

猪繁殖与呼吸综合征核酸疫苗的研究进展*

朱永兴 汤德元 曾智勇 汪忠荣

(贵州大学动物科学学院 贵阳 550025)

猪繁殖与呼吸综合征 (PRRS)自 1987年在美国出现以来,对世界各国的养猪业造成严重危害,尤其是近年来集约化养猪业发达的国家损失最为严重。虽然兽医科研人员和养猪业者进行多方面的努力,采取了包括种源控制、疫病净化、消毒隔离和早期断奶等防控措施,但仍不能禁绝该病的发生和蔓延。对于该病的预防,目前常用的疫苗是灭活苗和弱毒苗,由于灭活苗不能高效进入组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) Ⅱ类途径,所以难于诱导产生细胞毒性 T 细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL),而对于病毒这类在细胞内繁殖的微生物来说,CTL 应答更显重要;活苗虽然可以很好地刺激机体产生细胞免疫和体液免疫,但活苗毕竟是一种活的微生物,具有潜在的危险,如发生返祖、核酸重组等,而且通过常规的血清学方法一般与自然感染无法区分,所以利用生物技术手段开发新型疫苗以取代现用的常规疫苗势在必行。核酸疫苗作为疫苗家族的新成员,有着许多优点,是当前研究的热点。核酸疫苗又称为 DNA 疫苗,是指将含有编码某种抗原蛋白基因序列的质粒载体作为疫苗,直接导入动物细胞内,通过宿主细胞的转录系统合成抗原蛋白,诱导宿主产生对该抗原蛋白的免疫应答,从而使被接种动物获得相应的免疫保护。核酸疫苗的优势在于可以对动物产生长期保护,可以激发很强的细胞免疫应答。但 DNA 疫苗效力的好坏也取决于许多因素,如抗原自身的特性、免疫途径、是否使用佐剂或使用佐剂的类型等,所以现在人们对影响 DNA 疫苗效力的各种因素展开了研究。本文就 PRRS 核酸疫苗的作用机理、种类和前景综述如下。

1 核酸疫苗的作用机理

目前普遍认为核酸疫苗诱导免疫系统的方式和病毒感染所引起的免疫作用相似,包括疫苗的摄取、转运及表达;抗原的加工和递呈;淋巴细胞的活化;免疫效应细胞和分子的作用。首先,核酸疫苗进入机体后,被专职的抗原呈递细胞 (antigen-presenting cell, APC) 摄取,表达的蛋白质被细胞内蛋白酶体复合物降解成若干抗原短肽,这些短肽因存在不同的抗原表位,一方面与自身表达的 MHC - Ⅱ类分子和 MHC - Ⅰ类分子相结合,运送到细胞表面,细胞内质网合成的 MHC - Ⅰ类分子的 α 链与抗原肽结合成抗原肽 MHC - Ⅰ类分子复合物后被递呈到 APC 表面,特异地激活 $CD4^+$ Th 细胞;另一方面 MHC - Ⅱ类分子的 α 、 β 链与抗原肽形成抗原肽 MHC - Ⅱ类分子复合物,递呈于细胞表面,激活 $CD8^+$ T 细胞,递呈于 APC 表面的抗原肽 MHC - Ⅱ类分子复合物可被 $CD4^+$ T 细胞表面的 TCR/CD3 所识别,在 L - 4, L - 12 和 IFN - γ 的共同作用下变成为活化的 Th1 和 Th2。Th1 细胞活化后分泌一些细胞因子,激活迟发性过敏反应,而 Th2 细胞激活后产生多种细胞因子,刺激 B 细胞产生特异性抗体,中和相应的抗原,同时抗原肽 MHC - Ⅱ类分子复合物被 $CD8^+$ T 细胞上的 TCR/CD3 所识别,在 L - 2 和 IFN - γ 的作用下,

激活 $CD8^+$ T 细胞分化为细胞毒淋巴细胞 (CTL) 和记忆 T 细胞 (Tm),攻击表达有特异抗原的靶细胞,使宿主生于靶细胞内的病原体释放入血液,与体液免疫反应协同,完成对病原体的彻底清除。有学者通过肌肉注射 DNA 疫苗研究了 APC 在 DNA 疫苗免疫所引起的 CTL 反应中起的作用。APC 可能通过 3 种途径参与抗原递呈:肌肉内的 APC 直接吞入质粒,合成抗原蛋白,加工后进入 MHC - Ⅰ类抗原递呈途径;质粒免疫机体后,随血流进入外周淋巴器官,转染那里的 APC;肌细胞内合成的抗原释放到细胞外,通过某种方式传递给 APC,而后进入 MHC - Ⅱ类分子的抗原递呈途径。

2 PRRS 核酸疫苗种类

2.1 单基因疫苗 单基因疫苗常指 ORF5 单基因疫苗,是仅将 PRRS 的 ORF5 保护性抗原基因或经过修饰、改造后克隆到真核质粒表达载体上构建成的 DNA 重组质粒,也包括在此基础上插入各种细胞因子所构建的 DNA 重组质粒。Pirzadeh 等制备了针对 PRRSV GP5 蛋白的 DNA 疫苗,经小鼠和猪体免疫试验都证实 DNA 疫苗诱导产生了病毒特异性的体液免疫和细胞免疫,可使接种猪产生抗 ORF5 的特异性中和抗体,随后用 PRRSV AF - Klop 株攻毒,疫苗免疫猪没有出现广泛的病毒血症,而且肺部病变比攻毒对照猪要轻得多。这项试验证明:GP5 具有很好的免疫原性。Xue 等用 PRRSV ORF5、ORF7 基因和编码猪细胞因子 L - 2、IFN - γ 的 cDNA 构建了 pRESort5/IFN - γ 、pRESort5/L - 2、pRESort7/L - 2 等真核表达质粒联合免疫仔猪,诱导出了体液免疫和细胞免疫反应,并使免疫猪抵抗了 PRRS 强毒的攻击。

程安春等克隆了 PRRSV SC2 株 ORF5 基因,以 pcDNA3.1 为载体构建真核表达质粒 pcDNA - PRRSV - SC2 - ORF5,经脂质体转染 Marc 145 细胞后,第 26 小时检测到疫苗蛋白的特异性表达,第 56 小时达到高峰。疫苗肌肉注射小鼠和仔猪后能迅速分布到各组织器官中,未发现核酸疫苗与宿主细胞染色体整合现象,且能使仔猪产生体液和细胞免疫应答,免疫期持续 135 天以上,结果表明:构建的 PRRSV ORF5 基因疫苗具有良好的安全性和免疫原性。杨汉春等也开展了 PRRSV DNA 疫苗的研究,他们研制了针对 PRRSV BJ - 4 株 GP5 的 DNA 重组质粒,经小鼠免疫和猪体免疫都产生了较高的体液免疫和细胞免疫水平,并进一步将该 DNA 重组质粒与表达 L - 4 或 L - 2 的重组质粒联合免疫后,这 2 种细胞因子佐剂均可提高猪体抵抗 PRRSV 感染的能力。该研究小组还制备了泛素与 PRRSV GP5 融合表达的 DNA 重组质粒,经小鼠试验证实泛素可明显提高机体的细胞免疫功能。

秦晓光等将 ORF5 基因克隆至真核表达载体 pVAX1、pVR - L - 18 的 CMV 启动子下游,构建成真核表达质粒 pVAX1 - ORF5 和 pVR - L - 18 - ORF5,免疫 BALB/c 小鼠,结果表明:pVR - L - 18 - ORF5 实验组的 $CD4$ 和 $CD8$ 阳性细胞的百分率明显高于 pVAX1 - ORF5 组,说明 L - 18

既能提高动物的细胞免疫又能提高动物的体液免疫水平,但 pVR-L-18-ORF5 实验组 CD4⁺/CD8⁺ 低于 pVAX1-ORF5 组,说明 L-18 以增强细胞免疫为主。江云波等为了提高 PRRSV ORF5 基因 DNA 疫苗的免疫效力,将通用型辅助性 T 淋巴细胞表位 (PADRE) 插入 ORF5 的中和表位和覆盖表位间,获得修饰后的 ORF5 基因 ORF5M,并进一步构建 ORF5M 的真核表达质粒 pCI-52M,免疫 BALB/c 小鼠,检测免疫后的 ELISA 抗体和中和抗体,与未经修饰的 ORF5 基因真核表达质粒 pCI-52 进行比较,结果表明:修饰后的 DNA 疫苗 pCI-52M 诱导的 ELISA 抗体和中和抗体均明显优于未经修饰的 DNA 疫苗 pCI-52,是一种具有良好开发前景的 PRRS 新型疫苗。

2.2 复合基因疫苗 复合基因疫苗是将 ORF2、ORF3、ORF4、ORF6、ORF7 等基因与 ORF5 基因组合构建成真核表达质粒,共表达出融合蛋白,以增强 GP5 蛋白的免疫原性。赵永刚等利用重组 DNA 分子技术成功构建了 pRESorf5/4、pRESorf5/7、pRESorf6/5 等真核表达质粒,进行本体动物的基因免疫实验,经过免疫荧光、ELISA、Western blot 检测到质粒在动物体内进行复制和表达,诱导机体产生特异性抗体,引起体液免疫应答。用流式细胞术对免疫猪 T 淋巴细胞进行检测表明:所构建的真核表达质粒可以诱导机体产生细胞免疫应答。乐敏等利用 EcoRI SpeI 和 Hind III 位点将 ORF7 和 ORF5 基因片段依次克隆到 pMD-18T 载体,构建重组质粒 pMD18NE,将串联的 ORF7 和 ORF5 基因亚克隆到原核表达载体 pGEX-KG 构建重组原核融合表达质粒 pGEX-KGNE,并且表达的融合蛋白 GST-NE 具有免疫学反应活性,这为猪繁殖与呼吸综合征血清学诊断方法的建立及疫苗研究打下基础。JIANG 等构建了共表达 ORF5 和 ORF7 基因的真核表达质粒 pCI-ORF5/ORF6,经小鼠和猪体免疫,产生较高水平的 ELISA 抗体和中和抗体及淋巴细胞增殖反应。

沈国顺等将 ORF5、ORF3 基因插入真核表达载体 pVAX1、pVR-L-18 的 CMV 启动子下游,构建成真核表达质粒 pVAX1-ORF5-ORF3 和 pVR-L-18-ORF5-ORF3,进行 BALB/c 小鼠免疫试验,检测出 pVR-L-18-ORF5-ORF3 免疫组的小鼠的 ELISA 抗体水平高于 pVAX1-ORF5-ORF3 和 PRRS 灭活苗免疫组,CD8⁺ T 淋巴细胞亚群数量显著高于 pVAX1-ORF5-ORF3 和 PRRS 灭活苗组,表明 L-18 对猪的细胞免疫功能具有明显的促进作用。郑其升等对 ORF5 基因进行了改造,将 CpG 序列和通用型辅助性 T 淋巴细胞表位插入 A 表位与 B 表位之间,并对 N33 与 N51 位糖基化位点进行了点突变,获得改造的 ORF5 基因,在此基础上构建了由两个 CMV 启动子调控的共表达改造的 ORF5 (MORF5) 与 ORF6 基因的真核表达质粒 pDNA-M5A-6A,免疫 6 周龄 BALB/c 小鼠,利用微量中和和试验检测免疫后的中和抗体,利用 MTT 法检测免疫后淋巴细胞的增生情况,并与未改造的 ORF5 基因真核表达质粒 pDNA-5A-6A、弱毒疫苗以及灭活疫苗的免疫效果进行比较,结果表明:pDNA-M5A-6A 不但能够刺激免疫小鼠在较短的时间内产生更高水平的中和抗体,而且可以诱导产生更强烈的 T 淋巴细胞增殖反应。所构建的共表达 PRRSV 改造的 ORF5 基

因与 ORF6 基因的 DNA 疫苗 pDNA-M5A-6A,能够较好地诱发小鼠产生较高的特异性针对 PRRSV 的中和抗体和细胞免疫应答,为研究能够更好地防制 PRRSV 的新型疫苗提供了新的思路。

2.3 与其他病毒基因联合构建的多联基因疫苗 将某些病毒基因与 PRRS ORF5 等基因共同插入真核表达质粒组成 DNA 疫苗,增强了 GP5 的免疫效应,也为研究 PRRS 多联疫苗打下基础。赵武等将具有蛋白转导功能的牛疱疹病毒 1 型 (BHV-1) VP22 基因插入到经过修饰具有更好免疫原性的 PRRSV 修饰型 ORF5 基因 (ORF5M) 上游,构建 VP22 和 ORF5M 融合表达的真核表达质粒 pCI-VP22-ORF5M,免疫 BALB/c 小鼠,检测小鼠免疫后的 GP5 特异性 ELISA 抗体、抗 PRRSV 中和抗体和脾淋巴细胞增殖反应,并与非融合的真核表达质粒 pCI-ORF5M 进行比较,结果显示,融合表达 VP22-GP5 的 DNA 疫苗 pCI-VP22-ORF5M 诱导的体液免疫和细胞免疫反应均明显高于非融合表达的 DNA 疫苗 pCI-ORF5M,表明蛋白转导相关蛋白 BHV-1 VP22 能显著增强表达 GP5 的 PRRSV DNA 疫苗的免疫效应,有效发挥了基因免疫佐剂效应,这为研制 PRRSV 高效 DNA 疫苗提供了思路。

赵鸿雁等成功将猪圆环病毒 2 型 (PCV-2) ORF2 基因序列和 PRRS ORF5 基因序列共同组建成重组质粒 pRES-ORF2/ORF5,为进一步研究 PCV-2 ORF2 及 PRRSV ORF5 编码蛋白的生物学活性及研究猪圆环病毒和猪繁殖与呼吸综合征病毒二联核酸疫苗奠定了基础。郑其升等为探讨共表达 PRRSV 保护性抗原基因的重组改良型痘苗病毒安卡拉株 (Modified Vaccinia Virus Ankara, MVA) 的免疫效力,将 PRRSV NJ-a 株 ORF4、ORF5 和 ORF6 基因插入转移载体 pLR 中,获得了三基因共表达的转移载体 pLR-ORF5/ORF6/ORF4,通过同源重组的方法获得重组病毒 MVA-GP5M/GP4,免疫 6 周龄 BALB/c 小鼠,首免后 3 周可检测到特异性 PRRSV 中和抗体,8 周后中和抗体效价可达 1:25,并能继续维持 4 周;淋巴细胞增殖试验结果表明,重组病毒免疫小鼠产生强烈的特异性细胞增殖反应,表明 MVA-GP5M/GP4 具有良好的免疫原性,可作为预防 PRRS 的候选疫苗进一步研究。

3 讨论

总之,核酸疫苗作为一种新型的疫苗,在多种动物实验中得以证实与第一、二代疫苗相比具有许多优势:核酸疫苗可诱导机体产生全面的免疫应答,免疫后,能产生体液免疫和细胞免疫;采用同种不同株之间的保守核酸序列制成的核酸疫苗,其保护性免疫应答对不同亚型的病原体具有交叉保护作用;可将编码不同抗原的基因构建在同一个质粒中,或将不同抗原基因的多种重组质粒联合应用,制备多价核酸疫苗,增强疫苗的免疫效果;能表达经修饰的天然蛋白,能诱导与天然分子相同的或更有效的免疫应答;核酸疫苗既有预防作用,也有治疗作用,免疫具有持续性,一次接种可获得长期免疫力;核酸疫苗仅仅是病原体某种抗原的基因片段,而不是整个病原体的基因组,且利用质粒作载体,不涉及感染性因子,免疫接种后,蛋白质抗原在宿主细胞内表达,因此无传统疫苗因毒力返强或病毒之间核酸的重组而引发疾病的危害;核酸疫苗的制备简单、省时省力、成本低、稳定性好、贮存

和运输方便。正是因为核酸疫苗具有其它疫苗不可比拟的优点,在疾病的防制中显示出巨大的潜力,成为研究疫苗的一个新的发展方向。此外,核酸疫苗除了用于预防疫病外,还可以制备各种高免抗血清、制备各种单克隆抗体和研究病原的保护性抗原等方面。

尽管核酸疫苗有许多优点和现实意义,但是目前核酸疫苗的理论分析和实际应用还有很大差距,如何增强核酸疫苗的免疫应答并达到全面的保护作用,如何提高核酸疫苗的对细胞的转染效果,如何控制目的基因在细胞中的表达等问题都待进一步研究。核酸疫苗要想在临床上广泛应用还面临许多挑战,这就要求我们对其从现象到机理进行深入研究,弄清基因免疫后体内抗原的表达、提呈、加工、CTL 细胞机理,这些对新型高效核酸疫苗的设计、开发、生产将起到积极深远的影响。总之,核酸疫苗一问世即成为免疫学领域的研究热点,并以人们难以预料的速度迅猛发展,随着这方面研究的不断深入,核酸疫苗将在疾病防制中发挥重要作用。

参考文献:

- 1 孙树汉.核酸疫苗[M].上海:第二军医大学出版社.2000,5~6
- 2 Pirzadeh B,Dea S. Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J].J Gen Virol,1998,79:989~999
- 3 Xue Q, Zhao YG, Zhou YI, al. Immune responses of swine following DNA immunization with plasmids encoding porcine reproductive and respiratory syndrome virus ORFs 5 and 7, and porcine L - 2 and IFN-gamma[J].Vet Immunol Immunopathol, 2004,102(3):291~298
- 4 程安春 汪铭书 希尼尼根等.猪繁殖与呼吸综合征 ORF5 基因疫苗的构建及其安全性和免疫原性检测[J].中国兽医科技.2005,35(1):27~35
- 5 秦晓光 金宁一 沈国顺等.猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP5 蛋白实验性核酸疫苗的构建及其免疫原性的初步研究[J].病毒学报.2006,22(5):375~378
- 6 江云波 方六荣 肖少波等.修饰的 ORF5 基因增强猪繁殖与呼吸综

- 合征 DNA 疫苗的体液免疫[J].中国兽医学报.2005,25(1):1~3
- 7 乐敏 邱德新 陈焕春等.猪繁殖与呼吸综合征病毒 orf7 和 orf5 双基因的原核表达研究[J].中国病毒学.2004,19(5):476~480
- 8 Jiang Y, Xiao S, Fang L, al. DNA vaccines co - expressing GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) display enhanced immunogenicity[J]. Vaccine,2006,24(15):2869~2879
- 9 沈国顺 金宁一 秦晓光等.表达 PRRS 病毒 GP5、GP3 和猪 L - 18 的核酸疫苗的构建及实验免疫研究[J].免疫学杂志.2006,22(6):629~634
- 10 郑其升 李鹏 毕志香等.PRRSV NJ - a 株 ORF5 基因 A 表位的修饰与糖基化位点的突变对其 DNA 疫苗免疫效力的影响[J].生物工程学报.2007,23(1):33~39
- 11 赵武 肖少波 方六荣等.牛疱疹病毒型 VP22 和猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP5 融合基因 DNA 疫苗的免疫效应[J].生物工程学报.2005,21(5):725~730
- 12 赵鸿雁 李俊 丛晓燕等.PCV - 2 ORF2 和 PRRSV ORF5 基因的扩增与双基因真核表达载体的构建[J].动物医学进展.2006,27(11):61~64
- 13 Spier RE 著.张健康译.用于预防传染病的核酸疫苗及其管理[J].国外医学(生物制品分册).1997,20(3):122~125
- 14 范国昌.一类新型疫苗 - 核酸疫苗[J].生物技术通报.1998,33(5):23
- 15 刘海鹏 赵玉军.核酸疫苗的研究和应用[J].中国兽医杂志.2001,37(9):34~37

*基金项目:贵州省贵阳市 2005 年畜牧科技专项基金项目资助,编号(2005)筑科农字第 4 - 11 号; 2007 年贵州省科技厅项目资助,编号:黔科合 J 字(2007)2068 号

作者简介:朱永兴(1984—),男,湖南永州人,本科。

通讯作者:汤德元(1964—),男,教授,博士,硕士生导师,主要从事中西医结合和动物传染病的教学和科研工作。

收稿日期:2007 - 09 - 18

欢迎订阅、欢迎投稿《当代畜禽养殖业》

省部级优秀期刊:主管:内蒙古自治区农牧业厅 主办:内蒙古农牧业科学院

国内外公开发行:国内统一刊号:CN15—1150/S;国际标准刊号:ISSN1005—5959

发行范围:全国各省市自治区直辖市

办刊宗旨:推广养殖技术,传播养殖信息,普及养殖知识,提高养殖水平

读者对象:全国各省的养殖业企业(公司)和经销商,从事兽医、牧机、饲料、加工等领域的广大工作者,以及大中专院校师生和农牧业科研单位的工作人员等

主要栏目:市场论坛、科学实验、养殖技术、疫病防治、饲养管理、特种养殖、新技术成果、产品目录、名企展示等

规格与定价:国际标准大 16 开,64 页;定价 10 元/册,全年 120 元。全国各地邮政局(所)均可订阅,或直接向本刊编辑部订阅,邮发代号:16—49

通讯地址:内蒙古呼和浩特市赛罕区乌兰察布东路 68 号 内蒙古农牧业厅 52 室 邮政编码:010010

联系电话:0471—4931086、6652236

运行总监:李杰 13848113152 13190554288 电子信箱:nmgxny@sina.com ddxqzy@163.com