

小鼠对乙肝病毒小基因嵌合DNA疫苗免疫应答

张建军, 杨向东, 史小玲, 袁志平, 王超

张建军, 泸州医学院附属医院感染病科 四川省泸州市 646000
张建军, 杨向东, 泸州医学院附属医院分子医学中心实验室 四川省泸州市 646000
史小玲, 泸州医学院附属医院传染与免疫研究室 四川省泸州市 646000
袁志平, 宜宾市第二人民医院肿瘤科 四川省宜宾市 644000
王超, 山东省疾病预防控制中心 山东省济南市 2500014
四川省卫生厅资助项目, No. 000111
通讯作者: 张建军, 646000, 四川省泸州市, 泸州医学院附属医院感染病科. zhangjianjun2535@163.com
收稿日期: 2006-09-21 接受日期: 2006-10-11

Immunologic response to a hepatitis B virus small gene chimeric DNA vaccine in mice

Jian-Jun Zhang, Xiang-Dong Yang, Xiao-Ling Shi, Zhi-Ping Yuan, Chao Wang

Jian-Jun Zhang, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China
Jian-Jun Zhang, Xiang-Dong Yang, Central Laboratory for Molecular Medicine, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China
Xiao-Ling Shi, Department of Infectious Diseases and Immunology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China
Zhi-Ping Yuan, Department of Oncology, the Second People's Hospital of Yibin City, Yibin 644000, Sichuan Province, China
Chao Wang, Shandong Provincial Center for Disease Prevention and Control, Ji'nan 2500014, Shandong Province, China
Supported by Sichuan Provincial Bureau of Health, No. 000111
Correspondence to: Jian-Jun Zhang, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. zhangjianjun2535@163.com
Received: 2006-09-21 Accepted: 2006-10-11

Abstract

AIM: To investigate the immunologic response to pcHBV-CD80, a hepatitis B virus (HBV) small gene chimeric DNA vaccine containing CD80, in mice.

METHODS: Five randomly divided mouse groups were inoculated twice at a 2-week interval by intramuscular injection with pcHBV-CD80 (containing HBV-preS₂ 120-134, core 47-56, core 57-76, core 170-180 and human CD80

genes), pcHBV (containing HBV-preS₂ 120-134, core 47-56, core 57-76 and core 170-180 genes), pcDNA-CD80 (containing human CD80 gene), pcDNA3.1(empty plasmid), and normal saline, respectively. The levels of specific antibodies, interferon- γ (IFN- γ) and the rate of lymphocyte transformation in the mice were detected.

RESULTS: Both plasmids pcHBV-CD80 and pcHBV induced the production of specific antibodies, and the levels of anti-preS₂ and anti-HBc were not significantly different between the former two groups (anti-preS₂: 15125.52 nkat/L vs 14463.56 nkat/L; anti-HBc: 7607.35 nkat/L vs 7711.21 nkat/L; both $P > 0.05$). However, pcHBV-CD80 had a higher efficacy in increasing the production of γ -IFN (1266.7 ng/L vs 986.3 ng/L, $P < 0.01$) and lymphocyte transformation rate than pcHBV did.

CONCLUSION: HBV small gene chimerical DNA vaccine containing CD80 can stimulate the specific humoral and cellular immunologic responses in mice.

Key Words: Chimeric DNA vaccine; Small gene; CD80 molecule; Hepatitis B virus

Zhang JJ, Yang XD, Shi XL, Yuan ZP, Wang C. Immunologic response to a hepatitis B virus small gene chimeric DNA vaccine in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(1):61-63

摘要

目的: 探讨含CD80的乙肝病毒小基因嵌合DNA疫苗的免疫应答.

方法: 以乙肝病毒小基因嵌合DNA疫苗 pcHBV-CD80(含CMV启动子、HBV-preS₂片段、HBV-C片段和CD80)、pcHBV (含CMV启动子、HBV-preS₂片段、HBV-C片段), 以及质粒pcDNA-CD80、pcDNA3.1和生理盐水, im免疫小鼠2次(间隔2 wk), 末次接种后2 wk时检测特异性抗体、 γ -IFN水平和淋巴细胞转化率.

结果: 质粒pcHBV-CD80和pcHBV免疫后均

■背景资料

我国现在HBV感染者多达1.2亿, 部分感染者可能演变为肝纤维化、肝硬化和肝癌. 机体对外周血循环中乙肝病毒的清除, 主要依靠抗-HBs; 而要彻底清除受感染肝细胞内的HBV, 则需要针对C抗原的细胞免疫功能, 即CTLs的功能. 乙肝病毒感染慢性化或持续感染的成因, 在病毒方面, 主要是基因变异(包括S区和/或C区)导致的免疫逃避; 宿主方面的因素比较复杂, 包括HBV特异性T细胞克隆排除、病毒基因产物引起的免疫耐受、CTLs细胞不能到达之部位发生的感染等. 其中, 免疫耐受是主要原因. 所以, 打破乙肝病毒免疫耐受, 应该是彻底治愈乙肝病毒感染的有效途径.

■创新盘点

以往对乙型肝炎DNA疫苗的研究重点,在于筛选有效的目的基因,以及目的基因与细胞因子嵌合后的免疫增强效应。本文采用基因重组技术,将乙肝小基因与协同刺激信号CD80基因融合,构建成融合乙肝DNA疫苗,旨在提高乙肝DNA疫苗的免疫效果,可望通过基因免疫,获得免疫原性强、以低剂量即可有效刺激机体产生T细胞和B细胞应答、安全可靠的新型乙肝DNA疫苗。

可检测到特异性的抗体,抗-preS₂在pcHBV-CD80组和pcHBV组分别为15125.52 nkat/L和14463.56 nkat/L;抗-HBc在pcHBV-CD80组和pcHBV组分别为7607.35 nkat/L和7711.21 nkat/L,两组间无明显差异;但pcHBV-CD80更能增加γ-IFN的产生(1266.7 ng/L vs 986.3 ng/L, $P<0.01$),并增强免疫小鼠的激淋巴细胞转化。

结论: 含CD80的乙肝病毒小基因嵌合DNA疫苗可诱导特异性的体液免疫和细胞免疫应答。

关键词: 嵌合DNA疫苗; 小基因; CD80分子; 乙型肝炎病毒

张建军, 杨向东, 史小玲, 袁志平, 王超. 小鼠对乙肝病毒小基因嵌合DNA疫苗免疫应答. 世界华人消化杂志 2007;15(1):61-63 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/61.asp>

0 引言

机体彻底清除受感染肝细胞内的乙肝病毒(HBV),需要针对C抗原的细胞免疫功能,即CTLs的功能^[1]。我们选择已经明确之HBV preS₂区主要编码B细胞表位的基因,与C区T细胞表位编码基因相嵌合,构建了小基因DNA疫苗,再将共刺激因子CD80嵌合新型的疫苗,免疫小鼠后,研究该新型疫苗在小鼠中的体液免疫和细胞免疫应答情况。

1 材料和方法

1.1 材料 嵌合乙肝小基因DNA疫苗pcHBV和pcHBV-CD80由本室构建,经测序确认前者含编码HBV-preS₂ 120-134, Core 47-56, Core 57-76, Core 170-180位多肽的嵌合基因,后者含上述基因和人CD80基因(另文发表);6 wk龄、清洁级的健康小鼠C57BL/6N,由泸州医学院实验动物中心提供,体质量18-22 g。随机分为(1)pcHBV-CD80疫苗组;(2)pcHBV组;(3)pcDNA-CD80组;(4)空载体pcDNA3.1组和(5)空白对照组;每组10只,雌雄各半;抗-preS₂和抗-HBc EIA检测试剂盒购自北京肝炎试剂研制中心;IFN-γ检测试剂盒由晶美公司提供;MTT细胞增殖试验试剂盒购自Roche公司。

1.2 方法 取纯化后的质粒DNA 10 μL稀释至含9 g/L NaCl溶液的3 mL比色皿中,以生理盐水为空白对照,以 $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$ 为纯度合格要求,稀释质粒DNA至1.0 g/L, -20℃保存备用。第(1)、

表 1 IFN-γ的检测结果(mean ± SD, ng/L)

组别	疫苗	IFN-γ
(1)	pcHBV-CD80	1266.7 ± 102.4 ^a
(2)	pcHBV	986.3 ± 86.3 ^b
(3)	pcDNA-CD80	533.6 ± 55.9 ^c
(4)	pcDNA3.1	165.8 ± 39.5 ^e
(5)	生理盐水	144.3 ± 24.9

^a $P<0.01$ vs 其他各组; ^b $P<0.05$ vs (3)(4)(5)组; ^c $P<0.05$ vs (4), (5)组; ^e $P>0.05$ vs (5)组。

(2)、(3)、(4)组每只小鼠两侧股四头肌共注射100 μL(每侧50 μL)相应质粒DNA,第(5)组即空白对照组同法注射100 μL生理盐水;2 wk后同法加强免疫一次。

1.2.1 抗-preS₂、抗-HBc和IFN-γ的检测 末次免疫后2 wk处死小鼠,心脏采血,3000 r/min离心30 min分离血清, -20℃冻存,按北京肝炎试剂研制中心的抗-preS₂和抗-HBc EIA检测试剂盒进行检测,方法按说明书进行。IFN-γ的检测,按晶美公司ELISA检测试剂盒说明书操作。

1.2.2 脾淋巴细胞转化实验 于免疫后的第5周,每组随机抽取5只小鼠,无菌取脾,常规方法制备脾细胞悬液,用1640液调细胞浓度至 1×10^6 /L时,作ConA(5 mg/L)刺激,并以单纯1640培养液作对照孔;MTT(5 mg/L)染色,测 A_{570} ,计算刺激指数(SI): $SI = \text{ConA刺激孔}A_{570} / \text{对照孔}A_{570}$ 。

统计学处理 组间计量资料采用校正 t 检验,双侧检验, $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 诱导小鼠抗-preS₂、抗-HBc和IFN-γ的产生 免疫后第2周,抗-preS₂在(1)和(2)组分别可检测到 $15\ 125.52 \pm 377.24$ nkat/L和 $14\ 463.56 \pm 331.07$ nkat/L;抗-HBc在(1)和(2)组分别可检测到 7607.35 ± 428.59 nkat/L和 7711.21 ± 312.90 nkat/L,两组抗体滴度无显著差异;而(3)、(4)、(5)组未检测到相应抗体。IFN-γ的产生,在不同的组间,出现比较大的差别:(1)组平均值高达1266.7 ng/L, (2)组也平均产生了986.3 ng/L, (3)组平均533.6 ng/L, (4)组和(5)较低(表1)。

2.2 淋巴细胞转化实验结果 (1), (2), (3), (4)和(5)组的淋巴细胞转化实验刺激指数均值分别为 4.914 ± 0.667 、 3.421 ± 0.352 、 2.353 ± 0.264 、 1.356 ± 0.135 和 1.313 ± 0.198 , (1)组与其他各组有显著性差异; (2)组与(3), (4)和(5)有显著性差异; (3)组与(4)和(5)有显著性差异;而(4)和(5)间无差异。

3 讨论

1970年代, 乙型肝炎(HB)病毒(HBV)的发现和HB的肆虐, 催生了HBV疫苗. 30余年来, HBV疫苗的种类已由最初单一血源HBV疫苗发展为目前的多种基因重组HBV(rHBV)疫苗^[1-3], 而用于免疫治疗研究的, 则多为核酸疫苗(DNA疫苗).

蛋白质抗原抗原提呈细胞摄取后, 将被降解成8-12个氨基酸的短肽, 这些短肽带有不同的抗原表位, 分别与MHC I类和MHC II类分子结合并被提呈到细胞表面, 与MHC I类分子结合的短肽激活CD8⁺T细胞(CTL), 与MHC II类分子结合的短肽激活CD4⁺T细胞, 而分泌到细胞外的抗原则被表达相应抗体的B细胞捕捉, 并在Th细胞分泌淋巴因子的刺激下转化为浆细胞, 大量分泌抗体. 人体感染HBV后, 血清中病毒主要依靠特异性保护抗体, 即抗-HBs清除, 而肝细胞中的病毒, 则需要特异性细胞毒淋巴细胞(CTLs)来清除, 主要是针对HBcAg的CTLs^[4-5]. 根据这个原理, 治疗慢性HBV感染的疫苗, 应该满足既能诱导体液免疫、又能激发细胞免疫. DNA疫苗, 或核酸疫苗, 应用于慢性HBV感染治疗的研究, 已经取得了初步的效果. DNA疫苗可以明显增强受试者的细胞免疫应答^[6-7]. 而只含有HBcAg第18-27位氨基酸的疫苗, 也能诱导明显的T细胞应答^[5], 说明只含有B细胞表位和T细胞表位的疫苗, 能够取代大分子的亚组分疫苗. 本研究选择含编码HBV-preS₂ 120-134, Core 47-56, Core 57-76, Core 170-180位多肽^[8]的嵌合基因, 所构建的DNA疫苗, 在小鼠体内, 能够诱导出特异性抗体, 也能有效刺激 γ -IFN和淋巴细胞转化. 国内赫兢等研究也发现, HBV preS₂核酸疫苗的免疫接种效果, 比S核酸疫苗好^[9].

有研究显示, 与乙肝疫苗强应答者相比, 无、弱应答者外周血单个核细胞(PBMC)体外对外源性rHBsAg刺激的增殖反应明显低

下, PBMC 共刺激分子CD80, CD86的表达显著降低, IL-12和IL-10的产生均有所减少, 说明rHBsAg诱导的免疫应答中, 共刺激信号以及促进TH1细胞和TH2细胞增殖分化的细胞因子都明显不足^[10]. 向机体APC细胞提供CD80分子, 增加表达, 应该是解决该问题的思路之一. 本研究所构建的嵌合DNA疫苗pcHBV-CD80, 尽管在诱生抗体水平, 与无CD80质粒间无差异, 但其IFN- γ 水平、淋巴细胞转化方面, 明显优于无CD80质粒. 本研究显示, preS₂区主要编码B细胞表位的基因, 与C区T细胞表位编码基因, 以及CD80嵌合的新型疫苗, 能够有效诱导机体体液免疫和细胞免疫应答.

4 参考文献

- 1 洪源, 成军. 肝炎病毒DNA疫苗的研究. 世界华人消化杂志 2002; 10: 221-222
- 2 陈仕珠, 高建宏. 乙肝病毒疫苗的类型及其免疫原性和安全性. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2696-2700
- 3 洪源, 成军, 董菁, 李克, 王琳, 王刚, 刘妍. 乙型肝炎病毒HBsAg重组疫苗与表面抗原DNA疫苗诱导H-2b小鼠免疫应答的实验研究. 世界华人消化杂志 2002; 10: 137-140
- 4 梁扩寰, 李绍白. 肝脏病学. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 496
- 5 Huang CF, Lin SS, Ho YC, Chen FL, Yang CC. The immune response induced by hepatitis B virus principal antigens. *Cell Mol Immunol* 2006; 3: 97-106
- 6 Shata MT, Pfahler W, Brotman B, Lee DH, Tricoche N, Murthy K, Prince AM. Attempted therapeutic immunization in a chimpanzee chronic HBV carrier with a high viral load. *J Med Primatol* 2006; 35: 165-171
- 7 Thermet A, Rollier C, Zoulim F, Trepo C, Cova L. Progress in DNA vaccine for prophylaxis and therapy of hepatitis B. *Vaccine* 2003; 21: 659-662
- 8 Engler OB, Dai WJ, Sette A, Hunziker IP, Reichen J, Pichler WJ, Cerny A. Peptide vaccines against hepatitis B virus: from animal model to human studies. *Mol Immunol* 2001; 38: 457-465
- 9 赫兢, 辛绍杰, 毛远丽, 貌盼勇, 沈宏辉, 杨健洋, 徐军, 孔维. 前S₂抗原对乙型肝炎DNA疫苗免疫应答的影响. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2196-2198
- 10 黄茵, 陈智, 徐承槐, 黄茵, 陈智, 徐承槐, 李敏伟, 蔡玲斐, 金建华. 乙肝疫苗无、弱应答与B72CD28及IL-12、IL-10的相关性. 免疫学杂志 2002; 18: 452-455

■同行评价

本文研究的内容是重要的, 也比较新, 通过研究得出了一定的数据与结果, 提供了有意义的信息. 本文具有科学性与一定的创新性.

电编 李琪 编辑 张焕兰