

马传染性贫血病毒弱毒疫苗株跨膜蛋白截短突变 对其体外复制特性影响*

姜成刚^{1, 2)} 马建¹⁾ 高旭^{1, 4)} 林跃智¹⁾ 赵立平¹⁾ 华育平³⁾ 刘娣^{2)**} 周建华^{1)**}

¹⁾ 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 兽医生物技术国家重点实验室, 大动物病研究室, 哈尔滨 150001;

²⁾ 黑龙江省农业科学院畜牧研究中心博士后工作站, 哈尔滨 150086;

³⁾ 东北林业大学博士后流动站, 哈尔滨 150086; ⁴⁾ 延边大学农学院动物医学系, 延吉 133002)

摘要 马传染性贫血病毒(EIAV)减毒疫苗是世界首例慢病毒疫苗, 但其作用机理尚不明了. 研究发现, EIAV 疫苗株 EIAV_{HDM12} 的跨膜蛋白 gp45 在马体内发生高频率 261W 位点翻译终止突变, 使该蛋白质 C 端出现 154 个氨基酸的截短. 为了探讨该截短对 EIAV 疫苗株生物学特性的作用, 以 EIAV 弱毒疫苗株感染性克隆为骨干, 构建了 gp45 截短型感染性病毒株, 检测该截短突变对 EIAV 疫苗株在体外培养的马外周血单核细胞由来的巨噬细胞(MDM)、驴 MDM 和驴胎皮细胞(FDD)中的复制. 实验结果表明, gp45 截短型毒株在马和驴 MDM 中复制能力比未截短型毒株显著降低($P < 0.01$), 特别是在马 MDM 中此差异更明显. 相反, 截短型毒株在 FDD 中的复制能力则显著高于未截短型毒株($P < 0.01$). 此外, 结果显示 gp45 截短型毒株在马 MDM 中的低水平复制降低了 EIAV 对其靶细胞诱导的凋亡. 以上结果提示, EIAV 疫苗的 gp45 截短型毒株是适应在体外 FDD 细胞中传代致弱的变异, 该变异导致疫苗株在 EIAV 体内主要靶细胞巨噬细胞中复制能力的降低, 导致毒力进一步减弱.

关键词 马传染性贫血病毒, 跨膜蛋白, 截短突变, 体外复制, 细胞凋亡

学科分类号 S852.65+2, S852.4

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00595

诱导对人免疫缺陷病毒(HIV)为代表的慢病毒保护性免疫, 目前仍是病毒免疫学亟待解决的中心目标之一. 虽然存在与宿主染色体整合和回复突变等潜在安全因素, 弱毒活疫苗是目前唯一能诱导保护性免疫的慢病毒疫苗类型^[1-2]. 充分了解慢病毒弱毒疫苗诱导的必要条件和保护性免疫特性, 将对研发安全有效的慢病毒疫苗提供重要借鉴. 猴免疫缺陷病毒(SIV)或 SIV/HIV 嵌合病毒 SHIV 感染猴是研究 HIV 疫苗的主要动物模型. 迄今, 试验采用的 SIV/SHIV 弱毒疫苗均基于重组 DNA 技术改造的病毒感染性克隆而构建, 只能诱导对亲本或高度同源病毒感染的保护性免疫^[3-4].

马传染性贫血病毒(EIAV), 是一种巨噬细胞嗜性的慢病毒, 可以引起马属动物持续性感染和呈慢性疾病. 我国科学家沈荣显等于 20 世纪 70 年代研制出 EIAV 弱毒疫苗, 并成功地控制了马传染性贫血病(EIA)在中国的流行. 作为首例成功应用的慢病毒疫苗, EIAV / 马提供了一个有意义动物模型,

用以研究和评价保护性相关的免疫应答以及影响疫苗诱导保护性免疫的主要因素. 根据国内外和我们已发表的研究结果, 慢病毒的复制能力和对靶细胞的细胞毒性是影响诱导机体建立有效免疫应答的重要因素之一^[5].

慢病毒抗原的高度变异是机体难以建立特异性免疫的主要原因. 慢病毒的抗原变异主要发生在病毒的囊膜蛋白(Env), 与宿主免疫反应关键靶位. 有关 *env* 基因变异与抗原属性的研究表明, 氨基酸序列的数个残基的变化既可引起抗体和 CTL 特异

* 十一五重大传染病专项(2008ZX1001-1010), 国家自然科学基金面上项目(30771994)和黑龙江省博士后基金项目(LBH-Z08017)资助项目.

** 通讯联系人.

周建华. Tel: 0451-85935040, E-mail: jianhua_uc@126.com

刘娣. Tel: 0451-86677458, E-mail: liudi1963@163.com

收稿日期: 2009-10-13, 接受日期: 2009-12-17

性的体外检测结果发生明显变化,也可以引起体内针对持续性感染的免疫发生改变^[6-7]. EIAV 的 *env* 基因转录后经过单拼接产生了约 4.2 kb 的 mRNA, 合成后的糖蛋白前体再经蛋白酶裂解为表面蛋白(SU, gp90)和跨膜蛋白(TM, gp45). 跨膜蛋白 gp45 虽较 gp90 相对保守,但仍是决定病毒与细胞受体的结合以及中和抗体产生的重要病毒结构蛋白^[8-9].

本实验室前期研究发现, EIAV 疫苗株 EIAV_{FDDV12} 前病毒 DNA *gp45* 基因出现翻译提前终止突变, 30 个克隆中有 29 个在病毒基因组 *env* 的第 2 230 核苷酸位点出现 G→A 的突变(数据未发表). 该突变的产生造成 *gp45* 基因区提前出现了一个终止密码子 TGA, 即在 261W 位点翻译终止突变, 使该蛋白质跨膜区(transmembrane domain, TM)之后的胞浆内片段 C 端出现 154 个氨基酸残基的截短, 造成截短后 *gp45* 糖蛋白的胞浆区氨基酸残基数由原来的 220 减少到 66. 此外, 将 EIAV_{FDDV12} 免疫 15 天马外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)中前病毒 DNA 测

序结果显示, *gp45* 截短突变的几率为 6/24. 而在第 40 天血浆中游离病毒 RNA 测序结果显示, 该突变的几率为 20/30. 为了探讨 *gp45* 的 C 端截短对 EIAV 疫苗株生物学特性的作用, 本研究进一步以 EIAV 弱毒疫苗株 EIAV_{FDDV12} 感染性克隆为骨干, 构建了 C 端截短型感染性病毒株, 检测该截短突变对 EIAV 在体外培养的驴外周血单核细胞由来的巨噬细胞(MDM)、驴 MDM 和驴胎皮细胞(FDD)中的复制特性.

1 材料与方法

1.1 材料

EIAV 弱毒疫苗驴皮肤细胞适应株 EIAV_{FDDV12} 全基因克隆质粒 pLG3-8, 驴胎皮细胞(FDD)由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所大动物病研究室慢病毒课题组保存并提供. 本实验所用到的引物序列见表 1, 由 Invitrogen 公司合成. 细胞凋亡检测使用 Annexin V-FITC apoptosis detection kit I (BD 公司), 流式细胞仪为 Beckman FC500.

Table 1 Primers used in this test

Primers	Sequence(5'→3')	Positions in proviral genome of EIAV _{FDDV12}
P1	CCGCCAGTCGCTACCTGAGGAAAAG	7 297~7 321
P2	GCCAAGCTAGGCCTATAATTAACCC	8 372~8 392
M1	AGTTCTCCAGGAACAACCTGAAATGGCGAATC	7 429~7 459
M2	TCAGTTGTTCTGGAGAACTCCGCATGTTGG	7 417~7 448
gp45Up	ATGTCCTATATCGCTTTGACAGAA	6 734~6 757
gp45Down	TGTTACATGAGATGTAGCTGGATTT	7 870~7 894
gp90Up	CCACCAGAGTGTGTGGAAAGGTGA	5 022~5 046
gp90Down	TGCCCCATGATTCAATCCA	6 975~6 985

1.2 方法

1.2.1 重组质粒构建. 将分别带有酶切位点 *Nru* I 和 *Xho* I 的引物 P1 和 P2, 对 pLG3-8 质粒包含突变点的 1 054 bp 序列进行 PCR 扩增. PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳回收后, 插入 pMD-18T 载体, 质粒命名为 pMD-1054. 利用设计突变引物 M1 和 M2 对 pMD-1054 全质粒序列进行 PCR, 得到突变质粒 M-pMD-1054. 用 *Nru* I 和 *Xho* I 双酶切后, 重新插入 pLG3-8 质粒, 构建成突变质粒 M-pLG3-8.

1.2.2 质粒转染及重组病毒获得. 用 Endo-Free Plasmid Mini Kit(Omega 公司)提取质粒 M-pLG3-8. 经分光光度计测定质粒浓度后, 用 Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司)按使用说明转染 FDD 细胞. 转染 10~12 天后收集重组病毒, 反复冻融 3

次后, 继续在 FDD 细胞上传代. 用 Reverse Transcriptase Assay Colorimetric Kit(Roche 公司)按产品说明书检测培养病毒细胞上清中反转录酶活性. 将 FDD 细胞按 2×10^5 /ml 接种 6 孔细胞培养板, 将获得的重组病毒接种到 6 孔板内. 培养 10 天后, 用甲醛固定, 加入 1:100 稀释的 EIAV 马阳性血清反应 1 h, PBST 洗 3 遍后, 加入 1:5 000 稀释的 FITC 标记兔抗马 IgG(Sigma 公司). PBST 洗 3 遍后, 在荧光显微镜下检测与 EIAV 马阳性血清反应的含有 EIAV 细胞.

1.2.3 重组病毒序列测定. 病毒接种细胞, 37℃ 培养 10 天后收集病毒, 用 Qiaamp Viral RNA Mini Kit(Qiagen 公司)提取病毒 RNA, -80℃ 保存备用. 用 gp45Up 和 gp45Down 引物进行 RT-PCR 扩增

EIAV 的 *gp45* 序列, 用 *gp90Up* 和 *gp90Down* 引物扩增 EIAV 的 *gp90* 序列. RT-PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳回收后, 与克隆载体 pMD-18T 连接, 转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 每个样品挑取 10 个克隆, 送 Invitrogen 公司测序.

1.2.4 重组病毒的 Western blot. 将细胞培养上清中的病毒经 30 000 r/min 超离 1 h 浓缩后, 悬浮于 1×SDS-PAGE 上样缓冲液, 煮沸 5 min, 然后进行 SDS-PAGE. 将泳动分离后的蛋白质转印至硝酸纤维素膜上, 用 5% 脱脂乳 4℃ 封闭过夜. 用含 0.5% Triton X-100 的 PBS(PBST) 洗 3 遍后, 加入 1:200 稀释的 EIAV 马阳性血清中 37℃ 孵育 1 h. PBST 洗涤 3 遍, 加入 1:5 000 稀释 HRP 标记兔抗马 IgG 抗体 37℃ 孵育 1 h 后, PBST 洗涤 3 遍, 加入 ECL 超敏发光液(北京普利莱基因技术有限公司), 作用 5 min, 用富士 LAS-3000 发光成像分析仪进行分析.

1.2.5 病毒定量(蚀斑单位法). 将制备的病毒液进行 10 倍系列稀释后, 接种至 24 孔培养板的 FDD 细胞中(细胞密度 > 80%), 每稀释度设 4 个复孔, 每孔 100 μ l. 37℃ 孵育 1 h 后, 加入 500 μ l 含 0.8% 甲基纤维素的细胞培养维持液. 培养 8 天后, 用 3.7% 甲醛浸泡过夜, 1% Triton X-100 破膜 30 min, 然后用含 5% 脱脂乳的 PBST 封闭 1 h. 用 1:200 稀释的马 EIAV 阳性血清检测病毒蚀斑, 每孔加血清 200 μ l, 室温孵育 1 h. 经 PBST 洗 3 遍后, 加入 1:3 000 稀释的 HRP 标记兔抗马 IgG 抗体(Sigma 公司)室温反应 1 h. 最后用 PBST 洗 3 遍, 加入 NBT/BCIP 底物作用 30 min 显色, 加蒸馏水终止反应, 进行蚀斑计数.

1.2.6 马和驴外周血白细胞由来的巨噬细胞(MDM)分离和培养. 取健康马或驴的抗凝血 200 ml, 置三角瓶内自然沉降 1 h 后, 吸取上层白细胞层, 1 000 r/min 离心 10 min 后, 用 PBS 洗 2 遍, 最后用含 50% 牛血清的 1640 培养液稀释至 2×10^7 个/ml, 接种到细胞培养瓶中. 37℃ 培养 24 h 后, 用 PBS 洗掉未贴壁细胞, 用冷生理盐水洗脱贴壁细胞(以巨噬细胞为主), 按 2×10^3 细胞每微升每孔接种到 96 孔细胞培养板中, 再培养 24 h, PBS 洗掉未贴壁细胞, 加细胞维持液继续培养.

1.2.7 病毒体外复制动力学测定. 将病毒液稀释到约 1 000 PFU/ml, 接种到 FDD 细胞、马 MDM 或驴 MDM 的 96 孔细胞培养板中, 每稀释度设 4 个复孔, 每孔加病毒 20 μ l. 37℃ 孵育 1 h 后, 吸弃

病毒液, PBS 洗 2 遍, 然后加细胞维持液 100 μ l, 同时设阴性对照孔. 每隔 24 h 分别取 4 孔培养液上清, -20℃ 保存. 根据细胞状态, 9~12 天取样. 所有样品 -20℃ 保存备用, 最后同一时间测定反转录酶活性, 以检测病毒复制状态.

1.2.8 病毒诱导的马 MDM 凋亡检测. 将病毒液稀释到约 1 000 PFU/ml, 接种到 6 孔细胞培养板的马 MDM 中, 每稀释度设 2 个复孔, 每孔加病毒 500 μ l. 37℃ 孵育 1 h 后, 吸弃病毒液, PBS 洗 2 遍, 然后加细胞维持液 100 μ l, 同时设阴性对照孔. 第 5 天、第 7 天、第 9 天将细胞用生理盐水消化下来, 1 000 r/min 离心 10 min, 用 PBS 洗 2 遍, 然后用 1×结合缓冲液将细胞稀释到 1×10^6 个/ml, 取 100 μ l 加入流式管中, 再加入 5 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l PI, 轻柔混匀避光室温作用 15 min, 加入 400 μ l 1×结合缓冲液, 用流式细胞仪进行检测.

2 结 果

2.1 重组病毒复制的检测

应用点突变, 在 EIAV 弱毒疫苗株 EIAV_{FDDV12} 感染性克隆 EIAV_{FDDV3-8} 的 *gp45* 基因 2230 位点处引入翻译终止密码, 使表达的 *gp45* 在 C 端缺失 154 个氨基酸残基片段. 截短型 *gp45* 突变重组病毒质粒转染细胞后, 检测病毒中反转录酶活性, 以判断重组感染性克隆病毒在感染细胞中的复制. 图 1 可见, 转染后病毒传到第六代时, 反转录酶活性急剧升高, 表明 *gp45* 截短型重组病毒拯救成功, 在感染细胞中大量复制. 将该重组病毒命名为 EIAV_{FDDV-TM36}. 应用 EIAV 阳性马血清进行的 EIAV 感染细胞间接免疫荧光检测显示, 感染重组病毒的 FDD 细胞内可见明显特异性绿色荧光, 而未感染病毒组细胞内未见荧光信号(图 2). 此外, 经 RT-PCR 扩增后 *gp45* 片段检测, 其片段大小及核苷酸序列正确.

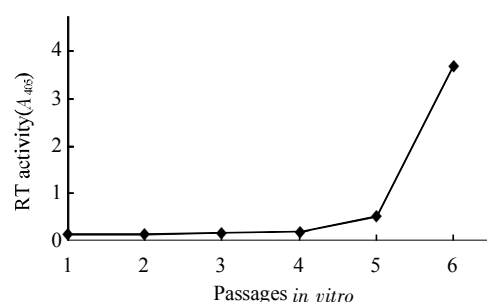


Fig. 1 Reverse transcriptase (RT) activity of the *gp45*-truncated EIAV strain

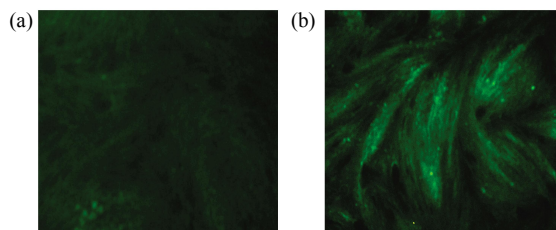


Fig. 2 Indirect immune fluorescence assay of FDD cells infected with empty vector (a) or the molecular clone of EIAV with the truncated gp45 gene (b)

2.2 重组病毒截短型 gp45 表达的鉴定

将收集的重组病毒 EIAV_{FDDV-TM36} 用超速离心进行浓缩后, 经 SDS-PAGE 将各病毒蛋白在凝胶中展开, 应用 EIAV 阳性血清进行 Western blot, 检测病毒中 gp45 的表达状态. 图 3 的结果显示, 重组病毒 gp45 蛋白的分子质量为 36 ku 左右, 明显小于正常 EIAV 对照中未发生截短的 gp45.

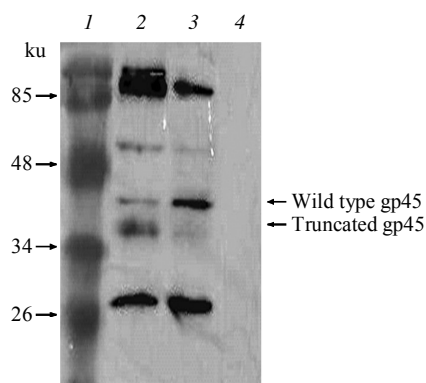


Fig. 3 Detection of truncated gp45 by Western blot

1: Protein markers; 2: pLG3-8 (truncated-gp45); 3: pLG3-8 (intact type gp45); 4: Mock-transfected cells.

2.3 gp45 截短型重组病毒的复制动力学分析

为检测 gp45 截短对病毒复制的影响, 将 gp45 截短型重组病毒 EIAV_{FDDV-TM36} 和未突变的 EIAV_{FDDV3-8} 感染体外原代培养的 EIAV 靶细胞马 MDM 和驴 MDM, 比较其在这些细胞中的复制动态. 由于 EIAV_{FDDV} 是经 FDD 细胞多次传代的 FDD 细胞适应株, 对 gp45 截短型重组病毒在该细胞株中的复制特性是否发生改变亦进行了检测. 病毒的复制用病毒反转录酶活性高低表示, 以更好反应具有生物活性病毒的复制情况. 图 4 实验结果显示, gp45 截

短型毒株在马 MDM 和驴 MDM 中复制能力比未截短型毒株显著减弱. 当未截短型病毒在马 MDM 中的复制第 7 天达到顶峰时, 截短型病毒的复制水平仅为未截短型病毒的 25%~30%(图 4a). 两种病毒在驴 MDM 细胞中的复制早期差异不显著, 但到了第 5 天, 未截短型病毒则开始明显高于截短型病毒, 直至第 8 天. 截短型和未截短型病毒在马 MDM 和驴 MDM 中整个复制测试期间的组间差异亦非常显著($P < 0.01$). 相反, gp45 截短型毒株在 FDD 细胞中的复制能力 则明显高于未截短型毒株(图 4c), 组间差异极显著 ($P < 0.01$).

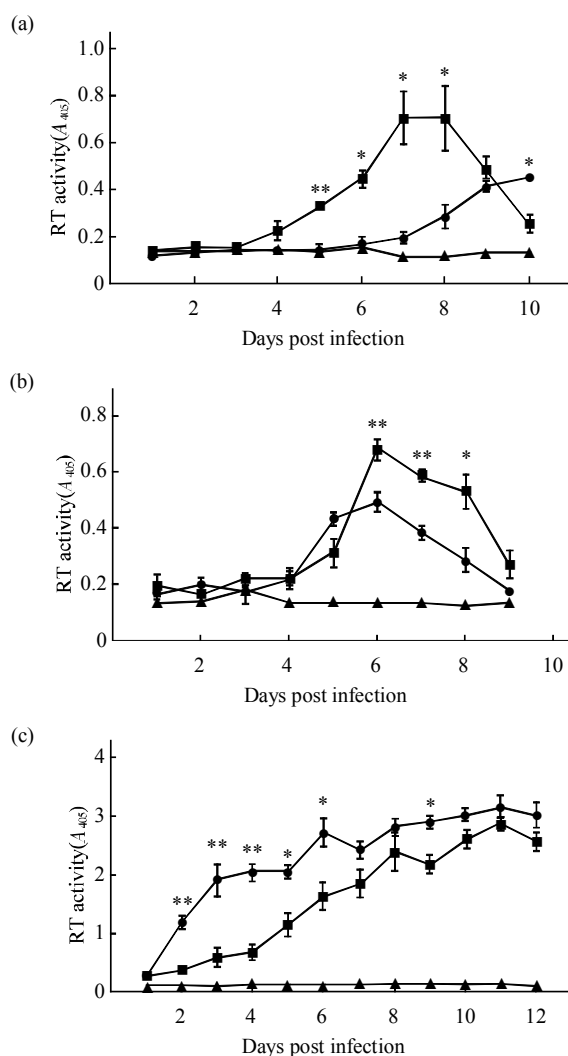


Fig. 4 Replication of EIAV truncated-gp45 strain

EIAV_{FDDV-TM36} and the intact-type gp45 strain

EIAV_{FDDV3-8} in cells of equine MDM (a),

donkey MDM (b) and FDD (c)

* Indicates statistically significant ($P < 0.05$), ** Indicates $P < 0.01$.

●—●: EIAV_{FDDV-TM36}; ■—■: EIAV_{FDDV3-8}; ▲—▲: Cell control.

2.4 病毒诱导的马 MDM 凋亡分析

病毒动力学分析显示, 未截短病毒接种到马 MDM 上第 7 天复制水平到达高峰, 第 9 天复制水平开始下降, 而截短型病毒种到马 MDM 上前 5 天复制水平较低, 之后呈缓慢上升趋势, 为了分析截短型病毒和未截短病毒在其靶细胞——马巨噬细胞复制差异原因, 进行了病毒诱导马 MDM 凋亡试

验. 结果表明, gp45 未截短型病毒在马 MDM 中的复制显示出较明显的细胞毒性, 表现为各期的细胞凋亡(图 5), 特别是早期凋亡(Annexin V 阳性但 PI 阴性)明显高于 gp45 截短型病毒($P < 0.05$, 图 6). 而凋亡出现的高峰期(接毒后第 7 天)与 gp45 未截短型病毒在马 MDM 中复制的高峰期相应, 提示了二者间的因果关系.

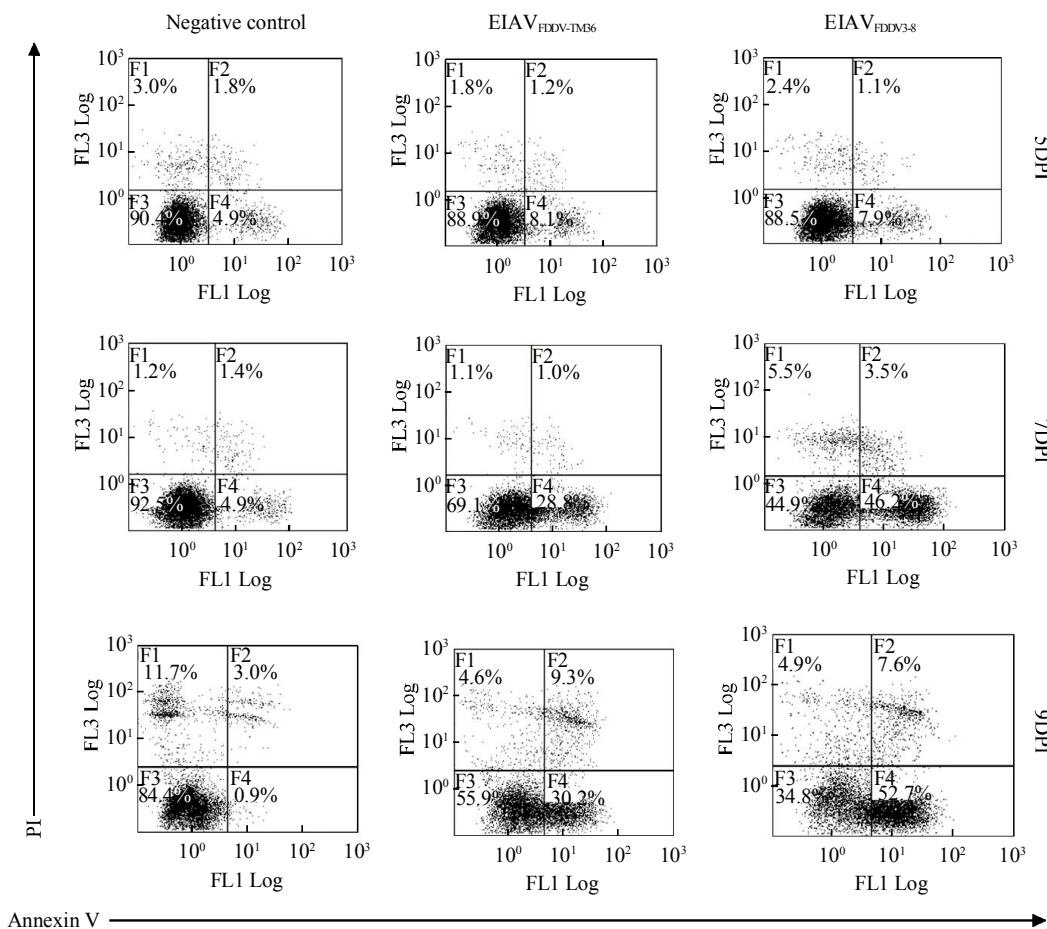


Fig. 5 Comparison of cytotoxicity of equine MDM induced by EIAV truncated-gp45 strain EIAV_{FDDV-TM36} and the intact-type gp45 strain EIAV_{FDDV3-8} in different days post infection (DPI)

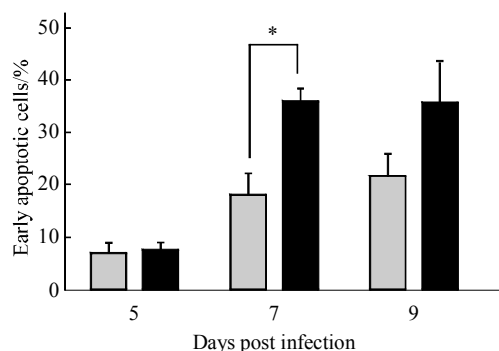


Fig. 6 Comparison of the early apoptosis of equine MDM induced by EIAV truncated-gp45 strain EIAV_{FDDV-TM36} and the intact-type gp45 strain EIAV_{FDDV3-8} in different days post infection

* $P < 0.05$. □: EIAV_{FDDV-TM36}; ■: EIAV_{FDDV3-8}.

3 讨 论

慢病毒的跨膜蛋白是一个相对保守的结构组织, 包括一个胞外功能区域(Ecto-domain), 一个跨膜区(membrane spanning domain, MSD)和一个特异的长 C 端胞浆内区(intracytoplasmic domain, CD). 慢病毒跨膜蛋白与病毒组装、病毒囊膜在细胞表面的表达、病毒与细胞的融合、诱导细胞病变和凋亡密切相关, 还可能与钙离子通道有关^[10-11]. EIAV 跨膜蛋白 gp45 的大多数免疫显性表位位于 N 端, 特别是胞外功能区域至穿膜锚区的免疫原性较强, 在该区域内已确定了多个免疫显性表位. 相反,

gp45 的 C 端与免疫马血清的反应弱而不稳定, C 端片段 p20 几乎没有或仅有检测微弱和不确定的免疫原性^[12].

EIAV 疫苗研究的早期实验结果证实, EIAV 弱毒疫苗株 FDD 细胞适应株 EIAV_{FDDV12}在诱导保护性免疫的效果和毒力弱化方面, 均优于其前代驴白细胞适应弱毒株 EIAV_{DLV125}(未发表结果). 本研究显示, gp45 截短型重组病毒 EIAV_{FDDV-TM36}在其适应性细胞 FDD 细胞上复制能力明显高于未截短型病毒, 在感染早期差异尤其显著(图 4c). 该结果与其亲本毒株 EIAV_{FDDV12}中存在高比例 gp45 截短型病毒颗粒的发现提示, gp45 C 端 154 氨基酸片段的缺失有助于 FDD 细胞适应株 EIAV_{FDDV12}在该类细胞中的复制. 由于已报道 gp45 的 C 端片段免疫原性较差, 因此推测其缺失不影响疫苗株 EIAV_{FDDV12}的免疫应答诱导能力.

本研究结果显示, gp45 截短型重组病毒 EIAV_{FDDV-TM36}在原代培养的主要宿主靶细胞马 MDM 细胞上复制能力明显低于未截短型(图 4a). 推测这种 gp45 截短型在 EIAV 体内主要靶细胞巨噬细胞中复制能力的降低可使血浆病毒载量下降, 是疫苗株 EIAV_{FDDV12}的毒力进一步弱化的可能原因. 慢病毒跨膜蛋白 MSD 的序列变化可以改变该蛋白质与细胞膜脂质双分子层相互作用和流动性, 而降低病毒与受体的结合. Waheed 等^[13]的研究表明, HIV 跨膜蛋白 MSD 截短降低病毒的复制是因为降低其在膜的流动性. 同时, 该研究观察到 C 端的截短并不能补偿由于 MSD 核心区域保守残基的缺失引起的复制缺陷. HIV 跨膜蛋白 gp41 的 C 端截短可以诱导膜蛋白表面单位 gp120 和 gp41 外功能区构象发生变化, 使 HIV 感染性克隆 pNL4-3 构建的近野生型跨膜蛋白截短株的感染性降低近 70%^[14].

对于病毒在不同细胞中复制能力研究中还发现, 在马 MDM 中 gp45 未截短型毒株 EIAV_{FDDV3-8}复制能力于接种后第 7 天达到高峰, 第 8 天就开始呈下降, 与截短型毒株 EIAV_{FDDV-TM36}复制动力曲线明显不同. 我们的实验结果表明, 该现象是由于病毒诱导细胞凋亡造成的. 截短型毒株对于诱导马 MDM 凋亡, 特别是早期凋亡的能力, 明显低于未截短型病毒. 病毒调节靶细胞凋亡的方式主要有诱导细胞凋亡和抑制细胞凋亡两种, 而这两种方式并不绝对独立, 如某种病毒的一种蛋白质抑制细胞凋亡, 其另一种蛋白质则可能诱导细胞凋亡, 只是分泌的时间不同, 处于不同的感染阶段而已. 已有报

道, EIAV 在病毒感染初期抑制细胞凋亡, 直到产生有活性的病毒粒子, 在感染后期则诱导细胞凋亡来释放病毒粒子, 进一步感染其他细胞^[15]. HIV 感染患者体内 CD4⁺ T 细胞严重衰竭就是因其囊膜糖蛋白 gp120 通过 NF- κ B 依赖 procaspase 8 介导的诱导细胞凋亡所致^[16]. Micoli 等^[17]试验证明, HIV-1 gp160 C 端点突变可以减低病毒诱导细胞凋亡, 但不影响病毒复制能力. Meng 等^[18]研究表明, EIAV Env 区胞浆末端截短可以增加病毒通过线粒体介导的细胞凋亡和坏死. 以上研究说明慢病毒跨膜蛋白与其诱导凋亡能力密切相关.

Shacklett 等在 SIV 早期研究中, 构建了包括多重 ICD 突变簇在内的 SIV 突变体 SIVmac-M4. 实验表明, 每个突变体克隆在体外复制能力都降低, 至少部分影响了病毒囊膜稳定性和 / 或病毒粒子组装. 体内接种 SIVmac-M4(对青年和幼年恒河猴存在潜在致病性)的青年和幼年恒河猴一年半后未出现临床症状^[19]. 将接种 SIVmac-M4 的猴用致病株 SIVmac251 攻击时, 这些动物与对照组相比, 病毒载量明显减少且疾病进程延缓, 猴体内 SIV 特异性 CD8⁺ T 细胞反应明显升高^[20]. 这些发现证实 ICD 是 SIV 猴体内致弱的一个位点, 提示在研究病毒与其免疫保护的相关性方面, 该区域可能比 SIV 的 *nef* 基因更有用.

本研究构建的 EIAV 跨膜蛋白 gp45 截短型突变株引入的终止密码子正是在 ICD 区. 实验结果表明该 gp45 截短突变明显降低了该病毒在病毒巨噬细胞中的复制效率, 与 SIVmac-M4 体外实验结果相一致. 本研究结果提示, EIAV 疫苗的 gp45 截短型突变毒株的多量出现是该疫苗株适应在体外 FDD 细胞中传代致弱的结果. 由于 EIAV 致病毒株在马属动物体内的主要靶细胞是巨噬细胞, EIAV_{FDDV12}的跨膜蛋白截短株在体外培养 MDM 细胞中的复制能力和细胞毒性明显降低, 可能是疫苗株致弱和产生诱导免疫保护能力的重要原因之一.

参 考 文 献

- [1] Craig J K, Li F, Steckbeck J D, *et al.* Discerning an effective balance between equine infectious anemia virus attenuation and vaccine Efficacy. *J Virol*, 2005, **79**(5): 2666-2677
- [2] Wodarz D. Immunity and protection by live attenuated HIV/SIV vaccines. *Virology*, 2008, **378**(2): 299-305
- [3] Miller C J, Mcchesney M B, Lu X, *et al.* Rhesus macaques previously infected with simian/human immunodeficiency virus are protected from vaginal challenge with pathogenic SIVmac239. *J Virol*, 1997, **71**(3): 1911-1921

- [4] Mori K, Sugimoto C, Ohgimoto S, *et al.* Influence of glycosylation on the efficacy of an env-based vaccine against simian immunodeficiency virus SIVmac239 in a macaque AIDS model. *J Virol*, 2005, **79**(16): 10386–10396
- [5] Wodarz D. Immunity and protection by live attenuated HIV/SIV vaccines. *Virology*, 2008, **378**(2): 299–305
- [6] Tagmyer T L, Craigo J K, Cook S J, *et al.* Envelope determinants of equine infectious anemia virus vaccine protection and the effects of sequence variation on immune recognition. *J Virol*, 2008, **82**(2): 4052–4063
- [7] Asquith B. The evolutionary selective advantage of HIV-1 escape variants and the contribution of escape to the HLA-associated risk of AIDS progression. *PLoS ONE*, 2008, **3**(10): e3486
- [8] Howe L, Leroux C, Issel C J, *et al.* Equine infectious anemia virus envelope evolution *in vivo* during persistent infection progressively increases resistance to *in vitro* serum antibody neutralization as a dominant phenotype. *J Virol*, 2002, **76**(21): 10588–10597
- [9] Zwick M B, Labrijn A F, Wang M, *et al.* Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *J Virol*, 2001, **75**(22): 10892–10905
- [10] Micoli K J, Mamaeva O, Piller S C, *et al.* Point mutations in the C-terminus of HIV-1 gp160 reduce apoptosis and calmodulin binding without affecting viral replication. *J Virol*, 2006, **344**(2): 468–479
- [11] Costin J M. Cytopathic mechanisms of HIV-1. *Virology J*, 2007, **4**(100): 100–122
- [12] Chong Y H, Ball J M, Issel C J, *et al.* Analysis of equine humoral immune responses to the transmembrane envelope glycoprotein (gp45) of equine infectious anemia virus. *J Virol*, 1991, **65**(2): 1013–1018
- [13] Waheed A A, Ablan S D, Roser J D, *et al.* HIV-1 escape from the entry-inhibiting effects of a cholesterol-binding compound *via* cleavage of gp41 by the viral protease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(20): 8467–8471
- [14] Shang L, Yue L, Hunter E, *et al.* Role of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in cell-cell fusion and virus infection. *J Virol*, 2008, **82**(11): 5417–5428
- [15] Thomson B J. Viruses and apoptosis. *Int J Exp Pathol*, 2001, **82**(2): 65–76
- [16] Bren G D, Trushin S A, Whitman J, *et al.* HIV gp120 induces, NF- κ B dependent, HIV replication that requires procaspase 8. *PLOS ONE*, 2009, **4**(3): e4875
- [17] Micoli K J, Mamaeva O, Piller S C, *et al.* Point mutations in the C-terminus of HIV-1 gp160 reduce apoptosis and calmodulin binding without affecting viral replication. *Virology*, 2006, **344**(2): 468–479
- [18] Meng Q L, Li S W, Liu L X, *et al.* Truncation of cytoplasmic tail of EIAV Env increases the pathogenic necrosis. *Virus Res*, 2008, **2**(133): 201–210
- [19] Jones D R, Suzuki K, Piller S C. A 100-amino acid truncation in the cytoplasmic tail of glycoprotein 41 in the reference HIV type 1 strain RF. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 2002, **18**(7): 513–517
- [20] Shacklett B L, Shaw K E S, Adamson L A, *et al.* Live, attenuated simian immunodeficiency virus SIVmac-M4, with point mutations in the env transmembrane protein intracytoplasmic domain, provides partial protection from mucosal challenge with pathogenic SIVmac251. *J Virol*, 2002, **76**(22): 11365–11378

Effects on *In vitro* Replication of Equine Infectious Anemia Virus Attenuated Vaccine Strain With Truncated Mutation in The Transmembrane Protein*

JIANG Cheng-Gang^{1,2)}, MA Jian¹⁾, GAO Xu^{1,4)}, LIN Yue-Zhi¹⁾, ZHAO Li-Ping¹⁾,
HUA Yu-Ping³⁾, LIU Di^{2)**}, ZHOU Jian-Hua^{1)**}

¹⁾ State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China;

²⁾ Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Livestock Research Center, Postdoctoral Workstation, Harbin 150086, China;

³⁾ Northeast Forestry University, Postdoctoral Workstation, Harbin 150086, China;

⁴⁾ Yanbian University, Veterinary Department of Agricultural College, Yanji 133002, China)

Abstract Equine infectious anemia virus (EIAV) vaccine is the first successfully applied lentiviral vaccine, but its mechanism on inducing protective immunity is not clear. Previous studies found that the EIAV vaccine strain EIAV_{FDDV12} transmembrane protein (gp45) had a high-frequent translational terminating mutation at the site of 261W, resulting in a truncation of 154 amino acid residues at the C-terminus. To explore the biological meaning of the gp45 truncation, a gp45-truncated molecular clone was constructed by using an infectious clone of EIAV_{FDDV12} as the backbone. Replications features of the gp45-truncated EIAV and its prototype virus were analyzed and compared in cultivated monocyte-derived macrophages (MDM) of equine and donkey and fetal donkey dermal cells (FDD). Results showed that the replication capacity of the gp45-truncated EIAV in equine and donkey MDMs was significantly decreased compared to the untruncated gp45 EIAV ($P < 0.01$), especially in the horse macrophages. In contrast, the truncated EIAV replicated significantly faster than the untruncated EIAV in FDD cells ($P < 0.01$). In addition, the reduced replication of the gp45-truncated EIAV in equine MDM led to a significant decline of cytotoxicity of the host cells when compared with the gp45 untruncated EIAV ($P < 0.05$). These results suggest that the truncation of the 154-residue C-terminus of the EIAV gp45 glycoprotein was an adaptation to the attenuation of the EIAV vaccine strain in FDD cells. This truncated mutation reduces the replication of the vaccine strain in macrophages, the primary *in vivo* target cell of EIAV, which leads to a further attenuation of the vaccine.

Key words equine infectious anemia virus, gp45 transmembrane protein, truncated mutation, replication, apoptosis

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00595

*This work was supported by grants from Eleventh Five-year major infectious diseases special project (2008ZX1001-1010), The National Natural Science Foundation of China (30771994) and Postdoctoral Foundation of Heilongjiang Province (LBH-Z08017).

**Corresponding author.

ZHOU Jian-Hua. Tel: 86-451-85935040, E-mail: jianhua_uc@126.com

LIU Di. Tel: 86-451-86677458, E-mail: liudi1963@163.com

Received: October 13, 2009 Accepted: December 17, 2009