

携带 A β 37-42 肽段的重组乙肝病毒表面抗原病毒样颗粒的制备

蒋桂云¹ 陈念华² 付远辉³ 焦月盈³ 徐青³ 何金生^{1,3}

摘要 目的 采用杆状病毒表达系统制备携带 A β 37-42 肽段的重组乙肝病毒表面抗原 (HBsAg) 病毒样颗粒 (VLPs)。方法 将 A β 42 分子的 C 末端 6 个氨基酸进行 3 个串联后, 插入到 HBsAg 的 113 aa 与 114 aa 之间, 利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统 构建表达 HBsAg A β 37-42 的重组杆状病毒载体 转染 Sf9 细胞, Western blot 鉴定目的蛋白表达情况, 用氯化铯 (CsCl) 密度梯度超速离心纯化, 电镜观察 VLPs 的形态。结果 制备并纯化出 HBsAg VLPs 和携带 A β 37-42 肽段的 HBsAg VLPs (HBsAgA β 37-42 VLPs)。结论 制备携带 A β 抗原表位的重组 HBsAg 作为一种阿尔茨海默病 (AD) 疫

苗具有一定的可行性 值得进一步探讨。

关键词 阿尔茨海默病; 乙肝病毒表面抗原; 杆状病毒表达系统; 病毒样颗粒

中图分类号 R 741.16; Q 78

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)08-1067-05

2014-02-25 接收

基金项目: 中央高校基本科研业务费 (编号: 2012JBZ003)

作者单位: ¹安徽医科大学免疫学教研室, 合肥 230032

²烟台市第二中学, 烟台 264000

³北京交通大学生命科学与生物工程研究院, 北京 100044

作者简介: 蒋桂云, 女, 硕士研究生;

何金生, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: jshhe@bjtu.edu.cn

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是以渐进性记忆力减退为主要临床症状的疾病。到目前为止, 世界 AD 患者将近 3 700 万^[1-2]。近年来, 以 A β 42 为靶向的治疗性 AD 疫苗引起广泛关注, 制约 AD 疫苗研制的因素: 首先是 A β 42 为 AD 患者的自身抗原, 存在免疫耐受问题。既往研究^[3]表明高密度、多价结构的病毒样颗粒 (virus-like particles, VLPs) 一类的抗原能够诱导机体产生高滴度的抗体反应, 强大的抗体应答能够突破免疫耐受。其次, 研究人员^[4]采用 A β 42 C 末端的 6 个氨基酸免疫动物, 能够获得识别 A β 42, 不识别 A β 40 的抗体, 避免了干扰 A β 40 的正常功能。另外, 作为 A β 治疗性疫

The study on the effect of silencing p70S6K on the proliferation and activation of HSC-T6

Zhan Shuxiang^{1,2}, Huang Cheng^{1,2}, Ma Taotao^{1,2}, et al

(¹School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Institute for Liver Diseases of Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effect of suppressing p70S6K (ribosomal protein S6 kinase) expression on the proliferation and activation of hepatic stellate cell strain (HSC-T6) *in vitro*. **Methods** CCl₄ induced liver fibrosis model in rats and then the phosphorylated p70S6K (P-p70S6K) level was determined in fibrotic liver tissue. After pretreated with Rapamycin or siRNA targeting p70S6K, HSC-T6 was stimulated with PDGF and then the proliferation and activation of it were observed. Western blot and RT-PCR were used to detect the protein and mRNA expression of p70S6K, P-p70S6K, α -SMA and Collagen I. **Results** The P-p70S6K level obviously increased in rat fibrotic liver tissue. The Rapamycin pretreatment significantly decreased the P-p70S6K level and inhibited PDGF-mediated proliferation and the expression of α -SMA, Collagen I in HSC-T6. p70S6K-siRNA down-regulated the expression of p70S6K in mRNA and protein level and meanwhile decreased the expression of α -SMA, Collagen I and P-p70S6K induced by PDGF in HSC. **Conclusion** Blocking p70S6K expression by Rapamycin and p70S6K-siRNA can suppress the activation and proliferation of HSC to a certain extent, maybe providing new ideas and targets for the prevention and treatment of liver fibrosis.

Key words HSC-T6; p70S6K; small interfering RNA; Rapamycin; hepatic fibrosis

苗主要免疫对象的老年人,存在免疫衰老现象^[5]。招募童年时期的记忆性 T 淋巴细胞,是突破免疫衰老的一种方法^[6]。本实验将 A β 42 分子的 C 末端 6 个氨基酸进行 3 个串联后,插入到乙肝病毒表面抗原 (hepatitis B virus surface antigen, HBsAg) 的 113 aa 与 114 aa 之间,制备融合有 A β 37-42 肽段的 HBsAg VLPs (HBsAgA β 37-42 VLPs),为提高 A β 42 分子的 C 末端作为疫苗抗原的免疫原性提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株、载体和感受态 杆状病毒表达系统 (包括 *E. coli* 菌株 DH10Bac、质粒 pFastBac1) 和草地贪夜蛾细胞 (Sf9) 购自美国 Invitrogen 公司;载体 pMD18-T 购自日本 TaKaRa 公司;菌株 *E. coli* DH 5 α 为本室保存。

1.2 主要试剂 引物合成及 DNA 测序由华大基因完成;A β 37-42 肽段的 HBsAg 基因 (HBsAgA β 37-42) 由上海生工合成;质粒小量提取及胶回收试剂盒购自美国 Promega 公司;T4DNA 连接酶、Ex Taq 聚合酶及 DNA Marker 购自日本 TaKaRa 公司;SF900 培养基购自美国 Gibco 公司;胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自美国 Hyclone 公司;核酸内切酶及预染蛋白 Marker 购自美国 NEB 公司;Cellfectin[®] Reagent 购自美国 Invitrogen 公司。RIPA 裂解液购自碧云天公司;HBsAg 抗体阳性人血清为本室保存;鼠特异性 HBsAg 免疫血清为本实验室制备;兔抗 A β 37-42 抗体购自美国 Abcam 公司;兔抗人、山羊抗小鼠及山羊抗兔 HRP 标记二抗购自北京中杉金桥公司;硝酸纤维素膜购自英国 Amersham 公司;BCA 蛋白定量试剂盒和 ECL 化学发光试剂盒购自美国 Pierce 公司;细胞培养用耗材购自美国 Corning 公司。

1.3 质粒 pMD18-T-HBsAg 的构建 分别设计引物 F1: 5'-GATATCATGGAGAACATCGCATCAG-GACTC-3', R1: 5'-TGGTCCGGTCTGCTGGTTGAT-GATCCTGGAATTAGAGGAC-3'; F2: 5'-GTCCTCTA-ATTCCAGGATCATCAACCACCAGCACCAGGACC-3' 和 R2: 5'-CTCGAGTCAAATGTATACCCAAAGAC-3' (下划线处分别为 EcoR V 和 Xho I 酶切位点),以 pUC57-HBsAgA β 37-42 为模板,扩增 HBsAg 基因,连接至 pMD18-T 载体测序获得质粒 pMD18-T-HBsAg,并测序。

1.4 质粒 pFastBac1-HBsAgA β 37-42 及 pFast-

Bac1-HBsAg 的构建 分别以 EcoR I 和 Xho I 双酶切 pUC57-HBsAgA β 37-42 和 pFastBac1,回收片段和载体,连接,挑选重组子,摇菌,提取质粒 pFastBac1-HBsAgA β 37-42;分别以 EcoR V 和 Xho I 双酶切测序正确的质粒 pMD18T-HBsAg 和 pMTV5-HisA 回收片段和载体连接,挑选重组子,摇菌,提取质粒 pMTV5-HisA-HBsAg;分别以 EcoR I 和 Xho I 双酶切 pMTV5-HisA-HBsAg 和 pFastBac1,回收片段和载体连接,挑选重组子,摇菌,提取质粒 pFastBac1-HBsAg。

1.5 重组杆状病毒 DNA rBacmid-HBsAgA β 37-42 和 rBacmid-HBsAg 的获得 分别取 pFastBac1-HBsAgA β 37-42 和 pFastBac1-HBsAg 转化 DH10Bac 使之发生转座,经蓝白斑筛选,挑选白色单菌落,扩大培养并提取重组杆状病毒 DNA 分子 rBacmid-HBsAgA β 37-42 和 rBacmid-HBsAg。PCR 方法鉴定后,以 Cellfectine reagent 分别转染 rBacmid-HBsAgA β 37-42 和 rBacmid-HBsAg 至 Sf9 细胞,于 28 °C 培养 72 h,待出现细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE) 后,离心收获培养上清液,即为第 1 代毒种,命名为 rBac-HBsAgA β 37-42 和 rBac-HBsAg。

1.6 蛋白的表达与鉴定 待 Sf9 细胞生长汇合度为 90% 时,按感染复数 (multiplicity of infection, MOI) = 5 分别接种 P3 代 rBac-HBsAgA β 37-42 和 rBac-HBsAg,72 h 收获细胞,裂解细胞,进行 SDS-PAGE 电泳,转膜,封闭,用抗 HBsAg 阳性人血清或兔抗 A β 37-42 抗体 4 °C 过夜孵育,洗膜 3 次后,用 HRP-羊抗人或羊抗兔为二抗进行 Western blot 检测。

1.7 HBsAgA β 37-42 和 HBsAg VLPs 的纯化 待 Sf9 细胞生长汇合度为 90% 时,将培养液换成无血清培养液,按 MOI = 5 分别接种 P3 代 rBac-HBsAgA β 37-42 和 rBac-HBsAg,72 h 收获细胞,超声裂解,收集上清液。采用氯化铯 (CsCl) 密度梯度离心 (1.1 ~ 1.4 g/cm³),收集 VLPs,进行 Western blot 检测和电镜观察。

1.8 BCA 法测定样品中蛋白浓度 按照 BCA 法蛋白定量试剂盒说明,采用酶标 96 孔板的方法,测定纯化后蛋白的浓度。

1.9 SDS-PAGE 检测蛋白的纯度 使用 12% 聚丙烯酰胺进行 SDS-PAGE,考马斯亮蓝染色 1 ~ 2 h,然后脱色 1 ~ 2 h,观察结果。

1.10 透射电镜观察 VLPs 形态 纯化后 VLPs 少

许 磷钨酸负染后在透射电子显微镜(荷兰 Philips 公司,EM410)下观察 VLPs 形态。

2 结果

2.1 质粒 pMD18T-HBsAg 的构建及鉴定 质粒 pMD18T-HBsAg 经 EcoR V 和 Xho I 双酶切鉴定,产生一条 2 692 bp 和一条 693 bp 条带,与预期条带大小一致,见图 1,并通过测序,序列也与标准序列一致。

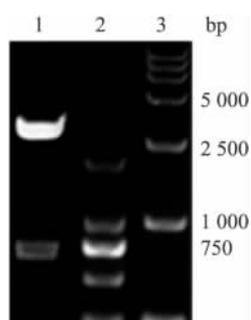


图 1 质粒 pMD18T-HBsAg 的酶切鉴定

1: 质粒 pMD18T-HBsAg; 2: DL 2000 Marker; 3: DL 15000 Marker

2.2 pFastBac1-HBsAgA β 37-42 及 pFastBac1-HBsAg 质粒的构建及鉴定 质粒 pFastBac1-HBsAgA β 37-42 及 pFastBac1-HBsAg 经 EcoR I、Xho I 双酶切后分别应产生 4 775、747 bp 和 4 775、693 bp 的条带,与预期条带相符,见图 2 酶切鉴定正确。

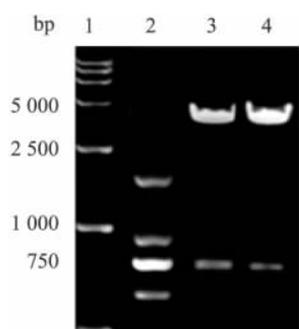


图 2 质粒 pFastBac1-HBsAgA β 37-42 和 pFastBac1-HBsAg 的酶切鉴定

1: DL 15000 Marker; 2: DL 2000 Marker; 3: 质粒 pFastBac1-HBsAgA β 37-42; 4: 质粒 pFastBac1-HBsAg

2.3 重组杆状病毒 DNA 的获得及 PCR 鉴定 转座后,获得表达 HBsAgA β 37-42 和 HBsAg 的重组杆状病毒载体 rBacmid-HBsAgA β 37-42 和 rBacmid-HBsAg,经 PCR 扩增出的片段大小和预期相符,见图 3。

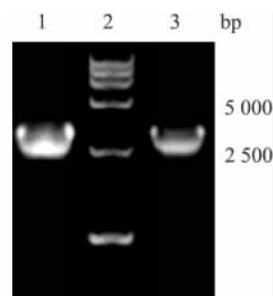


图 3 rBacmid-HBsAgA β 37-42 和 rBacmid-HBsAg PCR 鉴定结果

1: 质粒 rBacmid-HBsAgA β 37-42; 2: DL 15000 Marker; 3: 质粒 rBacmid-HBsAg

2.4 HBsAgA β 37-42 VLPs 和 HBsAg VLPs 纯化及鉴定 分别用 P3 代的重组杆状病毒 rBac-HBsAgA β 37-42 和 rBac-HBsAg 感染 Sf9 细胞 72 h 后,收获细胞裂解,并将细胞裂解液进行 CsCl 密度梯度超速离心后,分离出目的条带层(约 1.19 g/cm³),分别用 HBsAg 抗体阳性人血清(或鼠特异性 HBsAg 免疫血清)和兔抗 A β 37-42 抗体作为一抗,进行 Western blot 鉴定,可见目的条带 HBsAg 约 25 ku 和 HBsAgA β 37-42 约 27 ku,见图 4、5。

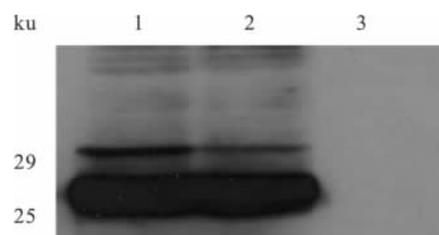


图 4 Western blot 分析 HBsAg 蛋白的表达

1: Sf9 细胞感染 rBac-HBsAgA β 37-42; 2: Sf9 细胞感染 rBac-HBsAg; 3: Sf9 细胞



图 5 Western blot 分析 A β 37-42 肽段的表达

1: Sf9 细胞感染 rBac-HBsAgA β 37-42; 2: Sf9 细胞感染 rBac-HBsAg

2.5 纯化后蛋白浓度的测定 BCA 法蛋白定量结果显示,CsCl 密度梯度离心纯化所得 HBsAgA β 37-42 蛋白浓度为 3.492 mg/ml,HBsAg 蛋白浓度为 3.589 mg/ml。

2.6 纯化后蛋白纯度的检测 使用 CsCl 密度梯度离心纯化蛋白,通过 SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色检测纯化后的蛋白,见图 6,可见纯化后样品在泳道上有 25 ku 左右的条带。

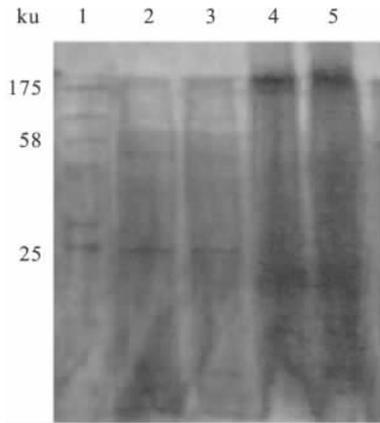


图6 SDS-PAGE 电泳检测纯化后蛋白

1:Marker;2:纯化的 HBsAgAβ37-42;3:纯化 HBsAg;4:未纯化 HBsAgAβ37-42;5:未纯化 HBsAg

2.7 HBsAgAβ37-42 VLPs 和 HBsAg VLPs 电镜观察 取 CsCl 密度梯度超速离心后的 HBsAgAβ37-42 VLPs 和 HBsAg VLPs 进行 2 倍稀释后负染,透射电镜观察,见约 22 nm 的 VLPs,见图 7。

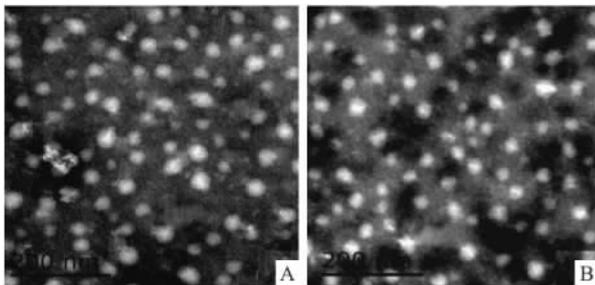


图7 VLPs 透射电镜观察结果

(1% 磷钨酸, pH 6.8 负染, TECNAI ×12 000)

A:纯化的 HBsAgAβ37-42 VLPs;B:纯化的 HBsAg VLPs

3 讨论

HBsAg 是半糖基化的蛋白,由 226 个氨基酸组成,在内质网合成并在腔膜上形成约 22 nm 的 VLPs,每个 VLP 由 100 ~ 150 个多肽组成,其构型复杂,外部含有一个能高效产生免疫原性的区域,这个区域曾被多个团队引用并已成为携带外源表位的一个平台,插入外源性基因序列或表位并不影响颗粒的形成和它的免疫原性^[7-9]。

Smith et al^[10] 首先报道以首蓆尺蠖核型多角体病毒 (autographa californica nuclear polyhedrosis virus, AcNPV) 转移载体表达 β-干扰素以来,包括 HBV 在内的许多外源基因都已在杆状病毒载体表

达系统中得到高水平表达。选用杆状病毒表达系统来表达 HBsAg 及 HBsAg Aβ37-42 具有以下优势:①蛋白表达量高且不影响杆状病毒 DNA 的复制和子代病毒的形成;②表达产物具有生物活性;③对人畜无害,其生产相当安全^[11-12]。

本实验获得表达 HBsAg 和 HBsAgAβ37-42 的重组杆状病毒,在昆虫细胞中合成并组装成 VLPs,但是不能有效地分泌出来,这与 Lanford et al^[13] 报道的在杆状病毒表达系统中表达的 HBsAg 蛋白主要集中在细胞内相符合,但在哺乳动物细胞,如中国仓鼠卵巢细胞 (Chinese hamster ovary, CHO) 细胞中 HBsAg 的表达是可以分泌的,这可能是由于在杆状病毒表达系统中 HBsAg 蛋白表达量高,且形成的 VLPs 多。

本实验利用 Western blot 鉴定 HBsAg 蛋白表达时,可见图中有两条带,分析可能是部分蛋白糖基化的结果,于是产生了非糖基化 25 ku 和糖基化 29 ku 左右的两条带,进一步鉴定发现感染后 72 h 蛋白表达量相对较高。在鉴定 Aβ37-42 短肽时,起初在加样孔附近检测到条带,在其正确分子量对应的位置 (27 ku) 却没有特异性条带出现,由此推测加样孔附近的条带可能是蛋白发生了聚集形成了多聚体所导致。为了避免此类现象的发生,将处理蛋白的温度从 100 °C 5 min 改为 50 °C 12 min,结果检测到目的蛋白分子量大小的条带。

在分析影响此实验的各种因素中,除了蛋白鉴定时的处理温度外,以下几个方面也值得关注:首先转染时质粒的量要足够;另外在以超速离心纯化 VLPs 时,垫层上加入样品时,应注意样品的浓度,如果浓度过高,会导致离心后分层不明显且分不开,影响样品的纯度。

通过本实验,制备出了携带 Aβ37-42 肽段的重组 HBsAgVLPs,在后续的实验中将从免疫效果的评价和体内功能实验进行研究。总之,HBsAg Aβ37-42 VLPs 的获得,为后续动物实验、提高 Aβ42 分子的 C 末端作为疫苗抗原的免疫原性以及提高老年人对疫苗的反应性等奠定了研究基础。

参考文献

[1] Feng G, Wang W, Qian Y, et al. Anti-Aβ antibodies induced by Aβ-HBc virus-like particles prevent Aβ aggregation and protect PC12 cells against toxicity of Aβ1-40 [J]. *J Neurosci Methods*, 2013, 218(1): 48-54.

[2] Fu H J, Liu B, Frost J L, et al. Amyloid-β immunotherapy for

- Alzheimer's disease [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2010, 9(2): 197–206.
- [3] Chackerian B. Virus-like particle based vaccines for Alzheimer disease [J]. *Hum Vaccin*, 2010, 6(11): 926–30.
- [4] Axelsen T V, Holm A, Christiansen G, et al. Identification of the shortest A β -peptide generating highly specific antibodies against the C-terminal end of amyloid- β 42 [J]. *Vaccine*, 2011, 29(17): 3260–9.
- [5] Madeo J, Frieri M. Alzheimer's disease and immunotherapy [J]. *Aging Dis*, 2013, 4(4): 210–20.
- [6] Olkhanud P B, Mughal M, Ayukawa K, et al. DNA immunization with HBsAg-based particles expressing a B cell epitope of amyloid beta-peptide attenuates disease progression and prolongs survival in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Vaccine*, 2012, 30(9): 1650–8.
- [7] Vietheer P T, Boo I, Drummer H E, et al. Immunizations with chimeric hepatitis B virus-like particles (VLPs) to induce potential anti-hepatitis C virus (HCV) neutralizing antibodies [J]. *Antivir Ther*, 2007, 12(4): 477–87.
- [8] Woo W P, Doan T, Herd K A, et al. Hepatitis B surface antigen vector delivers protective cytotoxic T-lymphocyte responses to disease-relevant foreign epitopes [J]. *J Virol*, 2006, 80(8): 3975–84.
- [9] Kotiw M, Johnson M, Pandey M, et al. Immunological response to parental vaccination with recombinant hepatitis B virus surface antigen virus-like particles expressing *Helicobacter pylori* KatA epitopes in a murine *H. pylori* challenge mode [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2012, 19(2): 268–76.
- [10] Smith G E, Summers M D, Fraser M. et al. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector [J]. *Mol Cell Biol*, 1983, 3(12): 2156–65.
- [11] Wang X, Gao L, Deng F, et al. High-level production of a functional recombinant hepatitis B virus polymerase in insect cells with a baculovirus expression system [J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2007, 27(3): 269–73.
- [12] 苗季从, 旭, 谭文杰等. 利用穿梭质粒快速构建乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) 基因的重组杆状病毒 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1998, 12(3): 245–8.
- [13] Lanford R E, Luckow V, Kennedy R C, et al. Expression and characterization of hepatitis B virus surface antigen polypeptides in insect cells with a baculovirus expression system [J]. *J Virol*, 1989, 63(4): 1549–57.

Preparation of a recombinant hepatitis B virus surface antigen virus-like particles expressing A β 37-42

Jiang Guiyun¹, Chen Nianhua², Fu Yuanhui³, et al

(¹ Dept of Immunology, Anhui Medical University, Hefei 230032; ² Yantai No. 2 Middle School, Yantai 264000; ³ College of Life Sciences and Bioengineering, Beijing Jiaotong University, Beijing 100044)

Abstract Objective To prepare a recombinant hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) virus-like particles (VLPs) which carried the peptides of A β 37-42 by using baculovirus expression system. **Methods** For constructed an expressing HBsAg A β 37-42 recombinant bacmid, the encoding sequence of six amino acid short peptide from the carboxy terminus of A β 42 peptide in triplicate were inserted into HBsAg between 113 aa and 114 aa. When the recombinant bacmid contained the gene of interest was confirmed, it was transfected to Sf9 cells for producing recombinant baculovirus and amplifying the baculoviral stock. The recombinant protein was identified by Western blot. The patterns of the VLPs were observed by transmission electron microscopy after the recombinant protein was purified by using CsCl density gradient centrifugation. **Results** HBsAg VLPs and HBsAg VLPs expressing A β 37-42 (HBsAgA β 37-42 VLPs) were successfully constructed and purified. **Conclusion** The expression of A β antigen epitope by HBsAg VLPs is successful and the result is applicable for further *in vivo* investigation as a candidate vaccine of Alzheimer's disease (AD).

Key words Alzheimer's disease; hepatitis B virus surface antigen; baculovirus expression system; virus-like particles