

# 戊型肝炎病毒重组颗粒性蛋白疫苗在小鼠体内诱导的免疫应答研究

吴婷, 欧山海, 程通, 何水珍, 伍小路, 郑舟, 张军, 夏宁邵\*  
(厦门大学 福建省医学分子病毒学研究中心, 福建 厦门, 361005)

**摘要:** HEV 239 是福建省医学分子病毒学研究中心实验室研制的一种戊型肝炎病毒(HEV)重组颗粒性蛋白疫苗, 该文旨在研究 HEV 239 蛋白疫苗在小鼠体内诱导产生特异性免疫应答的情况。将 5 $\mu$ g HEV 239 蛋白疫苗(239-Pro)、加铝佐剂疫苗(239-Vac)或加弗氏佐剂疫苗(239-CFA)肌肉注射免疫 BALB/c 鼠 3 次, 第 8 周检测鼠血清抗 HEV 抗体及其亚类, 同时用 ELISPOT 方法检测细胞毒性 T 细胞(CTL)应答。结果显示: 239-Vac 诱导的抗体滴度与 239-CFA 相当, 高于无佐剂的 239-Pro。239-Vac 诱导的抗体中, IgG1/IgG2a 比值显著高于 239-CFA 和 239-Pro, 主要为 Th2 型应答。除 239-CFA 之外, 239-Vac 和 239-Pro 也可诱导出一定的 HEV 抗原特异性 I 型 T<sub>c</sub> 应答。提示: 重组抗原 HEV 239 能诱导良好的抗体应答及一定的 T<sub>c1</sub> 应答。

**关键词:** 戊型肝炎病毒; 疫苗; 细胞免疫应答

中图分类号: R373.21; R392 文献标识码: A 文章编号: 1000-8721(2005)06-0428-06

戊型肝炎(戊肝)是一种主要经胃肠道传播的急性传染性肝炎, 临床表现与甲型肝炎相似, 但病死率较高(约 2.5%), 孕妇高达 20%。我国是戊肝高流行区之一, 20 世纪 80 年代新疆南部地区曾发生过累计发病约 12 万人的大流行, 且每年均有规模不等的食物和饮水引起的戊肝暴发<sup>[1, 2]</sup>。自 1983 年 Balayan 等<sup>[3]</sup>首次发现戊肝病毒(HEV)以来, 研制戊肝疫苗的努力一直未曾间断, 但遗憾的是, 迄今尚未获得成功<sup>[4-7]</sup>。

HEV 基因组含 3 个开放读码框(ORF), 其中 ORF2 编码 660 个氨基酸的多肽(PORF2), 组成病毒衣壳<sup>[2]</sup>。多个研究证实 PORF2 上存在保护性中和表位, 因此是疫苗研制的主要靶抗原<sup>[4-7]</sup>。我们曾表达了 HEV ORF2 的一个片段(E2), 免疫恒河猴可产生良好保护性<sup>[8-10]</sup>。利用 E2 蛋白制备的单克隆抗体, 鉴定到 PORF2 上有 2 个不同的中和表位<sup>[11]</sup>。在此基础上, 进一步利用大肠杆菌表达 PORF2 的 aa 368~606 片段, 获得的重组蛋白(HEV 239)可以形成颗粒样抗原, 其免疫原性显著增强, 中和表位活性也有所提高<sup>[12, 13]</sup>。用 HEV 239 蛋白制备的疫苗免疫恒河猴可诱导出很强的抗体应答, 并能有效保护动物免受同型和异型病毒的感

染<sup>[14]</sup>。除体液免疫外, 细胞免疫应答在病毒性疾病的预防和转归中起着重要作用<sup>[15-17]</sup>。因此, 深入了解 HEV 疫苗诱导的细胞免疫应答情况对全面评价该疫苗的免疫原性, 评估其应用前景具有重要意义。

## 材料与方 法

**1 细胞株和质粒** 细胞株 CV-1(ATCC CCL-70)、143-B(ATCC CRL-8303)和 BHK21(ADCC CCL210)购自 ATCC。小鼠肥大细胞瘤细胞 P815(H-2d)(ATCC TIB-64)、重组痘苗病毒载体 pV、痘苗病毒 Western Reserve 株(WR 株), 由香港大学吴文翰教授惠赠。

**2 实验动物** 无特殊病原体(SPF)级 BALB/c 小鼠, 雌性, 6~8 周龄, 由本校实验动物中心提供。

**3 疫苗** 铝佐剂吸附戊肝病毒重组蛋白疫苗(239-Vac, 批号 20030401)(铝佐剂与抗原 8:1 混合)、纯化 239 蛋白(239-Pro)由北京万泰生物药业有限公司提供<sup>[14]</sup>。弗氏佐剂疫苗(239-CFA)为完全弗氏佐剂与 239 蛋白等体积混合而成。

**4 重组痘苗病毒 WR-239 的构建**

**4.1 239 基因的定点突变** 在 239 基因序列第 285~291bp 处存在 TTTTCT 序列, 该序列为痘苗病毒的终止信号序列<sup>[17]</sup>, 可能导致 239 mRNA 的转录终止。因此我们通过设计引物, 将第 288 碱基 T 突变为 C(氨基酸同义突变), 以破坏该信号序列。具体方法是: 设计上游引物 239F: GATATC ATG ATA GCG CTT ACC CTG; 下游引物 239(273~303)R: AGC TCG GAG GAC AGA GAA AGG GCG CGA TGG C, 以 pTO-T7-239 质粒<sup>[12]</sup>为模板, 94℃ 5min, 94℃ 50s, 55℃

收稿日期: 2005-06-13; 修回日期: 2005-08-01

基金项目: 福建省科技重大专项(2004YZ01-01), 厦门市重大产业科技项目(3502Z20041008)

作者简介: 吴婷(1973-)女, 博士, 讲师, 分子病毒学, Tel: 86-592-2184113; E-mail: wuting@xmu.edu.cn

\* 通讯作者: 夏宁邵, E-mail: nsxia@xmu.edu.cn

50s, 72°C 50s, PCR 扩增 20 个循环, 得到 239 基因 nt 1~303 序列, 其中 nt288 已由 T 突变为 C。回收 PCR 产物作为上游引物, 与合成的另一个下游引物 239 (707~723) R: GATATC CTA GCG CGG AGG GGG, 仍以 pTQ-T7-239 质粒为模板进行第二轮 PCR, 条件为 94°C 5min, 94°C 50s, 55°C 50s, 72°C 50s, 扩增 20 个循环, 即得到突变的 239 基因 (其基因 5' 端和 3' 端皆带入 *EcoRV* 酶切位点)。回收 PCR 产物, 克隆到 pMD18-T 载体 (TAKARA 公司) 中, 得到 pT-239 质粒, 测序验证无误。

4.2 构建重组质粒 pV-239 *EcoRV* 单酶切 pT-239 质粒, 回收 720bp 的 239 片段, 插入经 *Sma*I 线性化的载体 pV 中, 置于痘苗病毒早晚期启动子 P7.5 下游, 获得 pV-239 质粒。

4.3 构建重组痘苗病毒 WR-239 构建重组痘苗病毒的方法参照文献<sup>[18]</sup>。简言之: 将 pV-239 质粒以 Lipofectamine (Invitrogen 公司) 转染经 WR 病毒 37°C 感染 2h 的 CV-1 细胞, 48h 后刮下细胞, 冻融 3 次, 作为重组病毒 WR-239 储存液。将该重组病毒储存液稀释不同倍数后感染 143B 细胞, 37°C 2h, PBS 洗 1 次, 加入含 0.05 mg/ml 5-溴脱氧尿嘧啶 (BrdU)、100 $\mu$ g/ml X-gal、1% 低熔点琼脂糖的 2% MEM, 48h 后挑取蓝色空斑, 进一步感染 CV-1 细胞扩增。获得的病毒用 CV-1 细胞测定病毒滴度, 方法是将 CV-1 种入 6 孔板内, 待细胞铺满约 95%, PBS 洗 1 次。将获得的病毒液用 2% MEM 做 10 倍系列稀释, 分别取 500 $\mu$ l 于 37°C 感染细胞 1h, 弃去残余病毒液, PBS 洗 1 次, 加入含 0.05 mg/ml BrdU、100 $\mu$ g/ml X-gal、1% 低熔点琼脂糖的 2% MEM, 72h 后计数蓝色空斑, 病毒滴度 = 蓝色空斑数  $\times$  2  $\times$  稀释倍数 PFU/ml。

4.4 WR-239 的表达和活性鉴定 以 WR-239 感染 BHK21 细胞 (MOI = 5), 48h 后收集细胞, 重悬于 PBS, 液氮冻融 3 次, 4 000r/min 离心取上清, 用 ELISA 方法检测 239 蛋白的表达 (双抗体夹心法), 包被抗体为抗 239 的单抗 8C11<sup>[11]</sup> 100 $\mu$ g/ml, 加入 100 $\mu$ l 细胞上清, 检测抗体为 8C11-HRP。同时采用 Western blot 检测抗原表达, 一抗为 8C11, 二抗为碱性磷酸酶标记的羊抗鼠多抗。

5 免疫小鼠 将 18 只小鼠随机均分成 3 组, 分别在腿部肌肉注射 125 $\mu$ l 239-Vac、239-CFA 或 239-Pro (其中 239 蛋白含量皆为 5 $\mu$ g/只)。在第 4 周、6 周各以相同疫苗相同剂量加强免疫 1 次。第 8 周采集小鼠尾部静脉血, 分离血浆, 检测抗 HEV 抗体及血清抗体亚型。同时取小鼠脾脏细胞检测 IFN- $\gamma$  ELISPOT。

6 血清抗-HEV 抗体检测 用 HEV ELISA 试剂盒 (双抗原夹心法, 北京万泰公司提供) 检测各组小鼠不同时间的血清抗-HEV 总抗体滴度<sup>[19]</sup>。

7 血清抗体亚型分析 (间接 ELISA 法) 96 孔板用 239 蛋白包被, 分别加入系列稀释的免疫小鼠血清后, 洗涤, 再分别加入 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG1 和 IgG2a 抗体进行检测。同时将一份作为定量参照品的含高滴度抗-HEV 抗体的小鼠血清 (北京万泰公司提供) 作系列梯度稀释, 检测绘制标准曲线, 测得小鼠血清相应的抗体含量相对值, 并计算 IgG1 /

IgG2a 比值。

8 IFN- $\gamma$  ELISPOT 检测 按照试剂盒 (BD<sup>TM</sup> ELISPOT SET) 说明书进行。简言之: (1) 以抗鼠 IFN- $\gamma$  抗体 100 $\mu$ l/孔 (5 $\mu$ g/ml) 包被 ELISPOT 96 孔板。以 WR-239 或 WR-S (重组乙型肝炎表面抗原的重组痘苗病毒, 本室保存) (MOI 10) 感染 P815 细胞, 37°C 培养过夜, 作为刺激细胞; (2) 次日各孔以 10% FBS 的 1640 培养基室温封闭 2h; (3) 小鼠脾细胞以台盼蓝计数活细胞数后, 每孔接种  $1 \times 10^6$  或  $3 \times 10^5$  个/100 $\mu$ l。同时将感染了 WR-239 和 WR-S 的 P815 细胞以台盼蓝计数活细胞数, 按脾细胞/刺激细胞 = 10/1 的量种于相应孔中。每个样品作 3 个复孔。阳性或阴性对照孔则分别加入 ConA (2 $\mu$ g/ml) 或同一培养基。37°C、5% CO<sub>2</sub> 静置培养 40h; (4) 各孔洗涤后加入生物素化抗鼠 IFN- $\gamma$  抗体, 100 $\mu$ l/孔 (2.5 $\mu$ g/ml), 室温反应 2h; (5) 各孔洗涤后加入链霉亲和素 HRP, 100 $\mu$ l/孔 (5 $\mu$ g/ml), 室温反应 2h; (6) 洗涤后加入 HRP 底物 AEC, 避光显色, 以水冲洗终止, 晾干; (7) 以 ImmunoSpot (CTL 公司) 进行计数和数据处理。

9 统计分析 以 Student *t* 检验进行抗体几何平均滴度 (GMT)、IgG1/IgG2a 几何平均比值 (GMR) 以及 IFN- $\gamma$  分泌细胞数间的差别检验。以配对 *t* 检验进行 HEV 239 刺激与 HBsAg 刺激的 IFN- $\gamma$  分泌细胞数间的差别检验。

## 结 果

### 1 表达 HEV 239 蛋白的重组痘苗病毒的构建

通过 PCR 将第 288 位碱基 T 定点突变为 C, 构建重组痘苗病毒 WR-239。以 ELISA 检测 MOI 10 的 WR-239 感染的 BHK21 细胞的细胞裂解上清, 其 OD<sub>620</sub> 值为 3.281; 而野生痘苗病毒 WR 感染 BHK21 细胞的细胞裂解上清对照的 OD<sub>620</sub> 值为 0.114。Western blot 结果 (图 1) 亦表明, WR-239 能够在哺乳动物细胞内表达出有活性的 239 蛋白。

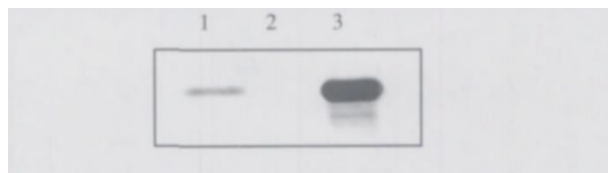


图 1 Western blot 检测 WR-239 表达活性

Figure 1 Expression of WR-239 detected by Western blot

Lane 1. Lysate of BHK21 cell line infected with WR-239;

Lane 2. Lysate of BHK21 cell line infected with WR-S;

Lane 3. Purified HEV239.

### 2 不同疫苗诱导产生的抗体滴度

分别用 239-Vac、239-CFA 和 239-Pro 于 0、4、6 周 3 次免疫 6~8 周龄 BALB/c 小鼠, 第 8 周采血检测各鼠抗 HEV 抗体滴度。结果表明, 239-Vac 诱导的抗体滴度与 239-CFA 基本相同 (*t* 检验 *t* =

0.35,  $P > 0.05$ ), GMT 分别为 1:24 251 和 1:28 509, 而无佐剂的 239-Pro 诱导的抗体滴度显著低于前二者 ( $t$  值分别为 3.53、4.61,  $P < 0.01$ ), GMT 仅 1:1 368 (图 2)。

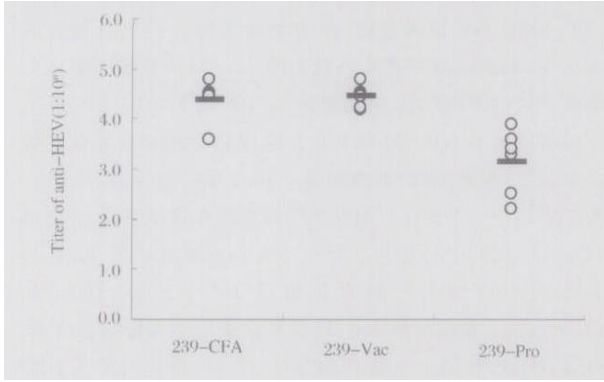


图 2 不同疫苗诱导的抗-HEV 抗体滴度

Figure 2 Titer of anti-HEV induced by different vaccines

Shortline symbols represent the geometric mean titers (GMT) of anti-HEV induced by vaccines.

### 3 不同疫苗诱导抗体的亚型

检测小鼠参比血清的抗 HEV IgG1、IgG2a 含量, 结果表明, 该血清中 IgG1、IgG2a 含量基本相同 (结果未显示)。以该参比血清制作标准曲线, 对免疫鼠血清中抗 HEV 抗体进行亚型测定。结果表明 (图 3), 239-Vac 诱导的 IgG1/IgG2a 的几何平均比值 (GMR) 为 269.2, 显著高于 239-CFA 以及 239-Pro ( $t_{Vac/CFA} = 7.01$ ,  $P < 0.001$ ;  $t_{Vac/Pro} = 3.67$ ,  $P < 0.01$ ), 而 239-Pro (GMR = 11.7) 和 239-CFA (GMR = 2.9) 的亚型分布基本一致 ( $t_{Pro/CFA} = 1.32$ ,  $P > 0.05$ )。表明铝佐剂疫苗主要诱导 Th2 型免疫应答, 而弗氏佐剂疫苗与无佐剂疫苗诱导较为均衡的 Th1/Th2 型应答。

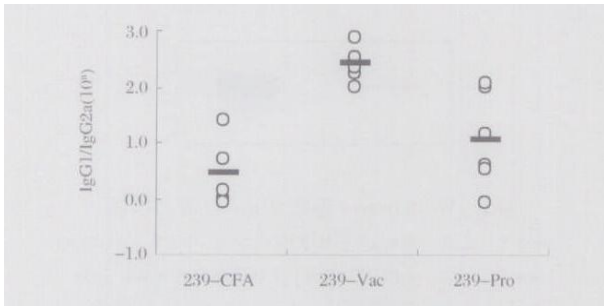


图 3 不同疫苗诱导的抗 HEV 的抗体亚类比值

Figure 3 Antibody subtypes of anti-HEV induced by different vaccines

Short line symbols represent the geometric mean ratios (GMR) of IgG1/IgG2a induced by vaccines.

### 4 IFN-γ-ELISPOT 分析 HEV 重组颗粒性蛋白疫苗

#### 苗不同剂型诱导的抗原特异性细胞免疫应答

用 IFN-γ-ELISPOT 法离体 (*ex vivo*) 检测 HEV 239 抗原特异性细胞免疫应答。三种疫苗免疫的小鼠脾细胞, 在非特异刺激剂 ConA 作用下, 产生的非特异斑点数未见明显差异, 表明其 IFN-γ 分泌能力相当 (图 4)。如图 5 所示, 239-Vac 免疫小鼠脾细胞在 WR-239 感染的 P815 细胞刺激下, 斑

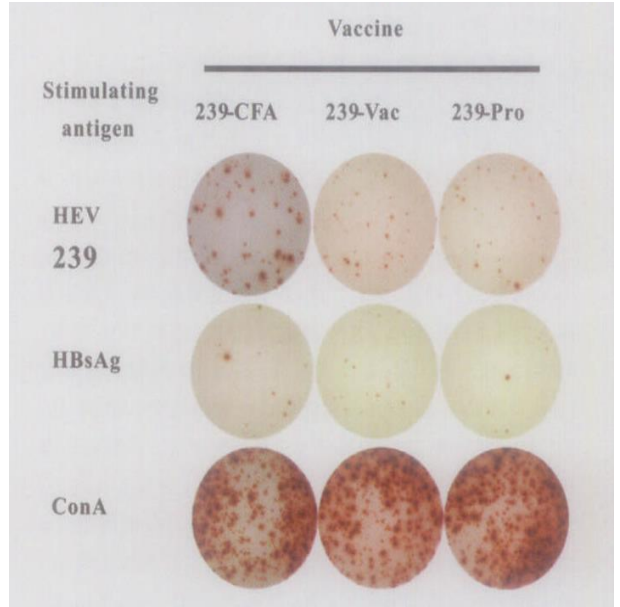


图 4 HEV 重组颗粒性蛋白疫苗不同剂型免疫的小鼠脾细胞经不同抗原刺激的 IFN-γ-ELISPOT 代表图

Figure 4 Representative IFN-γ-ELISPOT maps of spleen cells from vaccinated mice under antigen stimulation

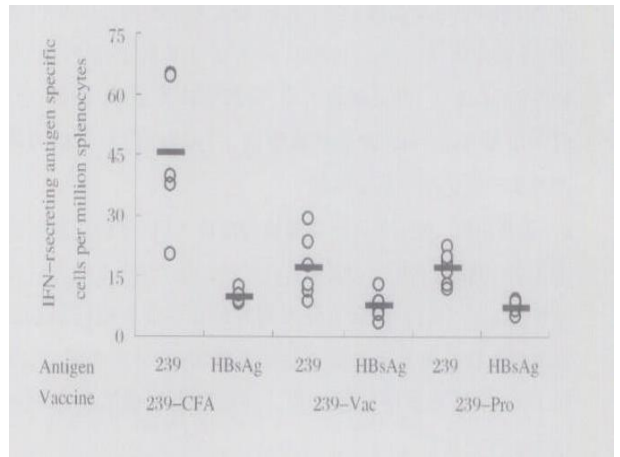


图 5 HEV 重组颗粒性蛋白疫苗不同剂型免疫的小鼠 HEV 抗原特异性 IFN-γ 分泌 T 细胞数

Figure 5 Frequencies of IFN-γ-secreting HEV antigen specific T cells following different vaccination Shortline symbols represent the geometric mean frequencies of IFN-γ-secreting cells.

点形成细胞数 (SFC) 显著高于对照 (以 WR-S 感染

的 P815 细胞刺激) ( $t_{239/s} = 4.08; P < 0.05$ ), 表明该疫苗能够诱导一定的抗原特异性 T<sub>cl</sub> 型细胞免疫应答。在三种疫苗中, 239-CFA 诱导的细胞免疫最强(45.5 SFC/10<sup>6</sup> 细胞), 显著高于 239-Vac(17.4 SFC/10<sup>6</sup> 细胞) 和 239-Pro(17.1 SFC/10<sup>6</sup> 细胞) ( $t_{CFA/Vac} = 3.31; t_{CFA/Pro} = 3.58; P < 0.01$ ), 而后二者诱导的细胞免疫应答均不高( $t_{Vac/Pro} = 0.08; P > 0.05$ )。

## 讨 论

机体特异性抗病毒免疫包括体液免疫和细胞免疫。一般疫苗主要通过刺激体液免疫系统产生特异性中和抗体发挥保护作用, 但细胞免疫应答对于疫苗的有效性同样具有重要作用。特异性细胞免疫应答由 CD4<sup>+</sup> T 辅助细胞(Th) 应答和 CD8<sup>+</sup> 细胞毒性 T 细胞(CTL) 两个部分组成。CTL 通过分泌 IFN- $\gamma$ 、IL-2 等细胞因子或通过细胞直接杀伤发挥抗病毒作用。Th1 细胞诱导产生 IgG2a 抗体, 同时对 CTL 应答起辅助作用; 而 Th2 细胞主要诱导 IgG1 抗体, 对 CTL 的辅助作用不明显<sup>[20-21]</sup>。因此, 对鼠抗体的亚型分析有助于了解疫苗诱导的免疫类型状况。本研究中, 239-Vac 能诱导出与 239-CFA 相当水平的抗体(GMT 分别为 1:24 251 和 1:28 509), 远高于无佐剂的 239-Pro(GMT 为 1:1 368,  $P < 0.01$ )。但 239-Vac 诱导的抗体中, IgG1/IgG2a 比值达 269.2, 显著高于 239-CFA(2.9) 和 239-Pro(11.7), 表现为明显的 Th2 型。而 239-CFA 与 239-Pro 诱导的抗体虽也以 IgG1 为主, 但 Th2 倾向性没有 239-Vac 那么显著。

CTL 具有分泌细胞因子和杀伤靶细胞的功能, CTL 的检测有两种方法, 即检测细胞因子分泌细胞数的 ELISPOT 和检测 CTL 对靶细胞杀伤效率的 Cr<sup>51</sup> 释放试验。研究表明, IFN- $\gamma$  ELISPOT 结果与 Cr<sup>51</sup> 释放法检测的 CTL 杀伤活性通常呈正相关, 均可反映出 CTL 的应答情况<sup>[22-25]</sup>。ELISPOT 方法无需进行同位素操作, 而且具有成熟的商业试剂盒, 结果稳定, 灵敏度高, 近年已越来越多地取代 Cr<sup>51</sup> 释放法成为 CTL 检测的通用方法<sup>[26]</sup>。

本研究采用 IFN- $\gamma$  ELISPOT 方法, 以表达 HEV 239 抗原的 P815 细胞和表达 HBsAg 抗原的 P815 细胞(对照) 作为抗原呈递细胞, 对免疫小鼠脾细胞进行刺激。由于 P815 细胞表面只表达 MHG-I 类分子, 故检测到的 IFN- $\gamma$  均由 CD8<sup>+</sup> T 细胞产

生<sup>[27]</sup>。结果显示, 三种疫苗均可诱导出一定的 HEV 抗原特异性 CTL 应答, 239-CFA 最强, 239-Vac 和 239-Pro 相当, 但均较弱。

许多蛋白抗原用完全弗氏佐剂、ISCOM、脂质体等作为佐剂可显著增强抗原的 CTL 应答<sup>[28-30]</sup>。乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg) 颗粒的细胞免疫应答研究显示, HBsAg 纯抗原可在 BALB/c 小鼠中诱导出 CTL 应答, 但加铝佐剂或不完全弗氏佐剂则不行, 提示这两种佐剂对 HBsAg 的 CTL 应答有抑制作用<sup>[31, 32]</sup>。艾滋病毒 Gag 颗粒加铝佐剂或不完全弗氏佐剂后同样出现 CTL 应答的抑制<sup>[33]</sup>。有人推测, 铝佐剂会阻碍颗粒抗原进入 APC 的内源性蛋白处理途径<sup>[31]</sup>。本研究结果显示, 239 颗粒抗原加铝佐剂后的 CTL 应答强度与纯抗原颗粒相当, 并未对抗原的 CTL 应答产生抑制, 提示铝佐剂的影响可能与颗粒抗原自身的理化性质有关。

一般情况下, 外源蛋白经内吞或吞噬后进入 APC 的 MHG-II 递呈途径, 激活 Th 并引发抗体应答, 而 MHG-I 类应答需要内源性蛋白的刺激<sup>[34]</sup>。因此过去曾认为蛋白疫苗免疫后 CTL 应答极难产生。但对艾滋病毒(HIV) V3: Ty 类病毒颗粒或 V3: Gag 嵌合颗粒的研究, 以及对 HBsAg 颗粒抗原、HCV 类病毒颗粒抗原的研究均发现, 无佐剂的这些外源蛋白颗粒都能诱导出一定的 CTL 应答, 但其确切机制尚不清楚<sup>[34]</sup>。本研究再次表明, 颗粒抗原对机体体液免疫和细胞免疫均具有较好的免疫原性。该疫苗的 I 期临床研究已启动, 其最终保护效果将经过 II 期临床研究的考核, 而本研究结果可能提示了较乐观的前景。

## 参考文献:

- [1] Zhuang H, Cao X Y, Liu C B, et al. Epidemiology of hepatitis E in China[J]. Gastroenterologia Japonica, 1991, 26(1): 135-138.
- [2] Purcell R H, Emerson S U. Hepatitis E virus[A]. Knipe D M, Howley P M, Griffin D E, et al. (Eds.) Fields Virology[M]. 4th ed., Vol 2. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2001. 3051-3061.
- [3] Balayan M S, Andjaparidze A G, Savinskaya S S, et al. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route[J]. Intervirology, 1983, 20(1): 23-31.
- [4] Purdy M A, McCaustland K A, Krawczynski K, et al. Preliminary evidence that a trpE-HEV fusion protein protects cynomolgus macaques against challenge with wild-type hepatitis E virus (HEV) [J]. J Med Virol, 1993, 41(1): 90-94.
- [5] Tsarev S A, Tsareva T S, Emerson S U, et al. Successful passive and active immunization of cynomolgus monkeys against hepatitis E

- [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(21): 10198 – 10202.
- [6] Purcell R H, Nguyen H, Shapiro M, et al. Pre-clinical immunogenicity and efficacy trial of a recombinant hepatitis E vaccine[J]. Vaccine, 2003, 21(19– 20): 2607– 2615.
- [7] Emerson S U, Purcell R H. Recombinant vaccines for hepatitis E [J]. Trends Mol Med, 2001, 7 (10): 462– 466.
- [8] 李少伟, 张军, 何志强, 等. 大肠杆菌表达的戊型肝炎病毒 ORF2 片段的聚合现象研究[J]. 生物工程学报, 2002, 18(4): 463– 467.
- [9] 葛胜祥, 张军, 黄果勇, 等. 大肠杆菌表达的戊型肝炎病毒 ORF2 多肽对恒河猴的免疫保护研究[J]. 微生物学报, 2003, 43(1): 35– 42.
- [10] Zhang J, Ge S X, Huang G Y, et al. Evaluation of antibody based and nucleic acid based assays for diagnosis of Hepatitis E virus infection in a rhesus monkey model[J]. J Med Virol, 2003, 71(4): 518 – 526.
- [11] Zhang J, Gu Y, Ge S X, et al. Analysis of hepatitis E virus neutralization sites using monoclonal antibodies directed against a virus capsid protein[J]. Vaccine, 2005, 23(22): 2881– 2892.
- [12] 何志强, 张军, 李少伟, 等. 颗粒化重组戊型肝炎病毒衣壳蛋白及其抗原性与免疫原性[J]. 生物工程学报, 2004, 20(2): 125– 131.
- [13] Li S W, Zhang J, He Z Q, et al. Mutational analysis of essential interactions involved in the assembly of hepatitis E virus capsid[J]. J Biol Chem, 2005, 280(5): 3400 – 3406.
- [14] Li S W, Zhang J, Li Y M, et al. A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine: antigenicity, immunogenicity and efficacy for primates[J]. Vaccine, 2005, 23(22): 2893– 2901.
- [15] Charoenvit Y, Goel N, Whelan M, et al. CEL-1000a peptide with adjuvant activity for Th1 immune responses[J]. Vaccine, 2004, 22(19): 2368– 2373.
- [16] Jeong S H, Qiao M, Nascimbeni M, Immunization with hepatitis C virus-like particles induces humoral and cellular immune responses in nonhuman primates[J]. J Virol, 2004, 78(13): 6995 – 7003.
- [17] Ogg G S, Jin X, Bonhoeffer S, Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA[J]. Science, 1998, 279(5359): 2103– 2106.
- [18] Moss B, Earl P L, Overview of the vaccinia virus expression system [A]. Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, et al. (Eds.), Current Protocols in Molecular Biology [M]. Greene Publishing Associates & Wiley, New York, 1998.
- [19] 何志强, 葛胜祥, 邱艳, 等. 戊型肝炎病毒抗体双抗原夹心法 ELISA 的建立与初步应用[J]. 中国人兽共患病杂志, 2002, 18(6): 18– 21.
- [20] Hahn S, Gehri R, Erb P. Mechanism and biological significance of CD4-mediated cytotoxicity [J]. Immunol Rev, 1995, 146: 57– 79.
- [21] Snapper C M, Paul W E, Interferon- $\gamma$  and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production[J]. Science, 1987, 236: 944– 947.
- [22] Miyahira Y, Murata K, Rodriguez D, et al. Quantification of antigen specific CD8<sup>+</sup> T cells using an ELISPOT assay [J]. J Immunol Meth, 1995, 181(1): 45– 54.
- [23] Scheibenbogen C, Romero P, Rivoltini L. Quantitation of antigen-reactive T cells in peripheral blood by IFN gamma-ELISPOT assay and chromium-release assay: a four-centre comparative trial [J]. J Immunol Meth, 2000, 244(1– 2): 81– 89.
- [24] Currier J R, Kuta E G, Turk E, et al. A panel of MHC class I restricted viral peptides for use as a quality control for vaccine trial ELISPOT assays[J]. J Immunol Meth, 2002, 260(1– 2): 157– 172.
- [25] Sun Y, Iglesias E, Samri A, et al. A systematic comparison of methods to measure HIV-1 specific CD8<sup>+</sup> T cells[J]. J Immunol Meth, 2003, 272(1– 2): 23– 34.
- [26] McConkey S, Reece W, Moorthy V, et al. Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans[J]. Nat Med, 2003, 9(6): 729– 735.
- [27] Vazquez-Bloomquist D, Iglesias E, Gonzalez-Horta, E E, et al. The HIV-1 chimeric protein CR3 expressed by poxviral vectors induces a diverse CD8<sup>+</sup> T cell response in mice and is antigenic for PBMCs from HIV+ patients[J]. Vaccine, 2003, 22(2): 145– 155.
- [28] Collins D S, Findlay K, Harding C V. Processing of exogenous liposome encapsulated antigens *in vivo* generates class I MHC-restricted T cell responses[J]. J Immunol, 1992, 148(11): 3336– 3341.
- [29] Kutubuddin M, Simons J, Chow M. Poliovirus-specific major histocompatibility complex class I-restricted cytolytic T-cell epitopes in mice localize to neutralizing antigenic regions[J]. J Virol, 1992, 66(10): 5967– 5974.
- [30] Mowat A M, Donachie A M, Reid G, et al. Immune stimulating complexes containing Quil A and protein antigen prime class I MHC-restricted T lymphocytes *in vivo* and are immunogenic by the oral route[J]. Immunology, 1991, 72(3): 317– 322.
- [31] Schirmbeck R, Melber K, Mentens T, et al. Antibody and cytotoxic T-cell responses to soluble hepatitis B virus (HBV) S antigen in mice: implication for the pathogenesis of HBV-induced hepatitis [J]. J Virol, 1994, 68(3): 1418– 1425.
- [32] 李河民, 梁争论, 张华远. 关于乙型肝炎疫苗免疫原性的评价[J]. 中华流行病学杂志, 2004, 25(5): 378– 381.
- [33] Griffiths J C, Harris S J, Layton G T, et al. Hybrid human immunodeficiency virus Gag particles as an antigen carrier system: induction of cytotoxic T-cell and humoral responses by a Gag: V3 fusion[J]. J Virol, 1993, 67(6): 3191– 3198.
- [34] Gromme M, Neefjes J. Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways[J]. Mol Immunol, 2002, 39(3– 4): 181– 202.
- [35] Harris S J, Geaning A J, Layton G T, et al. Enhanced proliferative cellular responses to HIV-1 V3 peptide and gp120 following immunization with V3: Ty virus-like particles [J]. Immunology, 1992, 77(3): 315– 321.

## Immune Response Induced by Recombinant Particulate Hepatitis E Virus Vaccine in Mice

WU Ting, OU Shan-hai, CHENG Tong, HE Shu-zhen, WU Xiao-lu,

ZHENG Zhou, ZHANG Jun, XIA Ning-shao\*

(The Research Center for Medical Molecular Virology of Fujian Province, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** This paper evaluated the specific humoral and cellular immune responses induced by a recombinant particulate hepatitis E virus (HEV) vaccine (HEV 239) in BALB/c mice. Three groups, each of six BALB/c mice, were immunized with 5 $\mu$ g HEV 239 antigen (239-Pro), antigen absorbed by alum adjuvant (239-Vac), and antigen absorbed by complete Freund's adjuvant (239-CFA) respectively. Two weeks after three vaccinations at day 0, 28 and 42, level of anti-HEV IgG antibody and their sub-isotypes were determined. At the same time, spleen cells of vaccinated mice were separated and stimulated with P815 cells which had been infected with recombinant vaccinia virus WR-239( containing the cDNA of HEV 239). IFN- $\gamma$  secreting CD8<sup>+</sup> T cell frequencies were determined by ELISPOT assay. Results showed that geometric mean titer (GMT) of anti-HEV induced by 239-Vac was 1: 28509, which was similar to that of 239-CFA vaccinated mice ( $t = 0.35$ ,  $P > 0.05$ ), and both were higher than that of 239-Pro vaccinated mice. The ratio of specific IgG1/ IgG2a was 269.2 in 239-Vac group, which was higher than that of 239-CFA group (2.9) and 239-Pro group (11.7). This result indicated that antibody induced by 239-Vac was more polarized to Th2. All the three vaccines induced HEV-specific CTL response, among which the CTL response in 239-CFA group was the strongest. The results suggested that recombinant 239 protein could induce good HEV-specific humoral immune response as well as T<sub>CI</sub> immune response in BALB/c mice.

**Key words:** hepatitis E virus; vaccine; cellular immune response

\* Corresponding author: XIA Ning-shao, E-mail : nsxia@xmu.edu.cn