

• 论 著 •

山东地区健康人群腺病毒稀有血清型感染状况调查分析

周 奇^{1,2}, 马春玲², 王国英^{1△}

(1. 青岛大学医学院, 山东青岛 266021; 2. 临沂市妇女儿童医院, 山东临沂 276002)

摘要:目的 调查山东地区健康人群中腺病毒不同血清型的感染状况, 筛选出流行水平较低的腺病毒血清型, 用于腺病毒载体构建。方法 利用腺病毒不同血清型标准株, 以 ELISA 方法检测健康人群中不同腺病毒血清型的中和抗体。结果 山东地区 18~70 岁的健康人群中腺病毒总抗体的阳性率为 95.2%。其中 Adv3、Adv5、Adv7、Adv11、Adv26、Adv35、Adv48、Adv49 中和抗体的阳性率分别为: 69.8%、71.0%、61.0%、9.4%、2.2%、5.8%、0.8%、1.6%。Adv11、26、35、48、49 5 个血清型的阳性率远低于 Adv3、5、7 型($P<0.01$)。结论 山东地区腺病毒的总感染率较高, 不同血清型之间有显著差异, 其中 Adv26、48、49 型腺病毒感染率较低, 可用于腺病毒载体的构建。

关键词:腺病毒; 载体; 血清型; 中和抗体; ELISA

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.07.021

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)07-0923-03

Investigation and analysis on infection situation of rare adenovirus serotype among normal population in Shandong area

Zhou Qi^{1,2}, Ma Chunling², Wang Guoying^{1△}

(1. Medical College, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266021, China; 2. Linyi Municipal Women and Children's Hospital, Linyi, Shandong 276002, China)

Abstract: **Objective** To investigate the infection status of different adenovirus serotypes of adenovirus among normal population in Shandong area in order to screen out the serotypes of low prevalence level for the use in the adenoviral vector construction. **Methods** Serum levels of neutralizing antibodies against different serotypes of adenovirus were determined with ELISA by using different adenovirus serotype standard strains. **Results** The positive rate of total adenovirus antibodies in the normal population aged 18—70 years old in Shandong area was 95.2%, in which the antibody positive rates of Adv3, Adv5, Adv7, Adv11, Adv26, Adv35, Adv48 and Adv49 were 69.8%, 71.0%, 61.0%, 9.4%, 2.2%, 5.8%, 0.8% and 1.6%, respectively. The positive rates of Adv11, 26, 35, 48, 49 neutralizing antibodies were significantly lower than those of Adv3, 5, 7 serotypes ($P<0.01$). **Conclusion** The adenovirus total infection rate is high in Shandong area. The infection rates of different serotypes are different, in which Adv26, 48, 49 serotypes have lower infection rates and can be used for constructing the adenovirus vector.

Key words: adenovirus; vector; serotype; neutralizing antibodies; ELISA

腺病毒是 1953 年由 Rowe 等^[1]从小儿扁桃体的细胞培养中发现的, 对其生物学和免疫学特征人类已经有了比较全面的认识^[2-3]。腺病毒自然感染非常普遍, 部分血清型可引起爆发, 但对免疫功能正常的人来说常自限性恢复, 所以腺病毒的总体致病性相对较弱^[4]。另外它可以感染很多分裂期或静止期细胞, 即使在一些高度分化的组织细胞中也可增殖。因此, 修饰的腺病毒于上世纪 80 年代开始被用作哺乳动物细胞的转基因载体。由于腺病毒载体具有宿主范围广、包装容量大、转染效率高、安全性好等突出的优势, 它已经成为继逆转录病毒载体后被广泛应用的载体系统^[5]。目前使用的腺病毒载体多以 5 型腺病毒血清型的基因组为框架进行构建的, 但是人群中普遍存在着 5 型腺病毒的中和抗体, 研究证明中和抗体的存在是影响目的基因表达的一个重要因素, 从而限制了腺病毒载体的广泛应用^[6]。对健康人群中不同腺病毒血清型的中和抗体进行检测, 统计分析不同血清型的中和抗体在人群中的存在情况, 从中筛选出流行水平较低的稀有血清型, 利用其基因组进行载体构建, 可以减少现存中和抗体的免疫影响, 有利于目的基因的表达。

1 资料与方法

1.1 一般资料 从山东省临沂市、青岛市、济南市、菏泽市、威海市 5 个地区收集到健康体检者的血清标本 500 例, 均获得知

情同意。年龄为 18~70 岁, 平均 36 岁, 其中男 242 例, 女 258 例。

1.2 主要毒株、细胞和试剂:腺病毒 1~49 型国际标准毒株购于北京 302 医院病毒研究室; A549 细胞购于中国科学院上海细胞生物研究所; 德国维润腺病毒总抗体检测试剂盒购于广州市益满生物科技有限公司。

1.3 血清标本的收集与制备 每个研究对象均采集空腹静脉血 5 mL, 血液标本常温放置 30 min 后, 3 000 r/min 离心 10 min, 收集血清 1.5 mL 转移至 EP 管中, 置于 -20℃ 备用。

1.4 Ad3、Ad5、Ad7、Ad11、Ad26、Ad35、Ad48、Ad49 各型病毒的扩增、提纯与滴度测定 首先对冻存的 A549 细胞进行复苏并传代; 取上述血清型的腺病毒感染 A549 细胞进行病毒扩增; 扩增后通过氯化铯梯度离心法进行纯化; 最后以 Karber 法计算病毒滴度。

1.5 血清腺病毒总抗体的检测 利用德国维润腺病毒 IgG 抗体检测试剂盒, 严格按照试剂说明书进行操作, 对 500 例正常血清进行原倍检测, 从中筛选出腺病毒感染阳性的血清标本。

1.6 血清中和抗体效价的测定 A549 细胞以 5×10^3 个细胞/孔加入 96 孔板中, 37℃, 5% CO₂ 培养, 抽取随机血清标本 20 份, 用 PBS 等比稀释, 与同体积 MOI=20 的各血清型病毒原液混合后加入 96 孔板中, 设细胞、病毒对照, 培养 3 d 后观

察细胞生长状态,在病毒对照出现 70% 以上的病变时判断结果,以完全抑制细胞病变的最大稀释倍数做为中和抗体的效价。

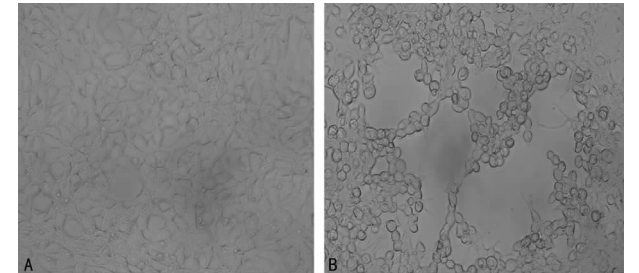
1.7 用 ELISA 方法检测血清中 Ad3、Ad5、Ad7、Ad11、Ad26、Ad35、Ad48、Ad49 各型腺病毒的中和抗体的阳性率 用包被缓冲液将各病毒原液稀释至 2×10^6 pfu/mL 加入到 96 微孔板中,每孔加 100 μ L,4 $^{\circ}$ C 过夜。次日洗涤 3 次。加一定稀释的待检血清、阴性血清、阳性对照 100 μ L 于上述已包被之反应孔中,置 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,洗涤,加入新鲜稀释的酶标二抗 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,洗涤,加入底物 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,加入终止液 50 μ L,用酶标仪读取试验结果。

1.8 阳性结果判断 使用阴性血清测定结果均值的 2 倍作为阳性判断值。

1.9 统计学处理 应用 SPSS19.0 软件进行统计学分析和数据处理,以 $P < 0.05$ 作为差异具有统计学意义的标准。

2 结 果

2.1 Ad3、Ad5、Ad7、Ad11、Ad26、Ad35、Ad48、Ad49 各型腺病毒扩增的结果 加入各型腺病毒原液 50 μ L 感染 A549 细胞,3 d 以后细胞开始出现病变,与正常细胞对照组相比典型的 CPE 为:细胞肿胀、变圆、脱落。分别选取一个正常细胞对照和一个典型 CPE 进行拍照,结果见图 1。



A 表示未感染腺病毒 Ad35 的 A549 细胞;B 表示感染腺病毒 Ad35 的 A549 细胞。

图 1 A549 细胞的形态

2.2 Ad3、Ad5、Ad7、Ad11、Ad26、Ad35、Ad48、Ad49 各型腺病毒滴度的检测结果 通过系列倍比稀释的病毒液感染 96 孔板中的 A549 细胞,10 d 后计数 CPE 出现的孔数,按公式 $\text{Titre (pfu/mL)} = 10^{(x+0.8)}$ 测得病毒滴度分别为:Ad3 = 1.2×10^9 pfu/mL,Ad5 = 1.9×10^9 pfu/mL,Ad7 = 1.1×10^9 pfu/mL,Ad11 = 1.5×10^9 pfu/mL,Ad26 = 2.0×10^9 pfu/mL,Ad35 = 0.6×10^9 pfu/mL,Ad48 = 2.2×10^9 pfu/mL,Ad49 = 1.8×10^9 pfu/mL。

2.3 血清腺病毒总抗体阳性率 对 500 例血清进行总抗体检测,只有 24 例标本为阴性,阳性率为 95.2%,对阳性血清再进行中和抗体的检测,见图 2。

2.4 血清中和抗体效价的检测 血清中和抗体效价试验结果见表 1,随机抽选的 20 例血清标本中,Ad35、48、49 均没有检测到相应的中和抗体,Ad3 的效价在 1:8 稀释倍数后有所下降,其他血清型的中和抗体效价均在 1:4 的稀释倍数后开始有所下降,因此选择 1:4 作为血清的稀释倍数,见表 1。

2.5 Ad3、Ad5、Ad7、Ad11、Ad26、Ad35、Ad48、Ad49 各型腺病毒中和抗体的 ELISA 检测结果 从以上结果可以看出 Ad3、Ad5、Ad7 血清型阳性率均在 60% 以上,其余 5 个型别的腺病毒的流行水平较低,均低于 10%。其中 Ad11 型阳性率最高为 9.40%,其次是 Ad35 型阳性率 5.8%,Ad26 型阳性率 2.2%,Ad49 型阳性率 1.6%,Ad48 型阳性率最低为 0.8%。

Ad3、Ad5、Ad7 血清型的阳性率与 Ad11、Ad26、Ad35、Ad48、Ad49 血清型比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 2。

表 1 各型腺病毒的中和抗体的效价							
项目	1∶1	1∶2	1∶4	1∶8	1∶16	1∶32	1∶64
Ad3	10	10	10	10	8	6	2
Ad5	14	14	14	12	7	6	4
Ad7	8	8	8	7	6	5	2
Ad11/26	1	1	1	0	0	0	0
Ad35/48/49	0	0	0	0	0	0	0

表 2 各型腺病毒的中和抗体的阳性率								
项目	Ad3	Ad5	Ad7	Ad11	Ad26	Ad35	Ad48	Ad49
标本总数(n)	500	500	500	500	500	500	500	500
阳性标本数(n)	349	355	305	47	11	29	4	8
阳性率(%)	69.8	71	61	9.4	2.2	5.8	0.8	1.6

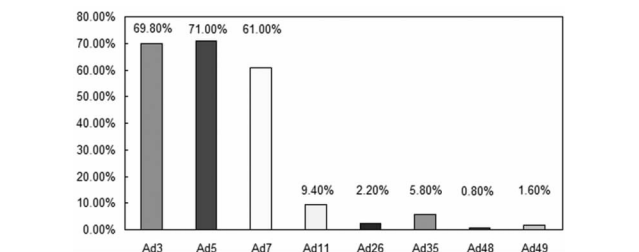


图 2 各型腺病毒中和抗体阳性率比较

3 讨 论

至 20 世纪 80 年代腺病毒基因组用于载体的构建以来,腺病毒载体在基因诊断和疫苗应用上得到了广泛应用^[5],但是腺病毒载体还存在着缺乏靶向性、目的基因表达持续时间较短、外源基因表达的可控性差等问题,对腺病毒载体进行优化是研究者们研究的热点。

目的基因表达持续时间普遍认为与机体的免疫反应有关。国外有研究小组将表达荧光素酶包被基因重组的 Ad35 型腺病毒载体注射到有 5-型腺病毒型免疫力小鼠体内^[6],明显地检测到荧光素酶的表达;而用荧光素酶包被基因重组的 5-型腺病毒型载体感染同样有 5-型腺病毒型免疫力小鼠,此包被基因的表达活性较没有 5-型腺病毒型免疫力的对照小鼠下降 90%。这说明避开现存的腺病毒中和抗体的影响可提高目的基因的表达活性。

腺病毒各血清型的分布存在一定地区和人种的差异,对山东地区健康人群进行腺病毒各血清型中和抗体的检测,有利于了解山东地区健康人群中腺病毒中和抗体的存在情况,对避开现存中和抗体构建新型腺病毒载体打下研究基础^[7-9]。

本研究证明在我国山东地区的健康人群中,腺病毒不同血清型中和抗体的阳性率有着显著差异,其中 Ad5 的中和抗体阳性率最高,对 5 型腺病毒载体的临床应用会造成一定影响。Ad11、Ad35、Ad26、Ad49、Ad48 型的中和抗体阳性率较低,均在 10% 以下。利用阳性率最低的 Ad26、Ad49、Ad48 三型腺病毒构建载体相对于 Ad5 型来说可有效避开健康人群中腺病毒现存免疫力的影响,有利于目的基因的表达。

参考文献

[1] Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, et al. Isolation(下转第 927 页)

和生殖激素测定均在正常范围之内。

3.3.5 T/LH 的比值与 FSH 结果进行讨论商榷 生殖激素测定的意义在于,可对不同类型的不育者,如 VC、附性腺感染不育、免疫不育、获得性睾丸损害不育等,判断睾丸损伤程度,可依据 FSH、LH 升高和 T 下降与睾丸损伤程度成正比的关系,来制定治疗方案和判断预后的依据。睾丸体积缩小而 FSH 明显升高,即可判断睾丸生精功能有明显损害,若同时伴有 T/LH 值的明显降低或单独 T 值明显降低,又可以判断睾丸生精小管和间质细胞的同时损害。LH 及 T 的测定主要观察睾丸间质细胞功能,而与睾丸体积大小不成正比关系。T/LH 比值是间质细胞功能障碍更敏感的指标,正常情况下,T/LH 应大于 2.12,当 T/LH 比值下降,说明间质细胞功能已有损害^[12]。从 T/LH 比值与睾丸容积看,刘睿智^[13]报道 147 例非嵌合型克氏综合征与 T/LH 值:年龄范围 25~31 岁;睾丸大小左 3.4~7.33 mL;精液量 1.84~2.91 mL;T:6.77~8.68 nmol/L;LH:19.47~25.68 IU/L;T/LH 比值 0.35~0.34;FSH 21.47~35.28 IU/L。结果显示睾丸体积小、无精子、无生精细胞的睾丸体积越小;生殖激素处于高促状态,支持细胞功能减退;T/LH 比值都小于 1,睾丸损伤基膜区,间质细胞分泌睾酮水平降低。杨慎敏等^[14]报道,355 例不同类型 AZF 微缺失的临床特点比较,年龄 21~45 岁(平均 28.5 岁),分析:睾丸总体积为 20~33 mL;T 为 11.16~13.83 nmol/L;LH 为 4.81~6.26 IU/L;T/LH 比值为 2.06~2.56;FSH 为 11.08~13.41 IU/L。从上面前后两组数据比较看,充分说明睾丸容积太小与 T/LH 比值密切相关性,睾丸容积小于 10 mL 者 T/LH 比值小于 1;睾丸容积大于 20 mL 者 T/LH 比值大于 2。本结果在 OA 中睾丸容积平均为大于 14 mL,(14.59±2.63),T/LH 比值为 2.94±2.0;而 NOA 生精细胞有无,睾丸均小于 10 mL(10.4±3.91;8.15±4.03),T/LH 比值小于 1.6(1.57±1.11;1.45±1.23)。总体参考指标小于 2.2。

冯俭等^[15]报道对男性不育 400 例生殖激素水平测定分析结果,血清 T 值在不同的精子密度层次的男性不育症患者,均呈正态分布,当 FSH、LH 上升,T/LH 的比值下降提示睾丸功能损害伴睾丸容积减少,并且 T/LH 的比值更能反映睾丸间质细胞的功能。若 T/LH 值的明显降低或单独 T 值明显降低,可判断睾丸生精小管和间质细胞的同时损害^[16]。

生精细胞学检测,可作为梗阻与非梗阻无精子患者的鉴别诊断的方法之一,对鉴别诊断起关键作用;采取 T/LH 比值计算,抑制素 B 的检测对判断睾丸功能损伤具有预见性,值得提倡与应用;生殖激素测定一定采用法定单位,一是遵法,二是与

国际数值接轨;精液生精细胞的有无和多寡常决定诊疗的成败,应积极开展。

参考文献

- [1] 田龙.显微外科治疗男性不育症.李宏军,黄宇烽.实用男科学[M].2版.北京:科学出版社,2015:485-488.
- [2] WHO.谷翊群,陈振文,于和鸣等译.人类精液及精子宫颈黏液相互作用实验室检验手册[M].4版.北京:人民卫生出版社,2001:48-49.
- [3] 曹兴午,杨文质,赵广明.精液分析与不育症[M].北京:人口出版社,2006:145-147.
- [4] 李宏军,黄宇烽.实用男科学[M].2版.北京:科学出版社,2015:101.
- [5] 钟影,吴东,艾玲,等.272 例无精子男性睾丸与生殖激素测量结果分析[J].四川医学,2013,23(10):1000-1002.
- [6] 曹兴午,齐来增,施长春,等.精索静脉曲张、AZFc 缺失和腮腺炎史一例病例报告[J].生殖医学杂志,2013,22(12):958-962.
- [7] 曹兴午,施长春,齐来增,等.严重少精子症治疗成功 1 例报告——文献复习与回顾性分析[J].生殖医学杂志,2014,23(5):408-410.
- [8] 杨振华.现代男性不育诊疗学[M].上海:上海科学技术文献出版社,2007:48.
- [9] 李宏军,李汉忠.男科学[M].3版.北京:北京大学医学出版社,2013:25.
- [10] 吴明章,林其德.生殖疾病诊断学[M].上海:上海科学技术出版社,2006:20-22.
- [11] 陈荣安,房秉仁,欧阳贵,等.不同病因无精子症的生殖激素水平[J].生殖与避孕,2002,22(2):111-113.
- [12] 郭应禄,胡礼泉.男科学[M].北京:人民卫生出版社,2004:985.
- [13] 刘睿智.男性生殖医学新进展[J].中国性科学杂志,2012,28(12):1230-1232.
- [14] 杨慎敏,李海波,温端改,等.无精子症患者中无精子因子微缺失分布[J].生殖医学杂志,2013,22(3):159-163.
- [15] 冯俭,张水林,吴志君,等.男性不育 400 例生殖激素水平测定分析[J].南通医学院学报,2001,21(1):53-54.
- [16] Rodrigaues-Rigau LJ. Harmomal control of spermatogenesis in man. Comparison. With the rat. In:steinberger A,Steinberger E, Testiculardevelopment, structure and function[J]. New York: Rovenpress,1980,26(2):139.

(收稿日期:2015-11-28)

(上接第 924 页)

- of a cytopathic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture[J]. Soc Bio Med,1953,84(3):570-573.
- [2] Smith JG, Wiethoff CM, Stewart PL, et al. Adenovirus[J]. Curr Top Microbiol Immunol,2010,343(2):195-224.
 - [3] 陈娜娜,向冬喜,郑丛龙.腺病毒及其研究进展[J].大连医科大学学报,2010,32(5):586-590.
 - [4] 谢立,杨旭辉,陈恩富.腺病毒感染研究进展[J].浙江预防医学,2015,27(3):262-265.
 - [5] 祝秀梅,慕洪涛,王凡,等.腺病毒载体研究进展与展望[J].湖北农业科学,2010,49(1):218-221.
 - [6] Peter AA, Lemckert AC, Bonnie A, et al. Comparative seroprevalence and immunogenicity of six rare serotype recombinant adeno-

virus vaccine vectors from subgroups B and D[J]. J Virol,2007,81(46):4654-4663.

- [7] Bonnie AE, Matthew D, Havenga JE, et al. Immunogenicity of heterologous recombinant adenovirus prime-boost vaccine regimens is enhanced by circumventing vector cross-reactivity[J]. J Virol,2006,80(22):12009-12016.
- [8] Dan H, Baroucha, Sandra V, et al. International seroepidemiology of adenovirus serotypes 5,26,35 and 48 in pediatric and adult populations[J]. Vaccine,2011,29(32):5203-5209.
- [9] Yu B, Wang Z, Dong JN, et al. A serological survey of human adenovirus serotype 2 and 5 circulating pediatric populations in Changchun, China[J]. Virology Journal,2012,9(28):287.

(收稿日期:2015-10-20)