文章编号:1000-5404(2006)18-1829-04

论著

脂类分子内佐剂 Th/CTL 多表位肽体内诱导 HLA-A2 转基因鼠 HBV 特异性 CTL 应答的研究

石统东[1,2],吴玉章[1],任 红[2] ([1]第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038;[2]重庆医科大学附属第二医院肝炎研究所感染病科,重庆 400010)

提 要:目的 探索如何在体内启动对外源性合成肽抗原的 HLA Ⅰ类分子限制性 $CD8^+$ T 细胞应答。**方法** 应用分子设计方法设计、合成基于免疫优势性 HBcAg CTL 表位、PreS2 B 细胞表位和破伤风类毒素通用 Th 表位的多肽,并在氨基端导入脂类分子内佐剂,分别与以完全弗氏佐剂(CFA)和不完全弗氏佐剂(IFA)乳化的多肽抗原相比较,在 HLA-A2 转基因小鼠体内对其诱导 T 细胞 Th1 型极化、$CD8^+$ CTL 扩增及 $CD8^+$ CTL 介导的 HBV 特异性细胞毒活性的功能进行研究。**结果** 含脂质分子内佐剂的 Th/CTL 多表位肽可在 HLA-A2 转基因小鼠体内诱导强而有效的 Th1 型极化和 $CD8^+$ CTL 扩增及 HBV 特异性 $CD8^+$ CTL 介导的细胞毒活性,其免疫原性显著高于 CFA 和 IFA 乳化的多肽($P<0.05$);而后二者其免疫原性未见显著差异。**结论** Th/CTL 多表位肽设计并引入脂质分子内佐剂是在体内有效诱导抗原特异性 CTL 应答并降低抗原制剂毒副作用的有效途径。

关键词: HBV; CTL; 治疗性多肽;表位;分子内佐剂
中图法分类号: R392.13;R392.7;R512.62 **文献标识码**: A

HBV-specific CTL responses in HLA-A2 transgenic mice induced by lipidated Th/CTL constructs

SHI Tong-dong[1,2], WU Yu-Zhang[1], REN Hong[2] ([1]Institute of Immunology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Infectious Diseases, Institute of Viral Hepatitis, Second affiliated Hosptial, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To explore how to trigger *in vivo* HBV-specific HLA Ⅰ-restricted CTL responses to exogenously synthesized polypeptides. **Methods** The polypeptide was designed and synthesized based on a common helper T lymphocyte (Th) sequence of tetanus toxoid, the immunodominant CTL epitope of HBcAg and B-epitope of PreS2. The polypeptide was given to the transgenic mice respectively after being emulsified in complete or incomplete Freund's adjuvant(CFA/IFA), or inducted to 2 palmitic acid molecules (palm2-KSS, as built-in adjuvant) at its amino termini. The immunological properties of mimicing human CTL responses to HBV proteins were studied in these immunized mice. **Results** The HTL-CTL epitope construct with lipidated built-in adjuvant could trigger specifically and effectively vigorous in HLA-A2 transgenic mice, and dramatic difference was found compared with the mimic polypeptides emulsified in CFA and IFA($P<0.05$). **Conclusion** Lipidated covalently linked HTL-CTL epitope construct might be the most effective approach to elicit HBV-specific CTL response in vivo and get rid of the side effects of exogenous adjuvants at the same time.

Key word: HBV; CTL; therapeutic peptide; epitope; lipidated built-in adjuvant

目前研究认为,只有对内源性 HBV 抗原的特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)应答才是控制 HBV 感染和清除细胞内感染病毒的决定因素。而天然 HBV 抗原由于含有不合理的表位组分,能够诱发 Th1/Th2 平衡改变、免疫偏差、免疫缺陷或免疫颠覆,而使某些病毒可逃避机体的免疫防御而持续存在于肝细胞内,造成感染慢性化、肝硬化或肝癌[1,2]。因此,必须对天然抗原在免疫优势性表位的基础上进行重新设计或改

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471553,30271189)
Supported by National Natural Science Foundation (30471553, 30271189)

作者简介:石统东(1970-),男,山东省蒙阴县人,博士,副教授,主要从事慢性肝炎发病机制与免疫治疗方面的研究,发表论文 20 余篇。电话:(023)63849075,E-mail:tdshih@yahoo.com.cn

收稿日期:2005-11-01;**修回日期**:2006-01-10

造，设计新一代治疗性疫苗，在体内诱导与天然感染过程有所不同的 CTL 应答的同时又保持抗 HBV 特异性。

我们既往已经应用分子设计的理论和方法进行计算机计算和筛选出基于 HBV 核心抗原免疫优势 CTL 表位、PreS2 B 表位和通用 Th 细胞表位及其优势连接多肽，并合成了多个模拟治疗性多肽，经进行体内、体外实验验证的基础上，确定“通用 Th 细胞表位 + CTL 表位 + B 细胞表位 + 短而高柔性连接顺序”组合肽段设计可显著提高小分子治疗性多肽诱导抗原特异性 CTL 应答的免疫原性，并得到了基于前述免疫优势 CTL、B、Th 细胞表位的治疗性多肽候选分子[3,4]。本研究在前述研究的基础上，对治疗性多肽分子进行改造，在其氨基端引入新的连接顺序并连接脂质分子内佐剂，以期能够进一步提高多肽免疫原性、降低免疫制剂的毒副作用。并以 HLA-A2 转基因小鼠为实验模型，对其诱导 T 细胞 Th1 型极化、$CD8^+$ CTL 扩增及 HBV 特异性 $CD8^+$ CTL 应答进行了体内研究，探索如何在体内启动对外源性合成肽抗原的 HLA Ⅰ类分子限制性 CTL 应答并期望为 HBV 治疗性多肽疫苗研究奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 试剂

纯系 HLA-A2 转基因小鼠（H-$2K^b$）12 只，雌雄不拘，6～8 周龄，购自美国 Jackson 实验室。多肽合成所用氨基酸购自 PE 公司和 ACT 公司。靶细胞标记用 $Na_2{}^{51}GrO_4$ 购自美国 NEN™公司。其他试剂还有：RPMI1640 培养基（Gibco），胎牛血清（FCS）（HyClone），嵌合 HLA-$A2K^b$/$HBcAg_{18\text{-}27}$ 四聚体试剂盒（ProImmune，UK）和小鼠 IFN-γ ELISpot 试剂盒（Diaclone）。

1.2 模拟肽抗原的合成、制备

模拟抗原 P1 为我们前述研究所确定的候选多肽（QYIKANSKFIGITE AAA FLPSDFFPSV GGG DPRVRGLYFPA），以不完全弗氏佐剂（IFA）乳化后使用。模拟抗原 P2 为以完全弗氏佐剂（CFA）乳化的该候选多肽。模拟抗原 P3 为在该候选多肽的氨基端连接 palm2-KSS 顺序，导入脂类分子内佐剂，合成新的抗原肽。

上述多肽的合成应用 Merrifield 固相多肽合成技术合成（PE431A 合成仪），以 RP-HPLC（WATERS 600）法纯化，并经质谱分析（API 2000）。所有纯化后（纯度 > 95%）多肽抗原以 10 mg/ml 溶解于 DMSO，保存于 -70 ℃，应用时以 0.02 mol/L pH 7.2 的 PBS 缓冲液稀释至合适浓度使用。

1.3 动物免疫

将上述 12 只 HLA-A2 转基因小鼠，分为 4 组，每组 3 只。以抗原 P1、P2、P3 皮下注射免疫小鼠，注射部位为双侧胁下和后足掌皮下。首次剂量为 500 μg/kg；2 周后加强免疫，剂量 250 μg/kg，每 2 周 1 次，共 4 次。阴性对照组小鼠仅以 PBS 皮下注射。

末次免疫 2 周后，处死小鼠，分离脾脏淋巴细胞，用含 10% FCS 的 RPMI1640 培养液悬浮，作为新鲜样本。

1.4 Th1 极化分析

应用鼠 IFN-γ ELISPOT 法进行模拟肽诱导淋巴细胞 Th1 型极化分析[3]：PVDF 衬底的 96 孔细胞培养板用抗鼠 IFN-γ 单抗 4 ℃包被过夜，新鲜脾细胞样本培养液内加入 10 μg/ml 相应抗原肽，以 5×10^3/孔加入细胞培养板内，每样本设 3 复孔，在 37 ℃、5% CO_2 条件下培养 15 h。然后洗去细胞，加入生物素标记抗 IFN-γ 单抗、亲和素-碱性磷酸酶偶联配体和底物充分反应。细胞培养板以流水冲洗后，4 ℃过夜晾干。所形成紫蓝色斑点在立体显微镜下观察、计数。Th1 极化细胞数量以 IFN-γ 分泌细胞（ISC）/10^6 淋巴细胞（PBMC）表示。结果以超过阴性对照 3 个标准差并超过 50 ISC/10^6 PBMC 为阳性。

1.5 细胞毒活性检测

抗原特异性 CTL 效应细胞产生如下：新鲜脾细胞以 2×10^5/ml 浓度培养于 24 孔细胞培养板内（2 ml/孔），培养液中含 10% FCS、30 IU/ml 鼠 IL-2 和 10 μg/ml 相应抗原肽，其中阴性对照来源的脾细胞培养液中加入的为无关对照抗原[黑色素瘤特异性抗原 $MART\text{-}1_{27\text{-}35}$ CTL 表位肽（AAGIGILTV）]。48 h 后收集细胞，作为效应细胞使用。

用 4 h ^{51}Cr 释放实验进行 CTL 介导的细胞毒活性检测：以 P815 细胞系为靶细胞，用前 2 h 在培养液中加入 $HBcAg_{18\text{-}27}$ 肽抗原 2 μg/ml 继续培养。取 1×10^6 靶细胞加 3.7×10^6 Bq $Na_2{}^{51}GrO_4$ 在 37 ℃水浴中标记 60 min，用 PBS 洗涤 3 次以去除未标记同位素。靶细胞按 1×10^4/孔加入 96 孔 V 底细胞培养板中，设 3 复孔，效应细胞按效/靶细胞比例（E/T）12.5、25、50、100 加入靶细胞中，混匀，每孔终体积 200 μl。细胞培养板以 500 r/min离心 3 min，然后在 37 ℃、5% CO_2 条件下培养 4 h。培养结束后，每孔取 100 μl 上清液进行 γ 计数。靶细胞特异性溶破率计算如下：[（样本 γ 计数值 - 自发释放 γ 计数值）/（最大释放 γ 计数值 - 自发释放 γ 计数值）] × 100%。最大释放为靶细胞培养于 1 mol/L HCl 中；自发释放为靶细胞在含 10% FCS 的 RPMI1640 培养液中培养；其中自发释放计数值应低于最大释放计数值的 30%。以靶细胞特异性溶破率超过无关肽对照组 3 个标准差并高于 10% 为 CTL 应答阳性。

1.6 HBcAg18-27 特异性 $CD8^+$ CTL 定量检测

应用嵌合 HLA-$A2K^b$/$HBcAg_{18\text{-}27}$ 四聚体法定量检测 $HBcAg_{18\text{-}27}$ 特异性 $CD8^+$ T 细胞扩增[5]：脾细胞以 PBS 洗涤，计数，悬浮于 PBS 中，每管 1.0 ml。加入 25 μg/ml 四聚体在 37 ℃孵育 20 min，然后加入抗鼠 CD8 单抗室温孵育 20 min。然后收集细胞，洗涤 2 次，重悬于 300 μl PBS 中，进行 FACS 分选计数，共计数 5×10^5 细胞。结果以鼠 $CD8^+$ T 细胞群中四聚体结合细胞的比率表示。以黑色素瘤特异性抗原 $MART\text{-}1_{27\text{-}35}$ CTL 表位肽为无关对照肽。结果以超过无关肽组 3 个标准差并高于 0.1% $CD8^+$ T 细胞为阳性。

1.7　统计学分析

所有数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件包进行 t 检验。

2　结果

2.1　模拟肽抗原诱导的 Th1 极化

免疫结束后，取脾细胞进行抗原诱导淋巴细胞 Th1 极化分析。结果显示每个抗原肽均可诱导 IFN-γ 分泌细胞产生。阴性对照组小鼠基本未检测到抗原特异性 $CD8^+$ T 细胞，其IFN-γ 分泌细胞背景计数为(230 ± 54) ISC /10^6 PBMC。3 种抗原肽均可诱导较强的 $CD8^+$ T 细胞扩增，抗原 P1、P2、P3 免疫小鼠诱导产生的 IFN-γ 分泌细胞计数分别为(3 180 ± 536)、(3 667 ± 689) ISC/10^6 PBMC 和(8 025 ± 1 088) ISC /10^6 PBMC。

2.2　细胞毒活性检测

免疫结束后，取诱导活化的效应脾淋巴细胞，应用 4 h ^{51}Cr 释放实验进行肽抗原诱导 HBV 特异性细胞毒效应检测。结果显示，3 种抗原肽均能诱导 HBV 特异性 CTL 应答，其中以 P3 诱导的 HBV 特异性细胞毒活性最强，靶细胞溶破率在 E/T = 100 时，可达(52.7 ± 14.5)%。而 P1、P2 诱导产生的效应淋巴细胞的细胞毒效应显著低于 P3($P < 0.05$)，而且二者间无统计学差异($P > 0.05$)。无关肽抗原诱导的效应淋巴细胞未显示对靶细胞的 HBV 特异性细胞毒效应，见表 1。

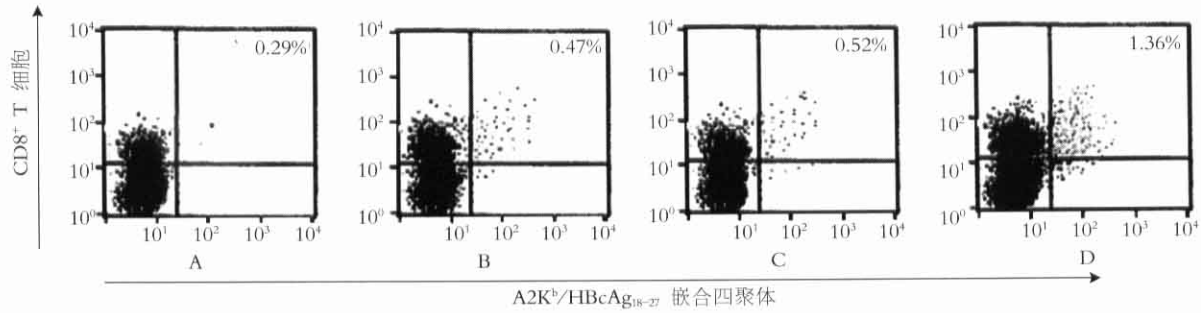
表 1　^{51}Cr 释放实验，抗原诱导的效应细胞对靶细胞的特异性溶破率($n = 12$, %, $\bar{x} \pm s$)

效/靶细胞比(E/T)	模拟抗原 P1	模拟抗原 P2	模拟抗原 P3	阴性对照
12.5	22.5 ± 7.1 [a]	23.3 ± 7.1 [a]	35.5 ± 8.9 [ab]	4.2 ± 0.8
25	29.6 ± 7.7 [a]	30.6 ± 8.9 [a]	41.3 ± 11.1 [ab]	6.5 ± 0.8
50	35.5 ± 11.7 [a]	38.9 ± 10.5 [a]	50.9 ± 13.1 [ab]	8.7 ± 1.1
100	38.3 ± 12.3 [a]	41.3 ± 13.3 [a]	52.7 ± 14.5 [ab]	9.7 ± 1.5

a：$P < 0.05$，与阴性对照比较；b：$P < 0.05$，与模拟抗原肽 P1、P2 比较

2.3　HBcAg18-27 特异性 $CD8^+$ CTL 定量检测

免疫结束后，取效应脾淋巴细胞，对抗原肽体内诱导 $HBcAg_{18-27}$ 特异性 $CD8^+$ T 细胞进行定量分析。在抗原肽 P1、P2、P3 免疫的小鼠脾细胞内，检测到 $A2K^b/HBcAg_{18-27}$ · $CD8^+$ T 细胞分别为 0.47%（4 700/10^6 PBMC）、0.52%（5 200/10^6 PBMC）和 1.36%（13 600/10^6 PBMC）。数据显示 3 种抗原均可在体内诱导 $HBcAg_{18-27}$ 特异性 $CD8^+$ T 细胞产生，以 P3 体内诱导产生的 $HBcAg_{18-27}$ 特异性 $CD8^+$ T 细胞数量显著高于 P1、P2（$P < 0.05$），抗原 P1、P2 相互间功能无显著差别，提示 P3 的设计使 CTL 短肽的免疫原性显著提高。在阴性对照/无关肽刺激组小鼠脾细胞内，未检测到 $HBcAg_{18-27}$ 特异性 $CD8^+$ T 细胞，其四聚体结合率低于背景(0.02%)，见图 1。



A：阴性对照小鼠；B：模拟抗原 P1 免疫小鼠；C：模拟抗原 P2 免疫小鼠；D：模拟抗原 P3 免疫小鼠

图 1　应用嵌合 $HLA\text{-}A2K^b$ 四聚体法定量检测 $HBcAg_{18-27}$ 特异性 $CD8^+$ T 细胞

3　讨论

HBV 特异性 $CD8^+$ CTL 在清除细胞内病毒感染过程中发挥关键作用。在 HBV 慢性感染过程中，低水平 HBV 特异性 $CD8^+$ CTL 应答使病毒得以持续存在。而设计新一代治疗性多肽激活 HBV 特异性 $CD8^+$ CTL 应答显然有助于 HBV 感染抑制和细胞内病毒感染的清除[1,3,6]。我们已经知道，在 HBV 慢性感染过程中，Th 细胞应答可能有所减弱，而 Th 细胞应答可调控 $CD8^+$ T 细胞应答的强度[3,4,7,8]。我们以前的研究以 $HBcAg_{18-27}$ CTL 表位和 $PreS_2$ B 细胞表位为基础，同时引入通用 Th 表位以辅助 T 细胞应答，设计、合成了基于上述免疫优势表位的模拟抗原肽，并经体内体外实验，筛选出了候选的治疗性多肽分子。本研究在原设计的基础上，在候选治疗性多肽分子氨基端引入新的连接顺序并连接脂质分子内佐剂，使多肽分子在水溶液中能以脂膜形式存在，降低多肽分子的降解速率，促进抗原分子与 APC 的细胞膜融合速率，以期能够进一步提高多肽免疫原性、降低免疫制剂的毒副作用。

经过数次加强免疫后，取小鼠新鲜脾淋巴细胞，应用 $HLA\text{-}A2K^b/HBcAg_{18-27}$ 嵌合四聚体分析所设计的模拟肽抗原诱导 HLA-A2 转基因小鼠淋巴细胞中 $HBcAg_{18-27}$ 特异性 $CD8^+$ T 数量。其结果因肽抗原不同而异。其中，最高 $HBcAg_{18-27}$ 特异性 $CD8^+$ T 细胞产生

比率为新设计模拟肽P3免疫的小鼠，显著高于抗原肽P2、P1免疫小鼠。抗原P2、P1也能诱导淋巴细胞中$HBcAg_{18-27}$特异性$CD8^+$ T细胞扩增，且相互间并无显著统计学差异。提示在候选治疗性多肽分子氨基端引入新的连接顺序并连接脂质分子内佐剂，能显著提高CTL短肽在体内的免疫原性。

在应用四聚体技术检测表达合适TCR的T细胞计数的同时，我们应用^{51}Cr释放实验和IFN-γELISpot实验分析所设计模拟肽诱导HBV特异性CTL应答和淋巴细胞Th1型极化的免疫学功能。结果显示$HBcAg_{18-27}$特异性$CD8^+$ T细胞的比率和前述免疫学功能密切相关。本研究所设计的模拟多肽均能在小鼠体内诱导淋巴细胞的Th1型极化及产生HBV特异性细胞毒效应，其中以含脂质分子内佐剂肽P3效应最高，P1和P2诱导淋巴细胞的Th1型极化及产生HBV特异性细胞毒效应功能的效率相对较低，提示该类结构设计能有效地驱动CTL增殖和T细胞向成熟杀伤细胞分化。而P3抗原的分子结构可能是其相对较高的免疫原性的基础：在免疫优势性CTL、B-、Th细胞表位合理组合与配置及短而高柔性的“铰链”连接顺序设计的基础上，在氨基端引入新的连接顺序并连接脂质分子内佐剂，可提高小分子多肽体内的有效呈递，或可促进$CD4^+/CD8^+$ T细胞直接识别并相互作用。实验结果同时表明，P3在体内具有高度免疫原性和HBV特异性，同时能避免CFA制剂的毒副作用，或可作为HBV治疗性多肽疫苗设计的基础。

参考文献：

[1] KAKIMI K, ISOGAWA M, CHUNG J, *et al*. Immunogenicity and tolerogenicity of hepatitis B virus structural and nonstructural proteins: implications for immunotherapy of persistent viral infections[J]. J Virol, 2002, 76(17): 8609-8620.

[2] SETTE A D, OSEROFF C, SIDNEY J, *et al*. Overcoming T cell tolerance to the hepatitis B virus surface antigen in hepatitis B virus-transgenic mice[J]. J Immunol, 2001, 166(2): 1389-1397.

[3] SHI T D, WU Y Z, JIA Z C, *et al*. Therapeutic polypeptides based on HbcAg(18-27) CTL epitope can induce antigen-specific $CD8^+$ CTL-mediated cytotoxicity in HLA-A2 transgenic mice[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(8): 1222-1226.

[4] SHI T D, WU Y Z, JIA Z C, *et al*. Therapeutic polypeptides based on HBV core 18-27 epitope can induce $CD8^+$ CTL-mediated cytotoxicity in HLA-$A2^+$ human PBMCs[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(13): 1902-1906.

[5] KUZUSHIMA K, HAYASHI N, KUDOH A, *et al*. Tetramer-assisted identification and characterization of epitopes recognized by HLA A*2402-restricted Epstein-Barr virus-specific $CD8^+$ T cells[J]. Blood, 2003, 101(4): 1460-1468.

[6] THIMME R, WIELAND S, STEIGER C, *et al*. $CD8^+$ T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection[J]. J Virol, 2003, 77(1): 68-76.

[7] LIVINGSTON B D, ALEXANDER J, CRIMI C, *et al*. Altered helper T lymphocyte function associated with chronic hepatitis B virus infection and its role in response to therapeutic vaccination in humans[J]. J Immunol, 1999, 162(5): 3088-3095.

[8] 石统东，吴玉章，周 伟，等. 多表位组合肽诱导HLA-A_2^+人PBMC产生抗原特异性$CD8^+$ T细胞应答的研究[J]. 第三军医大学学报，2003，25(12)：1045-1048.

（编辑 汪勤俭）

关于医学符号的使用

统计学符号不论用哪种字母，也不论大写或小写一律都用斜体。要注意区分拉丁字母和希腊字母。例如均数的符号是字母x，卡方的符号是希腊字母χ^2，自由度的符号是希腊文“υ”，不是拉丁文“V”。样本的相关系数是英文“r”，不能误为希腊文“γ”。

化学元素及核素在医学写作时一般多采用符号，都是拉丁字母正体大写。离子态是在右上角用数字加“-”或“+”表示。例如Na^+、Ca^{2+}、P^{3-}等等，不采用Ca^{++}、P^{---}、Al^{+3}、O^{-2}表示。核素的核子素（质量数）应写在元素符号的左上角，例如：^{131}I、^{32}P。表示激发状态的m写在右上角，例如：$^{99}Tc^m$、$^{113}In^m$。在科技论文和专著中不应写核素的中文名称，即不能写成^{131}碘、铟^{113m}、P^{32}、Tc^{99m}。

近几年分子生物学发展很快，并已渗透到许多学科，大多数分子生物学名词术语的符号已有统一的确定形式，要对符号的来源及其内涵有深刻的了解，使用时不致发生错误，例如：RNA有rRNA（ribosomal RNA）、tRNA（transfer RNA）、mRNA（messenger RNA）3类。r、t、m是表示类型的符号应小写，RNA应大写。

本刊编辑部