

DOI:10.13350/j.cjpb.240402

• 论著 •

基孔肯雅病毒(CHIKV)重组痘苗病毒候选疫苗小鼠免疫研究*

张金鑫^{1,2}, 肖妍^{1,3}, 李菁菁¹, 韩晶¹, 金宁一³, 李霄^{2,3**}, 韩继成^{1**}

(1. 长春中医药大学科研处院士工作室, 吉林长春 130122; 2. 长春理工大学生命科学技术学院; 3. 中国农业科学院长春兽医研究所)

【摘要】 目的 基孔肯雅病毒(Chikungunya virus, CHIKV)是甲病毒属的正股 RNA 病毒, 主要由埃及伊蚊和白纹伊蚊传播, 广泛流行于亚洲和非洲的部分地区, 每年给全球造成严重的经济损失。本研究基于重组痘苗表达系统构建了 CHIKV 重组痘苗候选疫苗, 进行小鼠免疫评价, 为 CHIKV 疫苗的研发提供理论基础。方法 将 CHIKV 重组痘苗候选疫苗进行小鼠免疫评价, 在首次免疫 35 d 后, 收集血清用于特异性抗体检测以及细胞因子检测, 分离小鼠脾脏淋巴细胞用于 T 细胞亚类分型分析, 并在 35 d 时进行攻毒保护实验。结果 免疫 CHIKV 重组痘苗候选疫苗小鼠特异性抗体显著升高, 且细胞因子 IL-4 ($P < 0.05$) 和 IFN- γ ($P < 0.05$) 的表达量显著高于对照组。CD3⁺CD4⁺T ($P < 0.05$) 和 CD3⁺CD8⁺T ($P < 0.05$) 细胞比例显著高于对照组。攻毒保护实验结果显示, 免疫疫苗组体重高于对照组。结论 本研究中的 CHIKV 重组痘苗病毒候选疫苗可以诱导机体产生良好的细胞免疫和体液免疫应答反应, 本研究结果可为 CHIKV 疫苗的研发提供参考。

【关键词】 基孔肯雅病毒; 重组痘苗病毒; 细胞免疫; 体液免疫

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2024)04-0378-04

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Apr.; 19(4): 378-381.]

Study of immunization in mouse with the CHIKV recombinant vaccinia virus

ZHANG Jinxin^{1,2}, XIAO Yan^{1,3}, LI Jingjing¹, HAN Jing¹, JIN Ningyi³, LI Xiaoxiao^{2,3}, HAN Jicheng¹ (1. Academician Workstation, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 133122, China; 2. College of Life Science and Technology, Changchun University of Science and Technology; 3. Changchun Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences)

【Abstract】 **Objective** Chikungunya virus (CHIKV) is a positive stranded RNA virus of the Alphavirus, mainly transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes, which is widely endemic in parts of Asia and Africa, causing serious economic losses worldwide every year. In this study, we constructed a CHIKV recombinant vaccinia virus based on the recombinant vaccinia virus expression system, and performed mouse immunization evaluation to provide a theoretical basis for the development of a CHIKV vaccine. **Methods** CHIKV recombinant vaccinia virus was evaluated for immunization of mouse. Serum was collected for specific antibody assay as well as cytokine assay, and mouse splenic lymphocytes were isolated for T-cell subclass typing analysis at 35 d after the first immunization, and challenge assay was performed at 35 d. The vaccine was used as an antidepressant in the immunization of mouse. **Results** Mouse immunized with CHIKV recombinant vaccinia virus had significantly higher specific antibodies and significantly higher expression of cytokines IL-4 ($P < 0.05$) and IFN- γ ($P < 0.05$) than the control group. The percentages of CD3⁺CD4⁺T ($P < 0.05$) and CD3⁺CD8⁺T ($P < 0.05$) cells was significantly higher than the control group. The weight of the immunized vaccine group was higher than that of the control group after challenge. **Conclusion** The CHIKV recombinantvaccinia virus in this study induced good cellular and humoral immune response, and the results of this study may provide a reference for the development of CHIKV vaccine.

【Key words】 Chikungunya virus; recombinant vaccinia virus; cellular immune; humoral immune

***基孔肯雅病毒(Chikungunya virus, CHIKV), 属于披膜病毒科甲病毒属, 病毒直径约 60~70 nm, 基因组为单股正链 RNA。CHIKV 感染可能有不同的临床表现, 基孔肯雅病毒感染的急性期伴有各种症状, 表现为高热、多关节炎和斑丘疹。慢性期表现为关节炎, 并出现风湿症状^[1]。大多数情况下, CHIKV 的潜伏期

* **【基金项目】** 吉林省青年科技人才托举工程项目 (No. QT202228)。

** **【通讯作者】** 韩继成, E-mail: 373108406@qq.com
李霄, E-mail: Skylee6226@163.com

【作者简介】 张金鑫 (1999-), 男, 吉林长春人, 硕士研究生, 主要研究方向为生物医学研究。E-mail: 2690697115@qq.com

通常为 2~7 d^[2]。基孔肯雅病(Chikungunya virus, CHIK)的病原体于 1952-1953 年首次在东非(坦桑尼亚马孔德高原)的一次流行病中被分离出来^[3-4]。1960 年至 1990 年间,CHIK 在非洲和亚洲零星爆发,2000 年后再次频繁出现并蔓延至其他国家^[5]。2014 年,CHIKV 在巴西引发了大规模流行,主要影响东北部地区^[6]。2015 年美洲报告了约 693 489 例疑似病例和 37 480 例确诊病例^[7-8]。现有报道指出 2022 年 1 月至 11 月 23 日,共报告了 362 021 例病例和 77 例死亡病例,其中大多数病例报告发生在巴西(247 537 例)^[5]。CHIKV 的感染每年给全球公共卫生安全带来了巨大的经济损失,但目前仍然没有商品化的疫苗用于预防 CHIKV 感染。因此,针对 CHIKV 的防治应该引起广泛关注。

痘苗病毒(Vaccinia virus, VACV)属于痘病毒科(Poxviridae)双链 DNA 病毒。本研究中的天坛株痘苗病毒是一个很有潜力的病毒,可以表达重组抗原或者作为病毒疫苗载体,目前已广泛用于新型冠状病毒(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)^[9]、猪繁殖和呼吸障碍综合症(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus, PRRSV)^[10]、猪圆环病毒 2 型(Porcine circovirus type 2, PCV2)^[11]等候选疫苗的研究。

本研究将表达 CHIKV 的 E1 基因的重组痘苗病毒候选疫苗进行小鼠免疫评价,分别通过细胞免疫指标、体液免疫指标、以及攻毒保护等检测评价 CHIKV 重组痘苗病毒候选疫苗的免疫效果。本研究的结果将为 CHIKV 的疫苗研发工作提供理论基础。

材料与方法

1 材料

1.1 病毒和细胞来源 基孔肯雅重组痘苗病毒由本实验室构建保存;基孔肯雅病毒由本实验室构保存;BHK 细胞,系叙利亚幼地鼠肾细胞,购自北纳生物。

1.2 主要试剂 DMEM 培养基及胎牛血清 购于美国 Hyclone 公司;白细胞介素 2(Interleukin-2, IL-2)、白细胞介素 4(Interleukin-4, IL-4)和 γ -干扰素(Interferon- γ , IFN- γ)等 ELISA 检测试剂盒购自于上海科顺生物有限公司;CD3、CD4、CD8 等流式细胞抗体购自于美国 Biolegend 公司;TMB 显色液及显色终止液购自于碧云天生物有限公司。

2 方法

2.1 CHIKV 重组痘苗病毒 鉴定将 BHK 细胞均匀的铺到 12 孔板中,培养 8-12 h 后加入 CHIKV 重组痘苗病毒在培养 24 h。培养结束后收集细胞,分别进行荧光显微镜观察,蛋白质免疫印迹(Western blot,

WB),以及聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)检测。

WB 检测方法如下,收集细胞进行蛋白样品制备,以 12%的 SDS-PAGE 分离胶进行实验,跑胶结束后,将分离胶蛋白转移至 0.45 μ m 的 NC 膜,加入封闭液室温封闭 20~30 min。封闭后加入 1:500 倍稀释的 CHIKV-E1 蛋白一抗 4 $^{\circ}$ C 条件下孵育过夜,再使用 1:5 000 倍稀释的 HRP 标记的二抗室温孵育 40 min 进行曝光显影。

PCR 检测方法如下,收集细胞提取总 DNA 后作为 PCR 模板,以 CHIKV 的 E1 基因作为引物设计 PCR 体系:模板 DNA 2 μ L,上游引物(10 μ mol/L)0.5 μ L,下游引物(10 μ mol/L)0.5 μ L,2 \times PCR Master Mix 10 μ L,ddH₂O 7 μ L,总量 20 μ L。

检测引物:CHIKV-E1-F:5'-ATGTACGAACAC GTAACAG-3';CHIKV-E1-R:5'-TTAGTGCCTACT GAACGAC-3'。PCR 扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

2.2 小鼠免疫计划 将 BALB/c 小鼠随机分为 3 组(每组 8 只),分别设置 CHIKV 重组痘苗病毒免疫组(rVACV-E1-EGFP,10⁷ TCID₅₀/mL,100 μ L),痘苗病毒对照组(rVACV-EGFP,10⁷ TCID₅₀/mL,100 μ L),以及 PBS 免疫组(PBS,100 μ L)。各实验组通过肌肉注射进行免疫,首次免疫后 14 d 进行加强免疫,首次免疫后 35 d,各实验组进行攻毒保护实验。

2.3 特异性抗体检测 小鼠免疫后,每周尾静脉取血分离血清。将 CHIKV 的 E1 蛋白加入到 ELISA 检测板中 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBST 清洗 3 次后,加入 5%脱脂乳 37 $^{\circ}$ C 避光封闭 2 h,封闭结束后 PBST 清洗 3 次后。将每周分离获得的小鼠血清 1:32 倍稀释后加入到 ELISA 板中孵育 2 h,用 PBST 清洗三次。加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗室温避光孵育 1.5 h 后,加入 TMB 显色液室温孵育 15 min。孵育结束后,加入 TMB 终止液,并于 450 nm 处读取吸光度 A 值。

2.4 细胞因子检测 小鼠首次免疫后 35 d,尾静脉采血分离小鼠血清。按照 IL-2、IL-4、以及 IFN- γ 等 ELISA 检测试剂说明书要求进行检测分析小鼠血清中细胞因子的含量。

2.5 T 细胞亚类分析 小鼠首次免疫后 35 d,安乐处死小鼠后,通过小鼠脾脏淋巴细胞分离试剂盒分离获得小鼠淋巴细胞。将获得的小鼠脾脏淋巴细胞浓度调整为 10⁶ cells/样,再加入 CD3、CD4、CD8 流式抗体置于 4 $^{\circ}$ C 条件下避光孵育 40 min。孵育结束后,利用含有 5%胎牛血清的 PBS 清洗 3 次,上机检测分析 CD3⁺CD4⁺T 和 CD3⁺CD8⁺T 细胞的比例。

结果

1 CHIKV 重组痘苗病毒鉴定

将 BHK 细胞感染 CHIKV 重组痘苗病毒 48 h 后, 荧光显微镜观察结果显示, CHIKV 重组痘苗病毒可以感染 BHK 细胞进行增殖, 感染的 BHK 细胞显示增强绿色荧光蛋白 (Enhanced Green Fluorescent Protein, EGFP) 的绿色荧光 (图 1A)。WB 检测结果显示, 感染 CHIKV 重组痘苗病毒组的细胞成功表达 CHIKV 的 E1 蛋白 (图 1B)。PCR 鉴定结果显示, 成功获得大小为 1 323 bp 的 E1 基因目的条带 (图 1C)。

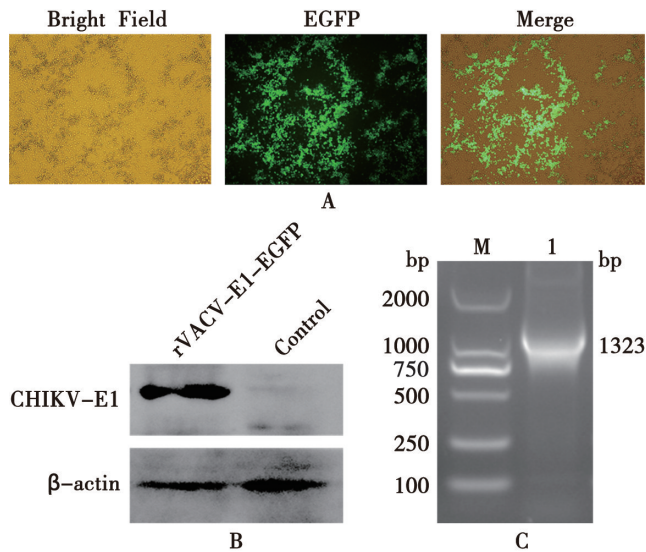


图 1 CHIKV 重组痘苗病毒鉴定结果
A 荧光显微镜观察结果 B Western blot 鉴定结果 C PCR 鉴定结果

图 1 CHIKV 重组痘苗病毒鉴定结果

A Fluorescence microscopy results B Western blot identification results C PCR identification results

Fig. 1 Identification of CHIKV recombinant vaccinia virus results

2 CHIKV 重组痘苗病毒免疫小鼠血清特异性抗体检测

特异性抗体检测结果显示, CHIKV 重组痘苗病毒免疫后, 特异性抗体持续升高。首次免疫 7 d 后, CHIKV 重组痘苗病毒免疫组特异性抗体显著高于 PBS 组 ($P < 0.05$)。免疫后 14 d 起, CHIKV 重组痘苗病毒组的特异性抗体显著高于重组痘苗病毒组 ($P < 0.01$) 和 PBS 组 ($P < 0.01$) (图 2)。

3 CHIKV 重组痘苗病毒免疫小鼠血清细胞因子分析

各实验组首次免疫 35 d 时, 随机选取 3 只小鼠分离血清, 进行 IL-2、IL-4、以及 IFN- γ 细胞因子的检测。IL-2 细胞因子检测结果显示 (图 3A), CHIKV 重组痘苗病毒免疫组的 IL-2 细胞因子高于重组痘苗病毒组和 PBS 组, 但差异不显著。IL-4 细胞因子检测结果显示 (图 3B), CHIKV 重组痘苗病毒免疫组的 IL-4 细胞因子显著高于重组痘苗病毒组 ($P < 0.05$)。IFN- γ 细胞因子检测结果显示 (图 3C), CHIKV 重组痘苗病毒

免疫组的 IFN- γ 细胞因子显著高于重组痘苗病毒组 ($P < 0.05$) 和 PBS 组 ($P < 0.05$)。

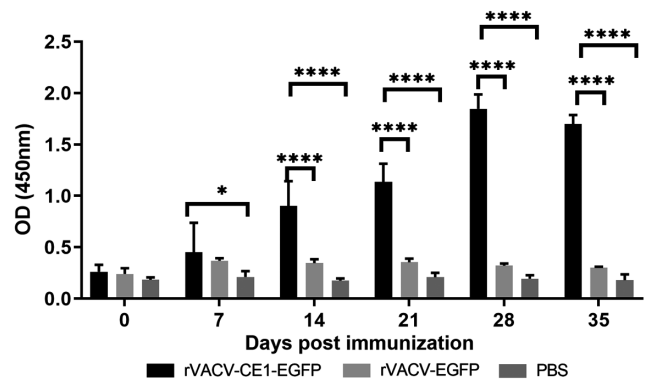


图 2 CHIKV 重组痘苗病毒免疫小鼠血清特异性抗体检测

Fig. 2 Detection of specific antibodies in mouse immunized with recombinant CHIKV vaccinia virus

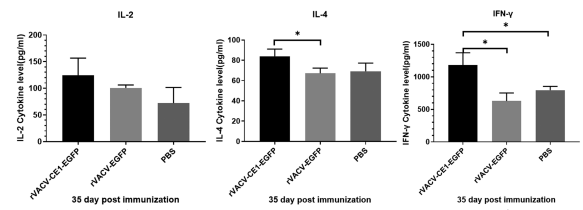


图 3 CHIKV 重组痘苗病毒免疫小鼠血清细胞因子检测
A IL-2 细胞因子检测 B IL-4 细胞因子检测 C IFN- γ 细胞因子检测

图 3 CHIKV 重组痘苗病毒免疫小鼠血清细胞因子检测

A IL-2 cytokine assay B IL-4 cytokine assay C IFN- γ cytokine assay

Fig. 3 Assay of serum cytokines in mouse immunized with recombinant CHIKV vaccinia virus

4 CHIKV 重组痘苗病毒免疫小鼠脾脏 T 细胞亚类分析

各实验组首次免疫 35 d 时, 随机选取 3 只小鼠分离脾脏淋巴细胞通过流式检测技术分析 T 细胞亚类情况。T 细胞亚类分析检测结果显示, 免疫 CHIKV 重组痘苗病毒免疫组和重组痘苗病毒免疫组的 CD3⁺CD4⁺T 细胞和 CD3⁺CD8⁺T 细胞比例均升高, 高于 PBS 组。但免疫 CHIKV 重组痘苗病毒免疫组的 CD3⁺CD4⁺T 细胞 ($P < 0.05$, 图 4A) 和 CD3⁺CD8⁺T 细胞 ($P < 0.05$, 图 4B) 比例显著高于 PBS 组。

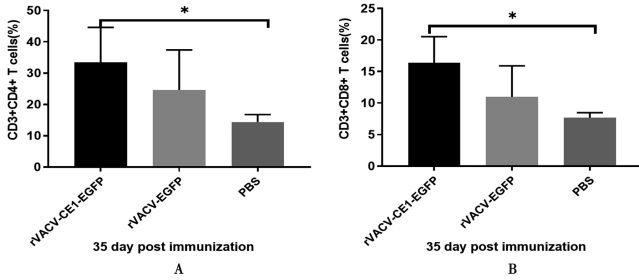
5 CHIKV 重组痘苗病毒免疫小鼠的攻毒保护评价

小鼠生存率观察结果显示, CHIKV 重组痘苗病毒免疫组小鼠体重趋于稳定, 活动能力良好。而重组痘苗病毒组和 PBS 组的小鼠, 体重出现下降, 同时伴有活动能力下降 (图 5)。

讨论

基孔肯雅病毒 (CHIKV) 是一种通过蚊子传播的病毒, 最近在全球多个地区再次出现, 并导致大规模疫情爆发。在最近的疫情中, 基孔肯雅热的非典型表现

包括严重的关节痛和神经系统并发症,如脑炎、脑膜炎和格林-巴利综合征^[12]。病毒进化、气候变化等多种因素可能导致了 CHIKV 的传播。目前,CHIKV 的主要挑战之一是缺乏有效的预防疫苗和经批准的抗病毒治疗方法。因此针对 CHIKV 的防治工作应引起广泛关注。



A CD3⁺CD4⁺ T 细胞检测结果 B CD3⁺CD8⁺ T 细胞检测结果

图 4 CHIKV 重组痘苗病毒免疫小鼠脾脏 T 细胞亚类检测

A CD3⁺CD4⁺ T cell assay results B CD3⁺CD8⁺ T cell assay results

Fig. 4 Detection of splenic T cell subclasses in mouse immunized with recombinant CHIKV vaccinia virus

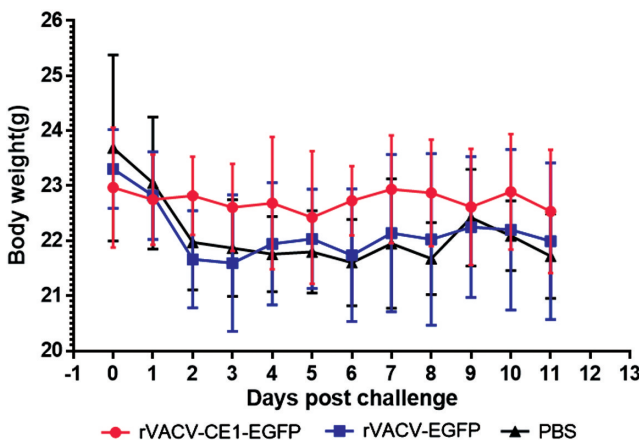


图 5 CHIKV 重组痘苗病毒免疫不同时间小鼠体重变化

Fig. 5 Changes in body weights of mouse immunized with recombinant CHIKV vaccinia virus in different times

本研究基于重组痘苗病毒表达系统构建了 CHIKV 的 E1 基因的重组痘苗病毒疫苗,并通过 WB、PCR 等检测手段证明重组痘苗病毒可以成功表达外源蛋白(图 1)。之前的研究指出 CHIKV 的 E1 蛋白于病毒的凝血活性有着密切的关系,且 E1 蛋白中含有中和抗体表位和 T 细胞抗原表位^[13]。此外,CHIKV 的 E1 蛋白具有良好的保守性^[14],E1 蛋白中的中和表位可以更好的诱导机体产生中和抗体进行抗病毒作用^[15]。本研究将 CHIKV 重组痘苗病毒候选疫苗小鼠后,可以有效诱导小鼠机体产生特异性抗体和 IL-4 细胞因子的分泌,表明 CHIKV 重组痘苗病毒可以有效诱导机体产生体液免疫应答。此外,CHIKV 重组痘苗病毒免疫组的小鼠的 IFN- γ 细胞因子的表达,以及 CD3⁺CD4⁺T 细胞和 CD3⁺CD48⁺T 细胞比

例升高,也表明 CHIKV 重组痘苗病毒可以有效诱导机体产生细胞免疫应答。

本研究中表达 CHIKV 的 E1 蛋白的重组痘苗病毒,可以有效的诱导小鼠机体产生细胞免疫和体液免疫应答反应,该候选疫苗可能是一种有效的抗 CHIKV 感染疫苗,本研究可为 CHIKV 的疫苗研发提供理论依据。

【参考文献】

- [1] Gasque P, Bandjee MC, Reyes MM, et al. Chikungunya pathogenesis: from the clinics to the bench[J]. J Infect Dis, 2016, 214 (5): S446-S448.
- [2] Weaver SC, Osorio JE, Livengood JA, et al. Chikungunya virus and prospects for a vaccine[J]. Expert Rev Vaccines, 2012, 11 (9): 1087-1101.
- [3] Naresh Kumar CV, Sai G DV. Reemergence of Chikungunya virus in Indian Subcontinent[J]. Indian J Virol, 2010, 21 (1): 8-17.
- [4] Chaaithanya IK, Muruganandam N, Surya Pet al. Association of oligoadenylate synthetase gene cluster and DC-SIGN (CD209) gene polymorphisms with clinical symptoms in chikungunya virus infection[J]. DNA Cell Biol, 2016, 35 (1): 44-50.
- [5] Gotay WJP, Rodrigues RO, Yaochite JNU. Influence of host genetic polymorphisms involved in immune response and their role in the development of Chikungunya disease: a review[J]. Braz J Med Biol Res, 2023, 56: e12557.
- [6] Weaver SC, Lecuit M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease[J]. N Engl J Med, 2015, 372 (13): 1231-1239.
- [7] Gimenez-richarte A, De Salazar MO, Arbona Cet al. Prevalence of chikungunya, dengue and Zika viruses in blood donors: a systematic literature review and meta-analysis [J]. Blood Transfus, 2022, 20 (4): 267-280.
- [8] Ferreira JM, Santos L, Oliveira SP et al. Chikungunya virus infection outcome: a systematic review of host genetics[J]. Immunol Invest, 2021, 50 (1): 58-79.
- [9] 丛佳南. SARS-CoV-2 重组痘苗病毒载体疫苗的构建、筛选和免疫原性研究[D]. 吉林大学 2021.
- [10] 韩继成,靖杰,肖朋朋,等. 欧洲型 PRRSV 重组痘苗病毒候选疫苗猪体免疫效果研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2015, 10(8): 673-676.
- [11] 韩继成,任静强,孙文超,等. 欧洲型 PRRSV/PCV2 二联重组痘苗病毒疫苗猪体免疫实验研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2014, 9(10): 869-872, 876.
- [12] Pereira MR, Franca RFO. Special issue "Chikungunya virus and emerging alphaviruses"[J]. Viruses, 2023, 15 (8): 1768.
- [13] Kumar P, Pok KY, Tan LK et al. Development and evaluation of baculovirus-expressed Chikungunya virus E1 envelope proteins for serodiagnosis of Chikungunya infection[J]. J Virol Methods, 2014, 206: 67-75.
- [14] Yap G, Pok KY, Lai YLet al. Evaluation of Chikungunya diagnostic assays: differences in sensitivity of serology assays in two independent outbreaks[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2010, 4 (7): e753.
- [15] Kam YW, Lum FM, Teo TH et al. Early neutralizing IgG response to Chikungunya virus in infected patients targets a dominant linear epitope on the E2 glycoprotein[J]. EMBO Mol Med, 2012, 4(4): 330-343.

【收稿日期】 2023-10-19 【修回日期】 2024-01-10