

HCV C 区 DNA 疫苗的研究现状

孙利,周永兴

孙利,周永兴,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038
项目负责人:孙利,710038,陕西省西安市,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心.
收稿日期:2002-10-29 接受日期:2002-11-16

摘要

1974年Golafield 首先报告输血后非甲非乙型肝炎. 1989年Choc et al 应用分子克隆技术获得本病毒基因克隆, 并命名本病及其病毒为丙型肝炎 (Hepatitis C)和丙型肝炎病毒 (HCV).由于至今尚未分离到病毒颗粒,使得必须以可得到的病毒核酸成分进行重组、表达蛋白,进而进行疫苗研究.本文详细阐述了HCV C区基因结构、HCV C蛋白功能以及HCV-C区DNA疫苗方面的内容及进展,以期为将来进一步的研究提供帮助.

孙利,周永兴. HCV C 区 DNA 疫苗的研究现状. 世界华人消化杂志 2003;11(6):806-809

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/806.asp>

0 引言

HCV 归为黄病毒科 HCV, 是肠道外非甲非乙型肝炎的主要致病因子, 呈世界范围性, 其致病常引起持续感染, 并且 HCV 的慢性感染和慢性肝脏疾病、肝硬化及肝细胞癌(HCC)明显相关^[1-7]. 因此, 运用疫苗保护免受 HCV 感染很有必要. 从基因学角度来说, 慢性病毒性肝炎属获得性基因疾病, DNA 疫苗能诱导细胞免疫及体液免疫, 从而使其成为免疫治疗的策略之一^[1,8]. 相信随着分子生物学技术的发展, 基因治疗将为慢性病毒性肝炎患者带来福音.

1 HCV C 区基因结构

HCV 病毒体呈球形, 直径<80 nm(在肝细胞中为 36-40 nm, 在血液中为 36-62 nm), 为单股正链 RNA 病毒, 在核衣壳外包绕含脂质的囊膜, 囊膜上有刺突.HCV-RNA 全长 9 600 bp, 含有一个大的单一开放阅读框(ORF), 编码约 3 010 个氨基酸的病毒前体蛋白.在 HCV 的编码基因中, 核心区基因位于 HCV 基因组 1-191 位氨基酸, 具有高度遗传保守性, C 基因表达产物具有良好的抗原稳定性.

2 HCV C 蛋白功能

C 蛋白经宿主蛋白酶裂解后产生蛋白 P23、P21 和 P16 (仅见于 HCV-1). C 蛋白主要位于胞质的内质网表面,

少数位于胞核内^[9], 呈颗粒状, 可在昆虫细胞内形成 40-60 nm 颗粒, 可能形成病毒衣壳;可调节几种转录和翻译的细胞基因, 作用于 5' UTR 的 IRES, 从而影响转录起始.C 蛋白可通过上调细胞周期蛋白 E 促进细胞增生, 可能通过基因调节实现致瘤作用.C 蛋白促进或抑制细胞对 Fas 介导的凋亡, 与淋巴毒素-β 受体的尾部作用而抑制程序性细胞死亡(PCD). C 蛋白是较强的免疫刺激原, 可产生较强的免疫反应, 通过 NF-κβ 途径影响细胞水肿和免疫反应. HCV 核心蛋白的 N 端含有两个 DNA 结合区, 结合区序列与核内转移信号的部分重迭以及对结合靶 DNA 序列的非选择性可能是 HCV 核心蛋白具有多功能的基础^[10].

HCV 感染的慢性化和致 HCC 产生主要是通过病毒基因编码的蛋白与宿主细胞的相互作用实现.HCV 核心蛋白具有与 DNA 结合的基序、核定位信号、磷酸化位点, 可能具有基因调节的功能. 近年来, 有大量的体内外实验揭示 HCV 核心蛋白能与细胞的多种蛋白结合, 调节多种细胞基因的转录活性, 在 HCV 感染的病理发生和慢性化以及宿主细胞的恶性转化等过程中起重要作用, 主要表现在影响细胞凋亡和免疫系统的功能, 并参与细胞恶性转化的发生等.

3 DNA 疫苗的概述

3.1 DNA 疫苗的定义 DNA 疫苗是将编码某种抗原蛋白的外源基因(DNA 或 RNA)直接导入动物体细胞内, 并通过宿主细胞的表达系统合成抗原蛋白, 诱导宿主产生对该抗原蛋白的免疫应答, 以达到预防和治疗疾病的目的. DNA 疫苗又称为基因疫苗或核酸疫苗, 这种免疫称为 DNA 介导的免疫、基因免疫、核酸免疫以及遗传免疫等.

3.2 构建 疫苗研究最鼓舞人心的新领域之一是 DNA 疫苗. 将有关的基因克隆到大肠杆菌的质粒中, 使哺乳动物细胞增加该基因的表达. 将其注入动物体内后, 该质粒进入宿主细胞核, 在核内仍以非整合形式存在, 并按要求合成抗原. 以这种方式产生的抗原优于传统疫苗. 首先, 在细胞内产生的抗原有可能以更为天然的折叠构型而有利于中和抗体的产生. 抗原也可被带到细胞表面, 由淋巴细胞抗原 1 型分子表达. 该质粒载体可能含免疫调节序列, 可刺激细胞免疫.

3.3 组成 DNA 疫苗由病毒的保护性抗原基因和载体质粒两部分组成. 目的基因通常是选择该病毒的主要保护性抗原基因, 最好是可对多数毒株都有保护作用的抗

原基因. 抗原基因可以是单个基因或具有协同保护功能的一组基因, 也可以是编码抗原决定簇的一段核苷酸序列. 质粒载体必须是能在大肠杆菌中高拷贝地扩增, 而在动物细胞内则能高效表达, 但不复制, 也不含有向宿主细胞基因组内整合的序列. 一般以 PBR322 或 PUC 质粒为基本骨架, 带有细菌复制子(ORI), 真核生物的启动子(有的含有增强子)和 Poly-A 加尾信号. 启动子大多来源于病毒基因组, 如 CMV, PSV, LTR 等, 其中以 CMV 的转录活性最高; Poly-A 序列具有保证 mRNA 在体内的稳定性的作用, 这种稳定性因 Poly-A 来源不同而异, 目前认为较好的 Poly-A 来自牛生长激素基因或兔 B 球蛋白基因; 载体中如果含 SV40 复制起始点, 应该使其缺失. 筛选基因可以选用卡那霉素, 氨苄青霉素或新霉素等抗性基因.

3.4 优点 传统用于传染病预防的疫苗有减毒活疫苗、灭活疫苗、亚单位疫苗和重组活载体疫苗等, 与这些疫苗相比, DNA 疫苗免疫效果好, 对已有免疫力的个体接种仍可起作用, 且免疫应答持久, 很微量的抗原即可刺激机体产生强而持久的免疫应答. DNA 疫苗引起 CTL 应答, 不存在散毒及毒力回升的危险. DNA 疫苗易于构建, 且方法简便、价格低廉、用量少, 便于贮藏和运输, 使用也较为方便, 比其他疫苗更经济. DNA 疫苗具有相同的理化性质, 为联合免疫提供了可能.

3.5 免疫应答 在开发和研制 HCV 疫苗的过程中, DNA 免疫是在快速构建、评价和筛选免疫原方面的有效办法. DNA 疫苗是一种新的针对靶抗原诱导产生免疫的方法. 他直接使识别基因编码的抗原和包含基因片段的抗原成为疫苗传播媒介, 识别候选基因可快速进入感染机体和肿瘤细胞. DNA 一项优点是在免疫的所有路径均显示了活性, 特别是细胞毒 T 细胞反应, 而在蛋白疫苗中很难产生. 对于各种病毒包括那些血液传播的病毒, DNA 疫苗均可被用于预防措施中. 对于慢性感染和肿瘤患者, DNA 疫苗则可作为一种治疗措施. 在这种情况下, 可把具有免疫活性的基因片段引入疫苗中, 对基因片段进行合适处理以及联合增加免疫的操作识别系统^[11].

4 HCV C 区 DNA 疫苗的研究进展

4.1 丙肝 DNA 疫苗定义 丙肝 DNA 疫苗含有编码病毒蛋白(如核心蛋白、包膜蛋白)的基因, 宿主细胞摄取外源性 DNA 并表达病毒基因、产生相应的病毒蛋白, 后者通过宿主细胞的主要组织相容性复合体 I 类(MHC-I)途径刺激 CD₈⁺ 细胞毒性 T 细胞启动细胞介导的免疫反应, 从而发挥抗病毒作用^[12].

4.2 HCV C 区 DNA 疫苗制备 HCV 的 DNA 疫苗制备主要集中在能刺激保护性抗体产生的包膜蛋白以及能诱导细胞毒性 T 淋巴细胞的核心蛋白或 NS 5 肽. 将编码核心蛋白(pC)、E1 蛋白(pE1)、E2 蛋白(pE2)、核心蛋白 E1、E2(pCE1E2)、E1 和 E2 蛋白(pE1E2)、E2 结构 N- 端高变区(pE2-HVR)的质粒转染到哺乳类动物细胞

以及接种于鼠, 发现 6 种 DNA 质粒在细胞内均能表达特异性的抗原, 但有编码核心蛋白的质粒能导致特异性的细胞毒性 T 淋巴细胞反应. 两种长度的 HCV 核心基因片段在 E.coli 中的表达, 从 HCV 感染者的血清扩增出核心区基因, 利用表达质粒 pQE-30, 构建了两种重组质粒, 其插入片段分别为 HCV 的全长核心区基因(c573)和“截断型”基因(c375). 经 IPTG 诱导, 含两种质粒的菌株都表达了目的蛋白, c573 表达的蛋白分子量为 22 kD, 表达量占菌体蛋白的 8.7%; c375 表达的蛋白分子量为 19kD, 表达量占菌体蛋白的 39.9%. 经 Ni-NTA 金属螯合层析纯化, 获得了高纯度的目的蛋白. 这两种蛋白均可特异地与丙型肝炎患者血清发生反应, 表明具有良好的抗原活性.

4.3 HCV C 区 DNA 疫苗表达 人肝细胞^[13]和黑猩猩对 HCV 很敏感, 但 HCV 体外培养尚未找到敏感有效的细胞培养系统. 有报道 HCV 核心蛋白在酵母中表达成功^[14]; 以非融合蛋白的方式, 在大肠杆菌中高效表达了完整的 HCV 核心蛋白, 具有较高生物活性^[15,16]. Hao et al^[17] 构建了 HCV C 基因腺病毒表达载体的骨架质粒, 并证实其可以在 7721 细胞中瞬时表达 HCV C 基因. 应用 PCR 方法获取完整的 HCV 核心区 cDNA 片段, 克隆到真核表达载体 PBK-CMV 上, 可在 HepG2 中稳定表达 C 蛋白, 提供了理想的实验用细胞株^[18].

4.4 免疫应答 HCV 核心基因疫苗能诱导 Balb/c 小鼠产生良好的细胞及体液免疫应答^[19-25]. 表达 HCV 结构蛋白(C, E1, E2)的 FVB/n 转基因小鼠及野生型(WT)FVB/n 小鼠经肌肉注射免疫表达核心(pHCVC)质粒或 C/E1/E2 (pHCVSt)质粒. WT 和转基因小鼠经结构蛋白或包膜蛋白免疫后均可产生抗 C 抗体和显示 T 细胞增生反应. WT 小鼠免疫 pHCVSt 后, 只产生抗 E2 的 CTL 活性, 非针对抗 C 或抗 E1, 而当 WT 小鼠免疫 pHCVC 时可产生强烈的抗 C 的 CTL 活性. 经 pHCVSt 免疫的转基因小鼠未测出抗 C 或抗包膜蛋白的 CTL 活性, 但免疫 pHCVC 的转基因小鼠产生了独特型抗 C 的 CTL 活性^[26].

4.5 增强策略 Balb/c(H-2d)和 C57bl/6 小鼠接受联接多顺反子 C/E1/E2/NS2/NS3(pRC/C-NS3)的黄疸病毒增强了对 HCV 蛋白的抗体和细胞反应, CD8(+)T 细胞反应增强^[27]. 重组体 pCD-HCV1、pCD-HCV2 和 pCD-HCV3 均可诱导小鼠产生抗体和脾细胞对 HCV 抗原增生反应^[28-30]; 重组体还可诱导鼠 PBMC 对 HCV 抗原的增生反应及使 SP2/0-HCV-C 细胞成瘤性显著降低; 通过免疫鼠荷瘤检测体内 CTL 反应, 可观察到免疫组鼠发瘤时间滞后, 发瘤部位减少和存活时间延长. 重组质粒 pcDNA HCV-C 治疗组, 使 SP2/0-HCV-C 细胞成瘤性显著降低, 对 HCV 皮下移植瘤有一定的治疗作用^[31]; 与表达 IL-12 质粒联合接种后, 治疗作用加强^[32]. 脂质转染剂^[33]或联合注射 GM-CSF 细胞因子^[22]可以促进基因疫苗的摄取并增强其诱导的抗病毒免疫应答的效力. pRSC-HBV/HCV 可分别表达 HBcAg 及 HCV 核蛋白, 免疫 Balb/c 小鼠后可诱

导其体液免疫应答^[34,35]. 双表达载体 pcDNA3.0 BA 同时输送 GM-CSF 与 pc154 基因能增强 Balb/c 小鼠对 HCV C 蛋白基因的体液免疫应答及免疫鼠脾淋巴细胞对特异性抗原刺激的增生能力^[36]. 重组的 HCV 结构区 DNA 疫苗 (pBK-CMV) 能诱导小鼠体内特异性 T 淋巴细胞反应^[37]. rhIL-12 可在体外显著增加慢性 HCV 感染者淋巴细胞的增生反应^[38].

4.6 联合免疫 HCV 多表位抗原基因 PCX 克隆到真核表达载体 pREP9(RSV 启动子)及 pcDNA3 (CMV 启动子)中, 构建真核表达载体 pREP9/PCX 及 pcDNA3/PCX, 将其肌肉注射免疫小鼠及家兔, 可诱发特异性免疫应答且安全性好^[39]. HCV 口服减毒鼠伤寒沙门菌 DNA 疫苗可诱发特异性的免疫应答^[40]. 为探讨复合多表位丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 及恶性疟原虫 (plasmodium falciparum, Pf) 双价疫苗的可行性, Huang et al^[41] 将人工合成的复合多表位 HCV 基因 PCX 及 Pf 抗原基因 AB (SPf66+SPf105) 克隆到谷胱甘肽转硫酶 (Glutathione S-transferase, GST) 表达载体 pGEX-2T 中, 并在大肠杆菌中高效表达 GST-HCV-Pf 复合抗原 (GST-CAB), 发现 GST-CAB 融合蛋白具有良好的 HCV 及 Pf 免疫特异性, 可诱发理想的体液及细胞免疫应答, 可望成为 HCV-Pf 双价疫苗的候选抗原. 免疫多表位的 PCX 蛋白可以诱导机体产生高水平的免疫应答^[42]. HCV 不同区段的基因重组抗原或人工合成多肽可诱导 HLA-II 类分子限制 CD₄⁺ T 细胞增生, 这种增生反应的强弱可能反映不同人群对 HCV 免疫应答的不同, 并与 HCV 感染的预后有关. CSpDNA3.1 融合重组质粒都优于 CpcDNA3.1+SpcDNA31 联合基因的免疫, 融合 DNA 疫苗有望成为慢性病毒性肝炎预防和治疗的制剂^[43].

4.7 展望 DNA 疫苗可产生强大的细胞免疫, 这是灭活的传统疫苗无法产生的. 联合疫苗机制可诱导增强 CD8 (+)CTL 和 IgG2a 反应, 这会涉及许多病原体疫苗的发展, 包括 HCV, 后者需要很强的抗体和 CTL 反应^[44]. 电基因传递 (EGT) 法将质粒 DNA 转入到肌纤维中, 是一种提高遗传免疫力的策略. EGT 诱导产生的体液反应比传统的裸 DNA 免疫高 10-30 倍. EGT 提高细胞和体液免疫的能力是抗原非依赖性的, 可望成为将来防治 HCV 及其他感染性疾病的一种安全低费用的治疗方法^[45]. 用复制和非复制核酸疫苗与 rSFVs 来评估抗 HCV 疫苗的发展^[46]; 描述 p214K9 表位并结合用流式细胞仪分析 CTL 反应可以成为定级不同 HCV 疫苗策略产生原始 CTL 反应的能力的方法之一^[47]. DNA 疫苗产生的细胞免疫在保护机体免受结核杆菌、疟原虫、利什曼原虫、HIV 等细胞内致病原的侵袭方面起重要作用. 实际上, 这是迄今为止一直在小鼠体内进行的研究^[48]. 给 20 名志愿者肌注 3 剂恶性疟原虫环孢子蛋白, 其中 11 名志愿者外周血出现细胞毒 T 细胞. 这些资料十分鼓舞人心, 但其安全性问题以及是否能产生保护水平的免疫反应需进一步得以验证.

5 参考文献

- 1 Prince AM. Perspectives on prophylactic and therapeutic immunization against hepatitis B and C viruses. *Transfus Clin Biol* 2001;8:467-470
- 2 Li J, Wang WL. Detection of hepatitis C virus RNA in the tissue of hepatocellular carcinoma by multiple detection system. *Chin J Experimental Clinical Virol* 2000;14:47-51
- 3 Liu RH. Chronic liver disease and hepatitis B and hepatitis C virus infection. *J Ningxia Med* 2000;22:209-210
- 4 Wang RQ, Zhou ZC, Yang JM, Fang DC. Expression of oncogenes and tumor-suppressor gene in the tissues of hepatocellular carcinoma with different types of HBV, HCV infection. *Chongqing Med* 2000;29:99-100
- 5 Yang JM, Wang RQ, Pu B, Zhou ZC, Fang DC, Luo YH. The effect of hepatitis C virus infection on expression of several cancer-associated gene products in hepatocellular carcinoma. *Tumour* 2000;20:40-42
- 6 Zhang WJ, Yu XL, Du CX, Yin Q, Du SC. The infections of HBV HCV HGV TTV in patients with hepatocellular carcinoma (HCC) and the possibility and prevention in interventional treatment. *Shaanxi Tumour Med* 2002;10:27-29
- 7 Prince AM, Shata MT. Immunoprophylaxis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2001;5:91-103
- 8 Brinster C, Inchauspe G. DNA vaccines for hepatitis C virus. *Intervirology* 2001;44:143-153
- 9 Chen LB, Chen PL, Fan GR, Li L, Liu CY. Localization of hepatitis C virus core protein in the nucleus of peripheral blood mononuclear cells of hepatitis C patients. *Chin J Experimental Clinical Virol* 2002;16:37-39
- 10 Yi DX, Guan DY. Determination of DNA binding domains in hepatitis C virus core protein. *Chin J Hepatol* 2001;9:160-162
- 11 Stevenson FK, Rosenberg W. DNA vaccination: a potential weapon against infection and cancer. *Vox Sang* 2001;80:12-18
- 12 Tang XP, Xu YL, Yuan XZ, Zhang FC. Activity of HCV-specific cytotoxic T lymphocytes in chronic hepatitis C. *Chin J Epidemiol* 2001;19:212-215
- 13 Ma QY, Hao F, Wang YM. Study on the infection of normal adult hepatocytes with HCV in vitro. *J Third Military Med University* 2001;23:1216-1218
- 14 Li K, Wang L, Cheng J, Zhang LX, Lu MY, Li L. Cloning and expression of the gene of hepatitis C virus core in yeast. *J Surg Advanced Colle* 2002;23:1-3
- 15 李华, 潘承恩, 陈武科, 王全颖, 杨广笑. 丙型肝炎病毒核心区基因在大肠杆菌中的高效表达. *世界华人消化杂志* 2001;9:221-223
- 16 Zhao W, Liao GY, Li WD, Chen JY, Zhang XW, Sun MB, Jiang SD. Expression of hepatitis C virus core protein in E.coli and its immunological characteristics. *Immunol J* 2001;17:425-429
- 17 Hao CQ, Zhou YX, Feng ZH, Li JG, Jia ZS, Wang PZ. Construction, identification and expression of framework plasmid pAd. HCV-C of adenovirus expression vector of HCV C. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:635-639
- 18 刘重阳, 刘为纹, 杨建民, 鲁荣, 罗元辉. HCV 核心基因 cDNA 真核表达载体的构建及其表达. *世界华人消化杂志* 2000;8:1049-1050
- 19 Tan DM, Liu SH, Li CZ, Fan XG, Yan MY, Sun KZ. V specific cellular and humoral immune responses induced by intramuscular injection of DNA vaccine containing HCV core gene in mice. *Fundamental Med Clinic* 2000;20:41-42
- 20 Feng ZH, Zhou YX, Jia ZS, Lian JQ, Jiao CS, Li JG. Construction and gene immunization of recombinant expression plasmid of Hepatitis C virus core gene. *Chin J Immunol* 2000;16:184-186
- 21 Ceng XW, Du Y, Wang QC. Research on DNA vaccines of hepatitis C virus. *J Sichuan University* 2000;37:582-585
- 22 Ou-Yang P, Hwang LH, Tao MH, Chiang BL, Chen DS. Co-delivery of GM-CSF gene enhances the immune responses of hepatitis C viral core protein-expressing DNA vaccine: role of dendritic cells. *J Med Virol* 2002;66:320-328
- 23 Duenas-Carrera S, Alvarez-Lajonchere L, Alvarez-Obregon JC, Herrera A, Lorenzo LJ, Pichardo D, Morales J. A truncated variant of the hepatitis C virus core induces a slow but potent immune response in mice following DNA immunization. *Vaccine* 2000;19:992-997
- 24 Deng T, Chen NL, Chen TB, Wu SS, Wang MW, Jia KM. Plasmid hepatitis C virus core protein: DNA-based immunization for im-

- mune responses in Balb/c mice. *Chin J Immunol* 1999;11:494-496
- 25 Feng ZH, Zhou YX, Jia ZS, Lian JQ, Li JG, Li WB. Immune responses to recombinant expression plasmid encoding hepatitis C virus core antigen. *Chin J Internal Med* 1999;7:462-468
- 26 Sato J, Murata K, Lechmann M, Manickan E, Zhang Z, Wedemeyer H, Rehmann B, Liang TJ. Genetic immunization of wild-type and hepatitis C virus transgenic mice reveals a hierarchy of cellular immune response and tolerance induction against hepatitis C virus structural proteins. *J Virol* 2001;75:12121-12127
- 27 Pancholi P, Liu Q, Tricoche N, Zhang P, Perkus ME, Prince AM. DNA prime-canarypox boost with polycistronic hepatitis C virus (HCV) genes generates potent immune responses to HCV structural and nonstructural proteins. *J Infect Dis* 2000;182:18-27
- 28 Dou J, Liu KZ, Chen Z, Wo EJ, Liu Y, He NX, Xu CH, Chen MH. Study on immune responses to recombinant protein in mice inoculated with pCD-HCV1 DNA recombinant. *Chin J Epidemiol* 1999;2:91-93
- 29 Dou J, Liu KZ, Chen Z, Wo JR, Liu Y, Xu CH, He NX, Zhang MT, Wang XZ. Preliminary inquire into approach of HCV-DNA nucleic acid immunity. *Chin J Immunol* 1999;4:155-157
- 30 Dou J, Liu KZ, Chen Z, Wo JE, Liu Y, Xu CH, Chen MH, Jin JH. Experimental study of immunization of mice with hepatitis C virus genetic vaccine constructs. *Chin J Internal Medicine* 1999;6:390-392
- 31 Shan MM, Liu KZ, Chen Z. DNA Vaccination of the induction of immune responses by hepatitis C structural antigens. *Viol Sinica* 2000;15:14-21
- 32 Du DW, Zhou YX, Feng ZH, Jia ZS, Jiao CS, Wang QC, Li JG. Enhancing therapeutic effect of DNA vaccine against hepatitis C virus infection by interleukin-12. *Chin J Epidemiol* 2001;19:11-14
- 33 Feng ZH, Zhou YX, Wang QC, Du DW, Jiao CS, Li JG. Lipofectamine coated hepatitis C virus core gene vaccine promotes the efficacy of immune responses. *J Fourth Military Med University* 2000;21:817-819
- 34 Deng T, Fan GR, Chen TB, Chen NL, Hu DR, Li L, Huang SL, Jia KP. Constructs and expression of hepatitis C virus core gene combined hepatitis B virus core gene with two multiple cloning sites vector. *Chin J Immunol* 2002;18:149-152
- 35 Deng T, Fan G, Chen T, Chen N, Hu D, Wang M, Jia K. Expression and immune response to hepatitis C virus core gene combined hepatitis B virus core gene with two multiple cloning sites vector. *Chin J Med* 2002;82:77-80
- 36 Liao GY, Zhang XW, Sun MB, Cheng JY, Yang HJ, Jiang D. Enhancement of immune response to HCV core gene by GM-CSF gene with bicistronic vector. *Immunol J* 2001;17:289-294
- 37 Li B, Yin PQ, Wang J, Dou J, Lin L, Wang LX, Shi ZY. DNA immunization of mice with a plasmid encoding hepatitis C virus structural proteins elicits significant cell-mediated immune responses. *Immunol J* 2001;17:323-327
- 38 Fan XG, Ou ZM, Hu GL. Effect of IL-12 on lymphoproliferative response in individuals with chronic hepatitis C virus infection. *Chin J Immunol* 2000;16:220-226
- 39 Zhang LY, Ren DM, Chen LS, Guo MQ, Huang JS, Shen XR, Zhang Q, Xie YM, Chen LY, Jia FX. Immunogenicity of a multiple epitope antigen gene of hepatitis C virus in mice and rabbits. *Chin J Cellular Molecular Immunol* 2001;17:52-54
- 40 Huang JS, Hu YQ, Xie YM, Xu C, Zhang MH, Zhang LY, Chen LY, Ren DM. Immunogenicity of a multi-epitopes antigen gene of hepatitis C virus carried by attenuated *Salmonella typhimurium* SL3261. *Chin J Epidemiol* 1999;4:234-237
- 41 Huang JS, Zhong XL, Bi HX, Dong WQ, Zhang Q, Xie YM, Yuan J, Li AK, Dong N, Ren DM. Expression of multi-epitopes antigen gene of hepatitis C virus and *Plasmodium falciparum* fused to glutathione S-transferase gene. *Chin J Immunol* 1999;6:250-253
- 42 He CQ, Yang F, Dai JJ, Hu F, Huang JS, Li QH. Immune responses in rhesus monkeys vaccinated with multi-epitope antigen of HCV and challenged by HCV virus. *Viol Sinica* 2002;17:30-33
- 43 Ying W, Xu ZK, Xue XP, Ma YY, Fu L, Lu X. Study on the immunization effect of the chimeric and the united genetic immunization including HBV and HCV. *Chin J Cellular Molecular Immunol* 2001;17:473-474
- 44 Song MK, Lee SW, Suh YS, Lee KJ, Sung YC. Enhancement of immunoglobulin G2a and cytotoxic T-lymphocyte responses by a booster immunization with recombinant hepatitis C virus E2 protein in E2 DNA-primed mice. *J Virol* 2000;74:2920-2925
- 45 Zucchelli S, Capone S, Fattori E, Folgori A, Di Marco A, Casimiro D, Simon AJ, Laufer R, La Monica N, Cortese R, Nicosia A. Enhancing B- and T-cell immune response to a hepatitis C virus E2 DNA vaccine by intramuscular electrical gene transfer. *J Virol* 2000;74:11598-11607
- 46 Vidalin O, Fournillier A, Renard N, Chen M, Depla E, Boucreux D, Brinster C, Baumert T, Nakano I, Fukuda Y, Liljestrom P, Trepo C, Inchauspe G. Use of conventional or replicating nucleic acid-based vaccines and recombinant Semliki forest virus-derived particles for the induction of immune responses against hepatitis C virus core and E2 antigens. *Virology* 2000;276:259-270
- 47 Lee AY, Polakos NK, Otten GR, Ulmer JB, Houghton M, Paliard X. Quantification of the number of cytotoxic T cells specific for an immunodominant HCV-specific CTL epitope primed by DNA immunization. *Vaccine* 2000;18:1962-1968
- 48 Gordon EJ, Bhat R, Liu Q, Wang YF, Tackney C, Prince AM. Immune responses to hepatitis C virus structural and nonstructural proteins induced by plasmid DNA immunizations. *J Infect Dis* 2000;181:42-50