

• 综 述 •

人博卡病毒病毒样颗粒研究进展*

邓中华 综述, 曹友德[△] 审校

(湖南省人民医院检验科, 湖南长沙 410005)

关键词: 人博卡病毒; 病毒蛋白 2; 病毒样颗粒

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.14.036

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)14-1901-03

人博卡病毒(Human Bocavirus, HBoV)是 Allander 等^[1] 2005 年在呼吸道标本大量筛查中发现的一种新病毒, 迄今为止 HBoV 共有 4 个基因型, 分别命名为 HBoV1~4^[2]。目前 HBoV 的致病机制尚未明确, 研究结果 HBoV1 主要存在于呼吸道分泌物中, 引起婴幼儿呼吸道感染^[2]; HBoV2-4 主要是在粪便标本中被检出, 其中 HBoV2 及 HBoV3 被证实与急性胃肠炎有关, 又以 HBoV2 的检出率最高^[2]。到目前为止, 尚没有针对 HBoV 感染的特异性抗病毒药物治疗的文献报道, 预防是降低 HBoV 对人类健康危害最有效的方法。疫苗接种是感染性疾病预防的主要手段, 有研究显示, 病毒样颗粒结构与野生病毒及其相似, 且无体内复制能力, 安全性好, 可替代减毒活病毒作为疫苗用于预防疾病的感染^[3], 因此病毒样颗粒疫苗是目前 HBoV 疫苗研究的主要方向。本文就 HBoV 病毒样颗粒研究进展进行综述。

1 病毒样颗粒

病毒样颗粒(VLPs)是包含病毒的一个或者多个结构蛋白的空心颗粒, 它的外部结构与天然的病毒粒子非常相似, 但是它不含有核酸, 因此它没有细胞内自我复制的能力。病毒样颗粒与天然病毒极其相似的外部结构导致它能够像天然病毒一样通过与膜相关免疫球蛋白组成的 B 细胞受体交联, 从而诱导强烈的体液免疫反应^[4]。作为外来抗原 VLPs 能够整体进入树突状细胞(DC)胞质内被树突状细胞有效的处理, 作为 MHC-I 类分子限制性表位, 通过交叉提呈或胞内直接加载的方式提呈给细胞毒性 T 淋巴细胞(CTLs)^[4-5]。部分 VLPs 还能直接诱导 DCs 表型和功能分化成熟。能够与 DC 之间发生交互作用是 VLPs 作为疫苗最为重要的优势, 因为最新的研究认为, 这种细胞模式是激活固有免疫反应和获得性免疫反应至关重要的因素^[6]。因此, 许多 VLPs 可以作为有效的抗原诱导抗病原的 CTL 反应^[7]。

很多研究证实病毒样颗粒可以作为一种安全有效的候选疫苗^[4,8], 它甚至不需要免疫佐剂。目前, 商品化的病毒样颗粒疫苗已经被用于保护人乳头瘤病毒(HPV)^[9]和乙型肝炎病毒(HBV)^[10]感染。这些病毒样颗粒疫苗被证实有强烈的免疫原性, 良好的耐受性以及预防相关疾病的高度的有效性^[11-12]。

2 HBoV VP2 VLPs 结构特点

HBoV 是一种小 DNA 病毒, 其基因组为单链 DNA, 长度大约是 5kb, 其终端序列目前尚不清楚^[13], 它编码两个非结构蛋白包括 NS1 和一个博卡病毒特异性的核酸磷酸化蛋白 NP1, 以及两个主要的结构蛋白 VP1 和 VP2^[14-16]。原核表达的带有多聚组氨酸(His)标签的 His-VP1、His-VP2、His-NP1

和 His-NS1 融合蛋白的相对分子质量大约分别是 78.1, 63.4, 29.0 和 75.0×10^3 ^[17]。VP1 和 VP2 十分相似, 他们的 C 端是相同的, 只是在 N 端的磷脂酶 A 片段是 VP1 所独有的(VP1u)^[18]。Brieu 等^[19]运用电镜在 HBoV 感染 DNA 阳性患者鼻咽抽吸物中观察到了一种类似于细小病毒的病毒颗粒, 但由于病毒数量较少, 因此并没有全面了解到病毒的详细结构。

由于 HBoV 在体外难以培养, 而 HBoV VP2 VLPs 包含了病毒粒子的绝大部分的病毒衣壳, 因此 Gurda 等^[20]运用杆状病毒表达体系成功表达了 HBoV VP2 VLPs, 纯化后的 VLPs 经磷酸钨负染色, 采用透射电镜观察, 同时采用低温电镜和图像重构技术详细分析 VLPs 的三维超微结构并与其他细小病毒 VLPs 比较。通过数千张单独的图片对 HBoV VLPs 进行 3D 重建得到了其详细的结构特征。其结果显示 HBoV VP2 VLPs 是一种没有包膜的对称二十面体, 其中三个突出的特征是和其他细小病毒相同的: (1)二十面体的每一个双重轴线都有一个前注样凹陷; (2)一个大的三聚物突起围绕着三重轴线或者处于三重轴线上; (3)每一个五重轴线上都有一个通道, 其最外面的开口是由被峡谷样区域广泛环绕的五聚体结构组成。而脊椎动物细胞病毒颗粒的双重轴线上也有同样的凹陷但却没有三聚物突起和五聚体通道。HBoV VP2 VLPs 二十面体的直径最低凹陷之间大约是 215Å, 而最高突起之间大约是 280Å, 因此 HBoV VP2 VLPs 的直径大约是 21.5~28 nm^[20], 与细小病毒 B19 在外部特征上最相似; 研究证实保护病毒核心结构的外壳蛋白包括 8 链 β 桶状结构, α 螺旋, DE 环和 HI 环, 这与病毒装配和保持病毒稳定的需求是一致的。保护 β 圆筒状通道的是 DE 环, 这就提示了这个通道是 HBoV 感染的必不可少的结构之一, 因为它可能作为 VP1u 外表化和 DNA 包装的门户, 与其他细小病毒是一致的。Gurda 等^[20]还将 HBoV VP2 VLPs 与其他脊椎动物细小病毒颗粒反复比较其结构, 推测 HBoV VP1u 应该是存在病毒内部而不在病毒表面, 这与 Kantola 等^[21]通过血清学研究结果是一致的, 进一步证实了 HBoV VP1u 是存在病毒衣壳蛋白内部。

3 HBoV VP2 VLPs 的表达

VLPs 的表达方法有很多, 2006 年德国默克公司成功的用酿酒酵母细胞成功的表达了 HPV 病毒样粒子, 并运用于疫苗的研究。此外, 魏旻希等^[22]通过大肠杆菌表达体系表达, 经纯化后, 在一定的外部条件下使之形成病毒样颗粒结构成功获得了 HPV 病毒样颗粒; 这些传统方法的运用范围十分局限, 大部分病毒结构蛋白经大肠杆菌原核表达体系表达出来的蛋白

* 基金项目: 湖南省科技厅科研条件创新专项计划(2012TT2004)。 作者简介: 邓中华, 男, 检验技师, 主要从事病毒检测方面研究。

[△] 通讯作者, E-mail: youde120@aliyun.com。

经纯化后都不能再外部形成 VLPs 结构。Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统的出现解决了传统方法 VLPs 表达的局限性问题,它具有表达量高、适用范围广等诸多优点,其主要内容是通过阳性标本扩增获得的目的蛋白基因片段或者根据 Gene Bank 获得的目的蛋白基因序列经人工合成的目的基因片段重组到 pFastBac donor 质粒上,在将含有目的基因的重组质粒转化到大肠杆菌细胞中,在大肠杆菌中获得类似细菌质粒的重组病毒杆粒 DNA。用重组杆粒 DNA 在 Cellfectin 试剂感染细胞获得原代重组杆状病毒,将重组杆状病毒感染昆虫细胞即大量扩增病毒或表达蛋白。目前,已经有 HBV、HPV、HIV 等病毒的 VLPs 通过 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统成功的表达出来^[3]。

自 2005 年 HBoV 被发现后不久就有 HBoV VP 蛋白被成功的通过原核表达体系和杆状病毒表达体系表达出来^[18,23-24], Shirkoohi 等^[17]采用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达体系成功的表达了带有 His 标签的 HBoV-VP1、VP2、NS1、NP1 蛋白,通过免疫荧光证实 HBoV 感染患者血清中的 IgG 抗体主要是 VP1 和 VP2 结合。Kantola 等^[18]研究显示,VP2 是构成 HBoV 病毒颗粒外部结构的主要成分,而 VP1u 存在于病毒的内部,因此在血清学调查中,只有很小一部分抗体能与 VP1u 反应,并且只有抗体和 VP2 结合形成的抗原抗体复合物才能在尿素作用下不解离,因此,HBoV VP2 VLPs 常被表达出来用于 HBoV 感染的血清流行病学的研究。Lin 等^[25]通过杆状病毒表达体系成功表达了 HBoV1 VP2 VLPs;而后 Kantola 等^[21]通过杆状病毒表达体系成功表达了 HBoV1~4 VP2 VLPs。

4 HBoV VP2 VLPs 应用

到目前为止尚未找到 HBoV 体外培养的合适的细胞系,因此许多有关于 HBoV 其他的研究也借用了与 HBoV 病毒粒子十分相似的 HBoV VP2 VLPs。HBoV VP2 VLPs 表达的最初目的就是建立血清学检测方法,目前 HBoV VP2 VLPs 最主要用途就是作为抗原用于 ELISA 检测血清中特异性抗体。2008 年, Lin 等^[25]首次系统的建立了运用 HBoV VP2 VLPs 作为抗原检测人血清中 HBoV 特异性抗体的 ELISA 检测方法。之后, 全世界各地均有采用 HBoV VLPs 作为抗原进行对 HBoV 各亚型进行血清流行病学研究的文献^[18,23-24,26-28]报道。2010 年 Kapoor 等^[29]发现了 HBoV4 后, Jartti 等^[2]用杆状病毒表达体系表达了 HBoV1~4 VP2 VLPs, 全面调查了 HBoV 的血清 IgG 与 IgM 抗体产生情况, 同时采用 VLPs 竞争 ELISA 方法探讨了 HBoV1~4 型之间的交叉反应, 结果指出, HBoV-1 IgG 抗体与 HBoV2~4 之间有很高的交叉反应率。HBoV 在血清学研究方面的广泛使用说明 HBoV VLPs 具有良好的抗原性。

目前, 尚没有研究报道 HBoV 特异性的人 T 细胞表位, Lindner 等^[30]在检测健康人 T 细胞针对 HBoV 反应时, 将 HBoV VP2 VLPs 作为 ELISPOT 实验的特异性刺激抗原, 成功地刺激了 HBoV 血清阳性健康人的单个核细胞分泌 IFN- γ , 这意味着 HBoV VP2 VLPs 可能具有诱导细胞免疫的活性。而 Kumar 等^[31]也成功的运用 HBoV VP2 VLPs 刺激人外周血单个核细胞分泌 IFN- γ , IL-10 和 IL-13, 这说明了 HBoV 刺激机体产生 Th1 型和 Th2 型免疫反应。Chung 等^[32]通过检测 HBoV 感染患者呼吸道分泌物中细胞因子所反应的 HBoV 感染的机体免疫反应类型一致。

此外 VLPs 还可以作为疫苗用于病毒感染的预防。目前

已经运用于临床的病毒样颗粒疫苗有 HBV、HPV 等。在细小病毒中, 细小病毒 B19 VP1 和 VP2 的免疫原性研究已经有文献^[33]报道, 研究结果显示, B19 VP1 VLPs 诱导机体产生高效价的中和抗体, 可以作为疫苗预防细小病毒 B19 的感染。而迄今为止, 尚无关于 HBoV VLPs 免疫原性及 HBoV VLPs 疫苗研究的报道, 因此 HBoV 作为疫苗可能性还有待进一步研究证实。

5 小 结

HBoV 是 2005 年新发现的病毒, 目前有关 HBoV 的文献报道主要是流行病学调查, 其 VP2 VLPs 也主要是用于血清流行病学调查研究。而 HBoV 在全世界范围的广泛传播已经严重影响到了人的生命健康, 研究 HBoV VP2 VLPs 疫苗具有一定的理论和实践基础, 具有较好的可行性和重要意义。

参考文献

- [1] Allander T, Tammi MT, Eriksson M, et al. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(36): 12891-12896.
- [2] Jartti T, Hedman K, Jartti L, et al. Human bocavirus-the first 5 years [J]. *Rev Med Virol*, 2011, 22(1): 46-64.
- [3] Buonaguro L, Tornesello ML, Buonaguro FM. Virus-like particles as particulate vaccines [J]. *Curr HIV Res*, 2010, 8(4): 299-309.
- [4] Chackerian B. Virus-like particles: flexible platforms for vaccine development [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2007, 6(3): 381-390.
- [5] Ludwig C, Wagner R. Virus-like particles-universal molecular toolboxes [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2007, 18(6): 537-545.
- [6] Grgacic EV, Anderson DA. Virus-like particles: passport to immune recognition [J]. *Methods*, 2006, 40(1): 60-65.
- [7] Gamvrellis A, Leong D, Hanley JC, et al. Vaccines that facilitate antigen entry into dendritic cells [J]. *Immunol Cell Biol*, 2004, 82(5): 506-516.
- [8] Roldao A, Mellado MC, Castilho LR, et al. Virus-like particles in vaccine development [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2010, 9(10): 1149-1176.
- [9] Paavonen J, Jenkins D, Bosch FX, et al. Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial [J]. *Lancet*, 2007, 369(9580): 2161-2170.
- [10] Kee GS, Pujar NS, Titchener-Hooker NJ. Study of detergent-mediated liberation of hepatitis B virus-like particles from *S. cerevisiae* homogenate; identifying a framework for the design of future-generation lipoprotein vaccine processes [J]. *Biotechnol Prog*, 2008, 24(3): 623-631.
- [11] Inoue M. Protection against uterine cervical cancer by HPV vaccines [J]. *Uirusu*, 2008, 58(2): 155-163.
- [12] Stanley M, Gissmann L, Nardelli-Haeffliger D. Immunobiology of human papillomavirus infection and vaccination - implications for second generation vaccines [J]. *Vaccine*, 2008, 26(8): K62-67.
- [13] Lusebrink J, Schildgen V, Tillmann RL, et al. Detection of head-to-tail DNA sequences of human bocavirus in clinical samples [J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e19457.
- [14] Dijkman R, Koekkoek SM, Molenkamp R, et al. Human bocavirus can be cultured in differentiated human airway epithelial cells [J]. *J Virol*, 2009, 83(15): 7739-7748.
- [15] Chen AY, Cheng F, Lou S, et al. Characterization of the gene ex-

pression profile of human bocavirus[J]. Virology, 2010, 403(2): 145-154.

[16] Cecchini S, Negrete A, Virag T, et al. Evidence of prior exposure to human bocavirus as determined by a retrospective serological study of 404 serum samples from adults in the United States[J]. Clin Vaccine Immunol, 2009, 16(5): 597-604.

[17] Shirkoohi R, Endo R, Ishiguro N, et al. Antibodies against structural and nonstructural proteins of human bocavirus in human sera[J]. Clin Vaccine Immunol, 2010, 17(1): 190-193.

[18] Kantola K, Hedman L, Allander T, et al. Serodiagnosis of human bocavirus infection[J]. Clin Infect Dis, 2008, 46(4): 540-546.

[19] Brieu N, Gay B, Segondy M, et al. Electron microscopy observation of human bocavirus (HBoV) in nasopharyngeal samples from HBoV-infected children[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(10): 3419-3420.

[20] Gurda BL, Parent KN, Bladek H, et al. Human bocavirus capsid structure: insights into the structural repertoire of the parvoviridae[J]. J Virol, 2010, 84(12): 5880-5889.

[21] Kantola K, Hedman L, Arthur J, et al. Seroepidemiology of human bocaviruses 1-4[J]. J Infect Dis, 2011, 204(9): 1403-1412.

[22] 魏旻希, 李少伟, 黄博, 等. 人乳头瘤病毒 16 型病毒样颗粒的制备及其免疫原性研究[J]. 病毒学报, 2009, 25(4): 245-250.

[23] Kahn JS, Kesebir D, Cotmore SF, et al. Seroepidemiology of human bocavirus defined using recombinant virus-like particles[J]. J Infect Dis, 2008, 198(1): 41-50.

[24] 蒿叶霞, 高金明, 金玉. 人博卡病毒 VP2 蛋白的原核表达及血清学检测方法的建立[J]. 中华实验与临床病毒学杂志, 2012, 26(1): 18-21.

[25] Lin F, Guan W, Cheng F, et al. ELISAs using human bocavirus VP2 virus-like particles for detection of antibodies against HBoV

[J]. J Virol Methods, 2008, 149(1): 110-117.

[26] Guido M, Zizza A, Bredl S, et al. Seroepidemiology of human bocavirus in Apulia, Italy[J]. Clin Microbiol Infect, 2012, 18(4): 74-76.

[27] Hustedt JW, Christie C, Hustedt MM, et al. Seroepidemiology of human bocavirus infection in Jamaica[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e38206.

[28] Endo R, Ishiguro N, Kikuta H, et al. Seroepidemiology of human bocavirus in Hokkaido prefecture, Japan[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(10): 3218-3223.

[29] Kapoor A, Simmonds P, Slikas E, et al. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections[J]. J Infect Dis, 2010, 201(11): 1633-1643.

[30] Lindner J, Zehentmeier S, Franssila R, et al. CD4+ T helper cell responses against human bocavirus viral protein 2 virus like particles in healthy adults[J]. J Infect Dis, 2008, 198(11): 1677-1684.

[31] Kumar A, Filippone C, Lahtinen A, et al. Comparison of Th-cell immunity against human bocavirus and parvovirus B19: proliferation and cytokine responses are similar in magnitude but more closely interrelated with human bocavirus[J]. Scand J Immunol, 2011, 73(2): 135-140.

[32] Chung JY, Han TH, Kim JS, et al. Th1 and Th2 cytokine levels in nasopharyngeal aspirates from children with human bocavirus bronchiolitis[J]. J Clin Virol, 2008, 43(2): 223-235.

[33] Bernstein DI, Sahly HME, Keitel WA, et al. Safety and immunogenicity of a candidate parvovirus B19 vaccine[J]. Vaccine, 2011, 29(43): 7357-7363.

(收稿日期: 2014-01-25)

• 综 述 •

免疫蛋白酶体在自身免疫性疾病中的研究进展

陈耀光 综述, 王昌富 审校

(湖北省荆州市荆州中心医院检验医学部, 湖北荆州 434020)

关键词: 免疫蛋白酶体; 自身免疫性疾病; 综述
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 14. 037

文献标识码: A **文章编号:** 1673-4130(2014)14-1903-03

免疫蛋白酶体是在 γ -干扰素 (IFN- γ) 诱导下合成的 *LMP2*、*LMP10*、*LMP7* 替换标准蛋白酶体中的 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 5$ 亚单位形成, 免疫蛋白酶体在 MHC-I 类分子抗原提呈途径、细胞信号转导中发挥重要作用, 影响炎性因子的表达, 在自身免疫性疾病中发挥着重要作用。

1 泛素-蛋白酶体系统与免疫蛋白酶体

1.1 泛素-蛋白酶体系统 (UPS) UPS 由泛素 (Ub)、泛素活化酶 (E1)、泛素结合酶 (E2)、泛素连接酶 (E3)、蛋白酶体及其底物 (蛋白质) 构成^[1]。经过 E1、E2、E3 一系列酶的催化级联反应, 底物蛋白泛素化并形成泛素-底物蛋白复合体, 随后泛素-底物蛋白复合体与 26S 蛋白酶体相偶联, 底物蛋白进入蛋白酶体核心被降解。标准蛋白酶体由一个 20S 核心颗粒和两个 19S 调节颗粒组成, 相对分子质量为 $2\ 000 \times 10^3$ 。20S 核心颗粒由 α 环和 β 环组成, 按 $\alpha 1$ - $7\alpha 1$ - $7\beta 1$ - $7\beta 1$ -7 顺序排成圆筒状

结构。 α 亚基构成的环位于 20S 核心颗粒的外部, 发挥守门员的作用, 调节 20S 颗粒的结合部, 使进入核心颗粒内部的蛋白质具有选择性。 β 环位于 20S 核心颗粒的内部, 含有蛋白酶活性位点, 用以催化蛋白质水解反应。

1.2 免疫蛋白酶体 标准蛋白酶体每个 β 环含有 3 个不同的蛋白水解活性位点, 其中的 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 和 $\beta 5$ 亚单位分别具有谷氨酰胺酶样 (PGPH-L)、胰蛋白酶样 (T-L) 和糜凝乳蛋白酶样 (CT-L) 活性, 分别水解酸性氨基酸、碱性氨基酸和疏水氨基酸^[2], 如图 1 所示。IFN- γ 等刺激可诱导低分子量多肽 (LMP) 表达 (如 *LMP2*、*LMP10* 和 *LMP7*), 同时抑制 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 和 $\beta 5$ 表达。*LMP2*、*LMP10* 和 *LMP7* 表达替换 20S 核心颗粒中的 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 和 $\beta 5$ 亚单位, 组成新的具有功能活性的免疫蛋白酶体。*LMP2*、*LMP10* 和 *LMP7* 又分别称为 $\beta 1i$ 、 $\beta 2i$ 和 $\beta 5i$, 如图 2 所示^[3]。