

44-21

## HCV 编码病毒结构蛋白的 DNA 免疫研究\*

单梅梅, 刘克洲, 陈智

R373.21

(浙江大学医学院附属一院传染病研究所, 杭州 310031)

**摘要:**应用 HCV C (pC) 和 HCV CE<sub>1</sub>E<sub>2</sub> (pCE<sub>1</sub>E<sub>2</sub>) 重组体转染真核细胞并且通过肌注免疫 BALB/C 小鼠, 对其体液免疫和细胞免疫进行检测。所用的 pC 和 pCE<sub>1</sub>E<sub>2</sub> 均可在真核细胞内表达出特异性 HCV C 蛋白; 肌注 DNA 免疫后均可诱导出 BALB/C 小鼠的体液和细胞免疫反应, 抗体反应的 A 值: pC 组为  $0.358 \pm 0.096$ , pCE<sub>1</sub>E<sub>2</sub> 组为  $0.415 \pm 0.127$ ; CTL 活力 pC 组为  $18.65\% \pm 5.72\%$ , pCE<sub>1</sub>E<sub>2</sub> 组为  $20.07\% \pm 11.11\%$ ; 通过免疫鼠荷瘤检测体内 CTL 反应, 可观察到免疫鼠发瘤时间滞后, 发瘤部位减少和存活时间延长。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。

**关键词:**丙型肝炎病毒; 病毒结构区蛋白; DNA 免疫

**中图分类号:** Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2000)01-0014-08

近来一些实验结果提示 DNA 免疫能诱导针对 HCV 的特异性抗体和 CTL 反应, 并在黑猩猩模型上亦显示一定的保护作用<sup>[1-3]</sup>, 说明发展 HCV DNA 疫苗是可行的。在 HCV 众多基因型中, HCV C 蛋白相对保守, 并且针对 C 蛋白的细胞免疫, 即 CTL 反应可减低感染者的慢性化比率, 因此在慢性感染者中 HCV C 区基因是诱导抗病毒免疫的主要候补基因。

本研究从我国输血后抗-HCV 阳性病人血清中, 采用 RT-PCR 法克隆出 HCV C 和 CE<sub>1</sub>E<sub>2</sub> 区基因片段(测序证实为 HCV II/1b 型), 构建高效真核细胞表达载体, 建立起稳定表达 HCV C 蛋白 SP2/0 和 P815 细胞系。用上述重组体免疫 BALB/C 小鼠, 对其体液免疫和细胞免疫进行检测, 探讨 HCV 结构区抗原 DNA 免疫的可能性, 进而推测其有效性, 为今后 HCV DNA 疫苗的研制提供实验和理论基础。

## 1 材料和方法

**1.1 主要试剂** pcDNA3.1/His 真核细胞表达载体购自美国 Invitrogen (San Diego, CA) Bluescript SK 载体 (华东制药厂徐放博士惠赠), pCE<sub>1</sub>E<sub>2</sub> (浙江医科大学传染病研究所窦骏博士惠赠), MMLV 逆转录酶 (Promega), DNA 聚合酶 (Pow DNA Polymerase, Boehringer Mannheim), 快速 DNA 连接试剂盒 (Boehringer Mannheim), 立可读 EIA (TMB-快速法) 检测抗-HCV 试剂盒 (上海科华生物技术有限公司), Cyto To × 96<sup>R</sup> Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega)。

**1.2 细菌和细胞株** *E. coli* DH-5 $\alpha$ , JM109, *E. coli* Top10<sup>+</sup>; 小鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0) 和小鼠肥大细胞瘤细胞

收稿日期: 1998-11-09, 修回日期: 1999-05-06

作者简介: 单梅梅, 女, 哈尔滨人, 36 岁, 博士, 主治医师, 主要从事病毒性肝炎防治研究。

\* 本文为国家和省自然科学基金资助项目 39670665, 396461

(P815)购自中国科学院上海细胞研究所。

1.3 实验动物 BALB/C 鼠, H-2<sup>d</sup> 雄性, 6~8 周龄, 购于北京中国实验动物中心, 属二级动物。

1.4 HCV C 区基因的克隆 收集输血后抗-HCV 阳性病人血清, 以 Trizol Reagent 抽提总 RNA, MMLV 逆转录酶合成第一链, 以其为模板进行 HCV C 的 PCR 扩增。上游引物为 5'-CGAGGATCCAGCA-CAAATCCTAAACCTCAAAG-3', 下游引物为 5'-CTATCTAGAAGCGGAAGCTGGGATGGTCA-3', 上游引物设计了 Bam HI 酶切位点, 下游引物设计了 Xba I 酶切位点, 产物预计 587 bp。PCR 反应体积为 50  $\mu$ L, 引物浓度 0.2  $\mu$ mol/L, 扩增参数 94  $^{\circ}$ C 1 min, 56  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环后产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。PCR 产物经酶切后, 克隆至 pBluescript-SK 载体上(pSK HCV-C), 用 T3 和 T7 为引物进行双向测序。

1.5 HCV C 真核表达载体的构建 按文献[4]提供的方法, pSK-HCV-C 经 Bam HI 和 Xba I 双酶切后的片段定向插入 pcDNA 3.1/His 中的相同位点, 得到重组体 pC。pC 重组体含有 CMV 启动子、HCV C cDNA 和 BGH 的 PolyA 终止序列。pC 大量制备, 经纯化后备用。

1.6 HCV C 蛋白在真核细胞中表达 用 Lipofectamine 分别将 pcDNA3.1/His (pBLANK) 和 pC 转染 P815 和 SP2/0 细胞, G418 压力筛选, 用有限稀释法筛选出阳性细胞克隆。P815 细胞系作为检测体外 CTL 反应的靶细胞, SP2/0 细胞作为检测体内 CTL 反应的靶细胞。

1.7 BALB/C 鼠的 DNA 免疫及荷瘤实验 BALB/C 小鼠, 随机分为 3 组, 每组均为 10 只, 1 组为对照组, 注射 pBLANK, 2 组注射 pC, 3 组注射 pCE<sub>1</sub>E<sub>2</sub>。质粒载体于小鼠股四头肌进行多点注射, 首次均为 200 微克·次<sup>-1</sup>·只<sup>-1</sup>, 以后改为 100 微克·次<sup>-1</sup>·只<sup>-1</sup>, 每只小鼠免疫 3 次, 间隔 2 周免疫一次。于最后一次免疫后 4 周, 上述各组均有 5 只鼠用于荷瘤试验, 5  $\times$  10<sup>5</sup> 细胞/100  $\mu$ L SP2/0 细胞分四点双肺部皮下注射, 每隔 3~5 d 观察记录肿瘤大小, 发瘤部位和存活时间等, 直至对照组全部死亡为止。

1.8 BLAB/C 鼠的血清抗-HCV 检测 小鼠接受免疫后 0、3、5、8 周采血, 无菌断尾取血, 置 4  $^{\circ}$ C 过夜, 4000 r/min, 20 min, 收集上清, -20  $^{\circ}$ C 保存。用 ELISA 法检测抗-HCV, 操作按立可读(TMB-ELISA)抗-HCV 检测试剂盒操作指南进行。

1.9 体外 CTL 活力检测 最后一次免疫后两周, 断颈处死, 无菌取脾, 灌洗法分离脾细胞, 然后进行梯度密度离心, 分离脾淋巴细胞, 计数, 用作效应细胞(Effector)用于 CTL 活力检测。同时收集稳定表达 HCV C 蛋白的 P815 细胞作为靶细胞(Target), 调整细胞浓度为 5000 细胞/50  $\mu$ L。分别调 E:T 比例为 50:1 和 100:1。检测培养上清中 LDH 浓度, 计算 CTL 活力。操作按 Cyto Tox 96R Non-Radioactive Cytotoxicity Assay 说明书进行。

1.10 统计学方法 比较两组之间的差异, 用 t 检验。

## 2 结果

### 2.1 HCV C 区基因真核细胞表达载体的构建及鉴定 (见图 1、图 2)

用 RT-PCR 法从输血后抗-HCV 阳性病人血清中扩增出预计大小的产物, 测序证实为 HCV II 型/1b C 区基因片段。以 BamH I 和 Xba I 为酶切位点定向插入真核表达载体 pcDNA 3.1/His 中, 经酶切证实为重组体, 定名为 pC。

pCE<sub>1</sub>E<sub>2</sub> 为窦骏博士构建<sup>[5]</sup>, 包括 HCV C、E<sub>1</sub> 有部分 E<sub>2</sub> 区基因, 核苷酸序号为 317~2009 nt, 基因片段长度为 1.73 kb, 以 EcoR I 为酶切位点插入 pCD-Sa1 中, 带有 SV40 早期启动子、HTLV-1 的重复长末端 R-U5 片段。

### 2.2 HCV 结构蛋白在真核细胞中的表达

pCE<sub>1</sub>E<sub>2</sub> 转染 HeLa 细胞并可表达出约 110 kD 的特异性蛋白(见窦骏<sup>[5]</sup>另文发表)。

分别提取 pC 转染 SP2/0 和 P815 阳性细胞克隆内蛋白, 经 SDS-PAGE 电泳后, 一块胶做

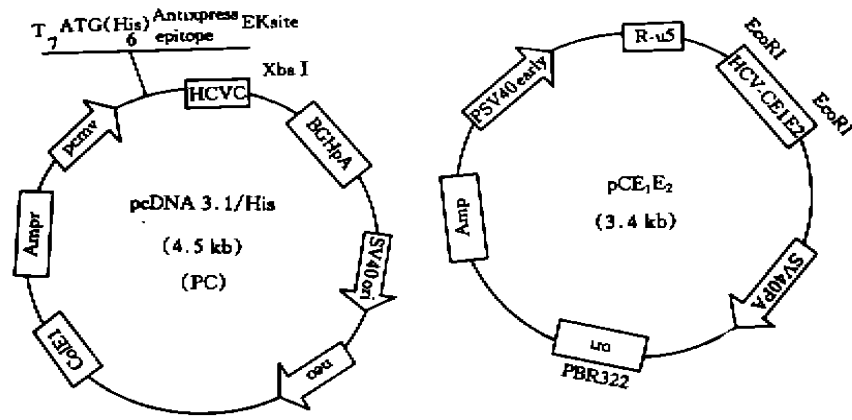


图 1 质粒 pC 和 pCE<sub>1</sub>E<sub>2</sub> 的简单物理图谱  
Fig. 1 Simple maps of the pC and pCE<sub>1</sub>E<sub>2</sub>

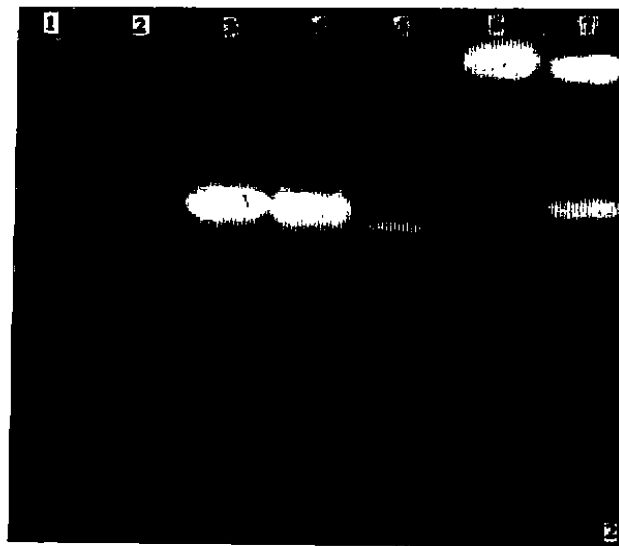


图 2 抗-HCV 阳性病人血清中 HCV C 区基因 RT-PCR 扩增产物和真核细胞重组体 pC 酶切鉴定  
Fig. 2 PCR amplification of HCV C cDNA fragment in blood samples of HCV Infected patients and enzyme digestion of pC.

Lane 1~2. Controls Lane 3~4. PCR products Lane 5. 100 bp DNA Ladder (the brightest band is 500 bp)  
Lane 6. Undigested pC Lane 7. pC digested by Bam HI/Xba I

转膜,另一块胶染色固定;转膜后经 Western blot 分析,出现约 31 kD 的特异性条带(如图 3, 4),从而证实所筛选的 SP2/0 和 P815 可正确、稳定地表达 HCV C 蛋白,并且该蛋白为胞内蛋白,非分泌型。

在图 3 中, Lane 1 为蛋白中分子量标准, Lane 2 未加样品, Lane 3 为 pC 转染 P815 细胞上清, Lane 4 为 pBLANK 转染 P815 细胞阳性克隆细胞提取物电泳, Lane 5 为 pC 转染 P815 阳

性克隆的电泳, Lane 6 为 pC 转染 P815 细胞阳性克隆细胞内提取物的 Western blot 结果。  
在图 4 中, Lane 1 为蛋白中分子量标准, Lane 2 为 SP2/0 空白细胞提取物对照, Lane 3 为

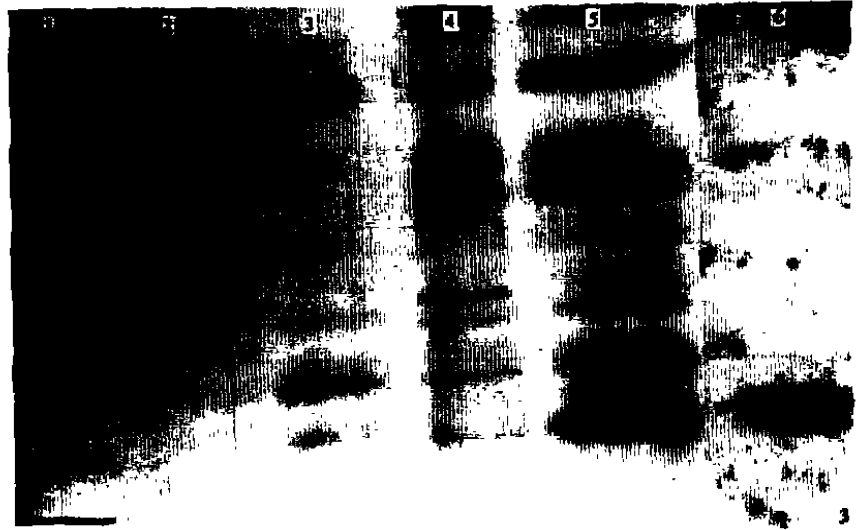


图 3 HCV C 蛋白在 P815 细胞中稳定表达

Fig. 3 Stable expression in P815 cells of HCV C protein

Lane 1. Mid-range protein molecular weight makers Lane 2. Unloading samples Lane 3. The supernatant from P815 cells transfected with pC Lane 4. The extract from P815 cells transfected with pBLANK Lane 5. The extract from P815 cells transfected with pC Lane 6. The result of Western blot of lane 5



图 4 HCV C 蛋白在 SP2/0 细胞内稳定表达

Fig. 4 Stable expression in SP2/0 cells of HCV C protein

Lane 1. Mid-range protein molecular weight makers  
Lane 2. The extract from SP2/0 cells without transfection  
Lane 4. The extract from SP2/0 cells transfected with pBLANK  
Lane 5. The extract from SP2/0 cells transfected with pC  
Lane 6. The result of Western blot of lane 5

pBLANK 转染 SP2/0 阳性细胞克隆抽提物电泳, Lane 4 为 pC 转染 SP2/0 阳性克隆细胞提取物电泳, Lane 6 为 pC 转染 SP2/0 细胞阳性克隆细胞内提取物的 Western blot 结果。

### 2.3 DNA 免疫后 BALB/C 鼠抗-HCV 检测 (见图 5)

第一次免疫后一周, 除对照组外, 实验组中均有 4~6 只鼠抗-HCV 阳转, 5 周达 8 只, 但至 8 周仍未全部阳转(表 1)。各组抗-HCV 平均 A 值为: pBLANK 组为  $0.101 \pm 0.042$ , pC 组为  $0.358 \pm 0.096$ , pCE<sub>1</sub>E<sub>2</sub> 组为  $0.415 \pm 0.127$ 。第一次免疫后 8 周达高峰(图 5)。

表 1 ELISA 法检测抗-HCV 阳性鼠数

Table 1 Number of antibody-positive mice by ELISA

Antibody	Plasmid		
	pBLANK (n=10)	pC (n=10)	pCE <sub>1</sub> E <sub>2</sub> (n=10)
Anti-HCV	0(0)*	8(4)	8(6)

The antibody responses were detectable after the first or third or third boost. Values in parentheses indicate the number of mice seroconverted by the first boost.

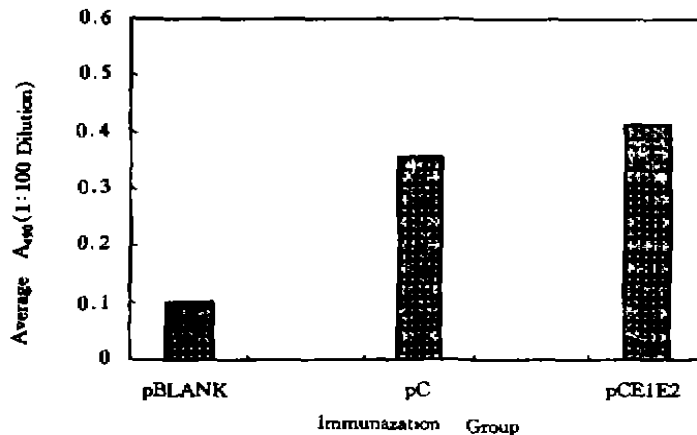


图 5 第八周各组免疫鼠抗-HCV 水平

Fig. 5 Antibody responses at eighth week in every group of mice immunized with HCV structural region expression plasmids

### 2.4 体外 CTL 检测

用定量乳酸脱氢酶(LDH)法测定 CTL 活力, 各组 CTL 反应平均值: 对照组为  $8.26\% \pm 4.44\%$ , pC 组为  $18.65\% \pm 5.71\%$ , pCE<sub>1</sub>E<sub>2</sub> 为  $29.97\% \pm 11.11\%$ , 最适效、靶细胞比例为 100:1(见图 6)。

### 2.5 体内 CTL 活力检测

荷瘤实验对照组较实验组鼠肿瘤出现早(平均  $12 \pm 3$  d), 注射 pC 和 pCE<sub>1</sub>E<sub>2</sub> 组为  $17 \pm 5$  d; 对照组肿瘤生长速度快, 死亡时肿瘤一般  $>20$  mm; 对照组较实验组存活时间短, 一般于肿瘤发生后 10 d 内死亡, 而实验组一般于 15~20 d 后死亡。

## 3 讨论

近年来研究发现, 应用带有外源基因的重组质粒 DNA 肌注小鼠, 可以诱导针对该表达抗原的体液和细胞免疫。

我们的研究结果证明, pC 和 pCE<sub>1</sub>E<sub>2</sub> DNA 免疫后, 均能产生对 HCV C 区的特异性抗体, 平均光密度(A 值)分别为  $0.358 \pm 0.096$  和  $0.415 \pm 0.127$ , 两组比较无显著差异( $P > 0.05$ ), 提示联合 E<sub>1</sub>E<sub>2</sub> 的 DNA 免疫不能增强 HCV C 区诱导体液免疫反应的能力。但是对于 pCE<sub>1</sub>E<sub>2</sub>

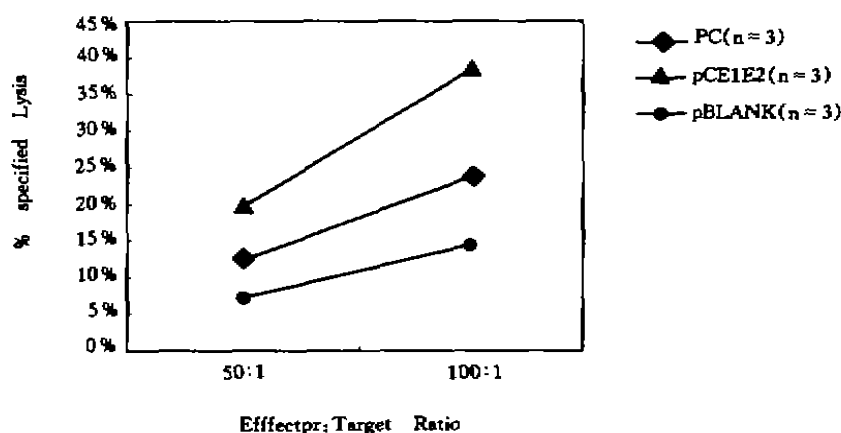


图 6 HCV 结构区抗原 DNA 实验鼠的 CTL 反应

Fig. 6 CTL responses in mice immunized with the HCV structural protein expression plasmids

免疫后是否可产生抗  $E_1$  和抗  $E_2$ , 由于实验条件所限未予检测。同类研究报道,  $pCE_1E_2$  免疫后, 可分别产生针对 C、 $E_1$  和  $E_2$  的抗体, 抗- $E_1$  和抗- $E_2$  的滴度分别较单纯  $pE_1$ 、 $pE_2$  免疫的滴度为低, 前者最高值(A 值)为 0.15 和 0.28, 而后者可达 0.48 和 0.38<sup>[6]</sup>。

若要探讨 DNA 免疫所诱导的抗体有否中和作用, 则需要建立起 HCV 的体外复制表达系统和简单、敏感的检测方法, 目前尚无法做到。更进一步的研究则要证实 DNA 免疫产生的抗体能否在体外阻止 HCV 与细胞的结合, 及对感染动物模型的保护作用。

对于疫苗免疫策略而言, 若要对突变后的毒株产生保护性免疫, 既需要诱导出交叉免疫的中和抗体, 也要有识别突变株 CTL 反应。目前, DNA 免疫诱导的 CTL 反应在一些病毒感染模型中诱导保护性免疫, 可保护致死量的病毒对感染模型的攻击<sup>[7]</sup>。

既然 HCV 感染者体内存在的抗-HCV 不对宿主产生免疫保护, 由突变株而诱导的抗体亦无保护作用, 那么细胞免疫能否在抵御感染和病毒清除中起作用?

在我们的实验中,  $pC$  和  $pCE_1E_2$  均可诱导 BALB/C 鼠产生针对 HCV C 区的 CTL 反应, 因为 BALB/C 鼠属 H-2<sup>d</sup> I 类, 靶细胞 P815 上仅表达 MHC I 类分子, 而不表达 MHC II 类分子, 所以上述结果提示 HCV C 区可能存在着受 BALB/C 鼠 MHC I 类分子限制的 CTL 抗原表位。同时我们的实验结果提示  $pCE_1E_2$  免疫组小鼠的 CTL 反应(平均值  $29.97\% \pm 11.11\%$ )较  $pC$  组( $18.65\% \pm 5.71\%$ )为高。但是我们无法得知 E 区是否也有可供 BALB/C 鼠识别的抗原表位, 因为我们没有单独表达 E 区蛋白的靶细胞。而且在我们的实验中, 针对 C 抗原的 CTL 反应较低是否由于检测方法不够敏感, 或是通过肌注技术导入的 DNA 在抗原提呈, 在免疫效率上较弱等所致, 尚需进一步探讨。如若对于 DNA 免疫所诱导出的 CTL 反应有否保护性进行探讨, 则需建立有效的动物模型进行验证, 这在目前尚未具备条件。

我们通过荷瘤的方法试图对体内 CTL 活力进行检测, 结果对照组小鼠存活时间明显短于实验组, 且肿瘤出现早, 生长快。提示 HCV DNA 免疫可有效诱导体内 CTL 反应。

在我们的实验中, 不是每只实验鼠都可产生抗体和 CTL 反应, 但是我们无法确定这种反应的不一致性是由于近交系鼠属遗传上的免疫弱反应性还是我们技术上的不够完善。而且,

若要研制广泛适用的 DNA 疫苗,则 MHC 的限制性亦将是难以逾越的障碍。所以提高免疫效率和增进免疫反应的一致性是目前急需解决的问题之一。

目前已经有了些提高 DNA 免疫效率的方法,如设计嵌合基因免疫原,将多个 T、B 细胞表位组合在一起<sup>[8]</sup>,或增加表达肽段在胞内降解<sup>[9]</sup>,或与其它免疫佐剂联合应用<sup>[10]</sup>等。但根本的办法应对 DNA 免疫进行更为系统的研究,如对使用的载体进行改进,对抗原提呈的机理作进一步探讨,对 DNA 免疫的途径和所用动物的品种进行改进等。我们今后将在增强 DNA 免疫效率及改变免疫反应类型上进行探讨。

综上所述,我们的结论是:利用 HCV 结构区基因重组体免疫 BALB/C 小鼠,可以诱导出特异性的体液和细胞免疫反应,但其 CTL 反应较弱,而且 DNA 免疫结果呈非一致性,原因尚待进一步探讨。

总之, DNA 免疫从技术上为 HCV 疫苗的研制提供了快速、便捷的方法,应用前景广阔,同时,对于预防和治疗高突变率、易成持续慢性化的病毒性感染而言, DNA 免疫应是最有前途、最有潜力的方法之一。

**致谢** 感谢姚航平先生、陈洪先生、陈勇博士、窦骏博士为本实验提供技术帮助。

### 参 考 文 献

- [1] Lagging LM, Meyer K, Hofst D *et al.* Immune response to plasmid DNA encoding the hepatitis C virus core protein [J]. *J Virol*, 1995, 69:5859~5863
- [2] Tokushige K, Wakita T, Pachuk C *et al.* Expression and immune response to hepatitis C virus core DNA-based vaccine constructs [J]. *Hepatology*, 1996, 24:14~20
- [3] Choo Q-L, Kuo G, Ralstone R *et al.* Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91:1294~1298
- [4] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE *et al.* Short protocols in molecular biology [M]. 3rd ed. John Wiley & Sons Inc 1995.
- [5] 窦骏,刘克洲,陈智等. HCV 结构区重组质粒建蛋白表达及小鼠对重组质粒抗体反应[J]. *中华实验临床免疫学杂志*, 1998, 10(3):150~155
- [6] Saito T, Sherman GJ, Kurokohchi K *et al.* Plasmid DNA-based immunization for hepatitis C virus structural proteins: immune responses in mice [J]. *Gastroenterology*, 1997, 112:1321~1330
- [7] Oldstone MBA, Tishon A, Eddleston M *et al.* Vaccination to prevent persistent viral infection [J]. *J Virol*, 1993, 67:4372~4378
- [8] Thomson ST, Khanna R, Gardner J *et al.* Minimal epitopes expressed in a recombinant polypeptide protein are processed and presented to CD<sub>8</sub><sup>+</sup> cytotoxic T cells: implication for vaccine design [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92:5845~5849
- [9] Tobery TW, Siliciano RF. Targeting of HIV-1 antigens for rapid intracellular degradation enhances cytotoxic T lymphocyte (CTL) recognition and the induction of de novo CTL responses *in vivo* after immunization [J]. *J Exp Med*, 1997, 185:909
- [10] Irvine KR, Rao JB, Rosenberg SA *et al.* Cytokine enhancement of DNA immunization leads to effective treatment of established pulmonary metastases [J]. *J Immunol*, 1996, 156:238~245

## DNA Vaccination of the Induction of Immune Responses by Hepatitis C Structural Antigens

SHAN Mei-mei, LIU Ke-zhou, CHEN Zhi

(*Institute of Infectious Disease, The First Affiliated Hospital, Medical School  
of Zhejiang University, Hangzhou 310006, China*)

**Abstract:** Two recombinant plasmids were constructed. These include the coding regions for the core protein (pC) and for the core, E<sub>1</sub> and E<sub>2</sub> together (pCE<sub>1</sub>E<sub>2</sub>). These plasmids were transfected into mammalian cells to test their protein expression and injected into the quadriceps muscles of BALB/C mice to measure specific antibodies and cytotoxic T-lymphocyte responses. All the recombinant plasmids were shown to express specific antigens transiently and stably in cells and elicited both specific antibody responses and specific cytotoxic T lymphocyte responses. The A value of anticore were  $0.358 \pm 0.096$  (pC) and  $0.415 \pm 0.127$  (pCE<sub>1</sub>E<sub>2</sub>). The CTL activity of pC was  $18.65\% \pm 5.71\%$  and  $20.07\% \pm 11.11\%$  of pCE<sub>1</sub>E<sub>2</sub>. Genetic immunization can aid the development of hepatitis C virus vaccines by allowing for the rapid construction and evaluation of different expression plasmids as potential immunogens.

**Key words:** Hepatitis C Virus; Viral protein of structural regions; DNA immunization