

· 医药生物技术 ·

B型流感病毒血凝素的表达及免疫原性测定

杨晨^{1,2}, 耿小宇^{1,2}, 原恺^{2,3}, 张娟琨¹, 校海霞²

1 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

3 山西高等创新研究院, 山西 太原 030032

杨晨, 耿小宇, 原恺, 张娟琨, 校海霞. B型流感病毒血凝素的表达及免疫原性测定. 生物工程学报, 2022, 38(3): 1112-1123.
YANG C, GENG XY, YUAN K, ZHANG JK, XIAO HX. Expression of influenza B virus hemagglutinin and its immunogenicity determination. Chin J Biotech, 2022, 38(3): 1112-1123.

摘要: B型流感病毒是引起季节性流感的原因之一, 严重时会造成重大疾病或死亡。为了检测B型流感病毒2个疫苗候选毒株的血凝素(hemagglutinin, HA)蛋白胞外段在哺乳动物细胞中的表达及在小鼠体内的免疫原性, 本研究将带有三聚体标签的HA胞外段(HA-ectodomain, HA-ecto)序列及神经氨酸酶(neuraminidase, NA)全长编码框经密码子优化后构建至pCAGGS载体中, 通过线性聚乙烯亚胺将pCAGGS-HA-ecto与pCAGGS-NA共转染293T细胞。收集转染后96 h的上清, 通过镍离子亲和层析及分子筛层析获得三聚体形式的HA-ecto蛋白, 然后将HA-ecto三聚体蛋白免疫小鼠, 进行酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)及血凝抑制实验(hemagglutination inhibition, HAI)检测HA-ecto蛋白诱导小鼠后产生的抗体水平。纯化结果显示, 通过哺乳动物细胞表达系统能够得到分泌型表达的三聚体HA-ecto蛋白。ELISA及HAI结果显示, 三聚体HA-ecto蛋白二次免疫小鼠后, 能诱导小鼠产生较高水平的同源和异源交叉抗体。以上结果表明, 哺乳动物细胞表达的B型流感病毒HA蛋白可作为亚单位重组流感疫苗的候选。

关键词: B型流感病毒; 血凝素蛋白; 哺乳动物细胞表达系统; 疫苗候选毒株

Received: March 11, 2021; Accepted: May 10, 2021

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2018YFC1200603)

Corresponding author: XIAO Haixia. Tel: +86-22-84861956; E-mail: xiao_hx@tib.cas.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFC1200603)

Expression of influenza B virus hemagglutinin and its immunogenicity determination

YANG Chen^{1,2}, GENG Xiaoyu^{1,2}, YUAN Kai^{2,3}, ZHANG Juankun¹, XIAO Haixia²

1 College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

2 Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

3 Shanxi Academy of Advanced Research and Innovation, Taiyuan 030032, Shanxi, China

Abstract: Influenza B virus is one of the causes for seasonal influenza, which can account for serious illness or even death in some cases. We tested the expression of extracellular domain of hemagglutinin (HA-ecto) of influenza B viruses in mammalian cells, and then determined the immunogenicity of HA-ecto in mice. The gene sequence encoding influenza B virus HA-ecto, foldon sequence, and HIS tag was optimized and inserted into pCAGGS vector. The opening reading frame (ORF) of neuraminidase was also cloned into pCAGGS. The pCAGGS-HA-ecto and pCAGGS-NA were co-transfected into 293T cells using linear polyethylenimine. Cell supernatant after transfection was collected after 96 h, and the secreted trimeric HA-ecto protein was purified by nickel ion affinity chromatography and size exclusion chromatography. Subsequently, the mice were immunized with HA-ecto protein, and the corresponding antibody titers were detected by ELISA and hemagglutination inhibition (HAI) assays. The results showed that soluble trimeric HA-ecto protein could be obtained using mammalian cell expression system. Moreover, trimeric HA-ecto protein, in combination with the adjuvant, induced high levels of ELISA and HAI antibodies against homogenous and heterologous antigens in mice. Thus, the soluble HA-ecto protein expressed in mammalian cells could be used as a recombinant subunit vaccine candidate for influenza B virus.

Keywords: influenza B virus; hemagglutinin; mammalian cell expression system; vaccine candidate

流感病毒是一种单股负链的 RNA 病毒,属于正粘病毒科 (Orthomyxoviridae)^[1]。根据其核蛋白 (Nucleoprotein, NP) 的抗原性分为 4 种病毒类型: A、B、C 和 D^[2-3]。其中, A 型和 B 型流感病毒是引起季节性流行的主要原因^[4-5]。据世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 统计^[4], 每年约有 5%–10% 的成年人以及 20%–30% 的儿童感染季节性流感病毒。季节性流感在全球范围内已造成 300 万–500 万例严重病例, 29 万–65 万例流感相关死亡病例。A 型流感病毒能够周期性地动物身上出现, 从

而导致大流行及相关疾病与死亡^[6-7]; B 型流感病毒的主要宿主是人类, 也在海豹、雪貂中发现^[8-9]。B 型流感病毒也能导致严重疾病甚至死亡^[10], 婴儿、孕妇、老年人和免疫系统受损的患者都是 B 型流感病毒的易感人群^[11]。

自 1980 年以来, 根据血凝素基因序列, B 型流感病毒可分为 Victoria 谱系和 Yamagata 谱系^[12-13]。两种谱系在世界范围内共同传播, 定期造成季节性流行, 致使出现了大量人员死亡, 加重了社会经济负担。在中国香港, 每名感染 B 型流感病毒儿童的平均住院费约 1 328.33 美元^[14]。

在 2014 年的关于美国流感季死亡率统计中,因感染 B 型流感病毒死亡的人数占季节性流感死亡总人数的平均值为 29%。有 4 个年份因 B 型流感病毒而死亡的人数占季节性流感死亡总人数比例较大,分别是 2000–2001 年占 95%、2002–2003 年占 78%、2006–2007 年占 51%和 2008–2009 年占 84%^[15]。目前,对于 B 型流感病毒的研究及报道远少于 A 型流感病毒,但是 B 型流感病毒流行不断呈上升趋势。据美国疾控中心统计,近年在美国主要流行 B 型流感病毒的 Victoria 谱系,在 2018–2019 年度间零星传播,在 2019–2020 年初期已更频繁地传播^[16]。

血凝素 (hemagglutinin, HA) 蛋白是流感病毒的主要保护性抗原,能够诱导机体产生中和抗体及保护性抗体,同时也是疫苗的主要组分。神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 是流感病毒表面的另一种重要的糖蛋白。NA 在病毒复制的晚期能够催化唾液酸受体水解,从而防止 HA 的过度聚集,促进新生病毒颗粒从宿主细胞表面释放^[17]。根据相关文献报道^[18], NA 在和 HA 共转染的状态下能够更好地模拟 HA 的形态帮助 HA 形成正确的折叠。因此,本研究将 NA 与 HA-ecto 共转染 293T 细胞,其目的是能够促进 HA-ecto 的表达,提高其产量。2020 年 9 月和 2021 年 2 月,WHO 推荐了南北半球季节性疫苗的组分, B/Victoria 谱系的 B/Washington/02/2019 候选毒株^[19], B/Yamagata 谱系的 B/California/12/2015 来自 WHO 的国际标准品供应中心实验室 (The National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC)^[20]。本研究采用哺乳动物细胞来表达纯化 HA-ecto 蛋白,能真实反映 HA 的糖基化修饰及其免疫原性。首先,我们通过哺乳动物细胞表达,镍离子亲和层析及分子筛纯化得到 Victoria 谱系 B/Washington/02/2019、Yamagata 谱系 B/California/

12/2015 的 HA 胞外段蛋白。其次,我们通过肌肉注射免疫小鼠,测定其产生血清的抗体水平。最后,通过测定血清是否存在跨种谱系的交叉反应活性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、病毒和质粒载体

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞购自康维世纪生物有限公司;人胚肾细胞 293T (human embryonic kidney, HEK-293T)、Victoria 谱系 B/Washington/02/2019 及 Yamagata 谱系 B/California/12/2015 的病毒样颗粒 (virus-like particle, VLP) 由本实验室保存;pCAGGS 载体由日本东京大学 Yoshihiro Kawaoka 教授实验室赠送;Victoria 谱系 B/Washington/02/2019 (BV-WA)、Yamagata 谱系 B/California/12/2015 (BY-CA) 的流感毒株由中国疾控中心王大燕研究员提供。

1.1.2 主要试剂

细胞培养基 DMEM、胎牛血清购自 Gibco 公司;转染试剂线性 PEI (分子量 40 000) 购于 Polysciences 公司;胰酶 (TRYPsin 1:250) 购于 Amresco 公司;HisTrapTM FF 5mL 预装柱、分子筛 Superdex 200 10/300GL 均购于 GE Healthcare 公司;彩色预染蛋白 Marker 购于柏奥易杰 (北京) 科技有限公司;anti-His 鼠单克隆抗体购自康维世纪生物有限公司;辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗鼠单克隆抗体购于碧云天生物技术有限公司;TMB 显色液购于 Solarbio 公司;5 周龄 SPF 级 BALB/c (雌鼠) 购自北京维通利华实验动物技术有限公司;佐剂 MINTANIDE ISA 61 VG 购自 SEPPIC 公司;1%豚鼠红细胞购自广州鸿泉生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 基因合成与克隆构建

将最新的疫苗候选毒株 BV-WA、BY-CA 的 HA-ecto (BVHA-WA-ecto、BYHA-CA-ecto) 的密码子序列优化后构建到 pCAGGS 载体中, 通过哺乳动物细胞表达系统进行表达。在每个编码基因的碱基序列 5'端 *EcoR* I 酶切位点序列 GAATTC 和起始密码子之间加入 KOZAK 序列 GCCACC, 在 3'端终止密码子后加上 *Xho* I 酶切位点 CTCGAG, 而后利用 *EcoR* I 和 *Xho* I 将目的基因构建到 pCAGGS 载体中。插入的目的基因片段组成: (1) BVHA-WA-ecto: BVHA-WA 的 HA 第 1-535 位氨基酸(胞外段为 16-535 位氨基酸)、thrombin 酶切识别序列为 LVPRGSPGS、折叠序列 GYIPEAPRDGQAYVR KDGEWVLLSTFL (维持 HA 三聚体形态^[21-22]) 和 HIS 标签序列 HHHHHH; (2) BYHA-CA-ecto: BYHA-CA 的 HA 第 1-537 位氨基酸(胞外段 16-537 位)、TEV 酶识别序列 ENLYFQSN, 折叠序列 GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL 和 HIS 标签 HHHHHH。基因合成、质粒构建和序列测定均由苏州金唯智生物科技有限公司完成。

1.2.2 质粒转染 HEK-293T 细胞

用加有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基传代培养 HEK-293T 细胞, 选取转染当天密度达到 80%-90%的细胞。以转染 1 盘 293T 细胞为例, 质粒部分: pCAGGS-HA-ecto 和 pCAGGS-NA-ORF 两种质粒质量比为 2:1, 总质量为 30 μg /盘, 用 1 mL 的 NaCl 缓冲液稀释。转染试剂 PEI 部分: 转染试剂 PEI 质量为 90 μg /盘, 同样用 1 mL 的 NaCl 缓冲液稀释, 各自静置 5 min 后, 将质粒稀释液与 PEI 稀释液混合均匀后室温放置 20 min, 然后将其加至 293T 细胞中, 十字摇匀将细胞放在细胞培养箱中培养。培养 5 h 后, 弃去原有的培养基上清, 用无菌的 PBS 轻轻洗

3 遍细胞, 最后用不含胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养。

1.2.3 HA-ecto 的表达、纯化及粒径分析

首先, 收取转染后 96 h 的细胞上清, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、9 000 r/min 离心 45 min, 弃去细胞沉淀。上清用 0.22 μm 微孔滤膜抽滤。其次, 将抽滤后的上清过夜吸附至 HisTrapTM FF 5 mL 预装柱后, 利用咪唑洗脱目的蛋白。最后, 将洗脱的目的蛋白浓缩后交换为分子筛缓冲液 PBS, 选择分子筛 Superdex 200 10/300 GL 进行纯化。SDS-PAGE 电泳制样时, 在上样缓冲液里添加还原剂二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT) 用于还原状态下电泳 (+DTT), 不添加 DTT 的作为非还原电泳 (-DTT)。将浓度为 2 mg/mL 的目的蛋白进行动态光散射 (dynamic light scattering, DLS) 分析, 确定蛋白的均一性。

1.2.4 动物试验

小鼠实验程序目前经中国科学院微生物研究所研究伦理委员会批准(SQIMCAS2020090)。选用 5 周龄 SPF 级别 BALB/c 雌性小鼠进行动物试验。将小鼠进行分组, 一共分成 3 组: 免疫 BVHA-WA-ecto 蛋白组、免疫 BYHA-CA-ecto 蛋白组、免疫 PBS 对照组, 每组 5 只小鼠。HA-ecto 蛋白用 PBS 进行稀释后, 按照体积比 4:6 加入灭菌处理的佐剂 MINTANIDE ISA 61 VG^[23]。对照组直接用 PBS 与佐剂按比例混合。用研磨器将混合液置于冰上彻底乳化。在第 1 天和第 15 天对小鼠腿部进行肌肉注射, 每只小鼠的 HA-ecto 免疫剂量是 20 μg , 共计免疫 2 次。每一次免疫后 2 周通过脸颊部位采血一次, 收集血清, 用于 ELISA 和 HAI 测定。

1.2.5 ELISA 抗体水平测定

根据文献[24], 为更好地显示血清中抗体的水平, 采用 ELISA 方法进行检测。首先, 将 BVHA-WA-ecto 或 BYHA-CA-ecto 蛋白按照 200 ng/孔分别包被到 96 孔板上, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。第

二天用5%脱脂奶粉封闭1 h,然后用PBST (PBS与0.05% Tween-20, pH 7.4) 进行洗板3次,每次5 min;其次,加入小鼠血清或 anti-His 鼠单克隆抗体、阴性对照血清。血清或抗体用 PBS 稀释的起始倍数为1:400,然后按2倍比梯度稀释。将稀释的血清或 anti-His 鼠单克隆抗体加入到包被抗原的96孔板中,100 μ L/孔;血清吸附1 h后,用PBST洗3次,每次5 min;再加入1:200倍稀释的HRP-山羊抗鼠单克隆抗体,100 μ L/孔,室温作用1 h,而后PBST洗板3次,每次5 min;接着,每孔加入50 μ L TMB显色液显色1 min,再加入50 μ L 2 mol/L H₂SO₄终止反应。最后,用酶标仪读取450 nm处吸光值,采用GraphPad Prism 7软件分析实验数据。

1.2.6 HAI 抗体水平测定

根据WHO《流感实验室诊断和监测手册》的规定^[25],进行了血凝及HAI测定。首先,测定病毒或VLP的血凝效价。取25 μ L PBS加入到96孔“U”型板中,在第一孔中加入25 μ L病毒或VLP,然后2倍比稀释,最后在每孔中加25 μ L的1%豚鼠红细胞,4 $^{\circ}$ C静置45 min,观察并记录血凝结果。其次,测定HAI效价。取25 μ L PBS和25 μ L相对应的小鼠首免和二免血清(56 $^{\circ}$ C灭活30 min)加入到96孔“U”型板中,并逐个进行2倍比稀释。以BV-WA的毒株或对应的VLP, BY-CA的毒株或VLP作为抗原,按照4个抗原单位稀释,并向每孔加入25 μ L的单位抗原,室温反应1 h,最后每孔加入50 μ L的1%豚鼠红细胞,4 $^{\circ}$ C静置45 min,观察并记录结果。

2 结果与分析

2.1 HA-ecto 蛋白的表达纯化及粒径分析

细胞转染上清中的BVHA-WA-ecto和

BYHA-CA-ecto 经过镍柱亲和层析纯化后,目的蛋白选用分子筛 Superdex 200 10/300 GL 纯化,最终得到2种BHA-ecto蛋白的相对纯度均在91%以上,且BVHA-WA-ecto和BYHA-CA-ecto蛋白产量分别为0.47 mg/L和0.64 mg/L。结果显示,2种HA-ecto蛋白均有少量多聚体,其余大多是三聚体形式。BVHA-WA-ecto分子筛层析显示三聚体在12.03 mL出峰,其带标签的单体理论分子量为62 kDa,由于存在10个糖基化修饰,SDS-PAGE胶图显示还原状态下(+DTT)条带在75 kDa左右,非还原状态(-DTT)条带略高(图1A)。BYHA-CA-ecto的三聚体出峰位置在分子筛上显示为11.84 mL,带标签的BYHA-CA-ecto单体理论分子量为63 kDa,存在9个糖基化的修饰,在SDS-PAGE胶图显示+DTT条带出现在75 kDa左右,-DTT的非还原状态下,BHA在SDS-PAGE变性胶出现的条带比单体的形式要高一些。这可能是因为在非还原状态下,HA单体间的连接不完全依靠二硫键的作用,而是一些非共价键或疏水作用,使得B型流感病毒的HA-ecto在变性条件下电泳出现单体间的交联^[26-27],在SDS-PAGE胶图上显示的条带近似二聚体形式(图1B)。DLS结果显示,BVHA-WA-ecto的单个球状颗粒粒径中值为13.8 nm,平均直径为14.3 nm;BYHA-CA-ecto的单个球状颗粒粒径中值为12.8 nm,平均直径为13.1 nm。两者的粒径分布系数(particle dispersion index, PDI)分别为0.060和0.063(图1C-D),接近0.05,说明两个HA-ecto蛋白是近似单分散体系(即形式均一的单一蛋白)。DLS的峰图曲线显示,HA-ecto蛋白粒径的分布满足对数正态分布,球状颗粒聚集形态在0-500 nm粒径的吸光度范围(S曲线)内均只有一个单峰出现,也证明粒子整体是以一种状态存在。

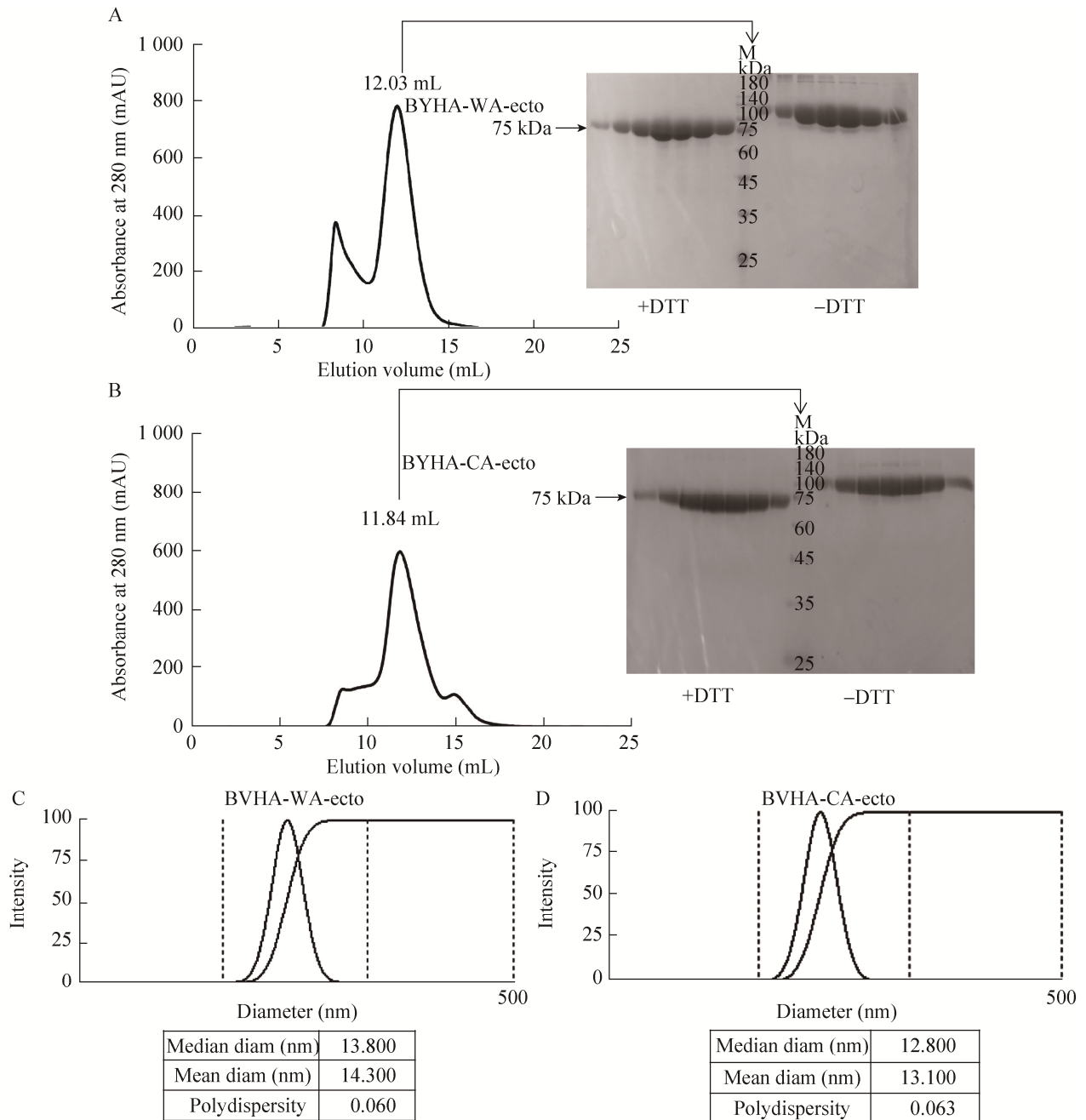


图1 BHA-ecto 蛋白分子筛层析纯化及粒径分析

Figure 1 Purification of BHA-ecto proteins by size exclusion chromatography and particle size analysis. (A) BVHA-WA-ecto was purified by Superdex 200 10/300 GL, M stands for marker, the long black arrow points to the collection samples of peak fraction on the SDS-PAGE gel. The short black arrow refers to the BVHA-WA-ecto, the molecular weight is 75 kDa. (B) BYHA-CA-ecto was purified by Superdex 200 10/300 GL, M stands for marker, the long black arrow points to the collection samples of peak fraction on the SDS-PAGE gel. The short black arrow refers to the BYHA-CA-ecto, the molecular weight is 75 kDa. (C) DLS of BVHA-WA-ecto, log-normal distribution stands for particle size range, S curve stands for the intensity. (D) DLS of BYHA-CA-ecto, log-normal distribution stands for particle size range, S curve stands for the intensity.

2.2 ELISA 抗体水平测定

2.2.1 同源 ELISA 抗体水平测定

为检测免疫小鼠对整个抗原 HA-ecto 的免疫反应,我们测定了小鼠血清中针对 HA-ecto 的 ELISA 反应。BVHA-WA-ecto 蛋白及 BYHA-CA-ecto 蛋白分别包被在 96 孔板上,对应一抗为 BVHA-WA-ecto 首免、二免血清和 BYHA-CA-ecto 首免、二免血清,二抗为 HRP 标记的山羊抗鼠抗体,阴性对照为免疫 PBS 的血清。结果发现, BVHA-WA-ecto 和 BYHA-CA-ecto 均能诱导小鼠产生一定水平的抗体。首免 BVHA-WA-ecto 和 BYHA-CA-ecto 的小鼠血清的抗体半最大效应浓度 (concentration for 50% of maximal effect, EC_{50}) 平均值分别为 2.53×10^{-3} 、 1.45×10^{-3} , 二免后血清的抗体 EC_{50} 平均值分别为 1.97×10^{-4} 、 3.46×10^{-4} 。统计学分析发现, BVHA-WA-ecto 首免与对照组、二免与对照组存在极显著以上水平差异,首免与二免之间存在极显著水平差异 (图 2A)。BYHA-CA-ecto 首免血清与对照存在极显著差异,二免与对照组存在极显著水平差异,且显著性更强,首免与二免有显著水平差异 (图 2B)。ELISA 结

果表明,2 种 HA-ecto 均能诱导小鼠产生相应的抗体,且二免后抗体水平均较高。

2.2.2 异源 ELISA 抗体水平测定

为测定 2 种 BHA-ecto 免疫小鼠后产生的抗体同异源 B 型流感病毒的 HA-ecto 蛋白之间是否有交叉反应活性,同样选择 ELISA 来检测。首先,包被 BYHA-CA 的 HA-ecto 蛋白,用 BVHA-WA-ecto 免疫小鼠血清测定交叉反应活性。其次,包被 BVHA-WA 的 HA-ecto 蛋白,用 BYHA-CA-ecto 血清测定。结果发现, BVHA-WA-ecto 和 BYHA-CA-ecto 首免血清的抗体 EC_{50} 平均值分别为 7.58×10^{-2} 和 2.91, 二免血清的抗体 EC_{50} 平均值分别为 2.03×10^{-4} 和 2.12×10^{-4} , 二免后血清对异源 HA-ecto 蛋白的交叉反应有大幅度提高。统计学分析发现, BVHA-WA-ecto 首免血清与对照相比有显著差异,二免血清与对照组比差异水平达到极显著,首免血清与二免血清相比差异显著 (图 3A)。BYHA-CA-ecto 二免血清与对照组表现出极显著差异水平,首免血清与二免血清差异显著 (图 3B)。异源 ELISA 结果显示,两种 BHA-ecto 首免的血清对异源 BHA-ecto 的交叉反应活性

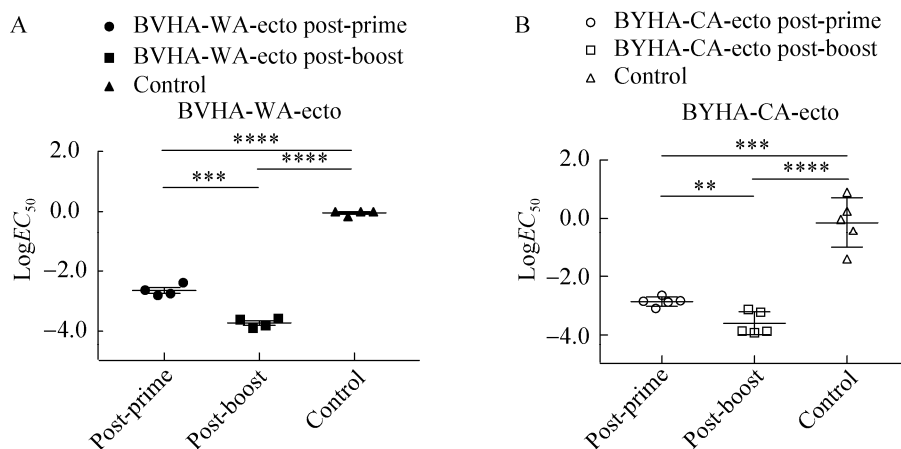


图 2 同源 ELISA 抗体水平测定

Figure 2 Antibody titers detected by homologous ELISA. (A) ELISA titers of BVHA-WA-ecto immunized mouse serum against BVHA-WA-ecto protein. (B) ELISA titers of BYHA-CA-ecto immunized mouse serum against BYHA-CA-ecto protein. Unpaired *t*-test, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$.

较低, 第二次免疫小鼠后产生的血清对异源的 BHA-ecto 有较强的交叉反应活性。

2.3 HAI 抗体水平检测

2.3.1 同源 HAI 抗体水平检测

为测定小鼠免疫血清中针对 BHA 头部区的受体结合部位的抗体水平, 我们利用病毒和 VLP 进行小鼠血清的 HAI 抗体水平测定。结果

发现, BVHA-WA-ecto 和 BYHA-CA-ecto 首免后能够诱导小鼠产生一定水平的 HAI 抗体, HAI 效价范围分别在 2^4 - 2^5 、 2^5 - 2^6 ; 2 个 HA-ecto 蛋白二免后抗体水平提高, HAI 效价范围分别为 2^7 - 2^8 和 2^7 - 2^9 。统计学分析发现, BVHA-WA-ecto 首免与二免的效价差异达到显著水平 (图 4A)。BYHA-CA-ecto 首免血清与二免血清抗体效价

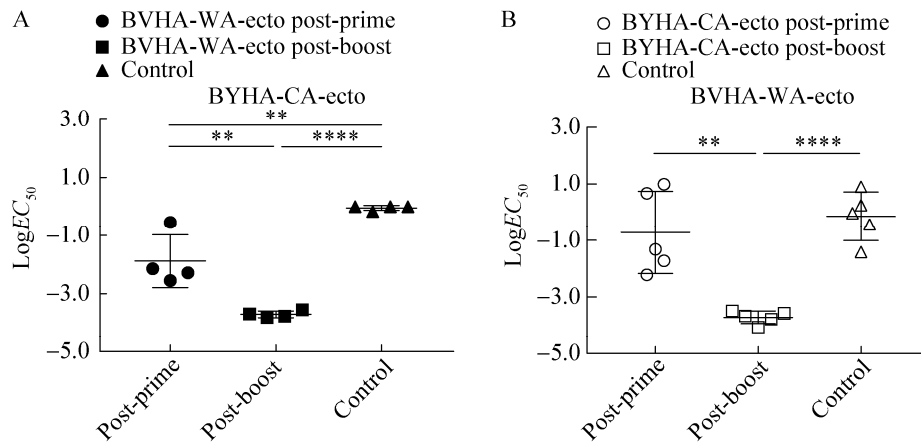


图 3 异源 ELISA 抗体水平测定

Figure 3 Antibody titers detected by heterologous ELISA. (A) ELISA titers of BVHA-WA-ecto immunized mouse serum against heterologous BYHA-CA-ecto protein. (B) ELISA titers of BYHA-CA-ecto immunized mouse serum against heterologous BVHA-WA-ecto protein. Unpaired *t*-test, **: $P < 0.01$, ****: $P < 0.0001$. (There was no difference between the first immunization and the control, so it was not shown).

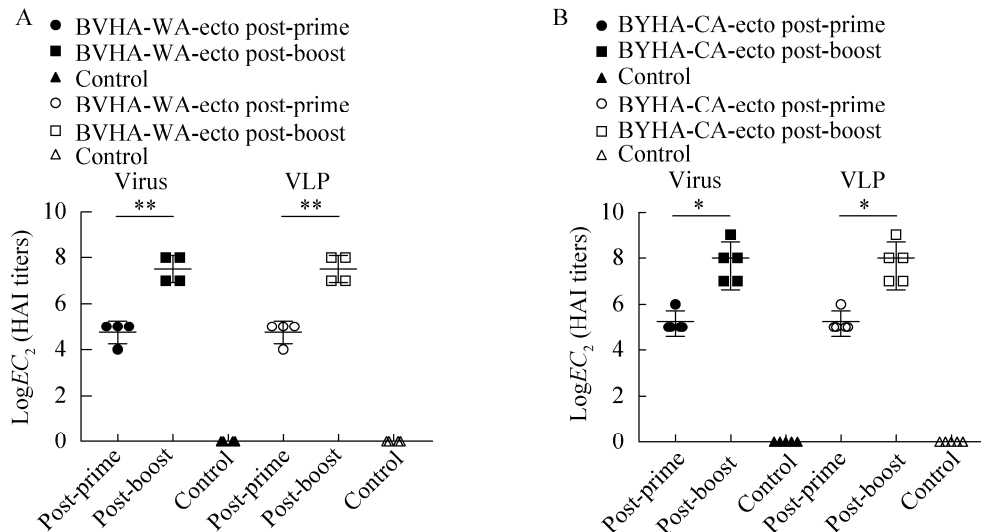


图 4 同源血清 HAI 抗体效价测定

Figure 4 HAI titers of BVHA-WA-ecto immunized mouse serum against BV-WA virus and VLP (A) and HAI titers of BYHA-CA-ecto immunized mouse serum against BY-CA virus and VLP (B). Unpaired *t*-test, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

存在差异 (图 4B)。与此同时发现,对于同源的病毒及 VLP,首免后的血清均显示出了 HAI 抗体效价,随着免疫次数增加,HAI 抗体水平也随之提高。另外,研究发现,利用活病毒和不具有感染性的 VLP 测定的小鼠血清中的 HAI 抗体水平是相一致的。

2.3.2 异源 HAI 抗体水平检测

为测定 2 种 BHA-ecto 免疫小鼠后产生的抗体同异源病毒之间是否有交叉反应活性,同样选择 HAI 来检测。同源 HAI 结果显示,血清对于病毒及 VLP 的反应是一致的,且出于安全和实验操作方便考虑,检测交叉反应活性时,VLP 作为抗原进行异源 HAI 测定。结果发现,BVHA-WA-ecto 首免的血清对异源 BY-CA 的 VLP 和 BYHA-CA-ecto 的首免血清对异源 BV-WA 的 VLP 作用效果较低,效价分别在 2^0 - 2^2 和 2^0 - 2^3 ,两种 HA-ecto 二免血清效价均提高,范围均在 2^7 - 2^8 。统计学分析发现,BVHA-WA-ecto 首免与二免的效价存在显著差异,二免与对照组差异显著,首免与对照组没有差异,说明二免后的血清表现出对异源 VLP 的交叉反应活性 (图 5A)。BYHA-CA-ecto 首免与二免血清水平

存在极显著差异,二免与对照组差异极显著,首免与对照组无差异 (图 5B)。BVHA-WA-ecto 和 BYHA-CA-ecto 第二次免疫的血清都表现出较高的对于异源 VLP 的交叉活性,且抑制水平相当,这与 ELISA 结果相一致。

3 讨论

B 型流感病毒虽不及 A 型流感病毒变异速度快,感染病例也没有 A 型多,但是患病后的严重程度和反应是与 A 型流感病毒相当的。近年来,B 型流感病毒的流行占据越来越多的比重。目前来说接种疫苗是预防流感最有效的措施。目前临床使用的季节性流感疫苗包括灭活疫苗、减毒活疫苗和昆虫杆状病毒系统生产的重组 HA 亚单位疫苗^[28-29]。在接种鸡胚扩增病毒制备的裂解疫苗 Fluzone 后^[30-31],能够在人体内诱导产生的抗体对于 B 型流感病毒的 HAI 效价范围在 2^7 - 2^8 ; Fluzone 能够在接种动物时产生抗体^[32-33],对于 A 型流感病毒的 HAI 效价范围在 2^4 - 2^6 。接种 MDCK 细胞扩增制备的灭活疫苗 Fluelvax 后也能够产生抗体^[31,34],其针对 B 型流感病毒的 HAI 效价在 2^5 - 2^6 。接

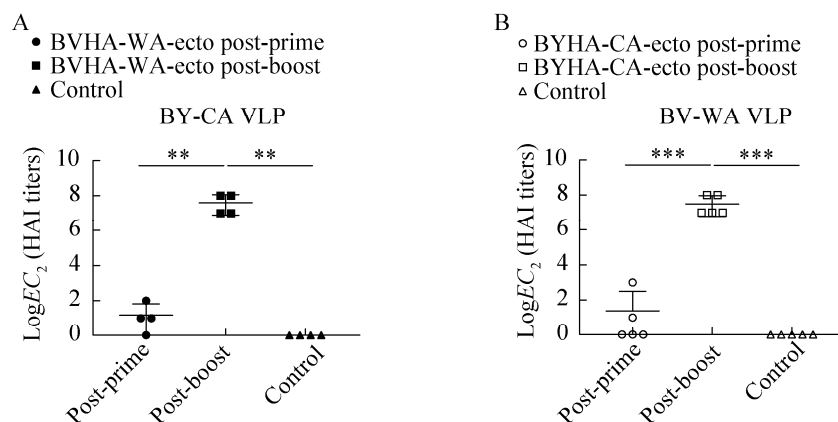


图 5 异源血清 HAI 抗体效价测定

Figure 5 HAI titers of BHA-ecto immunized mouse serum against heterologous influenza B virus and VLP. (A) HAI titers of BVHA-WA-ecto immunized mouse serum against BY-CA VLP. (B) HAI titers of BYHA-CA-ecto immunized mouse serum against BV-WA VLP. **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$.

种重组 HA 亚单位疫苗 Flublok 后^[31],在人体内诱导产生针对 B 型流感病毒的 HAI 效价范围为 2^6 – 2^7 ;在小鼠内诱导产生的^[35]HAI 效价在 2^2 – 2^4 。有研究^[35]将 B/Colorado/06/2017 的重组 HA 蛋白合成到新型疫苗接种系统 VaxiPatchTM 中,该系统由亚单位糖蛋白疫苗抗原、佐剂和皮肤传递组成,通过哺乳动物细胞表达,加佐剂进行免疫小鼠,最终诱导产生的抗体 HAI 效价可达 2^8 。本研究中通过哺乳动物细胞表达的 B 型流感病毒疫苗候选毒株的 HA 蛋白,免疫小鼠后能够在小鼠体内诱导产生抗体的同源 HAI 效价在 2^7 – 2^9 ,对于 B 型流感病毒的交叉反应的 HAI 效价在 2^7 – 2^8 ,相比较而言有很好的应用前景。

目前正在进行临床试验的重组蛋白的通用疫苗 M-001 是包含有 H1N1、H3N2 及 B 型流感病毒株的 HA、NP 和 M1 等蛋白重组合成的,接种 500 μ g 含有佐剂的疫苗人群对于疫苗的反应产生的抗体滴度增加了 50 倍,目前在进行 III 期临床(临床登记号: NCT03450915)^[36-37]; FLU-v 疫苗是合成的多肽通用疫苗,包括人及动物的 A 型和 B 型流感病毒的 NP、M1 和 M2 蛋白的高度保守区域,同样已经进行到了 II b 期临床(临床登记号: NCT03180801),被证实对于 B 型流感病毒有一定的保护作用^[38-39]。在接受 FLU-v 疫苗接种后的受试者中,最多会导致出现中轻度至中度流感症状,发病率在 2.6%–32.5%,有着较好的保护作用^[40]。预计 2021 年 4 月完成 III 期临床试验(临床登记号: NCT04646590)^[41]的新冠病毒重组亚单位疫苗 ZF2001 由哺乳动物的 CHO 细胞表达纯化,说明通过哺乳动物细胞表达系统纯化的亚单位疫苗具有较强的应用性。

本研究表明,哺乳动物细胞表达系统表达产生的 BHA-ecto 蛋白具有很好的免疫原性,能够诱导机体产生一定水平的抗体,可以作为亚

单位疫苗的候选。本研究疫苗抗原的制备不限于病毒扩增,如鸡胚扩增等,且能够迅速应对流感病毒的变异,利用悬浮细胞,如 CHO 进行大批量的生产。沿袭新冠病毒的重组 RBD 二聚体亚单位疫苗的研发和临床使用历程,哺乳动物细胞表达系统纯化的流感病毒亚单位疫苗将会是一种新的趋势。

REFERENCES

- [1] Stöhr K. Influenza—WHO cares. *Lancet Infect Dis*, 2002, 2(9): 517.
- [2] Lin TY, Brass AL. Host genetic determinants of influenza pathogenicity. *Curr Opin Virol*, 2013, 3(5): 531-536.
- [3] Hause BM, Collin EA, Liu R, et al. Characterization of a novel influenza virus in cattle and swine: proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family. *mBio*, 2014, 5(2): e00031-14.
- [4] Iuliano AD, Roguski KM, Chang HH, et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *Lancet*, 2018, 391(10127): 1285-1300.
- [5] Lafond KE, Nair H, Rasooly MH, et al. Global role and burden of influenza in pediatric respiratory hospitalizations, 1982–2012: a systematic analysis. *PLoS Med*, 2016, 13(3): e1001977.
- [6] Puzelli S, Frezza F, Fabiani C, et al. Changes in the hemagglutinins and neuraminidases of human influenza B viruses isolated in Italy during the 2001–02, 2002–03, and 2003–04 seasons. *J Med Virol*, 2004, 74(4): 629-640.
- [7] Virk RK, Jayakumar J, Mendenhall IH, et al. Divergent evolutionary trajectories of influenza B viruses underlie their contemporaneous epidemic activity. *PNAS*, 2020, 117(1): 619-628.
- [8] Tan J, Asthagiri Arunkumar G, Krammer F. Universal influenza virus vaccines and therapeutics: where do we stand with influenza B virus? *Curr Opin Immunol*, 2018, 53: 45-50.
- [9] Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF, Martina BE, et al. Influenza B virus in seals. *Science*, 2000, 288(5468): 1051-1053.
- [10] Su S, Chaves SS, Perez A, et al. Comparing clinical

characteristics between hospitalized adults with laboratory-confirmed influenza A and B virus infection. *Clin Infect Dis*, 2014, 59(2): 252-255.

- [11] Wu P, Goldstein E, Ho LM, et al. Excess mortality associated with influenza A and B virus in Hong Kong, 1998–2009. *J Infect Dis*, 2012, 206(12): 1862-1871.
- [12] Rota PA, Wallis TR, Harmon MW, et al. Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983. *Virology*, 1990, 175(1): 59-68.
- [13] Kanegae Y, Sugita S, Endo A, et al. Evolutionary pattern of the hemagglutinin gene of influenza B viruses isolated in Japan: cocirculating lineages in the same epidemic season. *J Virol*, 1990, 64(6): 2860-2865.
- [14] Chiu SS, Chan KH, So LY, et al. The population based socioeconomic burden of pediatric influenza-associated hospitalization in Hong Kong. *Vaccine*, 2012, 30(10): 1895-1900.
- [15] Matias G, Taylor R, Haguinet F, et al. Estimates of mortality attributable to influenza and RSV in the United States during 1997–2009 by influenza type or subtype, age, cause of death, and risk status. *Influenza Other Respir Viruses*, 2014, 8(5): 507-515.
- [16] Epperson S, Davis CT, Brammer L, et al. Update: influenza activity—United States and worldwide, May 19–September 28, 2019, and composition of the 2020 southern hemisphere influenza vaccine. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2019, 68(40): 880-884.
- [17] Von Itzstein M. The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6(12): 967-974.
- [18] Hsu HL, Millet JK, Costello DA, et al. Viral fusion efficacy of specific H3N2 influenza virus reassortant combinations at single-particle level. *Sci Rep*, 2016, 6: 35537.
- [19] Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2020–2021 northern hemisphere influenza season[EB/OL]. [2021-04-05]. https://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2021_south/en/.
- [20] Current availability from NIBSC of candidate influenza vaccine viruses, SRD reagents and neuraminidase reagents for use in the 2021–22 northern hemisphere season and 2021 southern hemisphere season[EB/OL]. [2021-04-05]. https://www.nibsc.org/science_and_research/virology/influenza_resource/_full_reagent_update.aspx
- [21] Güthe S, Kapinos L, Möglich A, et al. Very fast folding and association of a trimerization domain from bacteriophage T4 fibrin. *J Mol Biol*, 2004, 337(4): 905-915.
- [22] Zhang W, Qi JX, Shi Y, et al. Crystal structure of the swine-origin A (H1N1)-2009 influenza A virus hemagglutinin (HA) reveals similar antigenicity to that of the 1918 pandemic virus. *Protein Cell*, 2010, 1(5): 459-467.
- [23] Iz SG, Metiner PS, Kimiz I, et al. Polyclonal antibody production against haptent- structured KDN molecule by using different adjuvants alternative to Freund's adjuvant. *Eur J Ther*, 2018: 106-111.
- [24] Carreño JM, Strohmeier S, Kirkpatrick Roubidoux E, et al. H1 hemagglutinin priming provides long-lasting heterosubtypic immunity against H5N1 challenge in the mouse model. *mBio*, 2020, 11(6): e02090-20.
- [25] World Health Organization (2011). Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza[EB/OL]. [2021-05-02]. https://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/manual_diagnosis_surveillance_influenza/en/.
- [26] Lee PS, Zhu X, Yu W, et al. Design and structure of an engineered disulfide-stabilized influenza virus hemagglutinin trimer. *J Virol*, 2015, 89(14): 7417-7420.
- [27] Tao Y, Strelkov SV, Mesyanzhinov VV, et al. Structure of bacteriophage T4 fibrin: a segmented coiled coil and the role of the C-terminal domain. *Structure*. 1997, 5(6): 789-798.
- [28] Moa AM, Chughtai AA, Muscatello DJ, et al. Immunogenicity and safety of inactivated quadrivalent influenza vaccine in adults: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Vaccine*, 2016, 34(35): 4092-4102.
- [29] Del Giudice G, Rappuoli R. Inactivated and adjuvanted influenza vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2015, 386: 151-180.
- [30] Frenck RW, Belshe R, Brady RC, et al. Comparison of the immunogenicity and safety of a split-virion, inactivated, trivalent influenza vaccine (Fluzone®) administered by intradermal and intramuscular route in healthy adults. *Vaccine*, 2011, 29(34): 5666-5674.
- [31] Richards KA, Moritzky S, Shannon I, et al. Recombinant HA-based vaccine outperforms split and

- subunit vaccines in elicitation of influenza-specific CD4 T cells and CD4 T cell-dependent antibody responses in humans. *NPJ Vaccines*, 2020, 5: 77.
- [32] Carroll TD, Matzinger SR, Barro M, et al. Alphavirus replicon-based adjuvants enhance the immunogenicity and effectiveness of Fluzone® in rhesus macaques. *Vaccine*, 2011, 29(5): 931-940.
- [33] Corder BN, Bullard BL, DeBeauchamp JL, et al. Influenza H1 mosaic hemagglutinin vaccine induces broad immunity and protection in mice. *Vaccines (Basel)*, 2019, 7(4): 195.
- [34] Manini I, Domnich A, Amicizia D, et al. Flucelvax (Optaflu) for seasonal influenza. *Expert Rev Vaccines*, 2015, 14(6): 789-804.
- [35] Ellison TJ, Talbott GC, Henderson DR. VaxiPatch™, a novel vaccination system comprised of subunit antigens, adjuvants and microneedle skin delivery: an application to influenza B/Colorado/06/2017. *Vaccine*, 2020, 38(43): 6839-6848.
- [36] Atsmon J, Kate-Ilovitz E, Shaikevich D, et al. Safety and immunogenicity of multimeric-001—a novel universal influenza vaccine. *J Clin Immunol*, 2012, 32(3): 595-603.
- [37] Atsmon J, Caraco Y, Ziv-Sefer S, et al. Priming by a novel universal influenza vaccine (multimeric-001)—a gateway for improving immune response in the elderly population. *Vaccine*, 2014, 32(44): 5816-5823.
- [38] Pleguezuelos O, Robinson S, Stoloff GA, et al. Synthetic influenza vaccine (FLU-v) stimulates cell mediated immunity in a double-blind, randomised, placebo-controlled Phase I trial. *Vaccine*, 2012, 30(31): 4655-4660.
- [39] Van Doorn E, Pleguezuelos O, Liu H, et al. Evaluation of the immunogenicity and safety of different doses and formulations of a broad spectrum influenza vaccine (FLU-v) developed by SEEK: study protocol for a single-center, randomized, double-blind and placebo-controlled clinical phase IIb trial. *BMC Infect Dis*, 2017, 17(1): 241.
- [40] TRIAL C. Efficacy of FLU-v in an H1N1 influenza human challenge model[EB/OL]. [2021-04-08]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03180801?term=FLUv&rank=1>.
- [41] Yang SL, Li Y, Dai LP, et al. Safety and immunogenicity of a recombinant tandem-repeat dimeric RBD-based protein subunit vaccine (ZF2001) against COVID-19 in adults: two randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 and 2 trials. *Lancet Infect Dis*, 2021, 21(8): 1107-1119.

(本文责编 陈宏宇)