

## 丙型肝炎病毒疫苗研究进展

詹金美 刁永艳 张欣欣

**【摘要】** 近年来,在人体内及黑猩猩试验模型中发现 HCV 天然免疫与特异性免疫能自发清除病毒,表明发展部分有效的针对不同类型的 HCV 疫苗是可能的,这对慢性丙型肝炎的防治有重大意义。此文综述了 HCV 感染相关免疫保护机制、疫苗研制情况及今后发展方向。

**【关键词】** 丙型肝炎病毒;疫苗;免疫应答

**Recent development of hepatitis C virus vaccine** ZHAN Jin-mei\*, DIAO Yong-yan, ZHANG Xin-xin. \*Department of Infectious Disease, Longyan Second Hospital, Longyan 364000, China

Corresponding author: ZHANG Xin-xin, E-mail: zhangxx@shsmu.edu.cn

**【Abstract】** The recent discovery shows that the clearance of hepatitis C virus is associated with natural immunity and specific immune responses in human and in the chimpanzee challenge model. Vaccine efficacy has allowed optimism about the development of at least a partly effective vaccine against this heterogeneous pathogen that is responsible to prevent and treat the chronic HCV infection around the world. In this review, we will summarize current development regarding the correlates of immunity to HCV as well as the results of pre-clinical studies using vaccine candidates designed to recapitulate protective immunity and the future HCV vaccination development directions.

**【Key words】** Hepatitis C virus; Vaccine; Immune response

目前,丙型肝炎的经典治疗是聚乙二醇干扰素(PEG IFN- $\alpha$ )和利巴韦林联合治疗,费用高、副作用较多,且只有 50% 的持续病毒学应答,对基因 1 型感染者应答率更低<sup>[1]</sup>,因而只有研发有效且经济的疫苗,才能对其发病率和病死率有很好地控制。

### 一、抗 HCV 感染的免疫保护机制

有效的抗 HCV 疫苗在十年前被认为是不可可能的,主要基于以下 3 点:(1)HCV 感染呈慢性持续性倾向;(2)感染过的人和黑猩猩可再次感染;(3)正链 RNA 具有多种不同基因型与高变异性。而目前有两个有利因素:一是 50% 急性感染能通过特异性免疫自发清除病毒,通过合适的疫苗来重复这种免疫是可能的,二是在人和黑猩猩上发现天然免疫清除病毒的依据。大部分曾感染 HCV 的人和黑猩猩在再次暴露时可以有保护作用,甚至对不同的病毒株也

有,尤为重要的是能阻止进展为慢性持续性感染,能起到有效预防,这和 HCV 发病机制有关<sup>[1]</sup>。

从许多对急性 HCV 感染后恢复的患者研究中发现,其感染控制与细胞免疫相关。被感染的人和黑猩猩早期表达大量 MHC-I 限制性 HCV 特异性 CD8<sup>+</sup> 细胞和 MHC-II 限制性 CD4<sup>+</sup> T 细胞应答,能清除病毒。急性丙型肝炎的缓解与较强的 MHC-II 限制性 CD4<sup>+</sup> 应答和 MHC-I 限制性 HCV 特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞应答及 Th1 细胞因子模式占优势有关。这些激活的 T 细胞分泌促炎细胞因子 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-2 等,在细胞培养试验中有直接抗病毒作用,在急性感染时能明显降低病毒载量,特异的 CD8<sup>+</sup> 细胞能杀死被感染的细胞;但 Thimmes 的研究却发现病毒载量减少与此无相关性,认为细胞激活在病毒控制中不是主要因素,而细胞免疫应答不依赖 gpE1、gpE2 抗体,提示这类抗体在急性感染恢复中不是主要的<sup>[1]</sup>。

目前尚未建立有效的 HCV 细胞培养系统,HCV 的体液免疫对于保护再感染和 HCV 相关疾病的致病机制还不甚清楚。随着表面含有 HCV 膜糖蛋白的病毒假颗粒(HCVpp)构建成功,发现患者不仅有中和此 HCVpp 的抗体,而且此抗体还对其他基因型有交叉中和作用,这表明 HCV 交叉中和抗体广泛存在,能用作开发疫苗策略。最近 HCVpp 感染的相关

基金项目:国家自然科学基金(30471523)

作者单位:364000,福建省龙岩市第二医院感染科(詹金美);

136200,吉林省辽源市第二人民医院感染科(刁永艳);

200025,上海交通大学附属瑞金医院感染科(张欣欣)

欣欣)

通讯作者:张欣欣, E-mail: zhangxx@shsmu.edu.cn

保护试验结果提示,此类中和抗体与急性感染者恢复有关<sup>[1]</sup>。Youn等<sup>[2]</sup>发现感染HCV的黑猩猩病毒数量急剧减少与持续的E2抗体应答有关。

在缺乏抗膜糖蛋白抗体的情况下,激发广泛的CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>细胞应答不能阻止慢性持续性感染。有学者用来源于HCV 1型的NS3-4-5-C多蛋白配以佐剂ISCOMATRIX接种5只黑猩猩,再予HCV-H攻击,观察到持续的病毒血症<sup>[1]</sup>。这提示仅仅诱导细胞免疫是不够的,更为有效的疫苗要能激发抗膜中和抗体和广泛的细胞免疫应答。但近期Folgori等<sup>[3]</sup>发现只通过T细胞免疫是可行的,可作为新型的免疫治疗。

HCV不能整合到宿主基因组里,能持续逃避宿主天然与特异性免疫清除,抑制I型IFN产生,抑制NK细胞,很容易产生突变,增加对CTL介导的抵抗力和抗抗体中和作用。在持续HCV感染中,效应T细胞应答较弱,产生耐受甚至耗竭,部分与病毒逃避免疫清除有关,如宿主能激发早期广泛的Th1型CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>细胞应答,并能激发天然免疫,则病毒就能清除,而病毒中和抗体的存在能提高这一进程。

## 二、疫苗研制现状

疫苗可分为预防性疫苗与治疗性疫苗,包括各种重组亚单位疫苗与多肽疫苗、载体疫苗、DNA(核酸)疫苗、转基因植物疫苗等。

### 1. 重组亚单位疫苗与多肽疫苗

重组亚单位疫苗与多肽疫苗具有传统亚单位疫苗的很多特点,安全性好,但是免疫原性较差,因此需要佐剂、特殊的结构与特殊的递送系统。目前试验中的有含合适佐剂的重组糖蛋白E1或重组糖蛋白E1/E2,在人或黑猩猩中能激发体液和细胞应答,保护黑猩猩,防止慢性感染;重组的HCV-C/E1/E2在小鼠中表现强的免疫原性。来源于哺乳动物细胞的含佐剂的重组HCV-E1/E2抗原,接种黑猩猩,激发了抗包膜蛋白抗体和辅助性T细胞应答;当用与接种基因型同种的病毒攻击这些免疫过的动物时,存在高度免疫应答的能得到完全保护。用敏感的RT-PCR检测,在外周血和肝组织里始终未检测到病毒,这和E2抗体滴度直接相关,它能阻止E2(或病毒本身)和CD81接触,CD81为HCV进入细胞与之相连接的重要受体组分之一。而且,虽然低应答动物被感染,但大部分为亚临床经过的急性感染,没发展成持续的病毒携带状态。总而言之,这些

数据表明接种组的病毒携带显著低于未经免疫的对照组,而用异型病毒(HCV-H)攻击该免疫动物(HCV1型),大部分呈现急性感染过程,与对照组相比,很少发展为病毒携带状态。依据这些前期临床数据,现进入I期临床测试阶段<sup>[1]</sup>。克隆纯化的单一HCV多聚蛋白(C、NS3、NS4a、NS4b、NS5a、NS5b),以CpG为基序的寡核苷酸(CPG ODN)为佐剂,在小鼠模型中明显提高血清抗体和T细胞增殖反应;Vajdy等<sup>[4]</sup>发现NS3、NS5组引起的抗体反应与IFN- $\gamma$ 的产生高于核心蛋白和NS4组。另有研究发现,HCV的NS3、NS4、NS5B的4个HLA-I类、II类抗原表位肽,在HCV感染的患者外周血单个核细胞中,能再次激发T细胞,产生IFN- $\gamma$ <sup>[5]</sup>。

### 2. 载体疫苗

载体疫苗是将抗原基因通过无害的微生物载体进入体内诱导免疫应答,可持续表达大量的目的抗原,且病毒本身作为佐剂可有效地进行主动免疫治疗。各种表达HCV基因的减毒、缺陷病毒载体正在研究中,如腺病毒、AVIPOX、 $\alpha$ 病毒和痘苗病毒等;腺病毒作为载体,编码非结构蛋白,在猕猴模型里进行免疫原性研究,其血清6型优于血清5型<sup>[6]</sup>;在恒河猴,用不同血清型的腺病毒载体在初免-加强免疫中,能诱导广泛、显著的交叉反应<sup>[7]</sup>。目前正处于前期临床试验的有:改建的痘苗病毒(表达E1/E2)、缺陷的腺病毒(表达NS3)均能诱导转基因小鼠Th1应答;Semliki森林病毒(表达NS3)在小鼠里诱导特异性的NS3-CTL应答<sup>[1]</sup>;复制缺陷的水泡口炎病毒VSVdeltaG(表达C/E1/E2),接种BALB/c系小鼠,产生针对C、E2抗体应答,也产生对C、E1、E2特异性的由CD8<sup>+</sup>T细胞产生的IFN- $\gamma$ ,并有对E2(CT26-hghE2)抗肿瘤、CT26-hghE2特异性的IFN- $\gamma$ 生成和E2特异性的CD8<sup>+</sup>T细胞激活<sup>[8]</sup>。

### 3. DNA疫苗

DNA疫苗是将编码特异性抗原的基因插入到质粒中,构建重组载体,注射体内后可表达相应的抗原;在体内可持续表达,稳定性好,生产成本低,大量的变异可能性很小,可减少加强注射剂量,可构建多价疫苗,免疫效果好,维持时间长,具有潜在的优越性。Gao等<sup>[9]</sup>发现表达NS3的质粒(pHCV-NS3)和微基因疫苗pHCV-NS3-Th1[抗原表位直接替换恒定链上的II类相关恒定链短肽(CLIP)]在BALB/c小鼠体内产生特异性抗体和CD4<sup>+</sup>T细胞增殖反应,分泌IL-4和IFN- $\gamma$ ;pHCV-E1/E2/P7<sup>[10]</sup>、以核蛋白为佐剂

的 pIDKE<sup>[11]</sup>均表现了强大的体液和 Th1 细胞应答; pHCV-C 可提高特异性的 CD8<sup>+</sup> T 细胞应答<sup>[12]</sup>; 含两个 HCV 的 CTL 表位的 DNA 疫苗 (pcDNA3.1-CTL), 在 BALB/c 小鼠里诱导对这两个抗原肽特异性 CTL 应答, 同时也提高总体特异性 CTL 应答<sup>[13]</sup>。

#### 4. 转基因植物疫苗

转基因植物疫苗是将编码有效免疫原的基因导入可食用植物细胞的基因组中, 免疫原即可在植物的可食用部分稳定地表达和积累, 人类和动物通过摄食达到免疫接种的目的。黄瓜花叶病毒嵌合体(其表面有来源于多个的 HCV-E2 的 HVR1 序列合成肽, 即 R9 模拟位)能在家兔体内激发特异性体液应答, 在 HCV 感染者中能下调淋巴细胞 CD3 和 CD8 密度, 出现显著的 IFN- $\gamma$ 、IL-12 p70 和 IL-15 的释放, 而 R9 特异的 CD8<sup>+</sup> T 细胞也被检测到, 可作为食用的疫苗开发<sup>[14]</sup>。

其他丙型肝炎疫苗研究通常与那些慢性病原体如 HIV 和疟原虫等研究一样。新技术的发展提供了多种方法, 如 DNA 疫苗、病毒载体疫苗和不同的疫苗联用方案, 例如用一种疫苗初免, 用另一种疫苗加强免疫。几种基因可重组于单个疫苗中, 并在同一细胞中表达, 同样可将含有单种基因的质粒组成混合疫苗。此抗原可以被 MHC-I 和 MHC-II 类分子提呈并刺激产生各型免疫应答。DNA 能够诱导相对长期的免疫记忆(特别是 T 细胞介导型), 而基于基因的免疫能有效诱导 CD8<sup>+</sup> CTL 和 CD4<sup>+</sup> 辅助细胞, 通过添加细胞因子等佐剂增强疫苗免疫原性。

#### 5. 治疗性疫苗

在灵长类动物身上的试验中发现, 重组多肽和质粒 DNA 疫苗可引起 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 应答; 在人类, 糖蛋白亚单位包裹的疫苗在 I 期临床研究中成功地激发了体液和细胞免疫应答。在 II 期临床试验中, 重组 E1 疫苗引发强烈的 E1 特异性 T 细胞应答及 ALT 水平的明显下降。此外, 在 E1 治疗加量的患者中, 其肝脏组织学纤维化评分有改善, 但 HCV RNA 病毒载量无改变, 目前仍需长期研究。其他临床前期试验有 VSVdeltaG(表达 C/E1/E2)免疫黑猩猩<sup>[15]</sup>, 可产生强烈的细胞免疫和体液免疫应答, 而通过 HCV 的同种异体 DC 免疫, 能有效激发特异性免疫和天然免疫应答<sup>[16, 17]</sup>, 如经 HCV 核蛋白脉冲处理的 DC 免疫小鼠, 可产生强烈免疫应答<sup>[18]</sup>; 含佐剂的多肽混合物、核蛋白、热灭活酵母菌(表达 C/NS3)、pHCV-NS3-Th1、pHCV-NS3 等及重组腺病毒载体(表

达 NS3/C)转导人 DC 与重组腺病毒初免, 电穿孔技术 DNA 加强(表达 NS3/NS4/NS5), 均能激发 Th1 型 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> CTL 应答。

从以上研究看来, 无论是增加病毒中和抗体滴度还是激发广泛的 CD4<sup>+</sup> Th1 应答或 CD8<sup>+</sup> T 细胞应答, 都能明显减少病毒载量。目前部分疫苗已进入 I、II 期临床试验阶段。随着我们对 HCV 基因组及蛋白等的认识深入和新的分子技术的出现(如反义寡核苷酸、核酶、小干扰 RNA 等), 各种抑制剂如丝氨酸蛋白酶抑制剂、解旋酶抑制剂、RNA 依赖的 RNA 聚合酶抑制剂等也部分进入 II 期临床试验阶段。HCV 传统治疗疗效与病毒中和抗体效价及 Th1 细胞免疫有关, 通过合适的疫苗提高这种免疫应答是可能的, 也能提高传统治疗的效果, 且这种治疗性免疫可以减少病毒变异的产生, 将增加 HCV 蛋白酶抑制剂等的疗效。

提高疫苗效能是目前一巨大挑战, 明确保护性相关免疫、慢性化机制、确认主要的防治性疫苗组分、抗不同基因型交叉保护程度、合适的佐剂、优化抗原提呈系统, 以提高疫苗免疫原性和功效、确定疫苗保护周期等, 是未来 HCV 疫苗研究方向。

#### 参考文献

- Houghton M, Abrignani S. Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus. *Nature*, 2005, 436(7053): 961-966.
- Youn JW, Park SH, Lavallette D, et al. Sustained E2 antibody response correlates with reduced peak viremia after hepatitis C virus infection in the chimpanzee. *Hepatology*, 2005, 42(6): 1429-1436.
- Folgori A, Capone S, Ruggieri L, et al. A T-cell HCV vaccine eliciting effective immunity against heterologous virus challenge in chimpanzees. *Nat Med*, 2006, 12(2): 190-197.
- Vajdy M, Selby M, Medina-Selby A, et al. Hepatitis C virus polypeptide vaccine formulations capable of inducing broad antibody and cellular immune responses. *J Gen Virol*, 2006, 87(Pt 8): 2253-2262.
- Fournillier A, Dupuyot P, Martin P, et al. Primary and memory T cell responses induced by hepatitis C virus multi-epitope long peptides. *Vaccine*, 2006, 24(16): 3153-3164.
- Capone S, Meola A, Ercole BB, et al. A novel adenovirus type 6 (Ad6)-based hepatitis C virus vector that overcomes preexisting anti-ad5 immunity and induces potent and broad cellular immune responses in rhesus macaques. *J Virol*, 2006, 80(4): 1688-1699.
- Fattori E, Zanopigione I, Arcuri M, et al. Efficient immunization of rhesus macaques with an HCV candidate vaccine by heterologous priming-boosting with novel adenoviral vectors based on different serotypes. *Gene Ther*, 2006, 13(14): 1088-1096.
- Majid AM, Ezelle H, Shah S, et al. Evaluating replication-defective vesicular stomatitis virus as a vaccine vehicle. *J Virol*, 2006, 80(14): 6993-7008.
- Gao M, Wang HP, Wang YN, et al. HCV-NS3 Th1 minigenic vaccine based on invariant chain CLIP genetic substitution enhances CD4<sup>+</sup> Th1 cell responses in vivo. *Vaccine*, 2006, 24(26): 5491-5497.

在 HIV 感染者中, HCMV 毒株间重组可能发生, 并导致重组毒株的产生, 以至于进一步影响 HCMV 毒株的进化发展。

在肾移植、肺移植受者移植后, HCMV 混合感染分别为 >70% 和 >90%<sup>[10]</sup>, 其中, 肺移植受者 HCMV 混合感染与供者、受者血清状态无关, 再感染或于一个潜伏株再激活均有可能。但供者毒株与受者毒株有明显不同的则可能性很小。个别案例表明受者毒株再感染, 比起受者毒株的再激活, 更容易导致有症状的 HCMV 感染。越来越多的证据表明<sup>[10]</sup>, HCMV 混合感染对移植患者是特别不利的。实质器官移植受者中, 混合 gB 亚型感染与治疗时血液中病毒的延迟清除有关, 这个发现很有意义, 因为抗病毒治疗时延迟病毒清除意味着发生耐药的风险很高。另外, Zhou 等<sup>[13]</sup>发现在中国的实质器官移植受者中, gB 和 gH 基因混合感染是十分常见的。

总之, 进一步分析不同患者人群 HCMV 糖蛋白亚型混合感染的临床表现及混合感染的分子机制, 是未来关于 HCMV 研究的重点。

### 三、结语

虽然对 HCMV 的研究已取得许多进展, 由于该病毒庞大的基因组, 宿主与病毒相互作用的变化, 病毒株地理分布的不同, 病毒混合感染的增加等因素, 使得 HCMV 糖蛋白及亚型的致病性研究非常复杂, 需要更深一步的探索。

### 参 考 文 献

- Rasmussen L. Molecular pathogenesis of human cytomegalovirus infection. *Transpl Infect Dis*, 1999, 1(2): 127-134.
- Britt WJ, Jarvis MA, Drummond DD, et al. Antigenic domain 1 is required for oligomerization of human cytomegalovirus glycoprotein B. *J Virol*, 2005, 79(7): 4066-4079.
- Zhang C, Pass RF. Detection of cytomegalovirus infection during clinical trials of glycoprotein B vaccine. *Vaccine*, 2004, 22(4): 507-510.
- Lopper M, Conpton T. Coiled-coil domains in glycoproteins B and H are involved in human cytomegalovirus membrane fusion. *J Virol*, 2004, 78(15): 8333-8341.
- Galman PM, Lawrence MC. The structural biology of type I viral membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(4): 309-319.
- Watarabe S, Takada A, Watanabe T, et al. Functional importance of the coiled-coil of the Ebola virus glycoprotein. *J Virol*, 2000, 74(21): 10194-10201.
- Kinzler ER, Conpton T. Characterization of human cytomegalovirus glycoprotein-induced cell-cell fusion. *J Virol*, 2005, 79(12): 7827-7837.
- Tarragó D, Querceda C, Tenorio A. Different cytomegalovirus glycoprotein B genotype distribution in serum and cerebrospinal fluid specimens determined by a novel multiplex nested PCR. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(7): 2872-2877.
- Nye MB, Leman AR, Meyer ME, et al. Sequence diversity in the glycoprotein B gene complicates real-time PCR assays for detection and quantification of cytomegalovirus. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(10): 4968-4971.
- Puchhammer-Stöckl E, Czerter I. Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus subtypes—the search for clinical significance. *J Clin Virol*, 2006, 36(4): 239-248.
- Arav-Boger R, Willoughby RE, Pass RF, et al. Polymorphisms of the cytomegalovirus (CMV)-encoded tumor necrosis factor- $\alpha$  and beta-chemokine receptors in congenital CMV disease. *J Infect Dis*, 2002, 186(8): 1057-1064.
- Coquette A, Bourgeois A, Dirand C, et al. Mixed cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis*, 2004, 39(2): 155-161.
- Zhou L, Fan J, Zheng SS, et al. Genetic variation with in the glycoprotein B and H genes of human cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis*, 2007, 9(1): 73-77.
- Sominakaya I, Alekseeva E, Skrustina D, et al. Signal sequences modulate the immunogenic performance of human hepatitis C virus E2 gene. *Mol Immunol*, 2006, 43(12): 1941-1952.
- Alvarez-Lajonchere L, Gonzalez M, Alvarez-Obregon JC, et al. Hepatitis C virus (HCV) core protein enhances the immunogenicity of a co-delivered DNA vaccine encoding HCV structural antigens in mice. *Biotechnol Appl Biochem*, 2006, 44(Pt 1): 9-17.
- Andersson GA, Singh RA, Barry MA. Activation of refractory T cell responses against hepatitis C virus core protein by ablation of interfering hydrophobic domains. *Mol Ther*, 2006, 13(2): 338-346.
- 史磊, 袁育康, 胜利, 等. 多 CTL 表位 DNA 疫苗诱导特异性 CTL 应答的研究. *细胞与分子免疫学杂志*, 2006, 22(4): 430-432.
- Pizzolla G, Nuzziaci M, Tortorella C, et al. Immunogenic properties of a chimeric plant virus expressing a hepatitis C virus (HCV)-derived epitope: new prospects for an HCV vaccine. *J Clin Immunol*, 2005, 25(2): 142-152.
- Majid AM, Esaile H, Shah S, et al. Evaluating replication-defective vesicular stomatitis virus as a vaccine vehicle. *J Virol*, 2006, 80(14): 6993-7008.
- Xiang M, Eisenbach C, Lupa CM, et al. Induction of antigen-specific immune responses in vivo after vaccination with dendritic cells transfected with adenoviral vectors encoding hepatitis C virus NS3. *Viral Immunol*, 2006, 19(2): 210-219.
- Li W, Kriahnadas DK, Li J, et al. Induction of primary human T cell responses against hepatitis C virus-derived antigens NS3 or core by autologous dendritic cells expressing hepatitis C virus antigens: potential for vaccine and immunotherapy. *J Immunol*, 2006, 176(10): 6065-6075.
- Encki J, Finkeldey J, Geib J, et al. Prophylactic and therapeutic vaccination with dendritic cells against hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol*, 2005, 142(2): 362-369.

(收稿日期: 2007-04-19)

(收稿日期: 2007-03-09)