

戊型肝炎病毒颗粒性蛋白疫苗 H₂^d 限制性 Th 表位的筛选

伍小路, 吴婷, 欧山海, 林春鑫, 程通, 李少伟, 张军, 夏宁邵*

(厦门大学 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 福建省医学分子病毒学研究中心, 福建 厦门 361005)

摘要:戊型肝炎病毒衣壳蛋白重组抗原 HEV 239 能形成类病毒颗粒, 具备演变成多价疫苗的载体的潜力, 此文旨在筛选、鉴定其内包含的 H₂^d 限制性 Th 表位。以 50μg HEV 239 蛋白与完全弗式佐剂混合后皮下免疫 BALB/c 鼠, 以覆盖 HEV 239 蛋白全长的 15 氨基酸肽库体外刺激其脾细胞, 用 IFN-γ-ELISPOT 方法检测其细胞免疫应答, 并通过磁珠剔除脾细胞中 CD4⁺ T 细胞或 CD8⁺ T 细胞以分析筛选得到的 T 细胞表位的特性。结果显示: HEV 239 中包含优势的 T 细胞表位 P34 (HEV PORF2 AA533 ~ AA547, HSKTF FVLPL RGKLS) 及数个较弱的 T 细胞表位, P34 对 HEV 239 免疫的 BALB/c 鼠脾细胞的刺激效果与 HEV 239 蛋白相当, 剔除实验表明该表位为 CD4⁺ T 细胞表位, 即 Th 表位。

关键词:戊型肝炎病毒; T 辅助细胞; T 细胞表位

中图分类号: R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8721(2006)03-0176-04

戊型肝炎(简称戊肝)是一种经肠道传播的急性肝炎, 其病原体为戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV)。HEV 含 3 个开放读码框架(ORF), 其中 PORF2 编码含 660 个氨基酸的多肽, 为病毒主要结构蛋白, 组成病毒衣壳。本室以大肠杆菌表达戊型肝炎病毒 PORF2 第 368 ~ 606aa (HEV 239), 发现其能够形成类病毒颗粒(VLP), 作为疫苗不仅可以诱导良好的保护性抗体, 而且能诱导出特异性细胞免疫应答^[1, 2]。

由于 VLP 疫苗通常易于被抗原呈递细胞(APC)吞噬呈递, 从而诱导较强的免疫应答。以 VLP 蛋白做为肽表位疫苗的载体, 可以明显提高表位肽的免疫原性, 从而显现出广阔的应用前景^[3, 4]。CD4⁺ T 辅助细胞(Th)的功能与抗体产生密切相关^[5]。目前对于 HEV 239 蛋白的结构特征、免疫学特性、表位分布已积累了一些数据^[6, 7], 在此基础上, 进一步明确其 Th 表位对于开发该疫苗载体具有重要的意义。此文从覆盖 HEV 239 蛋白全长的 15 氨基酸(15aa)肽库中筛选到 HEV 239 蛋白的 H₂^d 限制性 Th 表位, 为该疫苗的深入研究奠定了理论和实验基础。

材料与方法

- 1 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。
- 2 多肽的合成及肽库构建** 合成覆盖 HEV 239 蛋白全长的 15 氨基酸肽库(西安美联公司, 70%纯度), 相邻肽相互重叠 10 个氨基酸, 共 46 条肽。各肽按照其顺序被命名为 P1 ~ P46, 以 DMSO 溶解多肽配置浓度为 10mg/mL 的储存液, 其中每 7 条肽混合在一起组成子肽库, 共组成 14 个子肽库(表 1)。

表 1 肽库的组成

Table 1 The construction of peptide libraries

Libraries	H	I	J	K	L	M	N
A	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
B	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14
C	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21
D	P22	P23	P24	P25	P26	P27	P28
E	P29	P30	P31	P32	P33	P34	P35
F	P36	P37	P38	P39	P40	P41	P42
G	P43	P44	P45	P46			

- 3 疫苗及免疫** 将纯化的 HEV 239 蛋白(北京万泰生物药业有限公司提供)与等体积完全弗氏佐剂(CFA, Sigma 公司)混合, 制备成 0.5mg/mL 浓度的疫苗(239-CFA), 以 100μL/鼠的剂量腹腔注射以及颈部皮下免疫小鼠, 两周后加强一次, 加强后第 10d 取小鼠脾脏, 分离脾细胞检测。以生理盐水与 CFA 混合的疫苗(NS-CFA)作为阴性对照疫苗。

- 4 小鼠脾脏细胞分离** 取免疫后小鼠脾脏, 2ml 注射器研磨, 200 目筛网过滤, 5% PBS(磷酸缓冲液)洗涤后离心, 3ml 红细胞裂解液室温处理 3min, 加入 50ml PBS, 离心, PBS 洗涤后将脾细胞重悬于 10% 1640(含 10% 胎牛血清, 1% 非必

收稿日期: 2005-12-01; 修回日期: 2006-03-01

基金项目: 863 计划(2005AA2Z3H20), 福建省科技重大专项(2004 YZ01), 厦门市重大产业科技项目(3502Z20041008)

作者简介: 伍小路(1982-)男, 硕士, 分子病毒学, Tel: 86-592-2184110; E-mail: wuting@xmu.edu.cn

通讯作者: 夏宁邵, E-mail: nsxia@xmu.edu.cn

需氨基酸、50 μ mol/L 巯基乙醇、2mmol/L 谷氨酰胺、1 mmol/L 丙酮酸钠、10 mmol/L HEPES、100U/mL 青霉素钠、100U/mL 硫酸链霉素,细胞浓度调整为 1×10^7 /mL。

5 IFN- γ -ELISPOT 检测 按照试剂盒(BD™ ELISPOT SET)说明书进行。简言之:(1)以抗-鼠 IFN- γ 抗体 100 μ l/孔(5 μ g/mL)包被 ELISPOT 96 孔板。(2)4 $^{\circ}$ C 孵育 12h 后,各孔以含 10% FBS 的 1640 培养液室温封闭 2h;(3)每孔接种小鼠脾细胞 1×10^6 个/200 μ l,刺激抗原分别采用 10 μ g/mL HEV 239 蛋白,A~G 肽库(其中每种肽的终浓度为 5 μ g/mL),10 μ g/mL 单独肽或 10 μ g/mL BSA,每个样品作 3 个复孔。阳性或阴性对照孔则分别加入 2 μ g/mL ConA 或单纯培养液。37 $^{\circ}$ C 静置培养 24 h;(4)各孔洗涤后加入生物素化抗鼠 IFN- γ 抗体,100 μ l/孔(2.5 μ g/mL),室温反应 2h;(5)各孔洗涤后加入链霉亲和素-HRP,100 μ l/孔(5 μ 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 (Cellular Technology Ltd. 公司)进行计数和数据处理。以斑点数/10⁶ 脾细胞 (Spots/10⁶ spleen cells)为单位,阴性孔 < 10 Spots/10⁶ 脾细胞,实验孔大于 2 倍阴性孔斑点数者为阳性。

6 剔除脾细胞中 CD4⁺ T 细胞或 CD8⁺ T 细胞以及流式细胞仪鉴定 参照 Miltenyi 公司操作手册,取 10⁷ 新鲜分离的小鼠脾细胞,洗涤后重悬于 90 μ l staining buffer 中,加入 10 μ l 与抗鼠 CD4 或抗鼠 CD8 抗体连接的磁珠,通过磁场分离,得到剔除 CD4⁺ T 细胞或 CD8⁺ T 细胞的小鼠脾细胞,重悬,计数,调整细胞浓度为 1×10^7 /mL。取 10⁶ 细胞,重悬于 100 μ l PBS,加入 2.5 μ g/mL PE-Cy5 anti-mouse CD3e (BD Pharmingen) 和 2.5 μ g/mL PE-anti-mouse CD8 (BD

Pharmingen),4 $^{\circ}$ C 孵育 15min,PBS 洗 2 遍,重悬于 1ml PBS,以流式细胞仪(Coulter Epics XL 购自 Beckman Coulter 公司)检测相应的剔除效率。

结 果

1 HEV 239 的 H2^d 限制性 T 细胞表位的初步筛选

用覆盖 HEV 239 蛋白全长的 15aa 肽库(相邻肽段重叠 10aa)做为 IFN- γ -ELISPOT 实验中的刺激剂初步筛选 HEV 239 蛋白的 T 细胞表位。为简化筛选,将相邻的 7 条肽组成子肽库 A-N(表 1),分别刺激 239-CFA 及 NS-CFA 免疫后的 BALB/c 小鼠脾细胞。以 IFN- γ -ELISPOT 检测其细胞免疫应答,结果表明 239-CFA 免疫鼠对肽库 E、M 反应强烈,每 10⁶ 个脾细胞中的斑点数超过 300 个;对肽库 A、B、F、H、I、K、N 有中等强度的反应(50 ~ 150 Spots/10⁶ 脾细胞);对肽库 C、D、G、J、L 几乎无反应(< 20 Spots/10⁶ 脾细胞)(图 1)。肽库 E、M 中共有的肽为 P34 (PORF2 aa533 ~ 547, HSKTF FVLPLRGKLS),推测该肽可能包含 HEV 239 蛋白的优势 H-2^d 限制性 T 细胞表位,而肽库 C、D、G、J、L 包含的 26 个肽中不含有明显的 HEV 239 的 H-2^d 限制性 T 细胞表位,故将该 26 条肽排除在进一步筛选的范围之外。

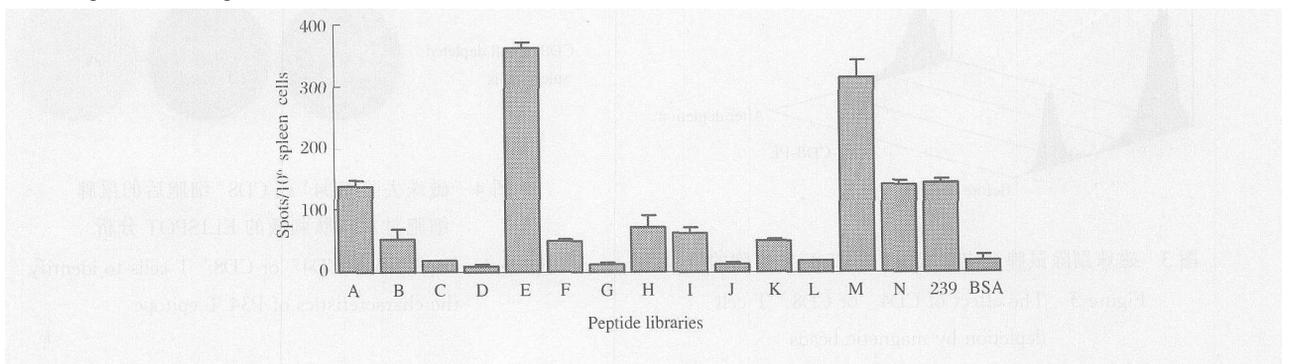


图 1 不同肽库刺激 HEV 239 免疫小鼠脾细胞的 IFN- γ -ELISPOT 分析

Figure 1 IFN- γ -ELISPOT assay to determine the reactivity of HEV 239 immunized mice spleen cells to different peptide libraries

2 用单独肽进一步筛选 HEV 239 的 H2^d 限制性 T 细胞表位

将 P34 肽以及其余 19 条肽单独做为刺激原分别刺激免疫鼠脾细胞,进行 IFN- γ -ELISPOT 检测。结果表明,P34 的刺激效果最好(413 Spots/10⁶ 脾细胞),与完整 HEV 239 蛋白相当,为 HEV 239 的优势 H-2^d 限制性 T 细胞表位;P35 的刺激效果较好

(76.5 Spots/10⁶ 脾细胞);P6、P7、P42 亦能刺激产生弱反应(图 2)。

3 P34 表位的 CD4⁺ 或 CD8⁺ 特异性分析

首先以流式细胞仪检测通过磁珠剔除 CD4⁺ 或 CD8⁺ T 细胞的效果。以 CD3⁺ 细胞(约占活细胞总数的 30%)设“门”,分析细胞剔除前后相应细胞所占 CD3⁺ 细胞的百分比。图 3 显示剔除 CD4⁺ T 细

胞前,CD4⁺ T 细胞约占 CD3⁺细胞的 65.2%,经磁珠剔除后,降至 1.5%;剔除 CD8⁺ T 细胞前后,CD8⁺ T 细胞占 CD3⁺细胞的比例分别为 27.8%和

0.1%。CD4⁺ 及 CD8⁺ T 细胞的剔除率分别为 97.7%和 99.6%。

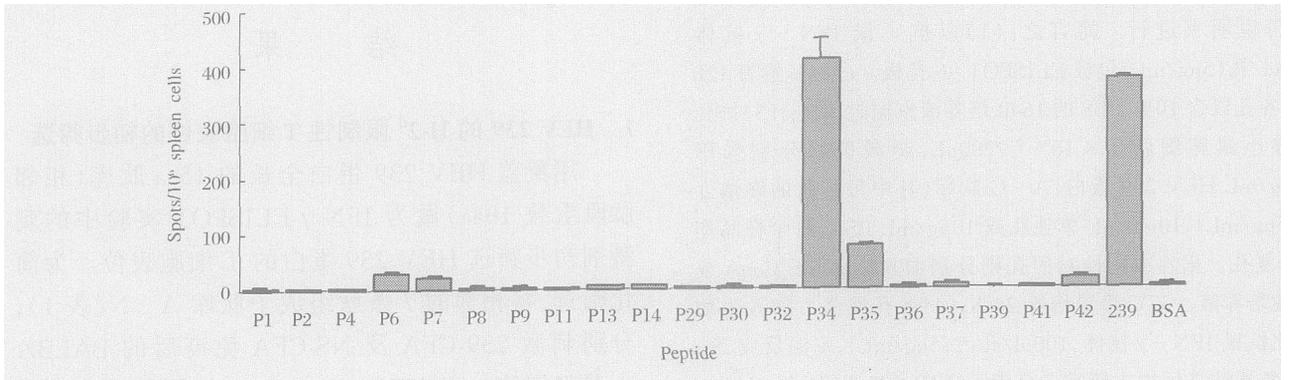


图 2 不同肽段刺激 HEV 239 免疫小鼠脾细胞的 IFN- γ ELISPOT 分析
Figure 2 IFN- γ ELISPOT assay to determine the reactivity of HEV 239 immunized mice spleen cells to single peptide

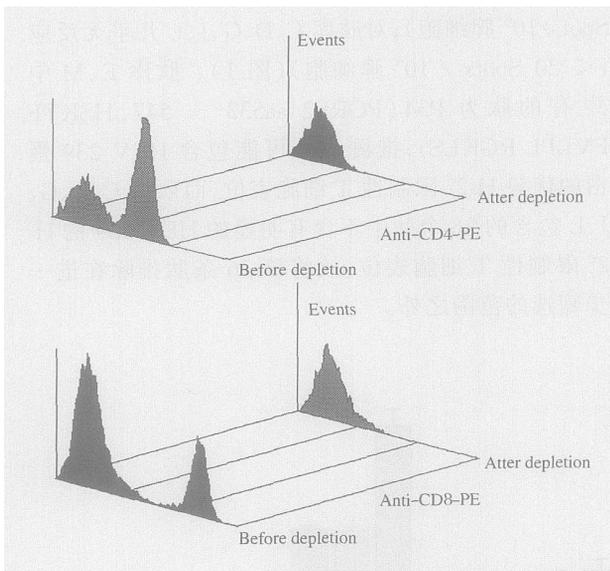


图 3 磁珠剔除鼠脾细胞中 CD4⁺ 或 CD8⁺ T 细胞的效果
Figure 3 The effect of CD4⁺ or CD8⁺ T cell depletion by magnetic beads

以 10 μ g/mL P34 分别刺激免疫鼠的脾细胞 (CD4⁺CD8⁺)、去除 CD4⁺ T 细胞的脾细胞 (CD4⁻CD8⁺) 以及去除 CD8⁺ T 细胞的脾细胞 (CD4⁺CD8⁻),进行 IFN- γ ELISPOT 检测。结果显示,当 CD8⁺细胞被剔除之后,脾细胞对 P34 的反应没有发生明显变化;而当 CD4⁺细胞被剔除之后,脾细胞对 P34 的反应显著下降,说明 P34 表位为 CD4⁺ T 细胞表位 (Th 表位) (图 4)。以 10 μ g/mL P2 肽作为阴性对照,结果均显示为阴性。

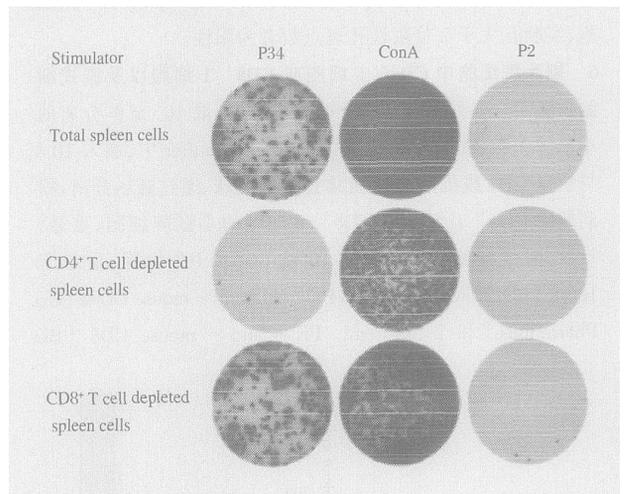


图 4 磁珠去除 CD4⁺ 或 CD8⁺ 细胞后的鼠脾细胞对 P34 肽刺激的 ELISPOT 分析
Figure 4 Depletion of CD4⁺ or CD8⁺ T cells to identify the characteristics of P34 T epitope

讨 论

蛋白的 Th 表位与抗体形成密切相关,因此筛选鉴定蛋白质的 Th 表位是疫苗研究的关键问题之一^[9]。BALB/c 小鼠 (H-2^d) 是疫苗研究、单克隆抗体研制中的常用动物模型,此研究中以覆盖 HEV 239 蛋白全长的 15AA 肽库,筛选其中 H-2^d 限制型 T 细胞表位。结果发现肽段 P34 能够在体外有效刺激 HEV 239 免疫的 BALB/c 小鼠脾细胞分泌 IFN- γ ,是优势 H-2^d 限制性 T 细胞表位,通过磁珠去除鼠脾细胞中 CD4⁺ 或 CD8⁺ T 细胞证实,该表位

为 Th 表位。

在类病毒颗粒表面插入免疫原性差的外源短肽,能够有效地暴露外源多肽的抗原表位,并且通过颗粒性载体自身激活 T 辅助细胞而促进浆细胞的形成。目前已有的类病毒颗粒疫苗载体有 HBV Core 蛋白颗粒^[3,4],流感病毒的 Virosome^[10]等等,均能有效呈递外源短肽,有很好的应用前景。目前 HEV 239 疫苗的、期临床研究,显示了优秀的安全性和免疫原性。该蛋白包含 HEV PORF2 的 368 ~ 606aa,自发组装成 23nm 直径的类病毒颗粒^[6]。我们已发现 HEV 239 上对应于 PORF2 368 ~ 394aa 的区域与颗粒形成有关,597 ~ 602aa 的疏水区与二聚体形成和中和表位构象有关^[6]。此研究表明 533 ~ 547aa 为优势 H-2^d 限制性 T 细胞表位。避开这些关键位点,寻找合适的外源短肽插入位点,有可能将 HEV 239 发展成为一个新的高效的颗粒疫苗载体。另外,P34 肽表位(HSKTF FVLPL RGKLS)作为高效 Th 表位,也可以作为一个有效的功能结构单位,与其它强 Th 表位、Tc 表位、B 细胞表位等组合在一起,在多种肽表位疫苗的研制中发挥作用。

参考文献:

[1] 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.

- [2] 吴婷,欧山海,程通,等. 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[J]. *病毒学报*, 2005, 21(6): 428 - 433.
- [3] Billaud J N, Peterson D, Barr M, et al. Combinatorial approach to hepadnavirus-like particle vaccine design[J]. *J Virol*, 2005, 79(21): 13656 - 13666.
- [4] Yang H J, Chen M, Cheng T, et al. Expression and immunoreactivity of chimeric particulate antigens of receptor binding site-core antigen of hepatitis B virus[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(4): 492 - 497.
- [5] Zhang G, Wang X, Robbins P F, et al. CD4⁺ T cell recognition of MHC class II-restricted epitopes from NY-ESO-1 presented by a prevalent HLA DP4 allele: Association with NY-ESO-1 antibody production[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(7): 3964 - 3969.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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): 262 - 268.
- [9] Shirai M, Arichi T, Chen M, et al. T cell recognition of hypervariable region-1 from hepatitis C virus envelope protein with multiple class II MHC molecules in mice and humans: preferential help for induction of antibodies to the hypervariable region[J]. *J Immunol*, 1999, 162(1): 568 - 576.
- [10] Gluck R, Burri K G, Metcalfe I, et al. Adjuvant and antigen delivery properties of virosomes[J]. *Curr Drug Deliv*, 2005, 2(4): 395 - 400.

Identification of H-2^d Restricted Th Epitope in Hepatitis E Virus Particulate Vaccine HEV 239

WU Xiao-lu, WU Ting, OU Shan-hai, LIN Chun-xin, CHENG Tong,
LI Shao-wei, ZHANG Jun, XIA Ning-shao

(National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Recombinant particulate hepatitis E virus (HEV) vaccine HEV 239 is a potential candidate of polyvalent vaccine vector. In this paper, a dominant H-2^d restricted Th epitope in HEV 239 was identified. Groups of BALB/c mice were subcutaneously (s.c.) immunized twice by 50μg HEV 239 protein mixed with complete Freund's adjuvant (239-CFA). A peptide library covering the whole HEV 239 protein, containing 46 peptides with 10 amino acids overlapping, was synthesized and used to stimulate the spleen cells separated from the immunized mice *in vitro*. IFN-γ-ELISPOT assay results showed that P34 (HEV PORF2 533 - 547aa, HSKTF FVLPL RGKLS) could stimulate the spleen cells to produce 413 spots/ million spleen cells which was similar to HEV 239 protein. Thus, the peptide P34 was identified as a dominant H-2^d restricted T cell epitope. After depletion of the CD4⁺ T cells in the immunized spleen cells by magnetic bead separation, the IFN-γ spots/ million spleen cells decreased to the background level while almost no influence was observed after CD8⁺ T cell depletion. This result showed that P34 was a H-2^d restricted Th epitope.

Key words: hepatitis E virus; Th cell; T cell epitope

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