

人肠道病毒71型抗原表位的研究进展

祝 苗 张添方 高柳莺 董长征*

(宁波大学医学院预防医学系, 浙江省病理生理学技术研究重点实验室, 宁波 315211)

摘要 人肠道病毒71型(enterovirus 71, EV71)是重症手足口病(hand, foot and mouth disease, HFMD)的主要病原体。我国已研发多种针对EV71的灭活疫苗, 在大规模临床试验中取得了理想效果, 其中, 两种疫苗已于2016年上市, 有望在保护儿童健康方面发挥重要作用。由于EV71通过快速进化来逃避宿主的免疫保护作用, 因此需要对EV71的变异, 尤其是抗原表位部分的变异, 进行持续性监测, 并及时更新疫苗。该文系统地收集和整理了EV71的抗原表位, 简介了表位鉴定的实验和生物信息学研究方法, 概述了表位参与的宿主免疫反应及抗病毒机制并展望了其临床应用价值。

关键词 肠道病毒71型; 手足口病; 疫苗; 抗原表位

Progress on Antigenic Epitopes of Human Enterovirus 71

Zhu Miao, Zhang Tianfang, Gao Liuying, Dong Changzheng*

(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Pathological and Physiological Technology, Department of Preventive Medicine, School of Medicine, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract Human enterovirus 71 (EV71) is the major pathogen of the hand, foot and mouth disease (HFMD). Several inactive EV71 vaccines which elicited remarkable protective efficacy had been developed in China. Two of them had been launched in 2016 and they were expected to benefit many children. Since EV71 escaped the host's immune response through quick and continual evolution, the vaccines should be updated according to the consecutive surveillance of the genetic variations of the virus, especially for the variations occurring in the antigenic epitopes. We summarized the epitopes from the published papers, introduced the experimental and bioinformatics methods for identifying the epitopes, described the immune response and antiviral mechanisms that the epitopes were involved in, and discussed the potential clinic applications of the epitopes.

Keywords enterovirus 71 (EV71); hand, foot and mouth disease (HFMD); vaccine; antigenic epitope

人肠道病毒71型(enterovirus 71, EV71)是手足口病(hand, foot and mouth disease, HFMD)最重要的病原体, 除引起发热和手、足和口腔等部位出现疱疹等轻症手足口病症状外, 还能引起无菌性脑膜炎和急性迟缓性麻痹等重症症状^[1]。我国已率先研发多种针对EV71的灭活疫苗, 在大规模临床试

验中取得了理想效果^[2-3]。其中, 两种疫苗已于2016年上市, 有望在保护儿童健康方面发挥重要作用。EV71的进化速率较快, 为 $(4.2\sim 4.6)\times 10^{-3}$ 替换/位置/年(substitutions per site per year), 相当于每年整个EV71基因组约有30个新突变^[1]。快速进化的病毒株是否改变了其抗原性, 疫苗对病毒株是否还具有保

收稿日期: 2017-01-14 接受日期: 2017-06-02

宁波市自然科学基金(批准号: 2015A610190)、浙江省教育厅基金(批准号: Y201533182)和宁波市环境有害因素致病机制及防治创新团队(批准号: 2016C51001)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0574-87609603, E-mail: dongchangzheng@nbu.edu.cn

Received: January 14, 2017 Accepted: June 2, 2017

This work was supported by the Ningbo Natural Science Foundation (Grant No.2015A610190), the Foundation of Zhejiang Province Educational Committee (Grant No.Y201533182) and the Ningbo Scientific Innovation Team for Environmental Hazardous Factor Control and Prevention (Grant No.2016C51001)

*Corresponding author. Tel: +86-574-87609603, E-mail: dongchangzheng@nbu.edu.cn

网络出版时间: 2017-07-19 11:13:41

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170719.1113.006.html>

护作用? 解决这些问题需要对病毒株的变异尤其是抗原表位处的变异进行持续性监测。

抗原表位指抗原分子能够被T细胞受体(T cell receptor, TCR)、B细胞受体(B cell receptor, BCR)或抗体特异性结合的一段多肽序列, 又称抗原决定簇, 通常由5~17个氨基酸残基组成^[4]。抗原表位根据其结构特点分为线性表位(由连续性线性排列的短肽构成, 又称为顺序表位)和构象表位(由不连续的短肽或氨基酸残基在空间上形成的具有特定构象的结构)。T细胞仅识别由抗原提呈细胞(antigen-presenting cell, APC)加工提呈的线性表位, 而B细胞则可识别线性表位和构象表位, 因此, 抗原表位又可根据识别对象分为T细胞线性表位、B细胞线性表位和B细胞构象表位。

本文系统地收集和整理了EV71的抗原表位, 简介了表位鉴定的实验和生物信息学研究方法, 概述了表位参与的宿主免疫反应及抗病毒机制并展望了其临床应用价值。

1 EV71简介

EV71与脊髓灰质炎病毒(poliovirus)和鼻病毒(rhinovirus)等同属微小核糖核酸病毒科(picornavirus)肠道病毒属(enterovirus), 它们具有相似的基因组和病毒结构^[1]。EV71基因组为单股正链核糖核酸(ribonucleic acid, RNA), 编码P1、P2和P3三个前体蛋白; P1又裂解成四个结构蛋白(viral protein, VP), 分别为VP1、VP2、VP3和VP4。成熟的病毒颗粒为二十面体, 60个拷贝的结构蛋白VP1、VP2和VP3组成衣壳暴露在病毒颗粒的表面, 因此病毒的抗原表位主要位于VP1~VP3上; VP4结合在衣壳的内侧, 连接着病毒RNA。VP1~VP3都含有一个由8条反向平行的 β 链(β strand)组成的结构域(motif), 称为 β 桶(β barrel)、果酱卷(jelly-roll)折叠结构或免疫球蛋白折叠, 形成了VP1~VP3空间结构的基本框架^[5-6]。8条 β 链依次为 β B、 β C、 β D、 β E、 β F、 β G、 β H、 β I, β 链之间的区域称为环(loop), 分别为BC环、CD环等。暴露在病毒颗粒表面的环是高度可变的二级结构, 也是抗原表位富集区域; 特别是VP1的BC环、GH环以及VP2上EF环的一部分最为暴露, 易与抗体结合。在三级结构上, VP1与VP2和VP3的结合处有一道裂缝(cleft), 称为“峡谷(canyon)”, 峡谷一侧边缘(rim)主要由VP1构成, 另一侧边缘主要由VP2和VP3

构成^[5-6]。“峡谷”是宿主受体可能的结合区域, 而峡谷两侧边缘则可能是抗体结合区域, 以此来阻滞宿主与受体的结合。

2 B细胞线性表位

B细胞线性表位是病毒衣壳蛋白与B细胞表面受体或抗体特异性结合的多肽, 通过B细胞介导体液免疫, 因此, B细胞线性表位通常位于蛋白抗原的表面。

2.1 B细胞线性表位鉴定的基本方法

肽扫描技术(peptide scanning)和表位作图(epitope mapping)是B细胞线性表位鉴定最常用的实验方法^[7-12]。肽扫描首先合成相互重叠的覆盖整个抗原蛋白的短肽(例如, 每个肽段包含15个氨基酸残基, 其中12个残基与相邻肽段重复), 通过免疫实验寻找具有抗原性的肽段, 再根据肽段之间的氨基酸残基重叠来确认表位的具体位置。表位作图则将一系列截断的重叠肽段通过融合蛋白等形式进行表达, 再通过免疫实验寻找具有抗原性的肽段。免疫实验中可以直接通过合成肽段或肽段展示抗原免疫小鼠, 然后通过酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)和免疫印迹实验(Western blot)检测小鼠血清中抗体的水平、分类(IgM、IgG类型)和免疫反应性, 通过微量中和试验(microneutralization assay)来确定血清中是否存在中和抗体, 即肽段是否为中和表位^[7-9]。此外, 也可以利用EV71免疫BALB/c小鼠, 通过杂交瘤技术分离单克隆抗体(单抗), 然后通过Western blot实验确定单抗在变性凝胶中结合的结构蛋白, 最后采用多肽-ELISA(peptide-ELISA)扫描结合单抗的多肽, 或者通过表达候选肽段的融合蛋白后用Western blot检测单抗, 再进行表位作图^[10-12]。

肽扫描和表位作图需要合成覆盖整个结构蛋白的肽库再逐一进行免疫实验, 工作量相当庞大, 因此, 可以通过生物信息学方法预测和筛选潜在的表位供进一步实验验证。考虑到B细胞线性表位通常位于蛋白抗原的表面, 根据这个特性, 生物信息学利用氨基酸残基的理化和二级结构特征, 发展了一系列预测算法^[13-18], 如隐马尔科夫(Hidden Markov model, HMM)模型BepiPred^[18]。由于不同实验室发现的B细胞线性表位往往存在部分重叠(表1), 为了判断部分重叠的多肽是否针对同一个表位, 我们采

表1 EV71的B细胞线性表位
Table 1 B-cell linear epitopes of EV71

结构蛋白 Structural protein	表位位置 Epitope regions	表位序列 Amino acid sequences	二级结构 ^a Secondary structure ^a	表位名称 Name of epitope	单克隆抗体 Monoclonal antibody	发现者 Authors	年份 Years	生物信息 预测评分 ^b Bioinformatics prediction scores ^b	其他发现者 及表位位置 Other authors and epitope regions	基因型 ^c Genotypes ^c
VP1	3-8	RVADVI	α -helix	–	1D9	Man-Li ^[1]	2012	0.224	–	C5
	6-43	DVIIEIGDSVSRALTHALPAP TGQNTQVSSHRLDTGK	Random coil	–	–	Zhang ^[28]	2014	0.623	–	C4
	12-19	IGDSVSRA	Random coil	–	MAb 4	Lim ^[10]	2013	0.411	Xu (6-20) ^[12]	B5
	97-105	LEGTNPNG	BC loop	SP32	–	Foo ^[8]	2008	1.447	Zhang (94-105) ^[27]	B4
	157-163	PPGAPKP	EF loop	–	2H2	Fan ^[29]	2015	2.054	–	–
VP2	163-177	PESRESLAWQTAITNP	EF loop	SP55	–	Foo ^[7]	2007	1.024	–	B4
	208-222	YPTFGEHKQEKDLEY	GH loop	SP70	2G8, E1, D5, H7, C4, MAb 53	Foo ^[7]	2007	0.932	Deng (208~222) ^[10] , Ku (211~220) ^[20] , Gao(211-222) ^[22] , Ku (211~225) ^[21] , Lim(215-219) ^[23]	B4
	240-260	TSKSKYPLVVRIMRMKHVR	HI loop, β I	–	4E8	Chang ^[30]	2010	–0.606	–	C4
	136-150	AGGTGTEDSHPPYKQ	EF loop	VP2-28	MAb 979	Liu ^[9]	2011	1.559	Xu (141~155) ^[32] , Kiener (142-146) ^[31]	B4
	6-13	STQRSGSH	Random coil	N20	–	Zhao ^[33]	2013	1.343	–	C4

^a二级结构注释来源于Wang等^[6]测定的EV71三级结构。^b生物信息预测阈值为0.35, 即评分超过0.35的肽段预测为表位, 用粗体标示。^c基因型指表位最早发现者所用病毒株的基因型。
^a Annotations for secondary structure derived from 3D structure of EV71 which was determined by Wang *et al*.^[6] ^bPrediction threshold of bioinformatics method is 0.35 and the peptides having scores larger than 0.35 are predicted as epitopes and shown in bold. ^cThe genotypes referred to the genotypes of the virus strains used by the researchers in “Authors” column.

取这样一个分析策略: 利用Bepipred计算多肽重叠部分成为抗原表位的生物信息学评分, 如果评分较高即重叠多肽成为表位的概率非常大, 即认为两个部分重叠多肽针对的是同一个表位; 反之, 如果重叠部分得分低于阈值, 不太可能成为表位, 则认为两个多肽针对的是不同表位, 即两个表位分别位于两个多肽的不重叠部分。

2.2 B细胞线性表位

Foo等^[7-8]最先采用肽扫描技术来鉴定EV71的B细胞线性表位。针对B4基因型的EV71, Foo等^[7]使用95个相互重叠的人工肽免疫雌性BALB/c小鼠, 并利用中和试验检测小鼠的抗血清(antiserum)是否具有中和活性。他们发现, SP55(位于VP1的163~177位点处, 氨基酸序列为PESRESLAWQTATNP)和SP70(位于VP1的208~222位点处, 氨基酸序列为YPTFGEHKQEKDLEY)这两个肽段展示了较强的中和能力(表1), 其中, SP70的中和抗体滴度水平(1:32)与热灭活病毒颗粒相近(1:64), 而SP55相对低一些(1:8)^[7]。有多项研究都报道了在VP1的207~225区域发现了B细胞线性表位^[9,19-23](表1)。虽然表位的具体定位有着细微的差别, 但经过生物信息学表位预测方法的鉴定, 证实它们都代表相同的表位, 这说明SP70是高度可靠的B细胞线性表位。通过ELISA实验检测免疫球蛋白G(immunoglobulin G, IgG)抗体水平并对SP55和SP70免疫小鼠的抗血清进行分类, 发现主要为IgG1, 说明SP55和SP70不仅是中和表位, 还能诱导辅助性T细胞亚群2(T helper cell type 2, Th2)的细胞免疫反应^[7]。

Foo等^[24]将SP70直接免疫小鼠产生了中和抗体。这些抗体不仅能够被动保护感染了EV71的新生小鼠BALB/c, 还能够通过抑制EV71在小鼠体内的复制从而降低体内病毒的含量。因此, SP70具有作为EV71合成肽疫苗的潜力。Huang等^[25]以日本脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)为载体构建SP70重组疫苗, 发现其具有JEV和EV71的双重保护作用。Ye等^[26]将SP55和SP70分别与乙肝病毒核心抗原(hepatitis B core antigen, HBcAg)进行融合形成病毒样颗粒(virus-like particle, VLP), 利用VLP免疫小鼠产生的中和抗体能够通过被动免疫保护小鼠。更进一步, SP70融合蛋白还能抑制EV71与宿主易感细胞的结合。Xue等^[27]将SP55和SP70同时嵌入到人3型腺病毒六邻体(adenovirus type 3

hexon)构建SP55-SP70联合重组腺病毒。联合重组腺病毒免疫BALB/c小鼠产生的IgG水平和中和抗体滴度较单纯SP70重组腺病毒更高。Ku等^[22]针对EV71制备了3个单克隆抗体, 分别为D5、H7、C4, 三者均识别VP1的GH环(SP70位于VP1的GH环)。单抗D5及C4结合GH环上的211~220区域后, 封闭了病毒细胞受体的识别和结合, 从而抑制了病毒的感染。

在另一项研究中, Foo等^[8]筛选出VP1-SP32(位于VP1的97~105位点处)并制作成重组GST-SP32融合蛋白, 在Western blot中发现, 融合蛋白能够与手足口病患者血清中的抗EV71的IgG抗体发生反应, 在ELISA实验中却无法反应(表1)。类似地, Zhang等^[28]同样利用GST-多肽融合蛋白技术发现, 94~105区域融合蛋白能够与抗VP1的小鼠血清发生免疫反应, 却不能与抗EV71颗粒的人/兔/小鼠血清发生免疫反应, 这意味着该表位可能不能充分暴露在VP1表面进行免疫反应, 更适合以融合蛋白的形式进行EV71感染的临床检测。

VP1的N-端(位于VP1序列的1~100区域)被认为是与宿主受体结合的区域, 多项研究都发现, VP1的N-端存在B细胞线性表位^[10-12,28-29](表1)。此外, Fan等^[30]和Chang等^[31]发现, VP1的C-端还有两个潜在的表位: 157~163和240~260。

除VP1外, VP2和VP4也发现了B细胞线性表位(表1)。Liu等^[9]合成了153条覆盖VP1、VP2和VP3的人工肽, 通过ELISA实验发现了单抗E1和MAb 979对应的B细胞线性中和表位VP1-43(211~220, 即SP70)和VP2-28(136~150)。利用分子建模可以观察到, VP1-43与VP2-28位于VP1和VP2所形成的峡谷状结构的边缘, 相距仅0.1 nm。Kiener等^[32]和Xu等^[33]也发现了同一个表位, 分别为(142~146)和(141~155), 并确认表位位于VP2的EF环。将VP1的GH环(SP70)和VP2的EF环(VP2-28)通过HBcAg构建联合表位VLP并免疫小鼠, 能够引起广泛的中和抗体反应。VP4没有直接暴露在衣壳上而是结合在衣壳内部, 因此成为B细胞线性表位的可能性相对较小。Zhao等^[34]将VP4的人工肽N20(6~13)与HBcAg融合形成VLP, 再免疫新生小鼠后发现其具有中和活性。这意味着, EV71的衣壳结构变化比其被报道的静态晶体结构所反映的更为复杂, VP4在VP1与受体结合时可能会发生外展, 这已经在与EV71近缘的鼻病毒14

血清型(rhinovirus 14, HRV14)的表位研究中得到了验证^[35]。

3 B细胞构象表位

3.1 B细胞构象表位鉴定的基本方法

构象表位鉴定的经典方法是先采用X射线衍射和核磁共振技术测定病毒衣壳和抗体复合物的三级结构,再寻找衣壳上与抗体结合的位置(footprint)。近年来,冷冻电子显微镜技术(cryo-electron microscopy, Cryo-EM)取得了重大突破,既能够较好地保持衣壳和抗体复合物的结合状态,又获得了较高分辨率的三级结构,使得抗原-抗体复合物三级结构的测定变得更加便捷,因而在构象表位测定领域得到了广泛应用^[36-38]。此外,还有未基于三级结构测定的构象表位鉴定方法,其原理为构象表位仅能与原始状态的病毒衣壳结合,而不能与变性后的衣壳蛋白结合(此为线性表位)。

B细胞构象表位的生物信息学预测采取这样一个基本原理:将蛋白抗原的三级结构视作球体或椭球体,然后在球体或椭球体表面寻找特别暴露或者容易与抗体结合的部位。例如,DiscoTope计算球体表面相邻氨基酸残基的平均表面邻近特征(如球体邻近数和上半球邻近数等),将具有较高平均表面邻近特征的不连续氨基酸残基预测为构象表位^[39]。

3.2 B细胞构象表位

Lee等^[36]利用Cryo-EM观测EV71与单抗MAB 28-7的抗原结合片段(fragment of antigen binding, Fab)结合状态下的空间结构。Fab结合的重要位点包括围绕在五聚体(5-fold mesa)核心的VP1的145位点和富含正电荷的区域(VP1的98、242及244位点),这恰好与P-选凝素糖蛋白配体-1(P-selectin glycoprotein ligand-1, PSGL-1)和硫酸乙酰肝素(heparan sulfate, HS)这两个EV71重要受体的结合部位重叠。Lee等^[36]根据中和试验、序列联配以及血清学交叉试验结果,认为VP1的145位点是部分EV71病毒株特异的构象表位,它发生单一突变能够改变这部分病毒株的抗原性以及和受体PSGL-1的结合能力。Shingler等^[37]发现,单抗22A12的Fab只能与不带病毒RNA的原壳体(procapsid)结合,而不能与感染性病毒颗粒结合,这暗示着病毒原壳体可能对感染性病毒颗粒起到保护作用。Fab结合的区域位于VP1的GH环上SP70(208~222)对应的位置。相对于

感染性颗粒SP70位置形成的有序环结构,原壳体该部分位置的空间构象更加柔韧和凌乱,这可能是单抗只结合原壳体的原因。Ye等^[38]也发现,VP1的GH环与单抗D5重链的互补决定区3(complementarity determining region 3, CDR3)结合,而且GH环的K218位点发生突变会导致VP1不能结合D5。Ye等^[38]认为,D5与GH环的结合会阻滞病毒受体的结合,在病毒感染宿主细胞过程中起到抑制作用。Plevka等^[40]用原壳体免疫小鼠获得了两个单抗E18和E19,两个单抗都能直接与热灭活病毒颗粒结合,却不能与线性表位结合,这说明E18和E19识别的是构象表位。E19主要结合峡谷一侧VP3上的球形突起结构(knob),而E18结合在VP2和VP3背离峡谷的部位。E18能够诱导成熟病毒颗粒的构象发生改变,使得病毒基因组释放出来,而这也是抗体中和作用机制的一部分。

Kiener等^[41]发现,单抗10D3在Western blot中无法结合EV71病毒或P1多聚蛋白,同时在斑点印迹实验(dot blot assay)中10D3仅能与原始状态的病毒而不能与变性的病毒结合,这说明10D3识别的是构象表位。免疫逃避实验(escape mutant)发现,VP3的59、62和67这三个位点的单一突变都能逃避10D3的中和作用;进一步通过反向遗传实验(reverse genetics)证实,这三个位点对于10D3与VP3的结合以及中和作用都非常重要。从分子模型观察到,VP3(59、62、67)位于峡谷边缘VP3的球形突起结构上,并与SP70和VP2-28这两个表位位置相近。Jiang等^[42]根据EV71和CV16之间尚无交叉中和抗体和交叉保护这样一个现象,假定EV71和CV16序列上高度分歧的部位可能是诱导保护性中和反应的关键表位所在区域。为此,他们通过序列比对筛选了10个候选肽段,连同SP70一起利用诺如病毒P粒子(norovirus P particle)作为载体进行表达。通过中和实验和小鼠被动保护实验,Jiang等^[42]将位于VP3的GH环上的表位71-6(176~190)鉴定为EV71的构象性中和表位。Chen等^[43]将一株C4基因型EV71免疫雌性BALB/c小鼠,通过杂交瘤技术分离到了50个构象性中和抗体,再与18株EV71各基因型的代表株进行中和试验,得到的中和反应谱(neutralization profile)提示,EV71的基因型并不能够充分反映其抗原性,即相同(不同)基因型的EV71可能有不同(相同)的抗原性或表位。但该文中并未定位抗体的具

体表位。

4 T细胞线性表位

T细胞受体不能直接结合游离抗原。抗原蛋白必须经抗原提呈细胞加工处理为小肽分子, 并进行免疫修饰, 再与主要组织相容性复合体-I(major histocompatibility complex-I, MHC-I)类和MHC-II类分子形成复合物, 然后被转送到细胞表面, 与表面抗原分化簇4(cluster of differentiation 4, CD4)T细胞和表面抗原分化簇8(cluster of differentiation 8, CD8)T细胞表面的TCR结合, 才能诱导机体产生免疫应答。

4.1 T细胞线性表位鉴定的基本方法

T细胞表位鉴定可以利用人工肽模拟T细胞增殖反应过程。通过T细胞增殖实验或酶联免疫斑点实验(enzyme linked immunospot, ELISPOT)测定增殖反应的强度——刺激指数(stimulation index, SI), 将具有较高刺激指数的人工肽确定为表位。由于T细胞结合的是MHC-肽段复合物, 因此受到MHC限制。抗体阻滞实验通过在增殖反应过程中添加MHC抗体, 可以判断抗原提呈过程受到何种类型的MHC限制^[44-45]。

生物信息学把抗原表位数据库中已知的MHC-I类/MHC-II类分子与抗原肽结合能力数据作为训练数据集, 再利用人工神经网络等机器学习算法构建非线性预测模型, 发展了MHC-I类/MHC-II类分子与肽段结合预测算法^[46-48]。采用类似的思路, 也发展了抗原肽加工处理算法和免疫原性预测算法^[49-50]。

4.2 T细胞线性表位

Foo等^[44]通过生物信息学工具ProPred预测了三个人类白细胞DR抗原(human leukocyte antigen DR, HLA-DR)限制的CD4⁺T细胞表位(分别位于VP1的66~77、145~159和247~261), 然后人工合成这三个多肽SP1(66~77)、SP2(145~159)和SP3(247~261)。CD4⁺T细胞增殖实验发现, 这三个多肽均能够与多个HLA-DR等位基因结合, 诱导产生CD4⁺T细胞增殖反应, 特别是SP2的作用表现最强烈和最稳定。进一步通过抗体阻滞实验确定SP2为MHC-II类限制性CD4⁺T细胞表位。细胞因子谱分析发现, SP1、SP2和SP3主要诱导产生 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)和白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2), 这提示它们诱导增殖的CD4⁺T细胞分化成辅助性T细胞亚群1(T helper cell type 1, Th1)参与免疫反应。

Wei等^[45]通过生物信息学工具EpiMatrix和ClustiMer预测了11个EV71结构蛋白上的CD4⁺T细胞表位, 人工合成这些多肽后利用酶联免疫斑点试验检测诱导的IFN- γ , 其中两个多肽A3(VP2的179~194)和A8(VP3的210~228)的刺激指数最高。胞内细胞因子染色(intracellular cytokine staining)和流式细胞术分析证实, A3和A8是CD4⁺T细胞表位, 而且通过抗体阻滞HLA-DR后, A3和A8的诱导活性几乎完全消失, 这说明A3和A8是HLA-DR限制的CD4⁺T细胞表位。保守性分析发现, A8在EV71各基因型中完全保守, 而A3则在手足口病相关的肠道病毒中保守, 提示A3可能是引起肠道病毒交叉反应的抗原表位。

5 展望

本文综述了目前所发现的EV71各种类型抗原表位, 其中一些表位已经得到了广泛的验证。例如, VP1的SP70(208~222)已经是公认的抗原表位, 不管是直接免疫小鼠产生的中和抗体还是以融合蛋白形式进行表达, 均具有较高的免疫保护效果。SP70所在的VP1上GH环作为松散的二级结构紧靠着峡谷结构, 而峡谷结构是肠道病毒宿主细胞重要的结合部位, 因此抗体与SP70的结合可能抑制了受体的结合, 进而阻滞了病毒对宿主细胞的感染^[5-6]。由此可见, 重要的抗原表位在病毒感染宿主细胞的过程中会起到重要作用。这也同样提示, B细胞线性表位和构象表位之间存在着密切的联系。我们还注意到, 许多B细胞线性和构象表位, 特别是得到广泛验证的表位都定位在 β 链之间的环上(例如VP1的GH环和VP2的EF环等), 这些环作为松散的结构分布在 β 桶这个框架结构周围(表1), 易与抗体结合。另外, 病毒衣壳上一些明显的突起结构, 如峡谷边缘VP2和VP3上的突起结构, 也是抗体容易结合的部位^[5-6]。目前, 对表位的研究更多关注B细胞线性和构象表位, 对T细胞线性表位的研究相对较少。这一方面是因为T细胞表位较为复杂, 涉及到复杂的MHC限制; 另一方面也是因为T细胞表位在病毒机制和临床应用不如B细胞表位更为直接。T细胞表位不仅参与细胞免疫, 也辅助B细胞的体液免疫, 对疫苗发挥保护作用具有重要意义, 相信在今后的研究中会得到更多的重视。

对抗原表位的研究, 具有重要的病毒学研究意义

义和临床应用价值。现有对中和抗体和表位的研究已经提示, 其在病毒致病机制, 特别是在病毒感染宿主细胞的过程中发挥了重要作用, 这有助于研发抗病毒药物、疫苗以及诊断和预后评价试剂等。对EV71和其他肠道病毒的表位研究, 也能帮助研发针对多种肠道病毒的多价疫苗, 更好地保护儿童健康。此外, EV71等肠道病毒快速进化, 疫苗是否更新也需要对病毒变异特别是表位部分的变异进行持续性的监测^[51]。

参考文献 (References)

- 刘志芳, 桂娟娟, 华启航, 董长征. 人肠道病毒71型与手足口病的分子流行病学及其分子进化. 遗传(Liu Zhifang, Gui Juanjuan, Hua Qihang, Dong Changzheng. Molecular epidemiology and evolution of human enterovirus 71 and hand, foot and mouth disease. Hereditas) 2015; 37(5): 426-35.
- Li R, Liu L, Mo Z, Wang X, Xia J, Liang Z, *et al.* An inactivated enterovirus 71 vaccine in healthy children. N Engl J Med 2014; 370(9): 829-37.
- Zhu F, Xu W, Xia J, Liang Z, Liu Y, Zhang X, *et al.* Efficacy, safety, and immunogenicity of an enterovirus 71 vaccine in China. N Engl J Med 2014; 370(9): 818-28.
- 曹雪涛. 医学免疫学, 第六版. 北京: 人民卫生出版社(Cao Xuetao. Medical Immunology, 6th edition. Beijing: People's Medical Publishing House), 2015, 20-2.
- Plevka P, Perera R, Cardosa J, Kuhn RJ, Rossmann MG. Crystal structure of human enterovirus 71. Science 2012; 336(6086): 1274.
- Wang X, Wei P, Ren J, Hu Z, Xu J, Lou Z, *et al.* A sensor-adaptor mechanism for enterovirus uncoating from structures of EV71. Nat Struct Mol Biol 2012; 19(4): 424-9.
- Foo DG, Alonso S, Phoon MC, Ramachandran NP, Chow VT, Poh CL. Identification of neutralizing linear epitopes from the VP1 capsid protein of enterovirus 71 using synthetic peptides. Virus Res 2007; 125(1): 61-8.
- Foo DG, Ang RX, Alonso S, Chow VT, Quak SH, Poh CL. Identification of immunodominant VP1 linear epitope of enterovirus 71 (EV71) using synthetic peptides for detecting human anti-EV71 IgG antibodies in western blots. Clin Microbiol Infect 2008; 14(3): 286-8.
- Liu CC, Chou AH, Lien SP, Lin HY, Liu SJ, Chang JY, *et al.* Identification and characterization of a cross-neutralization epitope of enterovirus 71. Vaccine 2011; 29(26): 4362-72.
- Lim XF, Jia Q, Chow VT, Kwang J. Characterization of a novel monoclonal antibody reactive against the N-terminal region of enterovirus 71 VP1 capsid protein. J Virol Methods 2013; 188(1/2): 76-82.
- Man-Li T, Szyport M, Fang LX, Kwang J. Identification and characterization of a monoclonal antibody recognizing the linear epitope RVADVI on VP1 protein of enterovirus 71. J Med Virol 2012; 84(10): 1620-7.
- Xu L, Huang KJ, Ho TS, Liu CC, Lee YR, Lin CY, *et al.* Monoclonal antibodies for diagnosis of enterovirus 71. Monoclon Antib Immunodiagn Immunother 2013; 32(6): 386-94.
- Parker JM, Guo D, Hodges RS. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: Correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. Biochemistry 1986; 25(19): 5425-32.
- Chou PY, Fasman GD. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol 1978; 47(6): 45-148.
- Emini EA, Hughes JV, Perlow DS, Boger J. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. J Virol 1985; 55(3): 836-9.
- Karplus PA, Schulz GE. Prediction of chain flexibility in proteins. Naturwissenschaften 1985; 72(4): 212-3.
- Kolaskar AS, Tongaonkar PC. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. FEBS Lett 1990; 276(1/2): 172-4.
- Larsen JE, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. Immunome Res 2006; 2: 2.
- Deng YQ, Ma J, Xu LJ, Li YX, Zhao H, Han JF, *et al.* Generation and characterization of a protective mouse monoclonal antibody against human enterovirus 71. Appl Microbiol Biotechnol 2015; 99(18): 7663-71.
- Gao F, Wang YP, Mao QY, Xin Y, Shuang L, Li FX, *et al.* Enterovirus 71 viral capsid protein linear epitopes: Identification and characterization. Virol J 2012; 9: 26.
- Ku Z, Ye X, Huang X, Cai Y, Liu Q, Li Y, *et al.* Neutralizing antibodies induced by recombinant virus-like particles of enterovirus 71 genotype C4 inhibit infection at pre- and post-attachment steps. PLoS One 2013; 8(2): e57601.
- Ku Z, Ye X, Shi J, Wang X, Liu Q, Huang Z. Single neutralizing monoclonal antibodies targeting the VP1 GH loop of enterovirus 71 inhibit both virus attachment and internalization during viral entry. J Virol 2015; 89(23): 12084-95.
- Lim XF, Jia Q, Khong WX, Yan B, Premanand B, Alonso S, *et al.* Characterization of an isotype-dependent monoclonal antibody against linear neutralizing epitope effective for prophylaxis of enterovirus 71 infection. PLoS One 2012; 7(1): e29751.
- Foo DG, Alonso S, Chow VT, Poh CL. Passive protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by neutralizing antibodies elicited by a synthetic peptide. Microbes Infect 2007; 9(11): 1299-306.
- Huang YT, Liao JT, Yen LC, Chang YK, Lin YL, Liao CL. Japanese encephalitis virus replicon-based vaccine expressing enterovirus-71 epitope confers dual protection from lethal challenges. J Biomed Sci 2015; 22(1): 74.
- Ye X, Ku Z, Liu Q, Wang X, Shi J, Zhang Y, *et al.* Chimeric virus-like particle vaccines displaying conserved enterovirus 71 epitopes elicit protective neutralizing antibodies in mice through divergent mechanisms. J Virol 2014; 88(1): 72-81.
- Xue C, Tian X, Li X, Zhou Z, Su X, Zhou R. Construction and characterization of a recombinant human adenovirus type 3 vector containing two foreign neutralizing epitopes in hexon. Virus Res 2014; 183(7): 67-74.
- Zhang J, Dong M, Jiang B, Dai X, Meng J. Antigenic characteristics of the complete and truncated capsid protein

- VP1 of enterovirus 71. *Virus Res* 2012; 167(2): 337-42.
- 29 Zhang J, Jiang B, Xu M, Dai X, Purdy MA, Meng J. Identification of specific antigenic epitope at N-terminal segment of enterovirus 71 (EV-71) VP1 protein and characterization of its use in recombinant form for early diagnosis of EV-71 infection. *Virus Res* 2014; 189(2): 248-53.
 - 30 Fan P, Li X, Sun S, Su W, An D, Gao F, *et al.* Identification of a common epitope between enterovirus 71 and human MED25 proteins which may explain virus-associated neurological disease. *Viruses* 2015; 7(4): 1558-77.
 - 31 Chang GH, Luo YJ, Wu XY, Si BY, Lin L, Zhu QY. Monoclonal antibody induced with inactivated EV71-Hn2 virus protects mice against lethal EV71-Hn2 virus infection. *Virol J* 2010; 7(1): 1-7.
 - 32 Kiener TK, Jia Q, Lim XF, He F, Meng T, Chow VT, *et al.* Characterization and specificity of the linear epitope of the enterovirus 71 VP2 protein. *Virol J* 2012; 9(1): 1-11.
 - 33 Xu L, He D, Li Z, Zheng J, Yang L, Yu M, *et al.* Protection against lethal enterovirus 71 challenge in mice by a recombinant vaccine candidate containing a broadly cross-neutralizing epitope within the VP2 EF loop. *Theranostics* 2014; 4(5): 498-513.
 - 34 Zhao M, Bai Y, Liu W, Xiao X, Huang Y, Cen S, *et al.* Immunization of N terminus of enterovirus 71 VP4 elicits cross-protective antibody responses. *BMC Microbiol* 2013; 13(1): 287.
 - 35 Katpally U, Fu TM, Freed DC, Casimiro DR, Thomas JS. Antibodies to the buried N terminus of rhinovirus VP4 exhibit cross-serotypic neutralization. *J Virol* 2009; 83(14): 7040-8.
 - 36 Lee H, Cifuentes JO, Ashley RE, Conway JF, Makhov AM, Tano Y, *et al.* A strain-specific epitope of enterovirus 71 identified by cryo-electron microscopy of the complex with Fab from neutralizing antibody. *J Virol* 2013; 87(21): 11363-70.
 - 37 Shingler KL, Cifuentes JO, Ashley RE, Makhov AM, Conway JF, Hafenstein S. The enterovirus 71 procapsid binds neutralizing antibodies and rescues virus infection *in vitro*. *J Virol* 2015; 89(3): 1900-8.
 - 38 Ye X, Fan C, Ku Z, Zuo T, Kong L, Zhang C, *et al.* Structural basis for recognition of human enterovirus 71 by a bivalent broadly neutralizing monoclonal antibody. *PLoS Pathog* 2016; 12(3): e1005454.
 - 39 Haste Andersen P, Nielsen M, Lund O. Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. *Protein Sci* 2006; 15(11): 2558-67.
 - 40 Plevka P, Lim PY, Perera R, Cardoso J, Suksatu A, Kuhn RJ, *et al.* Neutralizing antibodies can initiate genome release from human enterovirus 71. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(6): 2134-9.
 - 41 Kiener TK, Jia Q, Meng T, Chow VT, Kwang J. A novel universal neutralizing monoclonal antibody against enterovirus 71 that targets the highly conserved “knob” region of VP3 protein. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8(5): e2895.
 - 42 Jiang L, Fan R, Sun S, Fan P, Su W, Zhou Y, *et al.* A new EV71 VP3 epitope in norovirus P particle vector displays neutralizing activity and protection *in vivo* in mice. *Vaccine* 2015; 33(48): 6596-603.
 - 43 Chen Y, Li C, He D, Cheng T, Ge S, Shih JW, *et al.* Antigenic analysis of divergent genotypes human Enterovirus 71 viruses by a panel of neutralizing monoclonal antibodies: Current genotyping of EV71 does not reflect their antigenicity. *Vaccine* 2013; 31(2): 425-30.
 - 44 Foo DG, Macary PA, Alonso S, Poh CL. Identification of human CD4 T-cell epitopes on the VP1 capsid protein of enterovirus 71. *Viral Immunol* 2008; 21(2): 215-24.
 - 45 Wei R, Yang C, Zeng M, Terry F, Zhu K, Yang C, *et al.* A dominant EV71-specific CD4⁺ T cell epitope is highly conserved among human enteroviruses. *PLoS One* 2012; 7(12): e51957.
 - 46 Lundegaard C, Lamberth K, Harndahl M, Buus S, Lund O, Nielsen M. NetMHC-3.0: Accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8–11. *Nucleic Acids Res* 2008; 36(Web Server issue): W509-12.
 - 47 Nielsen M, Lundegaard C, Worning P, Hvid CS, Lamberth K, Buus S, *et al.* Improved prediction of MHC class I and class II epitopes using a novel Gibbs sampling approach. *Bioinformatics* 2004; 20(9): 1388-97.
 - 48 Nielsen M, Lund O. NN-align. An artificial neural network-based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction. *BMC Bioinformatics* 2009; 10: 296.
 - 49 Calis JJ, Maybeno M, Greenbaum JA, Weiskopf D, De Silva AD, Sette A, *et al.* Properties of MHC class I presented peptides that enhance immunogenicity. *PLoS Comput Biol* 2013; 9(10): e1003266.
 - 50 Peters B, Bulik S, Tampe R, Van Ender PM, Holzhütter HG. Identifying MHC class I epitopes by predicting the TAP transport efficiency of epitope precursors. *J Immunol* 2003; 171(4): 1741-9.
 - 51 Tan X, Huang X, Zhu S, Chen H, Yu Q, Wang H, *et al.* The persistent circulation of enterovirus 71 in People's Republic of China: Causing emerging nationwide epidemics since 2008. *PLoS One* 2011; 6(9): e25662.