

表达 H5 亚型禽流感病毒 HA 基因的 DNA 疫苗免疫保护效力研究

姜永萍, 于康震, 邓国华, 田国斌, 乔传玲, 陈化兰

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所农业部动物流感重点开放实验室 / 兽医生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150001)

摘要: 表达高致病力禽流感病毒分离株 A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) [GD/1/96 (H5N1)] HA 基因的 DNA 疫苗质粒 pCIHA5 具有良好的免疫保护性, 为了将其开发并应用于实际, 对其免疫保护效力进行了进一步的研究。结果表明, 用 10、40、70、100 和 150 μg pCIHA5 和油苗 1 次免疫后, 其免疫保护率分别为 12.5% (1/8)、58.3% (7/12)、72.7% (8/11)、50.0% (6/12)、66.7% (8/12) 和 100% (12/12), 其中 70 和 100 μg 剂量组的病毒分离结果为 1/8 和 2/6; 用剂量为 5、20、35 和 50 μg pCIHA5 分别免疫 2 次, 免疫保护率分别为 45.5% (5/11)、58.3% (7/12)、58.3% (7/12) 和 91.7% (11/12), 5 μg 的病毒分离结果为 1/5, 其余组未分离出病毒; pCIHA5 免疫后 AGP 抗体均未检出, 油苗免疫后其 HI 抗体虽高, 但 AGP 抗体也呈阳性。结果显示, 加强免疫应为 DNA 疫苗质粒 pCIHA5 的安全免疫方式, DNA 疫苗质粒 pCIHA5 虽具有较为稳定的免疫原性和免疫保护性, 但有必要进一步提高其在肌肉组织中的有效表达水平和抗体反应水平。

关键词: 禽流感病毒; 血凝素基因; DNA 疫苗; 免疫保护效力

Protection Efficacy of DNA Vaccine Encoding Hemagglutinin of H5 Subtype Avian Influenza Virus

JIANG Yong-ping, YU Kang-zhen, DENG Guo-hua, TIAN Guo-bin, QIAO Chuan-ling, CHEN Hua-lan

(Animal Influenza Laboratory of the Ministry Agriculture and National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001)

Abstract: The DNA vaccine pCIHA5 encoding hemagglutinin can protect SPF chicken against lethal H5N1 avian influenza virus challenge. The more characters about its protection efficacy were studied. The protective rates in 10, 40, 70, 100 and 150 μg groups which immunized pCIHA5 were 12.5% (1/8), 58.3% (7/12), 72.7% (8/11), 50.0% (6/12) and 66.7% (8/12), respectively. The protective rates in 5, 20, 35 and 50 μg groups were 45.5% (5/11), 58.3% (7/12), 58.3% (7/12) and 91.7% (11/12), respectively. The 70, 100 and 5 μg groups have virus shedding with 1/8, 2/6 and 1/5. Though the inactivated oil-emulsion vaccine has high HI antibody titers and 100% protective rate, the AGP antibody could be detected after vaccination. Results show that the pCIHA5 is fit to boost by intramuscular injection. This would be useful to the study on gene engineering vaccine of avian influenza virus.

Key words: Avian influenza virus; Hemagglutinin; DNA vaccine; Protection efficacy

1997 年香港流感事件中有 18 人感染了 H5 亚型禽流感病毒 (AIV) A/Hongkong/156/97 (H5N1) (HK156), 有 6 人因此死亡^[1,2], H5 亚型禽流感病毒可直接感染人。继 H5N1 感染人以后, 1999 年 2 月, 郭元吉等于香港首次分离出 2 株感染人的 H9N2 禽流感病毒^[3], 这一事件的发生, 无疑又增加了禽流感病毒可直接感染人并致病的佐证。自此, 禽流感

病毒已具有全新的公共卫生意义。在中国大陆的一些地区也相继分离到了不同亚型的 AIV, 对养禽业造成了很大的经济损失^[4,5]。虽然我国已开展了针对主要流行亚型的油乳剂灭活疫苗的研究, 并已取得了良好的区域试验效果, 但由于无法区分疫苗免疫和自然感染抗体, 而可能给我国禽流感的流行病学调查和疫病监测带来一定干扰。在此前提下, 开展禽

收稿日期: 2003-01-10

作者简介: 姜永萍 (1972-), 女, 甘肃会宁人, 博士, 主要从事禽流感基因工程疫苗及禽流感病毒分子生物学研究。陈化兰为通讯作者, Tel/Fax: 0451-82761925; E-mail: hlchen@hvri.ac.cn

流感基因工程疫苗的研究,为禽流感的防制提供新型的免疫预防途径是一种必然。许多研究表明^[6~14],表达AIV HA基因的DNA疫苗质粒可产生有效的免疫保护反应。陈化兰等^[9]报道,表达H5N1亚型高致病性禽流感病毒HA基因的DNA疫苗pCIHA5不但可诱导产生较高的抗体反应,而且可抵御同源强毒的致死性攻击,为了将其开发并应用于实际,为我国AIV的防制提供技术储备,笔者对其免疫保护效力进行了进一步的研究,结果如下。

1 材料与方 法

1.1 菌种及质粒

E. coli JM109购自大连宝生物公司,由哈尔滨兽医研究所农业部动物流感重点开放实验室保存。质粒pCIHA5由该实验室克隆构建。

1.2 SPF雏鸡和SPF鸡胚

9~11日龄SPF鸡胚由哈尔滨兽医研究所SPF试验动物中心提供;白色来杭近交系SPF雏鸡由哈尔滨兽医研究所SPF试验动物中心提供,试验时饲养于哈尔滨兽医研究所实验动物中心禽病感染实验室的负压隔离器内。

1.3 毒株及H5亚型油苗

HPAIV分离株A/Goose/Guangdong/1/96(H5N1)[GD/1/96(H5N1)]及H5亚型油苗由哈尔滨兽医研究所农业部动物流感重点开放实验室保存。

1.4 质粒pCIHA5的大量制备

在JM 109中扩增pCIHA5,碱裂解法提取,聚乙二醇纯化质粒DNA(参照《分子克隆实验指南》)紫外分光光度计定量后溶于磷酸盐缓冲液(PBS)(pH7.2)中冻存备用。

1.5 pCIHA5免疫保护效力研究

1.5.1 pCIHA5不同剂量单次免疫的保护效力研究

试验分为7组,其中1~5组以pCIHA5免疫1次,pCIHA5以200 μ l体积腿肌2点注射;其免疫剂量分别为10(8只)、40(12只)、70(11只)、100(12只)和150 μ g(12只),第6组(12只)为油苗免疫组,其免疫剂量为每羽0.3 ml,第7组(22只)为非免疫对照组,仅注射200 μ l PBS溶液;4周龄SPF鸡免疫后3周用HPAIV GD/1/96(H5N1)的10倍半数致死剂量(10 LD₅₀)以肌肉注射途径攻毒(每只0.2 ml);各组在免疫后每周及攻毒后2周均经翅静脉采血并分离血清检测HI抗体和AGP抗体;在攻毒后1周采集泄殖腔棉拭子,样品经无菌处理后

接种SPF鸡胚尿囊腔分离病毒,微量血凝法检测病毒。

1.5.2 pCIHA5不同剂量加强免疫的保护效力研究

试验设为5组,其中I~IV组以pCIHA5免疫2次,注射体积为200 μ l,其免疫剂量分别为5(11只)、20(12只)、35(12只)和50 μ g(12只),V组(17只)为非免疫对照组,仅注射200 μ l PBS溶液。4周龄SPF鸡首免后3周以同样剂量和体积加强免疫,2次免疫后2周以HPAIV GD/1/96(H5N1)的50 LD₅₀肌肉注射攻毒(每只0.2 ml)。各组在免疫后每周及攻毒后每周均经翅静脉采血并分离血清检测HI抗体和AGP抗体;在攻毒后1周采集泄殖腔棉拭子,样品经无菌处理后接种SPF鸡胚尿囊腔分离病毒。

2 结果与分析

2.1 pCIHA5不同剂量单次免疫的保护效力研究

对照组在攻毒后2~8 d全部死亡。10、40、70、100和150 μ g pCIHA5免疫组及油苗免疫组的免疫保护率分别为12.5%(1/8)、58.3%(7/12)、72.7%(8/11)、50.0%(6/12)、66.7%(8/12)和100.0%(12/12)(表1、图1)。10 μ g免疫组在免疫后3周才有可检测的HI抗体水平,40、70、100和150 μ g pCIHA5免疫组在免疫后HI抗体水平无明显差别,油苗免疫组在免疫后HI抗体水平明显高于其它组。其中70 μ g免疫组分毒结果为1/8,100 μ g免疫组分毒结果为2/6。pCIHA5免疫组在免疫后未检出AGP抗体,而油苗组在免疫后2周可检测出AGP抗体。

2.2 pCIHA5不同剂量加强免疫的保护效力研究

对照组在攻毒后2~6 d全部死亡,5 μ g免疫组的保护率可达45.5%(5/11),20和35 μ g免疫组的免疫保护率均为58.3%(7/12),50 μ g免疫组的保护率可高达91.7%(11/12)。5 μ g免疫组的病毒分离结果为1/5,20和35 μ g免疫组的HI抗体水平在免疫后有不同程度的升高,攻毒后有明显升高;首免2周后50 μ g免疫组的HI抗体平均水平明显高于其它组,且在攻毒后其抗体水平变化不大;pCIHA5以不同剂量免疫2次后其AGP抗体均为阴性(表2、图2)。

3 讨论

在DNA免疫中抗原表达水平是免疫成败的决定因素^[15,16],AIV感染的防治也依赖于针对AIV HA

表1 pCIHA5 不同剂量单次免疫保护效力研究

Table 1 The protection efficacy of different doses immunized with pCIHA5

组别 Groups	AGP 抗体 The AGP antibody titers	HI 抗体阳性率 ¹⁾ (阳性数/总数) The positive rate of HI antibody (positive/total)					保护率(存活/总数) The protection rate (survival/total)	病毒分离(阳性/存活) The virus shedding (positive/survival)
		1周	2周	3周	4周	5周		
		1 weeks	2 weeks	3 weeks	4 weeks	5 weeks		
10 μg 免疫 10 μg immunized	-	0/8	0/8	1/8	3/8 ²⁾	1/8	1/8 (12.5%)	0/1
40 μg 免疫 40 μg immunized	-	0/12	6/12	7/12	7/12	7/12	7/12 (58.3%)	0/7
70 μg 免疫 70 μg immunized	-	0/11	3/11	5/11	8/11	8/11	8/11 (72.7%)	1/8
100 μg 免疫 100 μg immunized	-	0/12	6/12	6/12	6/12	6/12	6/12 (50.0%)	2/6
150 μg 免疫 150 μg immunized	-	0/12	7/12	7/12	8/12	8/12	8/12 (66.7%)	0/8
油苗免疫 Oil-emulsion vaccine	+	0/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12(100.0%)	0/12
非免疫对照 Unvaccinated control	-	0/22	0/22	0/22	-	-	0/22(0.0%)	* ³⁾

¹⁾ 1、2、3、4、5周分别为免疫后1、2、3周和攻毒后1、2周; ²⁾ 有2只攻毒后抗体阳转, 但于攻毒后8 d死亡; ³⁾ 攻毒后2~8 d全死

¹⁾ 1, 2, 3, 4, 5 weeks mean after 1, 2, 3 weeks of vaccine and after 1, 2 weeks of challenge; ²⁾ The Antibody of two chickens was positive after challenge, but they died 8 days after challenge; ³⁾ The chickens died 2-8 days after challenge

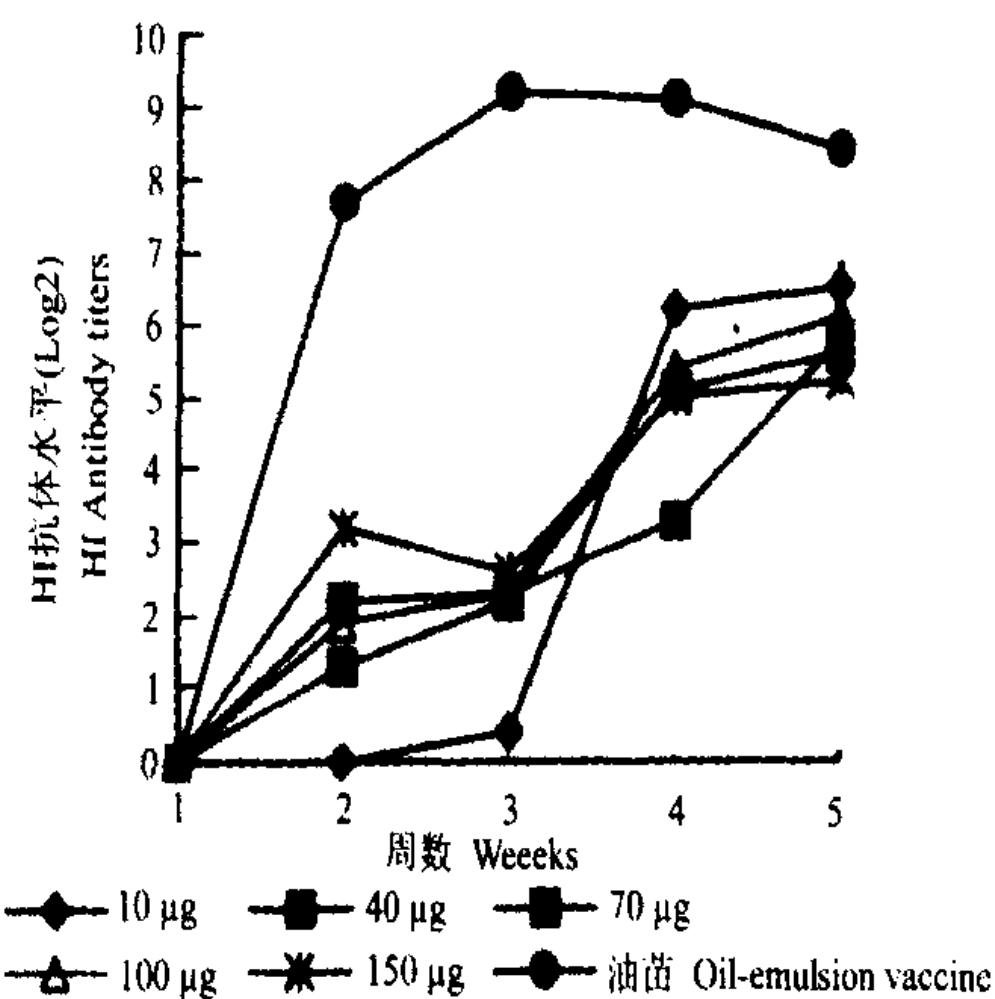


图1 pCIHA5 不同剂量单次免疫的HI 抗体平均水平

Fig.1 The HI antibody titers of different doses immunized with pCIHA5

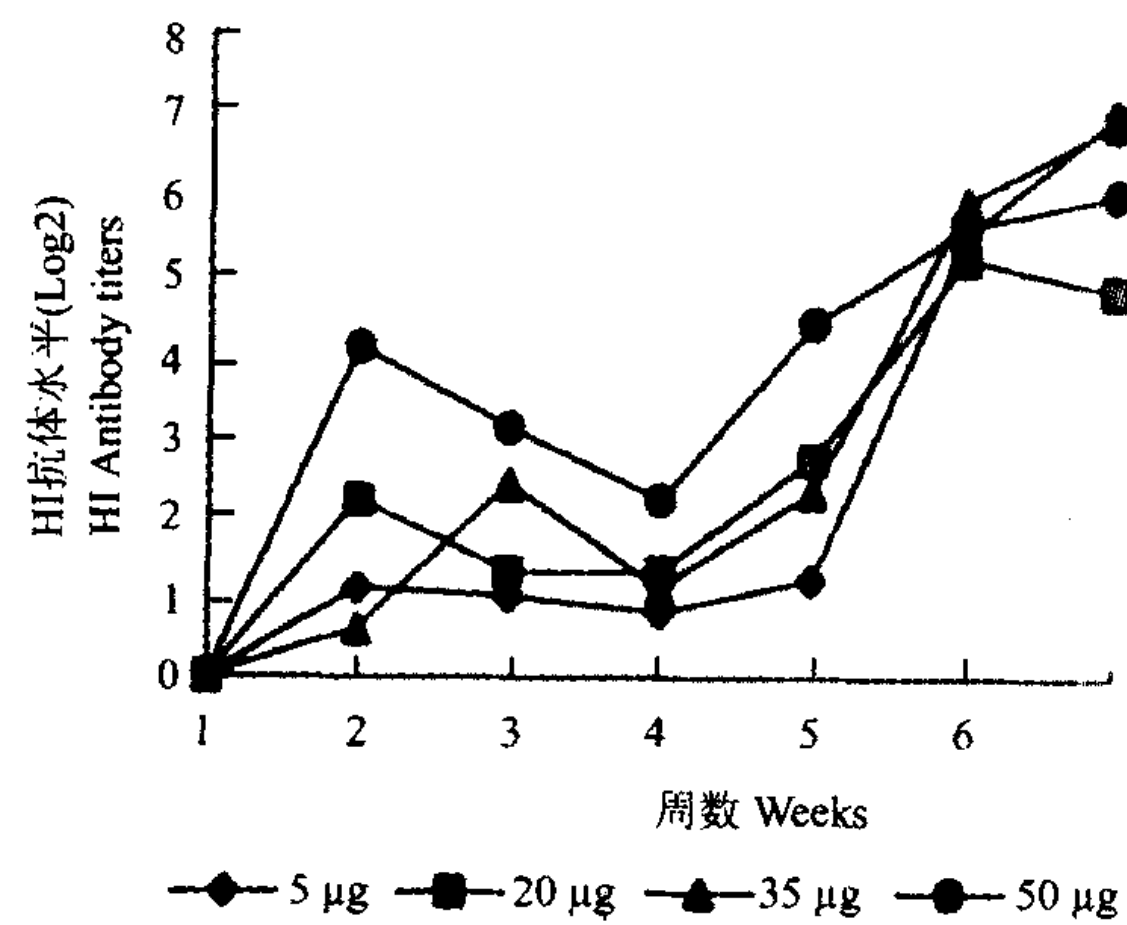


图2 pCIHA5 不同剂量加强免疫的HI 抗体平均水平

Fig.2 The HI antibody titers of different doses boosted with pCIHA5

表2 pCIHA5 不同剂量加强免疫的保护效力研究

Table 2 The protection efficacy of different doses boosted with pCIHA5

组别 Groups	AGP 抗体 The AGP antibody titers	HI 抗体阳性率 ¹⁾ (阳性数/总数) The positive rate of HI antibody(positive/total)							保护率(存活/总数) The protection rate (survival/total)	病毒分离(阳性/存活) The virus shedding (positive/survival)
		1周 ¹⁾	2周	3周	4周	5周	6周	7周		
		1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks	5 weeks	6 weeks	7 weeks		
5 μg 加强免疫 5 μg boosted	-	0/11	3/11	3/11	2/11	3/11	4/11	5/11	5/11(45.5%)	1/5
20 μg 加强免疫 20 μg boosted	-	0/12	5/12	4/12	4/12	7/12	7/12	7/12	7/12(58.3%)	0/7
35 μg 加强免疫 35 μg boosted	-	0/12	2/12	6/12	7/12	7/12	7/12	7/12	7/12(58.3%)	0/7
50 μg 加强免疫 50 μg boosted	-	0/12	10/12	10/12	8/12	10/12	11/12	11/12	11/12(91.7%)	0/11
非免疫对照 Unvaccinated control	-	0/17	0/17	0/17	0/17	0/17	-	-	0/17(0.0%)	* ²⁾

¹⁾ 1、2、3周分别为首免后1、2、3周, 4、5周为加强免疫后1、2周, 6、7周为攻毒后1、2周; ²⁾ 攻毒后2~6 d全死

¹⁾ 1, 2, 3 weeks mean after 1, 2 and 3 weeks of vaccine, respectively. 4 and 5 weeks mean after 1 and 2 weeks of boost, respectively. 6, 7 weeks mean after 1, 2 weeks of challenge, respectively. ²⁾ The chickens were all died 2-6 days after challenge

基因抗体的产生。许多表达 HA 基因的 DNA 质粒免疫鸡体后在攻毒前不能诱导产生可检测的 HI 抗体^[8,14]。Suarez 和 Schultz-Cherry^[15]曾报道用 50 或 100 μg 含有 H5 亚型 HA 的质粒免疫时, 有 50% 的鸡可以检测到抗体, 有 60% 的免疫鸡可以抵抗致死病毒的攻击。有报道表明 DNA 疫苗以肌肉注射途经免疫时, 至少在鸡体, 可以产生不同的免疫反应, 陈化兰等^[9]研究表明表达 H5 亚型 HA 基因的 DNA 疫苗质粒 pCIHA5, 以 50 和 100 μg 肌肉注射免疫时, 不仅可以诱导免疫鸡产生高水平的 HI 抗体, 而且可以完全抵抗同源强毒的攻击。

本研究进一步的试验表明, DNA 质粒 pCIHA5 以每次 10 μg 肌肉注射免疫后也可保护 12.5% (1/8) 的试验鸡免于死亡, 而当 1 次免疫的剂量加大至 150 μg pCIHA5 时, 其保护率仅为 66.7% (8/12), 由此可见, pCIHA5 质粒 1 次免疫的效果欠佳, 要达到坚实的免疫保护必须进行加强免疫。而 5 μg pCIHA5 2 次免疫 (累积 10 μg) 后即可得到 45.5% (5/11) 的保护率, 50 μg pCIHA5 的保护率可高达 91.7% (11/12)。在试验中, 即使 pCIHA5 2 次免疫试验组的攻毒剂量高于 1 次免疫试验组, 但比较 2 次试验中免疫总量相同的组时, 2 次免疫的效果要优于 1 次免疫, 说明 DNA 疫苗免疫后, 抗原表达水平必须达到一定剂量时才能诱导产生一定水平的抗体反应和完全有效的免疫保护, 这与前人的研究结果相一致^[12,13]。因此, 为了有效抵抗病毒攻击, 加强免疫应为 DNA 疫苗的安全免疫方式。

在 5 μg 加强免疫组、70 和 100 μg pCIHA5 免疫 1 次组的免疫耐过鸡中均有个别鸡病毒分离结果为阳性, 进一步分析表明, 这些病毒分离阳性鸡在免疫后未检测到 HI 抗体, 而在攻毒后其 HI 抗体水平明显上升很高; 在 10 μg pCIHA5 免疫 1 次组中, 有 2 只试验鸡在攻毒后抗体明显阳转并且未能抵抗病毒繁殖, 只是减慢了病毒繁殖速度; 有些免疫鸡虽在免疫后未能检测到抗体, 但仍能抵抗病毒攻击; 而在不同剂量的免疫组中, 凡是在免疫后能诱导并产生较高 HI 抗体反应的试验鸡均能完全抵抗强毒的攻击, 这些结果提示, 当 DNA 疫苗质粒在肌细胞中的表达量不足以诱导一定程度的体液免疫及细胞免疫时, 只可保护试验鸡免于死亡, 而不能保护其对强毒攻击后的感染。在 20 μg pCIHA5 首免后和 50 μg pCIHA5 加强免疫后均发现有个别完全免疫鸡的抗体水平出现降低现象, 这可能与血清分离及未能诱导稳定的抗体反应有关。

总之, 表达 H5 亚型 HA 基因的 DNA 疫苗质粒 pCIHA5 虽具有较为稳定的免疫原性和免疫保护性, 但其免疫后 HI 抗体产生水平明显低于油苗, 而且其免疫后抗体反应水平有一定的个体差异, 因此, 进一步提高 DNA 疫苗在肌肉组织中的有效表达水平和抗体反应水平, 是今后研究的方向。

References

- [1] Subbarao K, Klimov A, Katz J, Regnery H, Lim W, Hall H, Perdue M, Swaine D, Bender C, Huang J, Hemphill M, Rowe T, Shaw M, Xu X, Fukuda K, Cox N. Characterization of an avian influenza A(H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science*, 1998, 279: 393-396.
- [2] Xu X, Subbarao K, Cox N J, Guo Y. Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) virus: Similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong. *Virology*, 1999, 261(1):15-19.
- [3] 郭元吉, 李建国, 程小雯, 王敏, 邹毅, 李钊华, 蔡访瀑, 廖华乐, 张焯, 郭俊峰, 黄瑞敏, 贝东. 禽 H9N2 亚型流感病毒能感染人的发现. 中国实验和临床病毒学杂志, 1999, 13 (2): 105-108. Guo Y J, Li J G, Cheng X W, Wang M, Zou Y, Li C H, Cai F C, Liao H L, Zhang Y, Guo J F, Huang R M, Bei D. Discovery of men infected by avian influenza A(H9N2) virus. *Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology*, 1999, 13 (2):105-108. (in Chinese)
- [4] 唐秀英, 田国斌, 赵传删, 周金发, 于康震. 中国禽流感流行株的分离鉴定. 中国畜禽传染病, 1998, 20 (1): 1-5. Tang X Y, Tian G B, Zhao C S, Zhou J F, Yu K Z. Isolation and characterization of prevalent strains of avian influenza viruses in China. *Chinese Journal Animal Poultry Infection Disease*, 1998, 20 (1):1-5. (in Chinese)
- [5] 陈化兰, 于康震, 步志高. 一株鹅源高致病力禽流感病毒分离株血凝素基因的分析. 中国农业科学, 1999, 32 (2): 87-92. Chen H L, Yu K Z, Bu Z G. Molecular analysis of hemagglutinin gene of a goose origin highly pathogenic avian influenza virus. *Scientia Agricultura Sinica*, 1999, 32 (2): 87-92. (in Chinese)
- [6] Ulmer J B, Deck R R, DeWitt C M, Friedman A, Donnelly J J, Liu M A. Protective immunity by intramuscular injection of low doses of influenza virus DNA vaccine. *Vaccine*, 1994; (12):1 541-1 544.
- [7] Webster R G, Fynan E F, Santoro J C, Robinson H. Protection of ferrets against influenza challenge with a DNA vaccine to the haemagglutinin. *Vaccine*, 1994, (12):1 495-1 499.
- [8] Kodihalli S, Goto H, Kobasa D L, Krauss S, Kawaoka Y, Webster R G. DNA vaccine encoding hemagglutinin provides protective immunity against H5N1 influenza virus infection in mice. *Journal of Virology*, 1999, 73(3):2 094-2 098.
- [9] Chen H, Yu K, Jiang Y, Tang X. DNA immunization elicits high HI antibody and protects chicken from AIV challenge. *Immuntional Congress Series*, 2001, 917-921.
- [10] Robinson H L, Hunt L A, Webster R G. Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA. *Vaccine*, 1993, 11(9): 957-960.
- [11] Donnelly J J, Friedman A, Ulmer J B, Liu M A. Further

- protection against antigenic drift of influenza virus in a ferret model by DNA vaccination. *Vaccine*, 1997, 15 (8): 865-868.
- [12] Kodihalli S, Kobasa D L, Webster R G. Strategies for inducing protection against avian influenza A virus subtypes with DNA vaccines. *Vaccine*, 2000, 18(23): 2 592-2 599.
- [13] Fynan E F, Webster R G, Fuller D H, Haynes J R, Santoro J C, Robinson H L. DNA vaccines: Protective immunizations by parenteral, mucosal and gene-gun inoculations. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 1993, 90: 11 478-11 482.
- [14] 陈化兰, 于康震, 田国斌, 唐秀英, 卢景良. DNA 免疫诱导鸡对禽流感病毒的免疫保护反应. *中国农业科学*, 1998, 31 (5): 63-68.
- Chen H L, Yu K Z, Tian G B, Tang X Y, Lu J L. Protective immune response to avian influenza virus in chicken induced by DNA inoculation. *Scientia Agricultura Sinica*, 1998, 31 (5): 63-68. (in Chinese)
- [15] Suarez D L, Schultz-Cherry S. The effect of eukaryotic expression vectors and adjuvant on DNA vaccines in chickens using as avian influenza model. *Avian Disease*, 2000, 44: 861-868.
- [16] Galvin T A, Jacqueline M, Khan A S. Effect of different promoters on immune responses elicited by HIV-1 gag/env multigenic DNA vaccine in *Macaca mulatta* and *Macaca nemestrina*. *Vaccine*, 2000, 18: 2 566-2 583.

(责任编辑 林鉴非)

欢迎订阅 2005 年《西北农业学报》

《西北农业学报》是由教育部主管, 西北农林科技大学、甘肃、宁夏、青海、新疆农(林)业科学院和新疆、青海畜牧(兽医)科学院及新疆农垦科学院等八院校联合主办的综合性农林牧业学术期刊。本刊立足大西北, 面向国内外, 主要刊登农学、林学、植(森)保、园艺、土壤农化、畜牧、兽医、农业机械与电子工程、水利与建筑工程、食品加工与食品机械等方面体现西北地区特色的农、林、牧业各专业学科在基础理论研究和应用技术理论研究方面具有创新的学术论文、科研成果、学术报告、研究简报, 有新意的文献综述及学术动态、新品种介绍等。主要读者对象为国内外农、林、牧业科研人员、农业院校师生及高级农业技术管理和推广人员。

季刊, 每季末月 10 日出版, 大 16 开, 120 页。国内外公开发行, 邮发代号 52-111; 国外发行: 中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱), 代码 Q4380。每期定价 12.00 元, 全年 48.00 元。全国各地邮局均可订阅, 亦可直接向编辑部订阅。

编辑部地址: 陕西杨凌 西北农林科技大学西农校区 33 号信箱

邮编: 712100

联系电话: 029-87091132

网址: <http://xbnx.chinajournal.net.cn>

E-mail: xbnx@chinajournal.net.cn