

HSV-1 糖蛋白 B 和糖蛋白 D 重组抗原表位串联疫苗的构建及免疫保护作用研究

刘雨轩^{1,2,3}, 董晓鸣^{1,2,3}, 杨吉琨⁴, 张劲松^{1,2,3,4}, 王 静^{1,2,3,4,5}

引用:刘雨轩,董晓鸣,杨吉琨,等. HSV-1 糖蛋白 B 和糖蛋白 D 重组抗原表位串联疫苗的构建及免疫保护作用研究. 国际眼科杂志, 2025,25(4):530-536.

基金项目:湖南省自然科学基金项目(No.2021JJ40003);湖南省湘江公益基金项目(No. KY24003);沈阳市科学技术计划公共卫生研发专项(No.21-173-9-12);沈阳市青年科技创新人才支持计划项目(No.RC210388);爱尔眼科医院集团临床研究所科研基金项目(No.AR2202D1)

作者单位:¹(110000)中国辽宁省沈阳市,爱尔集团眼科医院集团白内障与人工晶状体研究所;²(110000)中国辽宁省沈阳市,沈阳爱尔眼科精准医疗研究所;³(110000)中国辽宁省沈阳市,辽宁爱尔眼科医院;⁴(110000)中国辽宁省沈阳市,沈阳爱尔卓越眼科医院;⁵(410004)中国湖南省长沙市,中南大学爱尔眼科学院

作者简介:刘雨轩,硕士,助理研究员,研究方向:白内障及后发性白内障的药物治疗。

通讯作者:王静,博士,主任医师,研究方向:白内障、青光眼及其他相关眼病. wj047322@163.com

收稿日期:2024-09-04 修回日期:2025-02-28

摘要

目的:构建 1 型单纯疱疹病毒(HSV-1)糖蛋白 B(gB)和糖蛋白 D(gD)重组抗原表位核酸疫苗,并进一步研究该疫苗在动物模型中的免疫保护作用及组织表达。

方法:筛选 HSV-1 的 gB、gD 表位基因进行串联,构建重组蛋白编码基因 X,并转入原核表达载体 PET28(a),利用重组蛋白制备单克隆抗体,免疫新西兰大白兔心脏采血分离血清检测纯化蛋白的免疫原性及血清中的多克隆抗体并获取血清抗体效价。构建真核表达载体 pcDNA3.1-X,并采取肌肉注射的方式对 4-6 wk BALB/c 雌性小鼠进行 3 针免疫程序,ELISA 实验法检测血清中抗体及免疫相关的细胞因子,免疫组化检测小鼠眼球、三叉神经节和脑组织中蛋白 X 的表达。

结果:重组蛋白 X 免疫大兔后,在兔血清中检测到目的多克隆抗体,血清抗体的效价为 1:3200。小鼠免疫真核重组质粒 pcDNA3.1-X 后,血清中检测到了实验组的 HSV-1 IgM 抗体含量为 12.13 ± 0.85 ng/L,显著高于载体对照组 (0.49 ± 0.44 ng/L) ($t = 21.07, P < 0.001$)。实验组细胞因子 IL-2、IL-4、IL-10、IFN- γ 的含量分别为 11.63 ± 0.60 、 22.65 ± 1.47 、 85.75 ± 14.12 、 114.90 ± 6.39 ng/L,均显著高于载体对照组和空白对照组(均 $P < 0.05$)。免疫组织化学染色法表明实验组眼球、三叉神经节和脑组织中均发现目的蛋白 X 的表达。

结论:本研究成功构建了 HSV-1 gB 和 gD 串联表位核酸疫苗,能够诱导机体产生较强的免疫应答,并能在眼球、三叉神经节和脑组织中稳定表达,具有较强的免疫原性,为

HSV-1 重组抗原表位串联疫苗的研制提供了基础数据。

关键词:1 型单纯疱疹病毒(HSV-1);核酸疫苗;糖蛋白 B;糖蛋白 D;抗体

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2025.4.03

Construction of recombinant epitope tandem vaccine of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B and glycoprotein D and its immunoprotective effect

Liu Yuxuan^{1,2,3}, Dong Xiaoming^{1,2,3}, Yang Jikun⁴, Zhang Jinsong^{1,2,3,4}, Wang Jing^{1,2,3,4,5}

Foundation items: Natural Science Foundation of Hunan Province (No. 2021JJ40003); Xiangjiang Philanthropy Foundation (No. KY24003); Shenyang Science and Technology Plan Public Health R&D Special Project (No.21-173-9-12); Shenyang Youth Science and Technology Innovation Talent Support Program Project (No. RC210388); Research Fund Project of Clinical Research Institute of Aier Ophthalmology Hospital Group (No.AR2202D1)

¹Aier Institute of Cataract and Intraocular lens, Shenyang 110000, Liaoning Province, China; ²Shenyang Aier Ophthalmology Institute of Precision Medicine, Shenyang 110000, Liaoning Province, China; ³Liaoning Aier Eye Hospital, Shenyang 110000, Liaoning Province, China; ⁴Shenyang Aier Excellence Eye Hospital, Shenyang 110000, Liaoning Province, China; ⁵Aier School of Ophthalmology, Central South University, Changsha 410004, Hunan Province, China

Correspondence to: Wang Jing. Aier Institute of Cataract and Intraocular lens, Shenyang 110000, Liaoning Province, China; Shenyang Aier Ophthalmology Institute of Precision Medicine, Shenyang 110000, Liaoning Province, China; Liaoning Aier Eye Hospital, Shenyang 110000, Liaoning Province, China; Shenyang Aier Excellence Eye Hospital, Shenyang 110000, Liaoning Province, China; Aier School of Ophthalmology, Central South University, Changsha 410004, Hunan Province, China. wj047322@163.com

Received:2024-09-04 Accepted:2025-02-28

Abstract

• AIM: To design and construct recombinant epitope nucleotides vaccine of glycoprotein B (gB) and glycoprotein D (gD) of herpes simplex virus type 1 (HSV-1), and to investigate its immunoprotective effects and tissue expression in animal models.

• METHODS: The HSV-1 gB and gD epitope genes were selected and tandem assembled to construct the

recombinant protein - coding gene X, which was transduced into the prokaryotic expression vector pET28 (a). The recombinant protein was synthesized and utilized to generate monoclonal antibodies, which were subsequently used to immunize New Zealand white rabbits. The immunogenicity of the purified protein and the presence of polyclonal antibodies in the serum were tested through separating serum from cardiac blood, and the serum antibody titers were determined. The pcDNA 3.1-X was successfully constructed as a eukaryotic expression vector and immunized the female BALB/c mice aged 4 to 6 wk *via* intramuscular injection. Serum antibodies and immune-related cytokines were quantified using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of the X protein in the ocular, trigeminal ganglion, and brain tissues of the mice was assessed.

• **RESULTS:** The target polyclonal antibody was identified with a serum antibody titer of 1:3200 in the rabbit serum after immunized by recombinant protein X. Upon immunizing mice with the eukaryotic recombinant plasmid pcDNA3.1-X, the concentration of HSV-1 serum IgM antibodies of the experimental group was 12.13 ± 0.85 ng/L, which was significantly higher than that of the vector control group (0.49 ± 0.44 ng/L; $t = 21.07$, $P < 0.001$). The concentrations of cytokines interleukin IL-2, IL-4, IL-10, and IFN- γ in the experimental group were 11.63 ± 0.60 , 22.65 ± 1.47 , 85.75 ± 14.12 , and 114.90 ± 6.39 ng/L, respectively, all of which were significantly higher than those in the vector control group and the blank control group (all $P < 0.05$). Immunohistochemical staining revealed the presence of target protein X in the eyeball, trigeminal ganglion, and brain tissue.

• **CONCLUSION:** The HSV-1 gB and gD tandem epitope nucleotides vaccine pcDNA3.1-X was successfully constructed, which activates a remarkable immune response and is stably expressed in the eyeball, trigeminal ganglion, and brain tissue. This study provides a foundation for further research of an HSV-1 recombinant antigen epitope tandem vaccine.

• **KEYWORDS:** herpes simplex virus type 1 (HSV-1); nucleic acid vaccine; glycoprotein B; glycoprotein D; antibody

Citation: Liu YX, Dong XM, Yang JK, et al. Construction of recombinant epitope tandem vaccine of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B and glycoprotein D and its immunoprotective effect. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)*, 2025, 25(4): 530-536.

0 引言

据统计,在全球范围内 1 型单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus type 1, HSV-1) 影响了近 37 亿 0-49 岁的患者^[1]。HSV-1 感染角膜或大脑,可能分别导致失明^[2]或对生命存在威胁的脑炎^[3]。其中,单疱病毒性角膜炎 (human simplex keratitis, HSK) 是一种严重的致盲眼病,其发病率和致盲率均占角膜病的首位。HSK 主要由于 HSV-1 感染所致并会对视力造成巨大的损伤。HSV 分为 HSV-1 型和 HSV-2 型两个血清型,其中 HSV-1 型可引起大多数眼部的感染。与 HSV-1 型相比,HSV-2 型主要

感染生殖器,其对眼部感染的风险很低。值得注意的是,HSK 的发病率呈现上升趋势,造成这种现象的主要原因为:HSV 病毒的免疫逃逸功能^[4]以及近年来抗病毒药物和皮质类固醇的广泛应用所造成耐药突变株的增加^[5]。因此,研制预防 HSV-1 病毒感染、潜伏和复发的疫苗具有深远的意义,并成为了未来重点的研究方向。

HSV 的包膜糖蛋白是细胞免疫和体液免疫的主要诱导物和靶点^[6]。HSV-1 的包膜中嵌入了 17 种病毒编码的蛋白质,其中有 12 种是具有免疫原性的糖蛋白^[7-8],分别为糖蛋白 B (glycoprotein B, gB)、gC、gD、gE、gG、gH、gI、gJ、gK、gL、gM、gN,且它们在免疫应答与病毒的中和作用中扮演重要的角色^[6,9]。HSV-1 侵染细胞的过程需要病毒颗粒表面多种糖蛋白的协调相互作用,与 gB、gD、gH 和 gI 四种糖蛋白的作用密不可分^[10-11]。gB 是疱疹病毒亚家族中最保守的糖蛋白之一^[12]。HSV-1 gB 是一种 III 类融合糖蛋白,是抗体介导免疫的主要靶标^[13]。gD 是受体结合蛋白,其与受体的结合促使其与激活的异二聚体 gH/gL 相互作用,从而触发 gB 发生构象变化并介导病毒与细胞膜的融合^[11]。Cairns 等^[14]研究表明感染了 HSV 的患者会产生针对 gD 或 gD+gB 组合的中和抗体,而 gH/gL 并没有引起主要的中和抗体反应。目前,DNA 疫苗成为研究的热点,其具有低成本、高稳定性和安全性、无感染和复制能力等特点^[15]。此外,DNA 疫苗能在单个核酸疫苗制剂中组合多个抗原编码序列进而提供一个多功能的平台,使得 DNA 载体能够编码一个融合基因^[16]。因此,在 DNA 疫苗的制备过程中,将几种变异较小且在免疫应答中发挥作用的蛋白的编码基因序列通过共价串联所形成的重组蛋白可能会增强靶抗原免疫原性,同时重组蛋白会赋予靶抗原成为一种具有特定形式的多价疫苗的可能^[17]。

本研究按照表位在基因组上的顺序对 gB 和 gD 细胞表位进行串联获得了串联基因 X,通过构建原核表达载体 pET-28a-X,对目的蛋白的表达进行鉴定,应用纯化后的重组蛋白免疫新西兰大兔制备多克隆抗体,评估疫苗效价及血清稀释的最大倍数,最后应用 pcDNA3.1-X 重组质粒免疫 BALB/c 小鼠,评估血清中的 HSV-1 IgM 及多种免疫相关细胞因子,并检测蛋白 X 在小鼠的多种组织中的表达情况。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 **菌株与质粒** 大肠杆菌 BL21 (DE3) (C1400)、大肠杆菌 E.coli DH5 α (C1100) (北京索莱宝科技有限公司);原核表达质粒 PET28a (+) (VT1207)、真核表达载体 pcDNA3.1 (+) (VT1001) (广州优宝生物科技有限公司)。

1.1.2 **主要试剂** BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (WLA004)、SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (WLA013)、Western 洗涤液 (WLA025)、SDS-PAGE 电泳液 (干粉) (WLA026) (沈阳万类生物科技有限公司);SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (WLA005)、ECL 发光液 (WLA003)、羊抗兔 IgG-HRP (WLA023)、ELISA 显色剂 (WLA041a)、HRP 标记山羊抗兔 IGG (WLA023a) (沈阳万类生物科技有限公司);咪唑 (I108707,阿拉丁生化科技股份有限公司);彩色预染蛋白 marker (BL712A,兰杰柯科技有限公司);PVDF 膜 (IPVH00010,美国 Millipore 公司);6 * His, His-Tag Monoclonal antibody (66005-1-Ig, Proteintech 公司);弗氏

完全佐剂(F5881)、弗式不完全佐剂(F5506)(美国SIGMA公司);预染蛋白分子量标准(26616,加拿大Fermentas公司);Mouse IL-2 ELISA Kit(EK202)、Mouse IL-4 ELISA Kit(EK204)、Mouse IL-10 ELISA Kit(EK210)、Mouse IFN- γ ELISA Kit(EK280,杭州联科生物技术股份有限公司);Mouse HSV-1 IgM ELISA Kit(AD42459,武汉艾迪生物科技有限公司);HRP标记山羊抗兔IgG(31460,美国Thermo Fisher Scientific公司);过氧化氢(10011218)、无水乙醇(10009218)(中国医药集团有限公司);苏木精(H8070,北京索莱宝科技有限公司);BSA粉末[A602440-0050,生工生物工程(上海)股份有限公司];DAB显色液(DAB-1031,福州迈新生物技术开发有限公司)。

1.1.3 实验动物 选取健康4-6周龄雌性BALB/c小鼠9只[辽宁长生生物技术股份有限公司,SCXK(辽)2020-0001],健康3月龄雄性新西兰大白兔3只[天津裕达实验动物养殖有限公司,SCXK(津)2021-0001]。本研究经爱尔眼科医院集团伦理委员会批准(批文号2020KJB0041),动物使用符合美国视觉和眼科研究协会的动物使用宣言规定。

1.2 方法

1.2.1 gB及gD重组串联抗原疫苗的设计 HSV-1 gB和gD糖蛋白的抗原表位由张劲松课题组惠赠^[18],具体实验的设计方案均体现在本课题组申请发明专利中^[19]。核酸序列的构建如下:在目的基因中添加起始密码子(ATG),终止密码子(TAA)及免疫球蛋白IgE引导序列,两端加入EcoRI/Xho I酶切位点,并在末端添加His-Tag标签。

1.2.2 原核表达载体PET-X的构建 构建PET-X原核表达载体,转入大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞中^[20],筛选阳性克隆,并扩大培养,待菌液OD600值接近0.6-0.8时,在23℃条件下应用0.4 mmol/L IPTG诱导表达8 h。随后,低温离心获取菌体沉淀,PBS重悬,超声波破碎,离心收集沉淀,超声裂解,吸取少量上清鉴定目的蛋白的表达情况。

1.2.3 Western blot 鉴定重组蛋白表达 首先,将待纯化的蛋白上清通过0.22 μ m滤膜,并经过PBS洗涤后的Ni-NTA柱3次。其次,PBS洗涤纯化柱2次出去部分杂质和结合不牢靠的蛋白后,分别用不同浓度的咪唑缓冲液洗脱,并收集蛋白。分别用纯水和20%的乙醇流洗,并将柱子于低温环境中保存。随后取样SDS-PAGE电泳分析,鉴定目的条带,并应用BCA法测定蛋白浓度。电泳结束后,取出凝胶,蒸馏水洗,考马斯亮蓝染色液中浸泡,水平摇床轻摇20 min。染色结束后,将凝胶浸泡在考马斯亮蓝脱色液中,水平摇床轻摇脱色,脱色结束后,拍照记录。电转移至PVDF膜上并用5%脱脂奶粉进行封闭,加入一抗His-tag抗体(1:5000稀释)并于4℃冰箱过夜孵育。随后,TBST洗膜,并加入相应的二抗(1:5000稀释),压膜机封口后置于37℃孵育。TBST洗膜,加入ECL超敏显色液显色。

1.2.4 多克隆抗体的制备及效价检测 将3只3月龄的雄

性新西兰大白兔分为:空载体组(1只)和免疫重组蛋白X组(2只)。每组背部皮下多点注射免疫重组抗原200 μ g,每2 wk免疫1次,共3次。免疫前均要采血留样,最后一次免疫14 d后耳静脉采血评估效价(达到1:1000以上),取血并分离血清。取纯化后的蛋白为样本,获取的血清为一抗,检测纯化蛋白免疫原性及血清中的多克隆抗体。稀释包被液,纯化蛋白包被96孔板(抗原为50 mg/L的纯化蛋白),4℃过夜。按梯度稀释大兔血清,37℃孵育2 h,随后清洗。加入二抗(1:1000稀释),37℃反应孵育2 h,PBST洗板。TMB显色液显色,读取450 nm吸光值。比较阳性血清与阴性血清的OD450值。稀释的兔血清为P,正常的血清为阴性对照N(P/N \geq 2.1)。

1.2.5 真核表达载体pcDNA3.1-X免疫动物 构建真核表达载体,免疫动物过程如下^[21]:取9只4-6 wk的BALB/c小鼠,分为实验组(3只)、载体对照组(3只)和空白对照组(3只)。实验组肌肉注射pcDNA3.1-X,载体对照组肌肉注射含有pcDNA3.1,空白对照组肌肉注射同体积且无菌的PBS溶液,每只100 μ L,即每只小鼠注射100 μ g质粒。每隔2 wk免疫1次,共计3次免疫。

1.2.6 小鼠血清中的HSV-1抗体及免疫相关细胞因子的测定 末次免疫2 wk后采血分离血清,ELISA法测定血清中的抗体^[22]。间接法测定血清中HSV-1 IgM、抗体,具体实验操作遵循试剂盒中的说明书。免疫相关细胞因子(IL-2、IL-4、IL-10、IFN- γ)测定方法具体如下:5倍稀释血清,并设立空白对照,96孔板37℃温浴30 min,洗涤液洗板5次,每次30 s。加入酶标试剂37℃孵育30 min,洗涤液洗板5次,每次30 s,随后37℃避光显色15 min中止反应,在450 nm处用酶标仪读取吸光度值。

1.2.7 重组蛋白X在相应组织中的表达 免疫组织化学法鉴定小鼠的眼球、三叉神经节及脑组织中重组蛋白X的表达,末次免疫2 wk后应用异氟烷麻醉后采血处死小鼠,取上述组织,中性福尔马林液固定,乙醇脱水,二甲苯透明,浸蜡,石蜡切片的厚度为5 μ m,并移到载玻片上,进行抗原修复和过氧化氢孵育并滴加1%的BSA封闭,多克隆抗体制备过程中重组蛋白免疫后的血清为一抗浓度1:100,二抗浓度为1:500,随后进行DAB显色反应,随后苏木素复染、脱水、透明和封片。

统计学分析:用统计学软件SPSS 25.0进行分析,计量资料数据经Shapiro-Wilk检验,正态分布数据以 $\bar{x}\pm s$ 的形式表示,组间均数经Levene检验方差齐,两组间比较采用独立样本t检验分析;多组之间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-t检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 gB及gD重组串联抗原疫苗的设计 各抗原表位来源及氨基酸序列见表1^[19]。通过进一步优化表位的设计,并确定串联表位的基因序列,设计的重组多表位串联基因长579 bp,编码183个氨基酸残基。

表1 HSV-1 gB、gD抗原表位的序列

表位	来源	序列
X1	HSV-1 gD 57-98	PGVRRVYHIQAGLPDPFPQPPSLPITVYVAVLERACRSVLLNAP
X2	HSV-1 gD 211-252	KGCKYALPLRIPPSACLSPQAYQQGVTVDSIGMLPRF
X3	HSV-1 gB 272-300	ARSVYPYDEFVLATGDFVYMSPFYG
X4	HSV-1 gB 627-673	IEPCTVGHRYGIFGGGYVYFEEYAYSHQLSRADVTTVSTFIDL

2.2 原核表达载体的构建及重组蛋白的鉴定 目的蛋白的相对分子质量(Mr)约 26 kD, SDS-PAGE 凝胶电泳结果显示获取的上清液中存在目的蛋白,且在 IPTG 的作用下目的蛋白条带增厚(图 1A、B),证明重组载体能够表达目的蛋白。通过 Western blot 进一步鉴定, PET-X 组出现了带有 His-Tag 的阳性条带(图 1C)。

2.3 多克隆抗体的制备 载体对照组无目的蛋白的阳性条带(图 2A),而实验组血清中抗体可以检测到纯化后的目的蛋白(图 2B、C),即多克隆抗体制备成功。

2.4 多克隆抗体的效价检测 大兔血清中抗体的效价伴随着稀释比例的扩大而呈现下降的趋势(图 3),稀释度为

1:3200 时,两组待测血清 P 与阴性血清 N 的 OD450 的比值分别为 3.06 ± 0.10 和 2.55 ± 0.03 , 均 $P/N \geq 2.1$, 即此稀释倍数为血清的最大稀释倍数且为抗体的效价。

2.5 动物免疫后血清中 HSV-1 抗体及细胞因子水平的变化 实验组、载体对照组中的小鼠血清中 HSV-1 IgM 含量分别为 12.13 ± 0.85 、 0.49 ± 0.44 ng/L, 而空白对照组中未检测到 HSV-1 IgM, 相较于载体对照组, 实验组的 HSV-1 IgM 抗体含量显著增加, 差异具有统计学意义($t = 21.07, P < 0.001$, 图 4)。此外, 相较于载体对照组及空白对照组, 实验组小鼠血清中的 IL-2、IL-4、IL-10、IFN- γ 含量均显著升高(均 $P < 0.05$, 表 2)。

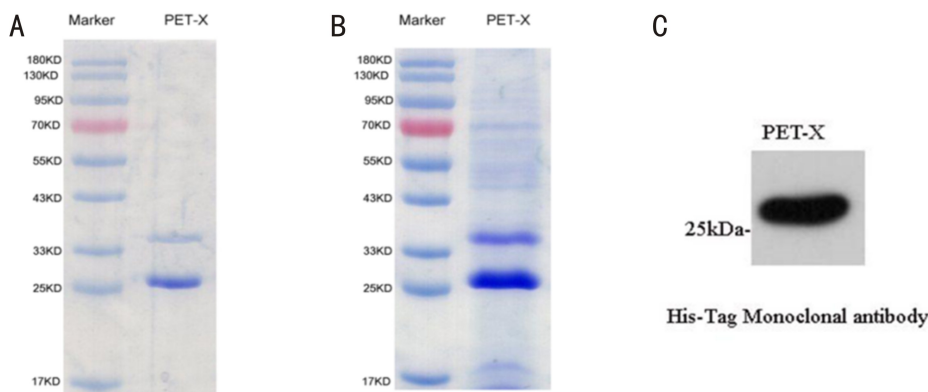


图 1 PET-X 的体外表达及鉴定。

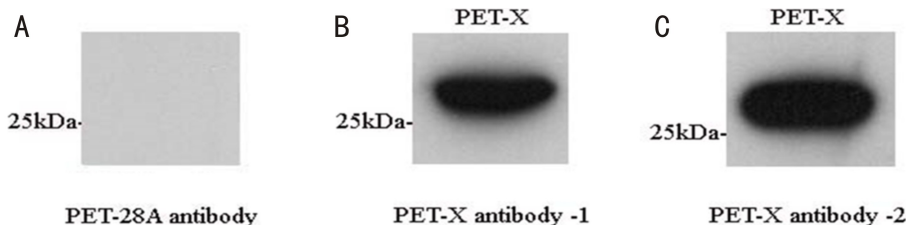


图 2 血清中的多克隆抗体的检测。

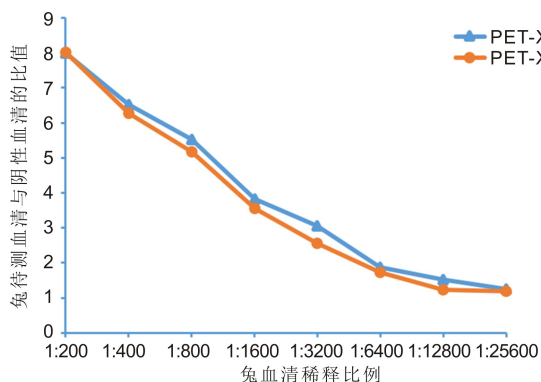


图 3 大兔血清中的多克隆抗体的效价测定。

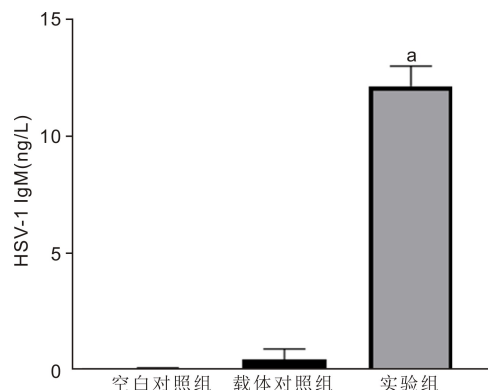


图 4 Elisa 检测小鼠血清中的 HSV-1 IgM 抗体含量 ^a $P < 0.05$ vs 载体对照组。

表 2 免疫动物后不同组别血清中 IL-2、IL-4、IL-10、IL-4 和 IL- γ 含量

($\bar{x} \pm s$, ng/L)

组别	样本量(只)	IL-2	IL-4	IL-10	IL- γ
实验组	3	11.63 ± 0.60	22.65 ± 1.47	85.75 ± 14.12	114.90 ± 6.39
载体对照组	3	4.70 ± 0.23^a	14.71 ± 0.74^a	42.22 ± 3.91^a	63.94 ± 1.28^a
空白对照组	3	4.85 ± 0.35^a	15.52 ± 1.22^a	38.81 ± 2.56^a	58.40 ± 1.94^a
F		263.17	41.13	27.88	188.78
P		<0.001	<0.001	<0.01	<0.001

注:^a $P < 0.05$ vs 实验组。

2.6 免疫组化检测不同组织中蛋白 X 的表达 载体对照组和空白对照组小鼠的脑组织、三叉神经节、眼组织细胞周边未见呈棕黄色改变,而在实验组的脑组织、三叉神经节、眼组织中均能发现目的蛋白 X 的表达(图 5)。

3 讨论

α 疱疹病毒亚家族的 HSV-1 是由包膜和核衣壳构成的大的双链 DNA 病毒。在潜伏期间,HSV-1 染色体保持为共价闭合的游离体,处于一种高水平抑制的状态^[23]。当宿主免疫机能下降时,处于潜伏期的病毒会被再次激活并传播到神经支配的部位,引起病症复发^[24]。由 HSV-1 诱发的 HSK,会对眼睑、角膜或结膜造成损伤,是全球失明的重要传染病^[25]。如何预防和治疗 HSV-1 成为了越来越多的学者探究的方向,Lin 等^[26]发现金黄色葡萄球菌(*S.aures*)裂解物(staphylococcus aureuslysates, SALs)呈现一种以剂量依赖的方式抑制 HSV-1 的感染,其制备的 SALs 滴眼液能有效地改善患有 HSV-1 角膜炎小鼠的角膜病变。将改造后带有 GFP 荧光标签的 HSV-1 侵染细胞,通过评估荧光信号及噬斑的形成确认 SALs 的抗病毒作用。在 2023 年,董亚慧等^[27]系统地阐述了 HSV-1 病毒潜伏过程及复发的机制,以及一些临床常用的抗 HSV-1 药物(有无环鸟苷、丙氧鸟苷、阿糖腺苷等)的局限性,这些药物虽能抑制病毒的 DNA 合成,但仍存在复发的可能性。

近年来,许多研究人员对 HSV-1 gB 或 gD 的疫苗做了大量的研究,主要原因为:gB 和 gD 蛋白序列高度保守的同时免疫原性也很强,在病毒侵染的条件下,会触发机体快速并高效的体液免疫反应和细胞免疫反应^[28]。如早在 1990 年,Anthony 等以新西兰雄性大白兔为模型评估了重组 gD 疫苗的安全性和有效性^[29];Du 等^[30]通过筛选 gD 蛋白表位制备了对 HSV-1 和 HSV-2 具有相同病毒中和活性的重组 gD DNA 疫苗,并在小鼠模型中进行了疫苗效

力评估;针对 HSV-1 gB DNA 疫苗亦有报道,在 2003 年,Cui 等^[31]向小鼠注射表达 gB 的裸质粒 DNA 疫苗,在感染 HSV-1 后诱导机体产生特异性的体液与细胞免疫反应;Caselli 等^[32]在小鼠肌肉中接种 HSV-1 gB DNA 疫苗,获得了对 HSV-1 保护性免疫反应的能力。值得注意的是,现有研究表明,分别接种 gB 或 gD 疫苗的小鼠模型中,仍然存在病毒潜伏的可能性,表明单一表位疫苗产生的免疫作用不能完全地保护机体^[33]。Egan 等^[34]发现 gC、gD 和 gE 三表位 HSV 核酸疫苗能够有效地预防 HSV-1 的 DNA 迁移到三叉神经节或背根神经节,并能对小鼠的口腔和生殖器官部位的 HSV-1 的感染提供有效地保护。因此,多表位核酸疫苗的开发是具有一定意义的,能够为机体提供一种更好的保护及预防作用。

本研究构建了同时表达 HSV-1 gB 和 gD 的 DNA 疫苗 pcDNA3.1-X,与以往的研究相比,我们利用研究中制备的单克隆抗体来验证小鼠体内蛋白 X 的表达情况。与载体对照组和空白对照组相比,我们发现实验组中小鼠的眼球、三叉神经节及脑组织中均存在重组蛋白 X 的表达,这与 Klimova 等^[35]研究 HSV-1 gD 基因质粒在小鼠间充质干细胞(mesenchymal stem cells)中的表达情况相一致,这是由于重组质粒被成功转染到宿主体内,使得机体内有目的蛋白的表达。此外,与载体对照组相比,DNA 疫苗 pcDNA3.1-X 在鼠体内产生了具有较强的特异性 HSV-1 IgM 抗体($P<0.001$),且细胞因子 IL-2、IL-4、IL-10 和 IFN- γ 分泌水平较载体对照组和空白对照组明显增高(均 $P<0.05$),这与王丹凤等^[36]的研究结果相似。这是因为在病毒的影响下,处于前体状态的 Th 细胞(T helper cells)向不同方向分化和增殖^[37]。其中 Th1 型细胞主要分泌 IL-2 和 IFN- γ 等细胞因子促进细胞介导免疫的产生,而 Th2 型细胞主要分泌 IL-4、IL-10,在抗体反应及寄生虫的保护性免疫中发挥作用^[38]。此外,IFN- γ 是活化 T 淋巴细

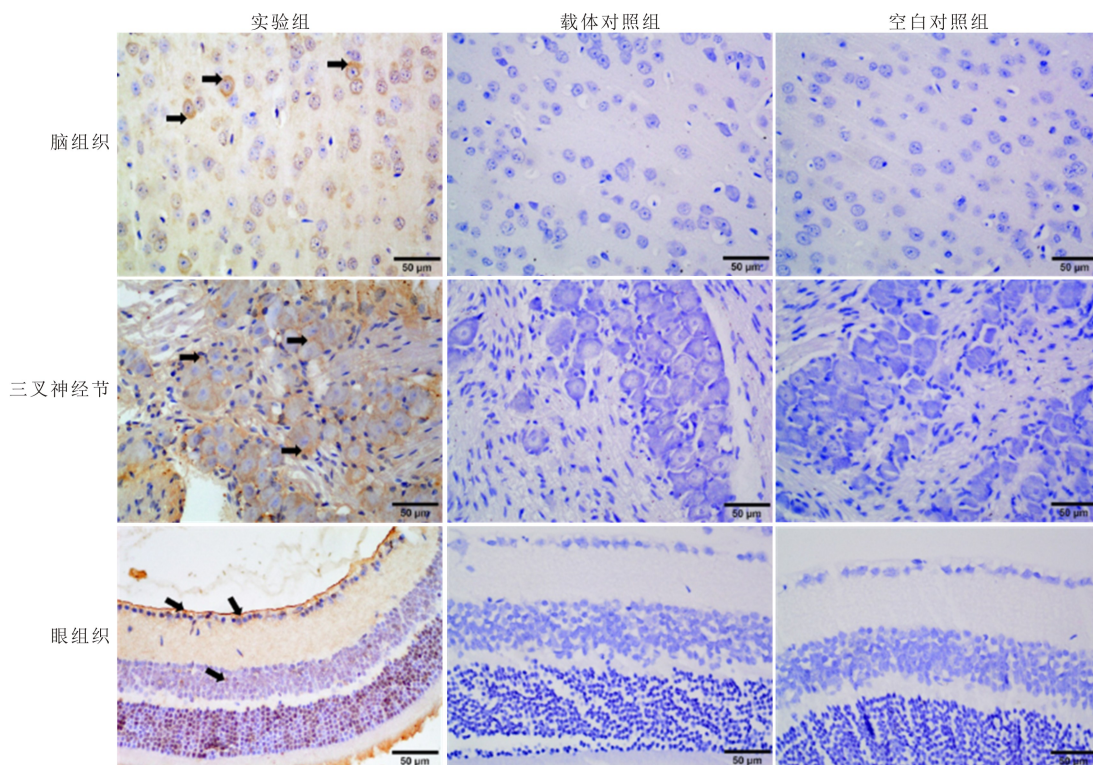


图 5 免疫组化检测重组蛋白 X 在小鼠相应组织中的表达 箭头所指为脑组织、三叉神经节和眼组织表达的蛋白 X。

胞的标志性细胞因子,能干扰病毒复制,在抗病毒防御系统中扮演着重要角色^[39]。可见,pcDNA3.1-X可引起机体产生较强的针对HSV-1的特异性免疫应答。在本文中,我们首次揭示了DNA疫苗pcDNA3.1-X免疫机体后,能在小鼠眼球、三叉神经节及脑组织等病毒易潜伏的组织中发挥效用,从而减弱HSV-1在机体内潜伏与复发感染的可能。但是,仅仅在眼球、三叉神经节和脑组织表达只是这项研究的第一步,具体如何能起到预防病毒复发的机制仍处于未知状态。此外,本研究未验证pcDNA3.1-X疫苗对灭活的HSV-1侵染小鼠所造成的角膜病变的影响,未来需要进一步验证重组疫苗在体内模型所发挥的保护作用。

在实验过程中,在测序结果一致的情况下,实验中的gB表位序列有2处的碱基发生了变异相较于前期获取的序列(355 G→C,435 G→C),进而导致相应氨基酸发生了变化(115 P→A,142 P→A)。由于方案中需要将4个肽段连接在一起构建表达载体,有可能引起蛋白结构不稳定,而丙氨酸是氨基酸中侧链最短的手性氨基酸,具有体积小,对蛋白结构影响小,且能提高蛋白稳定性的优势^[40-41]。因此,两个碱基发生突变的情况并未影响重组疫苗的免疫原性。

综上,相较于灭活疫苗或减毒疫苗,核酸疫苗具有安全、无毒、稳定,可直接刺激机体产生特异性免疫反应的特点。此外,针对病毒选择高度保守且免疫性强的表位进行组装构成多表位核酸疫苗,对预防和治疗HSV-1的意义重大。本研究发现DNA疫苗pcDNA3.1-X在免疫动物后在机体内产生了特异性抗HSV-1抗体,同时引起与免疫应答相关细胞因子分泌水平的显著增加,其主要的效用机制可能与HSV-1 gB和gD糖蛋白在机体内表达,从而激发免疫应答,并在易潜伏的组织中发挥预防及保护作用,这为单疱病毒的重组抗原表位串联疫苗的研发及在今后成为临床治疗手段提供了一种新的可能。

利益冲突声明:本文不存在利益冲突。

作者贡献声明:刘雨轩研究实施,数据采集、分析、解释,初稿撰写及论文修改;董晓鸣研究实施,数据采集;杨吉琨酝酿和设计实验;张劲松直接参与选题,酝酿和设计实验,对文章的知识性内容作批评性审阅;王静选题指导,论文修改及审阅。所有作者阅读并同意最终的文本。

参考文献

[1] James C, Harfouche M, Welton NJ, et al. Herpes simplex virus: global infection prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull World Health Organ*, 2020,98(5):315-329.

[2] Labib BA, Chigbu DI. Clinical management of herpes simplex virus keratitis. *Diagnostics (Basel)*, 2022,12(10):2368.

[3] Matthews E, Beckham JD, Piquet AL, et al. Herpesvirus-associated encephalitis: an update. *Curr Trop Med Rep*, 2022,9(3):92-100.

[4] Coleman JL, Shukla D. Recent advances in vaccine development for herpes simplex virus types I and II. *Hum Vaccin Immunother*, 2013,9(4):729-735.

[5] 刘贤洁,孙原,马小力.单纯疱疹病毒I型的Th细胞和B细胞表位重组核酸疫苗的构建及真核表达. *中国医科大学学报*, 2015,44(9):796-798,802.

[6] Jaggi U, Wang SH, Tormanen K, et al. Role of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) glycoprotein K (gK) pathogenic CD8⁺ T cells in exacerbation of eye disease. *Front Immunol*, 2018,9:2895.

[7] Hilterbrand AT, Heldwein EE. Go go gadget glycoprotein!: HSV-1 draws on its siZeable glycoprotein tool kit to customize its diverse entry routes. *PLoS Pathog*, 2019,15(5):e1007660.

[8] Ahmad I, Wilson DW. HSV-1 cytoplasmic envelopment and egress. *Int J Mol Sci*, 2020,21(17):E5969.

[9] El Kasmi I, Lippé R. Herpes simplex virus 1 gN partners with gM to modulate the viral fusion machinery. *J Virol*, 2015,89(4):2313-2323.

[10] Fan Q, Kopp S, Connolly SA, et al. Mapping sites of herpes simplex virus type 1 glycoprotein D that permit insertions and impact gD and gB receptors usage. *Sci Rep*, 2017,7:43712.

[11] Connolly SA, Jardetzky TS, Longnecker R. The structural basis of herpesvirus entry. *Nat Rev Microbiol*, 2020,19(2):110-121.

[12] Zmasek CM, Knipe DM, Pellett PE, et al. Classification of human Herpesviridae proteins using domain-architecture aware inference of orthologs (DAIO). *Virology*, 2019,529:29-42.

[13] Truong NR, Smith JB, Sandgren KJ, et al. Mechanisms of immune control of mucosal HSV infection: a guide to rational vaccine design. *Front Immunol*, 2019,10:373.

[14] Cairns TM, Huang ZY, Gallagher JR, et al. Patient-specific neutralizing antibody responses to herpes simplex virus are attributed to epitopes on GD, gB, or both and can be type specific. *J Virol*, 2015,89(18):9213-9231.

[15] Lunardelli VAS, Apostolico JS, Fernandes ER, et al. Zika virus-an update on the current efforts for vaccine development. *Hum Vaccin Immunother*, 2021,17(3):904-908.

[16] Tondini E, Arakelian T, Oosterhuis K, et al. A poly-neoantigen DNA vaccine synergizes with PD-1 blockade to induce T cell-mediated tumor control. *Oncoimmunology*, 2019,8(11):1652539.

[17] 孟子延. 串联 SARS-CoV-2 RBD 策略制备新型 COVID-19 广谱核酸疫苗的研究. 北京协和医学院, 2023.

[18] 高婧,王越,赵雨杰,等. HSV-gB、gD 糖蛋白重组串联抗原表位蛋白的表达及鉴定. *中国医科大学学报*, 2010,39(3):181-183.

[19] 沈阳爱尔卓越眼科医院有限公司. 一种以单纯疱疹病毒 I 型 gB、gD 抗原表位串联的重组 DNA 疫苗:CN202410456372.9. 2024-06-14.

[20] 程凯慧,沈付尧,邹积振,等. 牛冠状病毒 S 蛋白抗原表位基因的串联表达及抗血清制备. *中国兽医杂志*, 2018,54(10):59-61,66.

[21] 孟祥俊,苏云. 单纯疱疹病毒 I 型(HSV-1)糖蛋白 B 基因疫苗对 HSV-1 原发及潜伏感染的抑制作用. *中国生物制品学杂志*, 2015,28(1):17-20.

[22] 赵臣. 人工合成汉坦病毒多表位 DNA 疫苗的构建及免疫活性研究. 中国医科大学, 2011.

[23] Singh N, Tschärke DC. Herpes simplex virus latency is noisier the closer we look. *J Virol*, 2020,94(4):e01701-e01719.

[24] 肖书毓,俞莹,陶津华. BALB/c 小鼠单纯疱疹病毒性角膜炎复发感染模型的建立及鉴定. *中华实验眼科杂志*, 2021,39(2):107-112.

[25] Alimbarova L, Egorova A, Riabova O, et al. A proof-of-concept study for the efficacy of dispirotriperazine PDSIP in a rabbit model of herpes simplex epithelial keratitis. *Antiviral Res*, 2022,202:105327.

[26] Lin TL, Cheng C, Zeng WT, et al. Anti-viral activity of *Staphylococcus aureus* lysates against herpes simplex virus type - I infection: an *in vitro* and *in vivo* study. *Int J Ophthalmol*, 2021,14(10):1463-1472.

[27] 董亚慧,赵格,周庆军. 单纯疱疹病毒 I 型在三叉神经节潜伏复发机制的研究进展. *国际眼科杂志*, 2023,23(5):787-790.

[28] Rédua RB, Almeida de Rezende R, Eduardo de Almeida Ferreira C, et al. A complex orthognathic surgical approach correcting a Class III malocclusion involving traumatic dental injuries and a maxilla fracture. *Am J Orthod Dentofac Orthop*, 2019,155(5):702-713.

- [29] Nesburn AB, Ghiasi H, Wechsler SL. Ocular safety and efficacy of an HSV-1 gD vaccine during primary and latent infection. *Investig Ophthalmol Vis Sci*, 1990,31(8):1497-1502.
- [30] Du RK, Wang LL, Xu H, et al. A novel glycoprotein D-specific monoclonal antibody neutralizes herpes simplex virus. *Antiviral Res*, 2017,147:131-141.
- [31] Cui FD, Asada H, Kishida T, et al. Intravascular naked DNA vaccine encoding glycoprotein B induces protective humoral and cellular immunity against herpes simplex virus type 1 infection in mice. *Gene Ther*, 2003,10(25):2059-2066.
- [32] Caselli E, Grandi P, Argnani R, et al. Mice genetic immunization with plasmid DNA encoding a secreted form of HSV-1 gB induces a protective immune response against herpes simplex virus type 1 infection. *Intervirology*, 2001,44(1):1-7.
- [33] James SH, Kimberlin DW, Whitley RJ. Antiviral therapy for herpesvirus central nervous system infections; neonatal herpes simplex virus infection, herpes simplex encephalitis, and congenital cytomegalovirus infection. *Antiviral Res*, 2009,83(3):207-213.
- [34] Egan KP, Awasthi S, Tebaldi G, et al. A trivalent HSV-2 gC2, gD2, gE2 Nucleoside - modified mRNA - LNP vaccine provides outstanding protection in mice against genital and non-genital HSV-1 infection, comparable to the same antigens derived from HSV-1. *Viruses*, 2023,15(7):1483.
- [35] Klimova RR, Demidova NA, Masalova OV, et al. Preventive vaccination with mesenchymal stem cells protects mice from lethal infection caused by herpes simplex virus 1. *Mol Biol*, 2021,55(3):413-423.
- [36] 王丹凤, 马小力. HSV-1 糖蛋白 B 和糖蛋白 D 的 T 细胞表位重组核酸疫苗的构建及其免疫原性. *中国医科大学学报*, 2021,50(2):141-144,167.
- [37] Wu J, Guo YR, Lu X, et al. Th1/Th2 cells and associated cytokines in acute hepatitis E and related acute liver failure. *J Immunol Res*, 2020,2020:6027361.
- [38] Alebrahim-Dehkordi E, Molavi B, Mokhtari M, et al. T helper type (Th1/Th2) responses to SARS-CoV-2 and influenza A (H1N1) virus: From cytokines produced to immune responses. *Transpl Immunol*, 2022,70:101495.
- [39] Hasanvand A. COVID-19 and the role of cytokines in this disease. *Inflammopharmacology*, 2022,30(3):789-798.
- [40] Yuan SL, Li GM, Wang Y, et al. Identification of positively charged residues in enterovirus 71 capsid protein VP1 essential for production of infectious particles. *J Virol*, 2016,90(2):741-752.
- [41] Satvati S, Ghasemi Y, Najafipour S, et al. Finding and engineering the newly found bacterial superoxide dismutase enzyme to increase its thermostability and decrease the immunogenicity; a computational and experimental research. *Arch Microbiol*, 2023,205(7):260.