

丙型肝炎病毒复合高变区 1 模拟表位蛋白的免疫原性分析*

龚育平, 高 军, 赵 平, 秦照玲, 杨 苗, 戚中田**

(第二军医大学微生物学教研室, 全军医学微生物学重点实验室, 上海 200433)

Immunogenicity of a Hepatitis C Virus Multiple-mimotope Protein of Hypervariable Region 1*

GONG Yu-ping, GAO Jun, ZHAO Ping, QIN Zhao-ling, YANG Miao, QI Zhong-tian**

(Department of Microbiology, Key Laboratory for Medical Microbiology of PLA, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract : A synthesized multiple-mimotope gene of *Hepatitis C virus* was cloned into a prokaryotic expression vector pGEX-4T-1 to generate a fusion protein GST-HCVME. The reactivity of the GST-HCVME with the sera of HCV patients was measured by Western-blot and ELISA. BALB/c mice were injected with GST-HCVME, and an ELISA approach was applied to determine the specific antibody titers in the mouse serum. The cross-reactivity of the antibodies was also checked with 2 synthesized HCV hyper-variable region 1 (HVR1) peptides. The results showed that the purified GST-HCVME fusion protein was able to react with 25 out of 35 HCV patients' serum samples. The serum antibody response was effectively elicited in BALB/c mice injected with GST-HCVME. The highest titer of antibody against HCV (GST-HCVME) was about $1:10^4$ at the eighth week after first immunization. Moreover, the collected mouse serum antibody had the ability to cross-react with the 2 synthesized HCV HVR1 peptides. These findings suggest that the multiple-mimotope protein of hepatitis C virus can efficiently induce HCV-specific immune responses in mice, and may be of potential use in the development of HCV vaccines.

Key words : *Hepatitis C virus*; Hypervariable region 1; Mimotope; Immunogenicity

摘要 : 将丙型肝炎病毒高变区 1 (HVR1) 模拟表位融合基因插入原核表达载体 pGEX-4T-1, 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中进行表达, 经亲和层析和凝胶过滤层析获得 HCV HVR1 模拟表位融合蛋白。用 Western blot 和 ELISA 检测融合蛋白与 HCV 抗体阳性血清的结合情况。皮下注射免疫 BALB/c 小鼠, 用 ELISA 检测小鼠血清中的抗 HCV 抗体水平及其与天然 HCV 高变区 1 合成肽的交叉反应。结果表明融合蛋白能与 HCV 抗体阳性血清特异结合, 融合蛋白与 HCV 抗体阳性血清的结合频率为 71.6% (25/35)。融合蛋白免疫小鼠后能有效诱导免疫应答, 其诱生的特异性抗体最高滴度达 10^4 (免疫后第 8 周), 且该抗体能同 2 条天然 HCV HVR1 合成肽发生交叉反应。本研究提示, HCV 复合 HVR1 模拟表位融合蛋白在丙型肝炎疫苗的研发中可能具有潜在应用价值。

关键词 : 丙型肝炎病毒; 高变区 1; 模拟表位; 免疫原性

中图分类号: R373.21

文献标识码: A

文章编号: 1003-5153(2006)01-0024-05

丙型肝炎病毒 (*Hepatitis C virus*, HCV) 疫苗的研究一直难以取得突破的原因有很多, 其中之一便是由于 HCV 基因组高度变异。研究发现, 其结构

蛋白 E2 中的高变区 1 (Hypervariable region 1, HVR1) 诱生的抗体无论在体外还是在黑猩猩的实验中均可以阻断 HCV 的感染性^[1,2], 但 HVR1 区是整

收稿日期: 2005-07-19, 修回日期: 2005-09-12

* 基金项目: 国家自然科学基金 (30471596); 上海市科技攻关计划项目 (04DZ19221)。

作者简介: 龚育平 (1978 -), 男, 湖南省籍, 硕士生, 主要从事丙型肝炎病毒的感染与免疫研究。

** 通讯作者: Corresponding author. Tel:021-25070312, E-mail: qizt@smmu.edu.cn

个病毒基因组中变异最为显著的区域^[3], 通常抗 HVR1 的抗体都表现为株特异性, 对不同 HCV 毒株的感染往往又缺乏交叉保护性^[4]。HVR1 共含有 27 个氨基酸残基, 根据这 27 个氨基酸残基的变化规律, 从理论上计算 HVR1 可能有 10^8 种不同的序列^[5], 因此这是目前 HCV 疫苗研究的最大挑战之一。HVR1 虽然高变, 但仍具有免疫交叉反应性的发现又为疫苗研究带来了一线曙光^[6,7]。一些研究曾报道通过噬菌体肽库展示技术或 DNA shuffling 技术筛选得到了一些能够覆盖较多 HVR1 变异株抗原性的模拟表位^[5,8], 联合应用多条 HCV HVR1 模拟表位, 使其能诱导出交叉反应性更为广泛的中和抗体, 有可能是一种对付 HCV 感染和抗 HCV 变异的新策略。

本实验室曾合成了一段包含 HCV 9 条 HVR1 模拟 B 细胞表位及 4 条保守 T 细胞表位的多表位抗原基因 (*mfc*), 并经研究表明该多表位基因能够诱导 HCV 特异性的免疫反应^[9]。但该多表位基因中包含的表位数量较多, 各表位特别是 B 表位的免疫原性可能会受到一定的屏蔽, 其次各 T 表位的免疫效应在除转基因动物以外的一般动物体内无法得以有效验证。考虑到这些因素, 本研究以诱导 HCV 的中和抗体为目的, 从多表位基因的 9 条 HVR1 模拟 B 表位中优选了 5 条具有高模拟性的表位 (*hcvme*), 将其连入原核表达载体 pGEX-4T-1 并表达、纯化出重组蛋白 GST-HCVME, 然后对其免疫原性进行了分析。

1 材料和方法

1.1 实验材料

质粒 pGEX-MFC 为本实验室构建^[9], Glutathione Sepharose TM 4B 亲和层析柱、Superdex75 凝胶层析柱购自 Pharmacia 公司; HCV ELSIA 检测试剂盒购自上海复星长征医学科学有限公司; HRP 标记的兔抗人 IgG、Ap (碱性磷酸酶) 标记的兔抗鼠 IgG、完全福氏佐剂 (CFA) 和不完全福氏佐剂 (IFA) 购自 Sigma 公司; BALB/c 小鼠购于上海第二军医大学实验动物中心, 雄性, 健康 6 周龄。

1.2 原核表达质粒的构建

合成引物: 上游引物: 5-GAATTCATGGGTC CAGGTAGACAAACC-3, 下游引物: 5-GTCGAC CTTTTGTTGTGGACCTGGAGA-3, 上下游引物分别包含和引入 *EcoR* I 及 *Sal* I 酶切位点; 以质粒 pGEX-MFC 为模板, PCR 扩增 *hcvme* 基因, 产物连入 pMD18-T 载体。重组质粒经 DNA 测序后, 再用 *EcoR* I 和 *Sal* I 切出 *hcvme* 基因并插入经 *EcoR* I

和 *Sal* I 酶切的 pGEX-4T-1 之间, 得到重组原核表达质粒 pGEX-HCVME。

1.3 复合模拟表位蛋白的表达及纯化

pGEX-HCVME 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 同时用质粒 pGEX-4T-1 转化的大肠杆菌 DE3 作为对照, 加入异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 0.6 mmol/L 诱导表达。诱导结束后取 1 mL 菌液, 常规变性裂解处理及 12.5% PAGE 电泳检测, 筛选阳性表达菌株。对表达株进行诱导条件优化, 大量扩增重组表达菌, 超声破菌, 上清用 Glutathione Sepharose TM 4B (购于 Amersham Biosciences) 纯化, 得到的蛋白初提物经冷冻干燥后以少量 PBS 溶解, 再用 Superdex75 凝胶层析柱进行纯化, 获得多表位融合蛋白 GST-HCVME。融合蛋白冷冻干燥后用纯水溶解, 用 Bradford 法测定蛋白浓度。

1.4 GST-HCVME 蛋白同 HCV 患者阳性血清的反应

1.4.1 Western blot 方法检测: 将纯化的 GST-HCVME 蛋白跑蛋白电泳, 电泳结束后, 以电转移法将凝胶中的蛋白转至硝酸纤维素膜, 然后以 1:20 稀释的 HCV 抗体阳性血清为一抗, 1:1000 稀释的 HRP-兔抗人 IgG 为二抗, 邻苯二胺 (OPD) / H_2O_2 显色, 检测融合蛋白与 HCV 抗体阳性血清的反应性。

1.4.2 ELISA 方法检测: 用 60 份 HCV 抗体阳性血清 (HCV ELSIA 检测试剂盒检测为抗-HCV 抗体阳性) 进行检测, 6 份健康人血清作阴性对照。将纯化的 GST-HCVME 蛋白包被酶标板, 用封闭液 (5% BSA, 0.5% Tween20, 1 × PBS, pH 7.4) 进行封闭, 以 1:50 稀释的待检血清为一抗, 1:1000 稀释的 HRP-兔抗人 IgG 为二抗, 四甲基联苯胺 (TMB) / H_2O_2 显色, 以 OD_{630} 为参照测其 OD_{450} 值。检测标准^[9]为: 设 6 份健康人血清检测的平均 OD 值为 N , 单份 HCV 抗体阳性血清检测的平均 OD 值为 P , P/N 大于 2.1 为检测阳性, 反之为阴性。

1.5 复合模拟表位蛋白免疫小鼠

用 PBS 调整 GST-HCVME 蛋白浓度为 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 加入等体积的完全弗氏佐剂 (首次接种使用) 和不完全弗氏佐剂 (加强免疫使用) 后, 用超声波仪在 100 W 功率下, 冰水浴中多次乳化。将小鼠背部皮肤酒精消毒, 选择 3~4 个部位分别注射乳化液 0.1~0.5 mL/处, 接种剂量为首次注射 0.1 mg/只·次, 加强注射为 0.04 mg/只·次, 0、3、6 周各接种一次, 同时设 PBS 免疫对照组, 每组小鼠各为 6 只。分别于 0、2、5、8、11、14、20、40 周采血分离血清。

1.6 小鼠体液免疫应答的检测

1.6.1 ELISA 法检测抗体 :GST-HCVME 蛋白包被的酶标板检测免疫小鼠血清中的特异性抗体水平,一抗为 1 : 100 稀释的免疫小鼠血清,二抗为 1 : 1000 稀释的 HRP-山羊抗鼠 IgG,显色系统为 TMB/H₂O₂,测 OD₄₅₀ 值。以 GST-HCVME 蛋白免疫组小鼠血清 OD₄₅₀ 大于 PBS 免疫组小鼠血清 OD₄₅₀ 的 2.1 倍确定为抗体阳性。同时取 OD₄₅₀ 为最大值时的血清,从 1 : 20 连续倍比稀释,测其最高抗体滴度。

1.6.2 Western blot 法检测抗体 :以 1 : 500 稀释的第 8 周免疫小鼠混合血清为一抗,1 : 1000 稀释的 AP 标记的兔抗人 IgG 为二抗,NBT/BCIP 系统显色。

1.6.3 ELISA 法检测小鼠血清抗体与 HVR1 合成肽的交叉反应 :将多聚赖氨酸偶联的各条 HVR1 合成肽^[9]用 50mmol/L 的 NaHCO₃ 包被缓冲液稀释为 20 μg/mL,包被 ELISA 反应板,以 1 : 500 稀释的第 8 周小鼠混合血清为一抗,1 : 1000 稀释的 HRP-兔抗鼠 IgG 为二抗,TMB/H₂O₂ 显色,以 OD₆₃₀ 为参照测其 OD₄₅₀ 值。检测标准为 :设 PBS 组小鼠血清检测的平均 OD 值为 N,GST-HCVME 免疫组小鼠血清检测的平均 OD 值为 P,P/N 大于 2.1 为检测阳性。

2 结果

2.1 原核重组表达质粒 pGEX-HCVME 的鉴定

DNA 测序、酶切鉴定证明所有扩增、拼接序列与预期完全一致。质粒 pGEX-HCVME 的结构示意图见图 1。*hcvme* 基因包含的各 HVR1 区模拟 B 细胞表位氨基酸序列见表 1

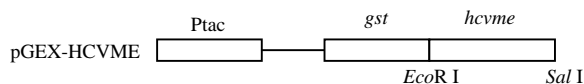


图 1 原核表达质粒 pGEX-HCVME 的结构

Fig.1 Diagram of prokaryotic expression plasmid pGEX-HCVME Ptac is the sequence of tac promoter. *gst* represents the glutathione S-transferase gene. *hcvme* represents the HCV multiple-mimotope gene.

表 1 *hcvme* 基因所含的各 HVR1 区模拟 B 细胞表位的氨基酸序列

Table 1 Amino acid sequence of the selected B-cell mimotopes of the HVR1 contained in *hcvme*

Name	Region	Amino acid sequence	Position(aa)
F78	HVR1	QTHTTGGQAGHQAHSLSLTLFSPGAKQN	384-410
E19	HVR1	TTHTGGQQAHTTSRLVSLFSPGASQK	384-410
M63	HVR1	QTHTTGGVVSHQTRSLVGLFSPGPQQN	384-410
D6	HVR1	QTTTTGGQVSHATHGLTLGLFSLGPQQK	384-410
G31	HVR1	TTHTVGGSVARQVHSLTLGLFSPGPQQK	384-410

2.2 重组蛋白 GST-HCVME 在大肠杆菌中的表达

重组质粒 pGEX-HCVME 转化的大肠杆菌 BL21 (DE3) 经 IPTG 诱导后,与空载体 pGEX-4T-1 转化的菌株相比较,可检测出一条新的蛋白质分子(图 2A),与理论计算的 GST-HCVME 蛋白分子量(约 41.3kDa)基本相符,表明 *hcvme* 基因在大肠杆菌中得到了表达。经亲和层析和凝胶过滤层析纯化之后,最终 1L 发酵菌液可得到目的蛋白约 3.57mg。纯化后的 GST-HCVME 蛋白电泳结果见图 2B。

2.3 GST-HCVME 与 HCV 患者阳性血清的反应结果

2.3.1 Western blot 杂交结果 :Western blot 杂交检测发现,HCV 抗体阳性血清可特异性识别蛋白 GST-HCVME,而不识别 GST 蛋白(图 2C)。此结果表明,HCVME 蛋白具有模拟 HCV 抗原性的特性。

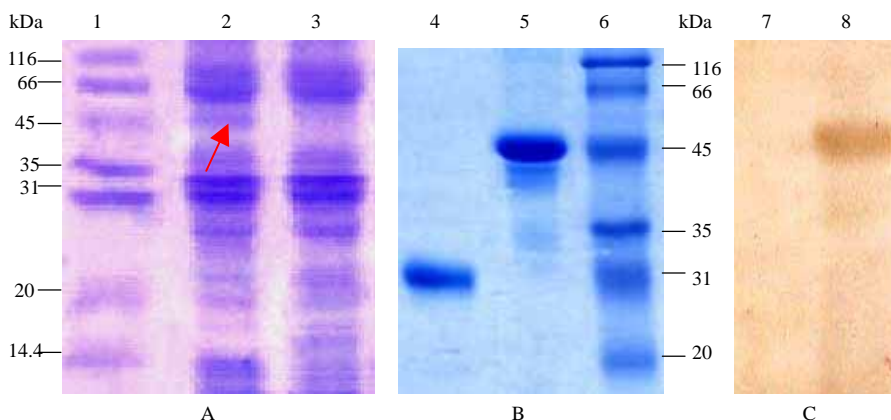


图 2 GST-HCVME 表达的分析及其与 HCV 患者阳性血清的检测

Fig.2 Analysis of the expressed GST-HCVME by SDS-PAGE and Western blot

A : 1, Protein Marker; 2, Induced *E. coli* BL21(pGEX-HCVME) cells by IPTG; 3, Induced *E. coli* BL21(pGEX-4T-1) cells by IPTG; 4, Purified GST protein; 5, Purified GST-HCVME protein; 6, Protein Marker. C : 7, Purified GST protein; 8, Purified GST-HCVME protein. (molecular weight is 41.3kDa).

2.3.2 ELISA 检测结果 : GST-HCVME 蛋白包被的酶标板同 60 份 HCV 抗体阳性患者血清反应 ,以 P/N 大于 2.1 为判断标准,可以检测到 GST-HCVME 能同 44 份血清发生反应,反应频率为 73.3%。

2.4 小鼠抗 GST-HCVME 抗体的检测

所有免疫小鼠在第 5 周均发生抗 GST-HCVME 抗体阳转,抗体滴度至第 8 周升至最高 (10^4),且维持时间较长,取免疫后第 40 周的血清进行检测时仍能检出高滴度的抗体 (图 3A)。由抗

GST-HCVME 抗体的 Western blot 检测结果(图 3B)可知,由于重组蛋白 GST-HCVME 中包含有一段 GST 组分,因此免疫后诱生的抗体也能特异性识别 GST 单体蛋白,但不与无关的 BSA 发生反应。GST-HCVME 免疫小鼠后的血清还能同 2 条具有较大差异性的 HCV HVR1 合成肽发生反应(图 3C)。结果提示,此重组蛋白可诱导出与不同天然 HCV HVR1 区具有交叉反应性的中和抗体。

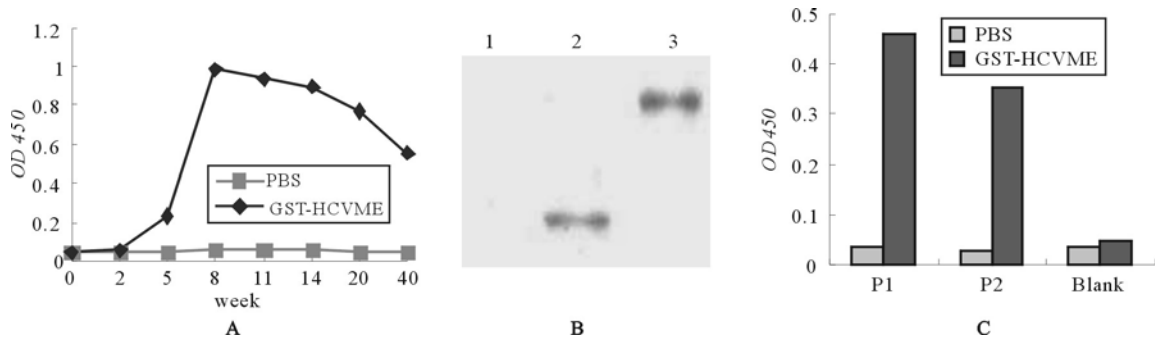


图 3 免疫小鼠抗-HCVME 抗体的检测结果

Fig.3 Detection of anti-HCVME antibody elicited in mice injected with GST-HCVME

A : Kinetics of anti-HCVME in mice immunized with GST-HCVME. B : 1, BSA protein; 2, GST protein; 3, GST-HCVME protein. C : P₁ and P₂ represent 2 synthesized HVR1 peptides; Blank represents an irrelative synthesized peptide.

3 讨论

多表位疫苗能同时携带多个目标抗原相关的以及辅助性的表位,能有效应付病原微生物的变异和免疫反应中的某些不利因素,因此已逐渐成为疫苗研究中的热点。在 HCV 多表位疫苗的研究中,一些研究者也各自做出了不同的尝试。黄建生^[10,11]及 Li 等^[12]分别选取了 HCV 基因组中不同的 B、T 细胞表位,构建真核表达质粒或是原核表达出蛋白,经免疫实验证实了能在小鼠或家兔体内诱导多表位蛋白特异性的体液和细胞免疫应答。

HVR1 区是目前唯一确认的 HCV 中和表位所存在的区域^[1,2,13],联合应用多条能诱导广泛交叉反应性抗体的 HVR1 区表位,有可能为 HCV 疫苗的研制带来希望。根据这一设想,我们优选了 5 条能模拟较多 HVR1 抗原性的 HVR1 区模拟 B 细胞表位,分析了其原核表达产物 GST-HCVME 的免疫原性。

在分析 GST-HCVME 的免疫效应时,我们进行了两方面的评价。一方面评价了 GST-HCVME 诱导抗体产生的能力。实验表明,首次免疫后第

5 周全部小鼠均发生抗体阳转,并且于第 3 次免疫后即首次免疫后第 8 周抗体滴度达到最高,约 10^4 左右。在免疫后第 40 周对小鼠血清进行抗体检测,可发现其滴度仍维持着较高的水平,表明重组多模拟表位蛋白 GST-HCVME 接种小鼠后可以诱导机体产生高水平的抗体反应,且这种体液免疫应答可以持续很长时间。另一方面,我们还评价了 GST-HCVME 诱导 HCV 特异性交叉保护抗体的能力。首先,我们检测了 GST-HCVME 蛋白是否可以被 HCV 感染者血清特异识别。结果显示 HCV 抗体阳性血清能同 GST-HCVME 蛋白特异性结合,但不能与单纯 GST 蛋白以及无关蛋白 BSA 发生特异反应,因此推测结合位点应该位于融合蛋白的 HCVME 组分所包含的 HVR1 模拟表位之中,具体是哪些表位参与结合,需进一步实验分析。

实验中我们发现多数 HCV 感染者阳性血清同 GST-HCVME 蛋白反应性较弱,而且有些不能发生反应,分析原因可能是尽管重组蛋白中各模拟 B 细胞表位模拟了 HVR1 中和表位的特性,但丙型肝炎慢性患者体内抗 HVR1 中和抗体含量较

少甚至没有,从而与 GST-HCVMEC 的结合能力较弱,若用丙肝急性感染痊愈者血清进行检测,也许反应强度会较高。其次,我们还评价了 GST-HCVME 蛋白诱生的抗体是否具有交叉反应性。国内外研究者普遍认为存在于 HCV HVR1 区内的中和表位为线性表位,因此,我们参照自然感染的不同 HCV 病毒株 HVR1 序列,人工合成了差异性较大的 HVR1 合成肽来评价 GST-HCVME 诱生抗体的中和活性。结果表明,GST-HCVME 蛋白诱生的抗体能同这两条合成肽发生特异反应,因此也预示了在作为疫苗应用时,其可能有预防较多 HCV 变异株感染的能力。

本研究尝试联合应用多条 HCV HVR1 模拟表位进行疫苗研究,所得到的 HCV 复合模拟表位融合蛋白能被多数 HCV 患者阳性血清(25/35)特异识别,接种小鼠后能诱导出针对不同 HVR1 区的交叉反应性抗体,提示该策略在 HCV 疫苗的研制中可能具有潜在应用价值。

References

- [1] Zhou Y H, Takekoshi M, Maeda F, *et al.* Recombinant antibody Fab against the hypervariable region 1 of hepatitis C virus blocks the virus adsorption to susceptible cells in vitro[J]. *Antiviral Res*, 2002, 56:51-59.
- [2] Goto J, Nishimura S, Esumi M, *et al.* Prevention of hepatitis C virus infection in a chimpanzee by vaccination and epitope mapping of antiserum directed against hypervariable region 1[J]. *Hepatol Res*, 2001, 19:270-283.
- [3] Simmonds P. Variability of hepatitis C virus[J]. *Hepatology* 1995; 21(2): 570-583.
- [4] Prince A M, Brotman B, Huima T, *et al.* Immunity in hepatitis C infection[J]. *J Infect Dis*, 1992, 165: 438-443.
- [5] Puntoriero G, Meola A, Lahm A, *et al.* Towards a solution for hepatitis C virus hypervariability: mimotopes of the hypervariable region 1 can induce antibodies cross-reacting with a large number of viral variants[J]. *EMBO J*. 1998, 17(13): 3521-3533.
- [6] Watanabe K, Yoshioka K, Ito H, *et al.* The hypervariable region 1 protein of hepatitis C virus broadly reactive with sera of patients with chronic hepatitis C has a similar amino acid sequence with the consensus sequence[J]. *Virology*, 1999, 264(1):153-158.
- [7] Zhou Y H, Moriyama M, Esumi M. Multiple sequence-reactive antibodies induced by a single peptide immunization with hypervariable region 1 of hepatitis C virus[J]. *Virology*, 1999, 256(2): 360-370.
- [8] Zhang X X, Deng Q, Zhang S Y, *et al.* Broadly cross-reactive mimotope of hypervariable region 1 of hepatitis C virus derived from DNA shuffling and screened by phage display library[J]. *J Med Virol*, 2003, 71(4): 511-517.
- [9] Gao J, Gong Y P, Zhao P, (高军, 赵平) *et al.* Construction and immunity of a multiple-epitope antigen gene of hepatitis C virus[J]. *Sci China C Life Sci (中国科学 C 辑)*, 2006, in press.
- [10] Huang J S, Peng C X. (黄建生, 彭春娴) Immunogenicity of a multiple epitope antigen of hepatitis C virus in mice and rabbits[J]. *Chinese Science Bulletin (科学通报)*, 1999, 44(23):2519-2524.
- [11] Huang J S, Chen L S, Lei C X, (黄建生, 陈丽珊, 雷呈祥) *et al.* Immunogenicity of a multiple epitope antigen gene of hepatitis C virus in mice and rabbits[J]. *J Cell Mol Immunol (细胞与分子免疫学杂志)*, 2001, 17(1):52-54.
- [12] Li Q, Dong C, Wang J, *et al.* Induction of hepatitis C virus-specific humoral and cellular immune responses in mice and rhesus by artificial multiple epitopes sequence[J]. *Viral Immunol*, 2003, 16(3): 321-333.
- [13] Esumi M, Rikihisa T, Nishimura S, *et al.* Experimental vaccine activities of recombinant E1 and E2 glycoproteins and hypervariable region 1 peptides of hepatitis C virus in chimpanzees[J]. *Arch Virol*, 1999, 144(5): 973-980.