

· 论 著 ·

HBV *preS2-S* DNA 免疫诱导小鼠体液免疫应答

巴月¹, 訾晓渊², 张南², 熊俊², 张树忠², 李文林², 李建秀², 吴逸明¹, 胡以平^{2*}

(1. 郑州大学公共卫生学院环境卫生学教研室, 郑州 450052; 2. 第二军医大学基础医学部细胞生物学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 构建 HBV 表面抗原 *preS2-S* 基因表达质粒, 并探讨其在小鼠体内的表达及诱导体液免疫应答的能力。 **方法:** 采用 PCR 方法, 以 PBR322-HBV2.0 (*adr* 亚型) 质粒 DNA 为模板获得 HBV *preS2-S* 基因, 并将其重组进入 pcDNA3.0 表达载体中, 转染 7721 细胞系进行稳定表达; 以此重组质粒免疫小鼠, ELISA 方法检测免疫小鼠抗 HBs 抗体浓度。 **结果:** 构建了 HBV *preS2-S* 基因的表达质粒 pcDNAS2-S, 该表达质粒可在 7721 细胞中稳定高效表达; 免疫接种小鼠 2 周后抗 HBs 抗体浓度明显升高, 接种后第 4 周布比卡因处理组小鼠抗 HBs 抗体的浓度达到峰值 161.4 mIU/ml, 布比卡因非处理组第 5 周抗 HBs 抗体的浓度可达 133.7 mIU/ml。 **结论:** 所构建的 pcDNAS2-S 表达质粒能有效表达并诱导小鼠体液免疫应答。

[关键词] 肝炎病毒, 乙型; 抗原, 表面; 免疫; 抗体生成**[中图分类号]** R 512.62 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)03-0286-04

Specific humoral immune response in mice induced by HBV *preS2-S* gene DNA immunization

BA Yue¹, ZI Xiao-yuan², ZHANG Nan², XIONG Jun², ZHANG Shu-zhong², LI Wen-lin², LI Jian-xiu, WU Yi-ming¹, HU Yi-ping^{2*} (1. Department of Environmental Health, College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

[ABSTRACT] **Objective:** To construct HBV *preS2-S* gene expression vector and evaluate its efficacy for inducing humoral immune response in mice. **Methods:** The PBR322-HBV2.0 (*adr* subtype) plasmids, which contains 2 copies of HBV genomic DNA, were used as template and HBV S2-S fragment was extended by PCR. The target gene was subcloned into pcDNA3.0 vector and transfected into 7721 cells. The serum anti-HBsAg antibody of DNA-mediated mice was detected by ELISA after immunization of the plasmid through intramuscular administration. **Results:** The pcDNAS2-S expression vector was constructed successfully and expressed *preS2-S* protein effectively in 7721 cell line. The level of anti-HBsAg antibody, which was detected firstly 1 week after the injection of the pcDNAS2-S expression vector, increased to a peak (161.3 mIU/ml) at 4 weeks in the group treated with bupivacaine and to 133.7 mIU/ml at 5 weeks in the group without bupivacaine treatment. **Conclusion:** The pcDNAS2-S expression vector can be expressed effectively and it can induce the humoral immune response in mice.

[KEY WORDS] Hepatitis B virus; antigen, surface; immunity; antibody formation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(3):286-289]

乙型肝炎是影响人类健康的主要传染病之一, 其不仅感染率高, 而且易于慢性化, 引起肝硬化和原发性肝癌。慢性 HBV 感染者体内虽然存在 HBV 抗原特异性 T 淋巴细胞, 但对 HBV 抗原的反应性较低。研究发现, 增强这类 T 淋巴细胞的反应性, 可以促进 HBV 的清除^[1]。DNA 介导的免疫反应能有效地激发机体对乙型肝炎表面抗原的免疫反应, 并有效诱导细胞免疫应答, 因而在乙肝的预防及治疗中具有良好的应用前景^[2,3]。本研究在构建 HBV 表面抗原中蛋白 *preS2-S* 编码基因的真核表达载体的基础上, 将所构建的真核表达载体以不同的免疫方法分别免疫 BALB/c 小鼠, 诱导正常小鼠产生体液免疫应答, 为加强 DNA 免疫保护性效应提供可靠的依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组 雌性 6~8 周龄 BALB/c 小鼠为第二军医大学基础医学部细胞生物学教研室 SPF 级动物房饲养, 体质量 20~25 g。免疫接种小鼠分为 3 组, 每组 8 只; 分别以 DNA 和 pcDNA3.0 免疫, 并分别以布比卡因预处理和布比卡因未处理两种方法进行。

1.2 主要试剂 含首尾相连的双拷贝 HBV 全基因组 DNA 的 PBR322-HBV2.0 质粒、真核表达载

[基金项目] 国家“九五”攻关课题 (TJ99-LA01); 国家自然科学基金 (39670811); 上海市科委基础研究重点项目 (03DZ14023); 上海市科学技术发展基金 (994919033)。

[作者简介] 巴月 (1963-), 女 (回族), 博士, 副教授。

* Corresponding author. E-mail: yphu@smmu.edu.cn

体 pcDNA 3.0、受体菌 DH5 α 及 7721 细胞系由第二军医大学基础医学部细胞生物学教研室保存。用于扩增 HBV 表面抗原基因的引物由上海生工生物工程服务有限公司合成。其中含 *Bam*H I 酶切位点的上游引物为 5'-GAG AAT TCC ATC CTG GAT CCA TGC AGT-3'; 含 *Eco*R I 酶切位点的下游引物为 5 - AAG GGA ATT CCC CCA AGC TTT GGT T-3'; DNA 片段回收试剂盒为 Qiagen 公司产品。DMEM 细胞培养基为 Gibco 公司产品; 免疫组化试剂盒为福建迈新公司产品。

1.3 HBV preS2-S 基因的获得及 pcDNAS2-S 重组体的构建 以合成的 preS2-S 上、下游引物 PCR 扩增含双拷贝 HBV 全序列的质粒, 回收扩增片段, *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切, 与经相同限制酶预切的 pcDNA3.0 连接, 转化 DH5 α 受体菌。分别以 *Hind* I、*Sal* I、*Apa*I 单酶切鉴定重组子, 以 T7 和 SP6 正、反向引物测序(上海生工生物工程服务有限公司完成)。

1.4 重组体转染真核细胞 纯化构建的重组 pcDNAS2-S, *Bgl* 线性化质粒 DNA, 电穿孔法转染 7721 细胞, G418 筛选阳性克隆, 免疫组化 S-P 法鉴定其表达情况。

1.5 小鼠血清中抗 HBsAg 抗体的检测 华美生物工程公司 ELISA 检测试剂盒, 按说明书检测。酶标仪选双波长 450/630 nm, 空白孔校零。用酶标对每孔进行比色, 并记录各孔光密度(D)值。小鼠分别用 DNA 及乙肝疫苗免疫, 每周小鼠眼球后静脉丛采血, 用 ELISA 法检测抗 HBs 抗体的产生。

1.6 统计学处理 所有统计分析应用 SPSS 10.0 软件进行。均数比较首先进行方差齐性检验, 方差齐, 采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 重组质粒 pcDNAS2-S 表达载体的鉴定 preS2-S 特异性引物扩增质粒 pBR322-HBV, 理论上扩增片段长度为 900 bp, 扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳观察, 片段大小与预期一致(图 1)。将扩增的 preS2-S 基因片段定向插入 pcDNA3.0 表达载体中, 转化感受态大肠杆菌 DH5 α , Amp⁺ 的 LB 培养基培养, 阳性菌落提取质粒 DNA 经 *Hind* III、*Apa*I、*Sal* I 酶切可分别得到 0.89 kb、5.4 kb、1.25 kb、5.0 kb、2.2 kb、4.1 kb 三组各 2 条片段, 与理论计算的片段大小符合(图 2)。以 T7 引物及 SP6 引物双向测序, 测序结果表明, 其序列与质粒图谱(pBR322 HBV/adr)中相应区段一致。

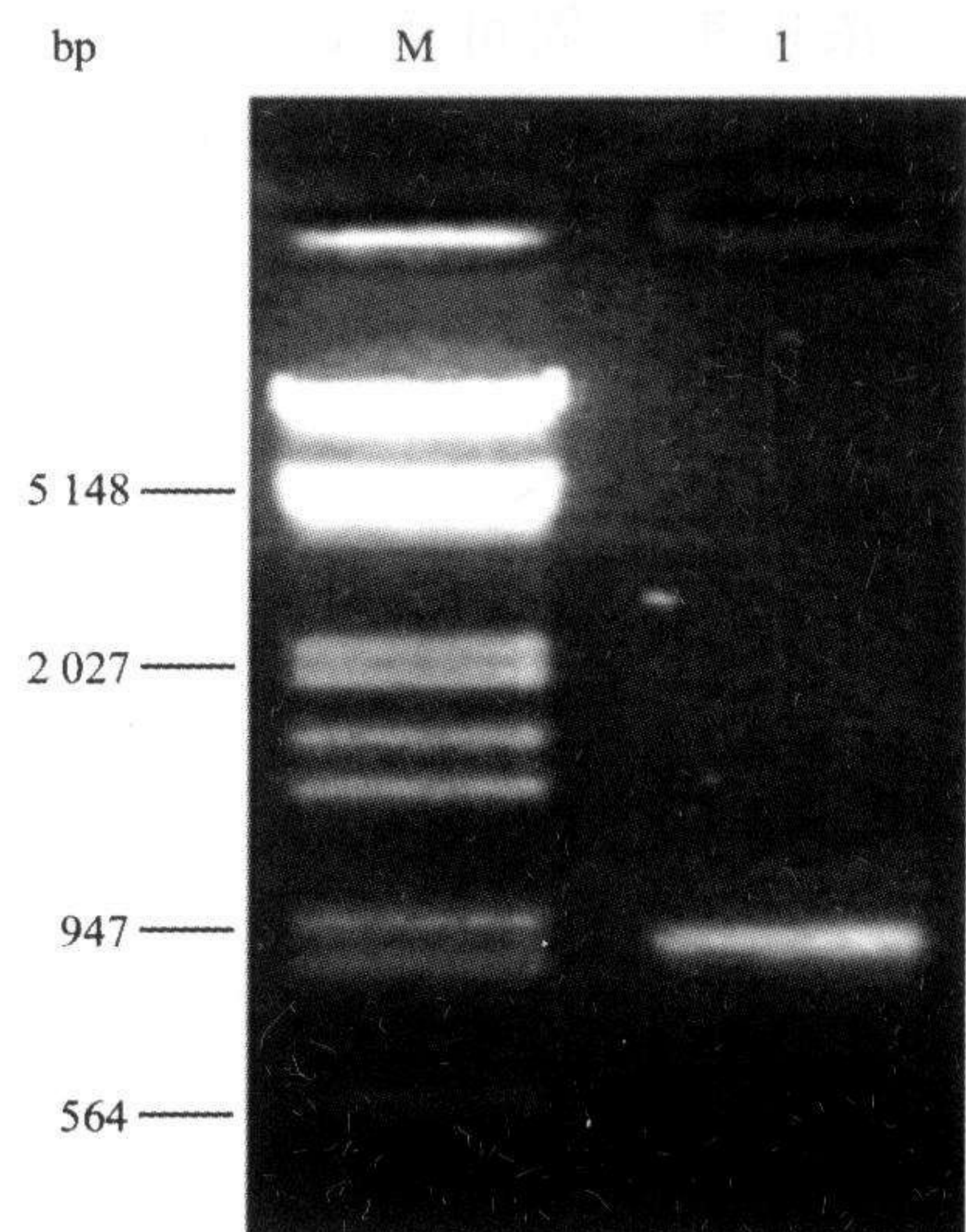


图 1 preS2-S 目的基因片段的扩增

Fig 1 Amplification of preS2-S gene

M: λ /EcoRI + HindIII marker; 1: Target gene

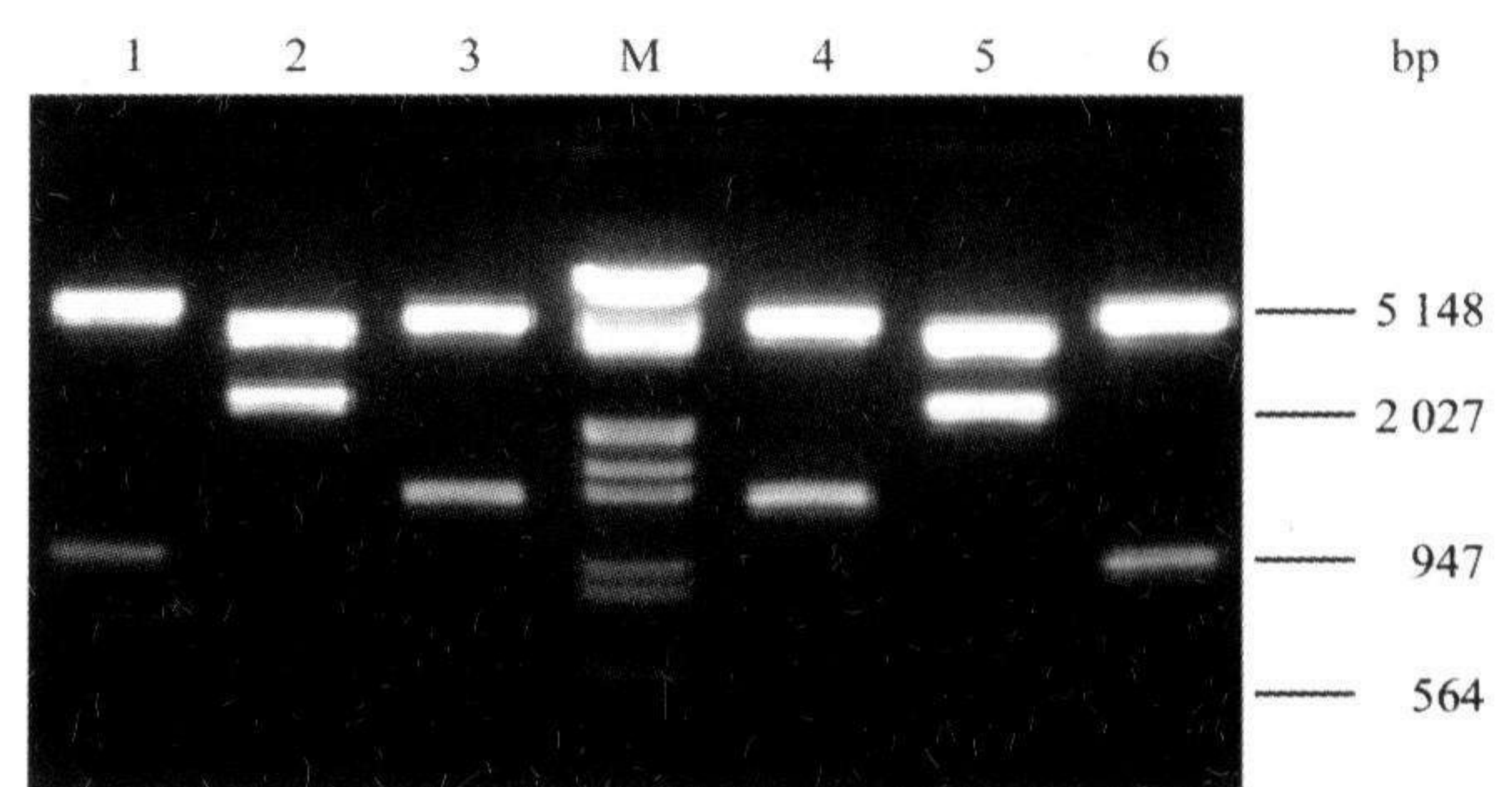


图 2 质粒 pcDNAS2-S 的酶切鉴定

Fig 2 Analysis of pcDNAS2-S by endonuclease digestion

1,6: pcDNAS2-S/*Hind* III (0.89 kb, 5.4 kb); 2,5: pcDNAS2-S/*Sal* I (2.2 kb, 4.1 kb); 3,4: pcDNAS2-S/*Apa*I (1.25 kb, 5.0 kb); M: λ /EcoRI + HindIII marker;

2.2 重组质粒 pcDNAS2-S 在 7721 细胞中的表达 对 G418 筛选后的阳性细胞进行免疫细胞化学检测, 结果显示, HBsAg 蛋白在 7721 细胞中稳定表达(图 3), 表明所构建的载体适合于作 DNA 免疫。

2.3 小鼠的 DNA 免疫及抗 HBs 的测定结果 抗 HBs 标准品分别为 40、20、10、5、2.5、0 IU, 测得的 D_{450} 值分别为 0.784、0.405、0.205、0.098、0.040 和 0。以 D_{450} 值为 X, 以抗 HBs 浓度为 Y, 得直线方程为: $Y=50.62X+0.009$ ($r=0.9997$)。

小鼠免疫 2 周后血清中抗 HBs 全部转阳 ($P/N>2.1$), 样品测定获得的 D_{450} 值经上述方程式计算得到抗体浓度(表 1)。结果显示, DNA 免疫后布比卡因处理与非处理组实验小鼠均产生了体液免疫应答; 第 4 周布比卡因处理组小鼠抗 HBs 抗体的浓度可达 161.4 mIU/ml, 布比卡因非处理组抗

HBs 抗体的浓度第 5 周可达 133.7 mIU/ml,均高于人体保护水平(10 mIU/ml);空质粒组无抗体产生。

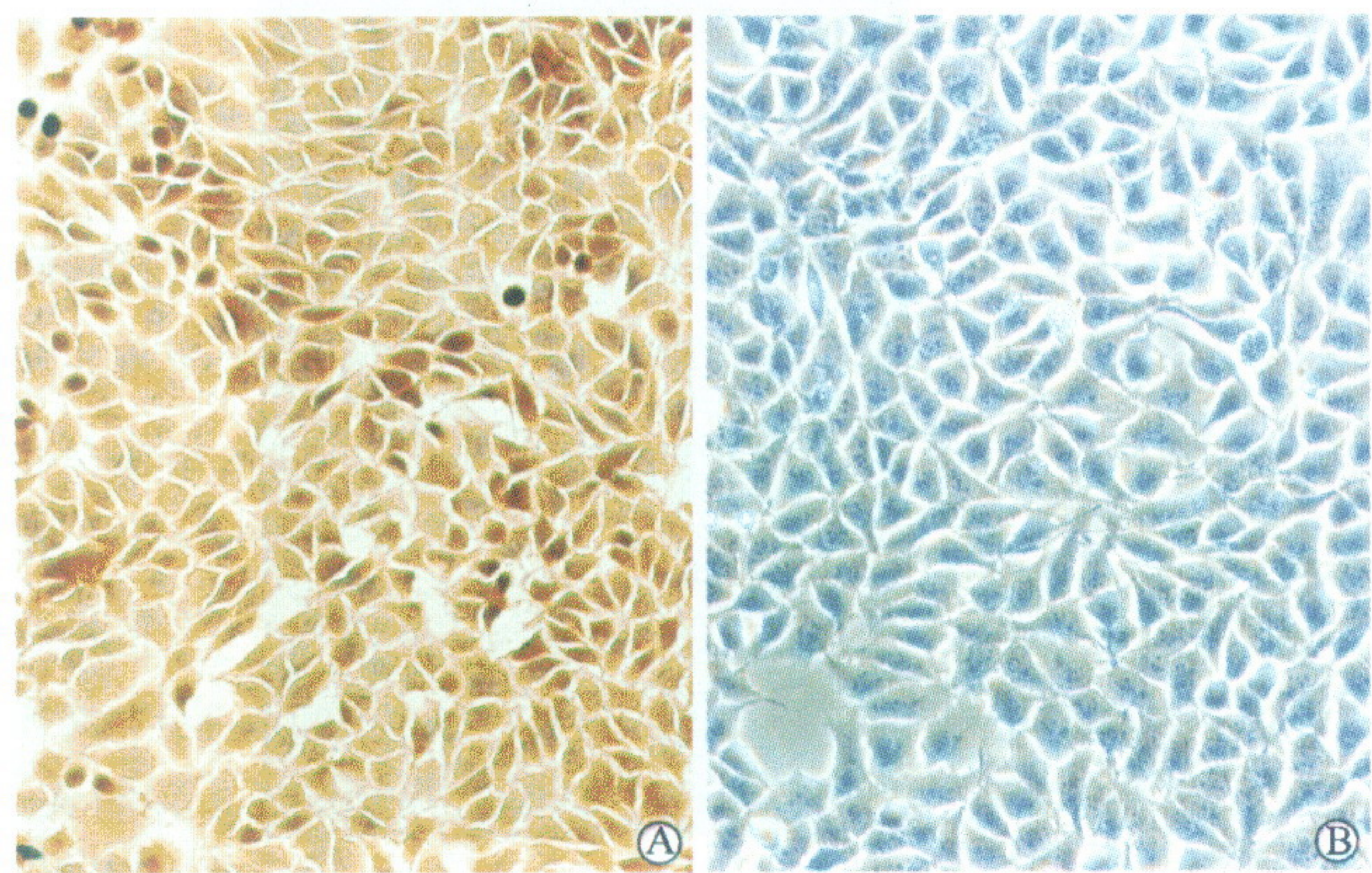


图 3 pcDNAS2-S 在 7721 细胞系中的表达

Fig 3 Expression of pcDNAS2-S in 7721 cell line(DAB, ×400)

A: Transfected with pcDNAS2-S; B: Transfected with pcDNA3.0

表 1 小鼠各周抗 HBs 测定结果

Tab 1 Level of mice anti-HBs

(n=8, $\bar{x} \pm s$, z_B /mIU · ml⁻¹)

Time (t/week)	Treated with bupivacaine	Treated without bupivacaine
1	34.64 ± 4.36*	21.48 ± 2.11
2	35.71 ± 4.49	39.76 ± 8.49
3	119.42 ± 16.37*	82.03 ± 10.47
4	161.38 ± 11.10*	126.45 ± 7.64
5	120.63 ± 15.55	133.70 ± 51.32
6	177.13 ± 33.45*	133.66 ± 14.06
7	115.69 ± 16.15*	91.65 ± 9.25
8	110.44 ± 15.54	96.08 ± 7.50
9	90.70 ± 3.66	89.43 ± 4.39
10	83.30 ± 4.16	80.45 ± 4.44
11	80.39 ± 4.91	75.39 ± 4.44
12	69.38 ± 6.04	64.63 ± 7.29

* P < 0.05 vs treated without bupivacaine group

3 讨论

质粒 DNA 编码的抗原蛋白可诱导强有力的细胞免疫和体液免疫应答,这已经在多种动物模型中证实^[4~7]。近年来,国内外学者已构建了含有不同抗原表位的 HBV DNA 表达载体并有效的诱导小鼠体液免疫应答^[8~11],但是由于所选择的抗原基因、表达载体以及免疫对象不同,其结果差异较大。本研究用含有 HBV/adr DNA 双拷贝的 pBR322 质粒为模板,通过 PCR、酶切、基因重组等技术构建了插入 HBV preS2-S 基因片段的重组表达质粒 pcDNAS2-S。限制性酶切分析及序列测定结果显示该片段全长 895 bp,编码 295 个氨基酸,蛋白相对

分子质量约 33 000,内部不含终止码。电穿孔法将重组质粒转染入 7721 细胞株进行表达,可见该表达载体能高效地表达于该细胞株。

DNA 免疫注射途径很多,Fynan 等^[12]和 Wolff 等^[13]系统地比较了不同途径(包括静脉注射、肌肉注射、滴鼻、皮内注射、皮下注射以及肝脏、脑注射等)接种 DNA 后的免疫效果,发现以肌肉注射效果最好。本研究以 100 μg preS2-S 质粒 DNA 经肌注射接种 BALB/c 小鼠,2 周后抗 HBs 转阳,而注射空载体 pcDNA3.0 的小鼠血清内未检出抗 HBs;该结果说明所构建的 pcDNAS2-S 能够在小鼠体内表达 HBsAg,并诱导小鼠产生抗 HBs 抗体。免疫 4 周后抗体水平达到峰值 161.4 mIU/ml 并持续表达 12 周;虽然免疫 4 周后抗体有下降趋势,但仍然保持高水平至少 3 个月,远远高于人体免疫要达到的保护水平(10 mIU/ml)。该结果与 Davis 等^[14]小鼠单次接种 100 μg 质粒 DNA,1 个月后抗体水平可达到高峰,其高水平可保持长达 19 周的研究结果基本一致,说明该重组体能够用作 DNA 免疫,以探讨 DNA 免疫在乙肝的预防和治疗中的作用。

许多研究认为,肌肉再生剂如布比卡因可增加肌肉摄取外源 DNA 的效率。本次研究结果显示布比卡因注射和非注射 2 组抗 HBs 的值均远远高于人体血清抗 HBs 的保护水平,而布比卡因处理组抗 HBs 的均值高于非处理;进一步的统计分析发现,免疫后观察 12 周,其中第 1、3、4、6、7 周布比卡因处理组抗体浓度高于非处理组(P < 0.05),余各周二者比较差异无统计学意义。同时 2 组抗 HBs 出现峰值的时间也有所不同,用布比卡因处理的小鼠抗 HBs 出现的时间要早于未用布比卡因处理的小鼠,二者分别为免疫后第 4 周和第 5 周;这些结果提示布比卡因处理组 DNA 免疫后抗体的产生较快,而非处理组小鼠抗体的出现是一个缓慢上升和缓慢下降的过程;有文献报道^[12],接种前使用麻醉药(如布比卡因)处理肌肉,可使肌肉处于再生状态,提高其免疫应答水平;其原因可能是再生肌肉有利于 DNA 扩散渗透或被迅速摄取,或有利于抗原提呈。研究表明,8~12 周,两者抗 HBs 差异均无统计学意义,提示不使用肌肉再生剂处理也可有效表达抗原并产生抗体。由于布比卡因具有较大的急性毒性,使用时剂量掌握不当极易造成小鼠死亡,因此,如不使用肌肉再生剂能有效的诱导免疫应答,则有利于简化 DNA 免疫的过程。

[参考文献]

[1] Bocher WO, Galun E, Marcus H, et al. Reduced hepatitis B

- virus surface antigen-specific Th1 helper cell frequency of chronic HBV carriers is associated with a failure to produce antigen-specific antibodies in the trimera mouse [J]. *Hepatology*, 2000, 31 (2): 480-487.
- [2] Rottinghaus ST, Poland GA, Jacobson RM, *et al.* Hepatitis B DNA vaccine induces protective antibody responses in human non-responders to conventional vaccination [J]. *Vaccine*, 2003, 21(31):4604-4608.
- [3] 景洪标,余宏宇,戴益民,等. 乙肝病毒 adr 型基因疫苗诱导小鼠体液免疫应答[J]. 第二军医大学学报, 2001, 22(9): 891-893.
- [4] Davis HL, Brazolot CL, Watkins SC. Immune-mediated destruction of transfected muscle fibers after direct gene transfer with antigen-expressing plasmid DNA [J]. *Gene Ther*, 1997, 4 (3):181-188.
- [5] Hasan UA, Harper DR, Wren BW, *et al.* Immunization with a DNA vaccine expressing a truncated form of varicella zoster virus glycoprotein E [J]. *Vaccine*, 2002, 20 (9-10): 1308-1315.
- [6] Nam JH, Cha SL, Cho HW. Immunogenicity of a recombinant MVA and a DNA vaccine for Japanese encephalitis virus in swine [J]. *Microbiol Immunol*, 2002, 46 (1): 23-28.
- [7] Schneder J, Langermans JA, Gilbert SC, *et al.* A prime-boost immunisation regimen using DNA followed by recombinant modified vaccinia virus Ankara induces strong cellular immune responses against the plasmodium falciparum TRAP antigen in chimpanzees [J]. *Vaccine*, 2001, 19 (32): 4595-4602.
- [8] Davis HL. DNA vaccines for prophylactic or therapeutic immunization against hepatitis B virus [J]. *Mt Sinai J Med*, 1999, 66(2):84-90.
- [9] Karayiannis P. Hepatitis B virus: old, new and future approaches to antiviral treatment [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2003, 51(4):761-785.
- [10] He XW, Wang F, Jiang L, *et al.* Induction of mucosal and systemic immune response by single-dose oral immunization with biodegradable microparticles containing DNA encoding HBsAg[J]. *J Gen Virol*, 2005, 86(Pt 3):601-610.
- [11] 余宏宇,陈新龙,宋维. HBV 基因疫苗诱导正常及 HBV 转基因小鼠产生体液免疫应答[J]. 第二军医大学学报, 2004, 25 (1): 47-50.
- [12] Fynan EF, Webster RG, Fuller DH. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene gun inoculations [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1993, 90 (24): 11478-11482.
- [13] Wolff JA, Malone RW, Williams P, *et al.* Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*[J]. *Science*, 1990, 247(4949 Pt 1):1465-1468.
- [14] Davis HL, Schirmbeck R, Reimann J, *et al.* DNA-mediated immunization in mice induces a potent MHC class-II restricted cytotoxic T lymphocyte response to the hepatitis B envelope protein [J]. *Hum Gene Ther*, 1995, 6(11):1447-1456.
- [收稿日期] 2004-10-27 [修回日期] 2005-01-05
[本文编辑] 尹 茶

Restoration of baroreflex function by ketanserin is not blood pressure dependent in conscious freely moving rats

Fu YJ, Shu H, Miao CY, Wang MW, Su DF (Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[**ABSTRACT**] **Objective:** Since the end of the 1980s, the pathological importance of baroreflex function has attracted the attention of many investigators. In our previous studies, it was found that ketanserin lowered blood pressure (BP), decreased BP variability and enhanced baroreflex sensitivity (BRS). The present work was designed to test the hypothesis that the restoration of BRS by ketanserin is not dependent on BP level in conscious rats. **Design and methods:** Spontaneously hypertensive rats (SHR) aged 8-12 months were used. Blood pressure was recorded for 60 min and BRS was determined separately before and after intragastric administration of ketanserin, with four doses. In a second experiment, 10-week-old Sprague-Dawley rats were used for preparing a myocardial infarction (MI) model by ligating the coronary artery. MI rats were treated with ketanserin for 5 weeks, with two doses. At the end of the treatment, BP and BRS of the MI rats were studied in conscious state. In addition, the effects of ketanserin on BRS in Sprague-Dawley rats with normal BRS and the effects of prazosin and ritanserin on BRS in SHR were also observed. **Results:** It was found that ketanserin significantly decreased BP and improved BRS in the conscious SHR. The decrease in BP was dose-dependent but the improvement of BRS was not. At the smallest dose (0.3 mg/kg), ketanserin did not lower BP but enhanced BRS. In MI rats, the treatment with ketanserin did not significantly decrease BP, but it improved BRS at both doses administered (0.6 and 10 mg/kg). Ketanserin [3 and 10 mg/kg, intragastric (i.g.)] did not affect BRS in SD rats with normal BRS. Prazosin and ritanserin did not enhance BRS in SHR when administered intravenously. Ritanserin markedly and prazosin slightly enhanced BRS in SHR following intracerebroventricular administration. **Conclusion:** The restoration of baroreflex function by ketanserin is not BP dependent and this effect is mediated by central 5-HT_{2A} receptor.

[*J Hypertens*, 2004, 22(6):1165-1172]