

日本乙型脑炎病毒强、弱毒株非结构蛋白 NS1、NS2A 和 NS1-NS2A 诱导小鼠 CD4⁺ T 细胞应答的研究

杨伟¹, 韦冠东^{1,2}, 汤德元^{1*}, 曾智勇¹, 黄涛¹,
王彬¹, 胡玲玲¹, 龙冬梅¹, 黄秋涵¹, 廖晓糠¹, 田红宇¹

(1. 贵州大学动物科学学院, 贵阳 550025; 2. 贵州大学明德学院, 贵阳 550025)

摘要: 为了解日本乙型脑炎病毒(JEV)强、弱毒株非结构蛋白的免疫效果, 笔者分析了 JEV 强、弱毒株非结构蛋白 NS1、NS2A 和 NS1-2A 真核表达的差异。通过观察 JE 减毒活疫苗(SA14-14-2 株)和 JEV 贵州分离株(GZ 株)分别在 BHK-21 细胞上出现的 CPE, 并收集强、弱毒株的细胞悬液, 提取总 RNA, 分别设计 6 对特异性引物, 应用 RT-PCR 技术扩增非结构蛋白 NS1、NS2A 和 NS1-2A 的编码基因, 构建真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-NS1r、pcDNA3.1(+)-NS2Ar、pcDNA3.1(+)-NS1-2Ar、pcDNA3.1(+)-NS1q、pcDNA3.1(+)-NS2Aq 和 pcDNA3.1(+)-NS1-2Aq, 将构建成功的 6 种真核表达质粒免疫健康小鼠, 最后采集小鼠的血液和组织分别进行 JEV 抗体检测和细胞免疫水平检测。研究结果显示: JEV GZ 强毒株与 JEV SA14-14-2 弱毒株能在 BHK21 细胞上增殖并产生 CPE 现象; 构建的 6 种真核表达质粒免疫小鼠后经血常规和 T 淋巴亚群检测可以极显著或显著增加 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞的含量。表明 JEV 强毒株非结构蛋白所诱导的细胞免疫略优于弱毒株非结构蛋白诱导的细胞免疫, 但差异不明显。本研究结果可为日本乙型脑炎病毒的病原基础研究提供参考。

关键词: 日本乙型脑炎病毒(JEV); 强毒株; 弱毒株; 非结构蛋白; 真核表达差异

中图分类号: S852.659.6

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)08-1693-08

Japanese Encephalitis Virus Virulent Strains and Attenuated Strains of Non-Structural Proteins NS1, NS2A and NS1-NS2A Induce Mouse CD4⁺ T Cell Responses

YANG Wei¹, WEI Guan-dong^{1,2}, TANG De-yuan^{1*}, ZENG Zhi-yong¹,
HUANG Tao¹, WANG Bin¹, HU Ling-ling¹, LONG Dong-mei¹,
HUANG Qiu-han¹, LIAO Xiao-kang¹, TIAN Hong-yu¹

(1. College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

2. College of Mingde, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: In order to understand the immunological effect of nonstructural protein of Japanese encephalitis virus (JEV), we analyzed the eukaryotic expression differences of NS1, NS2A and NS1-2A, nonstructural proteins of JEV. CPE was observed on BHK-21 cells by observing JE live attenuated vaccine (SA14-14-2 strain) and JEV Guizhou isolate (GZ strain) respectively. Cell suspensions of virulent, attenuated strains were collected and their total RNA were extracted. The NS1, NS2A and NS1-2A genes were amplified by RT-PCR, and six eukaryotic expression

收稿日期: 2017-07-28

基金项目: 贵州省 2017 年农业攻关项目资助(黔科合支撑[2017]2579 号); 贵州大学引进人才博士基金项目(贵大人基合字(2015)33 号); 贵州大学大学生创新创业训练计划项目(贵大(国)创字 2016(021)号)

作者简介: 杨伟(1993-), 男, 贵州松桃人, 硕士生, 主要从事动物传染病病原分子生物学研究

* 通信作者: 汤德元(1964-), E-mail: tdyuan@163.com

plasmids, pcDNA3.1(+)-NS1r, pcDNA3.1(+)-NS2Ar, pcDNA3.1(+)-NS1-2Ar, pcDNA3.1(+)-NS1q, pcDNA3.1(+)-NS2Aq and pcDNA3.1(+)-NS1-2Aq, were constructed successfully. The healthy mice were immunized with the above plasmids, and the blood and tissues of those mice were collected for JEV antibody detection and cell immunoassay respectively. The results showed that JEV GZ virulent strain and JEV SA14-14-2 virulent strain could proliferate and produce CPE on BHK21 cells; The results of routine blood tests and T lymphocyte subsets detection showed that the 6 eukaryotic expression plasmids immunization in mice increased the levels of CD4⁺ and CD8⁺ cells significantly or extremely significantly. The results indicated that the cellular immunity produced by the non-structural proteins of the attenuated strain JEV was slightly better than that produced by the non-structural proteins of the attenuated strains, but the difference was not significant. These results provide reference for the basic research of encephalitis virus pathogens.

Key words: Japanese encephalitis virus (JEV); virulent strains; attenuated strains; non-structural proteins; eukaryotic expression differences

日本乙型脑炎(Japanese encephalitis, JE)是由黄病毒科(*Flaviridae*)黄病毒属(*Flavivirus*)日本乙型脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)引起的一种危害严重的自然疫源性、虫媒性人兽共患病^[1]。猪是 JEV 重要的储存宿主与扩增宿主,感染 JEV 的猪群,大多不会死亡,多表现为生殖障碍。病猪多出现高热,精神沉郁或有神经症状,食欲减退,有的出现后肢麻痹、视力减退、摆头、乱冲撞等^[2]。猪 JE 是引起猪繁殖障碍的主要原因之一^[3],该病虽对母猪的致死率不高,但可引起怀孕母猪突然发生流产、产死胎、弱胎或木乃伊胎,公猪感染后睾丸出现急性炎症反应,多为单侧性,初期肿胀,有热痛感,数日后炎症消退,睾丸萎缩变硬,性欲减退,精液带毒,失去配种能力^[4-5],造成公猪不育,给养猪业造成严重的经济损失^[6]。JE 还严重威胁人类健康^[7]。

JEV 的基因组由 10 976 个核苷酸组成,长约 10.9 kb 的单股正链 RNA,其基因结构为 5'端有帽状结构,3'端无 PolyA 结构^[8],5'端和 3'端是病毒的非编码区,两个非编码区之间组成一个开放阅读框(ORF)为 RNA 编码区,编码一条由 3 432 个氨基酸组成的多蛋白前体,编码顺序为:5'-C-PrM-E-NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5-3'。该多蛋白前体经蛋白酶(NS3)切割加工成 3 个结构蛋白[核衣壳蛋白(C)、膜蛋白(PrM/M)、包膜糖蛋白(E)]和 7 个非结构蛋白(NS1、NS2a、NS2b、NS3、NS4a、NS4b、NS5)^[9]。NS1 蛋白可能参与病毒复制的早期阶段以及病毒组装和释放,是主要的抗原成分之

一,能刺激机体产生保护性体液免疫反应^[9]。NS1 蛋白的单克隆抗体可产生有效的保护性免疫,相关的动物试验表明,NS1 蛋白能够在致死性 JEV 的攻击下保护动物,能够诱导机体产生较好的保护力^[10],有报道称同时分别注射含 NS1 基因质粒和 E 基因质粒的免疫效果明显高于仅免疫 E 蛋白基因质粒^[11],NS1 基因和 E 基因联合表达质粒免疫效果明显优于仅免疫 E 蛋白基因质粒^[9]。NS2A 相对分子质量约为 17 ku,是参与 RNA 复制的小分子疏水膜蛋白,它顺势切割 NS1-NS2A 连接处,并参与病毒复制复合物的形成,同时在病毒的组装和释放上也起到至关重要的作用,它能通过抑制 IFN 信号通路和抑制宿主 PKR 途径从而调节宿主的抗病毒反应^[12]。

JEV 不同毒株免疫原性有所不同^[13],本研究通过 JEV 强、弱毒株接种 BHK-21 细胞分析其细胞病变效应(CPE)的差异,并构建真核表达质粒单独免疫健康小鼠,通过 JEV 抗体检测和小鼠外周血 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞含量检测,比较强、弱毒株非结构蛋白的免疫增强效果,分析强、弱毒株非结构蛋白 NS1、NS2A 和 NS1-2A 真核表达差异,寻找 JEV 的非结构蛋白与其致病机制的关系,以期为 JE 疫苗的研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 引物

JEV 贵州分离株(JEV Guizhou 株, KC915016),由本实验室分离鉴定和保存;JEV 疫苗

(成都生物制品研究所生产,生产批号:201606A081-2),由贵州大学附属医院赠送;BHK-21 细胞,本实验室传代保存;Top10 感受态细胞,由贵州大学动物科学学院生物技术试验中心保存;RNA 抽提试剂盒、内切酶 *Bam*H I、内切酶 *Xho* I 及 *Pfu* DNA 聚合酶,均购自 TaKaRa 公司;胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒,均购自 OMEGA 公司;X-gal、IPTG,购自 Solarbio 公司;猪日本乙型脑炎病毒抗体 ELISA 检测试剂盒,购自武汉科前生物工程有限公司;JEV 多克隆抗体,为中国兽医药品监

察所惠赠;其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 引物的设计与合成

根据 GenBank 上发表的 JEV SA14 株(登录号:U14163)、SA14-14-2(登录号:AF315119)和 JEV GZ 株(登录号:KC915016)的 NS1、NS2A 和 NS1-2A 基因序列,用 Primer5.0 软件设计 6 对特异性引物(表 1),并分别在引物的 5' 端设计 *Bam*H I 和 *Xho* I 限制性内切酶位点,由上海英潍捷基贸易有限公司合成,PAGE 级,OD 值为 2.0,扩增产片段长分别为 1 245、492、1 737 bp。

表 1 JEV 强弱毒株的 NS1、NS2A 和 NS1-2A 基因引物核苷酸序列

Table 1 The nucleotide sequences of NS1, NS2A 和 NS1-2A's primers

引物名称 Name	引物序列(5'→3') Sequence	酶切位点 Enzyme cutting site	扩增长度/bp Amplified fragment length
JEV _q NS1 F	5'-CGCGGATCCATGGACACTGGATGTGCCATTGAC-3'	<i>Bam</i> H I	1 245
JEV _q NS1 R	5'-CCGCTCGAGTTAAGCAGCGACTAGCACCACATACCTC-3'	<i>Xho</i> I	
JEV _q NS2A F	5'-CGCGGATCCATGGCTTTCGCAGAGGCCAACAGTG-3'	<i>Bam</i> H I	492
JEV _q NS2A R	5'-CCGCTCGAGTTATCTCTTCTTGTGGTTGC-3'	<i>Xho</i> I	
JEV _q NS1-2A F	5'-CGCGGATCCATGGACACTGGATGTGCCATTGAC-3'	<i>Bam</i> H I	1 737
JEV _q NS1-2A R	5'-CCGCTCGAGTTATCTCTTCTTGTGGTTGC-3'	<i>Xho</i> I	
JEV _r NS1 F	5'-CGCGGATCCATGGACACTGGATGTGCCATTGAC-3'	<i>Bam</i> H I	1 245
JEV _r NS1 R	5'-CCGCTCGAGTTAAGCAGCGACTAGCACCAC-3'	<i>Xho</i> I	
JEV _r NS2A F	5'-CGCGGATCCATGGCTTTCGCAGAGGCCAACAGTG-3'	<i>Bam</i> H I	492
JEV _r NS2A R	5'-CCGCTCGAGTTATCTCTTCTTGTGGTTGCA-3'	<i>Xho</i> I	
JEV _r NS1-2A F	5'-CGCGGATCCATGGACACTGGATGTGCCATTGAC-3'	<i>Bam</i> H I	1 737
JEV _r NS1-2A R	5'-CCGCTCGAGTTATCTCTTCTTGTGGTTGCA-3'	<i>Xho</i> I	

r. 弱毒株; q. 强毒株

r. Attenuated strain; q. Virulent strain

1.3 细胞接毒及总 RNA 的提取

待 BHK-21 细胞贴壁形成单层时,弃去细胞培养液,分别取 0.5 mL 处理好的本实验室保存的 JEV GZ 株的病毒上清和 JEV 疫苗悬液分别接种 BHK-21 细胞,置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中,每间隔 20 min 轻轻振摇 1 次,接毒 1 h 后轻轻吸去接种液体后,加入 5 mL 细胞维持液,待细胞出现 75% 细胞病变效应(CPE)时,收集病毒于 -80 °C 反复冻融 3 次,按 Invitrogen 公司的 TRIzol LS[®] Reagent 试剂盒操作说明书提取总 RNA。

1.4 目的基因的克隆及真核表达载体的构建和鉴定

采用高保真酶(*Pfu*)以提取的 RNA 为模板进行 RT-PCR 扩增后,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,参照 OMEGA 公司胶回收试剂盒操作说明书进行目的基因的回收纯化后,再克隆入 pMD19-T Simple 载体,阳性重组质粒菌液送 Invitrogen 公司测序。将测序正确的 pMD19-T Simple-NS1_r、pMD19-T Simple-NS2A_r、pMD19-T Simple-NS1-2A_r 和 pMD19-T Simple-NS1_q、pMD19-T Simple-NS2A_q、pMD19-T Simple-NS1-2A_q 阳性重组质粒

分别与 pcDNA3.1(+) 线性片段加入 T4 DNA Ligase 16 °C 连接至少 12 h, 连接产物转化至 Top10 感受态细胞内, 进行蓝白斑筛选, 挑选出白色阳性菌落进行菌落 PCR 鉴定及双酶切鉴定, 鉴定为阳性的重组质粒菌液送 Invitrogen 公司测序。

1.5 动物免疫试验

1.5.1 小鼠的分组及免疫程序 选取 90 只 4~5 周龄 BALB/c 小鼠, 随机分成 9 组, 每组 10 只, 按照指定的免疫方法和免疫程序进行免疫(质粒含量为 $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$): 第一组注射 pcDNA3.1(+)-NS1r $100 \mu\text{L} \cdot \text{只}^{-1}$, 第二组注射 pcDNA3.1(+)-NS2Ar $100 \mu\text{L} \cdot \text{只}^{-1}$, 第三组注射 pcDNA3.1(+)-NS1-2Ar $100 \mu\text{L} \cdot \text{只}^{-1}$, 第四组注射 pcDNA3.1(+)-NS1q $100 \mu\text{L} \cdot \text{只}^{-1}$, 第五组注射 pcDNA3.1(+)-NS2Aq $100 \mu\text{L} \cdot \text{只}^{-1}$, 第六组注射 pcDNA3.1(+)-NS1-2Aq $100 \mu\text{L} \cdot \text{只}^{-1}$, 第七组注射 JEV 减毒活疫苗 $100 \mu\text{L} \cdot \text{只}^{-1}$, 第八组注射 pcDNA3.1(+)-空载体 $100 \mu\text{L} \cdot \text{只}^{-1}$, 第九组注射生理盐水 $100 \mu\text{L} \cdot \text{只}^{-1}$, 每次免疫间隔两周, 在一免前、二免前、三免前及三免后三周, 分离血清, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

1.5.2 免疫小鼠血常规和 T 淋巴细胞亚群的检测

小鼠末次免疫三周后, 每组随机挑选 5 只小鼠采集抗凝血, 送贵阳医学院附属医院测血常规, 进行 T 淋巴细胞亚群检测。于 5 mL 流式管中, 先加入 $10 \mu\text{L}$ Rat Anti-Mouse CD3-SPRD, $10 \mu\text{L}$ Rat Anti-Mouse CD4/L3T4-FITC, $10 \mu\text{L}$ Rat Anti-Mouse CD8a/Ly-2-PE, 再取 $50 \mu\text{L}$ 抗凝血, 漩涡振荡混匀, 室温避光 15 min 后加入 1.0 mL 红细胞溶解液, 轻

弹管壁并上下颠倒离心管 3 次后避光 5 min, 再加入 1 mL PBS, $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 吸取 PBS 和红细胞的混合液至流式管划线处; 漩涡振荡混匀后, 用 FACS 检测 10 000 个细胞, 根据血常规检测的结果计算出 CD4^+ 、 CD8^+ 细胞在每立方毫米血液中的相对数, 所得数据用 SPSS 10.0 软件和 Microsoft Excel 2000 软件进行统计学分析。

2 结果

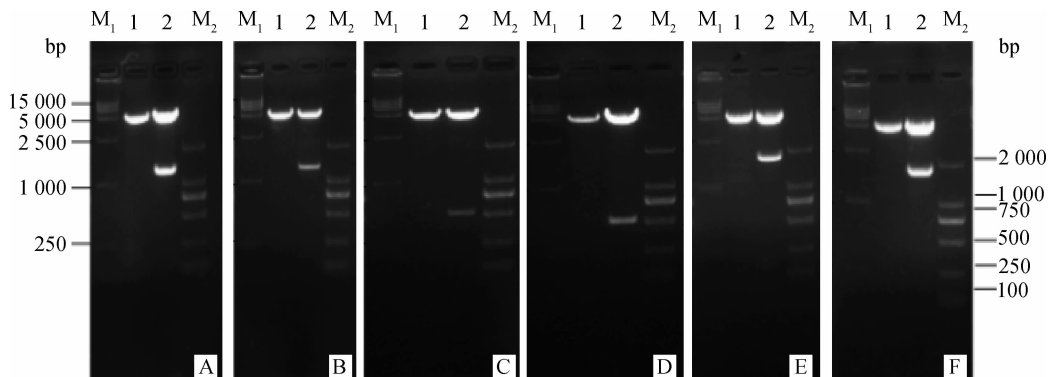
2.1 重组质粒 pcDNA3.1(+) 酶切鉴定

将构建的 6 种真核表达重组质粒用 *Bam*H I、*Xho* I 进行双酶切鉴定, 经 1% 琼脂糖凝胶中电泳检测, 6 种真核表达重组质粒 pcDNA3.1(+)-NS1r、pcDNA3.1(+)-NS1q、pcDNA3.1(+)-NS2Ar、pcDNA3.1(+)-NS2Aq、pcDNA3.1(+)-NS1-2Ar、pcDNA3.1(+)-NS1-2Aq 的双酶切鉴定结果与预期目的 DNA 片段的大小相符(图 1A~F)。

将双酶切鉴定符合预期结果的重组质粒送 Invitrogen 公司进行测序, 测序结果序列与 pMD19-T Simple 载体的测序结果相同, 表明乙型脑炎强、弱毒株非结构蛋白 NS1、NS2A 和 NS1-2A 真核表达质粒构建成功。

2.2 真核表达质粒在 BHK-21 细胞中的表达

采用脂质体转染法分别将成功构建的 6 个真核表达质粒转染至 BHK-21 细胞, 分别在转染后 24、48 和 72 h 用间接免疫荧光染色法检测真核表达质粒的表达情况, 结果在 24 h 即可检测到特异荧光, 可维持到 72 h(图 2)。

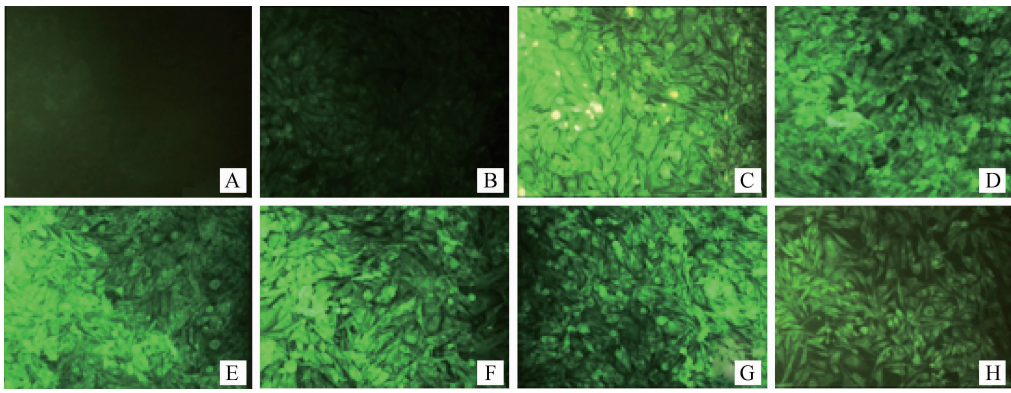


M_1 . DL15000 相对分子质量标准; M_2 . DL2000 相对分子质量标准; 1. 对照; 2. 质粒双酶切产物; A. pcDNA3.1(+)-NS1r; B. pcDNA3.1(+)-NS1q; C. pcDNA3.1(+)-NS2Ar; D. pcDNA3.1(+)-NS2Aq; E. pcDNA3.1(+)-NS1-2Ar; F. pcDNA3.1(+)-NS1-2Aq

M_1 . DL15000 marker; M_2 . DL2000 marker; 1. Control; 2. The result of double digestion of plasmid; A. pcDNA3.1(+)-NS1r; B. pcDNA3.1(+)-NS1q; C. pcDNA3.1(+)-NS2Ar; D. pcDNA3.1(+)-NS2Aq; E. pcDNA3.1(+)-NS1-2Ar; F. pcDNA3.1(+)-NS1-2Aq

图 1 重组质粒的双酶切结果

Fig. 1 The double digestion results of recombinant plasmids



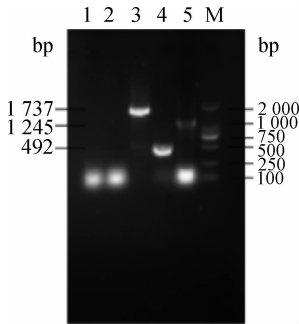
A. 阴性对照(24 h); B. pcDNA3. 1(+)-空质粒转染; C. pcDNA3. 1(+)-NS1r 转染(24 h); D. pcDNA3. 1(+)-NS1q 转染(24 h); E. pcDNA3. 1(+)-NS2Ar 转染(24 h); F. pcDNA3. 1(+)-NS2Aq 转染(24 h); G. pcDNA3. 1(+)-NS1-2Ar 转染(24 h); H. pcDNA3. 1(+)-NS1-2Ar 转染(24 h)

A. Control group (24 h); B. pcDNA3. 1 (+)-null plasmid transfection; C. pcDNA3. 1 (+)-NS1r transfection (24 h); D. pcDNA3. 1 (+)-NS1q transfection (24 h); E. pcDNA3. 1 (+)-NS2Ar transfection (24 h); F. pcDNA3. 1 (+)-NS2Aq transfection (24 h); G. pcDNA3. 1 (+)-NS1-2Ar transfection (24 h); H. pcDNA3. 1 (+)-NS1-2Ar transfection (24 h)

图 2 间接免疫荧光染色检测构建的 6 种真核表达质粒在 BHK-21 细胞中的表达情况

Fig. 2 Expression of six constructed eukaryotic expression plasmids in BHK-21 cells by indirect immunofluorescence staining

转染至 BHK-21 细胞后 24 h,收集细胞抽提总 RNA,进行 RT-PCR,电泳检测 RT-PCR 产物,电泳结果(图 3、图 4)显示扩增出目的条带,且 pcDNA3. 1(+)-转染细胞和对照细胞的 RT-PCR 结果均为阴性,证实了真核表达质粒在 BHK-21 细胞中得到表达。



1. 阴性对照;2. pcDNA3. 1(+)-转染细胞;3. pcDNA3. 1(+)-NS1-NS2Ar 转染细胞 RT-PCR 扩增产物;4. pcDNA3. 1(+)-NS2Ar 转染细胞 RT-PCR 扩增产物;5. pcDNA3. 1(+)-NS1r 转染细胞 RT-PCR 扩增产物;M. DL2000 相对分子质量标准

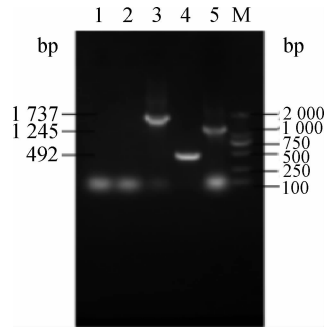
1. Control group;2. pcDNA3. 1(+)-transfected cells RT-PCR product;3. pcDNA3. 1(+)-NS1-NS2Ar transfected cells RT-PCR product;4. pcDNA3. 1(+)-NS2Ar transfected cells RT-PCR product;5. pcDNA3. 1(+)-NS1r transfected cells RT-PCR product;M. DL2000 marker

图 3 弱毒株转染细胞 RT-PCR 扩增结果

Fig. 3 SA14-14-2 strain RT-PCR results of tranfect cells

2.3 免疫小鼠血常规和 T 淋巴细胞亚群的检测

图 5 的检测结果显示 3 个对照组与 6 个免疫组 CD4⁺细胞的变化情况:与生理盐水组和空载体组



1. 阴性对照;2. pcDNA3. 1(+)-转染细胞;3. pcDNA3. 1(+)-NS1-NS2Aq 转染细胞 RT-PCR 扩增产物;4. pcDNA3. 1(+)-NS2Aq 转染细胞 RT-PCR 扩增产物;5. pcDNA3. 1(+)-NS1q 转染细胞 RT-PCR 扩增产物;M. DL2000 相对分子质量标准

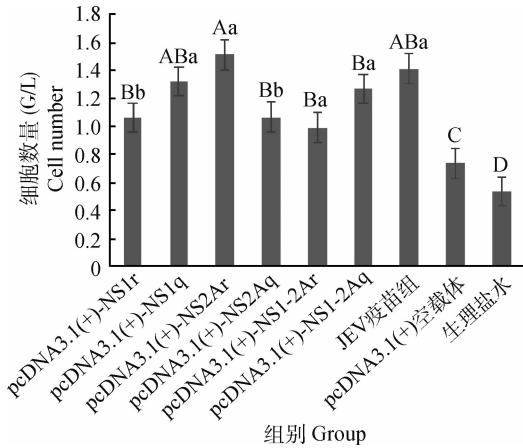
1. Control group;2. pcDNA3. 1(+)-transfected cells RT-PCR product;3. pcDNA3. 1(+)-NS1-NS2Aq transfected cells RT-PCR product;4. pcDNA3. 1(+)-NS2Aq transfected cells RT-PCR product;5. pcDNA3. 1(+)-NS1q transfected cells RT-PCR product;M. DL2000 marker

图 4 强毒株转染细胞 RT-PCR 扩增结果

Fig. 4 GZ strain RT-PCR results of tranfect cells

相比较,6 个免疫组均可以极显著($P < 0.01$)或显著($P < 0.05$)增加 CD4⁺细胞的相对数量;与 JEV 疫苗组相比,6 个免疫组除弱毒组 NS2A 蛋白增加 CD4⁺细胞的数量略高于疫苗组外,其余各组均略低于疫苗组。强、弱毒株非结构蛋白重组真核质粒同组间比较对细胞免疫 CD4⁺细胞的影响:强、弱毒株 NS1 免疫组和 NS1-2A 免疫组,均是强毒株非结构蛋白免疫组略高于弱毒株非结构蛋白免疫组,其中强、弱毒

株 NS1 免疫组差异显著 ($P < 0.05$); 强、弱毒株 NS2A 免疫组, 弱毒株免疫组增加 $CD4^+$ 细胞的数量极显著 ($P < 0.01$) 高于强毒株免疫组。



大写上标表示与相应组比较差异极显著 ($P < 0.01$); 小写上标表示与相应组比较差异显著 ($P < 0.05$)

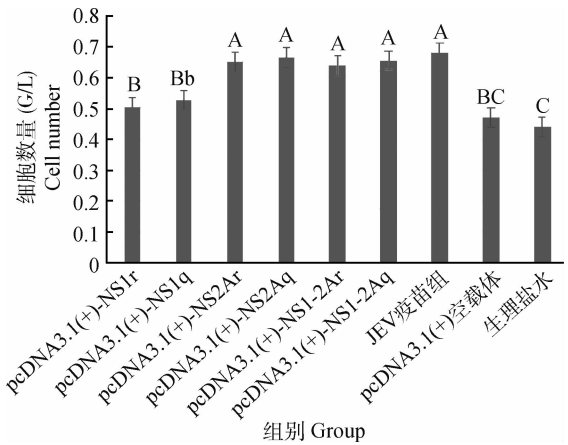
Marked with capital letter superscript means $P < 0.01$; Marked with lowercase means $P < 0.05$

图 5 免疫 BALB/c 小鼠 T 淋巴细胞亚群 $CD3^+ CD4^+$ 的变化
Fig. 5 The change of $CD3^+ CD4^+$ cells in immunized BALB/c mice

图 6 的检测结果显示 3 个对照组与 6 个免疫组 $CD8^+$ 细胞的变化情况: 与生理盐水组和空载体组相比, 6 个免疫组均可增加 $CD8^+$ 细胞的数量 (显著性见图 6); 与 JEV 疫苗组相比 6 个免疫组均略低于疫苗组增加 $CD8^+$ 细胞的数量 (显著性见图 6)。强、弱毒株非结构蛋白重组真核质粒同组间比较对细胞免疫 $CD8^+$ 的影响: 强、弱毒株 NS1 免疫组、NS2A 免疫组和强、弱毒株 NS1-2A 免疫组, 均是强毒株非结构蛋白免疫组略高于弱毒株非结构蛋白免疫组 ($P > 0.05$)。

3 讨论

为检测外源基因的表达情况, 本试验分别采用脂质体转染法将构建的 6 种真核表达质粒转染于 BHK-21 细胞中, 并分别提取转染细胞和对照细胞的总 RNA, 经 RT-PCR 检测结果显示在 24 h 分别检测到 NS1、NS2A 和 NS1-2A 的特征条带, 表明重组质粒已成功转染至 BHK-21 细胞, 通过间接免疫荧光技术检测真核表达质粒表达情况, 在转染后 36 h 构建的 6 种乙型脑炎病毒强、弱毒株非结构蛋白真核表达质粒呈现出特异荧光, pcDNA3.1(+) 空载体组合对照组没有检测到特异



大写上标表示与相应组比较差异极显著 ($P < 0.01$); 小写上标表示与相应组比较差异显著 ($P < 0.05$)

Marked with capital letter superscript means $P < 0.01$; Marked with lowercase means $P < 0.05$

图 6 免疫 BALB/c 小鼠 T 淋巴细胞亚群 $CD3^+ CD8^+$ 的变化
Fig. 6 The change of $CD3^+ CD8^+$ cells in immunized BALB/c mice

性荧光, 证明了 pcDNA3.1(+)-NS1r、pcDNA3.1(+)-NS2Ar、pcDNA3.1(+)-NS1-2Ar、pcDNA3.1(+)-NS1q、pcDNA3.1(+)-NS2Aq 和 pcDNA3.1(+)-NS1-2Aq 基因在 BHK-21 细胞中能够表达。

本试验采用间接 ELISA 方法检测体液免疫水平, 结果构建的重组真核表达质粒免疫小鼠后未能诱导机体产生较高水平的体液免疫。据相关文献报道, 重组病毒中 NS1 蛋白的有效表达、外泌及其诱生的保护性免疫, 依赖于 NS1 上有疏水信号序列及下游至少 70% NS2A 蛋白的协同^[14], 在没有 NS2A 蛋白的存在下, NS1 蛋白可能不能诱生其保护性免疫机制; NS2A 蛋白参与病毒复制复合物的形成, 同时在病毒的组装和释放上也起到至关重要的作用^[12], 国内外尚无报道证明其可以单独诱生机体产生保护性免疫; 在无 NS2A 蛋白存在的情况下, NS1-NS2A 连接处无法被切割, 则在 NS2A 蛋白协同下使 NS1 蛋白诱导机体产生保护性免疫的机制可能无法激活, 故联合蛋白无法诱导机体产生较高水平的体液免疫。构建的重组真核表达质粒免疫小鼠后未能诱导机体产生较高水平的体液免疫, 其原因可能是表达的蛋白不能够诱导产生抗体, 或者是蛋白表达量过低而与抗原结合量不足, 导致间接 ELISA 无法检测出, 具体原因还需进一步研究。

T 淋巴细胞亚群数量和比例的动态平衡是一个复杂的过程, 其调节机制并不十分清楚, 而 $CD4^+$ T

和 CD8⁺T 淋巴细胞的失调是许多疾病的主要表现特征。CD4⁺是辅助性 T 细胞表面的标志分子,一般认为 CD4⁺Th 细胞可以分泌 IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IFN- γ 等细胞因子,可诱导和增强细胞和体液免疫应答;CD8⁺T 细胞是杀伤性 T 细胞表面的标志分子,包括抑制性 T 淋巴细胞和杀伤性 T 淋巴细胞,可以分泌抑制因子,抑制 CTL 细胞和 B 淋巴细胞起到负调节作用。两种作用迥异的 T 淋巴细胞借其相互拮抗作用调节免疫应答过程,以保持免疫功能的平衡。CD3 分子能表达于全部 T 细胞上,是 T 细胞共同的表面标志。根据 CD4 和 CD8 可将 T 细胞分成两个重要亚群。CD4 存在于辅助性 T 细胞(TH)表面,而 CD8 主要存在于细胞毒性 T 细胞(CTL)表面。CD4⁺/CD8⁺ 比例高则机体自身免疫功能相对强,低则相反。本试验结果表明:pcDNA3.1(+)-NS1r、pcDNA3.1(+)-NS2Ar、pcDNA3.1(+)-NS1-2Ar 和 pcDNA3.1(+)-NS1q、pcDNA3.1(+)-NS2Aq、pcDNA3.1(+)-NS1-2Aq 免疫小鼠可以极显著或显著增加 CD4⁺细胞的相对数量;同时 CD8⁺细胞相对数量也有所增加,说明构建的真核表达质粒诱发了机体的细胞免疫。用 pcDNA3.1(+)免疫小鼠对其 CD4⁺、CD8⁺细胞的数量(与空白对照组相比较)有增强作用,这可能是因为 pcDNA3.1(+)含有以非甲基化的 CpG 为核心的免疫刺激序列可以诱导细胞免疫。强、弱毒株非结构蛋白重组真核质粒同组间比较对细胞免疫 CD4⁺的影响为:NS1 免疫组和 NS1-2A 免疫组均是强毒株非结构蛋白免疫组略高于弱毒株非结构蛋白免疫组,其中强、弱毒株 NS1 免疫组差异显著($P < 0.05$)。NS2A 免疫组弱毒株免疫组增加 CD4⁺细胞的数量略高于强毒株免疫组。强、弱毒株非结构蛋白重组真核质粒同组间比较对细胞免疫 CD8⁺的影响为:NS1 免疫组、NS2A 免疫组和强、弱毒株 NS1-2A 免疫组,均是强毒株非结构蛋白免疫组略高于弱毒株非结构蛋白免疫组。关于 JEV 的结构蛋白原核表达和真核表达的相关研究较多,非结构蛋白中 NS1 基因的研究已有很多的成果,但除 NS1 非结构蛋白基因外,其他的非结构蛋白基因研究较少^[7, 15-21],这些非结构蛋白的功能对机体的作用有许多机制不清楚,深入了解乙脑病毒非结构蛋白的作用对于乙脑疫苗的研制和乙脑的治疗有重要意义。

4 结论

综合分析数据显示,JEV 强毒株非结构蛋白所

产生的细胞免疫略优于弱毒株非结构蛋白产生的细胞免疫,但差异不明显。

参考文献(References):

- [1] 方美玉,林立辉,刘建伟. 虫媒传染病[M]. 北京:军事医学科学出版社,2005.
FANG M Y, LIN L H, LIU J W. Insect-borne infectious diseases[M]. Beijing: Military Medical Science Press, 2005. (in Chinese)
- [2] 黄庆生,马文煜,姜绍璋,等. 乙脑病毒全长 cDNA 的扩增克隆及体外转录制备感染性 RNA 的研究[J]. 中国病毒学,2000,15(4):330-335.
HUANG Q S, MA W Y, JIANG S C, et al. Amplification and cloning of full-length JEV cDNA and preparation of infectious RNA by *in vitro* transcription[J]. *Virologica Sinica*, 2000, 15(4): 330-335. (in Chinese)
- [3] 徐健,汤德元,黄涛,等. 日本乙型脑炎病毒的分离与鉴定[J]. 畜牧与兽医,2009,41(12):10-12.
XU J, TANG D Y, HUANG T, et al. Isolation and identification of Japanese encephalitis virus[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2009, 41(12):10-12. (in Chinese)
- [4] 徐高原,王祥,陈焕春,等. 乙型脑炎病毒 NS1 基因重组伪狂犬病毒的构建[J]. 畜牧兽医学报,2004,35(2):192-197.
XU G Y, WANG X, CHEN H C, et al. Construction of recombinant virus strain TK⁻/gG⁻/NS1⁺ recombinized by pseudorabies virus Ea Mutant strain TK⁻/gG⁻/LacZ⁺ and NS1 gene of Japanese encephalitis virus[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2004, 35(2):192-197. (in Chinese)
- [5] 徐健. 乙脑病毒分离株 PrM/E 和 E 基因表达载体构建及 E 基因表达的研究[D]. 贵阳:贵州大学,2010.
XU J. Construction of expression vector of PrM/E and E genes and expression of E gene in Japanese encephalitis virus isolate[D]. Guiyang:Guizhou University, 2010. (in Chinese)
- [6] 汤德元,王凤,马萍,等. 乙型脑炎病毒贵州分离株 E 基因原核表达及其免疫原性的研究[J]. 畜牧兽医学报,2012,43(8):1330-1336.
TANG D Y, WANG F, MA P, et al. The study of prokaryotic expression and immunogenicity of E gene of Japanese encephalitis virus Guizhou isolation strain [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2012, 43(8):1330-1336. (in Chinese)

- [7] 张亮,田耕,石双艳,等. RT-PCR-RFLP 方法鉴别基因 I 型和基因 III 型日本脑炎病毒[J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45(9): 1555-1560.
ZHANG L, TIAN G, SHI S Y, et al. Development of a RT-PCR-RFLP assay for differentiation of Japanese encephalitis virus genotype I and genotype III [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2014, 45(9): 1555-1560. (in Chinese)
- [8] QI W B, HUA R H, YAN L P, et al. Effective inhibition of Japanese encephalitis virus replication by small interfering RNAs targeting the NS5 gene[J]. *Virus Res*, 2008, 132(1-2):145-151.
- [9] LIN Y L, CHEN L K, LIAO C L, et al. DNA immunization with Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS1 elicits protective immunity in mice [J]. *J Virol*, 1998, 72(1):191-200.
- [10] LEE J M, CROOKS A J, STEPHENSON J R. The synthesis and maturation of a non-structural extracellular antigen from tick-borne encephalitis virus and its relationship to the intracellular NS1 protein [J]. *J Gen Virol*, 1989, 70(Pt 2):335-343.
- [11] MASON P W. Maturation of Japanese encephalitis virus glycoproteins produced by infected mammalian and mosquito cells[J]. *Virology*, 1989, 169(2):354-364.
- [12] LINDENBACH B D, RICE C M. *Trans*-complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication [J]. *J Virol*, 1997, 71(12): 9608-9617.
- [13] 冯瑶,岳辉喜,刘洪明,等. 基因 I 型猪乙型脑炎灭活疫苗免疫原性评价[J]. 畜牧兽医学报, 2017, 48(5): 889-895.
FENG Y, YUE H X, LIU H M, et al. The immunogenicity evaluation of inactivated vaccines of swine Japanese encephalitis virus genotype I [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2017, 48(5): 889-895. (in Chinese)
- [14] FALGOUT B, CHANOCK R, LAI C J. Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2a[J]. *J Virol*, 1989, 63(5):1852-1860.
- [15] 李自力,陈焕春,徐高原,等. 表达乙脑病毒 PrM 基因重组伪狂犬病病毒的构建[J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38(1): 53-58.
LI Z L, CHEN H C, XU G Y, et al. Construction of recombinant virus strain TK⁻/gG⁻/PrM⁺ recombinized by pseudorabies virus Ea mutant strain TK⁻/gG⁻/LacZ⁺ and PrM gene of Japanese encephalitis virus [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2007, 38(1): 53-58. (in Chinese)
- [16] ENDY T P, NISALAK A. Japanese encephalitis virus; Ecology and epidemiology[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2002, 267:11-48.
- [17] 王晓杜,赵凡凡,代兵,等. 猪日本乙型脑炎病毒 DNA 复制子载体的构建及外源基因表达分析[J]. 畜牧兽医学报, 2015, 46(1): 111-118.
WANG X D, ZHAO F F, DAI B, et al. Construction of DNA replicon vector of swine Japanese encephalitis virus and application of exogenous gene expression analysis[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2015, 46(1): 111-118. (in Chinese)
- [18] LIU H, CHIOU S S, CHEN W J. Differential binding efficiency between the envelope protein of Japanese encephalitis virus variants and heparan sulfate on the cell surface [J]. *J Med Virol*, 2004, 72(4): 618-624.
- [19] MIBAYASHI M, MARTÍNEZ-SOBRIDO L, LOO Y M, et al. Inhibition of retinoic acid-inducible gene mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus[J]. *J Virol*, 2007, 81(2): 514-524.
- [20] PARK G S, MORRIS K L, HALLETT R G, et al. Identification of residues critical for the interferon antagonist function of Langkat virus NS5 reveals a role for the RNA-dependent RNA polymerase domain[J]. *J Virol*, 2007, 81(13):6936-6946.
- [21] CHEN S O, TSAI T H, CHANG T J, et al. Expression of recombinant envelope protein of Japanese encephalitis virus YL strain in *Escherichia coli* possesses Hemagglutination activity [J]. *Virus Genes*, 2004, 28(2):215-221.