

SV40 灭活疫苗的制备及其对小鼠免疫的研究 *

曹 增¹, 孙强明¹, 孙 娟², 蒋鸿超¹, 李洪钊¹, 谢天宏¹, 孙茂盛^{1**}, 戴长柏¹

(1. 中国医学科学院 中国协和医科大学 医学微生物学研究所分子生物室, 云南昆明 650118; 2. 中国医学科学院 中国协和医科大学 天津血液学研究所及血液病医院, 天津 300020)

Preparation of SV40 Inactivation Vaccine and Immunization of Balb/c Mice

CAO Zeng¹, SUN Qiang-ming¹, SUN Juan², JIANG Hong-chao¹, LI Hong-zhao¹, XIE Tian-hong¹,
SUN Mao-sheng^{1**}, DAI Chang-bai¹

(1. Department of Molecular Biology, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Kunming, 650118, China; 2. Institute of Hematology and Blood Diseases Hospital, CAMS & PUMC, Tianjin 300020, China)

Abstract : Simian vacuolating virus 40 (SV40) belongs to polyoma virus and is a DNA tumor virus. The natural hosts for SV40 are species of Asian macaque monkeys, especially the rhesus (*Macaca mulatta*). SV40 can cause widespread infections leading to acutely pathological changes and long-term virus schlepung in healthy monkeys. SV40 was shown to be tumorigenic in rodents and was able to transform many types of cells in culture. This work represented the first description of inactivated SV40 by beta-propiolactone and evaluated its immunogenic properties in mice. This work was a primary attempt to tackle SV40 infection and spread has made it ready to further investigate the immunological characteristics of the inactivated virus in monkeys and provided a foundation for vaccine development against SV40.

Key words : SV40; Inactivation vaccine; Beta-propiolactone; Vero cell.

摘要 : 猴空泡病毒 40 (Simian vacuolating virus 40, SV40) 属于乳多空病毒科, 是一种 DNA 肿瘤病毒。亚洲猿类特别是恒河猴是 SV40 的天然宿主。感染 SV40 病毒可导致猴体急性病变或呈长期带毒状态, 此外能诱使幼鼠产生肿瘤, 并能使多种培养细胞发生转化。本研究初步建立了 SV40 病毒在 Vero 细胞中的增殖培养方法, 并且初步建立了 -丙内脂灭活病毒的方法和纯化工艺。使用 SV40 病毒灭活疫苗对 Balb/c 小鼠进行了免疫, 结果表明该疫苗具有较好的免疫原性。随后对 SV40 病毒 DNA 在免疫小鼠的重要脏器中的整合情况进行了调查, 结果表明 SV40 病毒 DNA 未在小鼠重要脏器中整合。本研究为 SV40 病毒灭活疫苗的研制和进一步开展猴体抗 SV40 感染实验奠定了良好的基础。

关键词 : 猴空泡病毒; 灭活疫苗; -丙内脂; Vero 细胞

中图分类号 : Q 81, R 392 **文献标识码 :** A **文章编号 :** 1003-5125(2005)02-0159-05

猴空泡病毒 40 (Simian vacuolating virus 40, SV40) 在自然状态下感染恒河猴, 引起包括肺炎和肾病等致死性相关疾病^[1]。猴属国家级保护动物, 在形态学和生物学性质上与人类有许多相似之处, 是一种非常珍贵和广泛运用的疾病动物模型资源。研制 SV40 疫苗是解决实验动物恒河猴中病毒感染问题的必要手段。目前, 国内外都开展了一些与

SV40 病毒相关的研究, 但都比较局限, 相关的报道也较少。国外主要集中在 SV40 的致肿瘤机制和抗肿瘤免疫的研究, 通过表达 SV40 T 抗原或构建 SV40 T 抗原的 DNA 疫苗作为肿瘤疫苗进行免疫来抑制肿瘤, 取得了一定的进展, 特别是去除 T 基因与 Rb 和 P53 的结合位点, 使疫苗的安全性大大提高, 并且已经进入临床研究^[2,3]。国内的相关研究

收稿日期: 2004-10-01, 修回日期: 2004-12-01

* 基金项目: 云南省自然科学基金 (2003C0077M)

作者简介: 曹增 (1973 -) 男, 天津籍, 硕士研究生

** 通讯作者. Corresponding author. Tel: 0871-8334326, Fax: 0871-8334483, E-mail: maoshs@public.km.yn.cn

主要集中在利用 SV40 病毒启动子构建真核表达载体等方面。对于猴用的 SV40 灭活疫苗和其他形式的疫苗等方面的研究在国内外报道均较少。至今,国内外还没有投入使用的抗猴 SV40 感染的疫苗。灭活疫苗具有较强的免疫原性和较好的安全性,一直倍受青睐。目前已被 FDA 批准应用于人类的疫苗大多数是灭活疫苗。灭活疫苗无论从狭义或广义上讲都将发挥其预防和控制感染性疾病的作用。本研究旨在建立 SV40 病毒在 Vero 细胞中增殖,病毒纯化和灭活的方法,并考察灭活病毒在 Balb/c 小鼠中的免疫学特性以及 SV40 病毒 DNA 在小鼠重要脏器中的整合情况,为 SV40 病毒灭活疫苗的研制作初步探讨。

1 材料与方法

1.1 实验材料

SV40-776 株,为 WHO 赠送,由医科院医学生物学研究所保存;SV40 野生株,购自中国预防医学科学院病毒学研究所;Balb/c 雌性小鼠,购自昆明医学院实验动物中心;Vero 细胞,为中国医学科学院医学生物学研究所保存。MEM 培养基购自 GIBCOL 公司。-丙内脂购自 sigma 公司;AlCl₃ 和硫代硫酸钠等化学试剂均为分析纯。

1.2 SV40 的纯化

应用罗式瓶培养 Vero 细胞形成单层后,按 $m.o.i = 3$ 接种 SV40 病毒,悬浮维持培养 4d。待其达到 75% CPE 时,将上清去除。加入细胞分散液 37℃ 消化 5min,收集的细胞悬液。将其放置于冰浴中,并缓慢加入脱氧胆酸钠和 Triton x-100,使它们的最终浓度分别达到 0.5% 和 1.0%。然后,立即 4 16 000g 离心 20min,弃沉淀。进行蔗糖密度梯度离心,收集底层组分并加入 2% 的小牛血清后冰冻储存。使用时,再次进行蔗糖密度梯度离心,将样品稀释 3 倍,将蔗糖溶于 pH 7.4, 0.02 mol/L 的 Tris 溶液中,上层为 30% (w/w) 蔗糖,下层为 75% (w/w) 蔗糖,密度分别为:1.132 和 1.387。4 28 000rpm 离心 7.5h,收集底层组分于玻璃管中待用。按 Brian 等的方法进行计算感染滴度^[5]。

1.3 蛋白质的检测

取纯化的病毒进行 SDS-PAGE 电泳检测病毒的衣壳蛋白。以免疫 Balb/c 雌性小鼠的血清为一抗做 Western blot。

1.4 SV40 的灭活

初步纯化的病毒液加入 1/5 (v/v) 的 1mol/L pH 7.2 的磷酸盐缓冲液,加入 -丙内脂使其最终起

始浓度为 11mmol/L 和 55mmol/L,置 20℃ 下连续搅拌灭活 3d。不同时间取样,每个样品做感染滴度测定,最后一次的样品测定蛋白含量并原倍种毒三瓶,连续盲传三代,看细胞是否有病变迹象,并用 PCR 法检测每代是否有 SV40 基因存在。灭活完成后,向溶液中加入相同体积的 4mmol/L 硫代硫酸钠 20 15min。灭活最后一天,样品经离心(45 000rpm, 2h),弃上清,沉淀用生理盐水悬浮至所需的蛋白浓度(测定蛋白含量为 0.238mg/mL)。根据标准曲线用直线回归法计算结果(Lowry 法)。

1.5 动物免疫^[6,7]

Balb/c 雌性健康 6-8 周龄小鼠 40 只,随机分成 8 组,空白对照组 5 只,阳性对照组 5 只,实验组 30 只。每组随机取 2 只小鼠,尾静脉采血 0.1mL;分离血清,检测是否有 SV40 基因组 DNA,全部阴性时才能用于试验。阴性对照组:注射 0.2mL 生理盐水及铝佐剂的混合液,阳性对照组:注射纯化的 SV40 病毒,0.2mL。以及实验组 I 至实验组 VI 共 6 组。用微量注射器给小鼠股四头肌和腹腔多点注射疫苗及空白溶液。注射后正常方法饲养、观察。每两周尾静脉采血一次,0.5mL/次,共 4 周。

1.6 ELISA 法检测血清抗体^[8]

包被液 1:100 稀释 SV40 病毒,加入到 96 孔微量滴定板中,100μL/孔,4℃ 过夜。洗液洗板孔 5 次,甩干。编排加样孔:设 A-1 为空白孔,不加任何溶液,阴性对照设 3 孔,阳性对照设 3 孔。加入抗原及待测样品:阴性血清、阳性血清、实验组血清及其倍比稀释的血清各取 10μL,混合加入对应孔中,37℃ 湿盒孵育 30min。洗液洗板 5 次,甩干。加入酶标抗体(辣根过氧化物酶标记):除空白孔外的其余各孔加入酶标抗体 100μL,湿盒,37℃、2h,洗液洗板三次,甩干。加入底物液:加入底物液 100μL/孔,避光显色,15-30min。终止反应:加入 25μL/孔 4N H₂SO₄ 轻轻振荡混匀,终止反应。酶标仪 490nm 测定各孔 OD 值。

1.7 免疫 Balb/c 小鼠血清的中和抗体实验(FRNIS0)^[9]

实验前,将实验血清经 56℃ 30min 加温处理,以去除非特异抑制因子。将猴血清用生理盐水作 2 倍稀释。毒株先测知 TCID₅₀,用维持液稀释成 1 000TCID₅₀/mL。各稀释度血清 0.1mL 与等量病毒液混合于 96 孔板中,放置在 37℃ CO₂ 孵箱中 1h。将 1.5 × 10⁵/mL 的 Vero 细胞每孔加 100μL 37℃ 孵育 7d 后观察结果。实验中同时设对照。病毒对照须出现病变,血清和细胞对照必须正常。测定血清的效价。结果判定:以能保护 50% 细胞孔不

出现病变的血清稀释度为中和效价。1/4 以上为阳性。

1.8 PCR 检测 Balb/c 小鼠的不同组织^[10~12]

应用 SV.for3/SV.rev,SV5/SV6,LA1/LA2 三对引物对不同组织进行 PCR 检测。三对引物的序列分别为:

SV.for3:5'-TGA GGCTACTGCTGACTCTCAACA-3'

SV.rev:5'-GCATGACTCAAAAACTTAGCAATTCTG-3'

SV5:5'-GAA GATCTACCATGCGGTCGCTCCGCC-3'

SV6:5'-GTCTCGAGCTATAACTCCCGAGTTTACC-3'

表 1 SV40 纯化步骤及病毒的感染滴度

Table. 1 SV40 purification protocol and infectivity titer

Procedure	Resulting fraction	Relative volume (approx.)	Virus infected titers (pfu/mL)
SV40 infected cells		100	3×10^4
Harvest when $\approx 75\%$ CPE (avoid shear)	'Lysate'	100	1.2×10^6
Add DOC + Triton X-100 to lysate, mix with minimum shear, centrifuge to remove cellular DNA and debris	Double-detergent supernatant	30	1.5×10^6
Concentrate virus and remove detergents, serum, and slowly sedimenting contaminants by first sucrose layer procedure	First sucrose peak	5	1.8×10^8
Further concentrate virus and remove added serum by second sucrose layer procedure	Second sucrose peak	1	2.4×10^8

2.2 SV40 的灭活

经过纯化后的 SV40 病毒,使用 β -丙内脂灭活。分别用起始浓度为 11mmol/L 和 55mmol/L 的 β -丙内脂灭活 SV40 共 3d,每隔一段时间取样,SV40 的感染性滴度不断下降,在 24~28h 病毒被灭活,从而提示 β -丙内脂对病毒有很强的作用。灭活的病毒样品经盲传三代,未检测到活病毒的存在,说明 SV40 病毒的感染性已检测不到(图 1)。

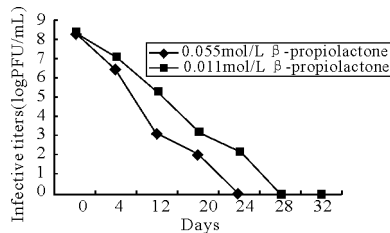


图 1 SV40 灭活动力曲线(20 °C)

Fig.1 The inactivation curve of SV40 with β -propiolactone at 20 °C

2.3 SV40 灭活疫苗的免疫原性

灭活后的 SV40 病毒加入适量佐剂 $Al(OH)_3$, 制成 SV40 灭活疫苗,其中含 $Al(OH)_3$ 0.5mg/mL, SV40 灭活疫苗组(疫苗蛋白含量分别为 1.0、3.0 和 5.0 μ g)灭活疫苗加佐剂组(疫苗蛋白含量也分别为 1.0、3.0 和 5.0 μ g),同时设对照组,每组 BALB/C 雌性小鼠分 7 组每组 5 只。实验期间,未见小鼠有异常反应。通过不同剂量的灭活疫苗免疫小鼠

LA1:5'-GGGTGTTGGCCCTTGTGCAAAAG-3'

LA2:5'-CATGTCTGGATCCCCAGGAAAGCTC-3'

2 结果

2.1 SV40 的纯化

SV40 的纯化的步骤及纯化浓缩前后病毒的滴度见表 1,从表中可以看出:随着 SV40 病毒溶液不断被浓缩纯化,病毒的感染滴度在不断上升,在第二次蔗糖密度梯度离心后感染滴度变化不大,从而初步判断病毒已基本达到一定的纯度。

后,均可以检测到较强的抗-SV40 抗体反应。ELISA 和 FRNT50 检测结果见图 2。

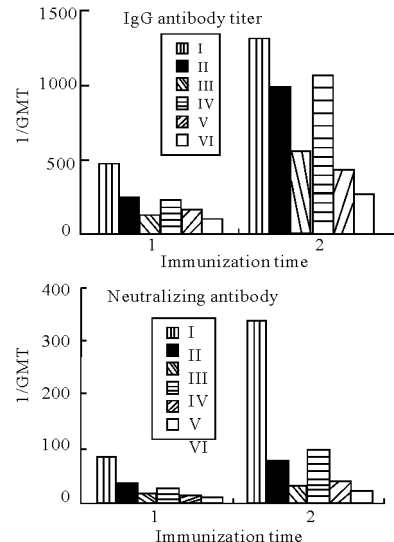


图 2 SV40 灭活疫苗免疫小鼠的抗-SV40 抗体反应

Fig.2 The anti-SV40 response induced in mice by SV40 inactivation vaccine

Group I:SV40 inactivation vaccine 0.2mL + $Al(OH)_3$ and contains 5.0 μ g protein;II:SV40 inactivation vaccine 0.2mL + $Al(OH)_3$ and contains 3.0 μ g protein;III:SV40 inactivation vaccine 0.2mL + $Al(OH)_3$ and contains 1.0 μ g protein;IV:SV40 inactivation vaccine 0.2mL and contains 5.0 μ g protein;V:SV40 inactivation vaccine 0.2mL and contains 3.0 μ g protein;VI:SV40 inactivation vaccine 0.2mL and contains 1.0 μ g protein.

从以上图 2 可以看出:用 SV40 灭活疫苗免疫 Balb/c 雌性小鼠,在 20d 时小鼠的阳转率为 90%,

在 30d 时小鼠全部阳转。免疫后 IgG 抗体最大滴度为 1/2560,佐剂组高于不加佐剂组。随着免疫剂量增大,小鼠的免疫应答也逐渐增强。同时,中和实验也同样佐证以上的结果。

2.4 纯化的 SV40 的 SDS-PAGE 检测

结果在 46kDa 和 30k KDa 处出现两条带此处恰是病毒衣壳蛋白(图 2)。应用灭活疫苗免疫 Balb/c 雌性小鼠的血清做 Western blot,可清晰的在相应位置有两条带(图 3)。说明 SV40 病毒的衣壳蛋白可以与多克隆抗体血清特异性结合。

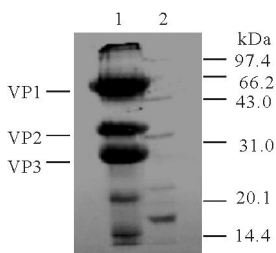


图 3 SV40 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of SV40

1, Purified SV40 virus; 2, Protein marker.

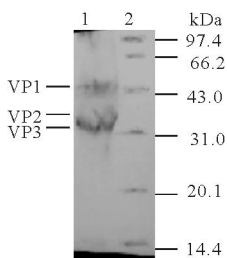


图 4 SV40 的 Western blot 分析

Fig. 4 Western blot analysis of SV40

1, Purified SV40 virus; 2, protein marker

2.5 疫苗质量的验证

从表 3 中可以看出 SV40 灭活疫苗免疫小鼠诱导的中和抗体不仅对本身病毒有效而且对其它不同株型的 SV40 病毒同样有很好的作用。从而直接说明 SV40 灭活疫苗具有一定的广谱性。

表 3 不同株型的 SV40 中和抗体滴度

Table 3 Distinct types of SV40 induced neutralizing antibody titer

	SV40-776		SV40 wild type	
	GMT	The highest	GMT	The highest
Group I	1/337.79	1/512	1/388.02	1/1024
Group IV	1/97.01	1/128	1/55.72	1/128
Control	< 4	< 4	< 4	< 4

GMT : geometric mean titers; Group I: SV40 inactivation vaccine 0.2mL + Al(OH)₃ and contains 5.0µg protein; Group IV :SV40 inactivation vaccine 0.2mL and contains 5.0µg protein.

2.6 SV40 检测

应用特异的 PCR 引物对免疫后小鼠的外周血

和不同器官进行 SV40 基因组的检测,每组随机挑选 2 只,结果除在血中检测到一例阳性外,在其它组织和器官中未检测到,表明没有病毒的整合,从而说明 SV40 灭活疫苗具有一定的安全性(表 4)。

表 4 不同组织的 PCR 检测

Table. 4 Distinct types of mouse tissues examined by PCR

	Blood	Kidney	Liver	Vessel	Brain
SV.for3/ SV.rev	+	-	-	-	-
SV5/ SV6	-	-	-	-	-
LA1/ LA2	-	-	-	-	-

- :No SV40 genome

3 讨论

对猴群携带 SV40 情况的相关报道,证明 SV40 的感染率已经很高,加上目前国际上对 SV40 的致肿瘤性众说纷纭^[13]。SV40 是一个 DNA 肿瘤病毒,对人类和猴都具有非常大的潜在威胁^[14,15]。因此,有必要对 SV40 的免疫学特性进行深入研究。本研究通过在 Vero 细胞中培养 SV40 来大量制备病毒,初步建立了 -丙内脂灭活病毒的方法和纯化工艺,并对灭活病毒的免疫原性进行了评价。

早在上世纪六十年代,人们应用紫外线和高温来进行灭活 SV40,应用强紫外线照射 12h 不能完全灭活此病毒^[16],应用 105 灭活 10min,检测证明 SV40 还残存一小部分毒力^[17]。鉴于以上情况,我们选择了 -丙内脂作为我们的灭活剂。-丙内脂现已广泛地应用于多种人和动物疫苗的生产。国内采用 -丙内脂灭活的 SARS-CoV 灭活疫苗应用于人体实验后尚未见任何副作用。-丙内脂的作用机理:它是一种烷化试剂,能与核酸的嘌呤碱(主要是鸟嘌呤)反应破坏核酸的结构,已应用于 DNA 和 RNA 病毒的灭活,而且 -丙内脂不直接作用于蛋白^[18]。

以 SV40 灭活病毒免疫小鼠的结果表明:在实验中所选剂量范围内,免疫剂量越大,所诱导小鼠的免疫应答越强,抗体滴度和中和抗体滴度越高,第二次免疫后,IgG 抗体和中和抗体的几何平均滴度明显高于第一次免疫后的抗体水平;加入 Al(OH)₃ 佐剂组的灭活疫苗免疫效果略好于不加佐剂组;通过用纯化的病毒进行 SDS-PAGE 和 Western blot 的结果进一步表明:SV40 灭活病毒诱导 BALB/C 小鼠产生的特异抗体能与 SV40 病毒的衣壳蛋白特异性结合。

另外,我们初步探索了应用灭活病毒免疫小鼠产生的免疫血清能否针对不同株型的 SV40 病毒产生保护性作用。由于条件所限,我们只选择了一种

SV40 的野生株与 SV40-776 株作比较。结果表明 SV40 灭活病毒免疫小鼠产生的免疫血清针对 SV40 野生株也产生了很好的保护效果。与 SV40-776 株相比,保护效果基本一致。

在研究和利用病毒的整个过程中,任何病毒的安全性问题都不容忽视^[19]。SV40 是一种 DNA 肿瘤病毒,具有一定的整合性。因此,我们还对基因的整合情况进行了考察。在免疫过程结束后,分别取小鼠的不同组织进行 PCR 检测。结果显示基本为阴性,但在血液组中出现了一例阳性,我们分析可能的原因是血液中还残存有少量的 SV40 DNA,才导致上述结果。

目前,国内外尚无关于针对抗 SV40 感染的灭活病毒及其免疫学特征报道。而本研究对 SV40 灭活病毒的免疫学特性进行了初步探索和尝试,从上述结果看已经基本达到灭活病毒的各项基本要求。此外,我们将在以后的实验中将尝试对病毒的纯化方案进一步改进,提高抗原表达水平,改善免疫程序,增加抗体滴度并进一步全面了解免疫反应的应答特点、反应持续时间、病毒攻击保护效果等,在此基础上我们还将运用恒河猴模型对 SV40 灭活疫苗的免疫原性和安全性进行进一步的评价。

参考文献

- [1] Shah K, Nathanson N. Human exposure to SV40: review and comment [J]. *Am J Epidemiol*, 1976, 103: 1-12.
- [2] Watts A M, Bright R K, Kennedy R C. DNA cancer vaccination strategies target SV40 large tumour antigen in a murine experimental metastasis model [J]. *Dev Biol (Basel)*, 2000, 104: 143-147.
- [3] Kennedy R C, Shearer M H, Watts A M, *et al.* CD4 + T Lymphocytes Play a Critical Role in Antibody Production and Tumor Immunity against Simian Virus 40 Large Tumor Antigen [J]. *Cancer Res*, 2003, 63: 1040 - 1045.
- [4] Brian W J, Hillar M, Kangro O. *Virology Methods Manual* [M]. San Diego: ACADEMIC PRESS INC, 1996.
- [5] Laakkonen P, Hyvonen M, Peranen J, *et al.* Expression of Sem-Liki Forest virus nsP1-specific methyltransferase in insect cells and in *Escherichia coli* [J]. *J Virol*, 1994, 68: 7418-7425.
- [6] Johansen K, Schroder U, Svensson L. Immunogenicity and protective efficacy of a formalin-inactivated rotavirus vaccine combined with lipid adjuvants [J]. *Vaccine*, 2003, 21: 368-375.
- [7] Power U F, Plotnicky H, Blaecke A, *et al.* The immunogenicity, protective efficacy and safety of BBG2Na, a subunit respiratory syncytial virus (RSV) vaccine candidate, against RSV-B [J]. *Vaccine*, 2003, 22: 168-176.
- [8] Edevag G, Grandien M, Mares I. An enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA, for SV40 antigen detection [J]. *J Virol Methods*, 1985, 11: 347-355.
- [9] Minor P, Pipkin P, Jarzebek Z, *et al.* Studies of neutralising antibodies to SV40 in human sera [J]. *J Med Virol*, 2003, 70: 490-495.
- [10] Strickler H D. International SV40 Working Group A multi-center evaluation of assays for detection of SV40 DNA and results in masked mesothelioma specimens [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2001, 10: 523-532.
- [11] Testa J R, Carbone M, Hirvonen A, *et al.* A multi-institutional study confirms the presence and expression of simian virus 40 in human malignant mesothelioma [J]. *Cancer Res*, 1998, 58: 4505-4509.
- [12] Griffiths D J, Nicholson A G, Weiss R A. Detection of SV40 sequences in human mesothelioma [J]. *Dev Biol*, 1998, 94: 127-136.
- [13] Gazdar A F, Butel J S, Carbone M. SV40 and human tumours: myth, association or causality? [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2: 957-964.
- [14] Carbone M, Pass HI, Miele L, *et al.* New developments about the association of SV40 with human mesothelioma [J]. *Oncogene*, 2003, 22: 5173-5180.
- [15] Barbanti-Brodano G, Sabbioni S, Martini F, *et al.* Simian virus 40 infection in humans and association with human diseases: results and hypotheses [J]. *Virology*, 2004, 318: 1-9.
- [16] Yamamoto H. Inactivation of the Transforming capacity of SV40 and the oncogenicity of adenovirus 12 by ultraviolet irradiation Japan [J]. *J. Microbiol*, 1970, 14: 487-493.
- [17] Lelie P N, Reesink H W, Lucas C J. Inactivation of 12 viruses by heating steps applied during manufacture of a hepatitis B vaccine [J]. *J Med Virol*, 1987, 23: 297-301.
- [18] Budowsky E I, Friedman E A, Zheleznova N V, *et al.* Principles of selective inactivation of viral genome. VI. Inactivation of the infectivity of the influenza virus by the action of beta-propiolactone [J]. *Vaccine*, 1991, 9: 398-402.
- [19] Jacobson R M. Vaccine safety [J]. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2003, 23: 589-603.