

EV71 - VP1 抗原在双歧杆菌中表达的免疫效果检测

孙艳影 金晓秋 秦丽丽 姚淑娟 刘伯阳 张 浩 周芳桦

摘 要 **目的** 检测表达肠道病毒 71 型 (enterovirus 71, EV71) VP1 基因的重组双歧杆菌免疫后小鼠 IgG、IgA 表达变化, 并对免疫的孕鼠产下的新生小鼠注射 EV71 病毒, 以检测免疫保护作用可否从母代传给子代。**方法** ELISA 法检测免疫小鼠血清 IgG、IgA 抗体效价; 用 EV71 毒株对免疫孕鼠所产下的新生小鼠攻毒。**结果** 两种抗体效价都有明显升高 ($P < 0.01$); 实验组受病毒攻击新生小鼠存活率明显高于对照组。**结论** 口服表达 VP1 蛋白的双歧杆菌能够激活体内免疫系统产生特异性抗体, 重组双歧杆菌可通过免疫孕鼠而使新生幼鼠获得保护性抗体。为研制 EV71 亚单位口服活疫苗奠定了研究基础。

关键词 肠道病毒 71 型 手足口病 双歧杆菌 口服疫苗

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.03.021

Detection of Immune Effect of EV71 - VP1 Antigen Expressed in Bifidobacteria. Sun Yanying, Jiin Xiaoli, Qin Lili, et al. Department of Medicine and Technology, Qiqihar Medical University, Heilongjiang 161006, China

Abstract **Objective** To construct a bifidobacterium recombinant carrying the VP1 gene from enterovirus71 to create an oral vaccine to prevent EV71 infection. To detect the further protective effect of the recombinant using ELISA in vivo. **Methods** We studied the efficacy of an orally administered vaccine candidate developed using recombinant baculovirus displaying VP1 (Bac - VP1) in a murine model. Gastrointestinal delivery of Bac - VP1 significantly induced VP1 - specific humoral (IgG) and mucosal (IgA) immune responses. **Results** Bifidobacterium recombinant with the VP1 gene from enterovirus71 was constructed. The virus - neutralizing titer of anti - EV71 - VP1 significantly increased than the control group. Expression of IgA and IgG increased after oral treatment. A lethal challenge test indicated that the survival rate of bac - VP1 and VP1 group was significantly higher than the control group during 14 days. **Conclusion** Bac - VP1 could be a promising oral vaccine candidate against EV71 infections. Thus, Bac - VP1 may provide a needle free, painless approach for immunization against EV71, thereby increasing patient compliance and consequently increasing vaccination coverage.

Key words Human enterovirus 71; Hand - foot - mouth disease; Bifidobacterium; Oral vaccine

肠道病毒 71 型 (enterovirus 71, EV71) 常引起严重的中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 感染, 主要表现为脊髓灰质炎样麻痹、无菌性脑炎和脑膜炎, 是引起人类手足口病 (hand - foot - mouth disease, HFMD) 死亡的主要原因。调查显示: 我国 2009 年 80.6% 的 HFMD 重症病例和 92.8% 的 HFMD 死亡病例为 EV71 感染。EV71 被普遍视为一种继脊髓灰质炎后最重要的嗜神经性肠道病毒, 是引起婴幼儿 HFMD 的主要病原体之一。引起的疾病临床症状较重, 致残率、病死率较高, 但目前针对 EV71 病毒感染的治疗还没有特异、高效的药物。

关于 EV71 疫苗研究的焦点主要集中在灭活疫苗、亚单位疫苗、DNA 疫苗、减毒活疫苗、表位肽疫苗和病毒样颗粒疫苗方面。2015 年 EV71 灭活疫苗上市。在亚单位疫苗研究方面, VP1 是研究最多的衣壳蛋白, 被认为是 EV71 中和抗原决定簇最为集中的区域, 因此针对 VP1 位点设计的 EV71 亚单位疫苗是当前研究的热点^[1-6]。双歧杆菌 (bifidobacterium) 作为基因工程受体菌具有特殊的意义: 既能发挥原有的益生功能, 还能发挥外源重组基因的功能^[6,7]。2011 年李江等^[8]应用重叠延伸 PCR 技术成功构建了 EV71 VP1 - LTB 融合表达质粒, 并在 *E. coli* BL21 (DE3) 中获得有生物学功能的 VP1 表达产物, 重组质粒电击转化长双歧杆菌。该研究成功克隆并表达了 VP1 - LTB 融合基因, 并将重组质粒转入长双歧杆菌, 为研制基于双歧杆菌表达系统的 EV71 - VP1 重组亚单位口服活疫苗奠定基础。

本课题组前期已完成如下工作: ① 获得含 891bp

基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (面上项目) (12541911)

作者单位: 161006 齐齐哈尔医学院医学技术学院 (孙艳影、姚淑娟、刘伯阳、张浩、周芳桦); 161006 齐齐哈尔医学院附属第二医院 (金晓秋、秦丽丽)

通讯作者: 孙艳影, 电子邮箱: syysunyaning@163.com

EV71 VP1 编码片段;②亚克隆 EV71 VP1 至 pGEX - 4T - 1 质粒;③重组质粒 pGEX - VP1 - EGFP 电击转化婴儿双歧杆菌,成功构建了表达 VP1 蛋白的双歧杆菌(bac - VP1),与空质粒及 PBS 对照组相比较,bac - VP1 组及 Vp1 组的中和抗体效价显著增加。

本研究旨在原有研究基础上,进一步检测重组双歧杆菌口服免疫小鼠的 IgG、IgA 表达变化,进一步检测重组双歧杆菌的免疫保护效果;并对孕鼠进行免疫,对其诞下的新生小鼠注射 EV71 病毒,以检测可否通过免疫孕(母)鼠而使新生幼鼠获得保护性抗体。为开发研制更为有效的 EV71 亚单位口服活疫苗奠定基础,并力图开拓新的免疫途径。

材料与方法

1. 毒株与细胞:EV71 阜阳 23 株(FY23)、Vero 细胞,由哈尔滨医科大学钟照华教授惠赠。

2. 用重组双歧杆菌对小鼠进行口服免疫:用表达 EV71 - VP1 蛋白的重组双歧杆菌对 4 周龄雌性 ICR 小鼠进行口服免疫(bac - VP1 组),首次剂量每只 100 μ l,间隔 2 周进行重复免疫,共 3 次。同时设两组阴性对照组:PBS 组、EGFP 转化的双歧杆菌(EGFP 组)。另设阳性对照组(VP1 组),即用纯化的重组 VP1 蛋白(50 μ g/ml)与弗氏完全佐剂充分乳化后,进行腹腔注射免疫,首次注射剂量为每只 0.4ml,间隔 2 周重复免疫,共 3 次。分别于免疫后 2、4、8 和 12 周,小鼠尾部取血,用于中和试验和 VP1 抗体效价测定。

3. 对重组双歧杆菌感染的免疫效果进行检测:选择 1 日龄、7 日龄 ICR 乳鼠,雌雄各半,随机分为 4 组,每组 10 只,实验组饮水中加入重组婴儿双歧杆菌。同时设饮水中加入未转化的婴儿双歧杆菌,空载体及 PBS 3 组为对照组。分别于免疫后 2、4、8、12 周,采集血清,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测各组血清中的 EV71 - VP1 抗体效价,纯化的重组蛋白抗原用于分别检测 VP1 的特异性血清 IgG 和黏膜 IgA 表达水平。纯化的 EV71 - VP1 蛋白包被酶标板,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,加入 0.05% 吐温 20(PBS - T),置室温 1h,不同时间点 200 倍稀释血清,室温孵育 1.5h。PBS - T 洗涤 3 次,加入 1000 倍稀释的羊抗鼠 IgG,450nm 吸光光度计测定。

4. 对免疫孕鼠产下的小鼠进行免疫保护作用延续实验:取 4 周龄雌性 ICR 小鼠进行初期免疫,免疫 2 周后交配,产后第 1、2 周进行再次免疫。新生小鼠出生 24h 后,腹腔注射(为了精确控制病毒量,防止病毒播散)50 μ l,500LD₅₀ 的 EV71 毒株。观察并记录

每组小鼠在病毒注射 14 天内的存活情况。

5. 统计学方法:实验数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用 SPSS 10.0 对数据进行非配对双尾 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 免疫小鼠 IgG 及 IgA 表达变化检测:免疫 2、4、8、12 周后收集小鼠血清,ELISA 检测 VP1 的 IgG(图 1)和肠道 IgA 抗体(图 2)效价,结果显示第 2、4、8 周抗体效价都有明显升高($P < 0.01$),且其抗体效价随免疫次数增加而升高;在第 12 周时效价略有降低但仍具有抗体表达,而阴性对照组抗体效价为 0。

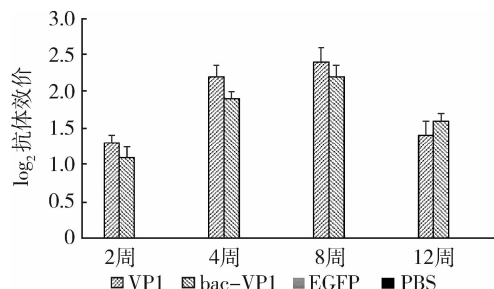


图 1 免疫小鼠抗 VP1 IgG 抗体效价

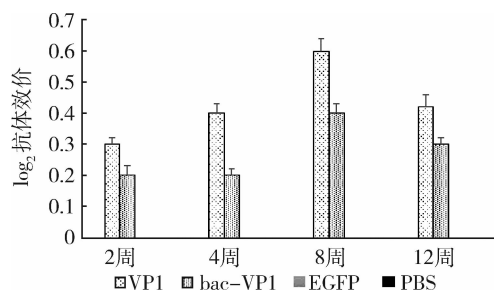


图 2 免疫小鼠抗 VP1 IgA 抗体效价

2. 免疫孕鼠产下的小鼠进行免疫保护作用延续实验结果:孕鼠进行重组双歧杆菌免疫后,对其新生小鼠注射 EV71 毒株,检测表达 VP1 蛋白的重组双歧杆菌免疫对新生小鼠的保护效果,结果见图 3。VP1 组在病毒注射后第 2、5、8、11、14 天的小鼠存活率分别为 95%、85%、70%、60%、55%;bac - VP1 组则分别为 95%、90%、70%、55%、55%,两组差异无统计学意义($P > 0.05$);对照组(EGFP 组和 PBS 组)从第 8 天起无小鼠存活。表明表达 VP1 蛋白长双歧杆菌免疫保护力可从母代维系到新生小鼠。

讨 论

目前,双歧杆菌作为基因工程受体菌的研究越来越受重视,虽然与大肠杆菌相比表达量要低 1 倍,但是双歧杆菌独特的功能性质是大肠杆菌所不能比拟的。

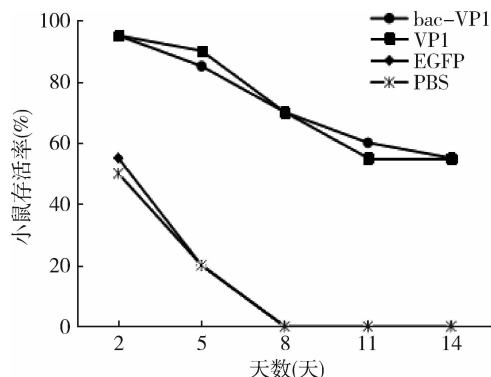


图3 500LD₅₀攻毒试验检测新生小鼠存活率($n=20$)

尤其对于 EV71 这类肠道病毒。以婴儿双歧杆菌作为宿主菌已成功表达了如下功能蛋白:大肠杆菌热不稳定肠毒素 B 亚单位(LTB)^[9];人血管内皮细胞生长因子受体 sFlt-1^[10];胞嘧啶脱氨酶和尿嘧啶磷酸核糖转移酶 UPRT^[11-13];霍乱弧菌肠毒素 B 亚单位基因^[14];幽门螺杆菌融合基因 vacA-hpaA^[15]。以长双歧杆菌作为宿主菌已成功表达了蛋白 PTEN、GFP^[16,17]。重组双歧杆菌疫苗治疗猪绦虫病及血吸虫病^[18,19]。以上研究均证实了双歧杆菌作为表达菌的可行性。

本课题组用婴儿双歧杆菌来表达 EV71-VP1 基因,检测重组蛋白的表达,动物实验鉴定重组双歧杆菌的免疫效果。本研究进一步表明,表达 VP1 蛋白的重组双歧杆菌可以唤起体内黏膜和全身性免疫反应,免疫后第 2、4、8 周抗体效价都有明显升高($P < 0.01$),且其抗体效价随免疫次数增加而升高,在第 12 周时效价略有降低但仍可检测到抗体。肠道分泌型 IgA 主要由肠黏膜的浆细胞分泌出聚合 IgA,以共价键形式在上皮细胞的嗜碱性一侧与 SC 结合,以内化的方式进入胞内形成吞饮小泡,继之以 IgA-SC 复合物形式释放入黏膜腔。sIgA 能抑制病毒的装配和释放,对减少病毒在黏膜的转换起重要作用。对孕鼠进行 3 次重复免疫,用 500LD₅₀ 的 EV71 毒株,50 μ l 攻击新生小鼠,结果表明 VP1 组和 bac-VP1 组,第 14 天新生小鼠的存活率均为 55%;对照组(EGFP 组和 PBS 组)在第 5 天时为 20%,第 8 天后则无小鼠存活。该结果表明,表达 VP1 蛋白的重组双歧杆菌的免疫保护力可从母代维系到新生小鼠。为 EV71-VP1 口服亚单位疫苗的研制提供新的思路和实验数据。可考虑通过对乳母进行疫苗接种而使幼儿获得免疫保护。具有一定的市场应用前景。

参考文献

- Jing Yuan, Xinyi Tang, Kai Yin, *et al.* GITRL as a genetic adjuvant enhances enterovirus 71 VP1 DNA vaccine immunogenicity[J]. Im-

munol Rese, 2015, 62(1):81-88

- Zhou SL, Ying XL, Han X, *et al.* Characterization of the enterovirus 71 VP1 protein as a vaccine candidate[J]. J Med Virol, 2015, 87(2): 256-262
- Zhang Zhiqin, Xiang Guoshi, Huang Xiaotian. Research progress of enterovirus 71 VP1[J]. Chinese J Zoonoses, 2015, 31(4):377-379
- Chung YC, Ho MS, Wu JC, *et al.* Immunization with virus-like particles of enterovirus 71 elicits potent immune responses and protects mice against lethal challenge[J]. Vaccine, 2008, 26(15):1855-1862
- Wu CN, Lin YC, Fann C, *et al.* Protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by passive immunization with subunit VP1 vaccines and inactivated virus. [J]. Vaccine, 2001, 20(5-6): 895-904
- Zhijian Yu, Zhen Huang, Chongwen Shao, *et al.* Oral administration of interferon- α 2b-transformed Bifidobacterium longum protects BALB/c mice against coxsackievirus B3-induced myocarditis[J]. Virology Journal, 2011, 8(1):525
- Zhijian Yu, Zhen Huang, Chongwen Sao, *et al.* Oral immunization of mice using Bifidobacterium longum expressing VP1 protein from enterovirus 71[J]. Arch Virol, 2013, 158(5):1071-1077
- 李江, 马永平, 李世彬, 等. 重叠延伸 PCR 法合成 EV71 VP1-LTB 融合基因及其原核表达. [J]. 中国微生态学杂志, 2011, 23(5):385-389
- 罗耀玲, 王勇, 黄雪萍, 等. 大肠埃希菌热不稳定肠毒素 B 亚单位在婴儿双歧杆菌中的表达[J]. 中国微生态学杂志, 2008, 20(2): 113-115
- 谢清. 人血管内皮细胞生长因子受体 sFlt-1 在婴儿双歧杆菌中的表达和鉴定[J]. 现代临床医学, 2010, 36(5):330-331
- 郭志英, 易成, 王树人, 等. 婴儿双歧杆菌/胞嘧啶脱氨酶肿瘤靶向性基因治疗系统的构建[J]. 中国肺癌杂志, 2004, 7(2):95-98
- Yi Cheng, Huang Ying, Guo Zhiying, *et al.* Construction of bifidobacterium Infantis/CD targeting gene therapy system. [J]. Chinese-German Journal of Clinical Oncology, 2005, 4(4):244-247
- Zhuhua Li, Peng Ye, Yanbiao Yang, *et al.* Construction of dual suicide gene therapy system pTRKH2/CD and pTRKH2/UPRT in Bifidobacterium infantis and its characterization[J]. Chinese-German Journal of Clinical Oncology, 2009, 8(7):375-380
- 云雪霞, 胡静, 陈清. 霍乱弧菌肠毒素 B 亚单位基因在大肠杆菌和双歧杆菌的表达[J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(2): 168-171
- 王国富, 高峰, 薛士鹏, 吴利先. 幽门螺杆菌融合基因 vacA-hpaA 的克隆及在大肠杆菌和双歧杆菌中的表达[J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(35):4388-4391
- 侯鑫, 刘俊娥. 大肠杆菌-长双歧杆菌穿梭载体的构建及 PTEN 在长双歧杆菌中的表达[J]. 微生物学报, 2006, 46(3):347-352
- 刘大伟, 孙忠科, 郭燕红, 等. 长双歧杆菌 NCC2705 高效转化系统的建立及 GFP 表达[J]. 生物技术通讯, 2010, 21(6):808-811
- Liu Mei-chen, Jiang Qiang, Zhou Bi-ying, *et al.* Dynamic observation of immune responses induced in domestic pigs by immunization with different doses of a recombinant bifidobacterium vaccine against Taenia solium[J]. J Pathogen Biol, 2014, 9(7):613-616
- Tan J, Li W, Zhang L. Construction and identification of recombinant vaccine Bifidobacterium bifidum (pGEX-Sj32) of Schistosoma japonicum[J]. Chinese J Endemiol, 2015, 34(1):37-40

(收稿日期:2017-06-23)

(修回日期:2017-07-18)