

## 丙型肝炎患者血清中的交叉中和抗体

严石 童一民 华显 魏萍 尹迪 赵平 戚中田

**【摘要】** 目的 分析 HCV 感染者血清中是否存在交叉反应性中和抗体。方法 以分泌表达 HCV 包膜 E2 蛋白真核表达质粒转染的 293T 细胞培养上清液中的 HCV E2 蛋白作为检测抗原,建立检测 HCV E2 抗体的 ELISA 方法,检测 48 份 HCV 抗体阳性的慢性丙型肝炎患者血清,然后用免疫荧光分析血清与 HCV 全长包膜蛋白表达质粒转染的 293T 细胞的结合反应,再用 5 株 HCV 假病毒为模型分析阴性血清的病毒中和活性。结果 48 份抗-HCV 阳性血清中,E2 抗体阳性血清达 36 份,阳性率 75%。免疫荧光分析的结果与 ELISA 检测一致。HCV E2 抗体阳性血清对 5 株 HCV 假病毒的感染性均有不同程度的中和作用,中和活性与 E2 抗体水平相一致。结论 丙型肝炎患者血清中存在交叉中和抗体,提示开发能诱导广泛交叉中和抗体的丙型肝炎疫苗或许具有可行性。

**【关键词】** 丙型肝炎;中和抗体;E2 蛋白

**Cross-neutralization antibodies against HCV in sera of patients with hepatitis C**  
YAN Shi, TONG Yi-min, HUA Xian, WEI Ping, YIN Di, ZHAO Ping, QI Zhong-tian. Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China

Corresponding author: WEI Ping, Email: weiping@yahoo.com.cn; QI Zhong-tian, Email: qizt@smmu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To study whether cross-neutralization antibodies against HCV are present in sera of hepatitis C patients. **Methods** A eukaryotic expression plasmid encoding carboxyl terminal-truncated HCV envelope protein 2 (E2) of H77 strain was constructed and transfected into human 293T cells. Both intracellular E2 and secreted E2 protein in supernatant could be detected by Western blot analysis with anti-E2 McAb. The supernatant was used to assay anti-E2 antibodies in sera of hepatitis C patients by an ELISA kit. The full-length envelope protein expression plasmid was transfected into 293 T cells and the reactivity of transfectant with anti-E2 IgG positive sera were analyzed by immunofluorescence. **Results** Thirty-six of 48 sera samples were detected anti-E2 IgG positive. The intensity of intracellular green fluorescence was paralleled with anti-E2 antibodies level of the tested sera. All the anti-E2

基金项目:上海市基础重点项目(06JC14084);国家自然科学基金(30671921,30770094);国家“863”基金(2006AA02Z401)

作者单位:150030 哈尔滨市,东北农业大学(严石、魏萍、尹迪);第二军医大学微生物学教研室(严石、童一民、华显、尹迪、赵平、戚中田)

通讯作者:魏萍 Email: weiping@yahoo.com.cn

戚中田 Email: qizt@smmu.edu.cn

positive sera could neutralize the infectivity of five strains of HCVpp at various degrees, and the neutralization activity was consistent with the anti-E2 antibodies levels.

**Conclusions** Cross-neutralization antibodies against HCV are present in sera of hepatitis C patients, and development of hepatitis C vaccines that induce broadly-reactive neutralization antibodies may be possible.

**【Key words】** Hepatitis C; Neutralization antibodies; Envelope protein 2

丙型肝炎病毒(HCV)为黄病毒科成员,是引起慢性肝病的主要病原体,其慢性感染率达70%以上,目前尚无有效的疫苗可预防HCV感染。细胞免疫应答在控制和清除HCV感染过程中的作用已被大量研究所证实和相关领域的学者所公认,在HCV感染早期产生强、多特异性和持久的抗HCV细胞免疫应答对于急性丙型肝炎的自然恢复极为重要<sup>[1-4]</sup>。然而,体液免疫应答对HCV清除的影响尚存在争议,抗体是否具有保护作用及其作用程度尚不明确。

近年来建立的装配有功能性的HCV包膜蛋白,核心为小鼠逆转录或HIV衣壳蛋白以及含报告基因的基因组RNA的HCV假病毒(hepatitis C pseudotype particle, HCVpp)以及由细胞培养产生的HCV(HCVcc)为分析包膜蛋白抗体的中和活性提供了良好的模型,尤其是HCVpp,可用于对各基因型/亚型HCV中和抗体的分析<sup>[5-7]</sup>。本研究用4个基因型/亚型的HCVpp分析HCV患者血清的中和活性。

## 材料与方法

### 一、主要材料

分泌表达H77株HCV包膜E2蛋白的真核表达质粒pcDNA3.1-1a661以及表达H77株(1a亚型)、Con-1株(1b亚型)、J6(2a亚型)、J4株(1b亚型)以及UNK3a株(3a亚型)全长包膜蛋白的真核表达质粒由本实验室构建,均以pcDNA3.1为载体。丙型肝炎患者血清由本校附属长海医院感染科和广东省人民医院实验诊断科提供,均为HCV抗体阳性。构建HCVpp采用的质粒由法国里昂ENS大学FL Cosset教授惠赠。凝集素GNA购自Sigma公司。构象依赖性E2单抗H53由法国巴斯德研究所J Dubuisson教授馈赠,E2多抗为BioDesign公司产品,6×His单克隆抗体为Qiagen公司产品。酶标二抗以及FITC标记二抗为Jackson公司产品。

### 二、方法

1. 丙型肝炎患者血清HCV E2抗体的ELISA检测:用Lipofectamine 2000(Invitrogen)将质粒pcDNA3.1-1a661转染293T细胞,48 h后收集细胞培养上清。以GNA包被酶标板,4℃过夜(1 μg/孔),次日37℃封闭2 h,洗板1次,每孔加质粒pcDNA3.1-1a661转染的HEK 293T细胞裂解液100 μl,室温孵育2 h,洗板2次,每孔加1:10稀释的丙型肝炎患者血清100 μl,37℃ 40 min,洗板5次,加HRP-抗人IgG(1:2000稀释),37℃ 40 min,洗板5次,TMB显色,测 $A_{450}/A_{630}$ 。HCV抗体

阴性的8份健康成人血清作为阴性对照,丙型肝炎患者血清的 $A_{450}/A_{630}$ 大于阴性对照平均值的2.1倍为E2抗体阳性。

2. 丙型肝炎患者血清中HCV E2抗体的免疫荧光检测:用Lipofectamine 2000 (Invitrogen)将编码H77株HCV全长包膜蛋白表达质粒pcDNA3.1-E1E2转染293T细胞,48 h后取细胞裂解液进行SDS-PAGE和Western blot分析,一抗为E2多克隆抗体,二抗为AP标记抗羊IgG。同时将质粒转染接种于96孔板内的293T细胞,48 h后吸除孔内的培养液,每孔加甲醇100  $\mu$ l,置于-20℃冰箱固定20 min,然后吸除甲醇,每孔用PBS洗一次,再加0.1% Triton-100 100  $\mu$ l,室温放置20 min,然后吸除,用PBS洗一次,加2% BSA 100  $\mu$ l,室温封闭1 h,然后吸除封闭液,取一孔加E2构象依赖的单抗H53(1:100),其余孔加稀释的丙型肝炎患者或健康人血清100  $\mu$ l(1:50),室温摇动1 h,洗孔2次,于H53单抗孔加FITC-抗小鼠IgG100  $\mu$ l(1:100),其余孔加FITC-抗人IgG100  $\mu$ l(1:100),室温摇动1 h,洗孔2次,于荧光显微镜下观察细胞是否有绿色荧光。

3. HCVpp制备<sup>[5]</sup>:将HEK 293T细胞传代接种于24孔板内,次日以Lipofectamine 2000 2  $\mu$ l以及质粒pcDNA3.1-E1E2 0.1  $\mu$ g(4株HCV E1E2表达质粒分别转染)、pCMV-gag-pol 0.2  $\mu$ g、pCMV-luciferase 0.2  $\mu$ g共转染。以pCMV-gag-pol 0.25  $\mu$ g、pCMV-luciferase 0.25  $\mu$ g共转染作为HCVpp对照上清。12 h后吸除细胞培养上清,加入500  $\mu$ l含10%胎牛血清及双抗的DMEM培养液,置于孵箱内培养24~48 h,然后收集细胞培养上清,高速离心去除残余细胞。

4. HCVpp中和实验:取含HCVpp的培养上清45  $\mu$ l置于微量离心管内,加入HCV患者或健康人血清5  $\mu$ l,混匀,于37℃孵箱放置1 h,随后将混合液加入预先接种有Huh7.5细胞的96孔板,设两个平行孔。过夜培养后换液,72 h后检测每孔的萤火虫酶活性(RLU),计算中和率:(正常人血清孔RLU - HCV患者血清孔RLU - HCVpp对照上清孔RLU)/(正常人血清孔RLU - HCVpp对照上清孔RLU)。

## 结 果

### 一、ELISA检测丙型肝炎患者血清中的E2抗体

凝集素GNA能结合HCV包膜E2蛋白的N-聚糖,因此可将GNA包被于酶标板,以之吸附E2蛋白,从而建立E2抗体的ELISA检测方法。8名健康成人血清的 $A_{450}/A_{630}$ 介于0.045和0.165之间,平均值为0.1019,以之2.1倍0.214为cut off值,则48名丙型肝炎患者血清中,E2抗体阳性血清为36例,阳性率75%。如图1所示。

### 二、免疫荧光分析丙型肝炎患者血清中的包膜蛋白抗体

为了进一步分析ELISA检测结果的准确性,我们挑选了4例健康成人血清和12例E2抗体阳性的丙型肝炎患者血清,根据 $A_{450}/A_{630}$ 可将这12例血清的E2抗体分为低(L1:0.253, L2:0.289, L3:0.243, L4:0.268)、中(M1:0.713, M2:0.744, M3:0.768, M4:0.78)、高(H1:1.295, H2:1.509, H3:1.389, H4:1.147)三种不同

水平。将 H77 株全长 E1E2 表达质粒转染 293T 细胞,细胞裂解液进行 Western blot 和免疫荧光分析均表明质粒转染的 293 T 细胞能表达质粒编码的蛋白(图 2 和图 3)。随后分析 16 例血清与 293 T 细胞的结合反应,结果表明,健康人血清不与转染 E1E2 质粒的 293 T 细胞结合,而 E2 抗体阳性的丙型肝炎患者血清能与 293 T 细胞发生特异性结合,荧光强度与 E2 抗体水平基本正相关(免疫荧光的图片未示)。

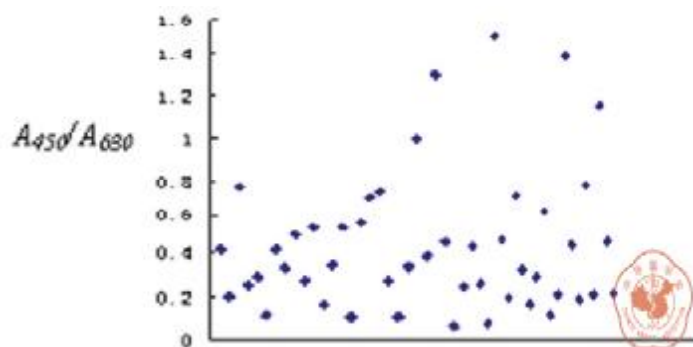


图 1 丙型肝炎患者血清中 HCV E2 抗体的检测

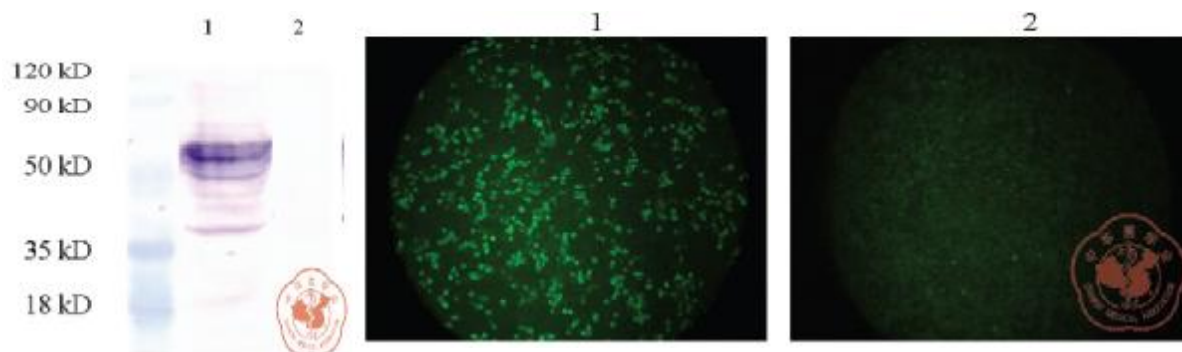


图 2 Western blot 分析 HCV 包膜蛋白在 293T 细胞内的表达  
1. 293 T 细胞转染 HCV 全长包膜蛋白后的裂解液  
2. 293 T 细胞转染模拟载体后的裂解液

图 3 免疫荧光分析 HCV 包膜蛋白在 293 T 细胞内的表达  
1. 293 T 细胞转染 HCV 全长包膜蛋白后的裂解液  
2. 293 T 细胞转染模拟载体后的裂解液

### 三、丙型肝炎患者血清能交叉中和不同株 HCVpp 的感染性

用 5 株 HCVpp 为模型评价血清中 E2 抗体的中和活性,将健康成人血清与 HCVpp 混合以后感染 Huh7.5 细胞的 RLU 值与单纯将 HCVpp 感染 Huh7.5 细胞的 RLU 值的差异低于 5%,表明健康成人血清对 HCVpp 的感染性无明显影响,因此,可以将健康成人血清作为阴性对照,计算 HCV 患者血清对 HCVpp 的中和率。图 4 为 L、M、H(分别代表低、中和高水平 E2 抗体血清)组血清对不同株 HCVpp 的平均中和率。可见,各组 E2 抗体阳性血清均对不同株 HCVpp 有不等的中和作

用,中和率显然与血清的 E2 抗体水平正相关。

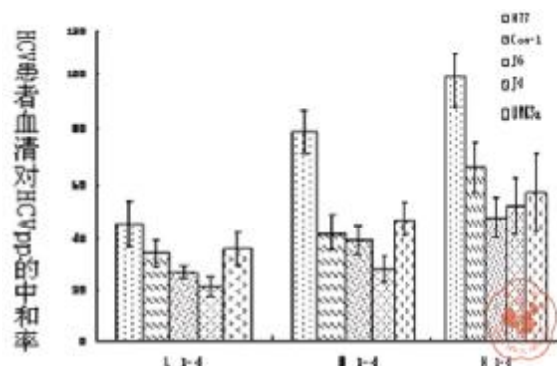


图4 以 HCV 假病毒分析 HCV 包膜蛋白抗体阳性血清的病毒中和活性

## 讨 论

抗体在 HCV 感染过程中的作用一直未有定论,在一些 HCV 感染高危人群,不能检测到 HCV 抗体,但能检测到 HCV 细胞免疫应答,有部分急性感染者并未检测到 HCV 抗体然而能自发清除病毒,这些提示抗体在 HCV 免疫清除过程中的作用可能并不重要<sup>[8,9]</sup>。但也有一些报道发现,在 HCV 感染早期产生包膜蛋白抗体与 HCV 的清除有直接关系,即使在慢性感染阶段,包膜蛋白抗体的升高往往与血清 HCV RNA 水平的降低在发生时间上相一致<sup>[10-12]</sup>,这些现象又提示抗体有利于 HCV 清除。对以上现象的解释以及明确界定抗体在 HCV 免疫清除中的作用,对于认识 HCV 慢性感染的发生机制以及开发 HCV 疫苗有重要意义。如果 HCV 感染能诱导中和抗体,那么 HCV 包膜蛋白显然是关键的中和抗体靶抗原。功能性的 HCV 包膜蛋白由 E1 和 E2 通过非共价键形成异源二聚体,其中 E2 蛋白介导 HCV 与肝细胞的结合,E1 的功能可能主要和病毒进入细胞内的膜融合(病毒包膜与内吞小体膜的融合)有关<sup>[13,14]</sup>。因此,E2 蛋白理论上应该是最重要的中和抗体靶抗原,目前鉴定出的一些能中和 HCVpp 感染性的单克隆中和抗体也主要是针对 E2 蛋白的。

本研究用截短的分泌性 H77 株 E2 蛋白为抗原检测丙型肝炎患者血清中的 E2 抗体,主要是因为 H77 株 E2 蛋白表达水平较高,明显高于 J4 株,可能有利于提高检测的敏感性。结果 48 名丙型肝炎患者血清的 E2 抗体阳性率为 75%。由于大部分 HCV 感染者在急性感染阶段肝损伤的症状不明显,以急性丙型肝炎首次就诊的病例少见,在中国这种现象尤为明显,因此从 HCV 急性感染阶段开始进行系统性抗体以及 HCV RNA 检测的报道不多见。有限的一些对急性 HCV 感染者血清进行的连续观察提示,HCV 感染后包膜蛋白抗体产生滞后,然而在慢性感染阶段,血清中可持久存在包膜蛋白抗体。虽然缺乏这些受检者的临床资料,但根据这些信息,我们认为这些患者主要为慢性感染者。为了验证 ELISA 检测的

特异性,我们进一步用免疫荧光分析血清与表达全长包膜蛋白的 293T 细胞的反应,结果 ELISA 检测的抗体水平与细胞荧光强度基本一致,这表明 ELISA 检测是基本可靠的。H77 株为 1a 型,而我国流行的 HCV 主要为 1b 型,此外,即使不同株包膜蛋白也可能有明显的序列差异,因此,从我们的检测结果可见,E2 抗体具有明显的交叉反应性。

用 HCVpp 为模型,评价低、中、高三种不同水平 E2 抗体的血清对 5 株 HCVpp 的中和活性,结果大部分血清能不同程度的交叉中和 1a、1b、2a、2b、3a 亚型 HCVpp 的感染性,中和活性与 E2 抗体水平呈现正相关。我国流行的 HCV 以 1b 型为主,但各组血清均对 H77 株的中和率最高,而对 1b 亚型的 J4 株的中和率较低。值得注意的是,H77 株 HCVpp 的产量或者感染性最高,显著高于其他四株 HCVpp。经典的 HCV 基因分型主要以 5' -NCR 和非结构区基因序列的差异为依据,并不涉及包膜基因,因此,包膜基因序列也许并不受这些基因分型的限制。我们用免疫荧光法检测了部分 E2 抗体阳性血清与这 5 株全长包膜蛋白表达质粒转染的 293 T 细胞的反应,发现血清与 H77 质粒转染细胞的结合明显强于与其他 4 株 E1E2 质粒转染细胞的结合(结果未显示),虽然 E1E2 蛋白的表达水平是影响荧光强度的可能原因,但 H77 株包膜蛋白的抗原性与血清抗体所针对的表位更接近也有可能。

总之,本研究在大多数丙型肝炎患者血清中检测出 E2 抗体,并且用 HCVpp 模型证明丙型肝炎患者血清能交叉中和多个基因型/亚型 HCVpp 的感染性,且血清的中和活性与 E2 抗体水平正相关。

#### 参 考 文 献

- 1 Grakoui A, Shoukry NH, Woollard DJ, et al. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science*,2003,302:659-662.
- 2 Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, et al. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci USA*,2002,99:15661-15668.
- 3 Ulsenheimer A, Gerlach JT, Gruener NH, et al. Detection of functionally altered hepatitis C virus-specific CD4 T cells in acute and chronic hepatitis C. *Hepatology*,2003,37:1189-1198.
- 4 Ulsenheimer A, Lucas M, Seth NP, et al. Transient immunological control during acute hepatitis C virus infection: ex vivo analysis of helper T- cell responses. *J Viral Hepat*,2006,13:708-714.
- 5 Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med*,2003,197:633-642.
- 6 Hsu M, Zhang J, Flint M, et al. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci USA*,2003,100:7271-7276.
- 7 Wakita T, Pietschmann T, Kato T, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*,2005,11:791-796.
- 8 Kamal SM, Amin A, Madwar M, et al. Cellular immune responses in seronegative sexual contacts of acute hepatitis C patients. *J Virol*, 2004,78:12252-12258.
- 9 Post JJ, Pan Y, Freeman AJ, et al. Clearance of hepatitis C viremia associated with cellular immunity in the absence of seroconversion in the hepatitis C incidence and transmission in prisons study cohort. *J Infect Dis*,2004,189:1846-1855.
- 10 Ishii K, Rosa D, Watanabe Y, et al. High titers of antibodies inhibiting the binding of envelope to human cells correlate with natural resolution of chronic hepatitis C. *Hepatology*,1998,28:1117-1120.

- 11 Yu MY, Bartosch B, Zhang P, et al. Neutralizing antibodies to hepatitis C virus (HCV) in immune globulins derived from anti-HCV-positive plasma. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101:7705-7710.
- 12 Logvinoff C, Major ME, Oldach D, et al. Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101:10149-10154.
- 13 Op De Beeck A, Voisset C, Bartosch B, et al. Characterization of functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. J Virol, 2004, 78:2994-3002.
- 14 Bartosch B, Cosset FL. Cell entry of hepatitis C virus. Virology, 2006, 348:1-12.

(收稿日期:2008-02-04)

(本文编辑:王丹静)

严石,童一民,华显,等. 丙型肝炎患者血清中的交叉中和抗体[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版, 2008, 2(3):131-137.