

戊肝病毒 Th 表位肽免疫可增强其载体蛋白的体液免疫应答

# Priming with an HEV Th Epitope Can Improve the Humoral Immunogenicity of Its Native Protein

林春鑫, 吴 婷, 伍小路, 谢明辉, 程 通, 李少伟, 张 军, 夏宁邵\*

LIN Chun-Xin, WU Ting, WU Xiao-Lu, XIE Ming-Hui, CHENG Tong, LI Shao-Wei, ZHANG Jun and XIA Ning-Shao\*

厦门大学 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心 福建省医学分子病毒学研究中心 厦门 361005

National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Disease, Xiamen University, Xiamen 361005, China

**摘 要** 戊型肝炎病毒衣壳蛋白内包含一个强 H-2<sup>d</sup> 限制性 Th 表位 P34。以该表位肽免疫 BALB/c 鼠, 其脾细胞能够在体外识别重组戊型肝炎病毒衣壳蛋白, 剔除实验表明应答细胞几乎完全是 CD4<sup>+</sup> T 细胞, 证明 P34 表位肽能有效诱导产生特异性 Th 细胞。以 P34 肽初免小鼠, 再以包含该表位的重组戊型肝炎病毒抗原(E2)免疫, 结果表明, 10 $\mu$ g、20 $\mu$ g E2 免疫组在免疫后第 1 周即有部分小鼠产生抗体, 到第 3 周所有小鼠均能够产生抗体, 而对照肽 P18 初免的小鼠, 以 20 $\mu$ g E2 加强免疫亦无法诱导小鼠产生抗体。这表明, Th 表位肽 P34 初免诱导产生的 Th 细胞能够有效促进小鼠对携带该表位的载体蛋白的体液免疫应答。

**关键词** 戊型肝炎病毒, T 辅助细胞, T 细胞表位, 免疫原性

中图分类号 R392 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)02-0310-05

**Abstract** A dominant H-2<sup>d</sup> restricted Th epitope P34 was found to be contained in recombinant particulate hepatitis E virus (HEV) vaccine HEV 239. In this paper, the cellular immune response induced in P34 immunized BALB/c mice were studied and the priming effect of P34 was characterized. Groups of BALB/c mice were subcutaneously (s.c.) immunized with P34, splenocytes were then stimulated with P34 and HEV 239 protein, cellular immune response was assayed by IFN- $\gamma$ -ELISPOT, flow cytometry and T cell proliferation experiments. Results showed that P34 immunized BALB/c splenocytes responded to P34 and HEV 239 protein stimulation in IFN- $\gamma$ -ELISPOT, flow cytometry and T cell proliferation experiments. After depletion of the CD4<sup>+</sup> T cells from the immunized splenocytes by magnetic separation, the response decreased to the background level while almost no influence was observed after CD8<sup>+</sup> T cells depletion which showed that the cells responsible for IFN- $\gamma$  secretion were mainly CD4<sup>+</sup> T cells. Then mice were primed with P34 and boosted with its vector protein, E2, the E2 specific antibody titer were assayed. Results showed that after P34 priming, some of the 10 $\mu$ g, 20 $\mu$ g E2 boosted mice could develop anti-E2 antibody 1 week later and all the mice had detectable antibody 3 weeks after boosting. In the control peptide P18 priming group, even after boosting with 20 $\mu$ g E2, anti-E2 antibody couldn't be detected until the end of this experiment. The results showed that priming with P34 epitope could increase the immunogenicity of its vector protein, E2, in BALB/c mice.

**Key words** Hepatitis E virus, Th cell, T epitope, immunogenicity

Received: September 25, 2006; Accepted: December 7, 2006.

This work was supported by the grants from "863" Projects (No. 2005AA23H20), Science and Technology Projects of Fujian Province (No. 2004YZ01), Xiamen Science and Technology Projects in Great Industry (No. 3502Z20041008), China.

\* Corresponding author. E-mail: nsxia@xmu.edu.cn

国家高技术研究与发展项目(No. 2005AA23H20), 福建省科技重大专项(No. 2004YZ01)和厦门市重大产业科技项目(No. 3502Z20041008)资助。

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

戊型肝炎病毒(HEV)引发戊型肝炎,含3个开放读码框架(ORF),其中PORF2编码含660个氨基酸的多肽,组成病毒衣壳。本室以大肠杆菌表达戊型肝炎病毒PORF2的aa368-606片段,获得的颗粒性抗原HEV 239,可以诱导良好的保护性抗体和特异性细胞免疫应答<sup>[1-3]</sup>。另一个重组蛋白E2(HEV ORF2 aa 394-606)与HEV 239相比,仅在N端缺少26个氨基酸,但不能形成颗粒<sup>[4]</sup>。二者具有相似的抗原性,然而E2的免疫原性比HEV 239低200倍<sup>[1,5-7]</sup>。本室曾鉴定出一个H-2<sup>d</sup>限制性CD4<sup>+</sup>T细胞(Th)表位肽P34(HEV ORF2 aa 533-547)<sup>[8]</sup>。本研究显示,以该Th表位肽单独免疫BALB/c鼠即能诱导出表位特异的Th应答,而且活化的表位特异性Th细胞能有效促进携带该表位的载体蛋白的免疫应答,提示这一表位肽可以作为合成肽疫苗的有效组成部分,并可应用于单克隆抗体的研制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

无特殊病原体(SPF)级BALB/c小鼠,雌性,6~8周龄,由本校实验动物中心提供。

### 1.2 蛋白及多肽合成

合成P34肽(HSKTFFVLPLRGKLS)和P18肽(PTPSPAPSRPFSLVR),70%纯度(西安美联公司),以DMSO溶解多肽配置浓度为10mg/mL的储存液<sup>[8]</sup>。纯化的HEV 239、E2蛋白由北京万泰生物药业有限公司惠赠。

### 1.3 免疫

将P34或P18肽与等体积完全弗氏佐剂(CFA, Sigma公司)混合,制备成1mg/mL浓度的疫苗(P34-CFA, P18-CFA),以100 $\mu$ L/鼠的剂量腹股沟及颈部皮下免疫小鼠,免疫后第4周分离脾细胞检测或加强免疫E2蛋白。E2蛋白与铝佐剂混合,制备50 $\mu$ g/mL、100 $\mu$ g/mL、200 $\mu$ g/mL的疫苗,以100 $\mu$ L/鼠的剂量肌肉免疫小鼠。以PBS与铝佐剂混合作为阴性对照。

### 1.4 小鼠脾脏细胞分离

取免疫后小鼠脾脏,2mL注射器研磨,200目筛网过滤,DMEM(Invitrogen公司)洗涤后离心,3mL红细胞裂解液室温处理3min,加入50mL PBS,离心,PBS洗涤后将脾细胞重悬于10% 1640,细胞浓度调整为 $1 \times 10^7$ /mL。

### 1.5 IFN- $\gamma$ -ELISPOT 检测

按照试剂盒(BDTM ELISPOT SET)说明书进行。简言之:(1)以抗-鼠IFN- $\gamma$ 抗体100 $\mu$ L/孔(5 $\mu$ g/mL)包

被ELISPOT 96孔板。(2)4 $^{\circ}$ C孵育12h后,各孔以含10% FBS的1640培养液室温封闭2h。(3)每孔接种小鼠脾细胞 $1 \times 10^6$ 个/200 $\mu$ L,刺激抗原分别采用10 $\mu$ g/mL HEV 239蛋白,10 $\mu$ g/mL BSA或10 $\mu$ g/mL单独肽,每个样品作3个复孔。阳性或阴性对照孔则分别加入2 $\mu$ g/mL ConA或单纯培养液。37 $^{\circ}$ C静置培养24h。(4)各孔洗涤后加入生物素化抗鼠IFN- $\gamma$ 抗体,100 $\mu$ L/孔(2.5 $\mu$ g/mL),室温反应2h。(5)各孔洗涤后加入链霉亲和素-HRP,100 $\mu$ L/孔(5 $\mu$ g/mL),室温反应2h。(6)洗涤后加入HRP底物AEC,避光显色,以水冲洗终止晾干。(7)以ImmunoSpot(Cellular Technology Ltd.公司)进行计数和数据处理。以斑点数/10 $^6$ 脾细胞(Spots/10 $^6$  spleen cells)为单位,阴性孔<10 Spots/10 $^6$ 脾细胞,实验孔大于2倍阴性孔斑点数者为阳性。

### 1.6 剔除脾细胞中CD4<sup>+</sup>T细胞或CD8<sup>+</sup>T细胞

参照Miltenyi公司操作手册,取 $10^7$ 新鲜分离的小鼠脾细胞,洗涤后重悬于90 $\mu$ L staining buffer中,加入10 $\mu$ L与抗鼠CD4或抗鼠CD8抗体连接的磁珠,通过磁场分离,得到剔除CD4<sup>+</sup>T细胞或CD8<sup>+</sup>T细胞的小鼠脾细胞,重悬,计数,调整细胞浓度为 $1 \times 10^7$ /mL,以流式细胞仪(Coulter Epics XL)检测相应的剔除效率。

### 1.7 流式细胞仪检测细胞内IFN- $\gamma$ 的分泌及T细胞表型

以10 $\mu$ g/mL P34, 2 $\mu$ g/mL ConA或10 $\mu$ g/mL P18于24孔板内刺激免疫后的鼠脾细胞,每孔 $5 \times 10^6$ 个细胞,37 $^{\circ}$ C静置培养1h后加入10 $\mu$ g/mL BFA(Sigma),37 $^{\circ}$ C 16h后,计数。以staining buffer洗涤细胞2次,3 $\mu$ L anti-CD8-PE(Beckman Coulter)/100 $\mu$ L/10 $^6$ 细胞染色15min, Cytofix/Cytoperm<sup>TM</sup>通透20min后,以1.25 $\mu$ L anti-CD3-PC5和2.5 $\mu$ L anti-IFN- $\gamma$ -Alexa Fluor 488染色30min,流式细胞仪检测。Cytofix/Cytoperm<sup>TM</sup>、anti-CD3-PC5和anti-IFN- $\gamma$ -Alexa Fluor 488均购自BD Pharmingen。

### 1.8 MTT法检测抗原特异性T细胞的增殖

以10 $\mu$ g/mL HEV 239, 10 $\mu$ g/mL P34, 2 $\mu$ g/mL ConA或10 $\mu$ g/mL P18于96孔板内刺激免疫后的鼠脾细胞,每孔 $5 \times 10^5$ 个细胞/100 $\mu$ L培养液,37 $^{\circ}$ C静置培养48h、72h。每孔加入15 $\mu$ L 5mg/mL MTT(Sigma),37 $^{\circ}$ C 4h后加入100 $\mu$ L 0.01mol/L HCl-10% SDS。酶标仪检测550nm OD值。每样品重复5孔。

### 1.9 血清抗-HEV 抗体检测

用HEV ELISA试剂盒(双抗原夹心法,北京万

泰公司提供 )检测血清抗-HEV 总抗体滴度。

1.10 统计学分析

以 Student *t* 检验进行不同蛋白或肽刺激脾细胞增殖效应的差别检验。

2 结果

2.1 P34 免疫 BALB/c 鼠诱导的细胞免疫应答

以 100μg P34 肽皮下免疫 BALB/c 鼠 ,IFN-γ-ELISPOT 实验检测其对 HEV 239 蛋白、P34 肽的反应性。结果( 图 1 )表明经 P34-CFA 免疫可激活 P34 肽特异性 T 细胞 ,体外经 P34 或 HEV 239 蛋白刺激可产生大量 IFN-γ。将 CD4<sup>+</sup> T 细胞从脾细胞中剔除后 ,脾细胞经 P34 或 HEV 239 蛋白刺激的反应下降到本底水平 ,而剔除 CD8<sup>+</sup> T 细胞的脾细胞则几乎保持剔除前的应答水平 ,说明该抗原特异性 T 细胞基本上都是 CD4<sup>+</sup> Th 细胞。而 P18-CFA 免疫的小鼠对 P34 或 HEV 239 蛋白刺激及 P34-CFA 免疫小鼠对 P18 肽均无反应。以 P34-CFA 免疫小鼠 ,无可检测的 IL-5 产生( 结果未显示 ) ,说明激活的主要为 Th1 细胞。

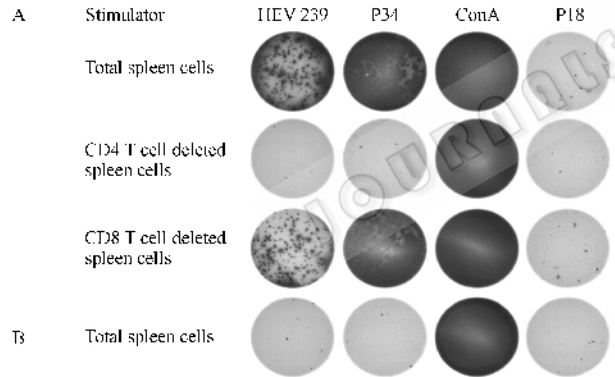


图 1 IFN-γ-ELISPOT 分析 P34 肽诱导的细胞免疫应答特性  
Fig.1 IFN-γ-ELISPOT assay to characterize the cellular immune response induced by P34 in BALB/c mice  
A : P34-CFA immunized mice ;B : P18-CFA immunized mice.

将免疫后的鼠脾细胞用细胞内细胞因子染色技术染色 ,流式细胞仪分析 ,以 CD3 阳性的活细胞设门。结果表明( 图 2 )经 P34 刺激后 ,CD3<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> IFN<sup>+</sup> 的细胞占门内细胞的 0.18% ,CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> IFN<sup>+</sup> 的细胞仅占门内细胞 0.02% ;而经 P18 刺激后 CD3<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> IFN<sup>+</sup> 的细胞以及 CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> IFN<sup>+</sup> 的细胞分别占门内细胞的 0.04% 和 0.02% ,说明 P34 肽免疫鼠脾细胞内的抗原特异性细胞主要为 CD3<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> 细胞 ,即 T 辅助细胞。

应用 MTT 的方法检测 P34-CFA 免疫小鼠脾细胞经 HEV 239 或 P34 肽刺激后的 T 细胞增殖效应 ,

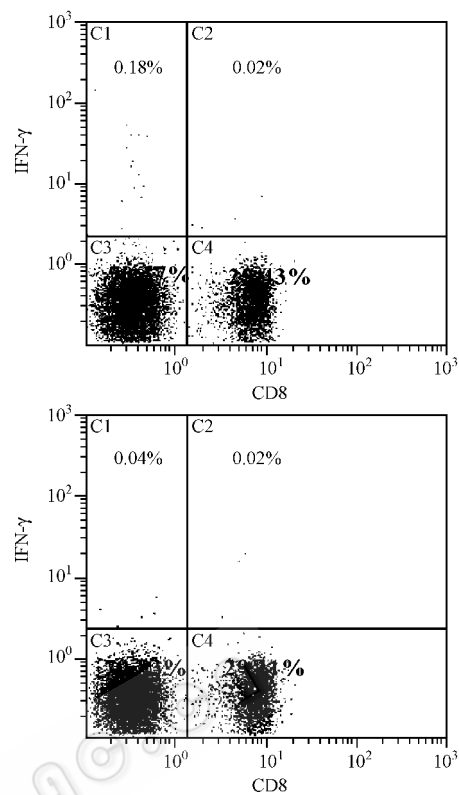


图 2 细胞内染色分析 P34 免疫小鼠脾细胞的特异性应答  
Fig.2 Intracellular staining assay to determine the reactivity of P34 immunized splenocytes  
A : stimulate with P34 peptide ;B : stimulate with P18 peptide.

结果( 图 3 )显示通过 MTT 的方法仍然能够检测出 P34-CFA 免疫小鼠脾细胞在 HEV 239 或 P34 肽刺激下的特异性增殖反应。

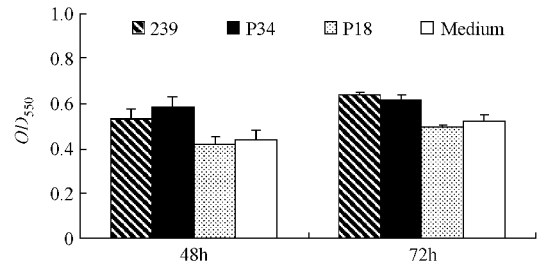


图 3 MTT 法检测 P34-CFA 免疫小鼠脾细胞特异性增殖效应  
Fig.3 The antigen specific proliferation reaction of P34-CFA immunized mice splenocytes assayed by MTT method  
“ \* ”represent “ *P* < 0.05 ”; “ \* \* ” represent “ *P* < 0.01 ”.

2.2 P34 特异性 Th 应答能够促进 P34 载体蛋白的免疫应答

以表位肽 P34 或对照肽 P18 初免 BALB/c 鼠 ,不同浓度的 E<sub>2</sub> 包含 P34 表位 )或 PBS 加强免疫 ,检测 P34 初免对 E<sub>2</sub> 诱导产生特异性抗体的影响。结果表明 ,经过 P34 初免 5μg E<sub>2</sub> 免疫组即有 2 只( 每组共 5 只 )小鼠于 E<sub>2</sub> 免疫后第 2 周产生特异性抗体

(表 1),10μg E2 免疫组在免疫后第 1 周有 4 只小鼠产生抗体 ,到第 3 周所有小鼠均能够产生抗体。而以 P34 初免 ,PBS 加强免疫小鼠无抗体产生 ,P18 初免各剂量 E2 加强免疫组亦无小鼠产生抗体 ,说明 P34 初免诱导产生的肽特异性 Th 细胞能够在体内识别 E2 特异的 B 细胞 ,从而促进体液免疫应答。

表 1 肽初免对 E2 免疫原性的影响

Table 1 Improvement of E2 immunogenicity by peptide priming

Dose of E2	Priming peptide	Number of mice with anti-E2 IgG seroconversion			
		0 week	1 week	2 week	3 week
5 μg E2	P34	-	-	2	2
	P18	-	-	-	-
10 μg E2	P34	-	4	4	5
	P18	-	-	-	-
20 μg E2	P34	-	3	4	5
	P18	-	-	-	-

3 讨论

外源蛋白进入机体后首先被树突状细胞( DC )、巨噬细胞等抗原呈递细胞( APC )吞噬 ,抗原在 APC 内被降解 ,其中包含的 T 细胞表位与 MHC II 分子结合而呈递于 APC 表面。在淋巴结内 ,抗原特异的 T 辅助细胞( Th )被呈递了 Th 表位肽的 APC 激活后移动到富含 B 细胞的滤泡附近。滤泡内抗原特异的 B 细胞则通过其表面的膜免疫球蛋白( mlg )结合外源蛋白抗原的 B 细胞表位而吞噬该蛋白 ,经过与 APC 细胞同样的生化过程 ,将抗原内包含的 Th 表位与 MHC II 分子复合物呈递于细胞表面。抗原特异的 T 细胞与抗原特异的 B 细胞通过细胞表面 TCR 与 MHC II -肽复合物的相互识别而结合 ,进而通过 B7-CD28、CD40-CD40L 等分子的相互作用及细胞因子分泌而激活 B 细胞<sup>[9]</sup> ,因此抗原内包含强的 Th 表位对产生特异性抗体非常重要。

本研究对 HEV 239 蛋白中包含的优势 H-2<sup>d</sup> 限制性 Th 表位肽 P34 的特性进行了深入研究 ,发现以 P34 混合 CFA 后免疫 BALB/c 鼠能在小鼠体内引起强的 Th1 应答 ,并且该 Th 细胞在体外体内均能识别其载体蛋白。以 P34 肽初免 ,可以明显促进动物对载体蛋白 E2 的体液免疫应答 ,缩短抗体产生的时间 ,提高抗体产生的滴度。抗体分型实验表明 E2 加强免疫后所产生的抗体主要为 IgG1 型(结果未显示) ,说明其中起辅助作用的是 Th2 细胞 ,这一现象与记忆性 T 细胞的可塑性理论相一致<sup>[10,11]</sup>。即 Th1 型效应 T 细胞分化成记忆 T 细胞后可重新分化为 Th1 或 Th2 细胞 ,这取决于加强免疫时所应用的抗

原。这些研究表明 P34 可以作为一个有效的 Th 表位肽应用于肽疫苗的设计中 ,并可在单克隆抗体研制中起重要作用。

基因工程颗粒性蛋白疫苗具有良好的免疫原性及免疫保护性 ,能够在机体内诱导全面的体液免疫、粘膜免疫及细胞免疫应答<sup>[12-15]</sup> ,非颗粒性蛋白疫苗的免疫原性则往往很弱。然而 ,试图使表达出的靶蛋白形成颗粒的尝试常常是不成功的 ,因此研究颗粒蛋白免疫原性优于非颗粒蛋白的机理 ,提高非颗粒蛋白抗原的免疫原性是疫苗研究急待解决的重要问题。E2 与 HEV 239 疫苗中包含的中和表位类似 ,这两个蛋白颗粒性的差异导致其免疫原性的不同<sup>[1]</sup> ,因此 E2 与 HEV 239 可作为模式蛋白研究颗粒蛋白和非颗粒蛋白免疫原性差异的机理。由于经过 P34 肽初免 ,激活体内特异性 Th 细胞 ,能够增强 E2 的免疫原性 ,推测是否由于 E2 不能有效被 APC 吞噬呈递而导致体内缺乏抗原特异性 Th 细胞 ,因而免疫原性较差。P34 表位可作为激活抗原特异性 Th 细胞的工具能够帮助阐明这一机理 ,目前相关研究正在进行中。

REFERENCES(参考文献)

[ 1 ] Li SW, Zhang J, Li YM, et al. A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine : antigenicity , immunogenicity and protectivity on primates. *Vaccine* , 2005 , **23**( 22 ) : 2893 - 2901.

[ 2 ] Li SW, Zhang J, He ZQ, et al. Mutational analysis of essential interactions involved in the assembly of hepatitis E virus capsid. *J Biol Chem* , 2005 , **280**( 5 ) : 3400 - 3406.

[ 3 ] Wu T(吴 婷) , Ou SH(欧山海) , Cheng T(程 通) , et al. Immune response induced by recombinant particulate hepatitis E virus vaccine in mice. *Chinese Journal of Virology*( 病毒学报 ) , 2005 , **21**( 6 ) : 422 - 427.

[ 4 ] Zhang JZ, Ng MH, Xia NS, et al. Conformational antigenic determinants generated by interactions between a bacterially expressed recombinant peptide of the hepatitis E virus structural protein. *J Med Virol* , 2001 , **64**( 2 ) : 125 - 132.

[ 5 ] Li SW, Zhang JZ, Zhuang H, et al. A bacterially expressed peptide prevents experimental infection of primates by the hepatitis E virus. *Vaccine* , 2001 , **19**( 27 ) : 3726 - 3732.

[ 6 ] Zhang J, Gu Y, Ge SX, et al. Analysis of hepatitis E virus neutralization sites using monoclonal antibodies directed against a virus capsid protein. *Vaccine* , 2005 , **23**( 22 ) : 2881 - 2892.

[ 7 ] Ge SX(葛胜祥) , Zhang J(张 军) , Huang GX(黄果勇) , et al. Protective efficacy of a particulate recombinant( *E. coli* ) hepatitis E vaccine on Rhesus Monkey. *Acta Microbiologica Sinica*( 微生物学报 ) , 2003 , **43**( 1 ) : 35 - 42.

[ 8 ] Wu XL(伍小路) , Wu T(吴 婷) , Ou SH(欧山海) , et al. Identification of H-2<sup>d</sup> restricted Th epitope in hepatitis E virus

- particulate vaccine HEV 239. *Chinese Journal of Virology*(病毒学报), 2006, **22**(3): 176 – 179.
- [ 9 ] Garside P , Ingulli E , Merica RR , *et al* . Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science* , 1998 , **281**( 5373 ) : 96 – 99 .
- [ 10 ] Farber DL . Remembrance of antigens past : new insights into memory T cells. *Scand J Immunol* , 2003 , **58**( 2 ) : 145 – 154 .
- [ 11 ] Ahmadzadeh M , Farber DL . Functional plasticity of an antigen-specific memory CD4 T cell population. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2002 , **99**( 18 ) : 11802 – 11807 .
- [ 12 ] Kirnbauer R , Booy F , Cheng N , *et al* . Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1992 , **89**( 24 ) : 12180 – 12184 .
- [ 13 ] Lopez de Turiso JA , Cortes E , Martinez C , *et al* . Recombinant vaccine for canine parvovirus in dogs. *J Virol* , 1992 , **66**( 5 ) : 2748 – 2753 .
- [ 14 ] Martinez C , Dalsgaard K , Lopez de Turiso JA , *et al* . Production of porcine parvovirus empty capsids with high immunogenic activity. *Vaccine* , 1992 , **10**( 10 ) : 684 – 690 .
- [ 15 ] Marin MS , Martin Alonso JM , Perez Ordoyo Garcia LI , *et al* . Immunogenic properties of rabbit haemorrhagic disease virus structural protein VP60 expressed by a recombinant baculovirus : an efficient vaccine. *Virus Res* , 1995 , **39**( 2 – 3 ) : 119 – 128 .