

文章编号:1005-6947(2007)08-0758-05

· 基础研究 ·

重组人抗 HBsAg-Fab 阻断肝移植后 HBV 再感染的体外研究

潘桃, 唐莉, 陈知水, 王大为, 程敦秀, 郭晖

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 器官移植研究, 所教育部、卫生部重点实验室, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 研究重组合成抗乙型肝炎病毒(HBV)表面抗原(HBsAg)的小分子抗体 Fab 阻断肝移植后乙肝病毒再感染的作用效应。方法 通过体外抗原黏附实验,补体毒实验和病毒感染实验,计算抗原黏附率、细胞死亡率和细胞感染率,进行统计分析,研究抗体 Fab 的功能效应。结果 在有、无重组抗体存在时,组间的抗原黏附率、细胞死亡率及细胞感染率对比,差异均有显著性(均为 $P < 0.05$),实验数据在统计学上有显著差异。结论 重组合成抗体 Fab 能阻断抗原对靶细胞的黏附,能介导补体毒杀伤靶细胞,降低 HBV 对人原代肝细胞的感染率。基因重组的小分子抗体 Fab 的体外效应实验为其在体内临床应用打下基础。

[中国普通外科杂志,2007,16(8):758-762]

关键词: 肝移植; 肝炎病毒,乙型/免疫学; 重组人抗 HbsAG-Fab; 手术后并发症/预防与控制

中图分类号: R 617; R 341.1

文献标识码: A

The recombinant antibody HBsAg-Fab of hepatitis B virus to block hepatitis B reinfection after liver transplantation: a research in vitro

PAN Tao, TANG Li, CHEN Zhi-Shui, WANG Da-wei, CHENG Dun-xiu, GUO Hui

(Institute of Organ Transplantation, Key Laboratory of Organ Transplantation, Ministry of Education/Ministry of Health, Tongji Hospital, Tongji Medical Collage, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: Objective To study the effect of recombinant antibody HBsAg-Fab of hepatitis B virus (HBV) to block hepatitis B reinfection after liver transplantation. **Methods** The functional efficiency of antibody Fab in blocking hepatitis B reinfection after LT was analysis and studied by vitro infection test, complement toxicity assay and virus infection test, calculated the antibody absorption rate and cell death rate and cell infection rate. **Results** When the group with and the group without recombinant antibody Fab were compared, the antibody absorption rate, cell death rate and cell infection rate between the 2 groups showed significant difference ($P < 0.05$). The tese data had significant statistical difference. **Conclusions** Recombinant antibody Fab can block antibody absorption by the target cell, can induce complement-dependent toxic death and damage of target cells, and decrease the HBV infection rate of primary human hepatocytes. The in vitro efficacy test of recombinant gene antibody Fab can be a basis for its use clinically in vivo.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(8): 758-762]

Key words: Liver Transplantation; Hepatitis B Virus/immunol; Recombinant Antibody HBsAg-Fab;

Postoperative Complications/prev

CLC number: R 617; R 341.1

Document code: A

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471695)

收稿日期:2007-01-14; **修订日期:**2007-05-30。

作者简介:潘桃,女,湖北大冶人,华中科技大学同济医学院附属同济医院博士,主要从事肝移植后乙肝复发方面的研究。

通讯作者:陈知水 E-mail:zschen@tjh.tjmu.edu.cn

肝移植是目前惟一有效的治疗终末期肝病的方式。但我国肝移植受者与国外相比病因比例有明显差别,我国以终末期乙型肝炎患者为主要受体。这些患者肝移植后极易发生乙肝病毒(HBV)复发感染。研究^[1]表明无预防者肝移植术后HBV感染率近80%,而且复发后生存率明显下降,3年生存率仅为44%。预防乙肝复发是提高我国肝移植患者生存率及生存质量的关键。

目前,临床上肝移植后乙肝复发的预防治疗主要是应用乙肝免疫球蛋白(HBIG)和拉米夫定,由于治疗存在的弊端,学者一直在寻找其它预防策略,如乙肝疫苗^[2]、基因治疗等。抗乙肝表面抗原的抗体是保护性抗体。抗HBsAg的全人源化Fab, scFv抗体在国内已开展研究。但大多处于抗体库构建、大肠杆菌表达、酵母菌表达或植物细胞表达等水平^[3-5]。尚无将抗HBsAg的全人源化Fab基因构建于腺相关病毒载体而用于体内基因治疗的研究。故笔者以基因治疗肝移植后乙肝复发为出发点,以一株来源于人源性噬菌体抗体库的乙肝表面抗原(HBsAg)高亲和力Fab抗体基因的噬粒p3HB为模板,成功构建了能于真核表达的腺相关病毒穿梭质粒pXXUF1-HBs-Fab。通过其脂质体介导法转染HEK 293细胞,G418筛选阳性克隆。应用羊抗人Fab抗体通过免疫亲和层析法纯化转染细胞上清的anti-HBs-Fab,经SDS-PAGE鉴定后用于以下功能检测。通过对其在体外功能效应的研究,探讨其体内应用价值——基因重组抗HBsAg的小分子Fab能否阻断肝移植后乙肝病毒的再感染。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 肝细胞 人原代肝细胞源于临床手术切除的经病理学证实的正常肝组织(患者肝功能正常,肝炎病毒标记物均呈阴性);HEK293细胞系、人肝癌细胞系HepG2和Hep3B均源自武汉生物物种典藏中心。

1.1.2 试剂及仪器 重组Fab由本实验室构建表达,工作浓度为1.435 μg/mL。HBsAg(Fitzgerald, ad型,源于人感染血清)购于吉泰生物制品公司。HBV感染血清取自同济医院感染科的慢性乙型肝炎患者,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测其

HbsAg, HBeAg及HBcAb均为阳性,实时多聚酶联反应(real time PCR)测病毒基因等量为 10^7 copies/mL。人原代肝细胞培养液配方如下:DMEM(Gibco, 21063), 15% 优等胎牛血清(Gibco), 地塞米松16 mg/L, 胰岛素4 mg/L, 青霉素10万U/L, 链霉素100 mg/L。人肝癌细胞系的培养液配方为:RPMI-1640培养液, 10%胎牛血清(杭州四季清), 青霉素10万U/L, 链霉素100 mg/L。兔补体由本科室临床检验部提供。抗HBsAg的免疫荧光抗体购于晶美公司。辣根过氧化物酶标记的抗HBsAg抗体购于武汉博士德公司。清蛋白含量由上海申能试剂盒及美国Abbott Aeroset全自动生化分析仪测定。ELISA试剂盒购于上海实业科华生物技术有限公司。酶标仪为Thermo电子公司的Multiskan MK3型号。PCR试剂盒购于美国Fermentas公司。PCR检测的引物由北京奥科公司合成,上游序列为F:5'-TGCACTTCGCTTCACCT-3';下游序列为R:5'-AGGGGCATTTGCTGCTC-3'^[6]。美国PE公司的PTC-100型PCR扩增仪。紫外分光光度仪为Pharmacia Biotech, 60-2103-98。凝胶图像分析系统为美国UVP bioimaging systems。

1.2 实验方法

1.2.1 原代肝细胞分离及培养 采用改良的体外两步灌流分离法^[7]分离正常成人肝细胞。对临床上切除的肝组织在离体12h内进行灌流消化、分离。先用含乙二胺四乙酸二钠(EDTA)的前灌液灌注约15 min。肝脏变白后,换用含0.05%胶原酶的灌注液,灌注30 min。灌注后剩下的肝组织块再在含胶原酶的灌注液中震荡水浴消化。上述步骤均控制在37℃进行。再以PERCOLL等密度离心方法,分离、纯化肝细胞。将分离后的肝细胞用配制好的DMEM培养液按细胞密度 5.0×10^5 /mL稀释后接种至有鼠尾胶(自制)覆盖加爬片的6孔培养板中;每孔含培养液2 mL,置于37℃, 5% CO₂培养箱孵育。12 h后,待肝细胞完全贴壁,且均已爬片生长,更换培养液。在以后的细胞培养中,隔天更换1次等量培养液。收集换液,进行分泌功能(清蛋白)的检测。

1.2.2 功能检测

1.2.2.1 HBsAg黏附阻断实验 HepG2细胞作为黏附靶细胞,在稳定传代24h后进行实验处理,用倒置生物相差显微镜观察细胞形态变化过程及

贴壁生长情况。细胞消化铺6孔板24h后,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗数次,换以不含胎牛血清的DMEM培养基。抗原组:用含10%正常人血清和HBsAg(0.78 μg/mL(实验量经前期实验摸索)的培养液对肝细胞进行换液处理,然后置于37℃,5%CO₂培养箱孵育30 min,随后4℃,60 min^[8],再用PBS对肝细胞洗涤3次以上(最后1次洗涤液留样待检),然后对细胞爬片进行HBsAg黏附检测。ELISA法检测洗涤留存液中的HBsAg,细胞表面HBsAg检测采用免疫荧光法,计算黏附率。实验组:用重组抗体20 μL与HBsAg20 μL混合孵育2h后,加入培养细胞,37℃孵育1h,PBS冲洗后,行免疫荧光检测,计算黏附率。空白对照组;用含人血清的培养基换液,其余处理同上。多次实验黏附率取平均值后,进行统计学分析。

1.2.2.2 小分子 Fab 介导的补体毒实验

Hep3B细胞作为攻击靶细胞,细胞消化后,用无血清的DMEM悬浮,浓度控制在 5.0×10^3 /mL,种于72孔板,每孔细胞悬液2 μL。阳性对照组:Hep3B细胞加入人免疫球蛋白IgG 2 μL,37℃孵育1h。实验组:Hep3B细胞加入标准重组抗体2 μL,37℃孵育1h后,加入羊抗Fab(1:2 000),37℃孵育0.5h后加入补体5 μL,37℃孵育1h。阴性对照组:Hep3B细胞非特异性抗体37℃孵育1h后,余处理同实验组。空白对照组:细胞不作任何处理。然后伊红1 μL染色,36%甲醛2 μL固定,观察计算每孔的死亡率,取平均值,行统计分析。

1.2.2.3 小分子 Fab 的抗病毒实验

以人原代肝细胞(HPHC)作为靶细胞,研究Fab的抗病毒效应。感染组:用含10%HBV感染血清(病毒基因等量为107 copies/mL对肝细胞进行换液处理,然后置于37℃,5%CO₂培养箱孵育。12h后,弃上清液,用PBS对肝细胞洗涤3次(最后1次洗涤液留样待检),再换成含2%二甲基亚砜(DMSO)的胎牛血清培养液。12h后,用含胎牛血清的培养液换液,换下的液体留样待检。在以后的细胞培养中,每2d用含胎牛血清的培养液换液1次,并收集上清液行ELISA检测。在吸光度405/630下读取吸光度。观察直至2周后固定细胞爬片。采用免疫组化S-P法对细胞爬片进行细胞表面HBsAg黏附检测,HWIAS-2000图文分析系统进行结果分析,并计算感染率。自细胞感染病毒后收集感染细胞,用不含蛋白酶的细胞裂解液裂解细胞,

酚氯仿抽提上清液提取cccDNA;使用跨缺口引物对其作cccDNA-PCR检测。PCR反应条件为95℃10 min,95℃10 s,56℃25 s,72℃40 s;循环45次。产物经2%的琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像分析仪进行分析。实验组:重组抗体40 μL在体外与病毒20 μL混合孵育后与聚乙二醇(PEG)一并加入细胞培养液中,孵育12h后弃上清液;用PBS对肝细胞多次冲洗,余步骤同感染组。空白对照组:HPHC不作任何处理。

1.3 统计学处理

实验数据输入SPSS12.0医学统计学分析软件进行分析。组间频数分布比较采用 χ^2 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 细胞培养及实验处理后细胞形态的动态变化

人原代肝细胞分离后,苔盼蓝染色显示细胞活性在80%以上,在体外存活时间达2周,细胞状态良好,基本适应体外环境。实验前(即培养48h后),人原代肝细胞生长良好,肝细胞体积大,形态为扁平不规则多角形,细胞核、核仁清晰可见,细胞器丰富,肝细胞伸展较好(图1),基本铺满培养板孔底。细胞换液后,在细胞培养上清液中检测到清蛋白平均含量为 (1.173 ± 0.113) mg/L。对照组人原代肝细胞一直维持正常的形态结构。感染组的人原代肝细胞在加了处理因素后,有部分细胞变为半贴壁状态。HepG2与Hep3B肝细胞系生长旺盛,2~3d传代1次,形态无明显变化。

2.2 小分子 Fab 的作用效应

2.2.1 阻断抗原黏附靶细胞

抗原组:免疫荧光检测到靶细胞膜上的HBsAg(图2-3),阳性率为98%;细胞洗涤留存液中的HBsAg检测呈阴性。实验组,空白组:免疫荧光均为阴性结果(图4)。抗原组与实验组的阳性率比较,差异有显著性($\chi^2 = 192.157, P < 0.05$)。

2.2.2 介导补体毒杀伤靶细胞

阳性对照组,实验组均显示细胞大片死亡(图5)。在倒置显微镜下,计算细胞死亡率分别为99.1%和98.8%。阴性对照组,空白对照组细胞死亡率为3.76%和1.1%(图6)。实验组与阳性对照组比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 0.203, P > 0.05$)。实验组与阴性对照组比较,两者有统计学差异($\chi^2 = 180.770, P < 0.05$)。

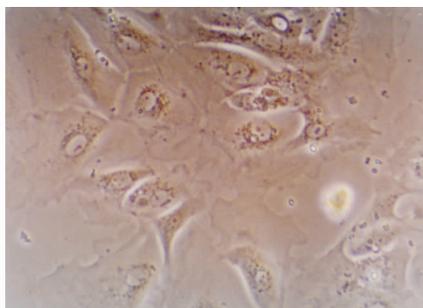


图1 人原代肝细胞(×400)

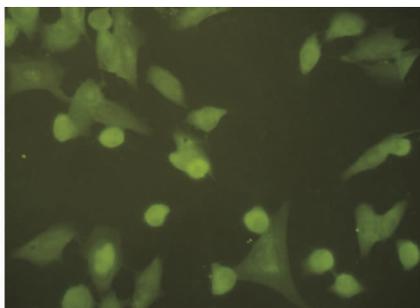


图2 抗原组吸附实验,HBsAg 吸附于 HepG2 细胞的表面(×200)

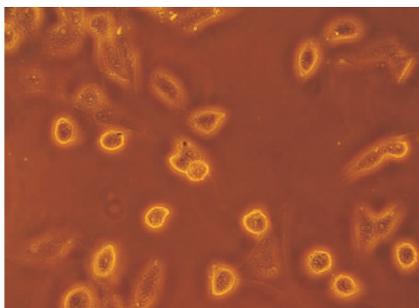


图3 去荧光下的细胞对照(×200)



图4 实验组吸附实验,细胞表面未见 抗原荧光(×200)



图5 补体毒实验实验组,细胞膜破裂, 细胞红染(×100)

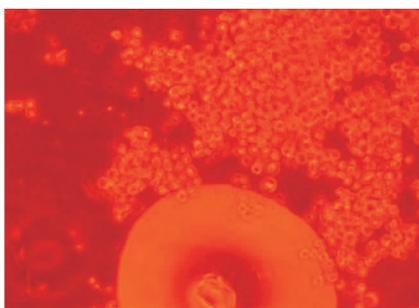


图6 补体毒实验阴性对照组,细胞存 活,胞膜完整(×100)

2.2.3 阻断病毒感染靶细胞 感染组:细胞洗涤留存液中 HBsAg 呈阴性,人原代肝细胞感染后所有留存系列上清液中 HBsAg 均呈阳性,HBsAg 在感染后 2 周内均可测出(图 7)。感染后第 16 天,免疫组化法检测到细胞中 HBsAg 呈阳性表达(图 8);用 HMIAS-2000 图文分析系统测得其平均阳性率为 77%。收集细胞进行 HBV-DNA 检测:人原代肝细胞内 HBV-cccDNA 的 PCR 结果为阳性(图 9)。实验组:以上结果均为阴性(图 10)。当 ELISA 组化、DNA 检测结果均为阳性时,可认为感染成功,单一结果阳性视为未感染。经过 10 次感染实验,在感染组中成功感染 2 次,实验组中未发生感染。

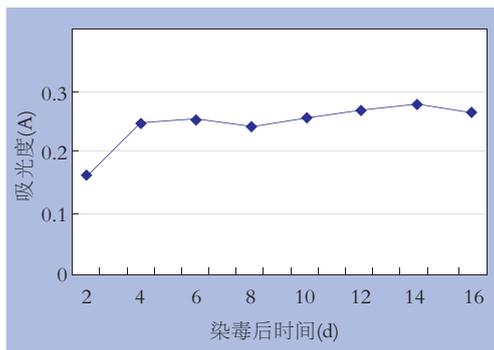


图7 ELISA 法检测人原代肝细胞感染 HBV 后培养上清中 HBsAg 的含量

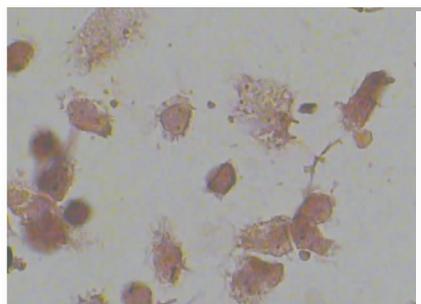


图8 病毒感染实验感染组(×400) 细胞胞浆内近胞膜区可见棕黄颗粒,为 HbsAg

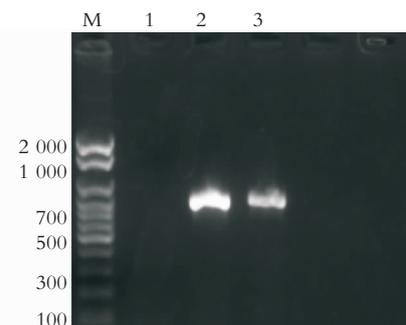


图9 HBV 感染后肝细胞内 HBV-cccDNA 的表达 M: Marker;1: 未感染 HBV 肝细胞;2,3: 感染后的肝细胞,产物大小为 735bp

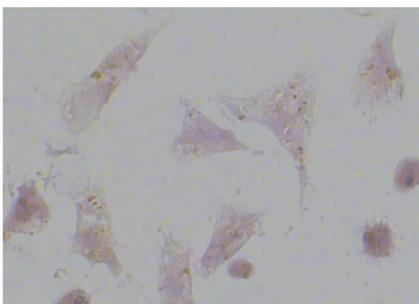


图10 实验组细胞胞浆内(×400) 细胞胞浆内未见 HbsAg

3 讨论

乙肝免疫球蛋白(HBIG)预防是目前阻止HBV再感染和改善长期生存质量最有效的一种方法^[9]。但肝移植手术前后短期使用乙型肝炎免疫球蛋白(HBIG)效果并不理想,大多数患者会发生HBV再感染;只有长期大剂量使用HBIG才能明显减少复发感染的机会。而HBIG费用十分昂贵,患者经济上难以满足长期治疗的需求^[10]。即使在终身接受高剂量HBIG治疗的患者中仍然有10%~20%会复发。主要原因可能是长期用药带来的免疫压力还可能造成编码HBsAg“a”决定簇的基因变异而形成免疫逃避株,导致约20%的患者治疗失败^[11]。而基因重组的抗HBsAg的全人源化Fab有着不可比拟的优势:分子小、免疫源性低,用于人体不易产生抗异种蛋白反应;易于渗透到病灶周围的微循环;血循环和全身清除快,半衰期短,肾脏蓄积少;无Fc段,不易与具有Fc受体的非靶细胞结合^[12]。

为了探讨携抗HBsAg的全人源化Fab基因腺相关病毒载体在真核细胞体内外表达的能力及用于临床预防肝移植后乙肝复发基因治疗的可行性,笔者选择构建针对中国人群占大多数的adr型HBsAg的抗体作为代表。

在前期实验中^[13],笔者将此基因重组于腺相关病毒穿梭质粒pXXUF1上,转染293细胞,分泌重组Fab。体外实验显示重组的真核细胞分泌表达的Fab抗体同样具有中和HBV,阻断其感染的作用。HepG2细胞黏附HBsAg的实验结果显示,加入重组Fab与HBsAg孵育的实验组细胞表面未见到荧光表达,即HepG2细胞无HBsAg黏附;而未加重重组Fab的对照组细胞在荧光显微镜下可检测到荧光。说明此重组Fab具有阻断HBsAg黏附HepG2肝细胞的能力。Hep3B细胞是一种低分泌HBsAg的肝癌细胞系,用其检测重组Fab可借助羊抗人Fab抗体间接介导补体对分泌Hep3B细胞实施杀伤作用,与HBIG的发挥杀伤作用相同。本实验羊抗人Fab抗体起到Fc段的作用。推测如果在体内转染携抗HBsAg的全人源化Fab基因腺相关病毒载体实验中,即使产生了抗重组Fab的抗体,它依然能通过抗Fab抗体的作用完成介导补体杀伤分泌HBsAg的感染靶细胞。此外在HBV感染人原代肝细胞的实验中也显示出加入重组Fab的实验组肝细胞中未检测到HBV-cccDNA;ELISA实验和免疫组化均证明肝细胞内无

HBsAg产生,表明重组Fab对正常肝细胞有保护作用。本实验在重组Fab阻断HBV感染肝细胞的能力方面进行了定性分析,至于对HBIG的性价比和定量分析,笔者拟于今后的实验中作进一步研究。

参考文献:

- [1] Errault NA, Zhou S, Combs C, *et al.* Prophylaxis in liver transplant recipients using a fixed dosing-schedule of hepatitis B immunoglobulin [J]. *Hepatology*, 1996, 24(6): 1327-1333.
- [2] 孙强,朱晓峰.乙型肝炎疫苗在预防肝移植术后乙型肝炎再感染中的应用[J].*中国普通外科杂志*, 2006,15(1):66-68.
- [3] Ning D, Junjian X, Qing Z, *et al.* Production of recombinant humanized anti-HBsAg Fab fragment from *Pichia pastoris* by fermentation [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2005, 38(3): 294-299.
- [4] Maeda F, Takekoshi M, Nagatsuka Y, *et al.* Production and characterization of recombinant human anti-HBs Fab antibodies [J]. *J Virol Methods*, 2005, 127(2): 141-147.
- [5] 郑大勇,罗荣城,蔡红兵.基因工程抗体anti-HBsAg Fab原核表达体系大规模培养条件的实验研究[J].*第一军医大学学报*, 2004, 24(5):517-520.
- [6] Dieter G, Mehriar Al, Perter K, *et al.* Pre-S1 Antigen-Dependent Infection of Tupaia Hepatocyte Cultures with Human Hepatitis B Virus [J]. *J of Virology*, 2003, 77(17): 9511-9521.
- [7] LeCluyse EL, Alexander E, Hamilton GA, *et al.* Isolation and culture of primary human hepatocytes [J]. *Methods Mol Biol*, 2005, 290: 207-229.
- [8] Neurath AR, Kent SB, Strick N, *et al.* Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis b virus [J]. *Cell*, 1986, 46(3), 429-436.
- [9] Lo CM, Fung JT, Lau GK, *et al.* Development of antibody to hepatitis B surface antigen after liver transplantation for chronic hepatitis B [J]. *Hepatology*, 2003, 37(1): 36-43.
- [10] Shouval D, Samuel D. Hepatitis B immune globulin to prevent hepatitis B virus graft reinfection following liver transplantation: A concise review [J]. *Hepatology*, 2000, 32(6): 1189-1195.
- [11] Protzer-Knolle U, Naumann U, Bartenschlager R, *et al.* Hepatitis B virus with antigenically altered hepatitis B surface antigen is selected by high-dose hepatitis B immune globulin after liver transplantation [J]. *Hepatology*, 1998, 27(1): 254-263.
- [12] Boder ET, Wittrup KD. Yeast surface display for directed evolution of protein expression, affinity, and stability [J]. *Methods Enzymol*, 2000, 328: 430-444.
- [13] 唐莉,曾志贵,潘桃,等.抗HBsAg-Fab重组体在小鼠肝脏的表达[J].*世界华人消化杂志*, 2006, 14(6):1554-1560.