

含乙型肝炎病毒 S-PreS1 基因的 DNA 疫苗与蛋白颗粒疫苗联合免疫可增强免疫应答

陈红*, 邓瑶*, 谭文杰, 王文, 管洁, 文波, 殷霄, 阮力

中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所 病毒病应急技术中心, 北京 100052

摘要: 为研制新型有效的 HBV 治疗性疫苗, 构建了含 PreS1 与 S 融合基因的 HBV DNA 疫苗, 即 pVRC-HBSS1 (PreS1 21-47 aa 融合在 S 抗原 1-223 aa 的羧基端), 并制备了 CHO 表达相同结构的蛋白颗粒亚单位疫苗 HBSS1。在 Balb/C 小鼠中采用不同的 DNA 免疫方式 (即肌肉注射、皮内注射加电转) 初免 3 次, 蛋白颗粒亚单位疫苗 (不同佐剂) 肌肉注射加强免疫 1 次, 然后我们分析比较了各组疫苗所引起的免疫应答特点。抗体检测结果表明: 皮内注射结合电转初免组产生的 PreS1 与 S 特异性抗体水平皆高于肌肉直接注射组。进一步还发现 DNA 疫苗与蛋白颗粒亚单位疫苗两种疫苗联合应用后 S 抗原特异的细胞免疫应答 (IFN- γ ELISpot 分析) 明显高于 DNA 疫苗或蛋白颗粒亚单位单独应用, 其中皮内注射+电转结合蛋白颗粒亚单位疫苗联合免疫组可产生最强的细胞免疫应答。这些研究为新型 HBV 治疗性疫苗的优化设计与合理应用提供了依据。

关键词: 乙型肝炎病毒 (HBV), DNA 疫苗, 颗粒亚单位疫苗, 电转, 联合免疫

Boosting with HBV subunit particle vaccine enhance immune response of novel DNA vaccine consisting of S-PreS1 fusion gene in mice

Hong Chen*, Yao Deng*, Wenjie Tan, Wen Wang, Jie Guan, Bo Wen, Xiao Yin, and Li Ruan

Biotech Center for Viral Diseases Emergency, National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China

Abstract: To develop novel and effective HBV therapeutic vaccine, we constructed an expression vector, pVRC-HBSS1, in which PreS1 (21-47aa) coding gene fused to the C-terminal of the S (1-223 aa) coding gene of HBV, and prepared the protein particle vaccine HBSS1 that consist of S and PreS1 fusion antigen derived from CHO system. We immunized mice by priming three times with DNA vaccine via different methods (i.e., intramuscular injection, intradermal injection with electroporation), then boosting once

Received: May 13, 2010; **Accepted:** October 9, 2010

Supported by: Mega-projects of Science Research for R&D of New Drugs (No. 2009ZX09102-237).

Corresponding author: Wenjie Tan. Tel/Fax: +86-10-63552140; E-mail: tanwj28@yahoo.com

*These authors contributed equally to this study.

新药创制科技重大专项 (No. 2009ZX09102-237) 资助。

with protein particle vaccine. We analyzed the immune response among various vaccination groups. The higher level of S or PreS1 specific antibodies was detected in the group via intradermal injection with electroporation, compared with that of direct intramuscular injection. We further found that the specific cellular immune responses (IFN- γ ELISpot analysis) in the group priming with DNA vaccines and boosting with protein subunit vaccine particles, was significantly higher than that of the DNA or protein particle subunit alone. Moreover, combination vaccination priming with intradermal injection DNA via electroporation and boosting with protein particle induced the strongest cellular immune response. These results provide a basis for rational design and application of the novel HBV therapeutic vaccine.

Keywords: Hepatitis B virus (HBV), DNA vaccine, subunit particle vaccine, electroporation, prime boost vaccination

乙型肝炎病毒 (HBV) 不仅可引起急慢性肝炎, 而且与肝硬化、肝癌的发生密切相关, 尽管乙肝疫苗的使用已逾 20 年, 目前 HBV 仍是传播最为广泛的病原之一^[1]。HBV 疫苗在中国已纳入计划免疫, 使用最为广泛的为酵母或 CHO 表达含 S 全长的颗粒亚单位疫苗^[2]。尽管 HBV 疫苗的应用已达 20 余年并取得极大成功, 但仍有 5%~10% 的人群不能产生保护性 anti-HBs 抗体, 且近年来, S 变异流行株呈增长趋势^[2]。目前全球绝大多数慢性 HBV 感染者得不到有效治疗, 而长期持续性感染将可能最终导致肝硬化、肝衰竭或者肝癌, 当前临床上乙肝主要药物的治疗效果有限, 且长期应用中存在不良反应, 仍需开发新的治疗策略, 因而 HBV 治疗性疫苗的研发与应用成为近年来研究的热点。

HBV 的治疗性疫苗主要包括重组蛋白疫苗、多肽疫苗、DNA 疫苗等^[2], DNA 疫苗与蛋白疫苗相比, 除了可激发特异性抗体应答外, 还可产生较强的、持久的 T 辅助 (Th) 细胞应答与抗原特异的 CTL 反应。此外, DNA 疫苗还具备制备简单、低廉并易于多价使用等优点^[3], 多种 DNA 疫苗应用的结果表明其主要的问题是其免疫原性相对较弱 (尤其是在大动物与人中), 故近年来科学家们探索了采用多种途径增强其免疫原性^[3], 如抗原改造、与蛋白疫苗或载体疫苗联合应用、采用基因枪及体内电转等方式免疫等。

本研究在前期工作基础上^[4-5]首先构建了含 PreS1 与 S 融合抗原的 HBV DNA 疫苗^[6], 即 pVRC-HBSS1 (PreS1 与 S 融合), 分别采用肌肉注射、皮内

注射+电转两种方式初免后, 用蛋白颗粒亚单位疫苗 (不同佐剂) 肌肉注射加强免疫 1 次, 在小鼠中比较分析了体液与细胞免疫应答特点。

1 材料与方法

1.1 HBV 颗粒蛋白疫苗与佐剂

CHO 表达的含 S+PreS1 融合抗原的颗粒疫苗 (HBSS1) 的制备及表达鉴定 (SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳及电镜观察) 参见文献[4]。Al(OH)₃ 佐剂为北京华尔盾科技服务公司提供, 浓度为 2 mg/mL; CpG-ODN 1826^[4-6]由 NEB 公司合成, 由上述抗原与佐剂分别配伍成 2 种免疫制剂, 即 HBSS1+Al(OH)₃、HBSS1+CpG, 其中每剂中抗原含量皆为 2 μ g, Al(OH)₃ 含量为 1 mg/mL, CpG 含量为 10 μ g。

1.2 HBV DNA 疫苗的构建与表达鉴定

包含 HBV S 抗原 (S:1-223 aa) 与前 S1 抗原 (PreS1: 21-47 aa) 融合基因的 pcHBSS 表达质粒为本室保存^[9], 可用于在 CHO 细胞中表达制备 HBV 颗粒样蛋白疫苗。乙肝病毒颗粒样 DNA 疫苗质粒 pVRC-HBSS1 的构建参见文献[6], 即将 HBV S 抗原 (S:1-223 aa) 与前 S1 抗原 (PreS1: 21-47 aa) 融合基因的目的片段, 连接到 pVRC8301 载体上, 限制酶分析和测序筛选获得 HBV DNA 疫苗阳性质粒 pVRC-HBSS1。DNA 疫苗质粒用 Endofree 试剂盒 (德国 Qiagen) 纯化。纯化的 pVRC-HBSS1 质粒 DNA 瞬时转染 293T 细胞, 转染 48 h 后裂解 293T 细胞, 取样进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜进行 Western blotting 分析, 用抗 PreS1 小鼠单抗作为一抗检测靶抗原表达 (图 1)。

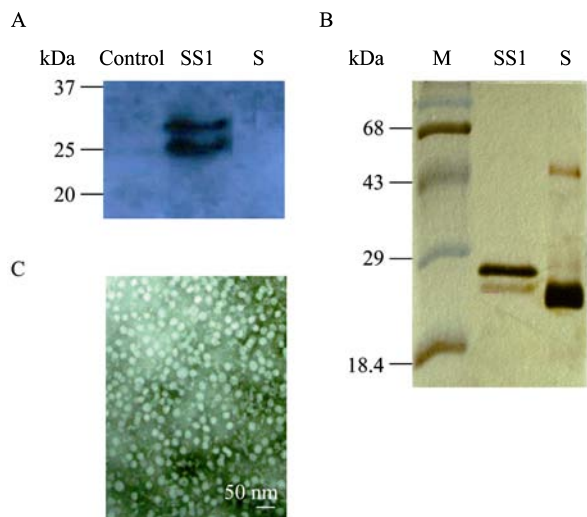


图 1 乙型肝炎病毒新型 DNA 疫苗的表达检测及颗粒亚单位蛋白疫苗的鉴定

Fig. 1 Expression detection of HBV DNA vaccine containing PreS1 and S fusion gene. (A) Western blotting analysis of expression of SS1 antigen in the HBV DNA vaccine. (B) Characterization of HBV particle subunit vaccine which consist of SS1 antigen by SDS-PAGE staining. (C) Electron-micrograph of HBV particle subunit vaccine which consist of SS1 antigen. M: protein marker; SS1: S+PreS1 fusion antigen; S: S antigen.

1.3 动物分组与免疫方案

Balb/C 小鼠, 雌性, 6~8 周龄, 购自中国医学科学院动物实验繁殖中心, 按照免疫方式随机分为 4 组 (表 1), A、B 与 C 每组 12 只, 另设生理盐水对照组 (6 只), 注射方式和免疫剂量见表 1。DNA 疫苗初免 (0、3、6 周), A 组和 B 组为肌肉注射, C 组为皮内注射, 结合卡钳式电转免疫 (表 1)^[7-8], 采用 BTX ECM830 电穿孔仪, 卡钳式电极皮内免疫 (C 组) 的电转参数为: 100 V, 10 ms 间隔, 3 次脉冲; 然后电极反向, 75 V, 15 ms, 3 次脉冲, 间隔 1 s/次。蛋白加强 (第 10 周) 为肌肉注射免疫。A、B 与 C 每组分别于第 10 周与第 14 周各取 6 只采血与脾细胞进行抗体检测与细胞免疫应答分析。

1.4 体液免疫应答检测

眼眶采血检测抗体, 倍比稀释后, 参照试剂盒说明进行^[5-6]。每组血清混合后皆从 1:10 起倍比稀释。

1.5 IFN- γ ELISpot 检测

HBV S 抗原合成肽库参见文献[5], 分别与小鼠脾细胞 (5×10^5) 孵育, 具体操作按试剂盒说明书进行^[5-6]。反应终止后在 ELISpot 读数仪上计数分析, 以 10^6 脾细胞中斑点 (减去无关肽孔) 计数求均值。实验数据采用 SPSS14.0 软件处理, 统计学分析采用 One-way ANOVA 检验法。

表 1 动物分组及免疫方案

Table 1 Group and immunization of mice used in this study

Group	Prime			Boost	
	Immunogen	Dose	Route	Immunogen	Dose
A	pVRC-HBSS1	50 μ g	i.m.	HBSS1+Al(OH) ₃	2 μ g
B	pVRC-HBSS1	50 μ g	i.m.	HBSS1+CpG	2 μ g
C	pVRC-HBSS1	10 μ g	i.d.+EP	HBSS1+Al(OH) ₃	2 μ g
D	PBS	100 μ L	i.m./i.d.+EP	PBS	100 μ L

2 结果

2.1 DNA 疫苗的表达及颗粒亚单位蛋白疫苗的检定

本实验以前的研究表明^[4], 将 HBV PreS1 区 21-47 位氨基酸融合到截短型 S 抗原 (1-223 aa) 的羧基端, 可在 CHO 系统中表达形成稳定的 VLP 结构抗原, 为此本研究中将上述含 PreS1 的融合抗原克隆到 DNA 疫苗载体 pVRC 上形成 DNA 候选疫苗, 即 pVRC-HBSS1, 体外瞬时转染 293T 细胞后进行 Western blotting 分析证实融合抗原的有效表达 (图 1A)。因糖基化不同, SS1 出现大小约为 24、27 kDa 两条带。颗粒亚单位蛋白疫苗的 SDS-PAGE 电泳及颗粒的电镜鉴定参见文献[4] (图 1B, 1C)。Western blotting 与 SDS-PAGE 染色实验中采用仅含 S 主蛋白的 DNA 疫苗或颗粒亚单位蛋白作对照。这些结果均与前述文献报道相符。

2.2 DNA 疫苗初免颗粒样蛋白疫苗加强后小鼠的抗体应答及 IgG 亚型

DNA 疫苗初免后 4 周, 肌肉注射组抗 PreS1 及

抗 S 抗体平均滴度分别为 60 与 10, 而皮内注射结合电转组则分别为 200 与 1 000; 蛋白疫苗加强免疫后 4 周采血进行特异性抗体滴度的测定, 结果表明 (表 2): 与初免后 4 周测定结果相比, 抗体平均滴度各组皆有所提高, 其中抗 PreS1 抗体以 A 组 (肌肉注射 DNA 疫苗初免, 蛋白疫苗结合 Al(OH)₃ 佐剂加强免疫) 抗体平均滴度最高, 而抗 S 抗体以 C 组 (DNA 疫苗皮内注射+电转初免, 蛋白疫苗结合 Al(OH)₃ 佐剂加强免疫) 平均滴度较高, 蛋白疫苗结合 CpG 佐剂加强免疫组 (B 组) S 与 PreS1 抗体平均滴度皆低于蛋白疫苗结合 Al(OH)₃ 佐剂加强免疫组 (A 和 C 组)。除了对抗体滴度进行分析外, 我们也在末次免疫后第 4 周采血以 1:100 稀释后对每组诱导的 IgG 亚型进行分析 (表 2), 结果表明: DNA 疫苗肌肉注射或皮内注射结合电转初免, 含铝佐剂的蛋白制剂加强后 (A 和 C 组) 产生的针对 S 与 PreS1 的抗体 IgG 亚型各组 IgG2a/IgG1>1; 而含 CpG 佐剂的蛋白制剂加强后 (B 组) 抗 PreS1 抗体以 IgG2a 为主, 而针对 S 的抗体 IgG 亚型, 则 IgG1 略高于 IgG2a。

表 2 联合免疫后抗原特异的总抗体平均滴度与亚型
Table 2 Total antibody titers and subtype class in sera of mice after prime-boost vaccination

Group	Anti-S Ab		Anti-PreS1 Ab	
	Titer	IgG1/IgG2a	Titer	IgG1/IgG2a
A	1.6×10 ³	1.15/1.98	8.4×10 ⁴	2.18/2.20
B	3.6×10 ²	1.37/1.35	3.5×10 ³	1.37/1.91
C	4.4×10 ³	2.17/2.30	4.5×10 ⁴	2.14/2.20

2.3 DNA 疫苗初免颗粒样蛋白疫苗加强后小鼠的抗原特异性细胞免疫应答明显增强

作为治疗性 DNA 疫苗, 细胞免疫应答是评定有效性最关键的评价指标, 为此我们采用 IFN- γ ELISpot 方法检测了 DNA 疫苗初免后 4 周及 DNA 疫苗与蛋白疫苗联合免疫后 4 周各组小鼠脾细胞中抗原特异的 IFN- γ 分泌细胞数, 结果如图 2 所示。DNA 疫苗初免蛋白疫苗加强应用后 S 特异的 SFC

读数明显提高, SFC 读数均值>400 SFC/10⁶ 脾细胞, 显著高于 DNA 疫苗肌肉注射初免各组。而且以 DNA 疫苗皮内电转初免 (10 μ g), 结合蛋白制剂加强应用后增强效果最明显 (SFC 读数均值>800 SFC/10⁶ 脾细胞)。

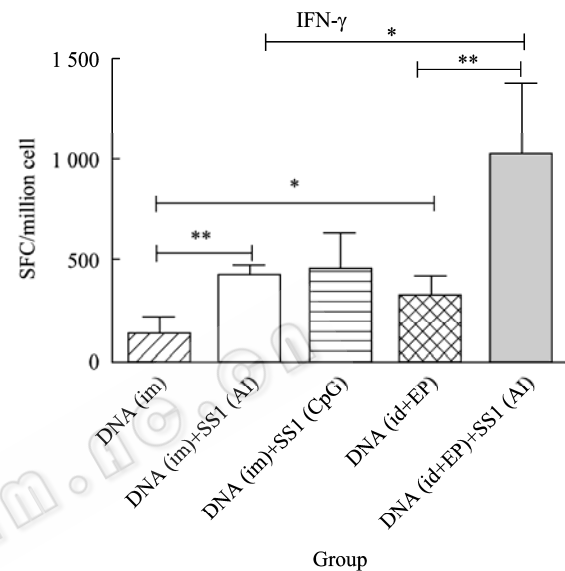


图 2 ELISPOT 分析不同 HBV 疫苗免疫后小鼠脾细胞中 IFN- γ 分泌斑点形成细胞数 (SFCs)

Fig. 2 ELISPOT analysis for IFN- γ secretion in mouse splenocytes immunized with different HBV vaccines as indicated. Data represent the average of spot forming cells (SFCs) per million of splenocytes from 6 mice/group. * $P<0.05$; ** $P<0.01$.

3 讨论

诱导针对多个抗原的较强的体液与细胞免疫应答是研制新型 HBV 治疗性疫苗的目标^[2,11-12]。HBV 表面抗原 (HBS) 在 CHO 细胞或酵母中表达可自我装配成 22 nm 球形 VLP, 是市售 HBV 疫苗的有效保护性抗原^[2]。PreS1 含多个比 S 蛋白免疫原性更强的 T 细胞和 B 细胞表位^[9-10], 并含肝细胞结合位点 (21-47 aa), 对于病毒的附着与进入等有重要作用^[13], 故对 PreS1 抗原的免疫反应在中和和阻断 HBV 感染及清除 HBV 感染上起着重要作用^[9-12]。

前期的实验结果表明^[4]: 在 CHO 细胞中表达

HBSS1 即 S (1-223 aa)+PreS1 (21-47 aa) 亦可形成稳定分泌的病毒样颗粒, PreS1 与 S 抗原的摩尔比率为 1:1。这种病毒颗粒样蛋白抗原皆可在动物模型中快速激发有效的体液免疫应答^[4-5]。而 DNA 疫苗制备快速、低廉, 而且较蛋白疫苗更易激发较强的细胞免疫应答, 但目前 DNA 疫苗面临的主要挑战是免疫强度有待增强^[3,11]。最近大量文献报道^[3,7-8,11]通过体内电转可明显增强细胞对外源 DNA 的摄取与表达水平, 外源蛋白引起局部的炎性因子聚集从而可同时提高 DNA 疫苗所诱导的体液与细胞免疫应答水平, 而 DNA 疫苗与蛋白疫苗或载体疫苗联合应用则是增强 DNA 疫苗免疫应答最有效的策略之一^[3]。

本研究旨在研制可诱导多抗原特异细胞免疫应答的 HBV 治疗性疫苗, 故首先采用 DNA 疫苗载体构建了包含上述颗粒样结构的 DNA 疫苗, 即 pVRC-HBSS1, 为增强免疫原性, 结合应用电转方式进行初免; 同时为进一步增强免疫应答水平, 采用了与蛋白颗粒亚单位疫苗联合应用的免疫策略, 在小鼠中分析比较其免疫应答特点。

我们的前期研究采用 2 次蛋白疫苗 (含不同佐剂) 肌肉注射初免, 1 次 DNA 疫苗皮内电转免疫加强的联合免疫方式, 在小鼠中分析比较了各疫苗所引起的体液与细胞免疫应答。结果表明^[6]: HBSS1 DNA 疫苗结合皮内注射+电转方式可明显加强含 S-PreS1 颗粒的蛋白疫苗在小鼠中免疫效果, 其特异性抗体滴度皆高于 10^4 , 高于本研究中采用的联合免疫所诱导的抗体水平, 但细胞免疫强度却明显低于本研究中采用的联合免疫, 前者小鼠中 IFN- γ 分泌斑点形成细胞数均值皆低于 250 SFC/ 10^6 脾细胞, 而本研究中联合免疫后 SFCs 读值均高于 400 SFC/ 10^6 脾细胞, 最高均值达 800 SFC/ 10^6 脾细胞。故本研究中采用的联合免疫方案更适合 HBV 治疗性疫苗的要求。

总之, 本研究中 HBSS1 DNA 疫苗初免蛋白疫苗加强的联合免疫策略, 结合皮内电转方式可产生

最强的抗原特异的细胞免疫应答, 是研发新型有效 HBV 治疗性疫苗的候选制剂与免疫方案, 值得进一步在大动物或人群中评价与应用。

REFERENCES

- [1] Lavanchy D. Worldwide epidemiology of HBV infection, disease burden, and vaccine prevention. *J Clin Virol*, 2005, 34(Suppl1): S1-S3.
- [2] Tan WJ, Ruan L. Progress on combination strategies of therapeutic vaccine approaches for the treatment of chronic HBV infection. *Chin J Virol*, 2006, 22(5): 407-411.
谭文杰, 阮力. HBV 病毒慢性感染疫苗治疗的组合策略及研究进展. *病毒学报*, 2006, 22(5): 407-411.
- [3] Lu S, Wang SX, Grimes-Serrano JM. Current progress of DNA vaccine studies in humans. *Expert Rev Vaccines*, 2008, 7(2): 175-191.
- [4] Tian SF, Zong F, Chen H, et al. The physicochemical and biological properties of SS1 fusion antigen of HBsAg secreted by mammalian cells. *Chin J Virol*, 2002, 18(4): 312-316.
田淑芳, 宗芳, 陈红, 等. 哺乳动物细胞分泌的乙型肝炎病毒表面 S+PreS1 融合抗原的理化 and 生物学性状. *病毒学报*, 2002, 18(4): 312-316.
- [5] Chen H, Deng Y, Tan WJ, et al. Impact of different adjuvant on immunogenicity of the HBV particle vaccine containing the S+PreS1 fusion antigen in Balb/C mice. *Chin J Biotech*, 2010, 26(1): 74-78.
陈红, 邓瑶, 谭文杰, 等. 不同佐剂对含 S+PreS1 融合抗原的乙型肝炎病毒颗粒疫苗免疫原性的影响. *生物工程学报*, 2010, 26(1): 74-78.
- [6] Chen H, Zhang LL, Tan WJ, et al. HBV DNA vaccination with electroporation enhances significantly the specific cell-mediated immune response in mice against HBV protein vaccine consisting of S-PreS1 fusion particles. *Chin J Exp Clin Virol*, 2010, 24(2): 94-97.
陈红, 张陵林, 谭文杰, 等. 乙型肝炎病毒 DNA 疫苗电转加强含 S-PreS1 颗粒的蛋白疫苗在小鼠中免疫效果. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2010, 24(2): 94-97.
- [7] Zhang L, Nolan E, Kreitschitz S, et al. Enhanced delivery of naked DNA to the skin by non-invasive *in vivo*

electroporation. BBA, 2002, 1527(1): 1-9.

- [8] Yin X, Lu J, Tan WJ, et al. Enhancement of the immune response of a novel DNA vaccine encoding conserved NS3 and core fusion gene of HCV injected by intradermal electrotransfer in mice. Chin J Microbio Immunol, 2010, 30(1): 41-45.

殷霄, 鲁健, 谭文杰, 等. 表达丙型肝炎病毒 NS3 和 Core 融合蛋白基因的 DNA 疫苗免疫方案优化. 中华微生物学和免疫学杂志, 2010, 30(1): 41-45.

- [9] Neurath AR, Seto B, Strick N. Antibodies to synthetic peptides from PreS1 region of hepatitis B virus (HBV) envelop (env) protein are virus-neutralizing and protective. Vaccine, 1989, 7(3): 234-236.

- [10] Milich DR, Melachlan A, Thornton GB. T-cell recognition of pre-S regions of HbsAg can bypass nonresponse to the S region. Adv Exp Med Biol, 1987, 225: 233-239.

- [11] Bertoletti A, Gehring A. Therapeutic vaccination and novel strategies to treat chronic HBV infection. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2009, 3(5): 561-569.

- [12] Depla E, Van der Aa A, Livingston BD, et al. Rational design of a multiepitope vaccine encoding T-lymphocyte epitopes for treatment of chronic hepatitis B virus infections. J Virol, 2008, 82(1): 435-450.

- [13] Dash S, Rao KVS, Panda SK. Receptor for pre-S1 (21-47) component of hepatitis B virus on the liver cell: role in virus cell interaction. J Med Virol, 1992, 37(2): 116-121.

—————

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

生物工程下游技术实验手册

“十一五”国家重点图书出版规划项目

应用生物技术大系

柯德森 主编

开本: B5 营销分类: 生物科学 装帧: 平装

ISBN978-7-03-029425-8 ¥38.00 2010年11月出版

内容简介

本书较系统地介绍了生物工程下游技术领域所涉及的主要技术手段的原理、操作方法和操作规范。主要包括细胞破碎与固液分离技术、膜分离技术、层析技术和电泳技术以及相关领域常见的仪器设备及其操作方法。在此基础上介绍了 22 项生物工程下游常规实验和 4 项综合性实验。

本书实验项目主要为适应高等院校生物工程、生物技术及食品卫生专业本科实践教学的需要而选择和设计,同时也适用于相关学科的职业技术教育。本书还可供相关专业的研究生及科研人员查阅参考。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书 (免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 周文宇 (010-64031535)

网上订购: www.dangdang.com www.joy.com www.amazon.cn www.beifabook.com

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目