

甲型 H5N1 流感病毒 M2 与 HA 双基因载体疫苗在小鼠体内的免疫学评价

郭建强¹, 姚立红¹, 陈爱珺¹, 徐一¹, 刘晓宇¹, 舒跃龙², 张智清¹

1 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所 病毒基因工程国家重点实验室, 北京 100052

2 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所 传染病预防控制国家重点实验室 国家流感中心, 北京 100052

摘要: 高致病性 H5N1 亚型禽流感病毒 (AIV) 严重威胁到人类健康, 因此研制高效、安全的禽流感疫苗具有重要意义。以我国分离的首株人 H5N1 亚型禽流感病毒 (A/Anhui/1/2005) 作为研究对象, PCR 扩增基质蛋白 2 (M2) 和血凝素 (HA) 基因全长开放阅读框片段, 构建共表达 H5N1 亚型 AIV 膜蛋白基因 M2 和 HA 的重组质粒 pStar-M2/HA。此外, 还通过同源重组以 293 细胞包装出表达 M2 基因的重组腺病毒 Ad-M2 以及表达 HA 基因的重组腺病毒 Ad-HA。用间接免疫荧光 (IFA) 方法检测到了各载体上插入基因的表达。按初免-加强程序分别用重组质粒 pStar-M2/HA 和重组腺病毒 Ad-HA+Ad-M2 免疫 BALB/c 小鼠, 共免疫 4 次, 每次间隔 14 d。第 1、3 次用 DNA 疫苗, 第 2、4 次用重组腺病毒载体疫苗, 每次免疫前及末次免疫后 14 d 采集血清用于检测体液免疫应答, 末次免疫后 14 d 采集脾淋巴细胞用于检测细胞免疫应答。血凝抑制 (HI) 实验检测到免疫后小鼠血清中的 HI 活性。ELISA 实验检测到免疫后小鼠血清中抗 H5N1 亚型流感病毒表面蛋白的 IgG 抗体。ELISPOT 实验检测到免疫后小鼠针对 M2 蛋白和 HA 蛋白的特异性细胞免疫应答。流感病毒 M2 与 HA 双基因共免疫的研究, 为研究开发新型重组流感疫苗奠定了基础。

关键词: H5N1 亚型流感病毒, 基质蛋白 2, 血凝素, 联合免疫

Immunological evaluation of vector-expressed M2 and HA genes of H5N1 influenza virus in mice

Jianqiang Guo¹, Lihong Yao¹, Aijun Chen¹, Yi Xu¹, Xiaoyu Liu¹, Yuelong Shu², and Zhiqing Zhang¹

1 State Key Laboratory for Molecular Virology and Genetic Engineering, Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China

2 Chinese Influenza Center, State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China

Abstract: We developed vectors expressing two antigen of H5N1 influenza virus. Based on the human H5N1 avian influenza virus strain A/Anhui/1/2005 isolated in China, we amplified the matrix protein 2 (M2) and Hemagglutinin (HA) genes by PCR and subcloned them into pStar vector to construct two genes co-expressing recombinant DNA vaccine pStar-M2/HA. After transfection of

Received: November 5, 2009; **Accepted:** March 21, 2010

Supported by: Major Special Science and Technology Project for Prevention and Treatment of AIDS and Viral Hepatitis and Other Major Infectious Diseases (No. 2009ZX10004-710).

Corresponding author: Zhiqing Zhang. Tel: +86-10-63519655; Fax: +86-10-63532053; E-mail: zhang_zq@hotmail.com

Yuelong Shu. Tel/Fax: +86-10-63577499; E-mail: yshu@vip.sina.com

“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项 (No. 2009ZX10004-710) 资助。

293 cells with the plasmid, we confirmed with indirect immunofluorescence assay (IFA) that *M2* and *HA* genes cloned on plasmid pStar co-expressed successfully. Using Ad-Easy adenovirus vector system, by homologous recombination in bacteria and packaging in 293 cells, we constructed two recombinant adenoviruses, namely Ad-M2 and Ad-HA. After infection of 293 cells with the recombinant adenoviruses, we confirmed with IFA that *M2* and *HA* genes cloned into adenoviruses expressed successfully. We then combined the recombinant DNA vaccine and adenoviral vector vaccines in immunization of BALB/c mice with a prime-boost regime. On day 0 and day 28, we immunized the mice with DNA vaccine and on day 14 and day 42, with recombinant adenovirus vaccines. We took blood samples before each injection and 14 days after the final injection. On day 56, we collected splenocytes from the mice. ELISA and hemagglutination inhibition (HI) assay showed that the vaccines successfully induced specific IgG antibodies against HA protein in serum of the immunized mice. ELISPOT confirmed that the vaccines successfully induced the special cellular immune response to M2 and HA protein of H5N1 influenza virus. The study on combined immunization with *M2* and *HA* genes provided basis for development of novel influenza vaccine.

Keywords: H5N1 influenza virus, matrix protein 2 (M2), hemagglutinin (HA), combined immunization

禽流感 (Avian influenza, AI) 于 1878 年首发于意大利, 后证实是由正粘病毒科流感病毒属 A 型流感病毒引起。禽流感不仅给畜牧业带来巨大的经济损失, 而且严重威胁到人类的健康和生命。1997 年我国香港首次发现 H5N1 亚型禽流感病毒 (Avian Influenza Virus, AIV) 感染人的病例, 2005 年 10 月, 我国安徽省发生首例确诊的人感染 H5N1 亚型 AIV 病例^[1], 并分离到我国首株人 H5N1 亚型 AIV (A/Anhui/1/2005)。目前已有多个国家出现 H5N1 亚型 AIV 感染人的情况。AIV 在公共卫生学上的意义, 使得研制高效、安全、生产工艺简单、适合人用的 AI 疫苗成为病毒学工作者的重要任务。

血凝素 (Hemagglutinin, HA) 是流感病毒颗粒表面的一种糖蛋白, 具有凝集红细胞的能力, 它可以识别靶细胞受体并与之结合, 在病毒吸附和膜融合过程中起着重要作用, HA 能诱导保护性中和抗体的产生, 是流感疫苗的重要组成部分。流感病毒基质蛋白 2 (Matrix protein 2, M2) 大量表达于感染细胞的表面, 具有对病毒脱壳和出芽起重要作用的离子通道活性。M2 蛋白不仅可以诱导机体产生抗体, 而且是细胞毒性 T 淋巴细胞的靶抗原, 因此可作为研究流感亚单位疫苗的靶蛋白。

DNA 疫苗作为一种新型疫苗, 可有效刺激体液和细胞免疫应答, 适合在联合免疫时作为初免疫苗使用, 是一种非常安全的候选疫苗。pStar 载体具有巨细胞病毒 (Cytomegalovirus, CMV) 强启动子和内部核糖体进入位点序列 (Internal ribosome entry

site, IRES), IRES 上游和下游各有一个多克隆位点 (Multiple cloning site, MCS), 可用于构建双基因共表达 DNA 疫苗。腺病毒载体在哺乳动物中可高效表达外源蛋白, 已经广泛应用于疫苗研究。与复制型腺病毒相比, 非复制型腺病毒更为安全, 而且因非复制型腺病毒以低剂量产生抗原蛋白, 不裂解细胞, 有利于激发长期的免疫反应^[2]。已有文献报道使用腺病毒载体表达流感病毒的 HA 蛋白并获得了较好的动物免疫效果^[3-4]。

本实验构建了重组质粒 pStar-M2/HA 以及重组腺病毒 Ad-HA、Ad-M2, 将其作为疫苗联合免疫小鼠, 对免疫效果进行评价。

1 材料和方法

1.1 材料

灭活 H5N1 亚型流感病毒 (A/Anhui/1/2005)、M2 及 HA 基因模板、马红细胞 (Horse red cells, HRC)、火鸡红细胞 (Turkey red cells, TRC)、受体破坏酶 (Receptor destroying enzyme, RDE) 由国家流感中心提供; 双基因共表达 pStar 载体、Ad-Easy 腺病毒载体系统、293 细胞由本室保存; 表达 HA 单基因的重组 pStar-HA 由本室构建; 引物合成及测序由三博远志公司完成; 各种限制性内切酶、Pyrobest DNA 聚合酶、去磷酸化酶 CIAP 购自 TaKaRa 公司; pGEM-T Easy Vector 购自 Promega 公司; DNA 片段回收试剂盒、质粒 DNA 小量快速提取试剂盒、去内毒素质粒大量提取试剂盒购自 Qiagen 公司;

大片段质粒提取试剂盒购自 Omega 公司; DMEM 培养基、胎牛血清、OPTI-MEM 购自 Gibco 公司; Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; 鼠抗 H5N1 M2 多克隆抗体、鼠抗 H5N1 HA 多克隆抗体由本室制备; FITC 标记的羊抗鼠 IgG 购自中杉金桥公司; 4~6 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司; DNA 疫苗免疫添加 CpG 基序作为佐剂, 序列为: 5'-TCCATGACGTTCCCTGACGTT-3', 由 TaKaRa 公司合成, 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所蒋涛博士惠赠; 包含 H5N1 亚型流感病毒 HA 蛋白所有氨基酸残基的肽库 (含 77 条多肽) 及 M2 蛋白所有氨基酸残基的肽库 (含 11 条多肽) 由英国 Sigma 公司合成, 英国剑桥大学 Medical Research Council 的 Chris Li 博士惠赠; 流感病毒 (A/Anhui/1/2005) M2 蛋白完整胞外区多肽 (Extracellular domain of M2 protein, M2e) 由北京华中生科技发展有限公司合成; 小鼠脾淋巴细胞分离液 EZ-Sep™ 购自深圳达科为生物技术有限公司; ELISPOT 试剂盒购自 BD 公司。

1.2 M2 和 HA 基因的扩增及 pStar-M2/HA 的构建

设计合成两组引物分别扩增 H5N1 亚型 AIV (A/Anhui/1/2005) M2 及 HA 基因完整开放阅读框 (Open reading frame, ORF): 引物 M2-*Nhe* I-FP (5'-CTAGCTAGCATGAGTCTTCTAACCG-3') 与 M2-*Eco*R I-RP (5'-CGGAATTCTTACTCCAATTCTATGTT-3') 用于扩增 M2 基因; 引物 HA-*Bam*H I-FP (5'-CGGATCCATGGAGAAAATAGTGC-3') 与 HA-*Sal* I-RP (5'-ACGCGTCGACTTAAATGCAAATTCTGC-3') 用于扩增 HA 基因。将 M2 基因和 pStar 载体分别用 *Nhe* I 及 *Eco*R I 双酶切后纯化回收相应片段, 连接、转化大肠杆菌、酶切鉴定, 重组载体命名为 pStar-M2/(“/”表示 IRES 序列)。再将 HA 基因和 pStar-M2 分别用 *Bam*H I、*Sal* I 双酶切后, 纯化回收相应片段、连接、转化、酶切鉴定, 重组载体命名为 pStar-M2/HA。使用去内毒素质粒 DNA 大量提取试剂盒大量制备质粒。使用 Lipofectamin 2000 将 pStar-M2/HA 和 pStar 分别转染 293 细胞, 转染 24 h 后, 分别使用鼠抗 M2 及鼠抗 HA 多克隆抗体, 采用间接免疫荧光 (Indirect immunofluorescence

assay, IFA) 法检测 M2 及 HA 基因的表达。

1.3 重组腺病毒载体疫苗的构建及鉴定

首先 PCR 扩增 M2 及 HA 基因片段 (两组引物上游酶切位点均为 *Sal* I, 下游酶切位点均为 *Not* I), 将 M2 与 HA 基因分别克隆到穿梭载体 pShuttle-CMV 的 MCS, 鉴定正确的重组载体分别命名为 pShuttle-M2、pShuttle-HA。将这两个载体线性化后电转化含有 pAd-Easy 骨架载体的 BJ5183 感受态细菌, 采用大片段质粒提取试剂盒提取质粒并酶切鉴定, 重组腺病毒载体命名为 pAd-M2、pAd-HA。将它们线性化后, 使用 Lipofectamine 2000 转染 293 细胞, 通过显微镜观察细胞病变效应 (Cytopathic effect, CPE), 出现明显 CPE (++~+++) 时收集细胞, 细胞沉淀用 PBS 重悬, 冻融 4 次, 上清即为 Ad-M2、Ad-HA 病毒原液。按 1:10 的比例感染新的 293 细胞, 如此反复制备出 4 代重组腺病毒。将 293 细胞培养至 90% 饱和度, 感染重组腺病毒, 24 h 后固定细胞, 分别使用鼠抗 M2 及鼠抗 HA 多克隆抗体进行 IFA 检测。

1.4 小鼠实验及免疫效果评价

将 4~6 周龄雌性 BALB/c 小鼠随机分为 3 组 (5 只/组): 1) M2、HA 双基因共免疫组 (M2HA), 分别免疫 pStar-M2/HA、AD-M2 及 Ad-HA; 2) HA 单基因免疫对照组 (HA), 分别免疫 pStar-HA 和 Ad-HA; 3) 空载体阴性对照组 (NC), 分别免疫 pStar 及 AD-easy。采用 DNA 疫苗与腺病毒载体疫苗联合免疫的方式, 左右腓肠肌部位注射, 100 μ L/只。共免疫 4 次, 每次间隔 14 d。第 1、3 次用 DNA 疫苗, 添加 CpG 佐剂 (重组 pStar 质粒为 100 μ g/只, CpG 为 10 μ g/只)。第 2、4 次用重组腺病毒载体疫苗 (HA 组与 NC 组只免疫一种重组腺病毒, 病毒量为 2.5×10^8 TCID₅₀/只, M2HA 组同时免疫 2 种重组腺病毒, Ad-M2、Ad-HA 病毒量均为 1.25×10^8 TCID₅₀/只)。4 次免疫间隔均为 14 d, 在每次免疫前和末次免疫后的 14 d 采集血清用于 ELISA 和血凝抑制 (Hemagglutination inhibition, HI) 实验。全程免疫结束后 14 d, 处死实验小鼠并取脾细胞样本用于 ELISPOT 实验。通过在线表位预测工具 (<http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/antigenic.pl>) 对蛋白抗原多肽

进行分析。

2 结果

2.1 M2 和 HA 基因 ORF 的克隆及 pStar-M2/HA 的构建

以我国首株分离到的人 H5N1 亚型 AIV (A/Anhui/1/2005) 的 cDNA 作为模板, PCR 扩增 M2 及 HA 基因。H5N1 流感病毒 M2 和 HA 基因片段长度分别为 294 bp、1 704 bp, 电泳结果显示, 两种 PCR 产物大小分别与 M2 和 HA 基因片段长度一致 (图略)。M2 基因用 *Nhe* I/*Eco*R I 双酶切后插入 pStar 载体 IRES 上游 MCS, HA 基因用 *Bam*H I/*Sal* I 双酶切后插入 pStar 载体 IRES 下游 MCS。重组后的 pStar-M2/HA 用 *Nhe* I/*Mlu* I 双酶切可得到约 300 bp 的 M2 基因片段 (因为 HA 基因中含有 *Eco*R I 位点, 所以使用 MCS 上 *Eco*R I 外侧的 *Mlu* I 切点代替); 用 *Bam*H I/*Sal* I 双酶切, 可得到约 1700 bp 的 HA 基因片段 (图 1)。表明 M2 基因和 HA 基因分别插入到了 pStar 载体 IRES 上游及下游的 MCS。

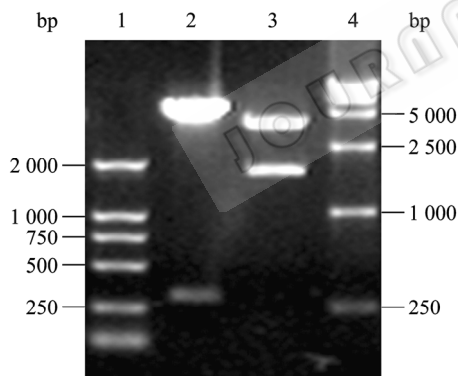


图 1 pStar-M2/HA 的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of pStar-M2/HA by restriction endonuclease digestion. 1: DNA marker (DL2000); 2: pStar-M2/HA digested with *Nhe* I and *Mlu* I; 3: pStar-M2/HA digested with *Bam*H I and *Sal* I; 4: DNA marker (DL15000).

将 pStar-M2/HA 转染 293 细胞, 24 h 后, 分别使用鼠抗 M2 多克隆抗体及鼠抗 HA 多克隆抗体进行 IFA, 检测到 pStar-M2/HA 中的 M2 及 HA 双基因共表达 (图 2)。

2.2 重组腺病毒 Ad-M2、Ad-HA 的构建

用 PCR 方法分别扩增出 M2 及 HA 基因片段 (上游酶切位点换为 *Sal* I, 下游酶切位点换为 *Not* I),

并分别将其插入到 pShuttle-CMV 上, 转化 DH5 α 感受态细胞, 鉴定正确的重组载体分别命名为 pShuttle-M2、pShuttle-HA。分别将两种重组载体用 *Pme* I 酶切、CIAP 去磷酸化后, 电穿孔转化含有 pAd-Easy 骨架载体的 BJ5183 感受态细胞, 进行同源重组。鉴定正确的重组腺病毒载体分别命名为 pAd-M2、pAd-HA, 将其用 *Pac* I 酶切后转染 293 细胞, 8 d 后显微镜下可观察到 CPE。将细胞收集、冻融、PBS 重悬, 上清即为 pAd-M2、pAd-HA 病毒原液, 将其继续感染 293 细胞, 3 d 后可出现明显 CPE (图 3)。使用相同方法构建包装出不含外源基因的对照腺病毒, 命名为 Ad-easy。

2.3 IFA 检测 M2 及 HA 基因的表达

Ad-M2、Ad-HA 以及 Ad-easy 分别感染 293 细胞, 进行 IFA 检测。使用鼠抗 M2 多克隆抗体可检测到感染 Ad-M2 的 293 细胞明显的黄绿色荧光, 使用鼠抗 HA 多克隆抗体可检测到感染 Ad-HA 的 293 细胞明显的黄绿色荧光 (图 4), 而感染 Ad-easy 的 293 细胞使用两种抗体均未检测到特异性黄绿色荧光, 表明两种重组腺病毒的外源基因在 293 细胞中均成功地获得表达。

2.4 红细胞凝集抑制实验检测免疫小鼠血清中特异性 HI 抗体

将免疫前及每次免疫后 14 d 采集的小鼠血清 (共 5 批) 进行预处理, 以灭活的流感病毒 A/Anhui/1/2005 (H5N1) 作为抗原, 用 1% 新鲜 TRC 悬液进行 HI 实验, 免疫前及第 1 次免疫后 14 d, 各免疫组的小鼠血清中均未检测到 HI 活性。在第 2 次免疫后 14 d, M2HA 免疫组检测到了 HI 活性, 并且随加强免疫的进行, 其 HI 活性逐渐升高 ($P < 0.05$) (图 5A)。M2HA 免疫组同 HA 单基因免疫对照组相比, 各时间点两个免疫组之间 HI 效价比较接近, 无统计学差异 ($P > 0.05$)。阴性对照组各时间点的血清均未检测到 HI 活性。此外还用 1% 新鲜 HRC 悬液和 1% 新鲜 TRC 悬液进行 HI 对比实验。结果显示, 全程免疫后的 M2HA 免疫组使用两种红细胞均检测到了 HI 活性, 并且使用 HRC 测定 HI 的敏感性更高 (图 5B)。M2HA 免疫组同 HA 单基因免疫对照组相比, HI 效价比较接近, 无统计学差异 ($P > 0.05$)。

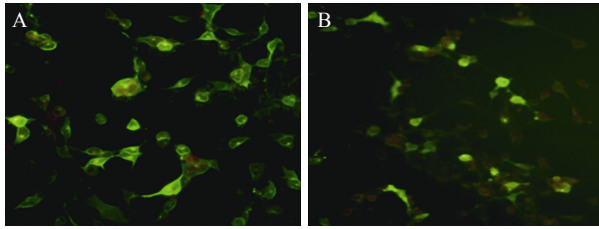


图2 IFA 法检测 pStar-M2/HA 的双基因共表达 (200×)
Fig. 2 M2 gene and HA gene of pStar-M2/HA co-expression detected by IFA (200×). (A) Detection of M2 gene expression. (B) Detection of HA gene expression.

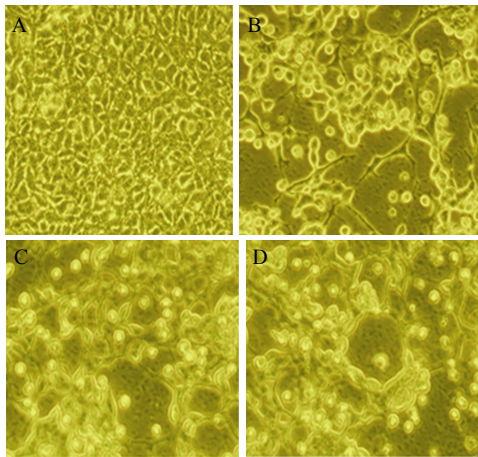


图3 重组腺病毒感染 293 细胞的 CPE (200×)
Fig. 3 CPE of 293 cells infected with recombinant adenovirus (200×). (A) Control 293 cells. (B) 293 cells infected with Ad-easy. (C) 293 cells infected with Ad-M2. (D) 293 cells infected with Ad-HA.

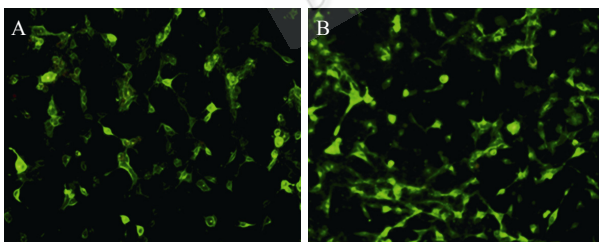


图4 IFA 法检测重组腺病毒 M2 或 HA 基因表达 (200×)
Fig. 4 M2 or HA gene expression detected by IFA (200×). (A) M2 gene expression of Ad-M2. (B) HA gene expression of Ad-HA.

2.5 ELISA 检测免疫小鼠血清中抗 H5N1 亚型流感病毒 IgG 抗体

以灭活的流感病毒 A/Anhui/1/2005 (H5N1) 作为抗原, 将全程免疫后的小鼠血清预处理后进行 ELISA, 测定吸光度值 (OD_{450})。结果显示, 在血清稀释 400 倍和 3 200 倍条件下, M2HA 免疫组吸光度值明显大于 NC 组 ($P < 0.05$), 表明 M2HA 免疫

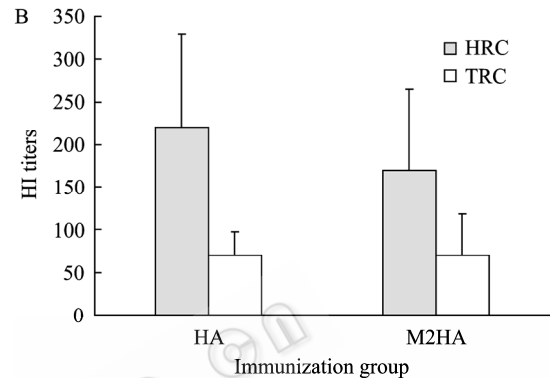
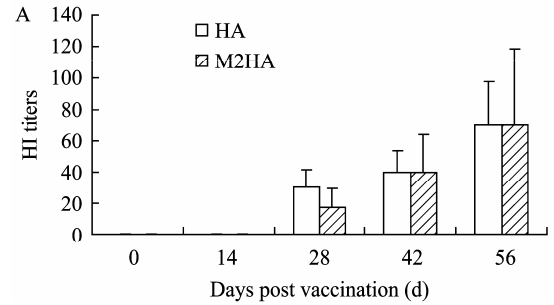


图5 HI 滴度检测

Fig. 5 Detection of HI titers. (A) HI titers of different groups (TRC). (B) HI titers with different red blood cells.

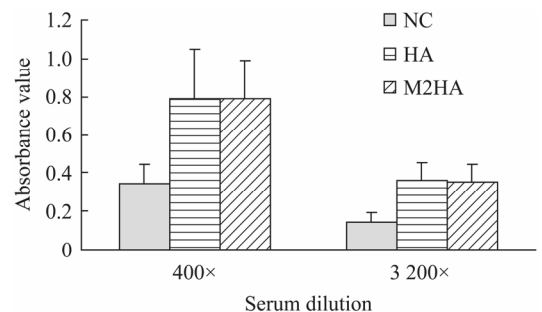


图6 ELISA 检测抗流感病毒 A/Anhui/1/2005 IgG 抗体
Fig. 6 Detection of anti-influenza virus A/Anhui/1/2005 IgG antibodies.

组小鼠血清中产生了针对流感病毒表面蛋白 (HA) 的抗体 (图 6)。M2HA 组与 HA 对照组吸光度值无明显差异 ($P > 0.05$)。

2.6 HA 表位筛选

首先通过 ELISPOT 实验, 从包含 H5N1 亚型流感病毒 HA 蛋白所有氨基酸残基的肽库 (含 77 条多肽, 每条肽 16~18 个氨基酸, 每两条相邻的肽有 10 个氨基酸残基的重叠) 中初步筛选出 HA-20、HA-21、HA-22、HA-23、HA-74 和 HA-75 共 6 条多肽。进而使用 HA 免疫组脾淋巴细胞通过 ELISPOT

实验对这 6 条多肽进行了比较。结果显示 (图 7), HA-74、HA-75 刺激产生 IFN- γ 的能力最强, 其次为 HA-22 号、HA-23, HA-20、HA-21 刺激能力最弱。HA-22、HA-23、HA-74、HA-75 这 4 条多肽均具有较强的刺激 T 淋巴细胞分泌 IFN- γ 的能力。通过在线表位预测工具对流感病毒 (A/Anhui/1/2005) HA 蛋白的抗原表位进行分析, 结果显示, 该蛋白中存在 23 个抗原指数较高的抗原多肽, 本实验中筛选出的 HA-22/23/74/75 四条多肽均位于抗原性较强的位置, 其序列分别对应预测的 8 号、9 号、23 号多肽序列。HA-22/23/74/75 四条多肽与预测的 HA 蛋白表位一致性比较见表 1 (阴影部分为相应的一致性序列)。

使用刺激能力最强的 HA-74、HA-75 进行 ELISPOT 实验, 结果显示, M2HA 免疫组小鼠均成功刺激出针对 H5N1 HA-74、HA-75 的细胞免疫应答, M2HA 免疫组与 HA 单基因免疫对照组之间无明显差异 ($P>0.05$) (图 8)。

2.7 M2 表位筛选

由于流感病毒 M2 蛋白胞外区疫苗在多种亚型的流感病毒感染中都有广谱的保护作用, 所以含 M2 基因的 DNA 疫苗及腺病毒载体疫苗联合免疫后是否能够产生针对 M2 蛋白胞外区的细胞免疫应答具有重要意义。为检测这种免疫应答, 合成了 H5N1 (A/Anhui/1/2005) M2 蛋白全长胞外区 (M2e), 并与 M2(H5N1) 蛋白肽库 (11 条多肽) 一起进行 ELISPOT 检测。结果显示, M2e 以及 M2 蛋白肽库中的 M2-2、M2-3 和 M2-6 均可以较好地刺激 M2HA 免疫组脾淋巴细胞产生 IFN- γ (图 9), 表明 M2HA 免疫组成功刺

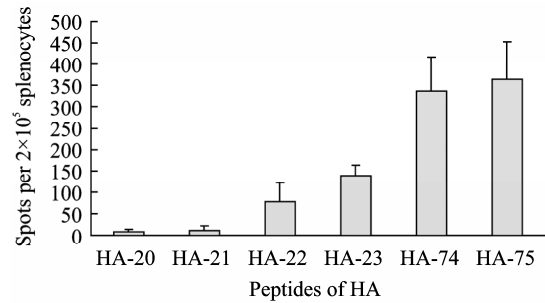


图 7 ELISPOT 检测 HA 多肽刺激能力

Fig. 7 Comparison of HA peptides for ELISPOT.

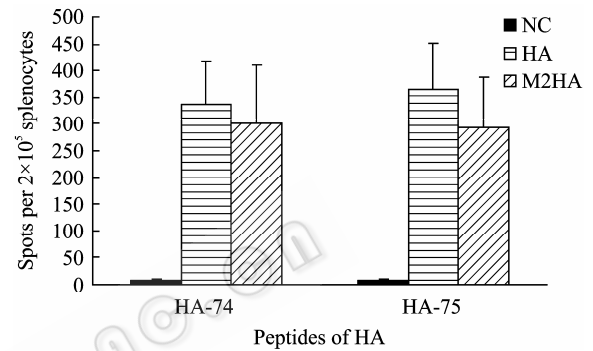


图 8 不同免疫组 ELISPOT 比较

Fig. 8 Comparison of ELISPOT results among different groups.

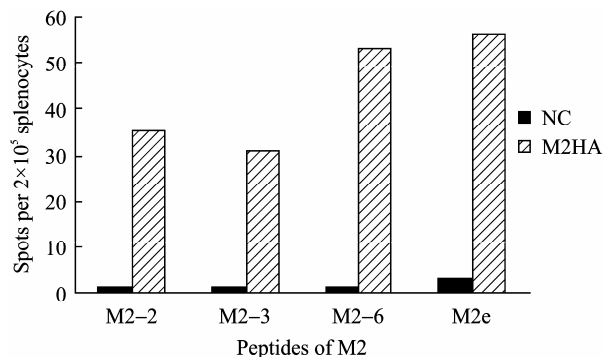


图 9 M2 多肽 ELISPOT 结果

Fig. 9 ELISPOT result of M2-Pep.

表 1 HA-22/23/74/75 四条多肽与预测的 HA 蛋白抗原多肽一致性比较

Table 1 Comparability between HA-22/23/74/75 and predicted antigenic peptides

Peptides screened out			Predicted antigenic peptides		
Number	Sequence	Location	Number	Sequence	Location
HA-22	ACPYQGT PSFFRN VVWLI	150-167	8	ASSGVSSV CPYQGT	143-156
			9	FFRN VVWL	159-166
HA-23	SFFRN VVWL IKKN NTY	158-173	9	FFRN VVWL	159-166
HA-74	IGTYQ LSIYSTV ASSLA	526-543	23	GT YQ LSI YSTV ASSL LALAIMVAGLSLWM	527-555
HA-75	IYST VASSLALAIMV AGL	534-551	23	GT YQ LSI YSTVASSLALAIMVAGLSLWM	527-555

表 2 M2e 及多肽 M2-2/3/6 与预测的 M2 蛋白抗原多肽一致性比较

Table 2 Comparability between M2e/M2-2/M2-3/M2-6 and predicted antigenic peptides

Peptides screened out			Predicted antigenic peptides		
Number	Sequence	Location	Number	Sequence	Location
M2e	SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD	2-24			
M2-2	TPTRNEWECRCSDSSDPL	9-26	1	WECRCSDSSDPLVVAASHIGIL	15-57
M2-3	CRCSDDSDPLVVAASHIG	17-34		HLILWILDRLFFKCIYRRLKY	
M2-6	WILDRLFFKCIYRRLKYG	41-58			

激出针对 H5N1-M2 蛋白的细胞免疫应答。通过在线表位预测工具对流感病毒 (A/Anhui/1/2005) M2 蛋白的抗原表位进行分析, 结果显示, 该蛋白中存在 2 个抗原指数较高的抗原多肽, 本实验中筛选出的 M2e 及 M2-2/3/6 四条多肽均位于抗原性较强的位置, 其序列对应预测的 1 号抗原多肽序列。M2e 及 M2-2/3/6 四条多肽与预测的 M2 蛋白抗原多肽一致性比较见表 2 (阴影部分为相应的一致性序列)。

3 讨论

目前使用的流感灭活疫苗不能刺激产生细胞免疫应答, 并且需要在鸡胚中传代, 生产工艺复杂, 无法及时生产足够的疫苗来应对新出现的毒株以阻止流感大流行^[5]。所以寻求一种能更有效地预防流感病毒感染的新型疫苗迫在眉睫, 而 DNA 疫苗和腺病毒载体疫苗就是其中比较有发展前景的流感疫苗策略。DNA 疫苗和腺病毒载体疫苗作为新的疫苗策略, 不需鸡胚传代, 能够诱导体液免疫应答和细胞免疫应答, 并且构建方法简单, 性质稳定。它们带有的抗原成分在机体内合成, 能进行正确的翻译后修饰和折叠, 以天然构象的形式呈递给免疫系统。目前许多研究表明, 采用 DNA 疫苗与腺病毒载体疫苗联合免疫的方法, 能诱导较强的免疫反应, 并有助于减弱病毒载体所导致的非特异反应, 增强由目的蛋白所诱导的特异性细胞免疫反应。因此本实验采用了 DNA 疫苗与腺病毒载体疫苗联合免疫的方式。

本研究中应用的人 5 型腺病毒 (Ad5) 载体天然宿主是人, Ad5 在人群中的感染率较高, 预先存在的 Ad5 特异性抗体可能减弱免疫效果, 如将来继续开展人用疫苗研究, 就要充分考虑降低人体对于腺

病毒载体本身的免疫反应。除了以 DNA 疫苗与腺病毒联合免疫的方式外, 可以通过对腺病毒表面进行修饰, 例如将聚乙二醇与腺病毒交联, 以降低其免疫原性, 延长在体内的存在时间。还可以选用无肠型腺病毒载体或微小腺病毒载体。研究表明, 使用此类载体, 可明显减少针对载体的中和抗体, 增加其在体内的存在时间和目的基因表达量^[6]。另外, 采用非人型腺病毒作为疫苗载体也是一种有效的方法。Singh 等^[7]研究表明, 采用牛腺病毒为载体构建的疫苗能够有效降低针对载体的中和抑制效应。

当前的流感疫苗主要是针对诱导产生中和抗体的表面糖蛋白 HA 和 NA, 由于 HA 和 NA 经常发生抗原转变和抗原漂移, 使其抗原性表现出很大的变异, 给流感防治带来极大的困难。与 HA 和 NA 不同, M2 蛋白 (特别是胞外区) 氨基酸序列高度保守^[8], 并且有研究表明 M2 蛋白抗血清具有抑制流感病毒复制的功能^[9-10]。因此, M2 分子有可能作为具有交叉保护能力的“通用流感疫苗”以解决 HA、NA 变异所导致的疫苗更换毒株问题。由于 HA 是流感疫苗最重要的抗原成分, M2 作为抗原对流感病毒具有一定的通用免疫保护作用, 因此, 进行 M2 与 HA 双基因共免疫, 刺激宿主既产生针对 H5N1 亚型流感病毒较强的保护作用, 又能产生针对其他多种流感病毒的通用保护作用, 具有重要意义。本研究结果显示, M2、HA 双基因共免疫小鼠成功刺激出了针对中和抗原 HA 蛋白和通用抗原 M2 蛋白的免疫反应。并且, 同 HA 单基因免疫组相比, M2、HA 双基因共免疫组刺激产生的针对 HA 蛋白的体液和细胞免疫应答水平没有减弱, 这与预期相符。双基因共免疫时, 不希望产生两种蛋白之间的相互干扰。实验中发现 pStar-M2/HA 中的 HA 基因插入到 pStar-IRES

下游其表达水平同 HA 单基因载体表达水平未有明显降低,使得在 1、3 次免疫 DNA 疫苗时的两免疫组的 HA 蛋白表达量基本相当,而 M2 基因的存在,并没有影响 HA 基因的免疫效果。本研究表明,相对于 HA 单基因免疫,能够同时表达中和抗原和通用抗原的双基因共免疫有可能提供更理想的免疫保护效果。流感病毒 M2 与 HA 双基因共免疫的研究,为研究开发新型重组流感疫苗奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Yu H, Shu Y, Hu S, *et al.* The first confirmed human case of avian influenza A (H5N1) in mainland China. *Lancet*, 2006, **367**(9504): 84.
- [2] Holterman L, Vogels R, van der Vlugt R, *et al.* Novel replication-incompetent vector derived from adenovirus type 11 (Ad11) for vaccination and gene therapy: low seroprevalence and non-cross-reactivity with Ad5. *J Virol*, 2004, **78**(23): 13207–13215.
- [3] Gao W, Soloff AC, Lu X, *et al.* Protection of mice and poultry from lethal H5N1 avian influenza virus through adenovirus-based immunization. *J Virol*, 2006, **80**(4): 1959–1964.
- [4] Hoeslscher MA, Garg S, Bangari DS, *et al.* Development of adenoviral-vector-based pandemic influenza vaccine against antigenically distinct human H5N1 strains in mice. *Lancet*, 2006, **367**(9509): 475–481.
- [5] Fedson DS. Pandemic influenza and the global vaccine supply. *Clin Infect Dis*, 2003, **36**(12): 1552–1561.
- [6] Kochanek S, Schiedner G, Volpers C. High-capacity ‘gutless’ adenoviral vectors. *Curr Opin Mol Ther*, 2001, **3**(5): 454–463.
- [7] Singh N, Pandey A, Jayashankar L, *et al.* Bovine adenoviral vector-based H5N1 influenza vaccine overcomes exceptionally high levels of pre-existing immunity against human adenovirus. *Mol Ther*, 2008, **16**(5): 965–971.
- [8] Ito T, Gorman OT, Kawaoka Y, *et al.* Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins. *J Virol*, 1991, **65**(10): 5491–5498.
- [9] Black RA, Rota PA, Gorodkova N, *et al.* Antibody response to the M2 protein of influenza A virus expressed in insect cells. *J Gen Virol*, 1993, **4**(Pt1): 143–146.
- [10] Treanor JJ, Tierney EL, Zebedee SL, *et al.* Passively transferred monoclonal antibody to the M2 protein inhibits influenza A virus replication in mice. *J Virol*, 1990, **64**(3): 1375–1377.