

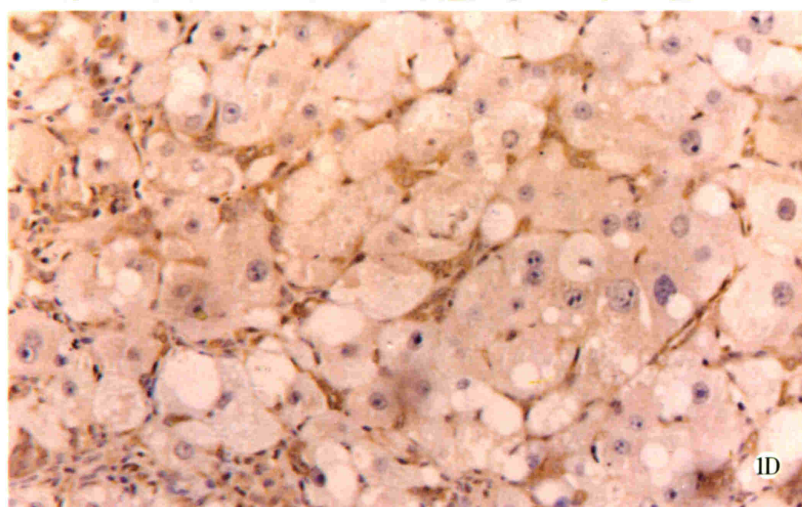
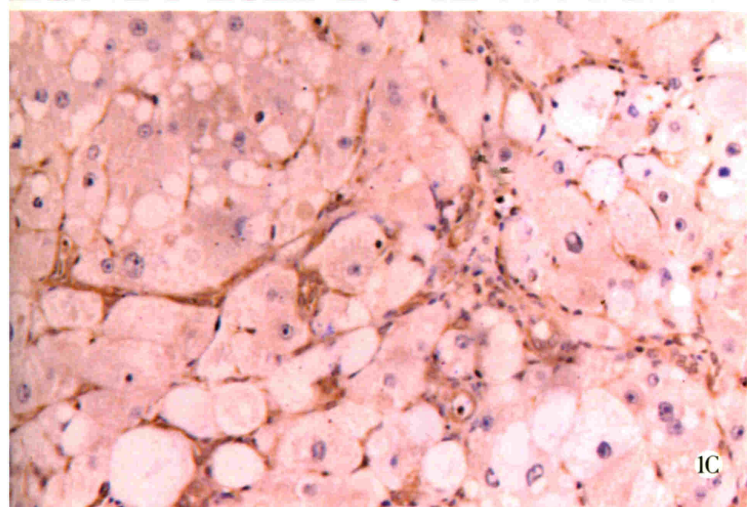
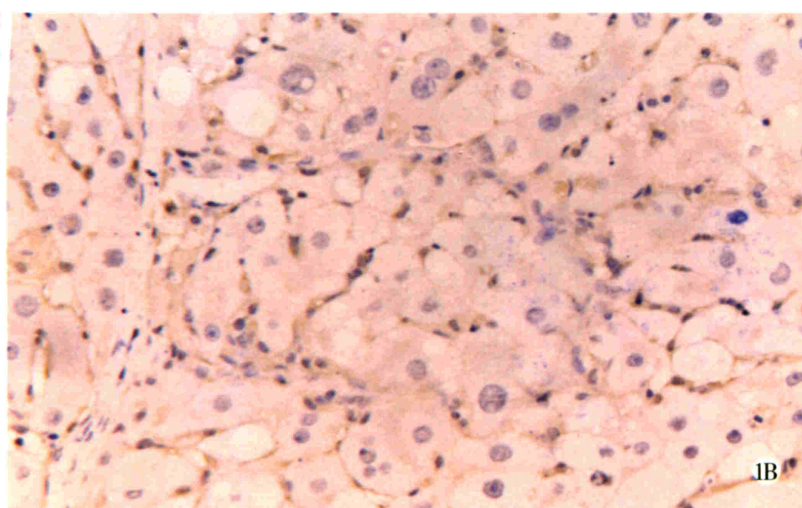
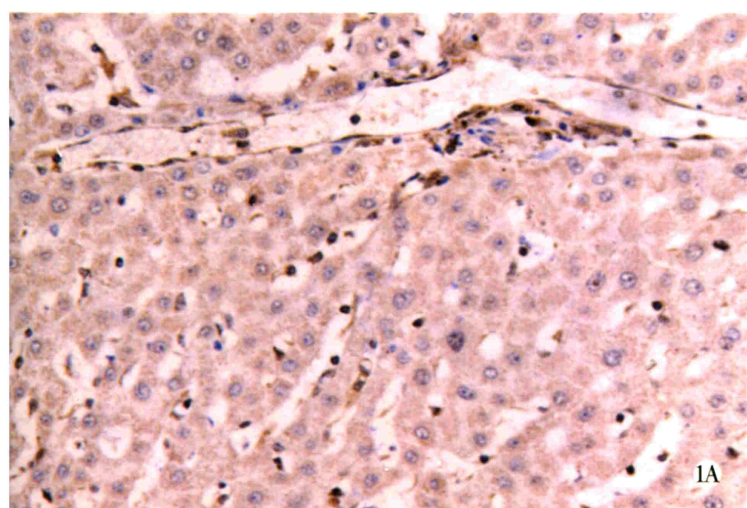
# 世界华人消化杂志®

**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 $\alpha$ 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	张金哲
黄象谦	张学庸
黄志强	赵东海
黎介寿	周殿元
刘耕陶	社长总编辑 马连生
裘法祖	中文编辑 潘伯荣
汤钊猷	王瑾晖
王宝恩	英文编辑 张建中
危北海	排版 李少华
吴孟超	校对 李天华
吴咸中	

**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

# HCVC 区 DNA 疫苗的研究现状

孙利,周永兴

孙利,周永兴,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  
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.  
收稿日期:2002-10-29 接受日期:2002-11-16

## 摘要

1974年Golafieid 首先报告输血后非甲非乙型肝炎. 1989年Choc et al 应用分子克隆技术获得本病毒基因克隆, 并命名本病及其病毒为丙型肝炎 (Hepatitis C)和丙型肝炎病毒 (HCV).由于至今尚未分离到病毒颗粒,使得必须以可得到的病毒核酸成分进行重组、表达蛋白,进而进行疫苗研究.本文详细阐述了HCV C区基因结构、HCV C蛋白功能以及HCV-C区DNA疫苗方面的内容及进展,以期将来进一步的研究提供帮助.

孙利,周永兴. HCVC 区 DNA 疫苗的研究现状. 世界华人消化杂志 2003;11(6):806-809

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/806.asp>

## 0 引言

HCV 归为黄病毒科 HCV, 是肠道外非甲非乙型肝炎的主要致病因子, 呈世界范围性, 其致病常引起持续感染, 并且 HCV 的慢性感染和慢性肝脏疾病、肝硬化及肝细胞癌(HCC)明显相关<sup>[1-7]</sup>. 因此, 运用疫苗保护免受 HCV 感染很有必要.从基因学角度来说, 慢性病毒性肝炎属获得性基因疾病, DNA 疫苗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>[1,8]</sup>. 相信随着分子生物学技术的发展, 基因治疗将为慢性病毒性肝炎患者带来福音.

## 1 HCV C 区基因结构

HCV 病毒体呈球形, 直径<80 nm(在肝细胞中为 36-40 nm, 在血液中为 36-62 nm), 为单股正链 RNA 病毒, 在核衣壳外包绕含脂质的囊膜, 囊膜上有刺突.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, 核心区基因位于 HCV 基因组 1-191 位氨基酸, 具有高度遗传保守性, C 基因表达产物具有良好的抗原稳定性.

## 2 HCV C 蛋白功能

C 蛋白经宿主蛋白酶裂解后产生蛋白 P23、P21 和 P16 (仅见于 HCV-1). C 蛋白主要位于胞质的内质网表面,

少数位于胞核内<sup>[9]</sup>, 呈颗粒状, 可在昆虫细胞内形成 40-60 nm 颗粒, 可能形成病毒衣壳;可调节几种转录和翻译的细胞基因, 作用于 5' UTR 的 IRES, 从而影响转录起始.C 蛋白可通过上调细胞周期蛋白 E 促进细胞增生, 可能通过基因调节实现致癌作用. C 蛋白促进或抑制细胞对 Fas 介导的凋亡, 与淋巴毒素-β 受体的尾部作用而抑制程序性细胞死亡(PCD). C 蛋白是较强的免疫刺激原, 可产生较强的免疫反应, 通过 NF-κβ 途径影响细胞水肿和免疫反应. HCV 核心蛋白的 N 端含有两个 DNA 结合区, 结合区序列与核内转移信号的部分重叠以及对结合靶 DNA 序列的非选择性可能是 HCV 核心蛋白具有多功能的基础<sup>[10]</sup>.

HCV 感染的慢性化和致 HCC 产生主要是通过病毒基因编码的蛋白与宿主细胞的相互作用实现.HCV 核心蛋白具有与 DNA 结合的基序、核定位信号、磷酸化位点, 可能具有基因调节的功能.近年来, 有大量的体内外实验揭示 HCV 核心蛋白能与细胞的多种蛋白结合, 调节多种细胞基因的转录活性, 在 HCV 感染的病理发生和慢性化以及宿主细胞的恶性转化等过程中起重要作用, 主要表现在影响细胞凋亡和免疫系统的功能, 并参与细胞恶性转化的发生等.

## 3 DNA 疫苗的概述

3.1 DNA 疫苗的定义 DNA 疫苗是将编码某种抗原蛋白的外源基因(DNA 或 RNA)直接导入动物体细胞内, 并通过宿主细胞的表达系统合成抗原蛋白, 诱导宿主产生对该抗原蛋白的免疫应答, 以达到预防和治疗疾病的目的. DNA 疫苗又称为基因疫苗或核酸疫苗, 这种免疫称为 DNA 介导的免疫、基因免疫、核酸免疫以及遗传免疫等.

3.2 构建 疫苗研究最鼓舞人心的新领域之一是 DNA 疫苗.将有关的基因克隆到大肠杆菌的质粒中, 使哺乳动物细胞增加该基因的表达.将其注入动物体内后, 该质粒进入宿主细胞核, 在核内仍以非整合形式存在, 并按要求合成抗原.以这种方式产生的抗原优于传统疫苗.首先, 在细胞内产生的抗原有可能以更为天然的折叠构型而有利于中和抗体的产生.抗原也可被带到细胞表面, 由淋巴细胞抗原 1 型分子表达.该质粒载体可能含免疫调节序列, 可刺激细胞免疫.

3.3 组成 DNA 疫苗由病毒的保护性抗原基因和载体质粒两部分组成.目的基因通常是选择该病毒的主要保护性抗原基因, 最好是可对多数毒株都有保护作用的抗

原基因. 抗原基因可以是单个基因或具有协同保护功能的一组基因, 也可以是编码抗原决定簇的一段核苷酸序列. 质粒载体必须是能在大肠杆菌中高拷贝地扩增, 而在动物细胞内则能高效表达, 但不复制, 也不含有向宿主细胞基因组内整合的序列. 一般以 PBR322 或 PUC 质粒为基本骨架, 带有细菌复制子(ORI), 真核生物的启动子(有的含有增强子)和 Poly-A 加尾信号. 启动子大多来源于病毒基因组, 如 CMV, PSV, LTR 等, 其中以 CMV 的转录活性最高; Poly-A 序列具有保证 mRNA 在体内的稳定性的作用, 这种稳定性因 Poly-A 来源不同而异, 目前认为较好的 Poly-A 来自牛生长激素基因或兔 B 球蛋白基因; 载体中如果含 SV40 复制起始点, 应该使其缺失. 筛选基因可以选用卡那霉素, 氨苄青霉素或新霉素等抗性基因.

**3.4 优点** 传统用于传染病预防的疫苗有减毒活疫苗、灭活疫苗、亚单位疫苗和重组活载体疫苗等, 与这些疫苗相比, DNA 疫苗免疫效果好, 对已有免疫力的个体接种仍可起作用, 且免疫应答持久, 很微量的抗原即可刺激机体产生强而持久的免疫应答. DNA 疫苗引起 CTL 应答, 不存在散毒及毒力回升的危险. DNA 疫苗易于构建, 且方法简便、价格低廉、用量少, 便于贮藏和运输, 使用也较为方便, 比其他疫苗更经济. DNA 疫苗具有相同的理化性质, 为联合免疫提供了可能.

**3.5 免疫应答** 在开发和研制 HCV 疫苗的过程中, DNA 免疫是在快速构建、评价和筛选免疫原方面的有效办法. 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>[11]</sup>.

## 4 HCV C 区 DNA 疫苗的研究进展

**4.1 丙肝 DNA 疫苗定义** 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 I 类(MHC-I)途径刺激 CD<sub>8</sub><sup>+</sup> 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>[12]</sup>.

**4.2 HCV C 区 DNA 疫苗制备** HCV 的 DNA 疫苗制备主要集中在能刺激保护性抗体产生的包膜蛋白以及能诱导细胞毒性 T 淋巴细胞的核心蛋白或 NS 5 肽. 将编码核心蛋白(pC)、E1 蛋白(pE1)、E2 蛋白(pE2)、核心蛋白 E1、E2(pCE1E2)、E1 和 E2 蛋白(pE1E2)、E2 结构 N-端高变区(pE2-HVR)的质粒转染到哺乳类动物细胞

以及接种于鼠, 发现 6 种 DNA 质粒在细胞内均能表达特异性的抗原, 但有编码核心蛋白的质粒能导致特异性的细胞毒性 T 淋巴细胞反应. 两种长度的 HCV 核心基因片段在 E.coli 中的表达, 从 HCV 感染者的血清扩增出核心区基因, 利用表达质粒 pQE-30, 构建了两种重组质粒, 其插入片段分别为 HCV 的全长核心区基因(c573)和“截断型”基因(c375). 经 IPTG 诱导, 含两种质粒的菌株都表达了目的蛋白, c573 表达的蛋白分子量为 22 kD, 表达量占菌体蛋白的 8.7%; c375 表达的蛋白分子量为 19kD, 表达量占菌体蛋白的 39.9%. 经 Ni-NTA 金属螯合层析纯化, 获得了高纯度的目的蛋白. 这两种蛋白均可特异地与丙型肝炎患者血清发生反应, 表明具有良好的抗原活性.

**4.3 HCV C 区 DNA 疫苗表达** 人肝细胞<sup>[13]</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>[14]</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>[15,16]</sup>. Hao et al<sup>[17]</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>[18]</sup>.

**4.4 免疫应答** HCV 核心基因疫苗能诱导 Balb/c 小鼠产生良好的细胞及体液免疫应答<sup>[19-25]</sup>. 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(pHCVSt)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 pHCVSt 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 pHCVSt 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 pHCVC 的转基因小鼠产生了独特型抗 C 的 CTL 活性<sup>[26]</sup>.

**4.5 增强策略** 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)的黄疸病毒增强了对 HCV 蛋白的抗体和细胞反应, CD8(+)T 细胞反应增强<sup>[27]</sup>. 重组体 pCD-HCV1、pCD-HCV2 和 pCD-HCV3 均可诱导小鼠产生抗体和脾细胞对 HCV 抗原增生反应<sup>[28-30]</sup>; 重组体还可诱导鼠 PBMC 对 HCV 抗原的增生反应及使 SP2/0-HCV-C 细胞成瘤性显著降低; 通过免疫鼠荷瘤检测体内 CTL 反应, 可观察到免疫组鼠发瘤时间滞后, 发瘤部位减少和存活时间延长. 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<sup>[31]</sup>; 与表达 IL-12 质粒联合接种后, 治疗作用加强<sup>[32]</sup>. 脂质转染剂<sup>[33]</sup>或联合注射 GM-CSF 细胞因子<sup>[22]</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>[34,35]</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>[36]</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>[37]</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>[38]</sup>.

4.6 联合免疫 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>[39]</sup>. HCV 口服减毒鼠伤寒沙门菌 DNA 疫苗可诱发特异性的免疫应答<sup>[40]</sup>. 为探讨复合多表位丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 及恶性疟原虫 (plasmodium falciparum, Pf) 双价疫苗的可行性, Huang et al<sup>[41]</sup> 将人工合成的复合多表位 HCV 基因 PCX 及 Pf 抗原基因 AB (SPf66+SPf105) 克隆到谷胱甘肽转硫酶 (Glutathione S-transferase, GST) 表达载体 pGEX-2T 中, 并在大肠杆菌中高效表达 GST-HCV-Pf 复合抗原 (GST-CAB), 发现 GST-CAB 融合蛋白具有良好的 HCV 及 Pf 免疫特异性, 可诱发理想的体液及细胞免疫应答, 可望成为 HCV-Pf 双价疫苗的候选抗原. 免疫多表位的 PCX 蛋白可以诱导机体产生高水平的免疫应答<sup>[42]</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. CspcDNA3.1 融合重组质粒都优于 CpcDNA3.1+SpcDNA31 联合基因的免疫, 融合 DNA 疫苗有望成为慢性病毒性肝炎预防和治疗的控制剂<sup>[43]</sup>.

4.7 展望 DNA 疫苗可产生强大的细胞免疫, 这是灭活的传统疫苗无法产生的. 联合疫苗机制可诱导增强 CD8 (+)CTL 和 IgG2a 反应, 这会涉及许多病原体疫苗的发展, 包括 HCV, 后者需要很强的抗体和 CTL 反应<sup>[44]</sup>. 电基因传递 (EGT) 法将质粒 DNA 转入到肌纤维中, 是一种提高遗传免疫力的策略. EGT 诱导产生的体液反应比传统的裸 DNA 免疫高 10-30 倍. EGT 提高细胞和体液免疫的能力是抗原非依赖性的, 可望成为将来防治 HCV 及其他感染性疾病的一种安全低费用的治疗方法<sup>[45]</sup>. 用复制和非复制核酸疫苗与 rSFVs 来评估抗 HCV 疫苗的发展<sup>[46]</sup>; 描述 p214K9 表位并结合用流式细胞仪分析 CTL 反应可以成为定级不同 HCV 疫苗策略产生原始 CTL 反应的能力的方法之一<sup>[47]</sup>. DNA 疫苗产生的细胞免疫在保护机体免受结核杆菌、疟原虫、利什曼原虫、HIV 等细胞内致病原的侵袭方面起重要作用. 实际上, 这是迄今为止一直在小鼠体内进行的研究<sup>[48]</sup>. 给 20 名志愿者肌注 3 剂恶性疟原虫环孢子蛋白, 其中 11 名志愿者外周血出现细胞毒 T 细胞. 这些资料十分鼓舞人心, 但其安全性问题以及是否能产生保护水平的免疫反应需进一步得以验证.

## 5 参考文献

- 1 Prince AM. Perspectives on prophylactic and therapeutic immunization against hepatitis B and C viruses. *Transfus Clin Biol* 2001;8:467-470
- 2 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;14:47-51
- 3 Liu RH. Chronic liver disease and hepatitis B and hepatitis C virus infection. *J Ningxia Med* 2000;22:209-210
- 4 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;29:99-100
- 5 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;20:40-42
- 6 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;10:27-29
- 7 Prince AM, Shata MT. Immunoprophylaxis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2001;5:91-103
- 8 Brinster C, Inchausti G. DNA vaccines for hepatitis C virus. *Intervirology* 2001;44:143-153
- 9 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 Experimental Clinical Virol* 2002;16:37-39
- 10 Yi DX, Guan DY. Determination of DNA binding domains in hepatitis C virus core protein. *Chin J Hepatol* 2001;9:160-162
- 11 Stevenson FK, Rosenberg W. DNA vaccination: a potential weapon against infection and cancer. *Vox Sang* 2001;80:12-18
- 12 Tang XP, Xu YL, Yuan XZ, Zhang FC. Activity of HCV-specific cytotoxic T lymphocytes in chronic hepatitis C. *Chin J Epidemiol* 2001;19:212-215
- 13 Ma QY, Hao F, Wang YM. Study on the infection of normal adult hepatocytes with HCV in vitro. *J Third Military Med University* 2001;23:1216-1218
- 14 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 Advanced Colle* 2002;23:1-3
- 15 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
- 16 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;17:425-429
- 17 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
- 18 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
- 19 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. *Fundamental Med Clinic* 2000;20:41-42
- 20 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;16:184-186
- 21 Ceng XW, Du Y, Wang QC. Research on DNA vaccines of hepatitis C virus. *J Sichuan University* 2000;37:582-585
- 22 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
- 23 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
- 24 Deng T, Chen NL, Chen TB, Wu SS, Wang MW, Jia KM. Plasmid hepatitis C virus core protein: DNA-based immunization for im-

- immune responses in Balb/c mice. *Chin J Immunol* 1999;11:494-496
- 25 Feng ZH, Zhou YX, Jia ZS, Lian JQ, Li JG, Li WB. Immune responses to recombinant expression plasmid encoding hepatitis C virus core antigen. *Chin J Internal Med* 1999;7:462-468
- 26 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
- 27 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
- 28 Dou J, Liu KZ, Chen Z, Wo EJ, Liu Y, He NX, Xu CH, Chen MH. Study on immune responses to recombinant protein in mice inoculated with pCD-HCV1 DNA recombinant. *Chin J Epidemiol* 1999;2:91-93
- 29 Dou J, Liu KZ, Chen Z, Wo JR, Liu Y, Xu CH, He NX, Zhang MT, Wang XZ. Preliminary inquiry into approach of HCV-DNA nucleic acid immunity. *Chin J Immunol* 1999;4:155-157
- 30 Dou J, Liu KZ, Chen Z, Wo JE, Liu Y, Xu CH, Chen MH, Jin JH. Experimental study of immunization of mice with hepatitis C virus genetic vaccine constructs. *Chin J Internal Medicine* 1999;6:390-392
- 31 Shan MM, Liu KZ, Chen Z. DNA Vaccination of the induction of immune responses by hepatitis C structural antigens. *Viral Sinica* 2000;15:14-21
- 32 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;19:11-14
- 33 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 Military Medical University* 2000;21:817-819
- 34 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;18:149-152
- 35 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. *Chin J Med* 2002;82:77-80
- 36 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;17:289-294
- 37 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;17:323-327
- 38 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;16:220-226
- 39 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 Cellular Molecular Immunol* 2001;17:52-54
- 40 Huang JS, Hu YQ, Xie YM, Xu C, Zhang MH, Zhang LY, Chen LY, Ren DM. Immunogenicity of a multi-epitopes antigen gene of hepatitis C virus carried by attenuated *Salmonella typhimurium* SL3261. *Chin J Epidemiol* 1999;4:234-237
- 41 Huang JS, Zhong XL, Bi HX, Dong WQ, Zhang Q, Xie YM, Yuan J, Li AK, Dong N, Ren DM. Expression of multi-epitopes antigen gene of hepatitis C virus and *Plasmodium falciparum* fused to glutathione S-transferase gene. *Chin J Immunol* 1999;6:250-253
- 42 He CQ, Yang F, Dai JJ, Hu F, Huang JS, Li QH. Immune responses in rhesus monkeys vaccinated with multi-epitope antigen of HCV and challenged by HCV virus. *Viral Sinica* 2002;17:30-33
- 43 Ying W, Xu ZK, Xue XP, Ma YY, Fu L, Lu X. Study on the immunization effect of the chimeric and the united genetic immunization including HBV and HCV. *Chin J Cellular Molecular Immunol* 2001;17:473-474
- 44 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
- 45 Zucchelli S, Capone S, Fattori E, Folgori A, Di Marco A, Casimiro D, Simon AJ, Laufer R, La Monica N, Cortese R, Nicosia A. Enhancing B- and T-cell immune response to a hepatitis C virus E2 DNA vaccine by intramuscular electrical gene transfer. *J Virol* 2000;74:11598-11607
- 46 Vidalin O, Fournillier A, Renard N, Chen M, Depla E, Boucreux D, Brinster C, Baumert T, Nakano I, Fukuda Y, Liljestrom P, Trepo C, Inchausti G. Use of conventional or replicating nucleic acid-based vaccines and recombinant Semliki forest virus-derived particles for the induction of immune responses against hepatitis C virus core and E2 antigens. *Virology* 2000;276:259-270
- 47 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
- 48 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



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](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

