

## 呼吸道合胞病毒重组蛋白候选疫苗的质粒构建、表达及免疫原性和保护性研究

# Plasmid Construction , Expression , Immunogenicity and Protective Efficacy of Recombinant Protein Candidate Vaccine of Respiratory Syncytial Virus

曾瑞红 , 龚 伟 , 方学平 , 张振亚 , 梅兴国 \*

ZENG Rui-Hong , GONG Wei , FANG Xue-Ping , ZHANG Zhen-Ya and MEI Xing-Guo \*

军事医学科学院毒物药物研究所 , 北京 100850

Institute of Pharmacology and Toxicology , Academy of Military Medical Sciences , Beijing 100850 , China

**摘 要** PCR 扩增呼吸道合胞病毒( respiratory syncytial virus ,RSV )M2 蛋白的 CD8<sup>+</sup> T 细胞表位 F/M2 31 - 95 和 RSV-G 蛋白的 B 细胞表位片段 G :125 ~ 225( 简称 G1 ) ,以一个 Linker 连接 ,插入质粒 pET-DsbA 中构建原核表达重组质粒 ,转染 *E. coli* BL21 ( DE3 )后成功表达了融合蛋白 DsbA-G1-Linker-F/M2 31-95( 简称 D-G1LF/M2 ) ,Western-blot 结果表明该融合蛋白是 RSV 特异性的 ,采用 Ni<sup>2+</sup> 螯合亲和层析法纯化变性的包涵体溶液 ,经梯度透析法复性 ,用该蛋白免疫 BALB/c 小鼠 ,结果表明被免疫小鼠肺部及血清中产生了高滴度的抗 D-G1LF/M2 及抗 RSV IgG 抗体和中和抗体 ,同时还诱导产生了 RSV 特异性的 CTL 应答 ;IgG 的亚型 IgG1/IgG2a 的比值为 2.66 ;用 RSV 攻击免疫后的小鼠 ,病毒滴定法检测肺部 RSV 滴度 ,结果表明 D-G1LF/M2 对小鼠肺部具有保护作用。

**关键词** 呼吸道合胞病毒( RSV ) ,融合蛋白 D-G1LF/M2 ,中和抗体 ,CTL

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)04-0534-06

**Abstract** To construct plasmid of recombinant protein candidate vaccine of respiratory syncytial virus , express it in *E. coli* , and to investigate its immunogenicity and protective efficacy. A CD8<sup>+</sup> T cell epitope from respiratory syncytial virus( RSV ) M2 protein F/M2 31 - 95 and the G :125 ~ 225 ( G1 ) gene fragments from RSV-G protein containing B cell epitopes were amplified by PCR method and then inserted into the prokaryotic expression vector pET-DsbA after bonding to a linker. The fusion protein DsbA-G1-Linker-F/M2 31 - 95 ( D-G1LF/M2 ) was expressed successfully in *E. coli* BL21( DE3 ). The product was proved to be RSV-specific by Western-blot. After purified by affinity chromatography on Ni<sup>2+</sup> Sepharose and renatured by gradient dialysis. D-G1LF/M2 was used to immune BALB/c mice. D-G1LF/M2 induced high anti-D-G1LF/M2 IgG , anti-RSV IgG and neutralizing antibody titers in serum and lung of BALB/c mice , and elicied RSV-specific CTL responses. The IgG subclass distribution revealed that IgG1/IgG2a ratio was 2.66. Viral titration indicated that D-G1LF/M2 could protect BALB/c mice against RSV challenge in lung.

**Key words** respiratory syncytial virus( RSV ) , fusion protein D-G1LF/M2 , neutralizing antibody , CTL

呼吸道合胞病毒( RSV )是 1956 年首次从患鼻 炎和呼吸道感染的猩猩上分离到的一类副粘病毒 ,

广泛流行于世界各地,是婴幼儿下呼吸道感染的最重要病原<sup>[1]</sup>,也是造成老年人和免疫缺陷成人高患病率和死亡率的重要原因之一;而且婴儿期的这种感染常会发展为过敏性哮喘<sup>[2]</sup>。60年代曾经研制出一例福尔马林灭活的RSV疫苗(FI-RSV),给2个月~7岁的儿童免疫后,产生了高滴度的抗体,但是不仅没达到预防目的,反而使婴儿自然感染RSV后病情更加严重,甚至造成死亡,死者肺组织内有大量嗜酸性粒细胞和Th2型细胞因子浸润<sup>[3]</sup>。这一悲剧促使人们在动物模型中广泛研究其免疫生物学和发病机理,40多年来理论研究的积累使得疫苗的开发研究成为可能,WHO已将RSV疫苗列为全球优先发展的疫苗之一,目前已有三个疫苗进入临床研究阶段,但是由于对其安全性的要求非常严格,仍无一例安全有效的疫苗被批准上市。

亚单位疫苗的结构和理化性质明确,并且相对安全,近年来这方面的研究进展很快。 $\alpha$ 黏附蛋白)蛋白是RSV的主要抗原蛋白,可诱导机体产生强体液免疫,但诱导的细胞免疫较弱,且仅诱导CD4<sup>+</sup>T细胞产生Th2优势应答,到目前为止尚未有G蛋白特异性CD8<sup>+</sup>T细胞应答的报道,可能由于缺乏MHC I限制的细胞表位,这种免疫的不平衡性是导致机体肺部大量嗜酸性粒细胞浸润的重要原因<sup>[4,5]</sup>。研究表明:用G蛋白免疫的同时进行MHC I限制的CD8<sup>+</sup>T细胞的诱导,可显著降低Th2型细胞因子,并使体液免疫和细胞免疫趋于平衡,从而防止肺部嗜酸性粒细胞浸润<sup>[6]</sup>,另外,CD8<sup>+</sup>CTL是具有高度靶向性的杀伤细胞,在清除病毒感染方面具有重要作用。已知M2蛋白(基质蛋白,22kDa)含有一个强CD8<sup>+</sup>T细胞表位,单独rVVG $\alpha$ 表达全长G蛋白和M2蛋白的重组牛痘病毒)或rVVG与rVVM2的混合物免疫BALB/c小鼠都同时诱导了特异性的抗体和CD8<sup>+</sup>CTL,CD8<sup>+</sup>T细胞的激活下调了Th2型应答,抑制了肺部嗜酸性粒细胞的浸润<sup>[6]</sup>,但是由于安全性问题,rVV(重组牛痘病毒)不能用于临床,将M2的CD8<sup>+</sup>T细胞表位片段M2:81-95偶联到麻疹病毒F蛋白(融合蛋白)片段的C端构成融合肽F/M2:81-95,可保证该片段的 $\alpha$ -螺旋结构,并促进其与细胞的结合,该融合肽在BALB/c鼠中诱导了RSV特异性CTL反应,但不产生抗体应答<sup>[7]</sup>;那么将F/M2:81-95与G蛋白融合表达是否会改善单独免疫的不足呢?本实验利用基因重组的方法将G蛋白的B细胞表位片段G1和F/M2:81-95插入pET-DsbA载体

中(为了维持G1的天然结构,在G1和F/M2:81-95之间设计了一个Linker),构建了重组质粒pET-DsbA-G1-Linker-F/M2:81-95(pET-DsbA-G1LF/M2),将该质粒转化*E. coli* BL21(DE3),成功表达了融合蛋白D-G1LF/M2,经Western-blot鉴定,该蛋白能被RSV特异性抗血清识别;用尿素裂解包涵体,经Ni<sup>+</sup>螯和sepharose亲和层析柱纯化,梯度透析复性后得到了纯度较高的融合蛋白D-G1LF/M2;用该蛋白免疫BALB/c小鼠,诱导产生了高滴度的抗D-G1LF/M2及抗RSV IgG抗体和中和抗体,IgG的亚型IgG1/IgG2a的比值为2.66,另外还诱导了RSV特异性的CTL应答,并对RSV攻击的小鼠具有保护作用,这些结果表明,融合蛋白D-G1LF/M2有望开发为一个安全有效的RSV疫苗。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

pET-DsbA表达载体、*E. coli* DH5 $\alpha$ 和*E. coli* BL21(DE3)由本室保存;Linker和F/M2的核苷酸序列由ABI 3900 DNA synthesizer(AuGCT Biotech, Beijing)合成,由本室将二者连接并克隆在质粒pET-DsbA中(pET-DsbA-LC);含G蛋白全长cDNA的pUC18-G10质粒由本室保存;一抗:兔抗RSV血清本室自制,羊抗鼠及羊抗兔HRP-IgG抗体购自中山生物技术公司,羊抗鼠HRP-IgG1和HRP-IgG2a抗体为Caltag Laboratories Inc.产品;BamH I、Nhe I等内切酶与相应缓冲液、PCR试剂以及T4DNA连接酶购自TaKaRa公司,IPTG、硝酸纤维素膜、二氨基联苯胺、MTT均为Amresco公司产品;Chelating Sepharose Gel为Pharmacia公司产品;DNA测序由上海生工公司完成;病毒RSV-A、Hep-2细胞和P815细胞由本室保存;6~9周龄雌性BALB/c小鼠购自军事医学科学院动物中心。

### 1.2 方法

1.2.1 原核表达质粒pET-DsbA-G1LF/M2的构建:PCR扩增G1和Linker-F/M2:81-95(LF/M2)片段,用BamH I切G1片段得到5'粘端、3'平端的酶切产物,Nhe I切LF/M2得到5'平端、3'粘端的酶切产物,BamH I和Nhe I双酶切载体pET-DsbA,三者按一定比例混合,用T4DNA连接酶连接,即得重组质粒pET-DsbA-G1LF/M2;对构建的载体进行PCR和DNA测序鉴定。

表 1 PCR 所用的引物序列及其内切酶位点

Table 1 Primer sequences used for the PCR and endonuclease sites

Construct	Primer sequence	Endonuclease site
G1	5'GCGGATCCAACCTGCAACCCACAACAG 3' 5'TACTTCCTTCGGTTTACTGTTGAGGTTTATGAT 3'	<i>Bam</i> H I
Linker-F/M2 81-95	5'CGTAGCTTTAACTTTCCGATTCT 3' 5'GAGCGGCTAGCAGCGCTCTGTTTGGTG 3'	<i>Nhe</i> I

**1.2.2 融合蛋白 D-G1LF/M2 的转化和表达** :用重组质粒 pET-DsbA-G1LF/M2 转化 *E. coli* BL21( DE3 ) ,挑取单克隆于 LB 培养基中 30℃ 过夜 ,次日按 1 :40 转接 35℃ 培养至  $OD_{600}$  为 0.6 ~ 0.8 ,加入 100 $\mu$ g/mL IPTG 35℃ 诱导 ,离心收集表达菌体 ,重悬于 PBS 中。

**1.2.3 Western-blot 鉴定** :菌体蛋白经 SDS-PAGE 后电转移至硝酸纤维素膜上。将膜置于 5% 的牛血清白蛋白溶液中 37℃ 封闭 2h ,然后依次加兔抗 RSV 血清和羊抗兔 HRP-IgG ,分别在 37℃ 孵育 2h ,最后用二氨基联苯胺显色液显色。

**1.2.4 裂解包涵体** :反复冻融破菌 ,离心收集包涵体 ,用适量缓冲液 A( 含 2mol/L 尿素的 PBS ,pH7.2 ) 重悬洗涤 2 次 ,离心收集包涵体 ,加适量的缓冲液 B( 含 6mol/L 尿素的 PBS ,pH7.2 ) 重悬裂解 ,室温放置 2h ,离心 ,收集上清以备纯化。

**1.2.5 Ni<sup>2+</sup> 螯合亲和层析** :取 5mL Chelating Sephrose Fast Flow 介质装柱 ,经缓冲液 B 平衡后上样 ,用洗涤缓冲液 C( 含 6mol/L 尿素、30mmol/L 咪唑的 PBS ,pH7.2 ) 洗柱 ,用洗脱缓冲液 D( 含 6mol/L 尿素、250mmol/L 咪唑的 PBS ,pH7.2 ) 洗脱 ,收集洗脱液 ,SDS-PAGE 分析。

**1.2.6 梯度透析复性** :将上述洗脱液对尿素梯度为 4mol/L $\rightarrow$ 2mol/L $\rightarrow$ 0.5mol/L $\rightarrow$ 0mol/L 的缓冲液依次透析 ,离心 ,取上清液冻干 ,Bradford 法测定复性后的蛋白浓度。

**1.2.7 动物免疫和病毒攻击** :分别取 D-G1LF/M2 和 D-G1( 对照 ) 蛋白 30 $\mu$ g/200 $\mu$ L/只 腹腔注射免疫 BALB/c 小鼠( 佐剂 Al(OH)<sub>3</sub> 至终浓度 0.4mg/200 $\mu$ L ) ,每组 5 只 ,每隔 10d 加强一次 ,共免疫 3 次 ,PBS 作为阴性对照。最后一次免疫后 10d 心脏取血分离血清 ,取脾制备脾单细胞悬液 ,取肺组织匀浆收集上清 ,用 1mL PBS 冲洗鼻腔 ,收集鼻腔冲洗物( NTL ) ,免疫后 3 周用 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub> RSV-A/50 $\mu$ L/只 经鼻腔攻击鼠 ,5d 后取肺匀浆上清及 NTL。

**1.2.8 体液免疫应答的检测** :

( 1 ) ELISA 检测抗体滴度 :微孔板用 50 $\mu$ L/孔 D-G1LF/

M2 或 RSV 的 PBS 溶液 4℃ 包被过夜 ,用 200 $\mu$ L/孔 1% BSA( W/V ) 的 PBS 于 37℃ 封闭 2h ,加两倍系列稀释的样品孵育 2h ,阴性对照不加样品 ;用 PBST 洗涤 ,加适当稀释的 50 $\mu$ L/孔的羊抗鼠 HRP-IgG 或 HRP-IgG1 或 IgG2a 二抗室温孵育 1.5h。洗涤后加入二氨基联苯胺 ,室温放置 10min ,然后用 2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应。于 490nm 检测 OD 值。ELISA 滴度表示为最后稀释度的倒数 ,OD  $\geq$  0.15 并且至少是阴性对照的 2 倍。

( 2 ) 空斑抑制实验检测中和抗体滴度 :适当浓度的 RSV 与等体积 3 倍系列稀释的样品混合 ,37℃ 孵育 1.5h ,加载于 Hep-2 单层细胞上 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 吸附 1.5 ~ 2h ,加 0.8% 甲基纤维素 200 $\mu$ L ,继续培养 3 天 ,数空斑 ,计算 60% 抑制率的样品最大稀释倍数。

**1.2.9 MTT 法检测 CTL 应答** :取被免疫小鼠的脾细胞悬液 ,用 0.5 $\mu$ mol/L 的融合蛋白体外刺激 7d ,得效应细胞 ,取 P815 细胞按 1PFU/细胞的比例与 RSV 共培养 2h ,得靶细胞 ;然后在 96 孔板中按不同的效/靶比 60.0:1 ,30.0:1 ,15.0:1 ,7.5:1 加载效应细胞和靶细胞 ,未感染的 P815 细胞作为对照 ,共培养 4h ;MTT 法检测细胞杀伤率。

$$\text{细胞杀伤率} = 1 - ( OD_{\text{样品}} - OD_{\text{效应细胞}} ) / OD_{\text{靶细胞}} \times 100\%$$

**1.2.10 肺病毒滴定** :将攻毒后的肺匀浆上清 10 倍比稀释 ,加载于 96 孔板中 Hep-2 单层细胞上 100 $\mu$ L/孔 吸附 1.5 ~ 2h ,洗涤 1 次 ,加细胞维持液 200 $\mu$ L/孔 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养 9 ~ 10d( 中间转种 1 次 ) ,观察细胞病变 ,计算 TCID<sub>50</sub>。病毒滴度降低 2log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub> 认为具有保护性。

## 2 结果

### 2.1 原核表达质粒 pET-DsbA-G1LF/M2 的构建

成功构建了重组质粒 pET-DsbA-G1LF/M2( 图 1 )。PCR 扩增了 G1( 303bp ) 和 LF/M2( 138bp ) 单个基因片段和 G1LF/M2( 441bp ) 全长基因片段( 图 2 ) ,分子量与理论值均一致。DNA 测序结果表明外源片段 G1 和 LF/M2 正确插入了 pET-DsbA 质粒中。

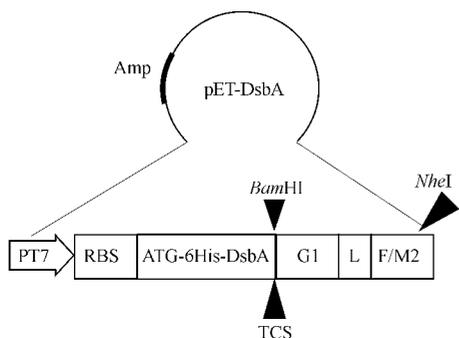


图1 重组质粒 pET-DsbA-G1LF/M2 的结构图

Fig.1 Schematic representation of recombinant plasmid pET-DsbA-G1LF/M2

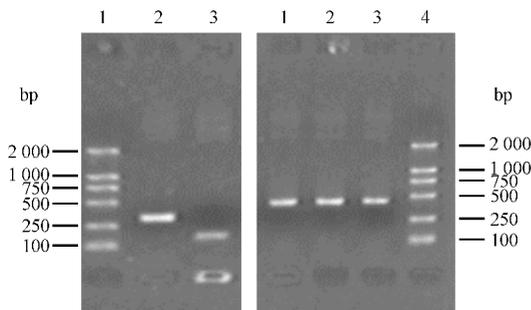


图2 重组质粒 pET-DsbA-G1LF/M2 的 PCR 鉴定

Fig.2 Identification of the recombinant plasmid pET-DsbA-G1LF/M2 by PCR

1 : marker ; 2 : G1 gene fragment ; 3 : LF/M2 gene fragment. Right 1 2 3 : G1LF/M2 gene fragment ; 4 : marker.

**2.2 融合蛋白 D-G1LF/M2 的诱导表达、纯化和复性**  
 重组表达质粒转化 *E. coli* BL21( DE3 ), IPTG 诱导, 经 12% SDS-PAGE 分析可见明显的表达蛋白带 (图 3 第 2 泳道), 分子量约为 40.9kD, 表达量约占

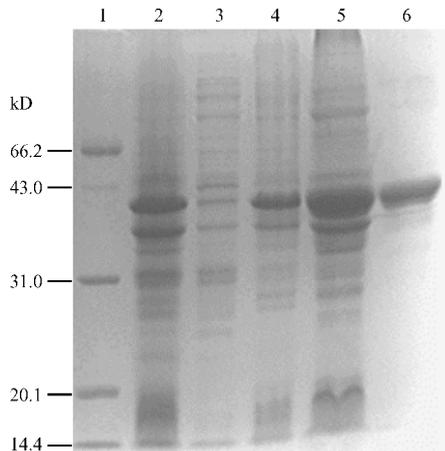


图3 融合蛋白 D-G1LF/M2 的表达纯化

Fig.3 Expression and purification of D-G1LF/M2 fusion protein  
 1 : protein molecular weights Marker ; 2 : lysates of bacteria ; 3 : supernatant ; 4 : sediment ; 5 : lysates of inclusion bodies ; 6 : purified D-G1LF/M2 fusion protein.

细菌总蛋白的 30%。破菌离心后的上清和沉淀经 12% SDS-PAGE 分析可知:目的蛋白以包涵体的形式存在于沉淀中(图 3 第 3、4 泳道)。利用金属螯合亲和层析一步纯化法,用低浓度的咪唑缓冲液洗涤杂蛋白,用高浓度咪唑缓冲液洗脱目的蛋白,经 SDS-PAGE 分析目的蛋白纯度可达 90% 以上(图 3 第 6 泳道),透析、冻干、复溶后用 Bradford 法测定复性后的蛋白浓度为 1.2mg/mL。

**2.3 融合蛋白的 Western-blot 鉴定**

免疫印迹显示,含重组质粒的菌体蛋白在 40.9kD 处出现了抗原抗体结合条带(图 4),即能为抗血清所识别,说明表达的融合蛋白 D-G1LF/M2 具有 RSV 特异反应性。

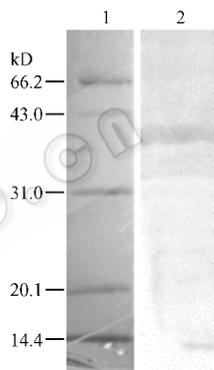


图4 融合蛋白 D-G1LF/M2 的 Western-blot 分析

Fig.4 Western-blot analysis of D-G1LF/M2 fusion protein

1 : protein molecular weights marker ; 2 : Western-blot of lysates of bacteria.

**2.4 免疫鼠血清、肺及 NTL 中抗 D-G1LF/M2 和抗 RSV IgG 抗体滴度**

用 ELISA 检测了血清、肺匀浆上清及 NTL 中的抗 D-G1LF/M2 和抗 RSV IgG 抗体滴度(图 5),D-G1LF/M2 诱导产生了强烈的抗蛋白自身和抗 RSV 的抗体,抗体主要集中在血清和肺部,鼻腔中很少。

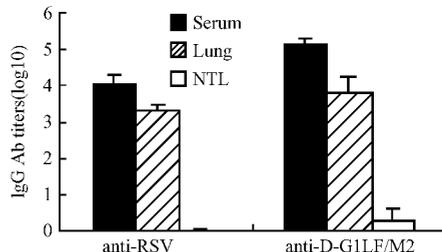


图5 腹腔注射 D-G1LF/M2 免疫 BALB/c 小鼠诱导的血清、肺及 NTL 中抗 D-G1LF/M2 和 RSV 抗体

Fig.5 Geometric means of serum , lung or NTL antibody titers ainst D-G1LF/M2 or RSV in miceimmunized with i. p. D-G1LF/M2

**2.5 血清中抗 RSV 的 IgG1 和 IgG2a 滴度**

我们进一步对 IgG 的亚型 IgG1 和 IgG2a 进行了

测定,ELISA 结果如表 2 所示:D-G1LF/M2 免疫 BALB/c 小鼠诱导了滴度为 1.47 的 IgG2a 应答,IgG1/IgG2a 为 2.66,而对照组 D-G1 免疫的 BALB/c 小鼠血清中无可检测的 IgG2a,表明:与单独的 G1 片段相比,CD8<sup>+</sup> T 细胞表位的引入,使得融合蛋白 D-G1LF/M2 诱导的免疫应答更平衡。

表 2 D-G1 和 D-G1LF/M2 免疫 BALB/c 小鼠后所诱导的血清 anti-RSV 抗体亚型应答

Table 2 Serum anti-RSV isotype response following immunization of BALB/c mice with fusion protein D-G1 or D-G1LF/M2

Immunogen	Dose μg	Mean ELISA titers( log <sub>10</sub> ) <sup>a</sup>			
		IgG	IgG1	IgG2a	IgG1/IgG2a
D-G1	30.00	3.60 ± 0.42	3.43 ± 0.20	< 0.48	> 7.15
D-G1LF/M2	30.00	4.0 ± 0.16	3.91 ± 0.00	1.47 ± 0.20	2.66
PBS	-	0	0	0	-

<sup>a</sup>Results are expressed as means ± S. D. of antibody titers ( log<sub>10</sub> ). Each group contains 5 mice.

### 2.6 血清、肺及 NTL 中抗 RSV 的中和抗体

用空斑抑制实验对血清、肺及 NTL 中抗 RSV 的中和抗体滴度进行了检测(表 3),结果表明:用 D-G1LF/M2 免疫 BALB/c 小鼠,可在血清中诱导很强的中和抗体滴度,肺组织中略弱,NTL 中检测不到。PBS 阴性对照组中无可检测的中和抗体。RSV 的感染部位主要是下呼吸道,该融合蛋白诱导的肺部高滴度抗体和中和抗体对于保护动物免受病毒攻击是非常重要的。

表 3 D-G1LF/M2 在 BALB/c 小鼠体内诱导的抗 RSV 中和抗体滴度

Table 3 Geometric means of neutralizing activity against RSV in BALB/c mice immunized with D-G1LF/M2

Immunogen	Neutralizing Ab titer( mean reciprocal log <sub>2</sub> ) <sup>a</sup>		
	Serum	Lung	NTL
D-G1LF/M2	4.92 ± 0.00	3.83 ± 0.52	-
PBS	0	0	0

<sup>a</sup>Results are expressed as means ± S. D. of antibody titers ( log<sub>10</sub> ). Each group contains 5 mice.

### 2.7 CTL 应答

MTT 法检测 CTL 对靶细胞的特异杀伤活性(图 6)结果表明:融合蛋白 D-G1LF/M2 经腹腔注射免疫 BALB/c 鼠,诱导了 RSV 特异性的 CTL 应答。

### 2.8 病毒攻击后的保护性

免疫后 3 周用 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub> RSV-A/50μL/只 经鼻腔

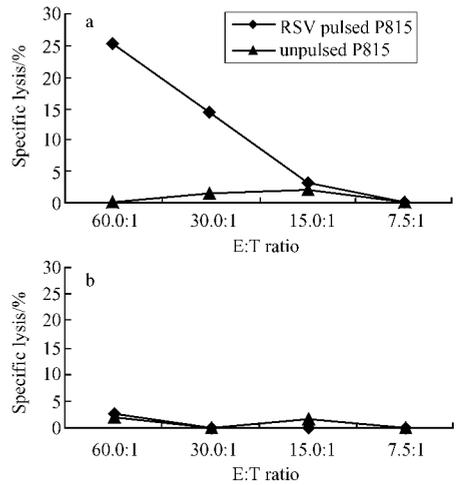


图 6 D-G1LF/M2 免疫 BALB/c 小鼠诱导 RSV 特异性的 CTL 应答

Fig. 6 Induction of virus-specific CTL responses in BALB/c mice following D-G1LF/M2 immunization a : D-G1LF/M2 immunization group ; b : PBS immunization group

攻击鼠,5d 后取肺匀浆上清,病毒滴定结果(表 4)表明:与 PBS 对照组相比,实验组的肺病毒滴度降低了 3.8log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>(约 6000 倍),可见 D-G1LF/M2 对被免疫小鼠具有明显的保护作用。

表 4 D-G1LF/M2 对 BALB/c 小鼠的保护性

Table 4 Immunoprotective ability of D-G1LF/M2 against RSV-A challenge in BALB/c mice

Mice immunized with	RSV titer <sup>a</sup> TCID <sub>50</sub> /g lung	Animals protected/total
PBS	5.38 ± 0.39	0/5
D-G1LF/M2	1.58 ± 0.21	5/5

<sup>a</sup>Results are expressed as means ± S. D. of antibody titers ( log<sub>10</sub> ).

## 3 讨论

RSV 感染是婴幼儿支气管肺炎的重要病因,在 RSV 的疫苗研究中,重组亚单位疫苗是一个研究热点,BBG2Na 是将 G 蛋白融合到链球菌的 BB 蛋白的 C 端而构成的一例重组亚单位疫苗,已进入 III 期临床研究,但其仅诱导体液免疫,不产生 CD8<sup>+</sup> T 细胞免疫,而且 IgG 抗体亚型仅为 IgG1(Th2)型,检测不到 IgG2a,由于这种免疫的不平衡性,致使其只能在成人中进行临床研究,不适用于儿童<sup>[3]</sup>。本研究将 G 蛋白片段 G1 和 F/M2 :81-95 片段插入到原核表达质粒中,构建了重组质粒,在大肠杆菌中高效表达了融合蛋白 D-G1LF/M2;免疫原性研究结果表明:D-

G1LF/M2 能诱导小鼠肺部及血清中产生高滴度的抗 D-G1LF/M2 及抗 RSV IgG 抗体和中和抗体,这一结果与 BBG2Na 以及其它有关 G 蛋白的研究是一致的。同时,该融合蛋白诱导产生了 RSV 特异性的 CTL 活性,这是由于引入了 CD8<sup>+</sup> T 细胞表位 M2 :81 - 95,该表位刺激特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞增殖,从而产生 RSV 特异性的杀伤活性,但是比 rVVM2<sup>[6]</sup>和 F/M2 81 - 95<sup>[7]</sup>所诱导的杀伤率略低,这可能和与之连接的 DsbA-G1-Linker 对其结构及功能的影响有关;另外,正如我们所期望的,出现了 IgG2a 亚型的抗体应答,IgG1/IgG2a 的比值为 2.66,IgG2a 是与 Th1 相关的亚型,这进一步证实了“CD8<sup>+</sup> T 细胞的激活可下调 Th2 型应答”的结论。用 10<sup>6</sup>TCID<sub>50</sub> 的 RSV 攻击免疫后的小鼠,病毒滴定法检测肺部 RSV 滴度,结果表明融合蛋白 D-G1LF/M2 对小鼠下呼吸道具有保护作用。

目前 RSV 疫苗的瓶颈在于安全性问题,以 G 蛋白为基础设计的亚单位疫苗与 FI-RSV 类似,主要诱导 Th2 优势应答并因此导致肺部嗜酸性粒细胞浸润。CD8<sup>+</sup> T 细胞能潜在地调节 CD4<sup>+</sup> T 细胞在不同阶段的分化和激活,是 Th2 驱动的嗜酸性粒细胞增多症的关键调节子<sup>[8]</sup>,用 G 蛋白免疫的同时进行 CD8<sup>+</sup> T 细胞的诱导可显著降低 Th2 型细胞因子<sup>[9]</sup>。可见 CD8<sup>+</sup> CTL 应答不仅可直接杀伤 RSV,而且可调节免疫的平衡性,从而降低疫苗的副作用,增强其安全性。候选疫苗 D-G1LF/M2 在诱导 CTL 的同时诱导了 IgG2a 应答,IgG1/IgG2a 比例的降低,意味着 Th1/Th2 比例的升高,即免疫应答趋于平衡,预示 D-G1LF/M2 更加安全,因此有望将其开发为一个安全

有效的 RSV 疫苗,下一步将对其安全性进行系统地研究。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Meissner HC. Economic impact of viral respiratory disease in children. *J Pediatr*, 1994, **24** :s17 - 21
- [ 2 ] Shay DK, Holman RC, Newman RD *et al.* Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *JAMA*, 1999, **282** : 1440 - 1446
- [ 3 ] Kim HW, Canchola JG, Brandt CD *et al.* Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol*, 1969, **89** :422 - 434
- [ 4 ] Alwan WH, Record FM, Openshaw PJ. Phenotypic and functional characterization of T cell lines specific for individual respiratory syncytial virus proteins. *J Immunol*, 1993, **150** :5211 - 5218
- [ 5 ] Nicholas JA, Rubino KL, Lively ME *et al.* Cytolytic T-lymphocyte responses to respiratory syncytial virus: Effector cell phenotype and target proteins. *J Virol*, 1990, **64** :4232 - 4241
- [ 6 ] Srikiatkachim A, Braciale TJ. Virus-specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes downregulate T helper cell type 2 cytokine secretion and pulmonary eosinophilia during experimental murine respiratory syncytial virus infection. *J Exp Med*, 1997, **186** :421 - 432
- [ 7 ] Hsu SC, Chargelegue D, Steward MW. Reduction of respiratory syncytial virus titer in the lungs of mice after intranasal immunization with a chimeric peptide consisting of a single CTL epitope linked to a fusion peptide. *Virology*, 1998, **240** :376 - 381
- [ 8 ] Cameron P, Simmons, Tract H *et al.* Mucosal delivery of a respiratory syncytial virus CTL peptide with enterotoxin-based adjuvants elicits antiviral CD8<sup>+</sup> T cell responses. *J Immunol*, 2001, **166** :1106 - 1113
- [ 9 ] Tracy H, Christopher JB, Anne OG *et al.* CD8<sup>+</sup> T cells control Th2-driven pathology during pulmonary respiratory syncytial virus infection. *Eur J Immunol*, 1997, **27** :3341 - 3349