

不同 HBsAg 疫苗联合免疫后诱导小鼠细胞和体液免疫应答的研究

吴 婷, 陈 敏, 欧山海, 颜渊清, 伍小路, 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)

Immune response induced by combinant immunization of different HBsAg vaccines in mice

WU Ting, CHEN Min, OU Shan-hai, YAN Yuan-qing,

WU Xiao-lu, ZHANG Jun, XIA Ning-shao*

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

[Abstract] **AM:** To investigate the specific humoral and cellular immune response induced by prime-boost immunization of HBsAg protein vaccine (P), recombinant vaccinia virus vaccine (V) and DNA vaccine (D) in mice. **METHODS** Groups of BALB/c mice were primed by one of the three vaccines P, V or D and boosted by another vaccine at 2, 5, 8 and 11 week later, thus 9 immune combinations were made PP, PV, PD, VP, VV, VD, DP, DV and DD. Serum samples were collected at week 2, 5, 8 and 11 and levels of anti-HBsAg IgG antibodies and their sub-isotypes were determined. Seven days after every boost spleen cells of vaccinated mice were separated and the specific CTL lysis ratio of P815S cells were determined. **RESULTS** Among the three HBsAg vaccines P, V and D, V could induce the quickest humoral immune response. The memory humoral immune response induced by P was the strongest. D induced the weakest antibody titer. The ratio of specific IgG1/IgG2a indicated that antibody induced by PP was more polarized to Th2. The other groups induced balanced Th1/Th2 immune response. Among all the groups, VD and DV induced the strongest CTL response, and the specific lysis ratio of P815S cells was 71% and 64%, respectively. **CONCLUSION:** The experimental results suggested that among all the immune combinations, PV, PD, VP and VD can induce better humoral immune response while DV and VD can induce stronger CTL response in BALB/c mice.

收稿日期: 2005- 07- 25; 接受日期: 2005- 09- 30

基金项目: 福建省科技重大专项基金资助 (2004Y201); 厦门市重大科技项目资助 (3502Z20041008)

作者简介: 吴 婷 (1973-), 女, 江西波阳人, 讲师, 博士

Tel 0592-2184113 E-mail wuting@xmu.edu.cn

* Corresponding author. E-mail: nsxi@xmu.edu.cn

[Keywords] HBsAg combinant immunization, immune response

[摘要] 目的: 了解 HBsAg 的蛋白疫苗 (P)、痘苗病毒疫苗 (V)、DNA 疫苗 (D) 联合免疫小鼠诱导的特异性体液和细胞免疫应答。方法: 以 P、V 或 D 疫苗中的一种疫苗初次免疫 BALB/c 小鼠后, 于第 2、5、8、11 周再用另一种疫苗加强, 共产生 9 种免疫组合: 即 PP、PV、PD、VP、VV、VD、DP、DV 及 DD。于初免后第 2、5、8、11 周采血检测血清中抗 HBsAg IgG 的总滴度及其 IgG1 和 IgG2a 亚类, 并于每次加强免疫后第 7 天, 检测小鼠脾脏的 CTL 对 P815S 细胞的特异性杀伤率。结果: 在 P、V、D 3 种疫苗中, V 疫苗诱导产生抗 HBsAg 抗体的速度最快, P 疫苗诱导的体液免疫回忆反应最强, D 疫苗诱导产生的抗体最弱。除 PP 疫苗组合诱导的抗体明显倾向于 IgG1 外, 其他均无明显的倾向性。各种免疫组合中, VD 和 DV 疫苗组诱导的 CTL 应答最强, 对 P815S 的特异性杀伤率分别为 71% 和 64%。结论: 在各种联合免疫组合中, PV、PD、VP 和 VD 疫苗组的抗体应答较好; 而 DV 和 VD 疫苗组诱导的 CTL 杀伤效应最强。

[关键词] 乙型肝炎表面抗原; 联合免疫; 免疫应答

[中图分类号] R373.9 **[文献标识码]** A

乙型肝炎病毒 (HBV) 疫苗的研究和发展, 对于乙型肝炎的预防和控制起着重要作用。目前, 大约有 5% ~ 10% 的成年人用 HBV 疫苗免疫后, 不能引起足够的保护性体液免疫应答^[1], 因此, 探讨新的免疫方式对于完善现有的预防性疫苗仍然有重要意义。另一方面, 治疗性疫苗能够在一定程度上清除体内的乙型肝炎病毒、打破免疫耐受状态^[2], 已成为乙肝治疗的新的研究热点, 因此, 寻找能够同时诱导强的体液免疫和细胞免疫应答的免疫方式, 是乙肝预防和治疗的研究方向。近年来, 混合免疫 (prime-boost or combination immunization) 受到越来越多的关注。混合免疫, 即用目的蛋白某一种类型的疫苗 (蛋白质、DNA 或病毒载体疫苗) 进行初次免疫, 而用另一种类型的疫苗进行加强免疫。通过混合免疫, 不同类型的疫苗从不同的途径提呈抗原、刺激机体免疫系统, 可诱导较强的体液及细胞免疫应答^[3, 4]。本研究中将基于 HBsAg 的 3 种疫苗 (DNA 疫苗、重组痘苗病

毒疫苗及蛋白疫苗)两两组合,形成9种不同的混合免疫方式免疫BALB/c小鼠后,检测了不同组合诱导小鼠产生的体液及细胞免疫应答。

1 材料和方法

1.1 材料 细胞株 CV-1(猴肾细胞)、143-B(人骨髓瘤细胞)、BHK21(仓鼠肾细胞)和 P815(小鼠肥大细胞瘤细胞)购自 ATCC 公司; P815S 为稳定整合 HBsAg 基因的 P815 细胞(可稳定高效表达 HBsAg),由本室构建并保存。pCDNA3.1 载体含 CMV 启动子(用于构建 DNA 疫苗),购自 Invitrogen 公司; pMD18T-HBs 质粒(含有 HBsAg 编码基因),由本室保存。重组痘苗病毒载体 pV、痘苗病毒 Westem Reserve 株(WR 株),由香港大学吴文翰教授惠赠。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。QIAGEN Plasmid Mega Kit 购自 QIAGEN 公司; HBsAg ELISA 检测试剂盒购自北京万泰生物药业有限公司; 转染试剂 Lipofectamine 购自 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 疫苗制备 DNA 疫苗(D)的构建:从 pMD18T-HBs 质粒上以 *Bam*H I/EcoR I 切下 HBsAg 基因片段,插入到经同样双酶切的 pCDNA3.1 载体中,得到 pCDNA3.1-S 质粒的大量提取采用 QIAGEN Plasmid Mega Kit 转染 BHK21 细胞(参照 Lipofectamine 说明书操作),取 48 h 后上清,用 ELISA 法检测 HBsAg 的表达。重组痘苗病毒疫苗(V)的构建:从 pMD18T-HBs 质粒上以 *Eco*R V 单酶切,切下 HBsAg 基因片段,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 的下游,获得 pV-S。构建重组痘苗病毒的方法参照文献[5]。简言之:将 pV-S 质粒以 Lipofectamine 转染经 WR 病毒 37℃ 感染 2 h 的 CV-1 细胞。48 h 后刮下细胞,冻融 3 次,作为重组病毒 WR-S 储存液。将该重组病毒储存液稀释不同倍数后,感染 143B 细胞,于 37℃ 2 h PBS 洗 1 次,加入含 0.05 g/L 5-溴脱氧尿嘧啶(BrdU)、100 mg/L x-gal 及 10 g/L 低熔点琼脂糖的 20 g/L MEM。48 h 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 细胞测定病毒的滴度。以其感染 BHK21 细胞 48 h 后,取上清用 ELISA 法检测 HBsAg 的表达。重组 HBsAg(P)的制备:酵母表达 HBsAg 并纯化,由北京万泰生物药业有限公司提供。

1.2.2 免疫小鼠 将 BALB/c 小鼠分成 10 组,每组 12 只。于第 0 周以一种疫苗初次免疫;于第 2、5、8、11 周时,均以同种或另外一种疫苗加强,这样 3 种疫苗两两组合后共产生 9 种免疫组合:即 PP、PV、PD、VR、VV、VD、DP、DV 及 DD 疫苗。3 种疫苗均以 PBS 稀释,D 疫苗每只 100 μg/100 μL, 双腿肌肉注射(每侧 50 μL); V 疫苗每只 1 × 10⁷ pfu/100 μL, 腹腔注射; P 疫苗每只 5 μg/100 μL, 双腿肌肉注射(每侧 50 μL)。另设一盐水对照组,以生理盐水初次免疫及加强免疫。

1.2.3 抗 HBsAg 抗体检测 分别于初免前(第 0 周),每次

加强前(第 2、5、8、11 周)以及处死小鼠前(第 3、6、9、12 周)采血,分离血清,于 -20℃ 保存备用。将待检血清作系列梯度稀释后,用 ELISA 法测定 IgG 的总滴度;并检测抗 HBsAg 抗体的亚类。即用 HBsAg 蛋白包被 96 孔板,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 进行检测,并计算 IgG1/IgG2a 的比值。抗体几何平均滴度(GMT)的计算方法:设 lg A = 各滴度的 lg 值的平均值,则 GMT 为 1:10^{lg A}。

1.2.4 CTL 杀伤率检测 详见文献[6],简言之:对各实验组分别于每次加强免疫后的第 7 天,处死 3 只小鼠,取出脾脏,经 200 目细胞筛磨碎,用冰冷的 8.3 g/L NH₄Cl 去除红细胞,以含 100 mL/L FCS 的 PBS 洗涤 2 遍,重悬于 100 mL/L RPMI 1640 液中,计数。获得的脾细胞按 5 × 10⁶/孔种入 24 孔板中,同时加入经丝裂霉素处理过的 P815-S 细胞作为刺激细胞,脾细胞与刺激细胞的比例为 40:1。第 3 天补充 500 μL 新鲜 100 mL/L RPMI 1640 培养基和 mIL-2 (1 × 10⁴ U/L),共培养 6 d。检测时,先准备靶细胞:取 P815-S 和 P815 细胞,以 25 mmol/L CaCl₂ 标记 30 min,洗涤 2 遍后,重悬于无酚红的 100 mL/L RPMI 1640 液中,按 10 000 个细胞/孔种于 96 孔圆底板中。然后处理效应细胞:收集经 6 d 特异性刺激的脾细胞,洗涤 1 遍后,重悬于无酚红的 100 mL/L RPMI 1640 液中;按效应细胞:靶细胞的数量比(50:1、20:1、5:1 和 1:1)种于上述 96 孔圆底板中,每个梯度设 3 个复孔。将 96 孔板经 300 g 离心 30 s 后置于 37℃、50 mL/L CO₂ 培养箱孵育 4 h,再以 700 g 离心 96 孔板 5 min,每孔小心吸出 150 μL 上清,经荧光检测仪测定其荧光值。用下式计算 CTL 的杀伤率:

$$\text{CTL 的杀伤率} = \frac{[(\text{实验组的荧光值} - \text{自然释放的荧光值}) / (\text{最大释放的荧光值} - \text{自然释放的荧光值})] \times 100\%}{}$$

2 结果

2.1 D 疫苗与 V 疫苗表达 HBsAg 活性的检测 用 ELISA 法检测转染 pCDNA3.1-S 的 BHK21 细胞的培养上清,以转染空载体 pCDNA3.1 的 BHK21 细胞培养上清为阴性对照,结果表明二者的 A₆₂₀ 值分别为 3.229 和 0.076。用 ELISA 法检测 MOI 10 的重组痘苗病毒 WR-S 感染的 BHK21 细胞培养上清,以感染野生痘苗病毒 WR 的 BHK21 培养上清为阴性对照,结果表明二者 A₆₂₀ 值分别为 3.334 和 0.108。说明 pCDNA3.1-S 与 WR-S 均能在哺乳动物细胞内表达出有活性的 HBsAg 蛋白。

2.2 不同免疫组合诱导的 IgG 抗体的总滴度 如图 1 所示,在 P、V、D 3 种疫苗中,V 疫苗诱导产生抗 HBsAg 抗体的速度最快,在初次免疫后 2 周诱导产生的抗体的几何平均滴度 GMT 为 1:10^{4.6},显著高于 P 疫苗和 D 疫苗。加强免疫后 3 周,P 疫苗初次免疫组抗体的滴度即超过 V 疫苗初次免疫组,而 PV 疫苗组抗体的滴度最高;V 疫苗初次免疫组无论以何种疫苗加强其抗体滴度均相当;D 疫苗初次免疫组诱导的抗体量较另两种疫苗初次免疫组均低,而又以 DD 疫苗组最低。

在连续加强免疫后, 不论以何种抗原初免, P疫苗加强免疫组产生的抗体量在 3个初免组中均最高, 免疫效果 PP> VP> DP疫苗。V疫苗初次免疫后以 V疫苗或 D疫苗加强免疫, 其抗体产生的水平均一致, 而 D疫苗初次免疫后以 V疫苗加强免疫后抗体的产生优于以 D疫苗加强。在各组合中, PP组诱导产生的抗体应答最好。这些结果提示以 P疫苗初次免疫诱导产生的抗体回忆反应最佳, 但 V疫苗初次免疫组诱导最快的抗体应答, D疫苗初次免疫和加强免疫诱导的抗体应答均弱。

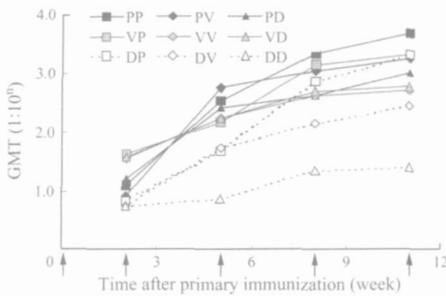


图 1 不同免疫组合诱导的抗体滴度

Fig 1 Antibody response induced by different immune combination
: Primary or booster immunization at week 0, 2, 5, 8, 11, respectively.

2.3 血清 IgG 亚类的分析 取初次免疫后的第 2、5、8、11 周的血清样本, 检测其 IgG1 和 IgG2a 的滴度。第 2 周抗体的滴度较低, 无法同时检测到 IgG1 和 IgG2a。第 5~11 周血清样本中的 IgG1/IgG2a 的比值相近 (结果未显示), 我们选取第 11 周血清样本中的 IgG1/IgG2a 比值的几何平均值作图。如图 2 所示。除了 PP 疫苗组明显以 IgG1 为主 ($P < 0.05$) 外, 其他各种免疫组合诱导的 IgG 抗体均没有明显的偏向性。

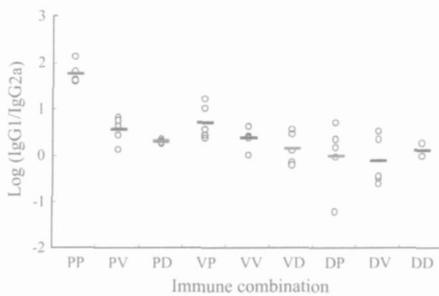


图 2 各种免疫组合诱导的血清 IgG1/IgG2a 的比值

Fig 2 The ratio of serum IgG1/IgG2a induced by different immune combination
“○”: The Log (IgG1/IgG2a) of one sample “-”: The average Log (IgG1/IgG2a) of one group's sample

2.4 不同免疫组合诱导的细胞免疫应答 在每次加强免疫后第 7 天, 检测小鼠脾细胞对靶细胞的特异性杀伤。结果表明, 除 PP 免疫组外, 各种免疫组合均能在小鼠体内诱导出细胞免疫应答。DV 免疫组诱导的细胞免疫应答产生最快, 第 1 次加强免疫后的第 7 天, CTL 的杀伤效率即达到 32%。以 D

疫苗初次免疫的 3 种组合以及 VD 组在各次加强免疫后, CTL 的杀伤率均持续升高, 其中 DV 免疫组和 VD 免疫组诱导的细胞免疫应答最强, 第 12 周的杀伤效率分别为 64% 和 71% (图 3)。

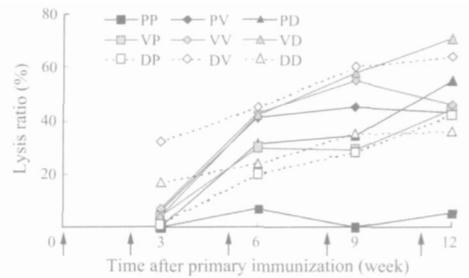


图 3 不同免疫组合诱导的 HBsAg 特异性细胞免疫应答

Fig 3 The specific cellular immune response induced by different immune combination
: Primary or booster immunization at week 0, 2, 5, 8, 11, respectively.

3 讨论

在疟疾、丙型肝炎和艾滋病毒等慢性传染性疾病的预防及治疗性研究中, 联合免疫已显示出较单独免疫更好的细胞免疫应答的效果。联合免疫的作用原理尚未十分明确, 推测主要与两个因素有关。其一是不同性质的疫苗通过不同的途径被提呈, 因而能够更加广泛地激活免疫系统; 另一是用不同疫苗加强免疫时, 仅有对重叠目标的抗原特异性细胞免疫应答才会被有效加强, 避免了目的抗原外其他的载体 T 细胞表位对免疫资源的竞争。

我们将 HBsAg 的 P 疫苗、V 疫苗和 D 疫苗进行组合, 以初步了解不同混合免疫方式诱导抗 HBV 免疫应答的效果。结果表明, P 疫苗诱导的体液免疫应答最强, 其次是 V 疫苗, 最弱的是 D 疫苗。V 疫苗诱导的体液应答速度比 P 疫苗快, 但诱导的抗体回忆反应稍差于 P 疫苗。分析不同疫苗组合诱导的抗体亚类发现, 单纯用 P 疫苗免疫以产生 IgG1 为主, 呈现出 Th2 倾向性, 而其他免疫组合诱导的 IgG 抗体无明显倾向性。D 疫苗和 V 疫苗均表现出良好的 CTL 诱导效应, 而 P 疫苗对 D 疫苗初次免疫的动物也有一定的加强 CTL 的作用。在各种联合免疫组合中, PV、PD、VP 和 VD 免疫组的抗体应答较好, 而 DV 和 VD 免疫组诱导 CTL 的效应最强。本研究中检测细胞免疫应答的主要包括通过抗体亚类反映的 Th 应答及溶细胞型 Tc 应答。近来有研究发现, FN-γ 在抗乙肝病毒感染过程中所起的重要作用^[7], Kleen 等^[8]通过 ELISPOT 实验检测了 CD8⁺ T 细胞分泌的

(下转 574 页)

$\beta^{[4]}$, 对 T 细胞功能有强大的抑制作用。CMV 还可以 FAS 途径诱导 T 细胞凋亡。还可能存在其他复杂的机制, 值得进一步研究。这种 T 细胞功能的抑制虽然可能是中枢神经系统的一种保护机制, 可以抑制过度的免疫反应, 防止免疫病理损伤, 但也可能导致机体免疫功能不能充分清除病毒, 使得病毒感染持续存在。最终疾病的自然转归将取决于免疫保护效应和免疫的适时下调及关闭程度。

我们建立的 T 细胞与 MCMV 感染的小鼠星形胶质细胞共培养模型, 证实 T 细胞能被感染的星形胶质细胞激活, 并发挥一定的免疫保护作用; 但之后继续共培养的 T 细胞增殖和免疫保护功能均受到了抑制, 其中的复杂机制值得进一步研究。

参考文献:

- [1] Cinque P, Arenzi R, Ceresa D. Cytomegalovirus infections of the nervous system [J]. *Inkervirolgy*, 1997, 40: 85-97.
- [2] Dorris R. The role of T-cell-mediated mechanisms in virus infections of the nervous system [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2001, 253: 219-245.
- [3] 尹 岚, 陆佩华. 中枢神经系统的抗原递呈细胞及其对免疫应答

的调节 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2002, 18(3): 309-312

- [4] Kosmann T, Morganti-Kosmann MC, Orenstein JM, et al. Cytomegalovirus production by infected astrocytes correlates with transforming growth factor-beta release [J]. *J Infect Dis*, 2003, 187(4): 534-541.
- [5] Shanley JD, Shanley JA, Albert G, et al. Characterization of virus-induced interferon- γ responses in mice previously infected with murine cytomegalovirus [J]. *J Infectious Diseases*, 2001, 183: 697-706.
- [6] Cheeran MC, Gekker G, Hu S, et al. CD4(+) lymphocyte-mediated suppression of cytomegalovirus expression in human astrocytes [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2000, 7(4): 710-713.
- [7] Cheeran MC, Gekker G, Hu S, et al. T cell-mediated restriction of intracerebral murine cytomegalovirus infection displays dependence upon perforin but not interferon-gamma [J]. *J Neurovirol*, 2005, 11(3): 274-280.
- [8] Meager A, Visvalingam K, Dilger P, et al. Biological activity of interleukins-28 and -29: comparison with type I interferons [J]. *Cytokine*, 2005, 31(2): 109-118.
- [9] Sedgwick JD. T-lymphocyte activation and regulation in the central nervous system [J]. *Biochem Soc Trans*, 1997, 25(2): 673-679.
- [10] 周玉峰, 方 峰. HCMV 免疫逃避分子机制研究进展 [J]. *国外医学·病毒学分册*, 2004, 11(2): 43-46.
- [11] Cheeran MC, Hu S, Sheng WS, et al. CXCL10 production from cytomegalovirus-stimulated microglia is regulated by both human and viral interleukin-10 [J]. *J Virol*, 2003, 77(8): 4502-4515.

(上接 570 页)

IFN- γ 和 Granzyme B (GzB, 颗粒酶), 将 Tc1 细胞分为 3 个亚群, Tc1a 细胞同时分泌 IFN- γ 和 GzB, Tc1b 细胞仅分泌 IFN- γ , Tc1c 细胞仅分泌 GzB, 我们分析的主要为 Tc1a 和 Tc1c, 各种免疫组合诱导的分泌 IFN- γ 的情况如何, 有待进一步研究。

本研究中我们初步探讨了不同疫苗免疫组合诱导免疫应答的强度和特点, 为进一步寻找更优的乙肝预防性和治疗性疫苗提供了一定的实验依据。尝试倾向于 Th1 型应答的蛋白佐剂, 以更安全的痘病毒载体 MVA (modified vaccinia Ankara) 替代本研究中的 WR 株, 将是下一步的研究方向。随着对 HBV 致病机制的进一步阐明, 通过疫苗精确地调控机体免疫应答方式, 例如通过疫苗诱导乙肝患者产生 HBV 特异性的倾向于非溶细胞型细胞免疫应答的免疫反应, 可能成为治疗乙肝的一条新的途径。

参考文献:

- [1] 梁争论, 李河民, 张华远. 接种乙型肝炎疫苗无 低应答与 HLA 关联的研究进展 [J]. *微生物学免疫学进展*, 2004, 4(1): 54-57.

- [2] Davis HL, Brazot Millan CL, Mancini M, et al. DNA-based immunization against hepatitis B surface antigen (HBsAg) in normal and HBsAg-transgenic mice [J]. *Vaccine*, 1997, 15(8): 849-852.
- [3] Takeda A, Igarashi H, Nakanura H, et al. Protective efficacy of an AIDS vaccine: a single DNA priming followed by a single booster with a recombinant replication-defective Sendai virus vector in a macaque AIDS model [J]. *J Virol*, 2003, 77(17): 9710-9715.
- [4] Moore AC, Hill AV. Progress in DNA-based heterologous prime-boost immunization strategies for malaria [J]. *Immunol Rev*, 2004, 199: 126-143.
- [5] Moss B, Earl PL. Overview of the Vaccinia Virus Expression System [A]. in Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. *Current Protocols in Molecular Biology* [M]. John Wiley & Sons, Inc, 1998: 16151-16155.
- [6] 吴 婷, 陈 敏, 欧山海, 等. 荧光素标记检测乙型肝炎病毒表面抗原特异性杀伤 T 淋巴细胞方法的探讨 [J]. *病毒学报*, 2005, 21(2): 113-117.
- [7] 郝友华, 杨东亮. 特异性细胞毒 T 淋巴细胞清除胞内乙肝病毒机制的研究进展 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005, 21(3): S128-129.
- [8] Kleen TO, Aasad R, Landry SJ, et al. Tc1 effector diversity shows dissociated expression of granzyme B and interferon-gamma in HIV infection [J]. *AIDS*, 2004, 18(3): 383-392.