

禽流感疫苗研究进展

陈全姣^{*} 金梅林^{**} 陈焕春
(华中农业大学动物医学院 武汉 430070)

摘要 禽流感是由正黏病毒科流感病毒属的A型流感病毒引起的,发生于各种家禽和野鸟的一种急性传染病。由于其重要的经济和公共卫生学意义,使得禽流感的防治显得突出重要。疫苗的使用是控制禽流感的主要手段。目前实际应用中仍以禽流感全病毒灭活疫苗为主,但由于其潜在的缺点使得人们将目光转向其它类型疫苗的研制。从常规疫苗、新型疫苗和交叉保护性疫苗三个方面对禽流感疫苗研究进展加以阐述。常规疫苗包括基因工程亚单位疫苗和重组活载体疫苗;新型疫苗主要有冷适应流感弱毒疫苗,基因工程活流感病毒疫苗,复制缺陷型病毒疫苗,DNA疫苗,RNA复制子疫苗,表位疫苗等;交叉保护性疫苗主要依据流感病毒表面的保守蛋白M和NP的特性,构建疫苗来达到交叉保护的目的。

关键词 禽流感疫苗 新型疫苗 交叉保护性疫苗

禽流行性感(禽流感,如avian influenza, AI)是由正黏病毒科流感病毒属的A型流感病毒引起的,发生于各种家禽和野鸟的一种急性传染病。该病呈全球性分布,给养禽业造成巨大的经济损失。而1997年一株禽流感H5N1病毒在香港直接从禽传染给人造成18人感染,6人死亡的事件更是提供了由禽流感造成人流感流行威胁的有力证据。事实上,同时含有禽流感和人流感基因的重组病毒正是造成人类流感不断流行的主要原因。加强对禽流感的预防和控制同时具有预防疾病学和人类公共卫生学双重意义。目前,各国对禽流感的预防和控制采取了不同的措施。而对于疫苗的使用,多数国家政府则采取禁止或不提倡的政策,在学术界同样存在是否应该使用禽流感疫苗的争议。但近年未随着疫苗研究技术上的进步,使人们不得不重新评价安全而高效的疫苗在控制禽流感流行中所起的作用。

由于AIV基因组极易变异,血清型众多,且各血清型间无交叉保护性,这给疫苗的研制造成了很大困难。目前禽流感疫苗的研制和应用情况如下:

1 常规疫苗

1.1 全病毒灭活疫苗(inactivated influenza virus vaccines)

由于禽流感基因组的抗原漂移,使禽流感疫苗仅提供70%的保护力。针对这种特点,禽流感灭活疫苗通常制备成针对几种不同亚型病毒的多价疫苗,已证明一种灭活疫苗可以至少包括4种不同的AIV亚型,同只含单一亚型的疫苗比,并没有减弱对同一种血凝素(HA)亚型病毒攻击的有效保护^[1],而且各亚型抗原之间不产生免疫干扰。

禽流感灭活疫苗能使免疫鸡群在感染禽流感野毒时有效地减轻损失并显著减少可能存在于鸡群和环境中的病毒数量,缩短其存活时间,是禽流感防治的主动措施、关键环节和最后防线。而且灭活疫苗具有制备工艺简单、免疫效果确实、免疫持续期长等特点。已被许多国家作为商品化的禽流感疫苗在家禽中使用。我国已研制成功所有不同亚型禽流感病毒,并证明具有良好的免疫保护作用。

作为控制和扑灭禽流感的一种手段,禽流感灭活疫苗如果在严格限制和控制的条件下使用,对预防和控制禽流感起一定的积极作用,但灭活疫苗有一些不足,如免疫效率低下,免疫剂量较大;它的使用在一定程度上增加了疫病监测中区分疫苗免疫与野毒感染的难度,而且存在着散毒的危险。

收稿日期:2004-01-12 修回日期:2004-03-02

* 现工作单位:中国科学院武汉病毒研究所

** 通讯作者, 电子信箱: jml8328@hotmail.com

其最突出的缺点是不能诱导有效的黏膜免疫 IgG 抗体的产生和细胞免疫应答, 因而无法有效地抑制呼吸道中流感病毒的复制。近年来, 人们试图从技术上突破此缺点, 使新型的灭活疫苗既能刺激机体产生体液免疫, 又能通过鼻腔摄入诱导黏膜免疫和 CTL 反应的产生。

2003 年 Takada 等对 5 周龄雌险 ddY 小鼠鼻腔注射 20 μ l 含量为 100 μ g 的用甲醛灭活的流感全病毒疫苗, 2~3 周后再免, 最后一次免疫后 1 周, 分别检测血清和鼻拭子样品, 并同时经鼻腔攻击 20 倍小鼠半数致死量的病毒。试验结果, 该疫苗既产生中和抗体, 又能刺激机体 CTL 反应, 并能抵御不同亚型流感病毒的攻击^[2]。如此种疫苗能经受进一步试验验证, 那么其应用潜力将是不可限量的。

1.2 基因工程亚单位疫苗 (subunit vaccines)

亚单位疫苗是提取禽流感具有免疫原性的蛋白, 加入佐剂而制成。这种疫苗安全性好, 能刺激机体产生足够的免疫力, 只是抗体持续时间短, 且成本高。后来随着基因工程技术的不断发展, 将免疫原性基因导入表达载体, 经诱导可获得大量表达的免疫原性蛋白, 提取所表达的特定多肽, 加入佐剂即制成基因工程亚单位疫苗, 这样可大大降低疫苗的成本。1994 年 Kodihalli 等研制了火鸡 H5N2 病毒 NP/HA 和 ISCOM 的复合亚单位疫苗, 用其免疫火鸡, 21d 可产生较高的抗体滴度, 并且 T、B 淋巴细胞被激活, 可以对同源和异源 (H6N1) 亚型病毒的攻击产生保护作用, 在攻毒后 3d, 可清除火鸡肺部和泄殖腔的病毒^[3]。

此外, Crawford 等 (1999) 利用杆状病毒表达系统生产 H5、H7 的重组 HA 佐剂疫苗, 免疫 3 周龄白色 Rock 鸡, 用同亚型致死性禽流感病毒攻击, 结果重组 HA 佐剂疫苗组所有的鸡只均不发病, 而未免疫组鸡只全部死亡。

基因工程亚单位疫苗产生的抗体不针对病毒的内部蛋白, 因此不会干扰禽流感病毒的血清学调查, 而且其不存在毒力返强、散毒和环境污染的问题, 是安全性很好的疫苗。

1.3 重组活载体疫苗 (recombinant live influenza virus vaccines)

利用对禽类致病性很弱的痘苗病毒或禽痘病毒作载体, 构建含有免疫原性基因的重组病毒。用此重组病毒作疫苗, 可在动物体内复制, 并不断地表达出免疫原性蛋白, 从而诱导禽类产生针对目标

病原的免疫保护力, 此种疫苗称为重组活载体疫苗。

Webster (1995) 和 Swayne (1997) 先后构建了含 A/Ty/ Ire/ 1378/ 83 (H5N8) HA 基因的禽痘病毒重组疫苗, 用其免疫仔鸡, 用在墨西哥分离的致死性强毒 H5N2 攻击, 试验结果证明该苗可对 H5N2 提供 90%~100% 的保护。

2003 年我国哈尔滨 Qiao CL^[4] 等构建 HA 和 NA 共表达的禽痘病毒重组疫苗, 攻毒结果显示该疫苗具有良好的免疫保护性。

活载体疫苗的本质是杂交病毒, 其既含有一种病毒复制所需的全部基因, 又含有禽流感病毒编码免疫原性蛋白质的基因片段。由于免疫原性基因在体内随载体的复制而表达, 所以同灭活苗相比, 其用量少, 又不需添加佐剂, 成本大大降低; 而且抗体持续时间长, 效果好。用其免疫家禽, 既可刺激宿主产生体液免疫, 又能刺激宿主产生细胞免疫。另外基因重组的鸡痘-H5 疫苗的有一个最大优点是不干扰血清学调查, 因此该重组疫苗适用于监测野毒感染。

2 新型疫苗

2.1 冷适应流感弱毒疫苗 (live attenuated influenza virus, LAIV)

用野毒株感染鸡胚在较低温度下 (25~30℃) 培养, 连续传代后可较快的使病毒的致病力减弱, 从而获得冷适应流感弱毒疫苗。

美国对冷适应流感弱毒疫苗的研制已有 30 多年的历史, 但由于担心其安全性, 至今仍未被批准使用。俄罗斯是目前全球惟一流感冷适应流感弱毒疫苗获准使用的国家, 该疫苗已在数亿儿童中使用, 并被证明其能提供良好的保护, 并且无不良反应。而且到目前为止, 无论俄罗斯还是全球, 没有流感病毒扩散的迹象^[5-6]。

由于弱毒疫苗的接种途径是滴鼻或喷洒入鼻腔, 因此可减少肌肉注射存在的风险和节约器械成本。而且弱毒疫苗可诱导细胞免疫和体液免疫, 其能在体内复制使其抗体维持时间长, 并能提供一定的交叉保护性, 节约成本。但弱毒疫苗也存在一些缺点, 如毒力返强, 造成新的流感毒株的出现等。因此对弱毒疫苗的大面积推广使用, 还需对其生物安全性加以时间上的验证。

2.2 基因工程活流感病毒疫苗 (genetically engineered live influenza virus vaccines)

利用基因工程技术对流感病毒基因组加以改造,产生流感病毒温度敏感型毒株。Parkin 等^[7]对 PB2 聚合酶几个特定的氨基酸突变,产生 2 个温度敏感型毒株,其只能在较低温度复制,当温度为 38℃ 时,病毒的复制停止。这样病毒就只能在上呼吸道繁殖,避免了病毒进一步进入机体内部危害宿主的可能性。

该疫苗由于是经鼻腔黏膜免疫,因此能产生体液免疫和细胞免疫,而且其与病毒自然感染过程相似,有效地将病毒阻止在上呼吸道,在第一时间将病毒杀死,避免病毒在上呼吸道繁殖时造成的不适。同时由于病毒能在接种部位繁殖,能产生持续抗体,且用量少,节约成本。

2.3 复制缺陷型流感病毒疫苗 (replication incompetent influenza virus vaccines)

Watanabe 等^[8]利用反向遗传学从 cDNA 获得 NS2 蛋白缺失的病毒粒子,其感染细胞时,能在细胞内表达病毒蛋白但不能形成有感染力的病毒粒子。用此方法制成的疫苗能保护离最后一次免疫 3 个月后的老鼠接受 10 或 100LD₅₀ 的攻击(9 只老鼠存活 8 只)。此疫苗不仅能产生保护性抗体,而且能诱导很强的细胞免疫,是另一很有发展前途的活疫苗。其它获得复制缺陷型流感病毒疫苗的途径是使 M2 基因缺失^[9]。此缺失疫苗在组织培养物中生长良好,但在老鼠体内有限生长,因此是一潜在的活疫苗候选。

2.4 DNA 疫苗 (DNA vaccines)

流感病毒是最早用于基因免疫研究的模型。1993 年 Ulmer 等^[10]首先报道了基因免疫用于流感病毒的结果,他们将 A/PR/8/34(H1N1) 流感株 NP 基因插入表达质粒,注射入老鼠体内,不仅产生抗 NP 的特异性 IgG 抗体,而且诱导 CTL 反应。攻毒结果免疫组小鼠能抵抗同型流感病毒株的攻击。用基因枪免疫小鼠,可以使其产生长期的 B 细胞应答反应,在免疫 1 年后仍可在骨髓和脾脏中检测到 HA 蛋白特异的 B 细胞存在^[11]。

2000 年 Pertmer 还发现,流感病毒的 NP 基因的核酸疫苗激活机体免疫反应不受母源抗体的干扰。同样,在有母源抗体存在的情况下,HA 和 NP 基因均能有效激活细胞免疫应答反应^[12]。

我国研制的 H7 亚型血凝素基因 DNA 疫苗,在

极小的使用剂量下即可成功诱导免疫保护反应,并有效阻断同源低致病力禽流感病毒在机体内的感染和排毒(陈化兰等,1997,1998)。

由此可见,DNA 疫苗与传统疫苗相比有许多优点:能长时间表达抗原;可避免母源抗体的干扰;可在质粒载体上根据要求设计或排除特定物质的干扰而构建复合疫苗(如下面提到的表位疫苗);易于构建,易冻干,成本低,具高温稳定性,且不带生物及化学活性污染物,可广泛应用。

2.5 RNA 复制子疫苗 (RNA replicon vaccines)

随着 DNA 疫苗的深入研究,人们担心 DNA 会整合到宿主细胞基因组上,造成致癌隐患。此外,DNA 通过核膜较为困难,限制了其作用的发挥。这在一定程度上阻碍了 DNA 疫苗的推广应用。于是,人们又设想用 RNA 替代 DNA 作基因疫苗,近年来开发的 RNA 复制子载体应运而生。该 RNA 复制子可以不依赖于宿主细胞而自主复制,包含病毒基因组 5' 和 3' 末端的顺式作用元件、全部非结构蛋白基因编码区(包括复制酶编码基因),而结构蛋白基因被缺失,由外源基因取代,这种重组病毒粒子可以很容易地携带达 3kb 的外源 RNA,并且感染的细胞谱较广,包括非分裂细胞^[13]。

2001 年 Vignuzzi^[14] 等将 A 型流感病毒 A/PR/8/34(ma) 株的 NP 基因插入塞姆利基森林病毒(SFV)载体上构建 RNA 疫苗,7~8 周龄的 C57BL/6 老鼠肌肉注射 10μgSFV RNA,3~4 周后再加强一次,共免疫 3 次。第 3 次免疫后 1~3 周,由鼻腔攻入 100pfu 的 A/PR/8/34(ma) 病毒。试验结果不仅有较高的中和抗体出现,而且诱导了有效的 CTL 反应。试验小鼠能有效清除肺部的病毒。

大量的研究证实 DNA/RNA 复制子比常规 DNA 疫苗的免疫原性好^[15],可以产生更强的抗体应答和更多的 CTL 前体,而且使用比常规 DNA 疫苗免疫剂量低 100 倍的复制子疫苗就可以产生与常规 DNA 疫苗相当的免疫效力。

可见, RNA 复制子载体的特点包括:复制效率高,用量远远低于常规 DNA 疫苗;可同时诱导抗体应答和 CTL 应答;安全性好, RNA 复制子在胞浆内复制,避免了核的参与,不存在整合进宿主基因组的可能性; RNA 复制子导致转染细胞的溶解,避免了有自主复制能力的病毒的产生;复制子系统能自主复制,可针对多种病原进行连续免疫,而不受已有载体病毒抗体的干扰。

2.6 表位疫苗(epitope vaccines)

表位(epitope)指免疫细胞能识别的抗原大分子上的一个特定部位, 又称抗原决定簇(antigen determinant)。表位代表了抗原分子上的一个免疫活性区, 负责与抗体分子或免疫细胞表面的抗原受体结合。因此人们设想根据病毒的抗原表位来研制表位疫苗, 尤其是为易变异的病毒疫苗的研制提供了方向。

Levi 等^[16]将流感病毒的三个表位: B 细胞表位 HA91-108、CTL 表位 NP147-158、Th 细胞表位 NP55-69 分别插入载体基因 flagellin(沙门氏菌的鞭毛蛋白基因)中构建了三个真核表达质粒, 鼻腔免疫小鼠。三种质粒混合免疫的组可以诱导长期的免疫应答, 并且可以完全抵抗病毒的致死性攻击。

1998 年 Thomson 等^[17]以一个真核表达质粒投递了 10 个 CTL 抗原表位, 其中包括 NP 基因的三个表位: NP50-58、NP147-155、NP366-374 和 NS1 基因的一个表位 NS1 152-160, 免疫鼠后通过 Cr⁵¹ 释放试验, 检测这些表位显示该质粒诱导了强的 CTL 应答, 并且可以清除感染的病毒。

表位疫苗不仅提供了一种更有效地利用病原体中各个抗原成分的方法, 而且对于流感病毒这种高度变异的病毒来说, 一方面可以通过选择具有交叉保护性的表位来达到预防多个毒株的目的, 另一方面可以通过对流行毒株的监测来及时合成表位, 实现对变异毒株的控制。

3 具有交叉保护性的通用疫苗

禽流感病毒抗原型的不断改变, 使得需经常变更疫苗的成分, 才不致于使注射了疫苗的鸡只免疫失败, 因此寻求一种能提供交叉保护性的通用疫苗引起了很多研究者的注意。

A 型流感病毒蛋白中较为保守的蛋白为 NP 和 M, 是诱导具交叉保护性 CTL 反应的特定多肽, 因此从理论上讲, 研究交叉保护性疫苗有两条途径。

Neirynck 等^[18]尝试将保守 M2 蛋白的膜外区域(M2e)融合到 B 型肝炎病毒的核心蛋白上, 在大肠杆菌中表达的蛋白来构建一种通用疫苗。他们发现腹腔内或肌肉注射纯化的 M2HBc 蛋白到小鼠体内能提供 90%~100% 的保护。其产生的中和抗体具广谱性, 对抗 A 型流感病毒感染的持续时间长等特点。但是否如此一小的表面抗原能对机体对流感病毒的感染提供足够的保护还有待进一步和

更大规模的验证。

Mozdzanowska 等^[19]将 23 个氨基酸的 M2e 与 Th 表位藕连构建多表位疫苗, 鼻黏膜免疫小鼠, 4~5 周加强一次。用异源病毒攻毒, 试验结果显示, 疫苗组能有效防止病毒在整个呼吸道的增殖。显示了将两种保护活性因素结合的有效潜力。

Takada 等^[2]用甲醛灭活的流感全病毒疫苗经鼻腔免疫小鼠, 能抵御 8 种不同亚型流感病毒的攻击, 表现出免疫效力的广谱性; 研究结果还显示交叉保护是由于 NP 基因刺激产生的 CTL 反应所引起的。

4 小结

禽流感病毒在公共卫生学上的意义, 使得对禽流感的研究和控制已刻不容缓。必须用科学的方法来控制禽流感的流行, 因此新的、更有效的疫苗研究势在必行。“高科技”的禽流感疫苗必须集防病、防病毒隐藏、防病毒扩散于一身。理想的禽流感疫苗必须同时具备诱导产生中和抗体和 CTL 反应。随着科技的进步和人们对生命的认识不断加深, 有理由相信一种能改变流感病毒防治状况的新型疫苗的出现指日可待。

参考文献

- [1] Robinson Andrew, Farrar Graham H, Wilbin Christopher N. Vaccine Protocols, To To Wa, New Jersey, Humana Press, 1996. 17~33
- [2] Takada A, Matsushita A, Ninomiya A, et al. Intranasal immunization with formalin inactivated virus vaccine induces a broad spectrum of heterosubtypic immunity against influenza A virus infection in mice. Vaccine, 2003, 21: 3212~3218
- [3] Kodihalli S, Sivanandan V, Nagaraja KV, et al. A type specific avian influenza virus subunit vaccine for turkeys: induction of protective immunity to challenge infection. Vaccine, 1994, 15: 1467~1472
- [4] Qiao CL, Yu KZ, Jiang YP, et al. Protection of chickens against highly lethal H5N1 and H7N1 avian influenza viruses with a recombinant fowlpox virus co-expressing H5 haemagglutinin and N1 neuraminidase genes. Avian Pathol, 2003, 32(1): 25~32
- [5] Wearing M, Tannock G. Live attenuated vaccines against influenza: an historical review. Vaccine, 2001, 19: 3320~3330
- [6] Maassab H, Heilman C, Herlocher M. Cold adapted influenza viruses for use as live vaccines for man. Adv Biotechnol Processes, 1990, 14: 203~242
- [7] Parkin N, Chiu P, Coelingh K. Genetically engineered live attenuated influenza A virus vaccine candidates. J Virol, 1997, 71: 2772~2778
- [8] Watanabe T, Watanabe S, Neumann G, et al. Immunogenicity and

- protective efficacy of replication incompetent influenza virus like particles. *J Virol*, 2002, 76: 767~ 773
- [9] Watanabe T, Watanabe S, Ito H, et al. Influenza A virus can undergo multiple cycles of replication without M2 ion channel activity. *J Virol*, 2001, 75: 5656~ 5662
- [10] Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*, 1993, 259: 1745~ 1749
- [11] Justewicz DM, Webster RG. Long-term maintenance of B cell immunity of influenza virus hemagglutinin in mice following DNA based immunization. *Virology*, 1996, 224: 10~ 17
- [12] Pertmer TM, Oran AE, Moser JM, et al. DNA vaccines for influenza virus: differential effects of maternal antibody on immune responses to hemagglutinin and nucleoprotein. *J Virol*, 2000, 74: 7787~ 7793
- [13] Schlesinger S, Dubensky T W. Alphavirus vectors for gene expression and vaccines. *Curr Opin Biotechnol*, 1999, 10: 434~ 439
- [14] Vignuzzi M, Gerbaud S, Weif Sylvie van der, et al. Naked RNA immunization with replicons derived from poliovirus and Semliki Forest virus genomes for the generation of a cytotoxic T cell response against the influenza A virus nucleoprotein. *Journal of General Virology*, 2001, 82: 1737~ 1747
- [15] Dubensky T W, Liu M H, Ulmer J B. Delivery systems for gene based vaccines. *Molecular Medicine*, 2000, 6: 723~ 732
- [16] Levi R, Arnon R. Synthetic recombinant influenza vaccine induces efficient long-term immunity and cross-strain protection. *Vaccine*, 1996, 14: 85~ 92
- [17] Thomson S A, Sherritt M A, Medveczky J, et al. Delivery of multiple CD8 cytotoxic T cell epitopes by DNA vaccination. *J Immunol*, 1998, 160: 1717~ 1723
- [18] Neirynck S, Derro T, Saelens X, et al. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat Med*, 1999, 5: 1157~ 1163
- [19] Mozdzanowska Krystyna, Feng JinQi, Eid Mark, et al. Induction of influenza type A virus specific resistance by immunization of mice with a synthetic multiple antigenic peptide vaccine that contains ectodomains of matrix protein 2. *Vaccine*, 2003, 21: 2616~ 2626

Research Progress on Avian Influenza Vaccine

CHEN Quar jian JUN Mei lin CHEN Huar chun

(Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Chian)

Abstract Avian influenza is caused by Avian influenza virus, Which is a member of family orthomyxoviridae, subfamily influenza virus and is the agent of acute infectious disease in all kinds of poultry and wild birds. Due to the importance role in economic and common healthy, The precaution and controlling of avian influenza become urgently necessary. The application of vaccine is the valid method of controlling avian influenza. Here we review recent advances in AIV vaccine. Currently, The inactivated influenza virus vaccines is the main vaccine in preventing AIV. Responsible for it's shortage, The inactivated influenza virus vaccines will be challenged by other novel vaccines. The novel vaccines are not only being used to control the homogeneous AIV, but also to provide a universal protect against all types of AIV.

Key words Avian influenza vaccine Novel vaccine Universal vaccine

广告索引

鼎星生物工程设备有限公司(封面), 大龙医疗设备(上海)有限公司(封2), 北京东胜创新生物科技有限公司(彩1), 杭州维特洁生化技术有限公司(彩2), 镇江达森发酵设备公司(彩3), 北京维通利华实验动物技术公司(彩4), 美国贝克曼库尔特有限公司(彩5), 上海保兴生物设备工程有限公司(彩6), 无锡星海王生化工程公司(彩7), 天津纺织工学院膜天膜技术工程公司(彩8), Promega 公司(前1), 潍坊康华生物技术公司(前2), 南京宁和生化设备公司(前3), 镇江市丰泽生物工程设备制造厂(前4), 常州市诚合卫生设备厂(前5), 重庆永生实验仪器厂(前6), 鼎兴生物工程设备有限公司(前7), 北京博励行仪器有限公司(彩9), 迈思通(北京)管路系统公司(彩10), 江苏绿环生化工程成套装备公司(彩11), 镇江东方公司(彩12), 扬中威柯特生物工程设备有限公司(前8), 宝生物工程(大连)有限公司(中彩1), 安玛西亚公司(中彩2), 上海高机生物工程有限公司(中彩3、4), 上海申东传感器厂(73), 广州微生物研究所(后彩1), 仪器信息网(后彩2), 安玛西亚公司(封3), 英杰生命技术公司(封底)