

【结果】 与健康组相比,治疗组 mDC 中 A20 表达显著下降,另两组则无统计学差异。与健康组相比,单用 poly-IC 处理时,未治疗组 A20 水平下降不明显;而单用 IFN- α 或 poly-IC+IFN- α 处理则无上述差异。IFN- α 刺激后各组 mDC 中 A20、IL-12 表达较未处理前下调,HLA-DR、CD86、CCR7 则上调;A20 表达水平与 HLA-DR、CD86、CCR7 及 IL-12 呈负相关,与 IL-10 正相关。

【结论】 HCV 感染后 mDC 失能,其 A20 持续处在正常水平,阻碍免疫反应活化致使感染慢性化;该过程可能与 HLA-DR、免疫共刺激分子 CD86、CCR7 及免疫活化因子 IL-12 表达下调,免疫抑制因子 IL-10 上调有关。相反,IFN- α 可以改善 mDC 功能并下调 A20 表达,增强机体免疫功能、促进 HCV 清除。因此,A20 沉默法可能成为丙肝治疗新策略。

关键词: 泛素剪辑蛋白 A20;丙型肝炎病毒;髓样树突状细胞;干扰素- α

A-S3-4

汉坦病毒胞膜糖蛋白与人溶酶体相关膜蛋白嵌合基因疫苗研制

姜东伯¹,张格飞²,闫阔成³;指导教师:杨琨

1. 第四军医大学 2010 级临床医学五年制

2. 第四军医大学 2011 级临床医学五年制

3. 第四军医大学 2012 级临床医学五年制

【目的】 我国是汉坦病毒所致肾综合征出血热发病情况最为严重的国家,作为传统预防措施的灭活疫苗在预防出血热发生中发挥了巨大的作用,然而仍存在免疫原性低,生产运输保存不便,免疫后机体不能获得长效免疫记忆能力等缺陷。为克服传统灭活疫苗的诸多不足,近年研究多集中在核酸疫苗的探索上。常规 DNA 疫苗表达的蛋白属内源性抗原,抗原提呈细胞(APC)启动 MHCI 类抗原加工途径,向 CD8⁺ T 细胞提呈 MHCI/抗原肽复合物,而 CD4⁺ T 细胞不能被有效活化。溶酶体是外源性抗原加工途径 MHC II 类分子器室(M II C)的重要组成部分。我们课题组利用溶酶体相关膜蛋白(LAMP)胞浆尾的靶向作用(可与内吞体/溶酶体膜结合并翻转其中),将汉坦病毒胞膜糖蛋白(Gn)基因插入 LAMP 分子 luminal domain 和 transmembrane/cytoplasmic tail 之间,使 Gn 直接进入 M II C,从而实现内源性抗原的 MHC I 类加工途径向 MHC II 类加工途径的转化。由此,不仅可同时激活细胞免疫应答和体液免疫应答,还可获得较好的长效免疫记忆能力,保护机体免受汉坦病毒的感染和疾病的发生。

【方法】 构建质粒 pVAX-Gn、pVAX-LAMP、pVAX-LAMP/Gn,转染 293T 细胞鉴定目的蛋白表达;高纯度去内毒素质粒免疫 BALB/c 小鼠,设立灭活疫苗对照组;通过间接 ELISA 和中和试验评价体液免疫应答;采用酶联免疫斑点试验(ELISpot)与细胞杀伤试验共同评价特异性细胞免疫应答;夹心 ELISA 和实时定量 PCR(qRT-PCR)检测攻毒后体内各组织病毒载量评价保护效力。

【结果】 成功构建载体并有效表达目的蛋白;实验组小鼠血清特异性抗体和中和抗体效价都明显高于各对照组,脾淋巴细胞特异性分泌 IFN- γ 和 CTL 杀伤活性亦均高于其他各组,体外结果表明:即使与传统灭活疫苗相比,特异性细胞与体液免疫应答均显著增强;体内攻毒试验显示,实验组小鼠体内无汉坦病毒特异性抗原检出,表明接种该疫苗可保护个体免受病毒感染;增强免疫观察到表位扩展,且仅在 LAMP 重组疫苗免疫小鼠组检测到长效记忆性免疫应答。

【结论】 汉坦病毒胞膜糖蛋白与人溶酶体相关膜蛋白嵌合基因疫苗能够获得良好的特异性免疫应答,同时具有很好的对抗病毒感染的保护效力和长效免疫记忆,这些都提示该新型汉坦病毒基因疫苗未来在临床上的应用前景。

关键词: 汉坦病毒;病毒糖蛋白;基因疫苗;溶酶体相关膜蛋白;靶向提呈