维普资讯 http://www.cqvip.com

第17卷 1期
2002年2月

中 国 病 毒 学
VIROLOGICA SINICA

17(1):30－33
February 2002

丙型肝炎病毒多表位抗原在恒河猴中的免疫应答及保护性试验

和绍清[1]，杨芳[1]，代解杰[1]，胡方[1]，黄建生[2]，李琦涵[1**]

(1.中国医学科学院 中国协和医科大学 医学生物学研究所病毒免疫室，云南昆明 650118;2.复旦大学遗传所，上海 200433)

Immune Responses in *Rhesus* Monkeys Vaccinated with Multi-epitope Antigen of HCV and Challenged by HCV Virus

HE Shao-qing[1], YANG Fang[1], DAI Jie-jie[1], HU Fang[1], HUANG Jian-sheng[2], LI Qi-han[1**]

(1. *Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Institute of Medical Biology, Dept. of Viral Immunology, Kunming* 650118, *China*; 2. *Fudan University, Institute of Heredity, Shanghai* 200433, *China*)

Abstract: It is a new approach to study and produce HCV vaccine by using multi-epitope antigen of HCV. In this study, multi-epitope antigen gene, PCX, which consists of 5 epitopes of HCV and an epitope of T cell stimulation of tetanus toxoid, was expressed in E. *coli*. And rhesus monkeys were vaccinated by expressed antigen and elicited the high humoral response, the titer of antibodies to PCX was high to 1:1000. In 60th week after vaccination, the titer of Abs was still to 1:40. Meanwhile, positive human sera of HCV challenged vaccinated monkeys after 6 weeks immunized, ALT value rose transiently in monkeys vaccinated by PCX. It was positive in monitoring RNA of HCV using RT-PCR in monkey sera. The result demonstrated that *Rhesus* monkey immunized by multi-epitope PCX could elicit high-level immune responses.

Key words: Hepatitis C Virus; Multi-epitope; Humoral response

摘要：利用HCV抗原多表位来研制HCV疫苗是目前的一个新方向。本研究利用HCV的HCV的5个保守表位串联，并加入破伤风类毒素上的一个T细胞激活位点，设计成一个HCV多表位抗原基因PCX，在大肠杆菌中表达，用此蛋白免疫恒河猴，诱导猴体产生了较高的抗体水平，滴度达1:1000以上，在免疫后的60周抗体滴度仍达1:40以上。同时，在免疫后6周用人HCV阳性血清攻击猴子，免疫PCX的猴子出现一过性ALT升高，在攻击后三周内用RT-PCR检测到猴血清内HCV的RNA阳性。结果表明，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。

关键词：丙型肝炎病毒；多表位；体液免疫

中图分类号：R392-33, R393.2　**文章标识码**：A　**文章编号**：1003-5125(2002)01-0030-04

HCV疫苗研究一直难以取得突破的原因有很多，无合适的HCV小动物模型是其中的一个重要因素。目前只有黑猩猩是公认的HCV易感动物，但黑猩猩是受保护动物，因此近几年来人们一直致力于其它HCV动物感染模型及体外细胞感染模型的研究，以期对HCV的致病机制、治疗、疫苗等方面研究有所帮助。

近年来，由于多表位抗原概念的兴起，在针对EB，HIV等病毒感染的疫苗研究中引入了多表位抗原疫苗[1]，这种思路使对HCV疫苗的研究有了新的切入点，Farci[2]等用HCV-H77株E蛋白的多个表位所制备的兔血清与HCV病毒同时接种黑猩猩，发现此血清对同种HCV株感染有保护作用。黄建生[3]等人在国内首先利用HCV的多个保守表位串联，并加入破伤风类毒素上的一个T细胞激活位点，设计成一个HCV多表位抗原基因PCX，与β-

收稿日期：2001-05-28，修回日期：2001-07-10

作者简介：和绍清(1971-)，男，云南省籍，助理研究员、硕士，主要从事病毒免疫学及分子生物学研究。

** 通讯作者：李琦涵(1958-)，男，云南省籍，研究员、博士，主要从事医学病毒分子生物学研究。Correspondence author.

维普资讯 http://www.cqvip.com

半乳糖苷酶基因融合后,在 *E. Coli* 中高效表达了 GZ-PCX 融合蛋白,该融合蛋白有良好的免疫原性,在体外能检测出来自上海、北京等多个来源的 HCV 阳性血清。同时将此表达的 GZ-PCX 蛋白免疫小鼠、家兔后,动物体都诱发了特异性细胞免疫及体液免疫应答,特别是在小鼠及家兔中,在有佐剂的辅助下,GZ-PCX 蛋白诱发高水平的体液免疫应答。为了验证我们所设计的 HCV 多表位抗原免疫大动物是否还具有良好的免疫原性,免疫的大动物是否具有保护性,参照夏宁邵等[4]的研究结果,我们先用 GZ-PCX 蛋白免疫恒河猴,再用高滴度的 HCV 攻击免疫后的猴子,以初步观察该抗原的免疫原性及在猴体是否具有保护性作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本所动物室饲养的健康恒河猴(*Rhesus Macaque*),均进行血清 ALT、HBV 两对半、HCV RNA、抗-HCV 抗体的筛选。把 4 只无 HBV 及 HCV 感染征象,ALT 正常的猴子编号为 M1～4 号,雌雄各 2 只(Table 1),分成 GZ-PCX 组(M1、M2 号)及 GZ 对照组(M3、M4 号)。猴子于小铁笼中分别饲养,每天进食 2 次,上午 100g 标准颗粒饲料,下午主食为 150g 标准窝头及适量的蔬菜、水果,自由饮水。猴子的饲养及管理由医学生物学研究所动物室负责。

表 1　免疫前猴子的总体状态

Table 1　Conditions of monkeys before immunization

猴号	性别	年龄(岁)	体重(kg)	ALT (U/mL)	HBV-M	HCV-M
M1	雄	2	2.5	29	-	-
M2	雌	2	2.4	40	-	-
M3	雄	2	2.6	40	-	-
M4	雌	2	2.4	34	-	-

1.2 免疫

大肠杆菌表达并纯化后的 GZ-PCX 蛋白及对照 GZ 蛋白分别用完全弗氏佐剂(CFA)乳化完全后,每只猴子注射剂量为 1.0mg/次,背部皮下多点注射免疫,于第 0、2、4 周各免疫一次。

1.3 HCV 攻击试验

于免疫后第 6 周,每只猴子用抗-HCV 抗体阳性及 HCV RNA 阳性的 HC 患者混合血清(共 8 份,由广州第一军医大学南方医院刘定燮博士、广州中心血站叶欣小姐惠赠)5mL,加入 50mL 的生理盐水中,缓慢静脉滴注攻击恒河猴。

1.4 血清转氨酶检测

每周抽取静脉血,分离血清后,用生化分析仪 OLYMPUS AU600 测定 ALT 水平,ALT 检测试剂购于日本和光公司。

1.5 抗-GZ-PCX 及抗-HCV 抗体的检测

用大肠肝菌表达的 GZ-PCX 蛋白或 PCX 蛋白(第 60 周)作为抗原包被酶标微孔板[5],每孔 1μg,检测猴血清中抗 GZ-PCX 抗体水平,二抗为 HRP-SPA;用华美生物工程公司的 Anti-HCV EIA Kit 检测血清中抗-HCV 水平,严格按说明书进行操作。

1.6 HCV RNA 检测

分别设计针对 HCV 的 5' UTR 和 NS5 两个片段的特异动物,分别为 5' UTR:(+)5'-ACACTC-CACCATAGATCAC/(-)5'-GTGCACGGTCTAC-GAGACC; NS5:(+)5'-GAGGTTTTCTGCG TC-CA/(-)5'-GCGATAACCGCGTTCT,目的片段分别为 320bp 及 402bp。取 100μL 猴血清,用华美生物工程公司的逆转录 RNA 一步提取试剂盒进行 RNA 提取,用宝生物 TAKARA AMV 逆转录酶做 RT-PCR。以 cDNA 为模板,用 5' UTR 及 NS5 的引物进行目的片段扩增。

1.7 临床一般指标观察

观察各恒河猴的体重、食欲、精神状态、行动、大小便、皮下出血、黄疸等指标。

2 结果

2.1 恒河猴一般情况

恒河猴一般情况良好,在 HCV 攻击前,未见明显的消化道症状,猴子精神状态好。用 HCV 攻击后,猴子出现一过性食欲降低,但未见明显黄疸及皮下出血,其中以对照组 M4 猴子较为明显,且其精神状态较差(表 2)。

2.2 ALT 检测

在前 8 周,ALT 水平未见显著改革,但自第 9 周开始,疫苗组 M1 号猴子 ALT 升高,但第 10 周 ALT 又降到正常值。具体见表 3。

2.3 抗-GZ-PCX 及抗-HCV 抗体检测

用 GZ-PCX 蛋白或 PCX(第 60 周,用大肠肝菌表达的单独 PCX 蛋白)包被酶标微孔板,ELISA 测猴抗-GZ-PCX 抗体,抗体在免疫后第 2 周开始升高,在第 2、4 周加强免疫后抗体滴度显著升高,至第

维普资讯 http://www.cqvip.com

表2 恒河猴免疫前后及病毒攻击后的症状

Table 2 Symptom of rhesus monkey before and after HCV virus challenge

	免疫时间（周）									
	攻击前						攻击后			
猴号	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
M1	–	–	–	–	–	–	–	△	△	–
M2	–	–	–	–	–	–	–	○	–	–
M3	–	–	–	–	–	–	–	◇	○	–
M4	–	–	–	–	–	–	–	△	○	–

–正常 ○轻微腹泻 ◇轻微疲倦 △食欲减退

9周升至最高，滴度为>1∶1000。因为前期工作是用GZ-PCX融合蛋白包被板子，所以免疫GZ的对照组也能测到相应的GZ抗体。在三次免疫后及HCV病毒攻击后，对猴子进行了长期的观察。在第60周时，实验组（免疫了PCX，同时受HCV病毒攻击）的抗体滴度为1∶40，而对照组（只受HCV病毒攻击）的抗体滴度为1∶20。结果见表4和图1。

抗-HCV于免疫后始可检测到抗-HCV，阴性对照OD值均<0.05，以0.05计；阳性对照正常；实验组OD值>0.1为阳性。

表3 免疫猴血清ALT水平检测（U/mL）

Table 3 ALT level detection of sera of monkey

	免疫时间（周）						
猴号	0	1	3	5	7	9	10
M1	27	35	38	29	31	107	42
M2	33	42	31	27	46	58	34
M3	40	38	29	36	23	30	32
M4	42	28	35	33	34	23	37

*：猴血清ALT正常值为0－80U/mL（引自代解杰[6]等报道（人工饲养条件下恒河猴血液生化正常参考值测定及分析））

*：normal value of ALT is 0－80U/mL

表4 免疫猴的抗HCV抗体检测（血清10倍稀释，OD_{450}值）

Table 4 Anti-HCV detection of immanized monkeys (10 times dilnted, OD_{450})

	免疫时间（周）							
	0	2	4	6	8	9	10	60
M1	0.015	0.101	1.124	1.138	1.093	1.280	1 174	0.298
M2	0.010	0.087	1.372	1.249	1.110	1.369	1.238	0.278
M3	0.004	0.075	1 286	1.224	1.583	1.154	0.967	0.161
M4	0.018	0.061	1.155	1.181	1.042	1.201	1.013	0.149

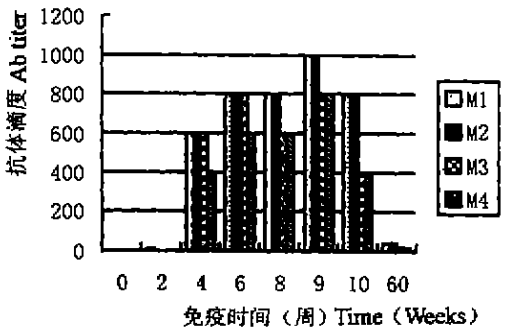

图1 免疫猴血清的抗GZ-PCX抗体滴度

Fig. 1 Titer of Anti-GZ-PCX of sera after immumiation

2.4 HCV RNA检测结果

在HCV攻击前，4只猴子的血清HCV RNA检测均为阴性，HCV病毒攻击猴体后，进行RT-PCR对猴子的血清HCV RNA检测，用NS5引物未得到特异性PCR产物，用5'UTR引物在第7、9周所采集的猴血清中扩增到特异性PCR产物。结果见表5。

表5 病毒血清攻击后猴子血清中HCV（用5'UTR引物）

Table 5 HCV in sera after challenged by virus(5'UTR primer)

猴号 Monkey No	0	6*	7	9	10	12(Weeks)
M1	–	–	+	+	–	–
M2	–	–	+	+	–	–
M3	–	–	+	+	–	–
M4	–	–	+	+	–	–

*在第6周对恒河猴用人HCV抗体阳性及RNA检测阳性血清进行攻击

3 讨论

黄建生等[7]根据HCV免疫表位的研究进展，

维普资讯 http://www.cqvip.com

从中优选了5个高度保守的T/B细胞表位,分别是C:1-16;C:132-141;E1:317-326;NS3:1445-1453;NS5:2781-2788,同时加入破伤风类毒素上的一个T细胞激活位点,设计成一个HCV多表位抗原基因PCX,与β-半乳糖苷酶基因融合后,在*E. Coli*中高效表达了GZ-PCX融合蛋白,具有良好的HCV免疫特异性。纯化蛋白免疫小鼠和家兔后,可诱发动物机体高滴度的体液免疫应答。为了进一步研究该蛋白的免疫原性及免疫大动物后的免疫反应,本研究将GZ-PCX蛋白用完全弗氏佐剂包被后,对恒河猴进行了多点皮下免疫。

GZ-PCX免疫猴子后在首次免疫后2周抗体开始转阳,第4周时(两次免疫后)抗体滴度达到1:600。在第6周后用人的HCV抗体阳性和RNA阳性血清对猴子进行攻击,在第9周时,抗HCV抗体滴度达到1:1000以上。结果表明,用HCV的多表位蛋白免疫猴子以后可以诱导机体产生高水平的抗体反应,当用HCV阳性血清攻击后的第3周,抗体滴度到了最高点。在免疫后第60周,对猴血清进行抗体检测结果表明,在免疫PCX蛋白同时病毒攻击后的猴体内的抗体滴度仍能达到1:40。结果说明,PCX的体液免疫可以持续很长时间。

在对谷丙转氨酶(ALT)的检测中发现,免疫GZ-PCX蛋白不会引起ALT值的升高,说明此蛋白免疫动物中安全的,不会导致肝组织的损伤。而当用HCV的阳性血清攻击猴子后,在攻击后的第3周(免疫时间的第9周)免疫PCX的其中一只猴子的ALT值出现一过性的升高,攻击后的第4周ALT又恢复正常,分析认为可能是采血时猴子惊吓所至或是测定ALT时的实验误差,而不是肝组织的病理损伤所致。在首次免疫后12周所有实验猴都进行了肝部穿刺,所得肝组织损伤。肝组织切片后用H.E.染色(资料未显示),病理切片显示无肝组织损伤证实了我们的分析。

同时,对临床一般指标的观察和对HCV RNA的检测结果来看,在HCV阳性血清攻击后1周、3周对猴血清的HCV RNA检测为阳性,因为无资料可以表明病毒攻击后,猴体能在多长时间对病毒进行清除,故现尚无证据可以说明检测到的HCV RNA在攻击的残留病毒还是病毒复制的产物,有待进一步的研究证实。病毒攻击恒河猴后,猴子出现了食欲降低、轻度腹泻等症状,以及在病毒攻击1-3周内可以检测到HCV的RNA,与夏宁邵等的实验结果基本一致,可以认为恒河猴在一定程度上可以作为HCV病毒的感染模型。

GZ-PCX免疫猴子后,诱发了机体高水平的体液免疫应答,并且抗体持续时间长,结合黄建生[7]等报道的PCX对小鼠和家兔的免疫结果,说明PCX蛋白有良好的免疫原性,也再次证实用多表位思路来设计和构建HCV的多肽疫苗是可行的。

参考文献

[1] Suhrbier A. Multi-epitope DNA vaccines[J]. Immunol Cell Biol, 1997, 75:402-408.

[2] Farci P, Shimoda A, Wong D, *et al*. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(26):15394-15399

[3] 黄建生,任大明. 丙型肝炎[M]. 北京:人民军医出版社,2000, 442-452.

[4] 夏宁邵,毕胜利,杨永平,等. 中国株丙型肝炎病毒实验感染3种猕猴的初步结果[J]. 中国科学(B辑),1995,25(7):732-739

[5] 沈关心,周汝麟. 现代免疫学实验技术[M]. 武汉:湖北科学技术出版社,1998,112-123.

[6] 代解杰,唐东红,鲁顺尧,等. 人工饲养条件下恒河猴血液生化正常参考值测定及分析[J]. 中国实验动物学报,2000,8(4):224-230.

[7] 黄建生,解咏梅,林元凯,等. HCV复合多表位抗原基因表达及免疫原性的研究[J]. 微生物学报,1999,39(3):268-271.