

戊型肝炎病毒 DNA 免疫的研究*

吕冬梅, 陈尔佳, 谢天宏, 庄俊英, 刘勇, 李春宏, 孙茂盛**, 戴长柏

(中国医学科学院 中国协和医科大学 医学生物学研究所, 云南昆明 650118)

DNA Immunization of Hepatitis E Virus (HEV)

LU Dong-mei, CHEN Er-jia, XIE Tian-hong, ZHUANG Jun-ying, LIU Yong,
LI Chun-hong, SUN Mao-sheng**, DAI Chang-bai

(Institute of Medical Biology, CAMS/PUMC, Kunming 650118, China)

Abstract: Two plasmid constructs, pcE2 and pcE3, containing 3' fragment of open reading frame 2 (ORF2, 1163 bp) of hepatitis E virus (HEV) and full-length ORF3 (369 bp), were injected into bilateral tibialis of Swiss mice respectively, for three times (0, 2nd and 4th weeks) and observed the HEV IgG by ELISA. HEV IgG was induced after the injection of pcE2 or pcE3 or both, and the percentage of seroconversion was 100% after two weeks of the third injection. Compared with injection of either construct, the antibody titers were higher in the group with combined injection of two constructs.

Key words: DNA immunization; Hepatitis E Virus; Humoral response

摘要: 利用 PCR 方法获得 1163 bp 的戊型肝炎(Hepatitis E Virus, HEV)开放读码框架(Open Reading Frame, ORF) ORF2 之 3' 大片段和 369bp ORF3 的完整片段, 分别克隆到真核表达载体 pcDNA3 中, 构建两种含有 HEV 主要抗原表位的质粒 DNA: pcE2 和 pcE3, 分别或混合免疫 Swiss 小鼠三次(0 时, 第 2 周, 第 4 周), 观察其在小鼠体内诱发的体液免疫应答。ELISA 检测结果表明, pcE2 和 pcE3 在小鼠体内均可诱导出一定水平的 HEV IgG 抗体, 且在第三次免疫接种两周后, 100% 的小鼠抗体阳转。与两种质粒单独免疫相比, 两者同时注射的抗体水平较高。本研究为 HEV DNA 疫苗的研究打下一定基础。

关键词: DNA 免疫; 戊型肝炎病毒; 体液免疫

中图分类号: R392-33; R373.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2001)02-0131-04

戊型肝炎病毒(HEV)为 RNA 病毒, 是引起戊型肝炎的病原体。虽然戊型肝炎是一种自限性的急性病毒性肝炎, 但感染者多为青壮年, 发病急, 症状重, 死亡率较高, 尤其在感染 HEV 的孕妇中死亡率接近 20%。该病是发展中国家常见的传染病, 常可引起暴发或流行, 对人类危害较大^[1,2], 但目前尚无有效的预防和治疗手段。由于戊型肝炎病毒的组织

培养研究尚不成熟, 因此传统疫苗的研制受到一定的限制。DNA 免疫又称为核酸免疫, 是近年来发展起来的新型免疫手段, 其优点之一是可同时诱发机体免疫产生特异的体液和细胞免疫, 并且性质稳定, 制备简单。国内外已有一些学者将其用于 HEV 疫苗的研究, 并取得了一定的进展^[3,4]。目前 HEV 基因的全序列已被测定^[5,6], 用于 HEV 基因工程疫苗

收稿日期: 2000-04-28, 修回日期: 2000-10-24

* 基金项目: 云南省自然科学基金资助项目 (97C079M)

作者简介: 吕冬梅 (1971-), 女, 山东省籍, 研究实习员, 硕士, 从事分子生物学研究。

** 通讯作者: 孙茂盛 (1955-), 男, 山东省籍, 研究员, 博士生导师。现从事分子病毒学, 病毒疫苗和基因工程多肽药物研究。

Correspondence author.

研究的主要抗原片段为 ORF2 和 ORF3^[7], 本文构建了两个含有主要抗原表位的质粒 DNA, 分别或同时免疫小鼠, 观察在小鼠中的体液免疫应答。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雌性 Swiss 小鼠, 6~8 周龄, 体重: 18~20 g (医学微生物学研究所实验动物中心提供)。

1.2 质粒 DNA 的构建与制备

参照 HEV 中国新疆株 cDNA 序列^[8]设计合成的引物以 PCR 方法从本科室制备的含有 HEV 主要开放读码框架的质粒 pVH2 中获得了 1 163 bp 的 HEV ORF2 之 3' 片段 (5 966-7 129 nt), 在其 5' 端引入 *EcoR* V 酶切位点和起始密码子 ATG, 在其 3' 端引入 *Xba* I 酶切位点。以类似的方法从质粒 pVH3 中获得了 369 bp HEV ORF3 的完整片段 (5 106-5 474 nt), 在其 5' 和 3' 端分别引入 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切位点。引物设计如下:

ORF2: CPC857-01 5'-TGCAGATATCATGG-GTCTTGTTATGCTTTGC-3'

CPC857-02 5'-TGCTCTAGATCACTATAA-CTCCCCGAGTTTTAC-3'

ORF3: CPE383-01 5'-GTGAATTCACCATG-AATAACATGTCTTCTGCTG-3'

CPE383-02 5'-TGCTCTACATCAGCGGCG-CGCCCCCAGC-3'

PCR 扩增反应条件: ORF2: 95℃, 4 min 变性; 70℃ 5 min 加 Taq 酶; (95℃, 45 s; 55℃, 45 s; 72℃, 1 min 20 s) 30 次循环, 72℃, 7 min 终延伸。ORF3: 95℃, 2 min 变性; 70℃ 5 min 加 Taq 酶; (95℃, 45 s; 58℃, 45 s; 72℃, 1 min) 30 次循环, 72℃, 7 min 终延伸。

将上述获得的基因片段分别克隆到真核表达载体 pcDNA3 中, 构建成含有 HEV 主要抗原表位的 pcE2 和 pcE3 质粒 DNA。经过酶切鉴定和 DNA 测序, 确证为所需目的基因片段后, 按常规方法大量制备, PEG 法纯化后溶于生理盐水, -20℃ 冻存备用^[9]。

1.3 动物免疫

将 pcE2 和 pcE3 质粒 DNA 分别或混合进行 Swiss 小鼠的动物免疫实验, 注射方式为双侧胫前肌肌注。初次免疫注射后, 间隔两周作两次加强免疫。自初次免疫第四周, 每周检测 HEV IgG 抗体水平免疫方案详见 (表 1)。

表 1 动物免疫方案

Table 1 Protocols of DNA injection

Group	Mice	Immunogen	Time of injection (week)		
1	20	pcE3 (100 μg)	0	2	4
2	20	pcE2 (100 μg)	0	2	4
3	20	pcE2 (50 μg) + pcE3 (50 μg)	0	2	4
4	15	pcDNA3 (100 μg)	0	2	4

1.4 血清抗 HEV IgG 抗体的检测

本文采用含有 ORF2 和 ORF3 的嵌合抗原 (本科室制备) 100 ng/孔, 包被酶联反应板, 二抗采用 HRP 酶标羊抗鼠抗体 (购自北京中山生物技术公司), 按常规 ELISA 方法操作, 被检血清分别按 1:1、1:2、1:4、1:8……倍比稀释, 每次实验均分别设 3 孔空白, 3 孔阳性和 3 孔阴性对照, 酶标仪检测 OD 值 (波长 450 nm), 被检血清 OD 值大于或等于阴性对照平均 OD 值的 2.1 倍为阳性, 否则为阴性。

2 结果

2.1 重组质粒 DNA 的鉴定

本研究构建的含有 HEV 主要抗原表位的 pcE2 和 pcE3 质粒 DNA 经过酶切鉴定和 DNA 测序, 确

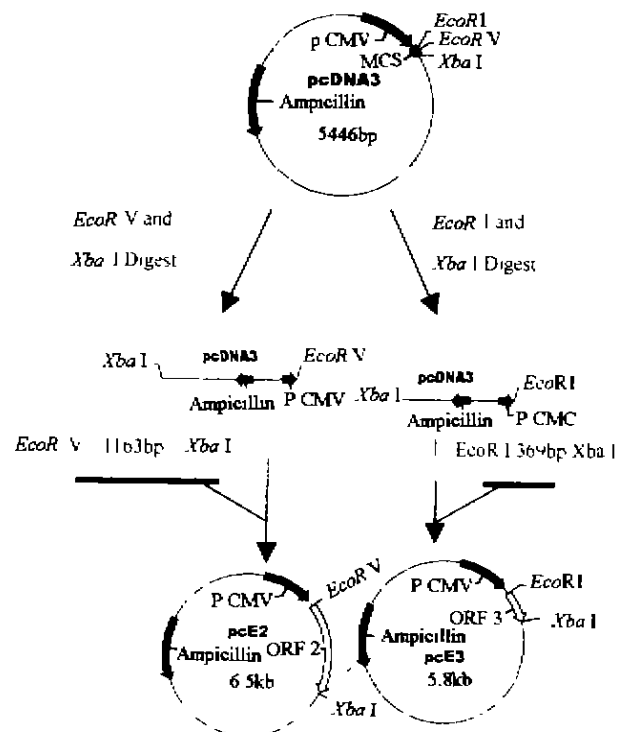


图 1 pcE2 和 pcE3 重组质粒的构建图谱
Fig. 1 Construction of pcE2 and pcE3 plasmid

证含有目的基因片段,读码框架正确。质粒构建图谱见图 1。

2.2 HEV IgG 抗体的检测

于初次免疫第 4 周开始,每周采用 ELISA 方法对小鼠 HEV IgG 抗体进行动态检测,结果第三组出现抗体最早,于初次免疫第 4 周抗体阳转,其它两实验组于第 5 周阳转,于第三次免疫两周后,所有小鼠都出现抗体阳性反应,而对照组小鼠均未检出抗体(见表 2、图 2)。

表 2 各组小鼠抗体几何平均滴度

Table 2 GMT to Anti-HEV

	Geometric mean titers (GMT)			
	Group1	Group2	Group3	Group4
4 th week	0	0	1.2	0
5 th week	1.2	0	1:9.51	0
6 th week	1:6.72	1:4.76	1:22.63	0
7 th week	1:11.31	1:6.72	1:26.91	0
8 th week	1:16	1:9.51	1:38.06	0

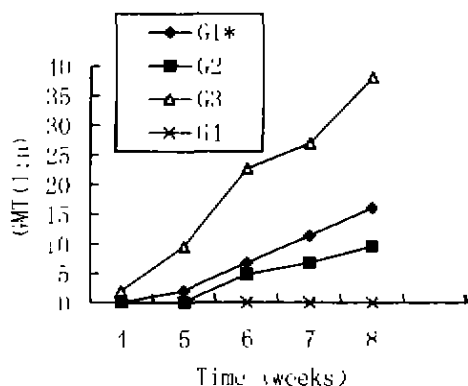


图 2 各组小鼠抗体几何平均滴度

Fig.2 Anti-HEV GMT of mice

3 讨论

DNA 免疫的本质是将插入外源编码基因(抗原基因)的真核表达质粒 DNA 直接接种机体后,在细胞内表达外源(抗原)蛋白,可同时诱发机体产生特异的体液和细胞免疫,并具有制备简单,性质稳定等优点,因此在世界范围受到广泛关注。在该领域研究的病原体越来越广泛,且有一些病原体的 DNA 疫苗已用于人体的临床试验,如: HIV、疟原虫等。HEV 全基因序列已被测定,并发现其主要抗原表位集中于 ORF2 和 ORF3,为 DNA 疫苗的研究提供了可能。He^[4]等人将 ORF2 全基因克隆到 pVCL1010 中,鲁凤民^[3]等将全长 ORF3 克隆到 pSVL 中,均成

功地在小鼠中获得了抗体应答。本研究不仅成功地构建了两种含有 HEV 主要抗原表位的质粒 DNA, pcE2 和 pcE3,且在质粒构建和免疫方案等方面进行了新的尝试。

质粒载体中启动子的强弱直接影响 DNA 转染细胞的效果,因此本研究选用了带有能够在多种细胞内高效表达的 CMV 早期启动子/增强子的真核表达质粒 pcDNA3。该质粒不仅带有 PUC19 骨架,保证了其在 *E. coli* 中高拷贝复制,且含有氨苄青霉素抗性基因。由于该基因中含有的 CpG 免疫刺激元件(ISS)可在体外诱导产生大量 α 、 β 干扰素 IL-12 等细胞因子,因此可增强质粒 DNA 免疫原性而提高机体的免疫应答。抗原基因的选择也影响 DNA 免疫的效率。ORF2 编码蛋白的 N 端存在一个典型的信号肽和一个富含碱性氨基酸的衣壳样区域,且含有一个潜在的裂解位点,其抗原决定簇主要集中在其 C 端^[10],因此本文选择了含有多个抗原表位的 ORF2 3' 大片段作为抗原基因进行 pcE2 质粒的构建。

免疫方案上将两种质粒 DNA 分别或混合注射,发现同时注射两种 DNA 疫苗的一组小鼠抗体水平高于分别注射一种 DNA 疫苗的两组,提示两种 DNA 疫苗同时注射可能对机体产生免疫应答有一定的协同作用,其机理有待进一步研究,也为将来制备嵌合型疫苗提供了新思路。

肌肉组织对 DNA 的转染效率较高,因此本研究采取的接种方式为肌肉注射。但近年来的研究提出含有专门抗原提呈细胞的皮肤作为 DNA 注射的靶器官可能具有更大的优势,因此在今后的研究中可尝试皮内、皮下等方式接种以期在机体中获得更强的免疫应答。

致谢:衷心感谢本室杜瑞娟惠赠质粒 pVH2 和 pVH3。

参考文献

- [1] Zhuang H, Cao X Y, Liu C B, *et al.* Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis in China [M]. In "Viral hepatitis C, D, E" (Shikata T, Purcell R. H., Uchida T, *et al.*) New York: Elsevier, 1991: 277-285.
- [2] Krawczynski K. Hepatitis E [J]. *Hepatology*, 1993, 17: 932-941.
- [3] 鲁凤民,朱永红,庄辉,等.戊型肝炎病毒(HEV)基因疫苗免疫小鼠的初步研究[J].北京医科大学学报,1995,27(2):111-112.

- [4] Hoffman S L, Hayes C G. DNA inoculation with a plasmid vector carrying the hepatitis E virus structure protein gene induces immune response in mice [J]. *Vaccine*, 1997, 15(4): 357 - 362.
- [5] Huang R T, Li D R, Wei J, *et al.* Isolation and identification of Hepatitis E virus in Xinjiang, China [J]. *J Gen Virol*, 1992, 73: 1143 - 1148
- [6] Huang C C, Nguyen D, Fernandez J, *et al.* Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV) [J]. *Virology*, 1992, 191: 550 - 558.
- [7] Khudyakov Y E, Khudyakov N S, Fields H A, *et al.* Epitope mapping in proteins of hepatitis E virus [J]. *Virology*, 1993, 194: 89 - 96.
- [8] 毕胜利, 刘崇柏, 曹学义, 等. 我国戊型肝炎病毒基因组 cDNA 全序列测定及分析 [J]. *病毒学报*, 1992, 8(3): 272 - 279.
- [9] 萨姆布鲁克, E. F 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南 [M]. 第 2 版, 北京: 科学出版社, 1992. 34 - 69.
- [10] Khudyakov Y E, Favorov M O, Jue D L, *et al.* Immunodominant antigenic regions in a structural protein of the hepatitis E virus [J]. *Virology*, 1994, 198: 390 - 393.