

# F1-V 重组亚单位疫苗对鼠疫耶尔森氏菌 141 强毒株皮下攻毒保护性的研究

王 栋<sup>①†</sup> 贾 暖<sup>②†</sup> 李 鹏<sup>③</sup> 邢 丽<sup>①</sup> 王希良<sup>①\*</sup>

(① 军事医学科学院微生物流行病学研究所免疫室 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071; ② 第二军医大学药学院 药物分析教研室, 上海 200433; ③空军航空医学研究所附属医院, 北京 100089)

**摘要** 在此实验中, 设计了一种包含 2 种成分的重组融合蛋白作为疫苗成分来防护鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia*)可能产生的生物威胁. 重组 F1-V 蛋白与铝佐剂结合, 分别以 10, 20, 50  $\mu\text{g}$  剂量免疫 BALB/C 小鼠, 周期为 2 个月. 检测小鼠血清抗体水平和 T 辅助细胞的亚型. 免疫后小鼠以 25~600 LD<sub>50</sub> 剂量的鼠疫耶尔森氏菌 141 强毒株进行皮下攻毒实验. 结果证明, F1-V 重组蛋白在小鼠体内诱导产生足够保护的免疫应答. 血清 IgG 水平是产生最终保护力的一个重要因素. 20  $\mu\text{g}$  的免疫剂量可以诱导血清抗体效价高达 51200, 使小鼠对 400 LD<sub>50</sub> 的鼠疫耶尔森氏菌产生 100% 的保护. F1-V 重组蛋白引发的抗体亚型主要为 IgG1 类, 说明抗体反应趋向 Th2 型反应. 流式细胞分析表明, 铝佐剂主要帮助 F1-V 重组融合蛋白诱导强烈的体液免疫而不是 CTL 细胞免疫应答. 表明 F1-V 重组亚单位疫苗株有望成为一种新型的鼠疫疫苗候选株.

**关键词** 耶尔森氏菌(*Yersinia*) F1-V 融合蛋白 攻毒 亚单位疫苗

鼠疫耶尔森氏菌是引起腺鼠疫和肺鼠疫的病原学的元凶, 在历史上曾经对人类文明产生过毁灭性打击, 尤其是 14 世纪的鼠疫大爆发(黑死病), 大约 1/3 的欧洲人口死于非命. 曾经被批准使用的鼠疫疫苗包括传统的死疫苗, 如美国使用的鼠疫 USP 死菌苗<sup>[1]</sup>, 虽然这种福尔马林全菌灭活疫苗对防护腺鼠疫有效, 但无法防护通过气雾剂传播的肺鼠疫. 灭活全菌疫苗制作困难, 伴有局部和全身的副作用, 而且必须不断的进行强化以保持其免疫效果<sup>[2]</sup>, 现在已经停止生产. 中国和其他几个国家正在使用的是 EV76 减毒活疫苗. 用 EV76 疫苗免疫能够保护人抵抗腺鼠疫和肺鼠疫. 然而, 这种疫苗对人的安全性还存在疑问, 因为使用的是未灭活的 EV76 减毒株, 小鼠实验发现可能存在毒力的恢复<sup>[3]</sup>.

为了克服以上疫苗的缺点, 尤其是提高疫苗对肺鼠疫的安全性和有效性, 近年来以鼠疫耶尔森氏菌荚膜蛋白 F1 和 V 毒力因子为构架的亚单位疫苗的研究成为热点<sup>[4-6]</sup>, 而 F1 和 V 分子是迄今为止所知道的最重要的鼠疫保护性抗原<sup>[7,8]</sup>. F1 分子是受温度调节蛋白, 在 37°C 最大表达, 具有抗吞噬作用. V 蛋白的作用是调节宿主防御, 通过下调 IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  和上调抗炎细胞因子 IL-10 起作用, 同时它还是一个毒力因子, 在 III 型分泌系统中发挥关键作用<sup>[9]</sup>. 以 F1, V, F1+V, F1-V 基础上构建的重组亚单位疫苗, 不仅可以有效防护腺鼠疫, 而且可以有效的阻止肺鼠疫的发生<sup>[6, 10-13]</sup>. 在美国和英国, 以 F1-V 和 F1+V 为基础的鼠疫疫苗研究已经进入临床阶段<sup>[14, 15]</sup>.

在以前的研究中, 已证明了 F1-V 重组融合亚单

收稿日期: 2006-09-25; 接受日期: 2006-11-23

† 并列第一作者

\* 联系人, E-mail: xiliangw@yahoo.com

位疫苗是一种很有发展前景的鼠疫疫苗候选株 [16]。这项工作的目的是比较免疫前后小鼠体内激发的不同类型的免疫应答,从而评价它们在致死性鼠疫耶尔森氏菌强毒株攻击中所起的保护作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和试剂

6~8 周龄的雌性 BALB/C 小鼠购买并饲养于军事医学科学院动物中心;质粒 F1-V/pET-11c 为本实验室构建和保存;表达菌株 BL21 (DE3) 为本实验室保存;鼠疫耶尔森氏菌 141 强毒株为中国疾病预防控制中心保存;单克隆抗体购自美国 Sigma-Aldrich 公司;HRP 羊抗鼠 IgG, IgG1, IgG2A 购自美国 Bethyl 公司;荧光标记的 CD3, CD4, CD8 抗体购自美国 BD Pharmingen 公司;氢氧化铝购自北京天坛生物制品股份有限公司。

### 1.2 融合蛋白的表达、发酵、纯化和鉴定

*CafI* 基因通过 *EcoR* I 连接在 *lcrV* 基因的 3'端,与 pET-11c 载体相连,转化菌株 BL21(DE3),构建 F1-V/pET-11c 重组表达菌株。利用发酵含有重组质粒 F1-V/pET-11c 的 BL21(DE3),获得高效表达的 F1-V 重组蛋白。发酵工作由军事医学科学院生物工程研究所完成。

原核表达的可溶性重组融合蛋白通过柱层析分离的方式纯化,依次通过阴离子交换、疏水层析和缓冲液交换,纯化方法参见文献 [14]。纯化的蛋白经过 Western blot 和氨基酸测序鉴定。分别测定纯化的重组蛋白的相关性质,如等电点、分子量、pH 值稳定性和温度敏感性等。

### 1.3 免疫方式

将不同剂量的重组融合蛋白抗原与氢氧化铝佐剂按一定的比例混合,并使后者的浓度保持在 1.2 mg/mL,轻轻搅拌过夜,得到 F1-V 重组融合蛋白亚单位疫苗候选株。融合蛋白抗原的浓度由每只小鼠免疫的剂量决定,分别为 50, 20 和 10  $\mu$ g/只。

采取肌肉注射的方式对小鼠进行免疫。实验组的小鼠于后腿肌肉注射相应剂量的氢氧化铝佐剂吸附的融合蛋白抗原,而对照组则注射 PBS 或氢氧化铝。小鼠初次免疫后每隔 2 周注射相同剂量,共加强免疫 3 次。免疫结束后,每组处死 5 只小鼠分析其免

疫应答效果,剩下的小鼠以鼠疫耶尔森氏菌 141 强毒株进行攻毒。

### 1.4 ELISA 抗体分析

每次免疫后第 10 天断尾取血分离血清,通过间接 ELISA 测定血清中抗 F1-V 抗体效价 [4]。F1-V 重组蛋白用包被液稀释后包被酶联板,免疫后血清作为一抗,以 HRP 标记的二抗 IgG, IgG1, IgG2a 鉴定结合的抗体。酶标仪 450 nm 波长处测  $A_{450\text{ nm}}$  值。阳性的判定标准为实验孔 A 值与阴性对照 A 值的比值大于、等于 2.1。

### 1.5 T 淋巴细胞的亚型分析

按文献 [17] 所述采集小鼠脾淋巴细胞,置于含有 5% 胎牛血清的完全 RPMI-1640 培养基中培养。过滤后,离心去除上清。加入 5 mL 1640 培养基悬浮并洗涤细胞 2 次,并最终使细胞浓度达到  $10^5$  个/mL。悬浮的脾细胞加入 FITC-CD3+, PE-CD4+ 和 PerCP-CD8+ 双染荧光抗体,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 40 min, PBS 洗 2 次,1% 多聚甲醛中固定,流式细胞仪测定,Cellquest 软件分析。

### 1.6 鼠疫耶尔森氏菌 141 强毒株攻毒

免疫后的小鼠 2 周内以鼠疫耶尔森氏菌 141 强毒株进行皮下攻毒,攻毒剂量为 25~600 LD<sub>50</sub>。记录小鼠死亡时间。

### 1.7 统计学分析

采用 Fisher 检验和 Student's *t* 检验分析实验组和对照组相应数据的统计学意义。如果分析结果为  $P < 0.05$ ,那么结果将被认为具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 F1-V 融合蛋白的纯化、鉴定和性质

超声裂解菌体,SDS-PAGE 发现外源表达蛋白占细菌原液总蛋白的 20% 以上(图 1(a))。外源表达蛋白进行 Western blot 鉴定,鉴定结果见图 1(b)。纯化后,蛋白纯度可达 99%。用 MALDI-TOF-MS 测定得到蛋白质的分子量为 53034 Da,如图 2,是理论分子量 53061 Da 去掉蛋氨酸的蛋白质产物。Edman 测序测得的 N 端序列为 ADLTASTTATATL,表明蛋白质 N 端蛋氨酸缺失。2-D 电泳分析得知等电点为 5.2。纯化过程中发现,层析过程可以有效去除内毒素和 DNA 成

分. 纯化的蛋白质对 pH 和温度敏感. 在室温、4℃或低 pH 条件下, 纯化蛋白质容易发生沉淀. 因为蛋白质容易变性, 因此不允许频繁的冻溶. 纯化的蛋白抗原在弱碱环境下存放于-70℃, 或者冻干保存在 4℃或更低的温度.

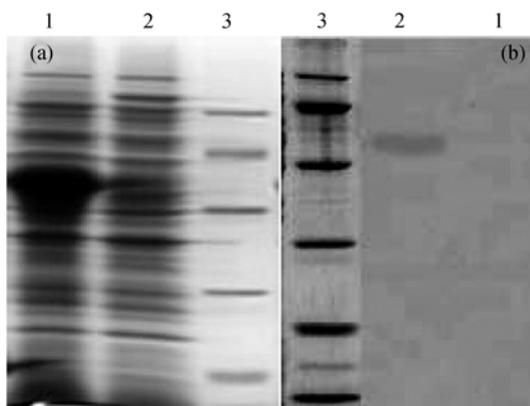


图 1 细菌表达原液的 SDS-PAGE 及 Western blot 分析 (a) SDS-PAGE 分析. 以 1 mg/mL IPTG 诱导 5 h 后, 大小为 50~60 kD 的外源表达蛋白占细菌总蛋白的 20%以上. (b) Western blot 分析表明此表达的外源蛋白即为预期的 F1-V 融合蛋白(1 为表达外源蛋白的细菌原液; 2 为阴性对照; 3 为低分子量蛋白质 marker)

## 2.2 血清总 IgG 抗体分析

间接 ELISA 测定不同剂量 F1-V 重组融合蛋白免疫的小鼠血清, 比较每次免疫后 450 nm 波长处测得的  $A_{450\text{nm}}$  值. 按照上面所述的方法测定血清的抗体效

价, 如图 3 所示. 图 3(a)说明在所有测试的 F1-V 浓度中, 50  $\mu\text{g}$  剂量诱导的抗体效价要高于其他 2 个剂量, 说明高浓度剂量的蛋白抗原可以刺激产生更高的抗原特异性 IgG 抗体. 在 50  $\mu\text{g}$  剂量组中, 最高可产生的 F1-V 特异性抗体效价为 102400, 而 20 和 10  $\mu\text{g}$  剂量组只有 51200.

以 50  $\mu\text{g}$  剂量组为例, IgG 抗体的亚型分析(图 3(b))表明, 免疫小鼠的 IgG1 和 IgG2a 的比值平均值为 5.0, IgG1 的数量显著性高于 IgG2a ( $P < 0.01$ ). 在其他 2 个剂量组也得到了类似的结果. 这说明抗体反应趋向 Th2 型反应, 重组抗原诱导的免疫应答以体液免疫为主 [18].

## 2.3 流式细胞分析

采用细胞表面不同抗原分子荧光标记抗体, 对不同免疫组小鼠脾细胞的淋巴细胞亚群进行染色分析. 在 50  $\mu\text{g}$  剂量组, CD4+ 的均值为  $(74.79 \pm 1.46)\%$ , CD8+ 为  $(21.61 \pm 1.25)\%$ , CD4+/CD8+ 为  $3.74 \pm 0.25$ ; 而对照组 (注射氢氧化铝) 则分别为  $(62.83 \pm 0.37)\%$ ,  $(33.53 \pm 1.26)\%$  和  $(1.87 \pm 0.18)$  (表 1). 统计学分析表明, 实验组的 CD4+/CD8+ 比值与对照组相比有显著性差异, 这说明脾细胞的 T 淋巴细胞主要为 CD4+ 细胞, 从而主要在小鼠体内引发体液免疫应答. 在 20 和 10  $\mu\text{g}$  剂量组有类似的数据.

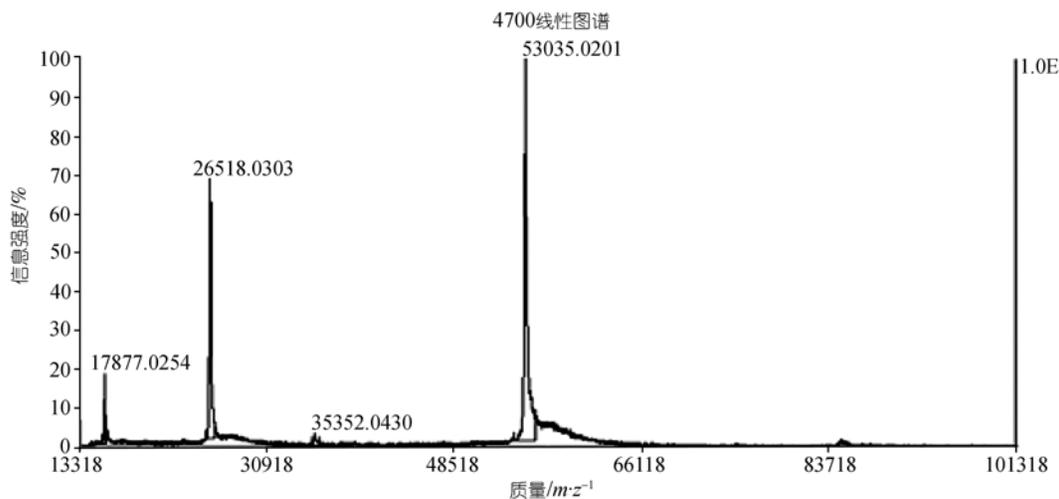


图 2 纯化蛋白的质谱分析: MALDI-TOF 分子量测定的质谱图

实测分子量为 53034 Da, 是理论分子量 53061 Da 去掉蛋氨酸的蛋白产物. 另外, Edman 测序测得的 N 端序列为 ADLTASTTATATL, 表明蛋白 N 端蛋氨酸缺失

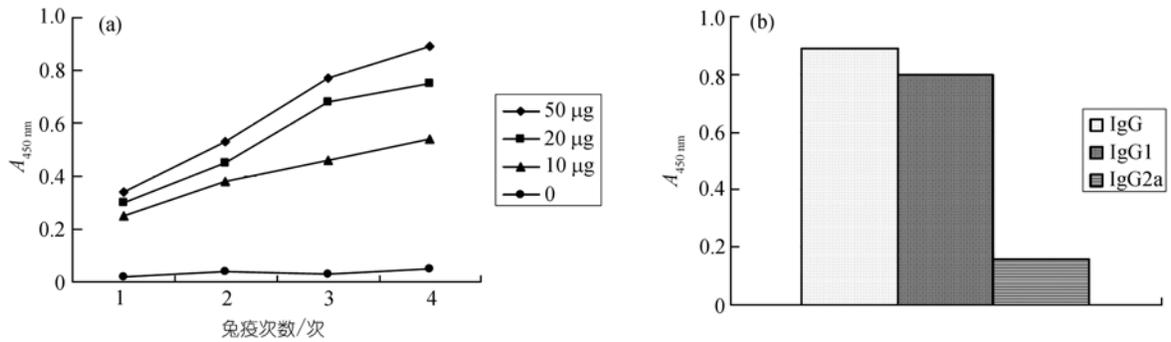


图 3 血清抗体分析

(a) 不同剂量的抗原引发不同的血清抗体水平. 50  $\mu g$  剂量组小鼠体内可产生高达 102400 的 IgG 抗体效价, 而 20  $\mu g$  剂量组小鼠血清平均 IgG 抗体效价为 51200. (b) 50  $\mu g$  剂量组小鼠血清 IgG 亚型分析. 血清样本来自最后一次免疫后取血. IgG1 效价平均为 50000, 而 IgG2a 则为只有 6000

表 1 50  $\mu g$  剂量组的小鼠脾细胞 T 淋巴细胞流式细胞分析

组别	CD4+/%	CD8+/%	CD4+/CD8+
F1-V/氢氧化铝	74.79±1.46	21.61±1.25	3.74±0.25*
氢氧化铝	62.83±0.37	33.53±1.26	1.87±0.18

\*  $P < 0.01$

### 2.4 攻毒存活率

实验组和对照组小鼠在末次免疫 2 周后用鼠疫耶尔森氏菌 141 强毒株进行皮下攻毒实验, 观察 60 天以上, 记录小鼠存活情况, 并计算平均死亡时间 (MTD). 从图 4 来看, 50  $\mu g$  剂量组的小鼠相对其他 2 个剂量组的小鼠对鼠疫强毒株的皮下攻毒有更好的保护性. 20  $\mu g$  的剂量足以使小鼠对 400  $LD_{50}$  的鼠疫耶尔森氏菌 141 强毒株产生完全的保护, 这表明, 结合经济性和有效性, 20  $\mu g$  剂量是最合适的. 10  $\mu g$  的剂量只能对 100  $LD_{50}$  的鼠疫耶尔森氏菌 141 强毒株产生 100% 的保护, 当攻毒剂量升高时, 这个剂量产

生的保护率急剧下降, 然而, 与对照组相比, 皮下攻毒后的平均死亡时间被显著的延迟. 比如, 在 200  $LD_{50}$  的攻毒剂量下, 10  $\mu g$  剂量的小鼠平均死亡时间为(13.6±0.4)天, 而 PBS 对照组则为(3.6±0.6)天.

### 3 讨论

小鼠血清抗体效价在第一次加强免疫后增长迅速. 抗体亚型分析表明, 小鼠产生的抗体主要是 IgG1 而不是 IgG2a, 因此疫苗组主要诱导 Th2 型免疫反应. 文献 [19] 表明, 氢氧化铝作为佐剂可以帮助抗原诱导产生 Th2 型的免疫应答, 而由于鼠疫耶尔森氏菌以胞外感染为主, 从而有助于对鼠疫的攻毒产生保护.

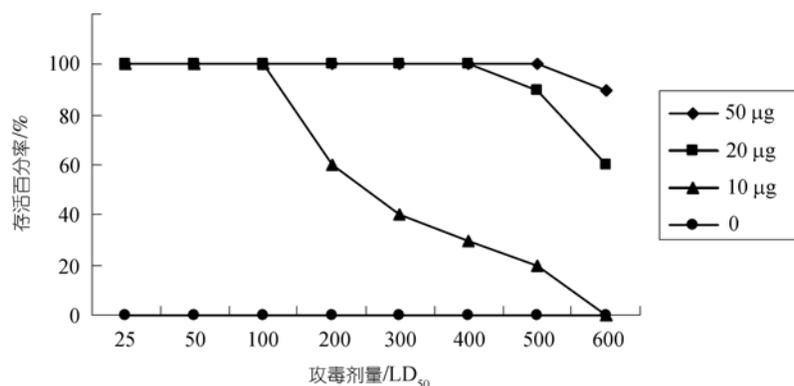


图 4 免疫小鼠攻毒实验结果

实验组和对照组的小鼠进行鼠疫耶尔森氏菌 141 强毒株皮下攻毒实验, 观察 60 天以上, 记录小鼠死亡时间

流式细胞分析表明, 氢氧化铝佐剂辅助抗原诱导了更加强烈的体液免疫而不是 CTL 细胞免疫应答. 这对鼠疫耶尔森氏菌感染的小鼠可能会产生积极作用——高效价的抗体最终会清除细菌的侵袭.

为了排除身体因素对攻毒结果产生的负面影响——比如可能会增加死亡率, 因此在每次免疫时记录小鼠的身体状况. 若小鼠体重偏离小鼠正常生长曲线, 那么这个数据应该被屏弃. 之所以采用鼠疫耶尔森氏菌 141 强毒株, 是因为这株强毒株是评价中国正在使用的 EV76 减毒活疫苗的标准毒株. 根据中国生物制品规程, EV76 减毒活疫苗有效性的标准是豚鼠应该对 200 LD<sub>50</sub> 的鼠疫耶尔森氏菌产生至少 80% 的保护率 [20]. 在我们的研究中, 20 μg 的重组亚单位抗原可以在小鼠模型中对 400 LD<sub>50</sub> 的鼠疫耶尔森氏菌 141 强毒株产生 100% 的保护性.

血清抗体的水平跟攻毒后小鼠的存活率密切相关. 血清 IgG 效价越高, 产生的保护性越好. 一般来说, 51200 的抗体效价可以对 200 LD<sub>50</sub> 的攻毒产生完全的保护. 如果效价低于 50000, 将很难提供完全的保护.

总之, 研究证明重组亚单位疫苗可以引发保护性免疫应答. 同时也证明了 F1-V 重组亚单位疫苗候选株可以很好的保护 BALB/C 小鼠对大剂量的鼠疫耶尔森氏菌强毒株的皮下攻毒, 下一步我们将考察此疫苗候选株在豚鼠和灵长类动物中的保护性; 还可能要建立气溶胶攻毒模型. 通过对 BALB/C 小鼠免疫应答和保护效率的研究将会给未来实验提供良好的基础.

## 参 考 文 献

- Meyer K F. Effectiveness of live or killed plague vaccines in man. Bull WHO, 1970, 42(5): 653—666
- Williams J E, Altieri P L, Berman S, et al. Potency of killed plague vaccines prepared from avirulent *Yersinia pestis*. Bull WHO, 1980, 58(5): 753—756
- Russell P, Eley S M, Hibbs S E, et al. A comparison of plague vaccine, USP and EV76 vaccine induced protection against *Yersinia pestis* in a murine model. Vaccine, 1995, 13(16): 1551—1556 [DOI]
- Williamson E D, Eley S M, Stagg A J, et al. A sub-unit vaccine elicits IgG in serum, spleen cell cultures and bronchial washings and protects immunised animals against pneumonic plague. Vaccine, 1997, 15(10): 1079—1084 [DOI]
- Williamson E D, Vesey P M, Gilhespy K J, et al. An IgG1 titre to the F1 and V antigens correlates with protection against plague in the mouse model. Clin Exp Immunol, 1999, 116(1): 107—114 [DOI]
- Williamson E D, Eley S M, Griffin K F, et al. A new improved sub-unit vaccine for plague: the basis of protection. FEMS Immunol Med Microbiology, 1995, 12(3~4): 223—230 [DOI]
- Leary S E C, Williamson E D, Griffin K F, et al. Active immunization with recombinant V antigen from *Yersinia pestis* protects mice against plague. Infect Immun, 1995, 63: 2854—2858
- Titball R W, Williamson E D. Vaccination against bubonic and pneumonic plague. Vaccine, 2001, 19(30): 4175—4184 [DOI]
- Perry R D, Fetherston J D. *Yersinia pestis*—etiologic agent of plague. Clin Microbiol Rev, 1997, 10: 35—66
- Andrews G P, Heath D G, Anderson G W Jr, et al. Fraction I capsular antigen (F1) purification from *Yersinia pestis* CO92 and an *Escherichia coli* recombinant strain and efficacy against lethal plague challenge. Infect Immun, 1996, 64(6): 2180—3187.
- Heath D G, Anderson G W J, Mauro J M, et al. Protection against experimental bubonic and pneumonic plague by a recombinant capsular F1-V antigen fusion protein vaccine. Vaccine, 1998, 16(11~12): 1131—1137 [DOI]
- Williamson E D, Sharp G J E, Eley S M, et al. Local and systemic immune response to a microencapsulated subunit vaccine for plague. Vaccine, 1996, 14: 1613—1619 [DOI]
- Anderson G W Jr, Leary S E C, Williamson E D, et al. Recombinant V antigen protects mice against pneumonic and bubonic plague caused by F1 capsule positive and negative strains of *Y. pestis*. Infect Immun, 1996, 64(11): 4580—4585
- Powell B S, Andrews G P, Enama J T, et al. Design and testing for a nontagged F1-V fusion protein as vaccine antigen against bubonic and pneumonic plague. Biotechnol Prog, 2005, 21(5): 1490—1510 [DOI]
- Williamson E D, Flick-Smith H C, LeButt C, et al. Human immune response to a plague vaccine comprising recombinant F1 and V antigens. Infect Immun, 2005, 73(6): 3598—3608 [DOI]
- Wang D, Huang S J, Xing L, et al. Purification and immuno-protection in BALB/c mice of recombinant F1-V fusion protein of *Yersinia pestis*. Prog Biochem Biophys, 2006, 33(3): 287—291
- Shu C L, Gao J Y, Peng H, et al. The immune reaction in mucosal and systemic immune system was induced after in2 tranasal immunization with bivalent Shigella vaccines. Chin J Immun, 2001, 17(10): 521—524
- Pulendran B, Smith J L, Caspary G, et al. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(3): 1036—1041 [DOI]
- Jones S M, Day F, Stagg A J, et al. Protection conferred by a fully recombinant sub-unit vaccine against *Yersinia pestis* in male and female mice of four inbred strains. Vaccine, 2000, 19(2~3): 358—366 [DOI]
- Chinese Pharmacopocia Commission of Biological Products Standardization. Regulations of manufacture and check of plague vaccine (live) for percutaneous scarification. Beijing: Chemical Industry Press, 2005. 40—42