表达轮状病毒 G2 和 G3 型 vp7 基因重组腺病毒的免疫效果 *

张彩红[1,2 #],姜秀丽[2 #],王 敏[2],张彦明[1],王健伟[2 **],洪 涛[2]

(1. 西北农林科技大学,陕西杨凌,712100;2. 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所,北京,100052)

Immune Response Induced by Recombinant Adenoviruses Expressing Serotype G2 or G3 VP7 of Group A Human Rotavirus in Mice

ZHANG Cai-hong[1,2], JIANG Xiu-li[2], WANG Min[2], ZHANG Yan-ming[1], WANG Jian-wei[2 **], HUNG Tao[2]

(1. NorthWest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, Shaanxi, China; 2. National Institute for Viral Disease Control and Prevention, China CDC, Beijing 100052, China)

Abstract: In order to clarify the feasibility of adenovirus vector-based multivalent genetic engineering vaccine of Rotavirus (RV), we investigated the immune responses induced by the adenoviruses expressing serotype G2 or G3 VP7 of group A rotavirus on the basis of our previous reports. Balb/c mice were immunized with recombinant adenovirus rvAdG2VP7 or rvAdG3VP7, which expressing G2 or G3 type VP7, respectively, via intranasal or oral route for 3 times and serum antibodies, mucosal antibodies as well as the level of related cytokines were determinated. The results demonstrated that immunizing with the adenoviruses expressing serotype G2 or G3 RV VP7 intranasally or orally could induce strong rotavirus-specific immune response in mice, including humoral immunity, cell-mediated immunity, mucosal immunity as well as protective neutralizing antibody. The results also implied that Th2-like response triggered by the immunization is probably the primary response compared to Th1-like response. In summary, this study laid a foundation for the development of novel rotavirus genetic engineering vaccine.

Key words: Rotavirus; *vp7* gene; Adenovirus vector; Genetic engineering vaccine; Immune response

摘要: 为探索以非复制型腺病毒为表达载体的多价轮状病毒(Rotavirus, RV)基因工程疫苗的可行性,在前期工作的基础上,对表达我国 G2 和 G3 型 RV 流行毒株 *vp7* 基因的重组腺病毒的免疫效果进行了研究。分别用表达 G2 和 G3 型 *vp7* 基因的重组腺病毒 rvAdG2VP7、rvAdG3VP7 经滴鼻和灌胃两种途径免疫 Balb/c 小鼠,对免疫后小鼠的血清抗体、黏膜抗体和相关的细胞因子水平进行了检测和比较。结果表明,用表达 G2 和 G3 型 *vp7* 基因的重组腺病毒经滴鼻和灌胃两种途径免疫小鼠后,均可诱导机体产生较强的 RV 特异性免疫反应,包括体液免疫、细胞免疫和黏膜免疫,并能产生中和抗体。但免疫反应以 Th2 类为主,Th1 类反应也占有相当的比例。本研究为新型 RV 基因工程疫苗的深入研究奠定了基础。

关键词:轮状病毒;*vp7* 基因;重组腺病毒;基因工程疫;免疫效果

中图分类号:R373 **文献标识码**:A **文章编号**:1003-5125(2005)04-0352-05

A 组轮状病毒(Rotavirus, RV)是引起全世界婴幼儿腹泻的最重要病原。据世界卫生组织(WHO)统计,每年有近 1.2 亿例腹泻是由 RV 引起的,在发展中国家,每年因RV感染发生死亡的儿童

收稿日期:2004-12-09,修回日期:2005-01-27

* 基金项目:国家 863 现代农业与生物技术领域资助项目(2003AA215071, 2002AA206641)

作者简介:张彩红(1979 -),女,陕西宝鸡籍,预防兽医学专业硕士生,主要从事基因工程疫苗的研究。

\# 同为第一作者。

** 通迅作者. Corresponding author. Tel:010-63518290, E-mail: wangjw28@vip.sina.com。

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

高达 870 000 人[1]。鉴于 RV 危害严重且无有效的治疗手段,WHO 已将 RV 疫苗列为最优先发展的疫苗项目之一。目前正在研制的候选 RV 疫苗包括重配或减毒疫苗、灭活疫苗、病毒样颗粒(VLP)疫苗、亚单位疫苗、转基因植物疫苗和 DNA 疫苗等,动物实验表明这些疫苗的免疫保护效果差异较大[2~4]。美国 Wyeth 公司生产的四价人 - 猴 RV 重组疫苗是第一个被批准上市的 RV 疫苗,但因怀疑引起儿童肠套叠而被暂停使用[1]。因此,RV 新型疫苗的研究仍在探索之中。

与国外策略不同,我们拟以非复制型腺病毒载体表达 RV 的 VP7 等重要结构蛋白作为口服或滴鼻疫苗。由于 A 组轮状病毒血清型众多,单价疫苗恐怕难以取得较全面的保护效果。疫苗研究的实践表明,对于基于中和性抗原的疫苗,多价疫苗的效果要好于单价疫苗,而我们对我国 A 组 RV 感染状况的调查结果显示,绝大部分为 G1 型(89.5%)感染,少数为 G2 和 G3 型(6.1%, 2.8%)感染[5]。因此,我们的疫苗设计方案主要包括 G1、G2 和 G3 型 3 种不同的 VP7 抗原。此前,我们利用表达我国 RV 主要流行株 G1 型 VP7 的非复制型重组腺病毒免疫小鼠,获得了较好的效果[6,7];随后我们又制备了表达我国 G2 和 G3 型流行株的重组腺病毒 rvAdG2VP7 和 rvAdG3VP7[8]。在前期工作的基础上,本文对 rvAdG2VP7 和 rvAdG3VP7 的免疫效果进行了研究,以期为新型 RV 基因工程疫苗的研究提供依据。

1 材料和方法

1.1 细胞和病毒

293 细胞购自美国 ATCC, MA104 细胞为本室保存。人 RV RV-5 株(G2 型)、Wa 株(G1 型)和猴 RV SA11 株(G3 型)均由美国 NIH Kapikian 博士惠赠。重组腺病毒 rvAdG2VP7 和 rvAdG3VP7 为本室构建[8]。

1.2 免疫学试剂

辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠和兔抗羊 IgG 均为美国 Santa Cruz 公司产品,HRP 标记的羊抗鼠 IgA 为美国 Sigma 公司产品;山羊抗 RV 抗体为美国 Chemicon International 公司产品;小鼠 IgG1/IgG2a 抗体检测试剂盒为美国 Southern Biotechnology Associates 产品;小鼠 IL-4 和 IFN-γ 定量检测试剂盒为瑞典 Amersham Biosciences 产品;ConA 为美国 Sigma 公司产品。

1.3 病毒培养

按常规方法培养 293 细胞和 MA104 细胞,分别用于重组腺病毒 rvAdG2VP7、rvAdG3VP7 和 RV 的增殖,具体方法见文献[9]。

1.4 动物实验

SPF 级 RV 抗体阴性 6～8 周龄雌性 Balb/c 小鼠购自军事医学科学院实验动物中心,随机分为 3 组。实验组分别经滴鼻和灌胃途径接种重组腺病毒 rvAdG2VP7(以下简称 G2 组)或 rvAdG3VP7(以下简称 G3 组),对照组为野生型 5 型腺病毒(以下简称 Ad5 组),每种途径均接种 10 只小鼠。鼻腔接种剂量为 100μL 1×10^7 荧光形成单位(ifu)腺病毒,灌胃组的接种剂量为 200μL 1×10^7 ifu 腺病毒。在初次免疫后第 4、第 6 周进行加强免疫并采集血清。第 3 次免疫 7d 后,每组分别取 5 只小鼠眼球采血后处死,取脾分离脾淋巴细胞,测定 IL-4 和 IFN-γ。同时制备肺、肠匀浆液和肺灌洗液,用于 RV 特异性黏膜免疫反应的检测。具体方法参见[6,7]。

1.5 RV 特异性抗体的测定

以培养的 RV 为抗原,用间接 ELISA 法测定 RV 特异性 IgG 和 IgA 抗体水平,具体方法参考文献[10]。小鼠血清中 IgG1/IgG2a 的测定参见文献[11]。

1.6 小鼠脾淋巴细胞分泌 IL-4 和 IFN-γ 含量的测定

无菌操作摘取小鼠脾脏,制备脾淋巴细胞悬液,用 1640 完全培养液调细胞数至 1×10^6 细胞/mL,加入 96 孔 U 型细胞培养板,每孔 100μL,做 3 个复孔,每孔再加入 100μL 含有 ConA 的 1640 培养液(ConA 终浓度为 5μg/mL)。CO_2 培养箱内 37 ℃培养 24h 后,每孔无菌吸出 100μl 培养液,2 000r/min 离心 10min,收集上清用于 IL-4 的测定;细胞继续培养至 72h,同样方法收集上清用于 IFN-γ 测定。IL-4 和 IFN-γ 的测定按试剂盒说明书进行。

1.7 中和试验

在 MA104 细胞上进行,具体方法参见文献[12]。

2 结果

2.1 重组腺病毒免疫小鼠后可诱导产生 RV 特异性血清抗体

以免疫 Ad5 组的小鼠血清为阴性对照,将重组腺病毒 rvAdG2VP7 和 rvAdG3VP7 免疫的小鼠血清进行 1 000 倍稀释后,对其抗 RV G2 或 G3 型 VP7 抗体的产生情况进行了检测,表明重组腺病毒可有效诱导针对 G2、G3 型 RV 的 IgG 抗体,结果见图 1、图 2。

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

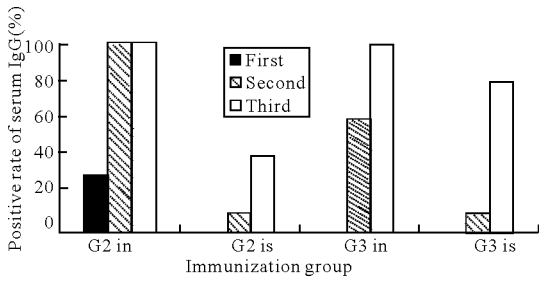

图1 重组腺病毒免疫后小鼠血清 IgG 抗体的阳转率

Fig. 1 Seroconversion rates of rotavirus specific IgG in mice immunized with different recombinant adenoviruses

G2: Immunized with rvAdG2VP7; G3: Immunized with rvAdG3VP7; in: intranasal; is: oral

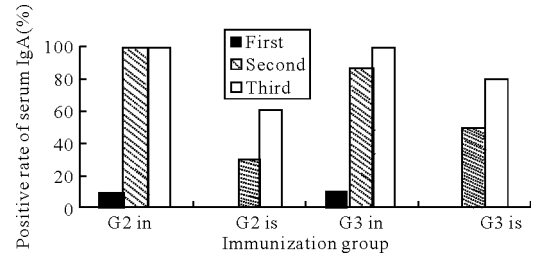

图2 重组腺病毒免疫后小鼠血清 IgA 抗体的阳转率

Fig. 2 Seroconversion rates of rotavirus specific IgA in mice immunized with different recombinant adenoviruses

G2: Immunized with rvAdG2VP7; G3: Immunized with rvAdG3VP7; in: intranasal; is: oral.

2.2 重组腺病毒免疫小鼠可诱导产生 RV 特异性黏膜免疫

由于黏膜免疫在 RV 感染的免疫保护作用中发挥重要作用,因此我们对小鼠肺灌洗液及肺、肠匀浆液中的 RV 特异性 IgG 和 sIgA 抗体进行了检测。将上述标本用 PBS 溶液 100 倍稀释后进行测定,结果见图 3,图 4,表明重组腺病毒可诱导 RV 特异性黏膜免疫。

2.3 重组腺病毒免疫小鼠可诱导产生 RV 特异性血清中和抗体

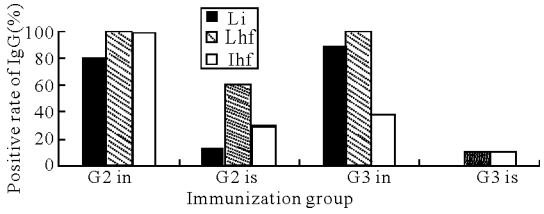

图3 重组腺病毒免疫后小鼠 IgG 抗体的阳转率

Fig. 3 Positive rates of rotavirus specific IgG in mice inoculated with different recombinant adenoviruses

Note: Li, Lung lavage; Lhf, Lung homogenate fluid; Inf, Intestine homogenate fluid. G2, Immunized with rvAdG2VP7; G3, Immunized with rvAdG3VP7; in, intranasal; is, oral.

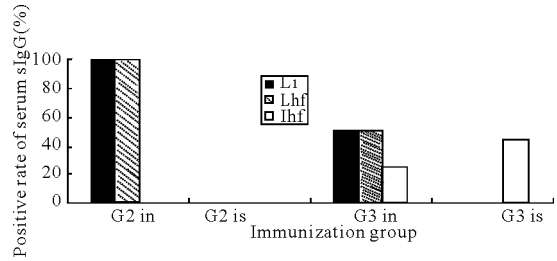

图4 重组腺病毒免疫后小鼠 sIgA 抗体的阳转率

Fig. 4 Positive rates of rotavirus specific sIgA in mice inoculated with different recombinant adenoviruses

Note: G2, Immunized with rvAdG2VP7; G3, Immunized with rvAdG3VP7; in, intranasal; is, oral. Li, Lung lavage; Lhf, Lung homogenate fluid; Inf, Intestine homogenate fluid.

根据血清抗体检测结果,我们从不同免疫组中分别取一支抗体阳性血清,检测其对不同 RV 毒株的中和活性。结果表明,经过 3 次免疫后免疫组小鼠血清均能产生较高滴度的中和抗体(表 1),在细胞培养上可阻止同型 RV 感染,但对异型病毒感染没有阻断作用,这与预期结果相符,也证实了多价疫苗的必要性。滴鼻组和灌胃组小鼠血清针对鼠 RV 的中和抗体滴度没有明显区别。

表1 重组腺病毒免疫小鼠诱导的轮状病毒血清中和抗体分析

Table 1 Titers of neutralizing antibody against rotavirus in sera from different mice groups immunized with recombinant adenoviruses

Rotaviruses	G2		G3		Ad5	
	in	is	in	is	in	is
RV-5(G2)	1:1600	1:800	ND	ND	ND	ND
SA11(G3)	ND	ND	1:800	1:800	ND	ND
Wa (G1)	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Notes: G2 group, Immunized with rvAdG2VP7; G3 group, Immunized with rvAdG3VP7; Ad5 group, Immunized with wild adenovirus type 5. in: intranasal; is: oral; ND: not detectable.

2.4 重组腺病毒免疫小鼠后诱导以 Th2 类反应为主的免疫应答

为了解重组腺病毒疫苗诱导的免疫反应类型,我们对免疫后小鼠脾淋巴细胞分泌的 IL-4 和 IFN-γ 水平进行了测定。结果表明,用同一抗原免疫的小鼠滴鼻组分泌 IL-4 和 IFN-γ 的水平高于灌胃组,其中滴鼻免疫 G3 组的 IL-4 和 IFN-γ 含量最高,可分别达 498.3pg/mL 和 3352 pg/mL,灌胃组小鼠分泌的 IFN-γ 量均低于 50 pg/mL,总体上看 IL-4 的水平要高于 IFN-γ(图 5、6)。为进一步证实结果的可靠性,同时我们还对小鼠血清中 IgG1/IgG2a 进行了测定,结果显示,免疫后小鼠血清中的 IgG1 含量均高于 IgG2a,未经任何免疫的正常对照小鼠两者的值均很低(表2)。上述结果提示,重组腺病毒

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

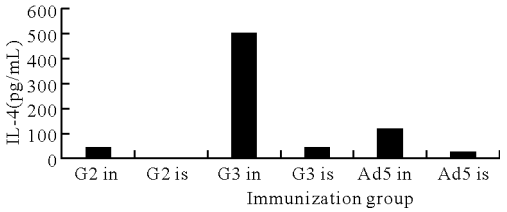

图 5 重组腺病毒免疫小鼠脾细胞分泌 IL-4 的测定

Fig . 5 IL-4 secreted by spleen cells of mice immunized with recombinant adenoviruses

G2 : Immunized with rvAdG2VP7 ; G3 : Immunized with rvAdG3VP7 ; Ad5 : Immunized with wild adenovirus type 5 ; in : intranasal ; is : oral.

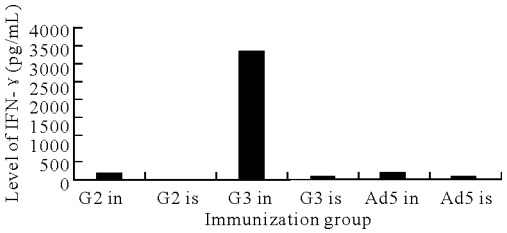

图 6 重组腺病毒免疫小鼠脾细胞分泌 IFN-γ 的测定

Fig . 6 IFN -γ secreted by spleen cells of mice immunized with recombinant adenoviruses

G2 : Immunized with rvAdG2VP7 ; G3 : Immunized with rvAdG3VP7 ; Ad5 : Immunized with wild adenovirus type 5 ; in : intranasal ; is : oral.

表 2 重组腺病毒免疫小鼠血清中 IgG1、IgG2a 的测定

Table 2 Rotavirus-specific serum IgG1 and IgG2a detected in mice immunized with recombinant adenoviruses

Group	IgG	G2		G3		ck
		in	is	in	is	
1	IgG1(pg/mL)	1.61	2.01	1.52	1.18	0.54
	IgG2a(pg/mL)	1.04	1.12	0.89	0.15	< 0.1
	IgG1/IgG2a	1.58	1.79	1.71	7.87	NA
2	IgG1(pg/mL)	3.26	3.50	1.63	2.02	
	IgG2a(pg/mL)	0.68	2.51	0.38	0.75	
	IgG1/IgG2a	4.79	1.39	4.29	2.69	
3	IgG1(pg/mL)	2.97	2.60	1.51	2.21	
	IgG2a(pg/mL)	2.05	1.02	0.83	0.93	
	IgG1/IgG2a	1.45	2.55	1.82	2.38	
4	IgG1(pg/mL)	3.23	3.40	1.52	1.73	
	IgG2a(pg/mL)	1.24	2.44	0.36	1.01	
	IgG1/IgG2a	2.60	1.39	4.22	1.71	

Notes : G2 group , Immunized with rvAdG2VP7 ; G3 group , Immunized with rvAdG3VP7 ; Ck , Control group. in : intranasal ; is : oral ; NA : not applicable.

rvAdG2VP7 和 rvAdG3VP7 免疫小鼠诱导的免疫是均衡的,既可诱导体液免疫,也可诱导细胞免疫,但以 Th2 类反应为主。

3 讨论

本研究在前期工作基础上,用表达人 RV G2 型和 G3 型主要糖蛋白 VP7 的非复制型重组腺病毒免疫小鼠,获得了较好的免疫效果:在血清中能产生高滴度并具有中和活性的抗体,同时也检测到了 IgA 的存在;在黏膜组织及其分泌液中也检出了 RV 特异性的 sIgA 和 IgG。与滴鼻组相比,灌胃组小鼠血清 IgG 和 IgA 的滴度及阳转率均较低,这与前期研究结果一致[6,7]。分析其原因,可能与灌胃组小鼠胃内的胃酸对重组腺病毒的破坏作用,或/和小鼠胃肠道其它肠道病原引起的非特异性小肠免疫机制对重组腺病毒感染细胞造成干扰有关。因此,可考虑采用其它增强免疫效果的方法将重组腺病毒疫苗传递到小肠,如使用肠溶胶囊等[13]。

RV 的免疫保护机制除体液免疫和黏膜免疫外,细胞免疫也起很重要的保护作用[14,15]。因此,我们对免疫小鼠脾淋巴细胞培养上清中的 IL-4 和 IFN-γ 进行了测定,以确定免疫反应类型。结果发现,同一小鼠 IL-4 和 IFN-γ 的上升是同步的,提示重组腺病毒疫苗免疫小鼠后既产生体液免疫又产生细胞免疫。由于分离培养小鼠脾淋巴细胞操作比较繁琐,且样本数量较少,为此我们还同时测定了 IgG1/IgG2a 来推断免疫反应类型。若 IgG1 含量高于 IgG2a,则以 Th2 反应为主,通过其分泌的细胞因子促进体液免疫反应;反之若 IgG2a 含量高于 IgG1,则推断以 Th1 反应为主,介导细胞免疫应答[11]。本研究的 IgG1/IgG2a 测定结果显示,免疫组小鼠的 IgG1 均略高于 IgG2a,说明重组腺病毒表达的 VP7 蛋白引起的免疫反应以 Th2 类反应为主,但 Th1 类反应也占有相当的比例,这与 IL-4 和 IFN-γ 测定所得出的结论一致。

宿主产生的针对腺病毒载体的细胞和体液免疫是以腺病毒为表达载体的 RV 基因工程疫苗应用的最大障碍之一,但本研究和本课题组前期的研究均发现用同型腺病毒载体再次免疫时,仍会取得较好的增强效果,这可能是由于小鼠体内已存在的抗腺病毒抗体与再次免疫的腺病毒抗原形成 ICOSOMS (immune complex-coated bodies),分布于滤泡树突状细胞(DC),延长了 B 细胞反应[16];也可能是腺病毒载体转导途径与载体-APC 相互作用激活先天性免疫的途径不同,腺病毒特异性抗体的存在提供了其它摄取途径,如 Fc 受体介导的抗体-病毒相互作用内化进入免疫系统[17]。Buge 等用 5 型非复制型腺病毒表达猴免疫缺陷病毒(SIV) gp120 蛋白免疫短尾猿,连续免疫 3 次,仍能表现出对表达蛋白的明显的免疫反应,证明已存在的腺病毒抗体不能清除有效的免疫反应[18]。本研究实验结果再次证明,即使机体已经存在针对腺病毒载体的免疫应答,粘膜途径免疫也能产生对外源蛋白的免疫反应。

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

综上所述,本研究的结果表明,与表达 G1 型 VP7 的重组腺病毒一样,用表达 G2、G3 型 VP7 的重组腺病毒免疫小鼠可以诱导机体产生以体液免疫为主的包括细胞免疫和黏膜免疫的全面免疫应答,获得了良好的免疫效果。这一工作为具有我国自主知识产权的 RV 基因工程疫苗的深入研究奠定了坚实的基础。

参考文献

[1] Cunliffe N A, Bresee J S, Hart C A. Rotavirus Vaccine: Development, current issues and future prospects[J]. J Infect, 2002, 45:1-9.

[2] Ward R L. Possible mechanisms of protection elicited by candidate rotavirus vaccine as determined with the adult mouse modle[J]. Viral Immunol, 2003, 16: 17-24.

[3] Lynch M, Shieh W J, Tatti K, *et al*. The pathology of rotavirus-associated deaths, using new molecular diagnostics[J]. Clin Infect Dis, 2003, 37: 1327-33.

[4] Kapikian A Z. A rotavirus vaccine for prevention of severe diarrhea of infants and young children: development, utilization and withdrawl[J]. Novartis Found Symp, 2001, 238: 153-179

[5] 徐倏 ,温乐英,王健伟,等. 中国部分城市 A 组轮状病毒感染状况调查及 VP7 血清型分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2001,15: 77-80.

[6] 何金生,王健伟,温乐英,等. 用重组腺病毒表达 A 组轮状病毒主要中和抗原 VP7 可获得良好免疫效果[J]. 病毒学报,2001, 17: 22-126.

[7] 何金生, 王健伟, 姜秀丽,等. 复制缺陷型重组腺病毒 rvAdG1VP7 免疫学效果的研究[J],安徽医科大学学报,2002, 37:86-88.

[8] 魏 强, 姜秀丽, 王健伟, 等. 人轮状病毒 G2 和 G3 型主要中和抗原 VP7 基因在重组腺病毒中的表达[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2004,18:12-15

[9] Crawford S E, Estes M K, Ciarlet M, *et al*. Heterotypic protection and induction of a broad heterotypic neutralization response by rotavirus-like particles[J]. J Virol, 1999, 73: 4813-4822.

[10] 朱立平,陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京:人民军医出版社, 2000, 192.

[11] Yang K,Wang S, Chang K O, *et al*. Immune responses and protection obtained with rotavirus VP6 DNA vaccines given by intramascular injection[J]. Vaccine, 2001, 19: 3285-3291.

[12] Ciarlet M, Hoshino Y,Liprandi F. Single point mutations may affect the serotype reactivity of serotype G11 porcine rotavirus strains: a widening spectrum[J]?J Virol, 1997, 71: 8213-8220.

[13] Buge S L. An adenovirus-simian immunodeficiency virus env vaccine elicits humoral, cellular, and mucosal immune responses in rhesus macaques and decreases viral burden following vaginal challenge[J]. J Virol, 1997, 71: 8531-8541.

[14] Offit P A and Dudzik K I. Rotavirus-specific cytotoxic T lymphocytes passively protect against gastroenteritis in suckling mice[J]. J Virol, 1990, 64: 6325-6328.

[15] Franco M A, Tin C, Greenberg H B. CD8+ T cells can mediate almost complete short-term and partial long-term immunity to rotavirus in mice[J]. J Virol, 1997, 71: 4165-4170.

[16] Gray D. Immunological memory: long-lived cells and long-lived antigen. In: Janeway C, Sprent J, and Sercarz E. ed. Immunogenicity. UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology[M]. New York: Alan R Liss, 219-228.

[17] Schnell M A, Zhang Y, Tazelaar J, *et al*. Activation of innate immunity in nonhuman primates following intraportal administration of adenoviral vectors[J]. Mol Ther, 2001, 3: 708-722.

[18] Buge S L, Murty L, Arora K, *et al*. Factors associated with slow disease progression in macaques immunized with an adenovirus-simian immunodeficiency virus (SIV) envelope priming-gp120 boosting regimen and challenged vaginally with SIVmac251[J]. J Virol, 1999, 73: 7430-7440.

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.