

伪狂犬病新型疫苗研究进展*

廖筱萍 娄高明

(广东省农业科学院兽医研究所 广州 510640)

摘要: 伪狂犬病是多种家畜和野生动物的一种重要传染病, 给世界畜牧业特别是养猪业造成了巨大的经济损失。疫苗免疫是预防控制该病的主要手段。综述了伪狂犬病亚单位疫苗、核酸疫苗、重组疫苗、基因缺失疫苗等新型疫苗的研究进展。

关键词: 伪狂犬病, 亚单位疫苗, 核酸疫苗, 重组疫苗, 基因缺失疫苗

中图分类号: S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 06-0076-06

RESEARCH ADVANCES ON PSEUDORABIES NEW-TYPE VACCINES

LIAO Xiao-Ping LOU Gao-Ming

(*Institute of Veterinary Medicine, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640*)

Abstract: Pseudorabies is an important infectious disease for many kinds of livestock and wild animals, and causes important economics losses for pig industry. Many kinds of vaccines including attenuated live viruses or inactivated are widely used for vaccination of pigs and other animals. In the present review, research advances on pseudorabies new-type vaccines such as subunit vaccine, DNA vaccine, recombination vaccine, deletion-mutant vaccine is presented and point out the further development of the vaccine.

Key words: Pseudorabies, Subunit vaccine, DNA vaccine, Recombination vaccine, Deletion-mutant vaccine

伪狂犬病 (PR) 是由伪狂犬病病毒 (PRV) 引起多种家畜和野生动物的一种重要传染病。自然条件下约 35 种动物可感染发病。猪是该病重要的病毒贮存宿主和传染源。据报道已有 40 多个国家和地区发生过该病, 遍及欧洲、东南亚、南美洲、中美洲和非洲。我国自 1947 年首次发现本病, 现已蔓延到 20 余个省市, 给畜牧业特别是养猪业造成了巨大的经济损失。因疫苗免疫是预防该病的主要策略, 故许多国家在发展和改进现有常规疫苗的同时, 纷纷探索利用生物技术研制和开发安全有效的新型基因工程疫苗及其配套的血清学鉴别诊断方法来控制 PR^[1-3]。本文就 PR 新型疫苗研究进展作一简要综述。

1 亚单位疫苗

亚单位疫苗是将 PRV 保护性抗原基因在原核或真核系统中表达所获得的产物制成的疫苗。它有许多优点。(1) 安全性好。疫苗中不含病原微生物, 接种后不会发生急性、持续或潜伏感染, 可用于不宜使用活疫苗的某些情况, 如妊娠动物。(2) 可以减少或消除常规活疫苗或灭活疫苗难以避免的热原、变应原、免疫抑制原和其它有害的反应原。(3) 疫苗稳定性好, 便于保存和运输。(4) 产生的免疫应答可以与野毒感染所产生的应答能相区别, 有利于疫病的控制和消灭计划。(5) 可以大量生产。Marchioli

* 国家“九五”科技攻关项目 (No. 2002BA514A-16-7)

广东省自然科学基金项目 (No. 990517)

广东省科技攻关项目 (No. 2KM03507N)

收稿日期: 2001-04-20, 修回日期: 2001-10-23

等1987年利用CHO *dhfr* 细胞表达了 *gD*, 用此细胞表达产物免疫猪, 能诱导体液免疫并能保护动物抵抗强毒的攻击。

可是, 这种亚单位疫苗的产品研究和开发费用非常昂贵, 免疫原性差, 故人们将保护性抗原以多体形式组装到一种用佐剂构建的基质上, 研制出免疫刺激复合物 (ISCOM)。ISCOM 不仅是疫苗抗原的呈递者, 而且由于是佐剂, 还可呈递免疫刺激。与传统灭活疫苗仅能活化 B 细胞和辅助性 T 细胞 ($CD_4^+ T_c$) 相比, 它还能活化细胞毒性 T 细胞 ($CD_8^+ T_c$), 因此具有很强的免疫原性, 可刺激产生强烈而持久的免疫应答。ISCOM 疫苗能克服母体获得性抗体的封闭作用, 可以区分疫苗免疫动物与野毒感染动物, 具有亚单位疫苗的所有优点。Tulman 等 1994 年将提取的 PRV 囊膜蛋白 *gC* 制成亚单位疫苗 (PRV[™]/ISCOM)。免疫小白鼠和猪, 均能诱导体液免疫和淋巴细胞增殖反应。免疫两次, 能保护小白鼠免受致死量的强毒攻击。

2 核酸疫苗

核酸疫苗, 也称 DNA 疫苗, 是将外源基因克隆到表达质粒上, 直接注入到动物体内, 使外源基因在活体内表达, 产生抗原从而激活免疫力。该疫苗安全, 因制苗不需要病原微生物并且不残留在疫苗中。与主要刺激体液免疫应答反应的灭活疫苗或亚单位疫苗相比, DNA 疫苗表达的抗原是通过刺激 I 类 MHC 分子和 II 类 MHC 分子进行抗原呈递的, 能高效诱导体液免疫与细胞免疫应答, 并能很有效地诱导专一性 T 杀伤细胞的能力而没有副作用, 但还需要大量的基础性研究。Gerdtis 等^[4]将 PRV *gC* 或 *gD* 置于人巨细胞病毒的主要立即早期启动子控制下构建了 DNA 疫苗。用表达 *gC* 的核酸疫苗免疫能完全保护猪抵抗 PRV 75V19 毒株的致死性攻击, 并能保护猪部分抵抗 PRV 强毒 NIA-3 株的攻击; 但用表达 *gD* 的核酸疫苗免疫却不能保护猪抵抗 PRV 强毒株的攻击。用 $1\mu\text{g}$ 的 *gC* 核酸疫苗肌肉或皮下免疫 3 次, 血清阳转并能部分保护猪抵抗 NIA-3 毒株致死性攻击。免疫后特异性抗体至少能持续 9 个月以上。另外, 能检测到针对 *gC* 的特异性细胞免疫应答。进一步实验, Gerdtis 等 1999 年发现含 PRV *gB*、*gC*、*gD* 或 *gE* 基因的 DNA 疫苗免疫效果优于灭活疫苗, 但不如弱毒疫苗。提示在不能用弱毒疫苗的情况下, 可用 DNA 疫苗替代。Haagmans 等 1999 年利用表达 PRV-*gD* 基因的质粒免疫小鼠与猪, 能诱导血清中和抗体与淋巴细胞增殖反应。Takada 等 1999 年利用含 *gB* 基因的 DNA 疫苗鼻内免疫, 小鼠能产生分泌性抗体并能抵抗强毒的攻击。van Rooij 等^[5]用含 PRV-*gB*、*gC* 或 *gD* 基因的 DNA 疫苗免疫猪, 含 PRV-*gB* 基因的 DNA 疫苗能诱导最强的细胞介导免疫应答 (包括细胞毒性 T 细胞应答), 而含 PRV-*gD* 基因的 DNA 疫苗却能诱导最强的中和抗体应答。同时前者能减少攻毒猪排毒时间, 而 *gC* 或 *gD* 的质粒却不能。Shiau 等 2001 年利用大肠杆菌作载体将含有 PRV *gD* 基因的 DNA 疫苗免疫, 小鼠能产生特异性抗体应答并能抵抗 PRV 强毒的攻击。如与含 α -胸腺素原基因的 DNA 疫苗同时免疫, 则有协同作用, 能增强细胞免疫应答。Shiau 等 2001 年进一步利用含有 PRV *gD* 基因的猪霍乱沙门菌弱毒株进行口服免疫小鼠, 发现能产生抵抗 PRV 强毒攻击的免疫应答。如与含 α -胸腺素原基因的猪霍乱沙门菌弱毒株同时免疫, 则能提高疫苗的免疫效果。Somasundaram 等 1999 年发现猪细胞因子 GM-CSF 能增强 PRV *gB* 和 *gD* 基因的 DNA 疫苗的免疫效果, 而猪细胞因子 IL-2 和 α -INF 却不能。

3 重组疫苗

3.1 以腺病毒为载体的重组 PRV 疫苗 腺病毒作载体具有成本低、宿主细胞种类广泛、能诱导粘膜免疫等优点。Eloit 等 1990 年将 PRV *gD* 基因克隆到 5 型腺病毒中构建重组腺病毒, 免疫小鼠和兔后能够诱导产生抗 *gD* 抗体, 并能使动物抵抗强毒的攻击。Reddy 等 1999 年将 PRV *gD* 基因克隆到猪腺病毒 3 型的 E3 区域构建了重组腺病毒。另外, Hammond 等^[6] 构建了表达 PRV *gD* 基因的重组猪腺病毒。

3.2 以痘苗病毒为载体的重组 PRV 疫苗 痘病毒作载体具有插入外源 DNA 容量大、操作方法简便、病毒较稳定等优点。Marchioli 等 1987 年构建了表达 PRV *gD* 的重组痘苗病毒, 免疫小白鼠有一定的保护作用。Riviere 等 1992 年构建了表达 *gB*、*gC*、*gD*、*gB/gC*、*gB/gD*、*gB/gC/gD* 几株重组痘苗病毒。用它们免疫小鼠和猪均能保护它们免受强毒的攻击。Brockmeir 等 1993 年利用高度减毒的痘苗病毒 NYVAC 株作载体构建了表达 *gB*、*gC*、*gD* 的重组痘苗病毒, 免疫后可以保护猪抵抗强毒株的攻击。娄高明等^[7] 利用痘苗病毒天坛 761 株构建了表达 *gD* 的 3 株重组痘苗病毒 V-50A、V-50B、V-50C, 用 ELISA 能检测到特异性抗原表达。

3.3 以猪痘病毒为载体的重组 PRV 疫苗 猪痘病毒基因组容量大, 可插入较大的外源基因。猪是唯一的宿主, 具有宿主特异性, 接种后不散毒, 安全。van der Leek 等 1994 年将 *gD/gI* 置于痘苗病毒 p7.5 启动子控制下插入猪痘病毒胸苷激酶 (*TK*) 基因中构建了重组猪痘病毒。免疫 21d 后, 人工划痕或肌肉接种分别有 90% 和 100% 猪产生中和抗体。用强毒攻击, 能明显减少临床症状和强毒排出。重组病毒也不能传播给与之接触的动物。血清中和抗体能持续 150d, 当再次接种时所有免疫猪均有记忆应答力。

3.4 以其他疱疹病毒为载体的重组 PRV 疫苗 Kit 等 1992 年利用缺失 *TK* 基因的牛传染性鼻气管炎病毒 (BHV-1) 作载体表达 PRV 糖蛋白 *gC* 基因, 表达产物可用于 *gC*-ELISA 鉴别诊断试剂盒作包被抗原。Otsuka 等^[8] 利用缺失 *TK* 基因的 BHV-1 作载体表达 *gB*、*gC*、*gD* 和 *gE* 单个或多个联合基因, 构建了 BHV-1 重组疫苗。用重组病毒免疫小鼠后 3 周攻毒, 结果表达 *gC/gD/gE/gI* 的重组病毒 BHV-1/TF7-1 能保护小鼠分别抵抗 20 个 (小白鼠存活 7/7) 和 100 个 (小白鼠存活 6/7) LD_{50} 的强毒攻击, 而对照组小鼠全部死亡。而表达其他单个 PRV 基因的重组病毒免疫效果不如表达 PRV *gB* 基因的重组病毒 (BHV-1/TF6-1) 免疫效果好。实验发现 BHV-1/TF6-1 诱导小鼠产生的血清中和抗体滴度最高, 而 BHV-1/TF7-1 诱导小鼠产生的血清中和抗体滴度反而低些。Nishikawa 等 1999 年利用犬疱疹病毒 (CHV) 表达 PRV *gB* 基因。用重组 CHV 免疫小鼠能产生中和 PRV 感染的抗体。

3.5 以伪狂犬病毒为载体的重组 PRV 疫苗 PRV 作载体除具有痘病毒载体的某些优点, 还有自身的独特优势。(1) PRV 基因组大, 具有许多复制非必需区, 能插入一种或多种重要传染病病原保护性基因, 构建多联 (价) 重组 PRV 活疫苗, 有助于兽医工作者实现“一针预防多病”的梦想。(2) 删除毒力基因的 PRV 活载体疫苗可同时启动机体细胞免疫和体液免疫, 避免了灭活苗免疫的缺点, 又无常规活苗毒力返祖之虞, 安全性好。(3) PRV 在动物和细胞中具有广泛的宿主范围, 但对人类无致病性。自 1987 年以来, 国外某些实验室先后利用 PRV 基因缺失株作载体, 成功地表达了猪瘟疫病毒 (HCV) *E1* 基因等。Van Zijl 等^[9] 成功地构建了表达 HCV *E1* 基因的重组 PRV 疫苗株。

重组病毒免疫后,保护猪不仅能抵抗 PRV 攻毒,而且能抵抗 HCV 致死性的攻毒。因此用一种病毒疫苗能够预防猪的两种重要的病毒性疾病。Mulder 等 1994 年将 HCV E1 基因插入到有毒力与无毒力的 PRV 毒株的 *gG* 基因中,构建了重组病毒 M205 株 ($gE^- / TK^- / gG^+ / E1^+$)。并与 M206 株 ($gE^- / TK^- / gG^-$) 比较其对猪、兔、仓鼠、小白鼠、恒河猴等动物和细胞的亲嗜性与毒力,结果均没有发现变异。Peeters 等^[10]利用缺失 gD^- / gE^+ 突变株构建了表达 HCV E2 基因的重组 PRV 疫苗株。用这种重组病毒免疫,保护猪不仅能抵抗 PRV 攻毒,而且能抵抗 HCV 致死性的攻毒。这种疫苗免疫动物后能用血清学鉴别诊断方法 *gE*-ELISA 区分开。目前利用 PRV 作活疫苗载体,构建能表达如猪轮状病毒、传染性胃肠炎病毒或猪流感病毒保护性抗原基因的多联(价)重组伪狂犬病病毒作活疫苗,用于动物传染病的预防,已成为动物医学研究中的一个热点。

4 基因缺失疫苗

随着 PRV 分子生物学特性研究的深入,人们发现了许多与病毒毒力有关的基因如 *TK* 基因、蛋白激酶 (*PK*) 基因、核苷酸还原酶基因、脱氧尿苷三磷酸水解酶 (*dUTPase*) 基因、尿嘧啶糖基化酶基因、碱性核酸酶基因和其它一些糖蛋白如 *gE*、*gB*、*gI* 等基因,删除或缺失这些毒力基因将明显降低病毒的毒力而仍保持较好的免疫原性。目前已研制出许多 PRV 基因缺失标记疫苗。

4.1 单基因缺失疫苗 (1) *TK* 基因缺失疫苗: Kit 等^[11]利用 BUK 株为亲本筛选出 *TK* 缺失 148bp 的 BUKd3 疫苗株。该疫苗株是稳定的 TK^- 变种,即使在选择培养基中也不回复为 TK^+ 。对鼠和兔毒力大为减退,并能引起鼠、兔和猪的坚强保护力,能抵抗 TK^+ BUK 株或其他 PRV 强毒的攻击,并减少攻击用强毒株的排出。该毒株于 1986 年被美国批准为上市的第一个基因工程疫苗。王琴等^[12]构建了 PRV 闽 A 株 TK^- 基因缺失株,免疫小鼠有一定保护作用。

(2) *gM* 基因缺失疫苗: *gM* 蛋白由 *UL10* 编码,是 PRV 的一个非必需糖蛋白。Dijkstra 等 1997 年将报告基因 *LacZ* 插入 PRV Ka 株构建了 gM^- 缺失株。用它鼻内免疫接种 6 周龄猪,其排毒量比接种野毒的对照猪减少 100 倍左右,能够保护猪抵抗强毒的攻击。

(3) *dUTPase* 基因缺失疫苗: *dUTPase* 由 *UL50* 编码,是 PRV 的一个主要毒力酶蛋白。Jons 等 1996 年将报告基因 *LacZ* 插入 PRV Ka 株构建了 $UL50^-$ 缺失株。用它免疫能够保护猪抵抗致死量的强毒攻击。

(4) *LLT* 基因缺失疫苗: Dean 等 1996 年将报告基因 *LacZ* 插入 PRV Indiana-Funkhauser 株构建了 LLT^- 缺失株。鼻内免疫接种 4 日龄与 4 周龄猪,与亲本相比,证明其毒力明显降低。

(5) *PK* 基因缺失疫苗: 蛋白激酶由 *US3* 编码。Kimman 等 1994 年证明 $US3^-$ 缺失株对猪的毒力明显降低。

(6) *RR* 缺失疫苗: *RR* 由大小亚基组成。大亚基 *RR1* 由 *UL39* 编码,小亚基 *RR2* 由 *UL40* 编码。Wind de 等^[13]利用 PRV NIA-3 株为亲本构建了 RRI^- 单基因缺失株与 RRI^- / gE^- 双基因缺失株。这两个缺失株对小鼠和猪无毒力。免疫接种猪排毒量减少,可产生中和抗体,并能保护猪抵抗强毒的攻击,其效果类似于某些目前市售的疫苗。尽管 RR^- 缺失株诱导的免疫效果不如 TK^- 缺失株,但 RR^- 缺失株不排毒,优于 TK^- 缺

失株,因此作为疫苗将是一个非常明显的优势。

除了上述缺失株外,还构建了 *ULI3* (编码碱性核酸酶) 缺失株等。它们毒力均明显降低,对动物具有较好的保护作用。其中有的显示出良好的苗头,可望成为新一代基因缺失疫苗的候选者。

4.2 双/多基因缺失疫苗 (1) TK^-/gC^- 双基因缺失疫苗: 推广 *PRV BUKdI3* 基因缺失疫苗时,发现该疫苗免疫效果虽好,但不能用血清学方法区别免疫接种猪与自然感染猪,给检疫工作带来困难。故 *Ku* 等 1985 年在 *BUKdI3* 的基础上进行第二次缺失,构建了缺失 TK^-/gC^- 双基因缺失株。疫苗免疫后,猪体内不产生抗 *gC* 抗体,用 *gC-ELISA* 可以区分疫苗接种动物与野毒感染动物,有利于检疫工作的开展。

(2) TK^-/gG^- 双基因缺失疫苗: *Marchioli* 等 1987 年利用一株碘脱氧腺苷抗性突变株 *HR* (TK^-) 作亲本构建了 TK^-/gG^- 双基因缺失株。该基因缺失株 *TK* 基因缺失 276 bp,对猪、鼠和绵羊无致病性,对山羊有中等毒力 (1/12),对人 (3/6)、猫 (2/6) 有较强的致病力。用 *gG-ELISA* 可以区分疫苗接种动物与野毒感染动物。

(3) TK^-/gE^- 双基因缺失疫苗: 利用 *NIA-3* 和 *NIA-4* 作亲本, *Quint* 等^[14] 和 *Van Oirschot* 等^[15] 分别构建了 TK^-/gE^- 双基因缺失株并建立了血清学鉴别诊断方法 *gE-ELISA*。该疫苗对猪、牛、羊均安全,不产生潜伏感染。

(4) $TK^-/gC^-/gE^-$ 三基因缺失疫苗: *Van Oirschot* 等 1991 年构建了 $TK^-/gC^-/gE^-$ 基因缺失株。

(5) $gG^-/gE^-/gI^-/gC^-$ 四基因缺失疫苗: *Mettenleiter* 等 1990 年构建了 $gG^-/gE^-/gI^-/gC^-$ 四基因缺失株。它对 6 周龄仔猪完全无毒,免疫接种仍使猪获得对强毒攻击的保护。

另外,颜其贵等^[16] 构建了 *PRV* 闽 A 株 gC^-/gE^- 双基因缺失株,目前已成功地研制出 $TK^-/gI^-/gE^-$ 三基因缺失疫苗株及其配套的血清学鉴别诊断试剂盒^[17],预测不久能投入生产应用。*Peeters* 等 1994 年构建了 gD^- 和 gD^-/gI^- 缺失突变株。它们的毒力均比亲本毒力低,能通过表型互补建立感染,但只能通过直接的细胞间扩散,不能引起传播。对接种猪能产生明显的保护性,证明 gD^- 和 gD^-/gI^- 缺失突变株是一种安全、不散毒的活疫苗,也可作为安全表达异源基因产物的活载体疫苗。

5 展望

基因缺失疫苗免疫动物,可以克服常规疫苗的诸多缺点,有利于 *PR* 的流行病学、免疫防制和根除措施的研究。而且某些国家应用基因缺失疫苗免疫动物,并结合鉴别诊断方法已成功地根除了 *PR*。可是,事实证明单一地运用疫苗不能控制和消灭该病,只有结合应用特异性强、敏感性高、快速和简便的实验室诊断方法进行检疫、隔离和淘汰病猪,净化猪群,才能彻底根除该病。据目前所知, TK^-/gE^- 突变株免疫效果最好。但是,如果长时间广泛应用 gE^- 疫苗株免疫猪群后仍不能消灭 *PRV* 强毒,则不排除研制其他的缺失株用于免疫接种。目前,本课题组正在尝试利用转基因植物(如玉米、西红柿、马铃薯等)生产预防伪狂犬病的新型疫苗。在进一步揭示 *PRV* 基因组结构和功能、基因表达调控及其诱导机体免疫应答机理的基础上,构建新基因缺失突变疫苗株和发展双价或多价重组活疫苗将是今后 *PRV* 基因工程新型疫苗发展的主要方向。

参 考 文 献

- [1] 娄高明, 郭万柱, 徐兰芳. 集约化养猪技术与疾病防治. 长春: 吉林科学技术出版社, 1998. 441~442.
- [2] 娄高明, 费恩阁, 杜伟贤. 预防兽医学进展, 1999, 1(4): 9~13.
- [3] Mengeling W L, Brockmeier S L, Lager K M, et al. *Vet Microbiol*, 1997, 55(1~4): 49~61.
- [4] Gerds V, Jons A, Makoschey B, et al. *J Gen Virol*, 1997, 78: 2139~2146.
- [5] van Rooij E M, Haagmans B L, Glansbeek H L, et al. *Vet Immunol Immunopathol*, 2000, 74(1~2): 121~136.
- [6] Hammond J M, Jansen E S, Morrissy C J, et al. *Vaccine*, 2001, 19(27): 3752~3758.
- [7] 娄高明, 郭万柱, 韩素文, 等. 中国兽医学报, 1996, 16(3): 226~233.
- [8] Otsuka H, Xuan X N, Shibata I, et al. *J Vet Med Sci*, 1996, 58(9): 819~824.
- [9] van Zijl M, Wensvoort G, de Kluyver E, et al. *J Virol*, 1991, 65: 2761~2765.
- [10] Peeters B, Rienkouska-Szewczyk K, Hulst M, et al. *J Gen Virol*, 1997, 78: 3311~3315.
- [11] Kit S, Kit M, Pirtle E C. *Am J Vet Res*, 1985, 46(6): 1359~1367.
- [12] 王 琴, 郭万柱, 娄高明, 等. 病毒学报, 1996, 12(4): 348~354.
- [13] de Wind N, Berns A, Gielkens A, et al. *J Gen Virol*, 1993, 74: 351~359.
- [14] Quint W G V, Gielkens A L J, Berns A J M, et al. *J Gen Virol*, 1987, 68: 532~534.
- [15] Van Oirschot J T, Terpstra C, Moormann R J M, et al. *Vet Rec*, 1990, 127: 443~446.
- [16] 颜其贵, 郭万柱, 王 琴, 等. 畜牧兽医学报, 1997, 28(6): 562~566.
- [17] 陈 陆, 郭万柱, 徐志文, 等. 中国预防兽医学报, 2000, 22(增刊): 153~156.