

DOI:10.13350/j.cjpb.240503

• 论著 •

新型发热伴血小板减少综合征病毒灭活疫苗的制备及免疫原性研究*

杨盼¹, 刘乐乐¹, 田莉¹, 韩越¹, 赵忠欣², 孙培录³, 郑学星^{1**}, 夏成柱⁴, 郑文文^{1**}

(1. 山东大学齐鲁医学院公共卫生学院, 山东济南 250012; 2. 山东省临沂市人民医院;
3. 山东第一医科大学(山东省医学科学院)药物研究所; 4. 军事科学院军事医学研究院军事兽医研究所)

【摘要】 目的 评估和比较采用 H₂O₂ 与 β-丙内酯为灭活剂制备新型发热伴血小板减少综合征病毒(SFTSV)灭活疫苗的免疫原性。 方法 将 SFTSV 分别用 H₂O₂ 与 β-丙内酯灭活, 并与铝胶佐剂配伍制成灭活疫苗免疫小鼠, 持续 21 d 测小鼠体重、进食量、精神状态等, 评估疫苗的安全性。 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测小鼠血清中 SFTSV 特异性抗体水平, 中和实验测定小鼠血清中 SFTSV 中和抗体水平, 使用流式细胞术测定脾脏中 B 细胞的募集与活化水平。 结果 研究制备的两种灭活疫苗均表现出良好的安全性, SFTSV 中和抗体均值在免疫后 8 周效价均能达到 1 : 300 以上, 诱导的免疫反应均倾向于 Th2 型, 且具有较高的 B 细胞的活化水平, 其中 H₂O₂ 灭活剂组诱导产生的中和抗体效价高于 β-丙内酯灭活剂组。 结论 成功制备了两种在小鼠中诱导强烈体液免疫反应的 SFTSV 灭活候选疫苗, 并提供了相关的免疫参数。 H₂O₂ 作为灭活剂已显示出一定的优势, 有助于开发有效的疫苗, 为制备发热和血小板减少综合征病毒新型灭活疫苗提供研究依据。

【关键词】 发热伴血小板减少综合征病毒; 灭活疫苗; 中和抗体; 灭活剂; H₂O₂

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2024)05-0507-07

[*Journal of Pathogen Biology*. 2024 May;19(5):507-513.]

Preparation and preliminary study of inactivated vaccine for fever with thrombocytopenia syndrome virus
YANG Pan¹, LIU Lele¹, TIAN Li¹, HAN Yue¹, ZHAO Zhongxin², SUN Peilu³, ZHENG Xuexing¹, XIA Xianzhu⁴, ZHENG Wenwen¹ (1. School of Public Health, Cheeloo Collage Medicine, Shandong University, Jinan 250012, China; 2. Linyi People's Hospital of Shandong Province; 3. Institute of Materia Medica, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences; 4. Institute of Military Veterinary Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences)***

【Abstract】 **Objective** To evaluate and compare the immunogenicity of a novel inactivated vaccine against febrile thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) using H₂O₂ and β-propanelactone as inactivators. **Methods** SFTSV was inactivated with H₂O₂ and β-propionolactone, and the inactivated vaccine was prepared with aluminum adjuvant, and the body weight, food intake, and mental status of the mice were measured for 21 days to evaluate the safety of the vaccine. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the level of SFTSV-specific antibodies in the serum of mice, neutralization assay was used to determine the level of SFTSV neutralizing antibody in the serum of mice, and the recruitment and activation of B cells in the spleen were determined by flow cytometry. **Results** The two inactivated vaccines prepared in this study showed good safety, the average titer of SFTSV neutralizing antibody could reach more than 1 : 300 at 8 weeks after immunization, the induced immune response tended to be Th2 type, and had a high activation level of B cells, up to 19.1%, and the neutralizing antibody titer induced by the H₂O₂ inactivator group was higher than that of the β-propanelactone inactivator group. **Conclusion** In this study, two inactivated SFTSV vaccine candidates that induced a strong humoral immune response in mice were successfully prepared, and relevant immune parameters were provided. H₂O₂ has shown certain advantages as an inactivator, which is helpful for the development of effective vaccines, provides strong protection against SFTSV infection, and provides a research basis for the preparation of new inactivated vaccines for febrile and thrombocytopenia syndrome virus.

【Key words】 fever with thrombocytopenia syndrome virus; inactivated vaccines; neutralizing antibodies; Inactivator; H₂O₂

* **【基金项目】** 国家重点研发计划项目(No. 2022YFC2305005); 国家自然科学基金项目(No. 32170154, 82102391, 82272335, 92269116); 山东省自然科学基金(No. ZR2021MC010)。

** **【通讯作者】** 郑文文, E-mail: zhengwenwen@sdu.edu.cn; 郑学星, E-mail: zhengxuexing@sdu.edu.cn

【作者简介】 杨盼(1999-), 女, 河北人, 硕士研究生, 主要从事分子病毒学研究, E-mail: yangpan2580@126.com

发热伴血小板减少综合征 (Severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS) 是一种由大别班达病毒 (Dabie bandavirus, DBV) 也称发热伴血小板减少综合征病毒 (Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, SFTSV) 引起的一种新型蜱传传染病^[1]。临床症状以急性发热为主要特征, 可伴有血小板和白细胞的减少。重症患者可在 1~2 周因多脏器功能衰竭, 如休克、呼吸衰竭、弥散性血管内凝血等死亡^[2-3]。SFTS 首次确定在中国, 随后在韩国和日本报道的死亡率可达 27%^[4-5]。由于其高死亡率和引起大流行传播的潜在可能, SFTS 被 WHO 列为十大优先传染病, 迫切需要深入研究。

亚洲长角血蜱是 SFTSV 的主要传播媒介和宿主^[6-7], 牛、羊、猪等家养动物是潜在宿主^[8-9], 人是偶然宿主。SFTSV 主要通过蜱叮咬传播给人和动物, 也能通过人间接接触传播, 如接触受感染的血液、唾液和气溶胶^[10-11]。家畜、宠物和野生动物逐渐被视为动物传人的风险来源。SFTSV 具有引起大流行和医院内传播的能力, 可能引起全球公共卫生问题之一^[12]。疫苗和治疗药物对预防和治疗 SFTS 至关重要, 但迄今尚无获批使用的 SFTSV 疫苗。

传染病疫苗种类多样, 包括减毒活疫苗、载体疫苗、灭活疫苗、组分疫苗等, 其中灭活疫苗具有制备简单、工艺成熟、研发耗时短, 免疫过程中无感染性、使用安全等优点, 仍是主要的疫苗类型。灭活疫苗的灭活剂有甲醛、 β -丙内酯、二乙烯亚胺等, 最常用的是 β -丙内酯。 β -丙内酯早在 1984 年被选作灭活狂犬病疫苗的灭活剂正式使用, 但其价格昂贵, 且对动物有致癌和过敏的风险, 因此开发新型灭活剂的需求十分迫切^[13-14]。 H_2O_2 是一种强氧化剂, 与病毒作用后破坏其基因组, 核酸单链或双链断裂使病毒丧失复制能力, 较为完整地保留抗原结构^[15-16]。学者尝试以 H_2O_2 作为新型灭活剂, 为病毒灭活和疫苗开发提供了新思路^[17-18]。本研究利用 H_2O_2 灭活 SFTSV 制备灭活疫苗, 以 β -丙内酯作对照, 从免疫安全性和疫苗有效性 2 个方面进行了分析, 为研发 SFTSV 灭活疫苗奠定了基础。

材料与方法

1 材料

1.1 细胞和病毒株 非洲绿猴肾细胞 (Vero cells) 保存于山东大学微生物检验实验室、SFTSV JS2011 株获赠于武汉大学公共卫生学院实验室。

1.2 主要试剂 30% H_2O_2 购于济南启光科贸有限公司; 牛血清白蛋白 (BSA)、 β -丙内酯、 H_2O_2 酶、0.5% 埃文斯蓝染液均购于北京索莱宝科技有限公司;

Imject Alum 购于美国赛默飞世尔科技公司; Alexa Fluor 488-山羊抗鼠抗体购于英国 abcam 公司; HRP 标记的山羊抗鼠 IgG2a、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG1 抗体均购于英国 abcam 公司; HRP 标记的鼠源 Ig 抗体购于美国 Southern Biotech 公司; APC 标记的 CD19 抗体鼠源单克隆抗体 (APC-CD19)、FITC 标记的 CD40 鼠源单克隆抗体 (FITC-CD40) 购于美国 BD 公司; 酶联反应板、Falcon 细胞筛网、流式上样管均购于美国康宁公司; TruStain FcX™ 抗鼠 CD16/32 抗体购于美国 BioLegend 公司; 小鼠淋巴细胞分离液购于深圳市达科为生物技术股份有限公司)。

2 方法

2.1 病毒的培养 用含 10% FBS 的 DMEM 培养 Vero 细胞。细胞传代 18 h 后将培养液替换为 2% FBS DMEM。按 MOI=0.5 接种 SFTSV 后培养于 37 °C、5% CO_2 恒温细胞培养箱。3 d 后收集病毒液, 离心清除细胞碎片, 留取 200 μ L 测定病毒滴度。

2.2 病毒滴度测定 96 孔板接种 Vero 细胞, 1.5×10^4 /孔, 置于 37 °C、5% CO_2 细胞培养箱培养。用 2% FBS DMEM 将病毒 10 倍系列稀释至 10^{-8} , 接种于 Vero 细胞, 每稀释度设 3 个复孔, 同时设置阴、阳性对照孔, 孵育 48 h 后使用 80% 丙酮固定 16 h。一抗为鼠源 SFTSV Gc 单克隆抗体, 二抗为 Alexa Fluor 488-山羊抗鼠抗体, 稀释度分别是 1:400 与 1:800, 抗体孵育条件为 37 °C 1 h。每次孵育抗体后均使用 PBS 清洗, 荧光显微镜下观察、记录荧光孔分布, 计算 CCID₅₀ (Karber 法)。

2.3 病毒液灭活 取 30% H_2O_2 加入病毒液, 使 H_2O_2 终浓度为 3%, 4 °C 静置 2 h。加入 H_2O_2 酶终止反应, 室温 20 min, 4 °C 保存。 β -丙内酯灭活剂组按 1:4 000 的比例添加 β -丙内酯, 4 °C 静置 24 h, 每隔 4~6 h 混匀一次, 37 °C 放置 2 h 水解 β -丙内酯, 4 °C 保存。

2.4 灭活程度检测 Vero 细胞传代至 T25 细胞瓶, 培养液为 2% FBS DMEM, 18 h 后分别接种 2 种灭活病毒液, 每瓶 100 μ L, 同时设置对照, 阳性对照接种 SFTSV JS2011 株, 阴性对照接种 2% FBS DMEM, 37 °C、5% CO_2 培养箱培养。如添加灭活病毒液的细胞不出现病变则进行盲传实验。反复冻融第 2 代和第 3 代细胞培养物 3 次, 接种 Vero 细胞, 操作同上。观察细胞病变现象, 并通过免疫荧光实验检测 SFTSV 特异性病毒蛋白。

2.5 动物免疫 96 只 6~8 周雌性 BALB/c 小鼠 (济南朋悦实验动物繁育有限公司), 分至 H_2O_2 灭活剂组、 β -丙内酯灭活剂组、佐剂组、空白组; 灭活病毒液与 Imject Alum 1:1 混合, 小鼠右后肢肌肉注射。首

次免疫后,对每组小鼠进食量及精神状态进行持续监测,记录体重变化,用于评估灭活疫苗安全性(体重变化率=免疫后每日体重/初始体重 $\times 100\%$),观察期为21 d。首次免疫后14 d加强免疫。免疫方案见表1。实验动物的使用与动物实验方案均按照山东大学实验动物伦理委员会批准的指导方针进行。

2.6 中和抗体水平测定 初次免疫后第2、4、8周采集小鼠眼球血并分离血清,每次每组采集6只。经荧光灶减少法测定中和抗体水平。96孔细胞培养板每孔接种 1×10^4 Vero细胞,在培养板第一列孔内加入100 μL 用DMEM培养基4倍稀释的血清,再2倍比稀释直至 2^{-12} (每只设置3个复孔)。50 μL 2000 TCID₅₀/mL SFTSV 稀释液加入倍比稀释的孔中,留1孔只加病毒,细胞培养箱孵育70 min。将传代培养16 h~18 h的Vero细胞培养液更换为上述血清和病毒互作后的混合液,孵育90 min后再将培养液更换为2% FBS DMEM,细胞培养箱中培养48 h。后续方法同病毒滴度测定。计算50%血清中和终点(Reed-Muench法)。

2.7 结合抗体水平测定 初次免疫后2、4、8周每组取5只小鼠采集眼球血,分离血清测定SFTSV特异性Ig和IgG水平。酶联反应板每孔加入100 μL 浓度为6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SFTSV全蛋白,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。1% BSA 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜封闭。将血清稀释100倍,再2倍比稀释至最后一列,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。HRP标记抗体每孔添加100 μL ,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。显色液100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光30 min,用1% SDS溶液终止显色。每次加新液体前均用PBST清洗,甩干孔内液体后加样。测定405 nm波长吸光度(A)。全部数值减去空白对照孔吸光度值,若实验组血清 $A_{405} \geq$ 空白组血清 $A_{405} \times 2.1$,则记为阳性,否则为阴性。

2.8 B细胞募集与活化检测 免疫后第2周,每组取5只BALB/c小鼠,用于脾脏B细胞检测。无菌解剖取脾,添加5 mL小鼠淋巴细胞分离液于3.5 cm细胞培养皿内研磨,之后转移至15 mL离心管并在细胞悬液上覆盖1 mL无血清RPMI 1640培养液,室温800 g离心30 min。吸取位于中间层的淋巴细胞,1 mL PBS洗涤细胞一次。每 1×10^6 细胞添加1 μL TruStain FcXTM抗鼠CD16/32抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育20 min,加0.2 μL APC-CD19、0.2 μL FITC-CD40抗体,同时设单个抗体染色管与空白管,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min,1 mL PBS洗涤后通过Falcon细胞筛网,BD FACSCelesta上机检测。

2.9 疫苗保护性研究 使用免疫I型干扰素敲除小鼠(IFNAR^{-/-})评价疫苗保护性。免疫方案如表1所述,每组8只,首次免疫后第14 d加强免疫。免疫后

的第4周,均注射100 μL SFTSV病毒液,剂量为 2×10^5 TCID₅₀。攻毒后每天称量小鼠体重,监测小鼠的饮食情况、精神状态及临床症状,直至21 d观察期结束。绘制临床症状评分表,记录死亡情况并绘制生存曲线。

2.10 数据分析 采用SPSS24.0软件对数据进行分析。采用方差分析、独立样本 t 检验、Mann-WhitneyU检验统计方法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 免疫方案
Table 1 Immunization program

分组 Groups	免疫物 Immunologies	免疫剂量 Immune dose	小鼠数量 No.	免疫方式 Immunization methods
H ₂ O ₂ 灭活剂组	H ₂ O ₂ 灭活液+Imject Alum	1×10^7 FFU	32	右后肢肌注
β -丙内酯灭活剂组	β -丙内酯灭活液+Imject Alum	1×10^7 FFU	32	
佐剂组	DMEM+Imject Alum	100 μL	16	
空白组	DMEM	100 μL	16	

结果

1 病毒培养与滴度测定

获得高滴度SFTSV以制备疫苗。使用2% FBS DMEM培养Vero细胞,0.5 MOI扩增SFTSV,72 h收集上清。经间接免疫荧光实验、Karber法计算病毒滴度为 2.37×10^8 FFU/mL。

2 灭活效果检测

对两种灭活剂灭活的病毒液进行盲传实验,检测其是否彻底灭活病毒。以鼠源SFTSV Gc单克隆抗体为一抗,Alexa Fluor 488-山羊抗鼠抗体为二抗,在盲传培养物中均未检测到特异性荧光(图1)。

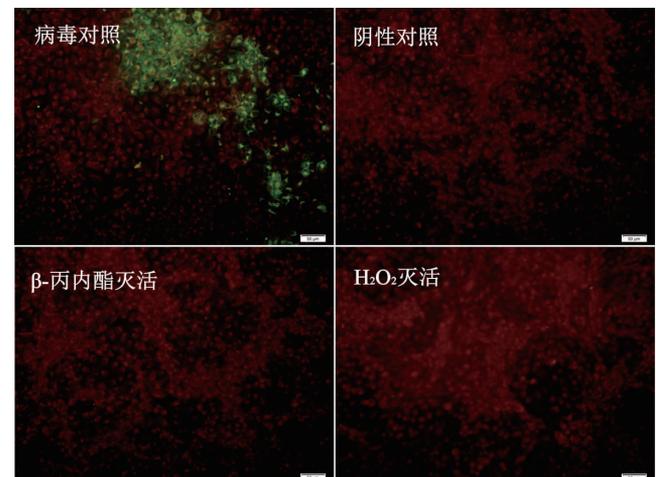


图1 灭活效果检测(标尺50 μm)
Fig. 1 Inactivation effect test (scale bar: 50 μm)

3 灭活疫苗的安全性评价

观察期内,H₂O₂灭活剂组、 β -丙内酯灭活剂组、佐剂组、空白组小鼠体重变化如图2所示。H₂O₂灭活

剂组、β-丙内酯灭活剂组小鼠体重均呈增长趋势,与佐剂组和空白组相比差异无统计学意义($F=0.3916, P>0.05$),表明灭活疫苗不致病。

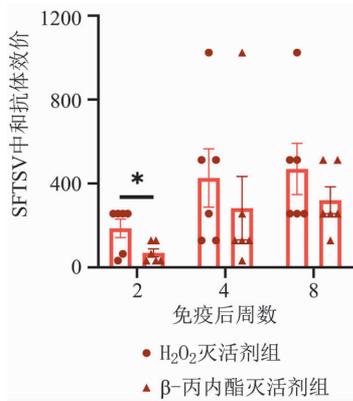
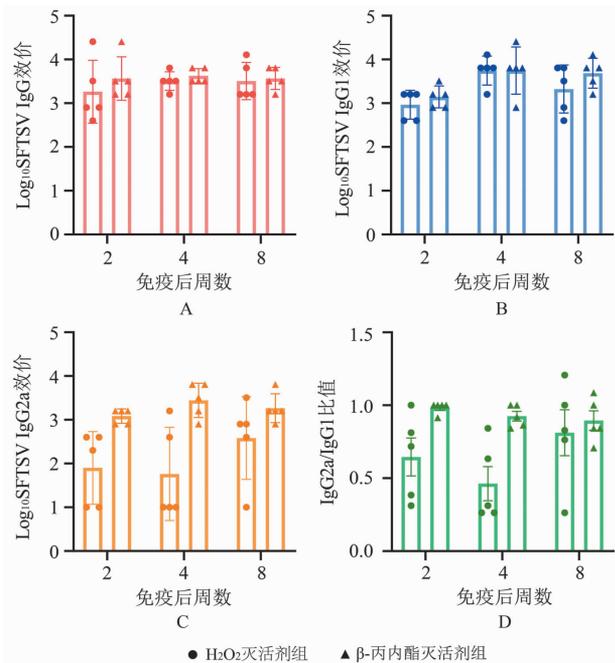


图3 中和抗体效价检测 (* $P=0.0348<0.05, n=6$)
Fig. 3 Neutralizing antibody titer assay

4 中和抗体水平测定

β-丙内酯灭活剂组 SFTSV 中和抗体效价均值分别为 1 : 69.33 (2 周), 1 : 282.67 (4 周), 1 : 320 (8 周)。H₂O₂ 灭活剂组 SFTSV 中和抗体效价均值分别为 1 : 186.67 (2 周), 1 : 426.67 (4 周), 1 : 469.33 (8 周)。两灭活剂组 4 周、8 周时 SFTSV 中和抗体效价均较高, H₂O₂ 灭活剂组抗体效价均值在 2、4、8 周时均高于 β-丙内酯灭活剂组(图 3)。特异性中和抗体的产生表明两疫苗具备保护活性,且 H₂O₂ 灭活疫苗保护性优于 β-丙内酯灭活疫苗。



A-D SFTSV 特异性抗体、IgG1、IgG2a 与 IgG2a/IgG1 比值, $n=5$
图4 免疫小鼠血清中 SFTSV 特异性抗体水平

A-D The ratio of SFTSV-specific antibody, IgG 1, IgG 2, and a to IgG 2 a/IgG 1, $n=5$

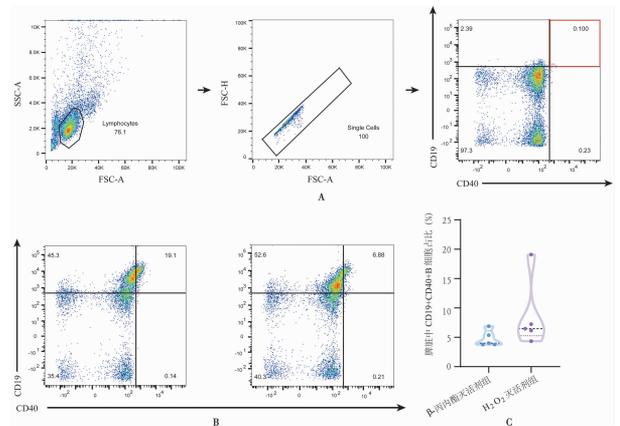
Fig. 4 SFTSV-specific antibody levels in serum of immunized mice

5 结合抗体效价测定

免疫后第 2、4、8 周, H₂O₂ 灭活剂组 SFTSV 特异性抗体均值分别为 1 : 6160、1 : 3520、1 : 4 800; β-丙内酯灭活剂组 SFTSV 特异性 Ig 均值分别为 1 : 7040、1 : 4480、1 : 4160(图 4A)。免疫后 2 周, 两种灭活剂组 SFTSV 特异性抗体即可达到高效价并维持 8 周以上, 表明两种灭活疫苗有高效免疫原性。为确定免疫小鼠 Th 细胞反应类型, 采用 ELISA 法检测小鼠血清内特异性 IgG1、IgG2a 水平。免疫后第 2、4、8 周, H₂O₂ 灭活剂组小鼠血清中的 SFTSV IgG1 平均水平分别为 1 : 1120、1 : 6720、1 : 3440; 而 β-丙内酯灭活剂组 SFTSV 特异性 IgG1 平均水平分别为 1 : 1600、1 : 9120、1 : 6080(图 4B)。免疫后第 2、4、8 周, H₂O₂ 灭活剂组小鼠血清中的 SFTSV 特异性 IgG2a 平均水平分别为 1 : 240、1 : 460、1 : 1060, β-丙内酯灭活剂组小鼠血清中的 SFTSV 特异性 IgG2a 平均水平分别为 1 : 1280、1 : 3680、1 : 2400(图 4C)。在 2、4、8 周时, IgG2a 均值均大于 IgG1 均值, 免疫反应更倾向于 Th2 型, 表明两种 SFTSV 灭活疫苗能够诱导小鼠产生强大的体液免疫反应(图 4D)。

6 B 细胞募集与活化情况

B 细胞分泌抗体产生免疫效应。图 5A 为圈门策略, 图 5B 为脾脏中表达 CD19、CD40 B 细胞的代表性流式图。H₂O₂ 灭活剂组 CD19、CD40 双阳性 B 细胞平均水平大于 β-丙内酯灭活剂组, 表明 H₂O₂ 灭活剂组有更多的 B 细胞被活化, 最高可达 19.1%(图 5C)。



A 圈门策略 B H₂O₂ 灭活剂组、β-丙内酯灭活剂组 C H₂O₂ 灭活剂组、β-丙内酯灭活剂组 B 细胞活化水平比较图, $n=5$

图5 代表性流式图与 B 细胞活化水平比较

A The circle gate strategy B H₂O₂ inactivation group and β-inactivation group C The B cell activation level of H₂O₂ inactivation group and β-inactivation group, $n=5$

Fig. 5 Representative flow diagram compared with B cell activation levels

7 疫苗保护性评价

开展感染保护实验, 对 SFTSV 灭活疫苗感染保护效力进行评价。感染后 21 d 内进行密切观察。空

白组和佐剂组小鼠感染后出现体重降低(图6)、体温升高、毛发杂乱、精神萎靡、躯体蜷缩等症状(图7),直至全部死亡(图8)。β-丙内酯灭活剂组、H₂O₂灭活剂组小鼠感染后短暂出现体重降低(图6)、体温升高、食欲缺乏、毛发凌乱等症状(图7),但较快恢复,且全部存活(图8)。

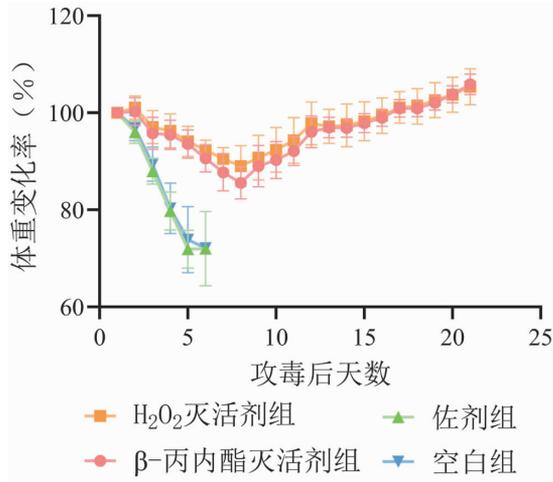


图6 感染 SFTSV 后小鼠体重变化图 (n=8)
Fig. 6 Body weight changes of mice infected with SFTSV

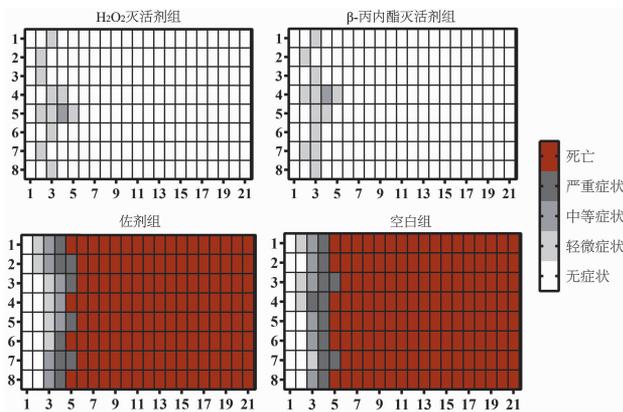


图7 感染 SFTSV 后小鼠临床症状评分图 (n=8)
Fig. 7 Grids of clinical symptom scores in mice after SFTSV infection

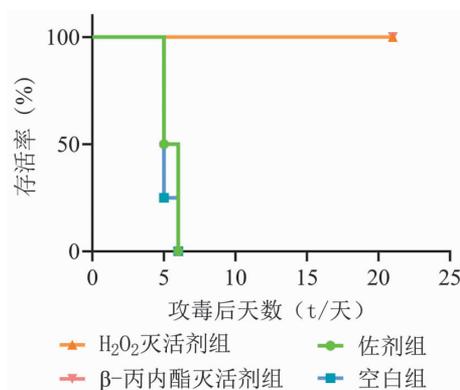


图8 SFTSV 感染保护实验生存曲线图 (n=8)
Fig. 8 Survival plots of the SFTSV infection protection experiments

讨论

在中国首次发现 SFTSV 后,越南、韩国和日本等地也陆续报告了 SFTSV^[19-21]。中国和韩国出现日本分支的毒株,日本也发现了中国分支的毒株,表明 SFTSV 发生跨区域传播^[22]。SFTSV 为负链分节段 RNA 病毒。在共同感染期间,SFTSV 基因组片段发生交换,当感染单个宿主细胞时,SFTSV 将其其他病毒的基因组片段打包成新生的杂交病毒粒子^[23]。研究表明 SFTSV 发生 3 个交换基因组片段的现象^[24-27]。遗传信息改变则导致子代病毒致病性、对外环境抵抗力改变,然而 SFTSV 基础和疫苗研究还很有限,目前普遍认为 SFTSV 的血清型只有一种,这为疫苗研究提供了基础。

灭活疫苗使得传染病疫情防控成为可能。β-丙内酯主要作用于病毒粒子中的核酸而对蛋白质结构的影响较小^[28]。接种 β-丙内酯灭活病毒疫苗后可能出现不良反应,比如过敏反应,1986 年研究表明 β-丙内酯处理同源血清白蛋白引起豚鼠的全身过敏反应,其频率和严重程度与接种人白蛋白的豚鼠相同^[29]。Monath 等^[30]发现一受试者接受 4.8 μg β-丙内酯灭活黄热病疫苗加强免疫后,出现荨麻疹。目前在美国可用的人类二倍体细胞中生产的狂犬病疫苗的一些接受者通常会在加强免疫接种后出现全身过敏反应^[29]。生产过程中 β-丙内酯暴露对皮肤、黏膜及眼睛有刺激作用,且有致癌的潜在风险。β-丙内酯对病毒的化学灭活可以改变抗原特性,并可能破坏其他病毒制剂中发现的某些表位^[31-32]。β-丙内酯性能不稳定,实际生产时还需考量冷藏问题。

目前关于 H₂O₂ 灭活病毒最先进的方案为 HydroVax-II, Quintel 等^[33-34]报道灭活过程中使用的 H₂O₂ 浓度大幅降低,添加氧化还原活性金属铜(Cu)与抗病毒化合物美沙松(MZ)后仍表现出快速的灭活动力学和对抗原结构的维持。Quintel 等^[35]灭活了 3 种毒株,季节性 H1N1、H1N1 大流行(2009 年)和季节性 H3N2,室温下浓度低至 1% 的 H₂O₂ 孵育 2 h 足以抑制病毒复制,体外测定灭活病毒仍然引起免疫原性反应。Marzi 等^[36]以 H₂O₂ 为灭活剂制备了复制缺陷型全灭活埃博拉病毒疫苗,在非人灵长类动物中保持抗原性并具有保护作用。H₂O₂ 灭活西尼罗河病毒疫苗在年轻和老年小鼠中诱导了强大的中和抗体反应,抗体介导和 CD8⁺ T 细胞介导的免疫效果显著,可保护小鼠抵御致命感染^[33],已有临床前、I 期临床研究数据发表^[17-37]。

B 细胞承担着关键的体液免疫功能。B 细胞发育成熟广泛表达 CD19 分子^[38]。CD40 信号促进激活和

增殖^[39]。因此,免疫后2周,H₂O₂与β-丙内酯灭活剂组特异性抗体即可达到较高效价。IgG2a/IgG1效比值反映出免疫反应倾向于体液免疫。免疫后8周H₂O₂与β-丙内酯灭活剂组SFTSV中和抗体效价均值都达到1:300以上。H₂O₂灭活剂组在免疫后2、4、8周中和抗体效价均值均大于β-丙内酯灭活剂组。此外,流式细胞术测定脾脏中CD19、CD40双阳性B细胞,H₂O₂灭活剂组与β-丙内酯灭活剂组都能促进B细胞活化,H₂O₂灭活剂组的激活能力更强,这便是H₂O₂灭活剂组抗体水平较高、H₂O₂灭活疫苗优于β-丙内酯灭活疫苗的原因。

建立评价候选疫苗有效性的SFTS动物模型对于开发候选疫苗不可或缺。SFTSV通过静脉、肌肉、腹膜或脑内途径感染BALB/c小鼠不产生免疫应答,但会引起小鼠血小板和白细胞减少等症状,不会出现严重的疾病进展与死亡^[40-41]。但该病毒可在I型干扰素受体缺陷小鼠(IFNAR^{-/-})或信号转导和转录激活因子2缺陷(STAT2^{-/-})C57BL/6小鼠体内有效复制,并导致死亡^[40,42-43]。目前鲜有非人灵长类动物模拟人类病毒感染报道。

综上所述,本研究成功制备了以H₂O₂和β-丙内酯为灭活剂的2种新型发热伴血小板减少综合征病毒灭活疫苗,疫苗具有良好的安全性,动物免疫实验发现两种疫苗均能诱导小鼠产生强烈的体液免疫应答,并且H₂O₂作为灭活剂优势显著,为SFTSV灭活疫苗的制备以及优越的灭活剂的选择提供了依据。

【参考文献】

[1] Du SW, Peng RC, Xu W, et al. Cryo-EM structure of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus[J]. Nat Commun, 2023, 14(1):6333.

[2] Kim EH, Park SJ. Emerging Tick-Bornedabie bandavirus: virology, epidemiology, and prevention [J]. Microorganisms, 2023, 11(9):2309.

[3] Huang M, Wang T, Huang Y, et al. The clinical and immunological characteristics in fatal severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) infection[J]. Clin Immunol, 2023, 248:109262.

[4] Kato H, Yamagishi T, Shimada T, et al. SFTS epidemiological research group-Japan. epidemiological and clinical features of severe fever with thrombocytopenia syndrome in Japan, 2013-2014 [J]. PLoS One, 2016, 11(10):e0165207.

[5] Kobayashi Y, Kato H, Yamagishi T, et al. SFTS epidemiological research group Japan. Severe fever with thrombocytopenia syndrome, Japan, 2013-2017[J]. Emerg Infect Dis, 2020, 26(4):692-699.

[6] Zhang X, Zhao CY, Cheng CY, et al. Rapid spread of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus by parthenogenetic asian longhorned ticks[J]. Emerg Infect Dis, 2022, 28(2):363-372.

[7] Zhang X, Zhao CY, Si XX, et al. Natural circulation of tick-borne severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in the city ecosystem, China[J]. Virol Sin, 2023, 38(5):832-835.

[8] Lin TL, Ou SC, Maeda K, et al. The first discovery of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in Taiwan [J]. Emerg

Microbes Infect. 2020, 9(1):148-151.

[9] Chen C, Li P, Li KF, et al. Animals as amplification hosts in the spread of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus: A systematic review and meta-analysis[J]. Int J Infect Dis, 2019, 79:77-84.

[10] Hu L, Li J, Zhang H, et al. Predisposing factors for person-to-person transmission of severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus[J]. J Hosp Infect, 2022, 123:174-178.

[11] Moon J, Lee H, Jeon JH, et al. Aerosol transmission of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus during resuscitation [J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2019, 40(2):238-241.

[12] Kim WY, Choi WY, Park SW, et al. Nosocomial person-to-person transmission of severe fever with thrombocytopenia syndrome[J]. Clin Microbiol Infect, 2019, 25(5):633. e1-633. e4.

[13] Madhusudana SN, Shamsundar R, Seetharaman S. *In vitro* inactivation of the rabies virus by ascorbic acid[J]. Int J Infect Dis, 2004, 8(1):21-25.

[14] Abd-Elghaffar AA, Ali AE, Boseila AA, et al. Inactivation of rabies virus by hydrogen peroxide [J]. Vaccine, 2016, 34(6):798-802.

[15] Slifka DK, Rau HP, Weber WC, et al. Development of a next-generation chikungunya virus vaccine based on the HydroVax platform[J]. PLoS Pathog, 2022, 18(7):e1010695.

[16] Termini JS. Hydroperoxide-induced DNA damage and mutations [J]. Mutat Res-Fund Mol M, 2000, 450(1-2):107-124.

[17] Poore EA, Slifka DK, Rau HP, et al. Pre-clinical development of a hydrogen peroxide-inactivated West Nile virus vaccine [J]. Vaccine, 2017, 35(2):283-292.

[18] Kim N, Lee TY, Lee H, et al. Comparing the immunogenicity and protective effects of three MERS-CoV inactivation methods in mice[J]. Vaccines (Basel), 2022, 10(11):1843.

[19] Tran XC, Yun Y, An LV, et al. Endemic severe fever with thrombocytopenia syndrome, vietnam [J]. Emerg Infect Dis, 2019, 25(5):1029-1031.

[20] Chatterjee S, Kim CM, Kim DM, et al. Coinfection with severe fever with thrombocytopenia syndrome and scrub typhus in Korea[J]. Open Forum Infect Dis, 2023, 10(10):ofad377.

[21] Matsuo A, Doi K, Ishijima K, Tatemoto K, et al. Increased risk of infection with severe fever with thrombocytopenia virus among animal populations on Tsushima Island, Japan, including an endangered species, tsushima leopard cats[J]. Viruses, 2022, 14(12):2631.

[22] Yoshikawa T, Shimojima M, Fukushi S, et al. Phylogenetic and geographic relationships of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in China, South Korea, and Japan[J]. J. Infect, 2015, 212(6):889-898.

[23] McDonald SM, Nelson MI, Turner PE, et al. Reassortment in segmented RNA viruses: mechanisms and outcomes [J]. Nat Rev Microbiol, 2016, 14(7):448-460.

[24] Shi JM, Hu S, Liu XP, et al. Migration, recombination, and reassortment are involved in the evolution of severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus[J]. Infect Genet Evol, 2017, 47:109-117.

[25] Ding NZ, Luo ZF, Niu DD, et al. Identification of two severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strains originating from reassortment[J]. Virus Res, 2013, 178(2):543-546.

[26] He CQ, Ding NZ. Discovery of severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus strains originating from intragenic recombination [J]. J Virol, 2012, 86(22):12426-12430.

[27] 任富利. 新发布尼亚病毒反向遗传学系统的构建以及病毒基因组重排和非编码区的研究[D]. 北京:中国科学院大学(中国科学院武汉病毒研究所), 2020.

[28] Astill J, Alkie T, Yitbarek A, et al. Examination of the effects of

- virus inactivation methods on the induction of antibody- and cell-mediated immune responses against whole inactivated H9N2 avian influenza virus vaccines in chickens[J]. *Vaccine*, 2018, 36(27):3908-3916.
- [29] Levenbook I, Merritt BA, Fitzgerald EA, et al. Sensitization Induced in guinea-pigs with beta-propiolactone-treated serum-albumin-experimental-evidence for the cause of allergic reactions in humans receiving human-diploid cell rabies vaccines[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 1986, 80(1):110-111.
- [30] Monath TP, Fowler E, Johnson CT, et al. An inactivated cell-culture vaccine against yellow fever[J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(14):1326-1333.
- [31] She YM, Cheng K, Farnsworth A, et al. Surface modifications of influenza proteins upon virus inactivation by β -propiolactone[J]. *Proteomics*, 2013, 13:3537-3547.
- [32] Gupta D, Parthasarathy H, Sah V, et al. Inactivation of SARS-CoV-2 by β -propiolactone causes aggregation of viral particles and loss of antigenic potential[J]. *Virus Res*, 2021, 305:198555.
- [33] Quintel BK, Thomas A, Deraad DE, et al. Advanced oxidation technology for the development of a next-generation inactivated West Nile virus vaccine[J]. *Vaccine*, 2019, 37(30):4214-4221.
- [34] Quintel BK, Prongay K, Lewis AD, et al. Vaccine-mediated protection against *Campylobacter*-associated enteric disease[J]. *Sci Adv*, 2020, (26):eaba4511.
- [35] Dembinski JL, Hungnes O, Hauge AG, et al. Hydrogen peroxide inactivation of influenza virus preserves antigenic structure and immunogenicity[J]. *J Virol Methods*, 2014, 207:232-237.
- [36] Marzi A, Halfmann P, Hill-Batorski L, et al. Vaccines. An Ebola whole-virus vaccine is protective in nonhuman primates [J]. *Science*, 2015, 348(6233):439-442.
- [37] Woods CW, Sanchez AM, Swamy GK, et al. An observer blinded, randomized, placebo-controlled, phase I dose escalation trial to evaluate the safety and immunogenicity of an inactivated West Nile virus Vaccine, HydroVax-001, in healthy adults. [J]. *Vaccine*, 2019, 37(30):4222-4230.
- [38] Chen D, Gallagher S, Monson NL, et al. Inebilizumab, a B cell-depleting anti-CD19 antibody for the treatment of autoimmune neurological diseases: Insights from Preclinical Studies[J]. *J Clin Med*, 2016, 5(12):107.
- [39] Cutrina-Pons A, De Sa A, Fear DJ, et al. Inhibition of PI3K p110 δ activity reduces IgE production in IL-4 and anti-CD40 stimulated human B cell cultures[J]. *Immunology*, 2023, 170(4):483-494.
- [40] Liu Y, Wu B, Paessler S, Walker DH, et al. The pathogenesis of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection in alpha/beta interferon knockout mice: insights into the pathologic mechanisms of a new viral hemorrhagic fever[J]. *J Virol*, 2014, 88(3):1781-1786.
- [41] Jin C, Liang MF, Ning JY, et al. Pathogenesis of emerging severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in C57/BL6 mouse model[J]. *PNAS*, 2012, 109(25):10053-10058.
- [42] Yoshikawa R, Sakabe S, Urata S, et al. Species-specific pathogenicity of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus is determined by Anti-STAT2 activity of NSs [J]. *J. Virol*, 2019, 93(10):e02226-18.
- [43] Park SC, Park JY, Choi JY, et al. Pathogenicity of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in mice regulated in type I interferon signaling: Severe fever with thrombocytopenia and type I interferon [J]. *Lab Anim*, 2020, 36:38.

【收稿日期】 2023-11-22 【修回日期】 2024-02-12

(上接 507 页)

- [4] NIH Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in Peptic Ulcer Disease [J]. *JAMA*, 1994, 272(1):65-69.
- [5] de Martel C, Georges D, Bray F, et al. Global burden of cancer attributable to infections in 2018; a worldwide incidence analysis [J]. *Lancet Glob Health*, 2020, 8(2):e180-190.
- [6] Odenbreit S, P Is J, Sedlmaier B, et al. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion [J]. *Science*, 2000, 287(5457):1497-1500.
- [7] Vergunst AC, van Lier MC, den Dulk-Ras A, et al. Positive charge is an important feature of the C-terminal transport signal of the VirB/D4-translocated proteins of *Agrobacterium* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(3):832-837.
- [8] Hohlfeld S, Pattis I, P Is J, et al. A C-terminal translocation signal is necessary, but not sufficient for type IV secretion of the *Helicobacter pylori* CagA protein [J]. *Mol Microbiol*, 2006, 59(5):1624-1637.
- [9] Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation [J]. *Mol Cell*, 2002, 9(4):789-798.
- [10] Cali T, Ottolini D, Vicario M, et al. splitGFP technology reveals dose-dependent ER-mitochondria interface modulation by α -synuclein A53T and A30P mutants [J]. *Cells*, 2019, 8(9):1072.
- [11] Van Engelenburg SB, Palmer AE. Imaging type-III secretion reveals dynamics and spatial segregation of *Salmonella* effectors [J]. *Nat Methods*, 2010, 7(4):325-330.
- [12] Sakalis PA, van Heusden GP, Hooykaas PJ. Visualization of VirE2 protein translocation by the *Agrobacterium* type IV secretion system into host cells [J]. *Microbiologyopen*, 2014, 3(1):104-117.
- [13] 季晓飞, 赵慧琳, 张莹, 等. 基因敲除质粒载体的构建及其在幽门螺杆菌基因敲除中的应用 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2016, 11(12):1066-1073.
- [14] 吴豪, 陕江帆, 季晓飞, 等. 幽门螺杆菌中基因过表达体系的构建及应用 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2023, 18(02):168-173.
- [15] Tomb JF, White O, Kerlavage AR, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori* [J]. *Nature*, 1997, 388(6642):539-547.
- [16] Hatakeyama M. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(9):688-694.
- [17] Cover TL, Lacy DB, Ohi MD. The *Helicobacter pylori* cag type IV secretion system [J]. *Trends Microbiol*, 2020, 28(8):682-695.
- [18] Naumann M, Wessler S, Bartsch C, et al. Activation of activator protein 1 and stress response kinases in epithelial cells colonized by *Helicobacter pylori* encoding the cag pathogenicity island [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(44):31655-31662.
- [19] Olbermann P, Josenhans C, Moodley Y, et al. A global overview of the genetic and functional diversity in the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island [J]. *PLoS Genet*, 2010, 6(8):e1001069.
- [20] Kim SY, Lee YC, Kim HK, et al. *Helicobacter pylori* CagA transfection of gastric epithelial cells induces interleukin-8 [J]. *Cell Microbiol*, 2006, 8(1):97-106.
- [21] Rieder G, Hatz RA, Moran AP, et al. Role of adherence in interleukin-8 induction in *Helicobacter pylori*-associated gastritis [J]. *Infect Immun*, 1997, 65(9):3622-3630.

【收稿日期】 2023-11-29 【修回日期】 2024-02-19