

犬细小病毒核酸疫苗、重组活载体疫苗与弱毒疫苗 免疫犬实验研究

谢之景^{1,2}, 杨松涛¹, 夏咸柱^{1*}, 闫芳^{1,3}, 赵忠鹏¹, 高玉伟¹, 邹啸环¹, 黄耕¹

(1. 军事医学科学院军事兽医研究所, 长春 130062;

2. 山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018; 3. 山西农业大学动物科技学院, 太谷 030801)

摘要: 分别用犬细小病毒(CPV)核酸疫苗(pVCPV-VP2)、CPV重组活载体疫苗(CAV2/CPV)与CPV弱毒疫苗对犬进行了免疫试验,以检测不同CPV疫苗的免疫原性。采用CPV ELISA、CPV HI与CPV微量中和试验检测免疫犬的体液免疫水平,采用淋巴细胞转化试验检测犬的细胞免疫水平。结果,pVCPV-VP2和CAV2/CPV均能诱导机体产生抗CPV ELISA抗体与抗CPV中和抗体,但是pVCPV-VP2不能诱导机体产生可检测的抗CPV HI抗体,而CAV2/CPV能够诱导机体产生抗CPV HI抗体。淋巴细胞转化试验结果,pVCPV-VP2和CAV2/CPV免疫犬的外周血淋巴细胞对ConA与CPV的刺激均出现明显的增殖反应。结果表明,pVCPV-VP2和CAV2/CPV免疫犬均能诱导机体产生抗CPV的特异性体液免疫反应和细胞免疫反应,两者所表达的VP2蛋白均具有较好的免疫原性。CAV2/CPV以及pVCPV-VP2和CAV2/CPV联合免疫犬的抗CPV体液免疫水平和细胞免疫水平均比用pVCPV-VP2单独免疫犬的体液免疫水平和细胞免疫水平高。但CAV2/CPV诱导机体产生的抗CPV特异性免疫反应仍然比CPV弱毒疫苗诱导机体产生的抗CPV特异性免疫反应弱。另外,CAV2/CPV还能诱导机体产生抗CAV-2的特异性免疫反应。

关键词: 犬细小病毒;核酸疫苗;重组活载体疫苗

中图分类号: S852.659.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)11-1562-05

Experimental Study on Dogs Immunized with CPV DNA Vaccine, CPV Recombinant Vector Vaccine and CPV Modified Vaccine

XIE Zhi-jing^{1,2}, YANG Song-tao¹, XIA Xian-zhu^{1*}, YAN Fang^{1,3},
ZHAO Zhong-peng¹, GAO Yu-wei¹, ZOU Xiao-huan¹, HUANG Geng¹

(1. *The Military Veterinary Institute, Academy of Military of PLA, Changchun 130062, China*; 2. *College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China*; 3. *College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China*)

Abstract: To test the immunogenicity of the different CPV vaccines, the dogs were respectively vaccinated with pVCPV-VP2, CAV2/CPV and CPV modified vaccine. The antibody titers against CPV were detected by CPV ELISA, CPV HI and CPV SN. And the proliferation of the PBMCs of the vaccinated dogs was detected by MTT. As a result, both anti-CPV ELISA antibody and SN antibody were checked up on in the dogs vaccinated with CAV2/CPV or pVCPV-VP2. Anti-CPV HI antibody was discovered in the dogs immunized with CAV2/CPV or CAV2/CPV combined with pVCPV-VP2, but not in the dogs vaccinated with pVCPV-VP2. And the PBMCs of the inoculated dogs obviously proliferated against both CPV and ConA stimulation, re-

收稿日期:2007-12-25

基金项目:全军“十五”医药卫生重点基金项目资助(01-Z-092)

作者简介:谢之景(1975-),男,山东人,博士,副教授,主要从事动物病毒学研究, E-mail: xiezhiqing@sohu.com

* 通讯作者:夏咸柱(1939-),男,江苏人,博士生导师,中国工程院院士,主要从事动物病毒学研究, Tel:86-431-6758799

spectively. It demonstrated that CAV2/CPV and pVCPV-VP2 induced humoral and cellular immunity against CPV in dogs. The immune levels elicited by CAV2/CPV or CAV2/CPV combined with pVCPV-VP2 were higher than that by pVCPV-VP2, but weaker than that by the CPV modified vaccine. At the same time, CAV2/CPV can also induce specific anti-CAV-2 immunity.

Key words: canine parvovirus; DNA vaccine; recombinant vector vaccine

犬细小病毒(Canine parvovirus, CPV)是细小病毒科细小病毒属成员,属单链小DNA病毒,与猫细小病毒(Feline parvovirus virus, FPV)和水貂肠炎病毒(Mink enteritis virus, MEV)关系密切,CPV易经过抗原漂移产生新的突变株,宿主范围不断扩大^[1-2]。感染CPV发病犬以呕吐、出血性肠炎、白细胞减少为主要临床特征,幼犬的易感性高,可引发心肌炎,发病率为50%~100%,死亡率为0~50%。CPV对养犬业和经济动物养殖危害很大,并且也影响到了野生动物的生存。

疫苗接种是预防CPV的主要方法,疫苗的应用曾在很大程度上控制了CPV的流行,但在临床中仍有许多CPV感染的病例。幼犬体内抗CPV母源抗体对于幼犬初期抗CPV的感染起主要作用,但是母源抗体的干扰是引起CPV免疫失败的主要原因^[3-4]。为克服母源抗体的影响,许多科研人员进行了不懈的努力。高滴度的CPV弱毒疫苗能在一定程度上克服母源抗体的影响^[5]; CPV-2b的29-97/40株能在一定程度上克服母源抗体的影响^[6];经鼻内接种CPV疫苗也能在一定程度上克服母源抗体的影响^[7]。核酸疫苗能够克服母源抗体的影响, Jiang等^[8]构建了表达CPV VP1全基因的真核表达质粒,免疫接种犬能够诱导产生抵抗CPV的免疫反应。Morrison等人^[9]用犬I型腺病毒(Canine adenovirus type 1, CAV-1)为载体构建了表达CPV VP2基因的重组活病毒,在繁殖的过程中能够表达CPV VP2蛋白。

作者构建了表达CPV 貉分离株(PV/貉/CC/1/86,为CPV弱毒株)VP2蛋白的真核表达质粒(pVCPV-VP2)^[10],并在pVCPV-VP2的基础上,构建以犬II型腺病毒(Canine adenovirus type 2, CAV-2)为载体表达CPV VP2蛋白的重组病毒(CAV2/CPV)^[11]。本试验用pVCPV-VP2、CAV2/CPV与CPV弱毒疫苗对犬进行免疫接种,检测不同CPV疫苗诱导机体产生的免疫水平,以期制定CPV免疫程序提供试验资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、质粒以及菌株 PV/貉/CC/1/86($1 \times 10^{5.0}$ TCID₅₀/mL)及其相应的灭活病毒, CAV2/CPV($1 \times 10^{5.0}$ TCID₅₀/mL)作为CPV重组活载体疫苗, CAV-2($1 \times 10^{7.0}$ TCID₅₀/mL)及其相应的灭活病毒, pVCPV-VP2作为CPV核酸疫苗。

1.1.2 主要试剂 DMEM为GIBCO美国生物技术公司产品,辣根过氧化物酶标记的兔抗犬IgG、ConA和MTT为Sigma公司产品。

1.1.3 实验动物 30只45~50日龄的健康幼犬(抗CPV HI抗体效价均小于1:2,抗CAV-2 HI抗体效价均小于1:2)。

1.2 方法

1.2.1 对实验犬进行免疫接种 将30只犬随机分为5组,每组6只。第1组犬进行pVCPV-VP2免疫试验,肌注,剂量为500 μg/只,每间隔15 d免疫1次,共免疫3次;第2组犬进行CAV2/CPV免疫试验,肌注,剂量为 $1 \times 10^{4.0}$ TCID₅₀/只,每间隔15 d免疫1次,共免疫3次;第3组犬进行pVCPV-VP2和CAV2/CPV联合免疫试验,用pVCPV-VP2进行第1次免疫,肌注,剂量为500 μg/只,用CAV2/CPV进行第2、3次免疫,肌注,剂量 $1 \times 10^{4.0}$ TCID₅₀/只,每间隔15 d免疫1次;第4组犬用CPV弱毒疫苗进行免疫,肌注,剂量 $1 \times 10^{4.0}$ TCID₅₀/只,每间隔15 d免疫1次,共免疫3次;第5组犬用pVAX1进行接种,肌注,剂量为500 μg/只,每间隔15 d免疫1次,共免疫3次,作为空白对照。

1.2.2 免疫犬抗CPV抗体与抗CAV-2抗体水平检测 在免疫前和第3次免疫后15 d采血制备血清,置56 °C 30 min进行灭活, -20 °C冻存待检。采用CPV ELISA、CPV HI与CPV微量中和试验^[12]检测实验犬血清中抗CPV抗体滴度。采用CAV-2 HI^[12]检测实验犬抗CAV-2抗体滴度。

1.2.3 免疫犬外周血淋巴细胞转化试验(MTT比色法) 第3次免疫后15 d,制备肝素抗凝血,采用

MTT 比色法^[12]检测免疫犬外周血淋巴细胞对 Con A、CPV 与 CAV-2 刺激的增殖反应。

2 结果

2.1 抗 CPV 抗体检测结果

用 pVCPV-VP2 和 CAV2/CPV 免疫犬均能诱导机体产生抗 CPV 的特异性抗体。

2.1.1 抗 CPV ELISA 抗体检测结果 与阴性对

照和免疫接种前相比较,实验犬在 3 次免疫后,产生了抗 CPV ELISA 抗体 ($P < 0.01$),见表 1。用 CAV2/CPV 以及 pVCPV-VP2 和 CAV2/CPV 联合免疫犬的抗体效价均比用 pVCPV-VP2 免疫犬的抗体效价高 ($P < 0.01$),并且 CAV2/CPV 免疫犬的抗体效价比 pVCPV-VP2 和 CAV-2/CPV 联合免疫犬的抗体效价高,但是比 CPV 弱毒疫苗免疫犬的抗体效价低 ($P < 0.01$)。

表 1 免疫犬抗 CPV ELISA 抗体检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The serum anti-CPV ELISA titers of the vaccinated dogs ($\bar{x} \pm s$)

	pVCPV-VP2	CAV2/CPV	pVCPV-VP2 + CAV2/CPV	CPV	pVAX1
免疫前 Before inoculation	0.22 ± 0.03	0.20 ± 0.07	0.21 ± 0.05	0.19 ± 0.09	0.21 ± 0.04
三免后 Post third inoculation	0.37 ± 0.06 ^C	0.48 ± 0.05 ^B	0.45 ± 0.04 ^B	0.85 ± 0.06 ^A	0.22 ± 0.08

肩标不同大写字母者,差异极显著, $P < 0.01$ 。下表同

Value with different capital letters differ significantly, $P < 0.01$. The same as below

2.1.2 抗 CPV HI 抗体检测结果 3 次免疫后,没有在 pVCPV-VP2 免疫犬检测到抗 CPV HI 抗体,在 CAV2/CPV 免疫犬以及 pVCPV-VP2 和

CAV2/CPV 联合免疫犬检测到抗 CPV HI 抗体,但比 CPV 弱毒疫苗免疫犬的抗 CPV HI 抗体效价低 ($P < 0.01$),见表 2。

表 2 免疫犬血清抗 CPV HI 检测结果

Table 2 The serum anti-CPV HI titers of the vaccinated dogs

	pVCPV-VP2	CAV2/CPV	pVCPV-VP2 + CAV2/CPV	CPV	pVAX1
免疫前 Before inoculation	<1 : 2	<1 : 2	<1 : 2	<1 : 2	<1 : 2
三免后 Post third inoculation	<1 : 2	1 : (8~16) ^B	1 : (4~8) ^B	1 : (128~512) ^A	<1 : 2

2.1.3 抗 CPV 中和抗体检测结果 在 3 次免疫后,免疫犬均产生了抗 CPV 中和抗体,见表 3。与 ELISA 检测结果相似,CAV2/CPV 以及 pVCPV-VP2 和 CAV2/CPV 联合免疫犬的中和抗体效价均比 pVCPV-VP2 免疫犬的中和抗体效价高 ($P <$

0.01),并且 CAV2/CPV 免疫犬的中和抗体效价比 pVCPV-VP2 和 CAV2/CPV 联合免疫犬的中和抗体效价高,但是比 CPV 弱毒疫苗免疫犬的中和抗体效价低 ($P < 0.01$)。

表 3 免疫犬血清抗 CPV 中和抗体效价

Table 3 The anti-CPV SN titers of the vaccinated dogs

	pVCPV-VP2	CAV2/CPV	pVCPV-VP2 + CAV2/CPV	CPV	pVAX1
免疫前 Before inoculation	<1 : 2	<1 : 2	<1 : 2	<1 : 2	<1 : 2
三免后 Post third inoculation	1 : (4~8) ^C	1 : (16~64) ^B	1 : (8~32) ^B	1 : (128~256) ^A	<1 : 2

2.2 抗 CAV-2 抗体检测结果

在第 2、3 组实验犬检测到了抗 CAV-2 HI 抗体。CAV2/CPV 免疫犬的抗 CAV-2 HI 抗体效价为 1:(256~512),用 pVCPV-VP2 和 CAV2/CPV 联合免疫犬的抗 CAV-2 HI 抗体效价为 1:(64~128)。

2.3 免疫犬的外周血淋巴细胞转化试验结果

与阴性对照相比较,第 1、2、3、4 组实验犬在三

免后外周血淋巴细胞对 ConA、CPV 的刺激均发生明显的增殖($P < 0.01$)。另外,用 CAV2/CPV 以及 pVCPV-VP2 和 CAV2/CPV 联合免疫犬的外周血淋巴细胞还对灭活 CAV-2 的刺激发生增殖反应。免疫犬外周血淋巴细胞对特异性抗原刺激的增殖反应指数比对 ConA 刺激的增殖反应指数低($P < 0.01$)。各组实验犬的外周血淋巴细胞对不同刺激的反应增殖结果见表 4。

表 4 免疫犬外周血淋巴细胞对 CPV、ConA 和 CAV-2 刺激的增殖结果

Table 4 The OD₅₇₀ of PBMCs proliferation of the vaccinated dogs against ConA, CPV, CAV-2 ($\bar{x} \pm s$)

	pVCPV-VP2	CAV2/CPV	pVCPV-VP2 + CAV2/CPV	CPV	pVAX1
未刺激 Non-stimulator	0.22±0.04	0.23±0.05	0.23±0.08	0.22±0.06	0.21±0.04
ConA	0.35±0.05 ^A	0.42±0.06 ^A	0.37±0.09 ^A	0.41±0.04 ^A	0.30±0.05 ^B
CPV	0.29±0.06 ^B	0.35±0.05 ^B	0.32±0.04 ^B	0.39±0.08 ^B	0.25±0.04 ^C
CAV-2	/	0.39±0.07 ^B	0.35±0.08 ^B	/	/

/ . Not tested

3 讨论

CPV 有 3 种衣壳蛋白 VP1、VP2、VP3。VP1 和 VP2 是同一个转录产物经剪切而成,VP1 在 N 端比 VP2 多 154 个氨基酸残基,VP3 是由 VP2 在 N 端切掉 15~20 个氨基酸残基而形成。每个核衣壳由 60 个 VP1、VP2 和 VP3 组成的蛋白亚单位构成,其中 VP2 是主要的衣壳蛋白,VP1 的拷贝数为 6~10 个,另外还有少量的 VP3,空衣壳中无 VP3,CPV 主要抗原位点在 VP2 蛋白上^[13-16]。本研究用所构建的表达 CPV VP2 蛋白的 pVCPV-VP2、重组病毒 CAV2/CPV 以及 CPV 弱毒疫苗^[10-12]进行了免疫犬研究。对免疫接种犬的体液免疫和细胞免疫水平检测结果表明,pVCPV-VP2 和 CAV2/CPV 免疫犬均能诱导机体产生抗 CPV 特异性体液免疫和细胞免疫,在宿主细胞内所表达的 VP2 蛋白均具有较好的免疫原性。

但是 CAV2/CPV 以及 pVCPV-VP2 和 CAV2/CPV 联合免疫犬的抗 CPV 体液免疫和细胞免疫水平平均比 pVCPV-VP2 单独免疫犬的体液免疫水平和细胞免疫水平高。这是因为 pVCPV-VP2 不能在宿主细胞内繁殖,而 CAV2/CPV 能够在宿主细胞内繁殖,所表达的 VP2 蛋白的量比 pVCPV-VP2 表达的 VP2 蛋白量高,所以能够刺激机体产生相对较强

的免疫反应。另外,CAV2/CPV 免疫犬的抗 CPV 免疫水平比 pVCPV-VP2 和 CAV2/CPV 联合免疫犬的抗 CPV 免疫水平高,原因在于 pVCPV-VP2 和 CAV2/CPV 联合免疫犬试验中第 1 次用 pVCPV-VP2 免疫犬所诱导的抗 CPV 的基础免疫水平较低,影响了第 2、3 次用 CAV2/CPV 进行免疫后的记忆免疫应答反应。但是 CAV2/CPV 诱导机体产生抗 CPV 的特异性免疫反应仍然比 CPV 弱毒疫苗诱导机体产生的抗 CPV 特异性免疫反应弱。另外,在 CAV2/CPV 以及 pVCPV-VP2 和 CAV2/CPV 联合免疫犬检测到抗 CPV HI 抗体。推测 CAV2/CPV 能够在体内表达相对较多的 CPV VP2 蛋白,进行正常折叠形成相对较多的抗原位点,但是与 CPV 弱毒疫苗相比,CAV2/CPV 表达的 VP2 蛋白及其所形成的抗原位点仍然较少。

CAV2/CPV 以及 pVCPV-VP2 和 CAV2/CPV 联合免疫犬,除能够诱导机体产生抗 CPV 的特异性免疫外,还能诱导机体产生抗 CAV-2 的特异性免疫反应。CAV-2 疫苗免疫动物也能够抵抗 CAV-1 的攻击,所以 CAV2/CPV 作为疫苗免疫犬能够同时诱导机体产生抗 CPV、CAV-2 以及 CAV-1 三种病毒的特异性免疫反应。但是,在免疫前,该试验所用实验犬抗 CAV-2 抗体均为阴性,所以抗 CAV-2 的母源抗体对 CAV2/CPV 免疫效果的干扰有待于进

一步研究。

CAV-2 主要感染犬科动物,还能感染黑熊和浣熊等动物,CPV 能够感染犬科、猫科、灵猫科、熊科等科的相关动物。所以用以 CAV-2 为载体表达 CPV VP2 蛋白的重组病毒作为疫苗具有较好的应用前景;另外 CAV-2 和 CPV 均可经过口/鼻感染,所以可以将 CAV-2 为载体的表达 CPV VP2 蛋白的重组病毒制成口服疫苗对动物进行免疫接种,特别是对于难以进行肌肉注射的相关野生动物有重要的意义。

CAV2/CPV 的生物安全性直接关系到其能否作为动物疫苗。CAV2/CPV 的生物安全性,特别是对人的生物安全性,还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] IKEDA Y, MOCHIZUKI M, NAITO R, et al. Prevalence of canine parvovirus (CPV) in unvaccinated cat populations and emergence of new antigenic types of CPVs in cats[J]. *Virology*, 2000, 278(1): 13-19.
- [2] STEINEL A, MUNSON L, VAN VUUREN M, et al. Genetic characterization of feline parvovirus sequences from various carnivores[J]. *J Gen Virol*, 2000, 81(2):345-350.
- [3] POLLOCK R V, CARMICHAEL L E. Maternally derived immunity to canine parvovirus infection; transfer, decline, and interference with vaccination [J]. *J Am Vet Med Assoc*, 1982, 180(1):37-42.
- [4] O'BRIEN S E, ROTH J A, HILL B L. Response of pups to modified-live canine parvovirus component in a combination vaccine[J]. *J Am Vet Med Assoc*, 1986, 188(7):699-701.
- [5] HOARE C M, DEBOUCK P, WISEMAN A. Immunogenicity of a low-passage, high-titer modified live canine parvovirus vaccine in pups with maternally derived antibodies[J]. *Vaccine*, 1997, 15(3): 273-275.
- [6] PRATELLI A, CAVALLI A, NORMANNO G, et al. Immunization of pups with maternally derived antibodies to canine parvovirus (CPV) using a modified-live variant (CPV-2b) [J]. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 2000, 47(4):273-276.
- [7] BUONAVOGLIA C, CAVALLI A, TEMPESTA M, et al. Intranasal vaccination of pups in the presence of maternally derived antibodies to canine parvovirus (CPV). Evaluation of minimal immunizing dose [J]. *New Microbiol*, 1995, 18(4):371-375.
- [8] JIANG W, BAKER H J, SWANGO L J, et al. Nucleic acid immunization protects dogs against challenge with virulent canine parvovirus[J]. *Vaccine*, 1998, 16(6): 601-607.
- [9] MORRISON M D, REID D, ONIONS D, et al. Generation of E3-deleted canine adenoviruses expressing canine parvovirus capsid by homologous recombination in bacteria[J]. *Virology*, 2002, 293:26-30.
- [10] 谢之景, 夏咸柱, 扈荣良, 等. 犬细小病毒核酸疫苗的构建及其免疫小鼠检测[J]. *农业生物技术学报*, 2006, 14(4):503-506.
- [11] 谢之景, 夏咸柱, 扈荣良, 等. 表达犬细小病毒 VP2 蛋白重组犬 2 型腺病毒的构建及鉴定[J]. *病毒学报*, 2006, 22(3): 214-219.
- [12] 谢之景. 犬细小病毒基因型调查及其核酸疫苗和重组疫苗的实验研究[D]. 长春:解放军军需大学, 2004.
- [13] PARRISH C R. Host range relationship and the evolution of canine parvovirus[J]. *Vet Microbiol*, 1999, 69(1-2):29-40.
- [14] TSAO J, CHAPMAN M S, AGBANDJE M, et al. The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications [J]. *Science*, 1991, 251(5 000):1 456-1 464.
- [15] CORTES E, SAN MARTIN C, LANGEVELD J, et al. Topographical analysis of canine parvovirus virions and recombinant VP2 capsids[J]. *J Gen Virol*, 1993, 74 (9):2 005-2 010.
- [16] AGBANDJE M, PARRISH C R, ROSSMANN M G. The structure of parvovirus[J]. *Virology*, 1995, 6:299-309.