

# 重组质粒与重组蛋白共免疫诱导 HBsAg 特异性 T 细胞免疫抑制

杜小刚<sup>1</sup>, 王军朋<sup>2</sup>, 康有敏<sup>2</sup>, 王肖<sup>2</sup>, 赵干<sup>2</sup>, 王宾<sup>2\*</sup>

1 四川农业大学生命科学与理学院应用生物物理与免疫工程实验室, 雅安 625014)

2 中国农业大学生命科学院, 农业生物国家重点实验室, 北京 100094)

**摘要:** 【目的】为了探索治疗急性乙型肝炎和爆发性乙型肝炎的新策略, 本研究将 HBV DNA 疫苗和相应抗原的蛋白质分子联合免疫小鼠, 旨在探讨联合免疫对小鼠抗原特异性 T 细胞增殖反应的影响。【方法】我们将 HBV DNA 疫苗 (pcDS2) 和相应抗原蛋白质分子 (HBsAg) 联合免疫 BALB/c 小鼠; 分别在第 0、2 和 4 周进行免疫, 在第 6 周用 ELISA 方法检测抗-HBs IgG 效价, MTT 和流式细胞仪检测 T 细胞增殖反应及流式细胞仪检测细胞因子表达水平。【结果】pcDS2 和 HBsAg 联合免疫组小鼠的抗-HBs 水平显著提高; 免疫小鼠的 T 细胞体外经 HBsAg 刺激后, 联合免疫组刺激指数 (SI) 明显降低; 经流式细胞仪检测进一步证实联合免疫组 T 细胞增殖反应被显著抑制; 联合免疫组 T 细胞表达 IL-10 和 Foxp3 水平显著升高。【结论】pcDS2 和 HBsAg 联合免疫能诱导产生特异性体液免疫应答, 但不能诱导产生抗原特异性 T 细胞增殖反应; T 细胞增殖反应被显著抑制可能与 T 细胞表达 IL-10 和 Foxp3 上调有关; 本研究为急性乙型肝炎和爆发性乙型肝炎治疗及 HBV 疫苗的研究奠定了基础。

**关键词:** 免疫抑制; T 细胞增殖; 表面抗原; DNA 疫苗

**中图分类号:** R392    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0001-6209 (2009) 07-0938-05

乙型肝炎是由乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 引起的一种影响世界公共卫生的重要传染病。乙型肝炎根据病史的长短, 临床症状和肝细胞损伤的程度可分为急性乙肝、爆发性乙肝和慢性乙肝。HBV 感染后, 90% 左右的患者诱发为急性乙肝和爆发性乙肝, 仅有 10% 最终转化为慢性乙肝; 在急性期和爆发期, 机体处于病毒“自限”阶段, 活化大量的免疫细胞包括 T 淋巴细胞、嗜中性粒细胞、NK 细胞等参与病毒的清除过程; 由于细胞免疫反应过强, 清除病毒的同时诱发肝细胞的损伤, 导致丙氨酸转氨酶 (ALT) 水平升高和黄疸等临床症状, 故临床上主要通过抗病毒药物和免疫抑制药物进行治疗<sup>[1-2]</sup>。近年来许多研究表明, 质粒 DNA 和相应抗原的蛋白质疫苗联合免疫能够抑制抗原特异性 T 细胞增殖反

应, 能有效地缓解自身免疫疾病的临床症状, 可能成为自身免疫疾病治疗的新方法<sup>[3-4]</sup>。本研究将表达 HBsAg DNA 疫苗和 HBsAg 蛋白质分子联合免疫小鼠, 观察联合免疫对小鼠抗原特异性 T 细胞增殖反应的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂:** 羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺脂 (CFSE) 为 Molecular Probes 产品; 胎牛血清和 RPMI1640 为 GIBCO 公司产品; CD3、IL-10、Foxp3、IgG1 荧光标记单克隆抗体和 Fc $\gamma$  抗体购自 BD 公司; 卵清蛋白 (OVA)、四甲基偶氮唑 (MTT)、刀豆蛋白 (Con A)、牛血清白蛋白 (BSA)、佛波二脂 (PMA)、

基金项目: 国家自然科学基金 (30771602)

\* 通信作者。Tel: +86-10-62733055; Fax: +86-10-62732012; E-mail: Bwang03@cau.edu.cn

作者简介: 杜小刚 (1977-), 男, 四川阆中人, 博士, 讲师, 主要从事分子免疫学研究。E-mail: dxg111@gmail.com

收稿日期: 2009-03-11; 修回日期: 2009-04-08

莫能菌素、多聚甲醛和皂素均为 Sigma 公司产品; HBsAg 华北制药集团提供。

**1.1.2 实验动物:** 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 15~18 g, SPF 级, 购自军事医学科学院实验动物研究中心。

## 1.2 质粒制备及动物免疫

HBV DNA 疫苗 pcDS2 是由 HBV 前 S2 区和 S 区基因构建到真核表达载体 pcDNA3.0 上而成, 质粒 pcDVP1 是由口蹄疫病毒 (FMDV) 结构蛋白 VP1 基因和 pcDNA3.0 构建而成, 两种质粒已证实均可高效表达<sup>[5-6]</sup>。将质粒 pcDS2 和 pcDVP1 分别转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5a, 将阳性克隆分别接种于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 转入发酵罐中发酵培养, 采用大规模碱裂解法提取质粒<sup>[7]</sup>, 并用生理盐水调节浓度至 1 g/L 于 -20℃ 保存。BALB/c 小鼠分两批免疫, 第一批随机分为 4 组, 每组 6 只, 免疫分组为第 1 组仅免疫 HBsAg, 第 2 组 pcDS2 组, 第 3 组 pcDS2 + HBsAg 联合免疫组, 第 4 组 Naive (空白) 组; 第二批随机分为 6 组, 每组 6 只, 免疫分组为第 1 组仅免疫 HBsAg, 第 2 组 pcDS2 组, 第 3 组 pcDS2 + HBsAg 联合免疫组, 第 4 组 pcDS2 + pcVP1 组, 第 5 组 pcDS2 + OVA 组, 第 6 组 Naive (空白) 组; 肌肉多点注射于小鼠两后股四头肌进行免疫, 质粒 50 μg/只, 蛋白 50 μg/只。分别在第 0、2 和 4 周免疫小鼠, 第 6 周处死小鼠检测相关的免疫学指标。

## 1.3 ELISA 法检测抗 HBs IgG 效价

在最后一次免疫后第 2 周, 小鼠眼眶采血, 分离小鼠血清检测抗-HBs IgG 效价。具体方法如下, 用碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 将 HBsAg 稀释为 2 μg/mL 包被 96 孔酶标板, 4℃ 过夜, PBST 洗涤, 用含 5% 脱脂牛奶的 PBS 封闭, 200 μL/孔, 4℃, 24 h, PBST 洗涤, 待检测小鼠血清从 1:50 倍开始进行倍比稀释后加入包被 HBsAg 孔中, 100 μL/孔, 37℃, 1 h, PBST 洗涤, 加入 100 μL/孔 1:2000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 酶标二抗, 37℃, 1 h, PBST 洗涤, TMB 显色于 OD<sub>450 nm</sub> 测定每孔光密度值。P/N ≥ 2.1 判为阳性, 以 P/N ≥ 2.1 的抗体最大稀释倍数的倒数作为抗体的效价。

## 1.4 MTT 法检测 T 细胞增殖反应

在最后一次免疫后第 2 周, 无菌条件下分离脾细胞, 通过尼龙柱除去 B 细胞制成单细胞悬液, 调整细胞浓度到 1 × 10<sup>6</sup> 个/mL, 活细胞数在 90%, 每孔加入 100 μL 细胞悬液到 96 孔细胞培养板上, 加 100 μL HBsAg 抗原至终浓度为 5 μg/mL 为实验组,

加 100 μL ConA 至终浓度为 5 μg/mL 为阳性对照, 加 100 μL BSA 至终浓度为 2 μg/mL 为无关对照, 100 μL RPMI-1640 为空白对照物, 实验组和对照孔各设 3 个重复孔, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养 48~72 h, 每孔加入 20 μL 5 μg/mL MTT, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养 4 h, 离心弃上清, 每孔加入 100 μL DMSO, 37℃ 培养 15 min, 用酶标仪测定 570 nm 吸光值。刺激指数 (SI), SI = (A<sub>实验组</sub> - A<sub>培养基</sub>) / (A<sub>细胞</sub> - A<sub>培养基</sub>)。

## 1.5 流式细胞仪检测 T 细胞增殖<sup>[8]</sup>

在最后一次免疫后第 2 周, 无菌条件下分离脾细胞, 通过尼龙柱除去 B 细胞制成单细胞悬液, 取 5 × 10<sup>7</sup> 个细胞用 5 μmol/L CFSE 避光染色 10 min, 加入等体积小牛血清终止反应 2 min, 425 × g 离心 5 min 弃上清, PBS 洗 1 次, 将 CFSE 染色的细胞浓度调到 1 × 10<sup>6</sup> 个/mL, 每孔加入 100 μL 细胞悬液到 96 孔细胞培养板上, 加 100 μL HBsAg 抗原至终浓度为 5 μg/mL 作为实验组, 加 100 μL ConA 至终浓度为 5 μg/mL 为阳性对照, 加 100 μL BSA 至终浓度为 5 μg/mL 为无关对照, 实验组和对照孔各设 3 个重复孔, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养 72 h, PBS 洗 1 次, 暗处取 300 μL 流式细胞仪检测分析。

## 1.6 流式细胞仪检测细胞因子表达水平

在最后一次免疫后第 2 周, 无菌条件下分离脾细胞, 通过尼龙柱除去 B 细胞制成单细胞悬液, 调整细胞浓度到 5 × 10<sup>6</sup> 个/mL, 每孔加入 100 μL 细胞悬液到 96 孔细胞培养板上, 加 HBsAg 抗原和抗 CD28 抗体每孔各 50 μL 至终浓度为 5 μg/mL 为实验组; 加 100 μL PMA 至终浓度为 5 μg/mL 为阳性对照组, 加 100 μL RPMI-1640 为空白对照组, 实验组和对照孔各设 3 个重复孔。37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养 48 h 后, 425 × g 离心 5 min 收集细胞, 抗 Fcγ 抗体封闭, 4% 多聚甲醛固定 8 min, 0.1% 皂素破膜 5 min, PBS 洗 2 次, 用 10 μL 荧光单克隆抗体 CD3-FITC、IL-10-PE 和 Foxp3-PE, 4℃ 暗处染色 30 min, 并设抗相应的同型对照, 取 300 μL 流式细胞仪检测。

## 1.7 统计学分析

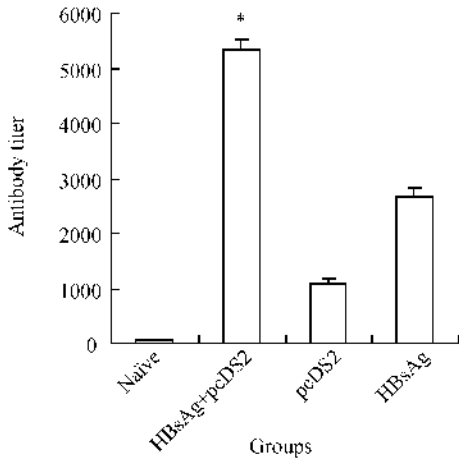
采用 *t* 检验法比较两组之间的差异。

# 2 结果

## 2.1 抗-HBs IgG 效价检测结果

最后一次免疫后 2 周, ELISA 法检测小鼠血清抗-HBs IgG 效价。抗-HBs IgG 检测结果显示, pcDS2 + HBsAg 联合免疫组抗-HBs 效价为 5333, 明显较 HBAg 组效价 2666 和 pcDS2 组效价 1066 高 (*P* < 0.05), 同时也显著高于 Naive (空白) 组效价 50 (*P* <

0.05) 图 1)。



**1 ELISA 检测抗-HBs IgG 效价**

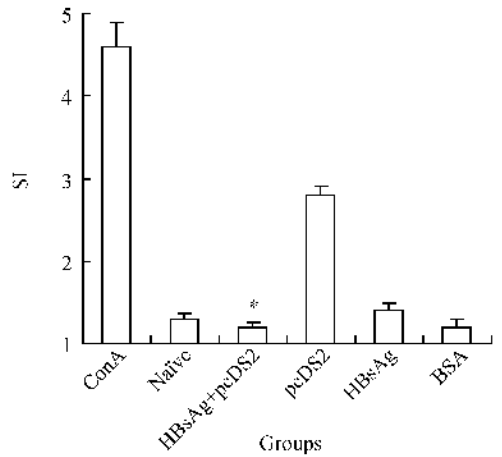
Fig.1 The antibody titer of anti-HBs IgG tested by ELISA. \* mean  $P < 0.05$  pcDS2 + HBsAg group vs other groups.

**2.2 MTT 法检测 T 细胞增殖试验结果**

在最后一次免疫后 2 周, MTT 法检测 T 细胞增殖反应结果表明, pcDS2 + HBsAg 联合免疫组抗原特异性 T 细胞增殖反应被显著抑制, 其 SI 为 1.2; 与核酸疫苗 pcDS2 组和 HBsAg 组相比较联合免疫组 pcDS2 + HBsAg 的增殖明显较低 ( $P < 0.05$ ), 后者的 SI 分别为 2.8 和 1.4 (图 2)。

**2.3 流式细胞仪检测 T 细胞增殖试验结果**

在最后一次免疫后 2 周, T 细胞增殖反应经过流式细胞仪进行检测, HBsAg 组、pcDS2 组、pcDS2 +



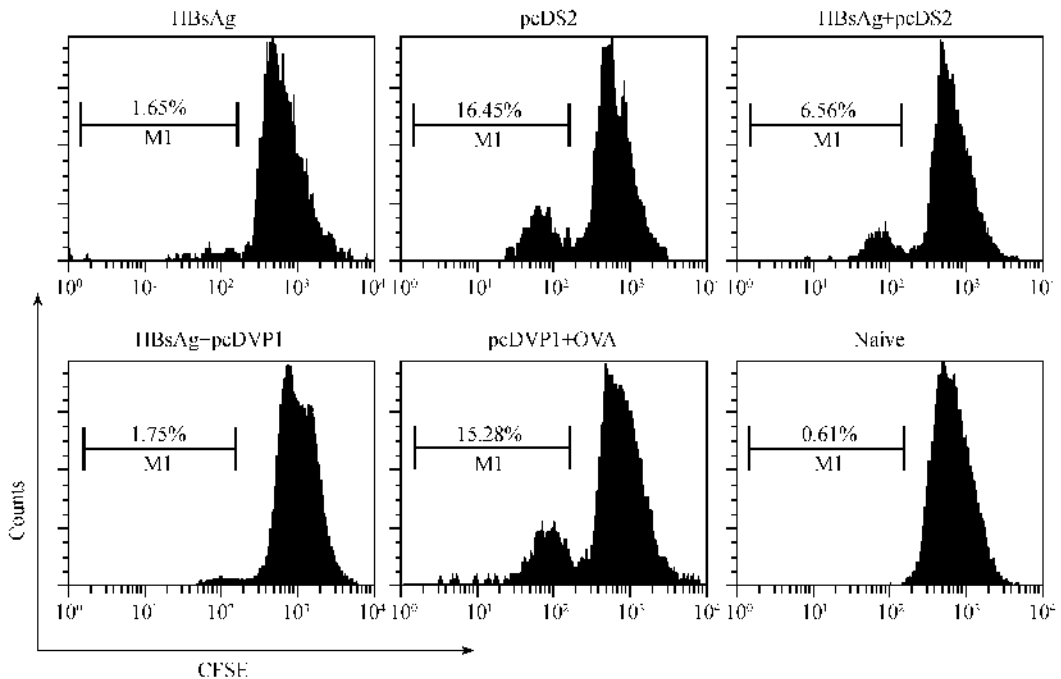
**图 2 MTT 法检测 T 淋巴细胞增殖反应**

Fig.2 The T cell proliferation reaction detected by MTT methods. \* mean  $P < 0.05$  pcDS2 + HBsAg groups vs pcDS2 groups.

HBsAg 组、HBsAg + pcVP1 组、pcDS2 + OVA 组和 Naive (空白) 组 T 细胞增殖率分别为 1.65%、16.45%、6.56%、1.75%、15.28% 和 0.61% (图 3)。

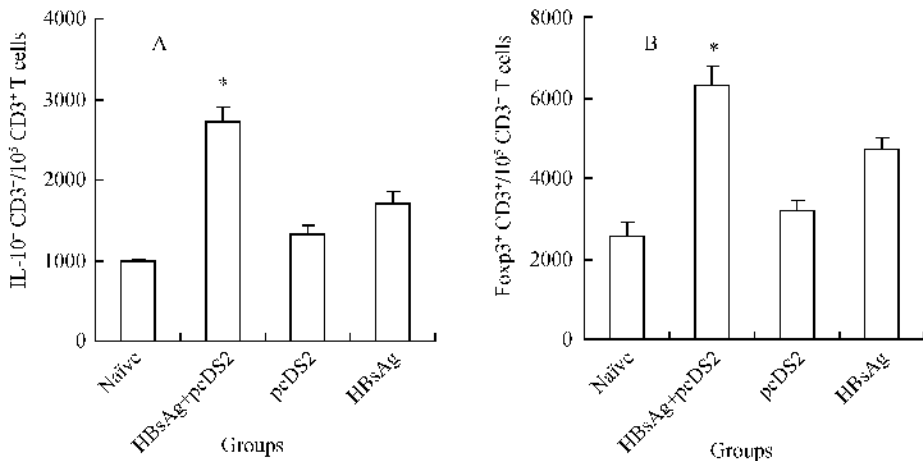
**2.4 细胞因子表达检测结果**

在最后一次免疫后 2 周, 小鼠 T 细胞经 HBsAg 刺激后, 与单独免疫 HBsAg 组和 pcDS2 组相比, 联合免疫组 pcDS2 + HBsAg 能够显著上调  $CD3^+$  T 淋巴细胞 IL-10 的表达 ( $P < 0.05$ ) (图 4-A), 同时联合免疫组也显著增强  $CD3^+$  T 淋巴细胞 Foxp3 的表达 ( $P < 0.05$ ) (图 4-B)。



**图 3 流式细胞仪检测 T 细胞增殖反应**

Fig.3 Detection of T cell proliferation reaction by flow cytometry.



4 流式细胞仪检测 CD3<sup>+</sup> T 淋巴细胞细胞因子表达水平

Fig.4 The expression of cytokines in CD3<sup>+</sup> T cell examined by flow cytometry. A: Amount of IL-10<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> cells in 10<sup>5</sup> CD3<sup>+</sup> T cells; B: Amount of Foxp3<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> cells in 10<sup>5</sup> CD3<sup>+</sup> T cells. \* mean  $P < 0.05$  pcDS2 + HBsAg group vs other groups.

### 3 讨论

较高的抗体水平对急性乙型肝炎和爆发性乙型肝炎有很好的治疗作用,能有效的清除病毒感染。Hiroshi 等<sup>[1]</sup>报道免疫 HBV 疫苗和用阳性血清能有效地治疗急性乙型肝炎,能够使发病率从 1.2% 降低到 0.1%。本研究将 HBV DNA 疫苗和 HBsAg 联合免疫 BALB/c 小鼠,结果表明联合免疫组能够诱导产生较高的抗体效价,且比仅免疫 HBV DNA 疫苗组或 HBsAg 组高,提示这种联合免疫方式可能清除急性乙型肝炎和爆发性乙型肝炎感染的病毒。

急性乙型肝炎和爆发性乙型肝炎引起的肝细胞损伤等病理变化,是由于机体产生较高的细胞免疫反应所致,故通常用免疫抑制剂抑制过强的细胞免疫反应,缓解临床症状;但缺点是停药后容易复,具有很强的依赖性<sup>[2]</sup>。本研究首先用 MTT 法体外检测 T 细胞增殖反应,结果发现联合免疫组能够诱导产生抑制 T 细胞增殖反应;为了进一步证明这种抑制反应是否具有抗原特异性,我们增加了 pcDS2 + OVA 和 HBsAg + pcDVPI 两组对照,并选用流式细胞的方法进行检测,增加实验的可靠性,结果证实 pcDS2 加上无关蛋白 OVA 没有抑制增殖反应,而 HBsAg 加无关抗原的质粒 pcDVPI 没有产生增殖反应,由于 pcDVPI 表达口蹄疫抗原 VP1 所致;表明 HBV DNA 疫苗和 HBsAg 联合免疫是抗原特异性的,且可能用于缓解急性乙型肝炎和爆发性乙型肝炎所引起的肝细胞损伤等副作用。

IL-10 是一种重要的抑制 Th1 型免疫反应的细胞因子,可通过活化的人类 T 细胞经克隆诱导产生调节性 T 细胞 (Treg);当抗原与 CD2 共刺激可通过

IL-10 非依赖途径诱导产生抗原特异性 Treg1,并产生大量 IL-10,具有强烈的抑制 Th1 型免疫反应的调节功能<sup>[1]</sup>。大量研究证明 Foxp3 是 Treg 细胞发育的一个重要开关,其 mRNA 编码蛋白 Scurfy 仅特异性表达于 Treg 细胞中,而其它细胞亚群均极少表达,且表达 Foxp3 的 T 细胞均具有抑制 Th1 免疫作用<sup>[2]</sup>。本研究发现当 HBV DNA 疫苗和 HBsAg 联合免疫时,T 细胞表达 IL-10 和 Foxp3 的量显著增加,说明联合免疫诱导产生抗原特异性抑制 T 细胞增殖反应可能是通过上调 IL-10 和 Foxp3 水平达到的。但 HBV DNA 疫苗和 HBsAg 联合免疫诱导的抑制反应是否与调节性 T 细胞有关;及与诱导产生哪一亚群的调节性 T 细胞有关;是否最终能够有效治疗急性乙型肝炎和爆发性乙型肝炎,都还需通过实验进一步证明。

### 参考文献

- [1] Hasegawa K, Huang J, Rogers SA, et al. Enhanced replication of a hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. *Journal of Virology*, 1994, 68 (8):1651 - 1659.
- [2] Whalley SA, Murray JM, Brown D, et al. Kinetics of acute hepatitis B virus infection in humans. *Journal of Experimental Medicine*, 2001, 93 (7):847 - 854.
- [3] Jin H, Kang Y, Zheng G, et al. Induction of active immune suppression by co-immunization with DNA- and protein-based vaccines. *Virology*, 2005, 337 (1): 183 - 191.
- [4] Kang Y, Jin H, Zheng G, et al. Co-inoculation of DNA and protein vaccines induces antigen-specific T cell suppression. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 2007, 353 (4):1034 - 1039.

- [5] Wang J, Su B, Ding Z, et al. Cimetidine enhances immune response of HBV DNA vaccination via impairment of the regulatory function of regulatory T cells. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 2008, 372 (3): 491 – 496.
- [6] Xiao C, Jin H, Hu Y, et al. Enhanced protective efficacy and reduced viral load of foot-and-mouth disease DNA vaccine with co-stimulatory molecules as the molecular adjuvants. *Antiviral Research*, 2007, 76 (1): 11 – 20.
- [7] Li X, Jin H, Wu Z, et al. A continuous process to extract plasmid DNA based on alkaline lysis. *Nature Protocol*, 2008, 3 (2): 176 – 180.
- [8] Li J, Jin H, Zhang F, et al. Treatment of autoimmune ovarian disease by co-administration with mouse zona pellucida protein 3 and DNA vaccine through induction of adaptive regulatory T cells. *Journal of Gene Medicine*, 2008, 10 (7): 810 – 820.
- [9] Ohara H, Ebisawa I, Naruto H. Prophylaxis of acute viral Hepatitis by immune serum globulin, Hepatitis B vaccine, and health education: a sixteen year study of Japan overseas cooperation volunteers. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*, 1997, 56 (1): 76 – 79.
- [10] Manegold C, Hannoun C, Wywiol A, et al. Reactivation of hepatitis B virus replication accompanied by acute hepatitis in patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Clinical Infectious Disease*, 2001, 32 (1): 144 – 148.
- [11] Zhang X, Koldzic DN, Izikson L, et al. IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *International Immunology*, 2004, 16 (2): 249 – 256.
- [12] Nesburn AB, Bettahi I, Dasgupta G, et al. Functional Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> (bright) “natural” regulatory T cells are abundant in rabbit conjunctiva and suppress virus-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> effector T cells during ocular herpes infection. *Journal of Virology*, 2007, 81 (4): 7647 – 7661.

## Suppression of the antigen-specific T cell immune response by co-immunization with the HBV DNA vaccine and recombinant HBsAg

Xiaogang Du<sup>1</sup>, Junpeng Wang<sup>2</sup>, Youmin Kang<sup>2</sup>, Wang Xiao<sup>2</sup>, Gan Zhao<sup>2</sup>, Bin Wang<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>(Applied Biophysics and Immune Engineering Laboratory, College of Life and Physical Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

<sup>2</sup>State Key Laboratory for Agro-Biotechnology, Department of Microbiology and Immunology, College of Biological Science, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract:** **[Objective]** To explore a new therapeutic strategy against acute hepatitis B and fulminant hepatitis B, we studied effect of co-immunization with HBV DNA and HBsAg on the T cell proliferation reaction. **[Methods]** We immunized the BALB/c mice with HBV DNA vaccine (pcDS2) plus HBsAg by intramuscular injection. The immunization was performed on week 0, 2 and 4. The anti-HBs (IgG) antibody titer, T lymphocyte proliferation reaction, and the expression of IL-10 and Foxp3 in CD3<sup>+</sup> T cell were detected on week 6. **[Results]** The anti-HBs IgG titer induced by pcDS2 plus HBsAg group was higher than that induced by pcDS2, or HBsAg alone. Compared to mice immunized with pcDS2, or HBsAg alone, the stimulated index (SI) of T cell proliferation induced by the pcDS2 plus HBsAg group tested by MTT methods decreased. Besides, the immune suppression of T cell proliferation response induced by co-immunization group was further confirmed by flow cytometry. Finally, the expression of IL-10 and Foxp3 in CD3<sup>+</sup> T cell was up-regulated in the co-immunization group significantly. **[Conclusion]** The co-immunization of HBV DNA vaccine and HBsAg can induce the humoral immune response, but cannot induce antigen specific T cell proliferation reaction. Besides, the immune suppression induced by co-immunization may be correlated with the expression of IL-10 and Foxp3.

**Keywords:** immune suppression; T cell proliferation; HBsAg; DNA vaccine

(本文责编: 张晓丽, 谷志静)