DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.10.010
第22卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 10
2000年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2000

文章编号:1000-5404(2000)10-0943-03

论著

噬菌体呈现疫苗诱导乙型肝炎病毒特异性细胞毒性T细胞反应

万 瑛,吴玉章,边 疆,王祥智,周 伟,贾正才,唐 燕,周丽芸 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研究噬菌体呈现颗粒作为亚单位疫苗是否能在体诱导乙型肝炎特异性细胞毒性T细胞反应。方法 构建呈现MHC I类分子(H-2^d)限制性表位$HBs_{28\sim39}$的噬菌体颗粒,小剂量、无佐剂接种BALB/c(H-2^d)小鼠。结果 重组噬菌体呈现颗粒在体诱导H-2^{d}限制的$HBs_{28\sim39}$特异性细胞毒性T细胞反应。结论 丝状噬菌体呈现疫苗有效诱导细胞毒性T细胞反应,能用于发展抗病毒疫苗。

关键词:疫苗;细胞毒性T细胞;丝状噬菌体;乙型肝炎
中图法分类号:R373.21;R392.7 文献标识码:A

Induction of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocyte responses by filamentous phage display vaccine

WAN Ying, WU Yu-zhang, BIAN Jiang, WANG Xiang-zhi, ZHOU Wei, JIA Zheng-cai, TANG Yan, ZHOU Li-yun (Insititute of Immunology PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the possible usage of a recombinant filamentous phage displaying a MHC class I restricted epitope as a subunit vaccine to induce hepatitis b virus-specific cytotoxic T lymphocytes response *in vivo*. Methods We genetically engineered hybrid filamentous phage particles containing mutant gV III with the $HBs_{28\sim39}$ epitope, and a low dose of the hybrid virus particle was inoculated into BALB/c (H-2^d) mice without adjuvants. Results The peptide epitope in the hybrid bacteriophages primed a MHC class I (H-2^d)-restricted HBs_{28-39}-specific CTL response. Conclusion These data suggest that the filamentous phage displayed vaccine elicited specific CTL responses effectivtly and could be a kind of potentially efficient form to develop the anti-virus vaccine.

Key words: vaccine; cytotoxic T lymphocyte; filamentous phage; hepatitis B virus

在肿瘤、病毒的免疫反应中,特异性细胞毒性T细胞(CTL)反应占有重要地位。故发展有效诱导CTL反应的疫苗形式是近年来肿瘤、病毒免疫治疗倍感关心的问题[1,2]。丝状噬菌体颗粒是一种直径为6 nm,长度为800~2 000 nm的不对称蛋白质颗粒[3]。已有报道呈现B细胞表位或模拟表位的噬菌体颗粒具有极强的免疫原性,能在不添加任何佐剂的情况下诱导产生抗体,产生针对相应病原体的保护效应[4]。Manoutcharian等[5]报道一个含有预测T细胞表位的丝状噬菌体颗粒免疫小鼠后,能诱导$CD4^+$和$CD8^+$ T细胞分泌IFN-γ,推测此丝状噬菌体颗粒活化了Th和CTL细胞。但据我们所知,尚未有呈现CTL表位的噬菌体颗粒在体诱导CTL反应的报道。本研究将MHC I类分子H-2^{d}限制的乙肝表面抗原表位$HBs_{28\sim39}$[6]与丝状噬菌体的大衣壳蛋白融合表达,构建呈现CTL表位的噬菌体颗粒,在体观察此噬菌体呈现颗粒作为亚单位疫苗是否能在体诱导乙型肝炎特异性细胞毒性T细胞反应,为发展高效的CTL疫苗形式奠定基础。

1 材料和方法

1.1 质粒和菌株

丝状噬菌体呈现质粒pC89[7]由本所李华硕士惠赠,宿主菌XL1-Blue由本校分子遗传教研室提供。

1.2 细胞系和动物

来源DBA/2小鼠的肥大细胞瘤细胞系P815购于上海细胞所,其MHC-I分型为H-2^d。BALB/c小鼠由军事医学科学院动物所提供。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39789010)
作者简介:万 瑛(1972—),男,湖北省沙市人,博士,助教,主要从事分子免疫方面的研究,发表论文11篇。电话:(023)68752236
收稿日期:2000-08-04;修回日期:2000-09-21

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

1.3 肽合成

采用标准的F-moc方案合成H-2^{d}限制的乙肝表面抗原表位$HBs_{28\sim39}$[8]，其序列为：PQSLDSWW TSL。合成肽经POROS 50 R1柱纯化，HPLC鉴定纯度>90%。

1.4 构建重组噬菌粒

将合成的寡聚核苷酸 AATTCATACCGCA GAGTCTAGAC-TCGTGGTGGACTTCTCTCTG 和 GATCCAGAGAAGTCCACCACGAGTC-TAGACTCTGCGGTATG 复性，与 *EcoR* Ⅰ、*BamH* Ⅰ 双酶切的 pC89 连接后转化 XL1-Blue。根据重组菌落在 X-gal 平板的蓝斑强弱挑选培养筛选。

1.5 DNA 测序

重组噬菌粒采用M13 forward-40 测序引物证实。

1.6 丝状噬菌体颗粒的大量制备

证实的重组菌落(pC89S4)在 2 ml LB 培养基(含 40 μg/ml 四环素，50 μg/ml 氨苄青霉素)37 ℃培养过夜，次日将菌液移至 1 L LB 培养基(含 10 μg/ml 四环素，50 μg/ml 氨苄青霉素)，加入 10^{12}噬斑形成单位(pfu)的辅助噬菌体 VSCM13 超感染，继续 37 ℃培养 10 h。10 000×g 离心 10 min 收集上清，加入 PEG8000 至4%，NaCl 至 3%，冰浴 30 min 后，12 000×g 离心 20 min 弃上清。用 10 ml的 PBS 溶液重悬沉淀，10 000×g 离心 5 min 弃不溶物，收集上清，PEG8000 重复沉淀 1 次，重悬沉淀于 2 ml 的 PBS 溶液。

1.7 SDS-PAGE 电泳

噬菌体颗粒 95 ℃ 10 min 变性，在 16%的不连续梯度凝胶，采用 Schägger 和 von Jagow 方案电泳分离[9]。

1.8 动物免疫方案

雌性 BALB/c 小鼠(6~8 周)随机分成 3 组，每组 5 只，分别腹腔注射重组丝状噬菌体颗粒 pC89S4(10 μg)、来源 VASM13 的野生型丝状噬菌体颗粒(10 μg)和合成的$HBs_{28\sim39}$ 12 肽(10 μg)，1 周后同样剂量腹腔加强免疫 1 次。

1.9 靶细胞制备

生长良好的 P815 细胞与终浓度 10 μg/ml 的$HBs_{28\sim39}$ 12 肽共浴 4 h，加入 200 μCi ^{51}Cr 标记靶细胞 90 min，洗涤 3 次后，调整细胞溶度为 10^5/ml。

1.10 特异性细胞毒分析

末次免疫后第 8 天，拉颈处死免疫小鼠，无菌制配脾细胞悬液，洗涤 3 次后，以 3× 10^7/ml 浓度重悬于 10 ml IMDM 培养基(含 25 mmol/L HEPES，4.0 mmol/L L-谷氨酸，10%胎牛血清)，加$HBs_{28\sim39}$ 12 肽至 40 ng/ml，体外刺激培养 5 d 后，收集洗涤效应细胞，按一定比例与 1× 10^4 个靶细胞在 96 孔 V 型底共培养 4 h(总体积 200 μl)。收集 100 μl 上清，γ-计数器测定每孔的 Bq 值，计算特异细胞裂解率，方法如下：特异细胞裂解率=(试验组释放 Bq−自发释放 Bq)/(最大释放 Bq−自发释放 Bq)，其中自发释放为靶细胞对照的 Bq 值，最大释放为靶细胞加 2 mol/L HCl 的 Bq 值。

2 结果

2.1 重组噬菌粒的构建

重组噬菌粒的构建过程见图 1，筛选的阳性克隆 pC89S4 经 DNA 测序证实。

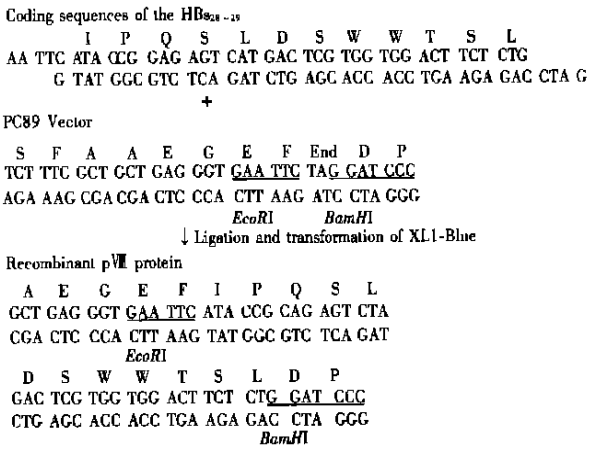


图 1 呈现 $HBs_{28\sim39}$的噬菌粒载体构建

Fig 1 Engineering of phagmid displaying the HBs_{28-39}

2.2 小衣壳蛋白与$HBs_{28\sim39}$的融合表达

噬菌粒 pC89S4 在宿主菌表达$HBs_{28\sim39}$和主要衣壳蛋白(gpⅧ)的融合蛋白。由于$HBs_{28\sim39}$位于融合蛋白的 N 末端，并不影响主要衣壳蛋白 C 末端的噬菌体组装结构域，故融合蛋白与辅助噬菌体 VASM13 合成的野生型 gpⅧ一起参与噬菌体的组装。在 SDS-PAGE 小分子量区域，重组的噬菌体颗粒含有两条电泳带，而野生型噬菌体颗粒只有一条电泳带，见图 2。

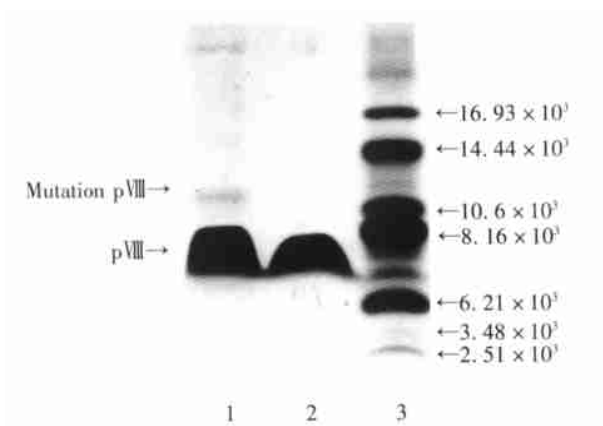


图 2 重组噬菌体颗粒蛋白的 SDS-PAGE

Fig 2 SDS-PAGE of recombinant filamentous phage particles

Lane 1: Recombinant filamentous phage particles; Lane 2: Wild-type filamentous phage particles; Lane 3: Protein markers

2.3 重组的噬菌体颗粒在体诱导$HBs_{28\sim39}$特异性 CTL 反应

重组噬菌体颗粒两次腹腔免疫后，采用标准的^{51}Cr 释放试验，观察到效应细胞特异性溶破$HBs_{28\sim39}$处理的靶细胞 P815，而野生型噬菌体颗粒与$HBs_{28\sim39}$肽均未诱导此效应，见图 3。

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

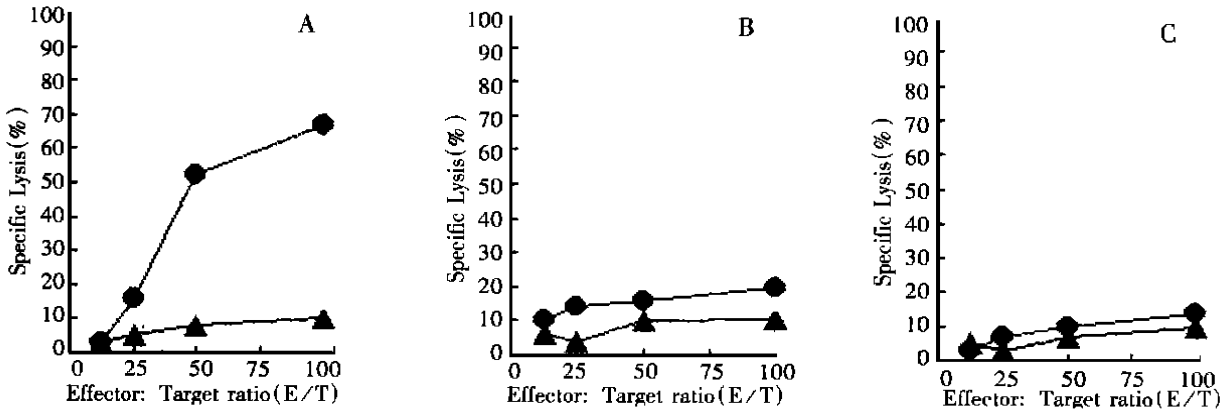


图 3　重组的噬菌体颗粒在体诱导 $HBs_{28\sim39}$特异性 CTL 反应

Fig 3　*In vivo* CTL priming by phage particles

Spleen cells from BALB/c mice that had been immunized with A) the hybrid filamentoux phage particles (without adjuvants); B) wild-type filamentous phage particles; C) synthesis $HBs_{28\sim39}$ oligopeptide. The resulting effectors were then tested for lysis of ^{51}Cr-loabeled (●) P815 pulsed the $HBs_{28\sim39}$ oligopeptide or (▲) P815.

3　讨论

近年来, 为在体有效诱导特异性 CTL 反应, 发展了众多的疫苗形式和接种方案, 如脂肽、DNA 和 RNA 疫苗, 肽包被 DC 细胞等等。在体内此类疫苗只能作为外源蛋白参与 MHC Ⅰ类非经典途径的抗原递呈, 而此类可溶性形式的外源蛋白参与 MHC Ⅰ类非经典抗原递呈的效率很低, 要求很高的抗原浓度。

有研究表明共价交联在微小颗粒的抗原参与 MHC Ⅰ类非经典抗原递呈的效率较可溶性抗原高 1 000～10 000 倍[10]。而丝状噬菌体是典型的颗粒抗原, 并且由于丝状噬菌体呈现技术的发展, 易于将外源抗原融合表达与噬菌体表面。故我们认为丝状噬菌体颗粒可能是一种有效的 CTL 疫苗形式。

为证实此设想, 选择 $HBs_{28\sim39}$ 为研究模型。$HBs_{28\sim39}$是一个广泛研究的 MHC Ⅰ类分子($H\text{-}2^d$)限制性的乙型肝炎表面抗原表位, 它能被 BALB/c 小鼠以 MHC Ⅰ类非经典途径递呈, 在体激活 CTL 反应[6]。我们将 CTL 表位 $HBs_{28\sim39}$和主要衣壳蛋白(gpⅤⅢ)的融合表达, 构建了重组的噬菌体颗粒。腹腔两次免疫小鼠后, 有效诱导了 $H\text{-}2^d$ 限制的 $HBs_{28\sim39}$特异性细胞毒性 T 细胞反应, 从而证明噬菌体颗粒是一种有效的 CTL 疫苗形式, 虽然我们对其机制还不清楚。由于噬菌体颗粒易于呈现外源蛋白、易于制备纯化且较为稳定, 故可能是一种颇有潜力 CTL 疫苗发展形式。

参考文献:

[1] Chattopadhyay U. Tumor immunotherapy: developments and strategies[J]. Immunol Today, 1999, 20(11): 480—482.

[2] Bona C A, Casares S, Brumeanu T D. Towards development of T-Cell vaccines[J]. Immunol Today, 1998, 19(3): 126—132.

[3] Marvin D A. Filamentous phage structure, infection and assembly [J]. Curr Opin Struc Biol, 1998, 8(1): 150—158.

[4] Magliani W L, Polonelli S, Conti A, *et al*. Neonatal mouse immunity against B streptococcal infection by maternal vaccination with recombinant anti-idiotypes[J]. Nat Med, 1998, 4(4): 705—709.

[5] Manoutcharian K L I, Terrazas G, Gevorkian G, *et al*. Phage-displayed T-cell epitope grafted into immunoglobulin heavy-chain complementarity-determining regions: an effective vaccine design tested in murine cysticercosis[J]. Infect Immun, 1999, 67(25): 4 764—4 770.

[6] Schrimbeck R K, Melber K, Reimann J. Hepatitis B virus small surface antigen particles are processed in a novel endosomal pathway for major histocompatibility complex class I—restricted epitope presentation[J]. Eur J Immunol, 1995, 25(8): 1 063—1 070.

[7] Felici F L, Castagnoli A, Musacchio R, *et al*. Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector[J]. J Mol Biol, 1991, 222(2): 301—310.

[8] Ruper J J, Sindney E, Celis R T, *et al*. Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules [J]. Cell, 1993, 74(6): 929—937.

[9] Schägger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separationof proteins in the range from 1 to 100 kDa[J]. Anal Biochem, 1987, 166(2): 368—379.

[10] Men Y. MHC class I-and II-restricted processing and presentation of microencapsulated antigens[J]. Vaccine, 1999, 17(8): 1 047—1 056.

（编辑　王　红）

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