

超抗原 SEA 增强小鼠对 HBV DNA 疫苗的免疫反应

Enhancement of Immune Responses to Hepatitis B DNA Vaccine by Superantigen SEA in Mice

靳彦文¹, 李 平¹, 胥全彬¹, 刘 萱¹, 黄 维¹, 王云龙², 曹 诚¹, 马清钧^{1*}

JIN Yan-Wen¹, LI Ping¹, XU Quan-Bin¹, LIU Xuan¹, HUANG Wei¹, WANG Yun-Long², CAO Cheng¹
and MA Qing-Jun^{1*}

1. 军事医学科学院 生物工程研究所 北京 100850

2. 河南生物工程技术研究中心 郑州 450001

1. Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100850, China

2. Henan Biotechnology Center, Zhengzhou 450001, China

摘 要 观察超抗原 SEA(D227A)的真核表达载体(p_mSEA),对 HBV DNA 疫苗诱导 Balb/c 小鼠(H-2d)免疫应答的调节作用。肌肉注射空载体 pcDNA3、HBV DNA 疫苗加 p_mSEA 佐剂(pHBVS2S + p_mSEA)或不加佐剂(pHBVS2S);ELISA 法测定血清抗 HBs;ELISPOT 检测分泌 IFN- γ 的脾淋巴细胞, ^51Cr 释放法检测小鼠脾细胞 CTL 活性。HBV DNA 佐剂组免疫小鼠抗 HBsAg 抗体滴度明显高于不加佐剂组,其 IgG1/IgG2a 的比例不同于多肽免疫组,二者分别为 0.282 与 10。HBV DNA 佐剂组均能增强 IgG1 和 IgG2a 的产生,是不加佐剂组的 1.36、1.73 倍。佐剂组小鼠脾淋巴细胞 IFN- γ 的分泌量是不加佐剂组 2~3 倍。CTL 细胞杀伤活性(E:T=100)佐剂组与不加佐剂组分别为 $69.77\% \pm 7.5\%$ 、 $42.81\% \pm 7.7\%$,差异显著($P < 0.05$)。HBV DNA 疫苗具有较强的免疫原性,能够诱导机体产生特异性的抗体及 CTL 反应,p_mSEA 佐剂能够提高小鼠对 DNA 疫苗的免疫应答,有望成为 DNA 疫苗的免疫佐剂。

关键词 DNA 疫苗,乙型肝炎表面抗原,SEA,小鼠,佐剂

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)05-0681-05

Abstract To investigate the adjuvant effect of plasmid DNA encoding superantigen SEA(D227A)(p_mSEA) on immune responses induced by HBV DNA vaccine containing HBV preS2 and S antigen in BALB/c(H-2^d). BALB/c mice were immunized intramuscular injection with HBV DNA vaccine(pHBVS2S) mixed with or without p_mSEA plasmid. Antibodies against HBV PreS2 and S antigen in the sera were accessed by Anti-HBs ELISA, and the HBsAg specific cytotoxic T lymphocytes(CTLs) activity was determined by ⁵¹Chromium Release Assay. The HBs peptide-specific IFN- γ secreting T cells were detected by ELISPOT. Anti-HBs antibody titers and CTLs activity in mice immunized with p_mSEA + pHBVS2S group were significant higher($P < 0.05$) than pHBVS2S DNA vaccine group. The ratio of IgG1/IgG2a(0.282) was apparently different from the group immunized with peptide(10). Mice immunized with HBV DNA vaccine plus adjuvant produce higher titer of IgG1 and IgG2a antibodies against HBV S antigen 1.36 and 1.73 time higher than that without adjuvant respectively. HBs peptide-specific IFN- γ secreting T cells increased 2~3 times by the p_mSEA adjuvant, compared to DNA vaccine group. HBV DNA

Received: April 4, 2005; Accepted: May 13, 2005.

This work was supported by a grant from High-tech Research and Development Program of China(863 program)(No. 2004AA215230).

* Corresponding author. Tel: 86-10-66931810; E-mail: qingjunma@sohu.com

国家高技术研究与发展项目基金资助(No. 2004AA215230)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

vaccine (pHBVS2S) induces humoral and cellular immuno-responses in BALB/c mice, and the responses could be significantly boosted by the plasmid encoding mSEA. Therefore the pmSEA was a potential adjuvant for DNA vaccines.

Key words DNA vaccine, Hepatitis B surface antigen, SEA, adjuvant, mice

我国是乙型肝炎病毒(HBV)感染的高发区, HBV携带者有1亿2千万,其中慢性乙型肝炎患者约3千万,对此类患者目前尚缺乏有效的治疗方法,故常导致患者病情迁延不愈,部分患者可发展为肝硬化和肝癌,危害极大。HBV DNA疫苗是将编码外源蛋白的基因表达载体直接导入机体以激发机体产生特异性免疫应答,提高机体细胞免疫功能以清除病毒感染^[1,2]。HBV DNA疫苗在机体引起的免疫应答,能否被应用于HBV慢性感染的治疗,引起人们很大的兴趣和关注,目前研究主要在病毒抗原与佐剂的选择。我们依据超抗原促进免疫反应的机理,选择葡萄球菌肠毒素A(Staphylococcal enterotoxin A, SEA)作为HBV DNA疫苗的免疫佐剂,SEA是超抗原家族的重要成员,它不需要抗原提呈细胞(APC)处理,直接与APC膜上的MHC-II类分子抗原结合槽外侧结合,导致带有特异性V β 节段的T细胞大量活化,并释放多种细胞因子^[3],动物实验和临床研究都证实SEA有显著的抗肿瘤效应^[3,4]。但是,超抗原诱生的CTL对表达MHC-II类分子的正常细胞也有一定的杀伤作用,为了减少对正常细胞的毒副反应,将SEA的227位氨基酸残基由D变为A可明显降低其促有丝分裂作用,同时对MHC-II分子依赖的细胞毒性作用降低100倍^[5],而其TCR V β 结合的特异性没有明显改变。因此,我们选择并构建227位氨基酸突变的SEA(D227A)真核表达载体,与HBV DNA疫苗肌肉注射免疫小鼠,观察其免疫应答反应。

1 材料与方法

1.1 材料

293细胞、P815细胞、pcDNA3质粒和大肠杆菌菌株DH5 α ,均为本室保存。含金黄色葡萄球菌肠毒素A突变体基因的质粒(pET22b-pmSEA)即(SEA:D227A)由本室胥全彬博士构建,含乙肝表面抗原基因的质粒pcDNA3-HBV3由郑州大学医学院陈宗德教授馈赠。Pfu DNA聚合酶、T4 DNA连接酶及限制酶,质粒及琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒购自Promega公司。Lipofectamine为Gibco BRL公司产品。DNA maker购自大连宝生物工程公司,乙型肝炎病毒表面抗原和抗体诊断试剂盒购自华美生物工

程公司。Balb/c(H-2d)雌性小鼠,6~8周龄,购于军事医学科学院动物中心。ELISPOT Kit(U-CyTech B. V. The Netherlands),HBsAg的CTL抗原表位肽S(IPQSLDSWW TSL)由军事医学科学院基础医学研究所合成。

1.2 方法

1.2.1 HBV基因疫苗(pHBVS2S)和佐剂质粒pmSEA的构建及制备:

(1) HBV基因疫苗(pHBVS2S):以pcDNA3-HBV3为模板设计一对引物。

上游引物S1:

5'-GGAagatctCAGGCCATGCAGTGAATT-3'(Bgl II)

下游引物S2:

5'-AGCgggcccAGCCCATGAAGTTTAGGGAA-3'(Apa I)。扩增pHBVS2S基因,94℃变性30s,58℃退火30s,72℃延伸30s。循环结束后,72℃延伸5min。回收843bp大小的片段,纯化。用Bgl II和Apa I双切,再回收纯化。

(2) 佐剂质粒pmSEA的构建:以pET22b-pmSEA为模板设计一对引物,上游引物P1:5'cgcgatccagcgagaaaagcgaagaaa-3'(BamH I)。下游引物P2:5'ccggaattcttaagatgcagctcagactgt-3'(EcoR I)。94℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸30s。循环结束后,72℃延伸5min。回收约700bp大小的片段,纯化。用BamH I和EcoR I双切,再回收纯化。

(3) 带有Flag标签的载体pcDNA3用BamH I和Apa I双切或者用BamH I和EcoR I双切,回收纯化。将(1)与(2)之目的基因片段和载体片段混匀,在T4连接酶的作用下,于16℃反应20h。将连接产物转化DH5 α 感受态细胞,铺置于含氨苄青霉素(100mg/L)的LB培养基上,37℃过夜,挑选菌落进行PCR,质粒酶切与测序鉴定。

1.2.2 质粒在293细胞内瞬时表达:293细胞培养后,按 1×10^6 /mL分别接种60cm²的培养皿。分别转染pcDNA3、pmSEA、pHBVS2S质粒各5 μ g。具体操作参照Lipofectamine 2000(购于Gibco-BRL公司)的试剂说明书。10h后吸出无血清培养基,代之以完全DMEM。培养48~72h后,收获细胞,Western blotting和ELISA检测目的基因表达。

1.2.3 免疫小鼠与抗体检测:采用Promega

Maxipreps DNA purification system 大量制备质粒 ,用于小鼠免疫。Balb/c 小鼠(雌性 ,6~8 周龄)每组 8 只。分别肌肉注射免疫 200μg pcDNA3、100μg pcDNA3 + 100μg pHBVS2S、100μg pmSEA + 100μg pHBVS2S ;于 0 和 14d 各免疫 1 次。注射部位为小鼠大腿股四头肌 ,注射后在注射部位使用活体基因导入仪(宁波新芝生物科技股份有限公司)进行电击(120V/cm ,10ms/2 次) ,注射前及注射后 ,每隔 2 周从小鼠尾静脉取血。ELISA 法检测抗 HBs。

1.2.4 ELISPOT 检测小鼠分泌 IFN-γ 的脾淋巴细胞 :另外免疫 Balb/c 小鼠(雌性 ,6~8 周龄) ,每组 6 只。分别肌肉注射免疫 200μg pcDNA3、100μg pcDNA3 + 100μg pHBVS2S、100μg pmSEA + 100μg pHBVS2S ;于 0 和 14d 各免疫 1 次。在第 2 次免疫后 1 周 ,引颈处死小鼠 ,在无菌条件下取小鼠脾脏 ,制备单个脾淋巴细胞。以 2 × 10⁶ cells/0.5mL 加入 24 孔细胞培养板 ,分别给与 Con A(5μg/mL)和不同 HBsAg(剂量依次为 50μg/mL、10μg/mL、1μg/mL、0.1μg/mL)刺激 ,37℃ ,5% CO₂ 孵箱孵育 40h。然后 ,使用 ELISPOT Kit 检测小鼠分泌 IFN-γ 的脾淋巴细胞形成的斑点。免疫斑点图像分析仪计算斑点数。

1.2.5 特异性 CTLs 杀伤功能测定 :Balb/c 小鼠(雌性 ,6~8 周龄) ,每组 6 只。分别肌肉注射免疫 200μg pcDNA3、100μg pcDNA3 + 100μg pHBVS2S、100μg pmSEA + 100μg pHBVS2S ;于 0 和 21d 各免疫 1 次。在第 2 次免疫后 3 周 ,引颈处死小鼠 ,无菌状态下取出小鼠脾脏 ,制成单细胞悬液 ,用 4h⁵¹Cr 释放法测定小鼠脾淋巴细胞对多肽 S 包被的 P815 细胞的杀伤活性。效应细胞 :靶细胞(E:T)25:1、50:1 及 100:1 ,每一比例设 3 个复孔 ,取平均值比较不同处理组 CTL 的杀伤活性。特异性 CTL s 杀伤率(%)=[(实验组释放值 - 自然释放值)/(最大释放值 - 自然释放值)]。

2 结 果

2.1 重组乙肝病毒表面抗原基因(pHBVS2S) DNA 与超抗原 SEA 重组质粒(pmSEA)鉴定

成功构建的 pHBVS2S 重组质粒 DNA 由 pcDNA3 载体与含有 HBV preS2 及 S 抗原的 HBVS2S 基因组成 ,经 Kpn I 和 Apa I 酶切鉴定 ,片段大小与预期结果一致 ,HBVS2S 经序列测定与 GenBank 保存的 HBV adw 亚型的 HBVS2S 基因序列完全一致。pmSEA(D227A)同样由 pcDNA3 载体与 SEA 基因组成 ,用 EcoR I 和 BamH I 双切后片段大小与预期

一致 ,测序结果除其第 680 位碱基由 A 突变为 C (天冬氨酸突变为丙氨酸) ,其余序列与 SEA 基因序列均相一致。

2.2 pmSEA、pHBVS2S 重组质粒在 293 细胞的瞬时表达

将带有 Flag 标签的 pcDNA3 空载体、pmSEA、pHBVS2S 重组质粒转染 293 细胞 ,用抗 Flag 标签的单克隆抗体进行 Western blot 检测。结果显示(图 1)均获得了表达 ,pHBVS2S 重组质粒表达的 HBsAg 蛋白有单糖和双糖两种糖基化形式(GP33 和 GGP36) ,与文献报道相一致 ,表达的 SEA 为 23Kd 的蛋白带 ,同时应用相应的抗体进行 ELISA 分析各自质粒转染的 293 细胞裂解上清 ,显示显著的抗原阳性。

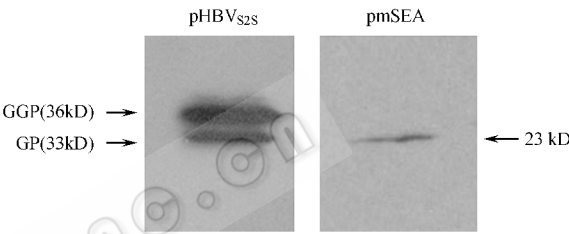


图 1 免疫印迹检测 pHBVS2S 与 pmSEA 重组质粒在 293 细胞的表达

Fig. 1 Western blotting analysis of the expression of recombinant plasmid pHBVS2S and pmSEA in 293 cells

2.3 pHBVS2S、pmSEA + pHBVS2S DNA 免疫小鼠诱导抗 HBs 的应答

pHBVS2S 重组质粒具有较强的抗原性 ,免疫小鼠后可产生特异性抗 HBs 抗体 ,6~8 周达到高峰。pmSEA + pHBVS2S 组可以增强 pHBVS2S 免疫小鼠抗 HBs 的产生 ,与 pHBVS2S DNA 免疫组相比 ,明显地提高抗 HBs 抗体滴度 ,差异显著(P < 0.01)(图 2)。

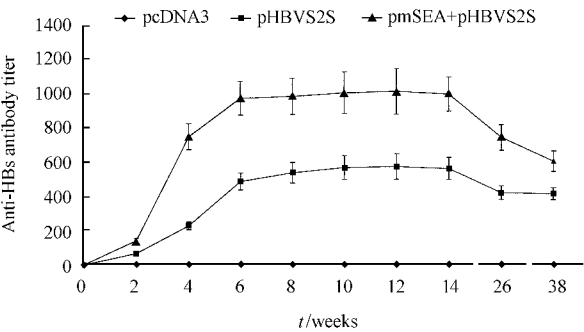


图 2 pHBVS2S、pmSEA + pHBVS2S DNA 免疫小鼠后产生的抗 HBs 抗体的比较

Fig. 2 Comparison of HBs antibodies after immunized pHBVS2S and pmSEA + pHBVS2S in mice

2.4 pHBS2S、pmSEA + pHBS2S 诱生抗 HBsAg 抗体亚类的分析

小鼠首次免疫 10 周后,抗 HBsAg IgG 达到高峰。检测抗 HBsAg 抗体亚类,发现重组亚单位(rHBsAg)多肽激发高滴度的 IgG1,IgG1/IgG2a 的比值为 10,而 pHBS2S 和 pmSEA + pHBS2S DNA 均激发产生高滴度的 IgG2a,IgG1/IgG2a 的比值分别为 0.356 和 0.282。pmSEA 增强 pHBS2S 的 IgG 的应答,与对照组相比,分别提高 IgG1 1.36 倍;IgG2a1.73 倍。表明 pmSEA 佐剂同时增强 IgG1 和 IgG2a 的产生,但对 IgG2a 较强(图 3)。

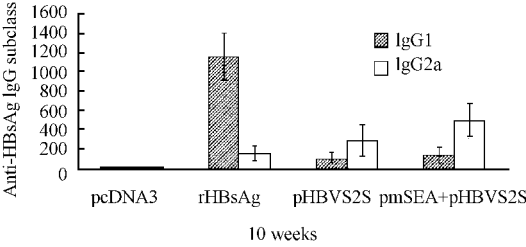


图 3 小鼠首次免疫后 10 周抗 HBsAg IgG 亚类分析
Fig. 3 The analyses of Anti-HBsAg IgG subclasses in mice serum at week 10 after first immunization

2.5 pHBS2S、pmSEA + pHBS2S 诱生鼠分泌 IFN-γ 的脾淋巴细胞比较

图 4 显示经 HBV DNA 免疫小鼠,ELISPOT 检测分泌 IFN-γ 的脾淋巴细胞结果,pmSEA 佐剂组小鼠分泌 IFN-γ 的脾淋巴细胞数量是不加佐剂组的 2~3 倍。而且在不同剂量抗原刺激下,pmSEA 佐剂组均高于不加佐剂组。

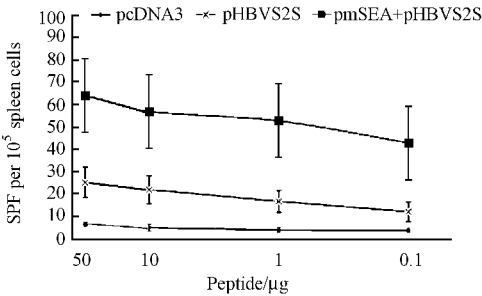


图 4 不同剂量 HBsAg 刺激诱生脾脏分泌 IFN-γ 的淋巴细胞的 ELISPOT 检测
Fig. 4 The ELISPOT detection of Spleen lymphocyte secreting IFN-γ elicited by different doses of HBsAg

2.6 pHBS2S、pmSEA + pHBS2S 诱生鼠脾细胞 HBsAg 特异性 CTLs 的杀伤活性的比较

结果(图 5)显示重组质粒 pHBS2S 可以明显诱生小鼠脾细胞表达 HBsAg 特异性的 CTLs 杀伤活性,CTLs 杀伤率随效应细胞与靶细胞比例的上升而逐

渐增高。pmSEA 佐剂可显著提高 pHBS2S 诱导的 CTLs 杀伤活性,与不加 pmSEA 单独 pHBS2S 免疫组相比,差异显著($P < 0.05$)。

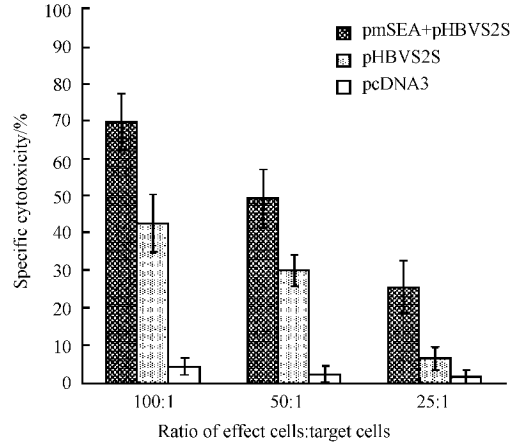


图 5 不同免疫组的特异性的 CTLs 杀伤活性的比较
Fig. 5 The comparison of CTLs specific cytotoxicities in different immunized groups

3 讨论

乙肝的治疗是迄今未解决的难题。在急性自限性乙型肝炎患者的外周血,可以检测到抗 HBV 活跃的、多克隆、多特异性细胞毒性 T 细胞和 T 辅助细胞,而在慢性 HBV 感染病人的外周血中只能检测到很弱的抗原特异性的 CTL 和 Th 细胞,或者根本检测不到^[6]。这种 T 细胞反应是清除或控制 HBV 感染的关键因素。而且,在慢性感染病人的外周血中,Th1 细胞因子(IFN-γ、IL-2 等)的含量也变弱或消失^[7-9]。因此,激发抗原特异性的 CTL 和 Th 细胞,成为治疗乙肝的关键。DNA 疫苗通过在体内合成抗原,通过抗原递呈,抗原多肽与 MHC I 类分子或 II 类分子结合,或者直接被抗原递呈摄取,经加工处理后与 MHC I 类分子或 II 类分子结合,诱生细胞免疫反应和体液免疫反应。因此,DNA 疫苗可能用于治疗 HBV 慢性携带者具有应用前景。本研究构建的 HBV DNA 疫苗为编码 HBV S 区 preS2 + S 抗原的真核细胞表达质粒(pHBVS2S),试验证明 pHBS2S 免疫小鼠能有效诱导健康小鼠产生抗原特异性 CTL,CTLs 的杀伤活性达 42%,而且,分泌 IFN-γ 的脾淋巴细胞数量较免疫前明显升高。

作为人体应用的免疫佐剂——铝制剂,发现其可显著增强体液免疫应答(抗体)水平,但主要诱导 IgG1 类抗体(即 TH2 型应答)。近年有报道,铝制剂可抑制 TH1 型应答,致 T 细胞杀伤性应答的 CTL 活性降低^[10]。在本研究中,我们应用加有铝佐剂的重

组亚单位疫苗(北京天坛生物制品股份有限公司)免疫小鼠,诱发出很强的 TH2 型应答,IgG1 是 IgG2a 的 10 倍,CTL 活性与非免疫对照组相似,未能显示诱生 CTL 活性的提高。为了增强基因疫苗的免疫活性,我们选择了超抗原 SEA 作为 HBV DNA 疫苗的佐剂。经与 pHBVS2S DNA 疫苗共免疫 Balb/c 小鼠试验,发现 pmSEA 可显著提高机体对 DNA 疫苗的免疫应答,无论是体液免疫还是细胞免疫。其机制可能是 SEA 通过与 MHC II 分子结合,激发 Th 2 类细胞,促进体液免疫反应,结果使佐剂组的抗体滴度明显高于不加佐剂组;同时由于失去分泌信号肽的 SEA,在细胞内通过与 MHC I^[11]分子结合,激发 Th1 类细胞,促进 IL-2、TNF- α 、IFN- γ 等淋巴因子的产生,从而使 IgG2a 型抗体增加,导致抗体水平的全面提高。此外,由其诱生 IL-2、IFN- γ 等淋巴因子的增加,促进 T 淋巴细胞的增殖反应,提高了 CTLs 的杀伤活性,所以与对照组相比,pmSEA 佐剂组 CTLs 的杀伤活性显著高于对照组($P < 0.05$)。至今将 pmSEA 作为 DNA 疫苗的佐剂,尚未见有报道。在实验中我们对 pmSEA 质粒免疫的 20 只小鼠观察 38 周,未发现产生肿瘤或其他显著的不良反应。以上实验结果表明 pmSEA 可有效地提高 pHBVS2S DNA 疫苗的细胞与体液免疫反应,展示了有望成为 DNA 疫苗的佐剂的前景。

在实验中,我们使用活体基因导入仪,在 DNA 疫苗注射部位进行电击,可以增加肌细胞对质粒 DNA 的摄取。发现应用电击的 pHBVS2S 和 pmSEA/pHBVS2S 免疫组小鼠产生抗 HBs 抗体阳转率较肌肉免疫接种组高 50% ~ 60%。因此,采用这种方法,有可能增加肌细胞和抗原递呈细胞对质粒 DNA 的摄取,提高抗原的表达量,促使小鼠抗 HBs 抗体阳转率的提高。

REFERENCES(参考文献)

[1] Wolff JA, Malone RW, Williams P *et al* . Direct gene transfer into mouse *in vivo* . *Science* , 1990 , **247** (4949Pt 1) :1465 – 1468

[2] Schirmbeck R, Bohm W, Ando K *et al* . Nucleic acid vaccination primes hepatitis B virus surface antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in non-responder mice. *J Virol* , 1995 , **69** : 5929 – 5934

[3] Torres BA, Kominsky S, Perrin GQ *et al* . Superantigens : The good , the bad , and the ugly . *Exp Biol Med* , 2001 , **226** (3) :164 – 176

[4] Yang XW(杨欣伟), Sui YF(隋延仿), Li ZS(李增山) *et al* . Construction of recombinant SEA gene eukaryotic expression vectors and its induction of immune response against murine hepatoma. *Chin J Cell Mol Immunol*(细胞与分子免疫学杂志), 2002 , **18** (5) :443 – 446

[5] Newton DW, Dohlsen M, Olsson C *et al* . Mutations in the MHC class II binding domains of staphylococcal enterotoxin A differentially affect T cell receptor V beta specially. *J Immunol* , 1996 , **157** (9) :3988 – 3994

[6] Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* , 1995 , **13** : 29 – 60

[7] Penna A, Del Prele G, Cavalli A *et al* . Predominant T-helper 1 cytokine profile of hepatitis B virus nucleocapsid-specific T cells in acute self-limited hepatitis B. *Hepatology* , 1997 , **25** :1022 – 1027

[8] Bertoleui AD, Elios MM, Boni C *et al* . Different cytokine profiles of intrahepatic T cells in chronic hepatitis B and hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* , 1997 , **112** :193 – 199

[9] Jung MC, Hanmann B, Gerlach JT *et al* . Virus-specific lymphokine production differs quantitatively but not qualitatively in acute and chronic hepatitis B infection. *Virology* , 1999 , **266** :165 – 172

[10] Schirmbeck E, Melber K, Mertens T *et al* . A ntibody and cyto toxic T-cell responses to soluble hepatitis B virus(HBV) S antigen in mice : implication for the pathogenesis of HBV-induced hepatitis. *J Viro l* , 1994 , **68** :1418 – 1425

[11] Baskar P, Hildreth JE, Chrest FJ *et al* . Anti-HLA class I antibody inhibits staphylococcus enterotoxin A (SEA)-induced proliferation of human PBMC. *Cell Immunol* , 1996 , **172** (1) :135

本期广告索引

企 业	版 位	企 业	版 位
GE Healthcare 公司	封底	杭州博日科技有限公司	文前 V、VI
Roche 诊断公司	封二	上海苏泊信息技术有限公司	文前 IX、X
美国英杰生命技术公司	封三	上海国强生化工程装备有限公司	文前 XIII、XIV
美国 Promega 公司	文前 I、II	江苏达森集团	文前 XV
德国艾本德股份公司	文前 III、IV	镇江东方生物工程公司	文前 XVI
北京天为时代科技有限公司	文前 VII VIII	扬中威柯特公司	文后 I
苏州汉星电化学有限公司	文前 XI、XII	天津泰达生命科学技术研究中心	文后 II