

原核细胞表达的肾综合征出血热病毒核蛋白 免疫原性及免疫保护作用的研究

黄长形¹ 李光玉¹ 杨为松¹ 杭长寿² 白雪帆¹

¹(第四军医大学唐都医院传染科, 西安 710038)

²(中国预防医学科学院病毒学研究所, 北京 100052)

R373.32

A **摘要** 对原核细胞表达的肾综合征出血热病毒核蛋白的免疫原性及免疫保护作用进行了研究, 结果发现表达的核蛋白具有很强的免疫原性, 免疫小白鼠血清中抗肾综合征出血热病毒荧光抗体滴度达 1:12800; 用免疫小鼠脾细胞和血清做被动免疫保护实验, 结果显示脾细胞对部分乳鼠肾综合征出血热病毒的致死感染有保护作用, 保护率可达 38%, 而血清不具有免疫保护作用; 同时也未观察到核蛋白免疫血清具有促感染乳鼠早死作用。表明核蛋白能诱导细胞免疫保护但不诱导抗体介导的免疫保护, 同时也不引起抗体介导的早死, 这就为肾综合征出血热病毒核蛋白作为该病毒基因工程疫苗的成分提供了一定的理论基础。

关键词 肾综合征出血热病毒, 重组核蛋白, 免疫原性, 免疫保护

肾综合征出血热(HFRS)病毒核蛋白是该病毒颗粒的核心组成部分, 它的免疫原性非常强, 但其在 HFRS 发病中的作用仍不十分清楚, 我们在对原核细胞表达核蛋白的免疫原性做了充分研究的基础上, 进行了核蛋白免疫血清和免疫脾细胞对 HFRS 病毒攻击乳小鼠的被动免疫保护作用及可能存在的致乳鼠早死作用的研究。

材料和方法

1 材料

- 1.1 HFRS 病毒完整核蛋白表达质粒 pBV76 S22 由本室构建^[1]。
- 1.2 成年昆明小白鼠(6~8 周龄)及乳鼠(2~4 日龄)购自本校实验动物中心, 使用前均进行 HFRS 病毒荧光抗体检测, 未发现阳性。
- 1.3 HFRS 病毒 76-118 株抗原片由本室制备。
- 1.4 兔抗鼠 IgG 荧光抗体及羊抗兔 IgG 荧光抗体购自北京生物制品研究所。
- 1.5 A9 株 HFRS 病毒毒种由本室保存。

2 方法

2.1 制备表达核蛋白

核蛋白表达质粒 pBV76 S22 转化受体菌 TG1, 挑单菌落, 接种于 2 mL 氨苄抗性 LB 培养基中, 32 ℃ 振荡过夜, 按 1:100 转种于 50 mL 氨苄抗性的 LB 培养基中, 32 ℃ 振荡, 当细菌密度值达 0.8(OD₆₀₀) 左右时快速转入 42 ℃ 振荡, 4~5 h 后 4 ℃ 5000 r/min 离心 10 min 收集细菌, 加 5 mL 细菌重悬液(50 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA), 混悬后冻融 3 次, 超声破碎 3 次, 每次 1 min, 破碎后的混悬液 4 ℃ 保存备用。同时用表达载

本文于 1995 年 10 月 4 月收到, 12 月 13 日修回

• 其他作者: ¹ 孙永涛, ¹ 张文彬, ¹ 李新红

体质粒 pBV220 转化 TG1 菌株,并在同样条件下进行诱导表达和制备细菌裂解液,用作对照免疫用抗原。

2.2 表达核蛋白免疫昆明小白鼠

制备好的核蛋白表达菌株破碎混悬液与等量的完全弗氏佐剂充分混匀后做免疫抗原,每只昆明小白鼠的免疫剂量为 0.2 mL,注射部位为后腿与腹部之间皮下组织,初次免疫后的第二和第三周各加强免疫一次,但佐剂为不完全弗氏佐剂,免疫剂量同初次免疫。同时用对照抗原进行同样的免疫。

2.3 免疫小鼠血清中抗 HFRS 病毒抗体检测

用间接免疫荧光法检测免疫小鼠血清中抗 HFRS 病毒抗体,采用剪尾方法取血,每次取血 10 μ L,稀释于 190 μ L 含 10%小牛血清的 PBS(pH7.4)中,3000r/min 离心 10 min,取上清,从 1:100 起做倍比稀释,取稀释液加于 HFRS 病毒的抗原片上,37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h, PBS 洗片三次,吹干后加荧光标记的兔抗鼠 IgG 抗体,37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min, PBS 洗片三次,吹干后封片,荧光显微镜下观察。

2.4 病毒 LD₅₀ 滴定

病毒 LD₅₀ 滴定按参考文献^[2]方法进行。

2.5 小鼠血清分离及脾细胞制备

小鼠加强免疫一周后,在无菌条件下,摘眼球采血,分离血清,采血后立即取脾脏,在 200 目的筛网上研磨脾脏,细胞培养液洗脾细胞 2 次,1%冰乙酸破坏红细胞后对脾细胞进行计数。

2.6 免疫小鼠血清及脾细胞对乳小鼠 HFRS 病毒致死的被动保护试验

试验分组进行,包括单独注射病毒组、血清和脾细胞对照组及保护试验组。对照组所用小鼠血清和脾细胞来源于用质粒 pBV220 转化的 TG1 菌株的裂解液免疫的小鼠;3~4 日龄乳小鼠腹腔内注射病毒,根据分组的需要,分别注射 10 LD₅₀ 和 50 LD₅₀ 的病毒;注射病毒后 24 h 腹腔内注射血清和脾细胞,试验血清采用原液及 1:10,1:100 和 1:1000 稀释液,对照血清为原液,每只乳鼠腹腔注射 0.03 mL;根据试验组的需要,试验脾细胞每只乳鼠分别腹腔注射 10⁸ 和 5 \times 10⁸,对照脾细胞每只小鼠腹腔注射 10⁸。注射病毒 4 d 内死亡的乳鼠为非特异性死亡,排除在试验观察之外,第 4 d 后每天观察小鼠二次,记录乳鼠死亡情况,观察时间为四周,四周后未死亡小鼠为存活小鼠。取存活小鼠血清,用间接免疫荧光法检测抗 HFRS 病毒抗体滴度。

2.7 对试验结果进行统计分析,方法为 T 检验。

结 果

1 表达核蛋白的免疫原性

免疫小鼠血清中抗 HFRS 病毒的间接荧光抗体滴度免疫后一周即达到 1:1600 的较高水平,免疫后一个月可达 1:12800(见表 1),而对照抗原免疫小鼠血清中抗 HFRS 病毒荧光抗体滴度均小于 1:10,这一免疫结果说明表达的 HFRS 病毒的核蛋白免疫原性非常强。

表 1 表达核蛋白免疫小鼠血清抗 HFRS 病毒间接荧光抗体滴度

Table 1 Antibody titers against HFRS virus infected Vero E6 cells in sera from mice immunized with recombinant nucleocapsid protein

小鼠编号 Mouse No.	免疫后不同时间(周)间接免疫荧光抗体滴度 IFA in different time(weeks) after immunizing		
	1	2	4
1	800	6400	12800
2	1600	6400	12800
3	1600	3200	12800
4	800	3200	6400
5	1600	12800	12800

2 被动免疫保护试验结果

通过实验观察,我们发现表达核蛋白免疫小鼠脾细胞过继免疫对 HFRS 病毒致乳鼠死亡有保护作用,但保护作用有限,大量脾细胞(10^8)对 $10 LD_{50}$ 病毒攻击的乳鼠保护率只能达到 38%,而少量脾细胞(5×10^6)对 $50 LD_{50}$ 病毒攻击的乳鼠保护率仅为 10%;同时也观察到核蛋白免疫血清对 HFRS 病毒致乳鼠死亡作用没有影响,既没有保护作用也未见促进乳鼠死亡,详见表 2。存活小鼠血清中抗 HFRS 病毒荧光抗体检测显示抗体滴度在 6400~12800 之间,这表明存活小鼠确实受到了病毒的攻击。

表 2 表达核蛋白免疫小鼠脾细胞和血清对 HFRS 病毒感染乳小鼠的保护作用

Table 2 Effect of spleen cells and sera of mice immunized with recombinant nucleocapsid protein on lethally infected infant mice

组号 Group No.	脾细胞数 Spleen cells($\times 10^6$)	血清 Sera	攻击病毒量 Challenge dose of virus(LD_{50})	存活率 Survival rate(%)	死亡时间(d) days to death	平均死亡时间 MTD ($\bar{x} \pm s$)
1	100 (对照 control)	-	10	0/5(0)	11 19 20 22	18.0 \pm 4.8
2	100 (对照 control)	-	50	0/5(0)	14 16 18 18	16.5 \pm 1.9
3	5	-	10	1/10(10)	10 11 15 17 19 19 20 21 22	17.1 \pm 4.3
4	5	-	50	0/5(0)	13 16 17 19 19	16.8 \pm 2.5
5	100	-	10	3/8(38)	16 19 19 19 20	18.4 \pm 1.5
6	100	-	50	1/8(13)	17 18 18 19 20 20 20	18.9 \pm 1.2
7	-	10^0	10	0/4(0)	18 19 19 20	19.0 \pm 0.8
8	-	10^{-1}	10	0/4(0)	13 16 17 20	16.5 \pm 2.9
9	-	10^{-2}	10	0/5(0)	15 18 20 23 23	19.8 \pm 3.4
10	-	10^{-3}	10	0/4(0)	15 22 22	19.7 \pm 4.0
11	-	10^0	10	0/4(0)	16 16 20 21	18.3 \pm 2.6

(对照 control)

统计分析:第 3,5 组与第 1 组比较;第 4,6 组与第 2 组比较;第 7,8,9,10 组与第 11 组比较。

Statistical analysis: group 3,5 compared with group 1; group 4,6 compared with group 2, group 7,8,9,10 compared with group 11.

讨 论

HFRS 病毒的结构蛋白包括核蛋白和膜蛋白(G1 和 G2),中和抗原位点位于 G1 和 G2 上,具有中和活性的抗 G1 和 G2 的单克隆抗体对 HFRS 病毒感染乳小鼠的死亡有保护作用;而核蛋白上没有中和位点,抗核蛋白的单抗不具备中和活性,也不能保护 HFRS 病毒感染的乳小鼠^[3]。然而, Schmaljohn, C. S. 等^[4]研究发现用重组昆虫病毒表达的核蛋白免疫的田鼠部分能抵抗 HFRS 病毒感染,并推测该免疫保护作用可能来源于细胞免疫。Yoshimatsu, K. 等^[5]以乳小鼠为实验对象进行了类似的研究,得到了相同的结果,并证实核蛋白的免疫保护作用来源于细胞免疫,因此提出核蛋白应成为 HFRS 病毒基因工程疫苗的一部分。上述研究所用的核蛋白为真核表达核蛋白,那么原核表达的核蛋白是否具有真核表达核蛋白的同样功能? 本文就此问题进行了探讨。

首先观察了原核细胞表达核蛋白的免疫原性,发现该蛋白免疫原性非常强,经过三次免疫,几乎所有的免疫小鼠血清中抗 HFRS 病毒荧光抗体滴度都能达到 1:12800,高于文献报道的真核细胞表达核蛋白的免疫结果^[5,6],这可能是由于真核细胞表达的核蛋白量较少;另外还采用不同的免疫方法(如单纯细菌裂解液腹腔内接种)和不同的动物(兔)进行免疫,血清抗体滴度也都达 1:12800(详细资料文中未显示),上述结果表明原核细胞表达的核蛋白免疫原性很强。由于没有得到一定种类的抗核蛋白单抗,所以未能对其抗原性进行客观评价,根据梁氏^[7]HFRS 病毒核蛋白的抗原性主要由蛋白一级结构决定的研究结果,我们认为原核表达核蛋白的抗原性也一定保存较好,后面的免疫保护试验也证明了这一点。

被动免疫保护试验再次证实 HFRS 病毒核蛋白对乳小鼠确有免疫保护作用,虽然保护作用有限。本试验结果为免疫脾细胞对 50 LD₅₀ 和 10 LD₅₀ 病毒攻击的乳鼠保护率分别是 13% 和 38%,文献报道^[5]的最好保护率也仅为 43%,且核蛋白的免疫血清不具有免疫保护作用。尽管如此,将核蛋白列为 HFRS 病毒基因工程抗原疫苗的 necessary 成分是有理由的。但最近有研究发现低剂量的 HFRS 病毒免疫血清不但具备免疫保护作用,反而有促 HFRS 病毒感染引起乳鼠早死作用^[8],这就为 HFRS 病毒疫苗研究提出了一个新问题。为此我们研究了核蛋白可能起的作用,观察了不同稀释度的核蛋白免疫血清对 HFRS 病毒感染乳小鼠致死的影响,结果表明核蛋白免疫血清既不具备免疫保护也没有促早死作用。基于本实验的结果,我们认为核蛋白作为 HFRS 病毒基因工程疫苗的成分之一是合理的。

参 考 文 献

- 1 黄长形,李盈盈,杨为松等.肾综合征出血热病毒核蛋白在大肠杆菌中表达及产物的初步应用.中华传染病杂志,1996,14(1):28~31
- 2 黄祯祥等主编.医学病毒学基础及实验技术.第一版.北京:科学出版社,1990,142~148
- 3 卫立辛,汪美先,徐志凯等.单克隆抗体对肾综合征出血热病毒感染乳鼠保护作用的研究.单克隆抗体通讯,1989,27:5~10
- 4 Schmaljohn C S, Yong-Kyu Chu, Schmaljohn A L *et al.* Antigenic subunits of Hantaan virus expressed by baculovirus and vaccinia virus recombinants. J of Virology, 1990, 64(7):3162~3170
- 5 Yoshimatsu K, Y-C Yoo, Yoshida R. Protective immunity of Hantaan virus nucleocapsid and envelope protein studied using baculovirus-expressed proteins, Arch Virol, 1993, 130:365~376
- 6 石晓宏,宋干,杭长寿等.重组杆状病毒表达汉坦病毒结构蛋白在实验动物中的免疫应答.中华微生物学和免疫学杂志,1995,15(4):238~241
- 7 梁米芳,宋干,杭长寿等.流行性出血热病毒单克隆抗体的特性鉴定及其对病毒结构蛋白作用的初步研究.病毒学报,1989,5(3):217~223
- 8 张满新,姚楚铮.被动免疫母鼠对乳鼠肾综合征出血热病毒致死感染的作用.中华微生物学和免疫学杂志,1994,14(4):243~245

Study on Immunogenicity and Immunoprotection of Hantaan Virus Nucleocapsid Protein Expressed in *E. coli*

Huang Changxing Li Guangyu Yang Weisong *et al*

(Dept. of Infectious Diseases, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038)

Immunogenicity and immunoprotection of recombinant Hantaan virus nucleocapsid protein (NP) expressed in *E. coli* were studied. First, mice were immunized with the recombinant NP, the titer of antibody against Hantaan virus was determined using indirect immunofluorescence assay, it was 1:12800 in 4 weeks after immunized. Then, the spleen cells and sera of immunized mice were transferred to 3~4 day-old mice in 24 hours after the mice infected with lethal dose of Hantaan virus. The protection rates of spleen cells were 10~38%, but the sera could not protect mice from death, at the same time, it also did not change the living time of mice with lethal Hantaan virus infection. The results indicate that NP can induce the cell-mediated immune protection but cannot induce the antibody-mediated immune protection and the early death in Hantaan virus infection mice.

Key words Hantaan virus, Recombinant nucleocapsid protein, Immunogenicity, Immunoprotection