

外分泌型的乙型肝炎病毒核心抗原核酸疫苗的构建与体外表达 *

贾一琼¹ 邢益平^{1△} 王文娟¹ 李 军¹ 王世霞² 卢 山² 黄祖瑚¹

(¹ 南京医科大学第一附属医院感染病科 江苏 南京 210029 ² 美国马萨诸塞州大学医学院 Worcester MA, 01605, USA)

摘要 目的 构建含有组织型纤溶酶原激活剂(tPA)信号肽的乙型肝炎病毒核心抗原(HBcAg)核酸疫苗。方法 将 HBcAg 基因用 PCR 方法扩增并分别引入相应的限制性内切酶酶切位点,然后克隆入 pJW4303 载体中获得相应的核酸疫苗,经筛选鉴定后,用上述核酸疫苗与野生型 HBcAg 核酸疫苗及空载体质粒 pJW4303 分别用脂质体瞬时转染 293T 细胞,应用蛋白印迹法检测核心抗原的表达。结果 成功构建以 pJW4303 为载体的含 tPA 信号肽的 HBcAg 核酸疫苗,体外表达证实含 tPA 信号肽的 HBcAg 在 293T 细胞胞内和胞外均能表达,含 tPA 信号肽的 HBcAg 核酸疫苗的核心抗原表达水平较高。结论 以 pJW4303 为载体的含 tPA 信号肽的 HBcAg 核酸疫苗能够将细胞内的 HBcAg 分泌到细胞外,为进一步研究其免疫原性打下了基础。

关键词 乙型肝炎病毒核心抗原 组织纤溶酶原激活剂 质粒构建 核酸疫苗

中图分类号 R512.62 **文献标识码** A **文章编号** :1673-6273(2012)16-3090-03

Construction and in Vitro Expression of Genetic Vaccine Encoding Hepatitis B Virus Core Antigen Fused to Tissue Plasminogen Activator Signal Sequence*

JIA Yi-qiong¹, XING Yi-ping^{1△}, WANG Wen-juan¹, LI Jun¹, WANG Shi-xia², LU Shan², HUANG Zu-hu¹

(¹ Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of NJMU, 210029, Nanjing, China;

² University of Massachusetts Medical School, 01605, Worcester MA, USA)

ABSTRACT Objective: To construct and express nucleic acid vaccine encoding hepatitis B virus core antigen(HBcAg) fused to tissue plasminogen activator signal sequence(tPA) in vitro. **Methods:** Restriction sites were introduced to HBcAg cDNA using polymerase chain reaction(PCR). The gene product was cloned to pJW4303 to construct nucleic acid vaccine and all constructs were identified by sequencing, and 293T cells were transiently transfected with pJW4303/HBc/tPA, pJW4303/HBc and pJW4303 blank vector. The HBcAg protein was measured by western blot. **Results:** pJW4303/HBc/tPA nucleic acid vaccine was constructed successfully and expressed HBcAg in lysates and supernatants in 293t cells in vitro. Expression level of pJW4303/HBcAg/tPA was higher than that of pJW4303/HBc. **Conclusion:** HBcAg encoded by nucleic acid vaccine pJW4303/HBc/tPA and the expressed product in 293t cells could be secreted out of the cells. This research is the foundation for the further study of the pJW4303/HBc/tPA nucleic acid vaccine.

Key words: Hepatitis B virus core antigen; tPA leader; Plasmid construction; DNA vaccine

Chinese Library Classification(CLC): R512.62 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)16-3090-03

前言

乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)是一种嗜肝、部分双链环状 DNA 病毒,不仅能引起急、慢性病毒性肝炎,而且与肝纤维化、肝细胞癌的发生发展密切相关^[1,2]。HBV 导致的病毒性肝炎目前尚无十分有效的治疗措施,疫苗接种是控制和预防乙型肝炎的重要手段,慢性乙型肝炎患者难以清除 HBV 的重要原因之一是特异性细胞免疫能力低下。在小鼠、灵长类等动物研究中已证实 HBV 核酸疫苗能激发机体产生特异性细胞免疫应答^[3,4],但将其作为治疗性疫苗时诱导的细胞免疫应答水平仍不令人满意。因此,怎样进一步提高核酸疫苗的免疫原性是开发新一代治疗性核酸疫苗的关键所在。

tPA 为组织纤溶酶原激活因子来源的通用信号肽编码基因^[5,6],长 23 氨基酸,其中含有一个 KOZARK 增强子,能促进靶抗原基因在真核细胞的转录,并且能够引导表达后的抗原肽从细胞内分泌到细胞外,有效促进异种蛋白的分泌。

由于 HBcAg 绝大部分在肝细胞内表达,仅少量能分泌到细胞外^[7],从而不能诱导良好的细胞免疫应答。我们利用基因重组技术构建分泌型乙型肝炎病毒核心抗原质粒,分析该质粒在体外表达的情况,以期获得免疫原性强的新质粒,为新型 HBV 核酸疫苗的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

* 基金项目 2011 年江苏省医学创新团队序号 21

作者简介:贾一琼(1986-),女,硕士研究生,主要研究方向 病毒性肝炎核酸疫苗的研究 电话 :15951822497 E-mail: sxczjyq@126.com

△通讯作者 邢益平 教授 E-mail: xingyiping2010@vip.sina.com

(收稿日期 2012-02-19 接受日期 2012-03-05)

1.1.1 质粒和菌株 质粒载体 pJW4303、HBc 核酸疫苗 pJW4303/HBc 均由南京医科大学第一附属医院感染病科自备。293T 细胞系、E.coli HB101 由本实验室提供。

1.1.2 酶和主要的试剂 DNA 连接酶购自美国 Promega 公司；各种限制性内切酶、DMEM 细胞培养液和胎牛血清购自美国 Gibco 公司；Millipore 离心管购自普克泰生物技术公司；免疫印迹(western blot)用一抗购自 abcam 公司的鼠抗 HBcAb，二抗是 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗血清由联科公司提供；化学发光液 A、B 购自美国 Pierce 公司。

1.2 方法

1.2.1 分泌型 pJW4303/HBc/tPA 核酸疫苗的构建 以 pJW4303/HBc 为模板进行 PCR 扩增，上游引物 P1: TCAT-CACTGCTAGCGACATCGACCCTTATAAAG 含 NheI 酶切位点，下游引物 P2 :TCTCACGGATCCCTAACATTGAGGTTC-CCGAG 含 BamHI 酶切位点。反应条件为：94℃ 5 min，94℃ 30 s，56℃ 1 min，72℃ 1 min，循环 35 次后 72℃ 延伸 10 min，回收 PCR 产物。对扩增片段及载体 pJW4303 进行 NheI 和 BamHI 双酶切，T4 连接酶连接两个酶切产物，16℃ 过夜。连接产物转化大肠杆菌 HB101，通过常规培养和克隆筛选，抽提质粒(Qiagen 公司，美国)经 NheI 和 BamHI(Promega 公司，美国)内切酶酶切，直接交上海英俊公司测序鉴定，测序鉴定正确后，4℃ 保存备用。

1.2.2 核酸疫苗的体外表达及检测 293T 细胞株复苏后用含 10%胎牛血清的含抗生素的 DMEM 培养液在 37℃，5% CO₂ 的条件下进行培养。转染前一天接入 150 mm 的培养皿中，待细胞丰度为 70%时用脂质体法分别转染 50 mg 的 pJW4303、pJW4303/HBc、pJW4303/HBc/tPA 质粒，转染 48 h 后收集培养上清和细胞裂解液。分别将收获的 20 ml 培养上清用 50 ml Millipore 离心管分次离心(2500 r/min，4℃)至培养上清浓缩到 200 μl。用 Western blot 法检测 HbcAg，以观察核酸疫苗质粒在真核细胞内表达及向细胞外分泌的情况。具体步骤如下：①灌制 12%SDS-PAGE 电泳胶；②浓缩后的培养上清和裂解液 20 μl 加入 5 μl Buffer 煮沸 3 min 后上样，电泳；③转膜，100 V，1 h；④封闭，5%脱脂奶粉，3 h；⑤PBST(PBS，0.05%Tween-20)1:1000 稀释鼠抗 HBcAb，与滤膜共孵育，4℃过夜；⑥PBST 漂洗滤膜 6 次，每次 10 min；⑦封闭液 1:10000 稀释 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗血清。摇床上缓慢摇动，37℃，1 h；⑧PBST 漂洗滤膜 6 次，每次 10 min；⑨显影及定影后观察结果。

2 结果

2.1 分泌型核酸疫苗的构建

2.1.1 分泌型核酸疫苗的构建及酶切鉴定 引物 P1、P2 扩增后的 PCR 产物经 1%的琼脂糖凝胶电泳检测，得到约 550 bp 的片段，与预期大小相符(图 1)。

新构建的 pJW4303/HBc/tPA 质粒经用 NheI 和 BamHI 双酶切后，1%琼脂糖凝胶电泳检测可得到分别与目的 DNA(550 bp)和载体(5000 bp)相同大小的两个片段，酶切反应的结果与预期的相符(图 2)。将酶切验证正确的质粒送去测序，结果完全正确，图略。

2.2 分泌型核酸疫苗的体外表达

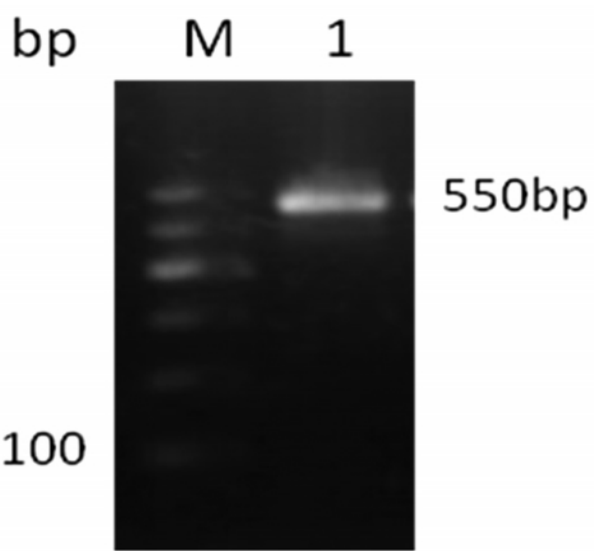


图 1 PCR 扩增产物电泳鉴定
Fig.1 Identification of PCR product by agarose gel electrophoretic
M: 100 bp DNA ladder Marker; 1: PCR product

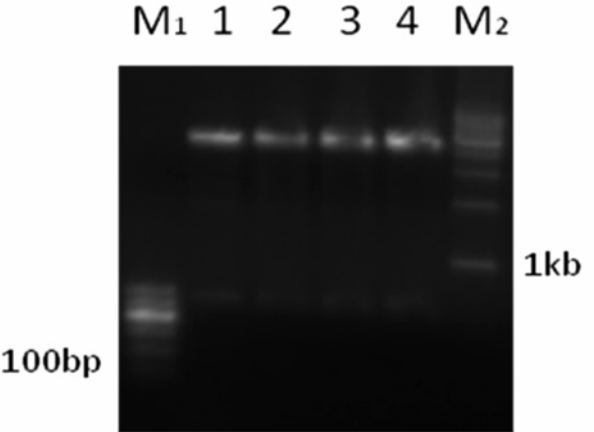


图 2 载体和 PCR 扩增基因连接产物质粒酶切电泳鉴定
Fig.2 Identification of the plasmid pJW4303/HBc/tPA by restriction enzyme digestion
M1: 100 bp DNA ladder Marker; 1~4: pJW4303/HBc/tPA was digested with NheI + BamHI; M2: 1 kb DNA ladder Marker

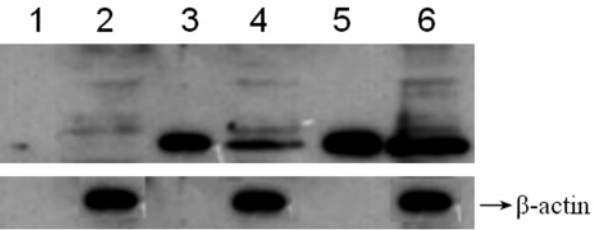


图 3 各组核酸疫苗在 293T 细胞中的表达
图中 β-actin 为内参，1: pJW4303 转染 293T 细胞上清液；2: pJW4303 转染 293T 细胞裂解液；3: pJW4303/HBc 转染 293T 细胞上清液；4: pJW4303/HBc 转染 293T 细胞裂解液；5: pJW4303/HBc/tPA 转染 293T 细胞上清液；6: pJW4303/HBc/tPA 转染 293T 细胞裂解液
Fig.3 Express of DNA vaccines in 293T cell line
β-actin is Internal Control, 1: supernatant of pJW4303 transfected 293T cell; 2: lysate of pJW4303 transfected 293T cell; 3: supernatant of pJW4303/HBc transfected 293T cell; 4: lysate of pJW4303/HBc transfected 293T cell; 5: supernatant of pJW4303/HBc/tPA transfected 293T cell; 6: lysate of pJW4303/HBc/tPA transfected 293T cell

3 讨论

尽管预防性 HBV 疫苗在过去几十年中取得了巨大的成功,但是 HBV 携带者中仍然有 5%~10%成人和 90%左右的儿童转变为慢性乙型肝炎,而且用于慢性乙型肝炎治疗的药物干扰素- α (IFN- α)和拉米呋啶(Lamivudine)的临床疗效也并不令人十分满意^[8,9],所以开发治疗性疫苗迫在眉睫。发生慢性乙型肝炎的主要原因是机体对 HBV 抗原不能产生迅速有效的免疫反应,尤其是 Th1 型细胞免疫反应。因此,增强患者对 HBV 抗原的免疫应答,打破机体对 HBV 的免疫耐受是对慢性乙型肝炎治疗的一个重要策略。

核酸疫苗能刺激机体产生细胞免疫应答^[3,4],其重要的机制之一是:它和病原微生物一样能在被接种的机体细胞内进行转录并翻译成目的蛋白质,他们的抗原递呈的过程都是内源性途径,而蛋白质疫苗主要是通过外源性抗原递呈途径产生免疫应答。在核酸疫苗的研究中发现,要获得良好的免疫原性,首先要做到有好的表达能力,高效的目的抗原表达使免疫系统能够受到足够强度和足够时间的抗原肽的刺激,必需使其能有效的分泌并达到效应部位才能使表达的细胞因子发挥有效的生物学活性。尽管核酸疫苗在感染性疾病及肿瘤的防治中显示出巨大的潜能,但在实际应用中,常因体内转染效率欠佳、核酸疫苗所激发的免疫应答强度相对较弱等原因,尤其在大动物以及人体内不足以引起足够的免疫保护效果^[10]。旨在提高核酸疫苗免疫效果的方法有多种,有学者联合使用核酸疫苗与蛋白疫苗协同免疫来增强免疫应答效果^[11]。

HBcAg 是乙肝病毒的一个重要优势免疫原,其以颗粒形式表达,主要分布在细胞核内,微量分布在胞浆中^[12-15],易被抗原递呈细胞(APCs)摄取、加工、处理和递呈,能激发机体产生较强的体液和细胞免疫应答。有研究证实,HBcAg 可以直接激活 B 细胞,它既是一种 T 细胞依赖性抗原,又是一种 T 细胞非依赖性抗原,同时它的 C 末端可以结合少量的核酸,可以使免疫反应向 Th1 方向极化^[16]。因此,HBcAg 基因常常被选择为乙型肝炎基因治疗的目标靶基因。

Lu 等研究证明,将非分泌性抗原蛋白连接一适当的信号肽序列可使哺乳动物细胞表达该抗原为分泌性形式而大大提高其诱导的抗体应答水平。将组织纤溶酶原激活剂的信号肽序列与 HIV-1gp120 蛋白的 N 末端相连接大大增强了 gp120 的细胞外表达以及免疫原性^[17,18]。Wang 等研究证明,连接了组织纤溶酶原激活剂信号肽序列的鼠疫杆菌 V 抗原,免疫老鼠后能增强 Th1 细胞免疫反应^[19]。

本实验中通过将 tPA 连接到 HBcAg 的氨基端构建的新质粒,经过 western blot 的验证,证实了 pJW4303/HBc/tPA 在上清和细胞裂解液中都高于 pJW4303/HBc。前期做实验中上清未作浓缩时,western 结果显示 pJW4303/HBc/tPA 的上清没有条带,改进实验方法,将收获的上清浓缩 100 倍后(20 ml 至 200 μ l),文章中 western 显示 pJW4303/HBc/tPA 上清有了条带。推测是因为上清中 HBcAg 含量极低,但是经过浓缩后蛋白含量增多,western 结果显示上清中有了蛋白条带。

基于以上的研究成果,我们构建的分泌型 HBcAg 核酸疫苗,期望能有效提高 HBV 核酸疫苗的免疫原性,更好地刺激机

体产生细胞免疫应答,为研究治疗型乙肝疫苗进一步打下基础。

参考文献(References)

- [1] Lupberger J, Hildt E. Hepatitis B virus-induced oncogenesis[J]. World Journal of Gastroenterology: WJG, 2007, 13: 74-81
- [2] Ott JJ, Stevens GA, Groeger J, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: New estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity[J]. Vaccine, 2012, 30(12): 2212-2219
- [3] 黄祖瑚,庄辉,卢山,等. 乙型肝炎病毒核心抗原核酸疫苗对猕猴的体液免疫原性观察[J]. 南京医科大学学报, 2001, 20(1): 69-72
Huang Zu-hu, Zhuang Hui, Lu Shan, et al. Humoral and cellular immunogenicity of DNA vaccine based on Hepatitis B core gene in rhesus monkeys[J]. World J Gastroenterol, 2001, 7(1): 102-106 (In Chinese)
- [4] 黄祖瑚,庄辉,郭人花,等. 乙型肝炎病毒核心抗原 DNA 疫苗对小鼠和猕猴的免疫原性观察 [J]. 南京医科大学学报, 2001, 21(5): 378-381
Huang Zu-hui, Zhuang Hui, Guo Ren-hua, et al. Observation in mice and rhesus monkeys on immunogenicity of DNA vaccine based on core gene of Hepatitis B virus [J]. Acta Nanjing Med Univ, 2001(5): 378-381 (In Chinese)
- [5] Wang JY, Song WT, Li Y, Chen WJ, et al. Improved expression of secretory and trimeric proteins in mammalian cells via the introduction of a new trimer motif and a mutant of the tPA signal sequence[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 91(3): 731-740
- [6] Yang S, Wang C, Fang X, Zhai L, et al. Fusion of C3d molecule with neutralization epitope(s) of hepatitis E virus enhances antibody avidity maturation and neutralizing activity following DNA immunization[J]. Virus Res, 2010, 151(2): 162-169
- [7] Karpinska E, Wawrzynowicz SM, Chosia M, et al. Hepatitis B core antigen in liver tissue from HBs-positive, HBe-negative patients[J]. Hepatogastroenterology, 2004, 51: 709-712
- [8] Niederau C, Heintges T, Lange S, et al. Long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with interferon alfa for chronic hepatitis B[J]. N Engl J Med, 1996, 334 (22): 1470-1471
- [9] Dienstag JL, Schiff ER, Wright TL, et al. Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in the United States [J]. N Engl J Med, 1999, 341(17): 1256-1263
- [10] Cui Z. DNA vaccine[J]. Adv Genet, 2005, 54: 257-289
- [11] Rown SA, Hanscom H N, VU H, et al. TWEAK binding to the Fn14 cysteine-rich domain depends on charged residues located in both the A1 and D2 modules[J]. Biochem J, 2006, 397(2): 297-304
- [12] Bo Ning and Chiahoh Shih. Nucleolar localization of human hepatitis B virus capsid protein[J]. Journal of Virology, 2004, 78: 13653-13668
- [13] Marilyn JR and Aleem S. In vivo phosphorylation and protein analysis of hepatitis B virus[J]. Journal of Virology, 1987, 61: 955-961
- [14] Jing-hsiun O, Orgad L, Wiliam JR. Hepatitis B virus gene function: The precore region targets the core antigen to cellular membranes and causes the secretion of the e antigen [J]. Biochemistry, 1986, 83: 1578-1582
- [15] Marilyn JR, Shahid J, Stephen HL, Aleem S. Expression of hepatitis B viral core region in mammalian cells[J]. Molecular and Cellular Biology, 1986, 6: 1393-1400

(下转第 3097 页)

- [3] Kuzuya K, Chemoradiotherapy for uterine cancer: current status and perspectives [J]. *Int J Clinical*, 2004,9(6):458-470
- [4] Nagata Y, Araki N, Kinura H et al. Neoadjuvant chemotherapy by transcatheter arterial infusion method for uterine cervical cancer [J]. *J Vasc Interv Radiol*, 2000,11:313-319
- [5] Yamakawa Y, Fujimura M, Hidaka T et al. Neoadjuvant intraarterial infusion chemotherapy in patients with stage IIB2-IIIB cervical cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2000,77:264-270
- [6] Symonds P. Chemoradiation: the new gold standard for non-surgical treatment of cervical cancer [J]. *Clin Oncol Coll Radiol*, 2002,14(3): 201-202
- [7] Benedetti-Panici PL, Zullo MA, Muzii L et al. The role of neoadjuvant chemotherapy followed by radical surgery in the treatment of locally advanced cervical cancer [J]. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2003,24 (6): 467-470
- [8] Itoh N, Sawairi M, Hanabayashi T et al. Neoadjuvant intraarterial infusion chemotherapy with a combination of mitomycin-C, vincristine, and cisplatin for locally advanced cervical cancer: a preliminary report [J]. *Gynecol Oncol*, 1992,47(3):391-394
- [9] Tsuda H, Tanaka M, Manabe T, et al. Phase I-II study of neoadjuvant chemoradiotherapy followed by radical surgery in locally advanced cervical cancer[J]. *Anticancer Drugs*, 2002,12(10): 853-858
- [10] Frei E III. Clinical and scientific considerations in preoperative (neoadjuvant) chemotherapy [J]. *Recent Results in Cancer Research*, 1986, 103:1-5
- [11] Jones EL, Samulski TV, Dewhirst MW, et al. A pilot Phase II trial of concurrent radiotherapy, chemotherapy, and hyperthermia for locally advanced cervical carcinoma[J]. *Cancer*, 2003,98(2):277
- [12] Bergs JW, Franken NA, Haveman J, et al. Hyperthermia, cisplatin and radiation trimodality treatment: a promising cancer treatment, A review from preclinical studies to clinical application[J]. *Int J Hyperthermia*, 2007,23(4):329-341
- [13] Zhang Beiguang, The clinical application of advanced cervical cancer by interventional heated chemotherapy [J]. *China modern medicine application*, 2010,14(24):74-75
- [14] Benedetti-Panici P, Greggi S, Scambia G, et al. Long-term survival following neoadjuvant chemotherapy and radical surgery in locally advanced cervical cancer[J]. *Eur J Cancer*, 1998,34:341-346
- [15] Sardi J, Sananes C, Giaroli A et al. Neoadjuvant chemotherapy in locally advanced carcinoma of the cervix uteri[J]. *Gynecol Oncol*, 1990, 38:486-493
- [16] Toita T, Sakumoto K, Higashi M et al. Therapeutic value of neoadjuvant intra-arterial chemotherapy (cisplatin) and irradiation for locally advanced uterine cervical cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 1997,65:421-424
- [17] Lejarcegui JA, Cot X, Lailla JM, et al. (1988) Intraarterial infusion chemotherapy as a primary treatment in cancer of uterine cervix limited to the pelvis[J]. *Eur J Gynecol Oncol*, 1988,9:403-409
- [18] Mizuno K, Kidokoro K, Miyazaki K, et al. Neoadjuvant chemotherapy with intra arterial infusion in the treatment of advanced cervical cancer [J] *Gan To Kagaku Ryoho*, 2005,32(6):815-819
- [19] Nagata Y, Araki N, Kinura H, Fujiwara K, Okajima K, Aoki T, Mitsumori M, Sasai K, Hiraoka M, Higuchi T, Fujii S (2000) Neoadjuvant chemotherapy by transcatheter arterial infusion method for uterine cervical cancer[J]. *J Vasc Interv Radiol*, 2000,11:313-319
- [20] Sugimoto K, Hirota S, Imanaka K, et al. Complications following balloon-occluded arterial infusion chemotherapy for pelvic malignancies[J]. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 1999,22:481-485

(上接第 3092 页)

- [16] Riedl P, Stober D, Oehninger C, et al. Priming Th1 immunity to viral core particles is facilitated by trace amounts of RNA bound to its A arginine-rich domain[J]. *J Immunol*, 2002, 168(10): 4951-4959
- [17] Lu S, Arthos J, Montefiori DC, et al. Simian immunodeficiency virus DNA vaccine trial in macaques[J]. *J Virol*, 1996, 70(6): 3978-3991
- [18] Lu S, Santoro JC, Fuller DH, et al. Use of DNAs expressing HIV-1 Env and noninfectious HIV-1 particles to raise antibody responses in mice[J]. *Virology*, 1995, 209(1): 147-154
- [19] Shixia Wang, Destin Heilman, Fangjun Liu, et al. A DNA vaccine producing LcrV antigen in oligomers is effective in protecting mice from lethal mucosal challenge of plague [J]. *Vaccine*, 2004, 22: 3348-3357