维普资讯 http://www.cqvip.com

第16卷4期 中国病毒学 16(4):299-303
2001年12月 VIROLOGICA SINICA December 2001

汉坦病毒疫苗研制进展*

肖春惠,杨占秋**

(武汉大学医学院病毒学研究所,湖北武汉 430071)

The Development of the Hantaanvirus Vaccine*

XIAO Chun-hui, YANG Zhang-qiu**

(*The Insititute of Virology the Medical school of Wuhan University, Hubei Wuhan 430071, China*)

Abstract: We outline the development of the hantaanvirus vaccine in recent years on brain tissue inavtivated vaccine, cultural cell bivalent and univalent inactivated vaccine, recombination vaccine, DNA vaccine, attenuated live vaccine, adjuvant, inactivation methods and immune strategy.

Key words: Hantaanvirus; Vaccine

摘要:本文从脑组织灭活疫苗、培养细胞单双价灭活疫苗、基因重组疫苗、DNA疫苗、减毒活疫苗、佐剂、灭活方法、免疫策略等方面概述了汉坦病毒疫苗研制近况。

关键词:汉坦病毒;疫苗

中图分类号:R373 **文献标识码**:A **文章编号**:1003-5125(2001)04-0299-05

我国是世界上受肾综合征出血热(HFRS)危害最严重的国家,90%以上的病例在我国。HFRS是由汉坦病毒引起的一种自然疫源性疾病,目前发现汉坦病毒有二十余种血清/基因型,引起人类HFRS和HPS主要是汉滩病毒(HTN)汉城病毒(SEO)、普马拉病毒(PUU)、Dobrava病毒(DOB)和Sin Nombre(SN_V)[1]。随着分子生物学技术的发展及对汉坦病毒基因结构的深入研究,汉坦病毒疫苗的研制也有了显著发展,现概述如下:

1 脑组织纯化疫苗

表1 I型汉坦病毒(HTN)乳鼠脑灭活疫苗制备概况

Table 1 The preparation survey of natal mouse brain tissue inactivated vaccine of hantaanvirus type I

学者 Auther	国家 Nation	毒株 Stain	乳鼠脑内病毒滴度(TCID50) Viral titre at mouse brain($TCID_{50}$)	处理方法 (Method)
董关木[2]	中国	LRI株	$10^{8.5}$/mL	鱼精蛋白及超速离心纯化,1:2000福尔马林4℃15d灭活,加$AL(OH)_3$为佐剂
Cho H W[3]	韩国	ROK84-105	$10^{9.8}$/mL	同上
金洛济[4]	朝鲜	HFRS821株	10^{6}~$10^{8.5}$/mL	鱼精蛋白及离心、凝胶柱层析纯化 1:4000β-丙内脂灭活,加$AL(OH)_3$为佐剂

收稿日期:2001-02-12,修回日期:2001-05-13

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870659)

作者简介:肖春惠(1976-),女,湖北省籍,硕士,从事医学病毒学研究。

** 通讯作者:杨占秋,(1952-),男,湖北省籍,研究员,博士生导师,从事医学病毒学研究。Correspondence author.

维普资讯 http://www.cqvip.com

陈化新[5]等观察乳鼠脑Ⅰ型灭活疫苗远期安全性及预防效果:在接种的143,581人中,中强副反应率为3.26%,4年内未出免疫增强反应。在基础免疫后14d和1年后加强免疫后14d,抽样检测接种人群,中和抗体平均阳转率分别为51.09%、61.09%,荧光抗体平均阳转率分别为84.27%,83.05%,平均保护率为94.3%,这证明此疫苗安全有效,可推广使用。

韩国已批准该疫苗的生产使用,Cho[3]等在人群中观察该疫苗效果,在未注射疫苗前的1987年发病人数为104人,接种后的1994年为34人,但未在同一地区做过接种与未接种疫苗人群的对比观察。

该疫苗在朝鲜亦已批准生产使用,金洛济等[4]在HFRS高发区进行人体免疫预防效果观察,保护率为79.5%~100%。

2 单价疫苗

朱智勇[6]等用HTN型Z_{10}在原代沙鼠肾细胞培养其滴度可达6-7logTCID^{50}/1.0mL经β-丙内脂灭活加入AL(OH)$_3$为佐剂制成Ⅰ型单价灭活疫苗。宋干等[7]用L_{99}毒株在原代地鼠肾细胞上培养其滴度可达7.5logTCID$_{50}$/1.0mL经福尔马林灭活加AL(OH)$_3$为佐剂制成Ⅱ型(SEO型)单价灭活疫苗。陈化新[5]等连续观察沙鼠肾细胞Ⅰ型灭活疫苗(简称沙鼠疫苗)和地鼠肾细胞Ⅱ型灭活疫苗(简称地鼠疫苗)在HFRS疫区试验人群中的远期安全性(4年)及预防效果:中强副反应率沙鼠疫苗为0.56%,地鼠疫苗为1.57%,未出现免疫增强反应。于基础免疫后14d和1年后加强免疫后14d在人群中抽样检测,中和抗体阳转率:沙鼠疫苗分别为57.18%、70.17%,地鼠疫苗82.46%、80.13%,荧光抗体阳转率沙鼠疫苗93.69%、89.04%,地鼠疫苗为65.73%、85.00%,4年平均保护率地鼠疫苗97.16%沙鼠苗为93.77%,结果证明安全有效,可推广使用。

3 双价疫苗

3.1 原代沙鼠肾细胞流行性出血热双价疫苗

朱智勇等[8]将Z_{10}毒株(Ⅰ型)和Z_{37}毒株(Ⅱ型)分别感染原代沙鼠肾细胞,以β-丙内脂灭活,混合后加氢氧化铝为佐剂制备而成。董关木等[9]大规模人体观察中抽查部分接种该疫苗人群,荧光抗体阳转率及GMT分别为99.04%、24.15,对Ⅰ型病毒中和抗体阳转率及GMT分别为91.03%,18.27;对Ⅱ型病毒中和抗体阳转率及GMT分别为88.44%、12.47,接种三针疫苗后局部反应率为1.84%,全身体温反应发生率0.36%,未见人群接种后发生异常反应。

3.2 地鼠肾细胞流行性出血热双价疫苗

宋干[7]等采用地鼠肾细胞(GHKC)传代适应滴度高(8.5logTCID$_{50}$/1.0mL)的两型EHF病毒株(家鼠型L_{99}株及野鼠型J_R株)试制出GHKC流行性出血热双价灭活疫苗,用福尔马林灭活,加AL(OH)$_3$为佐剂,免疫242人,全部接种者极少数有轻、中度反应,均无不良反应,疫苗接种后,抗体阳转率为95.9%(IFA),93.5%(ELISA)。用EFRNT抽样检查,对L_{99}株、J_R株病毒中和抗体阳转率分别为100%、88.2%。

上述两种双价疫苗均获批准生产。95期间主攻上述疫苗的纯化及Vero细胞纯化疫苗,均取得重要进展,它们将在控制我国出血热流行中发挥重要作用。

4 基因重组疫苗

4.1 痘苗病毒重组疫苗

Schmaljohn[10]等将HTN病毒76~118株的结构基因插入痘苗病毒Cannaught疫苗株构成重组体,Ⅰ期临床试验结果表明[11]1.人体皮下接种10^7PFU重组体是安全有效的2.二次接种可提高中和抗体滴度3.皮下接种较划痕接种好。二期双盲对照临床试验结果:已种痘人群中体内中和抗体阳转率低于未种痘人群。Schmaljohn等亦用WR株[12]、NYVAC株(弱毒痘苗病毒)和ALVAC株(一种不能在人体内复制的金丝雀痘苗病毒)[13]进行实验。姚树元[14]等亦将汉坦病毒76~118株M、S片段构建转染质粒pJSB11M7.5S,获得痘病毒与HTN基因的重组体,并在试验动物中诱导产生中和抗体。马章亮等[15]将汉滩病毒A_9株M基因段在重组痘苗病毒天坛株中进行表达,表达产物接近天然蛋白,能刺激宿主产生良好的免疫反应并可在机体内诱生针对汉滩病毒糖蛋白的特异性免疫。

4.2 杆状病毒表达载体

Schmaljohn[12]、石晓宏[16,17]等将HTN病毒78~118株的结构基因插入杆状病毒苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcNPV)的多角体蛋白基因构建杆状病毒与HTN基因的重组体,用重组体表达的蛋白rGP和rNP免疫地鼠后,地鼠获得保护性免疫。

维普资讯 http://www.cqvip.com

4.3 甲病毒载体

Strauss[18]等发现,甲病毒是单链正股RNA基因组的包膜病毒,其中SFV(Semliki Forest virus)、VEE病毒(Venezuelan equine encephalitis virus)、SINV(Sindbis virus)已开发成为极有价值的表达载体。Schmaljohn等[19]制备了表达SEOV结构基因的DNA基础的辛特比斯病毒复制子载体。(pSIN2.5)(DNA-based Sindbis virus replicon vector)和包装后辛特比斯病毒复制子的载体(pSINrep5),此重组体在地鼠体内诱导了针对基因表达产物的抗SEOV免疫力。

4.4 HBV颗粒核心嵌合载体

HBV核心抗原现已被用来呈递各种外来抗原决定簇。Ulrich等[2]将编码PUU(CG18~20株)核衣壳蛋白氨基末端199个氨基酸的基因片断分为3个部分重叠的片断,并用质粒pHBc2-19和pHBc 2-9构建了表达HBcAg/hantavirus N蛋白嵌合体三种重组质粒pHBc-N1、pHBc-N2、pHBc-N3,除表达HBcAg之外分别表达核衣壳蛋白氨基末端1~45aa、38~82aa、75~119aa。保护性免疫测试发现,pHBc-N1和pHBc-N3均显示出了免疫性保护,pHBc-N2却未显示出保护,结果表明NP的保护性抗原区主要位于氨基末端1~45aa。HBV核心颗粒嵌合体有可能成为表达汉坦病毒保护性抗原表位的良好载体。

已用各种载体研究了汉坦病毒结构蛋白免疫原性及保护性免疫力。Schmaljohn[12]、Xu x[24]、chu YK[25]等发现表达M片段痘苗病毒重组体可诱导中和抗体及保护动物免受同型病毒攻击,提示仅诱导针对G1及G2中和抗体可提供保护力,且G1及G2同时表达比G1或G2单独表达的重组体提供更完全的保护力。Yoshimatsu[26]、Ennis[27]均证实核衣壳蛋白和包膜蛋白都能诱导动物体内细胞介导的保护性免疫力,提示重组体同时表达汉坦病毒三种结构蛋白可诱导动物体内最全面的保护力。

5 DNA疫苗

DNA疫苗是指含有编码抗原基因的真核表达质粒的DNA经直接接种体内后,可被体细胞摄取,并转录、翻译表达出相应的抗原,然后通过不同途径刺激机体产生针对此种抗原的免疫应答[21]。

Welzel[22]等将PUU病毒CG18-20株和HTN病毒76-118株的sRNA反转录成cDNA用来构建真核表达载体。用由可诱导GRE(glucocorticoid responsive element)控制转录的pGRE5-1载体可在Vero-E60。细胞内有效表达PUU病毒核蛋白而未出现细胞毒作用。经测试各种载体,PCR3.1被选作汉坦病毒核衣壳蛋白稳定表达的载体。在不同哺乳动物细胞内表达PUU病毒和HTN病毒核衣壳蛋白模型的成功建立意味着在三个显著演化的物种(人、猴、鼠)中特殊病毒蛋白稳定而有效的表达是可能的。Schmaljohn[23]等将表达SEO病毒SR-11株的M或S片段分别亚克隆于真核表达载体pWRG7077,构建pWRG/SEO-M和pWRG/SEO-S裸DNA疫苗,两种疫苗均可诱导Balb/c小鼠和仓鼠体内抗体反应,但只有pWRG/SEO-M可诱导中和抗体及保护所有动物免受SEO病毒攻击。就疫苗接种方式而言,用基因枪更能获得高血清阳转率及抗体水平。

Schmaljohn[19]等比较了两种甲病毒载体疫苗pSIN2.5、pSINrep5和裸DNA疫苗pWRG/SEO-M和pWRG/SEO-S于仓鼠体内激发保护力的效力,pWRG/SEO-M表现出保护仓鼠免受SEO病毒感染最持久的保护力,并保护3/4地鼠免受HTN病毒感染。

6 减毒活疫苗

王昭孝[28]等分别分离出各地区流行的弱毒株,邱建明[29]等从实验室细胞传代病毒中通过空斑克隆挑选毒力低的弱毒株。以上这些弱毒株均有明显体内和体外弱毒株的特征,能在动物体内产生较好的抗体反应[1]。

7 其它

7.1 佐剂

Yoo YK等发现胞壁酰二肽(MDP)的亲脂衍生物能增强汉滩病毒B-1株灭活疫苗诱导抗汉滩病毒免疫应答作用[30],而且MDP的另一个亲脂衍生物B30-MDP亦有增强汉坦病毒灭活疫苗免疫原性的佐剂活性[31]。初免后抗体滴度(IFA)B-1/B30-MDP组及B-1/MDP-Lys18组(汉滩病毒B-1株灭活疫苗加B30-MDP或MDP-Lys18为佐剂)与B-1/FAC组(汉滩病毒B-1株灭活疫苗加FAC为佐剂)无显著差异,但远高于B-1组(未加佐剂),发现MDP佐剂组中Th-2型细胞因子比B-1组中高,说明此类佐剂可增强B-1疫苗诱导抗HFRS病毒特异性抗体应答。此外还发现MDP佐剂组T细胞增殖率明显高于B-1组。

7.2 灭活方法

WHO在芬兰的汉坦病毒疫苗研究会议上提出:

维普资讯 http://www.cqvip.com

用β-丙内脂(BPL)及福而马林两种方法可产生等量的成品,但BPL保留了一些表面抗原而福而马林灭活方法丧失一些抗原[32]。

7.3 免疫策略

陈化新等[33]认为应采取0、14、28d 3针免疫程序,1年后用新制同型疫苗加强免疫一次。1995年WHO在芬兰的汉坦病毒免疫研究会议上亦提出,灭活疫苗基础免疫需加强接种[32]。

8 研制前景

汉坦病毒脑组织纯化疫苗、单双价灭活疫苗、减毒活疫苗的制备纯化工艺已较成熟,并在中国、韩国、朝鲜得到广泛应用,为控制出血热的流行发挥了重要作用,但存在着抗原成分不纯、副发应多、毒株的毒力稳定性差、野生毒株污染和致癌等问题,基因工程疫苗和核酸疫苗由于自身特点,解决以上问题的同时为疫苗的研制提供了更广阔的前景。基因工程制备亚单位疫苗过程中保护性抗原的进一步选择及组合,如何筛选有效保护性抗原及如何将保护性抗原构建于合适的载体仍是一段时间内的研究课题。核酸疫苗与上述传统疫苗相比有诸多优点,但存在安全问题:如可能产生抗DNA抗体;外源性抗原的长期表达可能产生不良后果;可能出现转化或致癌等,这些不足给核酸疫苗的研究工作带来极大挑战,如若解决以上问题,未来核酸疫苗极可能取代传统疫苗。随着汉坦病毒疫苗的研制的深入发展及新型亚单位疫苗、核酸疫苗推广应用,不久的将来将全面控制肾综合征出血热的流行和发生。

参考文献

[1] Plyusnin A, Nemirov K, Apekina N, *et al*. Dobrava hantavirus in Russia[J]. LANCET, 353:207-210.

[2] 董关木.流行性出血热疫苗现状及研究课题[J].中国公共卫生,1997,13(8):451-452.

[3] Cho HW, Jeong YJ, Nam JW, *et al*. Evaluation of the immune response in human to hantaan virus vaccine, Hantavax in the Republic of Korea.[C]Abstract of the 3rd International Conference on HFRS and Hanaviruses[A].1993.54-56.

[4] 金洛济,俞爱春,金永门,等.朝鲜民主共和国对肾综合征出血热的特异性预防[J].中华实验和临床病毒学杂志,1991,5(4):487-490.

[5] 陈化新,翁景清,宋干,等.肾综合征出血热疫苗预防效果和免疫策略研究[J].中国公共卫生,1999,15(7):561-564

[6] 朱智勇,李岩金,陆群英,等.肾综合征出血热沙鼠肾细胞灭活疫苗的特点和它的生产与应用[J].中国公共卫生,1997,13(5):277-279.

[7] 宋干,黄永成,杭长寿,等.肾综合征出血热地鼠肾细胞灭活疫苗的初步人体观察[J].病毒学报,1991,7(2):102-105.

[8] 董关木,安棋,朱智勇,等.原代沙鼠肾细胞肾综合征出血热双价疫苗临床观察与免疫学研究[J].中华微生物学与免疫学杂志,1998,18(6):453-455.

[9] 阮玉华,徐校平,柳炜,等.肾综合征出血热双价灭活疫苗免疫原性和安全性观察[J].中华预防医学杂志,1999,33(6):340-343.

[10] Schmal john C S, Hasty S, Dalrymple J M, *et al*. Preparation of candidate vaccinia-vactored vaccines for hemorrhagic for hemorrhagic fever with renal syndrome[J]. Vaccine, 1992, 10(1):10-13.

[11] McClain D J, Summers P L, Harrison S A, *et al*. Clinical evaluation of a vaccinia-vectored Hantaan virus vaccine[J]. J Med Virol, 2000, 60(1):77-85.

[12] Schmal John C S, Chu YK, Schmal John A L, *et al*. Antigenic subunits of Hantaan virus expressed by baculovirus and vaccinia virus recombinants[J]. J Virol, 1990, 64(7):3162-3170.

[13] Schmal John C S, Dalrymple J M, McClain D J, *et al*. Expressed antigens of Hantaviruses as potential vaccines for hemorrhagic for hemorrhagic fever with renal sydrome[c]. Kustak E ed. In rdem Vaccinology[A]. 1994, 253-254.

[14] 姚树远,杭长寿,邱建明等,汉滩病毒糖蛋白G1、G2和核蛋白NP在痘苗病毒天坛株中联合表达[J].病毒学报,1998,14(2):121-125.

[15] 马章亮,杭长寿,邱建明等,A9株M基因片段在重组痘苗病毒中的表达及鉴定[J].病毒学报,1998,14(3):221-228.

[16] 石晓宏,杭长寿,宋干等,汉滩病毒包膜糖蛋白G1和G2重组杆状病毒表达载体的构建与表达及其免疫原性[J].病毒学报,1995,11(3):208-213.

[17] 石晓宏,杭长寿,宋干等,汉滩病毒核衣壳蛋白(NP)在杆状病毒系统的表达及其免疫原性研究[J].病毒学报,1995,11(2):124-129.

[18] Strauss E and Strauss, The alphavirus: Gene expression, replication, and evoluation[J]. Microbiol. Rev, 1994, 58:491-562.

[19] Kamrud K I, Hooper J W, Schmal John C S, *et al*. Comparision of the proective efficacy of naked DNA, DNA-based Sinbis replicon, and packaged Sinbis replicon vectors expressing Hantavirus structual gene in hamsters[J]. Virology, 1999, 263:209-219.

[20] Ulirch R, Lundkvist A, Meisel H, *et al*. Chimaeric HBV core particles carrying a defined segment of Puumala hantavirus necleocaspid protein evoke protective immunity in an animal model[J]. Vaccine, 1998, 16(2-3):272-280.

[21] Weiner D B, Kennedy R C. Genetic vaccines[J]. Scientific American, 1999, 281(1):50-57.

[22] Welzel T M, Kehm R, Tidona C A, *et al*. Stable expression of nucleocapsid proteins of Puumala and Hantaan virus in mammalian cells[J]. Virus Genes, 1998, 17(2):185-198.

[23] Hooper J W, kamrud K I, Schmal John C S, *et al*. DNA vaccination with hantavirus M segment elicits neutralizing antibodies and protects against Seoul virus infection[J]. Virology, 1999; 255:269-278.

维普资讯 http://www.cqvip.com

[24] Xu x, Ruo S, McCormick J, *et al*. Immunity to hantavirus challenge in Meriones unguiculatus induced by vaccinia - vectored viral proteins [J]. Am J Trop Med Hyg, 1992, 47: 376 - 397.

[25] Chu Y K, Jenings G B, SchalJohn C S, *et al*. A vaccinia virus - vectored Hantaan virus vaccine protects hamsters from challenge with Hantaan and Seoul viruses but not Puumala virus[J]. J Virol, 1995, 69 (10): 6417 - 6423.

[26] Yoshimatsu K, Yoo Y C, Yoshida R, *et al*. Protective immunity of Hantaan virus nucleocapsid and envelope protein studied using baculovirus - expressed proteins[J]. Ach Virol, 1993, 130: 365 - 376.

[27] Ennis F A, Cruz J, Spirpoulou C F, *et al*. Hantavirus pulmonary syndrome: CD8+ and CD4+ cytotoxic T lymphocytes to epitopes on Sin Nombre virus nuleocapsid protein isolated during acute illness[J], Virology, 238: 380 - 390.

[28] 王昭孝,付德庆,吕太富,等.流行性出血热病毒株在乳小白鼠脑内传代及其毒力研究[J].中华微生物学和免疫学杂志,1991,11(5):351 - 317.

[29] 邱建明,宋千,杭长寿,等.汉坦病毒鼠毒株的选育[J].中华实验和临床病毒学杂志,1996,10(1):1 - 3.

[30] Yoo Y C, Yoshimatsu K, Hatsuse R, *et al*. Effect of MDP - Lys (L18), a derivative of MDP on enhancing host resistance against Hantaan virus infection in newborn mice[J]. Vaccine, 1995, 13 (14): 1300 - 1305.

[31] Yoo Y C, Yoshimatsu K, Koike Y, *et al*. Adjuvant activity of muramyl dipeptide derivatives to enhance immunogenicity of a hantavirus - inactivated vaccine[J]. Vaccine, 1998, 16(2 - 3) 216 - 224.

[32] 汉坦病毒疫苗研[J]. BULL WHO 1996, 74(3): 336 - 337.

[33] 陈化新,叶克龙,张家驹,等.中国肾综合征出血热疫苗免疫效果评价及免疫策略研究[J].中国媒介生物学及控制杂志,1996,7(4):241 - 247.