

201-207

### 猪霍乱病毒及其疫苗研究进展

陆宇 陈建国 丁明孝

(北京大学生命科学学院, 北京 100871)

5852.651

### Research Progress on Hog Cholera Virus and its Vaccine

Lu Yu Chen Jianguo Ding Mingxiao

(College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871)

关键词 猪霍乱病毒, 疫苗, 研究进展

家畜病毒学

Key words Hog Cholera Virus, Vaccine, Research progress

猪霍乱病毒(Hog Cholera Virus, HCV)在分类上曾属于披膜病毒科(Togaviridae)瘟病毒属(Pestivirus)<sup>[1]</sup>,但就瘟病毒基因组结构与基因表达特征而论,瘟病毒更接近于黄病毒科(Flaviridae),因此 Wengner 等建议将瘟病毒属归入黄病毒科<sup>[2]</sup>,然而也有一些异议,因为目前的研究显示瘟病毒和黄病毒间存在着一些根本上的差异(涉及其病毒粒子组成、结构,核苷酸与氨基酸序列的同源性,瘟病毒开放阅读框第一个蛋白的酶活性以及由病毒编码 RNA 依赖的 RNA 聚合酶活性等),从而有理由考虑将其单独成一新科——瘟病毒科(Pestiviridae)<sup>[3,4]</sup>。

#### 1 HCV 病毒粒子结构

HCV 病毒粒子呈球形,直径为 40~60 nm,有脂双层囊膜,囊膜表面有囊膜糖蛋白突起。在 CsCl 中浮力密度为 1.16 g/mL,沉淀常数  $S_{20} = 140 \sim 150$ 。不能凝集鸡、豚鼠、猪、牛和人的红细胞。其核衣壳由单独衣壳蛋白组成,超薄切片中呈六角形<sup>[5]</sup>,可能具有 20 面体对称性<sup>[6]</sup>(图 1)。

HCV 基因组为一单股正链 RNA,约 12.3 kb,5'端可能有 I 型帽子结构  $m^7G^5pppAnp$ ,而 3'端未发现有多聚腺苷酸(Poly-A)尾部,代之以一段十分保守的核苷酸序列,富含亚序列 ATTT。cDNA 序列分析表明,HCV 基因组 RNA 只含一个大的开放阅读框(ORF)<sup>[7,8]</sup>。从 5'端到 3'端它可依次翻译成 4 个结构蛋白:衣壳蛋白 C 和高度糖基化的囊膜蛋白 E0(gp44/48)、E1(gp33)和 E2(gp55),以及 3~5 个非结构蛋白(包括在 ORF 5'末端表达的 P23)(图 2)。这些蛋白、特别是非结构蛋白的功能目前尚不完全清楚<sup>[3]</sup>。cDNA 序列分析还发现另外一些不同长度的 ORF,但均不表达。在 HCV 基因组大的开放阅读框的前后分别有一段 360 nt 与 226 nt 的非翻译区(Nontranslation region, NTR),存在一段 17 个核苷酸的互补序列,在 HCV 种内是非常保守的<sup>[6]</sup>。

本文于 1995 年 9 月 11 日收到,12 月 8 日修回

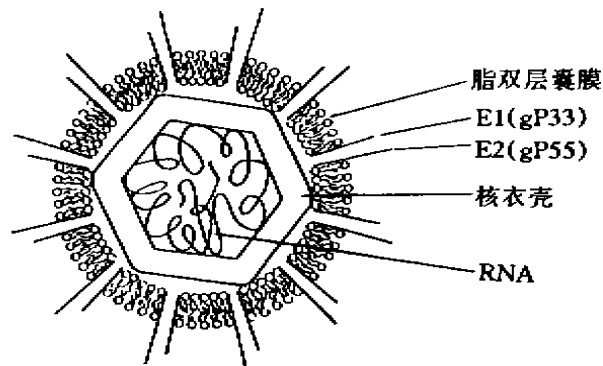


图 1 HCV 病毒粒子结构模式图

Fig 1 Structure model of the HCV particle

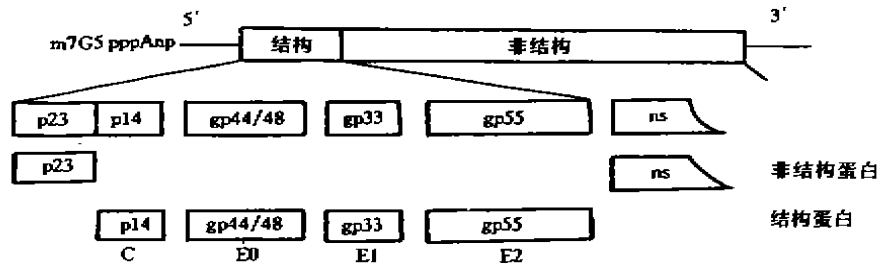


图 2 HCV 基因组结构模式图

Fig 2 Organization of the HCV genome

## 2 HCV 的复制过程

HCV 可能通过与宿主细胞的质膜融合或经受体介导的胞饮作用进入细胞。病毒 RNA 从核衣壳中释放的机制尚不清楚。一经释放, HCV RNA 可发挥两方面的功能: 一方面, 在基因组 ORF 前的 5'NTR、130~320 核苷酸之间, 存在着一个大的茎环结构, 此结构在瘟病毒中极为保守, 而黄病毒无此结构。这一结构被认为是核糖体的结合位点, 启动翻译<sup>[9]</sup>。从 ORF 单一的翻译起点开始, 以共翻译与后翻译的方式表达全部病毒蛋白; 另一方面, 病毒 (+)RNA 也可作为合成 (-)RNA 链的模板, 进而再以 (-)RNA 链为模板合成更多基因组 (+)RNA 链。正链与负链 RNA 的比值估计约为 10:1。与甲病毒所不同的是, 在瘟病毒感染的细胞中尚未发现有亚基因组 RNA。HCV RNA 的合成不为放线菌素 D 所抑制, 暗示 HCV 复制所必需的 RNA 依赖的 RNA 聚合酶直接由正链 RNA 翻译而来<sup>[10]</sup>。

由于 HCV 基因组 RNA 只有一个开放阅读框, 因此其表达产物是一个 3 898 氨基酸残基的多聚蛋白(polyprotein), 而后再经病毒自身的或细胞的蛋白酶作用, 将其裂解成各结构蛋白与非结构蛋白<sup>[11]</sup>(图 3)。

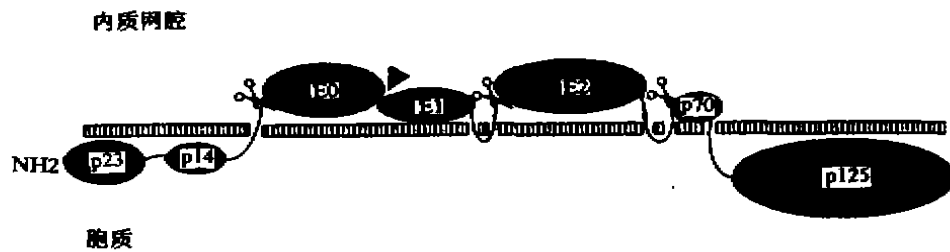


图3 HCV蛋白的合成与加工(剪刀表示信号酶;黑三角表示某未知蛋白酶)

Fig. 3 Synthesis and processing of the viral proteins  
(scissors: signalase; triangle: an unknown protease)

HCV 开放阅读框编码的第一个蛋白是一分子量为 23 kD 的多肽 P23, 以前曾认为它就是病毒核衣壳蛋白, 但实际上核衣壳蛋白是一个位于 P23 和第一个病毒糖蛋白 E0 之间的 14 kD 蛋白 P14。P23 本身具有蛋白水解酶活性, 可使 P23 与 P14 之间迅速断裂, 离开多聚蛋白<sup>[3,12]</sup>。

P14 与其随后的信号肽之间的蛋白酶解可能与位点 EKA(氨基酸 248 到 250)有关。这一段信号序列及糖蛋白之间的内部信号序列可能启动 HCV E0、E1、E2 结合并插入到内质网膜上, 并在宿主细胞信号酶介导下完成断裂。只是 E0/E1 间的断裂可能是受内质网腔中某一未知蛋白酶作用的结果<sup>[3]</sup>。

E2 下游区翻译产物的研究比较少, 主要是非结构蛋白的表达。在 1030~1310 氨基酸残基之间有一 70 个氨基酸组成的疏水区域, Collett 认为此疏水多肽可能与内质网膜的结合有关<sup>[11]</sup>。对瘟病毒中牛病毒性腹泻病毒(Bovine Viral Diarrhoea Virus, BVDV)和边界病毒(Border Disease Virus, BDV)的研究发现, 非结构蛋白 P125 在表达后即被加工成 P54 与 P80。P80 在瘟病毒间呈极高同源性, P80 属于以 eIF-4a 为代表的类解螺旋酶(helicase like)超家族, 并形成丝氨酸蛋白酶结构域的一部分, 因而 P80 是一个双功能蛋白, 但尚未发现 HCV P125 被加工成 P80。在 ORF 3'极末端的表达产物中存在一段 Gly-Asp-Asp 序列, 可能代表着病毒 RNA 依赖的 RNA 聚合酶的一部分<sup>[14]</sup>。

衣壳蛋白在合成后几分钟内即与病毒基因组 RNA 相结合, 包装进入核衣壳。E2-E2、E2-E0 及 E2-E1 之间由二硫键(或个别较强的非共价键)连接成同型或异型二聚物, 形成病毒的囊膜抗原。因此, 二聚化可能在病毒装配中非常重要<sup>[3]</sup>。E2 与 E1 的 C 端均有疏水氨基酸残基的伸展结构, 可作为跨膜结构域, 使之镶嵌于 HCV 囊膜脂双层中; E0 无此疏水伸展结构, 它与病毒粒子的联系尚不清楚, 可通过与 E2 形成异型二聚物而相连。总之这种联系不如 E1、E2 那样牢固, 易脱落<sup>[14]</sup>。核衣壳与糖蛋白 E1、E2 胞质面结构域的相互作用可能引发病毒粒子的出芽。在出芽的同时, 病毒粒子即披上宿主细胞的脂双层质膜而形成病毒的囊膜。

### 3 猪瘟病毒疫苗

猪瘟病毒(HCV)弱毒株的获得是研制抗猪瘟疫苗的关键一步。将强毒性 HCV 连续地传代, 会引起 HCV 毒力的变化。HCV 可在实验动物和鸡胚中繁殖, 特别是可在兔体内弱化, 以产生抗猪瘟病的减毒疫苗。我国研制的 HCV 兔化弱毒株(Lapinized chinese strain, LC)疫苗

的生产和应用对我国猪瘟乃至世界一些地区猪瘟病的防治起了十分重要的作用<sup>[15]</sup>。Ferrari 将 HCV 的 LC 株在一微型猪肾细胞系 (Minipig kidney cell line, MPK) 中适应生长后, 经感染新西兰白兔测量体温的方法检测, 获得比在兔体繁殖高得多的滴度。而且在适应以后, 经 HCV 抗体检测, 其抗原性并未发生任何明显的变化, 与原 LC 病毒株相比, MPK-LC 适应的病毒株 (MPK-LC-HCV) 在兔中也显示出较高的免疫活性。用 MPK-LC-HCV 接种猪, 可保护猪免受强毒 HCV 的感染, 即使将接种的猪生长在 HCV 强传染区也不会致病。这意味着 MPK-LC-HCV 毒株有可能作为新的预防 HCV 感染的疫苗<sup>[16]</sup>。但母源抗体水平似乎影响疫苗抑制 HCV 在扁桃体中复制的能力: 母源抗体效价较低时, 接种可完全抑制病毒复制; 而母源抗体效价较高时, 仅会减少病毒繁殖周期<sup>[17]</sup>。

IB-RS-2 猪肾细胞系在不断地用 HCV 接种和传代过程中, 能自发地减毒, 并产生携带 HCV 基因组的克隆 (第 154 代与第 188 代), 但此克隆并不表现 HCV 的病症。Ribeiro (1971) 已成功地用该 IB-RS-2 细胞克隆的提取物接种猪, 使其产生对 HCV 强毒的免疫性<sup>[18]</sup>。House (1988) 又在 IB-RS-2 的第 201 代上获得了 Clone 17, 在此克隆中发现了一个 HCV 阴性的品系 (即细胞中不携带 HCV 基因组) IB-RS-2 D10。此细胞系不仅对 HCV 不敏感, 而且对其它 20 多种病毒及支原体也不敏感。用其培养物上清液或用其细胞裂解物接种猪, 都能产生对 HCV 的免疫性<sup>[19]</sup>。因此, IB-RS-2 D10 细胞系被提交给美国标准培养物保藏中心 (ATCC), 并由此推广。曾考虑用 IB-RS-2 D10 生产无 HCV 的疫苗, 然而, 最近采用套式聚合酶链式反应技术 (nested PCR) 检测是否有 BVDV 污染时, 发现此细胞系亲本早就被一抗原变异的 HCV 所污染, 只是不易为常规免疫检测出。迄今实验室所用的 IB-RS-2 D10 株已传 200 代以上, 此 HCV 毒株已不能诱导出足够的 HCV 抗体以抵御 HCV 强毒 Ames 株感染, 故 ATCC 已在 1994 年将此细胞系销毁<sup>[20]</sup>。

应用 HCV 弱毒疫苗接种, 由于疫苗难以与经常发生的抗原变异毒株相对应, 而且猪的品种和个体对疫苗的感受性不同, 再加上家畜和畜产品的贸易检疫等问题, 活毒疫苗的试制及应用受到一定的限制。

近年来, 对 HCV 防治机理的研究进入分子生物学阶段。痘苗病毒 (Vaccinia virus, VAC) 拥有广泛的宿主范围和低的毒性, 用它作为其他病毒的重组载体是较理想的免疫实验材料。将编码 HCV 结构蛋白的 cDNA 片段插入到 VAC 的 tk 基因中, 得到 VAC/HCV 重组体: VAC-core (带有 HCV core 基因)、VAC 3.8 (带有 HCV core-E0-E1-E2 基因) 与 VAC 3.8\* (VAC 3.8 缺失大部分 E2 基因而得)。用 VAC 3.8 接种猪, 可获得能中和 HCV 的抗体, 并可完全抵抗 HCV 强毒的攻击; 用 VAC 3.8\* 接种的猪, 在 HCV 感染后的第 5 天, 有发烧的症状 (40.8~41℃), 但随后 2 d 则完全康复; 而用 VAC core 接种, 猪在感染 HCV 后很快发病死亡。因此, 利用 HCV 结构糖蛋白作为亚单位疫苗, 可以使猪产生抵抗 HCV 的免疫力, 而以核心蛋白接种则无免疫保护性, 这可能是由于 HCV 囊膜的存在, 使其抗体无法接触到病毒核心<sup>[21]</sup>。然而由于痘苗病毒会引起未种痘人群感染, 并使极少数感染者发病, 这使 VAC/HCV 重组体疫苗的应用受到限制, 但为发展亚单位疫苗的研究提供了思路。

在全部 HCV 结构蛋白中, gp55 引起的抗体中和效力是最强的, 而且 gp55 的抗原结构业已研究清楚<sup>[22, 23]</sup>。然而由于 HCV 存在抗原变异, 使其亚单位疫苗的研制变得较为困难。序列分析表明, gp44/48 比 gp55 序列更为保守, 但免疫测试显示, gp44/48 单抗只能完全中和滴

度为  $10^2$  TCID<sub>50</sub> 的 HCV, 而多抗体也只能部分地中和滴度为  $10^4$  TCID<sub>50</sub> 的 HCV, 而多抗体也只能部分地中和滴度为  $10^4$  TCID<sub>50</sub> 的 HCV, 仍远低于 HCV 自然发病组织中 HCV 的滴度  $5 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>。因此, 以 gp44/48 作为亚单位疫苗在目前仍未成熟, gp55 可能仍是目前较好的研究材料<sup>[24]</sup>。

编码 HCV Brescia 株囊膜蛋白 E2 的 cDNA 序列已被插入到伪狂犬病病毒 (Pseudorabies Virus, PRV) gX 位点<sup>[25]</sup>。这个 PRV 重组体所包含的 E2 序列有两种情况: 不带 (M203) 或带有 (M204 与 M205) 一段 E2 C-末端跨膜区 (C-terminal transmembrane region, TMR)。用 M203 感染 SK-6 细胞, E2 表达后分泌到培养基中; 而若用 M204 与 M205 感染, 则 E2 表达后积累在细胞中。如用 M204 接种猪, 则产生大量的抗 HCV 抗体; 若用 M203 接种, 仅产生少量的抗体, 只能部分起到对 HCV 的防护作用。

然而重组疫苗的一个潜在危险在于载体株与其他弱毒疫苗或野生株病毒之间的异常遗传信息交换<sup>[26]</sup>。同源或非同源重组会产生一个有外源基因的强毒性突变株, 从而有可能改变其生物学特征。由于重组疫苗的实际应用仍然是一个有争议的问题, 发展一个更为安全的疫苗, 如 E2 亚单位疫苗, 可能具有一定的意义。然而, 只有接种大量抗原时, 亚单位疫苗才能诱导出保护性的免疫应答反应。因此, 需要寻找一个比 PRV 更为高效的表达系统。

许多事实表明, 杆状病毒 (Baculovirus) 在昆虫细胞系中可高效地表达外源蛋白的基因, 除 N-连接的糖基化及其修饰外, 大部分蛋白质加工过程与哺乳类细胞相同。因此, 杆状病毒已成为非常流行和有效的疫苗研制体系。以 pAcAS3 作为载体, 构建能表达 E2 并带有一段信号序列 gX 的重组体 pAcAS3gXE2 ± TMR, 然后与分离出的杆状病毒 AcNPV 的 DNA 共转染昆虫细胞 SF-21, 经 α-互补筛选出重组病毒 BacE2 ± TMR。E2-TMR 表达后可分泌到培养基中, 其最大产率约 20 μg/mL (或 30 μg/10<sup>6</sup> 细胞)。用 20 μg 的 E2 蛋白接种猪, 四周之内, 可达到很高的抗体效价, 其偶联中性过氧化物酶的抗体效价 NPLA > 3000, 被接种猪能完全抵抗致死剂量的 HCV Brsecia 株强毒的攻击。另外, 接种后猪体内 E2 抗体的效价比用 HCV 弱毒进行免疫或 PRV M204 接种免疫时的抗体效价的提高快得多, 而且杆状病毒对宿主的专一性强, 对人、家畜和植物无害, 因此有可能成为一个新的、更为安全有效的以及免疫性可随时改变的亚单位疫苗<sup>[27]</sup>。

值得一提的是, 为了研究 HCV 的分子生物学和免疫学特征, 提高其病毒滴度是非常关键的。用 Roux 培养瓶或转瓶在猪肾细胞 PK-15 上培养 HCV 是应用最为广泛的方法, 其滴度一般在  $10^6 \sim 10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL。而应用微载体细胞培养术, 至少可将 HCV 的滴度再提高 10 倍。这种微载体 (Cytodex 3<sup>R</sup>, Pharmacia) 是一种多孔微珠, 将其加于悬浮细胞培养物中, 在 37 ℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中摇动培养时, 细胞即可贴附在微载体上生长。由于减少了培养基用量, 同时扩大了细胞的培养量, 从而使 HCV 的滴度比一般贴壁培养的毒价提高了 1.5 个滴度, 且这种微载体经处理后仍可继续使用, 因此微载体细胞培养也是提高 HCV 滴度的一个比较好的方法<sup>[28]</sup>。

## 参 考 文 献

- 1 Westaway E G, Brinton M A, Gaidanovich S Ya *et al.* Togaviridae. *Intervirology*, 1985, 24:125~139
- 2 Wengler G. Family Flaviviridae. In: *Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Franchi R I B, Fauquet C M, Knudson D L *et al.* ed. Berlin: Springer Verlag, 1991, 223~233
- 3 Thiel H J, Stark R, Weiland E *et al.* Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J Virol*, 1991, 65: 4705~4712
- 4 Hush M M, Himes G, Newbigin E *et al.* Glycoprotein E2 of classical swine fever virus: expression in insect cells and identification as a ribonuclease. *Virology*, 1994; 200: 558~565
- 5 Moenning V. Pestiviruses; a review. *Vet Microb*, 1990, 23:35~54
- 6 Moenning V. The hog cholera virus. *Comp Immun Microbiol Infect Dis*, 1992, 15(3):189~201
- 7 Meyers G, Rummenapf T, Thiel H J. Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus. *Virology*, 1989, 171: 555~567
- 8 Moomann R J M, Warmerdam P A M, van der Meer B *et al.* Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain Brescia and mapping of the genomic region encoding envelope protein E1. *Virology*, 1990, 177: 184~198
- 9 Brown E A, Zhang H, Li H *et al.* Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20(19):5041~5045
- 10 Moomann R J, Hulst M M. Characterization of hog cholera virus (HCV) RNA. *Virus Res*, 1988, 11: 281~291
- 11 Rummenapf T, Unger G, Strauss J H *et al.* Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J Virol*, 1993, 7: 3288~3294
- 12 Stark R, Meyers G, Rummenapf T *et al.* Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *J Virol*, 1993, 67: 7088~7095
- 13 Wike I G, Hmar K E, Liess B *et al.* Heterogeneous expression of the non-structural protein p80/p125 in cells infected with different pestiviruses. *J Gen Virol*, 1992, 73: 47~52
- 14 Schneider R, Unger G, Stark R *et al.* Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. *Science*, 1993; 261: 1169~1171
- 15 Terpstra C. The immunity against challenge with swine fever virus of piglets from sows vaccinated with C strain virus. *Tidsschr. Diergeneeskd.* 1977, 102: 1293~1298
- 16 Ferrari M. A tissue culture vaccine with *Lapinized chinese* (LC) strains of hog cholera virus (HCV). *Comp Immun Microbiol Infect Dis*, 1992, 15(3): 221~228
- 17 Biront P, Leunen J. Inhibition of virus replication in the tonsils of pigs previously vaccinated with a Chinese strain vaccine and challenged oronasally with a virulent strain of classical swine fever virus. *Vet Microb*, 1987, 14: 105~113
- 18 Ribeiro L O C, Sugay W, Paspualin O L. Protecção contra peste swina por células da linhagem IB-RS-2. *Arp. Inst. Biol*, 1971, 38: 279~281
- 19 House J A, House C, Llewellyn M E. Characteristics of the porcine kidney cell line IB-RS-2 clone D10 (IB-RS-2 D10) which is free of hog cholera virus. *J Virol*, 1988, 24: 677~682
- 20 Bolin S R, Black J W, Frey M L *et al.* Detection of a cell line contaminated with hog cholera virus. *JAVMA*, 1994, 205(5): 742~745
- 21 Rummenapf T, Stark R, Meyers G *et al.* Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: further characterization and induction of protective immunity. *J Virol*, 1991, 65: 589~597
- 22 Kimman T G, Bianchi A T J, Wensvoort G *et al.* Cellular immune response to hog cholera virus (HCV); T cells of immune pigs proliferate *in vitro* upon stimulation with live HCV, but the E1 envelope glycoprotein is not a major T-cell antigen. *J Virol*, 1993, 67: 2922~2927

- 23 van Rijn P A, Miedema G K W, Wensvoort G *et al.* Antigenic structure of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus. *J Virol*, 1994, 68:3934 ~ 3942
- 24 Weiland E, Ahl R, Stark R *et al.* A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. *J Virol*, 1992, 66:3677 ~ 3682
- 25 Berns A, Moormann R. Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera. *J Virol*, 1991, 65:2761 ~ 2765
- 26 Mulder W A M, Priem J, Glazenburg K L *et al.* Virulence and pathogenesis of non-virulent and virulent strains of pseudorabies virus expressing envelope glycoproteins E1 of hog cholera virus. *J Gen Virol*, 1994, 75:117 ~ 124
- 27 Hulst M M, Westra D F, Wensvoort G *et al.* Glycoprotein E1 of hog cholera virus expressed in insect cells protects swine from hog cholera. *J Virol*, 1993, 67:5435 ~ 5442
- 28 Caij A, de Smet A, Dubois N *et al.* High titre hog cholera virus production on Cytodex 3<sup>R</sup> microcarrier cultures. *Arch Virol*, 1989, 105:113 ~ 118