

HCV 多表位抗原基因重组减毒口服活菌苗的研究^{*}

黄建生 解咏梅 张 潜 沈先荣 任大明

(复旦大学生命科学院 上海 200433)

摘 要 把丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)复合多表位抗原基因 PCX 与 β -半乳糖苷酶基因(GZ)融合后,构建重组减毒鼠伤寒沙门氏菌口服活菌苗 SL3261(pWR/PCX),免疫小鼠及家兔后,于第 6 周始可检测到低水平的抗-GZ-PCX IgG(1:200),至 3 月时最高滴度分别达 1:800 及 1:25 600,均显著高于宿主菌 SL3261 组及空白对照组。在免疫小鼠的肠道灌洗液中可检测到抗-GZ-PCX sIgA。GZ-PCX 抗原可促进免疫小鼠及家兔淋巴细胞增殖,诱发明显的迟发性超敏反应(DTH)。口服免疫后小鼠体重出现一过性下降,但未见其它明显的毒性作用,安全性较好。本研究从新的角度探讨了 HCV 复合多表位重组口服活菌苗的可行性,为 HCV 疫苗的研究提供新的实验依据。

关键词 丙型肝炎,口服活菌苗,多表位抗原,免疫应答

中图分类号:Q781 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2000)05-0495-99

利用减毒鼠伤寒沙门氏菌来表达外源蛋白并制备口服活菌苗是近十几年来疫苗研究中鼓舞人心的进展之一。由于粘膜免疫直接把目的抗原表达于肠道上皮细胞中,可高效地激发特异性免疫应答,因此倍受关注,也是未来疫苗发展的最主要的方向之一。我们在 HCV 表达产物中优选了 5 个高度保守的免疫性 T 及/或 B 细胞表位,组合成一个 HCV 复合多表位抗原基因^[1],与 β -半乳糖苷酶基因融合后,构建重组减毒鼠伤寒沙门氏菌口服活菌苗 SL3261(pWR/PCX),用于免疫小鼠及家兔,研究该 HCV 重组活菌苗诱发免疫应答水平及其安全性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株 质粒 pWR450-1、pWR/PCX 为复旦大学遗传学研究所遗传工程国家重点实验室提供,减毒鼠伤寒沙门氏菌 LB5000 及 SL3261 为 Stanford 大学 Stocker B A 教授及何笑松博士赠送。

^{*} 国家自然科学基金资助(39780002)

作者简介 黄建生(1969-),男,福建泉州人,第一军医大学抗衰老研究室讲师,复旦大学遗传学研究所博士生,主要从事基因工程疫苗研究

作者还有 吉冬梅¹ 许 淳¹ 贾福星¹ 雷呈祥¹ 兰和魁² 郑维扬² 张丽芸² 陈立茵² 郭明秋²

¹ 海军医学研究所,上海 200433

² 第一军医大学,广州 510515

收稿日期:1999-04-05 修回日期:1999-06-07

1.1.2 试剂 :HRP-兔抗鼠 IgA、脂多糖(LPS)、小牛血清白蛋白(BSA)购自 Sigma 公司; HRP-兔抗人 IgG、HRP-羊抗兔 IgG、HRP-兔抗鼠 IgG、ConA、PHA-M 购自华舜生物工程有限公司;蛋白质 GZ-PCX、GZ 为我室纯化样品^[2],³H 购自英国 Amersham 公司。

1.1.3 动物 :ICR 小鼠及新西兰家兔均购自海军医学研究所实验动物中心,健康 6 周龄小鼠 17~21g,新西兰家兔 2~2.5kg,雌雄各半。每组小鼠 5~10 只,家兔 4~5 只。

1.2 方法

1.2.1 重组活菌苗的构建及表达 :质粒 pWR450-1 及 pWR/PCX 先分别转化到 LB5000 后,抽提质粒后用于转化 SL3261,获得重组减毒鼠伤寒沙门氏菌口服活菌苗 SL3261(pWR450-1)及 SL3261(pWR/PCX)。分别挑取单菌落在 LB 培养剂中培养,常规处理及电泳^[3]。

1.2.2 口服免疫 :口服免疫方法参照文献[3]进行。小鼠及家兔免疫剂量分别确定为 1×10^8 CFU/次及 2×10^9 CFU/次,于第 0、2、4 周时相同剂量各免疫一次。每隔 2 周采集血清。

1.2.3 免疫血清特异性抗体的检测 (1)抗-GZ-PCX IgG 的检测 :ELISA 方法参照[3],以 GZ-PCX 蛋白包被,二抗为 HRP-羊抗兔及 HRP-兔抗鼠 IgG,1:10 000 稀释。(2)鼠血清抗-GZ-PCX IgA 的检测 :ELISA 方法同上,以 GZ-PCX 蛋白包被,二抗为 HRP-兔抗鼠 IgA,以 1:1 000 稀释。(3)小鼠肠道及 sIgA 的检测 :取 10cm 小鼠小肠,剪开肠管后,用 0.8mL PBS 洗涤完全后,离心取上清作为一抗,二抗为 HRP-兔抗鼠 IgA。(4)血清抗-LPS IgG 的检测 :用 LPS 包被,二抗为 HRP-羊抗兔或 HRP-兔抗鼠 IgG。

1.2.4 细胞免疫检测 (1)淋巴细胞转化试验(LTT,³H-TdR 掺入法):参照文献[4]进行,并作改进。家兔耳静脉采血约 2mL,在 24 孔培养板每孔中加入 0.9mL RPMI-1640 完全培养基及 100 μ L 全血,每组 3 管,GZ-PCX 蛋白终浓度为 10 μ mol/L,置 37 $^{\circ}$ C 密封培养 72h,每日摇匀 2~3 次,观察细胞生长情况,于结束培养前 16h 加入 2 μ L 的³H-TdR。培养结束后,每孔加入 40 μ L 乙酸钠,作用 5min 后加到玻璃滤膜上,用水泵抽干后,加 3mL 5% 三氯醋酸(TCA),再加 3mL 无水乙醇脱水,滤膜置 80 $^{\circ}$ C 烤干后,加入闪烁液(4g PPO + 0.04g POPOP/L 二甲苯)5mL,于液体闪烁仪 LS-6500 中测定 CPM 值。(2)迟发性超敏反应(DTH):参照文献[4]进行,用 GZ-PCX 蛋白注射于小鼠后足趾皮下或家兔腿部皮内,注射剂量分别为 10 μ g、50 μ g,观察注射部位的变化。

1.2.5 免疫小鼠体重及肝脾变化 :免疫后每周分别称取各组小鼠体重;于免疫后 4 月处死部分小鼠,观察肝脾大小。

2 结果

2.1 SL3261(pWR/PCX)的构建及目的蛋白的表达

经 12% SDS-PAGE 电泳,可见 GZ-PCX 融合基因在 SL3261 中获得良好表达,GZ-PCX 蛋白的表达量约占总菌体蛋白质的 10%~15%,对照载体也表达了 GZ 蛋白,相对分子质量大小正确(图略)。

2.2 抗-GZ-PCX IgG 的检测

SL3261(pWR/PCX)口服免疫小鼠及家兔后,于免疫后第 6 周诱发特异性抗体滴度

达到最高,分别为 1:800 及 1:25 600(图 1、2)。活疫苗在家兔中可诱发更强的免疫应答,且持久性较好,于免疫后 4 月尚可检测到抗-GZ-PCX IgG。载体组在 小鼠可诱发与疫苗组相似的抗体反应,而在家兔中则较差,与疫苗组比较 $P<0.001$ 。

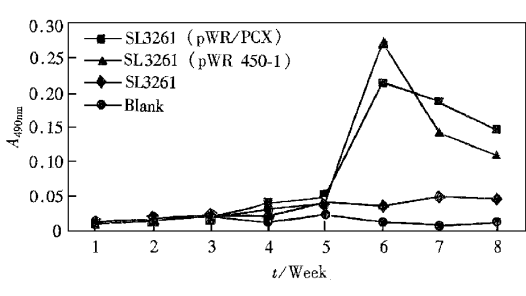


图 1 小鼠血清抗-GZ-PCX IgG 的检测结果
Fig.1 Detection of anti-GZ-PCX IgG in the sera of immunized mice(sera 1:100 dilution)

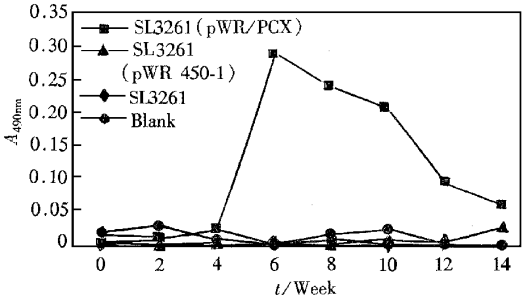


图 2 家兔血清抗-GZ-PCX IgG 的检测结果
(血清 1:6400 稀释)
Fig.2 Detection of anti-GZ-PCX IgG in the sera of immunized rabbits(sera 1:6400 dilution)

2.3 抗-GZ-PCX IgA 的检测

SL3261(pWR/PCX)组小鼠血清中可检测到低水平的抗-GZ-PCX IgA ,与空白对照相比 $P<0.05$ 。

2.4 小鼠肠道抗-GZ-PCX sIgA 的检测

在肠道灌洗液中可检测到低水平的 sIgA ,SL3261(pWR/PCX)组与空白对照组存在显著差异 ($P<0.05$)。

2.5 抗-LPS IgG 的检测

家兔及小鼠免疫后都可检测到一定水平的抗-LPS 抗体 ,与对照存在显著差异($P<0.05$ 或 <0.01 ,图 3)。

2.6 细胞免疫检测结果

2.6.1 LTT 结果 :GZ-PCX 抗原作为刺激

物 ,可促进免疫小鼠淋巴细胞增生 ,疫苗组与载体对照组分别为 256.0% 及 95.8%($P<0.05$) ,未加刺激物分别为 139.8% 及 102.6%。

2.6.2 DTH 结果 :免疫后第 4 周 ,疫苗组只有一半小鼠诱发较低水平的 DTH 反应 ,但 SL3261 对照组几乎都为阴性 ,SL3261(pWR/PCX) 与 SL3261(pWR450-1)组与 SL3261 组存在显著差异 ($P<0.05$,表 1、2)。6 个月后 ,疫苗组免疫家兔尚可诱发明显的 DTH 反应 ,而载体组则为阴性。

2.7 免疫小鼠体重动态分析

免疫后小鼠体重大多出现一过性下降 ,可能是减毒鼠伤寒沙门氏菌本身的残留毒性所致。

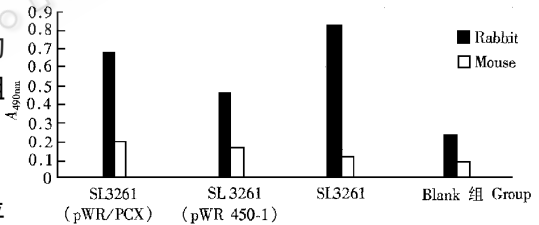


图 3 家兔及小鼠血清抗 LPS 的检测结果
Fig.3 Detection of anti-LPS IgG in immunized rabbits and mice(sera 1:100 dilution)

表 1 GZ-PCX 抗原诱发免疫小鼠的 DTH 反应结果(第 9 周)

Table 1 Delayed type hypersensitivity reactions induced by GZ-PCX antigen in immunized mice at week 9

Group	n	++	+	±	-
SL3261(pWR/PCX)	6	2	3	1	
SL3261(pWR450-1)	5	1	2	1	1
SL3261	3			1	2
Blank	5				5

++ Significant swollen ; + Swollen ; ± Slight swollen ; - No swollen

表 2 GZ-PCX 抗原诱发免疫家兔的 DTH 反应结果(第 4 及第 9 周)

Table 2 Delayed type hypersensitivity reactions induced by GZ-PCX antigen in immunized rabbits at week 4 and week 9

Group	week 4(1 st d)		Week 9(1 st d)		Week 9(2 nd d)	
	Diameter/mm	Mean/mm	Diameter/mm	Mean/mm	Diameter/mm	Mean/mm
SL3261(pWR/PCX)	5.5 5.0 5	4.0	6.12 8.0 6	6.3	4.10 8.5 7	6.7
SL3261(pWR450-1)	0.15 5.10 8	5.6	4.0 8.12 5	5.8	5.5 4.10 10	6.7
SL3261	5.0 0	1.7	0.0 0	0	0.0 0	0
Blank	0.0 0.0	0	0.0 0.0	0	0.0 0.0	0

2.8 免疫小鼠肝脾变化

肉眼可见免疫小鼠脾脏轻度肿大,而肝脏则未见明显变化。

3 讨论

减毒鼠伤寒沙门氏菌由于可在肠道寄生,所表达的外源抗原可被吞噬细胞所吞噬,继而提呈给抗原提呈细胞,激发特异性免疫应答。由于活疫苗不需注射,不需医护人员的参与,使用十分方便;不需纯化抗原,价格低廉且可很好地保持抗原的免疫原性,而且活菌苗储存及运输都比较方便,因此受到广泛的关注,也是 WHO 在未来疫苗研究中要极力推广的方向。

目前丙型肝炎疫苗还没有成功的报道,最主要的原因是 HCV 的高度变异性导致病毒易于逃逸宿主的免疫杀伤,这也是 HCV 感染易于慢性化的根源所在。我们根据目前 HCV 的免疫表位研究进展,在 HCV 表达产物中优选了 5 个 T/B 细胞表位,其表达产物具有显著的 HCV 特异性,各表位保持相对独立,以 P5、P6、P2 表位的免疫效应最强(待发表),但这些表位是否具有保护作用,尚需进一步验证。GZ-PCX 蛋白可与 HC 患者血清发生特异性反应,而不与载体 GZ 发生反应,证实所表达的融合蛋白具有 HCV 的免疫特异性^[1]。重组蛋白质免疫小鼠及家兔后可诱发高水平的特异性免疫应答,且无明显的毒性。

本研究把重组 HCV 口服活菌苗 SL3261(pWR/PCX)免疫小鼠及家兔后,诱发了特异性抗-GZ-PCX IgG 及 IgA、抗-LPS IgG 反应,提示该活菌苗可诱发针对目的蛋白及减毒鼠伤寒沙门氏菌的体液免疫应答。GZ-PCX 蛋白刺激免疫小鼠后,引发明显的 DTH 应答,说明活菌苗可诱发特异性细胞免疫应答。在免疫小鼠的肠道灌洗液中还可检测到低水平

的 sIgA 则提示活菌苗可诱发局部的分泌型免疫应答,可望加强疫苗的保护性作用,因此该 HCV 口服活菌苗的研究具有一定的理论意义及潜在的应用价值。我们拟进行恒河猴的保护性试验,以深入验证该疫苗的有效性。

近年来,借助其它一些细菌载体,如减毒鼠伤寒沙门氏菌等,把真核表达载体 DNA 直接进行口服免疫,已获得良好结果^[5-7]。我们的研究也已经表明,携带 PCX 基因的真核表达载体的 SL3261 也可诱发针对 GZ-PCX 蛋白的免疫应答(待发表)。

参 考 文 献

- [1] 黄建生,解咏梅,林元凯,等.微生物学报,1999,39(3):87~90.
- [2] 黄建生,解咏梅,沈先荣,等.复旦学报,1999,37(4):551~554.
- [3] 黄建生,王昌才,任大明,等.微生物学报,1996,36(3):234~236.
- [4] Huang J S, Wang C C, Ren D M, et al. J Med Col PLA, 1997, 12(2):166~171.
- [5] Darji A, Guzman C A, Geratel B, et al. Cell, 1997, 91:765~775.
- [6] Lowrie D B. Nature Medicine, 1998, 4(2):147~148.
- [7] Sizemore D R, Branstrom A A, Sadoff J C. Vaccine, 1997, 15(8):804~807.

IMMUNE RESPONSES OF A RECOMBINED LIVE *SALMONELLA* *TYPHIMURIUM* SL3261 EXPRESSING A MULTI-EPITOPE ANTIGEN OF HCV*

Huang Jiansheng Xie Yongmei Zhang Qian Shen Xianrong Ren Daming

(School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract: A multi-epitope antigen gene of hepatitis C virus (HCV) was fused to β -galactosidase gene and introduced into attenuated *Salmonella typhimurium* SL3261 to construct HCV recombined live vaccine candidate SL3261 (pWR/PCX). When the oral live bacteria were used to immunize mice or rabbits, specific anti-GZ-PCX IgG was detected at week 6 and the strongest antibody responses happened at week 12 at a titer of 1:800 and 1:25 600 in mice and rabbits, respectively, which showed significant difference compared with those of SL3261 and blank controls. Anti-GZ-PCX sIgA in mice's intestine and anti-LPS antibody in sera were also detected. The oral live bacteria elicited obvious DTH reaction and proliferation response of peripheral lymphocytes by GZ-PCX antigen. The body weight of immunized mice slightly decreased but no other toxic effects was observed, which showed the safety of oral immunization. The study of oral live HCV multi-epitope vaccine might be able to provide a new route for the researches of HCV vaccines.

Key words: Hepatitis C virus (HCV), Oral live vaccine, Multi-epitope antigen, Immune response

* This work is supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (39780002)