

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00145

## 含 CpG 免疫刺激序列的质粒增强 HBsAg 诱导的免疫应答

解冰<sup>1△</sup>, 唐紫薇<sup>1△</sup>, 劳文光<sup>1</sup>, 李建军<sup>2</sup>, 王岩<sup>1</sup>, 朱诗应<sup>1</sup>, 陶清源<sup>1</sup>, 戚中田<sup>1</sup>, 赵平<sup>1</sup>, 陈志辉<sup>3\*</sup>

1. 第二军医大学基础部微生物学教研室, 上海 200433
2. 中国人民解放军总政治部机关门诊部, 北京 100120
3. 第二军医大学长海医院感染科, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 探讨以含有多拷贝 CpG 寡脱氧核苷酸 (CpG ODN) 的质粒作为治疗性乙肝疫苗佐剂的可行性。**方法** 构建含有 6 个拷贝 D 型 CpG ODN 的质粒 pKO-CG6, 将该质粒以及载体 pKO 分别刺激健康人及 HBV 感染者的外周血单核细胞 (PBMC), 检测 PBMC 的增殖及分泌的细胞因子 IFN- $\gamma$ 、IL-12, 进一步将重组 HBsAg 分别联合这两种质粒免疫小鼠, 检测小鼠的细胞和体液免疫应答。**结果** 质粒 pKO-CG6 与载体 pKO 在体外均能有效激活健康人及 HBV 感染者 PBMC 增殖反应, 并促进 IFN- $\gamma$ 、IL-12 的产生, 其中 pKO-CG6 的免疫刺激活性强于载体 pKO。小鼠体内试验表明, 虽然载体 pKO 也具有免疫佐剂作用, 但 pKO-CG6 更能显著增强 HBsAg 诱导的免疫应答, 尤其是细胞免疫应答。**结论** 含有多拷贝 D 型 CpG ODN 的质粒能有效激活 HBV 感染者的 PBMC, 并增强 HBsAg 在小鼠体内的免疫原性。

**[关键词]** 乙型肝炎病毒; CpG 寡脱氧核苷酸; 质粒; 免疫佐剂

**[中图分类号]** R 373.21 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)02-0145-05

### Multi-copy CpG ODN-containing plasmid enhancing immune responses to HBsAg

XIE Bing<sup>1△</sup>, TANG Zi-wei<sup>1△</sup>, LAO Wen-guang<sup>1</sup>, LI Jian-jun<sup>2</sup>, WANG Yan<sup>1</sup>, ZHU Shi-ying<sup>1</sup>, TAO Qing-yuan<sup>1</sup>, QI Zhong-tian<sup>1</sup>, ZHAO Ping<sup>1</sup>, CHEN Zhi-hui<sup>3\*</sup>

1. Department of Microbiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Officer's Clinic of General Political Department of PLA, Beijing 100120, China
3. Department of Infectious Diseases, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the possibility of using plasmid containing multi-copy of CpG ODN as the adjuvant for therapeutic vaccine against hepatitis B. **Methods** A plasmid pKO-CG6 containing six copies of D type CpG ODN was constructed. The plasmid and the carrier plasmid pKO were used to stimulate peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy or HBV infected subjects; then the proliferation of PBMCs and secretion of IFN- $\gamma$  and IL-12 were examined. Recombinant HBsAg combined with either of the plasmid was used to immunize BALB/c mice, and immune responses to HBsAg were assayed. **Results** Both plasmid pKO-CG6 and carrier plasmid pKO not only effectively activated the proliferation response of PBMCs from healthy controls and HBV infected subjects *in vitro*, but also promoted the production of IFN- $\gamma$  and IL-12; the immuno-stimulation activity of pKO-CG6 was greatly stronger than that of the carrier plasmid pKO. *In vivo* study showed that although vector pKO could also act as immunological adjuvant for HBsAg in mice, plasmid pKO-CG6 elicited much stronger immune responses to HBsAg, especially the cell-mediated response. **Conclusion** Plasmid containing multi-copy of CpG ODN can effectively activate PBMCs of HBV infected subjects and enhance the immune responses to HBsAg in mice.

**[Key words]** hepatitis B virus; CpG oligodeoxynucleotides; plasmids; immunologic adjuvants

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(2):145-149]

**[收稿日期]** 2011-11-04 **[接受日期]** 2012-02-05

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30500452, 30771929), 上海市重点建设学科基金(B901). Supported by National Natural Science Foundation of China(30500452, 30771929) and Fund for Building Key Subjects of Shanghai(B901).

**[作者简介]** 解冰, 第二军医大学临床医学专业八年制 2004 级学员. E-mail: dadania\_jl@yahoo.com.cn; 唐紫薇, 硕士生. E-mail: tangziwei1989@gmail.com

△共同第一作者 (Co-first authors).

\* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81873509, E-mail: hchzhi@126.com

来源于细菌基因组 DNA 的含非甲基化的胞嘧啶和鸟嘌呤核苷酸 (CpG) 基序的寡脱氧核苷酸 (ODN) 能激活脊椎动物的免疫细胞, 在病毒感染、肿瘤及过敏性疾病的治疗中具有广阔的应用前景, 数种作为疫苗佐剂或单一治疗制剂的 CpG ODN 已进入临床试验<sup>[1-3]</sup>。根据 CpG ODN 中 CpG 两侧的序列特点, 可将 CpG ODN 分为 K 型和 D 型, 前者作用于 B 淋巴细胞, 后者作用于单核/巨噬细胞, 引起不同类型的免疫效应<sup>[4-5]</sup>。本研究构建了一种含有多拷贝 D 型 CpG ODN 的质粒, 观察其对健康人及 HBV 携带者外周血单核细胞 (PBMC) 生物学功能的影响, 并联合 HBV 表面抗原免疫小鼠, 观察其对免疫应答的增强作用, 探讨其作为治疗性乙肝疫苗免疫佐剂的可能性。

## 1 材料和方法

### 1.1 CpG ODN 载体质粒 pKO 的构建

以真核表达质粒载体 pVAX1 (Invitrogen 公司产品) 为模板, PCR 扩增编码卡那霉素抗性基因 (Kan<sup>R</sup>) 和 pUC 质粒复制起始点 (pUC ori) 的 DNA 片段, 上游引物: 5'-GAA TTC AAG CTT AGA GAC AGG ATG AGG ATC-3', 下游引物: 5'-GAA TTC GGA TCC GTC AAC GCG TAT ATC TGG-3', PCR 产物以内切酶 *EcoR* I 酶切, 再进行自身环化连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 得到的重组质粒 pKO 包含 Kan<sup>R</sup> 和 pUC ori, 以及 3 个可用于插入外源基因片段的单一酶切位点 *Hind* III、*EcoR* I 和 *Bam* H I。

### 1.2 D 型 CpG ODN 质粒 pKO-CG6 的构建

合成含有 3 个 D 型 CpG 基序的两条互补 ODN 链<sup>[6]</sup>, 5' 与 3' 末端分别加入 *Hind* III、*EcoR* I 酶切位点 (正链中的下划线为 CpG 基序)。ODN1: 5'-AGC TTG GTG CAT CGA TGC AGC ATC GAG GCA GGT GCA TCG ATA CAG GGG GG-3'; ODN2: 5'-AAT TCC CCC CTG TAT CGA TGC ACC TGC CTC GAT GCT GCA TCG ATG CAC CA-3'。将等量 (1 nmol) 的 ODN1、ODN2 分别用 PNK (TaKaRa) 进行磷酸化, 然后于 95°C 变性 5 min, 再冷却至室温, 产物与经过 *Hind* III/*EcoR* I 酶切的质粒载体 pKO 连接, 得到含有 3 个 CpG 基序的质粒 pKO-CG3。以相似的方法制备末端含 *EcoR* I 和 *Bam* H I 酶切位点的 CpG 双链 DNA 片段, 插入 pKO-CG3 的 *EcoR* I/*Bam* H I 酶切位点, 即得到含有 6 个 CpG 基序的质粒 pKO-CG6。利用载体 Kan<sup>R</sup> 中的 *Sph* I 单一酶切位点进行酶切鉴定。然后进行测序鉴定。用高纯度

质粒制备系统 (Invitrogen 公司) 抽提和纯化质粒 pKO 以及 pKO-CG6, 溶解于生理盐水, 浓度 2 mg/ml, 内毒素检测低于 2 EU/ml。

### 1.3 健康人及 HBV 携带者 PBMC 的分离

健康成年男性 5 名, 年龄 25~35 岁, HBV、HCV 抗体均阴性; HBV 感染者 5 名, 男性, 年龄 28~34 岁, ALT 正常, HCV 抗体阴性, 发现 HBV 感染史 3~5 年, 血清经荧光定量 PCR 检测为 HBV DNA 阳性, 未进行抗病毒治疗。受试者均签署知情同意书。无菌条件下采静脉血, 以标准梯度离心方法分离 PBMC, 以 RPMI 1640 培养液洗细胞 1 次, 再悬浮于含 10% 热灭活的自体血清、1 mmol/L 丙酮酸钠、0.5 mmol/L 2-巯基乙醇的 RPMI 1640 培养液, 调整细胞密度至  $2 \times 10^6$ /ml。

### 1.4 PBMC 增殖反应

将新分离的 PBMC 接种于 96 孔板, 每孔 100  $\mu$ l, 同时加质粒 pKO 或 pKO-CG6, 浓度分别为 5、20、50、100  $\mu$ g/ml, 对照孔加生理盐水 5  $\mu$ l, 每样品设 3 平行孔。将 96 孔板置于 37°C、5% CO<sub>2</sub>, 饱和湿度的细胞培养箱中, 72 h 后每孔加入 MTS 溶液 (Promega 公司) 20  $\mu$ l, 继续置于细胞培养箱中 2~4 h, 然后于酶标仪上测波长 492 nm 的光密度 (D) 值, 参考波长 630 nm。以加生理盐水孔为对照, 计算质粒孔 PBMC 的刺激指数 (stimulation index, SI), SI = 质粒孔  $D_{492}$  / 生理盐水孔  $D_{492}$ 。

### 1.5 ELISA 法检测 PBMC 分泌的细胞因子

人 PBMC 培养方法同上, 以 ELISA 法检测质粒浓度为 50  $\mu$ g/ml 孔培养上清中的 IFN- $\gamma$  及 IL-12 p40 (BD PharMingen 公司产品)。

### 1.6 小鼠免疫

24 只 BALB/c 小鼠, 雌性, 8 周龄, 分为 4 组, 每组 6 只, 其中 3 组小鼠分别皮下注射 1  $\mu$ g 酵母重组 HBsAg (深圳康泰生物制品有限公司), 1  $\mu$ g HBsAg + 10  $\mu$ g pKO, 1  $\mu$ g HBsAg + 10  $\mu$ g pKO-CG6, 第 4 组小鼠皮下注射 1  $\mu$ g 无关蛋白 BSA 作为对照。

### 1.7 小鼠抗-HBs 抗体检测

免疫 3 周后用玻璃采血管从小鼠眼眶取血, 4°C 静置过夜, 然后高速离心, 吸取血清, 用 ELISA 法检测抗-HBs 总 IgG 以及抗-HBs IgG2a 和 IgG1, 计算 IgG2a/IgG1<sup>[7]</sup>。

### 1.8 小鼠脾细胞增殖反应与细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 活性检测

取血清后处死小鼠, 无菌分离脾脏, 制备单个脾细胞悬液, 接种 96 孔板, 每孔加 HBsAg 至浓度为 10  $\mu$ g/ml, 同时设不加抗原的阴性对照孔, 于 37°C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的细胞培养箱中

72 h, 检测小鼠 T 细胞增殖反应, 结果以 SI 表示。以稳定表达 HBsAg-EGFP 融合蛋白的 SP2/0 细胞为刺激细胞和靶细胞, 以免疫小鼠的脾细胞为效应细胞, 效应细胞/靶细胞数目之比为 20 : 1 和 100 : 1, 以乳酸脱氢酶释放法检测小鼠的 CTL 应答, 结果以杀伤率(%)表示, 操作按照 Promega 公司非放射性细胞毒性检测试剂盒使用说明进行<sup>[7]</sup>。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件, 组间比较采用 *t* 检验, 检验水准( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 CpG ODN 编码质粒 pKO-CG6 的鉴定 pKO-CG6 质粒全长 1 943 bp, 含卡那霉素抗性基因、pUC 质粒复制起始点以及 CpG ODN 共 3 个功能单位; CpG ODN 中含 6 个 CpG 基序, 其序列为 5'-AAG

CTT GGT GCA TCG ATG CAG CAT CGA GGC AGG TGC ATC GAT ACA GGG GGG AAT TCA GGT GCA TCG ATG CAG CAT CGA GGC AGG TGC ATC GAT ACA GGG GGG ATC C-3', 下划线为免疫刺激的 CpG 基序。

2.2 质粒 pKO-CG6 能激活健康人或 HBV 感染者的 PBMC 质粒 pKO-CG6 能增强健康人或 HBV 感染者 PBMC 的增殖反应, 呈现量-效关系, 对健康人 PBMC 的作用强于对 HBV 感染者 PBMC 的作用, 然而当较低(5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )或较高浓度(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )质粒刺激时, 对健康人或 HBV 感染者 PBMC 的作用差异无统计学意义。空载体对人 PBMC 的增殖也有促进作用, 但效果不及 pKO-CG6, 且对健康人与 HBV 感染者 PBMC 的增殖反应增强作用相似。具体见表 1。

表 1 免疫刺激质粒增强人 PBMC 的增殖反应

Tab 1 Enhancement of proliferation response of human PBMCs by immuno-stimulatory plasmids

$n=5, \bar{x} \pm s$

Plasmid concentration $\rho_B/(\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$	pKO		pKO-CG6	
	Healthy individuals	HBV carriers	Healthy individuals	HBV carriers
5	1.13 $\pm$ 0.05	1.12 $\pm$ 0.04	1.42 $\pm$ 0.03**	1.36 $\pm$ 0.06**
20	1.22 $\pm$ 0.06	1.20 $\pm$ 0.04	1.72 $\pm$ 0.06**	1.58 $\pm$ 0.07** $\Delta$
50	1.31 $\pm$ 0.08	1.28 $\pm$ 0.05	1.95 $\pm$ 0.06**	1.83 $\pm$ 0.09** $\Delta$
100	1.38 $\pm$ 0.05	1.34 $\pm$ 0.05	2.11 $\pm$ 0.15**	1.94 $\pm$ 0.06**

\*\*  $P < 0.01$  vs pKO/healthy individuals or pKO/HBV carriers;  $\Delta P < 0.05$  vs pKO-CG6/healthy individuals

2.3 PBMC 分泌的细胞因子检测 结果(表 2)表明: 当浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  时, 质粒 pKO 或 pKO-CG6 均能增强健康人或 HBV 感染者 PBMC 表达和分泌 IFN- $\gamma$ 、IL-12, pKO-CG6 的作用强于前者 ( $P <$

0.01)。HBV 感染者 PBMC 上清中的 IFN- $\gamma$ 、IL-12 浓度低于健康人 PBMC 培养上清 ( $P < 0.05$ ), 但 pKO-CG6 刺激时, 二者的细胞因子浓度差异无统计学意义。

表 2 免疫刺激质粒促进 IFN- $\gamma$ 、IL-12 的产生

Tab 2 Enhancement of IFN- $\gamma$  and IL-12 production by immuno-stimulatory plasmids

$n=5, \bar{x} \pm s, \rho_B/(\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1})$

Group	IFN- $\gamma$		IL-12 p40	
	Healthy individuals	HBV carriers	Healthy individuals	HBV carriers
NS	15.3 $\pm$ 1.9	13.4 $\pm$ 1.4*	26.8 $\pm$ 2.8	20.5 $\pm$ 2*
pKO	28.3 $\pm$ 2.9 $\Delta\Delta$	22.8 $\pm$ 3.1* $\Delta\Delta$	48 $\pm$ 4 $\Delta\Delta$	40.8 $\pm$ 3.8* $\Delta\Delta$
pKO-CG6	88.8 $\pm$ 10.7 $\blacktriangle\blacktriangle$	69.5 $\pm$ 6 $\blacktriangle\blacktriangle$	141.8 $\pm$ 7.3 $\blacktriangle\blacktriangle$	117.3 $\pm$ 5.8 $\blacktriangle\blacktriangle$

\*  $P < 0.05$  vs healthy individuals;  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs NS group;  $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$  vs pKO group

2.4 小鼠抗-HBs 抗体检测 免疫 3 周后, 3 个实验组小鼠抗-HBs IgG 均为阳性, 质粒 pKO 或 pKO-CG6 均能提高抗体水平, 并提高 IgG2a/IgG1 比值。pKO-CG6 对抗体水平及 IgG2a/IgG1 的影响高于载体 pKO ( $P < 0.01$ , 表 3)。

2.5 小鼠脾细胞增殖反应与 CTL 活性 体外以重组 HBsAg 刺激免疫小鼠脾细胞, 联合质粒 pKO 免疫组的脾细胞增殖反应强于单一 HBsAg 免疫组 (1.39 $\pm$ 0.01 vs 1.27 $\pm$ 0.04,  $P < 0.05$ ), 而联合 pKO-CG6 免疫则比 pKO 能诱导更强的增殖应答

( $1.67 \pm 0.06, P < 0.01$ )。用 LDH 释放法检测 CTL 应答,联合质粒免疫小鼠的脾细胞产生更强的 CTL 活性,其中质粒 pKO-CG6 对 CTL 应答的增强作用大于载体质粒 pKO( $P < 0.05$ ,表 4)。

**表 3 小鼠抗-HBs 抗体应答**  
**Tab 3 Anti-HBs antibody response of immunized mice (1 : 400 dilution)**

*n* = 6,  $\bar{x} \pm s$

Group	Anti-HBs IgG	Anti-HBs IgG2a/IgG1
Control	0.02 ± 0.00	—
HBsAg	0.19 ± 0.02	0.14 ± 0.02
HBsAg+pKO	0.36 ± 0.03**	0.26 ± 0.03**
HBsAg+pKO-CG6	1.10 ± 0.14△△	0.60 ± 0.11△△

\*\*  $P < 0.01$  vs HBsAg group; △△  $P < 0.01$  vs HBsAg + pKO group

**表 4 小鼠的细胞毒性 T 细胞反应**  
**Tab 4 HBsAg specific CTL response of immunized mice (lysis percentage)**

*n* = 6,  $\bar{x} \pm s, \%$

E : T ratio	HBsAg	HBsAg+pKO	HBsAg+pKO-CG6
20 : 1	16.83 ± 1.67	22.89 ± 1.26	38.63 ± 2.91*△
100 : 1	30.67 ± 1.78	38.33 ± 2.44*	75 ± 4.67**△△

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs HBsAg group; △  $P < 0.05$  vs HBsAg+pKO group

### 3 讨 论

细菌 DNA 中的 CpG ODN 通过 TLR-9(Toll-like receptor 9)激活免疫细胞内多种信号转导通路,快速引起一系列免疫效应分子的表达,从而激发机体的免疫防御反应<sup>[8-9]</sup>。CpG ODN 在 DNA 疫苗诱导免疫应答的过程中起着极其重要的免疫佐剂作用,CpG ODN 也能显著提高蛋白类抗原的免疫原性<sup>[8,10]</sup>。目前,人工合成的 CpG ODN 用于乙肝疫苗佐剂已进入临床试验阶段,并取得了良好的效果。本研究构建了一种含有多拷贝 CpG ODN 的质粒,探讨其作为乙肝疫苗佐剂,尤其是治疗性疫苗佐剂的可行性。用质粒代替人工合成的 CpG ODN 作为佐剂,可避免 DNA 合成以及磷酸化修饰的繁琐制备过程,从而大大降低成本。近几年来,已有多个公司相继推出了人用标准的大规模高效质粒层析纯化技术,使得以质粒作为佐剂在技术上更方便可行。此外,CpG ODN 的拷贝数在一定范围内与其生物学活性正相关,因而可通过优化拷贝数使之具备最佳的免疫刺激活性。D 型 CpG ODN 主要靶细胞为

单核-树突状细胞(DC),比 K 型更有利于诱导细胞免疫应答,在 DNA 疫苗载体中插入 D 型 ODN 无论是诱导体液还是细胞免疫应答都优于插入 K 型 ODN<sup>[6]</sup>,故构建了一种含有 6 个拷贝 D 型 CpG ODN 的质粒 pKO-CG6。该质粒结构简单,全长 1 943 个碱基对,仅包含质粒复制起始点、筛选标志(卡那抗性基因)以及 CpG ODN 等 3 个基本元件。

质粒 pKO-CG6 以及载体 pKO 在体外均能刺激健康人及 HBV 感染者的 PBMC 增殖反应以及分泌细胞因子 IFN- $\gamma$ 、IL-12。总体而言,健康人 PBMC 对质粒的刺激更为敏感,但在一些条件下,健康人与 HBV 感染者 PBMC 的反应并无显著差异。载体 pKO 中也存在随机分布的 CpG 序列,因而具有一定的免疫刺激作用,但对于所有的检测指标,质粒 pKO-CG6 的免疫刺激作用均强于载体 pKO,表明在该载体中插入的 6 个拷贝 CpG 序列明显增强了免疫刺激作用。由于 D 型 CpG ODN 的细胞选择性,增强的应答主要由单核巨噬细胞及 DC 所引发。从实验结果可见,质粒能有效激活 HBV 感染者 PBMC,提示质粒在 HBV 感染者体内也许能起类似作用。

虽然经过序列优化的对小鼠有效的 CpG ODN 对于人类免疫细胞的免疫刺激效果并不理想,但对人类有效的 CpG ODN 在小鼠仍具有免疫刺激活性<sup>[11-12]</sup>。因此,可以用小鼠为模型初步评价质粒的体内作用。D 型 ODN 的主要作用在于刺激单核细胞分化为 DC,而 DC 为功能最强的 APC,APC 分泌的 IFN- $\alpha$  还能刺激 NK 细胞分泌 IFN- $\gamma$ ,IFN- $\gamma$  对于 CTL 的激活及杀伤活性有重要作用。因而,D 型 ODN 对于诱导细胞免疫应答具有重要促进作用,同样,也能增强 T 细胞依赖的抗体应答。本研究中,将酵母重组 HBsAg 联合质粒免疫小鼠,以观察质粒对 HBsAg 所诱导免疫应答的影响。HBsAg 主要以由百余单体分子组成的纳米颗粒形式存在,本身具有强免疫原性,故仅对小鼠进行了 1 次免疫。结果表明,载体 pKO 与 pKO-CG6 均能明显提高抗体水平并使抗体类型向 Th1 型偏移,其中 pKO-CG6 的作用显著强于 pKO。总抗 HBsAg 抗体水平升高与 IgG2a/IgG1 比例的升高相平行,Th1 类抗体水平的升高程度显著高于 Th2 类抗体,提示抗体水平的升高主要依赖于 T 细胞应答的增强。两种质粒对小鼠脾细胞增殖反应及 CTL 杀伤活性也具有显著影响,但 pKO-CG6 的影响程度显然大于载体

pKO。尤其是 CTL 活性,当效应细胞/靶细胞比为 20 : 1 时,载体 pKO 对 CTL 的影响并不明显。从抗体以及细胞免疫的检测结果不难看出,6 个拷贝的 CpG ODN 对免疫应答的影响主要在于增强 T 细胞免疫应答,进而通过 T 细胞免疫应答促进体液免疫应答。

细胞免疫应答在机体清除病毒的过程中起关键作用,对于自发恢复的 HBV 感染者的研究表明,抗 HBV 细胞免疫应答的增强是病毒清除和病毒复制抑制的前提,细胞免疫应答还在相当程度上影响抗病毒药物的疗效<sup>[13]</sup>。DNA 疫苗在 HBV 转基因小鼠可有效激活 HBV 特异性 CTL,并能逆转免疫耐受,但在大动物(如黑猩猩)诱导的抗 HBV 免疫应答并不理想,其原因与 DNA 疫苗在大动物体内的转染效率低从而导致抗原的低水平表达有重要关系,而用重组表达的 HBsAg 联合 DNA 免疫佐剂则能克服这一问题。对 HBsAg 而言,以内源性抗原形式进行抗原提呈并不是诱导 CTL 所必需的,如前所述,因以纳米颗粒形式存在,外源性 HBsAg 免疫可通过交叉提呈方式激活 CTL 应答<sup>[14-15]</sup>。因此,提高现有基于重组 HBsAg 的乙肝疫苗诱导的细胞免疫应答,是治疗性乙肝疫苗的重要发展方向。本研究构建的含有多拷贝 D 型 ODN 的质粒能有效激活健康人及 HBV 感染者 PBMC,在小鼠体内能显著增强重组 HBsAg 诱导的免疫应答,提示这种方法对于治疗性乙肝疫苗具有潜在的应用前景,值得进一步研究。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Gupta S, Sane S A, Shakya N, Vishwakarma P, Haq W. CpG oligodeoxynucleotide 2006 and miltefosine, a potential combination for treatment of experimental visceral leishmaniasis[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55: 3461-3464.
- [2] Verthelyi D, Kenney R T, Seder R A, Gam A A, Friedag B, Klinman D M. CpG oligodeoxynucleotides as vaccine adjuvants in primates[J]. *J Immunol*, 2002, 168: 1659-1663.
- [3] Chaput N, Schartz N E, André F, Taieb J, Novault S, Bonnaventure P, et al. Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. II. Exosomes in CpG adjuvants efficiently prime naive Tc1 lymphocytes leading to tumor rejection[J]. *J Immunol*, 2004, 172: 2137-2146.
- [4] Liu Y, Luo X, Yang C, Yu S K, Xu H L. Three CpG oligodeoxynucleotide classes differentially enhance antigen-specific humoral and cellular immune responses in mice[J]. *Vaccine*, 2011, 29: 5778-5784.
- [5] Krug A, Rothenfusser S, Selinger S, Bock C, Kerkmann M, Böttcher J, et al. CpG-A oligonucleotides induce a monocyte-derived dendritic cell-like phenotype that preferentially activates CD8 T cells[J]. *J Immunol*, 2003, 170: 3468-3477.
- [6] Coban C, Ishii K J, Gursel M, Klinman D M, Kumar N. Effect of plasmid backbone modification by different human CpG motifs on the immunogenicity of DNA vaccine vectors[J]. *J Leukoc Biol*, 2005, 78: 647-655.
- [7] 赵平,姜春鹏,赵兰娟,温新宇,戚中田. HBV 包膜-核心蛋白融合基因 DNA 疫苗诱导小鼠持久的细胞免疫应答[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2002, 29: 576-582.
- [8] Bode C, Zhao G, Steinhagen F, Kinjo T, Klinman D M. CpG DNA as a vaccine adjuvant[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2011, 10: 499-511.
- [9] Tsujimoto H, Ono S, Matsumoto A, Kawabata T, Kinoshita M, Majima T, et al. A critical role of CpG motifs in a murine peritonitis model by their binding to highly expressed toll-like receptor-9 on liver NKT cells[J]. *J Hepatol*, 2006, 45: 836-843.
- [10] Malanchere-Bres E, Payette P J, Mancini M, Tiollais P, Davis H L, Michel M L. CpG oligodeoxynucleotides with hepatitis B surface antigen (HBsAg) for vaccination in HBsAg-transgenic mice[J]. *J Virol*, 2001, 75: 6482-6491.
- [11] Ishii K J, Gursel I, Gursel M, Klinman D M. Immunotherapeutic utility of stimulatory and suppressive oligodeoxynucleotides[J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2004, 6: 166-174.
- [12] Partidos C D, Hoebeke J, Wieckowski S, Chaloin O, Bianco A, Moreau E, et al. Immunomodulatory consequences of ODN CpG-polycation complexes[J]. *Methods*, 2009, 49: 328-333.
- [13] Rappicetta M, Ferrari C, Levrero M. Viral determinants and host immune responses in the pathogenesis of HBV infection[J]. *J Med Virol*, 2002, 67: 454-457.
- [14] Reimann J, Schirmbeck R. Alternative pathways for processing exogenous and endogenous antigens that can generate peptides for MHC class I-restricted presentation[J]. *Immunol Rev*, 1999, 172: 131-152.
- [15] 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.