印迹鉴定

含融合蛋白 CA15C 的上清和沉淀经 SDS-PAGE, 抗 A β N 端抗体 (6E10) 进行 Western 印迹检测, 可见在 20 kD 附近有显色条带, 且沉淀中含量明显大于上清 (图 5)。证明在考马斯亮蓝染色中所见的蛋白条带可与抗 A β N 端抗体进行反应。

2.5 融合蛋白 CA15C 的电镜观察

CA15C 经纯化后, 在透射电镜下可见直径大小约 30 nm 的空心负染颗粒, 其大小与 HBcAg 所形成的颗粒相似。表明 A β_{15} 与截断型 HBc 形成的融合蛋白可形成 VLP (图 6)。

2.6 免疫小鼠血清中抗体滴度的检测

第 2 次免疫后, 4 只小鼠中有 2 只血清中抗 -A β 抗体的滴度可达到 1:4000, 2 只在 1:2000 左右。由于 CA15C 中缺乏 HBcAg 的 c/e1 抗原决定簇, 免疫后的血清中抗 -HBc 抗体的滴度很低, 几乎检测不到。第 5 次免疫后, 小鼠血清中抗 -A β 抗体滴度均超过 1:10000。

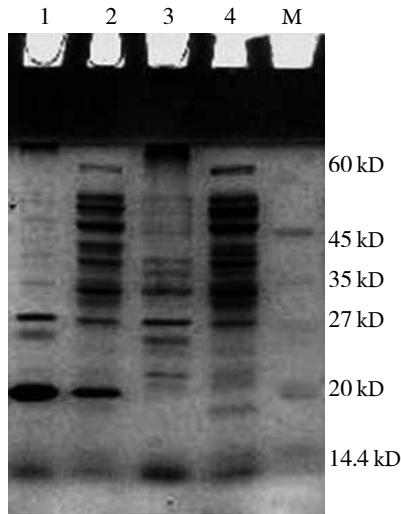


图4 融合基因 c-A β_{15-c} 诱导表达后的 SDS-PAGE 分析。1: pET/c-A β_{15-c} 表达的细菌裂解液沉淀; 2: pET/c-A β_{15-c} 表达的细菌裂解液上清; 3: pET-28a(+) 表达的细菌裂解液沉淀; 4: pET-28a(+) 表达的细菌裂解液上清; M: 蛋白分子量 marker。

Figure 4 SDS-PAGE analysis of fusion gene c-A β_{15-c} expressed in *E.coli* BL21. 1: Sediment of lysate of *E.coli* transformed by pET/c-A β_{15-c} ; 2: Supernatant of lysate of *E.coli* transformed by pET/c-A β_{15-c} ; 3: Sediment of lysate of *E.coli* transformed by pET-28a(+); 4: Supernatant of lysate of *E.coli* transformed by pET-28a(+); M: Protein marker.

3 讨论

目前, AD 的治疗多为缓解病情、改善症状等对症或支持治疗, 尚没有能阻止病情进展或逆转病理改变的可靠措施。疫苗的研究使人们看到了防治 AD 的希望。针对 A β 的疫苗不但可降低脑内的老年斑, 而且可减少 Tau 的病理改变^[8], 阻止神经元丢失。

理想的疫苗是既能产生高滴度的抗体, 又可避免产生或尽量减少不良反应。全长 A β_{42} 在中间和羧基端含有 T 细胞表位, 以其为抗原, 部分患者可引起脑膜脑炎等不良反应。越来越多的研究显示, 氨基端的 A β 在免疫中是安全的, 而且发挥清除老年斑、防止 A β 聚集纤维化的抗体为针对其氨基段的抗体。

目前国内外在 AD 的主动免疫的研究中, 大多采用直接化学合成 A β 氨基段多肽^[9-10], 这种方法具有一定的局限性和不足: 技术设备要求高、成本

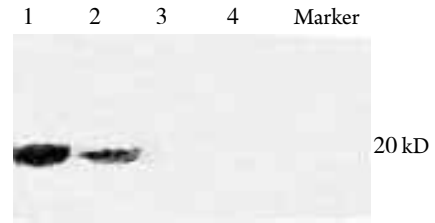


图5 融合蛋白 CA15C 的 Western 印迹鉴定。1: pET/c-A β_{15-c} 表达的细菌裂解液沉淀; 2: pET/c-A β_{15-c} 表达的细菌裂解液上清; 3: pET-28a(+) 表达的细菌裂解液沉淀; 4: pET-28a(+) 表达的细菌裂解液上清; M: 蛋白分子量 marker。

Figure 5 Identification of the fusion protein CA15C by Western blot. 1: Sediment of lysate of *E.coli* transformed by pET/c-A β_{15-c} ; 2: Supernatant of lysate of *E.coli* transformed by pET/c-A β_{15-c} ; 3: Sediment of lysate of *E.coli* transformed by pET-28a(+); 4: Supernatant of lysate of *E.coli* transformed by pET-28a(+).

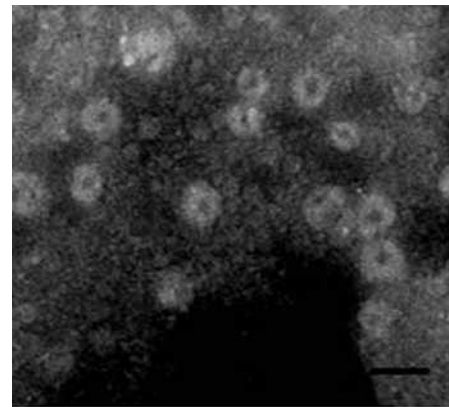


图6 融合蛋白 CA15C 形成的嵌合型 HBcAg 病毒样颗粒的电镜观察 (Bar=50 nm)。

Figure 6 Chemeric HBcAg virus-like-particle formed by fusion protein under transmission electron microscope (Bar=50 nm).

较高, 而且单纯合成的 A β 多肽的免疫反应弱, 使之研究和推广受到了很大限制。

为增强短肽疫苗的免疫原性, 国内外进行了很多的探索。通过基因工程获得含有 A β 及载体 (carrier) 的基因工程疫苗是研发的新方向。将 A β 融合于乳头瘤病毒、鼠白血病病毒等载体均有文献^[11-12]报道。HBcAg 是基因工程疫苗常用的载体。完整的单体 HBcAg 蛋白含有 183 个氨基酸, 180 或 240 个单体之间可聚合、组装而形成有立体构造的病毒样颗粒。氨基端的 144 个氨基酸是组装的必要部分, 删除 C-端的 39 个氨基酸的截断型 HBc(HBc Δ) 同样可组装成病毒样颗粒, 每个单体都有一个刺突样的抗原决定簇 (MIR) 位于颗粒的表面, 不影响抗原决定簇的暴露, 而且对 HBV 已感染者亦有效^[13-14]。更为重要的是, 可通过适当地删除部分 MIR c/e1 表位, 减弱或消除 HBcAg 本身的免疫原性, 因而受到研究者的青睐。

在前期的 AD 疫苗研究工作中, 笔者将 A β_{1-42} 基因插入于 HBcAg 基因的中间部位 (编码 72~87 氨基酸区), 并使其在大肠杆菌 DH5 α 和 BL21 中表达融合蛋白 c-A β_{42} -c。结果显示: 融合基因能在大肠杆菌中表达, 表达的融合蛋白主要以包涵体的形式存在于细菌裂解物的沉淀中, 表达量为细菌沉淀总量的 16% 和 30%^[7,15], 用其免疫可防止聚集态 A β 对 SD 大鼠的毒性作用^[16]。

本实验中, 为减少不良反应, 笔者仅采用氨基端 A β 。为将 A β_{1-15} 插入到 HBc Δ 的主要免疫优势区, 采用含 6his 的高表达质粒 pET-28a(+) 和相应的宿主菌 BL21。结果显示目的基因插入后, 经 IPTG 诱导, 可将产量提高到接近沉淀总蛋白 40%。Western 印迹显示融合蛋白可被抗 A β 抗体识别。电镜观察, 融合蛋白可形成 VLP。免疫昆明小鼠, 5 次后其血清中 A β 的平均抗体滴度达到 1:10000。说明所制备的基因工程疫苗具有很强的免疫原性。

氨基段 A β_{1-15} 抗体的有效性已得到多数实验室的验证。由于不含有 A β 的 T 细胞表位, 氨基段 A β_{1-15} 较全长 A β 更为安全。因此, 融合后的基因工程疫苗不仅安全有效, 而且生产工艺简单, 成本较低, 具有广阔的研究和应用前景。

参考文献

- Schenk D, Barbour R, Dunn W, et al. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse [J]. *Nature*, 1999, 400 (6740): 173-177.
- Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, et al. Abeta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease [J]. *Nature*, 2000, 408 (6815): 982-985.
- Gilman S, Koller M, Black RS, et al. Clinical effects of A β immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial [J]. *Neurology*, 2005, 64 (9): 1553-1562.
- Monsonogo A, Zota V, Karni A, et al. Increased T cell reactivity to amyloid beta protein in older humans patients with Alzheimer disease [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112 (3): 415-422.
- Seabrook TJ, Thomas K, Jiang L, et al. Dendrimeric A β 1-15 is an effective immunogen in wildtype APP tg mice [J]. *Neurobiol Aging*, 2007, 28 (6): 813-823.
- Yin Y, Zhang J, Dong D, et al. Chimeric hepatitis B virus core particles carrying an epitope of anthrax protective antigen induce protective immunity against Bacillus anthracis [J]. *Vaccine*, 2008, 26 (46): 5814-5821.
- 冯改丰, 胡海涛, 李月英, 等. 重组基因 c-A β -c 的制备及其表达蛋白的免疫原性分析 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005, 21 (5): 533-537.
- FENG Gaifeng, HU Haitao, LI Yueying, et al. Construction and prokaryotic expression of recombinant gene c-A β -c and the immunogenicity analysis of the fusion protein [J]. *Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2005, 21 (5): 533-537.
- Wilcock D, Gharkholonarehe N, Van Nostrand W, et al. Amyloid reduction by amyloid- β vaccination also reduces mouse tau pathology and protects from neuron loss in two mouse models of Alzheimer's disease [J]. *J Neurosci*, 2009, 29 (25): 7957-7965.
- Nemirovsky A, Fisher Y, Baron R, et al. Amyloid beta-HSP60 peptide conjugate vaccine treats a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Vaccine*, 2011, 29 (23): 4043-4050.
- Li H, Zou J, Yao Z, et al. Tetravalent Abeta1-15 vaccine reduces TCR-positive cell infiltration and up-regulates p75 in Tg2576 brains compared to Abeta42 vaccine [J]. *J Neuroimmunol*, 2010, 219 (1/2): 8-16.
- Eduardo Z, Alessandra H, Saeed SK, et al. Papillomavirus-like particles are an effective platform for amyloid- β immunization in rabbits and transgenic mice [J]. *J Immunol*, 2006, 177 (4): 2662-2670.
- Bach P, Tschape JA, Kopeitz F, et al. Vaccination with A β -displaying virus-like particles reduces soluble and insoluble cerebral A β and lowers plaque burden in APP transgenic mice [J]. *J Immunol*, 2009, 182 (12): 7613-7624.
- Geldmacher A, Skrastina D, Borisova G, et al. A hantavirus nucleocapsid protein segment exposed on hepatitis B virus core particles is highly immunogenic in mice when applied without adjuvants or in the presence of pre-existing anti-core antibodies [J]. *Vaccine*, 2005, 23 (30): 3973-3983.
- Marina DF, Wouter M, Anouk S, et al. Universal influenza A M2e-HBc vaccine protects against disease even in the presence of pre-existing anti-HBc antibodies [J]. *Vaccine*, 2008, 26 (51): 6503-6507.
- 刘朝晖, 冯改丰, 李月英, 等. β 淀粉样肽与 HbcAg/MIR 融合蛋白的免疫血清在 AD 转基因细胞模型中的生物效应 [J]. *四川大学学报: 医学版*, 2007, 38 (4): 608-612.
- LIU Zhaohui, FENG Gaifeng, LI Yueying, et al. Biological effects of immune serum from fusion protein of β -amyloid peptide and HbcAg/MIR on AD transgenic cells [J]. *Journal of Sichuan University. Medical Science Edition*, 2007, 38 (4): 608-612.
- 冯改丰, 胡海涛, 靳辉, 等. 融合蛋白 CAC 免疫对海马内注射 β -淀粉样肽大鼠的作用 [J]. *南方医科大学学报*, 2011, 31 (7): 1236-1239.
- FENG Gaifeng, HU Haitao, JIN Hui, et al. Immunization with recombinant HBcAg and β -amyloid peptide fusion protein promotes clearance of intrahippocampally injected β -amyloid peptide in rats [J]. *Journal of Southern Medical University*, 2011, 31 (7): 1236-1239.

(本文编辑 郭征)