

H5N1 型禽流感病毒广谱中和单克隆抗体的筛选 及其中和机制初步研究*

张 晓¹⁾ 曾晓燕²⁾ 刘 哲¹⁾ 金 秋¹⁾ 徐 言¹⁾ 冯振卿^{1)**} 焦永军^{2)**}

¹⁾ 南京医科大学, 卫生部抗体技术重点实验室, 南京 210029;

²⁾ 江苏省疾病预防控制中心, 卫生部肠道病原微生物重点实验室, 南京 210009)

摘要 利用杆状病毒-昆虫细胞表达 H5N1 型禽流感病毒的血凝素蛋白(HA), 纯化后的重组蛋白 HA 免疫小鼠并制备杂交瘤单克隆抗体, 用 H5N1 型禽流感病毒的全病毒进行筛选, 成功地获得了抗 H5N1 型禽流感病毒血凝素蛋白 HA 的单抗. MDCK 细胞微量中和试验表明, 单抗 8G10D7 可对 clade2 和 clade9 的 H5N1 型禽流感病毒起中和作用. Western-blot 及血凝抑制实验进一步证明了该单抗的结合位点位于 HA 蛋白的 HA1 亚基上. 鸡胚感染病毒预防试验结果表明, 8G10D7 对禽来源的和人来源的 H5N1 型禽流感病毒均可达到 100% 的保护率; 在治疗试验组中, 8G10D7 对禽来源的病毒感染具有较高的保护率, 可达 100%, 对人来源的 H5N1 型禽流感病毒最高也可达 87.5% 的保护率. 该抗体的获得不仅为 H5N1 型高致病性禽流感病毒的预防和治疗带来了希望, 同时其中和位点的发现也为以后亚单位疫苗的研制提供新的思路.

关键词 H5N1 型禽流感病毒, 杆状病毒-昆虫细胞表达系统, 单克隆抗体, 微量中和, 半数细胞培养物感染量, 血凝抑制
学科分类号 R392.11

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00090

禽流感是由 A 型流感病毒引起的禽类传染病, 近 10 年来, 以 H5N1 型为代表的高致病性禽流感 (highly pathogenic avian influenza, HPAI) 肆虐全球^[1-4], 不仅给世界养禽业造成损失, 甚至出现了越来越多的人感染 H5N1 型禽流感致死病例, 甚至已有少数报道的人传人禽流感^[5-6]. 由于人体内没有针对禽流感病毒的抗体, 特别是针对 H5 抗原的抗体, 人感染 H5N1 型禽流感病毒后具有较高的致死率. H5N1 型禽流感病毒对人类健康和世界公共卫生安全已构成重大威胁. 目前针对人间 H5N1 型禽流感大流行的防控主要采取两种措施: 一是化学药物, 主要包括 M2 蛋白阻滞剂, 如金刚烷胺和金刚乙胺, 及神经氨酸酶抑制剂, 如奥司他韦和扎那米韦等^[7]. 近年来, 在肯定化学药物在预防、治疗禽流感作用的同时, 其过量使用所产生的副作用问题也引起关注, 如产生耐药性和容易引起服用者精神异常等^[8]. 二是疫苗, 但是由于流感病毒不同毒株间存在有血清型差异且变异频繁, 使得根据传统思路开发的疫苗往往滞后于疫情暴发^[9], 且疫苗只能对

易感人群起到预防的作用, 对于已经发病的病人则无能为力. 作为化学药物和疫苗的有效补充, 由抗体介导的预防和临床治疗措施已显现良好的效果, 其应用前景得到专家的认同^[10-11].

H5N1 型禽流感病毒基因组由 8 个 RNA 片段组成^[12], 编码 11 种病毒蛋白质. 其中血凝素蛋白 (hemagglutinin, HA) 是禽流感病毒最主要的表面抗原糖蛋白, 基因变异率最大, 可直接改变宿主的特异性^[13], 很大程度上决定了禽流感病毒的抗原性和致病性, 是禽流感疫苗、中和抗体及诊断试剂的最主要靶点. HA 的前体 HA0 在病毒表面形成非共价结合的同源三聚体. HA0 在宿主蛋白酶的作用下裂解成由二硫键连接的两个亚基 HA1 和 HA2.

* 江苏省自然科学基金(BK2008446, BK2009431)资助项目, 江苏省卫生厅重点科研项目(H200857).

** 通讯联系人.

冯振卿. Tel: 025-86862739, E-mail: fengzhenqing@njmu.edu.cn

焦永军. Tel: 025-83759437, E-mail: yongjunjiao@gmail.com

收稿日期: 2011-02-28, 接受日期: 2011-05-19

美国研究小组最新报道, 在甲型流感病毒(包括 H5N1)HA 蛋白三聚体的颈干部及 HA2 亚基存在一个(或多个)序列和结构保守的抗原表位, 抗体与该区域结合后, 可有效阻止不同类型的流感病毒与细胞膜的融合过程, 使其丧失感染细胞的能力^[14-17], 说明在 H5N1 型禽流感病毒 HA 分子上确实存在着保守的中和表位, 在 HA1 亚基上也具有与其报道相似的结构, 是否也存在着这样的保守位点尚未有报道。

本研究利用重组的 HA 蛋白免疫小鼠并获得对不同 clade 的 H5N1 型禽流感病毒具有广谱中和活性的单克隆抗体, 并对其中和机制进行了初步分析。

1 材料和方法

1.1 材料

H5N1 病毒株 A/CK/Hongkong/3-69 (H5N1), A/Goose/ZD/8-9106 (H5N1), A/Jiangsu/08-6 (H5N1), A/Jiangsu/1/2007(H5N1) (GenBank: EU434686.1)由江苏省疾病预防控制中心提供, 在鸡胚中培养和扩增。

收集各株 H5N1 型禽流感病毒感染的鸡胚尿囊液, 甲醛灭活, 低速离心去除沉淀, 30%~50%线性蔗糖梯度高速离心, 待蛋白质梯度条带形成后取纯病毒重悬于少量 PBS 中。BCA 法测定蛋白质浓度, 调至 0.1 g/L 保存备用。

HA 基因的特异性引物 HAF: 5' CGGGAT-CCGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGAATA 3', HAR: 5' CCGCTCGAGCTAATGGTGGTGATG-GTGGTGAATGCAAATTCTGCATTG 3', 引入 5' *Bam*H I 和 3' *Xho* I 的酶切位点, 序列上标记 6 个组氨酸序列。重组 Bacmid 鉴定通用引物 M13F: 5' CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG 3', M13R: 5' AGCGGATAACAATTTACACAGG 3', 所有引物均由 Invitrogen 公司合成。

质粒 pFastBac, Cellfectin II 转染试剂盒, PureLink™ HiPure Plasmid Miniprep Kit, *E. coli* DH10Bac (F⁻ mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZ ΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ⁻ rpsL nupG/bMON14272/pMON7124), Sf9 细胞培养基 Grace's Insect Medium, 完全培养基, 单克隆细胞培养基 DMEM, FBS 均购自 Invitrogen 公司。

Ex Taq 酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、

质粒提取试剂盒和小量胶回收试剂盒均购自 TaKaRa 公司。

Anti-6×His(HRP), anti-influenza virus NP IgG 抗体, Alexa Fluor594 -labeled goat anti-mouse IgG 抗体均购自 Santa Cruz Biotechnologies 公司。

家蚕细胞 Sf9 半贴壁培养, 用含 10%FBS 的 Grace's Insect Medium, 完全培养基 27℃ 培养; 单克隆抗体杂交瘤细胞半贴壁培养, 用含 10% FBS 的 DMEM 37℃, 5% CO₂ 培养。

1.2 H5N1 型禽流感病毒 HA 基因在杆状病毒-昆虫细胞中的表达及鉴定

根据 GenBank 发表的 H5N1 型禽流感病毒核酸序列, 以江苏分离株 A/Jiangsu/1/2007(H5N1)为模板, 提取病毒基因组 RNA, 反转录为 cDNA, 以特异性引物 HAF 和 HAR 扩增 HA 基因, 酶切产物与重组质粒 pFastBac 连接筛选阳性重组子。阳性克隆进一步转化 *E. coli* DH10Bac 感受态细胞, 通过蓝白斑筛选和 PCR 鉴定为阳性后利用 PureLink™ HiPure Plasmid Miniprep Kit 试剂盒抽提重组质粒 rBacmid-HA。获得的重组 rBacmid-HA 通过 Cellfectin II 试剂转染昆虫细胞 Sf9, 待细胞 70%~80%病变后收集上清作为第 1 代重组病毒, 再经过 1 次传代后筛选到高滴度的含有 HA 基因的重组杆状病毒 rBacmid-HA 溶液^[18]。将高滴度 rBacmid-HA 溶液以 10 倍感染复数(MOI =10)接种 Sf9 昆虫细胞, 感染 72 h 后分别收集上清液和细胞沉淀, 裂解细胞沉淀后加入少量 PBS 溶液, 上清和沉淀裂解液分别进行 12%SDS-PAGE, 转印 NC 膜, 用 HRP 标记的 anti-6×His 抗体检测, ECL 曝光。以 His 亲和柱纯化 HA 重组蛋白, 纯化后进行 SDS-PAGE 检测。

1.3 鼠源单克隆抗体的制备

用纯化的 H5N1 型禽流感病毒重组蛋白 HA 免疫 Balb/c 小鼠, 取脾细胞与骨髓瘤细胞融合, 以灭活的 H5N1 型禽流感病毒 A/Jiangsu/1/2007 (H5N1)为包被抗原, 应用 ELISA 筛选高滴度高特异性的单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 制备单抗, 鉴定其抗体亚型。

1.4 微量中和试验

提取 4 株病毒株的 RNA, RT-PCR 扩增 HA 全长进行测序, 利用 MEGA5.0 软件构建系统进化树, 以世界卫生组织(WHO)提供的 H5N1 型禽流感病毒株进行比对^[19], 将 4 株病毒进行 clade 的划分。

用 Reed-Muench 方法测定各个 clade H5N1 型

禽流感病毒对 MDCK 细胞的半数细胞培养物感染量(TCID₅₀)^[20]. 中和试验中, 不同稀释浓度的抗体与 100TCID₅₀ 病毒混合, 37℃ 孵育 2 h, 然后加入到 MDCK 单层细胞中, 置 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 3 天, 细胞单层经充分洗涤、丙酮固定后, 加入鼠源 anti-influenza virus NP IgG 抗体, 弃上清, 洗去未结合的抗体, 加 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗显色, 抗体能抑制 50%MDCK 细胞病变的最高稀释倍数用 IC₅₀ 表示.

1.5 Western-blot 检测单抗与病毒的结合特异性

分别用 1 μg 病毒量与 SDS-PAGE 上样缓冲液混合, 煮沸 5 min, 10% SDS-PAGE 进行电泳后, Western-blot 转印 NC 膜, 以单抗为一抗, HRP 标记的山羊抗小鼠抗体为二抗进行检测.

1.6 细胞免疫荧光检测单抗与各个病毒株的结合特异性

各个病毒株分别感染 MDCK 细胞, 当细胞 70% 出现病变特征时用预冷的 80% 丙酮固定, 加入一抗单抗, 再加入二抗 Alexa Fluor594 -labeled goat anti-mouse IgG 荧光抗体后, DAPI 染色 5 min 后封片, 激光共聚焦显微镜观察细胞荧光, 以正常未感染病毒的 MDCK 细胞为阴性对照.

1.7 血凝(HA)及血凝抑制(HI)试验

将 4 株 H5N1 型禽流感病毒 2 倍梯度连续稀释, 加入 96 孔“U”形微量反应板中, 100 μl/ 孔, 每孔加入等量的 0.5% 鸡红细胞, 37℃ 孵育 1 h, 测定各个病毒的血凝效价.

根据 HA 实验结果, 确定 4 株 H5N1 型禽流感病毒的血凝价, 分别配成 4 个凝血单位病毒溶液. 96 孔“U”形微量反应板上 2 倍梯度连续稀释单抗, 50 μl/ 孔, 每孔各加 50 μl 4 个凝血单位的

H5N1 型禽流感病毒稀释液, 混合均匀, 置 37℃ 作用 30 min. 每孔再加入 0.5% 鸡红细胞 50 μl, 混合均匀, 置 37℃ 作用 30 min. 待 4 单位病毒已凝集红细胞时可观察结果, 以 100% 抑制凝集的最大稀释度为该抗体的 HI 滴度, 即血凝抑制效价.

1.8 单抗对鸡胚感染 H5N1 型禽流感病毒的预防和治疗作用

10 日龄 SPF 级鸡胚, 平均重约 50 g^[21]. Reed-Muench 测定各个病毒株对鸡胚的半数致死量(LD₅₀). 鸡胚预防试验中, 首先给鸡胚注射 12.5、25、50、100、200 μl 单抗 8G10D7, 1 h 后再给鸡胚注射 10 LD₅₀ 的病毒量. 在治疗组中, 首先给鸡胚注射 10 LD₅₀ 的病毒量, 1 h 后, 给鸡胚注射 50、100、200、300、400 μl 单抗 8G10D7. 观察各组鸡胚的存活情况, 共观察 8 天.

2 结 果

2.1 重组蛋白 HA 的表达

将重组载体 pFastBac-HA 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切后, 重组的转座载体包括 pFastBac(4 700 bp) 和 HA(1 700 bp) 2 个条带, 如图 1a 中所示, 证明构建的重组载体正确.

用 M13 上下游通用引物对重组表达质粒 rBacmid-HA 进行 PCR 鉴定. 如果 Bacmid 与 pFastBac-HA 质粒进行了重组, 理论长度应为 2 300 bp 加上插入基因的长度, 用 M13 上下游通用引物进行 PCR 扩增出 rBacmid-HA 的片段约在 4 000 bp(图 1b), 分子质量大小与预期相符, 说明重组转座载体的构建是正确的.

将 rBacmid-HA 病毒种子液以 10 倍感染复数接种 Sf9 昆虫细胞, 收集感染 72 h 后的细胞培养

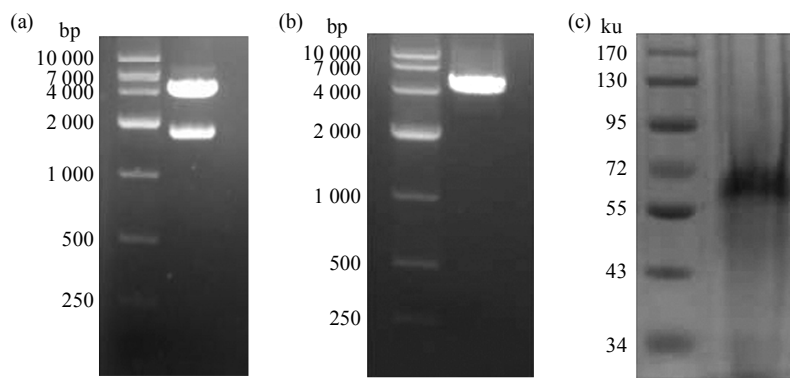


Fig. 1 Construction of recombinant bacmid (rBacmid-HA1) and SDS-PAGE analysis of the HA recombinant protein

(a) Restriction digestion of pFastBac-HA recombinant plasmids. (b) PCR analysis of rBacmid-HA with M13 primers. (c) SDS-PAGE analysis of the HA recombinant protein after purification.

上清及细胞沉淀, Western-blot 检测表明在上清液和细胞沉淀中均有重组蛋白 HA 的表达. 纯化后的 SDS-PAGE 分析显示重组蛋白分子质量在 70 ku 附近(图 1c), 即为 HA 蛋白的大小.

2.2 鼠源单克隆抗体的制备

以纯化的 A/Jiangsu/1/2007(H5N1)病毒为包被抗原, 0.1 μg /孔, ELISA 筛选高滴度高特异性的单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 一共获得 5 株效价较高的杂交瘤细胞株, 命名为 3A1A2, 3B5B11, 5H7F2, 8G10D7, 9D6D2. 收集杂交瘤细胞株分泌上清液, BCA 法测定总蛋白浓度, 分别用 PBS 稀释到 1 g/L 备用. ELISA 检测各个单抗稀释至 10 万以上时 A_{450} 值仍然为阴性对照(NC)的 2.1 倍以上. 图 2 为 ELISA 检测单抗 8G10D7 与 H5N1 病毒的结合特异性. 亚型鉴定表明, 单抗 3A1A2, 3B5B11, 8G10D7 的重链属于 IgG2a 亚型, 5H7F2, 9D6D2 的重链属于 IgG1 亚型, 5 株单抗的轻链均属于 κ 亚型.

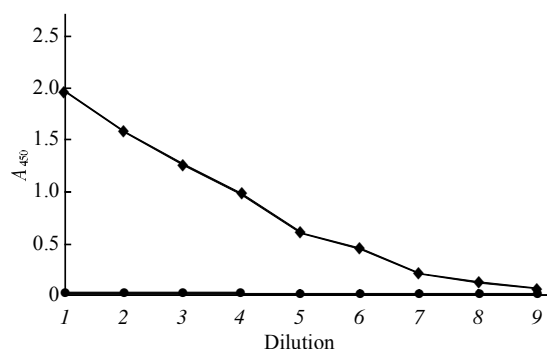


Fig. 2 ELISA used to analyze the binding specific of mAb 8G10D7 to H5N1 avian influenza A virus

●—●: NC; ◆—◆: 8G10D7. 1: 1 : 400; 2: 1 : 800; 3: 1 : 1 600; 4: 1 : 3 200; 5: 1 : 6 400; 6: 1 : 12 800; 7: 1 : 25 600; 8: 1 : 51 200; 9: 1 : 102 400.

2.3 单克隆抗体中和活性的鉴定

对 4 株 H5N1 病毒株的 HA 蛋白进行测序, 利用 MEGA5.0 软件分析, 构建进化树, 结果显示, A/CK/Hongkong/3-69(H5N1)属于 clade 9, A/Goose/ZD/8-9106 (H5N1), A/Jiangsu/08-6 (H5N1) 和 A/Jiangsu/1/2007(H5N1)均属于 clade 2. 按分离病毒的宿主划分, A/CK/Hongkong/3-69 (H5N1) 与 A/Goose/ZD/8-9106 (H5N1) 为禽来源的病毒株, A/Jiangsu/08-6 (H5N1)与 A/Jiangsu/1/2007(H5N1)为人类来源的病毒株.

5 株单抗的中和试验结果表明: 8G10D7 抗体与 4 株病毒均能起中和反应, 证明其对 clade 2 和

clade 9 的 H5N1 型禽流感病毒具有广谱的中和活性, 中和反应的稀释倍数从 1 : 64~1 : 256(表 1), 其中, 对禽来源的病毒株所需的 IC_{50} 较人来源的病毒低, 说明该单抗对禽来源的病毒具有较好的中和活性(表 1); 3A1A2 和 3B5B11 对 A/Jiangsu/08-6 和 A/Jiangsu/1/2007 有中和活性, IC_{50} 从 1 : 16~1 : 128; 9D6D2 仅对 A/Jiangsu/1/2007 有中和活性, IC_{50} 为 1 : 64; 5H7F2 在最大稀释倍数时(1 : 1)对 4 株病毒均无中和活性.

Table 1 Neutralizing activity and hemagglutination-inhibition activity of 8G10D7 against the 4 H5N1 avian influenza A viruses

Influenza A virus	IC_{50}	HI
A/CK/Hongkong/3-69	1 : 256	1 : 64
A/Goose/ZD/8-9106	< 1 : 256	1 : 128
A/Jiangsu/08-6	1 : 64	1 : 32
A/Jiangsu/1/2007	1 : 256	1 : 64

2.4 Western-blot 及免疫荧光检测

用 8G10D7 抗体与各个病毒株进行特异性杂交检测(图 3), 4 个病毒株均检测到分子质量 70 ku, 43 ku 的 2 条带, 分别为 HA0 及 HA1 蛋白的大小. HA2 亚基 26 ku 附近没有条带出现, 证明了 8G10D7 识别的抗原决定簇在 HA1 亚基上. 免疫荧光检测见图 4, 从图 4 中可见各个病毒感染后的细胞有红色荧光, 正常 MDCK 细胞只能观察到细胞核的紫色荧光.

Western-blot 及免疫荧光检测结果同时证明了 8G10D7 既可以与变性的 HA 蛋白结合, 也与天然的 HA 蛋白有结合活性.

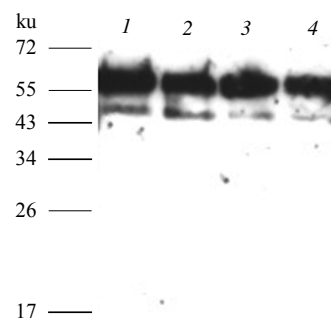


Fig. 3 The specific binding of the 8G10D7 to the 4 H5N1 avian influenza A viruses detected by Western-blot

1: A/CK/Hongkong/3-69; 2: A/Goose/ZD/8-9106; 3: A/Jiangsu/08-6; 4: A/Jiangsu/1/2007.

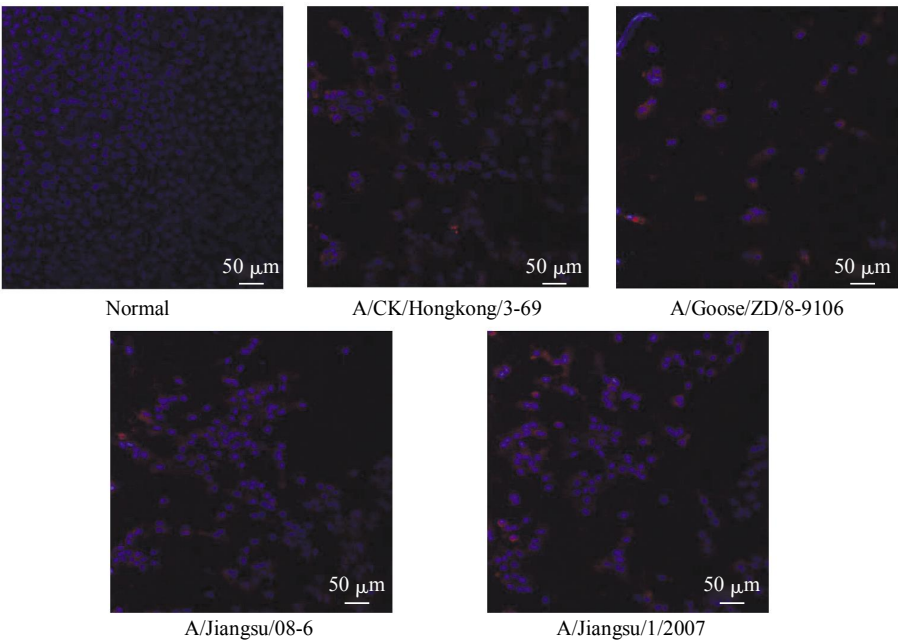


Fig. 4 Immunofluorescence assays used to show the specific binding of 8G10D7 to 4 H5N1 avian influenza A viruses in permeabilized MDCK cells

2.5 血凝抑制实验

血凝实验是因为病毒的血凝素可以与宿主细胞的受体结合从而引起红细胞凝集。但是病毒的血凝可被相应的特异性抗体所抑制，即血凝抑制实验。8G10D7 与 4 株病毒孵育后再加入红细胞产生血凝抑制，说明该单抗均可与 4 株病毒结合，阻止受体与病毒的结合。8G10D7 对不同病毒的 HI 活性与 IC_{50} 成正比相关性(表 1)。

2.6 H5N1 型禽流感病毒蛋白结构模式图的构建及单抗中和表位的确定

根据 Western-blot 及血凝抑制实验结果可知，8G10D7 与 HA 蛋白的结合位点位于 HA1 亚基上，且由于能引起血凝抑制，从而进一步推断该结合位点位于受体结合位点附近。利用 SWISS-PDBV 软件构建 A/Jiangsu/1/2007(H5N1)病毒 HA 的 3D 蛋白结构图(图 5b)^[22]。已发表的文献表明，在 HA 的头

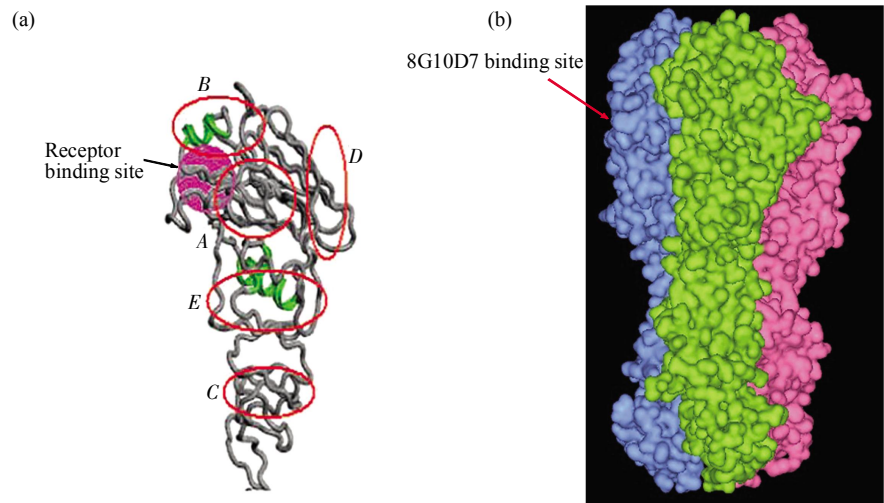


Fig. 5 Epitopes of the HA and mAb 8G10D7 binding site

(a) Globular head of amonomer of HA (Protein Data Bank ID code 1hgf), showing five antibody-binding sites (or epitopes) and the receptor-binding site. (b) A surface representation of the trimeric A/Jiangsu/1/2007(H5N1) HA protein. The trimeric HA protein were drawn in pink, green and blue, respectively. 8G10D7 binds an epitope near the receptor binding sites in HA1 domain.

部共有 5 个抗原结合表位(图 5a), 其中宿主细胞的受体结合表位主要在 A 和 B 抗原决定簇附近, 因此我们可以进一步推断 8G10D7 的结合位点即位于二者之间或附近(图 5b).

2.7 8G10D7 对 10 LD₅₀ 病毒感染鸡胚的保护试验

图 6 显示了不同浓度的 8G10D7 抗体对 4 株病毒感染鸡胚预防保护效率. 从图 6 可以看出对

A/CK/Hongkong/3-69(H5N1)(图 6a)感染的鸡胚, 8G10D7 抗体用量在 50 μ l 即可到 100%的保护率, 而对于 A/Goose/ZD/8-9106(H5N1)(图 6b), A/Jiangsu/08-6(H5N1)(图 6c), A/Jiangsu/1/2007(H5N1)(图 6d)感染的鸡胚则需要 100 μ l 方可达到 100%的保护率.

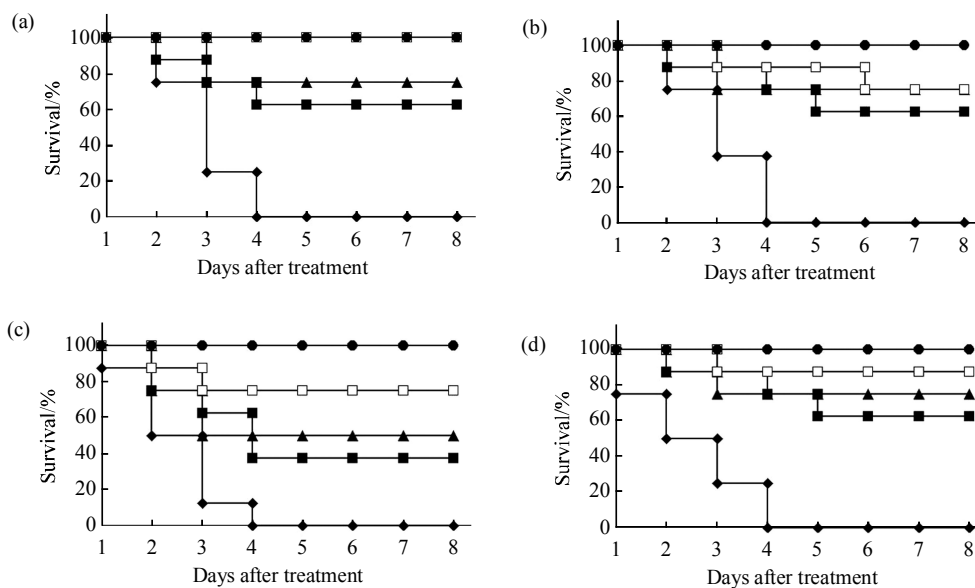


Fig. 6 Prophylactic protection of the mAb 8G10D7 against the 4 H5N1 avian influenza A viruses

(a) A/CK/Hongkong/3-69(H5N1). (b) A/Goose/ZD/8-9106(H5N1). (c) A/Jiangsu/08-6(H5N1). (d) A/Jiangsu/1/2007(H5N1). ◆—◆: PBS; ■—■: 12.5 μ l; ▲—▲: 25 μ l; □—□: 50 μ l; ○—○: 100 μ l; ●—●: 200 μ l.

图 7 显示了不同浓度的 8G10D7 抗体对 4 株病毒感染鸡胚治疗保护效率. 从图 7 可以看出对

A/CK/Hongkong/3-69(H5N1)(图 7a), A/Goose/ZD/8-9106(H5N1)(图 7b)感染鸡胚的保护率较好, 在

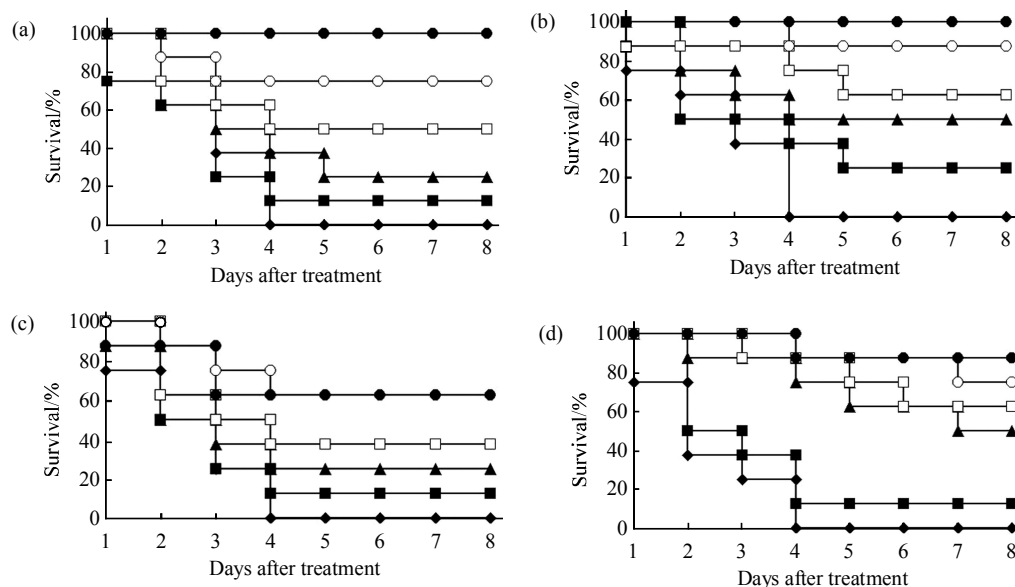


Fig. 7 Therapeutic protection of the mAb 8G10D7 against the 4 H5N1 avian influenza A viruses

(a) A/CK/Hongkong/3-69(H5N1). (b) A/Goose/ZD/8-9106(H5N1). (c) A/Jiangsu/08-6(H5N1). (d) A/Jiangsu/1/2007(H5N1). ◆—◆: PBS; ■—■: 50 μ l; ▲—▲: 100 μ l; □—□: 200 μ l; ○—○: 300 μ l; ●—●: 400 μ l.

最高用量 400 μl 可达到 100% 的保护率, 而对于 A/Jiangsu/1/2007(H5N1) (图 7d) 的保护率较低, 在最高用量 400 μl 时为 87.5%, 对 A/Jiangsu/08-6 (H5N1) (图 7c) 则只有 62.5%, 而且随着抗体浓度的增加, 保护率并没有提高。

3 讨 论

血凝素 HA 是流感病毒最重要的表面糖蛋白, 它具有与细胞表面病毒特异性受体结合、介导病毒外膜与细胞内体融合, 以及刺激机体产生中和抗体等作用。研究表明, 病毒表面膜蛋白 HA 在病毒吸附及穿膜过程中均起关键作用^[23]。病毒首先通过位于血凝素上的 HA1 亚基识别宿主细胞膜表面多糖受体唾液酸并与其结合^[24], 使病毒附着于易感细胞表面, 存在于 HA2 亚基的氨基酸末端上的融合序列裸露, 激活溶解多肽, 与宿主细胞表面发生膜融合从而使病毒 RNA 进入宿主细胞^[25]。HA 与细胞受体结合是病毒感染细胞的起始和关键步骤, HA 诱导机体产生的抗体是最重要的中和抗体, 且流感病毒膜蛋白 HA 上存在着多个抗原决定簇。另一方面, HA 蛋白易发生变异, 由其引起的病毒抗原性及毒力变异使得人群原有的特异性免疫力失效。如果能找到多个不同亚型病毒株之间的保守中和表位, 对以后可能会发生的甲型流感病毒的临床治疗具有重要意义。

本实验利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统在昆虫细胞中成功表达了 H5N1 型禽流感病毒的 HA 蛋白, 分子质量约为 70 ku。杆状病毒-昆虫细胞表达系统作为一种真核表达系统, 在外源基因表达方面具有糖基化、磷酸化和蛋白质切割加工修饰过程, 由此系统表达的 HA 蛋白的生物学特性与天然产物相似, 具有糖基化、磷酸化等细胞修饰结构^[26]。采用该重组蛋白免疫小鼠, 可排除病毒中其他蛋白质组分的干扰, 与传统的病毒免疫相比得到中和抗体的几率更高。本实验共获得 5 株高滴度的单抗, 最终获得具有广谱中和活性的单抗一株, 并将其应用于鸡胚感染病毒的保护试验中, 取得了较好的保护率。

中和试验结果表明, 5 株单抗中仅 8G10D7 对 4 株病毒均有一定的中和活性, 由于 4 株病毒属于不同亚型、不同宿主来源的病毒, 我们可以推断该单抗具有较为广谱的中和活性。Western-blot 实验及血凝抑制实验进一步证实了 8G10D7 的结合位点位于 HA1 亚基, 又由于其能引起血凝抑制, 证明

了结合位点位于受体结合位点附近。

8G10D7 对各病毒株感染后的鸡胚保护效率不同, 对禽来源的病毒感染的保护率较人来源的病毒的保护率高, 对人来源的 H5N1 型禽流感病毒的中和活性和血凝抑制活性都比禽来源的病毒低。鸡胚感染保护率与中和实验及血凝抑制实验中所需的 8G10D7 抗体的浓度有正相关性, 可能与分离病毒株的宿主有关, 由于能感染人的 H5N1 型禽流感病毒具有较高的致病性, 对宿主有更快的适应性, 在体内的繁殖速度也较快, 在注入病毒 1 h 之内, 病毒已感染鸡胚造成其机体内部某些部位不可逆的病变, 所以随着抗体浓度的增加, 保护率并没有提高, 此机制尚待进一步研究。

8G10D7 对 4 株病毒均具有中和活性, 说明 8G10D7 识别的表位是保守的中和表位。近年来, 对中和性抗体特异性抗原结合表位的确定是研究的热点。中和表位的分析既是对中和抗体进行特性分析和探讨抗体治疗的疗效和机制的基础, 又是研制开发治疗用中和抗体和亚单位疫苗的重要信息, 目前对 H5N1 禽流感中和抗体的研究较少。

Ekiert 等^[16]通过结晶衍射技术证实一株广谱中和活性 Fab 抗体 CR2621 通过其 HCDR 区与 HA2 亚基结合, 从而证明其通过抑制血凝素调节的病毒-宿主细胞膜融合抑制病毒的感染。Sui 等^[17]报道, 针对 HA2 亚基颈环区另一高度保守表位产生的 scFv 抗体 F10 不仅可以中和不同亚型的 H5N1 型禽流感病毒, 甚至还可以中和 H3N2 及 H1N1 型病毒株, 并对该抗体的抗原结合位点进行了大致的定位分析。说明在 HA 蛋白的 HA2 亚基上存在着保守的中和表位。Oh 等^[12]报道, 单抗 9F4 在 HA1 的表位上存在着一个保守表位, 该抗体不能产生血凝抑制, 但是可以中和 clade1 和 clade 2 的 H5N1 型禽流感病毒株。本实验中制备的 8G10D7 也能对不同 clade 的 H5N1 型禽流感病毒产生抗体, 又由于能产生血凝抑制效应, 证明其结合的表位也在 HA1 亚基上, 但结合的表位与 9F4 结合的位点不相同, 可能是新的保守中和表位, 位于受体结合位点附近, 其中和机制也是通过抑制血凝素与宿主细胞上的唾液酸受体结合。以上研究说明 H5N1 型禽流感病毒的 HA1 亚基中也存在着保守的中和表位, 该结果提示我们可以选择更多有代表性的禽流感毒株对这株抗体的广谱中和活性进行分析, 结合参与毒株的 HA 氨基酸序列分析比较, 通过构建血凝素蛋白 N 端和 C 端缺失突变体及其定点突变克隆, 对

抗原抗体结合位点进行精确定位. 如果能进一步鉴定出该单抗的结合抗原决定簇序列, 在疫苗设计上具有一定的应用价值.

本研究获得的针对 HA1 亚基的广谱中和性抗体, 在病毒感染的早期治疗中具有重要的临床意义, 对于防治不同类型的甲型流感及以后可能出现的甲型流感变异病毒都具有重要意义. 对流感病毒 HA 分子保守的中和表位的深入研究, 也可为工程重组通用 H5 型禽流感亚单位疫苗的研究提供理论基础^[28].

参 考 文 献

- [1] Ebrahim G J. Avian flu and influenza pandemics in human populations. *J Trop Pediatr*, 2004, **50**(4): 192–194
- [2] Lewis D B. Avian flu to human influenza. *Annu Rev Med*, 2006, **57**: 139–154
- [3] Andrade C R, Ibiapina Cda C, Champs N S, *et al.* Avian influenza: the threat of the 21st century. *J Bras Pneumol*, 2009, **35**(5): 470–479
- [4] Peiris J S, de Jong M D, Guan Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. *Clin Microbiol Rev*, 2007, **20**(2): 243–267
- [5] Wang H, Feng Z, Shu Y, *et al.* Probable limited person-to-person transmission of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus in China. *Lancet*, 2008, **371**(9622): 1427–1434
- [6] Ungchusak K, Auewarakul P, Dowell S F, *et al.* Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1). *N Engl J Med*, 2005, **352**(4): 333–340
- [7] Collins P J, Haire L F, Lin Y P, *et al.* Crystal structures of oseltamivir-resistant influenza virus neuraminidase mutants. *Nature*, 2008, **453**(7199): 1258–1261
- [8] Suzuki M, Masuda Y. Effect of a neuraminidase inhibitor (oseltamivir) on mouse jump-down behavior *via* stimulation of dopamine receptors. *Biomed Res*, 2008, **29**(5): 233–238
- [9] Subbarao K, Murphy B R, Fauci A S. Development of effective vaccines against pandemic influenza. *Immunity*, 2006, **24**(1): 5–9
- [10] Kong L K, Zhou B P. Successful treatment of avian influenza with convalescent plasma. *Hong Kong Med J*, 2006, **12**(6): 489
- [11] Yu X, Tsibane T, McGraw P A, *et al.* Neutralizing antibodies derived from the B cells of 1918 influenza pandemic survivors. *Nature*, 2008, **455**(7212): 532–536
- [12] Russell C J, Webster R G. The genesis of a pandemic influenza virus. *Cell*, 2005, **123**(3): 368–371
- [13] Yamada S, Suzuki Y, Suzuki T, *et al.* Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature*, 2006, **444**(7117): 378–382
- [14] Sui J, Aird D R, Tamin A, *et al.* Broadening of neutralization activity to directly block a dominant antibody-driven SARS-coronavirus evolution pathway. *PLoS Pathog*, 2008, **4**(11): e1000197
- [15] Wang T T, Tan G S, Hai R, *et al.* Broadly protective monoclonal antibodies against H3 influenza viruses following sequential immunization with different hemagglutinins. *PLoS Pathog*, 2010, **6**(2): e1000796
- [16] Ekiert D C, Bhabha G, Elsliger M A, *et al.* Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. *Science*, 2009, **324**(5924): 246–251
- [17] Sui J, Hwang W C, Perez S, *et al.* Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, **16**(3): 265–273
- [18] Shen S, Tan T H, Tan Y J. Expression, glycosylation, and modification of the spike (S) glycoprotein of SARS CoV. *Methods Mol Biol*, 2007, **379**: 127–135
- [19] WHO. Continuing progress towards a unified nomenclature system for the highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses [R/OL]. Geneva: World Health Organization, 2009 [2011-02-28]. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/nomenclature/en/index.html
- [20] Hu A Y, Weng T C, Tseng Y F, *et al.* Microcarrier-based MDCK cell culture system for the production of influenza H5N1 vaccines. *Vaccine*, 2008, **26**(45): 5736–5740
- [21] Sauerbrei A, Haertl A, Brandstaedt A, *et al.* Utilization of the embryonated egg for *in vivo* evaluation of the anti-influenza virus activity of neuraminidase inhibitors. *Med Microbiol Immunol*, 2006, **195**(2): 65–71
- [22] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, *et al.* The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 2006, **22**(2): 195–201
- [23] Steinhauer D A. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology*, 1999, **258**(1): 1–20
- [24] Skehel J J, Wiley D C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem*, 2000, **69**: 531–569
- [25] Stegmann T, Bartoldus I, Zumbunn J. Influenza hemagglutinin-mediated membrane fusion: influence of receptor binding on the lag phase preceding fusion. *Biochemistry*, 1995, **34**(6): 1825–1832
- [26] Browne M J, Balcarek J M. Expression of mammalian cell-surface receptors in higher eukaryotic systems. *Curr Opin Biotechnol*, 1993, **4**(5): 553–557
- [27] Oh H L, Akerstrom S, Shen S, *et al.* An antibody against a novel and conserved epitope in the hemagglutinin 1 subunit neutralizes numerous H5N1 influenza viruses. *J Virol*, 2010, **84**(16): 8275–8286
- [28] Adar Y, Singer Y, Levi R, *et al.* A universal epitope-based influenza vaccine and its efficacy against H5N1. *Vaccine*, 2009, **27** (15): 2099–2107

Broad-spectrum Neutralizing Monoclonal Antibodies Against H5N1 Avian Influenza A Viruses and Primary Research on The Mechanism*

ZHANG Xiao¹⁾, ZENG Xiao-Yan²⁾, LIU Zhe¹⁾, JIN Qiu¹⁾, XU Yan¹⁾, FENG Zhen-Qing^{1)**}, JIAO Yong-Jun^{2)**}

¹⁾ Key Laboratory of Antibody Technique, Ministry of Health, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China;

²⁾ Key Laboratory of Enteric Pathogenic Microbiology, Ministry of Health and Institute of Pathogenic Microbiology, Jiangsu Provincial Center for Disease Prevention and Control, Nanjing 210009, China)

Abstract Avian influenza is a highly contagious disease of birds caused by A influenza viruses. The circulation in humans by the highly pathogenic H5N1 avian flu in the past few years have caused most pandemics and have heightened fear that the next influenza pandemic is due. Antibodies could be used as an efficient anti-virus agent in clinical therapy. The full-length HA of the A/Jiangsu/1/2007(H5N1) about 1.7 kb was amplified, subcloned to the pFastBac vector and recombinant bacmid DNA was selected. The recombinant HA was expressed and purified HA about 70 ku was used as the antigen to immunize Balb/c mice. The whole H5N1 virus was used to select 5 mono-antibodies (mAbs), and all of them were tested using microneutralization assays. 8G10D7, one of the antibodies, had broad neutralizing effect against clade 2 and clade 9 H5N1 avian influenza A viruses, and the IC_{50} was from 1 : 256 to 1 : 64. When detected with 8G10D7, all 4 viruses showed 70 ku and 43 ku protein band, which confirms that the binding site of the scFv antibodies were located at the HA1 domain. The nucleuses of MDCK cells infected by 4 viruses were colored purple, and red around the nucleus. 8G10D7 showed HI activity to the 4 viruses, the HI has a positive correlation with neutralization concentration IC_{50} , which also further confirms that the binding site of the scFv antibodies were located at the HA1 domain. When the mAb 8G10D7 was used for the study of prophylaxis and therapeutic effect on influenza A viruses infection in an embryonated chicken eggs model. It had a complete 100% protection effect on the H5N1 viruses in avian host in the prophylactic and therapeutic groups. The 100% preventive protection effect could be reached when challenged with H5N1 avian influenza A virus in human host in the prophylactic groups, and there is also a 87.5% protection effect with H5N1 viruses in human host in the therapeutic groups. Thereby, the study suggests that the mAb 8G10D7 could be used in therapies to counter the H5N1 influenza A virus, and the epitope could be the key point for the design and implementation of vaccines.

Key words H5N1 avian influenza A virus, Bac-to-Bac baculovirus expression system, mAb, microneutralization assay, $TCID_{50}$, hemagglutination-inhibition

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00090

*This work was supported by grants from The Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK2008446, BK2009431) and The Health Department of Jiangsu Province (H200857).

**Corresponding author.

FENG Zhen-Qing. Tel: 86-25-86862739, E-mail: fengzhenqing@njmu.edu.cn

JIAO Yong-Jun. Tel: 86-25-83759437, E-mail: yongjunjiao@gmail.com

Received: February 28, 2011 Accepted: May 19, 2011