

# DNA 疫苗对小鼠 HCV - C 皮下移植瘤的防治

孙 利,周永兴,郝春秋,冯志华,赵 君,胡沛臻,付 勇,马福成,常吉庆,王九平,聂青和

孙利,周永兴,郝春秋,冯志华,王九平,聂青和,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038  
赵君,胡沛臻,付勇,马福成,中国人民解放军第四军医大学病理学教研室 陕西省西安市 710032  
常吉庆,山西省临汾市肿瘤医院 041000  
孙利,女,1971-02-22生,1995年于第四军医大学获医学本科学位,现攻读第四军医大学医学硕士学位,从事丙肝DNA疫苗方面的研究。  
国家自然科学基金资助, No. 39800122  
项目负责人:孙利,710038,陕西省西安市,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心。 sunli200096 @sina.com.cn  
电话:029-3377595  
收稿日期:2002-10-29 接受日期:2002-11-16

## Effect of DNA vaccine on anti-HCV infection in mice with subcutaneous inoculating tumor

Li Sun, Yong-Xing Zhou, Chun-Qiu Hao, Zhi-Hua Feng, Jun Zhao, Pei-Zhen Hu, Yong Fu, Fu-Cheng Ma, Ji-Qing Chang, Jiu-Ping Wang, Qing-He Nie

Li Sun, Yong-Xing Zhou, Chun-Qiu Hao, Zhi-Hua Feng, Jiu-Ping Wang, Qing-He Nie, The Center of Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases of PLA, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China  
Jun Zhao, Pei-Zhen Hu, Yong Fu, Fu-Cheng Ma, Department of Pathology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China  
Ji-Qing Chang, Tumour Hospital, Linfen 041000, Shanxi Province, China  
Supported by the Natural Scientific Foundation of Shaanxi Province, No. 39800122  
Correspondence to: Master Li Sun, The Center of Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases of PLA, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China.  
sunli200096 @sina.com.cn  
Received: 2002-10-29 Accepted: 2002-11-16

## Abstract

AIM: To investigate the effect of DNA vaccine on infection of hepatitis C virus (HCV) in mice model of subcutaneous inoculating tumour of HCV - C.

MEHODS: SP2/0 cell was transfected with pcDNAHCV-C with the lipofectamine and confirmed the ability to express the HCV-C antigen steadily, and then inoculated subcutaneously into Balb/c mice. The formed nodules were removed surgically and examined pathologically.

RESULTS: T lymphocytes infiltrated dominately in inoculated tumour; HCV-C antigen was mainly expressed in cytoplasm and membrane of Sp2/0 cell, and scarcely in nucleolus; The level of expression of HCV-C antigen in experimental group was significantly lower than that in control group.

CONCLUSION: HCV-C DNA vaccine has the effect against HCV infection.

Sun L, Zhou YX, Hao CQ, Feng ZH, Zhao J, Hu PZ, Fu Y, Ma FC, Chang JQ, Wang JP, Nie QH. Effect of DNA vaccine on anti-HCV infection in mice with subcutaneous inoculating tumor. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003; 11(2): 165-168

## 摘要

目的:从病理组织学方面验证DNA疫苗对小鼠HCV-C皮下移植瘤的预防及治疗作用,为将来的临床应用提供动物实验依据。

方法:利用脂质体转染技术将pcDNA HCV-C质粒转染SP2/0细胞并将稳定表达HCV C抗原的SP2/0细胞皮下接种于Balb/c小鼠,成瘤后取小鼠瘤组织,用病理组织学方法验证DNA疫苗对HCV-C皮下移植瘤的预防及治疗作用。

结果:肿瘤组织中以T淋巴细胞浸润为主;HCV-C抗原表达主要在SP2/0细胞的细胞质和胞膜上,少数位于胞核中;对照组HCV-C抗原表达明显强于实验组。

结论:HCV-C DNA疫苗对HCV的感染有预防和治疗作用。

孙利,周永兴,郝春秋,冯志华,赵君,胡沛臻,付勇,马福成,常吉庆,王九平,聂青和。  
DNA疫苗对小鼠HCV-C皮下移植瘤的防治。世界华人消化杂志 2003; 11(2): 165-168

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/165.htm>

## 0 引言

丙型肝炎呈世界性,常呈持续感染,是一严重危害人类身心健康的传染性疾病。目前除了部分患者对于干扰素(IFN)有部分应答之外<sup>[1-4]</sup>,至今尚无特异性的预防和治疗措施。因此寻求免疫预防及治疗措施以防止这种致死性疾病的发生至关重要。DNA免疫能诱导细胞免疫及体液免疫,从而使其成为免疫治疗的策略之一<sup>[5,6]</sup>。

## 1 材料和方法

1.1 材料 5-8周龄 Balb/c小鼠由本校动物中心提供,小鼠骨髓瘤SP2/0细胞由本校免疫学教研室惠赠,重组真核表达质粒pcDNA HCV-C基因和CMV启动子由本室构建。胰蛋白酶、酵母提取物为Oxford公司产品;氨苄青霉素为齐鲁制药厂产品;琼脂糖为BRL产品;溴化乙锭(EB)为华美公司产品;质粒提取及纯化试剂盒(大量)为上海华舜生物工程公司产品;质粒超大量提取试剂盒为Sigma公司产品;脂质体 lipofectamine 2000和DMEM均为Gibco公司产品;国产小牛血清为杭州四季青公司产品;核酸内切酶HindIII, XhoII, DNA/HindIII, DNA/EcoRI+HindIII, G418, 荧光标记的羊抗人IgG和过氧化物酶标记的羊抗小鼠IgG均购自华美生物工程公司;小鼠抗HCV-C单克隆抗体由南京军区总医院检验科李保全主任惠赠。

**1.2 方法** 用含 100 mL/L 小牛血清的 DMEN 培养基,于 50 mL/L CO<sub>2</sub> 孵箱中培养.取重组质粒 DNA 20 μg,加 1/10 体积 3 mol/L NaAc 及 3 倍体积的无水乙醇,混匀后置 -20 过夜,1 000 g 离心 10 min,弃上清,加 700 mL/L 乙醇 1 mL 轻轻冲洗管壁,弃上清后倒置无菌超净台约 1 h,吹干备用.收获 SP2/0 细胞,将  $2 \times 10^5$  细胞重悬于完全培养基 2 mL 中.转种于 35 mm 培养瓶,37 50 mL/L CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 18-24 h,使细胞达 50-80 % 汇合,于无菌 Ep 管中制备溶液 A:质粒 DNA 20 μg 溶于无血清培养基 100 μL 中,溶液 B:lipofectamine 15 μL 加无血清培养基 85 μL,溶液 A 和溶液 B 轻轻混合,置室温 15 min;弃取细胞培养基,用无血清培养基洗涤细胞 1 次,将 lipofectamine-DNA 混合物 200 μL 加无血清培养基 800 μL,轻轻混匀,小心滴加至细胞上,置 37 50 mL/L CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 15-18 h,弃取培养基,加完全培养基 2 mL 继续培养.转染 72 h 后,取少量细胞滴加在微孔玻片上,晾干,冰丙酮固定 15 min, PBS 洗涤 3 次,每次 3 min,滴加 HCV 阳性患者血清(1:20 稀释),5 % CO<sub>2</sub> 孵箱中湿育 1 h, PBS 液洗涤 3 次,加荧光标记羊抗人 IgG (1:200 稀释),50 mL/L CO<sub>2</sub> 孵箱中湿育 1 h 后,置荧光显微镜下观察转染细胞瞬时表达情况.同时,细胞按 1:4 传代,继续培养,细胞达 50-80 % 汇合后,更换浓度为 400 mg/L 的 G418 培养基进行筛选,约 96 h 后,对照细胞大部分死亡时,筛选液 G418 浓度降至为 150 mg/L,维持筛选约 3 wk,待被转染细胞 HCV-C 抗原荧光染色均阳性后,将其做为靶细胞备用.将 pcDNA HCV-C 质粒转染并稳定表达 HCV-C 抗原的 SP2/0 细胞(SP2/0-HCV-C)以每只 Balb/c 小鼠  $5 \times 10^6$  /L 右肋皮下接种观察肿瘤形成情况.将 16 只小鼠随机分为预防组和治疗组(记为 A 组和 B 组),A 组又随机分为对照组和实验组(记为 A<sub>1</sub> 组和 A<sub>2</sub> 组),分别注射空载体 pcDNA3 和重组体 pcDNA HCV-C 质粒,2 wk 后与 B 组同时接种 SP2/0-HCV-C, B 组又随机分为对照组和实验组(记为 B<sub>1</sub> 组和 B<sub>2</sub> 组),于接种后 3 d 开始治疗,每次股四头肌肌肉注射 1 g/L 质粒 100 μL,1 次/wk,共 4 次,每次注射质粒前 24 h 于小鼠股四头肌注射 2.5 mL/L 布比卡因 100 μL.观察成瘤时间、肿瘤大小及小鼠存活情况.治疗 4 wk 后,拉颈处死各组小鼠,取出瘤体,直接做冰冻切片,其余用 40 g/L 甲醛固定,做成石蜡切片,用免疫组化的方法观察瘤组织内 HCV-C 抗原表达情况.一抗用小鼠 HCV-C 单克隆抗体,二抗用过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG,最后 DAB 显色.另外做特异性 T 淋巴细胞标记,看肿瘤组织中 T、B 淋巴细胞浸润情况.由本校病理学教研室 协作完成.

## 2 结果

用免疫荧光法检测表明, SP2/0 细胞内的表达产物,可与 HCV-C 单抗发生特异性结合(图 1,2).pcDNA HCV-C 对 SP2/0-HCV-C 细胞在小鼠体内成瘤时间延长, B<sub>2</sub> 组尤为明显(图 3,4).肿瘤组织中以 T 淋巴细胞浸润为主(图 5);HCV-C 抗原表达主要在 SP2/0 细胞的细胞质和胞膜上,少数位于胞核中,对照组 HCV-C 抗原表达明显强于实验组(图 6-9).

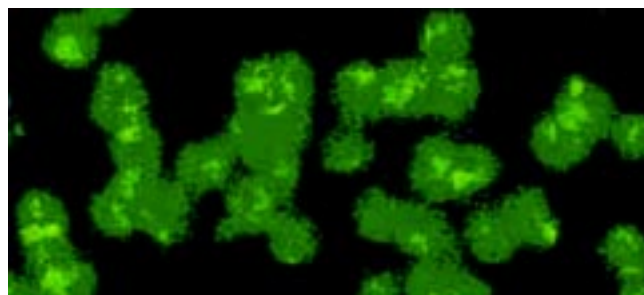


图 1 免疫荧光法检测 SP2/0 细胞内的表达.

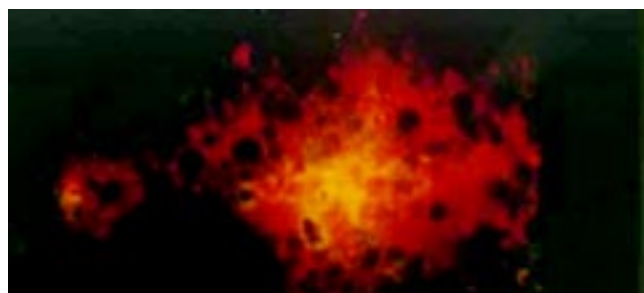
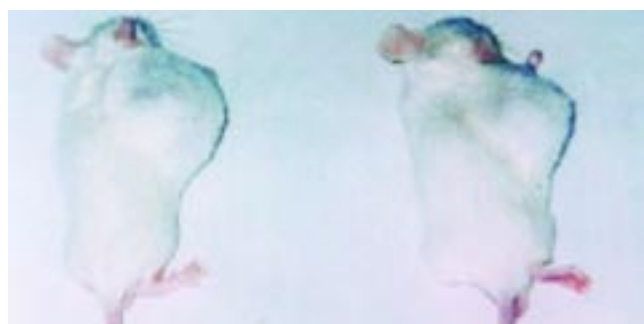


图 2 阴性对照产物与 HCV-C 单抗发生特异性结合.



左:对照组 右:实验组  
图 3 预防组小鼠成瘤情况.



左:对照组 右:实验组  
图 4 治疗组小鼠成瘤情况.

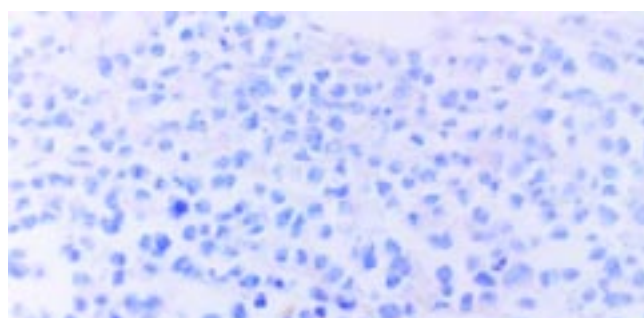


图 5 肿瘤组织特异性 T 淋巴细胞显色



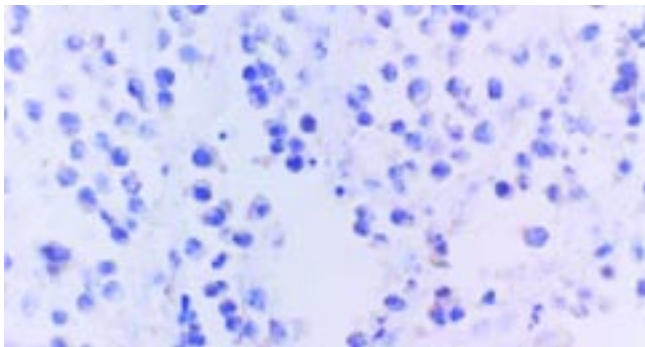


图6 A1 组 HCV - C 抗原表

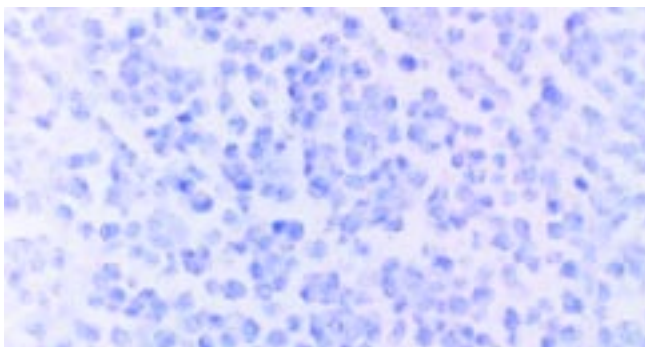


图7 A2 组 HCV - C 抗原表达

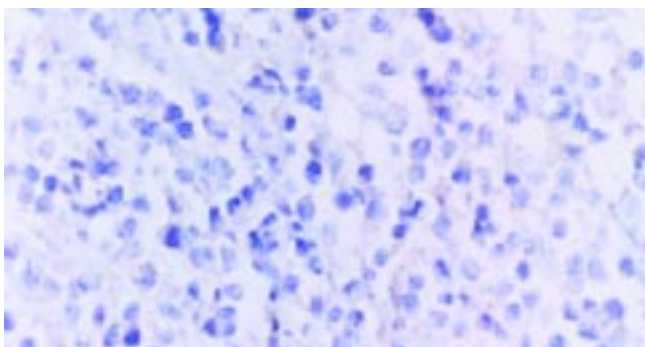


图8 B1 组 HCV - C 抗原表达

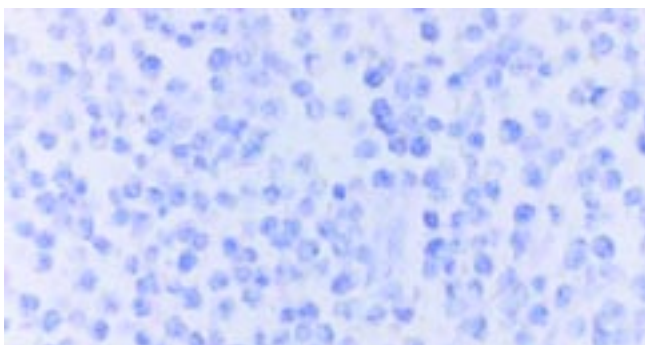


图9 B2 组 HCV - C 抗原表达

### 3 讨论

丙型肝炎是一种严重的进展性肝病,急性丙型肝炎患者中有50-60%转为慢性,其中5 a内20%发展为肝硬化,且与肝细胞癌(HCC)的发生密切相关<sup>[5,7-12]</sup>。我国输血后HCV感染率为34.8%左右,献血人群中HCV感染率达40%<sup>[13]</sup>,是流行范围仅次于乙型肝炎的第二大传染性肝

病。HCV为单股正链RNA病毒,HCV-RNA全长9 600 bp,含有一个大的单一开放阅读框(ORF),编码约3 010个氨基酸的病毒前体蛋白。在HCV的编码基因中,核心区(C区)序列具有高度遗传保守性,核心蛋白定位于胞核中<sup>[14]</sup>,C基因表达产物具有良好的抗原稳定性。人肝细胞<sup>[15]</sup>和黑猩猩对HCV很敏感,但HCV体外培养尚未找到敏感有效的细胞培养系统。有报道HCV核心蛋白在酵母中表达成功<sup>[16]</sup>;以非融合蛋白的方式,在大肠杆菌中高效表达了完整的HCV核心蛋白,具有较高生物活性<sup>[17,18]</sup>。Hao et al<sup>[19]</sup>构建了HCV C基因腺病毒表达载体的骨架质粒,并证实其可以在7721细胞中瞬时表达HCV C基因。应用PCR方法获取完整的HCV核心区cDNA片段,克隆到真核表达载体PBK-CMV上,可在HepG2中稳定表达C蛋白,提供了理想的实验用细胞株<sup>[20]</sup>。

丙型肝炎发病机制仍未明。体液免疫应答总的效应很弱,不能有效地中和病毒。多数学者认为细胞免疫病理反应可能起重要作用,其组织浸润细胞以CD3<sup>+</sup>为主,细胞毒T细胞(TC)特异攻击HCV感染的靶细胞,可引起肝细胞损伤。

DNA疫苗是一种新的针对靶抗原诱导产生免疫的方法。他直接使识别基因编码的抗原和包含基因片段的抗原成为疫苗传播媒介,识别候选基因可快速进入感染机体和肿瘤细胞。DNA一项优点是在免疫的所有路径均显示了活性,特别是细胞毒T细胞反应,而在蛋白疫苗中很难产生。对于各种病毒包括那些血液传播的病毒,DNA疫苗均可被用于预防措施中。对于慢性感染和肿瘤患者,DNA疫苗则可作为一种治疗措施。在这种情况下,可把具有免疫活性的基因片段引入疫苗中,对基因片段进行合适处理以及联合增加免疫的操作识别系统<sup>[21]</sup>。丙肝DNA疫苗含有编码病毒蛋白(如核心蛋白、包膜蛋白)的基因,宿主细胞摄取外源性DNA并表达病毒基因、产生相应的病毒蛋白,后者通过宿主细胞的主要组织相容性复合体类(MHC-)途径被运载到细胞表面,通过刺激细胞表面的CD8及细胞毒性T细胞启动细胞介导的免疫反应,从而发挥抗病毒作用<sup>[22]</sup>。

本实验中SP2/0-HCV-C细胞形成的肿瘤组织中以T淋巴细胞浸润为主,说明HCV核心基因疫苗能诱导Balb/c小鼠产生良好的细胞免疫应答,与相关报道一致<sup>[23-27]</sup>。并发现HCV-C抗原表达主要在SP2/0细胞的细胞质和胞膜上,少数位于胞核中。实验组HCV-C抗原表达明显弱于对照组,说明HCV-C DNA疫苗对HCV感染有预防及治疗作用。

表达HCV结构蛋白(C,E1,E2)的FVB/n转基因小鼠及野生型(WT)FVB/n小鼠经肌肉注射免疫表达核心(pHCVC)质粒或C/E1/E2(pHCVCst)质粒。WT和转基因小鼠经结构蛋白或包膜蛋白免疫后均可产生抗C抗体和显示T细胞增生反应。WT小鼠免疫pHCVCst后,只产生抗E2的CTL活性,非针对抗C或抗E1,而当WT小鼠免疫pHCVC时可产生强烈的抗C的CTL活性。经pHCVCst免

疫的转基因小鼠未测出抗 C 或抗包膜蛋白的 CTL 活性,但免疫 pHVCV 的转基因小鼠产生了独特型抗 C 的 CTL 活性<sup>[28]</sup>. Balb/c(H-2d)和 C57bl/6 小鼠接受联接多顺反子 C/E1/E2/NS2/NS3(pRC/C-NS3)的黄痘病毒增强了对 HCV 蛋白的抗体和细胞反应,CD8(+)T 细胞反应增强<sup>[29]</sup>. 重组质粒 pcDNA HCV-C 治疗组,使 SP2/0-HCV-C 细胞成瘤性显著降低,对 HCV 皮下移植瘤有一定的治疗作用;与表达 IL-12 质粒联合接种后,治疗作用加强<sup>[30]</sup>. 脂质转染剂<sup>[31]</sup>或联合注射 GM-CSF 细胞因子<sup>[26]</sup>可以促进基因疫苗的摄取并增强其诱导的抗病毒免疫应答的效力. pRSC-HBV/HCV 可分别表达 HBcAg 及 HCV 核蛋白,免疫 Balb/c 小鼠后可诱导其体液免疫应答<sup>[32,33]</sup>. 双表达载体 pcDNA3.0 BA 同时输送 GM-CSF 与 pc154 基因能增强 Balb/c 小鼠对 HCV C 蛋白基因的体液免疫应答及免疫鼠脾淋巴细胞对特异性抗原刺激的增生能力<sup>[34]</sup>. 重组的 HCV 结构区 DNA 疫苗(pBK-CMV)能诱导小鼠体内特异性 T 淋巴细胞反应<sup>[35]</sup>. rhIL-12 可在体外显著增加慢性 HCV 感染者淋巴细胞的增生反应<sup>[36]</sup>. HCV 多表位抗原基因 PCX 克隆到真核表达载体 pREP9(RSV 启动子)及 pcDNA3 (CMV 启动子)中,构建真核表达载体 pREP9/PCX 及 pcDNA3/PCX,将其肌肉注射免疫小鼠及家兔,可诱发特异性免疫应答且安全性好<sup>[37]</sup>. HCV 不同区段的基因重组抗原或人工合成多肽可诱导 HLA-II 类分子限制 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T 细胞增生,这种增生反应的强弱可能反映不同人群对 HCV 免疫应答的不同,并与 HCV 感染的预后有关.

#### 4 参考文献

- 1 Yu SK, Yi DY. Response of Patients with HCV Genotype Infection to IFN  $\alpha$ . *J Jiangxi Med* 2000;40:1
- 2 Zhou GP, Bai JY, Huang YQ, Wang YZ, Deng WQ, Chen M. The levels of Hepatitis C virus RNA of sera in patients with Chronic hepatitis C during alpha interferon treatment. *J Ningxia Med* 2000;22:7
- 3 Yao ZB, Fu XX, Tian GS, Xu DZ, Hao LJ, Huang PY. Clinical trial of consensus interferon for chronic hepatitis C. *Chinese J Epidemiol* 2000;18:2
- 4 Zhao GZ, An P, Li Y. The relationship between HCV genotypes, HCV RNA quantities, and IFN therapeutic effectiveness. *J Chinese Med Univers* 2000;29:6
- 5 Prince AM. Perspectives on prophylactic and therapeutic immunization against hepatitis B and C viruses. *Transfus Clin Biol* 2001;8:467-470
- 6 Brinster C, Inchauspe G. DNA vaccines for hepatitis C virus. *Intervirology* 2001;44:143-153
- 7 Li J, Wang WL. Detection of hepatitis C virus RNA in the tissue of hepatocellular carcinoma by multiple detection system. *Chin J Experimental Clinical Virol* 2000;14:1
- 8 Liu RH. Chronic liver disease and hepatitis B and hepatitis C virus infection. *J Ningxia Med* 2000;22:4
- 9 Wang RQ, Zhou ZC, Yang JM, Fang DC. Expression of oncogenes and tumor-suppressor gene in the tissues of hepatocellular carcinoma with different types of HBV HCV infection. *Chongqing Med* 2000;29:2
- 10 Yang JM, Wang RQ, Pu B, Zhou ZC, Fang DC, Luo YH. The effect of hepatitis C virus infection on expression of several cancer-associated gene products in hepatocellular carcinoma. *Tumour* 2000;20:1
- 11 Zhang WJ, Yu XL, Du CX, Yin Q, Du SC. The infections of HBV HCV HGV TTV in patients with hepatocellular carcinoma (HCC) and the possibility and prevention in interventional treatment. *Shaanxi Tumour Med* 2002;10:1
- 12 Prince AM, Shata MT. Immunoprophylaxis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2001;5:91-103
- 13 Han DL, Liu W, Ou ZY, Liang M, Hu Q. A survey on HCV infection among blood donors. *Contem Precaut med* 2001;28:4
- 14 Chen LB, Chen PL, Fan GR, Li L, Liu CY. Localization of hepatitis C virus core protein in the nucleus of peripheral blood mononuclear cells of hepatitis C patients. *Chin J Exper Clin Virol* 2002;16:1
- 15 Ma QY, Hao F, Wang YM. Study on the infection of normal adult hepatocytes with HCV in vitro. *J Third Milit Med Univer* 2001;23:10
- 16 Li K, Wang L, Cheng J, Zhang LX, Lu MY, Li L. Cloning and expression of the gene of hepatitis C virus core in yeast. *J Surg Advan Coll* 2002;23:1
- 17 李华, 潘承恩, 陈武科, 王全颖, 杨广笑. 丙型肝炎病毒核心区基因在大肠杆菌中的高效表达. *世界华人消化杂志* 2001;9:221-223
- 18 Zhao W, Liao GY, Li WD, Chen JY, Zhang XW, Sun MB, Jiang SD. Expression of hepatitis C virus core protein in E. coli and its immunological characteristics. *Immunol J* 2001;17:06
- 19 Hao CQ, Zhou YX, Feng ZH, Li JG, Jia ZS, Wang PZ. Construction, identification and expression of framework plasmid pAd.HCV-C of adenovirus expression vector of HCV C. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:635-639
- 20 刘重阳, 刘为纹, 杨建民, 鲁荣, 罗元辉. HCV 核心基因 cDNA 真核表达载体的构建及其表达. *世界华人消化杂志* 2000;8:1049-1050
- 21 Stevenson FK, Rosenberg W. DNA vaccination: a potential weapon against infection and cancer. *Vox Sang* 2001;80:12-18
- 22 Tang XP, Xu YL, Yuan XZ, Zhang FC. Activity of HCV-specific cytotoxic T lymphocytes in chronic hepatitis C. *Chin J Epidemiol* 2001;19:4
- 23 Tan DM, Liu SH, Li CZ, Fan XG, Yan MY, Sun KZ. V specific cellular and humoral immune responses induced by intramuscular injection of DNA vaccine containing HCV core gene in mice. *Fund Med Clin* 2000;20:5
- 24 Feng ZH, Zhou YX, Jia ZS, Lian JQ, Jiao CS, Li JG. Construction and gene immunization of recombinant expression plasmid of Hepatitis C virus core gene. *Chin J Immunol* 2000;16:4
- 25 Ceng XW, Du Y, Wang QC. Research on DNA vaccines of hepatitis C virus. *J Sich Univer* 2000;37:04
- 26 Ou-Yang P, Huang LH, Tao MH, Chiang BL, Chen DS. Co-delivery of GM-CSF gene enhances the immune responses of hepatitis C viral core protein-expressing DNA vaccine: role of dendritic cells. *J Med Virol* 2002;66:320-328
- 27 Duenas-Carrera S, Alvarez-Lajonchere L, Alvarez-Obregon JC, Herrera A, Lorenzo LJ, Pichardo D, Morales J. A truncated variant of the hepatitis C virus core induces a slow but potent immune response in mice following DNA immunization. *Vaccine* 2000;19:992-997
- 28 Sato I, Murata K, Lechmann M, Manickan E, Zhang Z, Wedemeyer H, Rehmann B, Liang TJ. Genetic immunization of wild-type and hepatitis C virus transgenic mice reveals a hierarchy of cellular immune response and tolerance induction against hepatitis C virus structural proteins. *J Virol* 2001;75:12121-12127
- 29 Pancholi P, Liu Q, Tricoche N, Zhang P, Perkus ME, Prince AM. DNA prime-canarypox boost with polycistronic hepatitis C virus (HCV) genes generates potent immune responses to HCV structural and nonstructural proteins. *J Infect Dis* 2000;182:18-27
- 30 Du DW, Zhou YX, Feng ZH, Jia ZS, Jiao CS, Wang QC, Li JG. Enhancing therapeutic effect of DNA vaccine against hepatitis C virus infection by interleukin-12. *Chin J Epidemiol* 2001;19:1
- 31 Feng ZH, Zhou YX, Wang QC, Du DW, Jiao CS, Li JG. Lipofectamine coated hepatitis C virus core gene vaccine promotes the efficacy of immune responses. *J Fourth Mil Med Univer* 2000;21:7
- 32 Deng T, Fan GR, Chen TB, Chen NL, Hu DR, Li L, Huang SL, Jia KP. Constructs and expression of hepatitis C virus core gene combined hepatitis B virus core gene with two multiple cloning sites vector. *Chin J Immunol* 2002;18:3
- 33 Deng T, Fan GR, Chen TB, Chen NI, Hu DR, Wang M, Jia KP. Expression and immune response to hepatitis C virus core gene combined hepatitis B virus core gene with two multiple cloning sites vector. *Chin J Med* 2002;82:77-80
- 34 Liao GY, Zhang XW, Sun MB, Cheng JY, Yang HJ, Jiang D. Enhancement of immune response to HCV core gene by GM-CSF gene with bicistronic vector. *Immunol J* 2001;17:4
- 35 Li B, Yin PQ, Wang J, Dou J, Lin L, Wang LX, Shi ZY. DNA immunization of mice with a plasmid encoding hepatitis C virus structural proteins elicits significant cell-mediated immune responses. *Immunol J* 2001;17:5
- 36 Fan XG, Ou ZM, Hu GL. Effect of IL-12 on lymphoproliferative response in individuals with chronic hepatitis C virus infection. *Chin J Immunol* 2000;16:4
- 37 Zhang LY, Ren DM, Chen LS, Guo MQ, Huang JS, Shen XR, Zhang Q, Xie YM, Chen LY, Jia FX. Immunogenicity of a multiple epitope antigen gene of hepatitis C virus in mice and rabbits. *Chin J Cell Mol Immunol* 2001;17:1