

表达 H1N1、H3N2 猪流感病毒 HA 基因重组质粒在小鼠的免疫效力

胡永浩^{1,2}, 包世俊¹, 赵有淑^{1,2}, 温峰琴^{1,2}, 姚学萍¹, 杨焕良², 陈化兰^{2*}

(1. 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070; 2. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 哈尔滨 150001)

摘要: 应用已构建的真核表达质粒 pCI-H1-HA、pCAGGS-H1-HA、pCI-H3-HA 和 pCAGGS-H3-HA 作为 DNA 疫苗, 利用 BALB/c 小鼠进行免疫保护试验, 通过测定不同免疫期 HI 抗体滴度、分析攻毒后 BALB/c 小鼠体重变化及肺脏病毒含量, 评价 DNA 疫苗的免疫效力。结果表明: 构建的 DNA 疫苗均可诱导小鼠产生免疫力; BALB/c 小鼠体重变化统计学分析显示, 免疫组与对照组差异极显著 ($P < 0.01$), pCAGGS 表达载体构建的 DNA 疫苗免疫效果优于 pCI 表达载体构建的 DNA 疫苗 ($P < 0.05$)。

关键词: 猪流感病毒; HA 基因; DNA 疫苗; 免疫效力

中图分类号: S855.3; S852.65+9.5

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)12-1410-04

Immune Efficacy of the Recombinant Plasmids Expressing HA Gene of H1N1 and H3N2 Subtype SIV in Mice

HU Yong-hao^{1,2}, BAO Shi-jun¹, ZHAO You-shu^{1,2}, WEN Feng-qin^{1,2}, YAO Xue-ping¹,
YANG Huan-liang², CHEN Hua-lan^{2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

Abstract: BALB/c mice were inoculated with the recombinant plasmids (pCI-H1-HA, pCAGGS-H1-HA, pCI-H3-HA and pCAGGS-H3-HA) which included the HA gene of H1N1 and H3N2 subtype SIV to screen valuable vaccine candidate. The immune efficacy was evaluated by detecting HI antibody titers, analyzing weight changes of mice and examining virus titers in lungs. The results indicated that the constructed DNA vaccines induced immune responses in BALB/c mice. Meanwhile, by the statistical analysis of the weight changes of BALB/c mice, there were high significant differences between the immunization groups and the control ($P < 0.01$), and the DNA vaccines constructed with pCAGGS as the expression vector had better immune efficacy than that of DNA vaccines constructed with pCI ($P < 0.05$).

Key words: SIV; HA gene; DNA vaccine; immune efficacy

猪流感 (swine influenza, SI) 是由猪流感病毒 (swine influenza virus, SIV) 引起的猪的一种群发性呼吸道传染病。猪流感急性发病期的病猪鼻漏中含有大量病毒, 是主要的传染源。康复猪可长期带

毒, 并在环境、气候变化或饲养管理不良时再次表现症状, 成为某些国家或地区存在不明显地方流行性猪流感的重要原因^[1,2]。作为流感病毒的重要宿主, 猪不仅具有 SIV 的表面受体, 而且具有禽流感

收稿日期: 2007-09-05

基金项目: 农业部动物流感重点开放实验室开放课题资助项目

作者简介: 胡永浩 (1962-), 男, 甘肃古浪人, 教授, 主要从事动物传染病学及病原分子生物学研究

* 通讯作者: 陈化兰, Tel: 0451-82761925, E-mail: hlchen1@yahoo.com

病毒和人类流感病毒的表面受体^[3~5],在流感病毒种间传播中起着举足轻重的作用,因而在流感感染的病原学、流行病学、生态学及公共卫生学方面有重要意义。

目前,SI 的防制多采用灭活疫苗进行预防接种,灭活疫苗存在免疫剂量大、免疫期短、针对性差及毒副作用大等诸多问题^[6,7]。本研究以 H1N1、H3N2 猪流感病毒株 HA 基因的真核表达质粒作为 DNA 疫苗对实验小鼠进行免疫保护试验,并对用不同载体构建的真核表达质粒的免疫效果进行分析和评价,为研制猪流感病毒 DNA 疫苗奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 重组质粒

真核表达质粒 pCI-H1-HA、pCI-H3-HA、pCAGGS-H1-HA 和 pCAGGS-H3-HA 均由作者构建^[8]。碱裂解法提取质粒,聚乙二醇法纯化^[9],适量稀释,用于免疫接种。

1.2 病毒株

猪流感病毒广东分离株 A/Swine/Gongdong/711/2001(H1N1)及福建分离株 A/Swine/Fujian/668/2001(H3N2)由哈尔滨兽医研究所动物流感重点开放实验室提供。

1.3 实验动物

6~7 周龄 BALB/c 小鼠(18~25 g)由哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供。

1.4 免疫接种及攻毒试验

80 只 BALB/c 小鼠随机分为 H1 疫苗组和 H3 疫苗组两大组,每组又随机均分为 5 个小组,每小组 8 只小鼠,按表 1 及表 2 所示疫苗种类和剂量进行后肢肌肉注射。首次免疫接种后第 10 天进行第 2 次免疫。空白对照组小鼠不进行免疫接种。第 2 次免疫后第 10 天用 A/Swine/Guangdong/711/2001 毒株(H1N1)和 A/Swine/Fujian/668/2001 毒株(H3N2)分别对两大组小鼠滴鼻攻毒,病毒量为 $100 \times \text{EID}_{50}$ (利用 Reed & Muench 法计算 EID_{50})^[10]。攻毒后每天观察小鼠临床表现,测量体重。

1.5 HI 抗体测定

小鼠分别于第 1 次免疫后第 10 天、第 2 次免疫后第 10 天、攻毒后第 10 天断尾采集血液,分离血清。以微量血凝抑制试验^[10]检测小鼠 HI 抗体。

1.6 病毒分离

攻毒后第 5 天每组随机抽取 3 只小鼠,断颈处死,取肺脏,研磨后加入 1 mL 含双抗的 PBS 溶液,并移入 1.5 mL Eppendorf 管中,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,用含双抗的 PBS 溶液 10 倍倍比稀释(一般在 $0 \sim 10^6$),每个稀释度上清液经尿囊腔接种 4 枚 9~10 日龄 SPF 鸡胚(由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供)。无菌收取 48 h 以后死亡的鸡胚尿囊液,微量血凝试验检测病毒,Reed & Muench 法计算病毒滴度,对比分析。

1.7 统计学分析

数据采用 SPSS11.0 软件进行方差分析,差异显著时用 Duncan 法进行多重比较。

2 结果

2.1 H1 DNA 疫苗对小鼠的保护效力试验

2.1.1 小鼠 HI 抗体水平 H1 疫苗免疫组及对照组小鼠第 1 次免疫、第 2 次免疫及攻毒后 HI 抗体水平变化见表 1。各小组小鼠 2 次免疫后均未检测到 HI 抗体。

2.1.2 攻毒后小鼠肺脏病毒含量 H1 疫苗免疫组及对照组小鼠肺脏病毒含量见表 1。攻毒后对照组小鼠肺脏病毒含量最高,为 $(3.55 \pm 0.54) \log_{10} \text{EID}_{50} / \text{mL}$; 2 个低剂量免疫组小鼠肺脏病毒含量分别为 (1.24 ± 0.24) 和 $(1.00 \pm 0.35) \log_{10} \text{EID}_{50} / \text{mL}$,表明这 2 组实验小鼠在攻毒后第 5 天对病毒的清除能力优于对照组; 2 个高剂量免疫组小鼠攻毒后肺脏病毒含量均小于 $1 \log_{10} \text{EID}_{50} / \text{mL}$,表明此 2 组小鼠在攻毒后第 5 天对病毒的清除能力明显高于对照组。

2.1.3 H1 DNA 疫苗免疫组攻毒后小鼠体重变化 H1 疫苗免疫组小鼠体重变化见图 1。分析表明:所有免疫组与对照组差异极显著($P < 0.01$);第 1 组和第 2 组与第 3 组和第 4 组差异显著($P < 0.05$)。

2.2 H3 DNA 疫苗对小鼠保护效力试验

2.2.1 小鼠 HI 抗体水平 H3 疫苗免疫组及对照组小鼠第 1 次免疫、第 2 次免疫及攻毒后 HI 抗体水平变化见表 2。所有小组小鼠首免后均未检测到 HI 抗体,第 2 次免疫和攻毒后各免疫组 HI 抗体滴度均明显高于对照组。

2.2.2 攻毒后小鼠肺脏病毒含量 H3 疫苗免疫组及对照组小鼠肺脏病毒含量见表 2。攻毒后对照

表 1 H1 DNA 疫苗免疫及攻毒后不同时间 HI 抗体水平及攻毒后肺脏病毒含量

Table 1 Antibody titer of sura and virus titration in lung at various time after immunity and challenge

组别 Groups	首免疫苗	免疫剂量/ μg	一免后第 10 天 HI 滴度	二免疫苗	免疫剂量/ μg	二免后第 10 天	攻毒后第 10 天	攻毒后肺脏
	The vaccines of the prime	Dosage of the prime	HI antibody titer at the 10th day after prime	The vaccines of the boost	Dosage of the boost	HI 滴度	HI 滴度	病毒含量
						HI 滴度	HI 滴度	病毒含量
						at the 10th day after boost	at the 10th day after challenge	in lung after challenge
1	pCI-H1	10	0	pCI-H1	10	0	4.2±0.8	1.24±0.24
2	pCI-H1	100	0	pCI-H1	100	0	5.0±0	<1
3	pCAGGS-H1	10	0	pCAGGS-H1	10	0	5.7±1.2	1.00±0.35
4	pCAGGS-H1	100	0	pCAGGS-H1	100	0	6.7±0.6	<1
5	Control		0			0	2.7±0.6	3.55±0.54

In table 1 and 2, the antibody titer were presented as log₂ of the endpoint dilution, and the virus titration were presented as log₁₀EID₅₀ per mL

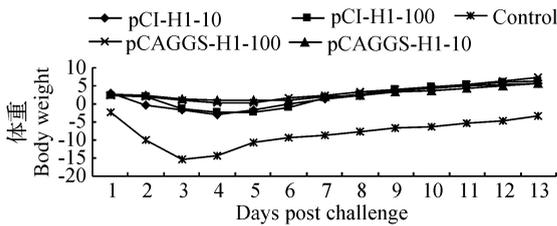


图 1 攻毒后 H1 疫苗免疫组及对照组小鼠体重变化
Fig. 1 The weight curve of control and H1 vaccines inoculated groups post challenge

组小鼠肺脏病毒含量最高,为(3.67±0.72) log₁₀EID₅₀/mL,其余各免疫组肺脏病毒含量小于 1 log₁₀EID₅₀/mL,表明免疫组小鼠在攻毒后第 5 天清除病毒的能力明显高于对照组。

2.2.3 H3 DNA 疫苗免疫组攻毒后小鼠体重变化
H3 疫苗免疫组攻毒后小鼠体重变化见图 2。分析表明:所有免疫组与对照组差异极显著($P < 0.01$);第 1 组和第 2 组与第 3 组和第 4 组差异显著($P < 0.05$)。

表 2 H3 DNA 疫苗首免、加强免疫及攻毒后 HI 抗体水平及攻毒后肺脏病毒含量

Table 2 Antibody titer after inoculation, boost and challenge and virus shedding and titration in lung after challenge

组别 Groups	首免疫苗	免疫剂量/ μg	一免后第 10 天	二免疫苗	免疫剂量/ μg	二免后第 10 天	攻毒后第 10 天	攻毒后肺脏
	The vaccines of the prime	Dosage of the prime	HI 滴度	The vaccines of the boost	Dosage of the boost	HI 滴度	HI 滴度	病毒含量
			HI antibody titer at the 10th day after prime			HI antibody titer at the 10th days after boost	HI antibody titer at the 10th days after challenge	病毒含量
								in lung after challenge
1	pCI-H3	10	0	pCI-H3	10	3.7±0.8	5.8±1.3	<1
2	pCI-H3	100	0	pCI-H3	100	4.7±0.6	7.1±1.5	<1
3	pCAGGS-H3	10	0	pCAGGS-H3	10	3.8±2.8	6.5±0.5	<1
4	pCAGGS-H3	100	0	pCAGGS-H3	100	5.6±0.6	7.5±0.6	<1
5	Control		0			0	2.1±1.1	3.67±0.72

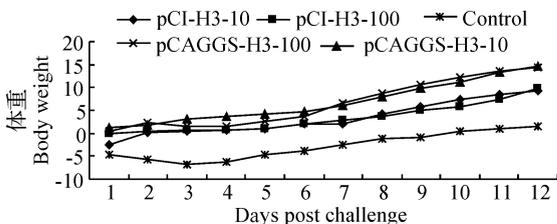


图 2 攻毒后 H3 疫苗免疫组及对照组小鼠体重变化
Fig. 2 The weight curve of control and H3 vaccines inoculated groups post challenge

3 讨论

流感病毒 HA 基因在流感病毒入侵细胞的过程中起着极为重要的作用,其产物是流感病毒最主要的保护性抗原^[11~13]。因此,在人类流感和禽流感 DNA 疫苗的研制中,HA 基因成为首选基因。本试验在查阅人类流感和禽流感 DNA 疫苗研究文献的基础上,选择以猪流感病毒 HA 基因为目的基因构建的真核表达质粒免疫 BALB/c 小鼠。与对照组

相比,免疫小鼠不仅具有较高的 HI 抗体滴度和良好的清除病毒感染的能力,而且在影响小鼠体重增减变化方面与对照组差异极显著($P < 0.01$)。表明猪流感病毒 HA 基因能够作为猪流感 DNA 疫苗的目的基因,用于猪流感 DNA 疫苗的研究,这与许多流感病毒 DNA 疫苗的研究结论相一致。

表达载体及其调控元件决定目的基因的表达效率,不同启动子的真核表达载体对免疫原基因的表达强度差异显著^[14]。因此,表达载体及其调控元件的选择及改造是提高 DNA 疫苗免疫力的有效方法。本试验选择 pCI 和 pCAGGS 作为表达载体,其中 pCI 带有巨细胞病毒(CMV)的早期启动子/增强子,并含有来源于 β 球蛋白基因的内含子序列;而 pCAGGS 则含有鸡的 β -actin 启动子和 CMV 增强子。结果显示,pCAGGS 系列的猪流感 DNA 疫苗免疫效果优于 pCI 系列的猪流感 DNA 疫苗。因此,猪流感 DNA 疫苗的进一步研究应优先选择 pCAGGS 质粒作为表达载体。

疫苗的免疫保护试验通常是以减少感染率、发病率和死亡率为指标进行评估,试验中需要现成的实验动物或本动物疾病模型。对于某些缺乏实验动物模型的疾病,上述方法存在明显缺陷。本试验所用流感病毒株 A/Swine/Guangdong/711/2001(H1N1)和 A/Swine/Fujian/668/2001(H3N2)均来源于感染猪群。这 2 株病毒对实验小鼠致病力不强,感染后一般无明显临床症状。因此,本试验以试验鼠不同时期的 HI 抗体滴度、攻毒后体重变化及肺脏病毒含量作为指标,建立了猪流感 DNA 疫苗免疫效力评价的有效方法,进而证实用本研究构建的 H1 亚型和 H3 亚型 DNA 疫苗免疫的 BALB/c 小鼠能够产生较高滴度的 HI 抗体,且免疫鼠可获得较强的清除进入体内病毒的能力。研究结果为进一步研究和开发猪流感 DNA 疫苗奠定了基础。

参考文献:

[1] 陈焕春. 规模化猪场疫病控制和净化[M]. 北京:中国农业出版社, 2001. 256~260.
[2] Bruce H J. Diagnostic tests for swine influenza[A]. Pig progress (special), Respiratory diseases [M].

2001. 32~34.
[3] 李海燕,于康震,华英佐. 猪流感病毒的种间传播及分子进化[J]. 中国兽医学报, 2004, 5(24): 304~309.
[4] Harvey R, Martin A C R, Zambon M, *et al.* Restrictions to the adaptation of influenza A virus H5 hemagglutinin to the human host[J]. J Virol, 2004, 78(1): 502~507.
[5] Ito T, Couceiro J S, Kelm S, *et al.* Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential[J]. J Virol, 1998, 72: 7 367~7 373.
[6] Allwinn R, Doerr H W. The "influenza vaccine" benefit, risk, costs[J]. Med Microbiol Immunol(Berl), 2002, 191(3-4):183~185.
[7] Ruben F L. Prevention and control of influenza. Role of vaccine[J]. Am J Med, 1987, 82: 31~34.
[8] 胡永浩. H1N1、H3N2 猪流感病毒 HA 基因 DNA 疫苗构建及免疫效力评估[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2006.
[9] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 著. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 候云德, 等译. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992. 28.
[10] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1997. 329.
[11] Macklin M D, Neumann V, Meyer T, *et al.* Immunization of pigs with a particle-mediated DNA vaccine to influenza A virus protects against challenge with homologous virus[J]. J Virol, 1998, 72(2): 1 491~1 496.
[12] Ze C, Kurata T, Tamura S. Identification of effective constituents of influenza vaccine by immunization with plasmid DNAs encoding viral proteins[J]. Jpn J Infect Dis, 2000, 53(6):219~228.
[13] Robinson H L, Hunt L A, Webster R G, *et al.* Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA[J]. Vaccine, 1994, 11: 957~960.
[14] Suarez D L, Schultz-cherry S. The effect of eukaryotic expression vectors and adjuvant on DNA vaccines in chickens using as avian influenza model[J]. Avian Disease, 2000, 44: 861~868.