

文章编号:1002-2694(2012)01-0041-05

# 柯萨奇病毒 B3 的 VP1 DNA 疫苗与蛋白或重组腺病毒疫苗不同组合免疫方式的免疫效果观察\*

蓝佳明, 高志云, 金玉怀, 李 剑, 刘贵霞, 美 鲜, 张永红, 王永祥

**摘要:**目的 观察柯萨奇病毒 B3 (Coxsackievirus B3, CVB3) 衣壳蛋白 VP1 DNA 疫苗初免后 VP1 蛋白或重组腺病毒 rAd/VP1 加强的 prime-boost 策略的免疫效果。方法 用 CVB3 VP1 的真核表达质粒 pcDNA3/VP1 初次免疫小鼠后, 分别用 VP1 蛋白或重组腺病毒 rAd/VP1 加强免疫 2 次。检测免疫小鼠血清特异性 IgG 抗体、中和抗体滴度以及脾脏细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic lymphocytes, CTLs) 杀伤活性; 致死量 CVB3 攻击后, 检测小鼠血中病毒滴度并观察动物的存活情况。结果 pcDNA3/VP1 + VP1 蛋白组小鼠血清 IgG 抗体、中和抗体滴度以及动物生存率明显高于 pcDNA3/VP1 + rAd/VP1 组和 pcDNA3/VP1 质粒组 ( $P < 0.05$ ); pcDNA3/VP1 + rAd/VP1 组和 pcDNA3/VP1 + VP1 蛋白组小鼠脾脏 CTLs 杀伤活性明显高于 pcDNA3/VP1 质粒组 ( $P < 0.05$ )。结论 质粒 pcDNA3/VP1 初次免疫后, VP1 蛋白或重组腺病毒 rAd/VP1 加强的 prime-boost 策略有较好的免疫效果, 两者比较 pcDNA3/VP1 + VP1 蛋白 prime-boost 免疫策略的效果更为明显。

**关键词:**柯萨奇病毒 B3; prime-boost; DNA; 蛋白; 重组腺病毒

中图分类号:R373.2 文献标识码:A

## Generation of protective immune responses against coxsackievirus B3 challenged by DNA priming VP1 protein or recombinant adenovirus boosted vaccination

LAN Jia-ming, GAO Zhi-yun, JIN Yu-huai, LI Jian, LIU Gui-xia,  
XIAN Xian, ZHANG Yong-hong, WANG Yong-xiang

(Department of Pathogenic Biology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

**ABSTRACT:** In order to compare the immune effects of 2 different prime-boost strategies, BALB/c mice were primed immunization with eukaryotic expression plasmid pcDNA3/VP1 contained the VP1 capsid gene of coxsackievirus B3 (CVB3), following by two boosts with the VP1 protein from prokaryotic cells or recombinant adenovirus rAd/VP1. Mice were bled from the retroorbital sinus plexus every 2 weeks after each immunization. Enzyme-linked immunosorbent assay and micro-neutralization test were used to detect levels of CVB3-specific IgG antibody and neutralizing antibody titers in the sera of immunized mice. Three weeks after the last immunization, the Cytotoxic T lymphocytes (CTLs) killing activity of spleen lymphocytes was detected with Cytotoxicity Counting Kit-8 assay. Followed the 3 immunization, mice were challenged with CVB3 infection. Virus titers in the sera of immunized mice were determined by the 50% cell culture infective dose assay on HeLa cell monolayers. Percentage of animals surviving was observed after lethal CVB3 attacking over a period of 21 days. The results showed the titers of specific IgG antibody and neutralizing antibody in sera of the pcDNA3/VP1 and VP1 protein regime immunized mice were higher ( $P < 0.05$ ) than the other 2 groups including pcDNA3/VP1 and pcDNA3/VP1 + rAd/VP1 groups. CTLs killing activity of spleen lymphocytes of the pcDNA3/VP1 + rAd/VP1 immunized mice were higher ( $P < 0.05$ ) than the pcDNA3/VP1 or pcDNA3/VP1 + VP1 protein group. In addition, the pcDNA3/VP1 + VP1 protein vaccine resulted to the strongest protection of mice from lethal CVB3 challenge and the lowest viral load in sera of immunized mice after acute CVB3 infection. It has been concluded pcDNA3/VP1 priming and VP1 protein or rAd/VP1 boosting immunization had obvious immune responses against CVB3 infection in mice. The pcDNA3/VP1 priming and VP1 protein boosting regimen surpassed plasmid pcDNA3/VP1 and recombinant adenovirus rAd/VP1 regime and might be a promising vaccine candidate against CVB3 infection.

**KEY WORDS:** coxsackievirus B3; prime-boost; DNA; protein; recombinant adenovirus

\* 河北省医学科学研究重点课题资助项目(20090054;20090049)

通讯作者:王永祥, Email:wangyongxiang1@yahoo.com.cn

作者单位:河北医科大学病原生物教研室,石家庄 050017

柯萨奇病毒 B3 (Coxsackievirus B3, CVB3) 是人类病毒性心肌炎的主要病原体, 也是新生儿猝死的重要原因之一, 目前尚无有效的预防方法。病毒衣壳蛋白 VP1 含有中和抗原表位<sup>[1]</sup>, 因此关于 CVB3 疫苗的研究多以 VP1 为切入点。本室前期以 CVB3 VP1 作为目的基因构建了真核表达质粒 pcDNA3/VP1, 免疫小鼠后发现其可诱导一定水平的细胞免疫和体液免疫应答, 但免疫原性较差<sup>[2]</sup>。用原核细胞表达纯化的 VP1 蛋白免疫小鼠, 其血清中和抗体水平和脾脏细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic lymphocytes, CTLs) 活力均明显增强, 但亦不能有效保护小鼠抵抗致死量 CVB3 的攻击<sup>[2]</sup>。重组腺病毒载体疫苗 rAd/VP1 虽然诱导了较高水平的细胞免疫应答, 但作为 CVB3 预防性疫苗, 尚不能应用于临床<sup>[2]</sup>。

异源 prime-boost 免疫策略即当单独应用一种疫苗产生的免疫效力不足时, 使用不同的疫苗重复接种来增强免疫效果的方法。该策略因能显著增强免疫动物的细胞免疫和体液免疫功能, 目前已在疫苗研制中广为应用<sup>[3]</sup>。本研究采用质粒 pcDNA3/VP1 初次免疫后, VP1 蛋白或重组腺病毒 rAd/VP1 分别加强的两种 prime-boost 策略免疫小鼠, 观察比较其免疫效果。

## 1 材料与方法

**1.1 质粒、菌毒株和细胞株** 原核表达质粒 pET-his/VP1、真核表达质粒 pcDNA3/VP1 和重组腺病毒 rAd/VP1 为本室前期构建; 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和 BL21(DE3)pLysS、HeLa 细胞和 CVB3 Nancy 株为本室保存; HEK293 细胞购自中国医学科学院基础所细胞中心。

**1.2 实验动物** 6~8 w 龄雄性纯系 BALB/c 小鼠购自河北医科大学实验动物中心。

**1.3 试剂** 工具酶购自日本 TaKaRa 公司; 腺病毒纯化试剂盒购自上海杰美基因医药科技有限公司, 细胞计数试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) 购自日本同仁化学研究所; Anti-His 抗体和辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG 购自北京中杉生物技术公司。

**1.4 rAd/VP1 的扩增与纯化** 重组腺病毒 rAd/VP1 为本室前期构建与包装<sup>[2]</sup>。将第 3 代重组腺病毒 rAd/VP1 感染 HEK293 细胞。当约 80% 的细胞出现细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE) 时, 收集细胞并用 GENMED 大量腺病毒沉淀法纯化试剂盒纯化。用 GFP 阳性细胞计数法测定病毒滴度。

病毒滴度 (pfu/mL) = 荧光细胞数 × 病毒液的稀释倍数 / 病毒液量。

**1.5 VP1 蛋白的表达与纯化** 按本室采用的方法<sup>[1]</sup>。将原核表达重组质粒 pET-his/VP1 转化感受态 BL21(DE3)pLysS 大肠杆菌中, 37 ℃ 培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.6 左右, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 25 ℃ 诱导表达 5 h。超声波粉碎 30 min 后, 离心收集包涵体沉淀, 用 Western blot 法鉴定目的蛋白的表达。SDS-PAGE 法分离目的蛋白后, 置于透析袋中, 经尿素透析复性和 PEG 浓缩后定量备用。

**1.6 质粒 pcDNA3/VP1 的制备** pcDNA3/VP1 质粒转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 依照分子克隆实验指南<sup>[5]</sup> 方法大量制备 pcDNA3/VP1 质粒, 纯化定量后保存备用。

**1.7 免疫动物** 6~8 w 龄雄性 BALB/c 小鼠随机分为 4 组, 每组 18 只, 分别为 PBS 对照组、pcDNA3/VP1 质粒组、pcDNA3/VP1 + VP1 蛋白 prime-boost 实验组、pcDNA3/VP1 + rAd/VP1 prime-boost 实验组。免疫 3 次, 间隔 2 w。质粒 pcDNA3/VP1 每次每只小鼠接种 100  $\mu$ g, 接种前 20 min 先在股四头肌原位注射 250 g/L 蔗糖 100  $\mu$ L; prime-boost 实验组小鼠初次用 pcDNA3/VP1 质粒免疫后, 分别腹腔注射 VP1 蛋白或 rAd/VP1 各加强免疫 2 次。VP1 蛋白每次每只小鼠接种量为 25  $\mu$ g, 初次加强免疫加用弗氏完全佐剂, 再次加强免疫加用弗氏不完全佐剂。重组腺病毒 rAd/VP1 每次每只小鼠接种  $1.2 \times 10^7$  pfu。对照组注射 3 次 PBS, 每次 100  $\mu$ L。

**1.8 血清 IgG 抗体的检测** 采用 ELISA 方法。每次免疫后 2 w, 内眦静脉取血, 分离血清。VP1 蛋白包被酶标板, 洗板后加入封闭液。洗板后再加入系列稀释的血清, 每个稀释度设 4 个复孔, 同时设阴性和空白对照孔。洗板后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG。洗板后加入 TMB 避光显色, 测定各孔 450 nm 吸光度值 (A)。试验孔 A450/阴性对照孔 A450  $\geq 2.1$  时判为阳性。

**1.9 血清中和抗体的检测** 采用微量中和试验方法。血清经 56 ℃ 灭活后, 以 1 : 5 开始进行 2 倍系列稀释, 加至细胞培养板中, 每个稀释度设 4 个复孔, 每孔 50  $\mu$ L, 加入等体积的 100 CCID50 CVB3, 37 ℃ 孵育 1 h 后, 每孔加入 100  $\mu$ L HeLa 细胞悬液, 37 ℃ 5% CO<sub>2</sub> 孵育, 逐日观察 CPE。当病毒对照孔细胞出现明显 CPE, 试验孔细胞仍然正常时, 根据 Reed-Muench 法计算中和抗体滴度。

**1.10 脾细胞 CTLs 活力测定** 末次免疫后 3 w,

每组随机抽取3只小鼠,无菌取脾脏制备淋巴细胞悬液,用IL-2、ConA和灭活的CVB3体外刺激3d作为效应细胞,SP2/0细胞用灭活的CVB3体外刺激1d作为靶细胞,以效靶比为40:1加入96孔板中,24h后用CCK-8检测脾脏CTLs杀伤活性,同时设效应细胞和靶细胞对照孔各3复孔。杀伤率(%)=[1-(效靶A值-效应细胞A值)/靶细胞A值]×100%。

**1.11 血清病毒滴度的测定** 末次免疫后3w,每组随机取3只小鼠,腹腔注射3LD<sub>50</sub>s CVB3。第7d取血分离血清,用1640细胞维持液10倍递次稀释,接种HeLa单层细胞,于37℃5%CO<sub>2</sub>孵育,逐日观察CPE。当对照孔细胞正常,试验孔CPE不再发展时,按Reed-Muench法计算病毒滴度。

**1.12 动物的生存情况观察** 每组剩余的12只小鼠腹腔注射含10 LD<sub>50</sub>s的CVB3病毒液各0.2mL,观察并记录小鼠生存情况至感染后第21d。

**1.13 统计学分析** 用SPSS 13.0软件分析处理实验数据。其中血清IgG抗体滴度、中和抗体滴度、CTL杀伤率和血中病毒滴度均采用one-way ANOVA分析;小鼠生存率采用Kaplan-Meier法检验。

## 2 结果

**2.1 重组腺病毒rAd/VP1的培养** 重组腺病毒rAd/VP1感染293细胞48h后,荧光显微镜下观察到约10%的293细胞有GFP表达;5d时可见局部的荧光增多;8~10d时出现典型的“彗星云”状荧光。表明重组腺病毒rAd/VP1的产生和扩增增加。

**2.2 VP1蛋白的鉴定** 将收集的包涵体蛋白进行SDS-PAGE电泳,用his单抗进行Western-blot鉴定,在33kD左右看到一条清晰的目的条带,见图1。

**2.3 CVB3 VP1特异性IgG检测结果** ELISA检测结果显示PBS对照组各次免疫后抗体滴度均<1:50,其余3组随免疫次数增加抗体水平逐渐升高( $P<0.05$ )。末次免疫后,pcDNA3/VP1+VP1蛋白组、pcDNA3/VP1+rAd/VP1组、pcDNA3/VP1组的IgG抗体滴度分别为52000.32±2.05、2425.15±1.86和503.50±1.41,两两比较显示差异有统计学意义( $P<0.05$ )。提示pcDNA3/VP1初免后,VP1蛋白或重组腺病毒rAd/VP1加强的两种prime-boost策略均能增强免疫小鼠血清CVB3 VP1特异性IgG抗体滴度,且以pcDNA3/VP1+

VP1 prime-boost免疫策略效果更为明显,见图2。

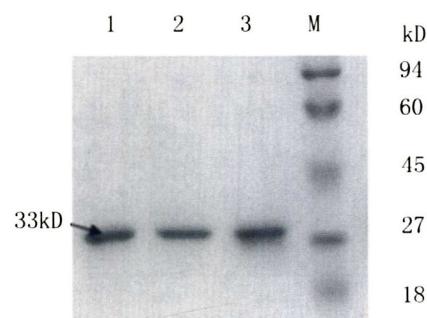


图1 重组VP蛋白的Western blot检测结果

Fig. 1 Western blot analysis of the purposing protein by his antibody

1-3: The purified induction, M: protein marker III

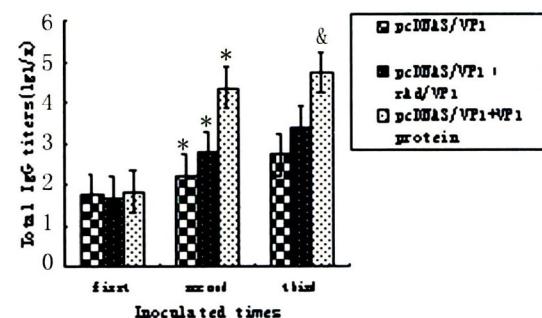


图2 不同免疫组小鼠血清特异性VP1 IgG抗体平均滴度

Fig. 2 Mean sera specific VP1 IgG titers of BALB/c mice in different groups

\*  $P<0.05$  versus the first and the third immunization &  $P<0.05$  versus the pcDNA3/VP1 + rAd/VP1 and pcDNA3/VP1 group

**2.4 中和抗体检测结果** 微量中和试验结果显示,PBS对照组各次免疫后抗体滴度均<1:5,其余3组随免疫次数增加抗体水平逐渐升高( $P<0.05$ )。末次免疫后pcDNA3/VP1+VP1蛋白组、pcDNA3/VP1+rAd/VP1组、pcDNA3/VP1组的中和抗体滴度分别为70.79±1.31、31.74±1.41和23.71±1.37,统计学分析示各组之间有显著差异( $P<0.05$ )。提示pcDNA3/VP1+VP1蛋白和pcDNA3/VP1+rAd/VP1两种prime-boost策略均能增强免疫小鼠血清中和抗体滴度,且以pcDNA3/VP1+VP1蛋白prime-boost疫苗效果更为明显,见图3。

**2.5 脾脏CTLs杀伤活性** 如图4所示,末次免疫后3w,pcDNA3/VP1+VP1蛋白组和pcDNA3/VP1+rAd/VP1组CTLs杀伤率分别为60.79%±11.83%、89.47%±1.36%明显高于pcDNA3/VP1组38.18%±1.90%( $P<0.05$ )。提示两种prime-boost策略均能增强免疫小鼠脾脏CTLs杀伤活性,以pcD-

NA3/VP1 + rAd/VP1 组效果更为明显。

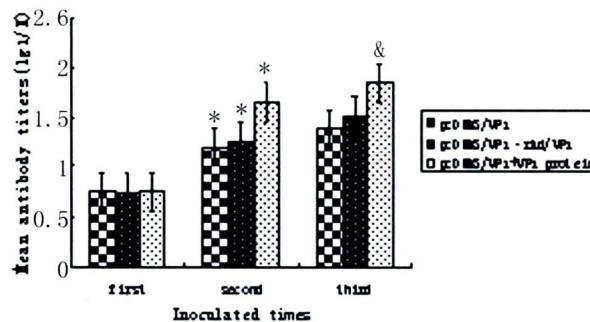


图 3 不同免疫组小鼠血清中和抗体平均滴度

Fig. 3 Mean neutralizing antibody titers of BALB/c mice in different groups after each inoculation

\*  $P < 0.05$  versus the first and the third immunization &  $P < 0.05$  versus the pcDNA3/VP1 + rAd/VP1 and pcDNA3/VP1 group

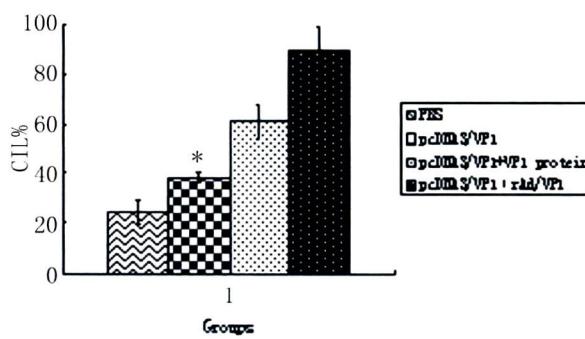


图 4 不同免疫组小鼠 CTLs 杀伤活性

Fig. 4 The CTLs response of BALB/c mice in different groups

\*  $P < 0.05$  versus the other three groups

**2.6 血中病毒滴度** 3LD50s CVB<sub>3</sub> 攻击后, pcDNA3/VP1 + VP1 蛋白组、pcDNA3/VP1 + rAd/VP1 组、pcDNA3/VP1 质粒组和 PBS 对照组小鼠血中病毒滴度分别为  $2.27 \pm 0.21$ 、 $3.41 \pm 0.21$ 、 $4.27 \pm 0.21$  和  $5.67 \pm 0.15$ 。统计分析显示, pcDNA3/VP1 + VP1 蛋白组和 pcDNA3/VP1 + rAd/VP1 组病毒滴度均低于 pcDNA3/VP1 质粒组 ( $P < 0.05$ ), 且 pcDNA3/VP1 + VP1 蛋白组小鼠血清病毒滴度最低 ( $P < 0.05$ ), 见图 5。

**2.7 动物保护率** 如图 6 所示, 10 LD50s CVB3 攻击后 PBS 对照组小鼠全部死亡, 而 pcDNA3/VP1 + VP1 蛋白组、pcDNA3/VP1 + rAd/VP1 组和 pcDNA3/VP1 质粒组小鼠病毒攻击后 21 d 存活率依次为 75%、41.7% 和 8.33%, Kaplan-Meier 生存分析表明 pcDNA3/VP1 + VP1 蛋白组、pcDNA3/VP1 + rAd/VP1 组生存率高于 pcDNA3/VP1 质粒组 ( $P < 0.05$ ), 其中 pcDNA3/VP1 + VP1 蛋白组生存率最高 ( $P < 0.05$ )。表明两种 prime-boost 策略均能明显提高免疫小鼠的保护率, 以 pcDNA3/VP1 + VP1 蛋白 prime-boost 组效果更为理想。

略均能明显提高免疫小鼠的保护率, 以 pcDNA3/VP1 + VP1 蛋白 prime-boost 组效果更为理想。

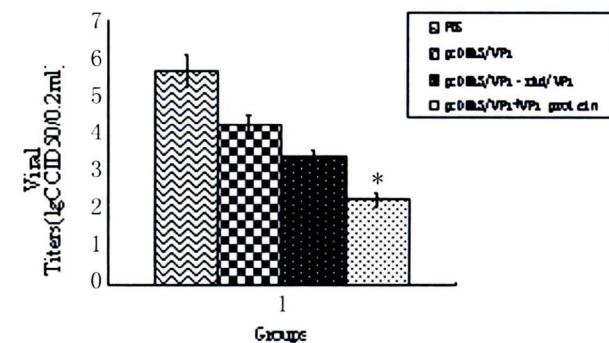


图 5 不同免疫组小鼠血中病毒平均滴度

Fig. 5 The means value of virus titers in different groups

\*  $P < 0.05$  versus the other three groups

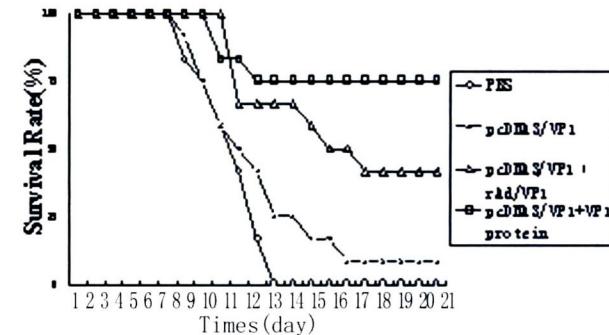


图 6 10LD50s CVB3 攻击后 BALB/c 小鼠的生存曲线

Fig. 6 Survival curve of BALB/c mice challenged with 10LD50s CVB3

### 3 讨论

Prime-boost 免疫策略即初免-加强免疫法, 是利用携带同一抗原的相同或不同载体进行初免与加强免疫的方法。前者称为同源性初免-加强免疫策略, 后者为异源性初免-加强免疫策略。异源性初免-加强免疫策略可以诱导特异的 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> 和 CD<sub>8</sub><sup>+</sup> T 细胞反应, 目前已在多种感染性疾病的动物模型中取得了显著成效<sup>[6-8]</sup>, 其有效增强免疫效果的详细机制尚未完全阐明, 可能的机制为<sup>[9]</sup>: 1. T 淋巴细胞的免疫记忆反应: 初次免疫使用的疫苗所携带的抗原, 激活了体内特异性 T 淋巴细胞, 随后使用含有相同抗原的另一种疫苗来加强免疫, 即引发了初始 T 淋巴细胞的免疫记忆反应, 从而提高了疫苗的免疫效果。实验发现, 用痘病毒和腺病毒为载体的重组疫苗作为加强疫苗, 可以有效地激活特异性的 CD<sub>8</sub><sup>+</sup> T 淋巴细胞反应; 2. 避免了抗载体免疫反应: 同源初免-加强免疫即重复接种同一疫苗时, 会刺激宿主产生针对疫苗载体的免疫记忆反应, 这种抗载体反应, 可破坏再次进入体内的疫苗, 从而降低疫苗的免疫

效果<sup>[10]</sup>。应用不同的疫苗加强免疫,可以避免T、B淋巴细胞介导的抗载体免疫反应的发生。故此本研究应用了该种免疫策略,用表达CVB3衣壳蛋白VP1的质粒pcDNA3/VP1初次免疫小鼠后,分别用VP1蛋白或重组腺病毒rAd/VP1各加强免疫2次,以期提高CVB3预防性疫苗的免疫效果。

实验结果表明:与单独应用质粒pcDNA3/VP1相比较,质粒DNA初免后VP1蛋白或重组腺病毒rAd/VP1加强的免疫接种策略,明显增强免疫小鼠血清CVB3特异性IgG抗体、中和抗体滴度及脾脏特异性CTLs杀伤活性;其中DNA初免后VP1蛋白加强的prime-boost免疫策略以增强小鼠的体液免疫反应为主,而DNA初免后重组腺病毒rAd/VP1加强的prime-boost免疫接种策略增强小鼠的细胞免疫反应更为明显。亦有其他研究表明DNA初免,重组蛋白加强的prime-boost免疫策略可以诱导较强的抗体水平<sup>[11-12]</sup>,而其他免疫加强策略,例如DNA初免,重组病毒加强的prime-boost免疫策略其免疫增强效果体现在细胞免疫上<sup>[12]</sup>。Wang<sup>[13]</sup>等应用HIV DNA疫苗初免后蛋白疫苗加强的策略,在健康志愿者体内诱导出较强的体液免疫反应,其血清IgG抗体和中和抗体水平均明显提高。McConkey等<sup>[14]</sup>用抗疟疾的DNA疫苗免疫人后,用重组痘苗病毒MVA株加强,结果诱导了高频率的抗原特异性IFN-γ分泌细胞,抗原特异性T细胞反应比单独应用DNA疫苗或重组痘苗病毒免疫增强了5~10倍。针对HIV-1的疫苗研究显示,使用DNA疫苗初免、重组病毒加强同样能诱导高水平的抗原特异性CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞。

本研究发现,虽然pcDNA3/VP1质粒初免后VP1蛋白或重组腺病毒rAd/VP1加强的prime-boost免疫接种策略,均能增强免疫小鼠的体液和细胞免疫应答,但是前者在降低免疫小鼠血中病毒滴度以及提高CVB3攻毒后小鼠的生存率和存活时间上效果更为显著。这提示虽然细胞免疫和体液免疫在保护免疫小鼠免受致死量CVB3攻击时均发挥重要作用,可能体液免疫的作用更为重要。我们曾将3个分子的补体C3d(C3d3)、巨噬细胞源趋化因子(macrophage-derived chemokine, MDC)和志贺毒素B亚单位分别与VP1基因融合<sup>[15]</sup>,构建成靶向融合基因疫苗,免疫小鼠发现,用C3d3和MDC构建的融合基因疫苗诱导的中和抗体明显高于志贺毒素B亚单位构建的融合基因疫苗,而特异性CTLs杀伤活性低于后者。用致死量病毒感染后,C3d3和MDC构建的融合基因疫苗免疫小鼠的存

活率高于志贺毒素B亚单位构建疫苗。提示体液免疫在预防CVB3感染中可能发挥主要作用。Jiang<sup>[16]</sup>等给CVB3诱导的病毒性心肌炎小鼠注射表达IL-4的质粒后,IL-4在小鼠不同器官持续高水平表达,小鼠心肌炎症明显减轻,病死率显著下降。进一步研究表明,这种有效的免疫保护作用与Th细胞明显向Th2类免疫细胞分化,进而诱导有效的体液免疫应答密切相关。最近,Li<sup>[17]</sup>的研究显示,通过诱导Th2类细胞因子的表达,进而调解M2类巨噬细胞的分化,使动物的体液免疫功能增强后,能明显减轻CVB3感染小鼠的心肌炎症。Lv<sup>[18]</sup>等给CVB3感染后的小鼠腹腔注射半乳糖凝素-9,连续应用12 d后发现:和对照组相比较,注射半乳糖凝素-9的实验组小鼠心肌损害明显减轻,进一步研究发现实验组小鼠心肌和血清中TNF-α、IFN-γ等Th1类细胞因子水平明显下降,相反IL-4和IL-10等Th2类细胞因子水平明显上升。这些均表明Th2类免疫反应在预防和治疗CVB3诱导的病毒性心肌炎中起重要作用。

本研究表明,pcDNA3/VP1质粒初免后VP1蛋白或重组腺病毒rAd/VP1加强的Prime-boost免疫接种策略均有较好的免疫效果,但前者效果更为明显。包括IgG1和IgG2a在内的IgG亚型分析、免疫小鼠脾脏细胞IL-4及IFN-γ等细胞因子体外检测实验,将有助于进一步探究细胞免疫和体液免疫在预防柯萨奇病毒引起的心肌炎中的作用,可为筛选安全有效的疫苗提供依据。

## 参考文献:

- [1]Haarmann CM, Schwimmbeck PL, Mertens T, et al. Identification of serotype-specific and nonserotype-specific B-cell epitopes of coxsackie B virus using synthetic peptides [J]. J Virol, 1994, 200(2):381-389.
- [2]蓝佳明,高志云,李嘉,等.柯萨奇病毒B3 VP1蛋白、rAd/VP1和pcDNA3/VP1的免疫效果比较[J].中华微生物学和免疫学杂志,2011,31(1):25-29.
- [3]Lu S. Heterologous prime-boost vaccination [J]. Curr Opin Immunol, 2009, 21(3):346-351.
- [4]Lan J, Gao Z, Xing H, et al. Generation of protective immune responses against coxsackievirus B3 challenge by DNA prime-protein boost vaccination [J]. Vaccine, 2011, 29(40):6894-6902.
- [5]萨母布鲁克J,拉塞尔DW,黄培堂,等.分子克隆实验指南[M],3版.北京:科学出版社,1998:26-96.
- [6]Li P, Cao RB, Zheng QS, et al. Enhancement of humoral and cellular immunity in mice against Japanese encephalitis virus using a DNA prime-protein boost vaccine strategy [J]. Vet J, 2010, 183(2):210-216.

(下转第50页)

质体蛋白在速殖子内的转运机制,为顶质体功能研究提供了技术支持。

## 参 考 文 献:

- [1]Muench SP, Prigge ST, McLeod R, et al. Studies of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum* enoyl acyl carrier protein reductase and implications for the development of antiparasitic agents[J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2007, 63(3): 328-338.
- [2]Seeger F, Soldati-Favre D. Metabolic pathways in the apicoplast of apicomplexa[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2010, 281:161-228.
- [3]吴亮,陈盛霞,李琳婕,等.刚地弓形虫RH株速殖子在HeLa细胞系体外培养的实验观察[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2008,26(6):452-456.
- [4]姜旭淦,朱敏娟,葛彦文,等.Ⅱ型胶原蛋白抗血清的制备和检测[J].江苏大学学报(医学版),2008,18(1):34-38.
- [5]Kostrewa D, Winkler FK, Folkers G, et al. The crystal structure of PfFabZ, the unique beta-hydroxyacyl-ACP dehydratase involved in fatty acid biosynthesis of *Plasmodium falciparum* [J]. *Protein Sci*, 2005, 14(6):1570-1580.
- [6]van Dooren GG, Tomova C, Agrawal S, et al. *Toxoplasma gondii* Tic20 is essential for apicoplast protein import[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(36):13574-13579.
- [7]Wilson RJM. Progress with Parasite Plastids[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2002, 319(2):257-274.
- [8]Mazumdar JH, Wilson E, Masek K, et al. Apicoplast fatty acid synthesis is essential for organelle biogenesis and parasite survival in *Toxoplasma gondii* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(35):13192-13197.
- [9]Wilson RJ, Denny PW, Preiser PR, et al. Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* [J]. *J Mol Biol*, 1996, 261(2):155-72.
- [10]Parsons M, Karnataka A, DeRocher AE. Evolving insights into protein trafficking to the multiple compartments of the apicomplexan plastid [J]. *J Eukaryot Microbiol*, 2009, 56(3): 214-220.
- [11]Waller RF, Keeling PJ, Donald RG, et al. Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(21):12352-12357.
- [12]Vembar SS, Brodsky JL. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(12):944-957.
- [13]Tonkin CJ, Kalanon M, McFadden GI. Protein targeting to the malaria parasite plastid[J]. *Traffic*, 2008, 9(2):166-175.
- [14]DeRocher AE, Coppens I, Karnataka A, et al. A thioredoxin family protein of the apicoplast periphery identifies abundant candidate transport vesicles in *Toxoplasma gondii* [J]. *Eukaryot Cell*, 2008, 7(9):1518-1529.

收稿日期:2011-09-28;修回日期:2011-12-02

## (上接第 45 页)

- [7]Wang S, Parker C, Taaffe J, et al. Heterologous HA DNA vaccine prime-inactivated influenza vaccine boost is more effective than using DNA or inactivated vaccine alone in eliciting antibody responses against H1 or H3 serotype influenza viruses [J]. *Vaccine*, 2008, 26(29-30): 3626-3633.
- [8]Brown SA, Surman SL, Sealy R, et al. Heterologous Prime-Boost HIV-1 Vaccination Regimens in Pre-Clinical and Clinical Trials [J]. *Viruses*, 2010, 2(2):435-467.
- [9]McShane H, Hill A. Prime-boost immunization strategy for tuberculosis [J]. *Microbes Infect*, 2005, 7(5-6):962-967.
- [10]邵亚卿,王洪海.结核疫苗研究进展:异源初始+加强免疫策略[J].中华结核和呼吸杂志,2008,31(9):692-694.
- [11]Goonetilleke NP, McShane H, Hannan CM, et al. Enhanced immunogenicity and protective efficacy against *Mycobacterium tuberculosis* of bacille Calmette-Guerin vaccine using mucosal administration and boosting with a recombinant modified vaccinia virus Ankara [J]. *J Immunol*, 2003, 171(3):1602-1609.
- [12]Ramshaw IA, Ramsay AJ. The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination [J]. *Immunol Today*, 2000, 21(4):163-165.
- [13]Wang S, Kennedy JS, West K, et al. Cross-subtype antibody and cellular immune responses induced by a polyvalent DNA
- prime-protein boost HIV-1 vaccine in healthy human volunteers [J]. *Vaccine*, 2008, 26(31):3947-3957.
- [14]McConkey SJ, Reece WH, Moorthy VS, et al. Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans [J]. *Nat Med*, 2003, 9(6): 729-735.
- [15]刘贵霞,蓝佳明,揣侠,等.四种靶向因子与柯萨奇病毒B3 VP1融合基因疫苗免疫效果的比较[J].细胞与分子免疫学杂志,2010,26(2):103-106.
- [16]Jiang Z, Xu W, Li K, et al. Remission of CVB3-induced viral myocarditis by *in vivo* Th2 polarization via hydrodynamics-based interleukin-4 gene transfer [J]. *J Gene Med*, 2008, 10(8):918-929.
- [17]Li K, Xu W, Guo Q, et al. Differential macrophage polarization in male and female BALB/c mice infected with coxsackievirus B3 defines susceptibility to viral myocarditis [J]. *Circ Res*, 2009, 105(4):353-364.
- [18]Lu K, Xu W, Wang C, et al. Galectin-9 administration ameliorates CVB3 induced myocarditis by promoting the proliferation of regulatory T cells and alternatively activated Th2 cells [J]. *Clin Immunol*, 2011, 140(1):92-101.

收稿日期:2011-08-11;修回日期:2011-10-23