

# 新型呼肠病毒 S 基因 DNA 疫苗在小鼠体内的免疫原性

侯俊<sup>1</sup>, 刘泽<sup>2</sup>, 谢国明<sup>1</sup>, 罗声栋<sup>1</sup>, 李瑞生<sup>1</sup>, 白冰珂<sup>1</sup>

(1. 解放军第302医院实验技术研究保障中心, 北京 100039;  
2. 解放军第302医院肝脏肿瘤诊疗与研究中心, 北京 100039)

**【摘要】** 目的 探讨新型呼肠病毒 R4 株 S 片段免疫小鼠后引发的免疫应答。方法 构建 4 个不同 S 基因节段的重组真核表达质粒, 并免疫小鼠; ELISA 检测血清以研究 R4 特异性抗体升高水平, 并对其抗体亚型进行鉴定; ELISPOT 检测小鼠淋巴细胞 INF- $\gamma$  的表达情况。结果 与对照组相比, 4 个重组质粒免疫的小鼠血清都有明显的 R4 特异性抗体升高, 尤其以 S1 和 S3 基因免疫后抗体水平较高, 且均以 IgG2a 占绝对优势; S1 基因免疫组小鼠的细胞免疫应答最强。结论 S1 基因重组质粒免疫小鼠后可同时引发较强的体液免疫和细胞免疫应答, 是较为理想的疫苗备选基因片段。

**【关键词】** 呼肠病毒; DNA 疫苗; 体液免疫; 细胞免疫; 小鼠

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 04-0024-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.04.006

## Immunogenicity of a vaccine of S fragments from a new type reovirus generates humoral and cellular immune responses in mice

HOU Jun<sup>1</sup>, LIU Ze<sup>2</sup>, XIE Guo-ming<sup>1</sup>, LUO Sheng-dong<sup>1</sup>, LI Rui-sheng<sup>1</sup>, BAI Bing-ke<sup>1</sup>

(1. Research and Technology Service Center;  
2. Center of Therapeutic Research for Liver Cancer, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China)

**【Abstract】 Objective** To explore the humoral and cellular immune responses of a vaccine of S fragments from a new type reovirus R4 strain in mice. **Methods** Four recombinant plasmids were constructed by respectively cloning S1, S2, S3, S4 genes into pcDNA3.1<sup>+</sup>, and mice were intramuscularly immunized with the recombinant plasmids in a dose of 100  $\mu$ g/mouse. Control vector pcDNA3.1<sup>+</sup> and phosphate buffered saline (PBS) were used as negative controls. The specific antibody level and IgG subclass (IgG1, IgG2a, and IgG2b) were detected by ELISA, and cellular immune responses to R4 were assessed using an interferon (IFN)- $\gamma$  ELISpot assay. **Results** All recombinant plasmids induced significantly higher levels of anti-R4 IgG compared with that of the controls (pcDNA3.1<sup>+</sup> and PBS), and the titers were highest in the mice immunized with S1 and S3. On the other hand, S1 gene induced highest IgG2a antibody and the cellular immune response was best. **Conclusions** After the mice immunized with S1 gene recombinant plasmid, this plasmid can initiate both cellular and humoral immune responses in mice. S1 gene recombinant plasmid is a promising vaccine candidate.

**【Key words】** Reovirus; DNA vaccine; Cellular immunity; Humoral immunity; Mouse

2003年我中心从SARS患者标本中分离到1株新型呼肠病毒R4株<sup>[1]</sup>,这是继1982年国内报道分离出呼肠病毒21年后再次分离得到的呼肠病毒<sup>[2]</sup>。呼肠病毒是一种分节段病毒<sup>[3]</sup>,基因组由10个基因

节段组成,分为3组,即3个大基因节段(L1, L2, L3)、3个中基因节段(M1, M2, M3)和4个小基因节段(S1, S2, S3, S4)。其中S1基因编码 $\sigma 1$ 和 $\sigma 1s$ 蛋白,是呼肠病毒主要的抗原蛋白,能诱导宿主免疫系

**【基金项目】** 国家自然科学基金青年基金(81000735)。

**【作者简介】** 侯俊(1973-),女,博士研究生,副主任技师, E-mail: houjun5757@sina.com。

**【通讯作者】** 白冰珂(1980-),女,助理研究员, E-mail: bbk3627@sohu.com; 李瑞生(1969-),男,副研究员, E-mail: lrsheng@sohu.com。

统产生保护性中和抗体和血凝抑制抗性,是决定病毒的致病性、感染性和毒力的主要因素。S2 和 S3 基因分别编码内衣壳蛋白  $\sigma 2$  和非结构蛋白  $\sigma NS$ , 与病毒感染复制过程中结合 dsRNA 有关。S4 基因编码外衣壳蛋白  $\sigma 3$ , 对蛋白酶降解作用敏感。DNA 疫苗由于不存在毒力回升、免疫应答持久、制备简单等特点,所以在病毒流行期的预防和控制等方面起到非常关键性的作用。为了从新型呼肠病毒 4 个小基因节段中筛选出制备疫苗最佳的备选片段,研制更有效的疫苗来预防和控制新型呼肠病毒所引起的疾病。因此,本实验构建了 4 种包含不同 S 基因节段的重组质粒来免疫 BALB/c 小鼠,对其诱导的体液免疫和细胞免疫应答进行了对比分析,以期筛选出最佳的免疫片段,为今后疫苗的研发和应用提供可靠的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 重组质粒的构建

新型呼肠病毒 R4 株从北京第一例 SARS 患者咽拭子感染 Hep-2 细胞中分离。按照操作说明用 QIAamp Viral RNA Mini Kit 提取病毒 RNA,一步法 RT-PCR 分别扩增呼肠病毒小节段基因 S1、S2、S3 和 S4 片段,并分别克隆至真核表达载体 pcDNA3.1 (+) 后,构建重组真核表达质粒 pCS1、pCS2、pCS3 和 pCS4。酶切和测序分析确认重组质粒构建成功。质粒用 Qiagen Plasmid Mega Kit (Cat. No. 12181) 大量纯化并在 SmartSpec™ Plus Spectrophotometer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 上测定浓度和纯度。取符合纯度要求的质粒 DNA,根据其初始浓度稀释至终浓度为  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ,置  $-40^\circ\text{C}$  冰箱分装保存备用。

### 1.2 免疫小鼠

SPF 级 6~8 周龄的 BALB/c 小鼠 36 只,雌性,体重 18~20 g,来自军事医学科学院实验动物中心【SCXK(军)2012-0004】,实验在解放军第 302 医院动物实验室完成【SYXK(军)2012-0010】。小鼠随机分成 6 组,每组 6 只。实验 I 组,免疫 pCS1 质粒,每只 100  $\mu\text{g}$ ;实验 II 组,免疫 pCS2 质粒,每只 100  $\mu\text{g}$ ;实验 III 组,免疫 pCS3 质粒,每只 100  $\mu\text{g}$ ;实验 IV 组,免疫 pCS4 质粒,每只 100  $\mu\text{g}$ ;实验 V 组,免疫 pcDNA-3.1 质粒,每只 100  $\mu\text{g}$ ;实验 VI 组为 PBS 组,每只 100  $\mu\text{L}$ 。隔 2 周用相同剂量重组质粒加强免疫一次,共免疫 3 次。

### 1.3 免疫小鼠血清特异性抗体鉴定

每周小鼠尾静脉采血,分离血清冻存备用。特异性抗 R4 抗体的检测采用间接 ELISA 法。灭活 R4 病毒包被 96 孔板,每孔 200 ng,  $4^\circ\text{C}$  过夜。封闭后加入 1:10 稀释的血清,  $37^\circ\text{C}$  孵育 1h,每个血清样品重复 3 个复孔。羊抗鼠二抗孵育并显色后测定 405 nm 的光吸收值。

### 1.4 抗体亚型测定

IgG 抗体亚型 IgG1、IgG2a 和 IgG2b 的测定分别用 ADI 公司 ELISA 检测试剂盒 (Catalog numbers 6330, 6340, and 6350; Alpha Diagnostic International Inc., USA)。按照说明书的要求,标准品、对照和待测血清样品分别稀释后加入孔中,  $37^\circ\text{C}$  孵育 1h。再经过二抗孵育和底物显色后,测定 450 nm 的光吸收值。

### 1.5 ELISPOT 检测

第 3 次免疫后 10 d,摘眼球放血处死小鼠,取小鼠脾脏磨碎,分离淋巴细胞,用 RPMI 1640 培养液配成  $2 \times 10^6/\text{mL}$  单细胞悬液,于 96 孔板中每孔加入 100  $\mu\text{L}$ 。(96 孔板预先每孔加入 100  $\mu\text{L}$  浓度为 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的大鼠抗小鼠 INF- $\gamma$  抗体,  $4^\circ\text{C}$  过夜进行预包被。)每个基因对应的特异性肽段作为刺激抗原加入孔中与淋巴细胞  $37^\circ\text{C}$  共同孵育 18 h。按照操作说明进行二抗孵育和底物显色后,送 ELISPOT 读板仪进行读数(斑点形成细胞, SFC)。

## 2 结果

### 2.1 S 基因免疫小鼠的体液免疫反应

血清 1:10 稀释后进行 ELISA 检测,与对照组相比,4 个重组质粒免疫的小鼠血清都有明显的 R4 特异性抗体升高,其中 S3 免疫组的抗体水平最高。S1 和 S3 组的抗体水平随着免疫次数增多而逐步加强,呈持续升高。而 S4 组的抗体在第 5 周达到最高,第 6 周时抗体水平明显回落。S2 组抗体在前 4 周时抗体上升最快,而后大幅度下降,末次免疫后抗体水平最低(图 1,彩插 1)。

### 2.2 IgG 抗体亚型测定

对不同免疫小鼠血清的抗体亚型进行了检测,结果除了 S3 和 S4 免疫组之间的 IgG2b 水平没有统计学差异( $P > 0.05$ ),4 个重组质粒免疫组和 2 个对照组之间的 IgG2a、IgG2b 和 IgG1 抗体水平都有明显差异( $P < 0.001$ )。S1、S2 和 S3 免疫组的抗体以 IgG2a 占优势,而且 S1 免疫组的 IgG2a 抗体水平是 IgG2b 的 3 倍,是 IgG1 的将近 10 倍(图 2,彩插 1)。

### 2.3 S 基因免疫小鼠的细胞免疫反应

利用 ELISPOT 的方法检测了不同免疫组小鼠脾脏淋巴细胞的 INF- $\gamma$  分泌情况。所有重组质粒免疫组中分泌 INF- $\gamma$  的淋巴细胞比对照组至少有 6 倍提高 ( $P < 0.001$ ), 而且 S1 免疫组的孔中斑点最多(在每 10 万细胞中有 350 个斑点), 是 S2 组(在每 10 万细胞中有 111 个斑点)的 3 倍, S3 组(在每 10 万细胞中有 158 个斑点)的 2 倍, S4 组(在每 10 万细胞中有 56 个斑点)的将近 7 倍(图 3)。

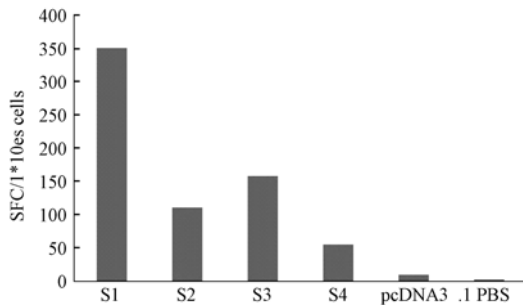


图 3 INF- $\gamma$  特异性淋巴细胞分泌检测

Fig. 3 ELISPOT assay of the secretion of specific lymphocytes in the immunized mice

## 3 讨论

呼肠病毒广泛存在于自然界中,可从许多动物体内(如蝙蝠和昆虫)分离到<sup>[4]</sup>,加之感染后常无症状,与人类疾病的关系仍未确定;但有报道认为呼肠病毒与人类某些疾病有关,如 Rosen 等<sup>[5]</sup>报道从患有轻度呼吸道和胃肠道疾病的儿童患者中分离出该病毒,而呼肠病毒 1 型曾引起爆发流行。王吉等<sup>[6]</sup>利用 RT-PCR 的方法分析了呼肠病毒 III 型。刘伟等<sup>[7]</sup>构建了小鼠 MIP-1 $\alpha$  和 B7-1 基因的慢病毒的载体,为病毒免疫原性的研究提供了参考。单纯疱疹病毒的糖蛋白 D 特异性单克隆抗体 IgG2a 在保护小鼠免受病毒攻击时就远比 IgG1 重要<sup>[8]</sup>。

该病毒的 S1 基因与原有的哺乳类呼肠病毒 1、2、3 型标准株差异较大,其氨基酸序列与目前已知呼肠病毒的同源性最高只有 64%。呼肠病毒 S1 基因节段编码  $\sigma 1$  蛋白,是病毒主要的型特异中和抗原,决定病毒的感染力和致病性,能诱导机体产生保护性中和抗体。S1 重组质粒免疫后可产生以 IgG2a 占绝对优势的抗体,这与 Nguyen 等的研究结果基本一致<sup>[9]</sup>。如果采用病毒的蛋白或肽段作为疫苗去免疫小鼠,则主要产生以 IgG1 为主的抗体<sup>[10]</sup>。对于不同的免疫途径或免疫佐剂也会影响 DNA 疫苗

的免疫应答反应,引发不同的抗体反应<sup>[11]</sup>。Th1 型细胞功能与细胞介导的免疫应答有关,可引发嗜菌细胞介导的预防感染反应,以 MHV-3 感染来说, Th1/Th2 淋巴细胞有不同的作用<sup>[12]</sup>。高滴度的抗体仅能保护初次感染,却并不能消除再次感染,仅仅有体液免疫反应对于清除病毒感染是不够的, Th1 介导的细胞免疫反应对于保护机体免受病毒攻击起到至关重要的作用。而动物模型是疫苗评价的重要手段,朱华<sup>[13]</sup>和魏东<sup>[14]</sup>等利用小鼠建立了 H7N9 禽流感病毒和 H9N2 亚型猪流感病毒的动物模型为其疫苗的评价提供了良好的研究平台。

本实验所构建的 4 种包含不同 S 基因节段的重组质粒免疫小鼠,其体液免疫反应与对照组相比,4 个重组质粒免疫的小鼠血清都有明显的 R4 特异性抗体升高,其中 S3 免疫组的抗体水平最高。S1 和 S3 组的抗体水平随着免疫次数增多而逐步加强,呈持续升高。S1、S2 和 S3 免疫组的抗体以 IgG2a 亚型为主,是 IgG2b 的 3 倍, IgG1 的 10 倍。细胞免疫反应中免疫组分泌大量的 INF- $\gamma$  淋巴细胞,比对照组至少提高了 6 倍;孔中斑点数是 S2 组的 3 倍、S3 组的 2 倍、S4 组的 7 倍,这表明 S1 基因的重组质粒引发的细胞免疫应答最强。综合血清抗体的检测结果, S1 基因的重组质粒免疫小鼠可引发较强的体液免疫和细胞免疫应答,主要以 IgG2a 占优势的抗体反应,是较为理想的疫苗选择对象。温璟<sup>[15]</sup>和丘力功等<sup>[16]</sup>利用 OK432-肿瘤疫苗和电脉冲增强治疗型 HBV DNA 疫苗评价了机体免疫细胞的免疫反应,为疫苗的评价提供了参考。因此,本研究从新型呼肠病毒 S 基因中成功地筛选出 S1 基因是构建 DNA 疫苗最佳的免疫片段,为今后研发和应用 S1 基因重组 DNA 疫苗提供了可靠的理论依据。

(本文图 1、2 见彩插 1)。

### 参 考 文 献

- [1] Duan Q, Zhu H, Yang L, et al. Reovirus, isolated from SARS patients [J]. Chin Sci Bull, 2003, 48(13):1293-1296.
- [2] 吴慎, 李印堂, 吴士芳, 等. 两株呼肠病毒的分离和鉴定 [J]. 中华医学杂志, 1982, 62(3):146-151.
- [3] Kim M, Chung YH, Johnston RN. Reovirus and tumor oncolysis [J]. J Microbiol, 2007, 45(3):187-192.
- [4] Chua KB, Crameri G, Hyatt A, et al. A previously unknown reovirus of bat origin is associated with an acute respiratory disease in humans [J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007, 104(27):11424-11429.
- [5] Rosen L, Evans HE, Spickard A. Reovirus infections in human volunteers [J]. Am J Epidemiol, 1963, 77:29-37.

- [ 6 ] 王吉, 卫礼, 贺争鸣, 等. 呼肠孤病毒 III 型 (Reo3) RT-PCR 检测方法的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(9):46-50.
- [ 7 ] 刘伟, 余英豪. 重组表达小鼠 MIP-1 $\alpha$  和 B7-1 基因的慢病毒载体的构建及鉴定 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(1):54-61.
- [ 8 ] Ishizaka ST, Piacente P, Silva J, et al. IgG subtype is correlated with efficiency of passive protection and effector function of anti-herpes simplex virus glycoprotein D monoclonal antibodies [J]. J Infect Dis. 1995, 172(4):1108-1111.
- [ 9 ] Nguyen L, Knipe DM, Finberg RW. Mechanism of virus-induced Ig subclass shifts [J]. J Immunol. 1994, 152(2):478-484.
- [ 10 ] Stasikova J, Kutinova L, Smahel M, et al. Immunization with varicella-zoster virus glycoprotein E expressing vectors; comparison of antibody response to DNA vaccine and recombinant vaccinia virus [J]. Acta Virol. 2003, 47(1):1-10.
- [ 11 ] Song L, Zhou Y, He J, et al. Comparative sequence analyses of a new mammalian reovirus genome and the mammalian reovirus S1 genes from six new serotype 2 human isolates [J]. Virus Genes. 2008, 37(3):392-399.
- [ 12 ] Whitmire JK, Benning N, Whitton JL. Cutting edge: early IFN-gamma signaling directly enhances primary antiviral CD4<sup>+</sup> T cell responses [J]. J Immunol. 2005, 175(9):5624-5628.
- [ 13 ] 朱华, 许黎黎, 鲍琳琳, 等. H7N9 禽流感病毒小鼠感染动物模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(1):18-21.
- [ 14 ] 魏东, 刘英, 徐彤. H9N2 亚型猪流感病毒感染 BALB/c 小鼠动物模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(5):54-57+98.
- [ 15 ] 温璟, 郑晓东, 武峰, 等. OK432-肿瘤疫苗对 DBA/2 小鼠外周血中 T 细胞亚群的影响 [J]. 中国医药导报, 2013, 10(11):16-18.
- [ 16 ] 丘力功, 孙希海, 韦剑, 等. 利用体内电脉冲增强治疗型 HBV DNA 疫苗细胞免疫反应的研究 [J]. 中国医药导报, 2010, 7(11):23-26.

[ 收稿日期 ] 2014-01-22

## 《中国实验动物学报》2013 年度优秀论文评选揭晓

为了配合精品期刊项目的实施,同时也为了不断提高学术水平、促进学术交流、鼓励高质量论文发表和提升期刊的学术影响力。经过本刊编辑部组织 17 位专家评选,推荐陈丹丹等撰写的《骨髓间充质干细胞黑质内移植对帕金森病大鼠的治疗作用》等三十篇文章为 2013 年度优秀论文,详细名单参见本刊投稿系统公告栏。

希望获奖作者再接再厉,继续支持本刊的发展,将您优秀的科研成果继续通过我们的园地展示给科技工作者!也期待更多的作者(尤其基金项目文章)关注我刊。

2014 年底,本刊将推出“实验动物新资源的开发与应用”专题,只要能反映“新”“特”的实验动物资源,均可投稿到中国实验动物学报。

《中国实验动物学报》编辑部