维普资讯 http://www.cqvip.com

重庆医科大学学报 1993年第18卷第4期

HBV衣壳抗原的免疫原性与免疫应答

病毒性肝炎研究所 杨 林 综述 张定凤 审校

中图分类号 R392

HBV 衣壳蛋白由具有共同羧基端序列的主S蛋白、中分子S蛋白、大分子S蛋白组成[1]。近年对其组成、免疫原性、免疫应答及调节的研究取得不少进展。

1. HBV衣壳蛋白的组成

HBV 衣壳蛋白为S区编码产物。基因克隆表明 HBV DNA L 链的S开放读码框架(ORF)有3个可转录起始密码 (ATG)，据此，S区分为S、$Pres_2$、$Pres_1$基因[2]。S基因编码226个氨基酸的主S蛋白 (SS，HBsAg，P24)，分子量24kd，糖基化形式27kd；S与 $Pres_2$ 基因编码中分子S蛋白 (MS，P33)，由S蛋白N-端连接55个氨基酸残基的$Pres_2$组成，不同程度糖基化分子量为30kd、33kd、36kd；S、$Pres_2$、$Pres_1$基因共同编码大分子S蛋白(LS，P39)，由MS蛋白N-端连接108(ayw)或119(adw) 个氨基酸残基组成，分子量39kd，糖基化形式42kd[1,2]。SS、MS、LS蛋白不仅组成完整HBV (Dane颗粒) 的外壳，也可以无病毒核心的管型、直径22nm球形HBsAg颗粒存在于HBV感染者血清中。在3种颗粒中，SS、MS和LS蛋白的比例不等。SS为3种颗粒的主要成份，每个 Dane 颗粒外壳含300—400个SS蛋白分子，40—80个MS、LS分子[3]。MS以5—10% 的比例存在于以上3种颗粒；LS在 Dane 颗粒外壳中占 0—20%，在22 nm 球形 HBsAg 颗粒中占 1—2% 或更少[4,5]。虽然MS、LS蛋白在Dane颗粒中比SS蛋白少得多，但对Dane颗粒形成是必须的。SS、MS 和LS 蛋白相互作用并和脂质连接，在其内侧形成直径与核心大小配比的凹陷，从而衣壳与核心组装，若缺少任何一种蛋白则外壳不能与核心颗粒组装[1]；另一模式认为$Pres_1$和/或$Pres_2$独特序列与核心颗粒相互作用从而外壳紧包核心颗粒[11]。研究发现$Pres_1$P6—9序列的内质网滞留信号，adw_2 $Pres_1$ N-端11个氨基酸残基的肉豆蔻化(myristylation)信号对外壳蛋白与核心颗粒结合，减少空心颗粒分泌至关重要[6]。

2. 抗原T、B细胞位点与免疫原性

SS 蛋白的抗原决定簇：SS 蛋白含主要抗原决定簇的亲水区位于32—76、110—156序列，赖氨酸对其抗原性至关重要[7]。合成肽免疫动物发现SS 蛋白2—16、22—35、48—81、95—109、139—147、139—158，145—158序列的相应抗体能 与 HBsAg 发生反应；HBsAg/P24的117—137、122—137环状肽免疫小鼠可产生与SDS 变性HBsAg/P24 相似特异性的抗体反应[7,8,9]，表明以上序列含HBsAg抗原决定簇。HOPP 等报道30—50%的 P141—146 免疫的小鼠产生抗-HBs，用McAb反应发现P141—146、P122—137含HBsAg a、y决定簇[7,10]。现多认为42—52(Val—Cys—Leu—Gly—Glu—Asn) 为T细胞决定基，122—137、117—37，139—147含T、B细胞决定基。

维普资讯 http://www.cqvip.com

Pre-s 蛋白抗原决定基：Pre-s_2的主要抗原决定簇位于120—153。其间120—135含T细胞决定基，133—145、133—139、137—145含抗体结合部位。Pre-$s_2$120—145注射的家兔均产生抗体，滴度高达$1—1.6\ 10^5$以上，较SS蛋白免疫后抗体滴度高400倍[11,12]。Itoh等报道Pre-s_2N-端14—32免疫的猩猩能耐受HBV攻击[13]，表明此段也含抗原决定簇，并能激发保护性抗体。Pre-s_1蛋白在T、B细胞水平为良好免疫原，能调节S、Pre-s_2蛋白的免疫应答[12,14]。免疫小鼠发现Pre-s_1P1—12、P12—32、P94—117肽能刺激T淋巴细胞增殖，提示以上区段含T细胞位点。现已明确12—21为T细胞位点，以第18、19位氨基酸残基最关键[14,15]。有报道Pre-s_1 12—32、32—53、41—53、94—105，106—117有抗体结合位点[14,15]。看来Pre-s_1有多个T、B细胞位点，并且T、B细胞位点不完全重叠。

HBV外壳抗原T、B细胞位点在人和小鼠的重叠度不很清楚，似乎抗体结合位点在人和小鼠是相似的，但不完全一致。Milich报道Pre-s_1 32—53、94—117含人和小鼠共同的抗体结合位点，而P1—12、P12—32仅是人的抗体结合位点[12,14]。限制T细胞抗原性的可能的化学及结构因素，MHC编码的Ⅱ类分子以及介导T细胞识别的机制在种系之间是保守的，提示T细胞位点在人和小鼠也可能是重叠的，已发现几个S蛋白的T细胞位点可同时激活人及鼠T细胞。但有人发现对多个人T细胞克隆是免疫决定簇的一个S区T细胞位点，在小鼠体内无活性。因此，人和小鼠的T、B细胞位点可能是部份重叠[12]。

3. 对HBV外壳抗原的免疫应答

对HBV外壳抗原的有效应答，自然感染HBV及外壳抗原免疫的人和动物大多能产生免疫应答。急性乙型肝炎患者在肝炎征象出现前30天即出现对Pre-s_1的T细胞应答，症状出现前10天出现对S蛋白的明显T细胞应答[16]。在潜伏期即出现抗-Pre-s_1，到急性期90%病例可测到抗-Pre-s_2，持续时间比抗-HBs长，部份病例出现抗-PHSA。约半数患者在恢复期、HBsAg转阴后出现抗-HBs，且机体对HBsAg的体液、细胞免疫应答能力平行[17]。从机体对S、Pre-s免疫应答出现的时间及抗体持续的长短提示Pre-s免疫原性强于S蛋白。

机体对HBsAg疫苗有良好免疫应答，但不同年龄个体应答能力有一定差异，新生儿、婴妇儿、健康成人注射三针后抗-HBs阳转率分别为70—90%、90%、90%，抗体持续4—5年[18,19,20]。40岁以上老年HBsAg免疫后抗-HBs滴度较低，女性应答能力比男性强。机体对HBsAg疫苗存在回忆反应，初次免疫后低抗-HBs或抗-HBs阴性者再次免疫后很快产生高水平抗-HBs。

免疫应答与保护作用　早在70年代就明确HBsAg（主S蛋白）能激发保护性免疫。近年发现Pre-s_2免疫的猩猩能耐受HBV攻击[11,13,21]；急性乙型肝炎患者常出现抗-Pre-s，而慢性患者常抗-Pre-s阴性[22]，提示对Pre-s的应答与病毒清除及机体抵抗力有关。Pre-s激发保护性免疫的机制还不很清楚。由于Pre-s_2与肝细胞膜上有多聚人血清白蛋白（PHSA）受体（PHSAR），以PHSAR为介导Pre-s_2参与HBV对肝细胞的吸附[23]；已明确Pre-s_1 21—47有与肝细胞结合的位点[24]。因此，抗-Pre-s_2（包括抗-PHSAR）、抗-Pre-s_1封闭PHSAR与Pre-s_1 21—47而阻止HBV对肝细胞的吸附浸入起到保护作用。此外，Pre-s特异细胞免疫也与肝细胞内HBV清除有关。同时，Pre-s调节机体对S蛋白的免疫应答，产生有效抗-HBs也可能是Pre-s激发保护性免疫的原因。

HBV外壳抗原的无应答　临床发现慢性乙型肝炎患血常无抗-Pre-s_1[22]，慢性HBV携带者常无抗-HBs。10—25%新生儿，

维普资讯 http://www.cqvip.com

5—20%健康成人对HBsAg疫苗无应答[26]。部份S蛋白免疫的小鼠无抗-HBs。表明存在对HBV外壳抗原无应答。

机体对HBV外壳抗原无应答分特异性与非特异性。特异性无应答的原因很多，既有机体因素，也有病毒的因素，还受免疫遗传的控制。其机制不很清楚。Watanbe等[25]报道HBsAg无应答者外周血细胞去除CD_8^+细胞（Ts/Tc）后能对HBsAg刺激产生增殖反应并产生抗-HBs。说明HBsAg特异性CD_8^+细胞抑制作用增强参与HBsAg无应答。而Egea等发现HBsAg无应答者外周血去除Ts不能逆转HBsAg无应答，提出T细胞在发育过程中存在MHC决定的T异质性缺陷，或MHC Ⅱ类分子与呈递抗原不能发生相互作用，以致不能活化HBsAg特异CD_4^+(TH)细胞，导致无应答[25]。除Ts或T_H异常外，HBsAg特异B细胞缺陷也可能是对HBsAg无应答的原因[28]。

小鼠和人体对HBV外壳抗原的应答受主要组织相容性复合体（MHC）的限制[12,25]，这种限制导致机体对HBV外壳抗原的应答呈高、中、低或无应答的差异。应答是显性性状，无应答是隐性性状。无应答者呈现不同MHC单位型。日本部份无应答者为HLA-Bw54、DRw53、DR4单倍性，其免疫抑制基因为杂合子，无应答为显性遗传[25]。Egea报道美国HBsAg无应答者为HLA-B8、B44、DR3、DR7单倍型，其免疫抑制基因为纯合子，无应答为隐性遗传[25]。另报道无应答者以HLA-DR3、DR7单倍型最高[27]。表明HBV外壳抗原无应答还受宿主免疫遗传的控制。MHC限制的免疫无应答的机制不很清楚，可能是HBV外壳抗原呈递给T细胞障碍或免疫活性细胞亚群改变所致，或MHC Ⅱ类蛋白DR抗原性改变所致[28]。

近期发现HBV DNA变异也与HBV外壳抗原免疫无应答的发生有关。HBV核壳体是T细胞的主要靶抗原，分泌性HBeAg通过对在免疫识别中起主要作用的细胞因子的下行调节而影响免疫系统对HBV抗原的免疫应答，HBeAg缺陷HBV感染由于缺乏HBeAg的调节作用导致对包括外壳在内的HBV抗原耐受。Pre-s、C、Pre-c变异导致Pre-s蛋白、核壳体抗原性改变，而对S蛋白的调节减弱亦可导致HBsAg无应答[12,15]。HBV DNA变异导致无应答的机制还不很楚，可能是DNA变异后的抗原缺陷导致HBV抗原在免疫应答水平的相互调节作用减弱或失去调节作用之故。

此外，感染HIV、恶性肿瘤患者、免疫抑制剂的应用导致机体免疫抑制或缺陷，而对HBV外壳抗原产生非特异性免疫无应答

4、HBV衣壳抗原免疫应答的MHC调节

机体对HBV衣壳抗原的免疫应答受MHC的限制[12,25]。免疫小鼠发现对S、Pre-s_1、Pre-s_2抗原的应答独立地受H-2的调节[14]，不同H-2单倍型鼠株对HBV外壳抗原的应答能力不等。HBsAg/P24、P33、P39分别免疫同系$H-2^{d,b,k,s,q,f}$小鼠发现，$H-2^{q,d}$株对HBsAg/P24高应答，其应答能力$H-2^a>H-2^b>H-2^k$均为中度应答，$H-2^{f,s}$无应答；对Pre-s_2应答能力$H-2^b>H-2^d=H-2^s>H-2^k$株，仅$H-2^f$株无应答，包括原来S抗原无应答株$H-2^f$，所有株均对S产生应答；对Pre-s_1各株均产生应答，其应答能力$H-2^b=H-2^f>H-2^k>H-2^s>H-2^d$株，包括原来S、Pre-$s_2$无应答株均产生抗-S、抗-Pre-$s_2$[12]。表明Pre-s对S蛋白应答、Pre-$s_1$对Pre-$s_2$应答有调节作用。其机制可能是Pre-$s_1$活化Th能辅助Pre-$s_2$、HBsAg特异B细胞产生相应抗体。人体对HBV外壳抗原的应答受HLA限制，不同HLA单倍型应答能力不等[25]。

5、HBcAg对HBV外壳抗原免疫应答的调节

HBcAg具有高度免疫原性，在T细胞

维普资讯 http://www.cqvip.com

水平为一有效免疫原，能通过T细胞依赖和非依赖两种途径诱导抗体反应。鼠抗体产生的比较性研究显示在所有试验品系中，抗-HBC明显强于抗-HBs（至少80倍）[12]，H-2相关基因影响抗-HBc反应，但未发现无反应品系。近年发现HBcAg还对HBV外壳抗原的免疫应答有调节作用[13]。

Milich等用HBcAg致敏于鼠B10.S，然后用HBcAg/P39混合物免疫小鼠，该小鼠无抗-HBs产生，而用完整HBV颗粒免疫小鼠B10.S，该鼠产生了抗-S、抗-Pre-s_1、抗-Pre-s_2；用HBcAg T位点P120—140代替HBcAg得到同样结果[12]。进一步将鼠B10.S的HBcAg T细胞位点P120—140与Pre-s_2 B细胞位点P133—140偶联后免疫小鼠B10.S，实验小鼠产生抗-Pre-s_2，而单独P133—140免疫小鼠无抗-P133—140产生[12]。表明HBcAg活化Th细胞能辅助B细胞对HBV外壳抗原的免疫应答，且这种调节作用不一定要HBcAg与HBV外壳抗原在同一分子，只需在同一颗粒，识别单个T位点的Th能辅助多个特异B细胞对HBV外壳抗原的免疫应答，HBcAg似乎能打破小鼠对HBV外壳抗原无应答。

HBcAg特异Th细胞辅助B细胞对HBV外壳抗原应答的机制还不很清楚，Lake等的分子间—结构内作用学说（Intermolecular-Intrastructural）[29,30]为其可能作用基础。该学说认为病毒等颗粒性抗原，T、B细胞的相互作用并不完全遵从T、B细胞位点必须在同一分子的载体效应学说。对含多个抗原分子的颗粒性抗原，当某抗原被B细胞特异识别后，该B细胞将颗粒内吞，然后该B细胞表面表达该颗粒所有抗原的T细胞位点，这些位点作为配体识别特异T细胞。据此理论，HBcAg与HBV外壳抗原在同一颗粒时，HBsAg特异B细胞通过对HBV外壳抗原B位点的识别，将该颗粒内吞，并在该B细胞表面呈现HBcAg及HBV外壳蛋白T位点，然后活化HBcAg特异Th细胞（受MHC限制），由于HBcAg在T细胞水平为强免疫原，该Th细胞辅助该B细胞（内吞颗粒抗原的HBsAg特异B细胞）对HBV外壳抗原的体液免疫应答。

结语 HBV外壳抗原是HBV重要抗原之一，能激发保护性免疫。其Pre-s的免疫原性较强且能调节S蛋白的免疫应答，提示含Pre-s的乙肝疫苗效果更佳。机体对HBV外壳抗原的应答能力不等，无应答的机制还不很清楚，特异性Ts细胞作用增强、Th细胞功能减弱、特异性B细胞缺陷、MHC限制的免疫遗传、HBV DNA变异、宿主非特异性免疫抑制或缺陷等均参与无应答的发生。因此，应针对不同原因采取措施克服免疫无应答。而HBV核壳体抗原（HBcAg）特异Th能辅助B细胞对HBV外壳抗原的免疫应答，从而打破机体对HBV外壳抗原的免疫耐受，提示HBcAg或合成的T细胞位点可作为T细胞载体，通过化学或基因重组方法与HBsAg或HBsAg B细胞位点甚至Pre-s偶联，制备免疫原性更强的HBsAg复合抗原，以克服机体的HBsAg耐受、产生有效抗-HBs以清除病毒。这对慢性HBV感染者的免疫调节治疗及研制免疫原性更强的新一代乙肝疫苗以控制HBV感染有重要意义。

参 考 文 献

[1] Ueda K, et al. J Virol 1991; 65(7): 352

[2] Milich DR, et al. J Immunol 1986; 137(8): 2703

[3] Heermann KH, et al. J Virol 1984; 52(2): 396

[4] Yu Xianming, et al. Virol 1991, 181: 386

[5] Gerber MA, et al. Hepatol 1989; 9(2) 328

[6] Prange R, et al. J Virol 1991; 65(7): 3919

[7] Bhatnagar PK, et al. Proc. Natl. Acad.

维普资讯 http://www.cqvip.com

Sci.USA 1982; 79: 4400
[8] Lerner RA, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1981; 78(6): 3403
[9] Dreesan GR et al. Nature 1982; 295 (14): 158
[10] Prince AM, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, 79: 579
[11] Neurath AR, et al. Molecular Immunol 1987; 24: 975
[12] Milich DR, et al. Immunol Today 1988, 9(12): 380
[13] Hoh Y, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986; 83: 9174
[14] Milich DR, et al. J Immunol 1986; 137 (1): 315
[15] Milich DR, et al. J Immunol 1987; 138 (12): 4457
[16] 张定凤. 国外医学流行病学传染病学分册 1988, 4: 162
[17] 张定凤. 乙型病毒性肝炎的免疫发病机理及临床 第二版 重庆科技文献出版社 1988
[18] Weeley SM, et al. J Med Virol 1990, 30: 113
[19] Ton SH, et al. Indian J Med Res 1988; 87: 542
[20] Yoshida K, et al. J Gastroenterol Hepatol 1990; 5: 126
[21] Brown JL, et al. Hepatol 1992; 15(1): 144
[22] Iman L, et al. J Hepatol 1987; 4: 22
[23] Ohnuma H, et al. Gastroenterol 1986; 90(3): 695
[24] Neurath AR, et al. Cell 1986; 46: 429
[25] Egea E, et al. J Exp Med 1991; 173: 531
[26] Zhang Ding-feng, et al. Chinese medical J 1987; 100(4): 338
[27] Craven DE, et al. Ann Intern Med 1986; 105: 356
[28] Weissman JY, et al. JAMA 1988, 260 (12): 734
[29] Mlich DR, et al. Nature 1987, 329(8): 547
[30] Ferrari C, et al. Viral Hepatitis and Liver Diseases, Baltmore, Williams & Wilkins, 1991, 238

(收稿日期 1992-11-10)

(上接274页)

DETERMINATION OF THE ZINC CONCENTRATION AND THE RETAINED ZN IN RATS WITH HEPATIC COMA

Zeng Zhaochun, et al

Dept. of Biochemistry

The zinc concentrations and the ^{65}Zn retained in some tissues of the rats with hepatic coma induced by CCl_4 were measured, the results were that compared with control zinc concentrations in the brains and livers of the rats with hepatic coma decreased significantly, those in hearts and kindeys were no difference, and that ^{65}Zn retained in the tissues of the rats with hepatic coma were similar to that of the control. The relationship between the result and hepatic coma were discussed

KEY WORDS Hepatic coma, Zinc concantration, Retained ^{65}Zn