

编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620141152568

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

肠道病毒 71 型与水痘-带状疱疹病毒联合
表位疫苗研究

A novel combined vaccine based on monochimeric VLP co-
displaying multiple conserved epitopes against Enterovirus

71 and Varicella-Zoster Virus

巫洋涛

指导教师姓名: 夏宁邵 教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2017 年 4 月

论文答辩日期: 2017 年 5 月

学位授予日期: 2017 年 5 月

答辩委员会主席:

评 阅 人:

2017 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心)课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在(国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名): 王泽清

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

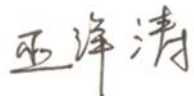
本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）： 

年 月 日

目 录

摘要.....	I
Abstract.....	III
缩略词 (Abbreviation)	V
前言.....	1
1 EV71 和 CA16 的生物学特性	2
1.1 分类地位.....	2
1.2 病毒基因组结构和功能.....	3
1.3 病毒结构和理化性质.....	4
1.4 病毒复制.....	6
2 EV71 和 CA16 的致病机制及治疗	8
2.1 致病机制.....	8
2.2 临床症状.....	9
2.3 治疗手段.....	11
3 EV71 和 CA16 的表位和疫苗研究进展	15
3.1 EV71 和 CA16 表位研究概况.....	15
3.2 EV71 疫苗研究进展	17
3.3 CA16 疫苗研究进展	21
3.4 EV71/CA16 二价疫苗.....	21
4 水痘-带状疱疹病毒的生物学特性及致病性	22
4.1 病毒形态学及其基因组结构与功能.....	22
4.2 病毒的复制.....	25
4.3 病毒主要糖蛋白概述.....	27
4.4 病毒的致病机制.....	28
5 水痘/带状疱疹流行病学与诊治	29
5.1 水痘/带状疱疹流行病学	29
5.2 水痘/带状疱疹的诊断与治疗	30

6 水痘-带状疱疹病毒疫苗研究进展	31
6.1 水痘疫苗.....	31
6.2 带状疱疹疫苗.....	32
7 本论文研究的思路、目的和意义	34
材料与方法	36
1.材料	36
1.1 仪器.....	36
1.2 试剂和材料.....	37
1.3 常用溶液和试剂配制.....	38
2.方法	40
2.1 常规细胞生物学实验.....	40
2.2 病毒培养与滴度测定.....	41
2.3 酶联免疫斑点法应用于 EV71 和 CA16 中和抗体效价的检测.....	43
2.4 酶联免疫吸附试验 (ELISA).....	44
2.5 免疫荧光试验 (IFA).....	44
2.6 分子克隆及蛋白表达相关操作.....	45
2.7 小鼠免疫.....	48
2.8 乳鼠攻毒和监测统计方法.....	48
2.9 组织病理学分析.....	49
结果与分析	54
一、 EV71 和 VZV 多表位联合疫苗的设计和构建	54
1.1 多表位联合疫苗的设计思路.....	54
1.2 多表位联合疫苗的构建.....	56
二、联合疫苗的表达和鉴定	58
三、联合疫苗的免疫原性及保护效果	61
3.1 抗原免疫小鼠.....	61
3.2 免疫血清中表位特异性抗体分析.....	62
3.3 免疫血清的中和抗体检测.....	67
3.4 免疫血清的体内保护效果评价.....	69

讨论.....	74
小结.....	78
参考文献.....	79
在校期间内发表的论文.....	91
致谢.....	92

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

Abstract in chinese	I
Abstract in english	III
Abbreviation	V
Introduction	1
1 Biological characteristics of EV71 and CA16	2
1.1 Classification.....	2
1.2 Genome structure and function.....	3
1.3 Structure and physicochemical property.....	4
1.4 Replication cycle.....	6
2 Pathogenesis and therapy of EV71 and CA16 infection	8
2.1 Pathogenesis.....	8
2.2 Clinical manifestation.....	9
2.3 Therapy	11
3 Epitopes and vaccines progressing of EV71 and CA16	15
3.1 Epitopes progressing of EV71 and CA16.....	15
3.2 EV71 vaccines	17
3.3 CA16 vaccines	21
3.4 The bivalent vaccines of EV71/CA16	21
4 Biological characteristics and pathogenesis of VZV	22
4.1 Morphology and genome	22
4.2 Replication cycle.....	25
4.3 Glycoproteins.....	27
4.4 Pathogenesis.....	28
5 Epidemiology, diagnosis, therapy of varicella and zoster	29
5.1 Epidemiology	29
5.2 Diagnosis and therapy.....	30

6 Vaccines progressing of VZV	31
6.1 Varicella vaccines.....	31
6.2 Zoster vaccines.....	32
7 The purpose and meaning in this study	34
Materials and Methods	36
1. Materials	36
1.1 Equipment.....	36
1.2 Reagents.....	37
1.3 Solution.....	38
2. Mehods	40
2.1 Cell biology experiments	40
2.2 Virus culture and titering	41
2.3 ELISPOT.....	43
2.4 ELISA	44
2.5 IFA	44
2.6 Molecular cloning and protein.....	45
2.7 Immunization	48
2.8 Passive challenge	48
2.9 Histopathological analysis	59
Results and Analysis	54
一、 Construction of combined vaccine	54
1.1 Design of combined vaccine.....	54
1.2 Construction of combined vaccine.....	56
二、 Purification and identification	58
三、 Evaluation of immunogenicity and efficacy	61
3.1 Immunization	61
3.2 Antibody responses of immune sera	62
3.3 Neutralizing antibody.....	67
3.4 Passive protection in mouse model.....	69

Discussion	74
Summary	78
References	79
Publications	91
Acknowledgement	92

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

手足口病（HFMD）和水痘是主要影响婴儿和儿童的两种主要急性传染病，每年导致大量的发病人数，给儿童的健康带来严重威胁。HFMD 的主要发病人群为 6 个月至 5 岁的儿童，自 2008 年 HFMD 在我国大陆地区大爆发以来，每年的发病人数平均都在 200 万以上。引起 HFMD 的病原体是以 EV71 和 CA16 为主的肠道病毒，尤其 EV71 是引起重症 HFMD 神经并发症和死亡的最主要病原体。除 HFMD 外，水痘是另一种非常普遍的儿童急性传染病，主要出现在小于 14 岁的儿童。引起水痘的唯一病原体是水痘-带状疱疹病毒（VZV），该病毒在全球也流行非常广泛，超过 90% 的人呈血清阳性。目前，虽然 HFMD 和水痘都有相应的疫苗上市，但每年的发病人数仍居高不下。另一方面，由于科技的发展，开发的疫苗种类增多，在预防更多疾病的同时也增加了人们的接种负担和经济负担。因此，联合疫苗的发展也是优化现有疫苗的有利途径，既能够减轻儿童的接种负担又能提高疫苗接种的覆盖率。而 HFMD 和水痘这两种儿童传染病的疫苗接种对象都是儿童，所以发展新型的 HFMD 和水痘联合疫苗预防这两种疾病经济、安全、有效的办法。本研究的目的是构建一种新型的 EV71 和 VZV 联合疫苗，利用该疫苗预防 EV71 和 VZV 引起的相关疾病，同时也探索一种新型的联合疫苗的构建方法。

本研究构建了 3 个三价的嵌合病毒样颗粒（VLPs）（命名为 HBc-V/1/2, HBc-2/V/1 和 HBc-1/2/V），分别以不同的串联顺序展示 EV71-VP1 (aa208-222)、EV71-VP2 (aa141-155) 和 VZV-gE (aa121-135) 表位于乙型肝炎病毒核心抗原（HBc）载体中，并在大肠杆菌中成功的进行了表达和纯化。Western blot 结果发现，HBc-1/2/V 中无法检测到嵌入的表位，而 HBc-V/1/2 和 HBc-2/V/1 的检测结果均正常。由于融合蛋白的颗粒组装对疫苗的免疫原性具有很大的影响，因此进一步对候选疫苗进行颗粒性分析。在电镜观察和 HPLC 中发现，HBc-1/2/V 也无法自我组装成类病毒颗粒，而 HBc-V/1/2 和 HBc-2/V/1 均能很好地自我组装成正确的类病毒颗粒。接着将 HBc-V/1/2 和 HBc-2/V/1 免疫小鼠，通过 ELISA 检测免疫血清对 EV71-VP1、EV71-VP2H 和 VZV-gE 的反应性，分析血清中的表位特异性抗体，

分析发现 HBc-V/1/2 能够刺激机体产生对这三个表位的均衡的抗体反应,说明表位间不存在免疫干扰。进一步,评价了免疫血清对这三种病毒的中和能力,体外的血清中和抗体分析结果显示,HBc-V/1/2 免疫血清能够有效的中和 EV71、CA16 和 VZV,而 HBc-2/V/1 免疫血清对 EV71 和 VZV 的中和能力弱于 HBc-V/1/2。分别在 EV71 和 CA16 的乳鼠攻毒模型中, HBc-V/1/2 亦能够分别赋予乳鼠抵抗 EV71 和 CA16 的致死性攻击。另外,本研究还评价了 HBc-V/1/2 对 EV71 和 CA16 共同感染的保护效果,该免疫血清能够保护乳鼠抵抗 EV71 和 CA16 的共同攻毒,表明 HBc-V/1/2 能够预防 EV71 和 CA16 的共同感染。这些结果表明 HBc-V/1/2 是一个非常有潜力的新型 EV71 和 VZV 联合疫苗。

综上所述,本研究构建了一种新型的基于 HBc VLP 展示多个 EV71 和 VZV 中和表位的联合疫苗。该联合疫苗具有很好的免疫原性,其免疫血清在体外和体内实验中均表现出良好的保护效果。同时本研究也提供了一种新型的基于表位的联合疫苗构建策略。

关键词: 肠道病毒 71 型; 水痘-带状疱疹病毒; 联合疫苗

Abstract

Hand-foot-mouth disease (HFMD) and chickenpox are two major acute infectious diseases that mainly affect infants and children, causing significant morbidity annually and posing a serious threat to children's health. Since 2008, HFMD outbreak in China mainland, the average annual incidence of more than 2 million, and affect mainly 6 months to 5 years old children. Two major etiological agents that cause HFMD are enterovirus 71 (EV71) and coxsackievirus A16 (CVA16), especially EV71 is responsible for gives rise to severe neurological complications and even death. In addition to HFMD, chickenpox is another common childhood acute infectious disease, mainly infect children less than 14 years of age. The only pathogen that causes chickenpox is the varicella-zoster virus (VZV), which is a pervasive pathogen with a seroprevalence of >90% around the world. At present, although the corresponding vaccine prevents chickenpox and HFMD are available, but the incidence of each year is still significant. On the other hand, the increasing number of vaccines people available meant prevention of more diseases, but it also increases vaccination burden and economic burden. Therefore, the development of the combined vaccine is a favorable way to optimize the existing vaccine, both to cope the above problems and can improve the coverage of vaccination. HFMD and chickenpox, both of which vaccinated target population are children. Therefore, it is attractive to explore a novel combined vaccine, which is an economical, safe and effective way for children, to prevent these two diseases. The purpose of this study was to construct a novel combination of EV71 and VZV vaccine to prevent EV71- and VZV-related diseases, and also to explore a new strategy for design of a combined vaccine.

In this study, three trivalent chimeric virus-like particles (VLPs) (named HBc-V/1/2, HBc-2/V/1 and HBc-1/2/V), which based on the hepatitis B core antigen (HBc) carrier that display epitopes derived from VZV-gE, EV71-VP1, and EV71-VP2 in a varied tandem manner, were constructed and expressed in *E.coli*. The chimeric HBc can self-assemble into VLPs with these three epitopes displayed on the surface of

particles except HBc-1/2/V. Western blot analysis showed that the inserted epitopes were detected by epitope-specific monoclonal antibodies in HBc-V/1/2 and HBc-2/V/1, but not HBc-1/2/V. Since the significant effect of the fusion protein assemble into particle on the immunogenicity of the vaccine, the candidate vaccines are further analyzed through High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and electron microscopy. The results suggested that these fusion proteins could self-assemble into VLP particles except for HBc-1/2/V. Next, present study evaluated the immunogenicity of these chimeric VLPs through immunized mice. Epitope-specific antibody characterization suggested that HBc-V/1/2 elicits a balanced antibody response toward these three epitopes, and no immune interference was observed between the three epitopes. Importantly, the neutralization capacity of combined vaccine-immunized sera was also evaluated through an *in vitro* micro-neutralization assay. The anti-HBc-V/1/2 sera could simultaneously neutralize VZV and EV71 and cross-neutralize CA16. Finally, the *in vivo* protective efficacy of the combined vaccines antisera were assessed using a neonatal mouse model infected with EV71 or CVA16. Fortunately, the anti-HBc-V/1/2 sera protected neonatal mice from lethal challenge of EV71 and CVA16, respectively. More importantly, the results from the neonatal mice challenged simultaneously by EV71 and CA16 demonstrated the antisera also prevent co-infection of EV71 and CA16. These results qualify HBc-V/1/2 is a promising candidate combined vaccine for EV71 and VZV.

Collectively, this study constructed a novel combined vaccine based on HBc VLP display multiple neutralizing epitopes derived from EV71 and VZV. The combined vaccine possess good immunogenicity, and its immune serum have shown a potent protective effect both *in vitro* and *in vivo*. Besides, present study also provides a novel strategy for the design of combined vaccines.

Keywords: Enterovirus 71; Varicella - zoster virus; Combined vaccine

缩略词 (Abbreviation)

- HFMD: Hand foot and mouth disease, 手足口病
- EV71: Enterovirus 71, 肠道病毒 71 型
- CA16: Coxsackievirus A16, 柯萨奇病毒 16 型
- VZV: Varicella-zoster Virus, 水痘-带状疱疹病毒
- HZ: Herpes zoster, 带状疱疹
- HBc: hepatitis B core antigen, 乙肝病毒核心抗原
- PV: Poliovirus, 脊髓灰质炎病毒
- CA6: Coxsackievirus A6, 柯萨奇病毒 A 组 6 型
- CA10: Coxsackievirus A10, 柯萨奇病毒 A 组 10 型
- CB3: Coxsackievirus B3, 柯萨奇病毒 B 组 3 型
- Echo: Echovirus, 埃可病毒
- ORF: Open reading frame, 开放阅读框
- UTR: untranslated region, 非编码区
- nt: nucleotide, 核苷酸
- aa: Amino acid, 氨基酸
- SCARB2: Scavenger receptor class B member 2, 清道夫受体 B2
- PSGL-1: P-selectin glycoprotein ligand 1, P 选择素糖蛋白配体 1
- Anx2: Annexin II, 膜粘蛋白
- IRES: Internal ribosome entry site, 内部核糖体进入位点
- HRV: Human rhinovirus, 人鼻病毒
- VLP: Virus like particles, 类病毒颗粒
- HSV: Herpes simplex virus, 单纯疱疹病毒
- UL: unique long region, 长独特区
- US: unique short region, 短独特区
- TRL: terminal long repeats, 末端长重复序列
- IRL: internal long repeats, 内部长重复序列
- TRS: terminal short repeats, 末端短重复序列
- IRS: internal short repeats, 内部短重复序列
- IE: Immediate early, 立即早期蛋白
- gE: Glycoprotein E, 糖蛋白 E
- Man-6-P: Mannose-6-phosphate, 甘露糖-6-磷酸受体

- MAG: myelin-associated glycoprotein, 髓磷脂相关糖蛋白
TGN: trans Golgi network, 反面高尔基体网架
PRV: pseudorabies virus, 伪狂犬病毒
DRG: Dorsal root ganglion, 背根神经节
SCID: severe combined immune deficiency, 严重综合性免疫缺陷
HIV: human immunodeficiency virus, 人免疫缺陷病毒
PHN: postherpetic neuralgia, 疱疹后遗神经痛
ACV: acyclovir, 阿昔洛韦
HRP: horse radish peroxidase, 辣根过氧化物酶
FITC: fluorescein isothiocyanate, 异硫氰酸荧光素
HE: hematoxylin-eosin staining, 苏木精-伊红染色
kD: kilo Daltons, 千道尔顿
HPLC: High Performance Liquid Chromatography, 高效液相色谱
ELISA: enzyme-linked immuno sorbent assay, 酶联免疫吸附试验
ELISPOT: enzyme-linked immunospot assay, 酶联免疫斑点试验
SPF: Specific pathogen Free, 无特殊病原体
WHO: World Health Organization, 世界卫生组织
FMDV: Foot and mouth disease virus, 口蹄疫病毒
HPV: Human papillomavirus, 人乳头瘤病毒
CTL: cytotoxic lymphocyte, 细胞毒性 T 淋巴细胞
MIR: Major immunodominant region, 免疫显性区域

前 言

手足口病（HFMD）和水痘是两种主要的儿童传染病，每年导致大量的儿童发病。HFMD 是由肠道病毒感染引起，伴随发热、在手足口和臀部等部位出现疱疹或溃疡为主要症状的常见儿童急性传染性疾病。自上个世纪 90 年代起，HFMD 在全世界频繁爆发，特别是在亚太地区，包括中国、新加坡、马来西亚和日本等。从 2008 年 5 月 HFMD 被国家卫生局列入丙类法定传染病以来，我国每年的 HFMD 报告病例和死亡病例居高不下。根据卫计委的统计，2016 年 HFMD 发病数达 2,468,174 例，其中死亡病例 201 例。以肠道病毒 71 型（EV71）和柯萨奇病毒 A 组 16 型（CA16）为主的多种肠道病毒是引起 HFMD 的病原体，也正是由于多种肠道病毒的交替流行和共流行对 HFMD 疫情的控制提出了巨大挑战。目前，两个分别由中国医学科学院医学生物学研究所和北京科兴生物制品有限公司研发的 EV71 灭活疫苗获得批准上市，但该 EV71 疫苗对 CA16 和其他肠道病毒无保护效果，显然无法满足目前的需要。水痘是另一种常见的急性传染病，高发人群为婴幼儿和儿童，一年四季都可发病。水痘-带状疱疹病毒（VZV）是引起水痘的唯一病原体，传染性极高，在未接受疫苗免疫的人群中感染率高达 90% 以上。原发感染 VZV 主要引起水痘，主要症状为发热，伴有皮疹、水疱，一般一到两周后痊愈，并终生免疫。初次感染 VZV 后病毒将潜伏于脊髓背根神经节或感觉神经节，在机体免疫力减弱时病毒被再次激活，引发二次感染，即带状疱疹（HZ）。针对相关病原体的疫苗接种是控制感染的最有效方式。手足口病和水痘的易感人群均为婴幼儿和儿童，因此研究开发针对这两种传染病的联合疫苗既能增加这两种疫苗的覆盖率，又能减轻儿童的疫苗接种负担。在此，本研究通过构建基于嵌合乙肝病毒核心抗原类病毒颗粒（HBc）展示多个 EV71 和 VZV 中和表位的新型联合疫苗，以期同时预防 EV71 和 VZV，并探索新型的联合疫苗构建方法。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库