

共表达 H5N1、H7N1 亚型 AIV HA 与鸡 IL-18 多价重组鸡痘病毒免疫保护性研究 *

王振国^{1,2}, 金宁一^{1**}, 马鸣潇^{1,3}, 费东亮¹, 郑 敏¹, 尹革芬¹, 贾雷立¹, 金扩世¹,
夏志平¹, 金明兰¹

(1. 军事医学科学院军事兽医研究所 全军重点基因工程实验室, 长春 130062; 2. 吉林出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 长春 130062; 3. 锦州医学院畜牧兽医学院, 锦州 121001;)

Immunogenicity of Recombinant Fowl-pox Vaccines Co-expressing HA of AIV H5N1, H7N1 and Chicken IL-18

WANG Zher-guo^{1,2}, JIN Ning-yi^{1**}, MA Ming-xiao^{1,3}, FEI Dong-liang¹, ZHENG Min¹,
YIN Ge-fen¹, JIA Lei-li, JIN Kuo-shi¹, XIA Zhi-ping¹, JIN Ming-lan¹

(1. *The Military Veterinary Institute, the Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130062, China*; 2. *Jilin Entry Exit Inspection and Quarantine Bureau of the People's Republic of China, Changchun 130062, China*; 3. *College of Animal Science and veterinary Medicine, Jinzhou Medical University 121001, China*)

Abstract: Three recombinant fowlpox viruses: rFPV-H5HA-IL18, rFPV-H5HA-H7HA-IL18 and rFPV-H5HA were administered to one-day-old specific pathogen free (SPF) chicken and seven-day-old commercial Leghorn egg laying chicken by wing web route. At 7, 14 and 21 days post infect, hemagglutination inhibition (HI) antibody titer and nonspecific cellular immunity level were quantified. The results showed all rFPV-vaccinated groups produced HI antibody, and cellular immunity levels induced by rFPV-H5HA-IL18 and rFPV-H5HA-H7HA-IL18 strains were significantly higher than that induced by rFPV-H5HA. At 21days post-inoculation, immunized SPF chicken and commercial Leghorn egg laying chicken were challenged with H5N1 HPAIV. rFPV-H5HA-IL18 and rFPV-H5HA-H7HA-IL18 strains could induce 10/10 protection against challenge with HPAIV. rFPV-H5HA strain induced 90% protection. For immunized egg laying chicken groups, cloacal swabbing samples were collected at 7 days post challenge, and no shedding was found in groups vaccinated with rFPV-H5HA-IL18 and rFPV-H5HA-H7HA-IL18. rFPV-H5HA-IL18 and rFPV-H5HA-H7HA-IL18 strains-vaccinated groups displayed significantly enhanced weight gain compared to groups vaccinated with rFPV-H5HA.

Key words: Avian influenza virus(AIV); rFPV vaccine; Immunogenicity; Hemagglutinin; IL-18

摘要:用本实验室构建的重组鸡痘病毒 rFPV-H5HA-IL18、rFPV-H5HA-H7HA-IL18 和 rFPV-H5HA, 经翼蹼免疫 1 日龄 SPF 鸡和 7 日龄商品 Leghorn 蛋鸡, 同时以 H5 亚型 AIV 全病毒灭活疫苗作为对照。免疫后测定 HI 抗体效价、淋巴细胞转化指标、重组疫苗对增重的影响、免疫后的攻毒保护效力、免疫后的抑制排毒情况。免疫后不同时间分别测定特异性抗体和淋巴细胞刺激指数。试验结果表明, 3 株重组鸡痘病毒株均能诱导鸡体产生血凝抑制抗体(HI); 共表达鸡 IL-18 的 rFPV-H5HA-IL18 和 rFPV-H5HA-H7HA-IL18 诱导商品蛋鸡的细胞免疫水平明显高于非共表达鸡 IL-18 的 rFPV-H5HA。重组鸡痘疫苗免疫 SPF 和商品蛋鸡后第 21d 进行攻毒实验, rFPV-

收稿日期: 2005-04-28, 修回日期: 2005-07-28

* 基金项目: 国家十五重点攻关项目(2004BA519A12), 吉林省科技厅发展计划项目资助(20010544)

作者简介: 王振国(1965—), 男, 博士研究生, 主要从事分子生物学研究。

** 通迅作者. Corresponding author. Tel: 0431-5921, E-mail: ningyij@yahoo.com

H5HA-IL18 和 rFPV-H5HA-H7HA-IL18 免疫攻毒保护率达 10/10, rFPV-H5HA 免疫攻毒保护率达 9/10, 与常规疫苗相当。免疫的商品蛋鸡于攻毒后 7d 采集泄殖腔棉试子样品, 检测排毒情况。结果表明, rFPV-H5HA-IL18、rFPV-H5HA-H7HA-IL18 免疫组在攻毒后第 7d 无排毒, 其抑制免疫鸡排毒效果优于常规疫苗和单独表达 HA 的 rFPV-H5HA 重组鸡痘病毒。rFPV-H5HA-IL18 和 rFPV-H5HA-H7HA-IL18 免疫组鸡, 在 14 日龄时的体重明显高于 rFPV-H5HA 免疫组和常规疫苗对照免疫组, 表明共表达的鸡 IL-18 能降低鸡痘病毒载体对雏鸡增重的影响。

关键词:禽流感病毒; 重组鸡痘病毒疫苗; 实验免疫; 血凝素; 白介素 18

中图分类号:S831.7

文献标识码:A

文章编号:1003-5125(2005)06-0607-06

目前预防禽流感主要是使用灭活油乳剂疫苗, 但这一途径生产的疫苗成本高, 使用不便, 疫苗应用后会产生针对禽流感病毒 (Avian influenza virus, AIV) HA 和 NP 蛋白的抗体, 从而严重影响现有条件下的禽流感免疫监测和流行病学调查^[1], 并可能造成人为散毒。鸡痘病毒作为较成熟的重组病毒疫苗载体已成功地用于多种病原保护性抗原的表达, 并接种机体后显示出良好的免疫原性。HA 是 AIV 的主要保护性抗原^[2]。以表达各种亚型 AIV HA 基因的重组鸡痘病毒 (rFPV) 疫苗免疫均可对同一亚型不同毒株(包括高、低致病力毒株)的攻击产生近 10/10 的免疫保护, 而且不会干扰禽流感疫情的监测, 具有较好的应用前景。用于构建重组鸡痘病毒的载体一般为鸡痘病毒疫苗株, 虽然它们的毒副作用小、安全性高, 但仍有一定的残留毒性, 表现为对雏鸡的体重增长和免疫应答抑制作用^[3]。因此, 近年来许多研究者探索了多种途径来降低载体鸡痘病毒的毒副作用。其中之一就是在重组疫苗中引入细胞因子, 如 IL-2 和 IFN-II, 用以构建共表达保护性抗原和细胞因子的重组鸡痘病毒。此外, 引入细胞因子还能增强疫苗的免疫效力。因此, 这一方法成为近年来研制安全、高效鸡痘病毒重组疫苗的有效途径之一^[4]。

为了预防 H5 和 H7 亚型禽流感的发生, 同时克服鸡痘病毒载体抑制雏鸡体重增长和免疫应答的残留毒性, 以 282E4 疫苗株作为载体, 构建了共表达 H5 亚型 AIV HA 基因与鸡 IL-18 基因的重组鸡痘病毒疫苗 rFPV-H5HA-IL18、共表达 H5、H7 亚型 AIV HA 基因与鸡 IL-18 基因的重组鸡痘病毒疫苗 rFPV-H5HA-H7HA-IL18 和表达 H5 亚型 AIV HA 基因的重组鸡痘病毒疫苗 rFPV-H5HA, 以期克服目前在兽医临床上较广泛使用的抗 H5 亚型 AIV 全病毒灭活疫苗的一些缺陷。初步研究表明, rFPV-H5HA-IL18 和 rFPV-H5HA-H7HA-IL18 的免疫保护力与灭活疫苗相当, 而且能克服灭活疫苗的一些不足。同时, 由于共表达的鸡 IL-18 的作用, 增强了疫苗的免疫效果, 降低了鸡痘病毒载

体的毒性, 提高了免疫保护率, 因而具有一定的实用前景。

1 材料与方法

1.1 实验材料

鸡痘病毒 282E4 疫苗 (wt-FPV), 购自中国兽医药品监察所, TCID₅₀ 为 $1 \times 10^7 / 0.1 \text{ mL}$ 。AIV Isolate1 为本室分离保存的 H5N1 亚型鸡源高致病性禽流感病毒 (ELD₅₀ = $10^{-7.33} / 0.1 \text{ mL}$, LD₅₀ = $10^{6.84} / 0.1 \text{ mL}$), 在本试验中用作攻毒毒株。共表达 H5 亚型 AIV HA 基因与鸡 IL-18 基因的重组鸡痘病毒疫苗 rFPV-H5HA-IL18、共表达 H5、H7 亚型 AIV HA 基因与鸡 IL-18 基因的重组鸡痘病毒疫苗 rFPV-H5HA-H7HA-IL18 和表达 H5 亚型 AIV HA 基因的重组鸡痘病毒疫苗 rFPV-H5HA 均由本实验室构建。H5 亚型 AIV 全病毒灭活疫苗、鸡和鸡胚 1 日龄 SPF 鸡及 9~11 日龄 SPF 鸡胚均购自哈尔滨兽医研究所, 1 日龄商品 Leghorn 蛋鸡由长春农科院提供。

1.2 重组病毒的 RT-PCR 鉴定

收集重组病毒感染的 CEF, 用 TRIZOL LS Reagent 按说明书指示提取细胞总 RNA, AIV HA 基因特异引物和鸡 IL-18 基因特异引物进行 RT-PCR。

1.3 IFA 鉴定重组病毒

将纯化的重组病毒, 接种于玻片上的 CEF 细胞单层细胞上, 同时设 FPV 282 E4 株亲本和空白细胞对照。100%丙酮固定, 以 3% BSA 为封闭液, 以鸡抗 AIV 多克隆抗体为第一抗体, 用保温液 60 倍稀释, FITC 标记的羊抗鸡 IgY 为第二抗体, 用 TBS 10×稀释, 荧光显微镜下观察。

1.4 重组病毒和鸡痘病毒毒价测定

将重组病毒及鸡痘病毒 282E4 在 SPF 鸡胚成纤维细胞上扩增, 选取 1:109 稀释度接种细胞 (0.2 mL/5 mL 细胞培养瓶) 进行蚀斑计数, 计算出重组病毒的效价。

1.5 重组病毒诱导的 HI 抗体水平的检测

120 只 1 日龄 SPF 鸡随机分成 6 组, 每组 20

只,1~4 组,分别经翅皮下刺种重组鸡痘病毒疫苗,第 5 组接种 H5 亚型 AIV 灭活苗 0.2mL,第 6 组接种 0.2mL PBS。接种当日、第 7d、14d、21d 采集血清,测定针对 H5 亚型 AIV 特异性血凝抑制抗体(HI)滴度(以 \log_2 表示)。以上述各疫苗免疫 7 日龄商品蛋鸡,免疫剂量、途径及分组状况同上。对重组疫苗免疫鸡血清同时检测抗 NP 抗体。

1.6 免疫与攻毒

60 只 1 日龄 SPF 鸡随机分成 6 组,按 1.5 的方法进行免疫。免疫 21d 后,用 10^3 ELD₅₀ AIV Isolate 强毒肌肉注射进行攻击,观察两周,统计发病及死亡鸡数,计算保护率。90 只 1 日龄 Leghorn 商品蛋鸡随机分成 9 组,在 1 周龄时按上述相同的方法进行免疫和攻毒,其中重组毒株疫苗组各设定两个实验组,按 10^6 PFU 和 10^4 PFU 的毒量接种。免疫 3 周后,用 10^3 ELD₅₀ AIV Isolate 强毒肌肉注射进行攻击,统计 2 周内发病及死亡鸡数,计算保护率。

1.7 重组病毒免疫鸡脾淋巴细胞转化实验

50 只 1 日龄 Leghorn 商品蛋鸡随机分成 5 组,每组 10 只,分群饲养,1 周龄免疫。1~4 组分别经翅皮下刺种 10^6 PFU 的 rFPV-H5HA-IL18、rFPV-H5HA-H7HA-IL18、rFPV-H5HA 和 wt-FPV;第 5 组为空白对照组,接种 0.2mL PBS。免疫后 14 d,取脾脏进行淋巴细胞转化试验。

1.8 重组病毒免疫 SPF 雏鸡后对体重增长的影响

100 只 1 日龄 SPF 鸡随机分成 5 组,每组 20 只,1~4 组分别经翅皮下刺种 rFPV-H5HA-IL18、rFPV-H5HA-H7HA-IL18、rFPV-H5HA 和 wt-FPV 各 10^6 PFU,第 5 组接种 0.2mL PBS。分别于接种后 7d 和 14d 称重。用 SPSS 软件对各组鸡的体重作方差分析。

1.9 免疫攻毒后泄殖腔排毒率检测

对 1.6 免疫与攻毒的 9 组 Leghorn 商品蛋鸡,选择 10^6 PFU rFPV-H5HA-IL18、rFPV-H5HA-H7HA-IL18、rFPV-H5HA 及灭活疫苗免疫鸡,在攻毒后 7 天采集各组鸡泄殖腔棉拭子样品,用禽流感疫苗非免疫蛋孵化的 9 日龄鸡胚进行 AIV 分离,每份样品接种 5 个鸡胚,最后测定各组鸡泄殖腔排毒率。

2 结果

2.1 重组病毒的 RT-PCR 鉴定

对 rFPV-H5HA 感染的细胞培养物提取 RNA,用 H5 亚型 AIV HA 基因引物进行 RT-PCR 扩增,均可扩增出约 1700bp 的 HA 基因片段(图 1),与预期大小相符,表明 H5 亚型 AIV HA 基因

已经整合进入 rFPV-H5HA 重组病毒基因组,并在 CEF 细胞中得到转录。对从 rFPV-H5HA-H7HA-IL18 感染细胞培养物中提取的 RNA,用 IL-18 基因引物进行 RT-PCR 扩增,可扩增出约 500bp 的 IL-18 基因片段(图 1),与预期大小相符,表明鸡 IL-18 基因已经整合进入 rFPV-H5HA-H7HA-IL18 基因组,并在 CEF 细胞中得到转录。用 H5HA 基因上游引物和 H7HA 下游的引物进行 RT-PCR 扩增,可扩增出约 3400bp 的 H5HA-H7HA 基因片段(图 2),与预期大小相符,表明 H5HA-H7HA 融合蛋白基因整合进入 rFPV-H5HA-H7HA-IL18 基因组,并在 CEF 细胞中得到转录。因此表明 rFPV-H5HA-H7HA-IL18 和 rFPV-H5HA 重组病毒构建成功。

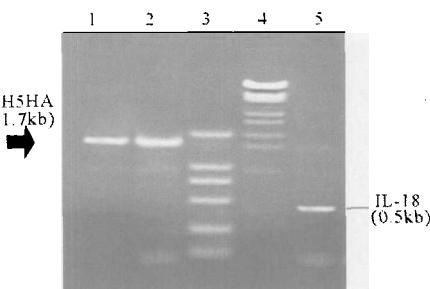


图 1 rFPV-H5HA-H7HA-IL18 的 PCR 鉴定

Fig. 1 PCR amplification of rFPV-H5HA-H7HA-IL18
1. rFPV-H5HA-IL18 strain; 2, rFPV-H5HA strain; 3/4, DL-2000
DNA Marker; 5, rFPV-H5HA-IL18 and rFPV-H5HA-H7HA-
IL18.

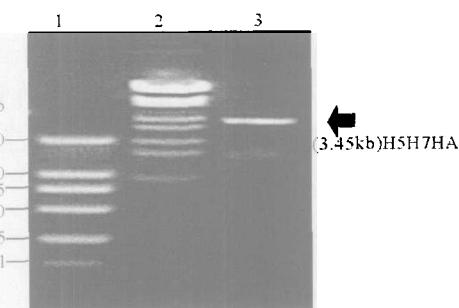


图 2 rFPV-H5HA-H7HA-IL18 的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR amplification of rFPV-H5HA-H7HA-IL18
1/2, DNA Marker; 3, rFPV-H5HA-H7HA-IL18 strain.

2.2 IFA 检测

用重组病毒感染玻片上的单层 CEF 细胞,经丙酮固定,先后与鸡抗 AIV 抗体、FITC 标记的羊抗鸡抗体进行结合反应,荧光显微镜下观察。结果显示,从病毒噬斑中筛选出的 3 株重组鸡痘病毒感染细胞表现出明显强荧光,阳性细胞主要为圆缩的病毒感染细胞,其周围未病变的 CEF 细胞为阴性(见图 3)。结果表明 rFPV-H5HA-H7HA-IL18、rFPV-

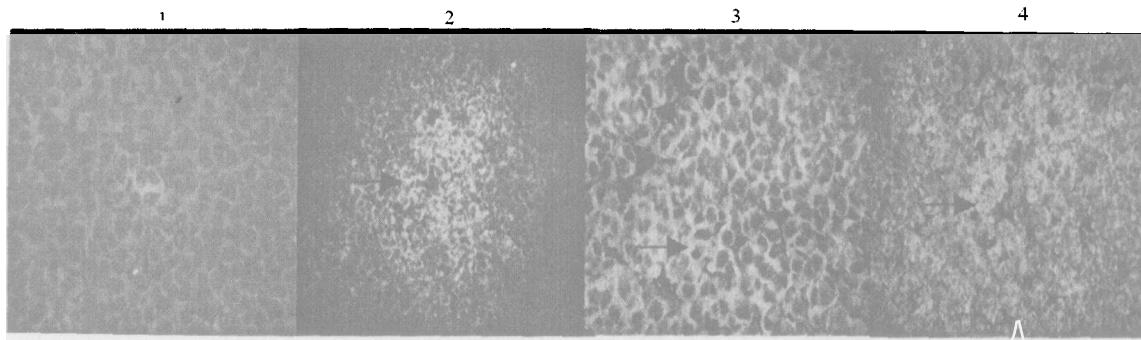


图3 间接免疫荧光法检测表达 H5HA、H7HA 基因的重组病毒

Fig. 3 Identification of the recombinant FPVs by IFA

1. Nomoral CEF; 2. rFPV-H5-IL-18; 3. rFPV-H5-H7-IL18; 4. rFPV-H5.

H5HA-IL18 和 rFPV-H5HA 能够在 CEF 内表达 H5 和 H7 亚型 AIV HA。

2.3 重组病毒和鸡痘病毒的毒价

通过对重组病毒原液加以稀释,选取 $1:10^9$ 稀释度接种细胞(0.2 mL/5mL 细胞培养瓶)进行蚀斑计数,最后计算出重组病毒的效价为:rFPV-H5HA-IL18、rFPV-H5HA-H7HA-IL18 的毒价均为 50×10^{10} PFU/mL, rFPV-H5HA 和 wt-FPV 的毒价为 25×10^{10} PFU/mL。

2.4 重组病毒诱导的 HI 抗体水平

1 日龄 SPF 实验鸡和 7 日龄 Leghorn 商品蛋实验鸡血清中均没有检测到 H5 亚型母源 AIV 血凝抑制抗体(HI)。Leghorn 商品蛋实验鸡在 7 日龄时能检测到微弱的母源 FPV 抗体($\leq 2, \log_2$ 表

示)。按 1.5 中描述的方法对实验鸡进行分组和免疫。SPF 实验组鸡在接种重组病毒 rFPV-H5HA-IL18、rFPV-H5HA-H7HA-IL18 和 rFPV-H5HA-7d 后能诱生出可检测到的 HI 抗体,但抗体水平较低,免疫 14d 和 21d 后 HI 抗体达到较高的水平;接种 wt-FPV 和 PBS 的鸡未产生任何 HI 抗体;接种灭活苗鸡产生了较高水平的 HI 抗体,结果见表 1。Leghorn 商品蛋鸡实验组,重组疫苗也诱导产生了相似水平的 HI 抗体,结果如表 1。SPF 鸡和 Leghorn 商品蛋鸡接种 rFPV-H5HA-H7HA-IL18 后均能产生抗 H7 AIV HA 血凝抑制抗体,产生的抗体水平与抗 H5HA 抗体水平相似。两组实验鸡接种重组疫苗均不产生抗 NP 抗体。

2.4 重组疫苗免疫攻毒保护率

表 1 重组疫苗免疫 SPF 鸡/商品蛋雏鸡产生的 HI 抗体

Table 1 HI antibodies induced by rFPV for SPF chicken/commercial egg laying chicken

	rFPV-H5HA-IL18	rFPV-H5HA-H7HA-IL18	rFPV-H5HA	Inactivated vaccine	wt-FPV	Negative control
7d	2.15±0.32/	2.02±0.16/	3.14±0.17/	3.98±0.26/	0	0
	3.22±0.42	2.52±0.51	3.62±0.12	3.93±0.12		
14d	3.26±1.02/	3.04±0.92/	4.04±0.91/	5.94±0.51/	0	0
	4.56±1.52	3.94±0.32	4.04±0.71	5.53±0.61		
21d	3.21±1.21/	3.01±0.88/	4.56±0.37/	7.85±0.83/	0	0
	4.33±1.22	3.64±0.82	4.45±0.53	7.45±0.63		

Note: Antibody titers denote significant difference at 7 and 14 days old ($p < 0.05$). Dose of inoculation was 10^6 PFU.

按照 1.5 中描述的方法对试验鸡进行分组、攻毒、观察和计算攻毒保护率。在 SPF 鸡和商品 Leghorn 蛋鸡试验组中,攻毒对照组与 wt-FPV 对照组在攻毒后第 2d 开始出现精神沉郁、食欲废绝、腹泻、鸡冠和足部皮下出血等典型症状,并于 2~6d 内全部死亡。SPF 鸡试验组,10⁶ PFU 的 rFPV-H5HA-

IL18 和 rFPV-H5HA-H7HA-IL18 免疫组鸡对强毒攻击产生 10/10 保护率,rFPV-H5HA 及灭活苗免疫组鸡对强毒攻击产生 9/10 保护率。商品蛋鸡试验组,除 10⁴ PFU 的 rFPV-H5HA 和灭活苗免疫鸡组对强毒攻击产生 9/10 保护率外,其它重组疫苗免疫组对强毒均产生 10/10 保护。

2.5 重组病毒免疫商品蛋鸡的脾淋巴细胞增殖反应比较

商品蛋鸡免疫 14d 后无菌取脾脏,每组 10 只,检测脾淋巴细胞受 Con A 刺激后的增殖能力。结果表明(图 4),rFPV-H5HA-IL18 和 rFPV-H5HA-H7HA-IL18 免疫组鸡淋巴细胞 Con A 刺激指数明显高于 rFPV-H5HA 和 wt-FPV 免疫组($p < 0.05$),证明 rFPV-H5HA-IL18 和 rFPV-H5HA-H7HA-IL18 在体内表达的 IL-18 增强了鸡的细胞免疫水平。

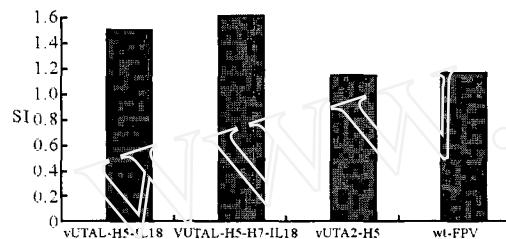


图 4 Con A 刺激的淋巴细胞增殖反应

Fig. 4 Splenocyte lymphocytes proliferation stimulated by Con A

2.6 重组病毒免疫 SPF 雏鸡后对体重增长的影响

1 日龄 SPF 鸡接种各种疫苗 7d 和 14d 后,进行称重试验,称重结果见表 2。免疫 14d 后,接种 rFPV-H5HA 和 wt-FPV 的鸡体重显著轻于接种 rFPV-H5HA-IL18、rFPV-H5HA-H7HA-IL18 和空白对照组鸡,表明 rFPV-H5HA-IL18、rFPV-H5HA-H7HA-IL18 在体内表达的鸡 IL-18 能减轻鸡痘病毒载体对雏鸡体重增长的抑制作用。

表 2 重组病毒免疫 1 日龄 SPF 雏鸡后对体重增长的影响
Table 2 The effects of rFPV on the body weight gain of 1-day-old SPF chickens

Groups	Dose (PFU)	Body weight(g)	
		7 dpi	14 dpi
rFPV-H5HA-IL18	10^6	65.1 ± 6.3^a	115.5 ± 11.4^c
rFPV-H5HA-H7HA-IL18	10^6	64.9 ± 5.6^a	114.2 ± 11.8^c
rFPV-H5HA	10^6	62.3 ± 7.3^b	101.8 ± 13.5^d
wt-FPV	10^6	61.8 ± 7.3^b	99.8 ± 13.5^d
PBS control		68.6 ± 8.4^a	120.5 ± 18.1^c

Note: a and b denote significant difference ($p < 0.05$); c and d denote significant difference ($p < 0.05$); dpi: days post inoculation.

2.7 重组病毒免疫的商品蛋雏鸡用 AIV Isolate (H5N1) 攻毒后泄殖腔排毒率

对免疫攻毒的 9 组 Leghorn 商品蛋鸡,选择 10^6 PFU rFPV-H5HA-IL18、rFPV-H5HA-H7HA-IL18、rFPV-H5HA 及灭活苗免疫鸡,在攻毒后第

7d 从各组鸡泄殖腔中采集棉拭子样品,用鸡胚分离法进行 AIV 病毒分离,病毒分离结果见表 3。表明重组鸡痘病毒能明显降低免疫鸡攻毒后的排毒,而且共表达 IL-18 的重组鸡痘病毒的抑制排毒效果优于不带 IL-18 的重组鸡痘病毒和灭活疫苗。

表 3 重组病毒免疫的商品蛋雏鸡用 AIV Isolate (H5N1) 攻毒后泄殖腔排毒率
Tab 3 Data of virus isolation from cloacal swab specimens of rFPV vaccinated commercial egg laying chicken

Groups	Dose (PFU)	Ratios of chicken shedding virus 7 days post challenging	
		0/10	1/10
rFPV-H5HA-IL18	10^6	0/10	-
rFPV-H5HA-H7HA-IL18	10^6	0/10	-
rFPV-H5HA	10^6	1/10	-
Inactivated vaccine	0.2mL	1/9	-
wt-FPV	10^6	- ^a	- ^b
PBS control		- ^c	- ^d

^a: Negative control all died. Vaccinating age were 7d and challenging age were 28d.

3 讨论

以鸡痘病毒为载体构建的禽用重组鸡痘病毒疫苗有很多优点,但也存在一定的毒副作用,表现为对雏鸡的体重增长及免疫功能的抑制作用^[5],研究证明一些细胞因子能够缓解这种毒副作用。一些细胞因子在动物模型或临床试验中已被证明是很有效的免疫调节剂,已有很多把一系列细胞因子(IL-1~IL-8、IL-12、IFN、颗粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、肿瘤坏死因子等)作为免疫调节剂研究和应用的报道,表明细胞因子佐剂能够促进细菌、病毒和寄生虫疫苗诱导保护性免疫应答,增强免疫保护效果^[6],因此细胞因子免疫调节剂(cytokine adjuvant)的应用越来越广。Schneider^[7]等于 2000 年首先克隆到鸡 IL-18 cDNA,并在大肠杆菌中进行了表达,表明重组的鸡 IL-18 具有诱导 IFN- γ 合成的生物学活性。Thomas WG^[8]等于 2003 年的最新研究进一步表明鸡 IL-18 cDNA 具有多种生物学活性,能诱导 CD4 $^{+}$ T 细胞分泌 IFN- γ ,是 Th 细胞强活化剂,能诱导 T 细胞增殖,对 MHC Class II Ag 的合成具有正调节作用。

本研究对本课题组已构建好的重组病毒疫苗 rFPV-H5HA、rFPV-H5HA-IL18 和 rFPV-H5HA-H7HA-IL18,进行了免疫保护性实验。初步研究表明,通过共表达的 IL-18 细胞因子能够调节和增强

同时表达的 H5N1 亚型 AIV 血凝素基因(HA)及 H5N1 和 H7N1 亚型 AIV 血凝素融合表达产物的免疫保护效力,同时降低了鸡痘病毒载体对雏鸡体重增长抑制作用及免疫抑制作用。在免疫 SPF 雏鸡和 Leghorn 商品蛋雏鸡后均能产生一定水平的针对 H5 亚型 AIV 的 HI 抗体。SPF 雏鸡和 Leghorn 商品蛋雏鸡用这 2 个重组疫苗免疫后对同源 H5 亚型 HPAIV 病毒的攻击均能产生 10/10 的保护力,与常规疫苗相当,另外,与传统疫苗相比,3 株基因重组疫苗免疫鸡后均不产生抗 NP 蛋白抗体,不会干扰禽流感疫情的监测。同时本实验室究构建的 rFPV-H5HA-H7HA-IL18 重组毒疫苗有望对 H5 和 H7 两个亚型 AIV 同时起到保护作用,不但降低了成本,而且简化了操作。当然本项研究尚处在实验室阶段,下一步本课题组将严格按照新药证书标准对其理化特性、遗传稳定性、生产工艺以及免疫剂量、接种途径等方面进行研究,进一步完善相关指标,达到临床应用的标准,为我国 AI 的综合仿制储备物质基础。

参考文献

- [1] Leong K H, Ramsay A J, Boyle D B, et al. Selective induction of immune response by cytokines coexpressed in recombinant fowlpox virus[J]. *J Virol*, 1994, 68: 8125-8130.
- [2] Webster R G, Kawaoka Y, Taylor J, et al. Efficacy of nucleoprotein and haemagglutinin antigens expressed in fowlpox virus as vaccine for influenza in chickens[J]. *Vaccine*, 1991, 9: 303-308.
- [3] Springer W T, Truman R W. Effect of subcutaneous pox vaccination of young chickens on immune response and weight gains[J]. *Poultry Science*, 1981, 60: 1213-1220.
- [4] Shearer G M, Clerici M. Vaccine strategies :selective elicitation of cellular or humoral immunity[J]. *Bio/technol.*, 1997, 15 (3): 106-109.
- [5] Leong K H, Ramsay A J, Boyle D B, et al. Selective induction of immune response by cytokines coexpressed in recombinant fowlpox virus[J]. *J Virol*, 1994, 68: 8125-8130.
- [6] Noll A, Autenrieth I B. Immunity against *Yersinia enterocolitica* by vaccination with *Yersinia HSP60* plus interleukin-12[J]. *Infect Immun*, 1996, 64: 2955-2961.
- [7] Schneider K, Puehler F, Baueuerle D, et al. cDNA cloning of biologically active chicken interleukin-18[J]. *Journal of interferon & cytokine research*, 2000, 20: 879-883.
- [8] Thomas W G , Schneider K, Schaeerer B, et al. IL-18 Stimulates the Proliferation and IFN- γ release of CD4 $^{+}$ T Cells in the Chicken: Conservation of a Th1-Like System in a Nonmammalian Species[J]. *Immunol*. 2003, 171: 1809-1815.