

N-糖基化移位对乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白核酸疫苗的 表达及免疫原性的影响*

刘浩¹ 邢益平^{1△} 贾一琼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 230029 2 美国马萨诸塞州大学医学院 Worcester MA,USA,01605)

摘要 目的:研究 N-糖基化移位对乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白核酸疫苗体外蛋白表达及小鼠体内体液免疫及细胞免疫应答的影响。方法:通过基因工程中定点突变技术,将乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白(MHBs)中第4位氨基酸上连接的糖链去除,或将糖链依次移位至第5、6或7位氨基酸,来构建 N-糖基化去除及移位的核酸疫苗,分别命名为 Adr-dN4、Adr-N4-5、Adr-N4-6、Adr-N4-7。用上述核酸疫苗与野生型 MHBs 核酸疫苗(pSW3891/MHBs/Adr,简称 Adr)及空载体质粒 pSW3891 分别用脂质体瞬时转染 293T 细胞,应用蛋白印迹法检测 MHBs 的表达。采用肌肉注射法,以各组疫苗分别对 BALB/c 小鼠于第0、2、4和6周进行免疫,用 ELISA 法检测小鼠血清中抗-HBs 抗体、ELISPOT 法检测小鼠表面抗原多肽特异性分泌 IFN- γ 的脾细胞数量。结果:蛋白印迹法结果显示 Adr、Adr-dN4、Adr-N4-5、Adr-N4-6、Adr-N4-7 体外转染 293T 细胞后,均可以在 293T 细胞内表达,且 Adr、Adr-N4-5、Adr-N4-7 可将表达产物分泌到细胞外。ELISA 及 ELISPOT 结果表明:Adr 免疫组小鼠抗-HBs 终点滴度及表面抗原特异性分泌 IFN- γ 的脾细胞数量,均略高于其他免疫组小鼠,但与 Adr-N4-5、Adr-N4-7 相比无统计学差异($P>0.05$),与 Adr-dN4 和 Adr-N4-6 组相比有显著的统计学差异($P<0.05$)。结论:在第5或7位氨基酸附加 N-连接糖链,能修补或替代 Asn4 连接糖链引导 MHBs 分泌的功能。HBs 表达蛋白分泌到细胞外对诱导机体产生特异性细胞和体液免疫是至关重要的。

关键词 N-糖基化;乙肝表面抗原中蛋白;免疫原性;核酸疫苗

中图分类号 R512.62 文献标识码 A 文章编号:1673-6273(2011)13-2443-04

Effects of N-glycosylation Shift on Protein Expression in Vitro of Protein Nucleic Acid Vaccine and Immunogenicity in HBsAg*

LIU Hao¹, XING Yi-ping^{1△}, JIA Yi-qiong¹, 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 investigate the expression and immunogenicity of DNA vaccine encoding middle hepatitis B surface antigen with relocating N-linked glycosylation. **Methods:** Site-directed mutagenesis were used to construct four DNA vaccines encoding middle hepatitis B surface antigen with relocating N-linked glycosylation named Adr-dN4, Adr-N4-5, Adr-N4-6 and Adr-N4-7, which transfer N-linked glycosylation sites from amino acid 4 to 5, 6 or 7 in preS2 domain. 293T cells were transiently transfected with Adr-dN4, Adr-N4-5, Adr-N4-6, Adr-N4-7, wild-type MHBs DNA vaccine (pSW3891/MHBs/Adr) and pSW3891 vector. The protein was measured by western blot. 7 weeks age BALB/c mice were used in the experiments. Each BALB/c mouse separately was intramuscularly injected with 100 μ g of each mutant or Adr or vector pSW3891 at 0, 2, 4 and 6 weeks. Anti-HBs in sera of mice were detected by ELISA. Peptide of HBsAg specific IFN- γ secreted splenocytes of mice were detected by ELISPOT. **Results:** There were the MHBs in the lysates of 293T cells transfected with each vaccine by western blot and in the supernatants in Adr, Adr-N4-5, Adr-N4-7. The peak Anti-HBs antibody titer and antigenic specific IFN- γ secreted splenocytes from immunized mice with Adr are slightly superior to with Adr-dN4, Adr-N4-5, Adr-N4-6, Adr-N4-7. But there was no significant difference between Adr and Adr-N4-5, Adr-N4-7 ($P>0.05$), while there was significant difference between Adr and Adr-dN4, Adr-N4-6 ($P<0.05$). **Conclusion:** Defect by deleting N-linked glycosylation on amino acid 4 can be rescued by adding N-linked glycosylation on amino acid 5 or 7. Secreting of MHBs from the cells is essential to induce the specific cellular and humoral immunity.

Key words: N-linked glycosylation; MHBs; Immunogenicity; DNA vaccine

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

Article ID:1673-6273(2011)13-2443-04

* 基金项目 江苏省兴卫工程重点学科基金(G:zk200715)

作者简介 刘浩(1982-)男,硕士研究生,主要研究方向 病毒性肝炎核酸疫苗的研究,

Tel:15896450845 E-mail:liuhaoanhui@126.com

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

(收稿日期 2011-03-07 接受日期 2011-03-31)

前言

乙肝病毒(HBV)是一种嗜肝、部分双链的 DNA 病毒,不仅引起急、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]。乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白(MHBs)核酸疫苗能诱导机体产生特异性中和性抗体^[2,3],因此,许多乙肝疫苗选用 MHBs 作为蛋白疫苗并已经取得了公认的效果。影响 MHBs 免疫原性的因素很多,其中糖基化对 MHBs 免疫原性的影响尚未完全明了。MHBs 编码基因中共有 3 个 N(天门冬酰胺 Asn)连接的糖基化位点(氨基酸序列必须为 NXS 或 NXT),preS2 区的第 4 位氨基酸(Asn)和 S 区的第 146 位氨基酸(Asn)是所有病毒株均有的,部分病毒株在 S 区的第 59 位氨基酸(Asn)还存在第三个糖基化位点^[4-7]。本课题组既往研究结果提示:去除表面抗原第 59 位和第 146 位氨基酸 N-连接的糖链可导致细胞介导免疫下降^[8]。Werr M 等研究表明 preS2 区第 4 位氨基酸的糖基化对 MHBs 的分泌表达以及 HBV 颗粒的形成起着至关重要的作用^[9]。因此,本研究在既往的研究基础上,通过基因工程中定点突变技术^[10],使 MHBs 中第 4 位氨基酸上连接的糖链去除,或将糖链依次移位至第 5、6 或 7 位氨基酸,来构建 N-糖基化去除及移位的核酸疫苗,以观察 N-糖基化去除及移位对 MHBs 合成、分泌及免疫原性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒载体 pSW3891、MHBs 核酸疫苗 pSW3891/MHBs/Adr(简称 Adr)均由南京医科大学第一附属医院感染病科自备。293T 细胞系由本实验室提供。各种限制性内切酶购自美国 Promega 公司,胎牛血清和 DMEM 细胞培养液购自美国 Gibco 公司,定点突变试剂盒(QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kits)购自美国 Stratagene 公司。免疫印迹(western blot)用一抗为 Adr 组免疫 BALB/c 小鼠 8 周后所得的血清,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。小鼠血清抗-HBs 的检测用 HBsAg 购自美国 USbiological 公司,ELISPOT 试剂盒购自达科为生物公司。36 只雌性 BALB/c 小鼠(7 周龄)由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。

1.2 N-糖基化移位 MHBs 核酸疫苗的构建及鉴定

为了完成糖基化去除或糖基化移位突变,本研究突变 MHBs 中特定位置的氨基酸设计四对互补引物:

①. Mutation of de-N4:

Primer1:Adr-dN4-F:ATGCAGTGGCAGTCCACAACATTCCACC

Primer2:Adr-dN4-B:GGTGGAATGTTGTGGACTGCCACTGCAT

②. Mutation of N4 to N5:

Primer1:Adr-N4-5-F:ATGCAGTGGCAGAACACAACATTCCACCAA

Primer2:Adr-N4-5-B:TTGGTGGAATGTTGTGTTCTGCCACTGCAT

③. Mutation of N4 to N6:

Primer1:Adr-N4-6-F:ATGCAGTGGCAGTCCAACACATCCCA-

CCAAGCTCTG

Primer2:Adr-N4-6-B:CAGAGCTTGGTGGGATGTGTTGGACTGCCACTGCAT

④. Mutation of N4 to N7:

Primer1:Adr-N4-7-F:ATGCAGTGGCAGTCCACAAACTTCACACAAGCTCTC

Primer2:Adr-N4-7-B:GCAGAGCTTGTGTGAAGTTTGTGGACTGCCACTGCT

反应条件为:95℃ 30s,95℃ 30s,55℃ 1min,68℃ 5min,共 18 cycles。转化、挑选克隆、质粒酶切鉴定及直接序列测定(上海英骏完成),以证实突变的发生。将构建成功的质粒、Adr 及 pSW3891 分别转化大肠杆菌 HB101。经大量扩增后,提取制备高纯度无内毒素质粒(德国 Qiagen 试剂盒),经 BamH I 和 Pst I(Promega 公司,美国)内切酶酶切及直接测序鉴定正确后,用生理盐水稀释为 1 g/L,-20℃保存备用。

1.3 核酸疫苗的体外表达及检测

将 Adr、Adr-dN4、Adr-N4-5、Adr-N4-6、Adr-N4-7 及 pSW3891 分别以脂质体法转染 293T 细胞,转染后 72 h 收集培养上清和细胞裂解液,用 Western blot 法检测 MHBs。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收集的培养上清及裂解液 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 2 h;⑤1 %的脱脂奶粉 1:500 稀释 Adr 组免疫 BABL/c 小鼠 8 周后所得的血清。与滤膜共孵育,4℃过夜;⑥PBST 漂洗滤膜 6 次,每次 10 min;⑦封闭液 1:5000 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。

1.4 动物实验

7 周龄 BALB/c 小鼠 60 只,随机分成 6 组,每组 6 只,阴性对照组:以空载质粒 pSW3891 免疫;阳性对照组:以 Adr 核酸疫苗质粒免疫。实验组:共 4 组。分别以 Adr、Adr-dN4、Adr-N4-5、Adr-N4-6、Adr-N4-7 糖基化移位核酸疫苗质粒免疫。采用两侧胫前肌肉注射法,程序为 0、2、4、6 周,每次每鼠注射 100 μg 质粒 DNA。每次免疫前及末次免疫后 2 周眼眶采血,分离血清,-20℃保存备用。

1.5 抗-HBs 检测

采用酶联免疫吸附试验 ELISA 间接法。

1.6 免疫小鼠脾细胞特异性 T 淋巴细胞检测

将末次免疫后 2 周小鼠以拉颈脱臼法处死,采用 ELISPOT 法检测免疫小鼠表面抗原特异性分泌 IFN-γ 的脾细胞数量。具体步骤如下:①包被:试剂盒中的抗 IFN-γ 抗体 50 μl/孔,4℃包被过夜;②获取脾细胞:拉颈脱臼法处死小鼠,无菌取脾研磨,加入 1 %FBS,4℃,1200 r/min,离心 5 min,1 %FBS 洗涤细胞 1 次,加入 1 %ACK 去除红细胞,再次加入 1 %FBS 洗涤细胞 2 次,最后 1 次离心后以 10 % FBS 重悬细胞,计数;③封闭:倒掉包被液,PBS 洗 3 次。试剂盒中的封闭抗体,100 μl/孔,37℃ 1 h;④种入脾细胞:倒掉封闭液,按照实验设计先在 ELISPOT 板中种入相应刺激物(阳性对照组:ConA 刺激;实验组:以特异性多肽刺激;阴性对照组:不加刺激物;空白对照组:不加刺激物也不加细胞,每组设 3 个复孔,每孔种入细胞数

为 5×10^5 个 37°C $5\% \text{CO}_2$ 培养 24 h ; ⑤倒掉细胞和培养液 , 加入冰冷的去离子水 $200\mu\text{l}$ / 孔 , 冰浴 10 min ; ⑥PBS-T 洗 10 次 , 加入生物素标记的检测抗体 $100\mu\text{l}$ / 孔 37°C 1 h ; ⑦PBS-T 洗 5 , 加入 HRP 标记的链亲和素 $100\mu\text{l}$ / 孔 37°C 1 h ; ⑧PBS-T 洗 5 次 , 加入 AEC 显色 $100\mu\text{l}$ / 孔 40 min ; ⑨晾干膜 , 拍照。

1.7 统计方法

应用 SPSS 13.0 统计软件 , 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示 , 两组均数比较采用 t 检验或配对 t 检验 , 多组均数比较采用 ANOVA 单因素方差分析 ($P < 0.05$) 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 N-糖基化移位疫苗的构建

对所构建的 Adr-dN4、Adr-N4-5、Adr-N4-6、Adr-N4-7 疫苗进行直接序列测定结果显示 : 其核酸序列与本研究原先设计的核酸序列完全一致 , 提示 N-糖基化移位的核酸疫苗构建成功。

2.2 各核酸疫苗的体外表达

蛋白质印迹法分析结果显示 将 Adr、Adr-dN4、Adr-N4-5、Adr-N4-6、Adr-N4-7 转染 293T 细胞 72 小时后 , 在所有的细胞裂解液中显示相类似的条带 , 但 AdrM-dN4 是例外 , 它的糖基化位点被去除了 , 从而双糖基化的 MHBs(ggp36)没有出现 ; 在 Adr-dN4 和 Adr-N4-6 的上清中也没有出现表达产物 ; 同时空载体 pSW3891 转染后 , 细胞裂解和上清中均检测不到 MHBs。提示 : Adr、Adr-dN4、Adr-N4-5、Adr-N4-6、Adr-N4-7 体外转染 293T 细胞后 , 均可以在细胞内表达 , 且 Adr、Adr-N4-5、Adr-N4-7 都可将表达产物分泌到细胞外。如图所示 : 除 Adr-N4-6 外 , 糖基化移位突变并不明显影响 HBV 表面抗原中蛋白外源基因在真核细胞中的蛋白表达量及其分泌。在实验中 , 为了更好的进行比对 , 我们同时检测了小鼠的细胞骨架蛋白 Beta-Actin(β -Actin)作为内参。而 Adr-N4-6 在细胞内表达与 Adr 相似 , 但表达蛋白不能分泌到细胞外。

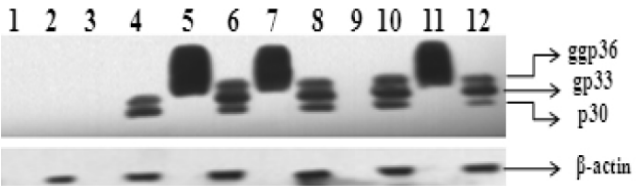


图 1 各组核酸疫苗在 293T 细胞中的表达 ; β -actin 为内参 , 1: pSW3891 转染 293T 细胞上清液 2: pSW3891 转染 293T 细胞裂解液 3: Adr-dN4 转染 293T 细胞上清液 4: Adr-dN4 转染 293T 细胞裂解液 5: Adr 转染 293T 细胞上清液 6: Adr 转染 293T 细胞裂解液 7: Adr-N4-5 转染 293T 细胞上清液 8: Adr-N4-5 转染 293T 细胞裂解液 9: Adr-N4-6 转染 293T 细胞上清液 10: Adr-N4-6 转染 293T 细胞裂解液 11: Adr-N4-7 转染 293T 细胞上清液 12: Adr-N4-7 转染 293T 细胞裂解液。

Fig.1 Express of DNA vaccines in 293T cell line; β -actin is Internal Control , 1: supernatant of pSW3891 transfected 293T cell 2: lysate of pSW3891 transfected 293T cell 3: supernatant of Adr-dN4 transfected 293T cell 4: lysate of Adr-dN4 transfected 293T cell 5: supernatant of Adr transfected 293T cell 6: lysate of Adr transfected 293T cell 7: Adr-N4-5 transfected 293T cell supernatant of 8: lysate of Adr-N4-5

transfected 293T cell 9: supernatant of Adr-N4-6 transfected 293T cell ; 10: lysate of Adr-N4-6 transfected 293T cell ; 11: supernatant of Adr-N4-7 transfected 293T cell ; 12: lysate of Adr-N4-7 transfected 293T cell

2.3 N-糖基化移位核酸疫苗及 Adr 核酸疫苗免疫 BALB/c 小鼠的抗体应答

各组核酸疫苗质粒免疫 BALB/c 小鼠血清抗 -HBs 动态观察结果表明 : Adr 组及各 N-糖基化移位疫苗组在第一次免疫两周后血清中即可检测到特异性抗 -HBs 第四次免疫后 , 小鼠特异性抗体滴度达到最高峰 ; Adr 免疫组小鼠第 8 周抗 -HBs 滴度达 1:121500 , 略高于其他免疫组小鼠 , 但与 Adr-N4-5、Adr-N4-7 相比无统计学差异 ($P > 0.05$) , 与 Adr-dN4 和 Adr-N4-6 组相比有显著的统计学差异 ($P < 0.05$)。而阴性对照组无抗体反应(图 2)。

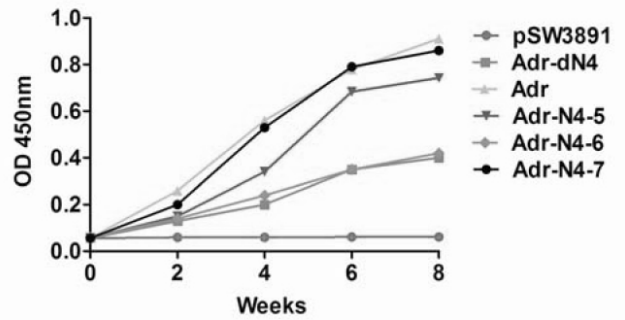


图 2 各组疫苗免疫小鼠血清抗 -HBs 吸光度(OD)值动态变化(1:500)
Fig.2 Dynamic changes of Anti-HBs in the sera of mice in different groups(1:500)

2.4 免疫小鼠表面抗原特异性分泌 IFN- γ 脾细胞数量的检测

应用 ELISPOT 法观察各组小鼠脾脏中表面抗原特异性分泌 IFN- γ 的脾细胞。结果显示 : Adr、Adr-dN4、Adr-N4-5、Adr-N4-6 和 Adr-N4-7 各组小鼠表面抗原特异性分泌 IFN- γ 的脾细胞分别为 138.6/ 百万细胞、66.5/ 百万细胞、123.9/ 百万细胞、65.9/ 百万细胞和 125.2/ 百万细胞。统计学两两比较 Adr 免疫组与 Adr-N4-5、Adr-N4-7 相比无统计学差异 ($P > 0.05$) ; 与 Adr-dN4 和 Adr-N4-6 均有统计学差异 ($P < 0.05$)(图 3)。

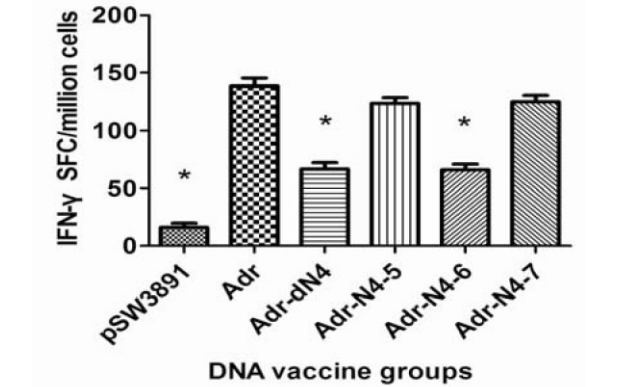


图 3 各组疫苗免疫小鼠表面抗原特异性分泌 IFN- γ 脾细胞的比较 (*表示 $P < 0.05$)

Fig.3 IFN- γ secretion splenocytes of mice immunized with DNA vaccines by ELISPOT(* $P < 0.05$)

3 讨论

本研究采用基因定点突变的技术去除 preS2 区 Asn4 的糖基化位点使其不能糖基化,成功地构建了质粒 Adr-dN4,用来直接观察 Asn4 上连接的糖链与 MHBs 表达的关系。我们通过 Western blot 法检测野生型 Adr 在细胞内和细胞外均可高效表达,这一结果与以前的研究相吻合^[2]。Adr 在细胞内表达三种形式的蛋白:非糖基化(p30)、单糖基化(gp33)和双糖基化(ggp36),其分子量分别为 30、33 和 36KDa。转染细胞上清液较裂解液中表达产物分子量明显增大,是由于 MHBs 在分泌过程中又经过了进一步的修饰,其中包括 preS2 区第 27-47 位氨基酸的 O-连接糖基化^[9,11]。而 Adr-dN4 在细胞内仅表达两种蛋白 p30 和 gp33,以及培养上清液中未检测到表达产物。说明第 4 位氨基酸连接的糖链在真核细胞内 MHBs 合成后的分泌起着决定性作用。同时通过把 Asn4 的糖基化位点重新移位于其下游的第 5、6 或 7 位氨基酸来进一步观察这种修饰是否能够替代 Asn4 上糖链的功能。Western blot 法检测发现 Adr-N4-5 和 Adr-N4-7 在细胞内外表达的情况和 Adr 相类似,说明糖链移至第 5 或 7 位氨基酸,能替代 Asn4 上连接的糖链在 MHBs 细胞内的表达和分泌中的功能。而 Adr-N4-6 仅在细胞内表达而没有分泌到细胞外,说明糖链移至第 6 位氨基酸时影响了 MHBs 的分泌。

已有证据表明糖链和蛋白的分泌密切相关,Arnold JN 等证实 IgD 的 N-聚糖是其合成、分泌必需的,如去除 N-糖链,免疫球蛋白 IgD 则不能被分泌到胞外而留在内质网中^[12]。Lu XY 等研究表明,与乙肝表面抗原大蛋白(LHBs)和小蛋白(SHBs)相比,MHBs 从 2.2.15 细胞中的分泌受糖苷酶抑制剂的影响较为严重,主要是由于在 MHBs 中存在 2 个 N-糖基化位点(preS2 区的 Asn4 和 S 区的 Asn146),其中 preS2 区 Asn4 糖基化位点起着至关重要的作用^[13]。然而这一作用是与糖链在氨基酸上连接位置有关?还是仅仅与糖链本身存在有关?本研究通过把糖链移至第 5 或 7 位氨基酸时,发现 MHBs 也出现在转染后的培养上清中,说明分泌与 MHBs 蛋白的氨基端存在 N-连接糖链有关,并非 N-连接糖链必须存在于 Asn4。但是当把糖链移至第 6 位时,在其转染后的培养上清中未能检测到 MHBs 的存在。推测可能是由于糖链连在第 6 位氨基酸上时,使 MHBs 的整体构象发生了改变,最终伴侣蛋白 Calnexin 不能和其有效地进行结合而阻碍其正确折叠、成熟、转运以及分泌到细胞外。但具体机制需待进一步研究。

糖基化的改变可引起抗原表位的结构改变,所导致的对免疫应答的影响表现为两方面:一方面可形成新的免疫决定簇,诱导特异性免疫应答,增强免疫原性。Abdel 等将流感病毒的 HA 连接上携带 a-gal 表位的糖链,发现其能诱导有效的抗原提呈,增强 HA 抗原的免疫原性。另一方面,可通过糖基化改变分子或空间结构而封闭或破坏抗原表位,降低免疫原性^[14]。Liu M 等发现 HCV 的 EI 抗原的 Asn209 位点突变,CTL 活性明显增强,而 Asn305 位点突变,则能诱导更强的体液免疫^[15]。

在体液免疫方面,本研究通过 ELISA 法检测核酸疫苗质粒免疫 BALB/c 小鼠血清的特异性抗-HBs,并对其进行动态观察发现:Adr 组及各糖基化移位组在第一次免疫两周后血清中即可检测到特异性抗-HBs 抗体,第四次免疫后,小鼠特异性抗

体滴度达到最高峰;Adr 免疫组小鼠第 8 周抗-HBs 滴度达 1:121500,略高于其他免疫组小鼠,但与 Adr-N4-5、Adr-N4-7 相比差别无统计学意义,说明糖链移位至第 5 或 7 位氨基酸,基本不影响 MHBs 特异性抗体的产生,第 5 或 7 位氨基酸附加糖链可以替代 Asn4 上糖链在抗体应答中发挥的作用。与 Adr 相比,Adr-dN4 和 Adr-N4-6 组产生的抗体显著减少,差别具有显著的统计学意义。其原因可能是由于 Adr-dN4 去除糖链和 Adr-N4-6 将糖链移至第 6 位氨基酸,导致 MHBs 极少或没有被分泌到细胞外,其难以经 B 细胞和 DC 细胞等抗原递呈细胞的递呈,而激起有效的体液免疫反应。说明对于 MHBs 来说,表达蛋白分泌到细胞外对诱导机体产生特异性抗体是至关重要的。

采用 ELISPOT 法检测各组免疫小鼠脾脏中表面抗原多肽特异性淋巴细胞,结果显示:Adr 组小鼠表面抗原特异性的脾细胞为 138.6/百万细胞,与 Adr-N4-5、Adr-N4-7 相比无统计学差异,但与 Adr-dN4 和 Adr-N4-6 比有显著统计学差异。说明糖链移至第 5 或 7 位氨基酸的 MHBs 核酸疫苗诱导的细胞免疫没有受到明显影响;而去除 Asn4 糖链或糖链移至第 6 位氨基酸时,在诱导特异性淋巴细胞应答方面出现了障碍。Rush C 等研究表明,DNA 疫苗表达的抗原量是启动有效的 T 细胞免疫反应的重要因素之一。CD4⁺T 细胞免疫反应要求有持续的抗原暴露和有效的抗原量,而且 CD4⁺T 细胞的辅助作用对 CTL 的启动和记忆性 CTL 的形成是重要的,因此,如果增加了 DNA 疫苗表达的抗原量,CD4⁺Th1 细胞介导的免疫反应就会被增强,从而也增强了 CD8⁺T 细胞免疫反应^[16,17]。本研究发现 MHBs 的分泌障碍也可能是导致了其细胞免疫应答下降的原因。因此,DNA 疫苗表达抗原的分泌也是启动有效的 T 细胞免疫反应的重要因素之一,但具体作用机制需待进一步探索。

总之,氨基端的 N-连接糖链是 MHBs 分泌的必需条件之一。这一功能与氨基酸位置无明显相关,分泌量与糖链的数量、种类或分子大小是否有关尚需进一步探索。氨基端糖链具有引导蛋白分泌的功能,是 MHBs 分子特有的,还是病毒蛋白表达时的共性。如 HBcAg 在表达过程中仅存在于肝细胞内而不能分泌到细胞外^[18],可否在其氨基端人为附加 N-连接糖链引导 HBcAg 向细胞外分泌,从而改变 HBcAg 的免疫原性,值得进一步研究。

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] Xing YP, Huang ZH, Wang SX, et al. Immunogenicity of new DNA vaccine encoding for middle hepatitis B surface antigen[J]. 2002, 28: 423-425(In Chinese)
- [3] Hadziyannis SJ, Vassilopoulos D. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B[J]. Hepatology, 2001, 34: 617-624
- [4] Heermann KH, Kruse F, Seifer M, et al. Immunogenicity of the gene S and Pre-S domains in hepatitis B virions and HBsAg filaments[J]. Intervirology, 1987, 28: 14-25
- [5] Lu X, Mehta A, Dwek R, et al. Evidence that N-linked glycosylation is necessary for hepatitis B virus secretion[J]. Virology, 1995, 213: 660-665
- [6] Gerlich WH, Heermann KH, Lu X. Functions of hepatitis B surface proteins[J]. Archives of virology,Supplementum, 1992, 4: 129-132

(下转第 2431 页)

殖与分化,并减少其凋亡,在临床应用上也将是一种更简单、快速的方法。

为了更好的预防术后血管再狭窄,本实验通过建立兔颈总动脉球囊损伤模型,术后给予辛伐他汀及重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)药物干预治疗,来探讨辛伐他汀及 rhG-CSF 在动脉内膜损伤后内膜修复的影响,结果发现辛伐他汀可促进损伤内膜修复及预防血管再狭窄,长期服用可以增加外周血 CD34⁺ 细胞, rhG-CSF 可明显增加外周血 CD34⁺ 细胞及预防血管在狭窄;辛伐他汀与 rhG-CSF 联合用药可明显增加外周血 CD34⁺ 细胞、加速内皮修复与预防再狭窄,较单一用药具有更好的疗效。

参考文献(References)

- [1] Fattori R, Piva T. Drug-eluting stents in vascular intervention [J]. Lancet, 2003, 361: 247-249
- [2] Keith C, Ozaki MD. Cytokines and the Early Vein Graft-Strategies to Enhance Durability[J]. J Vasc Surg, 2007, 45: 92-98
- [3] 刘丽, 黄从新. 冠状动脉支架术后再狭窄 [J]. 武汉大学学报, 2007, 28(3): 404-408
- [4] Palmaz JC, Hunter G, Carson SN, et al. Postoperative carotid restenosis due to neointimal fibromuscular hyperplasia: clinical, angiographic and pathological findings[J]. Radiology, 1983, 148: 699-702
- [5] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. Science, 1997, 275 (5302): 964-967
- [6] Bertolini F, Mancuso P, Gobbi A, et al. The thin red line: Angiogenesis in normal and malignant hematopoiesis [J]. Exp Hematol, 2000, 28(9): 993-1000
- [7] Zeng L, Xiao Q, Margariti A, et al. HDAC3 is crucial in shear and

VEGF-induced stem cell differentiation toward endothelial cells [J]. Cell Bio, 2006, 174 (7): 1059-1069

- [8] Torsney E, Mandal K, Halliday A, et al. Characterisation of progenitor cells in human atherosclerotic vessels [J]. Atherosclerosis, 2007, 191(2): 259-264
- [9] Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al. Ischemia and Cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization [J]. Nat Med, 1999, 5: 434-438
- [10] 王改玲, 肖传实, 邱龄, 等. 粒细胞集落刺激因子对内皮前体细胞的动员 [J]. 医学研究生学报, 2006, 19 (4): 3342-3371
- [11] 吴俊, 陈绍良. 重组人粒细胞集落刺激因子修复大鼠动脉损伤 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(2): 4630-4633
- [12] Maron DJ, Fazio S, Linton MF. Current perspectives on statins [J]. Circulation, 2000, 101: 207-213
- [13] Fox A, Smythe J, Fisher N, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells into the circulation in burned patients [J]. Br J Surg, 2008, 95 (2): 244-251
- [14] Assmus B, Urbich C, Aicher A, et al. HMG-CoA reductase inhibitors reduce senescence and increase proliferation of endothelial progenitor cells via regulation of cell cycle regulatory genes [J]. Circ Res, 2003, 92: 1049-1055
- [15] 周亚林, 杨乃全. 辛伐他汀影响内皮祖细胞数量、粘附及凋亡的研究 [J]. 徐州医学院学报, 2009, 29(2): 86-88
- [16] Schömig K, Busch G, Steppich B, et al. Interleukin-8 is associated with circulating CD133⁺ progenitor cells in acute myocardial infarction [J]. Eur Heart J, 2006, 27: 1032-1037
- [17] Landmesser U, Bahlmann F, Mueller M, et al. Simvastatin versus ezetimibe pleiotropic and lipid-lowering effects on endothelial function in humans [J]. Circulation, 2005, 111: 2356-2363

(上接第 2446 页)

- [7] Liu Y, Simsek E, Norton P, et al. The role of the downstream signal sequences in the maturation of the HBV middle surface glycoprotein: Development of a novel therapeutic vaccine candidate [J]. Virology, 2007, 365(1): 10-19
- [8] Xing Y, Huang Z, Lin Y, et al. The ability of Hepatitis B surface antigen DNA vaccine to elicit cell-mediated immune responses, but not antibody responses, was affected by the deglycosylation of S antigen [J]. Vaccine, 2008, 26(40): 5145-5152
- [9] Werr M, Prange R. Role for calnexin and N-linked glycosylation in the assembly and secretion of hepatitis B virus middle envelope protein particles [J]. Journal of virology, 1998, 72: 778-782
- [10] Ito K, Qin Y, Guarnieri M, et al. Impairment of Hepatitis B Virus Virion Secretion by Single-Amino-Acid Substitutions in the Small Envelope Protein and Rescue by a Novel Glycosylation Site [J]. J Virol, 2010, 84(24): 12850-12861
- [11] Schmitt S, Glebe D, Alving K, et al. Analysis of the pre-S2 N- and O-linked glycans of the M surface protein from human hepatitis B virus [J]. The Journal of biological chemistry, 1999, 274: 11945-11957
- [12] Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, et al. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins.

Annual review of immunology, 2007, 25: 21-50

- [13] Lu X, Lu Y, Geschwindt R, et al. Hepatitis B virus MHBs antigen is selectively sensitive to glucosidase-mediated processing in the endoplasmic reticulum [J]. DNA and cell biology, 2001, 20: 647-656
- [14] Abdel-Motal UM, Guay HM, Wigglesworth K, et al. Immunogenicity of influenza virus vaccine is increased by anti-gal-mediated targeting to antigen-presenting cells [J]. Journal of virology, 2007, 81: 9131-9141
- [15] Liu M, Chen H, Luo F, et al. Deletion of N-glycosylation sites of hepatitis C virus envelope protein E1 enhances specific cellular and humoral immune responses [J]. Vaccine, 2007, 25: 6572-6580
- [16] Rush C, Mitchell T, Garside P. Efficient priming of CD4⁺ and CD8⁺ T cells by DNA vaccination depends on appropriate targeting of sufficient levels of immunologically relevant antigen to appropriate processing pathways [J]. Journal of immunology, 2002, 169: 4951-4960
- [17] Wang JC, Livingstone AM. Cutting edge: CD4⁺ T cell help can be essential for primary CD8⁺ T cell responses in vivo [J]. Journal of immunology, 2003, 171: 6339-6343
- [18] 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