

研究报告

热休克蛋白 HSP70 和 gp96 增强乙肝 DNA 疫苗的细胞和体液免疫应答

王彦中^{1,2}, 王赛锋^{1,2}, 张小俊¹, 李杨¹, 赵世宇³, 孟颂东¹

1 中国科学院微生物研究所 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

2 中国科学院研究生院, 北京 100049

3 北京天坛生物制品股份有限公司, 北京 100024

摘要: 旨在以乙肝病毒 (HBV) 的主要结构蛋白-表面蛋白 (HBsAg) 和核心蛋白 (HBcAg) 作为抗原设计 DNA 疫苗, 研究热休克蛋白 HSP70 和 gp96 作为新型免疫佐剂增强疫苗的细胞免疫和体液免疫水平。利用酶联免疫斑点实验、流式细胞内因子染色、³H-TdR 实验、酶联免疫吸附实验技术分析, 结果显示 HSP70 和 gp96 可使疫苗的细胞免疫水平提高 1~6 倍, 提高体液免疫水平 20%~60%。研究结果为设计以 HSP70 和 gp96 作为免疫佐剂的新型乙肝治疗性疫苗提供了依据。

关键词: 乙肝治疗性疫苗, HSP70, gp96, 佐剂

Enhancement of cellular and humoral immune responses of HBV DNA vaccine by HSP70 and gp96

Yanzhong Wang^{1,2}, Saifeng Wang^{1,2}, Xiaojun Zhang¹, Yang Li¹, Shiyu Zhao³, and Songdong Meng¹

1 CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 Beijing Tiantan Biological Products Co., Ltd., Beijing 100024, China

Abstract: While currently therapeutic vaccines for chronic hepatitis B virus (HBV) infection are actively being developed to complement standard antiviral treatments, their immune activity, especially T cell activity, remains to be further improved. Here, we investigated the role of heat shock proteins HSP70 and gp96 on cellular and humoral immunity, using the main structure antigens of hepatitis core (HBcAg) and surface (HBsAg) as the DNA vaccine. By ELISPOT (enzyme linked immunospot assay), IFN- γ intracellular staining, [³H]-thymidine incorporation and ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) analyses, we showed

Received: December 9, 2010; **Accepted:** March 9, 2011

Supported by: Knowledge Innovation Program of Chinese Academy of Sciences (Nos. KSCXZ-YW-R-1, KSCXZ-YW-R-183), China National Grand S&T Special Project (No. 2009ZX09503-007), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA02A241).

Corresponding author: Songdong Meng. Tel: +86-10-64807350; E-mail: mengsd@im.ac.cn

中国科学院知识创新项目 (Nos. KSCXZ-YW-R-1, KSCXZ-YW-R-183), “重大新药创制”科技重大专项项目 (No. 2009ZX09503-007), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2006AA02A241) 资助。

that immunization with HBsAg/HBcAg DNA formulation along with HSP70 or gp96 induced significant increase of T-cell (about 1-6-fold) and antibody (about 20%–60%) immunity against HBsAg and HBcAg. These results may provide bases for designing HSP70- and gp96-based vaccines aimed at eliciting T-cell responses for therapeutic applications.

Keywords: HBV therapeutic vaccine, HSP70, gp96, adjuvant

目前世界上有 20 亿人被乙肝病毒 (HBV) 感染, 3.7 亿患者转变为慢性感染, 每年有 100 万人死于乙肝引发的肝癌^[1]。在我国有大约 9 300 万乙肝病毒携带者, 3 000 万乙肝患者。慢性乙肝病毒感染的治疗方案包括干扰素 IFN- α -2b、PEG-IFN- α -2a, 以及核苷类似物药物如拉米夫定、阿德福韦、恩替卡韦。其中拉米夫定、阿德福韦、恩替卡韦为逆转录抑制剂, 而 IFN- α -2b 和 PEG-IFN- α -2a 则抑制病毒 mRNA 的转录和增强免疫系统功能。这些药物只对部分患者有疗效, 且不能有效地清除病毒 cccDNA, 长时间用药可能导致病毒耐药, 使得疗效降低^[2-3]。

临床资料提示 HBV 特异性免疫, 特别是 T 细胞免疫在病毒的清除中发挥关键作用。在急性乙肝患者中可以检测到较强的、多克隆的乙肝特异性 T 细胞应答, 但是在慢性肝炎患者中仅能检测到较弱的、寡克隆的免疫应答, 因此乙肝特异性 T 细胞应答不足是导致病毒无法清除、感染慢性化的决定因素之一。乙肝治疗性疫苗通过设计 HBV 特有抗原, 并利用生物技术增强其免疫原性, 有效激活乙肝携带者或慢性乙肝患者 T 细胞免疫和体液免疫, 打破免疫耐受, 有效抑制和清除病毒, 达到治疗的目的。研制乙肝治疗性疫苗可有效补充目前的抗病毒治疗。

目前已经设计出的乙肝治疗性疫苗包括蛋白疫苗、表位多肽疫苗以及 DNA 或病毒载体疫苗, 并通过临床试验检验其疗效^[4]。蛋白或多肽疫苗易降解, 作用时间短, 相比之下以 DNA 为基础的疫苗在体内可以较长时间表达抗原基因^[5], 而且 DNA 疫苗能更有效地激活细胞免疫, 这在乙肝免疫治疗中有重要意义^[6-7]。目前乙肝治疗性 DNA 疫苗已经进入临床 I、II 期, 主要有法国巴斯德所研发的 pCMV-S2.S 表达载体作为 DNA 疫苗编码和表达 HBV 表面蛋白

S 和 M (包含 S 和 preS2) 蛋白, 韩国浦项 (Pohang) 科技大学开发 HB100 DNA 疫苗 (包括 5 个载体: pGX10 S、pGX10 S1/S2/X、pGX10 core、pGX10 Pol、pGX10 hIL-12), 以及表达 HBsAg 的安卡拉痘病毒 (MVA) 疫苗等^[4]。

热休克蛋白 gp96 和 HSP70 作为分子伴侣, 可结合肿瘤或病原微生物特异抗原, 并将抗原呈递给 MHC I 类分子和 II 类分子, 激活肿瘤或病原特异性 T 细胞, 同时与 Toll 样受体相互作用激活天然免疫^[8-10]。本课题组首次从乙型肝炎病毒感染肝癌患者的肝组织中分离鉴定了与 gp96 结合的天然抗原多肽, 发现 gp96 能有效促进 DC 细胞成熟, 激活特异性 CTL 和 Th1 型细胞^[11-13]。因此, HSPs 与其结合的抗原肽复合物是迄今发现的最为理想的、启动特异性免疫应答的天然多价抗原。HBsAg、HBcAg 特异性 T 细胞对于控制感染和清除乙肝病毒至关重要, 而 DNA 疫苗主要作用机制是激活细胞免疫, 我们前期的研究发现, 将 HBsAg 与 HBcAg 联合免疫和 HBsAg 单独免疫相比, 发现产生的抗 HBsAg 的抗体水平, 特别是特异性 T 细胞免疫水平, 联合免疫的方式明显高于 HBsAg 单独免疫的水平, 提示 HBcAg 本身对 HBsAg 有免疫增强作用 (数据待发表), 这可能由于 HBcAg 独特的 20 面体的类似 VLP 结构, 在此基础上我们设计 HBsAg/HBcAg DNA 疫苗, 以 gp96 和 HSP70 为免疫佐剂, 进一步提高 T 细胞免疫应答, 为设计新型乙肝治疗性疫苗提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株

小鼠肥大细胞瘤系 P815 由本实验室传代、保

存。用 HBsAg 和 HBcAg 质粒转染 P815 细胞以表达 HBV 抗原 (HBsAg 和 HBcAg), 经 G418 筛选, 鉴定获得稳定表达 HBsAg 和 HBcAg 的细胞株。P815 细胞株均采用 DMEM+10%FCS+青链霉素+G418 于 37 °C、5% CO₂ 孵育箱内常规培养。

1.2 质粒载体

本实验所用真核表达载体均构建于 pcDNA3.1(+) (Invitrogen), 包括 pcDNA3.1-HbsAg、pcDNA3.1-HbcAg、pcDNA3.1-gp96、pcDNA3.1-HSP70。pcDNA3.1-HBsAg、pcDNA3.1-HBcAg、pcDNA3.1-gp96 由本实验室保存。HSP70 的序列由中国科学院微生物研究所叶昕研究员馈赠。以 PCR 从 pCMV-HSP70 得到 HSP70 序列并在两端引入 *Bam*H I 和 *Xho* I 位点 (下划线所示), 经双酶切克隆于 pcDNA3.1(+). 上下游引物 (5'-3') 各是: GCGGATCCATGTCGGTGGTGGGCATAGACC (forward), GCGCTCGAGTCAATCAATGTCCATTTTCAGGAAGC (reverse)。所有载体都经过双酶切和 DNA 测序进行鉴定。所有载体在大肠杆菌 DH5 α 中扩增, 按产品说明提取和纯化质粒, 去除内毒素 RNA 和蛋白的污染 (威格拉斯生物技术有限公司, 北京)。

1.3 蛋白免疫印记

蛋白免疫印记鉴定真核表达载体 pcDNA3.1-gp96 和 pcDNA3.1-HSP70 在 P815 细胞系中的表达。按照脂质体 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 标准转染程序转染 pcDNA3.1-gp96 和 pcDNA3.1-HSP70, 以空载体和未转染的细胞作为阴性对照。转染 48 h 后收集细胞提取蛋白。10% SDS-PAGE 电泳分离, 转印于 PVDF 膜, 5% 的脱脂牛奶封闭 1 h, 一抗 (1:1 000) 4 °C 孵育过夜, 以 PBST 洗 3 次, 每次 10 min, 辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:2 000) 室温孵育 1 h, 同样步骤用 PBST 洗去二抗后加显色液曝光显影。

1.4 小鼠免疫

雌性 BALB/c 小鼠(H-2d) (6~8 周) 购于北京维通利华实验动物有限公司, 在北京大学医学院实验动物中心 SPF 级环境下饲养。实验分为 6 组, 每组

12 只小鼠, 分别是 gp96+HBsAg+HBcAg (50 μ g+50 μ g+50 μ g/只), HSP70+HBsAg+HBcAg (50 μ g+50 μ g+50 μ g/只), HBsAg+HBcAg (50 μ g+50 μ g/只), gp96+pcDNA3.1 (50 μ g+100 μ g/只), HSP70+pcDNA3.1 (50 μ g+100 μ g/只), pcDNA3.1 (100 μ g/只)。免疫前 3 天在小鼠后肢肌肉内注射利多卡因 (100 μ L, 0.25% (V/V)) 进行麻醉, 然后在同样的部位肌肉内注射无菌 PBS 稀释的质粒 DNA, 每只 200 μ L。第 1 次免疫后的第 7 天和 21 天进行两次加强免疫。第 1 次免疫前第 1 次采血, 以后隔周采血收集血清样品。体液免疫指标 (每组 6 只小鼠) 在第 1 次免疫后跟踪检测 8 周。最后 1 次免疫结束后 5 d 处死小鼠, 体外刺激 3 d 后检测细胞免疫学指标 (每组 6 只小鼠)。

1.5 酶联免疫斑点实验

使用 ELISPOT (Enzyme linked immunospot assay) (BD-Pharmingen, San Diego, CA) 检测 HBsAg 和 HBcAg 激活特异的 T 细胞分泌 IFN- γ 的能力。实验分为 6 组, 每组 6 只小鼠。每只小鼠再分别做阴性孔、阳性孔和实验孔。我们以 P815 空细胞和 BSA 为阴性孔, 以 PHA 刺激为阳性孔, 每只小鼠做 3 个复孔, 加入 P815 稳定株作为实验孔。

使用 Anti-IFN- γ 包被 96 孔板, 4 °C 过夜, 次日用无菌 PBS 清洗 5 次, 再以含 10% FCS 的 RPMI 1640 封闭 2 h, 弃去培养基加入抗原刺激物和 IL-2, 然后按照 1×10^6 细胞/孔加入淋巴细胞, 终体积为 200 μ L。在 37 °C、5% CO₂ 中孵育 24 h, 去离子水 4 °C 裂解细胞 10 min, PBST 洗 5 次, 加入检测抗体, 室温孵育 2 h, PBST 洗 5 次, 然后加入酶联亲和素, 室温孵育 1 h, PBST 洗 5 次, 后加入显色液显色。充分干燥后用荧光酶联斑点分析仪 (Biosys, Germany) 计数。读出的斑点数减去阴性对照的斑点数即为淋巴细胞特异刺激条件下分泌 IFN- γ 斑点数。

1.6 细胞内因子染色

以流式细胞内因子染色检测小鼠 CTL 细胞的活化程度。按照 Cytofix/Cytoperm 试剂盒 (BD-Pharmingen, San Diego, CA) 的操作流程, 取体外

刺激 3 d 后的淋巴细胞 (3×10^6) 加入蛋白转运抑制剂和刺激物 (PMA+离子霉素) 37 °C、5% CO_2 培养 6 h, 收集细胞用含 5% BSA 的 PBS 封闭 0.5 h, 加入表面标志的标记单抗 (Percp-Cy5.5-CD3, PE-CD4, FITC-CD8 (E Bioscience)), 4 °C 避光孵育 0.5 h, 再用含 5% BSA 的 PBS 清洗 2 次, 加入固定/破膜剂, 4 °C 孵育 20 min, 然后用破膜/清洗剂清洗 2 次, 然后在 50 μL 体系中加入胞内细胞因子单抗 (APC-IFN- γ), 4 °C 避光孵育 0.5 h, 清洗剂清洗 2 次, 用 5% BSA 的 PBS 重悬, 用流式细胞仪 (FACS Calibur; Becton Dickinson, Mountain View, CA) 分析。

1.7 ^3H -TdR 实验

体外刺激后的淋巴细胞单细胞用含 10% 胎牛血清的 1640 培养基培养, 以 $2 \times 10^6/\text{mL}$ 的密度铺于 96 孔 U-型板, 每孔 100 μL , 再加入抗原刺激物。以 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 HBsAg (北京天坛生物股份有限公司馈赠) 和 HBcAg (本室表达) 抗原刺激为实验孔, 以 conA 刺激为阳性对照、BSA 刺激为阴性对照。孵育 3 d 后, 加入 1 μCi 的 [^3H]-脱氧胸苷 (Amersham, UK), 孵育过夜, 然后收集细胞, 用液体闪烁仪检测 [^3H]-脱氧胸苷摄入量。

1.8 酶联免疫吸附试验

酶联免疫吸附试验方法 (ELISA) 方法用于鉴定稳定表达 HBsAg 和 HBcAg 的质粒构建的 P815 稳定细胞株, 以及检测免疫小鼠体内的体液免疫水平。

质粒表达的验证: 收集 P815 细胞稳定表达 pcDNA3.1-HBsAg 和 pcDNA3.1-HBcAg 的细胞株的总蛋白。以空载体和未转染细胞为阴性对照。用 ELISA 试剂盒 (上海科华生物工程股份有限公司) 检测 HBsAg 的表达水平。用本实验室保存的小鼠多抗鉴定 HBcAg 的表达水平。

小鼠的体液免疫水平的跟踪检测: 用 HBsAg 蛋白包被平底 96 孔板 (8 $\mu\text{g}/\text{孔}$), 4 °C 孵育过夜, 然后用 PBST 清洗 3 次, 每次 5 min, 再用含 5% 脱脂牛奶的 PBST 封闭 1 h, 然后重新清洗 3 次, 每次

5 min, 然后加入稀释好的血清 (1:2 000), 37 °C 孵育 2 h, 然后 PBST 清洗 3 次, 分别加入过氧化物酶标记的抗小鼠 IgG、IgG1 和 IgG2a 抗体, 37 °C 孵育 2 h, 然后 PBST 清洗。加入显色液显色, 反应应用 1 mol/L 的硫酸终止, 在 490 nm 读吸光值。

2 结果

2.1 质粒信息的正确性

本实验使用的 4 种 DNA 质粒 (包括 pcDNA3.1-HBsAg、pcDNA3.1-HBcAg、pcDNA3.1-gp96 和 pcDNA3.1-HSP70) 都经双酶切和 DNA 测序验证其序列的正确性。为了确保 pcDNA3.1-gp96 和 pcDNA3.1-HSP70 载体能够在细胞内正确表达, 我们以脂质体将载体转染 P815 细胞, 以空载体和未转染细胞作为阴性对照。48 h 后通过蛋白免疫印迹鉴定基因的表达。而 P815-HBsAg 和 P815-HBcAg 稳定株则使用 ELISA 方法检测细胞内 HBsAg 和 HBcAg 蛋白的表达, 以瞬时转染空载体和 P815 空细胞为阴性对照。实验结果如图 1 所示, 这些结果表明所有基因都正确表达。

2.2 gp96 和 HSP70 可以显著增强乙肝特异性细胞免疫水平

通过 ELISPOT、细胞内 IFN- γ 染色和 ^3H -脱氧胸苷掺入方法检测 CTL 的活化, 检测 gp96 和 HSP70 在激活乙肝特异性细胞免疫的佐剂效果。ELISPOT 的结果显示, gp96 和 HSP70 都能显著地增加乙肝特异性淋巴细胞分泌 IFN- γ 的水平 (图 2), 与单独使用 DNA 疫苗 (HBsAg/HBcAg) 免疫相比, 联合 gp96 免疫分别提高 HBsAg 和 HBcAg 特异性 T 细胞水平 2.5 倍 ($P < 0.01$) 和 3.8 倍 ($P < 0.001$), HSP70 分别提高特异性 T 细胞水平 6.2 倍 ($P < 0.01$) 和 1.3 倍 ($P < 0.01$)。同时, 体外转染实验表明, 与单独转染 HBsAg/HBcAg 相比, gp96 或 HSP70 与抗原共同转染 293T 细胞并未使抗原表达明显发生变化, 排除了 gp96 或 HSP70 通过改变 HBsAg 和 HBcAg 的表达影响免疫活性的可能性。

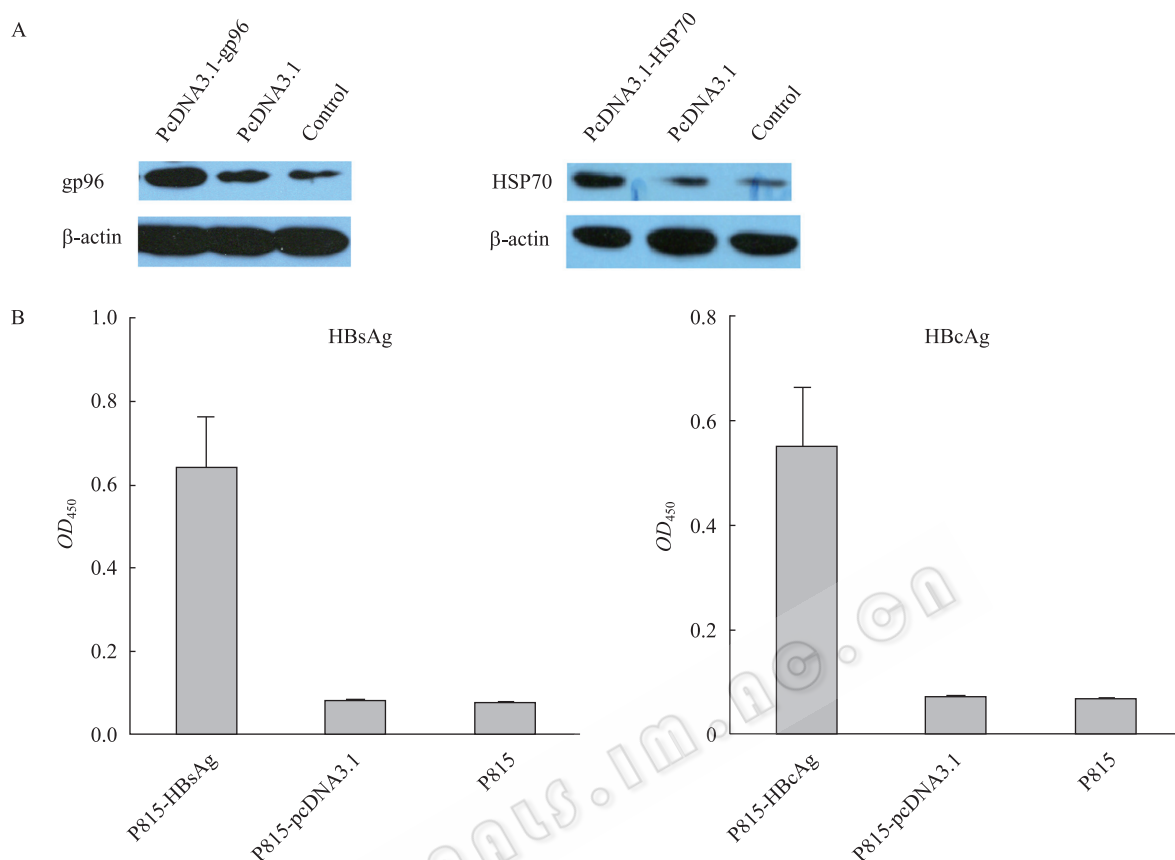


图1 DNA载体的表达鉴定

Fig. 1 Expression of gp96, HSP70, HBsAg and HBcAg in P815 cells. (A) Western blotting analysis to characterize the expression of plasmid pcDNA-gp96 and pcDNA-HSP70. P815 cells were transfected with pcDNA-gp96 or pcDNA-HSP70, or the empty vector pcDNA or no vector as control. 48 h after transfection, cells were harvested, and cell lysates were immunoblotted with an anti-gp96 or anti-HSP70 Ab. β -actin was used as the loading control. (B) ELISA analysis to characterize the expression of HBsAg or HBcAg in stably transfected cells. Results were presented as $\bar{x} \pm s$ from 3 independent experiments.

进一步通过细胞内 IFN- γ 染色法检测活化的 T 细胞。如图 3 所示, 与单独使用 DNA 疫苗 (HBsAg/HBcAg) 免疫相比, 联合 gp96 免疫分别提高 IFN- γ^+ 的 CD8 $^+$ T 细胞水平 1.37 倍 (HBsAg 刺激) 和 1.23 倍 (HBcAg 刺激), 提高 IFN- γ^+ 的 CD4 $^+$ T 细胞水平 1.47 倍 (HBsAg 刺激) 和 1.70 倍 (HBcAg 刺激) ($P < 0.001$)。同样, 联合 HSP70 免疫分别提高 IFN- γ^+ 的 CD8 $^+$ T 细胞水平 1.36 倍 (HBsAg 刺激) 和 1.44 倍 (HBcAg 刺激), 提高 IFN- γ^+ 的 CD4 $^+$ T 细胞水平 1.60 倍 (HBsAg 刺激) 和 1.59 倍 (HBcAg 刺激) ($P < 0.001$)。

T 细胞在特异抗原刺激下的增殖水平也是反映

T 细胞活性的指标之一。我们进一步检测 T 细胞的增殖能力, 与单纯抗原组 (sc 组) 相比, 联合 gp96 和 HSP70 均能提高脾脏淋巴细胞的增殖, 其中 gp96 分别提高脾脏淋巴细胞增殖能力 59% (HBsAg 刺激) 和 81% (HBcAg 刺激), 而 HSP70 则分别提高 31% (HBsAg 刺激) 和 64% (HBcAg 刺激)。

2.3 gp96 和 HSP70 可以提高乙肝抗原的体液免疫水平

最后, 我们检测免疫后小鼠表面抗原抗体 (anti-HBsAg) 的产生, 通过 ELISA 检测 HBsAg 特异的总 IgG、IgG1 和 IgG2a 的抗体滴度。各组小鼠跟踪 5 次, 结果如图 4 所示。与单独抗原免疫组 (sc

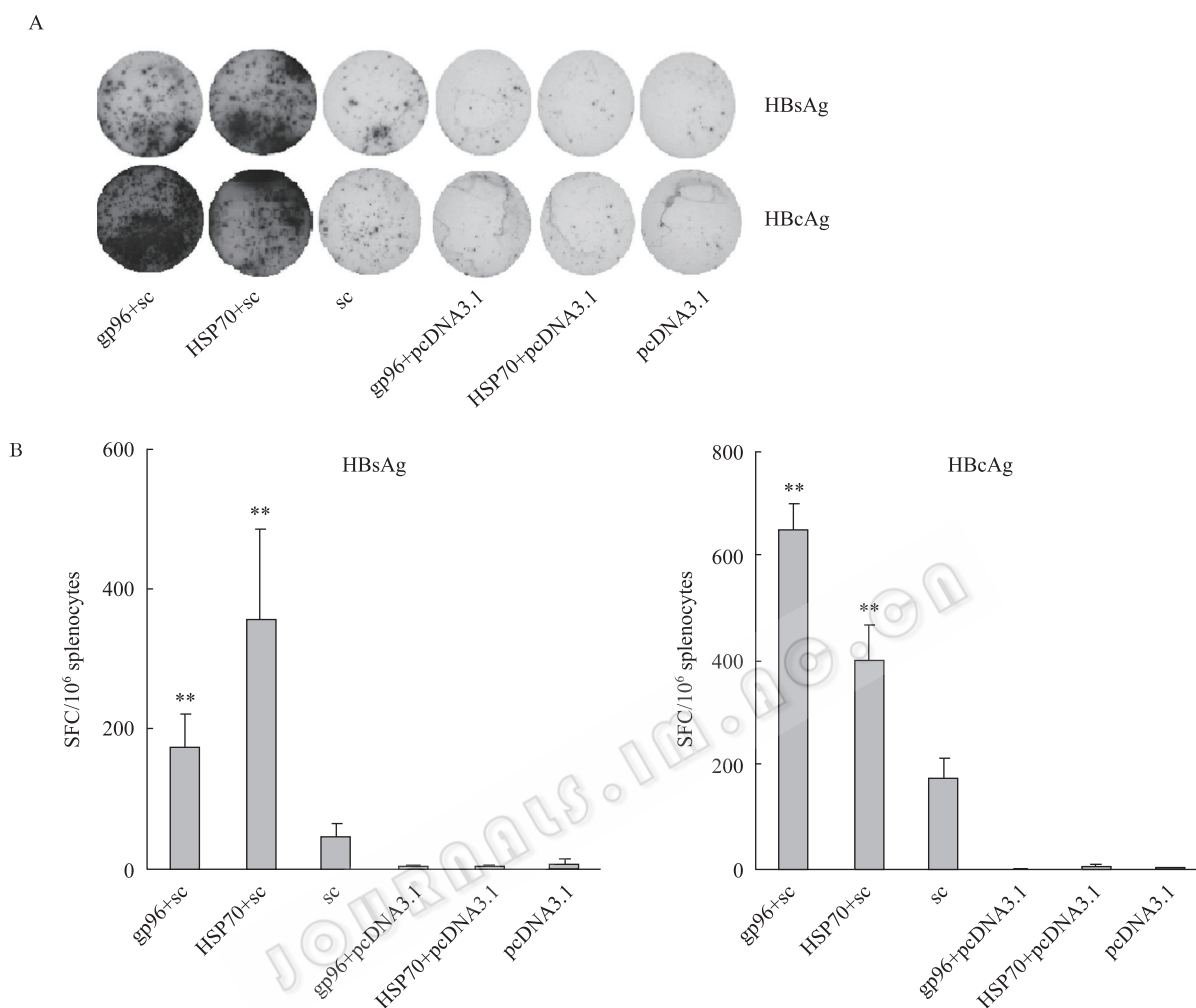


图2 ELISPOT 检测 HBsAg 和 HBcAg 特异性 T 细胞

Fig. 2 T-cell responses in immunized Balb/c mice were detected by ELISPOT assay. Mice were immunized with DNA constructs of gp96 and HBsAg/HBcAg (gp96+sc), HSP70 and HBsAg/HBcAg (HSP70+sc), HBsAg/HBcAg (sc), gp96 and pcDNA3.1 (gp96+pcDNA3.1), HSP70 and pcDNA3.1 (HSP70+pcDNA3.1), or pcDNA3.1 for three times with intramuscular (i.m.) injection. Mice were sacrificed on the fifth day after the last immunization and the splenocytes were collected for ELISPOT assay. The photograph of the representative wells from different immunization groups is shown (A). Data showed $\bar{x} \pm s$ of six mice (B). ** $P < 0.01$ compared with HBsAg/HBcAg DNA immunization (sc) only.

组) 相比,免疫 8 周后 gp96 和 HSP70 联合免疫组在总 IgG 和 IgG2a 水平上均有显著提高 (20%~60%),但是在 IgG1 水平上各组无显著性差异。说明热休克蛋白 gp96 和 HSP70 主要增强 DNA 疫苗的 Th1 型免疫应答 (IgG2a 水平)。

3 讨论

本研究对热休克蛋白 gp96 和 HSP70 提高

HBsAg/HBcAg DNA 疫苗的免疫活性作了全面研究,通过 ELISPOT 检测发现 gp96 和 HSP70 可提高抗原特异性 T 细胞水平 1~6 倍,提高 IFN- γ ⁺的 T 细胞水平 1~2 倍,同时 HBsAg 特异的 IgG1 和 IgG2a 的水平提高了 20%~60%。以上结果说明 gp96 和 HSP70 可显著提高乙肝 DNA 疫苗的细胞免疫和体液免疫应答,对细胞免疫的促进作用要优于体液免疫。这与常用的佐剂如氢氧化铝有很大的不同,氢

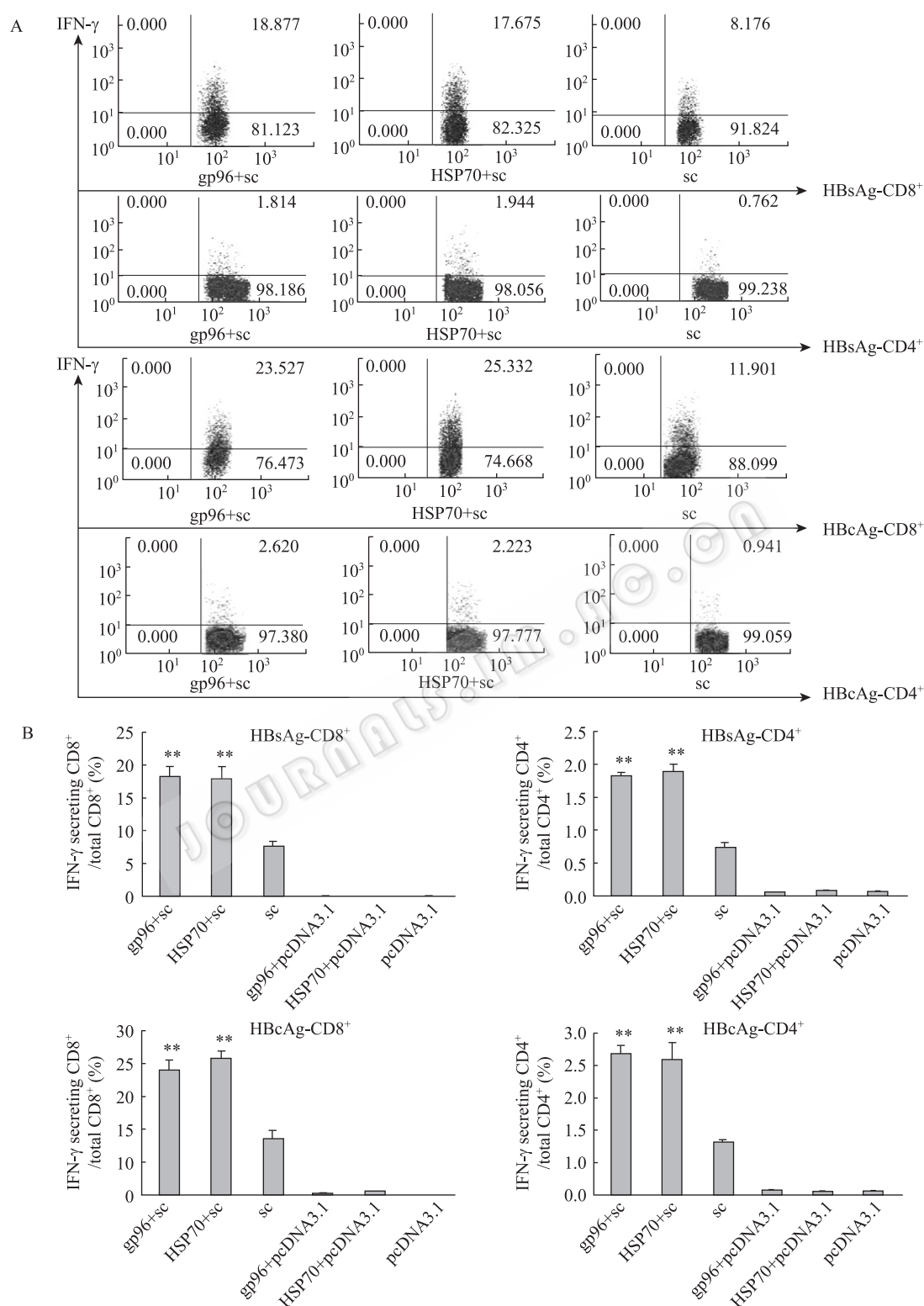


图3 流式细胞术检测分泌 IFN- γ 的 CD8⁺和 CD4⁺ T 细胞

Fig. 3 IFN- γ producing CD8⁺ and CD4⁺ T cells were detected by intracellular IFN- γ staining. (A) Flow cytometric analysis were performed for the presence of IFN- γ ⁺ CD8⁺ and CD4⁺ T cells stimulated with HBsAg or HBcAg. (B) Data showed $\bar{x} \pm s$ of six mice. ** $P < 0.01$ by t test compared with HBsAg/HBcAg DNA immunization (sc) only.

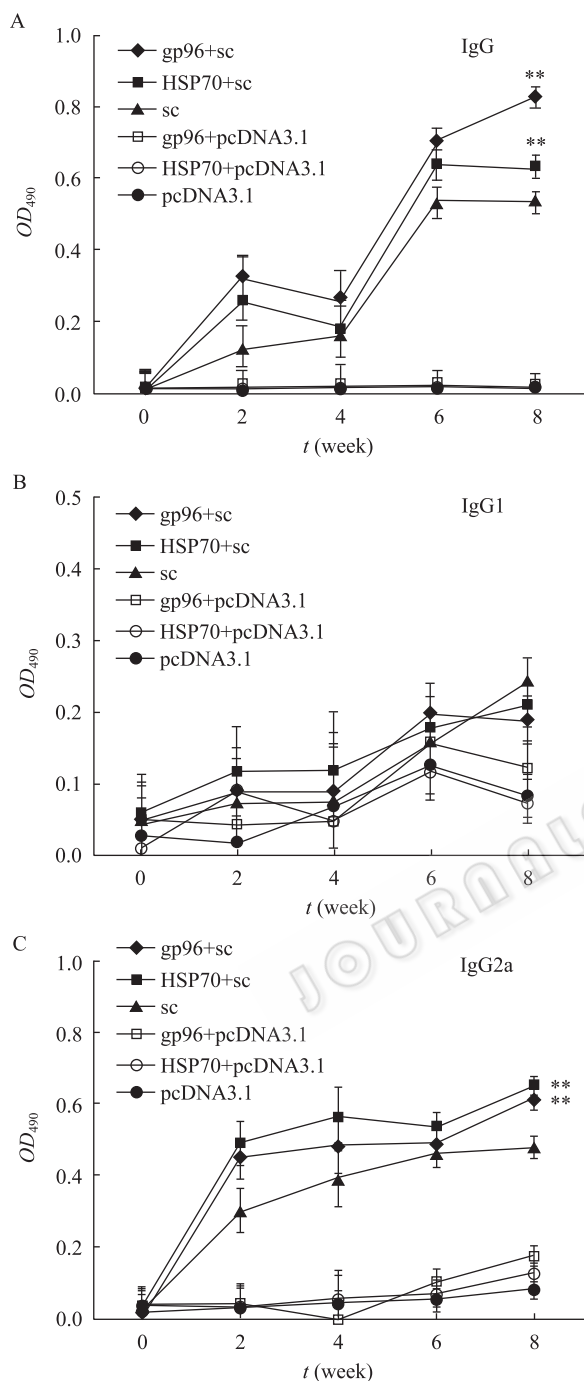


图4 ELISA方法检测IgG、IgG1、IgG2a的水平

Fig. 4 Humoral immune responses in Balb/c mice were measured by ELISA. Serum anti-HBsAg IgG (A), IgG1 (B), and IgG2a (C) antibody titers were detected by ELISA at one-week interval after the first immunization. IgG, IgG1 and IgG2a titers from 1:2 500, 1:2 000 and 1:2 000 dilution sera respectively. Data showed $\bar{x} \pm s$ of six mice. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ by *t* test compared with HBsAg/HBcAg DNA immunization (sc) only. Data were representative of three independent experiments.

氧化铝佐剂主要提高抗体水平,但对细胞免疫应答影响有限。我们的结果显示了热休克蛋白 gp96 和 HSP70 作为佐剂激活乙肝特异性细胞免疫的突出效果。

我们设计的 DNA 疫苗以 HBV 的两种主要结构蛋白 HBsAg 和 HBcAg 作为抗原,联合热休克蛋白免疫小鼠可显著诱导病毒特异性 T 细胞和抗体反应。目前以 HBsAg/HBcAg 蛋白作为抗原研制乙肝治疗性疫苗在古巴哈瓦那遗传与生物技术中心已经用于临床,初步结果显示疫苗安全可靠^[4,14-15]。本研究发现热休克蛋白 gp96 和 HSP70 可进一步提高 HBsAg/HBcAg 抗原的免疫活性,更重要的是我们的结果表明与 HBsAg 相比,HBcAg 在激活细胞免疫方面比 HBsAg 更有优势(图2、图3),这对于设计更有效的乙肝治疗性疫苗有重要意义。

Th1 型免疫会产生 IgG2a 抗体,Th2 型免疫则产生 IgG1 抗体。实验结果显示热休克蛋白在体液免疫方面主要提高了 IgG2a 的水平,而在 IgG1 水平上无明显的作用,这与我们的 T 细胞检测结果一致,说明热休克蛋白主要激活 Th1 型免疫应答。

虽然已有的研究发现将 gp96 基因片段与抗原 DNA 融合设计 DNA 疫苗能有效激活机体细胞免疫和体液免疫应答^[13,16],但基因的融合方式(如 gp96 基因片段的选取)、融合方向(在 C 端或 N 端融合)等均会影响免疫效果,这使得 gp96 的 DNA 疫苗设计复杂化和存在不确定性。本研究证明单独构建 HSP70 和 gp96 表达载体与现有的 HBV DNA 疫苗联合使用均可显著提高疫苗的免疫活性,这为设计高效的乙肝治疗性 DNA 疫苗提供了依据。

REFERENCES

- [1] Michel ML, Tiollais P. Hepatitis B vaccines: protective efficacy and therapeutic potential. *Pathol Biol*, 2010, 58(4): 288–295.
- [2] Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology*, 2009, 137(5): 1593–1608.

- [3] Zheng YL, Zhao LS, Zhou TX, et al. Efficacy of consensus interferon in treatment of HbeAg-positive chronic hepatitis B: a multicentre, randomized controlled trial. *Virology*, 2009, 6: 99.
- [4] Li Y, Wang SF, Meng SD, et al. Development of therapeutic vaccines against hepatitis B and clinical application. *Biotechnol Bull*, 2010(4): 33–37.
李杨, 王赛锋, 孟颂东, 等. 乙肝治疗性疫苗的研制与临床应用. *生物技术通报*, 2010(4): 33–37.
- [5] Shen ML, Wang SX, Ge GH, et al. Profiles of B and T cell immune responses elicited by different forms of the hepatitis B virus surface antigen. *Vaccine*, 2010, 28(45): 7288–7296.
- [6] Michel ML, Loirat D. DNA vaccines for prophylactic or therapeutic immunization against hepatitis B. *Intervirology*, 2001, 44(2/3): 78–87.
- [7] Michel ML, Davis HL, Schleef M, et al. DNA-mediated immunization to the hepatitis B surface antigen in mice: aspects of the humoral response mimic hepatitis B viral infection in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(12): 5307–5311.
- [8] Udono H, Levey DL, Srivastava PK, et al. Cellular requirements for tumor-specific immunity elicited by heat shock proteins: tumor rejection antigen gp96 primes CD8⁺ T cells *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(8): 3077–3081.
- [9] Han LF, Wang W, Fang Y, et al. Soluble B and T lymphocyte attenuator possesses antitumor effects and facilitates heat shock protein 70 vaccine-triggered antitumor immunity against a murine TC-1 cervical cancer model *in vivo*. *J Immunol*, 2009, 183(12): 7842–7850.
- [10] Nicchitta CV. Re-evaluating the role of heat-shock protein-peptide interactions in tumor immunity. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(5): 427–432.
- [11] Meng SD, Gao T, Gao GF, et al. HBV-specific peptide associated with heat shock protein gp96. *Lancet*, 2001, 357(9255): 528–529.
- [12] Liu Z, Li XH, Qiu LP, et al. Treg suppress CTL responses upon immunization with HSP gp96. *Eur J Immunol*, 2009, 39(11): 3110–3120.
- [13] Yan JB, Liu XQ, Wang Y, et al. Enhancing the potency of HBV DNA vaccines using fusion genes of HBV-specific antigens and the N-terminal fragment of gp96. *J Gene Med*, 2007, 9(2): 107–121.
- [14] Aguilar JC, Lobaina Y, Muzio V, et al. Development of a nasal vaccine for chronic hepatitis B infection that uses the ability of hepatitis B core antigen to stimulate a strong Th1 response against hepatitis B surface antigen. *Immunol Cell Biol*, 2004, 82(5): 539–546.
- [15] Betancourt AA, Delgado CA, Estévez ZC, et al. Phase I clinical trial in healthy adults of a nasal vaccine candidate containing recombinant hepatitis B surface and core antigens. *Int J Infect Dis*, 2007, 11(5): 394–401.
- [16] Pakravan N, Soleimanjahi H, Hassan ZM. GP96 C-terminal improves Her2/*neu* DNA vaccine. *J Gene Med*, 2010, 12(4): 345–353.