

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*

49(5) 653-657; 4 May 2009

ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q

http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

## 表达 H3N2 亚型猪流感病毒血凝素蛋白的重组腺病毒在猪体内的免疫试验

汪思钧<sup>1,2#</sup>, 亓文宝<sup>1#</sup>, 徐成刚<sup>1</sup>, 罗开健<sup>1</sup>, 张桂红<sup>1</sup>, 叶贺佳<sup>1</sup>, 廖明<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 华南农业大学兽医学院, 广州 510642)

(<sup>2</sup> 深圳出入境检验检疫局, 深圳 518010)

**摘要** 【目的】本研究旨在评价表达 H3N2 亚型猪流感病毒血凝素蛋白的重组腺病毒在猪体内的免疫效果。【方法】以  $10^{-8}$  TCID<sub>50</sub>、 $2 \times 10^{-8}$  TCID<sub>50</sub> 和  $4 \times 10^{-8}$  TCID<sub>50</sub> 的剂量经肌肉注射接种后 2 到 6 周每周检测血凝抑制 (HI) 抗体, 比较肌肉注射、滴鼻、灌胃 3 种接种途径对仔猪免疫效果的影响, 并通过攻毒保护试验进一步考察重组腺病毒 rAd-HA-GFP 在猪体内的免疫效力。【结果】以不同的剂量分别经肌肉注射免疫后, HI 抗体水平与接种剂量呈正相关。3 种接种途径均能刺激仔猪产生特异性抗体, 肌肉注射组的 HI 抗体要高于其他 2 组, 差异显著 ( $P < 0.01$ )。通过滴鼻和肌肉注射方式进行攻毒后, 阴性对照组仔猪在攻毒 2 d 后出现体温升高、打喷嚏、咳嗽、流鼻涕、精神沉郁、体重减轻等症状, 而各免疫组仔猪未观察到明显的临床症状, 各免疫组的病毒分离率也明显低于阴性对照组。【结论】重组腺病毒 rAd-HA-GFP 诱导的 HI 抗体达到 1:320 可以有效抵抗 H3N2 亚型猪流感病毒的侵袭, 可以作为候选疫苗株。

**关键词:** H3N2 亚型猪流感病毒; 血凝素蛋白; 重组腺病毒

中图分类号: R392 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)05-0653-05

猪流感 (Swine influenza, SI) 是由猪流感病毒 (Swine influenza virus, SIV) 引起的一种急性、热性、高度接触性呼吸道传染病。由于猪呼吸道上皮细胞表面同时具有人流感和禽流感病毒受体<sup>[1]</sup>, 猪是流感病毒发生基因重排和重组的重要场所, 因此 SI 在流感病毒的流行病学研究及“禽-猪-人”种间传播中有着特殊地位和作用<sup>[1-2]</sup>。近年来的流行病学调查表明, SI 的流行日趋严重, 对养猪业及公共卫生安全造成了巨大威胁<sup>[3]</sup>。

疫苗接种是预防 SI 的主要手段之一。SI 灭活

疫苗免疫效果显著, 但也存在着不少缺点, 如难以诱导黏膜免疫及细胞免疫应答, 接种疫苗对猪应激较大, 伴有肌痛, 偶尔会出现对杂蛋白的过敏反应等。而采用弱毒疫苗又存在疫苗株毒力返强、引发安全性问题的可能<sup>[4]</sup>。

腺病毒载体是一种安全性好、能高效表达、具有生物学活性产物的真核表达载体, 与其他表达系统相比有着突出的优势, 近年来在基因治疗及基因工程疫苗研制中发展迅速<sup>[5-6]</sup>。以重组腺病毒介导表达的口蹄疫病毒囊膜蛋白<sup>[7]</sup>、爱滋病病毒 Env 抗

基金项目: 新世纪优秀人才支持计划 (NCET-06-0752); 广东省自然科学基金创新团队项目 (5200638); 国家“863 计划” (2006AA10A204); 教育部创新团队项目 (IRT0723); 广东省科技计划项目 (2005A20901003, 2006B21101001, 2006B0152)

\* 通信作者。Tel: +86-20-85280240; Fax: +86-20-85280242; E-mail: mliao@scau.edu.cn

作者简介: # 并列第一作者。汪思钧 (1980-) 男, 广东梅州人, 硕士, 从事动物传染病研究, E-mail: wangwang101@163.com; 亓文宝 (1979-) 男, 山东莱芜人, 博士, 从事动物传染病研究, E-mail: qiwenbao@163.com

收稿日期: 2008-11-04; 修回日期: 2009-01-17

原<sup>[8]</sup>等都在啮齿类动物中诱导产生了特异性免疫反应。SIV的血凝素(hemagglutinin, HA)是诱导机体产生体液免疫的主要表面抗原,产生的抗体能中和病毒的感染能力,并能诱导细胞毒性T淋巴细胞反应。我们在成功构建表达H3N2亚型SIV HA基因的重组腺病毒的基础上,在猪体内进行了一系列的试验,为SI基因工程疫苗的研制奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试验材料、病毒和细胞:**双表达H3N2 SIV HA蛋白和绿色荧光蛋白的重组腺病毒 rAd-HA-GFP、表达绿色荧光蛋白的重组腺病毒 rAd-GFP 为华南农业大学禽病室构建(AdenoVator™ Vector System,包括穿梭载体 pAdenoVator-CMV5-IRES-GFP、腺病毒基因组骨架质粒 pAdenoVator ΔE1/ΔE3 购于加拿大 Q-biogene 公司)。猪流感病毒 A/Swine/Guangdong/1/2003(H3N2)以下简称 SIV-H3N2 株)由华南农业大学禽病室提供。40日龄流感抗体阴性断奶长白仔猪购于中山农牧总公司。9~11日龄 SPF 鸡胚购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**限制性内切酶 *Pme* I、*Pac* I 为 New England Biolabs 公司产品,限制性内切酶 *Bgl* II、DNA Marker DL2000、T4 DNA 连接酶为宝生物(大连)公司产品。DMEM 细胞培养基和胎牛血清为 Gibco 公司产品。受体破坏酶购于中国疾病预防控制中心。SIV-H3N2 阳性血清由华南农业大学禽病研究室提供。超纯水制备系统购自 CPMQ004RI MILLIPORE 公司,倒置显微镜购自 Olympus 公司, Allegra™ 64R centrifuge 台式高速冷冻离心机购自 BECKMAN 公司。

### 1.2 免疫用重组腺病毒 rAd-HA-GFP 的制备

免疫用重组腺病毒 rAd-HA-GFP 的制备见参考文献[9]。用有限稀释法进行滴度测定。免疫接种前将重组腺病毒 rAd-HA-GFP 和腺病毒 rAd-GFP 的病毒滴度稀释为  $1 \times 10^{-8}$  TCID<sub>50</sub>/mL。

### 1.3 不同接种剂量的免疫效果试验

将 20 头 40 日龄长白仔猪随机分为 4 组,5 头/组,第 1、2、3 组分别经肌肉注射接种 1 mL/头、2 mL/头、4 mL/头重组腺病毒 rAd-HA-GFP,第 4 组为接种 2 mL/头腺病毒 rAd-GFP 的阴性对照组。免疫后第 2 周到第 6 周,每周经前腔静脉采血,用血凝抑制试验(hemagglutination inhibition, HI)检测血清中特

异性抗体滴度,试验方法参照文献[10]。计算各组 HI 滴度几何平均值,采用 SPSS 软件进行 SNK 多重级差分析。

### 1.4 不同接种途径对仔猪免疫效果的影响

将 20 头 40 日龄仔猪随机分为 4 组,5 头/组。第 1、2、3 组分别经肌肉注射、灌胃、滴鼻途径接种重组腺病毒 rAd-HA-GFP,接种剂量为 2 mL/头。第 4 组为肌肉注射重组腺病毒 rAd-GFP 的阴性对照组,接种剂量为 2 mL/头。免疫 14 d 后,采血检测 HI 抗体滴度,计算各组 HI 滴度几何平均值。

### 1.5 HI 抗体水平和中和抗体水平的关系

取 HI 抗体滴度为 1:80、1:160、1:320、1:640 的免疫猪血清各 2 份,分别进行鸡胚中和试验,检测免疫血清的中和抗体效价。方法参照文献[11],采用固定病毒-稀释血清法,按 Reed-Muench 法计算各份免疫血清的鸡胚半数保护量。

### 1.6 攻毒保护试验

将重组腺病毒 rAd-HA-GFP 经肌肉注射接种 40 头 40 日龄仔猪,4 mL/头。同时设立注射重组腺病毒 rAd-GFP 的阴性对照组 5 头,4 mL/头。选取 HI 抗体滴度分别为 1:80、1:160、1:320 及重组腺病毒 rAd-GFP 免疫的阴性对照组的仔猪各 5 头,通过滴鼻(1 mL/头,  $10^{-7.3}$  EID<sub>50</sub>/0.2 mL)和肌注(1 mL/头)SIV-H3N2 毒株进行攻毒。攻毒后 14 d 内每天观察临床症状。攻毒后第 2、4 和 6 天测量体温,同时棉拭子采集鼻分泌物,经双抗感作后,离心取上清,每个样品接种 3 个 SPF 鸡胚。37℃ 培养 72 h 后,收取尿囊液,检测其血凝滴度,并用标准阳性血清(H1、H3、H5、H9)做 HI 试验,对分离到的病毒进行鉴定。攻毒后第 14 天,采血检测 HI 抗体,计算各组 HI 滴度几何平均值。

## 2 结果

### 2.1 不同接种剂量的免疫效果试验

如图 1 所示,重组腺病毒 rAd-HA-GFP 以不同剂量接种仔猪,14 d 后各组猪只都检测到了特异性抗体。接种剂量为 2 mL/头和 1 mL/头的试验组 HI 抗体水平差异不显著( $P > 0.05$ )。而接种剂量为 4 mL/头的试验组诱导的 HI 抗体水平明显高于其他 2 组,差异显著( $P < 0.01$ )。

### 2.2 不同接种途径对仔猪免疫效果的影响

如图 2 所示,采用肌肉注射、滴鼻、灌胃 3 种接种途径均能刺激仔猪产生特异性抗体。肌肉注射组的 HI 抗体要高于其他 2 组,差异显著( $P < 0.01$ )。

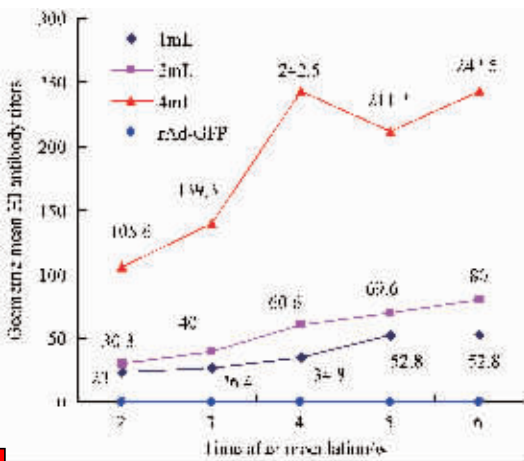


图1 不同剂量接种 rAd-HA-GFP 诱导的 HI 抗体水平

Fig. 1 The HI antibodies of rAd-HA-GFP.

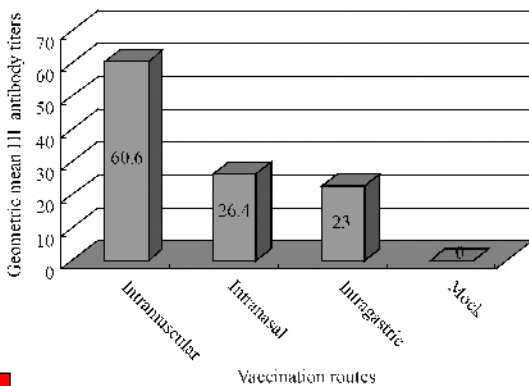


图2 各组仔猪 HI 抗体几何平均值

Fig. 2 The average titer of HI antibodies in four groups of swines.

### 2.3 HI 抗体水平和中和抗体水平的相关性

不同 HI 抗体滴度的血清都检测到了针对 SIV 的特异性中和抗体(见表 1)经直线回归分析表明, HI 抗体滴度和中和抗体滴度呈正相关关系, 相关系数为 0.97。

表 1 各 HI 抗体滴度对应的中和抗体滴度

Table 1 The relationship between HI titer and neutralization titer

HI titer	Neutralization titer
1:80	1:188.4
1:160	1:398.2
1:320	1:466.4
1:640	1:784.7

### 2.4 攻毒保护试验

仔猪攻毒保护试验结果见表 2。在观察期间, 阴性对照组仔猪在攻毒 2 d 后有 4 头体温升高, 出现喷鼻、咳嗽、流鼻涕等症状, 精神沉郁, 常俯卧在地。相比之下, 各免疫组未观察到明显的临床症状, 仅见 HI 抗体 1:80 组在攻毒后 2 d 有一仔猪体温超过 40℃。从病毒分离率来看, 各免疫组的情况也明显低于阴性对照组。攻毒 14 d 后阴性对照组明显

比免疫组消瘦, 检测 HI 抗体, 可见 1:80 组的 HI 抗体显著提高, 而 1:160 组及 1:320 组则无显著提高, 表明 SIV 在这 2 组仔猪体内的复制受到了有效的抑制。

表 2 H3N2 SIV 攻毒后的实验结果

(体温超过 40℃ 判为高热)

Table 2 Protective response in swine challenged with H3N2 SIV

Group	Days post challenge/d	Swines with a higher temperature	The rate of virus isolation	HI antibodies in swines challenged with SIV
1:80	2	1/5	1/5	
	4	0/5	1/5	1:970.0
	6	0/5	0/5	
1:160	2	0/5	1/5	
	4	0/5	0/5	1:211.1
	6	0/5	0/5	
1:320	2	0/5	0/5	
	4	0/5	0/5	1:367.6
	6	0/5	0/5	
Negative control	2	4/5	4/5	
	4	4/5	4/5	1:105.6
	6	2/5	3/5	

## 3 讨论

总的来说, 上述试验结果显示重组腺病毒 rAd-HA-GFP 诱导仔猪产生了显著的免疫保护效应, 具有良好的免疫学活性。目前检测流感抗体水平的方法有很多种, 其中 HI 一直被认为是一种经典的方法。一般认为, 在流感病毒变异性不大时, 血清的 HI 抗体水平能大体上反映动物免疫水平, 抗体水平与免疫保护力在一定范围内呈正相关。从本研究的试验结果来看, 在重组腺病毒 rAd-HA-GFP 以不同剂量接种仔猪 14 d 后, 猪体内都检测到了 HI 抗体。其中, 高剂量接种组的抗体显著高于低剂量接种组, 在一定范围内接种剂量和抗体水平呈正相关关系。通过不同 HI 滴度血清的鸡胚中和试验, 证实了 HI 抗体水平与中和抗体水平之间呈正相关关系, 对今后流感抗体、免疫状态的评价有一定的意义。有必要通过更加细化的试验, 来确定对不同日龄的猪的最佳免疫剂量。

流感是一种呼吸道疾病, 病毒首先感染的是上呼吸道的上皮细胞, 主要侵害的也是呼吸系统。这正是需要第一道免疫防御的“侵入门户”<sup>[12]</sup>。然而现行疫苗不能在黏膜表面诱导产生分泌型抗体, 和感染恢复所需要的细胞介导的免疫应答。这是宿主对感染的典型应答, 理想的疫苗应当能诱导这种免疫应答。腺病毒的自然感染部位就是呼吸道和消化

道<sup>[13]</sup>。国内外报道过许多尝试经口服及滴鼻进行重组腺病毒的免疫的研究<sup>[14]</sup>。在本研究中,对仔猪的免疫试验表明,通过灌胃、滴鼻途径接种重组腺病毒,都能诱导仔猪产生明显的免疫应答,只是在血清中的循环抗体较肌注组为低。其原因可能是在呼吸道和消化道存在非特异性免疫应答机制,对重组腺病毒的吸收造成了影响。考虑到养猪业的实际情况,采用饮水给药或者喷雾给药进行 SI 的免疫防制更有着突出的优势,可以减少或消除接种疫苗对猪造成的应激,方便操作、减少工作量,避免仔猪可能出现的过敏情况等。因此,加快口服型、喷雾型 SI 疫苗的开发有着重大意义。

Durrwald 等认为 HI 抗体效价在 1:40~1:80 时,能产生部分临床保护,可发病,肺部少量病毒复制,受到重复刺激后抗体应答强烈;HI 抗体效价在 1:80~1:320 时,能产生临床保护,不发病或轻微发病,受到重复刺激后抗体应答强烈;HI 抗体效价高于 1:320 时,完全保护,不发病,无病毒复制<sup>[15]</sup>。为进一步评价重组腺病毒 rAd-HA-GFP 对仔猪的免疫效应,并考察 HI 抗体水平和免疫保护力的相关性,本研究在免疫 14 d 后选取了 HI 抗体为 1:80、1:160、1:320 的 3 组仔猪,对其进行了攻毒保护试验。试验结果与上述报道基本一致。在阴性对照组仔猪出现咳嗽、流涕、体温升高等流感症状的情况下,各免疫组都未出现临床症状(除 1:80 组在攻毒后 2 d 出现过 1 次体温升高)。从病毒分离率、体温升高比例、临床症状来看,各免疫组都得到了较好的保护。其中抗体水平 1:160 组和 1:320 组在攻毒 2 周后没有明显升高,表明病毒在体内的复制得到了有效的抑制。

本研究结果为 SI 腺病毒活载体疫苗的研究提供了初步的技术资料,证实该重组病毒疫苗具有良好的生物学功能,肌肉注射方式能诱导机体产生特异性的 HI 抗体和中和抗体,攻毒保护试验也证实该重组病毒疫苗诱导的免疫反应能有效保护仔猪抵抗 SIV 的侵袭;通过滴鼻、灌胃途径接种重组病毒,也能有效刺激猪体产生 HI 抗体。下一步的研究重点主要是根据重组病毒活载体疫苗的特点来确定恰当的免疫程序,选择最佳的接种途径、剂量,确定产生有效免疫保护力的时间和抗体持续期,为 SI 的免疫防制开辟新的途径。

## 参考文献

[ 1 ] Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ. Influenza in pigs and

their role in the intermediate host. London: Blackwell Science, 1998: 137-145.

- [ 2 ] 崔尚金,李建伟,金红. 中国 H3 亚型流感病毒生态学及分子进化的研究. 中国预防兽医学报( *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine* ) 2002 24( 2 ): 144-146.
- [ 3 ] Ito T, Couceiro JN, Kelm S, et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A virus with pandemic potential. *Journal Virology*, 1998, 72: 7367-7373.
- [ 4 ] 汪思钧,廖明,任涛等. 表达猪流感病毒血凝素基因的重组腺病毒的构建及免疫原性分析. 畜牧兽医学报( *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica* ), 2007 ( 01 ): 78-83.
- [ 5 ] Toro H, Tang DC, Suarez DL, et al. Protection of chickens against avian influenza with non-replicating adenovirus-vectored vaccine. *Vaccine*, 2008, 26: 2640-2646.
- [ 6 ] Toro H, Tang DC, Suarez DL, et al. Protective avian influenza in ovo vaccination with non-replicating human adenovirus vector. *Vaccine*, 2007, 25( 15 ): 2886-2891.
- [ 7 ] Mayr GA, Chinsangaram J, Grubman MJ. Development of replication-defective adenovirus serotype 5 containing the capsid and 3C protease coding regions of foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate. *Virology*, 1999, 263: 496-506.
- [ 8 ] Pinto AR, Fitzgerald JC, Gao GP, et al. Induction of CD8 + T cells to an HIV-1 antigen upon oral immunization of mice with a simian E1-deleted adenoviral vector. *Vaccine*, 2004, 22: 697-703.
- [ 9 ] 汪思钧. 表达 H3N2 亚型 SIV HA 基因的重组腺病毒的构建及其特性研究. 华南农业大学硕士论文, 2006.
- [ 10 ] 郭元吉,程小雯. 流行性感病毒及其实验技术. 北京: 中国三峡出版社, 1997.
- [ 11 ] 殷震,刘景华. 动物病毒学. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997.
- [ 12 ] Holman DH, Wang D, Raja NU, et al. Multi-antigen vaccines based on complex adenovirus vectors induce protective immune responses against H5N1 avian influenza viruses. *Vaccine*, 2008, 26: 2627-2639.
- [ 13 ] Tatsis N, Ertl HC. Adenovirus as vaccine vectors. *Molecular Therapy*, 2004 ( 10 ): 616-626.
- [ 14 ] Shanley JD, Wu CA. Intranasal immunization with a replication deficient adenovirus vector expressing glycoprotein H of murine cytomegalovirus induces mucosal and systemic immunity. *Vaccine*, 2005, 23: 996-1003.
- [ 15 ] Durrwald R, Selbitz HJ. Swine influenza control by vaccination. *Pig Progress, Respiratory Disease( special)*: 11-13.

## Elicitation of protective immune responses by a recombinant adenovirus expressing hemagglutinin of H3N2 SIV in swine

Sijun Wang<sup>1,2#</sup>, Wenbao Qi<sup>1#</sup>, Chenggang Xu<sup>1</sup>, Kaijian Luo<sup>1</sup>, Guihong Zhang<sup>1</sup>, Hejia Ye<sup>1</sup>, Ming Liao<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(<sup>2</sup> Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518010, China)

**Abstract [ Objective ]** To evaluate the immunity of the adenovirus recombinant rAd-HA-GFP encoding an H3N2 swine influenza virus hemagglutinin. **[ Methods ]** Three groups of 6-week-old pigs (5 pigs per group) were vaccinated intramuscularly with the recombinant, one group was immunized with  $10^{-8}$  TCID<sub>50</sub> recombinant adenovirus rAd-HA-GFP, the other groups were vaccinated with  $2 \times 10^{-8}$  TCID<sub>50</sub> and  $4 \times 10^{-8}$  TCID<sub>50</sub>. A control groups (5 pigs) were vaccinated with recombinant adenovirus rAd-GFP. Virus-specific hemagglutination-inhibition (HI) antibody was detected by 2-6 weeks post vaccination. Compared the difference of vaccinated intramuscularly, intragastric administration and intranasal inoculation, three groups of different HI antibody pigs and one control group were challenged with a virulent H3N2 field virus. **[ Results ]** The results showed that pigs in the groups given higher immunizing dose were developed higher levels HI antibody. All of vaccinated intramuscularly, intragastric administration and intranasal inoculation could produce HI antibody, but the titer of vaccinated intramuscularly was higher significantly ( $P < 0.01$ ). Three groups of pigs (5 pigs per group) which HI titers were 1:80, 1:160, 1:320 respectively were challenged with a virulent H3N2 field virus, include the negative control group. The immunization efficacy was evaluated by clinical signs, the rate of virus isolation and HI titer. It suggested that immunological response induced by rAd-HA-GFP could resist attack of SIV effectively. **[ Conclusion ]** The adenovirus vaccines rAd-HA-GFP are efficacious for SIV and have the additional advantage over commercial vaccines that suckling piglets have no pre-existing maternally-derived antibody to block early life vaccination.

**Keywords :** H3N2 swine influenza virus ; hemagglutinin ; adenovirus recombinant

( 本文责编 : 张晓丽 , 谷志静 )

Supported by the New Century Excellent Talent Support Project ( NCET-06-0752 ), the Innovation Group Fund of Natural Science Foundation of Guangdong Province ( 5200638 ), National Programs for High Technology Research and Development of China ( 2006AA10A204 ), the Innovation Group Fund of Ministry of Education ( IRT0723 ) and the Science and Technology Project of Guangdong Province ( 2005A20901003 , 2006B21101001 , 2006B0152 )

\* Corresponding author. Tel : + 86-20-85280240 ; Fax : + 86-20-85280242 ; E-mail : mliao@scau.edu.cn

# Equal contribution

Received : 4 November 2008 / Revised : 17 January 2009