

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.01230

携带抑胃多肽序列的 HBc 病毒样颗粒蛋白疫苗的制备及其免疫效果

田建卿¹, 王越², 林宁³, 邹大进^{1*}, 孙树汉^{2*}

1. 第二军医大学长海医院内分泌科, 上海 200433
2. 第二军医大学基础部医学遗传学教研室, 上海 200433
3. 第二军医大学长海医院临床营养科, 上海 200433

[摘要] **目的:** 设计及制备携带抑胃多肽(GIP)抗原序列的 HBc 病毒样颗粒(VLP)蛋白疫苗, 并研究其免疫效果, 为肥胖免疫干预治疗提供新的策略。**方法:** 克隆 GIP cDNA 序列, 并与 HBc VLP(1~144aa)cDNA 序列进行融合, 通过原核表达及纯化, 制备携带 GIP 序列的 HBc VLP 疫苗(HBc-GIP); 同时将该融合基因的 cDNA 序列克隆入 pVAX1 真核表达载体, 制备 GIP 核酸疫苗。用 2 种疫苗免疫大鼠并进行免疫学指标评价。**结果:** 成功制备了携带 GIP 抗原序列的 HBc-GIP, 并同时制备了编码该融合蛋白序列的核酸疫苗 pVAX1-HBc-GIP。经过两种疫苗的联合免疫, 可以获得高滴度的 GIP 特异性抗体 IgG, 显示了良好的免疫效果。**结论:** 采用 HBc(1~144aa)作为 GIP 的载体, 制备 VLP 蛋白疫苗, 联合核酸疫苗免疫可以有效地诱导靶向大鼠 GIP 的特异性体液免疫反应, 打破大鼠自身抗原耐受。该疫苗可以作为一种新的控制肥胖的免疫干预药物来进一步深入研究。

[关键词] 抑胃多肽; 病毒样颗粒; 肥胖症; 免疫疗法; 蛋白疫苗

[中图分类号] R 589.25 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)11-1230-06

Preparation of HBc virus-like particle vaccine harboring sequences of gastric inhibitory peptide and its immune effects

TIAN Jian-qing¹, WANG Yue², LIN Ning³, ZOU Da-jin^{1*}, SUN Shu-han^{2*}

1. Department of Endocrinology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Medical Genetics, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433
3. Department of Clinical Nutrition, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To design and prepare HBc virus-like particle vaccine (VLP) harboring the specified epitope of gastric inhibitory peptide (GIP), and to study its immune effects, so as to cast new lights on immune therapy of obesity. **Methods:** GIP cDNA was cloned and was fused with HBc VLP (1-144aa) cDNA. Through prokaryotic expression and purification processes, a GIP vaccine linked to the HBc-derived VLP carrier was constructed. We also cloned the fusion gene into eukaryotic vector pVAX1 to prepare GIP nuclear acid vaccine. And the two kinds of vaccines were tested in rats for their immunological parameters. **Results:** GIP vaccine linked to HBc-derived VLP carrier was successfully prepared. We also prepared the genetic vaccine pVAX1-HBc-GIP. The combined vaccination with both vaccines could obtain high titer and peptide-specific IgG antibody, displaying a satisfactory immunogenicity. **Conclusion:** GIP protein vaccine using HBc as immune-enhancing vaccine carrier can effectively induce GIP-specific humoral immunity, disrupting the tolerance to self antigens in rats. The vaccine is worth studying as a new drug for control of obesity.

[KEY WORDS] gastric inhibitory peptide; virus-like particles; obesity; immunotherapy; protein vaccination

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(11):1230-1235]

肥胖是世界范围内危害人类健康的主要疾病之一, 与 2 型糖尿病、冠心病、卒中、高血压、血脂紊乱、肿瘤等多种慢性疾病密切相关^[1]。适度减轻体质量

可以明显减少肥胖相关性疾病的发生率及病死率。抑胃多肽 (gastric inhibitory peptide, GIP) 又称葡萄糖依赖促胰岛素分泌多肽 (glucose-dependent in-

[收稿日期] 2009-04-20 **[接受日期]** 2009-07-27

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑课题(2006BAI02B08), Supported by National Key Technology R&D Program(2006BAI02B08).

[作者简介] 田建卿, 博士生, 主治医师, 原单位兰州军区乌鲁木齐总医院血液内分泌科, 乌鲁木齐 830000. E-mail: fiqztjq@126.com

* 通讯作者 (Corresponding authors). Tel: 021-81873277, E-mail: zwj22@medmail.com.cn; Tel: 021-81871053, E-mail: shsun@vip.sina.com

sulinotropic polypeptide), 被诸多研究认为是营养过剩导致肥胖的一个关键激素。GIP 能调控糖脂代谢, 促进脂肪细胞对葡萄糖的摄取^[2], 与脂肪细胞分化成熟密切相关^[3], 具有胰岛素样的生脂作用^[4], 能增加脂蛋白酯酶的合成、分泌及活性, 促进脂肪贮存^[5]。利用 GIP 受体基因敲除小鼠^[2,6]、GIP 受体拮抗剂^[7]、减少小肠 K 细胞 GIP 的分泌^[8]等方法, 均能有效抑制脂肪合成、控制肥胖、减低体质量, 提示阻断或削弱 GIP 生物活性的方法在抗肥胖方面具有潜在研究前景。

基因工程疫苗技术的快速发展为抗肥胖领域研究提供了另一种可能的药物治疗策略。目前已有研究者以病毒样颗粒 (virus-like particles, VLP) 或卵清蛋白为载体, 分别与 GIP 1~15 位多肽序列^[9]或 GIP 1~11 位多肽序列^[10]采用化学偶联方式结合构建蛋白疫苗, 在小鼠模型上进行抗肥胖相关研究, 发现两种疫苗均能使小鼠打破免疫耐受, 产生针对 GIP 的特异性抗体, 从而获得体质量减轻或改善血糖的作用, 且未发现明显的不良反应。但是, 类似的研究尚需在更多动物模型上进行。另外, 化学偶联是在蛋白合成后进行偶联, 其偶联位点可能会发生变化, 进而影响肽表位的空间结构, 影响疫苗的接种效率及稳定性。本研究中, 我们尝试利用 HBc VLP 作为载体, 与大鼠 GIP 多肽活性中心表位 (GIP 1~12) 进行融合后原核表达与纯化, 以期获得了一种新型 GIP 疫苗, 并在高脂饮食致肥胖大鼠模型上进行相关免疫效果研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、细胞株和实验动物 大肠杆菌 Top10、BL21 为本室保存, 分别用作克隆、原核表达工程菌; 人胚肾来源上皮细胞株 HEK-293 购自 ATCC 细胞库 (Manassas, VA, USA), 用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基 (Gibco 公司, 美国) 培养; 小鼠单核细胞源性白血病细胞株 Raw264.7 购自 ATCC 细胞库 (Manassas, VA, USA), 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 (Gibco 公司, 美国) 培养。SPF 级雄性 SD 大鼠 20 只, 购自上海斯莱克实验动物公司, 第二军医大学实验动物中心饲养。

1.1.2 主要试剂 pcDNA3.1(+), pET28a(+) 质粒均为本室保存; pMD18T 载体, 连接酶试剂盒 DNA ligation Kit, 内切酶 *Nde* I、*Xho* I、*Bam*H I 均购自大连宝生物工程有限公司; 2×Taq Master Mix PCR 试剂购自北京天根生物有限公司; PCR 引

物委托上海赛百胜生物有限公司合成; Ni-NTA Resin 购自美国 GenScript 公司; 弗氏不完全佐剂购自美国 Sigma 公司; Hilyte Flour 555 蛋白标记试剂盒、DAPI 染料购自日本 Dojindo 公司; 转染试剂 Lipofectamine 2000、TRIzol 试剂、MLMV 酶购自美国 Invitrogen 公司; 质粒大量抽提试剂盒购自北京博大泰克公司; HRP 标记的山羊抗大鼠总 IgG 购自优宁维生物公司; HBc 单克隆抗体由第二军医大学基础部医学遗传学教研室王芳博士自行制备; GIP 标准品购自中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所。

1.2 核酸疫苗和蛋白疫苗的构建及鉴定

1.2.1 GIP 基因序列的克隆 根据 GenBank 网站上公布的大鼠 GIP mRNA (NM_019630) 序列, 获取其 N 端 12 肽 (YAEGTFISDYSD) 的编码 cDNA 序列: TAT GCA GAG GGG ACT TTC ATC AGT GAT TAC AGC ATC。委托上海英骏公司合成单链 cDNA 序列如下: 5'-CAC TTC CGG GCG CCT ATG CAG AGG GGA CTT TCA TCA GTG ATT ACA GCA TCC TCG AG-3', 以双蒸水按照 1 μg/μl 浓度溶解备用。其中, 5' 端划线区域为与 HBc 基因互补连接区, 3' 端划线区域为 *Xho* I 酶切位点。并设计 GIP 下游扩增引物 GL: 5'-CTC GAG GAT GCT GTA ATC ACT GAT G-3'。

1.2.2 HBc-GIP 融合基因的克隆 以本室保存的 pET28a(+)-HBc(1~144) 质粒为模板, PCR 扩增 HBc 第 1~144 位氨基酸编码 cDNA 片段, 使用引物 P1 (forward, 5'-CAT ATG GAC ATT GAC CCG TAT AA AG-3', 划线部分为 *Nde* I 位点)、P2 (reverse, 5'-GGC GCC CGG AAG TGT TGA TAA GAT AGG-3'), 进行 PCR 扩增 40 个循环, 得到含 542 bp HBc(1-144 aa) 片段的 PCR 产物。采用 PCR 体系 (50 μl): Taq Pre-Mix 25 μl, HBc(1-144 aa) 片段的 PCR 产物 2 μl, GIP 编码 cDNA 2 μl, ddH₂O 21 μl 进行 PCR 扩增 5 个循环, 随后在体系内加入 HBc 上游引物 P1 和 GIP 下游引物 GL 各 1 μl, 继续反应 30 个循环, 最终获得 494 bp PCR 产物, 连接入 pMD-18T 载体后测序证实为 HBc-GIP 片段, 上述引物退火温度均为 60℃。

1.2.3 pET28a(+)-HBc-GIP 和 pVAX1-HBc-GIP 表达载体构建 将 pMD18T-HBc-GIP 载体用 *Nde* I 和 *Xho* I 内切酶进行酶切, 获得 HBc-GIP 片段连入 pET28a(+) 载体, 测序鉴定, 获得 pET-28a(+)-HBc-GIP 载体。以 pMD18T-HBc-GIP 为模板, PCR 引物 P3 (5'-GGA ATT CGA CAT TGA CCC GTA TAA AG-3', 划线部分为 *Eco*R I 酶切位

点)及引物 GL 进行反应,获得含有 *EcoR* I 和 *Xho* I 位点的 HBc-GIP 小片段,连入 pVAX1 载体获得 pVAX1-HBc-GIP 载体,测序鉴定正确。

1.2.4 HBc-GIP 重组融合蛋白的原核表达、纯化及条件优化 将鉴定正确的 pET-28a(+)-HBc-GIP 载体转化大肠杆菌 BL21(DE3) codonplus-RIL (本室保种),成功后进行单克隆化,挑取单菌落于含氨苄青霉素(Amp)的 LB 培养液中,37℃ 培养过夜。以 2% 的比例,接种上述过夜菌于新鲜的 LB/Amp 培养液中,37℃ 振荡(300 次/min) 培养 2 h 至 D_{600} 为 0.6~0.8,然后加入 IPTG,终浓度为 1 mmol/L,再振荡培养 3~4 h,最后取样测 D_{600} ,离心收集裂解菌体,12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 分析并鉴定表达结果。通过对不同温度(25℃ 和 37℃)、 D_{600} 值(0.50 和 1.00) 和 IPTG (0.50 和 0.1 mmol/L) 浓度条件下,重组 pET28a(+)-HBc-GIP 的诱导表达和可溶性研究,并以未加 IPTG 诱导的菌体为对照,摸索最适表达条件。利用优选的表达条件,大量培养表达产物,超声波破碎菌体,收集上清及沉淀,将沉淀进行洗涤、变性、复性。上清和复性沉淀用镍亲和层析柱纯化,具体步骤按使用说明书进行。收集蛋白质洗脱峰,电泳检测重组蛋白在各洗脱峰的分布情况。BCA 法(上海捷瑞公司 BCA 蛋白定量试剂盒)测定纯化物含量。采用 HBc 单克隆抗体进行蛋白质印迹实验,检测蛋白质的特异性。

1.2.5 纯化 HBc-GIP 蛋白形成病毒样颗粒的验证 将纯化的 HBc-GIP 蛋白按照 HiLyte Flour 555 蛋白标记试剂盒说明书标记为红色荧光,添加到 Raw 264.7 细胞培养基中,培养 4 h 后,以 4% 多聚甲醛固定。磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次,DAPI 染料进行胞核染色,400 倍荧光显微镜下观察吞噬情况。

1.2.6 pVAX1-HBc-GIP 体外表达验证 按说明书将 pVAX1-HBc-GIP 质粒大量抽提并去除内毒素后,测 D_{280} 值和电泳分析进行定量,分装后 -80℃ 保存。取少量质粒,以 Lipofectamine 2000 作为转染试剂转染 HEK-293 细胞株,按照说明书标准流程操作。

1.3 动物免疫及抗体检测 将大量抽提的 pVAX1-HBc-GIP 质粒和纯化的 HBc-GIP 蛋白作为免疫原进行免疫。核酸疫苗免疫方法为每只大鼠股四头肌注射 400 μg 质粒,注射后原位肌肉进行电击处理,采用美国 BTX 公司 ECM830 型号电击仪,电击参数 110 V 10 ms 6 次;蛋白疫苗免疫方法为与等体积不完全弗氏佐剂混合后,大鼠背部皮下多点注射 50 μg 蛋白。免疫流程为:核酸疫苗免疫 2 次+蛋白疫苗免疫 2 次,或蛋白疫苗免疫 4 次,或核酸疫苗免疫 4 次,每次免疫均间隔 2 周。对照组免疫用重组 HBc 蛋白(本室制备并保存),空白组免疫用 PBS 溶液。

初次免疫后 0、14、28、42、63 和 84 d 眶静脉丛采集大鼠全血,离心后收集血清,生理盐水倍比稀释后检测,采用 ELISA 法检测 GIP 特异性抗体滴度。

1.4 统计学处理 各组间抗体滴度采用 Wilcoxon 符号秩和检验进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HBc-GIP 原核及真核表达载体的构建 PCR 扩增 HBc 基因(1~144 位氨基酸的编码片段)将其与 GIP 基因(1~12 位氨基酸的编码片段)连接,获得 HBc-GIP 融合基因(图 1A)。

经过连接 T 载体,测序正确后,再次经过相似的酶切、连接过程,构建真核表达载体 pVAX1(图 1B)和原核表达载体 pET28a(+)(图 1C),酶切鉴定正确。

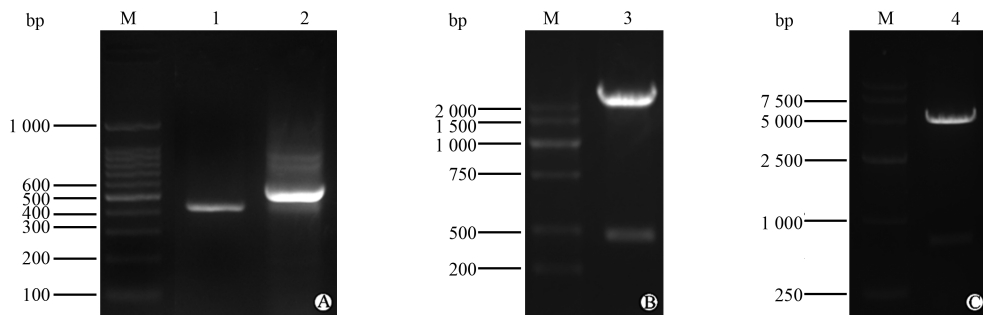


图 1 HBc-GIP 基因克隆(A)及表达载体的构建(B,C)

Fig 1 Clone(A) and construction of expression vector(B,C) for HBc-GIP

M: Marker; 1: PCR amplification of HBc cDNA fragments (encoding region 1-144 aa); 2: PCR amplification of HBc-GIP fusion gene (HBc cDNA plus GIP 1-12 aa coding region); 3: pVAX1-HBc-GIP digestion with *EcoR* I / *Xho* I; 4: pET28a(+)-HBc-GIP digestion with *Nde* I / *Xho* I

2.2 HBc-GIP 颗粒状蛋白原核表达与纯化 将转化了 pET28a(+)-HBc-GIP 的 BL21 大肠杆菌进行优化条件诱导蛋白表达, 随后将其蛋白经 15% 的 SDS-PAGE 电泳分析, 与转化空 pET28a(+) 载体的细菌诱导物对照, 发现在相对分子质量约 21 000 的位置有新蛋白表达, 与推测的分子量相符, 并略大于重组表达的 HBc 蛋白片段(1~144 氨基酸)的相对分子质量(图 2A)。表达量并未见随 IPTG 诱导剂、葡萄糖浓度以及诱导时间的变化而变化(结果未显示), 因此最终选定 0.1 mmol/L IPTG 诱导 4 h 作为表达条件。超声破碎菌体后发现所表达的蛋白均存在于包涵体中, 经 0~6 mol/L 尿素变性剂的梯度洗脱, 发现该包涵体溶于 6 mol/L 尿素。由于 pET28a(+) 载体表达蛋白自身携带 6×His 标签, 将包涵体在变性条件下通过 Ni-NTA 树脂亲和层析柱, 发现目的蛋白可以较容易地吸附于柱上。当洗脱液中的咪唑浓度达到 0.5~1 mol/L 时, 大部分的目的蛋白被洗脱下来。变复性后的蛋白纯度约为 90% 以上(图 2B), 可以作为抗原用于后面的免疫实验。变复性后的蛋白能被本室制备的抗 HBc 单抗所特异性识别, 说明抗原经纯化、复性后保持了原来的免疫原性(图 2C)。

2.3 HBc-GIP 颗粒状蛋白的颗粒组装活性验证 为了验证重组 HBc-GIP 蛋白能否有效组装入 VLP, 我们利用 VLP 可以被巨噬细胞吞噬的活性进

行了荧光显微镜检测。利用红色荧光标记的重组 HBc-GIP, 以及红色荧光标记的牛血清白蛋白(BSA)为对照蛋白, 结果(图 3)发现, 添加 Raw 264.7 细胞培养液上清中的 HBc-GIP 蛋白可以有效地被细胞吞噬, 400 倍镜下可见胞质内呈团块样分布的红色荧光颗粒。而对照蛋白没有被明显吞噬。说明原核重组表达的 HBc-GIP 可以自发组装为能被巨噬细胞吞噬的大型蛋白颗粒, 提示其具有形成 VLP 的能力。

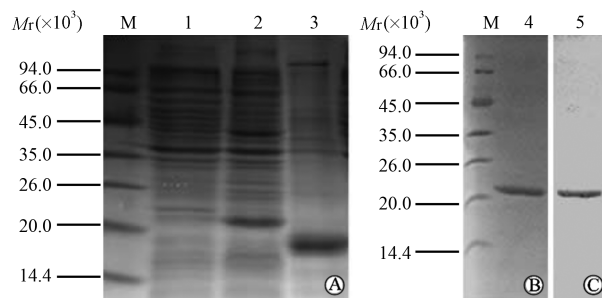


图 2 HBc-GIP 颗粒状蛋白原核表达与纯化结果

Fig 2 Expression and purification of HBc-GIP VLP

A: SDS-PAGE gel analysis. M: Protein marker; 1: pET28a(+) transformed *E. coli* lysate; 2: pET28a(+)-HBc-GIP transformed *E. coli* lysate; 3: pET28a(+)-HBc transformed *E. coli* lysate; all the *E. coli* had been induced by IPTG. B: Purified recombinant HBc-GIP protein. C: Western blotting analysis of purified recombinant HBc-GIP protein with anti-HBc monoclonal antibody. M: Protein marker; 4, 5: Recombinant HBc-GIP

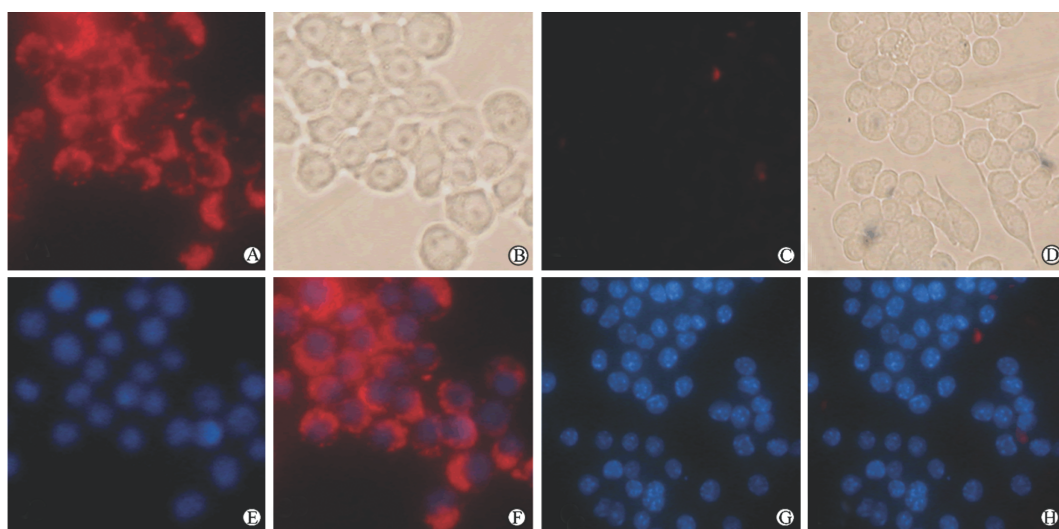


图 3 HBc-GIP 颗粒状蛋白被 Raw264.7 细胞吞噬

Fig 3 HBc-GIP VLP phagocytized by RAW264.7 cells

Fluorescent photos of cultured Raw 264.7 cells phagocytizing HiLyte Flour 555-labeled HBc-GIP protein, stained with DAPI dye (A-D). Flour 555-labeled BSA protein was used as a negative control (E-H). A, E: Obtained in red fluorescence channel; B, F: Non-fluorescence channel; C, G: UV fluorescence channel; D, H: Overlay photos. Original magnification: $\times 400$

2.4 pVAX1-HBc-GIP 核酸疫苗体外表达验证
 经过将纯化的 pVAX1-HBc-GIP 核酸疫苗转染 HEK293 细胞株后 48 h,分别采用 RT-PCR 在转录水平和采用 HBc 单抗进行 Western 印迹法在蛋白水平检测该核酸疫苗表达水平。结果发现,pVAX1-HBc-GIP 可以在转录水平高效表达,且转染 pVAX1 空质粒的 HEK-293 细胞株没有表达(图 4A);在蛋白水平,pVAX1-HBc-GIP 转染的细胞中可以检测到 HBc 单抗特异性条带,而 pVAX1 转染的细胞没有显色(图 4B)。从而证明该核酸疫苗构建成功并可以在体外培养的真核细胞内高效表达。

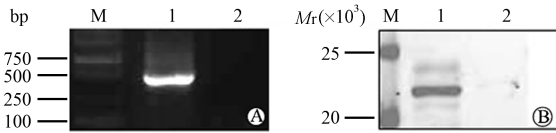


图 4 pVAX1-HBc-GIP 转染 HEK-293 细胞株后 48 h 表达情况

Fig 4 Expression of pVAX1-HBc-GIP

48 hours after transfection of HEK-293 cells

A: Agarose gel electrophoresis analysis. M;DNA marker; 1;RT-PCR assay of HBc-GIP expression in total RNA from pVAX1-HBc-GIP transfected 293 cells; 2;pVAX1 transfected 293 cells as a control. B: Western blotting analysis. M;Protein marker; 1;Western blotting analysis of HBc-GIP protein in pVAX1-HBc-GIP transfected 293 cells; 2;pVAX1 transfected 293 cells as a control

2.5 pVAX1-HBc-GIP 核酸疫苗和 HBc-GIP 重组 VLP 疫苗联合免疫后抗体水平检测 经过设计,我们采用 4 轮免疫,2 周间隔的策略进行体内免疫实验。通过 GIP 标准品包被平板用 ELISA 法检测 GIP 特异性抗体滴度,可见经过两种疫苗分别免疫或联合免疫大鼠,均可以产生 GIP 特异性抗体,而作为对照的 HBc 免疫组和 PBS 免疫组则没有 GIP 特异性抗体产生(图 5)。说明我们制备的 GIP 核酸疫苗及蛋白疫苗均能够打破宿主对自身 GIP 的免疫耐受产生抗体。

在免疫策略组合上,我们发现两次免疫 GIP 核酸疫苗后再两次免疫 HBc-GIP 蛋白疫苗的策略(pV-HBc-GIP×2+HBc-GIP×2)可以有效地诱导高滴度 GIP 抗体,其抗体滴度在第 3 轮免疫后开始显著提高,并在第 4 轮加强免疫后继续上升,最终持续产生高滴度的 GIP 特异性抗体,抗体最终滴度优于 4 轮免疫 HBc-GIP 蛋白疫苗或 GIP 核酸疫苗的

水平(P<0.05)。因此提示,2 次免疫 GIP 核酸疫苗后再 2 次免疫 HBc-GIP 疫苗的策略可能是较为经济而有效的免疫策略,可以在进一步研究中采用。4 轮免疫 HBc-GIP 颗粒状蛋白疫苗也可以达到较好的诱导抗体的效果,也是一种可选的免疫方式。

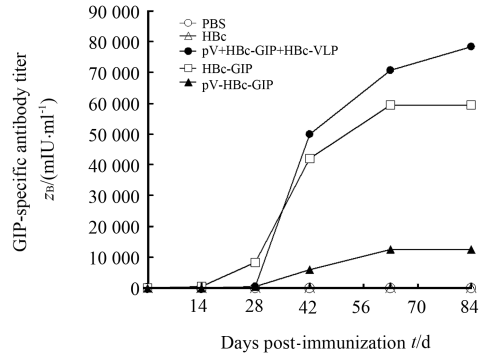


图 5 HBc-GIP 核酸疫苗和重组 VLP 疫苗联合免疫后抗体水平检测

Fig 5 GIP antibody levels after HBc-GIP protein and(or) DNA vaccination immunization

3 讨论

本研究尝试利用 HBc 作为载体,与大鼠 GIP 多肽融合后克隆入原核表达载体,通过原核表达与纯化,获得了一种新型 VLP 型 GIP 疫苗。同时,我们将该融合基因的 cDNA 序列克隆入真核表达载体,从而获得了一种 GIP 核酸疫苗。经过两种疫苗分别免疫或联合免疫大鼠,发现两次免疫 GIP 核酸疫苗后再两次免疫 HBc-GIP 疫苗可以有效地诱导高滴度 GIP 抗体,效果略优于 4 次免疫 HBc-GIP 蛋白疫苗,显著优于 4 次免疫 GIP 核酸疫苗。从而探索了一种 GIP 疫苗的组合策略,为 GIP 靶向免疫干预治疗肥胖等疾病的研究奠定了基础。

HBc 是一种可以自发组织为 VLP 的蛋白,在该蛋白的 N 端、C 端和中间(第 76 位氨基酸后方)均可插入抗原表位形成融合基因,并且在重组表达后不影响其组装活性^[11]。本次研究中,我们尝试利用 HBc 作为 GIP 多肽的载体,构建并原核表达了 GIP 多肽(第 1~12 位氨基酸)与 HBc 的融合基因,最终获得了较高纯度的 HBc-GIP 颗粒状蛋白疫苗,并具有很高的免疫活性,从而建立了一种经济有效的 GIP 疫苗制备手段。

核酸疫苗是一种更加经济简便的疫苗形式^[13],但是其单独应用下,抗原表达水平较低,诱导的抗体

滴度不高。近年来,很多报道中采用了核酸疫苗初次免疫联合其编码重组蛋白加强免疫的 Prime-Boost 免疫策略,有利于高水平免疫反应的产生^[14]。在我们的研究中,采用了核酸疫苗 2 次免疫联合重组蛋白 2 次免疫的策略,结果诱导了持续高滴度的抗体。核酸疫苗及 Prime-Boost 联合免疫增强免疫反应的机制尚无定论,我们设想,核酸疫苗可能通过直接转染抗原递呈细胞并在胞内递呈抗原,从而有利于 GIP 抗原特异性抗原递呈细胞的生成,另外 HBc-VLP 蛋白在肌肉细胞内表达后,可能仍然具有一定的自组装活性,从而有利于抗原递呈过程,因此, pVAX1-HBc-GIP 核酸疫苗较单纯表达 GIP 多肽的 pVAX1-GIP 疫苗可能是一种更好的初次免疫原,有利于 HBc-GIP 蛋白免疫后高滴度抗体的生成。这一策略为后期 GIP 疫苗的应用研究提供了很好的基础。

[参考文献]

- [1] Renehan A G, Tyson M, Egger M, Heller R F, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies[J]. *Lancet*, 2008, 371: 569-578.
- [2] Miyawaki K, Yamada Y, Ban N, Ihara Y, Tsukiyama K, Zhou H, et al. Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity[J]. *Nat Med*, 2002, 8: 738-742.
- [3] Weaver R E, Donnelly D, Wabitsch M, Grant P J, Balmforth A J. Functional expression of glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptors is coupled to differentiation in a human adipocyte model[J]. *Int J Obes (Lond)*, 2008, 32: 1705-1711.
- [4] Getty-Kaushik L, Song D H, Boylan M O, Corkey B E, Wolfe M M. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide modulates adipocyte lipolysis and reesterification [J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2006, 14: 1124-1131.
- [5] Kim S J, Nian C, McIntosh C H. Resistin is a key mediator of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) stimulation of lipoprotein lipase (LPL) activity in adipocytes[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 34139-34147.
- [6] Naitoh R, Miyawaki K, Harada N, Mizunoya W, Toyoda K, Fushiki T, et al. Inhibition of GIP signaling modulates adiponectin levels under high-fat diet in mice[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 376: 21-25.
- [7] McClean P L, Irwin N, Cassidy R S, Holst J J, Gault V A, Flatt P R. GIP receptor antagonism reverses obesity, insulin resistance, and associated metabolic disturbances induced in mice by prolonged consumption of high-fat diet[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 293: E1746-E1755.
- [8] Althage M C, Ford E L, Wang S, Tso P, Polonsky K S, Wice B M. Targeted ablation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide-producing cells in transgenic mice reduces obesity and insulin resistance induced by a high fat diet[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283: 18365-18376.
- [9] Fulurija A, Lutz T A, Sladko K, Osto M, Wielinga P Y, Bachmann M F, et al. Vaccination against GIP for the treatment of obesity[J]. *PLoS One*, 2008, 3: e3163.
- [10] Irwin N, McClean P L, Patterson S, Hunter K, Flatt P R. Active immunisation against gastric inhibitory polypeptide (GIP) improves blood glucose control in an animal model of obesity-diabetes[J]. *Biol Chem*, 2009, 390: 75-80.
- [11] Storni T, Lechner F, Erdmann I, Bächli T, Jegerlehner A, Dumrese T, et al. Critical role for activation of antigen-presenting cells in priming of cytotoxic T cell responses after vaccination with virus-like particles[J]. *J Immunol*, 2002, 168: 2880-2886.
- [12] Mihailova M, Boos M, Petrovskis I, Ose V, Skrastina D, Fiedler M, et al. Recombinant virus-like particles as a carrier of B- and T-cell epitopes of hepatitis C virus (HCV)[J]. *Vaccine*, 2006, 24: 4369-4377.
- [13] Donnelly J J, Ulmer J B, Shiver J W, Liu M A. DNA vaccines [J]. *Annu Rev Immunol*, 1997, 15: 617-648.
- [14] Schwarz K, Meijerink E, Speiser D E, Tissot A C, Cielens I, Renhof R, et al. Efficient homologous prime-boost strategies for T cell vaccination based on virus-like particles[J]. *Eur J Immunol*, 2005, 35: 816-821.

[本文编辑] 孙 岩

欢迎订阅

《第二军医大学学报》

ISSN 0258-879X
CN 31-1001/R

JOURNAL OF MEDICAL COLLEGES OF PLA

ISSN 1000-1948
CN 31-1002/R

上海市翔殷路 800 号(邮编:200433) 邮发代号:4-373

上海市翔殷路 800 号(邮编:200433) 邮发代号:4-725