

携带 HCV 核心蛋白原核表达质粒与真核表达质粒的减毒伤寒沙门菌诱导小鼠免疫应答之比较

Comparison of Immune Responses Induced by Recombinant Attenuated *Salmonella typhi* Carrying Eukaryotic Expression Plasmid or Prokaryotic Expression Plasmid of HCV Core Protein

陈志辉¹ 赵平² 吴淑梅³ 曹洁² 张斌¹ 万谟彬¹ 柯金山² 戚中田^{2*}

CHEN Zhi-Hui¹ , ZHAO Ping² , WU Shu-Mei³ , CAO Jie² , ZHANG Bin¹ , WAN Mo-Bin¹ , KE Jin-Shan² and QI Zhong-Tian^{2*}

1 第二军医大学长海医院感染科, 上海 200433

2 第二军医大学微生物学教研室, 上海 200433

3 第二军医大学长海医院实验诊断科, 上海 200433

1 Department of Infectious Disease, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2 Department of Microbiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

3 Department of Experimental Diagnosis, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

摘要 丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白是丙肝疫苗的重要候选抗原,然而,该蛋白因具有免疫调控作用而影响免疫应答的诱导。构建了HCV核心蛋白的两种表达质粒,一种是体内激活型原核表达质粒pZW-C,另一种是真核表达质粒pCI-C。将该两种质粒转化减毒鼠伤寒沙门菌SL7207,得到重组菌SL7207/pZW-C和SL7207/pCI-C,分别将重组菌口服接种小鼠,检测小鼠的免疫应答,结果发现:①SL7207/pCI-C免疫鼠的CD3⁺CD4⁺T细胞持续降低,而SL7207/pZW-C免疫鼠的CD3⁺CD4⁺T细胞无明显改变;②SL7207/pCI-C免疫只诱导低水平抗HCV核心蛋白抗体,加强免疫对抗体阳转率及抗体水平无明显影响,而SL7207/pZW-C免疫组所有小鼠均产生较高水平的抗核心蛋白抗体。③SL7207/pCI-C免疫鼠脾细胞的体外增殖活性、细胞毒性T细胞活性以及加强免疫对细胞免疫应答的增强作用均明显不及SL7207/pZW-C免疫鼠。结果提示:携带真核表达质粒pCI-C的沙门菌因在小鼠细胞内表达天然形式(结构以及磷酸化修饰)的HCV核心蛋白,可能通过对T细胞的免疫抑制作用而弱化免疫应答。而以携带原核表达质粒pZW-C的沙门菌免疫可避免这一问题,并具有接种方便、成本低廉等优点,从而可望作为基于HCV核心蛋白为靶抗原的HCV疫苗的候选免疫方式。

关键词 丙型肝炎病毒 核心蛋白 减毒伤寒沙门菌 疫苗 免疫应答

中图分类号 R512.630.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)05-0862-05

Abstract Hepatitis C virus (HCV) core protein is considered to be an attractive candidate for development of protective HCV vaccines. However, this protein may attenuate the induction of systemic immune responses due to its immunomodulatory properties. In this study, we constructed a HCV core gene-containing eukaryotic expression plasmid pCI-C, and an *in vivo*-

Received: January 19, 2007; Accepted: March 12, 2007.

This work was supported by grant from the National Natural Science Foundation of China (No. 30471543 and No. 30671921).

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-21-25070313; E-mail: qizt@smmu.edu.cn

国家自然科学基金(No.30471543和No.30671921)项目资助。

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

inducible prokaryotic expression plasmid pZW-C, and transformed the recombinant plasmids into an attenuated *Salmonella typhimurium aroA* strain SL7207. The resulting bacterial strains SL7207/pCI-C and SL7207/pZW-C were used to orally immunize BALB/c mice, and the immune responses specific to HCV core protein were assessed. Immunization with the recombinant bacteria SL7207/pCI-C led to a persistent drop in percentage of CD3⁺ CD4⁺ T cells, and induced a weak anti-core IgG production. Splenocytes from SL7207/pCI-C immunized mice developed a relatively weak proliferation response and inferior cytotoxic activity compared to those from the mice immunized with bacteria SL7207/pZW-C. Boost immunization with SL7207/pCI-C yielded limited improvement in immune strength, while the boost with bacteria SL7207/pZW-C significantly enhanced the immune response. These results suggest that de novo synthesis of native HCV core protein may blunt the induction of immune responses. Attenuated *S. typhimurium* carrying HCV core protein could efficiently activate systemic cellular and humoral responses, and may be a promising strategy for the development of core-based HCV vaccines.

Key words Hepatitis C virus, core protein, attenuated *S. typhimurium*, vaccine, immune responses

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)主要经血液传播,是急、慢性肝炎的重要致病因子,并且与肝硬化和肝细胞癌的关系非常密切。HCV 基因组被克隆以后,HCV 疫苗在欧美国家一直是研究热点,然而十余年来一直未取得突破性进展。越来越多的资料表明,细胞免疫应答对于控制和清除 HCV 感染起关键作用,尤其在急性 HCV 感染的自然恢复中起决定性作用^[1,2],因此,诱导细胞免疫应答成为目前 HCV 疫苗研究的重要发展方向。HCV 核心蛋白是 HCV 诸蛋白中最保守的蛋白,在 HCV 感染者能诱导 CD4⁺ 与 CD8⁺ 限制性 T 细胞免疫应答,并且具有持久的记忆性^[3,4]。因此,核心蛋白可作为重要的 HCV 疫苗靶抗原。然而,该蛋白本身具有免疫调控作用,可通过多种途径抑制 T 细胞的免疫功能^[5,6],因此,选择基于该抗原的疫苗的免疫方式对于有效诱导免疫应答可能有重要意义。

伤寒沙门菌是细胞内侵袭菌,主要通过肠道感染,侵入肠粘膜相关淋巴组织(MALT),被 MALT 内的专职抗原提呈细胞(APC),如巨噬细胞、树突状细胞吞噬,并在吞噬小体内增殖^[7]。由于其能靶向感染 APC,因而作为疫苗载体很有发展潜力,多种病原体抗原以减毒伤寒菌为载体均可有效诱导免疫应答^[8]。本研究分别将携有 HCV 核心蛋白原核表达质粒和真核表达质粒的减毒伤寒沙门菌口服接种小鼠,发现二者诱导的免疫应答有明显差异。

1 材料和方法

1.1 实验材料

aroA 基因缺陷的减毒鼠伤寒沙门菌 SL7207 由美国 Stanford 大学 Stocker 教授惠赠。含有鼠伤寒沙门菌 *phoP* 活化的基因启动子(P_{phoP})的体内激活型原核表达载体 pZW 由本室构建^[9]。BALB/c 小鼠购自

上海必凯实验动物有限公司。非放射性细胞增殖(MTS)和细胞杀伤(LDH)检测试剂盒为 Promega 产品。

1.2 HCV 核心蛋白表达质粒的构建

以 HCV J4 株全长 cDNA 为模板,PCR 扩增编码 HCV 核心蛋白的 C 基因,分别用于构建 HCV 核心蛋白的原核和真核表达质粒。引物序列:pR1:5'-GGAATTCAAGGAGATATACATATGAGCACGAATCCTAAAC-3'(下划线为 SD 序列),pR2:5'-GCGAAGCTTTC AAGCGGAAGCTGGGATGGTC-3'; eR1:5'-GCGGCTA GCCCACCATGAGCACGAATCCTAAAC-3'(下划线为 Kozak 序列),eR2:5'-GCGTCTAGATTAAGCGGAAG CTGGGATGGTC-3'。引物 pR1 与 pR2 的扩增产物插入 T 载体,测序鉴定以后,以 *EcoR* I / *Hind* III 酶切,将 C 基因插入原核表达质粒载体 pZW,得到 pZW-C。引物 eR1 与 eR2 的扩增产物插入 T 载体,测序鉴定以后,以 *Nhe* I / *Xba* I 酶切,再将 C 基因插入真核表达质粒载体 pCI-neo(Promega 产品)得到 pCI-C。

1.3 HCV 核心蛋白在 293 T 细胞内的表达

将表达质粒 pCI-C 及空载体 pCI-neo 分别转染人胚肾 293 T 细胞,48 h 后以 Western blot 分析细胞裂解液中的 HCV 核心蛋白(HCV 核心蛋白单抗购自 Biodesign)。

1.4 HCV 核心抗原在减毒伤寒沙门菌中的表达

将质粒 pZW-C 及 pZW 分别转化减毒鼠伤寒沙门菌 SL7207,得到的重组菌 SL7207/pZW-C 及 SL7207/pZW 分别接种于含 100 mg/L 氨苄青霉素及 80 mmol/L MgCl₂ 的 LB 培养基,37 °C 振荡培养至对数生长中期,用含不同浓度 MgCl₂(0 ~ 100 mmol/L)的 LB 培养基重悬,37 °C 振荡培养 3 h,离心收集细菌。细菌裂解、煮沸,以 Western blot 检测 HCV 核心蛋白的表达。

1.5 减毒沙门菌口服免疫小鼠

将质粒 pCI-C、pCI-neo 分别转化沙门菌 SL7207, 得到重组菌 SL7207/pCI-C 及 SL7207/pCI-neo。将四种重组菌 SL7207/pCI-C, SL7207/pCI-neo, SL7207/pZW-C 及 SL7207/pZW 接种于含 100 mg/L 氨基青霉素及 80 mmol/L MgCl₂ 的 LB 培养基中培养, 对数生长期的细菌分别口服接种 6 周龄的雌性 BALB/c 小鼠, 每组 18 只, 剂量每次 1 × 10¹⁰ TU, 两周 1 次, 共 4 次。

1.6 小鼠体液免疫应答的检测^[9]

每次免疫后的第 12 天从各组小鼠眼眶取血, 离心分离血清, 以包被 HCV 核心蛋白的酶标板(1 μg/孔)ELISA 检测小鼠血清抗 HCV 核心蛋白 IgG。

1.7 流式细胞术分析小鼠 T 细胞表型

每次免疫后的第 12 天, 各组小鼠分别处死 3 只, 无菌分离脾脏, 制备脾细胞悬液, 0.84% NH₄Cl 裂解红细胞后, 以流式细胞计数 CD3⁺ CD4⁺ 与 CD3⁺ CD8⁺ T 细胞(FITC 标记的抗小鼠 CD3 单抗、PE 标记的抗小鼠 CD4、CD8 单抗购自 BD Pharmingen)。

1.8 小鼠 T 细胞增殖反应和 CTL 效应的检测^[9]

将小鼠脾细胞悬液接种 96 孔板, 分别以重组

HCV 核心蛋白(20 μg/mL) 转铁蛋白(50 μg/mL) 刺激, 同时设无抗原刺激孔, 72 h 后, 以 MTS 试剂检测小鼠的脾细胞增殖反应, 结果以刺激指数(stimulation index, SI) 表示。分别以稳定表达 HCV 核心抗原的 P815 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, 以乳酸脱氢酶释放法检测小鼠的 CTL 应答, 结果以效应细胞对靶细胞杀伤率表示。

1.9 统计学处理

数据的统计学分析: 采用两组间样本均数的 *t* 检验。

2 结果

2.1 HCV 核心蛋白在 293T 细胞和伤寒沙门菌中的表达

Western blot 分析表明质粒 pCI-C 在 293T 细胞内可表达 HCV 核心蛋白, 分子量与预计的 22 kD 相符(图 1), 重组沙门菌 SL7207/pZW-C 在低于 1 mmol/L Mg²⁺ 的 LB 培养液中可表达 HCV 核心蛋白, 若培养在 100 mmol/L Mg²⁺ 的 LB 中, 则检测不到 HCV 核心蛋白的表达(图 2)。



图 1 Western blot 分析 HCV 核心蛋白在 293T 细胞和减毒沙门菌中的表达

Fig. 1 Western blot analysis of HCV core protein expressed in 293T cells and attenuated *S. typhimurium*

(A) 1: 293 T cells transfected with pCI-C; 2: 293 T cells transfected with pCI-neo. (B) 1~5: SL7207/pZW-C cultured with 100, 10, 1, 0.1, and 0.01 mmol MgCl₂, respectively; 6: SL7207/pZW-C cultured without MgCl₂; 7: SL7207/pZW cultured without MgCl₂.

2.2 小鼠抗体应答

分别检测各免疫组接受全程免疫的 6 只小鼠的血清抗 HCV 核心蛋白 IgG 抗体, 重组菌 SL7207/pZW-C 免疫组中的 6 只小鼠于第二次免疫后均可产生抗核心蛋白抗体, 而 SL7207/pCI-C 免疫组被检测的 6 只小鼠中仅 2 只产生了抗核心蛋白抗体, 并且随后的两次加强免疫未提高抗体阳转率。图 2 为第 4 次免疫后第 12d 各组小鼠的血清抗体检测结果。

2.3 小鼠 T 细胞表型分析

对各组小鼠脾细胞进行的流式细胞分析表明, SL7207/pCI-C 免疫组小鼠的 CD3⁺ CD4⁺ T 细胞在第二次免疫后明显降低, 而其余 3 组小鼠的 CD3⁺ CD4⁺ T 细胞百分率相似(图 3)。SL7207/pCI-C 免疫组 CD3⁺ CD8⁺ T 细胞百分率也低于其他三组, 但无显著性差异(结果未示)。

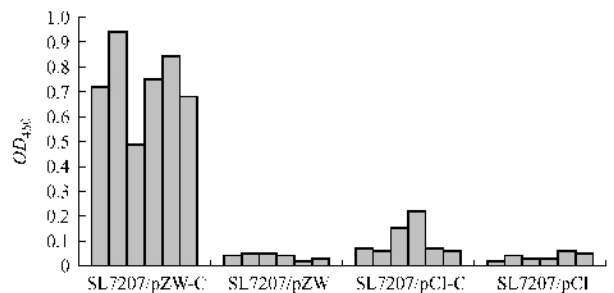


图 2 小鼠血清抗 HCV 核心抗体的检测

Fig. 2 Anti-HCV core IgG in orally immunized mice (serum was diluted 200 fold, and *n* = 6 mice)

2.4 小鼠 T 细胞增殖应答

体外以重组 HCV 核心蛋白刺激免疫鼠的脾细胞 SL7207/pCI-C 免疫组于第二次免疫后才可发生增殖反应, 随后的两次加强免疫未能增强增殖应答。SL7207/pZW-C 免疫小鼠在首次免疫后即产生增殖

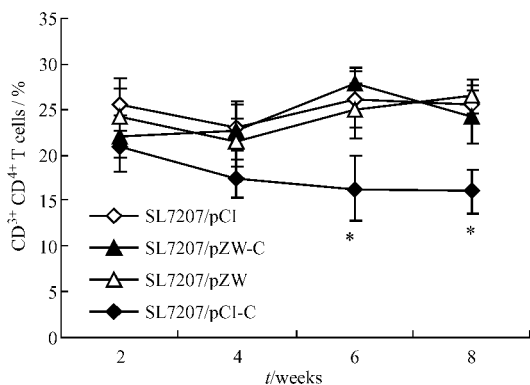
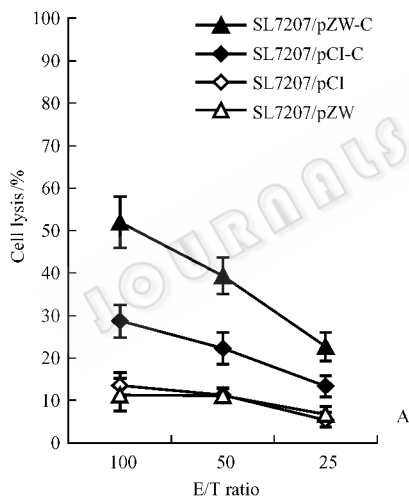


图3 流式细胞分析小鼠 CD3⁺ CD4⁺ T 细胞百分率
Fig. 3 Analysis of CD3⁺ CD4⁺ T cells by flow cytometry (Asterisks indicate a significant difference compared to the control group, $P < 0.05$)

反应,且加强免疫能明显增强增殖应答(图4)。

2.5 CTL 应答

检测免疫小鼠脾细胞对稳定表达 HCV 核心抗原的 P815 细胞的杀伤效应,如图5所示,第一次加强免疫以后,SL7207/pCI-C 与 SL7207/pZW-C 免疫小



鼠的脾细胞均可有效杀伤靶细胞,后者的杀伤率明显高于前者($P < 0.05$)。加强免疫可上调 CTL 应答,但 SL7207/pZW-C 的作用更明显,第四次免疫后,SL7207/pZW-C 免疫小鼠 CTL 应答的增强幅度明显高于 SL7207/pCI-C 组。

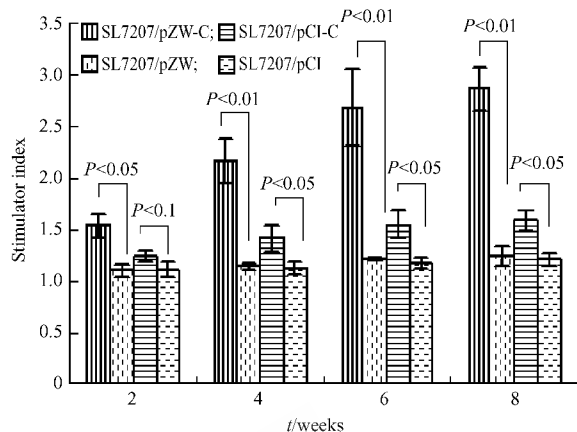


图4 小鼠的 T 细胞增殖应答

Fig. 4 The T lymphocyte proliferative response of immunized mice

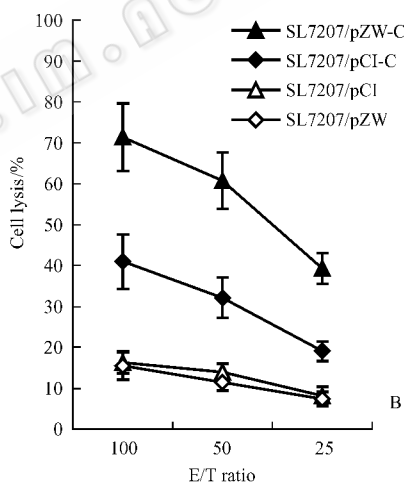


图5 小鼠的 CTL 应答

Fig. 5 CTL response of immunized mice

A : assay after the second immunization B : assay after the fourth immunization.

3 讨论

编码 HCV 核心蛋白的 DNA 疫苗能诱导细胞 CTL 应答,然而,诱导辅助性 T 细胞应答以及体液免疫应答的效果不够理想^[10,11]。HCV 核心蛋白具有免疫调控作用,对 T 淋巴细胞以及 APC 有全面的抑制作用,这可能是 HCV 慢性感染的形成机制之一^[5,6]。DNA 疫苗在体内表达 HCV 核心蛋白,产生的核心蛋白经过细胞内的加工修饰(如磷酸化),使之具有天然的免疫抑制作用,从而导致免疫应答的弱化。

伤寒沙门菌可靶向感染抗原提呈细胞,作为疫苗载体很有发展潜力。本研究中,我们分别构建了两种 HCV 核心蛋白表达质粒,一种是含伤寒沙门菌 P_{pag} 启动子的体内激活型原核表达质粒 pZW-C,该质粒只有在沙门菌进入细胞内以后才启动转录活性,可避免外源蛋白组成性表达造成的质粒丢失。镁离子能抑制该启动子活性,故细菌培养液中加镁离子^[9],一种是含巨细胞病毒启动子的真核表达质粒 pCI-C。将转化有该两种质粒的沙门菌 SL7207/pZW-C 和 SL7207/pCI-C 分别口服免疫小鼠。SL7207/pCI-C 免疫的小鼠 CD4⁺ T 细胞在第二次免疫以后出现持续的明显降低趋势,而 CD8⁺ T 细胞数量仅略有降低。HCV 核心蛋白能增强 T 淋巴细胞对 Fas 介导

的细胞凋亡的敏感性,并抑制 IL-2 与 IFN- γ 的表达^[12]。这可能与本研究中 SL7207/pCI-C 免疫小鼠的 CD4⁺ T 细胞数量明显降低有关,该结果还提示,可能 CD4⁺ T 细胞比 CD8⁺ T 细胞对 HCV 核心蛋白的负向调控作用更为敏感。检测小鼠的 T 细胞增殖反应则发现,重组菌 SL7207/pZW-C 免疫 1 次即可诱导强的 T 细胞增殖反应,且加强免疫可有效增强增殖应答,而 SL7207/pCI-C 免疫的小鼠在进行第二次免疫后才可检测到 T 细胞增殖应答,并且,随后的加强免疫对 T 细胞增殖反应的影响并不明显。

两种重组沙门菌诱导的 CTL 反应与各自所诱导的 T 细胞增殖应答模式相似,SL7207/pZW-C 诱导更强的 CTL 应答,并且加强免疫能增强 CTL 应答,而 SL7207/pCI-C 诱导的 CTL 应答明显低于 SL7207/pZW-C,并且加强免疫的作用幅度有限。从理论上分析,SL7207/pCI-C 免疫以内源性表达抗原的方式进行抗原提呈,诱导免疫应答的途径与 DNA 免疫相似,更有利于 CTL 的激活,而 SL7207/pZW-C 则以外源性抗原的提呈方式刺激免疫系统,并非是刺激 CTL 的最有效方式,但本试验的结果与理论相反。CTL 应答通常依赖于 CD4⁺ T 细胞以及其分泌的细胞因子,如 IL-2 与 IFN- γ ,因此,CD4⁺ T 细胞的数量以及反应强度的限制可能是 SL7207/pCI-C 免疫小鼠 CTL 应答相对较低的直接原因。SL7207/pCI-C 免疫小鼠中仅小部分产生了抗体,而 SL7207/pZW-C 免疫鼠全部产生了高水平抗体。这固然和两种方式免疫中的抗原表达水平有关,但与 CD4⁺ T 细胞应答也有密切关系。如 Gehring 等报道,HCV 核心蛋白 DNA 疫苗仅能诱导弱的 T 细胞增殖应答与体液免疫应答,而将细胞因子基因如 IL-2、GM-CSF 基因与 DNA 疫苗同时肌肉注射接种则能有效提高系统性免疫应答^[13,14]。这也提示,HCV 核心蛋白的免疫抑制作用对其诱导的免疫应答的模式和强度有全面的影响。SL7207/pCI-C 免疫所致的抗原在细胞内表达,形成天然结构的 HCV 核心蛋白,其磷酸化修饰与该蛋白在细胞内的定位以及免疫调控作用密切相关,而 SL7207/pZW-C 在细菌内表达抗原,无磷酸化修饰,表达的抗原与细菌残骸在抗原提呈细胞内被共同加工、提呈,从而不能行使免疫抑制作用。

本研究表明,对于本身具有免疫抑制作用的 HCV 核心蛋白,以在免疫宿主内表达内源性抗原的方式进行免疫接种并非可取的方式,而以外源性抗原的形式进行免疫可能更有效诱导免疫应答,对于其他类似的病毒抗原,也许存在类似机制。本研究中构建的携带原核表达质粒的沙门菌因在宿主细胞内表达外源性抗原,可避免这一问题,并具有接种方便、成本低廉等优点,从而可望作为以核心蛋白为靶抗原的 HCV 疫苗的候选免疫方式。当然,减毒沙门

菌作为疫苗载体还存在一些问题,在疫苗制备以及运输过程中细菌活力的降低,细菌感染性在不同个体之间的差异,抗原在体内的表达水平等均是今后需要解决的问题。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, et al. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 2000, **191**(9): 1499 - 1512.
- [2] Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, et al. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(24): 15661 - 15668.
- [3] Bukh J, Purcell RH, Miller RH. Sequence analysis of the core gene of 14 hepatitis C virus genotypes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**(17): 8239 - 8243.
- [4] Janvier G, Chaix ML, Fontaine H, et al. The core-specific precursor T cell response is directed to the N-terminal and central parts of the protein and positively correlates to the viral load in chronically HCV-infected patients. *Virology*, 2005, **340**(2): 318 - 325.
- [5] Eisen-Vandervelde AL, Waggoner SN, Yao ZQ, et al. Hepatitis C virus core selectively suppresses interleukin-12 synthesis in human macrophages by interfering with AP-1 activation. *J Biol Chem*, 2004, **279**(42): 43479 - 43486.
- [6] Siavoshian S, Abraham JD, Thumann C, et al. Hepatitis C virus core, NS3, NS5A, NS5B proteins induce apoptosis in mature dendritic cells. *J Med Virol*, 2005, **75**(3): 402 - 411.
- [7] Kang HY, Srinivasan J, Curtiss R, et al. Immune responses to recombinant pneumococcal PspA antigen delivered by live attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium vaccine. *Infect Immun*, 2002, **70**(4): 1739 - 1749.
- [8] Xu F, Ulmer JB. Attenuated salmonella and Shigella as carriers for DNA vaccines. *J Drug Target*, 2003, **11**(8 - 10): 481 - 488.
- [9] Zhao P (赵平), Ke SS (柯山山), Wang HW (王宏卫), et al. Enhancement by an *in vivo*-activated promoter of immunogenicity of recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* expressing hepatitis C virus core antigen. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* (生物化学与生物物理学报), 2003, **35**(3): 266 - 270.
- [10] Isaguliantis MG, Petrakova NV, Kashuba EV, et al. Immunization with hepatitis C virus core gene triggers potent T-cell response, but affects CD4⁺ T-cells. *Vaccine*, 2004, **22**(13 - 14): 1656 - 1665.
- [11] Encke J, Putlitz J, Stremmel W, et al. CpG immuno-stimulatory motifs enhance humoral immune responses against hepatitis C virus core protein after DNA-based immunization. *Arch Virol*, 2003, **148**(3): 435 - 448.
- [12] Mooman JP, Prayther D, McVay D, et al. The C-terminal region of hepatitis C core protein is required for Fas-ligand independent apoptosis in Jurkat cells by facilitating Fas oligomerization. *Virology*, 2003, **312**(2): 320 - 329.
- [13] Gehring S, Gregory SH, Kuzushita N, et al. Type 1 interferon augments DNA-based vaccination against hepatitis C virus core protein. *J Med Virol*, 2005, **75**(2): 249 - 257.
- [14] Ouyang P, Hwang LH, Tao MH, et al. Co-delivery of GM-CSF gene enhances the immune responses of hepatitis C viral core protein-expressing DNA vaccine: role of dendritic cells. *J Med Virol* 2002, **66**(3): 320 - 328.
- [15] Isaguliantis MG, Petrakova NV, Kashuba EV, et al. Immunization with hepatitis C virus core gene triggers potent T-cell response, but