

• 论 著 •

## HBV 基因疫苗诱导正常及 HBV 转基因小鼠产生体液免疫应答

余宏宇<sup>1\*</sup>, 陈新龙<sup>2</sup>, 宋 维<sup>3</sup>, 余永伟<sup>4</sup>, 张乐之<sup>5</sup>, 胡以平<sup>6</sup>

(1. 第二军医大学长征医院病理科, 上海 200003; 2. 长海医院烧伤科; 3. 长征医院贵宾诊疗科; 4. 长海医院病理科; 5. 长海医院实验诊断科; 6. 基础医学部细胞生物学教研室)

**[摘要]** **目的:**用乙型肝炎病毒(HBV)蛋白基因真核表达载体诱导正常小鼠及 HBV 转基因小鼠产生特异性体液免疫应答,以探讨其预防及治疗 HBV 慢性感染的可行性。**方法:**将 HBV S2.S 基因的真核表达载体 pCMV-S2.S(PS)和相应的空载体 pcDNA3.0 分别免疫正常 C57BL/6 小鼠及同一品系 HBV 转基因小鼠( $n=5$ )。每只小鼠肌肉注射纯化质粒 100  $\mu\text{g}$ 。用 ELISA 方法检测小鼠血清抗 HBs 和抗 preS2 效价及 HBV 转基因小鼠血清 HBsAg 和 HBeAg 的水平。注射基因疫苗后第 8 周,活检取转基因小鼠肝脏组织,制备石蜡切片并行 H-E 染色,光镜下观察其病理改变。**结果:**PS 诱导正常及转基因小鼠产生了抗 HBs 及抗 preS2,并且抗 preS2 的出现早于抗 HBs 约 1~2 周。PS 免疫 8 周后,转基因小鼠血清 HBsAg 和 HBeAg 为阴性。注射基因疫苗后第 8 周病理检查转基因小鼠肝脏组织,肝细胞出现程度不同的广泛浊肿和水样变性,而相应的对照组无明显改变。免疫前后肝组织内单个核淋巴细胞数量无显著变化。**结论:**研究表明 HBV 中蛋白基因疫苗能够有效诱导 HBsAg 特异性的体液免疫应答,能够清除转基因小鼠血清中的 HBsAg 和 HBeAg;初步的实验结果为研制治疗 HBV 慢性感染的基因疫苗提供了依据。

**[关键词]** 乙型肝炎病毒;疫苗,DNA;转基因小鼠;体液免疫应答

**[中图分类号]** R 373.21 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)01-0047-04

### HBV DNA-based immunization inducing humoral immune response in normal and HBV transgenic mice

YU Hong-Yu<sup>1\*</sup>, CHEN Xin-Long<sup>2</sup>, SONG Wei<sup>3</sup>, YU Yong-Wei<sup>4</sup>, ZHANG Le-Zhi<sup>5</sup>, HU Yi-Ping<sup>6</sup>(1. Department of Pathology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Burns, Changhai Hospital; 3. Department of VIP, Changzheng Hospital; 4. Department of Pathology, Changhai Hospital; 5. Department of Laboratory Diagnosis, Changhai Hospital; 6. Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences)

**[ABSTRACT]** **Objective:**To investigate the feasibility of treating chronic HBV infection by inducing specific humoral immune response to HBV middle envelope proteins in normal and HBV transgenic mice with HBV DNA-based immunization. **Methods:**The eukaryotic expression vector pCMV-S2.S (PS) containing HBV S2.S gene and pcDNA3.0 were used respectively to immunize 5 C57BL/6 normal mice and HBV transgenic mice. Each mouse was injected intramuscularly with one of those plasmids at the same dose (100  $\mu\text{g}$ ). Sera of mice were detected for anti-HBs, anti-preS2, HBsAg and HBeAg with ELISA. Pathological changes of transgenic mice liver were observed by microscopy. **Results:**PS can stimulate immune responses of anti-HBs and anti-preS2 in normal and transgenic mice. The appearance of anti-preS2 was 1-2 weeks earlier than that of anti-HBs. HBsAg and HBeAg in sera turned negative 8 weeks after immunization. At the 8th week, hepatocytes showed extensive granular degeneration and hydropic degeneration. There was no obvious difference in the amount of mononuclear lymphocytes between pre- and post-gene immunization. **Conclusion:**It is showed that specific humoral immune response can be effectively induced by PS after DNA-based immunization, and PS seems to be responsible for the disappearance of HBsAg and HBeAg in sera of HBV transgenic mice. The results provide an evidence for further investigation of genetic vaccine in the treatment of chronic HBV infection.

**[KEY WORDS]** hepatitis B virus; vaccine,DNA; transgenic mice; humoral immune response

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(1): 47-50]

我国是乙型肝炎高发区,约 20% 的人群受到乙型肝炎病毒(HBV)的感染,而 HBV 感染与肝硬化、肝癌密切相关。但是,对于慢性乙型肝炎患者的治疗尚无有效手段,公认为疗效尚可的 IFN $\alpha$  其有效率也只有 30%~40%。核苷酸类似物,如拉米夫定(lamivudine)虽可迅速降低血清 HBV DNA 水平并改善肝脏的组织病理学状况,但短期治疗易复发,长期治疗易导致有

抗性变异株的选择作用<sup>[1]</sup>。因此,研制和开发乙肝治疗性疫苗具有十分重要的意义。DNA 疫苗在体内表达的蛋白可在内质网和高尔基体进行加工和修饰,形成正确的空间结构,抗原免疫原性强,刺激机体产生的抗体

**[基金项目]** 国家自然科学基金(39670669,39970676)。

**[作者简介]** 余宏宇(1960-),男(汉族),博士,教授。

\*Corresponding author.

质量高,已证明能对多种病毒产生保护性免疫应答作用<sup>[2]</sup>。我们通过构建HBV基因真核表达载体(pCMV-S2.S,PS)并将其免疫正常C57BL/6及同一品系HBV转基因小鼠,观察其诱导体液免疫应答的能力及抗病毒效果,以便为进一步开发和研制治疗性HBV基因疫苗提供依据。

### 1 材料和方法

1.1 材料 转化菌DH5α由本校基础医学部细胞生物学教研室提供。质粒抽提试剂购自Qiagen公司。HBsAg ELISA检测试剂AUSAB试剂盒、抗HBs标准品购自Abbott Laboratories。表面抗体检测ELISA试剂盒购自上海实业科华生物技术有限公司。抗-preS2检测试剂盒购自北京大学医学院肝病研究所肝炎试剂研制中心。Wellsan MK酶标仪购自Labsystem公司。H-E染色为常规试剂。

1.2 实验动物 C57BL/6小鼠(由本校基础医学部细胞生物学教研室动物房提供)共10只,雌性,4~6周龄,体质量约为20g,SPF级(合格证号:医动字第02-68号)。HBV转基因小鼠<sup>[3]</sup>为C57BL/6品系,SPF级,血清ELISA检测HBsAg和HBeAg阳性。

1.3 PS的构建 按文献<sup>[4]</sup>方法构建并鉴定。

1.4 质粒提取 按试剂盒说明书进行。采用紫外分光光度仪定量,每100ml DH5α转化菌株的菌液可获得高纯度质粒500μg。

1.5 PS免疫小鼠 正常及HBV转基因小鼠分别随机分为实验组和对照组,每组5只,实验组肌注基因疫苗PS,对照组肌注空载体pcDNA3.0。先将0.5%盐酸布比卡因50μl注入小鼠的双侧胫骨前肌内,3d后给小鼠腹腔注射0.75%戊巴比妥钠(约200μl),待小鼠麻醉后将溶于0.9%生理盐水中的纯化质粒注射入同一部位。质粒浓度为1μg/μl。两组均单次注射100μg,每侧50μg。注射前及注射后每隔1~2周用肝素化毛细吸管从小鼠球后静脉取血200μl,离心后将血清-70℃保存待检。

1.6 小鼠血清中抗-HBs的检测 小鼠血清抗HBs ELISA检测按试剂盒说明书进行。将抗HBs抗体浓度(mIU/ml, Y)与酶联仪上测得的D<sub>450</sub>值(X)进行线性回归,得方程为Y = 94.442X - 1.959, r = 0.9988。样品测定D<sub>450</sub>后根据此方程计算抗体浓度。

1.7 ELISA法检测小鼠血清中抗preS2<sup>[5]</sup> 按试剂盒说明书进行。抗preS2抑制率(%) = (D<sub>试剂阴性对照</sub> - D<sub>待测样品</sub>) / (D<sub>试剂阴性对照</sub> - D<sub>试剂阳性对照</sub>) × 100%。

1.8 ELISA法检测转基因小鼠血清HBsAg和

HBeAg 按试剂盒说明书进行。

1.9 转基因小鼠肝脏组织病理学观察 基因免疫后第8周小鼠腹腔注射0.75%戊巴比妥钠(约200μl)麻醉,旁正中切口经腹腔活检取小鼠肝脏,以10%中性甲醛固定,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,常规切片,脱蜡后H-E染色,光镜下观察。

1.10 统计学处理 采用SAS统计软件包。

### 2 结果

2.1 血清中抗HBs水平 注射PS后,对人体有保护作用的临界值抗体浓度(>10 mIU/ml)最早均出现在第4周;C57BL/6小鼠至观察结束时的第12周达到高峰,个体正常小鼠最高抗体浓度88.42 mIU/ml;转基因小鼠至观察结束时的第11周达到高峰,个体转基因小鼠最高抗体浓度达178.20 mIU/ml。而pcDNA3.0质粒免疫的C57BL/6及转基因小鼠,其血清中抗HBs抗体均始终为阴性(<10 mIU/ml)。两组比较差异显著(P<0.01,图1)。

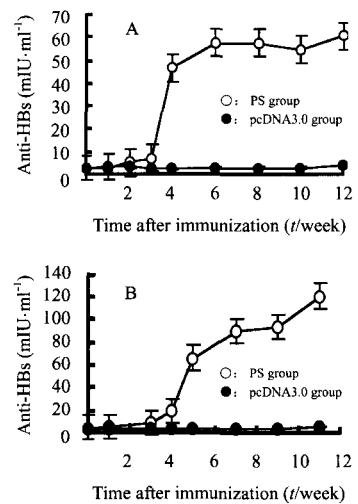


图1 DNA疫苗免疫后小鼠血清抗HBs抗体水平  
Fig 1 Titres of anti-HBs in mice immunized with PS or pcDNA3.0  
A: C57BL/6 mice; B: Transgenic mice

2.2 血清抗HBs2水平 C57BL/6小鼠及转基因小鼠注射PS后,有效抗体抑制率(>50%)最早均出现在个别小鼠基因免疫后第2周;按组内平均值衡量,C57BL/6小鼠至第8周达到高峰(图2A),个别小鼠最高抗体抑制率可达103.40%,转基因小鼠至第5周达到高峰(图2B),个体最高抗体抑制率达101.60%;两者抗HBs2有效抗体抑制率的出现均都早于抗HBs抗体峰值的出现。而pcDNA3.0质粒

免疫的 C57BL/6 及转基因小鼠,其血清相应抗体始终为阴性(抗体抑制率 $<30\%$ )。

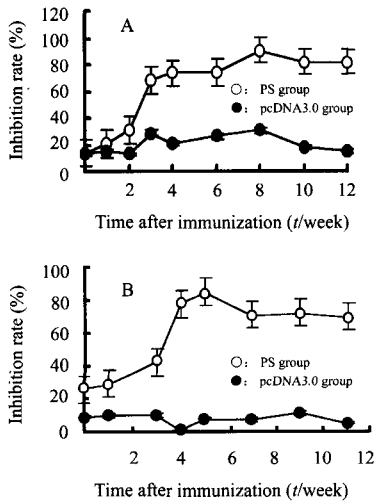


图2 DNA 疫苗免疫后小鼠血清抗 preS2 抗体抑制率

Fig 2 Inhibition rate of anti-preS2 in mice immunized with PS or pcDNA3.0

A: C57BL/6 mice; B: Transgenic mice

2.3 血清 HBsAg 和 HBeAg HBV 转基因小鼠 PS 免疫后第 5 周起至观察结束(第 12 周),未检测到 HBsAg 和 HBeAg;而 pcDNA3.0 免疫的转基因小鼠在此期间可检测到 HBsAg 和 HBeAg。

2.4 转基因小鼠肝脏的病理改变 PS 免疫后第 8 周,肝细胞出现程度不同的广泛浊肿变性和水样变性,免疫前后单个核淋巴细胞数量无显著变化。

### 3 讨论

DNA 疫苗免疫是指裸 DNA 直接注射到皮肤或肌肉组织,并被转染到某种细胞里、转录 mRNA、翻译成蛋白质抗原,通过主要组织相容性复合物(MHC-I 和 MHC-II)途径刺激机体产生相应的免疫应答。与合成疫苗仅有少数抗原表位可被利用相比,DNA 疫苗由于能更好地保持抗原的空间结构和翻译后的修饰如糖基化,从而能够很好地被抗原递呈细胞、辅助 T 细胞及 CTL 细胞表面受体识别<sup>[6]</sup>。此外,免疫途径对 DNA 免疫应答也有重要影响,肌肉和皮下的 DNA 免疫途径能有效诱导体液和 MHC-I 类限制性 CTL 应答,而静脉注射却不能<sup>[7]</sup>。本实验通过单次肌肉注射 DNA 疫苗,成功地诱导了小鼠体液免疫应答。

免疫耐受是临床乙型肝炎慢性化的最主要机制。慢性乙型肝炎患者对 HBV 的各种抗原产生程度不同的免疫耐受,表现为 HBs 和(或)HBe 抗体阴

性,HBc 抗体阳性或阴性。HBV 转基因小鼠也存在类似情况,HBV 复制对小鼠肝细胞不造成病理损伤,免疫系统对 HBV 抗原均处于耐受状态<sup>[8]</sup>,与人 HBV 慢性肝炎患者情形相似。转基因小鼠免疫状态形成并非由于免疫系统单一环节所致,在抗原递呈细胞、抗原特异性细胞免疫应答、细胞因子及靶细胞抗原标志,都存在免疫功能低下及调节识别障碍。本实验通过单次肌肉注射 DNA 疫苗,成功诱导转基因小鼠体液免疫应答,抑制转基因小鼠的病毒复制,打破了其免疫耐受状态。

虽然转基因小鼠血清中含有大量的抗原,但是 DNA 疫苗免疫后很快便诱导产生高水平的抗体。在起始阶段只有针对 preS2 抗原表位的抗体产生,这可能是由于转基因小鼠针对这一决定簇的免疫耐受性要比 HBsAg 低<sup>[9]</sup>。DNA 疫苗免疫后抗原-抗体免疫复合物的形成也有助于抗原递呈细胞捕获 HBsAg,进而刺激 T 细胞的增殖。此外,本研究所采用的 DNA 疫苗的载体上含有免疫刺激序列 CpG 基序可作为佐剂,促进机体建立 Th1 类占优势的免疫应答,诱导 IL-12、IFN $\gamma$  等细胞因子的产生,使吞噬细胞、NK 细胞等功能增强。通过未甲基化 DNA 的协同输送作用进一步增强了 Th1 型免疫应答<sup>[10]</sup>。Th1 型免疫应答的产生使 HBsAg 表位的递呈成为可能,也有助于自发免疫反应的产生。同时,可能 CpG 的刺激导致专职抗原递呈细胞递呈抗原并提供共刺激信号,激发免疫反应;而肝脏细胞是非专职抗原递呈细胞,其表达的 HBsAg 由于缺乏共刺激信号则有助于引起免疫无能<sup>[11]</sup>。

无论是哪种机制,DNA 免疫产生高水平的保护性抗体,打破转基因小鼠的免疫耐受,抑制 HBV 基因的表达,这一现象为慢性乙型肝炎的治疗性疫苗的研究开辟了新的途径。但在应用于人体前,尚须克服注射 DNA 可能引起的不良反应,可能激活癌基因而致癌<sup>[12]</sup>及产生抗 DNA 抗体,引起人体自身免疫性反应等<sup>[13]</sup>。随着对 DNA 疫苗免疫机制和调节控制的深入研究,相信将为病毒的慢性持续性感染的预防和治疗提供强有力的手段。

### 【参考文献】

- [1] Maddrey WC. Hepatitis B: an important public health issue [J]. *J Med Virol*, 2000, 61: 362-366.
- [2] Clark KR, Johnson PR. Gene delivery of vaccines for infectious disease [J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2001, 3(4): 375-384.
- [3] 管晓渊,姚玉成,胡以平,等.乙型肝炎转基因小鼠品系 C57-TgN(HBV adr2.0)的生物学特征 [J]. 第二军医大学学报, 2002, 23(11): 1179-1183.

- Zi XY, Yao YC, Hu YP, *et al.* Biological characters of hepatitis B virus transgenic mice strain C57-TgN(HBV adr2. 0)SMMU [J]. *Di-er Junyi Daxue Xuebao (Acad J Sec Mil Med Univ)*, 2002, 23(11):1179-1183.
- [4] 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.
- Jing HB, Yu HY, Dai YM, *et al.* Cellular and humoral immune response to hepatitis B virus adr subtype vaccine in mice [J]. *Di-er Junyi Daxue Xuebao (Acad J Sec Mil Med Univ)*, 2002, 23(8):819-821.
- [5] 葛军辉 刘惠敏, 何 金, 等. 重组乙型肝炎病毒变异 s 基因疫苗诱导小鼠产生特异性体液免疫应答[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2003, 19(5):447-449.
- Ge JH, Liu HM, He J, *et al.* Induction of specific humoral immune response in mice by recombinant mutant HBV s gene vaccine [J]. *Xibao Yu Fenzi Mianyizue Zazhi (Chin J Cell Mol Immunol)*, 2003, 19(5):447-449.
- [6] Schirmbeck R, Bohm W, Ando K, *et al.* Nucleic acid vaccination primes hepatitis B virus surface antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in nonresponder mice [J]. *J Virol*, 1995, 69(10):5929-5934.
- [7] Bohm W, Mertens T, Schirmbeck R, *et al.* Routes of plasmid DNA vaccination that prime murine humoral and cellular immune responses [J]. *Vaccine*, 1998, 16(9-10):949-954.
- [8] Chisari FV, Pinkert CA, Milich DR, *et al.* A transgenic mouse model of the chronic hepatitis B surface antigen carrier state [J]. *Science*, 1985, 230(4730):1157-1160.
- [9] Mancini M, Hadchouel M, Tiollais P, *et al.* Induction of anti-hepatitis B surface antigen (HBsAg) antibodies in HBsAg producing transgenic mice; a possible way of circumventing "non-response" to HBsAg [J]. *J Med Virol*, 1993, 39(1):67-74.
- [10] McCluskie MJ, Davis HL. CpG DNA is a potent enhancer of systemic and mucosal immune responses against hepatitis B surface antigen with intranasal administration to mice [J]. *J Immunol*, 161(9):4463-4466.
- [11] Joseph A, Louria-Hayon I, Plis-Finarov A, *et al.* Liposomal immunostimulatory DNA sequence (ISS-ODN): an efficient parenteral and mucosal adjuvant for influenza and hepatitis B vaccines [J]. *Vaccine*, 2002, 20(27-28):3342-3354.
- [12] Nichols WW, Ledwith BJ, Manam SV, *et al.* Potential DNA vaccine integration into host cell genome [J]. *Ann N Y Acad Sci USA*, 1995, 772:30-39.
- [13] Mor G, Singla M, Steinberg AD, *et al.* Do DNA vaccines induce autoimmune disease [J]? *Hum Gen Ther*, 1997, 8(3):293-300.
- [收稿日期] 2003-06-08 [修回日期] 2003-12-15  
[本文编辑] 邓晓群

• 研究简报 •

老年男性心力衰竭患者血清皮质醇浓度的变化

Changes of serum cortisol in male senilities with cardiac failure

杨 波<sup>1</sup>, 李卓朝<sup>1</sup>, 王晓山<sup>2</sup>, 姜丽萍<sup>1</sup>, 谷海燕<sup>1</sup>, 刘晓杰<sup>1</sup>, 韩彦博<sup>1</sup>, 齐 月<sup>1</sup>

(1. 北华大学第四临床医学院吉林铁路中心医院, 吉林 132001; 2. 济南铁路中心医院, 济南 250001)

[关键词] 心力衰竭; 老年人; 皮质醇

[中图分类号] R 541.61

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2004)01-0050-01

皮质醇由肾上腺皮质束状带合成与分泌, 是糖皮质激素中生理效应最强的成分之一, 对维持人体的生命活动起重要作用。尤其在应激反应中, 对机体起着重要的保护作用。我们观察了 54 例老年男性充血性心力衰竭患者血清皮质醇浓度的变化, 现分析报告如下。

1 资料和方法

1.1 研究对象 选择本院年龄 ≥ 60 岁的老年男性患者 99 例, 基础疾病为冠心病 79 例, 其中心绞痛 46 例、心肌梗死 33 例, 合并高血压者 49 例; 肺心病 11 例; 老年退行性心脏瓣膜病 6 例; 心肌病 3 例。根据 NYHA 法心功能分级, 分为心衰组和无心衰组。心衰组: 54 例, 平均年龄 (72.31 ± 6.63) 岁。心功能 II ~ IV 级及心脏彩超左室射血分数 (EF) < 0.45 者。无心衰组: 45 例, 平均年龄 (67.21 ± 8.51) 岁, 心功能 I 级及 EF > 0.45 者。另选择 30 例无器质性疾病的正常老年男性为对照组, 平均年龄 (66.78 ± 9.89) 岁。

1.2 研究方法 分别于 0:00、8:00、16:00 各采取静脉血

2 ml 送本院核医学科, 应用放射免疫法测定血清中皮质醇含量。放免试剂盒由中国核动力院 401 研究所提供, 仪器为中国科学技术大学科技实业总公司中佳光电仪器分公司生产的 GC-1200 Y 放射免疫计数器。为避免药物对测定的影响, 所有患者采血前 72 h 禁用糖皮质激素类药物。

1.3 统计学处理 计量资料数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 *t* 检验; 计数资料采用  $\chi^2$  检验。

2 结果

见表 1。

对照组昼夜节律性正常 (8:00 值 > 16:00 值 > 0:00 值), 皮质醇含量的平均值均在正常范围 (正常值 50 ~ 200 μg/L)。无心衰组仍为昼夜节律性变化, 皮质醇含量的平均值高于对

(下转第 54 页)

[作者简介] 杨 波 (1955-), 女 (汉族), 副主任医师。  
E-mail: boboyang556682610@yahoo.com.cn