

• 基础论著 •

丙型肝炎病毒包膜 E2 蛋白 DNA 疫苗诱导小鼠产生中和抗体研究

尹迪 严石 丁惠 华显 童一民 王永智 刘媛 徐凤花 赵平 戚中田

【摘要】 目的 探讨 HCV 包膜 E2 蛋白 DNA 疫苗诱导小鼠产生中和抗体的可行性。**方法** 分别构建 HCV E2 蛋白全长表达质粒 pcDNA3.1-1a746、截除疏水性羧基末端的表达质粒 pcDNA3.1-1a661 以及同时截除疏水性羧基末端和高变区 1(HVR1)的表达质粒 pcDNA3.1-1a661 Δ , 转染 293T 细胞, 以 Western blot 和 ELISA 法检测细胞内和培养上清中的 HCV E2 蛋白, 将 3 种表达质粒以及空载体分别肌注免疫 BALB/c 小鼠, 检测小鼠血清的 E2 及 HVR1 抗体, 以 HCV 假病毒模型分析小鼠血清的中和活性。**结果** 3 种 E2 表达质粒均能有效表达 HCV E2 蛋白, 其中 pcDNA3.1-1a746 质粒的表达产物不能分泌, 而 pcDNA3.1-1a661 和 pcDNA3.1-1a661 Δ 均能分泌表达 E2 蛋白。分泌表达 E2 蛋白可显著增强小鼠的抗体应答, pcDNA3.1-1a661 免疫血清对 HCV 假病毒颗粒(HCVpp)的中和活性明显高于 pcDNA3.1-1a661 Δ 免疫血清。pcDNA3.1-1a661 免疫血清中的 HVR1 抗体量仅占总 E2 抗体的一小部分, 却是中和抗体的重要成分。**结论** 表达 E2 蛋白的 DNA 疫苗能有效诱导 HCV 中和抗体的产生, HVR1 不仅是重要的中和抗体表位, 而且能增强 E2 蛋白其他抗原表位的抗体应答。

【关键词】 丙型肝炎病毒; 包膜 E2 蛋白; DNA 疫苗; 高变区 1; 中和抗体

Study on the induction of mouse neutralization antibodies to HCVpp by HCV E2 DNA vaccines YIN Di, YAN Shi, DING Hui, HUA Xian, TONG Yi-min, WANG Yong-zhi, LIU Yuan, XU Feng-hua, ZHAO Ping, QI Zhong-tian. Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China

Corresponding author: XU Feng-hua, Email: xfh00001@126.com; QI Zhong-tian, Email: qizt@smmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the feasibility of induction of neutralization antibodies against HCV infection by HCV envelope 2 protein DNA vaccines. **Methods** Three expression plasmids of HCV envelope 2 protein, plasmid pcDNA3.1-1a746 encoding full length of E2, plasmid pcDNA3.1-1a661 encoding hydrophobic carboxyl

基金项目: 上海市基础重点项目(06JC14084); 国家自然科学基金(30671921, 30770094); 国家“863”基金(2006AA02Z401)

作者单位: 150030 哈尔滨市, 东北农业大学(尹迪、严石、徐凤花); 第二军医大学微生物学教研室(尹迪、严石、丁惠、华显、刘媛、王永智、童一民、赵平、戚中田)

通讯作者: 徐凤花 Email: xfh00001@126.com; 戚中田 Email: qizt@smmu.edu.cn

terminal truncated E2 and pcDNA3.1-1a661 Δ encoding E2 with deletion of hypervariable region 1 (HVR1) and carboxyl terminal, were constructed, respectively. The 293T cells were transfected with these plasmids, respectively, and the excretion of E2 protein were analyzed by Western blot and ELISA. Then the plasmids were used to immunize BALB/c mouse intramuscularly. The sera antibodies against E2 and HVR1 were detected by ELISA and the neutralization activity of the antibodies were assayed with HCV pseudotype particle (HCVpp). **Results** All three plasmids could express HCV E2 protein, the expression product of pcDNA3.1-1a746 could not secrete, while that of pcDNA3.1-1a661 and pcDNA3.1-1a661 Δ could secrete E2 protein into culture medium. The secretion of HCV E2 protein enhanced antibody response elicited by DNA vaccines in mice significantly. Sera from pcDNA3.1-1a661 immunized mice showed stronger neutralization activity than that from pcDNA3.1-1a661 Δ immunized mice. For sera from pcDNA3.1-1a661 immunized mice, the anti-HVR1 antibodies account trivially in total anti-E2 antibodies in quantity, while play a major role in neutralization infectivity of HCVpp. **Conclusions** DNA vaccines that express and secrete HCV E2 protein could induce neutralization antibodies against HCVpp infection. HVR1 not only acts as a region containing neutralization antibodies epitopes, but also enhance antibody response of other epitopes presented in HCV E2 protein.

【Key words】 Hepatitis C virus; Envelope 2 protein; DNA vaccine; Hypervariable region 1; Neutralization antibody

丙型肝炎病毒(HCV)包膜 E2 蛋白是介导 HCV 感染及诱导产生中和抗体的主要成分,是重要的丙肝疫苗候选靶抗原。E2 蛋白氨基末端由 27 个氨基酸残基组成的高变区 1(hypervariable region 1, HVR1)是 HCV 蛋白中变异频率最高的区域,也是公认的 HCV 中和抗体表位所在区域^[1]。HVR1 的高度变异曾被认为是遏制丙肝疫苗发展的瓶颈问题。然而,近年来以感染性假 HCV 颗粒(HCV pseudotype particle, HCVpp)以及细胞培养产生的 HCV(HCVcc)为模型进行的病毒中和实验发现,HVR1 并不是唯一的中和抗体表位所在区域,在 HCV 包膜 E2 蛋白中还存在保守的空间构象和线性中和抗体表位^[2,4]。

本研究分别构建了羧基端截短的含有 HVR1 和缺失 HVR1 的 E2 蛋白以及全长 E2 蛋白的真核表达质粒,以之免疫小鼠,分析 HVR1 抗体与总 E2 抗体在数量与功能(病毒中和活性)方面的关系。

材料和方法

一、主要材料

含 H77 株 C/E1/E2 cDNA 序列的质粒 pGEM-CE1E2 为本实验室保存; HS prime start DNA 聚合酶及 T 载体 pMD18-T 为 TaKaRa 产品;质粒载体 pcDNA3.1

二、3 种 E2 表达质粒的构建

2. 截除 HVR1 且羧基端截短的 E2 表达质粒 pcDNA3.1-1a661Δ 的构建: 以质粒 pGEM-CE1E2 为模板, 分别扩增 E2 蛋白的信号肽 (即 364 ~ 383 位氨基酸编码序列) 和第 411 ~ 661 位氨基酸残基编码序列, 引物分别为 1a-364、1a-delR (5'-GGTGTGATCAGTTGGATCGCGTCGACGCCGCAA-3') 和 1a-delF (5'-TTGCCGCGCTCGACGCGATCCAACCTGATCAACACC-3')、1a-661。两种 PCR 产物再以引物 1a-364/1a-661 进行重叠延伸 PCR, 产物与 T 载体连接并测序, 插入 pcDNA3.1 的 *Eco* R I 和 *Xba* I 位点间构成质粒 pcDNA3.1-1a661Δ, 以下简称为 pcDNA3.1-1a661Δ。

三、质粒转染 HEK 293T 细胞及表达产物的鉴定

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn

洗板2次,再加 $6 \times \text{His}$ 单克隆抗体(1:500稀释)或E2多克隆抗体(1:1000稀释), 37°C 孵育40 min,洗板5次,加酶标二抗,HRP-抗小鼠IgG(1:2000稀释)或HRP-抗羊IgG(1:1000稀释), 37°C 孵育40 min,洗板5次,TMB显色,测 A_{450} 和 A_{630} 。

四、小鼠的免疫

用QIAGEN质粒纯化试剂(Mega)抽提质粒pcDNA3.1-1a661、pcDNA3.1-1a661 Δ 和pcDNA3.1-1a746以及空载体pcDNA3.1,溶解于PBS,浓度为1 g/L。分别免疫BALB/c小鼠,每侧胫骨前肌内注射100 μl ,1次/w,共免疫3次。每次免疫前两天用毛细管从小鼠眼眶取血,离心,血清用于ELISA检测抗体。

五、ELISA检测小鼠免疫血清中的E2抗体与HVR1抗体

以GNA包被酶标板, 4°C 过夜(1 $\mu\text{g}/\text{孔}$),次日 37°C 封闭2 h,洗板1次,每孔加质粒pcDNA3.1-1a746转染的HEK 293T细胞裂解液100 μl ,室温2 h,洗板2次,每孔加系列倍比稀释的小鼠血清100 μl , 37°C 孵育40 min,洗板5次,加HRP-抗小鼠IgG(1:2000稀释), 37°C 孵育40 min,洗板5次,TMB显色,测 A_{450} 和 A_{630} 。将TRX-HVR1包被酶标板, 4°C 过夜(1 $\mu\text{g}/\text{孔}$),次日 37°C 封闭2 h,洗板2次,每孔加小鼠稀释血清100 μl , 37°C 孵育40 min,洗板5次,加HRP-抗小鼠IgG(1:2000稀释), 37°C 孵育40 min,洗板5次,TMB显色,测 A_{450} 和 A_{630} 。

六、HCVpp制备及中和实验

将HEK 293T细胞传代接种于24孔板内,次日以脂质体2 μl 以及质粒pcDNA-E1E2 0.1 μg 、pCMV-gag-pol 0.2 μg 、pCMV-GFP 0.2 μg 共转染。12 h后吸除细胞培养上清,加入500 μl 含10%新生牛血清、青霉素和链霉素的DMEM培养液,置于孵箱内培养24~48 h,然后收集细胞培养上清,高速离心去除残余细胞^[5]。

含HCVpp的培养上清以12 000 r/min离心5 min,取上清用于病毒中和试验。DMEM培养液(预先加入polybrane,终浓度4 mg/L)130 μl 加入1.5 ml离心管,再加入DNA免疫小鼠血清或对照载体免疫小鼠20 μl ,HCVpp上清50 μl ,混匀,置于 37°C 孵箱1 h。以从1:20开始倍比稀释的TRX-CD81大胞外环免疫的小鼠血清作为阳性对照。其间吸除提前接种于48孔板的Huh7.5细胞(普通Huh7.5细胞或以CD81慢病毒感染的Huh7.5细胞),将混合液加入48孔板内,过夜培养后换液,4~5 d后胰蛋白酶消化细胞,以流式细胞计数绿色荧光阳性细胞,计算中和率(未加血清孔的阳性率-小鼠血清处理孔的阳性率)/未加小鼠血清处理孔的阳性率。

结 果

一、HCV包膜E2蛋白表达质粒的结构

以质粒pcDNA3.1(+)为载体,构建了H77株E2蛋白的3种表达质粒,结构如图1所示。

二、E2表达质粒表达产物的分析

分别用 E2 多克隆抗体以及构象依赖性 1a 型特异的 E2 单克隆抗体 H53(非变性蛋白电泳)检测质粒转染的细胞裂解液中的 E2 蛋白,结果如图 2、3 所示,所构建的 3 种表达质粒均能有效表达 E2 蛋白,同时也表明 HVR1 对 E2 的表达以及空间构象无明显影响。对质粒转染的 293T 细胞培养上清用 E2 多克隆抗体、6 × His 及 E2 构象依赖单克隆抗体 H53 进行 ELISA 分析表明,pcDNA3.1-1a661 及 pcDNA3.1-1a661Δ 表达产物能有效分泌,且分泌表达水平相似,而 pcDNA3.1-1a746 主要为胞内表达(图 4)

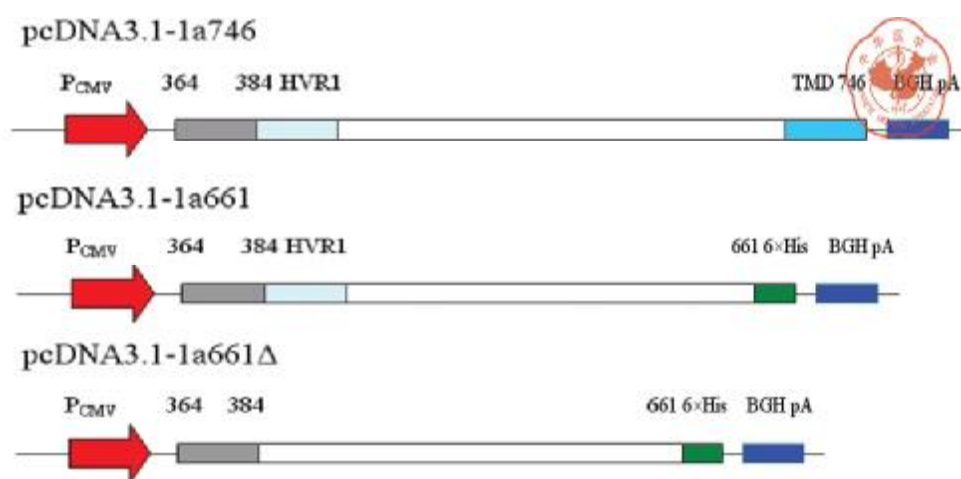


图 1 HCV 包膜 E2 蛋白表达质粒的结构

P_{CMV}: 巨细胞病毒启动子;BGH pA: 牛生长激素 poly A 信号

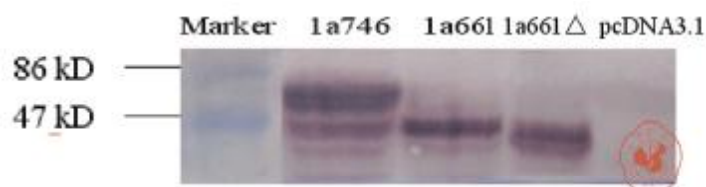


图 2 用 E2 多克隆抗体检测 E2 蛋白

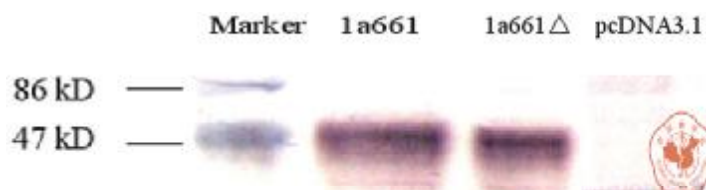


图 3 用构象依赖性 E2 单抗检测 E2 蛋白

三、小鼠 E2 抗体及 HVR1 抗体的检测

1. 小鼠 E2 抗体的检测: 用全长 1a746 转染的 HEK 293T 细胞裂解液检测每组 6 只小鼠血清中的 E2 抗体, 血清 1:100 稀释时 A_{450} 和 A_{630} 高于空载体对照组平均值的 2 倍为抗体阳性。第 1 次免疫后, 3 个实验组小鼠血清均为阴性。第 2 次免疫后, pcDNA3.1-1a661 Δ 组有 2 只小鼠抗体阳性, 而 pcDNA3.1-1a661 组有 5 只小鼠抗体阳性, 1a746 组仍均为阴性(图 5)。第 3 次免疫后, pcDNA3.1-1a661 Δ 组有 3 只小鼠抗体阳性, pcDNA3.1-1a661 组 6 只小鼠均抗体阳性, 1a746 组有一只小鼠抗体阳性(图 6)。

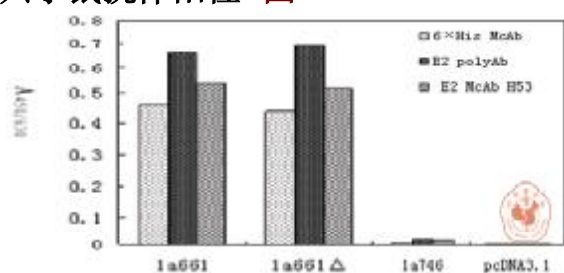


图 4 ELISA 检测 E2 质粒转染 293T 细胞培养上清中的 E2 蛋白

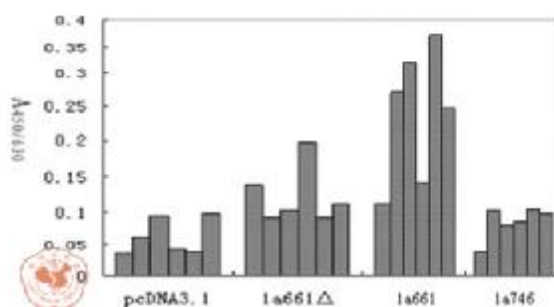


图 5 第二次免疫后 E2 IgG 抗体的检测

2. 小鼠抗 HVR1 抗体的检测: 以重组 TRX-HVR1 重组蛋白包被酶标板, 检测小鼠血清中的 HVR1 抗体, 以 1:200 稀释时 A_{450} 和 A_{630} 高于空载体对照组平均值的 2 倍为抗体阳性。第 1 次免疫后, pcDNA3.1-1a661 组 4 只小鼠抗体阳性, 1a746 组均阴性。第 2 次免疫后, pcDNA3.1-1a661 组 6 只小鼠均抗体阳性, 1a746 组抗体均阴性(图 7)。第 3 次免疫后, pcDNA3.1-1a661 组抗体水平显著升高, 1a746 组有 1 只小鼠抗体阳性(图 8)。由于用于免疫的 E2 羧基末端融合有 6 个组氨酸, 故小鼠有可能产生针对 6 个组氨酸的抗体, 而检测 E2 抗体以及 HVR1 抗体使用的抗原包括融合有 6 个组氨酸的 1a661、1a661 Δ 以及 TRX-HVR1, 3 种蛋白中均含有 6 个组氨酸肽段, 因此可能影响检测结果的特异性。用 TRX-CD81 与 TRX-HVR1 平行包被酶标板进行检测, 所有小鼠血清的检测结果均低于 0.15, 表明小鼠血清中未产生明显的 6 × His 的抗体(结果未显示)。

四、HCVpp 中和实验

用 HCVpp 分析第三次免疫后的小鼠血清的中和作用(1a746 组因仅一只小鼠抗体阳性, 因而未予分析), 同时用从 1:20 开始倍比稀释的 TRX-CD81LEL 免疫小鼠血清作为阳性对照。从结果可见: TRX-CD81LEL 免疫小鼠血清能有效中和 HCVpp 的感染性, 1a661 以及 1a661 Δ 免疫血清对 HCVpp 均具有一定的中和作用(图 9)。从图 6、8、9 可见, 1a661 免疫小鼠血清的中和作用与血清中的总 E2 抗体水平无明显相关性, 而与 HVR1 的抗体水平呈现一定的正相关(图 9 中 CD81 多克隆抗体组为其从 1:20 开始连续倍比稀释共 6 个稀释度的中和百分率)。1a661 Δ 免疫血清的中和作用基本与总 E2 抗体水平相一致, 但 E2 抗体水平相似

的 1a661 与 1a661Δ 免疫血清中,前者的中和作用明显强于后者。

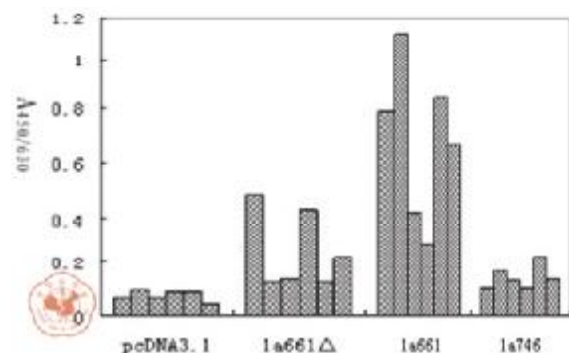


图6 第三次免疫后 E2 IgG 抗体的检测

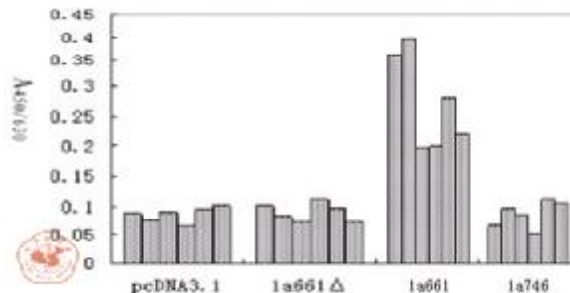


图7 第二次免疫后检测 HVR1 IgG 抗体

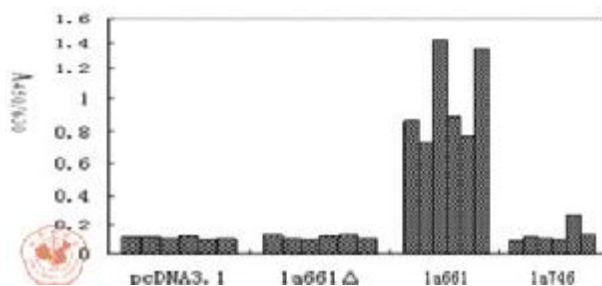


图8 第三次免疫后检测 HVR1 IgG

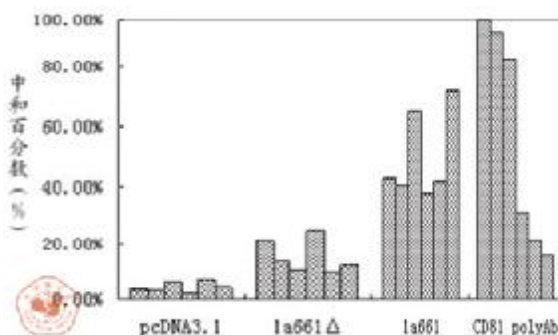


图9 HCV E2 DNA 免疫小鼠血清对 HCVpp 的中和作用

讨 论

本研究分别构建了 H77 株的全长和截短共 3 种形式的 E2 表达质粒免疫小鼠,主要目的在于分析 HVR1 抗体与针对 HVR1 以外表位的抗体在总中和抗体中的比重关系。对质粒转染的 293T 细胞的培养上清和细胞裂解液进行的 Western blot 和 ELISA 分析表明,3 种质粒均能有效表达 HCV E2 蛋白,全长 E2 蛋白表达质粒的表达产物主要位于胞内,而截除羧基末端的疏水性跨膜区(TMD)的表达质粒,其产物则能分泌至培养上清,是否存在 HVR1 对 E2 的表达分泌及构象无明显影响。

分别将 3 种 E2 表达质粒肌内注射接种小鼠,检测小鼠血清中的 E2 及 HVR1 抗体,结果表明分泌表达 E2 蛋白能明显提高 DNA 疫苗诱导的抗体应答。全长 E2 表达质粒虽然在细胞内的表达水平与截短的 E2 表达质粒无明显差异,但全程检测仅有 1 只小鼠的 E2 抗体与 HVR1 抗体阳性胞内表达靶抗原的 DNA 疫苗诱导抗体的效果低于分泌或膜表面表达的 DNA 疫苗,这与以前的报道相似^[6]。全长 E2 绝大部分被 TMD 固定于内质网内,只有极少部分能通过高尔基体的分泌途径锚定于细胞表面,从而不能使 B 细胞受到足够的刺激。有报道,将 E2 的 TMD 置换为可以使之在细胞表面表达的跨膜区,能显著增强其 DNA 疫苗诱导的抗体

反应^[7]。

从结果还可以看出, HVR1 能明显增强小鼠的抗体应答。比较 pcDNA3. 1-1a661 组每只小鼠血清的总 E2 抗体和 HVR1 抗体的检测结果, 小鼠血清中的 E2 抗体水平与 HVR1 抗体水平并不平行, E2 抗体含量高的血清中 HVR1 抗体水平可能较低, 而 HVR1 抗体水平较高者的 E2 抗体水平可能较低。另外, 用 1a 661 检测 E2 抗体的结果与用 1a661Δ 的检测结果相似(结果未显示)。这些均提示 HVR1 抗体在总 E2 抗体中所占比重有限。

用 HCVpp 为模型, 分析 pcDNA3. 1-1a661 与 pcDNA3. 1-1a661Δ 免疫小鼠血清的中和作用, pcDNA3. 1-1a661 免疫血清的中和作用明显强于 pcDNA3. 1-1a661Δ 组。在 pcDNA3. 1-1a661 免疫组中, 血清中和作用与 HVR1 抗体水平呈现正相关, 而与总 E2 抗体无明显相关。综合两组小鼠免疫血清中和实验结果, 可以认为在 HVR1 以外存在中和抗体表位, 但就截短分泌表达 E2 的 DNA 疫苗而言, 其诱导的抗体中 HVR1 抗体是主要的中和抗体, 而 HVR1 以外表位抗体的中和作用则较弱。HCV 感染早期, HVR1 抗体的产生是病毒血症水平降低和病毒清除的前兆, 而体外试验则更能直接证明 HVR1 抗体的有效中和作用^[8], 因此, 不能轻估 HVR1 抗体的保护作用, 这与本研究的结果高度一致。

比较 pcDNA3. 1-1a661 与 pcDNA3. 1-1 a 661Δ 免疫小鼠的抗体反应还可发现, 两组小鼠血清中的 E2 抗体水平有明显差异, 而抗体水平差异并不是 pcDNA3. 1-1a661 免疫组小鼠血清中的 HVR1 抗体造成的, 这表明 HVR1 的存在不仅能使小鼠产生 HVR1 抗体, 而且能明显增强小鼠针对 E2 其他表位的免疫应答。通过体外细胞转染和对两种质粒表达产物的分析可初步认为 HVR1 对 E2 的表达、分泌以及空间构象无明显影响, 那么如何解释 HVR1 增强 E2 免疫原性这一现象? 有报道, HVR1 中存在辅助性表位, 尤其在干扰素治疗持续应答的感染者, 可检测到高频率的 HVR1 特异性 CD4⁺ T 细胞应答^[9,10]。然而, 目前还没有报道, HVR1 在小鼠是否仍具有类似的作用, 本研究尚需进一步深入探讨。根据我们的初步结果, HVR1 在疫苗中的作用可能不仅仅在于其作为中和抗体本身。

总之, 本研究发现分泌表达 E2 的 DNA 疫苗能有效诱导 HCVpp 中和抗体的产生, HVR1 抗体在总中和抗体中占重要比重, 与 HVR1 抗体相比, 虽然针对 HVR1 以外表位的抗体在量上占绝对优势, 但中和活性明显不及 HVR1 抗体。此外, HVR1 的作用不仅仅在于作为中和抗体表位, 还可能作为重要的辅助性 T 细胞表位, 能明显增强 E2 蛋白的免疫原性。这些信息对于 HCV 疫苗的研发有较为重要的理论意义。

参 考 文 献

- 1 Weiner AJ, Brauer MJ, Rosenblatt J, et al. Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology*, 1991, 180: 842-848.
- 2 Logvinoff C, Major ME, Oldach D, et al. Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection.

- Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 10149-10154.
- 3 Burioni R, Mancini N, Carletti S, et al. Cross-reactive pseudovirus-neutralizing anti-envelope antibodies coexist with antibodies devoid of such activity in persistent hepatitis C virus infection. *Virology*, 2004, 327: 242-248.
 - 4 Meunier JC, Engle RE, Faulk K, et al. Evidence for cross-genotype neutralization of hepatitis C virus pseudo-particles and enhancement of infectivity by apolipoprotein C1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 4560-4565.
 - 5 Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med*, 2003, 197: 633-642.
 - 6 Heile JM, Fong YL, Rosa D, et al. Evaluation of hepatitis C virus glycoprotein E2 for vaccine design: an endoplasmic reticulum-retained recombinant protein is superior to secreted recombinant protein and DNA-based vaccine candidates. *J Virol*, 2000, 74: 6885-6892.
 - 7 Frons X, Allander T, Rohwer NP, et al. Characterization of modified hepatitis C virus E2 proteins expressed on the cell surface. *Virology*, 2000, 274: 75-85.
 - 8 Pestka JM, Zeisel MB, Blaser E, et al. Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 6025-6030.
 - 9 Frasca L, Scotta C, Del Porto P, et al. Antibody-selected mimics of hepatitis C virus hypervariable region 1 activate both primary and memory Th lymphocytes. *Hepatology*, 2003, 38: 653-663.
 - 10 Del Porto P, Puntoriero G, Scotta C, et al. High prevalence of hypervariable region 1-specific and -cross-reactive CD4(+) T cells in HCV-infected individuals responsive to IFN-alpha treatment. *Virology*, 2000, 269: 313-324.

(收稿日期 2007-11-08)

(本文编辑:温少芳)

尹迪, 严石, 丁惠, 等. 丙型肝炎病毒包膜 E2 蛋白 DNA 疫苗诱导小鼠产生中和抗体研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2008, 2(1): 24-32.