

世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003 年 6 月 15 日 第 11 卷 第 6 期 (Volume 11 Number 6)



6/2003

ISSN 1009-3079



名誉总编辑
潘伯荣
总编辑
马连生

World Journal of Gastroenterology® 被 SCI®-E, Research Alert®, Current Contents®/Clinical Medicine, Journal Citation Reports® Index Medicus, MEDLINE, Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2001 年 JCR® 报告 WJG 影响因子 1.445. 世界华人消化杂志® 被 Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2001 年中国科技期刊引证报告: 世界华人消化杂志® 影响因子 3.733, WJG 影响因子 2.920.

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2003 年 6 月 15 日 第 11 卷 第 6 期 (总第 110 期)

述 评	689 肝脏胶原蛋白检测进展与评析 刘成海
病毒性肝炎	693 甲型肝炎减毒活疫苗(LA-1 株)大规模免疫长期效果观察 龚健,李荣成,徐志一,江世平,罗东,杨进业,李艳萍,陈修荣,黄贵彪,凌文武,韦光武,汪莹怡 697 HCV-Fc 融合基因疫苗真核表达载体的构建及表达 冯志华,王全楚,周永兴,郝春秋,聂青和 701 胸腺肽 $\alpha 1$ 对慢性乙型肝炎患者免疫系统的影响 段国荣,聂青和,周永兴,王全楚,田长印,刘拉羊,薛红安 705 蛋白激酶 C 对肾小球前小动脉平滑肌细胞 I 型 IP_3 受体表达影响 王静艳,刘沛,韩峰
肝 癌	708 抗肝癌单链免疫毒素基因修饰的 PBMCs 在动物体内的抑瘤作用 程虹,刘彦仿,张惠中,沈万安,张菊,张静 712 经皮穿刺氩氦刀冷冻治疗肝癌 31 例 钱国军,陈汉,吴孟超 716 大鼠肝细胞癌形成过程中 MMP-2mRNA 的表达及应用 BB-94 的影响 张志,方石岗,高毅,蒋泽生,孙尔维
基础 研究	719 西安酒精性肝病流行病学 鲁晓岚,陶明,罗金燕,耿燕,赵平,赵红莉 723 蛋白激酶 C 在肝细胞缺氧预处理中的作用 单毓强,高毅,王瑜,潘明新 726 肝硬化不同病期 ET-1,NO 对离体肝脏血流动力学的调节作用 姚冬梅,姚希贤,杨川杰,冯志杰,房红梅,高军萍 730 大鼠肝纤维化中细胞外信号调节激酶的作用 梁增文,张国,王天才 733 环氧合酶-2 反义核酸对人胆管癌细胞增生的影响 吴高松,武小勇,邹声泉,裘法祖 737 ONO-3403 对胆囊收缩素刺激的大鼠胰腺外分泌的影响 陈少夫,刘维新,山本光胜,大槻真 741 内皮抑素-可溶性血管内皮细胞生长抑制因子融合基因重组腺病毒的包装与鉴定 李喆,潘欣,潘卫,曹贵松,闻兆章,方国恩,戚中田,毕建成,华积德 745 激活素 A 对肝星状细胞细胞外基质合成的影响 刘清华,李定国,黄新,尤汉宁,潘勤,徐雷鸣,徐芹芳,陆汉明 749 脾静脉结扎诱导继发性脾功能亢进犬动物模型的评价 刘全达,马宽生,何振平,丁钧,董家鸿 753 IL-6 与整合素家族细胞黏附分子在大鼠急性坏死性胰腺炎合并多器官损伤模型中的表达 孙威,张俊东,赵滢,赵宇,王强
临床 研究	756 老年消化道多原发癌的早期诊断及综合治疗 蔡昌豪,吴本伊,吴道宏,邵勇,王孟薇
焦 点 论 坛	760 进一步深化慢性乙型肝炎诊断治疗的实用性研究 李梦东,聂青和 762 慢性乙型肝炎临床分度、诊断的一些问题 周永兴 766 慢性乙型肝炎的鉴别诊断及常见并发症 聂青和 768 特殊人群乙型肝炎的临床特点及处理 罗新栋,聂青和 772 病理学检测在慢性乙型肝炎诊断治疗中的价值 郎振为 775 经皮肝脏活体穿刺活检技巧及研究进展 滕光菊,聂青和 776 乙型肝炎的实验检查及其临床意义 郝春秋,聂青和 780 慢性乙型肝炎的抗病毒治疗 程明亮,吴亚云 783 慢性乙型肝炎的免疫治疗 施光峰 785 慢性乙型肝炎的中医药治疗 申德林,王全楚,焦栓林 787 乙型肝炎病毒携带者的诊断与治疗 江家骥,朱琪 789 慢性乙型肝炎肝纤维化的诊断与治疗 蔡卫民,张彬彬 791 乙型肝炎病毒慢性感染和肝癌发生 苏勤 795 治疗性疫苗-慢性乙型肝炎患者的希望 王全楚,聂青和
文 献 综 述	799 抗乙型肝炎病毒肝靶向药物制剂的研究进展 王九平,白雪帆 803 腺病毒载体的特点及其在 HCV 研究中的应用 郝春秋,冯志华,聂青和 806 HCVC 区 DNA 疫苗的研究现状 孙利,周永兴 810 病毒性肝炎基因治疗的研究和面临的挑战 贾战生,冯志华,周永兴

文献综述	815 抗 HCV 树突状细胞疫苗的制备及功能研究 王全楚,冯志华,周永兴 819 疫苗新概念及新型疫苗的研制 冯志华,王全楚 823 特殊状态下的逆行胰胆管造影检查术 智发朝 824 胃肠道出血的内镜诊治 陈村龙,宋于刚,周殿元 827 介入内镜学在胆胰疾病中的应用 刘思德 829 老年期消化性溃疡与恶性肿瘤溃疡、应激性溃疡的鉴别 吴保平,肖冰 831 老年人消化道急症 黄纯炽
研究快报	834 肠癌细胞 BAI1 基因表达的检测及其抗肿瘤作用 王志华,康熙雄,张智清,申宝忠,李莹 836 三氧化二砷对鸡胚移植胆管癌生长的抑制作用 喻智勇,王曙光,郑秀海,李昆 838 小鼠实验性肝损伤中 NO 的动态检测及意义 陈会松,柳利明,黄华,杨晋辉
临床经验	841 结肠黑变病 25 例 孙军,李岩 842 保留胰腺的脾动脉干及脾切除术在胃癌根治术中的意义 陈志新,胡建昆,张波,陈佳平,周总光 844 萎缩性胃炎临床证型分类研究 朱方石,姒健敏,王良静 846 叶酸对胃癌前细胞凋亡的影响 曹大中,刘顺英,赵建学 848 短肠综合征的远期并发症 4 例 周伟,江志伟,姜军,朱维铭,张佃良,李宁,黎介寿 851 幽门螺杆菌感染与慢性肝病的临床关系 焦建中,聂青和,赵春林,吴永胜,文绍先,吴群 853 内支架术与腔内近距离放射治疗联合应用治疗晚期食管癌 8 例 申宝忠,于友涛 855 组织黏合剂 Histoacryl 治疗胃静脉曲张活动性出血的疗效 曾黎明,陈村龙,智发朝 856 肝病患者血清肿瘤坏死因子 α 水平变化 徐学刚,张美稀,董惠芳,杨协珍,金树根,陈建杰,王灵台 859 尼美舒利引起肝脏损害 14 例 关英,徐峰,胡莲,周甘平 861 脾脏体积、脾静脉血流及血细胞计数在门静脉高压症分期中的意义 王秀艳,游晓功,施宝民,穆庆岭,吴秦璜 863 大连地区糖尿病患者与健康成年人肠内菌群的比较 孙艳,刘波,赵静玫,王海岩,徐和利,李雪松 865 影像学检查对肝门部胆管癌进展范围评价的临床价值 张国梁,韦斌,朱春兰,任旭 867 分离培养在 Hp 感染诊断中的重要地位 史济经,闵海阳,王青,杨慧芳,王洪涛,张振华 870 HBV 感染者 HBV DNA 与抗原抗体标志物的关系 陈雪娟,李刚,刘淑芳,陈文思,李桂侠 871 乙型肝炎肝组织中细胞间黏附分子-1 及 Fas 的表达及意义 张闯峰,郑瑞丹,孟家榕,郭以河,林福地 873 轮状病毒全身感染对肝胆胰的影响 姚英氏,李宁,欧巧群 877 良性肝病患者血清 AFP 升高的临床意义 程天霞 875 胆源性胰腺炎手术治疗 58 例 黄建勇,马清涌,马建新 879 经皮肝穿刺胆道引流治疗外伤后胆瘘 汪邵平,霍枫,张玉新,裴世强
病例报告	840 以肠梗阻为首表现的原发性小肠肿瘤 4 例 赵永玲,魏芳
编委来信	707 711 江学良
投稿细则	附 1-4 世界华人消化杂志投稿细则
封面故事	730 大鼠肝纤维化中细胞外信号调节激酶的作用 梁增文,张国,王天才

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名
陈可冀 题写版权刊名

(月刊)
创刊 1993-01-15
改刊 1998-01-25
出版 2003-06-15
原刊名 新消化病学杂志

总顾问 陈可冀
黄象谦
黄志强
黎介寿
刘耕陶
裘法祖
汤钊猷
王宝恩
危北海
吴孟超
吴咸中

张金哲
张学庸
赵东海
周殿元
社长总编辑 马连生
中文编辑 潘伯荣
王瑾晖
英文编辑 张建中
排版 李少华
校对 李天华

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
030001, 山西省太原市双塔西街 77 号
E-mail:wcjd@wjgnet.com
出版 世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市 2345 信箱
E-mail: wcjd @ wjgnet.com
http://www.wjgnet.com
电话 (010)85381892
传真 (010)85381893
印刷 北京科信印刷厂
发行 国内 北京报刊发行局
国外 中国国际图书贸易总公司
(100044, 北京 399 信箱)
订购 全国各地邮电局
邮购 世界胃肠病学杂志社发行部
(100023, 北京市 2345 信箱)
电话:(010)85381892
传真:(010)85381893
2003 年版权归世界胃肠病学杂志社所有

本刊已被国内外 检索系统收录

美国《化学文摘(CA)》
荷兰《医学文摘库/医学文摘(EM)》
俄罗斯《文摘杂志(PJ)》
中国科技论文统计与分析
中国学术期刊文摘
中国中医药信息服务网
中国生物医学文献光盘数据库
《中文科技资料目录(医药卫生)》
中国生物医学期刊目录数据库
中国医学文摘外科学分册(英文版)
中国医学文摘内科学分册(英文版)

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点,除非特别声明.本刊如有印装质量问题,请向本刊编辑部调换.

ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

邮发代号 82-262
国外代号 M 4481

国内定价 每期 24.00 元 全年 288.00 元

广告经营许可证
1401004000050

HCV - Fc融合基因疫苗真核表达载体的构建及表达

冯志华,王全楚,周永兴,郝春秋,聂青和

冯志华,王全楚,周永兴,郝春秋,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
冯志华,女,1964-11-08生,山西省忻州市人,汉族,医学博士,副教授,副主任医师,硕士研究生导师。主要从事病毒性肝炎治疗方面的研究,发表论著22篇。参加编写医学专著4部。
国家自然科学基金资助课题, No.30170822
项目负责人:冯志华,710038,陕西省西安市灞桥区新寺路1号,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。 fengzh@fmmu.edu.cn
电话:029-3577742 传真:029-3537377
收稿日期:2002-10-25 接受日期:2002-11-25

Construction and expression of chimeric plasmid pHCV-IgFc

Zhi-Hua Feng, Quan-Chu Wang, Yong-Xing Zhou, Chun-Qiu Hao, Qing-He Nie

Zhi-Hua Feng, Quan-Chu Wang, Yong-Xing Zhou, Chun-Qiu Hao, Qing-He Nie, The Center of Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases of PLA, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shan'xi Province, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30170822
Correspondence to: Zhi-Hua Feng, The Center of Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases of PLA, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaan'xi Province, China. fengzh@fmmu.edu.cn
Received: 2002-10-25 Accepted: 2002-11-25

Abstract

AIM: To construct a recombinant chimeric plasmid of HCV-Fc that can express HCV core protein and IgG Fc.

METHODS: The HCV core gene derived from the plasmid pBRTM/HCV1-3011 by using polymerase chain reaction (PCR) was inserted into the backward position of cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter element of Fc plasmid (pIgFc), then the recombinant plasmid pHCV-IgFc was obtained.

RESULTS: The insert DNA of pHCV-IgFc was HCV core and Fc gene confirmed by endonuclease, PCR and sequencing. HCV core gene and Fc gene expressed transiently with Lipofectamine 2000 coated in human hepatoblastoma 7 721 cells, which was confirmed by immunofluorescence.

CONCLUSION: Recombinant chimeric plasmid vector pHCV-IgFc can express HCV core and Fc gene transiently in 7 721 cells. It may be useful in transfection of dendritic cells and development into dendritic cell vaccine.

Feng ZH, Wang QC, Zhou YX, Hao CQ, Nie QH. Construction and expression of chimeric plasmid pHCV-IgFc. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(6):697-700

摘要

目的:构建能表达HCV C-Fc融合基因的真核表达载体,为

进一步修饰和转染树突状细胞,制备能高效表达HCV C和Fc基因的树突状细胞疫苗做准备。■

方法:用分别含有Kpn I和Xho I酶切位点的HCV C区基因上、下游引物,以含有HCV H株基因序列的质粒pBRTM/HCV1-3011为模板,通过PCR扩增获得HCV C区基因片段回收后,以Kpn I和Xho I双酶切,定向插入到含IgG1 Fc基因的质粒pIgC3双粘端位点之间,获得重组表达质粒pHCVFc。通过Kpn I双位点酶切、PCR及插入片段序列测定对质粒进行了鉴定。以抗HCV C单克隆抗体为一抗,利用间接免疫荧光法检测了pHCV-IgFc在人肝癌细胞7 721中的瞬时表达。■

结果:酶切、PCR及测序鉴定证实, pHCV-IgFc插入片段为HCV C区基因片段,免疫荧光法检测表明其可以在7 721细胞中瞬时表达。■

结论:构建的质粒pHCV-IgFc可以在7721细胞中瞬时表达HCV C区基因,为研究HCV C-Fc融合基因修饰的树突状细胞的功能奠定了基础。

冯志华,王全楚,周永兴,郝春秋,聂青和. HCV - Fc融合基因疫苗真核表达载体的构建及表达. 世界华人消化杂志 2003;11(6):697-700
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/697.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)感染是当前危害人类健康的重要传染病,至今尚无特异性的预防和治疗措施。基因治疗作为一种控制HCV感染的新途径,正在受到人们的重视^[1-23]。树突状细胞具有最强的抗原呈递能力,可广泛用于肿瘤和感染性疾病的免疫治疗,其诱导的强烈的CTL反应在HCV基因治疗中具有很好的应用前景^[24-27]。我们构建了HCV C-Fc融合基因真核表达载体,并证实其可以在7721细胞中瞬时表达HCV C基因,为下一步制备转染和表达HCV C及Fc融合基因的树突状细胞疫苗奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料 pBRTM/HCV1-3011质粒(HCV-H)含除5' NCR外的全部HCV序列,是由美国华盛顿大学Rice教授惠赠;含Fc基因的质粒载体pIgFc3(Fc上游含Kpn I, BamH I单酶切位点)为张新海博士惠赠;大肠杆菌MC1061及人肝癌细胞7 721株均为本室保存。Kpn I, BamH I, T4DNA连接酶, Taq DNA聚合酶, dNTP,

PCR产物回收试剂盒及P1asmid Purification Kit均为Promega公司产品. 脂质体Lipofectamie 2000, 1 640培养基及胎牛血清均为Gibco公司产品; 小鼠抗人HCV C单克隆抗体购自中国预防科学院. PCR引物设计, 参考已发表的HCV H株核心区序列设计I对引物. 根据克隆所需, 在每条引物的5'端引入相应的限制性内切酶识别序列及保护碱基, 采用DNA SIS和OLIGO核酸分析软件在微机上进行分析. 引物由宝生物(大连)有限公司合成, 序列如下: P1 (HCV C基因上游引物, 5'端含有Kpn I位点及起始码) 5' TTG GTACCATGAGC ACGAATCCTAAACCT3'; P2 (HCV C下游引物, 5'端含有BamH I位点及插入碱基以保证下游Fc基因三联密码子顺读): 5' ATTGGATCCTTGGCTGAAGCGGG CCACAGT3'.

1.2 方法

1.2.1 pHCV-IgFc质粒的构建 参照文献. 以pBRTM/HCV1-30II质粒为模板, 用合成的分别含有Kpn I及BamH I限制性内切酶识别序列的HCV C区基因上下游引物进行PCR扩增. PCR在100 μ L的反应缓冲液中进行(50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl, pH9.0 25 $^{\circ}$ C, 1.5 mmol/L MgCl₂, 1 g/L Triton X-100), 其中含上下游引物各100 pmol, dNTP各25 μ L, 模板质粒5 μ L, Taq聚合酶1U, 三温循环的程序为: 预变性94 $^{\circ}$ C 5 min, 变性94 $^{\circ}$ C 45 s, 退火55 $^{\circ}$ C 45 s, 延伸72 $^{\circ}$ C 1 min, 35个循环后, 72 $^{\circ}$ C再延伸10 min, PCR产物回收(按试剂盒说明书操作)后, 用Kpn I/BamH I双酶切, 获得572 bp的HCV C基因片段, 即目的DNA; 含Fc基因的载体pIgFc3亦用Kpn I/BamH I双酶切, 切胶回收获得3 500 bp的载体DNA. 目的DNA与载体DNA在16 $^{\circ}$ C下经T4 DNA连接酶连接16 h(连接体系为: 目的DNA 0.4 μ g, 载体DNA 0.1 μ g, 10 \times Buffer 2 μ L, T4 DNA连接酶16 μ L, 加无离子水至20 μ L), 获得重组质粒. 将重组质粒转化到用氯化钙制备的新鲜感受态大肠杆菌E.coli MC1061中, 挑取阳性克隆, 扩增后提取并纯化质粒, 得到含HCVC-Fc融合基因的真核表达质粒pHCV-IgFc.

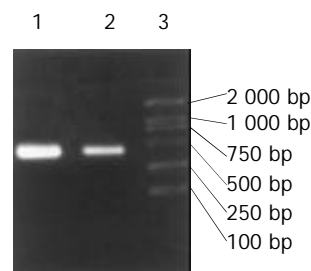
1.2.2 pHCV-IgFc的鉴定 酶切鉴定: 将重组质粒pHCV-IgFc和空载体质粒pIgFc3分别用Kpn I单酶切. 10 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定. PCR鉴定: 分别以重组质粒pHCV-IgFc和空载体质粒pIgFc3为模板, 用前面合成的HCVC区基因上游及下游引物在相同的反应体系中进行PCR扩增, PCR产物用10 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定. 测序鉴定: 为确保重组质粒pHCV-IgFc中插入序列及读码框的正确性, 对其进行测序鉴定, 由宝生物(大连)有限公司的自动测序仪完成.

1.2.3 pHCV-IgFc在人肝癌细胞株7721中的瞬时表达 将重组质粒pAd. HCV-C用lipofectamine 2000转染7721细胞, 72 h后收集爬片细胞, 以小鼠抗HCV-C单克隆抗体为一抗做间接免疫荧光实验, 检测重组载体

pHCV-IgFc插入的HCV-C基因在人肝癌细胞株7721中的瞬时表达情况.

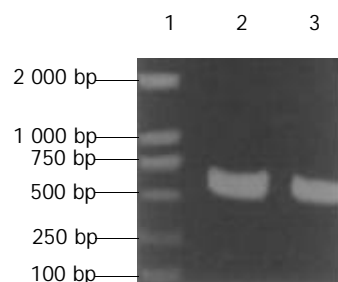
2 结果

2.1 重组质粒pHCV-IgFc的双位点酶切鉴定 插入的HCV-C基因片段含有另一个Kpn I位点. 重组质粒pHCV-IgFc经Kpn I双位点酶切后, 可切下300 bp片段, 空载体质粒pIgFc3只用一个Kpn I酶切位点. 电泳酶切片段, 证明插入片段和载体大小均正确(图1):



Line 1,2 重组质粒pHCV-IgFc经Kpn I双位点酶切后300 bp片段; Line3 Marker (DL-2000)
图1 重组质粒的酶切鉴定.

2.2 重组质粒pHCV-IgFc的PCR鉴定 利用前面合成的PCR引物, 以重组质粒pHCV-IgFc为模板进行PCR^[14], 反应产物电泳后发现572 bp的条带(插入的HCV C基因)存在; 对照组用相同的引物. 以空载体质粒pIgFc为模板进行PCR, 反应产物电泳后未见条带存在(图2). 证明重组质粒pHCV-IgFc中成功地插入了HCV C基因.



Line 1 Marker (DL-2000); Line2-3; 重组质粒pHCV-IgFc PCR产物
图2 重组质粒的PCR鉴定.

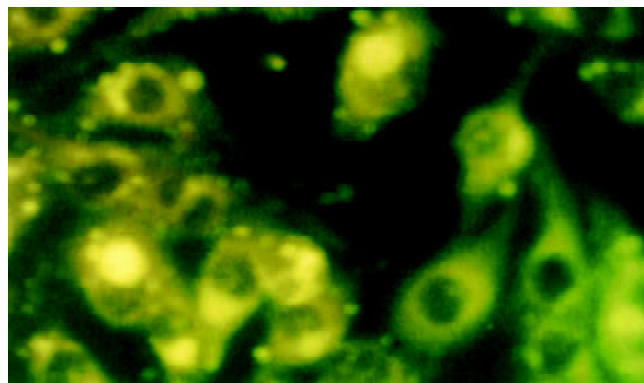


图3 重组质粒pHCV-IgFc在人肝癌细胞株7721中的瞬时表达.

2.3 重组质粒 pAd.HCV-C 的测序鉴定 重组质粒 pHCV-IgFc 由宝生物(大连)有限公司测序, 插入片段正是 HCVH 株 C 区基因, 结果如下:

2.4 重组质粒 pHCV-IgFc 在人肝癌细胞株 7 721 中的瞬时表达 转染了重组质粒 pHCV-IgFc 的人肝癌细胞株 7 721 细胞, 以抗 HCV C 单克隆抗体为一抗, 进行间接免疫荧光检测, 获得阳性结果(图 3); 未转染的 7 721 细胞进行间接免疫荧光检测, 未见阳性结果. 表明 pHCV-IgFc 在 7 721 中瞬时表达了 HCV C 抗原.

3 讨论

丙型肝炎病毒(HCV)感染常导致慢性肝炎、肝硬化、甚至肝癌及肝外病变. HCV 基因序列的高度变异性以及机体细胞免疫功能低下使病毒得以逃避宿主免疫系统的作用而造成病毒的持续感染, 因而难以治疗及预防. 基因疫苗是将编码抗原的外源基因插入合适的表达载体中, 再以载体免疫机体, 使目的基因在机体内高效表达, 达到基因治疗的目的. 丙型肝炎基因疫苗诱导特异性免疫应答产生已被大量的实验室证实^[28]. 但普遍存在着抗体滴度不高, CTL 杀伤力不强等问题. 其原因可能与 HCV 感染后, 抗原提呈细胞(APC), 尤其是树突状细胞(dendritic cells, DC)数量减少、功能降低有关^[29]. 如何绕过或提高 DC 免疫功能低下, 诱导出更强有力的、更具广泛性的免疫应答, 应当成为基因疫苗和免疫治疗亟待解决的问题之一.

一个理想的抗原呈递策略, 应当是全方位、强有力的诱导 CD₈⁺CTL、CD₄⁺Th 及 B 细胞应答, 这样才能更有效的清除病原体及肿瘤细胞. 近年来, 以免疫球蛋白(主要是 IgG1)的 Fc 段为基础构建的新型免疫分子进展很快, 有望用于新型免疫复合外物制剂的研制. IgG1 的 Fab 与 Fc 是功能相对独立的片段, Fab 中的可变区负责与抗原结合, 而 Fc 段能与免疫效应细胞的 Fc γ 受体(Fc γ R)结合, 发挥其调节免疫效应、细胞炎症反应、细胞毒效应以及激活吞噬细胞的作用. DC 本身表面带有 Fc γ R, 因此由 Fc γ R 介导的吞噬细胞内在化的过程可加强免疫应答的抗原提呈.

要获得有效的防治 HCV 感染的疫苗, 必须克服 HCV 多型、易变带来的困难^[30-34]. HCV 中和抗体位点所在膜区(E 区)呈高度变异性, 机体感染 HCV 后易发生免疫耐受. 因此, 采用传统方法构建的以产生中和抗体为主的体液免疫型疫苗难以获得对不同 HCV 株型同时具有防治功效的疫苗. 要克服这种困难, 就必须诱导机体产生对预防和清除不同株型 HCV 感染具有重要作用的细胞免疫应答^[35-39]. Saito et al 研究发现, 仅用 HCV E 区基因免疫难以诱导有效的细胞免疫应答. HCV CE1 区含有 5 个 CTL 表位, 以 HCV CE1 区基因免疫机体, 可产生较强的针对不同株型 HCV 的 CTL 反应, 且杀伤效应至少可持续 100 d 以上. 因此, 我们选用在我国常见的 HCV II 型 H 株 C 区基因作为目的基因, 插入到含人 IgG1 Fc

段基因的载体 pIGC3 中, 以此为基础构建了 HCV C-Fc 的可分泌型真核表达载体 pHCV-IgFc. 经双酶切、PCR 扩增及测序三重鉴定, 证实插入片段为 HCV C 区基因. 重组质粒 pHCV-IgFc 在人肝癌细胞 7 721 中瞬时表达了 HCV C 抗原, 证实了其表达功能的完整性. 以上工作为以后制备能表达 HCV C 及 Fc 抗原的树突状细胞疫苗提供了物质保证, 为进一步探讨抗 HCV 基因疫苗及树突状细胞疫苗奠定了基础^[40,41].

4 参考文献

- 1 Imanishi T, Obika S. Down-regulation of a gene-expression by an antisense BNA oligonucleotide. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 2002;120:85-90
- 2 He Y, Nakao H, Tan SL, Polyak SJ, Neddermann P, Vijaysri S, Jacobs BL, Katze MG. Subversion of cell signaling pathways by hepatitis c virus nonstructural 5a protein via interaction with Grb2 and P85 phosphatidylinositol 3-kinase. *J Virol* 2002; 76:9207-9217
- 3 Lee MN, Jung EY, Kwun HJ, Jun HK, Yu DY, Choi YH, Jang KL. Hepatitis C virus core protein represses the p21 promoter through inhibition of a TGF-beta pathway. *J Gen Virol* 2002; 83(Pt 9):2145-2151
- 4 Zhu F, Eckels DD. Functionally distinct helper T-cell epitopes of HCV and their role in modulation of NS3-specific, CD8 (+)/tetramer positive CTL. *Hum Immunol* 2002;63:710-718
- 5 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
- 6 Alvarez LL, Duenas CS, Vina A, Ramos T, Pichardo D, Morales J. Additives and protein-DNA combinations modulate the humoral immune response elicited by a hepatitis C virus core-encoding plasmid in mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97:95-99
- 7 Deng T, Fan G, Chen T, Chen N, Hu D, Wang M, Jia K. Expression and immune response to hepatitis C virus core gene combined hepatitis B virus core gene with two multiple cloning sites vector. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002;82:77-80
- 8 Brinster C, Chen M, Boucreux D, Paranhos-Baccala G, Liljestrom P, Lemmonier F, Inchauspe G. Hepatitis C virus non-structural protein 3-specific cellular immune responses following single or combined immunization with DNA or recombinant Semliki Forest virus particles. *J Gen Virol* 2002;83 (Pt 2):369-381
- 9 Prince AM. Perspectives on prophylactic and therapeutic immunization against hepatitis B and C viruses. *Transfus Clin Biol* 2001;8:467-470
- 10 Ou Yang P, Hwang 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
- 11 Brinster C, Muguet S, Lone YC, Boucreux D, Renard N, Fournillier A, Lemmonier F, Inchauspe G. Different hepatitis C virus nonstructural protein 3 (Ns3)-DNA- expressing vaccines induce in HLA-A2.1 transgenic mice stable cytotoxic T lymphocytes that target one major epitope. *Hepatology* 2001; 34:1206-1217
- 12 Sato J, 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
- 13 Prince AM, Shata MT. Immunoprophylaxis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2001;5:1091-1103
- 14 Forns X, Payette PJ, Ma X, Satterfield W, Eder G, Mushahwar IK, Govindarajan S, Davis HL, Emerson SU, Purcell RH, Bukh

- J. Vaccination of chimpanzees with plasmid DNA encoding the hepatitis C virus (HCV) envelope E2 protein modified the infection after challenge with homologous monoclonal HCV. *Hepatology* 2000;32:618-625
- 15 Eckels DD. MHC: function and implication on vaccine development. *Vox Sang* 2000;78 (Suppl 2):265-267
- 16 Encke J, Wands JR. Ethanol inhibition: the humoral and cellular immune response to hepatitis C virus NS5 protein after genetic immunization. *Alcohol Clin Exp Res* 2000;24:1063-1069
- 17 Kamei A, Tamaki S, Taniyama H, Takamura S, Nishimura Y, Kagawa Y, Uno-Furuta S, Kaito M, Kim G, Toda M, Matsuura Y, Miyamura T, Adachi Y, Yasutomi Y. Induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in mice by an intrahepatic inoculation with an expression plasmid. *Virology* 2000;273:120-126
- 18 Heile JM, Fong YL, Rosa D, Berger K, Saletti G, Campagnoli S, Bensi G, Capo S, Coates S, Crawford K, Dong C, Wininger M, Baker G, Cousens L, Chien D, Ng P, Archangel P, Grandi G, Houghton M, Abrignani S. Evaluation of hepatitis C virus glycoprotein E2 for vaccine design: an endoplasmic reticulum-retained recombinant protein is superior to secreted recombinant protein and DNA-based vaccine candidates. *J Virol* 2000;74:6885-6892
- 19 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
- 20 Lee AY, Polakos NK, Otten GR, Ulmer JB, Houghton M, Paliard X. Quantification of the number of cytotoxic T cells specific for an immunodominant HCV-specific CTL epitope primed by DNA immunization. *Vaccine* 2000;18:1962-1968
- 21 Song MK, Lee SW, Suh YS, Lee KJ, Sung YC. Enhancement of immunoglobulin G2a and cytotoxic T-lymphocyte responses by a booster immunization with recombinant hepatitis C virus E2 protein in E2 DNA-primed mice. *J Virol* 2000;74:2920-2925
- 22 Arichi T, Saito T, Major ME, Belyakov IM, Shirai M, Engelhard VH, Feinstone SM, Berzofsky JA. Prophylactic DNA vaccine for hepatitis C virus (HCV) infection: HCV-specific cytotoxic T lymphocyte induction and protection from HCV-recombinant vaccinia infection in an HLA-A2.1 transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:297-302
- 23 Gordon EJ, Bhat R, Liu Q, Wang YF, Tackney C, Prince AM. Immune responses to hepatitis C virus structural and nonstructural proteins induced by plasmid DNA immunizations. *J Infect Dis* 2000;181:42-50
- 24 Kanto T, Hayashi N, Takehara T, Tatsumi T, Kuzushita N, Ito A, Sasaki Y, Kasahara A, Hori M. Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals. *J Immunol* 1999;162:5584-5591
- 25 Auffermann GS, Keeffe EB, Levy S. Impaired dendritic cell maturation in patients with chronic, but not resolved, hepatitis C virus infection. *Blood* 2001;97: 3171-3176
- 26 Matsue H, Kusuhara M, Matsue K, Takashima A. Dendritic cell-based immunoregulatory strategies. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;127:251-258
- 27 Santin AD, Bellone S, Underwood LJ, O'Brien TJ, Ravaggi A, Pecorelli S, Cannon MJ. Novel immunotherapeutic strategies in gynecologic oncology. Dendritic cell-based immunotherapy for ovarian cancer. *Minerva Ginecol* 2002;54:133-144
- 28 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
- 29 Chen MY, Huang ZQ, Chen LZ, Gao YB, Peng RY, Wang DW. Detection of hepatitis C virus NS5 protein and genome in Chinese carcinoma of the extrahepatic bile duct and its significance. *World J Gastroenterol* 2000;6:800-804
- 30 Wu J, Cheng ML, Ding YS, Liu RC, Li J, Wang WL, Hu L. Five years following-up Survey of risk factor of virus hepatic cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1365-1367
- 31 Deng ZL, Ma Y, Yuan L, Teng PK. The importance of hepatitis C as a risk factor for hepatocellular carcinoma in Guangxi. *World J Gastroenterol* 2000;6(Suppl 3):75
- 32 Yan FM, Chen AS, Hao F, Zhao XP, Gu CH, Zhao LB, Yang DL, Hao LJ. Hepatitis C virus may infect extrahepatic tissues in patients with hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2000;6:805-811
- 33 Jia ZS, Zhou YX, Lian JQ, Feng ZH, Li GY, Zhang WB. Computerized design of hepatitis C virus RNA-directed hammerhead ribozymes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:300-302
- 34 Du DW, Zhou YX, Feng ZH, Yao ZQ, Li GY. Immune responses to interleukin 12 and hepatitis B gene vaccine in H2 d mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:128-130
- 35 Li JG, Zhou YX, Lian JQ, Jia ZS, Feng ZH. Inhibitory effect of ribozyme on HBeAg in human HCC cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:28-30
- 36 Restifo NP, Ying H, Hwang L, Leitner WW. The promise of nucleic acid vaccines. *Gene Ther* 2000;7:89-92
- 37 Song ZQ, Hao F, Zhang J, Gu CH. Detection of antibodies against hypervariable region 1 in sera from patients with hepatitis C. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:666-668
- 38 Elliott SL, Pye S, Le T, Mateo L, Cox J, Macdonald L, Scalzo AA, Forbes CA, Suhrbier A. Peptide based cytotoxic T-cell vaccines; delivery of multiple epitopes, help, memory and problems. *Vaccine* 1999;17:2009-2019
- 39 Navas MC, Fuchs A, Schvoerer E, Bohbot A, Aubertin AM, Stoll-Keller F. Dendritic cell susceptibility to hepatitis C virus genotype 1 infection. *J Med Virol* 2002; 67:152-161
- 40 Moriya O, Matsui M, Osorio M, Miyazawa H, Rice CM, Feinstone SM, Leppla SH, Keith JM, Akatsuka T. Induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in mice by immunization with dendritic cells treated with an anthrax toxin fusion protein. *Vaccine* 2001;20:789-796
- 41 Galle MB, DeFranco RM, Kerjaschki D, Romanelli RG, Montalto P, Gentilini P, Pinzani M, Romagnoli P. Ordered array of dendritic cells and CD8+ lymphocytes in portal infiltrates in chronic hepatitis C. *Histopathology* 2001;39:373-381



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

