

DOI:10.3969/j.issn.1673-5501.2009.01.010

## 呼吸道合胞病毒 DNA 疫苗的构建和免疫效果的初步观察

徐 锦 丁韵珍 杨 毅 孙家娥 苏犁云

**摘要 目的** 构建呼吸道合胞病毒(RSV)的DNA疫苗并对其免疫效应进行观察,为RSV的免疫预防提供新思路。**方法** 构建表达RSV-F蛋白的质粒pcD-F,接种BALB/c小鼠后以RSV long株进行攻击,于攻击当日和攻击后第5、14天采用ELISA和ELISPOT方法分别检测小鼠RSV特异性IgG抗体和分泌RSV特异性IFN- $\gamma$ 的淋巴细胞,荧光定量PCR方法检测小鼠肺组织RSV-RNA的含量。肺组织切片行苏木精-伊红染色,观察RSV long株攻击后肺组织病理改变。**结果** pcD-F免疫小鼠后,产生RSV特异性IgG抗体(滴度1:60),RSV攻击后第14天,pcD-F免疫小鼠的特异性IgG抗体水平升至1:250,明显高于对照组( $P < 0.05$ )。RSV攻击后,pcD-F免疫小鼠分泌RSV特异性IFN- $\gamma$ 的淋巴细胞升至99个/ $1 \times 10^5$ 细胞,明显高于对照组的9个/ $1 \times 10^5$ 细胞( $P < 0.05$ )。pcD-F免疫小鼠的肺部炎症反应明显轻于对照组,肺部RSV得到有效的清除。**结论** 成功构建的RSV DNA疫苗具有良好的免疫原性。

**关键词** 呼吸道合胞病毒; DNA疫苗; 抗体; 细胞免疫

### Construction of respiratory syncytial virus DNA vaccine and study of immune efficacy

XU Jin, DING Yun-zhen, YANG Yi, SUN Jia-e, SU Li-yun Children's Hospital, Fudan University, Shanghai 201102, China

**Corresponding Author:** XU Jin, E-mail: jinxu\_125@163.com

**Abstract Objective** Respiratory syncytial virus(RSV) is one of the principal causes of bronchiolitis and pneumonia in young children. There is no safe and effective vaccine. A DNA vaccine against RSV was constructed and its immune efficacy in mice was investigated. **Methods** The full-length fusion genes of an RSV long strain were subcloned into pcDNA3.1(-) and the pcD-F constructs were transfected into Hela cells. Protein expressions were evaluated by Western blot analysis of lysed cells. Specific pathogen-free, female BALB/c mice, 6- to 7-weeks old, were inoculated with pcD-F by intramuscular(im) immunization and challenged by RSV long strains. On 0, 5, and 14 days after RSV challenge, 6-7 mice were killed and blood and lung specimens were collected at each time point. ELISA and ELISPOT assays were applied respectively for determination of RSV-specific antibody titers in serum and IFN- $\gamma$ -producing cells in spleens. RSV-RNA copies in lung tissues were detected by real-time PCR. Sections stained with hematoxylin and eosin were examined by microscopy for evidence of lung inflammation. **Results** The band recognized by the anti-RSV-F monoclonal antibody was observed from pcD-F transfected Hela cells. The average geometric anti-RSV antibody titer was 1:60 in mice vaccinated with pcD-F plasmid before challenge. A significantly higher titer(1:250) was produced in mice immunized with pcD-F on 14 days post challenge compared with controls,  $P < 0.05$ . The RSV-specific IFN- $\gamma$ -producing cells in vaccinated mice were 99 spots/ $1 \times 10^5$  cells on 5 days post challenge, significantly higher than in the controls(9 spots/ $1 \times 10^5$  cells). Control mice also showed a slightly increased RSV-specific cellular response on 5 days(9 spots/ $1 \times 10^5$  cells) and 14 days(18 spots/ $1 \times 10^5$  cells) after challenge, but this response was significantly lower than that in im immunization group. The vaccinated mice showed milder pulmonary inflammatory changes in lungs and effective RSV clearance compared with controls on 5 days post RSV challenge. **Conclusions** The study demonstrated that pcD-F was an effective DNA vaccine against RSV. Our study provides implication for the prevention strategy of RSV infection.

**Key words** Respiratory syncytial virus; DNA vaccine; Antibody; Cellular immune response

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)是导致婴幼儿支气管炎和肺炎的最主要病毒,也是老人和免疫

抑制人群常见的呼吸道感染病原,每年在世界范围内可引起至少16万的死亡病例。RSV感染与哮喘的关系也十分

**作者单位** 复旦大学附属儿科医院 上海,201102

**通讯作者** 徐锦, E-mail: jinxu\_125@163.com



密切<sup>[1]</sup>。采用疫苗进行有效预防是从根本上减少和消除 RSV 所致疾病的重要手段。

20 世纪 60 年代甲醛灭活 RSV 疫苗开始接种儿童,发生自然感染 RSV 后疾病加重而死亡的事件,RSV 疫苗的研制一度停滞<sup>[2]</sup>。目前虽然有包括减毒活疫苗和亚单位疫苗在内的多种疫苗已进行了初步的临床试验,但安全及有效的商品化 RSV 疫苗至今尚未上市<sup>[3,4]</sup>。

RSV-DNA 疫苗作为一种有应用前景的新型疫苗,目前正在研制之中。RSV-DNA 疫苗是将抗原基因重组到表达载体上,通过一定方法导入到机体,抗原可以在细胞内从头合成和表达,经过抗原呈递细胞的处理后进一步激活免疫应答,因此具有模仿自然感染的特点<sup>[5]</sup>。

在 RSV 基因编码的蛋白中,融合蛋白 F (fusion protein) 和吸附蛋白 G 是激发免疫保护效应的两种主要蛋白,成为包括 RSV-DNA 疫苗在内的多数 RSV 疫苗的主要靶蛋白<sup>[1]</sup>。但有研究表明,G 蛋白的分泌性片段可能会导致 RSV 感染后的免疫应答向 Th2 方向发展,从而引发过敏反应<sup>[6,7]</sup>。F 蛋白是 A、B 两种亚型 RSV 间高度保守的一种蛋白。因此,本研究构建插入 RSV-F 基因全长的质粒疫苗并观察其接种小鼠后的免疫效应,为 RSV 的免疫预防提供新线索。

## 1 材料与与方法

1.1 病毒滴度 HEp-2 细胞 (ATCC, 美国) 以 RPMI-1640 培养液 (Invitrogen 公司, 美国) 和 10% 的胎牛血清 (Hyclone 公司, 美国) 进行培养, 将 RSV long 株接种至该细胞进行增殖。将收集的病毒液进行 10 倍系列稀释后加入长满 HEp-2 细胞的 96 孔板中, 培养 24 h 后, 用抗 RSV 的单克隆荧光抗体 (Chemicon 公司, 美国) 进行免疫染色, 根据染上荧光的细胞数计算 RSV 的病毒量 ( $\text{ffu} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。

1.2 质粒构建和鉴定 将通过 PCR 扩增的、带有酶切位点的 RSV long 株 F 全长基因插入酶切后的 pcDNA3.1 (-) 质粒 (Invitrogen 公司, 美国) 中。将重组质粒在 DH5 $\alpha$  大肠埃希菌中进行转化, 挑选氨苄西林抗性的克隆, 通过酶切、PCR 扩增和测序进行插入片段的鉴定。质粒构建后经 Xho I 和 EcoR I 酶切, 切出 5.4 kb 的 pcDNA3.1 (-) 质粒片段和 1 724 bp 的 RSV-F 片段。测序后证实序列与 RSV long 株的序列完全一致。挑选鉴定正确的质粒 (命名为 pcD-F2、pcD-F3) 扩增后, 通过 lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司, 美国) 转染 HeLa 细胞, 培养 72 h 后, 收集细胞, 破碎后用抗 RSV-F 的单克隆抗体进行 Western blot 鉴定所构建的克隆是否表达 RSV 的 F 蛋白。

1.3 免疫用质粒的准备 将 pcD-F 质粒大量扩增后, 用去内毒素的质粒纯化试剂 (Qiagen 公司, 德国) 进行纯化, 以生理盐水将 pcD-F 质粒稀释后备用。

1.4 小鼠免疫接种和标本收集 将 6~7 周、SPF 级的

BALB/c 雌性小鼠 (上海斯莱克实验动物有限公司) 分别肌肉注射空载体质粒 (对照组) 或 pcD-F 质粒 (pcD-F 组)。每次均为 50  $\mu\text{g}$ , 每周 1 次, 共 3 次, 最后 1 次注射后停 2 周, 经鼻吸入  $1 \times 10^5 \text{ffu} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 RSV long 株进行攻击。RSV long 株攻击的当日及攻击后的第 5、14 天分别收集脾、肺和血标本。每个时间点均处死 6~7 只小鼠。

1.5 肺组织 RSV-RNA 拷贝数检测 Trizol 试剂常规抽提肺组织 RNA, 随机引物逆转录后, 以荧光定量 PCR 法在 ABI 7000 上进行肺组织 RSV-RNA 拷贝数的检测。

上游引物: 5' ACATACGTGAACAAGCTTCACGAA3'

下游引物: 5' TCTGCTGGCATAGATGATTGGA3'

探针: Fam-ATGACCCTGCATCACITTAGAATATGGGTGC-Tamra

PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$  20 min, 95 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 共 40 个循环。将标本和标准品同时进行检测, 标本的拷贝数根据标准曲线自动显示, RSV-RNA 的拷贝数以  $\text{copies} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{RNA}$  表示。

1.6 RSV 特异性 IgG 抗体的检测 采用直接 ELISA 法, 将培养的 RSV long 株上清液稀释后包被在 96 孔酶标板上, 洗涤封闭后将对倍系列稀释的小鼠血清加入相应的孔中, 室温下孵育 2 h, 彻底清洗后将辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG 抗体 (KPL 公司, 美国) 加入板中, 室温下孵育 2 h, 彻底清洗后用 TMB 显色液 (KPL 公司, 美国) 进行显色, 450 nm 处检测吸光度 (A) 值。减去空白孔 A 值 > 0.1 的最大血清稀释度定为该血清的滴度, 起始稀释度为 1:25。

1.7 RSV 特异性分泌 IFN- $\gamma$  淋巴细胞的检测 无菌条件下取出小鼠脾脏, 直接在小鼠淋巴细胞分离液中研磨 (达科为公司, 深圳), 收集悬有脾脏细胞的分离液, 通过离心分离出脾脏淋巴细胞, 以细胞计数板计数每只小鼠脾脏中分离出的淋巴细胞总数。采用 ELISPOT 试剂盒 (U-CyTech 公司, 荷兰), 将抗 IFN- $\gamma$  的抗体包被在 96 孔酶标板上, 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜, 洗涤封闭后将 3 倍系列稀释的小鼠脾脏淋巴细胞 (每孔  $3 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^4$  个细胞) 加入相应的孔中, 同时加入  $1 \times 10^4 \text{ffu} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 RSV long 株, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 16 h。去除细胞彻底清洗后, 加入生物素标记的检测抗体, 室温下孵育 2 h, 加入抗生物素抗体并于室温下孵育 2 h, 洗板后用显色剂显色 15~30 min, 在光镜下观察并计数所形成的黑色斑点, 检测结果以个/  $1 \times 10^5$  细胞表示。

1.8 肺组织病理学检查 肺组织常规的石蜡包埋和组织切片后行苏木精-伊红染色, 光镜下观察各组肺组织病理改变。

1.9 统计学方法 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。两组小鼠不同时间点 RSV 特异性 IgG 抗体和特异性分泌 IFN- $\gamma$  的淋巴细胞水平比较采用方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。采用 SPSS 11.5 软件进行统计分析。

## 2 结果

2.1 pcD-F 表达产物的鉴定 经 Western blot 鉴定 pcD-F2 和 pcD-F3 质粒可在 HeLa 细胞中表达 RSV-F 蛋白(图 1)。

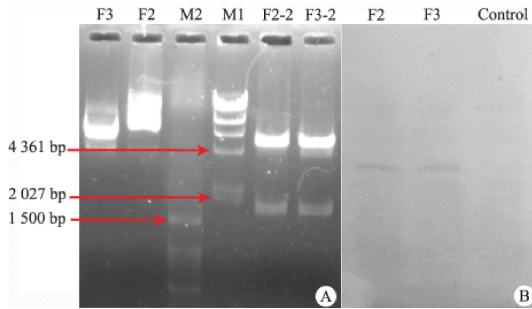


图 1 pcD-F 质粒的酶切鉴定图和转染 HeLa 细胞后 RSV-F 蛋白的表达

Fig 1 Restriction enzyme analysis for pcD-F plasmid constructs and western blot for exprssion of RSV-F protein after transfection in HeLa cells

Note: A:Restriction enzyme analysis for pcD-F plasmid constructs;B: Western blot ( B ) for expression of RSV-F protein after transfection in HeLa cells. F2, F3: pcD-F2, pcD-F3 before restriction enzyme digestion; F2-2, F3-2: pcD-F2, pcD-F3 after restriction enzyme digestion; Control: pcDNA3.1 ( - ); M1:  $\lambda$ -Hin III digest DNA marker;M2: 100 bp DNA ladder

2.2 肺组织 RSV-RNA 拷贝数 RSV long 株攻击前,所有小鼠均未在肺部检测到 RSV-RNA。RSV long 株攻击后第 5 天,对照组 5/6 只小鼠检测到明显的 RSV-RNA,拷贝数为  $(1\ 829 \pm 793)$  copies  $\cdot \mu\text{g}^{-1}$  RNA,pcD-F 组 2/7 只小鼠检测到明显的 RSV-RNA,拷贝数分别为 56 和 1 862 copies  $\cdot \mu\text{g}^{-1}$  RNA(表 1)。

表 1 pcD-F 疫苗免疫 BALB/c 小鼠后 RSV 的清除 (n/N)

Tab 1 Clearance of respiratory syncytial virus from the lungs of BALB/c mice after pcD-F immunization( n/ N)

Immunization	RSV challenge		
	Before	5 d after	14 d after
Intramuscular	0/6	2/7 <sup>1)</sup>	1/7
Controls	0/6	5/6 <sup>2)</sup>	2/6

Notes:1) RSV-RNA:56 and 1 862 copies  $\cdot \mu\text{g}^{-1}$  RNA, respectively,  $P < 0.05$ , vs controls;2)RSV-RNA:(  $1\ 829 \pm 793$  ) copies  $\cdot \mu\text{g}^{-1}$  RNA

2.3 pcD-F 组 RSV 特异性 IgG 抗体的产生 RSV long 株攻击的当日 pcD-F 组产生 1:60 的 RSV 特异性 IgG 抗体,而对照组未检测到。RSV long 株攻击后的第 5 天,两组小鼠的 RSV 特异性 IgG 抗体水平均有轻微的增加。攻击后第 14 天,两组小鼠的 RSV 特异性 IgG 抗体水平均显著升高,

pcD-F 组的 RSV 特异性 IgG 抗体水平明显高于对照组(图 2)。

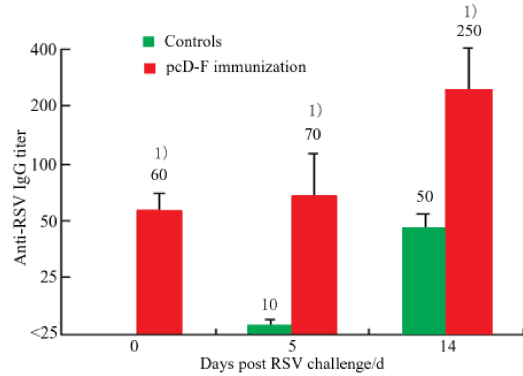


图 2 pcD-F 疫苗免疫对 BALB/c 小鼠 RSV 特异性 IgG 抗体的影响

Fig 2 The effect of immunization with pcD-F on RSV-specific IgG titers in BALB/c mice

Note:1)  $P < 0.05$  vs controls

2.4 RSV 特异性分泌 IFN- $\gamma$  淋巴细胞的产生 pcD-F 组与对照组于 RSV long 株吸入当日未检测到明显的分泌 RSV 特异性 IFN- $\gamma$  的淋巴细胞。RSV long 株攻击后第 5 天,分泌 RSV 特异性 IFN- $\gamma$  的淋巴细胞升至 99 个/ $1 \times 10^5$  细胞,明显高于对照组的 9 个/ $1 \times 10^5$  细胞。RSV long 株攻击后第 14 天,pcD-F 组分泌 RSV 特异性 IFN- $\gamma$  的淋巴细胞数有所减少,但仍维持较高水平,对照组分泌 RSV 特异性 IFN- $\gamma$  的淋巴细胞升至 14 个/ $1 \times 10^5$  细胞(图 3)。

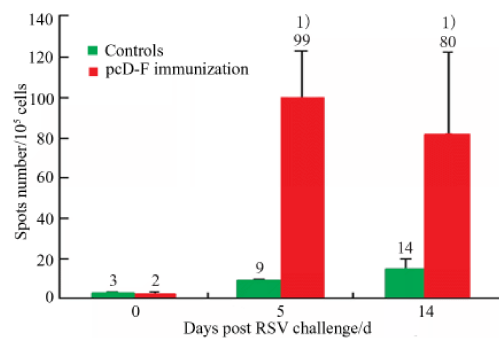


图 3 pcD-F 疫苗免疫对 BALB/c 小鼠分泌 RSV 特异性 IFN- $\gamma$  淋巴细胞的影响

Fig 3 The effect of immunization with pcD-F on RSV-specific IFN- $\gamma$  response in BALB/c mice

Note:1)  $P < 0.05$  vs controls

2.5 肺组织病理学检查 RSV long 株攻击当日,pcD-F 组和对照组小鼠肺组织表现出正常的肺部结构。RSV long 株

攻击后第 5 天,对照组肺组织出现较广泛的炎症改变,表现为终末细支气管和肺泡内炎性细胞浸润(图 4A),pcD-F 组表现为类似的肺部炎症反应(图 4B),但程度上明显轻于对照组。RSV long 株吸入后第 14 天,对照组肺部炎症反应明显好转(图 4C),pcD-F 组肺组织结构基本恢复正常(图 4D)。

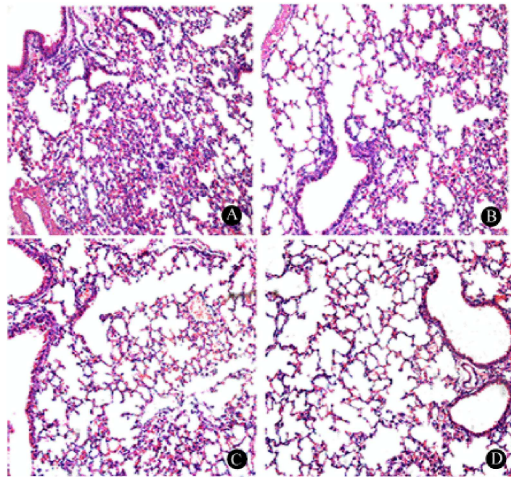


图 4 RSV 攻击后第 5 和 14 天 BALB/c 小鼠的肺部病理改变  
Fig 4 Effect of vaccination on pulmonary histopathology in the lungs of BALB/c mice 5 days and 14 days after RSV challenge

Note: HE staining(×200). A: Controls (5 days), more extensive inflammatory reaction, represented as inflammatory cells infiltration in terminal bronchioles and alveoli; B: pcD-F immunization (5 days), pulmonary inflammatory reaction but milder than controls; C: Controls (14 days), pulmonary inflammatory reaction significantly improved; D: pcD-F immunization (14 days), lung tissue recovery with almost normal structure

### 3 讨论

血清抗体对于 RSV 感染的保护十分必要,母传抗体的水平与婴儿抵御严重感染的能力相关;RSV 感染的严重程度与婴儿血清中母传抗体的水平和急性期抗体的水平呈负相关;被动给予抗 RSV 的单克隆抗体后可降低高危患儿 RSV 感染的概率和严重程度<sup>[8-10]</sup>。而细胞免疫在 RSV 感染中也起重要作用,细胞免疫缺陷的患儿清除 RSV 的能力明显下降。CD8<sup>+</sup> 和 CD4<sup>+</sup> 在降低小鼠 RSV 病毒滴度和感染的恢复过程中发挥着与抗体同样的作用<sup>[11-13]</sup>。

本研究构建的 pcD-F 疫苗免疫小鼠后当日产生了 RSV 特异性 IgG 抗体(1:60),RSV 攻击后第 14 天,此抗体水平上升近 4 倍(1:250),明显高于对照组水平(1:50),显示出 pcD-F 疫苗可激发较强的体液免疫反应。pcD-F 疫苗免疫后和 RSV 攻击前虽未检测到明显的分泌 RSV 特异性 IFN-

γ 的细胞,但在 RSV 攻击后第 5 天,RSV 特异性分泌 IFN-γ 的细胞数有显著的增加,并在第 14 天后依然维持较高水平,而对照组在 RSV 攻击后第 14 天仅检测到微量的分泌 RSV 特异性 IFN-γ 的细胞,显示 pcD-F 疫苗免疫后有记忆性细胞免疫的产生。依靠体液免疫和细胞免疫的共同作用,pcD-F 疫苗免疫接种后有利于对肺部 RSV 进行有效的清除。

可见,本研究构建的可表达 RSV-F 蛋白的质粒 DNA 疫苗接种小鼠后产生了特异性的免疫应答和对 RSV 感染的保护作用。国外的同类研究表明,RSV-DNA 疫苗是一种有良好应用前景的疫苗<sup>[14-20]</sup>,相比于其他疫苗的最大优势是其所编码的蛋白质或多肽在细胞内可以从头合成,通过抗原呈递细胞和主要组织相容性复合体分子共同激发免疫反应;来自母亲的抗体不会与质粒结合,对质粒在细胞内的蛋白质表达不会产生干扰,可有效解决其他类型的 RSV 疫苗(如减毒活疫苗和亚单位疫苗等)易被母传抗体中和而极大降低免疫原性的问题<sup>[5]</sup>。

本研究的不足之处和局限性:经呼吸道感染的 RSV 诱导的免疫应答具有黏膜免疫的特征,局部分泌型 IgA 抗体是保护和抵抗 RSV 感染的重要因素,但由于 IgA 抗体的滴度较低,现有检测 IgG 的 ELISA 法的敏感度尚不足以准确检测出 IgA,尤其是低水平的 IgA。因此今后我们需要在建立更敏感的方法基础上进一步检测血清和肺泡灌洗液中的 RSV 特异性 IgA 抗体。

在成功构建了真核表达载体并证实了其良好的免疫原性后,将以此为基础,继续观察不同剂量及各种佐剂的应用等对 RSV-DNA 疫苗的影响,进一步提高 RSV-DNA 疫苗的免疫效应。

### 参考文献

- [1] Domachowske JB, Rosenberg HF. Respiratory syncytial virus infection: immune response, immunopathogenesis, and treatment. Clin Microbiol Rev, 1999, 12(2):298-309
- [2] Kapikian AZ, Mitchell RH, Chanock RM, et al. An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine. Am J Epidemiol, 1969, 89(4):405-421
- [3] Karon RA, Wright PF, Crowe JE Jr, et al. Evaluation of two live, cold-passaged, temperature-sensitive respiratory syncytial virus vaccines in chimpanzees and in human adults, infants, and children. J Infect Dis, 1997, 176(6):1428-1436
- [4] Crowe JE Jr. Respiratory syncytial virus vaccine development. Vaccine, 2001, 20(S1):32-37
- [5] Gunmathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. Annu Rev Immunol, 2000, 18:927-934

- [ 6 ]Becker Y. Respiratory syncytial virus( RSV )evades the human adaptive immune system by skewing the Th1/Th2 cytokine balance toward increased levels of Th2 cytokines and IgE, markers of allergy – a review. *Virus Genes*,2006,33( 2 ):235-252
- [ 7 ]Castilow EM, Olson MR, Varga SM. Understanding respiratory syncytial virus( RSV ) vaccine-enhanced disease. *Immunol Res*, 2007,39( 1-3 ):225-239
- [ 8 ]Groothuis JR, Simoes EA, Levin MJ, et al. Prophylactic administration of respiratory syncytial virus immune globulin to high-risk infants and young children. The respiratory syncytial virus immune globulin study group. *N Engl J Med*,1993, 329( 21 ):1524-1530
- [ 9 ]Englund JA. Passive protection against respiratory syncytial virus disease in infants: the role of maternal antibody. *Pediatr Infect Dis J*,1994,13( 5 ):449-453
- [ 10 ]Piedra PA, Jewell AM, Cron SG, et al. Correlates of immunity to respiratory syncytial virus( RSV ) associated-hospitalization: establishment of minimum protective threshold levels of serum neutralizing antibodies. *Vaccine*,2003,21( 24 ):3479-3482
- [ 11 ]Chiba Y, Higashidate Y, Suga K, et al. Development of cell-mediated cytotoxic immunity to respiratory syncytial virus in human infants following naturally acquired infection. *J Med Virol*,1989,28( 3 ):133-139
- [ 12 ]Fishaut M, Tubergen D, McIntosh K. Cellular response to respiratory viruses with particular reference to children with disorders of cell-mediated immunity. *J Pediatr*,1980,96( 2 ): 179-186
- [ 13 ]Hall CB, Powell KR, MacDonald NE, et al. Respiratory syncytial viral infection in children with compromised immune function. *N Engl J Med*,1986,315( 2 ):77-81
- [ 14 ]Vaughan K, Rhodes GH, Gershwin LJ. DNA immunization against respiratory syncytial virus ( RSV ) in infant rhesus monkeys. *Vaccine*,2005,23( 22 ):2928-2942
- [ 15 ]Harcourt JL, Anderson LJ, Sullender W, et al. Pulmonary delivery of respiratory syncytial virus DNA vaccine using macroaggregated albumin particles. *Vaccine*,2004,22( 17-18 ): 2248-2260
- [ 16 ]Iqbal M, Lin W, Jabbal-Gill I, et al. Nasal delivery of chitosan-DNA plasmid expressing epitopes of respiratory syncytial virus ( RSV ) induces protective CTL responses in BALB/C mice. *Vaccine*,2003,21( 13-14 ):1478-1485
- [ 17 ]Xie C, He JS, Zhang M, et al. Oral respiratory syncytial virus ( RSV ) DNA vaccine expressing RSV F Protein delivered by attenuated *Salmonella typhimurium*. *Hum Gene Ther*,2007,18( 8 ):746-752
- [ 18 ]Letellier C, Boxus M, Rosar L, et al. Vaccination of calves using the BRSV nucleocapsid protein in a DNA prime-protein boost strategy stimulates cell-mediated immunity and protects the lungs against BRSV replication and pathology. *Vaccine*,2008,26( 37 ):4840-4848
- [ 19 ]Temette N, Tippler B, Uberla K, et al. Immunogenicity and efficacy of codon optimized DNA vaccines encoding the F-protein of respiratory syncytial virus. *Vaccine*,2007,25( 41 ): 7271-7279
- [ 20 ]Helson R, Olszewska W, Singh M, et al. Polylactide-co-glycolide( PLG ) microparticles modify the immune response to DNA vaccination. *Vaccine*,2008,26( 6 ):753-761

( 收稿日期: 2008-10-20 修回日期: 2008-11-06 )

( 本文编辑: 丁俊杰 )

### 中国医师协会循证医学专业委员会第二届委员会改选

中国医师协会循证医学专业委员会第二届委员会第一次全体委员会议于 2008 年 10 月 26 日在北京召开。会议经民主程序选举产生了由 59 名委员组成的第二届委员会。

主任委员: 詹思延

副主任委员( 姓氏拼音排序 ): 曹立亚 丛玉隆 李幼平 王吉耀 姚 晨

常务委员( 姓氏拼音排序 ): 谌贻璞 丁 洁 黄 峻 纪立农 刘 鸣 刘保延 田少雷 王 文 王拥军  
魏万林 吴尚纯 吴一龙 薛 榆 张忠涛( 兼总干事 )

委 员( 姓氏拼音排序 ): 陈 红 崔树起 刁天喜 董碧蓉 郭艺芳 蒋立新 李 静 李 浪 李恒进  
栗克清 刘建平 刘玉秀 柳琪琳 沈曙铭 唐旭东 王 嵘 王传新 王共先  
王汉亮 王继光 王乐民 王宁利 王文清 谢雁鸣 徐佩茹 杨克虎 于雅琴  
余金明 俞光岩 曾正陪 张崇凡 张黎明 张秋航 张秀华 张玉琪 赵 英  
赵秀丽 赵一鸣 朱 俊

中国医师协会循证医学专业委员会