

· 论 著 ·

## 寡核苷酸 CpG-ODN 增强 HBV 疫苗接种的细胞免疫反应\*

施 理, 贾 杰, 林 锋, 陈所贤, 肖芙蓉, 蔡笃运, 王 英  
(海南省人民医院传染科, 海口 570311)

**摘要:**目的 研究寡核苷酸 CpG-ODN 对小鼠接种基因重组乙型肝炎病毒(HBV)疫苗产生的细胞免疫的影响。方法 BALB/c(H-2<sup>d</sup>)小鼠腹腔分别接种基因重组 HBV 疫苗(rHBs)或 50 μg CpG-ODN+rHBs,rHBs 分为 0.65、1.25、2.50、5.00 μg 剂量组。4 周后分离小鼠脾淋巴细胞,体外分别用 rHBs 刺激,<sup>3</sup>H 掺入实验检测特异性淋巴细胞增殖反应的液闪计数值(cpm)。结果 (1)接种 0.65、1.25、2.50、5.00 μg rHBs 的小鼠脾淋巴细胞,体外用 rHBs 刺激,cpm 值( $\bar{x}\pm s$ )分别为 3 830.24±1 496.12、2 736.19±1 238.06、4 100.37±1 723.74、1 246.18±1 088.88,均高于体外未用 rHBs 刺激的对照组 cpm 值:1 607.00±182.6、1 677.5±358.3、2 255.5±227.3、753.8±206.8,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。(2)接种 0.65 μg rHBs +50.00 μg CpG-ODN、1.25 μg rHBs+50.00 μg CpG-ODN、2.50 μg rHBs+50.00 μg CpG-ODN、5.00 μg rHBs+50.00 μg CpG-ODN 的小鼠 cpm 值分别为 6 863.87±1 243.24、6 582.48±1 132.48、7 332.43±938.28、5 184.24±947.45,均高于体外未用 rHBs 刺激的对照组 cpm 值:2 307.00±182.6、2 577.5±358.3、2 655.5±227.3、2 753.8±206.8;同时也高于单用 rHBs 免疫的小鼠。结论 CpG-ODN 能增强接种 rHBs 产生的特异性淋巴细胞增殖反应。

**关键词:**寡核苷酸 CpG-ODN;乙型肝炎疫苗;细胞免疫;增强作用

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.21.009

中图分类号:R512.62;R979.5

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)21-2869-03

## Augment of CpG-ODN on cellular immune response induced by vaccination with recombinant HBV vaccine\*

SHI Li, JIA Jie, LIN Feng, et al.

(Department of Infective Diseases, Hainan Provincial Hospital, Haikou 570311, China)

**Abstract: Objective** To explore the augment of CpG-ODN on cellular immune response induced by vaccination with recombinant HBV vaccine (rHBs). **Methods** BALB/c(H-2<sup>d</sup>) mice were inoculated intraperitoneally(i. p.) with rHBs at the doses ranging from 0.65—5.00 μg or CpG-ODN of 50.00 μg +rHBs at the doses ranging from 0.65—5.00 μg. 4 weeks after the boosting immunization, spleen T lymphocytes were restimulated with rHBs in vitro, and specific helper lymphocyte proliferative activity was determined, the cpm for the spleen lymphocyte not being stimulated by rHBs were regarded as control. **Results** The cpm for specific helper lymphocyte proliferative activity in the group vaccinated with rHBs of 0.65, 1.25, 2.50, 5.00 were 3 830.24±1 496.12, 2 736.19±1 238.06, 4 100.37±1 723.74, 1 246.18±1 088.88, respectively, which were greater than those in control group with the spleen lymphocyte not being stimulated by rHBs: 1 607.00±182.6, 1 677.5±358.3, 2 255.5±227.3, 753.8±206.8 ( $P<0.05$ ). The cpm for specific helper lymphocyte proliferative activity in the group vaccinated with rHBs+CpG-ODN was 6 863.87±1 243.24, 6 582.48±1 132.48, 7 332.43±938.28, 5 184.24±947.45, which were greater than those in control group with the spleen lymphocyte not being stimulated by rHBs: 2 307.00±182.6, 2 577.5±358.3, 2 655.5±227.3, 2 753.8±206.8 ( $P<0.05$ ), higher than those vaccinated with rHBs only. **Conclusion** CpG-ODN enhances the cellular immune response induced by vaccination with rHBs.

**Key words:** CpG-ODN; recombinant HBV vaccine; cellular immune response; augment

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是世界性的常见病、多发病,全世界 HBV 感染者有 3 亿人,每年有上千万的新增患者。主要通过接种基因重组 HBV 疫苗(recombinant HBV vaccine, rHBs)预防 HBV 感染,但约有 10%~15%的低反应或无反应者不能得到有效保护。寡核苷酸 CpG 是新近发现的一种免疫佐剂,有很强的免疫增强作用,尤其是细胞免疫反应。一般 HBV 感染者体内均存在特异性抗 HBV 抗体,但这种体液免疫反应却不能清除机体内的 HBV,而特异性细胞免疫反应在清除体内已有的 HBV、治疗 HBV 感染过程中起着重要作用<sup>[1-4]</sup>。本文研究 CpG-ODN 对小鼠接种 rHBs 产生的 HBV 特异性淋巴细胞增殖反应(T lymphocyte proliferation)的影响。

## 1 材料与方

1.1 材料 rHBs 为酵母基因重组产品,Merck 公司生产。

CpG-ODN:5'ggGGG ACGA TCG TCgggggG 3'由上海生工生物工程公司合成,小写碱基为硫代磷酸化修饰,大写碱基为非硫代磷酸化修饰;PAGE 纯化;将 ODN 分别按比例溶于 NaCl 注射液。

1.2 BALB/c 小鼠免疫接种(H-2<sup>d</sup>) 6~10 周龄、SPF 级 BALB/c 小鼠 50 只,每组 10 只。按以下方法分组,腹腔内各接种不同剂量的 rHBs,2 周后加强免疫接种 1 次:0.65 组,接种 0.65 μg 的 rHBs(对照组),0.65 μg 的 rHBs+50.00 μg CpG-ODN(实验组);1.25 组,接种 1.25 μg 的 rHBs(对照组),1.25 μg 的 rHBs+50.00 μg CpG-ODN(实验组);2.50 组,接种 2.50 μg 的 rHBs(对照组),2.50 μg 的 rHBs+50.00 μg CpG-ODN(实验组);5.00 组,接种 5.00 μg 的 rHBs(对照组),5.00 μg 的 rHBs+50.00 μg CpG-ODN(实验组)。最后一次接种 4 周后,分离培养小鼠脾淋巴细胞。

\* 基金项目:海南省自然科学基金资助项目(200831);海南省卫生厅资助项目(200816)。

表 1 小鼠接种 rHBs 产生的淋巴细胞特异性增殖反应

项目	0.65 组	1.25 组	2.50 组	5.00 组
体外用培养液刺激的 cpm 值	1 607.00±182.6	1 677.5±358.3	2 255.5±227.3	753.8±206.8
体外用 rHBs 刺激的 cpm 值	3 830.24±1 496.12	2 736.19±1 238.06	4 100.37±1 723.74	1 246.18±1 088.88
SI	2.38	1.63	1.82	1.65

表 2 小鼠接种 CpG-ODN+rHBs 产生的淋巴细胞特异性增殖反应

项目	0.65 组	1.25 组	2.50 组	5.00 组
体外用培养液刺激的 cpm 值	2 307.00±182.6	2 577.5±358.3	2 655.5±227.3	2 753.8±206.8
体外用 rHBs+CpG-ODN 刺激的 cpm 值	6 863.87±1243.24	6 582.48±1132.48	7 332.43±938.28	5 184.24±947.45
SI	2.97	2.55	2.76	1.88

表 3 CpG-ODN 对小鼠接种 rHBs 产生的淋巴细胞特异性增殖反应的增强作用

项目	0.65 组	1.25 组	2.50 组	5.00 组
体外用 rHBs 刺激的 cpm 值	3 830.24±1 496.12	2 736.19±1 238.06	4 100.37±1 723.74	1 246.18±1 088.88
再用体外用 rHBs+ CpG-ODN 刺激的 cpm 值	6 863.87±1 243.24	6 582.48±1 132.48	7 332.43±938.28	5 184.24±947.45

**1.3 淋巴细胞特异性增殖实验** 用含 10% FCS 的 DMEM 培养液悬浮小鼠脾 T 淋巴细胞,加巯基乙醇至  $5 \times 10^{-5}$  M、小鼠 IL-2 至 5 U/mL,CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 5 d 后,分别用 DMEM 培养液、rHBs、rHBs+CpG-ODN 体外刺激,每个浓度做 3 个重复孔;10 d 后小鼠脾细胞用培养液冲洗 2 次,DMEM 培养液悬浮,按  $2 \times 10^4$  个/孔加入 96 孔 U 型培养板,再用 rHBs(终浓度 10 μg/mL)体外刺激 4 d,结束前 18 h,每孔按 0.5 μCi 加入 <sup>3</sup>H-甲基胸腺嘧啶;将细胞收集在玻璃滤膜上,用液闪计数器检测放射性,每 1 例重复 3 次。以体外未用疫苗刺激的增殖实验液闪计数值(cpm 值)为对照,体外用疫苗或疫苗+CpG 刺激的增殖实验 cpm 值为实验组小鼠脾淋巴细胞的增殖实验 cpm 值,以刺激指数(SI)=实验组 cpm 值/对照组 cpm 值表示淋巴细胞特异性增殖。

**1.4 统计学方法** 用 *t* 检验比较各组小鼠脾淋巴细胞特异性增殖,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 小鼠接种 rHBs 产生的淋巴细胞特异性增殖反应** 见表 1。

**2.2 小鼠接种 CpG-ODN+rHBs 产生的淋巴细胞特异性增殖反应** 见表 2。

**2.3 CpG-ODN 对小鼠接种 rHBs 产生的淋巴细胞特异性增殖反应的增强作用** 见表 3。

## 3 讨论

人感染 HBV 后产生的多种抗 HBV 抗体,不能清除 HBV;感染 HBV 后呈现急性、自限性的患者,体内存在较强的抗 HBV 特异性细胞免疫;感染 HBV 后呈现慢性、迁延性的患者,机体对 HBV 的免疫应答失衡,表现为 Th1 型免疫功能低下而 Th2 型免疫功能亢进,前者致使免疫系统不能产生足够的细胞免疫反应以杀伤、破坏病毒感染的靶细胞和抑制病毒基因的复制和表达;Th2 型的免疫反应则进一步抑制 Th1 型免疫应答,虽然诱导强烈的特异性抗 HBV 抗体,但这种体液免疫反应却不能清除机体内的 HBV,HBV 抗原的持续刺激又诱导特异性 T 细胞凋亡,形成对 HBV 的免疫耐受。

研究表明特异性细胞免疫反应在清除体内已有的 HBV、治疗 HBV 感染过程中起着非常重要的作用。在 HBV 研究中,细胞介导的免疫应答(cell mediated immune response,

CMI)较体液免疫应答(抗 HBV 抗体)更为重要。接种 HBV 疫苗能够产生抗 HBV 抗体,但能否产生抗 HBV 特异性细胞免疫反应,许多人心存疑虑。最近国外研究发现,加大接种剂量及同时使用 CpG-ODN 作为疫苗佐剂,可以产生明显的细胞免疫反应<sup>[1-4]</sup>。

1984 年,日本学者发现细菌 DNA 有一种可诱生免疫应答的 DNA 序列,被称之为免疫刺激 DNA 序列(immunostimulatory DNA sequence,ISS),普遍含胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤(CpG)二核苷酸回文序列——CpG 基序,含有 CpG 基序的寡核苷酸称为 CpG-ODN。CpG 基序在细菌、病毒等原核生物基因组 DNA 中出现的频率为 1/16,通常为非甲基化的;而在脊椎动物 DNA 中 CpG 基序出现频率仅为细菌、病毒基因组 DNA-CpG 出现频率的 1/4,并且 80% 以上 CpG 的胞嘧啶高度甲基化。CpG 特征结构是诱导 T、B 细胞反应的强有力佐剂,有很强的免疫增强作用,能促进抗原特异性免疫应答的产生。本研究证实,CpG-ODN 是一种良好的免疫佐剂,能增强 rHBs 接种产生的特异性淋巴细胞增殖反应:0.65、1.25、2.50、5.00 μg 组小鼠,脾淋巴细胞特异性增殖反应的 cpm 值均高于相应对照组 cpm 值,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。CpG-ODN 能增强 rHBs 疫苗接种产生的特异性淋巴细胞增殖反应,以上各组分别加用 50.00 μg CpG-ODN 后,脾淋巴细胞特异性增殖反应的 cpm 值不但高于对照组,也高于不加 CpG-ODN 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。CpG-ODN 作为疫苗佐剂,能够促进抗原提呈,诱导 Th1 型免疫应答,增强淋巴细胞增殖能力,能促进 Th1 型免疫反应;IFN $\gamma$  含量增加,增强 NK 细胞的杀伤作用,还可抑制 Th2 型免疫反应。CpG-DNA 的作用是通过识别 Toll 样受体家族,主要是 TLR9 受体,以模拟细菌感染的方式激活了细胞经由 TLR9 通道的固有免疫,由于仅仅是一段序列,在激活免疫的同时不具有感染性,同时激活体内的免疫细胞,调动免疫系统,通过若干信号传递途径活化转录因子,启动相关细胞因子的基因转录,可直接或间接激活机体巨噬细胞、树突状细胞、淋巴细胞和 T 淋巴细胞,促进 IL-12、IFN $\gamma$ 、IL-6 和 TNF $\alpha$  等细胞因子分泌,诱导机体建立 Th1 型免疫反应,刺激 CD8<sup>+</sup> 细胞,对杀伤胞内感染具有很好的应用前景,有可能用于治疗 HBV 感染。动物实验还证实 CpG-ODN 作为佐剂安

全可靠<sup>[5-20]</sup>。

研究小鼠接种 rHBs 疫苗产生细胞免疫反应,其意义在于:理论上,无论是人,还是小鼠,接种 rHBs 疫苗产生的免疫反应均受 MHC-I 限制,识别的 rHBs 疫苗的免疫表位点相似。HBV 慢性肝炎 T 淋巴细胞致病机制的小鼠模型,国外已构建成功,不论是感染表达 HBV 表面抗原的重组病毒的小鼠,还是感染 HBV 的人,均产生特异性、MHC-I 限制性细胞毒 T 淋巴细胞反应及辅助 T 淋巴细胞(helper T lymphocyte, HTL)介导的淋巴细胞增殖反应。对接种 rHBs 疫苗产生细胞免疫反应的研究,可能开发出针对 CTL、HTL 缺乏的免疫治疗方案,降低体内 HBV 含量,甚至清除 HBV,降低 HBV 慢性并发症(肝硬化、肝癌)的发生,研究治疗 HBV 感染的疫苗。

#### 参考文献:

[1] 陈小华,潘庆春. PTD-HBcAg 融合蛋白经树突状细胞诱导特异性 CTL 抑制 HBV 的体外研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2009,25(4):289.

[2] Vassilopoulos D, Rapti I, Nikolaou M, et al. Cellular immune responses in hepatitis B virus e antigen negative chronic hepatitis B[J]. J Viral Hepat,2008,15(11):817.

[3] Schumann A, Fiedler M, Dahmen U, et al. Cellular and humoral immune response to a third generation hepatitis B vaccine[J]. J Viral Hepat,2007,14(8):592.

[4] Desombere I, Willems A, Gijbels Y, et al. Partial delipidation improves the T-cell antigenicity of hepatitis B virus surface antigen[J]. J Virol,2006,80(7):3506.

[5] Barry M, Cooper C. Review of hepatitis B surface antigen-1018 ISS adjuvant-containing vaccine safety and efficacy [J]. Expert Opin Biol Ther,2007,7(11):1731.

[6] Cooper CL, Angel JB, Seguin I, et al. CPG 7909 adjuvant plus hepatitis B virus vaccination in HIV-infected adults achieves long-term seroprotection for up to 5 years[J]. Clin Infect Dis,2008,46(8):1310.

[7] Borges O, Silva M, de Sousa A, et al. Alginate coated chitosan nanoparticles are an effective subcutaneous adjuvant for hepatitis B surface antigen[J]. Int Immunopharmacol, 2008,8(13-14):1773.

[8] Liu X, Xu Q, Chen W, et al. Hepatitis B virus DNA-induced carcinogenesis of human normal liver cells by virtue of nonmethylated CpG DNA[J]. Oncol Rep,2009,21(4):941.

[9] Xie Q, Shen HC, Jia NN, et al. Patients with chronic hepatitis B infection display deficiency of plasmacytoid dendritic cells with reduced expression of TLR9 [J]. Microbes Infect,2009,11(4):515.

[10] Vincent IE, Lucifora J, Durantel D, et al. Inhibitory effect of the combination of CpG-induced cytokines with lamivudine against hepatitis B virus replication in vitro [J]. Antivir Ther,2009,14(1):131.

[11] Xu Y, Hu Y, Shi B, et al. HBsAg inhibits TLR9-mediated activation and IFN-alpha production in plasmacytoid dendritic cells [J]. Mol Immunol,2009,46(13):2640.

[12] Ko E, Kim SJ, Joh JW, et al. CpG island hypermethylation of SOCS-1 gene is inversely associated with HBV infection in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Lett, 2008, 271(2):240.

[13] Shi L, Liu SR, Yi XR, et al. Cytotoxic T lymphocyte response to hepatitis B virus small surface antigen in BALB/c mice [J]. J First Mil Med Univ,2003,23(12):1242.

[14] 丛中一,包木胜,万敏,等. 新型 CpG-ODN 增强乙型肝炎疫苗诱导 IgG<sub>2</sub>a 类抗体产生的实验研究 [J]. 中国免疫学杂志,2006,22(11):987.

[15] 杨光,杨亮. 新型 CpG-ODN 对乙型肝炎病毒复制的抑制作用 [J]. 中国免疫学杂志,2009,25(6):487.

[16] 韩堃,郑源强,韩新荣,等. 两种 CpG 寡核苷酸对乙型肝炎疫苗免疫小鼠淋巴细胞增殖的影响 [J]. 中国生物制品学杂志,2008,21(11):948.

[17] Dittmer U, Olbrich AR. Treatment of infectious diseases with immunostimulatory ligodeoxynucleotides containing CpG motifs [J]. Curr Opin Microbiol,2003,6(5):472.

[18] An H, Xu H, Yu Y, et al. Up-regulation of TLR9 gene expression by LPS in mouse macrophages via activation of NF-kappaB, ERK and p38 MAPK signal pathways [J]. Immunol Lett,2002,81(3):165.

[19] Takeshita F, Gursel I, Ishii KJ, et al. Signal transduction pathways mediated by the interaction of CpG-DNA with Toll-like receptor 9 [J]. Semin Immunol,2004,16(1):17.

[20] 张林波,陈清彬,刘香英,等. CpG-ODN 对卡介苗免疫效应的影响 [J]. 中国生物制品学杂志,2009,22(7):686.

(收稿日期:2010-01-31 修回日期:2010-04-01)

(上接第 2868 页)

[11] Glunde K, Bhujwala ZM. Will magnetic resonance imaging (MRI)-based contrast agents for molecular receptor imaging make their way into the clinic [J]. J Cell Mol Med,2008,12:187.

[12] Yang DJ, Kim CG, Schechter NR, et al. Imaging with <sup>99m</sup>Tc EC-DG targeted at the multifunctional glucose transport system: feasibility study with rodents [J]. Radiology,2003,226(2):465.

[13] Chen Y, Xiong Q, Yang X, et al. Noninvasive Scintigraph-

ic Detection of Tumor with <sup>99m</sup>Tc-DTPA-Deoxyglucose: An Experimental Study [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2007,22(3):403.

[14] Liang J, Chen Y, Huang Z, et al. Early Chemotherapy Response Evaluation in Tumors by <sup>99m</sup>Tc-DTPA-DG [J]. Cancer Biother Radiopharm,2008,23(3):363.

[15] 陈跃,黄占文,何菱,等. <sup>99m</sup>Tc-DTPA-DG 的制备及其荷瘤裸鼠实验研究 [J]. 中华核医学杂志,2005,25(3):176.

(收稿日期:2010-03-18 修回日期:2010-06-09)