

# HSK 的包膜糖蛋白 gB 和 gD 与疫苗的研究新进展

关瑞娟, 亢泽峰, 李 凌

基金项目: 国家中药管理局资助项目(No. 06-07LP41); 青海省科技厅资助项目(No. 2007-N-129)

作者单位: (810007) 中国青海省西宁市, 青海省人民医院眼科

作者简介: 关瑞娟, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 角膜病。

通讯作者: 亢泽峰, 教授, 硕士研究生导师. zefeng2531@163.com

收稿日期: 2012-03-27 修回日期: 2012-04-23

## New research progress in envelope glycoprotein gB and gD and vaccine of herpes simplex keratitis

Rui-Juan Guan, Ze-Feng Kang, Ling Li

**Foundation items:** State Administration of Traditional Chinese Medicine Funded Projects (No. 06-07LP41); Qinghai Provincial Science and Technology Department Funded Project (No. 2007-N-129) Department of Ophthalmology, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810007, Qinghai Province, China

**Correspondence to:** Ze-Feng Kang. Department of Ophthalmology, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810007, Qinghai Province, China. zefeng2531@163.com

Received: 2012-03-27 Accepted: 2012-04-23

### Abstract

• Glycoprotein B, D (gB, gD) are essential components for infection by herpes simplex virus-1 (HSV-1), possess important epitope, participate in viral transmembrane process, mediate virus spreading between the cells, and play an important role in the process of host immune and viral infection. The study of their molecular and functional properties has important significance for research of herpes simplex keratitis (HSK) mechanism of action and prevention. In recent years, the research in HSVgB, HSVgD has certain progress, already developed vaccine specific to HSVgB, HSVgD epitope. Here, we reviewed the research progress in HSK related gB, gD and vaccine.

• **KEYWORDS:** herpes simplex keratitis; glycoprotein B, D; vaccine

Guan RJ, Kang ZF, Li L. New research progress in envelope glycoprotein gB and gD and vaccine of herpes simplex keratitis. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(6):1076-1077

### 摘要

包膜糖蛋白 gB, gD 是参与单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus, HSV) 感染的基本结构蛋白, 具有重要的抗原表位, 参与病毒穿膜过程, 介导了病毒的细胞间扩散, 在病毒感染和宿主免疫过程中起着重要作用, 其分子和功能特性的研究对 HSV 作用机制及预防的研究有着重要意义。近年

来, 该领域的研究取得一定进展, 针对 HSVgB, HSVgD 的抗原表位已研究出相应疫苗, 本文将对与单纯疱疹病毒性角膜炎 (herpes simplex keratitis, HSK) 有关的糖蛋白 gB, gD 与疫苗的研究进展做一简要综述。

**关键词:** 单纯疱疹病毒性角膜炎; 糖蛋白 B, D; 疫苗  
DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.06.19

关瑞娟, 亢泽峰, 李凌. HSK 的包膜糖蛋白 gB 和 gD 与疫苗的研究新进展. *国际眼科杂志* 2012;12(6):1076-1077

### 0 引言

单纯疱疹性角膜炎 (herpes simplex keratitis, HSK) 是宿主感染单纯疱疹病毒 1 型 (herpes simplex virus type 1, HSV-1) 后在角膜引起的免疫病理性疾病, HSV-1 终身潜伏在三叉神经节内, 角膜感染的反复发作最终致盲<sup>[1]</sup>, 然而多年来针对复发性 HSK 确没有有效药物。随着对 HSV 包膜糖蛋白的分子生物学研究, 加深了人们对 HSV 的了解如包膜糖蛋白在病毒侵入细胞及细胞之间的传播中起着重要作用<sup>[2]</sup>, 其分子和功能特性的研究对了解 HSK 的发病机制及治疗有重要意义。针对这一点做一简要综述。

### 1 HSV-1 包膜糖蛋白

**1.1 包膜糖蛋白基因组结构** HSV 为有包膜 DNA 病毒, 属疱疹病毒科  $\alpha$  亚科。病毒体直径为 120 ~ 150nm, 其基因组为一线性双链 DNA 分子, 由共价连接的长片段 (L) 和短片段 (S) 组成, 两者分别占病毒 DNA 的 82% 和 18%, 每一片段由中间的独特序列 (U) 和两端的倒置重复序列组成, 根据 L 和 S 片段相互连接方式的不同可有 4 种同分异构体。迄今为止已测定了 HSV-1 和 HSV-2 基因组的全部序列, 序列分析显示二者在核苷酸序列、框架结构、编码蛋白质功能上存在较大同源性。HSV 分为 I 型和 II 型, 目前认为 HSV 基因组有 34 个基因, 编码 70 多种蛋白质, 其中包膜糖蛋白正式命名的有 11 种, 分别为 gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL 和 gM。它们以独特或复合体的形式在 HSV 复制循环及病毒的感染致病中发挥不同的作用<sup>[3]</sup>, 在其已知的 11 种包膜糖蛋白中, 与 HSV-1 感染有关的膜蛋白包括: gB, gC, gD, gH, gL, 它们与其配体连接在一起进入靶细胞<sup>[4]</sup>。

**1.2 包膜糖蛋白 gB 的结构与功能** gB 糖蛋白基因 (HSV-1) 全长 2 712bp, 编码 29 个氨基酸序列信号肽、696 氨基酸序列胞外区、69 个氨基酸序列的跨膜区、109 个氨基酸序列的胞内区。gB 蛋白是 HSV-1 感染宿主 T 淋巴细胞的主要靶抗原。HSV 的原发感染即诱导针对 gB 的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 反应, 病毒表达 gB 并活化 T 细胞在 1 ~ 2h 内达到高峰, 小鼠脾中 gB 特异性 CTL 占有 HSV 特异性 CTL 的 55% ~ 77%<sup>[5]</sup>。gB 是 HSV-1 感染宿主的基本组成元件。因为大多数哺乳类动物拥有 PILR- $\alpha$  基因, PILR- $\alpha$  可能在免疫细胞的调节过程中起重要作用<sup>[6]</sup>。有学者研究证明<sup>[4]</sup> HSV-1 感染的细胞表达的 PILR- $\alpha$  (配对

的免疫球蛋白受体- $\alpha$ )是gB的配体,并且用突变体的实验证实了gB同PILR- $\alpha$ 的相互作用介导了HSV-1的感染。

**1.3 包膜糖蛋白gD的结构与功能** gD由HSV的US6基因编码,基因序列长185bp,含有131个氨基酸,是病毒包膜的主要成分,它能够促进病毒包膜与细胞的融合、介导病毒在胞间扩散和释放。gD的功能很大程度上取决于它的结构,gD为一个四聚体,4个邻近的单体相互连接,中间有一极明显的口袋结构。gD的结构依赖3个完整的二硫键来维持。gD共有7个cys,其中cys1(aa66)与cys5(aa189),cys2(aa106)与cys6(aa202),cys3(aa118)与cys4(aa127)相连构成二硫键桥,为高度保守的序列。gD有4个区域在病毒的穿膜过程中起重要作用,分别位于27~43aa,126~161aa,225~246aa和227~310aa,它们可能在感染过程的不同阶段发挥作用。gD在病毒的复制和刺激中和抗体的产生中起重要作用,也是宿主细胞免疫和体液免疫反应的主要靶标之一。gD与多种受体相互作用介导病毒的穿膜,并可阻断细胞凋亡。受体包括属于肿瘤坏死因子(TNF)家族的HVEM(herpes virus entry mediator),6-磷酸甘露糖,免疫球蛋白超家族的PILR- $\alpha$ (配对的免疫球蛋白受体- $\alpha$ )、nectin-1(粘蛋白-1)、nectin2(粘蛋白-2)<sup>[7,9]</sup>。有学者研究表明,病毒能够成功进入人上皮细胞,但是这一侵入过程依赖于细胞膜上的受体粘蛋白-1,HVEM,和PILR- $\alpha$ 。

## 2 HSV-1 疫苗

包膜糖蛋白是HSV感染发病的关键所在,大量的免疫学研究表明,gD(glycoprotein D)和gB(glycoprotein B)能诱导细胞和体液免疫,绝大多数HSV疫苗的研究都集中于对HSV糖蛋白gB和gD<sup>[10]</sup>的研究,因其两者在HIV表达量最大、在机体引起的保护性免疫反应最为重要而被重组技术列为第一位被识别和表达的糖蛋白<sup>[11]</sup>。国内外学者认为应用针对HSV特异性主动免疫的基因疫苗是控制HSV感染的最有效途径,并且对基因疫苗功能的研究和鉴定具有重大意义。HSV主要分为1型(HSV-1)和2型(HSV-2),一般来说,两者分别感染面部、眼部、口腔和生殖器,两者的基因组有80%的同源性<sup>[12]</sup>。

**2.1 HSV-gB 疫苗** gB糖蛋白基因编码29个氨基酸序列信号肽,696氨基酸序列胞外区,69氨基酸序列的跨膜区、109氨基酸序列的胞外区,去除部分信号肽序列不影响gB糖蛋白的分泌表达<sup>[13]</sup>,李光源等<sup>[5]</sup>选用HSV-gB去除N端部分信号肽序列(39bp)的基因片段(2673bp)构建了HSV-gB基因疫苗,经小鼠动物实验证实,结果显示HSV-gB基因疫苗能够诱导小鼠产生较好的细胞免疫应答,表现为CTL活性增强,BALB-c小鼠脾CD4<sup>+</sup>T细胞增加,这给HSV持续感染患者的治疗带来了新的希望。

**2.2 HSV-gD 疫苗** gD是一种典型的跨膜蛋白,切除C端25aa的信号肽加工后形成成熟的gD分子(369aa),靠近C端有疏水性的跨膜结构域(TMR)。HSV-gD疫苗是一种亚单位疫苗,是利用基因工程方法合成的纯化gD。gD有多个中和表位,能诱导细胞和体液免疫反应,对HSV-1和HSV-2的感染均有保护作用,是HSV疫苗研究的主要对象<sup>[14,15]</sup>。Chiron和GlaxoSmithKline(GSK)公司的gD2亚单位疫苗临床研究表明,该疫苗可以诱发较高的中和抗体,对HSV感染者和疾病患者有一定的保护作用,不同程度地降低被病毒感染后的发病率和致死率。李智华等<sup>[16]</sup>采用毕赤酵母表达载体pPIC9K进行重组gD的表

达研究,该菌株能稳定分泌表达gD重组蛋白。表达产物经SDS-PAGE,Western blot等分析,所获得的重组分泌型gD的主要分子量条带约为44kDa,可与HSV-1gD单克隆抗体(1-I-9)特异性结合,且存在一定程度的糖基化,将纯化后的重组gD蛋白免疫接种BALB/c小鼠后可诱导针对gD的特异性体液免疫应答。

综上所述,由于HSV糖蛋白及其受体的相互作用在病毒作用机制及宿主反应中的重要作用,已经成为HSV研究的热点问题。近年来,这方面的研究取得了不少进展,但就HSV的11种包膜糖蛋白的结构、功能及其疫苗研制方面而言,仍需深入研究。目前疱疹病毒感染及机体保护性免疫有关的多种因素尚未清楚,如何提高外源基因的表达等均有待进一步研究。随着免疫机制、病毒潜伏感染机制及病毒免疫逃避机制等基础研究不断深入,将推动HSV疫苗的发展,为HSV患者带来福音。

### 参考文献

- 1 Itzhaki R, Wozniak M. Herpes simplex virus type 1, apolipoprotein E, and cholesterol: A dangerous liaison in Alzheimer's disease and other disorders. *Prog Lipid Res* 2006;45(1):73-90
- 2 Vchida H, Shah WA, Ozuor A, et al. Generation of herpesvirus entry mediator (HVEM)-restricted herpes simplex virus type 1 mutant viruses: resistance of HVEM-expressing cells and identification of mutations that rescue nectin-1 recognition. *J Virology* 2009;83(7):2951-2961
- 3 金奇. 医学分子病毒学. 北京: 北京科学出版社 2001:105-107
- 4 Satoh T, Arai J, Suenaga T, et al. PILRalpha is a herpes simplex virus-1 entry coreceptor that associates with glycoprotein B. *Cell* 2008;132(6):935-944
- 5 李光源, 贺冰, 冯非, 等. 单纯疱疹病毒I型糖蛋白B基因疫苗的构建及细胞免疫学研究. *中国免疫学杂志* 2005;21(7):535-539
- 6 Wilson MD, Cheung J, Martindale DW, et al. Comparative analysis of the paired immunoglobulin-like receptor (PILR) locus in six mammalian genomes: duplication, conversion, and the birth of new genes. *Physiol Genomics* 2006;27(3):201-218
- 7 Akhtar J, Kovacs M, Oh M, et al. HVEM and nectin-1 determine herpes simplex virus 1 (HSV-1) entry into human conjunctival epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(9):4026-4035
- 8 Pepose JS, Keadle TL, Morrison LA. Ocular herpes simplex: changing epidemiology, emerging disease patterns, and the potential of vaccine prevention and therapy. *Am J Ophthalmol* 2006;141(3):547-557
- 9 Shukla SY, Singh Y, Shukla D. Role of nectin-1, HVEM, and PILR-alpha in HSV-2 entry into human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(6):2878-2887
- 10 Rajcani J, Durmanova V. Developments in herpes simplex virus vaccines: old problems and new challenges. *Folia Microbiol (Praha)* 2006;51(2):67-85
- 11 Spear PG. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell Microbiol* 2004;101(50):401-410
- 12 McGeoch DJ, Dolan A, Jamieson FE, et al. Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *Mol Biol* 1995;247(3):443-458
- 13 Nass PH, Elkins KL, Weir JP. Protective immunity against herpes simplex virus generated by DNA vaccination compared to natural infection. *Vaccine* 2001;19(11-12):1538
- 14 Stanberry LR, Spruance SL, Cunningham AL, et al. Glycoprotein-D-adjunct vaccine to prevent genital herpes. *N Engl J Med* 2002;347(21):1652-1661
- 15 Bourne N, Bravo FJ, Francotte M, et al. Herpes simplex virus (HSV) type 2 glycoprotein D subunit vaccines and protection against genital HSV-1 or HSV-2 disease in guinea pigs. *J Infect Dis* 2003;187(4):542-549
- 16 李智华, 徐维明, 姬秋彦, 等. 单纯疱疹病毒I型糖蛋白D在酵母中的表达. *中国病毒学* 2006;21(1):6-10