DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.24.032
第26卷第24期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 24
2254 2004年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)24-2254-04

HCV高变区1串联模拟表位基因免疫研究

赵 军,李 靖,陈 昊,舒翠莉,高 蓉,李伯安,何卫平,迟淑萍,程 云 (解放军第302医院传染病研究所免疫室,北京 100039)

提 要:目的 研究丙型肝炎病毒(HCV)高变区1(HVR1)串联模拟表位基因免疫在BALB/c小鼠体内引起抗体产生的特点。方法 针对中国人群HCV HVR1位中6个较保守的AA位点设计并合成多肽表位,从中筛选活性最好的肽1、5、6、7构建含4条多肽编码基因的表达载体。将HCV HVR1串联模拟表位表达载体对小鼠股四头肌直接免疫,采用ELISA法检测小鼠血清内抗体的产生,并将免疫血清与一系列基于本室对HVR1氨基酸序列的分析结果合成的多肽进行反应,分析免疫血清对这些多肽的交叉反应性。结果 免疫血清同编码的各合成肽都有较好的反应性,其中对肽1反应最好。免疫血清同合成的4条HVR1全序列多肽及其他非编码HVR1多肽有较好的反应性。结论 基因免疫能够在小鼠体内引起表位特异性抗体的产生。此串联表位设计引起的体液免疫反应对HCV HVR1合成肽有较好的交叉免疫反应。

关键词:丙型肝炎病毒高变区1;模拟表位;基因免疫;交叉反应
中图分类号:R373.21;R392-33;R392.2 文献标识码:A

DNA immunization of mice with plasmid encoding mimic epitopes of hypervariable region 1 of hepatitis C virus

ZHAO Jun, LI Jing, CHEN Hao, SHU Cui-li, GAO Rong, LI Bo-an, HE Wei-ping, CHI Shu-ping, CHENG Yun (Department of Immunology, Institute of Infectious Diseases, No. 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China)

Abstract: **Objective** To study the characteristics of the humoral responses induced by mimic epitopes of the hypervariable region 1 of hepatitis C virus by DNA based immunization. **Methods** Mimic epitopes were designed and constructed according to 6 conservative AA of HCV HVR1 in Chinese population and 4 most active ones were chosen to construct plasmid. The plasmids were then intramuscularly injected into BALB/c mice to induce immune reaction and ELISA was used to detect the specific antibodies. The crossover reactions between the immunological serum and polypeptides of HVR1 were also observed. **Results** Mice serum had good reactivity with all mimic epitopes with No. 1 peptide being the best. Good reactivity was also found between the 4 synthesized HVR1 complete polypeptides and other non-HVR1 encoded polypeptides. **Conclusion** DNA immunizaition can produce specific antibodies in BALB/c mice. The immunological serum in this study has good crossover reation with HCV HVR1 peptides.

Key words: hypervariable region 1 of hepatitis C virus; mimic epitope; DNA immunization; cross-reaction

丙型肝炎病毒(HCV)是慢性肝病的主要病原,全球大约有1.7亿的HCV感染者,70%以上转为持续感染,其中发展为肝硬化和肝细胞癌的比例也甚高。由于机体对HCV感染缺乏有效的保护免疫,人体对异源甚至同源HCV均可发生重复感染,它的慢性化机制仍然不十分清楚。HCV有着极高的变异率,这也成为它逃避人体免疫监视的一个重要原因。大量的研究[1~3]表明E2区N端的高变区1(HVR1)的AA384~410含有HCV主要中和表位,而且抗HCV HVR 1的抗体与其他不同亚型的HCV HVR1有不同程度的交叉反应,并认为这种现象的分子基础是HVR1中的保守基团[4]。本室通过对中国人HCV Ⅱ/1b以及Ⅲ/2a型HVR 1序列变异的动态观察,发现中国人群HCV HVR1位中有6个较保守的AA位点[5,6]。我们以此为基础,通过计算机模建分析设计并合成了一系列多肽表位,并对这些合成肽的活性作了系列研究,从中筛出了活性最好的肽1、5、6、7。

本研究合成了包含所有具有良好活性的HVR1模拟表位的串联基因,构建了表达此基因的pcDNA3.1质粒,并进行了小鼠体内的DNA免疫研究。

基金项目:军队医学科研课题青年基金(02M016)
Supported by the Scientific Research Foundation for the Youth of PLA (02M016)
作者简介:赵 军(1968-),男,安徽省寿县人,博士,主治医师,主要从事传染病学和细胞免疫学研究,发表论文10余篇。电话:(010)66933192
通信作者:程 云,电话:(010)66933313,E-mail:yuncheng21@yahoo.com
收稿日期:2004-05-16;修回日期:2004-10-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

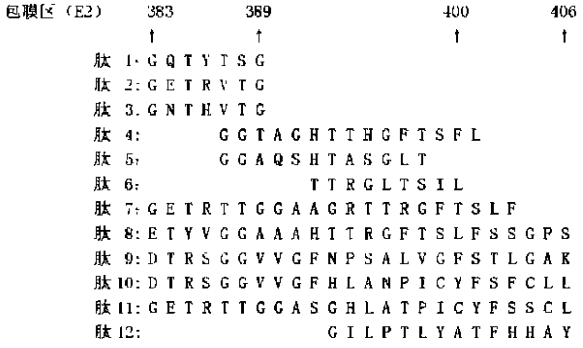
1　材料和方法

1.1　实验动物

10 只 BALB/c 小鼠, 体质量(15.32±0.71) g, 均为雄性 6 周龄, 购自军事医学科学院实验动物中心。

1.2　合成肽制备

用413A 型自动合成仪(PE 公司产品)合成。各种合成肽的序列如下:



合成肽产品经高压液相色谱(HPLC)分析进行纯度鉴定, 纯度均大于 95%, 符合设计要求。其中肽 6、7、8、9 覆盖 HVR1 全长, 且与肽 5 序列差异大于 50%。

1.3　目的基因的合成

目的基因由上海生物工程公司合成, 序列如下: GGA TCC ATG GGC GAG ACT CGT ACT ACC GGC GGT GCG GCC GGT CGT ACT ACC CGT GGC TTC ACT AGC TTG TTC GGT CAA ACT TAC ACT TCC GGC GGT GGT GCT CAG TCT CAC ACC GCT TCT GGC CTG ACC ACT ACT CGT GGT CTG ACC TCT ATC CTG GGT GAA ACC CGT ACC ACT GGT GGC GCT GCG GGC CGT ACC ACT CGT GGC TTT ACC TCC CTG TTC GGC CAG ACC TAT ACC AGC GGT TCT TTC GCT ATC AAA TGG GAA TAC ATC CTG CTG CTG TTC CTG CTG CTG GCT GAC GCT CGT GTT TGC GCT TGC CTG TGG ATG ATG CTG CTG TAA GAA TTC。上游酶切位点: *Bam*HⅠ; 下游酶切位点: *Eco*RⅠ。

目的基因代表的氨基酸序列如下:



我们将肽 1、5、6、7 串联起来, 并且将抗原性最好的肽 1 和肽 7 重复了两次。为了提高目的基因的抗原性, 以及促进抗原合成后的分泌, 在片段的尾部增加了 HCV E2 蛋白的跨膜区序列。

1.4　免疫质粒的构建

目的基因经限制性内切酶 *Bam*HⅠ 和 *Eco*RⅠ 酶切及电泳回收, 与经相同酶切的 pcDNA3.1 表达载体连接。转化至 JM109 大肠杆菌株, 克隆扩增后, 对阳性克隆提取纯化质粒, 并进行酶切鉴定。所用质粒纯化试剂盒及 *Bam*HⅠ 和 *Eco*RⅠ 酶均为 Promega 公司产品。

1.5　质粒 DNA 免疫

10 只雄性 6 周龄 BALB/c 小鼠被分为 2 组, 5 只编入实验组, 5 只编入对照组, 对实验组小鼠股四头肌肌内注射 1 mg/ml 的 pcDNA3.1-目的基因质粒 100 μl, 对照组以同样剂量注射 pcDNA3.1 质粒。分别在第 3 周和第 6 周以同样的剂量加强免疫。对小鼠每周采用剪尾取血, 并在第 7 周对小鼠进行眼内眦取血, 收取血清－20℃保存待测。

1.6　多肽免疫

另设 4 组(每组 5 只小鼠)为多肽免疫组, 第 1 次免疫合成肽用量为 50 μg, 将弗氏完全佐剂与各合成肽抗原各 50 μl (1 mg/ml)等体积混合, 用微量搅拌器充分混匀, 多点注射小鼠足垫。2 周后进行第 2 次免疫, 即加强免疫。用同样的合成肽量, 改用弗氏不完全佐剂, 注射剂量和方法同上。免疫 2 周后冲击免疫, 用 PBS 200 μl 溶解 20 μg 的合成肽, 经脾内直接注射。加强免疫 3 d 后, 收取血清－20℃保存待测。

1.7　抗体检测

采用 ELISA 法, 分别用上述合成肽作为抗原包被聚丙乙烯微孔条, 包被浓度为 100 μg/ml, 以 100 μl/孔包被, 4℃过夜。加 120 μl 10% FCS-PBS 37℃封闭 2 h。先后加入免疫小鼠血清(1∶100 稀释, 37℃孵育 1 h)和酶标羊抗鼠 IgG(1∶1 000, 孵育同上)。最后每孔加入底物 A、B 液各 50 μl, 置暗处放 5 min, 检测 450 nm 波长下的光密度(*D*)值。阴性对照采用 3 只正常小鼠血清相同倍数稀释, 检测方法同上。

1.8　抗体滴度检测

将基因免疫各时间段血清进行稀释(1∶100, 1∶200, 1∶300, 1∶400, 1∶500, 1∶600, 1∶700, 1∶800)同各合成肽进行 ELISA 反应, 具体方法同上。Cutoff 值定义为(实验孔 *D*－本底 *D*)/(阴性对照 *D*－本底 *D*)＞2。

1.9　统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 Stata 统计软件行方差分析和组间多重比较。

2　结　果

2.1　免疫质粒的酶切鉴定

对构建的 pcDNA3.1-目的基因质粒进行 *Bam*HⅠ 和 *Eco*RⅠ 酶切。将酶切产物进行 2% 琼脂糖电泳后, 在 330 bp 左右出现目的条带, 测序后与设计序列相同。

2.2　ELISA 法检测抗体

将免疫 7 周后血清 1∶100 稀释后与编码各肽进行 ELISA 反应。此次基因免疫在小鼠体内有效地引起了针对其中编码的各个表位的抗体产生, 其中尤以肽 1 特异性抗体最为明显, 见表 1。将免疫 7 周后血清 1∶100 稀释后与其他非编码多肽进行 ELISA 反应, 结果表明基因免疫鼠血清同大多数非编码多肽反应阳性, 见表 2。

表 1　基因免疫血清同各多肽反应 D_{450} 值 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　D_{450} value of serum reaction with mimic epitopes ($\bar{x}\pm s$)

Group	Peptide 1	Peptide 5	Peptide 6	Peptide 7
Experimental	0.178±0.019**△△	0.165±0.010**△△	0.149±0.013**△△	0.137±0.009**△△
pcDNA3.1	0.013±0.009	0.024±0.011	0.031±0.010	0.030±0.013
Normal control	0.025±0.010	0.019±0.011	0.026±0.011	0.021±0.010

**: $P<0.01$, *vs* pcDNA3.1 group; △△: $P<0.01$, *vs* normal control group

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 2 免疫血清同其他非编码多肽反应的 D_{450} 值（$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 D_{450} value of serum reaction with other non-HVR1 encoded mimic epitopes（$\bar{x}\pm s$）

Group	Peptide 2	Peptide 3	Peptide 4	Peptide 8	Peptide 9	Peptide 10	Peptide 11	Peptide 12
Experimental	0.109±0.01 **△△	0.090±0.02 **△△	0.076±0.01 **△△	0.094±0.01 **△△	0.045±0.01 **△△	0.027±0.00 **△△	0.044±0.01 **△△	0.051±0.01 **△△
pcDNA3.1	0.024±0.02	0.028±0.03	0.019±0.01	0.028±0.01	0.019±0.02	0.019±0.01	0.012±0.02	0.024±0.01
Normal control	0.021±0.009	0.031±0.007	0.026±0.01	0.023±0.005	0.026±0.01	0.017±0.00	0.020±0.011	0.019±0.00

**：$P<0.01$，*vs* pcDNA3.1 group；△△：$P<0.01$，*vs* normal control group

2.3 基因免疫产生各肽特异性抗体滴度随时间变化

对表位特异性抗体滴度的持续观察结果表明，抗体滴度随着免疫时间的延长逐渐升高，并在两次加强免疫后出现了明显提升（图 1）。

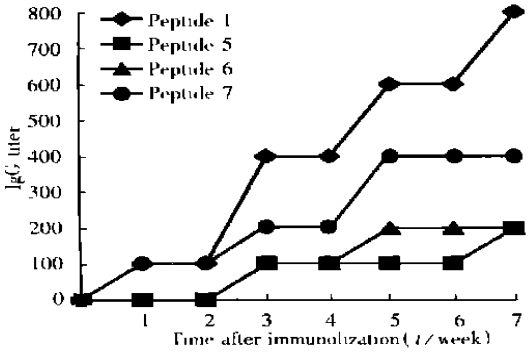


图 1 各多肽特异性抗体滴度随时间变化的曲线

Fig 1 Time-curve of titer of special IgG antibody against different epitopes

2.4 E 基因免疫组和多肽免疫组各表位特异性抗体的滴度

结果表明基因免疫组产生的针对各多肽的抗体滴度分别为：肽 1，1∶800；肽 5，1∶200；肽 6，1∶200；肽 7，1∶400。多肽免疫组分别为：肽 1，1∶100；肽 5，1∶50；肽 6，1∶50；肽 7，1∶50。

3 讨论

近来对基因免疫的研究表明基因免疫能够在实验小鼠体内引起针对一些病毒蛋白的特异性的细胞及体液免疫反应。这包括流感病毒 A、HIV-1、HBV 等多种病毒[7~9]。对于 HCV 基因免疫方面的研究是近几年的一个热点[10~12]，虽然这种方法仍存在着一些缺陷，比如安全性等问题，它仍然被认为是治愈慢性病毒感染非常有希望的一种方法。但是对 HCV HVR1 的基因免疫方面的研究较少，在本研究中我们通过将合成的串联 HCV 高变区 1 模拟表位基因序列插入真核表达载体 pcDNA 3.1，构建了重组质粒 pcDNA3.1-目的基因。直接免疫小鼠股四头肌，并对小鼠体内的抗体的产生及其特点进行了研究，对 HCV HVR1 模拟表位基因免疫作为 HCV 疫苗的价值和前途进行初步的探讨。

DNA 免疫能够诱导针对许多病毒的较强的抗体反应[11]。但是对于 HCV 的研究结果通常是诱导抗体反应的能力弱，而且产生的抗体通常是 IgM，而诱导 IgG 抗体产生的能力差[12]。与这些研究结果相反，在本研究中我们观察到在重组 pcDNA3.1-目的基因免疫后产生了显著的抗 HCV HVR1 模拟表位的 IgG 水平升高，而且远远高于多肽直接免疫诱导抗体的水平。分析产生抗体的水平，我们发现肽 1 和肽 7 抗体水平要远高于肽 5、6 抗体水平。这与先前对这些多肽活性研究的结果是一致的。尤其是肽 1，在 HCV 阳性血清交叉反应性、小鼠免疫原性、体外刺激 HCV 感染患者 PBMC 增殖活性等（结果未显示）能力上都表现出最好的活性，值得作进一步的研究。我们设计的重组载体的免疫效果要优于多肽直接免疫，推测这可能是由于：①串联处理增强了表位的浓度与密度，增加了重组抗原反应的范围。②在设计时人为加入了 HCV 包膜蛋白 2 跨膜区以增强目的抗原的分泌。值得注意的是在设计目的片段的过程中在表位间并没有设计蛋白 linker，这仍然没有影响各个表位抗体的产生。这提示表位串联后没有改变各自的抗原性，从一个侧面证实了 HVR1 抗原表位是线形的、分散的假说。HVR1 抗原表位间存在着较强的交叉免疫性，本实验中我们合成了其他 HVR1 多肽，其中肽 8、9、10、11 分别为 HVR1 全序列多肽。它们与各个串联表位间在氨基酸序列上存在较大的差异，但是小鼠血清对除肽 10 以外的所有 HVR1 表位都有较好的反应性，这说明 pcDNA3.1-目的基因在小鼠体内引起了交叉反应抗体的产生。这对于诱发产生针对广泛亚型的免疫反应的 HCV 亚基疫苗的设计思路有重要的提示作用。

参考文献：

[1] Cho J H, Lee S W, Sung Y C, *et al*. Enhanced cellular immunity to hepatitis C virus nonstructural proteins by codelivery of granulocyte macrophage-colony stimulating fact or gene in intramuscular DNA immunization[J]. Vaccine, 1999, 17(9-10): 1136—1144.

[2] Lee S W, Cho J H, Sung Y C, *et al*. Optimal induction of hepatitis C virus envelope-specific immunity by bicistronic plasmid DNA inoculation with the granulocyte-macrophage-colony stimulating factor gene[J]. J Virol, 1998, 72(10): 506—512.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[3] June G H, Bluestone J A, Nadler L M, *et al*. The B7 and CD28 receptor families[J]. Immunol Today, 1994, 15(7): 321—331.

[4] Zhang X X, Deng Q, Zhang S Y, *et al*. Broadly cross-reactive mimotope of hypervariable region 1 of hepatitis C virus derived from DNA shuffling and screened by phage display library[J]. Biotechnol Appl Biochem, 2002, 35(Pt 3): 205—212.

[5] 赵　军,程　云,张鸿飞,等.北京地区46例Ⅱ/1b型HCV高变区I的序列变异研究[J].中华肝脏病杂志, 1999, 7(1): 88—90.

[6] 赵　军,程　云,苏　琴,等.20例中国人HCVⅡ/1b型高变区1序列变异的动态观察[J].中华微生物和免疫学杂志, 2000, 20(4): 507—510.

[7] Hu G J, Wang R Y, Han D S, *et al*. Characterization of the humoral and cellular immune responses against hepatitis C virus core induced by DNA-based immunization[J]. Vaccine, 1999, 17(23-24): 3160—3170.

[8] Ulmer J B, Donnelly J J, Parker S, *et al*. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein[J]. Science, 1993, 259(5102): 1745—1749.

[9] Wang B, Uren L E, Srikantan V, *et al*. Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type I [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90(9): 4156—4160.

[10] Duenas-Carrera S, Alvarez-Lajonchere L, Cesar Alvarez-Obregon J, *et al*. Enhancement of the immune response generated against hepatitis C virus envelope proteins after DNA vaccination with polyprotein-encoding plasmids[J]. Biotechnol Appl Biochem, 2002, 35(Pt 3): 205—212.

[11] Michel M L, Davis H L, Schleef M, *et al*. DNA-mediated immunization to hepatitis B surface antigen in mice: aspects of the humoral response mimic hepatitis B virus infection in human[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(12): 5307—5311.

[12] Youn J W, Park S H, Cho J H, *et al*. Optimal induction of T-cell responses against hepatitis C virus E2 by antigen engineering in DNA immunization[J]. J Virol, 2003, 77(21): 11596—11602.

（编辑　汪勤俭）

欢迎订阅《组织工程与重建外科》杂志

《组织工程与重建外科》杂志是由上海第二医科大学主办的综合性医学学术期刊,标准刊号:ISSN 1673—0364,国内外公开发行。本刊是组织工程学和整形重建外科的专业学术期刊,以组织工程研究人员和广大整形重建外科医师为主要读者对象。报道组织工程及其相关领域、美容外科、颅面外科、眼科、口腔颌面外科、四肢显微外科、骨科的临床及基础研究成果,并及时介绍整形重建外科的重大进展、新技术和新动态,力求科学性、实用性。本刊辟有论著、论著摘要、病例报告、经验交流、讲座、综述、国内外学术动态、会议纪要等栏目。适合广大医务人员、科研工作者、相关研究院所、医院图书馆、高等院校图书馆订阅。本杂志为双月刊,大16开本,60页,每期定价:8元,全年48元。订阅可通过邮局汇款

地　址:上海市制造局部639号上海第九人民医院《组织工程与重建外科》编辑部
邮　编:200011　　电　话:(021)63138341
传　真:(021)53078128　　E-mail:zhongbin93@yahoo.com.cn

欢迎订阅《第三军医大学学报》

《第三军医大学学报》为国内外公开发行的综合性医药卫生类学术刊物。先后被确定为《中国科技论文统计源期刊》和中国自然科学类核心期刊;并被《俄罗斯文摘杂志(AJ)》和《美国化学文摘(CA)》及国内所有相关收录机构所收录。2003年荣获第二届国家期刊奖百种重点期刊。

本刊登载校内外广大医疗、教学、科研工作者在医药科研领域中所取得的新理论、新成果、新经验、新技术、新方法。主要栏目设有:专家论坛、基础医学、临床医学、军事医学、预防医学、综述、技术方法、经验与短篇等。

本刊为半月刊,铜版纸彩色印刷,大16开,96页,每期定价10.00元,全年240.00元。国内统一刊号:CN51—1095/R,国际标准刊号:ISSN 1000—5404,国内邮发代号:78—91,国外邮发代号:M6529。请及时向当地邮局订阅,漏订读者可直接汇款至我刊编辑部。

地　址:重庆市高滩岩《第三军医大学学报》编辑部　　邮　编:400038
联系人:王　红　曾　颖　　电　话:(023)68752187,68752189
E-mail:aammt@mail.tmmu.com.cn

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net