

基于 DENV-prM/E 基因构建 DENV-VLP 及其免疫学特性

方丹云, 刘岩, 喻治准, 罗雅艳, 江丽芳, 周俊梅*

(中山大学 1.中山医学院微生物学教研室;2.热带病防治研究教育部重点实验室,广东 广州 510080)

摘要:【目的】构建和表达登革病毒 4 型病毒样颗粒,初步研究其免疫学特性。【方法】用 RT-PCR 法扩增 DENV4-prM/E 基因,构建重组质粒 pGAPZ-sprM/E-D4,转化 X33 酵母菌株,SDS-PAGE、Western Blot 鉴定目的蛋白表达。切片电镜检测病毒样颗粒,蔗糖密度梯度离心纯化。免疫三组 Balb/C 小鼠,每组 15 只。采用间接 ELISA 检测抗原特异性抗体,间接免疫荧光法检测免疫血清与天然病毒粒子的结合,流式细胞术分析小鼠脾淋巴细胞表型,酶联免疫斑点法(ELISPOT)检测脾分泌 IFN- γ 、TNF- α 和 IL-10 的细胞。【结果】重组质粒在酵母中以病毒样颗粒形式表达,为直径 20 ~ 30 nm 的球形颗粒,VLP 免疫组刺激小鼠产生抗体与灭活病毒组相似,流式及 ELISPOT 结果提示 DENV4-VLP 与灭活病毒组相似,用登革病毒抗原刺激后,分泌 IFN- γ 、TNF- α 的细胞数目明显增加,各组分泌 IL-10 细胞数目的整体水平均不高。【结论】应用毕赤酵母表达系统成功表达获得了 DENV4-VLP,具有良好的免疫原性,可诱导 Balb/C 小鼠产生有效的体液免疫应答,并能诱导 Th1 型免疫应答而诱导 Th2 型免疫应答较弱。

关键词:登革病毒;病毒样颗粒;免疫应答

中图分类号:R373.3

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2014)04-0494-06

Construction and Immunological Properties of Dengue Virus Like Particles Based on the prM/E Genes

FANG Dan-yun, LIU Yan, YU Zhi-zhun, LUO Ya-yan, JIANG Li-fang, ZHOU Jun-mei*

(1.Department of Microbiology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

2.Key Laboratory of Tropical Disease Control, Chinese Ministry of Education, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To construct and express DENV4-like particles and study the immunological properties. 【Methods】 The prM and E genes of DENV4 were amplified by RT-PCR. The recombinant plasmid pGAPZ-sprM/E-D4 was transferred in yeast X33 and expressed. The proteins were identified by SDS-PAGE and Western Blot. The VLP were purified with sucrose density gradient centrifugation and observed with section electron microscopy. Three groups (15mice in each group) of Balb/c mice were immunized. Antigen specific antibody was detected by indirect ELISA. Indirect immunofluorescence was used to detect the combination of serum with natural virus particles. Flow cytometry was used to analyse mice spleen lymphocyte phenotype. Enzyme-linked immune spots method (ELISPOT) was used to detect the secreting IFN- γ , TNF- α , and IL-10 spleen cells. 【Results】 The recombinant plasmid expressed in the form of virus-like particles in the yeast, for 20-30 nm in diameter spherical particles. The VLP stimulate antibody production in mice was similar with the inactivated virus group. Flow cytometry and ELISPOT results indicated that VLP was similar to inactivated viruses that the number of IFN- γ , TNF- α secreting cells obviously increased while the number of IL-10 secreting cells was not high with dengue virus antigen stimulation. 【Conclusion】 The DENV4-VLP has been successfully expressed by Pichia expression system. It showed good immunogenicity, which can induce Balb/C mice to produce effective humoral immune response and prefer induce Th1 type immune response to Th2 immune response.

Key words: dengue virus; virus like particles; immune response

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(4):494-499]

收稿日期:2013-12-06

基金项目:国家自然科学基金(U0632002, U1132002, 31270974, 81261160323);广东省科技计划项目(2011B031800360)

作者简介:方丹云,实验师,研究方向:细胞与分子病毒学,E-mail:danyunf@126.com; * 通信作者:周俊梅,副教授,硕士生导师,E-mail:junmeizh@126.com

登革病毒(Dengue Virus, DENV)感染人可引起登革热(dengue fever, DF)、登革出血热(dengue hemorrhagic fever, DHF)和登革休克综合征(dengue shock syndrome, DSS)。其中 DHF/DSS 病情严重,病死率高,但其发病机制至今尚未阐明,仍缺乏有效治疗措施和疫苗。病毒样颗粒(virus-like particles, VLP)是由病毒结构蛋白组成的类似天然病毒粒子空间构象的颗粒,但不含病毒核酸。VLP 具有良好的免疫原性,可以诱导机体产生体液免疫应答和细胞免疫应答,因此成为研究病毒致病机制的良好工具,并且也为研究新型安全高效的疫苗提供了一个新的途径,目前乙肝表面抗原病毒样颗粒疫苗和人乳头瘤病毒样颗粒疫苗已成功上市。有效的登革疫苗应能同时对四个血清型都起保护作用的平衡免疫应答,用体外表达系统组装登革病毒样颗粒,为四价登革疫苗的研制提供了新的策略。本室前期已成功构建和表达了 DENV-1, -2, -3 型病毒样颗粒^[1-3],所以,构建登革 4 型病毒样颗粒对四价登革病毒样颗粒疫苗的研究必不可少。本研究基于登革病毒结构蛋白 prM/E,应用毕赤酵母表达系统构建和表达 DENV4 病毒样颗粒并对其免疫学特性进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 病毒和细胞

登革病毒 4 型(DENV4)H241 株由中国 CDC 菌毒种保藏中心提供,白纹伊蚊 C6/36 细胞由本室保存。

1.2 载体和宿主菌

大肠杆菌感受态细胞(DH5 α)购于天根公司,酵母表达载体 pGAPZ α A 和酵母菌 Pichi Pastoris X-33 购于 invitrogen 公司。

1.3 生物信息学软件和资源

SignalP3.0 Server <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>(信号肽序列预测与分析);Primer Primer 5.0(引物设计);DNASTAR(基因序列分析);Clustalx1.81(多重序列比对)。

1.4 主要试剂

MEM 粉末培养基和胎牛血清(Gibico),购于 Invitrogen;RNA 抽提试剂盒、反转录试剂盒(Takara);Zeocin 抗生素(Life Technology);逆转录

试剂盒(QIAGEN Rneasy Mini kit);各种工具酶(Takara);引物由上海英骏公司合成。IFN- γ 和 IL-10 细胞因子试剂盒(R&D 公司);IFN- γ 、TNF- α 和 IL-10 ELISPOT 试剂盒,脾脏淋巴细胞分离液购自深圳达科为公司;流式抗体(eBioscience 公司);弗氏完全/不完全佐剂(Sigma-Aldrich 公司)。

1.5 实验方法

用 C6/36 细胞培养 DENV4,提取病毒 RNA,反转录后扩增 prM 信号肽、prM 和 E 蛋白基因,常规分子克隆法构建重组质粒 pGAPZ-sprM/E-D4,质粒线性化后转化 X33 酵母菌株,SDS-PAGE、Western Blot 鉴定目的蛋白表达。切片电镜检测病毒样颗粒,蔗糖密度梯度离心纯化。参照 E 蛋白标准品,利用 BCA 蛋白分析定量检测试剂盒对蔗糖密度梯度离心纯化的 VLP 进行定量。纯化后的 VLP 放于-80 $^{\circ}$ C 保存待用。空斑形成实验(PFU)测定病毒滴度,采用 β 丙内酯灭活病毒。采用间接 ELISA 检测抗原特异性抗体,间接免疫荧光法检测免疫血清与天然病毒粒子的结合,流式细胞术分析小鼠脾淋巴细胞表型,酶联免疫斑点法(ELISPOT)检测脾淋巴细胞分泌 IFN- γ 、TNF- α 和 IL-10 的细胞数。

1.6 实验动物

SPF 级 4 周龄雌性 Balb/C 小鼠购于中山大学动物中心。

1.7 动物免疫

腹腔和皮下多点联合注射,三次免疫;初次免疫后第 14 天和第 28 天,分别进行加强免疫。初次免疫用完全弗氏佐剂乳化物,加强免疫用不完全弗氏佐剂乳化物,灭活病毒为阳性对照,PBS 为阴性对照。免疫剂量为 50 μ g/只,每组 15 只小鼠。

2 结果

2.1 pGAPZ-sprM-D4 的构建及表达

将提取的 DENV4(H241 株)的 RNA 反转录为 cDNA 后,以 cDNA 为模板用特异性引物 FDV4/RDV4 扩增 DENV4-sprM/E 基因,基因片段为 2 055 bp,双酶切后克隆到载体 pGAPZ α A,引物序列和酶切位点见表 1。将测序鉴定正确的 pGAPZ-sprM/E-D4-DH5 α 阳性克隆大量培养,提取质粒,用于转化毕赤酵母 X33,如图 1 所示,阳性菌液扩增产物约 2 000 bp(泳道 2-4,6-8,10),与预期结

果一致, 而泳道 5,9 为 PCR 鉴定为阴性的克隆。转化空质粒的菌液无条带(泳道 1)。

表 1 扩增采用的引物序列

Table 1 The primer sequences used in amplification

Primer name	Primer sequences and enzyme loci
FDV4	5'-CCGTTCGAAACGATGAGAAAAAGGTCAAC-3' (<i>Bsp</i> 119 I)
RDV4	5'-TCCTCTAGACTAAGCGTGAACCTGTGAAACC-3' (<i>Xba</i> I)

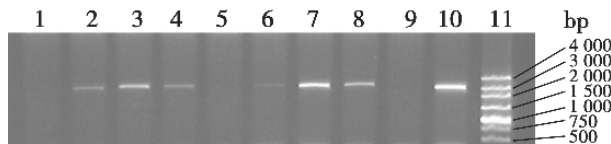


图 1 特异性引物鉴定 pGAPZ-sprM/E-D4-X33

Fig.1 The identification of the recombinant yeast clones by primers FDV4/RDV4 with PCR

1: pGAPZ α A-X3 3; 2-10: pGAPZ-sprM/E-D4-DH5 α ; 11: 250 bp DNA Ladder Marker

收集 0、24、48、72、96 h 的发酵液, 离心后收集细胞沉淀, 破碎裂解, 并用 PBS 稀释, 进行 SDS-PAGE 检测, 结果如图 2 所示。

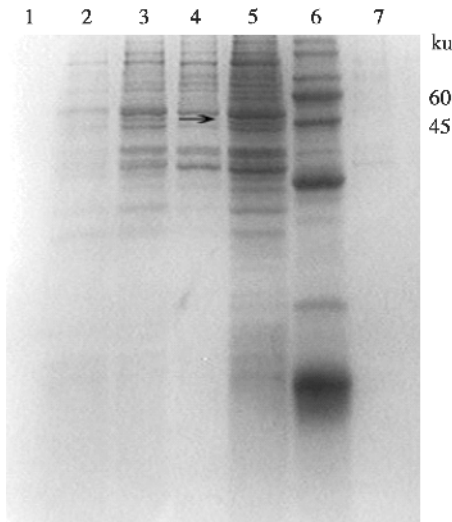


图 2 SDS-PAGE 检测 E 蛋白在不同时间点的表达

Fig.2 Time-course of the expression of E protein by SDS-PAGE

1: 0 h, 2: 24 h, 3: 48 h, 4: 72 h, 5: 96 h, 6: Marker, 7: X33

将 96 h 酵母细胞裂解液进行 SDS-PAGE 和 Western Blot 检测, WB 所用检测抗体为 DENV4-E 蛋白单克隆抗体 (HB48, ATCC) 和 DENV4 免疫血清, 结果如图 3 所示, 45 ~ 50 ku 处检测到 E 蛋白

特异性条带, 而免疫血清成分复杂, 故除可见到明显的 E 蛋白条带外, 上方还可见到较弱的未切割的 prME 蛋白条带。

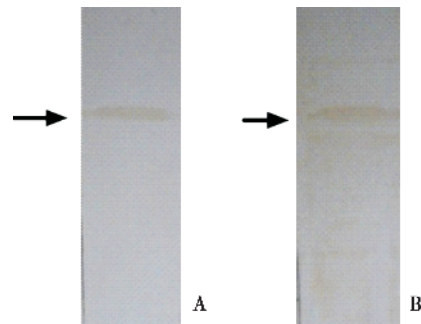


图 3 Western Blot 检测 E 蛋白表达

Fig.3 Identification of E protein by Western blot

A: the detecting antibody was Mab HB48; B: the detecting antibody was anti-DENV4 sera. Molecular mass of the band indicated by the arrow ranged from 45 to 50 ku.

2.2 DENV4 VLP 浓缩纯化及滴度确定

采用蔗糖密度梯度超速离心法纯化蛋白, 将收集到的各层溶液进行 SDS-PAGE 检测, 蛋白主要富集在 15%~30% 的蔗糖层中, 故将 20%~25% 蔗糖层进行 Western Blot 检测, 条带可与 DENV4-E 蛋白单克隆抗体结合, 结果表明 E 蛋白主要位于 20% 和 25% 蔗糖层中, 15% 蔗糖层亦有少量 E 蛋白存在。取 20%~25% 蔗糖层溶液用负染电镜观察, 结果如图 4 所示, 可见直径 20~30 nm 的球形颗粒, 表明重组 prM/E 蛋白以病毒样颗粒形式表达。经蔗糖密度梯度离心后, 收集离心管中可见亮带, 经超滤离心后重悬, 使用 BCA 法测定总蛋白含量, 绘制标准曲线, 经计算得到的 VLP 平均质量浓度为 1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

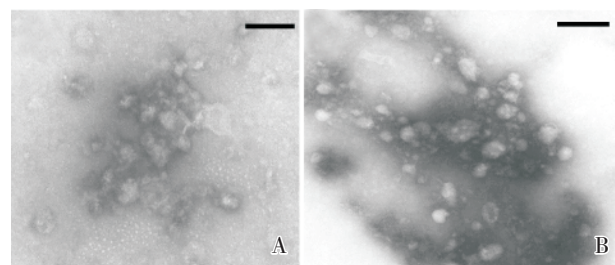


图 4 负染电镜检测 DENV4-VLP

Fig.4 Detection of DENV4-VLP by electron microscopy

A, B: DENV4-VLP; Scale bar: 100 nm

2.3 免疫血清抗原特异性抗体变化趋势

如图 5 所示, 免疫前各组小鼠血清中抗原特

异性抗体为阴性,三次免疫后,VLP 组与灭活病毒组的抗体水平逐渐升高,说明重组 VLP 具有与天然病毒粒子类似的诱导体液免疫应答的能力。间接免疫荧光实验结果表明免疫血清可与天然病毒粒子结合。

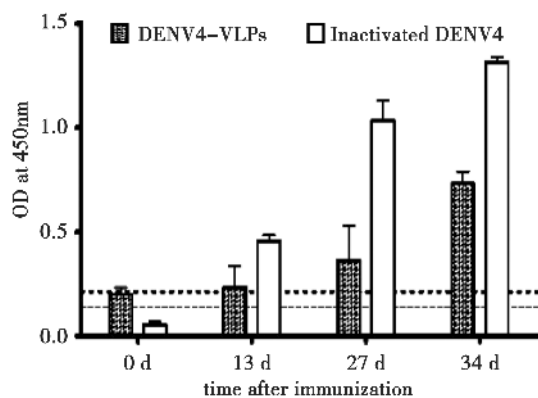


图 5 ELISA 检测抗原特异性 IgG 抗体

Fig.5 Antigen specific IgG antibody responses detected by ELISA

At day 0, 13, 27, 34, sera were collected after Balb/C mice were immunization, and indirect ELISA was used to test for antigen specific IgG. Data were expressed as mean of absorbance at OD450nm with a standard error of mean (SEM) bar. The baseline (dash line) indicates negative with normal mouse serum.

2.4 免疫小鼠脾 CD4⁺和 CD8⁺T 淋巴细胞变化

将 Balb/C 小鼠于第三次免疫后 7 d 脱颈处死,无菌分离脾脏淋巴细胞,用 10⁵ PFU 登革病毒加入淋巴细胞悬液共孵育 24 h,同时设立未刺激对照组,孵育后用 CD3-PE 和 CD8-FITC 进行表面分子染色,用流式细胞术检测脾脏 CD4⁺和 CD8⁺T 淋巴细胞的变化。CD4⁺T 淋巴细胞的变化如图 6 所示,登革病毒刺激前和刺激后,CD4⁺T 淋巴细胞无显著性差异,DENV4-VLP 组和灭活病毒组 CD4⁺T 淋巴细胞百分比明显低于阴性对照组。

CD8⁺T 淋巴细胞刺激前后的变化如图 7 所示,DENV4-VLP 组和灭活病毒组刺激后,CD8⁺T 淋巴细胞有显著性增加($P < 0.05$),但与 CD4⁺T 淋巴细胞检测结果类似其百分比均低于阴性对照组。

2.5 ELISPOT 评价 DENV4-VLP 免疫小鼠的细胞免疫应答

如图 8 所示,与正常 Balb/C 小鼠的脾脏淋巴细胞相比,DENV4-VLP 组、灭活病毒组用登革病

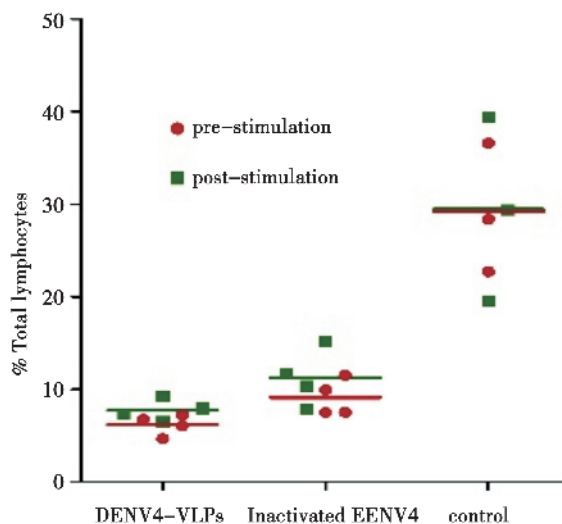


图 6 免疫后 Balb/C 小鼠脾脏 CD4⁺T 淋巴细胞检测

Fig.6 Detection of CD4⁺T cells in splenocytes in recipients of DENV4-VLP and virons

毒抗原刺激后,分泌 IFN- γ , TNF- α 的细胞数目明显增加。各组分泌 IL-10 细胞数目的整体水平均不高,小于 $6/2 \times 10^5$ splenocytes,但是,仍然可以看出与 PBS 组比较有所增加。结果提示 DENV4-VLP 与灭活病毒组相似能够诱导 Th1 型免疫应答,诱导 Th2 型免疫应答较弱。

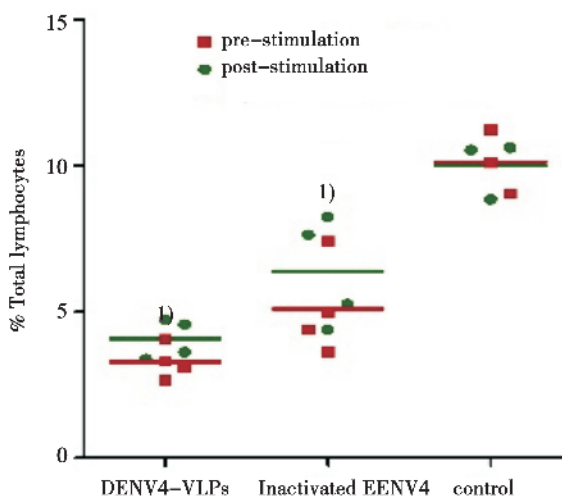


图 7 免疫后 Balb/C 小鼠脾脏 CD8⁺T 淋巴细胞检测

Fig.7 Detection of CD8⁺T cells in splenocytes in recipients of DENV4-VLP and virons

1) lymphocytes increased after stimulation, $P < 0.05$

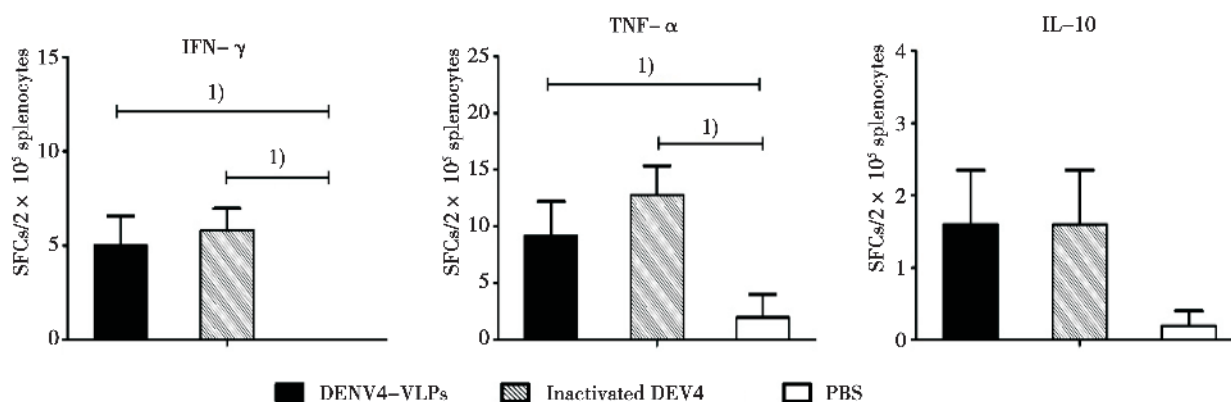


图 8 ELISPOT 检测分泌 IFN- γ , TNF- α 和 IL-10 的脾脏淋巴细胞
Fig.8 Detection of IFN- γ , TNF- α , and IL-10 secreting cells by ELISPOT

3 讨论

黄病毒和登革病毒的 E 蛋白正确折叠和空间构象形成依赖于 prM 蛋白的共表达^[4-5], 即 prM 蛋白和 E 蛋白是形成病毒样颗粒的必需蛋白, 本实验室前期对 DENV1-3 型的 prM 蛋白和 E 蛋白在酵母表达系统中进行了表达, 发现其均能形成病毒样颗粒形式^[1-3]。迄今为止, 在登革病毒样颗粒研究中, 已有多种表达系统被采用, 如酵母表达系统^[6-8]、哺乳类细胞表达系统^[9-10]、大肠杆菌表达系统^[11]以及植物表达系统^[11]、杆状病毒-昆虫表达系统^[12]等。本研究仍利用我室已建立的 VLP 表达技术路线, 选用 *Pichia pastoris* 表达系统, 具有 GAP 启动子的 pGAPZ α 酵母表达载体, 利用 prM 蛋白的自身信号肽引导 DENV4-VLP 的成功表达。

DENV4-VLP 免疫 Balb/C 小鼠可以产生抗原特异性抗体, 说明 VLP 具有良好的免疫原性, IFA 检测 VLP 免疫血清可识别天然病毒抗原 (结果未展示), 抗体滴度较低于灭活病毒组, 可能是由于 VLP 诱导体液免疫应答的能力不同。细胞免疫应答主要由 CD4 和 CD8T 淋巴细胞构成, CD4⁺T 淋巴细胞作为辅助性体细胞增加其他 T 细胞和 B 细胞的功能, CD8⁺T 淋巴细胞为毒性 T 淋巴细胞, 具有杀伤作用。CD8⁺T 细胞对控制登革病毒的感染是重要的^[13], 用 DENV4-VLP 免疫小鼠可以诱导有效的细胞免疫应答, 并且以 CD8⁺T 淋巴细胞的

增加为主, 提示 VLP 有诱导保护性细胞免疫应答的可能, 但是这需要更详细的实验确证。PBS 组的 CD4⁺和 CD8⁺百分比在刺激前后, 均高于 VLP 组和灭活病毒组, 提示 VLP 和灭活病毒的免疫可能同时诱导了其他免疫细胞的增殖。

CD4⁺T 淋巴细胞根据其分泌细胞因子的差异可以划分为 Th1 和 Th2 两个亚群, Th1 细胞主要分泌 IFN- γ 、TNF- α 和 IL-2, Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5、IL-10 和 IL-13。IFN- γ 和 TNF- α 对胞内病原体具有直接的杀伤效应, 因此 Th1 型细胞免疫应答对于病毒和细菌的防御是非常重要的。目前认为, 登革感染后, 轻型的登革热以 Th1 型免疫应答为主, 而 DHF/DSS 则以 Th2 型免疫应答为主。我们用 ELISPOT 方法检测 VLP 免疫小鼠后分泌 IFN- γ 、TNF- α 、IL-10 的脾脏 T 淋巴细胞数目, 以此反应 VLP 诱导免疫应答的方向, 即倾向于 Th1 型还是 Th2 型的免疫应答。结果发现 DENV4-VLP 组 IFN- γ 和 TNF- α 分泌细胞数低于病毒对照组, VLP 组分泌 Th1 型细胞因子 IFN- γ 的细胞增加明显, IL-10 上升微弱, 但该结果不排除也可能与取样的时间点有关, DENV4-VLP 组分泌 IL-10 的脾细胞数较高, 而 IFN- γ 较低。

总之, 本文利用非甲醇诱导的毕赤酵母表达系统成功表达获得了 DENV4-VLP, 发现其具有良好的免疫原性, 可诱导 Balb/C 小鼠产生有效的体液免疫应答和细胞免疫应答。为发展四价登革病毒样颗粒疫苗奠定了基础, 并对进一步阐明登革病毒的致病与免疫机制提供了实验依据。

参考文献

- [1] Liu WQ, Jiang HN, Zhou JM, et al. Recombinant dengue virus -like particles from *Pichia pastoris*: efficient production and immunological properties [J]. *Virus Genes*, 2010, 40(1): 53-59.
- [2] Tang YX, Jiang LF, Zhou JM, et al. Induction of virus-neutralizing antibodies and T cell responses by dengue virus type 1 virus -like particles prepared from *Pichia pastoris* [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2012, 125 (11): 1986-1992.
- [3] 付春云, 方丹云, 刘岩, 等. 登革病毒 3 型病毒样颗粒在酵母体内的表达与鉴定[J]. *热带医学杂志*, 2011, 11(6): 613-614, 656.
Fu CY, Fang DY, Liu Y, et al. Expression and identification of dengue virus type 3 like particles in *Pichia pastoris*[J]. *J Trop Med*, 2011, 11(6): 613-614, 656.
- [4] Ocazionez JR, Lopes da Fonseca BA. Recombinant plasmid expressing a truncated dengue-2 virus E protein without co-expression of prM protein induces partial protection in mice [J]. *Vaccine*, 2000, 19(6): 648-654.
- [5] Raviprakash K, Kochel TJ, Ewing D, et al. Immunogenicity of dengue virus type 1 DNA vaccines expressing truncated and full length envelope protein [J]. *Vaccine*, 2000, 18(22): 2426-2434.
- [6] Sugrue RJ, Fu J, Howe J, et al. Expression of the dengue virus structural proteins in *Pichia pastoris* leads to the generation of virus-like particles [J]. *J Gen Virol*, 1997, 78(Pt8): 1861-1866.
- [7] Bisht H, Chugh DA, Rajee M, et al. Recombinant dengue virus type 2 envelope/hepatitis B surface antigen hybrid protein expressed in *Pichia pastoris* can function as a bivalent immunogen [J]. *J Biotechnol*, 2002, 99 (2): 97-110.
- [8] Bisht H, Chugh DA, Swaminathan S, et al. Expression and purification of Dengue virus type 2 envelope protein as a fusion with hepatitis B surface antigen in *Pichia pastoris* [J]. *Protein Expr Purif*, 2001, 23(1): 84-96.
- [9] Lai CY, Hu HP, King CC, et al. Incorporation of dengue virus replicon into virus-like particles by a cell line stably expressing precursor membrane and envelope proteins of dengue virus type 2 [J]. *J Biomed Sci*, 2008, 15(1): 15-27.
- [10] Zhang S, Liang MF, Gu W, et al. Vaccination with dengue virus-like particles induces humoral and cellular immune responses in mice [J]. *Virol J*, 2011, 8: 333-342.
- [11] Lopez C, Gil L, Lazo L, et al. In vitro assembly of nucleocapsid-like particles from purified recombinant capsid protein of dengue-2 virus [J]. *Arch Virol*, 2009, 154(4): 695-698.
- [12] 张硕. 多价登革热病毒样颗粒疫苗的研究 [D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2011.
Zhang S. Study on multivalent dengue virus-like particles vaccine [D]. Beijing: China Centre of Diseases Control, 2011.
- [13] Yauch LE, Prestwood TR, May MM, et al. CD4⁺ T cells are not required for the induction of dengue virus-specific CD8⁺ T cell or antibody responses but contribute to protection after vaccination [J]. *J Immunol*, 2010, 185(9): 5405-5416.

(编辑 孙慧兰)