

携带 HBV 包膜大蛋白 DNA 疫苗的减毒沙门菌 在小鼠诱导免疫应答

赵平¹ 王宏卫¹ 卢洋² 戚中田^{1*}

¹(第二军医大学微生物学教研室, 上海 200433)

²(第一军医大学珠江医院肿瘤科, 广州 510282)

摘要 探索一种简便、有效的乙型肝炎病毒 DNA 疫苗免疫方法。将编码绿色荧光蛋白的真核表达质粒 pEGFPN1 转化到减毒鼠伤寒沙门菌 SL7207, 灌胃饲服 BALB/c 小鼠, 流式细胞术检测出小鼠脾细胞内表达的绿色荧光蛋白; 构建编码 HBV 包膜大蛋白的 DNA 疫苗 pCI-S1S2S, 分别以 SL7207 为载体的口服途径或直接肌肉注射途径免疫 BALB/c 小鼠, 检测小鼠的血清抗体、T 细胞增殖和细胞毒性 T 淋巴细胞反应, 结果表明两种免疫途径均能在小鼠体内诱导细胞和体液免疫应答, 但口服途径诱导免疫应答的强度明显强于肌肉注射途径。口服携带 HBV DNA 疫苗的减毒鼠伤寒沙门菌可能代表一种简便、有效的治疗乙型肝炎的新方法。

关键词 乙型肝炎病毒, DNA 疫苗, 减毒沙门菌, 免疫应答

中图分类号 R512.620.5 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)05-0601-04

乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)慢性感染在我国人群中相当普遍, 目前还缺乏有确切疗效的治疗方法。接种重组乙肝疫苗或合成肽疫苗均能增强乙肝患者的抗 HBV 免疫应答, 表明通过接种疫苗对机体施加 HBV 抗原刺激有助于乙肝的治疗^[1,2]。新近发展起来的 DNA 疫苗在 HBV 转基因小鼠不仅能抑制 HBV 基因的表达, 还可诱导抗-HBs 抗体的产生, 故可能成为一种有效治疗乙肝的新方法^[3]。和其他类型的疫苗相似, 专职抗原提呈细胞(APC)对于 DNA 疫苗表达的抗原进行加工并提呈给 T 淋巴细胞是 DNA 免疫的基本机制^[4]。因此, 将 DNA 疫苗靶向性导入 APC 内可增强免疫应答。鼠伤寒沙门菌是细胞内侵袭性致病菌, 可通过肠道和上呼吸道途径感染, 侵入粘膜相关淋巴组织(MALT), 被 MALT 内的专职 APC 吞噬, 在其中增殖^[5]。由于其能靶向感染 APC, 因而作为疫苗载体很有发展潜力。本研究将编码 HBV 包膜大蛋白(LHBs)的 DNA 疫苗导入减毒鼠伤寒沙门菌, 以此细菌口服接种小鼠, 发现这种免疫途径诱导的免疫应答明显强于肌肉注射途径, 对于 HBV 感染可能是一种有效、简便的免疫治

疗方法。

1 材料和方法

1.1 实验材料

编码 HBV adr 亚型全基因组的质粒 pADR-1 由中国科学院上海生物化学研究所李载平教授馈赠; 真核表达质粒载体 pCI-neo、细胞增殖和细胞杀伤检测试剂为 Promega 产品; 增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的真核表达质粒 pEGFPN1 为 Clontech 产品; 鼠伤寒沙门菌 LB5000 和减毒鼠伤寒沙门菌 SL7207 为美国 Stanford 大学 Bruce Stocker 教授馈赠; 6 周龄、雌性 BALB/c 小鼠购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司; 酵母重组 HBV 表面抗原(HBsAg)购自深圳康泰生物制品有限公司; 抗-HBsAg、抗-preS2 ELISA 试剂为上海复星-长征生物试剂公司产品; HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG、G418、丝裂霉素 C 为 Sigma 产品。

1.2 HBV 包膜大蛋白 DNA 疫苗的构建

根据 HBV adr 亚型核苷酸序列设计引物, 上游引物: gcgcggctagccaccatgggaggttggctcttc, 下游引物: gcgaattctcaaatgtatacccaagac。上、下游引物中分别引

入 *NheI* 和 *EcoRI* 酶切位点。以质粒 pADR-1 为模板,PCR 扩增 preS1preS2S 基因,产物与 pMD18-T 载体连接,再以 *NheI*、*EcoRI* 切出 preS1 preS2 S 基因,插入质粒载体 pCI-neo 的 *NheI*、*EcoRI* 酶切位点之间,得到重组表达质粒 pCI-S1S2S。

1.3 稳定表达 HBV 包膜大蛋白的 SP2/0 细胞株的建立

分别将重组质粒 pCI-S1S2S 及空载体 pCI-neo 转染 SP2/0 细胞,转染后 3d 培养液中加入 G418 进行筛选,G418 抗性细胞克隆扩大培养,免疫组化和 ELISA 检测细胞和培养上清中的 HBsAg^[6]。

1.4 重组表达质粒转化减毒伤寒沙门菌

将质粒 pEGFPN1、pCI-neo、pCI-S1S2S 分别转化氯化钙处理的鼠沙门菌 LB5000,提取质粒,用 Gene Pulser[®] (Bio Rad)电穿孔仪转化经 10% 甘油处理的减毒鼠沙门菌 SL7207。

1.5 小鼠口服接种转化有重组表达质粒的减毒沙门菌^[7]

用含相应抗生素的 LB 培养基分别培养 SL7207/pEGFPN1 (kana^R)、SL7207/pCI-neo (amp^R)、SL7207/pCI-S1S2S (amp^R) 至 A₆₀₀ 达 0.5~0.6,离心收集细菌,以 PBS 悬浮,调整细菌浓度为 1×10⁹ 个/mL。BALB/c 小鼠,分为 3 组,禁水、禁食 4h,每只小鼠灌胃饲服 100μL 5% NaHCO₃ 以中和胃酸,30min 后分别饲服 SL7207/pEGFPN1、SL7207/pCI-neo、SL7207/pCI-S1S2S 菌液 100μL。SL7207/pCI-neo、SL7207/pCI-S1S2S 接种组每组小鼠 10 只,3 周 1 次,接种 3 次。SL7207/pEGFPN1 接种组 2 只,接种 1 次。

1.6 小鼠肌注接种 DNA 疫苗

BALB/c 小鼠,分为 2 组,每组 10 只,双侧胫骨前肌注射 pCI-S1S2S 或 pCI-neo,剂量 100μg/次,3 周 1 次,共注射 3 次^[6]。

1.7 检测绿色荧光蛋白在小鼠脾细胞中的表达

首次口服沙门菌后 3 周,SL7207/pEGFPN1 和 SL7207/pCI-neo 接种组各处死 2 只小鼠,无菌取脾脏,低渗裂解红细胞后得到的单细胞悬浮于 RPMI1640 培养基,接种于 60mm 细胞培养皿,于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 2h,震荡片刻,弃上清中悬浮细胞,流式细胞术检测贴壁细胞中绿色荧光蛋白的表达。

1.8 小鼠体液免疫应答的检测

分别在首次免疫后第 2、5、8、11 周采集各组小

鼠血清,ELISA 检测抗-HBs 和抗-preS2 IgG^[6]。

1.9 小鼠 T 细胞增殖反应和细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL)效应的检测^[6]

首次免疫后第 11 周,各组小鼠分别处死 4 只,制备 SL7207/pCI-S1S2S 口服免疫和 pCI-S1S2S 肌注免疫组小鼠脾细胞悬液,接种 96 孔板,设 HBsAg 刺激孔、无抗原刺激的阴性对照孔和 BSA 刺激的无关对照孔,抗原和 BSA 的终浓度均为 10μg/mL,检测小鼠 T 细胞的增殖反应,结果以刺激指数 (Stimulation index, SI) 表示。以稳定表达 HBV 包膜大蛋白的 SP2/0 细胞为刺激细胞和靶细胞,以免疫小鼠的脾细胞为效应细胞,效应细胞/靶细胞数目之比为 20:1 和 100:1,检测小鼠的 CTL 应答,结果以杀伤率 (%) 表示。

1.10 统计学分析

小鼠 T 细胞增殖的 SI 值、CTL 杀伤率先做方差齐性检验,符合条件则做方差分析,α=0.05。

2 结 果

2.1 HBV 包膜大蛋白在 SP2/0 细胞的表达

免疫组化检测 pCI-S1S2S 转染并经克隆化的 SP2/0 细胞胞浆内可见蓝紫色颗粒阳性信号,阳性率达 100%,表明 pCI-S1S2S 能表达其编码的 HBV 包膜大蛋白,该稳定转染的细胞株可用于检测免疫小鼠的 CTL 应答 (Fig. 1)。ELISA 未检测到 pCI-S1S2S 转染的 SP2/0 细胞培养上清中的 HBsAg (结果未示)。

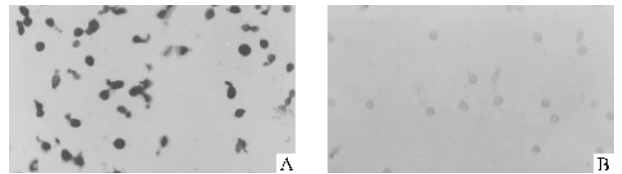


图 1 免疫组化检测重组质粒在 COS7 细胞表达的 HBV 包膜大蛋白

Fig. 1 Immunohistochemical staining of HBV envelope protein HBsAg in COS7 cells transfected with recombinant plasmid (20×).

A. Transfected with pCI-S1S2S; B. Transfected with pCI-neo

2.2 绿色荧光蛋白在小鼠脾细胞内的表达

SL7207/pEGFPN1 口服小鼠 3 周后,用流式细胞术检测 EGFP 在脾细胞内的表达,发现可贴壁培养的脾细胞中 EGFP 阳性率分别为 17.40% 和 16.29% 而 SL7207/pCI-neo 口服的 2 只小鼠脾细胞中的 EGFP 阳性率分别仅为 2.45% 和 1.74%。

2.3 小鼠血清抗体的检测

首次免疫后第 2、5、8、11 周,pCI-S1S2S 肌注免

疫小鼠抗-HBs IgG 阳转率分别为 0/10、0/10、3/10 和 3/10,第 11 周的抗体滴度最高,平均滴度为 1:300,所有小鼠抗-preS2 IgG 均为阴性;SL7207/pCI-S1S2S 口服免疫小鼠的-HBs IgG 阳转率分别为 0/10、2/10、4/10 和 5/10,第 11 周的抗体滴度最高,平均滴度为 1:800,第 8 和 11 周均检测出 3 只小鼠抗-preS2 IgG 阳性,其中第 11 周的平均抗体滴度为 1:200。

2.4 小鼠 T 细胞增殖反应的检测

用无关抗原 BSA 刺激,小鼠 T 细胞无增殖反应,而用 HBsAg 刺激,两组免疫小鼠均表现出明显的 T 细胞增殖反应,且口服免疫组的反应显著强于肌注免疫组($F = 18.79, P = 0.005$)。

表 1 免疫小鼠 T 淋巴细胞经 HBsAg 或 BSA 刺激的增殖反应

Table 1 The T lymphocyte proliferative response of immunized mice stimulated by HBsAg or BSA *in vitro* (SI)

Group stimulator	Oral group		I. M. group	
	HBsAg	BSA	HBsAg	BSA
SI	1.91 ± 0.2	1.02 ± 0.07	1.43 ± 0.11	1 ± 0.09

2.5 小鼠 CTL 反应的检测

检测免疫小鼠脾细胞对表达 HBV 包膜大蛋白的 SP2/0 的杀伤反应,效应细胞/靶细胞比为 20:1 时,口服免疫组的反应明显强于肌注免疫组($F = 10.69, P = 0.017$),效应细胞/靶细胞比为 100:1 时,口服免疫组的反应亦明显强于肌注免疫组($F = 7.02, P = 0.035$)。

表 2 肌注或口服免疫小鼠的 HBsAg 特异性 CTL 反应(靶细胞裂解率)

Table 2 HBsAg specific CTL response of mice by I. M. injection or oral immunization (lysis percentage of target cells)

E:T ratio ¹⁾	I. M. group	I. M. control ²⁾	Oral group	Oral control ²⁾
20:1	35.1 ± 7.66 %	3.88 ± 1.18 %	53.9 ± 8.58 %	3.63 ± 1.02 %
100:1	50.23 ± 8.34 %	4.88 ± 1.44 %	66.85 ± 9.4 %	4.78 ± 0.87 %

¹⁾E:T ratio: effector cells: target cells

²⁾Control: SP2/0 cells expressing EGFP as target cells

3 讨论

在 DNA 免疫过程中,专职 APC,主要包括树突状细胞(DC)和巨噬细胞能直接被 DNA 疫苗转染并表达抗原,或摄取其他体细胞如肌细胞表达、释放的抗原,进行抗原加工、提呈^[8]。由于专职 APC 在组织间的分布稀少,而且常规途径接种时,99% 以上的质粒 DNA 在组织间隙被 DNA 酶降解为寡核苷酸片段,因而只有极少量完整的质粒 DNA 能进入专职

APC 或其他细胞内表达抗原^[9]。这可能是影响 DNA 疫苗对大动物的免疫效果的重要原因。

本研究使用的减毒鼠伤寒沙门菌 SL7207 为编码分枝酸合成酶的 *aroA* 基因缺陷,不能合成分枝酸^[10]。沙门菌利用分枝酸合成对羟基苯甲酸(pAB)和 2-β-二羟基苯(DHB),由于 pAB 和 DHB 都不是哺乳动物细胞的代谢产物,所以 *aroA* 基因缺陷的沙门菌不能在哺乳动物细胞内增殖而成为营养缺陷的减毒菌。以这种减毒沙门菌为 DNA 疫苗的载体,在侵入粘膜淋巴组织内的专职 APC 以后,APC 被活化,向淋巴结和脾脏迁移,沙门菌本身因营养缺陷而死亡,随着菌体的溃解,质粒 DNA 被释放到 APC 的胞浆并被转移至细胞核,表达抗原蛋白。以 EGFP 为报告基因检测 SL7207 输送 DNA 的效力,发现 16% ~ 17% 的贴壁脾细胞为 EGFP 阳性,由于贴壁脾细胞中含有大量 DC 和巨噬细胞,表明以这种方法进行 DNA 免疫是可行的。以减毒沙门菌为 DNA 疫苗的载体至少有几个优点:① 能将质粒 DNA 直接输送进入专职 APC 内,而且由于每个菌体内的质粒 DNA 达数百拷贝,所以外源抗原能在 APC 内高水平表达。② 沙门菌的基因组 DNA 和脂多糖等成分能刺激 APC 上调 MHC II 类分子和 IFN-γ、TNF-α 等细胞因子的表达,起着 Th1 型免疫佐剂作用。③ 口服途径的免疫接种极为方便。

本研究用编码 HBV LHBs 的 DNA 疫苗转化 SL7207,以之口服免疫小鼠,有效诱生出抗 HBV 免疫应答。最近 Woo 等报道用类似的方法进行编码 HBV 包膜主蛋白(即表面抗原 HBsAg)DNA 疫苗的免疫实验,诱生出了强的 CTL 应答,但抗体反应很微弱,作者认为导致后者的原因是极少有 DNA 进入 APC 以外的其他体细胞表达分泌型 HBsAg,故很难有效激活 B 细胞而产生抗体^[11]。但 Darji 报道用携带李斯特菌膜蛋白抗原或溶解素抗原真核表达质粒的减毒沙门菌口服接种小鼠,免疫 1 次即诱导出高水平的抗体,机制可能是 CTL 杀伤部分表达抗原的 APC,导致抗原释放而激活 B 细胞^[7]。本研究中,口服 SL7207/pCI-S1S2S 诱导的 T 细胞增殖反应、CTL 反应均明显强于肌注 pCI-S1S2S 免疫,在体液免疫方面,不仅抗体产生的时间早、抗体阳转率高,而且有效抗原谱广,诱生出了抗-preS2 IgG。DNA 疫苗 pCI-S1S2S 表达产物为非分泌性胞浆蛋白,抗体的诱导必须依赖表达 LHBs 的细胞因损伤等原因而被动释放。因而,口服 SL7207/pCI-S1S2S 诱导强的抗体反应可能与该途径免疫可诱导 LHBs 更高水平在小

鼠体内表达及诱生更强的 CTL 应答均有关。

用减毒沙门菌作为原核表达重组疫苗的载体已经有大量的人体试验,结果表明其具有较好的安全性,商品化的人用伤寒活菌苗 Ty21a 本身就是减毒人沙门菌。减毒沙门菌作为 HBV DNA 疫苗的载体,不仅免疫效果更好,而且制备方法更简单,接种更方便。若将 HBV DNA 疫苗转化到 Ty21a 进行口服免疫,可能是极具前景的乙型肝炎的治疗方法。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Couillin I, Pol S, Mancini M *et al.* Specific vaccine therapy in chronic hepatitis B: induction of T cell proliferative responses specific for envelope antigens. *J Infect Dis*, 1999, **180**(1):15 ~ 26
- [2] Heathcote J, McHutchison J, Lee S *et al.* A pilot study of the CY-1899 T-cell vaccine in subjects chronically infected with hepatitis B virus. *Hepatology*, 1999, **30**(2):531 ~ 536
- [3] Oka Y, Akbar S M F, Horiike N *et al.* Mechanism and therapeutic potential of DNA-based immunization against the envelope proteins of hepatitis B virus in normal and transgenic mice. *Immunology*, 2001, **103**:90 ~ 97
- [4] Whitton J L, Rodriguez F, Zhang J *et al.* DNA immunization: mechanistic studies. *Vaccine*, 1999, **17**:1612 ~ 1619

- [5] Sirard J C, Niedergang F, Kraehenbuhl J P. Live attenuated *salmonella*: a paradigm of mucosal vaccines. *Immunological Reviews*, 1999, **171**:5 ~ 26
- [6] ZHAO F(赵平), ZHAO L J(赵兰娟), CAO J(曹洁) *et al.* Enhancement of immune responses of hepatitis B virus core DNA vaccine by a signal peptide and a universal helper T lymphocyte epitope. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*(生物化学与生物物理学报), 2002, **34**(3):341 ~ 346
- [7] Darji A, Guzman C A, Gerstel B *et al.* Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. *Cell*, 1997, **91**:765 ~ 775
- [8] Condon C, Watkins S C, Celluzzi C M *et al.* DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nat Med*, 1996, **2**(10):1122 ~ 1128
- [9] Barry M E, Gonzalez D P, Orson F M *et al.* Role of endogenous endonucleases and tissue site in transfection and CpG-mediated immune activation after naked DNA injection. *Human Gene Therapy*, 1999, **10**:2461 ~ 2480
- [10] Brown A, Hornaech C E, Demarco R *et al.* An attenuated *aroA* *Salmonella typhimurium* vaccine elicits humoral and cellular immunity to cloned β -galactosidase in mice. *J Infect Dis*, 1987, **155**:86 ~ 91
- [11] Woo P C Y, Wong L, Zheng B *et al.* Unique immunogenicity of hepatitis B virus DNA vaccine presented by live-attenuated *salmonella typhimurium*. *Vaccine*, 2001, **19**:2945 ~ 2954

Induction of Immune Responses in Mice by Hepatitis B Virus Large Envelope DNA Vaccine Delivered by Attenuated *Salmonella typhimurium*

ZHAO Ping¹ WANG Hong-Wei¹ LU Yang² QI Zhong-Tian^{1*}

¹(Department of Microbiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

²(Department of Oncology, Zhujiang hospital, affiliated to First Military Medical University, Guangzhou 510282, China)

Abstract The enhanced green fluorescent protein(EGFP) expression plasmid was transformed into an attenuated *AroA*⁻ autotrophic mutant of *Salmonella typhimurium* SL7207, the resultant bacteria was administered orally to BALB/c mice. EGFP expressed in spleen cells was detected by flow cytometry. A DNA vaccine encoding HBV large envelope protein was immunized BALB/c mice by oral delivery through SL7207 or by direct intramuscular injection. The serum antibodies, T lymphocyte proliferative response and cytotoxic T lymphocyte response of mice were detected. The results showed that both DNA immunization methods could induce cellular and humoral immune responses, whereas oral vaccination elicited stronger immune responses than intramuscular vaccination did. Therefore, oral administration with HBV DNA vaccine using attenuated *Salmonella* may be a simple and effective method for the therapy of hepatitis B.

Key words hepatitis B virus, DNA vaccine, attenuated *Salmonella*, immune responses

Received: 03-10-2002

This work was supported by Grant from Science and Technology Development Foundation of Shanghai(No.004319206)and Second Military Medical University Yu Ruan Research Foundation(No.43513003).

* Corresponding author. Tel: 86-21-25070265; Fax: 86-21-25070265; E-mail: qizt@smmu.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>