论著·基础医学

大别班达病毒糖蛋白Gn和Gc中HLA-A*02:01限制性CTL表位的筛选与鉴定

朱誉恒[1],刘静娴[2],崔仑标[2],肖忠党[1] [1]东南大学生物科学与医学工程学院,江苏南京;[2]江苏省疾病预防控制中心,江苏南京

[摘要] **目的** 大别班达病毒(Dabie bandavirus,DBV)感染所致发热伴血小板减少综合征(severe fever with thrombocytopnia syndrome,SFTS)病死率高,目前尚无特效疫苗,而DBV糖蛋白前体(glycoprotein precursor,GP)是重要的免疫靶点,但其细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte,CTL)表位尚不明确。本研究以DBV GP为研究对象,通过生物信息学工具预测结合动物体外实验验证的方法筛选并鉴定具有较强免疫原性的CTL表位,为DBV特异性细胞免疫机制研究及表位疫苗设计提供理论依据。**方法** 以DBV HB29株糖蛋白n(glycoprotein n,Gn)和糖蛋白c(glycoprotein c,Gc)氨基酸序列为模板,利用IEDB、NetMHCpan 4.1、STMHCpan 3种生物信息学工具,预测长度为8~11个氨基酸的HLA-A*02:01限制性T细胞表位。经ToxinPred2、AlgPred 2.0评估毒性与致敏性,并通过20株国内DBV分离株序列比对分析保守性。选取在2种及以上工具中结合亲和力排名前2%的作为表位肽。将6~8周龄雌性HLA-A*02:01转基因小鼠随机分为2组(n=2):Gn组和Gc组,分别以Gn(100 μg/只)或Gc(100 μg/只)联合弗氏佐剂于第0、14、28天进行3次免疫。末次免疫后7 d处死小鼠,取脾脏制备单细胞悬液。使用各表位肽(终浓度25 μg/mL)体外刺激脾细胞(5×10^5个/孔),采用ELISPOT检测IFN-γ分泌水平,以每10^5个脾细胞中斑点形成细胞(spot-forming cell,SFC)值>100为阳性判断标准。为了避免$CD4^+$T细胞分泌IFN-γ对结果的影响,通过磁珠阳性分选法获得$CD4^+$T细胞耗竭的脾细胞($CD4^+$T cells-depleted splenocytes,$CD4^-$SP),以相同条件再次进行ELISPOT检测,以每10^4个$CD4^-$SP中SFC值>100为阳性判断标准。**结果** 经3种工具交叉预测,共筛选出12条表位肽(Gn1~Gn6、Gc1~Gc6)。各表位肽经免疫原性预测均显示良好潜力,通过毒性及致敏性评估,并且在多地的分离株中表现出良好的保守性。分子对接模拟结果显示,12条表位肽与HLA-A*02:01分子均能形成稳定的对接复合物。ELISPOT结果显示:Gn5、Gn6、Gc1、Gc2、Gc3、Gc4、Gc5、Gc6能显著诱导免疫小鼠脾细胞分泌IFN-γ(SFC值均>100,P均<0.000 1);在$CD4^-$SP中,Gn5、Gn6、Gc3、Gc4仍能诱导强IFN-γ应答(SFC值均>100,P均<0.000 1)。**结论** 本研究成功从DBV中鉴定出4条能特异性诱导$CD8^+$T细胞产生IFN-γ应答的CTL表位(Gn5、Gn6、Gc3、Gc4),并且在国内DBV分离株中高度保守,为DBV多表位疫苗的研发提供了实验依据。

[关键词] 发热伴血小板减少综合征;细胞毒性T淋巴细胞表位;酶联免疫斑点测定;HLA-A*02:01抗原

[中图法分类号] R341;R373.9;R392.3 [文献标志码] A

Screening and identification of HLA-A*02:01-restricted CTL epitopes in the glycoproteins Gn and Gc of Dabie bandavirus

ZHU Yuheng[1], LIU Jingxian[2], CUI Lunbiao[2], XIAO Zhongdang[1] [1]School of Biological Science and Medical Engineering, Southeast University, Nanjing, Jiangsu; [2]Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing, Jiangsu, China

[**Abstract**] **Objective** Dabie bandavirus (DBV) infection causes severe fever with thrombocytopenia

[基金项目] 江苏省卫生厅科研基金(MQ2025039)

[通信作者] 肖忠党,E-mail:zdxiao@seu.edu.cn
崔仑标,E-mail:lbcui@jscdc.cn

2097-0927/Copyright © 2026, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

引用格式:朱誉恒,刘静娴,崔仑标,等. 大别班达病毒糖蛋白Gn和Gc中HLA-A*02:01限制性CTL表位的筛选与鉴定[J]. 陆军军医大学学报,2026,48(13):1876-1885. DOI:10.16016/j.2097-0927.202605008.

Citation:ZHU Y H,LIU J X,CUI L B,*et al*. Screening and identification of HLA-A*02:01-restricted CTL epitopes in the glycoproteins Gn and Gc of Dabie bandavirus[J]. J Army Med Univ,2026,48(13):1876-1885. DOI:10.16016/j.2097-0927.202605008.

syndrome (SFTS), which has a high fatality rate and for which no specific vaccine is currently available. The DBV glycoprotein precursor (GP) is an important immunological target, however, its cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitopes remain unclear. This study aims to screen and identify CTL epitopes with strong immunogenicity from DBV GP using bioinformatics tools for prediction, combined with *in vitro* animal experiments for validation, providing a theoretical basis for research on DBV-specific cellular immune mechanisms and epitope-based vaccine design. **Methods** Using the amino acid sequences of glycoprotein n (Gn) and glycoprotein c (Gc) of the DBV HB29 strain as templates, 3 bioinformatics tools, namely IEDB, NetMHCpan 4.1, and STMHCpan, were employed to predict HLA-A*02:01-restricted T-cell epitopes with a length of 8 to 11 amino acids. Toxicity and allergenicity were evaluated using ToxinPred2 and AlgPred 2.0, and conservation was analyzed through sequence alignment of 20 domestic DBV isolates. The peptides ranked in the top 2% for binding affinity by at least 2 of the 3 tools were selected as epitope peptides. Female HLA-A*02:01 transgenic mice (6 to 8 weeks old) were randomly divided into a Gn group and a Gc group (n=2). The transgenic mice were immunized on days 0, 14, and 28 for a total of 3 immunizations with Gn (100 μg/mouse) or Gc (100 μg/mouse) combined with Freund's adjuvant. In 7 d after the last immunization, the mice were sacrificed, and the spleens were harvested to prepare single-cell suspensions. Splenocytes (5×10^5 cells/well) were stimulated *in vitro* with each epitope peptide at a final concentration of 25 μg/mL, and IFN-γ secretion was detected using ELISPOT assay. A spot-forming cell (SFC) value >100 per 10^5 splenocytes was set as the positive criterion. To eliminate the potential interference of IFN-γ secreted by $CD4^+$T cells, $CD4^+$T cell-depleted splenocytes ($CD4^-$SP) were obtained *via* magnetic bead-based positive selection, and ELISPOT assay was performed again under the same conditions, with an SFC value >100 per 10^4 $CD4^-$SP set as the positive criterion. **Results** A total of 12 epitope peptides (Gn1 to Gn6 and Gc1 to Gc6) were screened out through cross-prediction using the 3 tools. All epitope peptides showed promising potential in immunogenicity, passed toxicity and allergenicity evaluation, and exhibited good conservation among isolates from multiple regions. Molecular docking showed that all 12 epitope peptides could significantly induce IFN-γ secretion by splenocytes from immunized mice (all SFC values >100, all P<0.000 1). In $CD4^-$SP, Gn5, Gn6, Gc3 and Gc4 still induced strong IFN-γ responses (all SFC values >100, all P<0.000 1). **Conclusion** Four CTL epitopes (Gn5, Gn6, Gc3 and Gc4) that can specifically induce IFN-γ responses in $CD8^+$T cells were successfully identified from DBV. These epitopes are highly conserved among domestic DBV isolates, providing experimental evidence for the development of multi-epitope vaccines against DBV.

[**Key words**] severe fever with thrombocytopenia syndrome; cytotoxic T lymphocyte epitopes; enzyme-linked immunospot assay; HLA-A*02:01 antigen

Supported by the Scientific Research Fund of Jiangsu Provincial Health Department (MQ2025039). Corresponding authors: XIAO Zhongdang, E-mail: zdxiao@seu.edu.cn; CUI Lunbiao, E-mail: lbcui@jscdc.cn

发热伴血小板减少综合征(severe fever with thrombocytopnia syndrome,SFTS)是一种病死率较高的自然疫源性传染病,由大别班达病毒(Dabie bandavirus,DBV)引起,DBV原名严重发热伴血小板减少综合征病毒(severe fever with thrombocytopenia syndrome virus,SFTSV)。SFTS重症患者会出现多器官功能障碍综合征,住院患者的死亡率达到12%~50%[1]。DBV主要通过蜱虫叮咬传播,中间宿主有家畜(牛、羊、猪)与宠物(猫、犬)等,人群普遍易感。有研究表明,DBV亦存在人传人现象,接触患者的体液、血液、血性分泌物及气溶胶等可造成传染[2]。我国SFTS患者主要分布在河南、安徽、湖北、辽宁、山东、浙江、江苏等省份,50岁及以上者约占80%,发病高峰为5~7月,多数病例发病前有牛、犬、猪等家畜动物的接触史[3]。近年来江苏省的SFTS患者死亡率呈上升趋势,病死率随着病例年龄增长而升高。此外,有些患者身上并无明显被蜱虫叮咬的痕迹,提示感染来源的多样性。有报道称,人亦可以从猫和狗等伴生动物那里获得感染[4]。SFTS已严重威胁人们的健康,但目前还无特效的治疗方法,也无疫苗可用于预防,最主要的预防措施是避免蜱虫叮咬[5]。为了保护人们的健康,亟需进行DBV的病原学、传播媒介、宿主、致病机制以及疫苗研制等方面的研究。

DBV最新被归属为白蛉纤细病毒科,各流行株的基因序列具有高度同源性,与汉坦病毒属的基因组差异较大。DBV的基因组由分节段的3个环形负链RNA片段组成,分别表达RNA依赖的RNA聚合酶(RNA dependent RNA polymerase,RdRP)、糖蛋白前体

(glycoprotein precursor,GP)、非结构蛋白(nonstructural protein,NSs)与核蛋白(nucleoprotein,NP)[6]。GP在宿主细胞内经蛋白水解加工后裂解为2种成熟的包膜糖蛋白,即糖蛋白n(glycoprotein n,Gn)和糖蛋白c(glycoprotein c,Gc)。DBV Gn与Gc在病毒的感染中发挥重要作用,能通过结合不同的细胞表面受体,在低pH的环境里,引发膜融合,是诱发机体产生中和抗体的主要抗原[7]。Gn可与细胞表面非肌肉肌球蛋白重链ⅡA(Nonmuscle Myosin Heavy Chain ⅡA,NMMKC-ⅡA)结合诱导病毒进入细胞;Gc在吞噬溶酶体中由二聚体变构为三聚体,促进病毒膜与吞噬溶酶体膜融合,从而实现病毒基因组RNA的释放[8]。此外,作为主要表面抗原,Gn与Gc在宿主免疫逃逸机制中也具有重要功能。Gn与Gc可通过与人源树突状细胞特异性细胞间黏附分子-3捕获非整合素受体(dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin receptor, DC-SIGN)结合,介导pH-依赖性病毒进入,从而在一定程度上帮助病毒逃避中和抗体介导的阻断作用[9]。进一步研究表明,针对Gn与Gc的免疫能够在体内模型中激活抗原特异性T细胞反应,尤其是诱导$CD8^+$T细胞产生IFN-γ等效应细胞因子[10],提示其不仅是体液免疫的重要靶点,同时在细胞免疫中亦具有潜在的免疫靶标价值。因此,DBV GP已成为探究病毒与宿主之间的相互作用以及制备治疗性抗体的重要靶抗原[11]。探究DBV特异性T细胞应答规律以及鉴定DBV GP上相关表位对研究其免疫应答机制、免疫治疗方法,以及研发DBV新型表位疫苗均具有重要意义[12]。

本研究以DBV HB29株的Gn与Gc为研究对象。根据等位基因频率网络数据库(http://www.allelefrequencies.net)的统计数据,人类白细胞抗原A基因HLA-A*02:01是目前已知分布最广泛的MHCⅠ类等位基因之一[13],同时HLA-A*02:01相关的抗原加工与呈递机制研究最为深入,在免疫表位数据库(http://www.iedb.org)等数据库中积累了大量实验验证数据,预测结果具有更高准确性[14]。本研究利用IEDB、NetMHCpan 4.1和STMHCpan等免疫信息学工具预测HLA-A*02:01限制性T细胞表位,并合成表位肽进行免疫验证;使用HLA-A*02:01转基因小鼠模型模拟人类HLA-A*02:01限制性免疫环境,以确定其能否有效诱导特异性细胞免疫反应,从而为DBV GP的T细胞表位疫苗设计提供理论与实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DBV Gn与Gc由江苏省疾病预防控制中心购买;PBS缓冲液、红细胞裂解液购自北京Solarbio公司;RPMI-1640培养基购自美国Gibco公司;弗氏完全佐剂(complete Freund's adjuvant,CFA)、弗氏不完全佐剂(incomplete Freund's adjuvant, IFA)、植物血凝素(phytohemagglutinin, PHA)购自美国Sigma公司;ELISPOT试剂盒购自美国CTL公司;人淋巴细胞分离液、小鼠$CD4^+$T细胞磁珠法阳性分选试剂盒购自上海翌圣公司。预测的HLA-A*02:01限制性T细胞表位由中国上海生工科技有限公司合成,纯度≥95%,共12条。将合成肽溶解于无菌PBS中,配制成1 mg/mL储存液,-80 ℃保存备用。

1.2 实验动物

4只6~8周龄的HLA-A*02:01转基因(C57BL/6NCya背景)雌性小鼠,体质量18~22 g,购自中国苏州赛业科技有限公司。小鼠饲养于江苏省疾病预防控制中心SPF级动物实验室。动物实验方案经江苏省疾病预防控制中心实验动物福利伦理委员会审批(2025028),所有操作严格遵循实验动物福利与伦理规范。免疫及处死前对小鼠实施适当麻醉处理以降低疼痛。

1.3 方法

1.3.1 DBV GP蛋白MHC-Ⅰ表位的预测 从NCBI GenBank(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)中获取DBV HB29株的GP序列(登录号:NC_018138.1),作为序列计算机模拟分析的输入。将目标GP序列进行顺序寡肽分割,获取所有长度为8~11的多肽,并利用预测模型计算多肽与HLA-A*02:01分子结合的亲和力。结合如下3个算法:IEDB[15]、STMHCpan[16]、NetMHCpan 4.1[17]。其中IEDB与NetMHCpan 4.1展示HLA-A*02:01分子与GP多肽的结合亲和力的rank值,STMHCpan展示HLA-A*02:01分子与GP多肽的结合亲和力的综合预测得分。选取在2个及以上预测结果中排名前2%的作为表位肽,同时仅与HLA-A*02:01分子表现出高结合亲和力的多肽无法诱导足够的免疫反应,还需要具有高免疫原性才能具有高免疫反应性,因此根据IEDB算法计算上一步中获取的表位肽的免疫原性,以评分>0表示高免疫原性。

同时为了分析不同DBV毒株之间氨基酸的差异并对其保守区域进行分析,通过NCBI数据库(https://www.ncbi.nlm.nih.gov)获取了来自中国不同地区(包括江苏、浙江、湖南、安徽等)共20组不同的分离株GP序列,构建一个具有代表性的DBV GP序列数据集。通过WebLogo服务器(http://weblogo.threeplusone.com)进行多序列比对[18],重点分析上述表位肽在对应氨基酸位点上的保守性。

1.3.2 多肽与HLA-A*02:01分子对接模型的预测 通过上述方法预测得到具备高亲和力、高免疫原性

且保守性较好的表位肽。利用计算机模拟表位肽与HLA-A*02:01分子的对接。从RCSB PDB数据库(https://www.rcsb.org)获取该等位基因的结构(PDB ID:3MRE)作为受体,表位肽的三维结构通过在线服务器PEP-FOLD 3.5(https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD/)进行预测[19]。针对每个表位肽,服务器生成多个可能构象,从中选取全局能量最低的模型作为该表位肽最稳定的三维结构,用于后续的分子对接分析。采用HPEPDOCK在线服务器(http://huanglab.phys.hust.edu.cn/hpepdock/)进行分子对接模拟确定多肽是否具有与HLA-A*02:01分子结合的能力[20],首先采用CABS-dock对HLA-A*02:01分子与表位进行分子对接,获得可能的结合构象;随后利用PDBePISA对对接复合物的界面特征进行进一步分析。该分析基于多个结构与能量参数进行综合评价:平均均方根偏差(root mean square deviation,RMSD)表示同一聚类内所有构象两两之间的平均结构偏差,反映该类构象的整体相似性,RMSD<5 Å表示构象具有稳定性,数值越小说明该构象结合模式越稳定;界面面积(interface area,IA)用于反映蛋白结合后被埋藏的溶剂可及表面积,IA>1 000 Å^{2}以上表示有较强相互作用;界面形成的溶剂化自由能变化(solvation free energy change,Δ^iG)用于评估界面形成的热力学稳定性,Δ^iG在-10~-5之间为中等结合,数值越小表明结合倾向越强;氢键和盐桥数量反映界面中非共价相互作用的类型与数量。用Pymol对CABS-dock对接的结果进行可视化。

1.3.3 肽毒性和致敏性的预测 多肽的毒性和致敏性可能导致一系列不良反应的出现,从而影响预防和治疗的效果,因此,对表位肽毒性和致敏性的研究非常重要。本研究使用基于ToxinPred2(https://webs.iiitd.edu.in/raghava/toxinpred2/index.html)和AlgPred 2.0(https://webs.iiitd.edu.in/raghava/algPred2/)的网络算法分别测试了各表位肽的毒性和致敏性。毒性评分>0.7,则被视为可能的毒性表位[21];致敏性评分>0.4,则被视为疑似过敏原[22]。

1.3.4 DBV糖蛋白Gn和Gc联合弗氏佐剂3次免疫小鼠 将小鼠随机分为Gn组(n=2)和Gc组(n=2),于SPF级动物房适应性饲养3 d后开始免疫,以首次免疫当天为第0天,分别于第0、14、28天进行3次免疫。首次免疫(第0天):将Gn(100 μg/只)或Gc(100 μg/只)与等体积CFA用注射器反复抽推乳化,直至形成油包水状态的稳定乳剂,每只小鼠背部皮下多点注射。第2次(第14天)和第3次(第28天)免疫:将Gn(100 μg/只)或Gc(100 μg/只)与等体积IFA按上述方法乳化后,以同样途径和体积注射。免疫及处死前对小鼠实施适当麻醉以降低疼痛,实验期间每日观察小鼠精神状态、进食饮水及注射部位情况。

1.3.5 ELISPOT评估多肽的细胞免疫应答诱导能力 末次免疫后7 d(即第35天),麻醉后处死小鼠,收集脾脏,研磨过网筛并离心,红细胞裂解10 min后,将脾细胞重悬于RPMI 1640培养基,制备成单细胞悬液。采用ELISPOT实验评估预测的多肽刺激脾细胞后所产生的细胞免疫应答水平,实验使用96孔PVDF膜ELISPOT板,包被抗小鼠IFN-γ单克隆捕获抗体(5 μg/mL,PBS稀释),4 ℃避光过夜。每孔加入脾细胞(5×10^5个/孔),实验设以下分组:Gn刺激组(终浓度25 μg/mL)、Gc刺激组(终浓度25 μg/mL)、阳性对照组(加入终浓度10 μg/mL的PHA)、阴性对照组(加入等体积PBS)。在37 ℃、5%CO_2下培养36 h。细胞培养结束后按照试剂盒说明书进行操作,用大量去离子水终止反应并晾干板面。使用ELISPOT读板仪对膜上形成的蓝色斑点进行计数,每个斑点对应一个分泌IFN-γ的脾T细胞。进一步对各表位肽进行鉴定,取免疫小鼠脾细胞,按照$CD4^+$T细胞磁珠阳性分选试剂盒说明书操作,去除$CD4^+$T细胞,获得$CD4^+$T细胞耗竭的脾细胞($CD4^+$T cells-depleted splenocytes,$CD4^-$SP)。将初筛得到的12条表位肽分别刺激$CD4^-$SP,采用ELISPOT方法检测IFN-γ分泌水平,若某表位肽在$CD4^-$SP中仍能诱导显著的IFN-γ应答,则鉴定其为CTL表位。

1.4 统计学分析

采用GraphPad Prism 10.0软件进行统计分析。实验重复2次,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。P<0.05表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 多工具交叉预测获得12条HLA-A*02:01高亲和力T细胞表位

使用MHC Ⅰ类表位预测算法IEDB、NetMHCpan 4.1和STMHCpan进行生物信息学分析(表1)。在NetMHCpan 4.1和IEDB中,强结合位点的阈值均为<0.5%,在STMHCpan中,强结合位点的阈值为>50%,选择在其中2个及以上取得较好预测结果的多肽,获得了6个Gn的表位肽和6个Gc的表位肽,其中Gn2、Gn3、Gn4、Gn6在3个预测工具中都取得了较为突出的结果。用IEDB预测其免疫原性得分,结果以>0为阳性判断标准,Gn6、Gc2、Gc3、Gc5的免疫原性预测得分均为负值,但本研究因其与MHC结合亲和力较高,故将其继续纳入研究。

表1 DBV Gn和Gc与HLA-A*02:01分子结合亲和力预测结果

Table 1 Predicted binding affinity of DBV epitope peptides Gn and Gc with HLA-A*02:01 molecule

Serial number	Peptide	Start position	Percentile rank/%（NetMHCpan 4.1）	Presentation/%（STMHCpan）	Rank_EL/%（IEDB）	Immunogenicity score（IEDB）
Gn1	SEFPDICKI	198	3.10	35.21	22.62	0.13
Gn2	KLMDRGRQV	508	0.09	92.67	0.12	0.10
Gn3	CQIDRLIHV	49	0.14	93.45	0.19	0.33
Gn4	RLITLTSEL	362	0.15	88.62	0.21	0.12
Gn5	MYSPVILTI	546	1.60	57.41	3.40	0.23
Gn6	ILLGYAGLMLL	460	0.29	82.47	0.43	−0.06
Gc1	SVLEGVHSY	957	0.14	80.96	2.68	0.12
Gc2	HPMSGIPTQVF	747	8.50	77.98	11.36	−0.10
Gc3	ELKSKKLAL	782	5.05	36.41	6.75	−0.64
Gc4	MPSGEVRTF	737	7.80	84.75	19.37	0.32
Gc5	VFKGVSVTY	755	2.70	48.67	12.50	−0.08
Gc6	NYSAIPTTI	853	11.07	26.75	13.64	0.31

2.2 12条表位肽在国内20株DBV分离株中高度保守

保守性分析的结果显示,12个表位肽在本研究获取的共20组DBA GP序列中完全一致,未发生突变,表现为高度保守。

2.3 分子对接显示12条表位肽均能与HLA-A*02:01稳定结合

分子对接模拟结果显示(表2),12条表位肽与HLA-A*02:01分子均能形成稳定的对接复合物,平均RMSD均<5 Å,IA为1 110.8~1 285.8 Å^2,Δ^iG为−15.1~−8.4 kcal/mol;在非共价相互作用方面,Gn4形成的盐桥最多(13对),Gn6形成的氢键最多(11对),Gc2亦形成9对氢键和9对盐桥。图1和图2分别展示了Gn1~Gn6、Gc1~Gc6与HLA-A*02:01分子的对接构象。

2.4 结合毒性与致敏性筛选排除表位肽

使用ToxinPred2和AlGPred 2.0模型分别进行致敏性和毒性预测。结果显示,所有的表位肽致敏性评分均≤0.4,仅Gn1和Gn2的毒性评分>0.7,见表3。

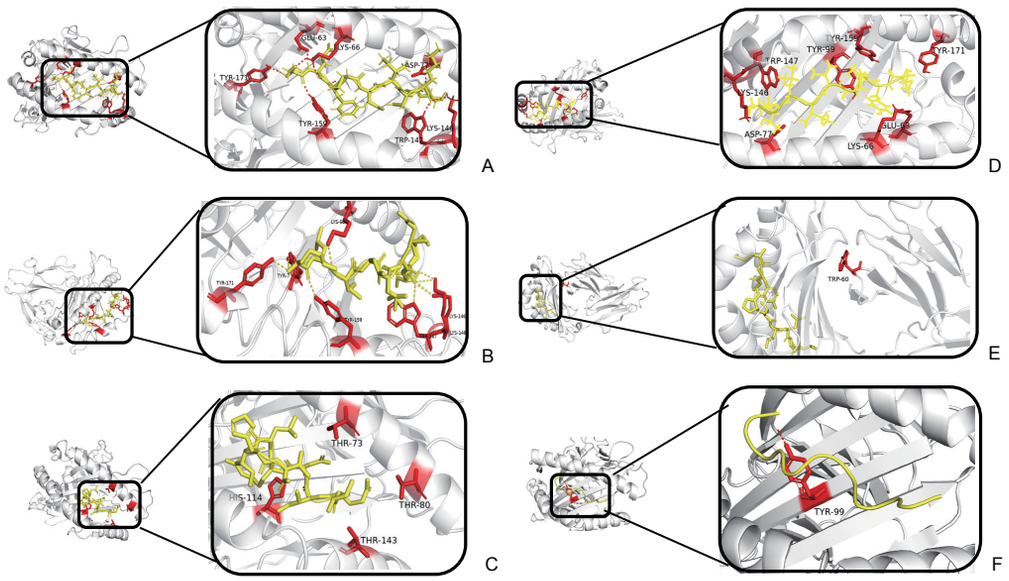
2.5 ELISPOT初筛鉴定8条具有IFN-γ诱导活性的T细胞表位

评估小鼠脾细胞在12个表位肽刺激下分泌IFN-γ的水平,结果如图3所示,Gn5、Gn6、Gc1、Gc2、Gc3、Gc4、Gc5和Gc6能够诱导DBV感染小鼠脾细胞产生显著的IFN-γ应答(P<0.000 1),其平均斑点形成细胞(spot-forming cell,SFC)值分别为211、173、128、178、277、273、193,140。PHA作为非特异性阳性对照刺激小鼠脾细胞分泌IFN-γ的平均SFC值为632,PBS培养基作为阴性对照刺激小鼠脾细胞分泌IFN-γ的平均SFC值为8。其中,Gc3与Gc4诱导的应答最为强烈。以上结果显示,Gn5、Gn6、Gc1、Gc2、Gc3、Gc4、Gc5和Gc6均可诱导小鼠T细胞分泌IFN-γ,表明其为T细胞表位。

表2 T细胞表位与HLA-A*02:01分子对接复合物界面分析参数

Table 2 Interface analysis parameters of T cell epitope-HLA-A*02:01 molecular docking complexes

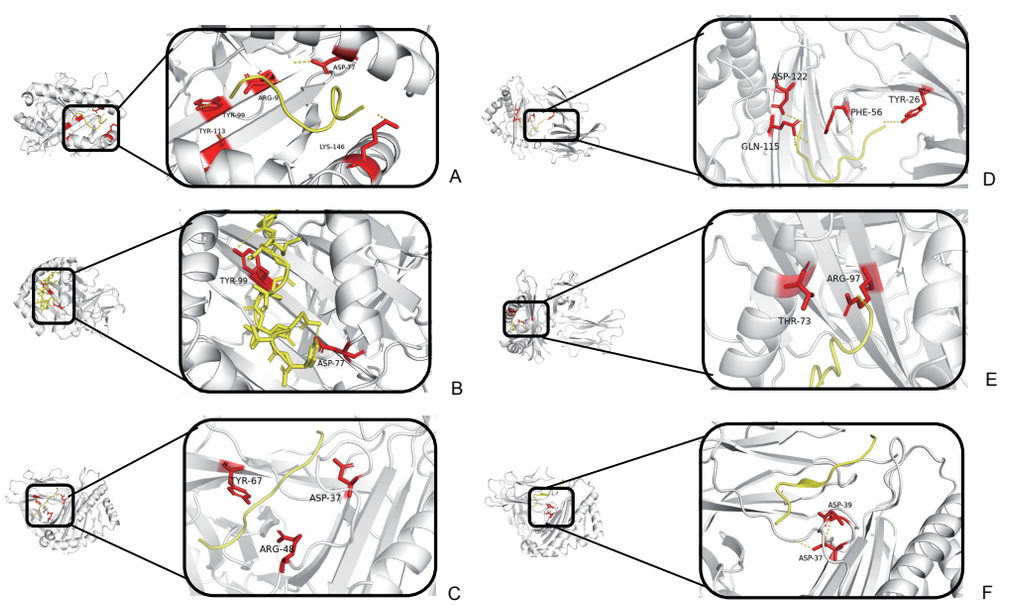
Serial number	Average RMSD/Å	Interface area/Å^2	Δ^iG/(kcal/mol)	Hydrogen bonds	Salt bridges
Gn1	1.08	1 136.0	−8.6	3	2
Gn2	1.84	1 235.1	−15.1	7	5
Gn3	1.89	1 196.9	−12.1	10	5
Gn4	3.29	1 285.8	−8.4	10	13
Gn5	2.92	1 272.8	−13.9	9	6
Gn6	3.49	1 209.9	−9.6	11	3
Gc1	3.57	1 124.0	−10.8	7	4
Gc2	0.85	1 170.0	−12.4	9	9
Gc3	4.01	1 235.0	−14.5	5	2
Gc4	1.90	1 162.9	−10.7	7	3
Gc5	3.10	1 188.3	−9.2	8	4
Gc6	0.58	1 110.8	−10.7	7	2



Gray represents the HLA-A*02:01 molecule; Yellow represents the CTL epitope; Red represents the amino acid residues in the binding region

图1　T细胞表位(Gn1~Gn6,A~F)与HLA-A*02:01分子对接复合物可视化

Figure 1　Visualization of T cell epitope (Gn1 to Gn6, Panels A to F)-HLA-A*02:01 molecular docking complexes



Gray represents the HLA-A*02:01 molecule; Yellow represents the CTL epitope; Red represents the amino acid residues in the binding region

图2　T细胞表位(Gn1~Gn6,A~F)与HLA-A*02:01分子对接复合物可视化

Figure 2　Visualization of T cell epitope (Gc1 to Gc6, Panels A to F)-HLA-A*02:01 molecular docking complexes

2.6　$CD4^+$ T细胞去除后终筛确认4条CTL表位

进一步鉴定上述8个T细胞表位肽是否为CTL表位。通过磁珠细胞分选技术用$CD4^+$T细胞磁珠阳性分选获得$CD4^-$SP,用上述筛选到的T细胞表位刺激$CD4^-$SP,检测其分泌IFN-γ的水平,结果如图4所示,在$CD4^-$SP中,Gn5、Gn6、Gc3、Gc4仍能诱导强IFN-γ应答(SFC分别为160、138、195、191,$P<0.000\ 1$),表明Gn5、Gn6、Gc3、Gc4可能为DBV GP特异性CTL表位。

3　讨论

3.1　DBV Gn和Gc是重要的CTL免疫靶点,但目前研究不足

目前对DBV的免疫学研究主要集中于体液免疫,尤其是中和抗体对病毒糖蛋白的识别作用。研究表明,DBV Gn和Gc是诱导中和抗体的主要抗原,在病毒吸附及膜融合过程中发挥关键作用,因此成为疫苗设

表3 DBV GP上表位肽的毒性与致敏性预测结果

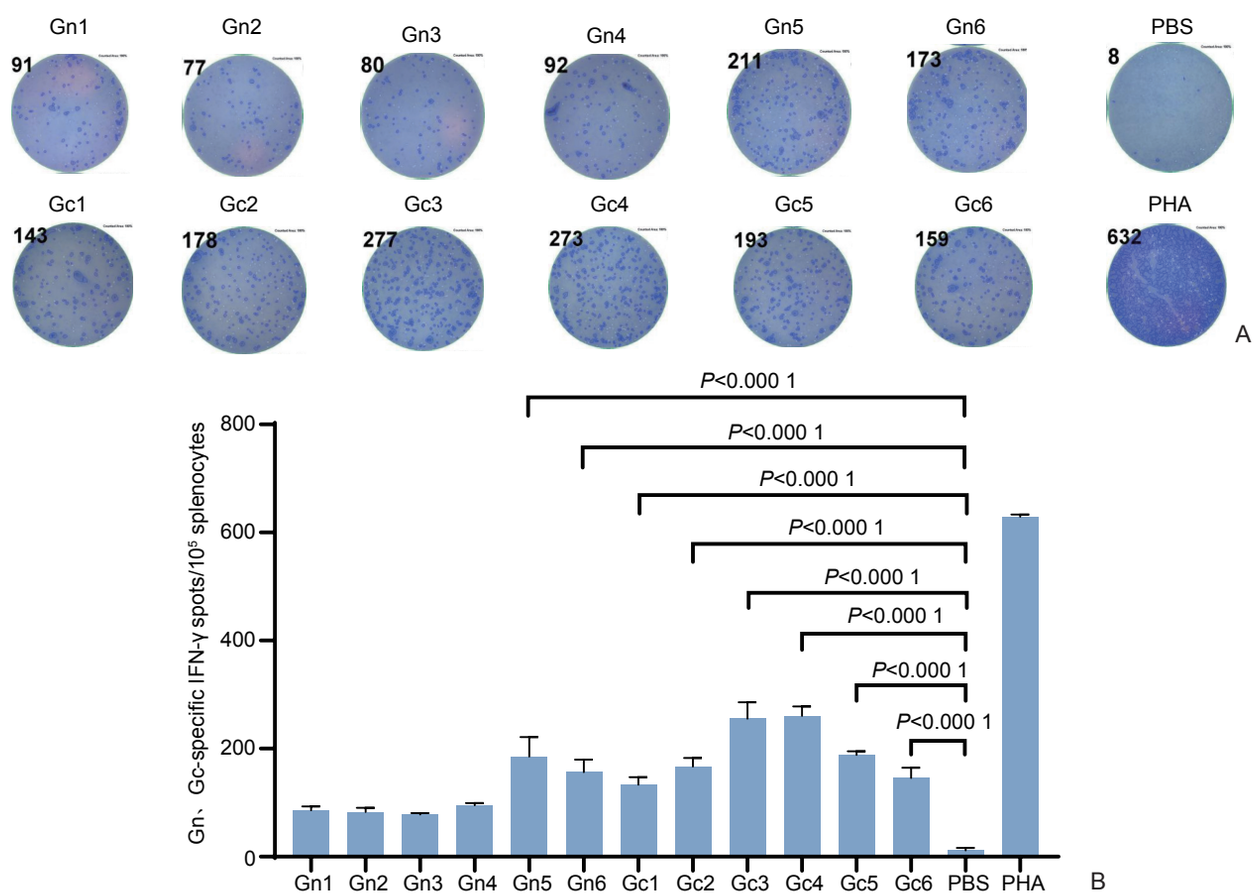
Table 3 Predicted toxicity and allergenicity of DBV GP epitopes

Serial number	Allergenicity score	Toxicity score
Gc1	0.35	0.58
Gc2	0.35	0.43
Gc3	0.36	0.68
Gc4	0.26	0.58
Gc5	0.34	0.57
Gc6	0.34	0.5
Gn1	0.26	0.71
Gn2	0.34	0.82
Gn3	0.31	0.66
Gn4	0.23	0.44
Gn5	0.25	0.6
Gn6	0.35	0.58

计的重要靶标[23]。然而,相较于体液免疫,关于DBV特异性细胞免疫,尤其是CTL表位的研究仍相对有限。现有研究多集中于NP的T细胞表位,而针对Gn与Gc进行的CTL表位系统筛选及实验验证报道较少,Gn和Gc位于病毒包膜表面,直接参与病毒与宿主细胞的相互作用,在感染过程中更易被抗原加工与呈递系统处理,并通过MHC Ⅰ类分子递呈至$CD8^+$T细胞,从而诱导特异性细胞免疫应答。此外,已有研究表明,病毒表面糖蛋白不仅能够诱导体液免疫,还可激活细胞免疫反应,包括$CD8^+$T细胞产生IFN-γ等效应细胞因子[24-25]。因此,系统鉴定Gn和Gc上的CTL表位,对于理解DBV细胞免疫机制及开发多表位疫苗具有重要意义。

3.2 预测结合实验验证是CTL表位筛选的有效策略

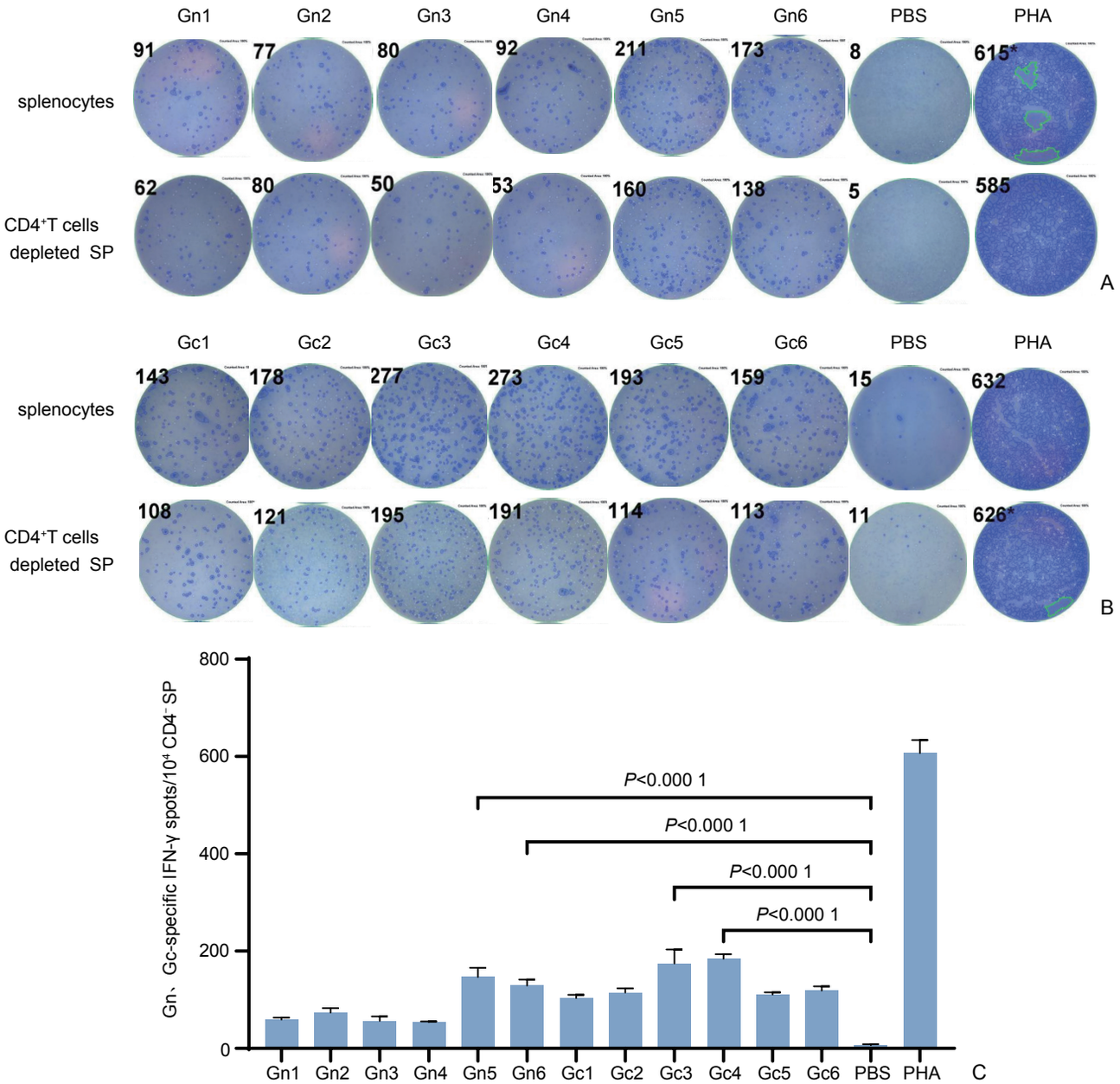
随着免疫信息学方法的发展,通过预测结合实验筛选CTL表位的方法已成为病毒疫苗研究的重要策略。在COVID-19的研究中,TARKE等[26]通过Immune Epitope Database等平台预测表位肽,并结合



A: IFN-γ responses of splenocytes from DBV-infected mice stimulated with different peptides. The 8 peptides (Gn5, Gn6, Gc1, Gc2, Gc3, Gc4, Gc5 and Gc6) induce significant IFN-γ responses in splenocytes from DBV-infected mice; B: Statistic analysis of IFN-γ ELISPOT assay results of splenocytes from HLA-A*02:01 transgenic mice

图3 小鼠脾细胞分泌IFN-γ的ELISPOT检测结果及统计分析

Figure 3 ELISPOT assay results and statistical analysis of IFN-γ secreted by splenocytes



A: IFN-γ secretion by lymphocytes stimulated with different Gn epitope peptides after depletion of CD4⁺T cells from mouse splenocytes; B: IFN-γ secretion by lymphocytes stimulated with different Gc epitope peptides. Among them, Gn5, Gn6, Gc3, and Gc4 maintain relatively high levels of IFN-γ production; C: Statistical analysis of ELISPOT assay results from $CD4^+$ T cell-depleted splenocytes of mice immunized with DBV Gn and Gc epitope peptides

图4 小鼠$CD4^-$SP分泌IFN-γ的ELISPOT检测结果及统计分析

Figure 4 ELISPOT assay results and statistical analysis of IFN-γ secreted by $CD4^+$T cells-depleted splenocytes

ELISPOT等实验进行验证,成功鉴定出多种具有免疫活性的$CD8^+$T细胞表位。在流感病毒(influenza A virus)研究中,EICKHOFF等[27]利用NetMHCpan预测血凝素蛋白候选CTL表位,并在HLA-A*02:01转基因小鼠中通过ELISPOT检测IFN-γ反应,成功鉴定出多个高免疫原性表位,为多表位疫苗设计提供了实验依据。本研究采用类似策略,对DBV GP进行系统筛选与实验验证。

基于DBV HB29株GP序列,本研究利用IEDB、NetMHCpan 4.1和STMHCpan工具预测HLA-A*02:01限制性CTL表位,经保守性分析、分子对接模拟及毒性与致敏性评估后筛选出12条表位肽。通过HLA-A*02:01转基因小鼠免疫及ELISPOT验证,最终确认4条能特异性诱导$CD8^+$T细胞产生IFN-γ应答的CTL表位

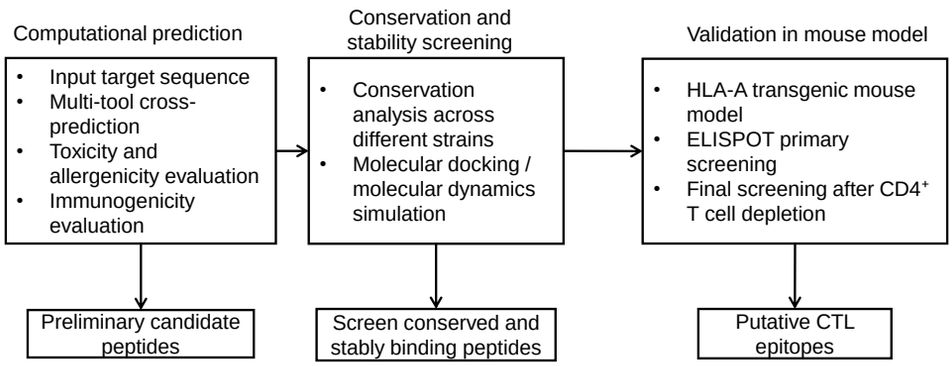


图5 CTL表位筛选与鉴定优化流程示意图

Figure 5 Schematic diagram of the optimized workflow for CTL epitope screening and identification

(Gn5、Gn6、Gc3、Gc4)。上述结果进一步验证了预测结合实验验证策略在CTL表位筛选中的可靠性与有效性。

3.3 免疫原性预测与实验结果存在差异,建立多级筛选流程予以互补

尽管上述结果验证了多工具交叉预测策略的有效性,但表1中IEDB算法预测的免疫原性评分与实际ELISPOT实验结果之间仍存在一定差异。例如,Gc3在实验中表现出最强的IFN-γ诱导能力,但其IEDB免疫原性评分仅为-0.64;相反,Gn1预测评分为0.13,却在实验中检测到较少的特异性IFN-γ分泌。可能的原因包括:免疫原性是一个多因素决定的复杂表型,除MHC结合亲和力外,还受到T细胞受体(T cell receptor, TCR)识别能力、表位肽稳定性、蛋白酶体切割效率及抗原加工呈递过程的影响,而当前预测模型难以完全整合所有这些参数;本研究中使用的HLA-A*02:01转基因小鼠TCR库与人类存在一定差异,可能影响某些表位肽的免疫识别效率。同时这也表明,免疫信息学预测可作为CTL表位筛选的有效初筛工具,但最终确认仍需依赖实验验证,未来可尝试整合多种预测算法(NetTepi、DeepImmuno)以提高免疫原性预测的可靠性。

基于上述预测与实验验证结果,本研究总结出一套CTL表位筛选与鉴定流程(图5),共分3级。第1级为免疫信息学预测,依次包括输入目标序列、多工具交叉预测、毒性与致敏性评估及免疫原性评价,输出表位肽。第2级为保守性与结合稳定性筛选,通过不同毒株间的保守性分析及分子对接或动力学模拟,筛选出兼具保守性和稳定结合能力的表位肽。第3级为小鼠模型验证,利用HLA转基因小鼠进行免疫,经ELISPOT初筛及$CD4^+$T细胞去除后终筛,最终确认特异性CTL表位。

尽管本研究取得了一定进展,但仍存在一定局限性:①本研究仅针对单一HLA等位基因HLA-A*02:01进行分析,尚不能覆盖不同人群的HLA多态性,因此未来仍需扩展至多种HLA亚型以提高疫苗的适用范围;②本研究主要通过ELISPOT检测IFN-γ分泌来评估T细胞应答,尚未进一步通过CTL杀伤实验或体内保护实验验证其功能活性,未来可以结合细胞毒性检测及动物攻毒实验,对其免疫保护效果进行系统评估,以进一步明确其作为疫苗表位的实际应用价值。

综上所述,本研究通过整合预测与验证2种方法,系统筛选并确认了DBV GP中的HLA-A*02:01限制性CTL表位。其中Gn5、Gn6、Gc3和Gc4表位肽表现出较强的免疫应答,该表位序列位于膜蛋白末端,在目前已知的DBV变异株中高度保守,能在HLA-A*02:01转基因小鼠中诱导特异性细胞免疫反应,可以为开发DBV治疗性或预防性多表位肽疫苗提供实验依据。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] ZHUANG L, SUN Y, CUI X M, *et al*. Transmission of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus by *Haemaphysalis longicornis* ticks, China[J]. Emerg Infect Dis, 2018, 24(5): 868-871. DOI: 10.3201/eid2405.151435.

[2] TRAN X C, YUN Y, VAN AN L, *et al*. Endemic severe fever with thrombocytopenia syndrome, Vietnam[J]. Emerg Infect Dis, 2019, 25(5): 1029-1031. DOI: 10.3201/eid2505.181463.

[3] HE Z Q, WANG B H, LI Y, *et al*. Severe fever with thrombocytopenia syndrome: a systematic review and meta-analysis of epidemiology, clinical signs, routine laboratory diagnosis, risk factors, and outcomes[J]. BMC Infect Dis, 2020, 20(1): 575. DOI: 10.1186/s12879-020-05303-0.

[4] LI J Z, WANG C P, LI X, *et al*. Direct transmission of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus from farm-raised fur animals to workers in Weihai, China[J]. Virol J, 2024, 21(1): 113. DOI: 10.1186/s12985-024-02387-x.

[5] KIM S, JEON K, CHOI H, *et al*. Comparative analysis of the efficacy of vaccines using structural protein subunits of the severe fever with thrombocytopenia syndrome virus[J]. Front Microbiol, 2024, 15: 1348276. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1348276.

[6] KIM D, LAI C J, CHA I, *et al*. Current progress of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) vaccine development[J]. Viruses, 2024, 16(1): 128. DOI: 10.3390/v16010128.

[7] KWAK J E, KIM Y I, PARK S J, *et al*. Development of a SFTSV DNA vaccine that confers complete protection against lethal infection in ferrets[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 3836. DOI: 10.1038/s41467-019-11815-4.

[8] DU S W, PENG R C, XU W, *et al*. Cryo-EM structure of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 6333. DOI: 10.1038/s41467-023-41804-7.

[9] HOFMANN H, LI X X, ZHANG X A, *et al*. Severe fever with thrombocytopenia virus glycoproteins are targeted by neutralizing antibodies and can use DC-SIGN as a receptor for pH-dependent entry into human and animal cell lines[J]. J Virol, 2013, 87(8): 4384-4394. DOI: 10.1128/JVI.02628-12.

[10] MANZONI T B, WESTOVER J B, LUNDGREEN K A, *et al*. Homologous and heterologous vaccination regimens with mRNA and rVSV platforms induce potent immune responses against SFTSV glycoprotein[J]. Viruses, 2025, 17(8): 1095. DOI: 10.3390/v17081095.

[11] SUN H, HU Q M, LU S W, *et al*. Current status of severe fever with thrombocytopenia syndrome in China (Review)[J]. Int J Mol Med, 2025, 56(5): 169. DOI: 10.3892/ijmm.2025.5610.

[12] JIANG D B, MA Z L, ZHANG J Q, *et al*. Immunoreactivity analysis of MHC-I epitopes derived from the nucleocapsid protein of SARS-CoV-2 *via* computation and vaccination[J]. Vaccines, 2024, 12(11): 1214. DOI: 10.3390/vaccines12111214.

[13] GONZALEZ-GALARZA F F, MCCABE A, SANTOS E J M D, *et al*. Allele frequency net database (AFND) 2020 update: gold-standard data classification, open access genotype data and new query tools[J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48(D1): D783-D788. DOI: 10.1093/nar/gkz1029.

[14] WANG G Z, WAN H H, JIAN X X, *et al*. INeo-epp: a novel T-cell HLA class-I immunogenicity or neoantigenic epitope prediction method based on sequence-related amino acid features[J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 5798356. DOI: 10.1155/2020/5798356.

[15] VITA R, BLAZESKA N, MARRAMA D, *et al*. The immune epitope database (IEDB): 2024 update[J]. Nucleic Acids Res, 2025, 53(D1): D436-D443. DOI: 10.1093/nar/gkae1092.

[16] YE Z, LI S H, MI X, *et al*. STMHCpan, an accurate Star-Transformer-based extensible framework for predicting MHC I allele binding peptides[J]. Brief Bioinform, 2023, 24(3): bbad164. DOI: 10.1093/bib/bbad164.

[17] REYNISSON B, ALVAREZ B, PAUL S, *et al*. NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data[J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48(W1): W449-W454. DOI: 10.1093/nar/gkaa379.

[18] CROOKS G E, HON G, CHANDONIA J M, *et al*. WebLogo: a sequence logo generator[J]. Genome Res, 2004, 14(6): 1188-1190. DOI: 10.1101/gr.849004.

[19] SHEN Y M, MAUPETIT J, DERREUMAUX P, *et al*. Improved PEP-FOLD approach for peptide and miniprotein structure prediction[J]. J Chem Theory Comput, 2014, 10(10): 4745-4758. DOI: 10.1021/ct500592m.

[20] ZHOU P, JIN B W, LI H, *et al*. HPEPDOCK: a web server for blind peptide-protein docking based on a hierarchical algorithm[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(W1): W443-W450. DOI: 10.1093/nar/gky357.

[21] SHARMA N, NAOREM L D, JAIN S, *et al*. ToxinPred2: an improved method for predicting toxicity of proteins[J]. Brief Bioinform, 2022, 23(5): bbac174. DOI: 10.1093/bib/bbac174.

[22] SHARMA N, PATIYAL S, DHALL A, *et al*. AlgPred 2.0: an improved method for predicting allergenic proteins and mapping of IgE epitopes[J]. Brief Bioinform, 2021, 22(4): bbaa294. DOI: 10.1093/bib/bbaa294.

[23] CHEN C H, LI J X, ZHOU Y M, *et al*. Latest advances and prospects in the pathogenesis, animal models, and vaccine research of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus[J]. Front Immunol, 2025, 16: 1624290. DOI: 10.3389/fimmu.2025.1624290.

[24] GRIFONI A, WEISKOPF D, RAMIREZ S I, *et al*. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals[J]. Cell, 2020, 181(7): 1489-1501.e15. DOI: 10.1016/j.cell.2020.05.015.

[25] SETTE A, CROTTY S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19[J]. Cell, 2021, 184(4): 861-880. DOI: 10.1016/j.cell.2021.01.007.

[26] TARKE A, SIDNEY J, KIDD C K, *et al*. Comprehensive analysis of T cell immunodominance and immunoprevalence of SARS-CoV-2 epitopes in COVID-19 cases[J]. Cell Rep Med, 2021, 2(2): 100204. DOI: 10.1016/j.xcrm.2021.100204.

[27] EICKHOFF C S, TERRY F E, PENG L D, *et al*. Highly conserved influenza T cell epitopes induce broadly protective immunity[J]. Vaccine, 2019, 37(36): 5371-5381. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.07.033.

(收稿:2026-05-07;修回:2026-06-16)

(编辑 刘秋池)