

# Advance Research on Avian Influenza Viruses Vaccine\*

Wenyao Lin, Dawei Liu, Ang Li

<sup>1</sup>Guangdong De Bao Ecological Raise Co. Ltd., Yingde  
<sup>2</sup>Foshan Gaoming Xin Guang Agricultural and Livestock Co. Ltd., Foshan  
<sup>3</sup>Qing Xin Jinyufeng Goose Industry Co. Ltd, Qingyuan  
Email: 275902708@qq.com

Received: May 17th, 2012; revised: May 23rd, 2012; accepted: May 28th, 2012

**Abstract:** Avian influenza virus (AIV) is harmful to poultry industry. Currently, prevention of avian influenza is mainly by inactivated whole virus vaccines. The paper provided a review of the research and development of AIV as a reference.

**Keywords:** Avian Influenza Viruses; Vaccine; Advance

## 禽流感疫苗研究进展\*

林文耀<sup>1</sup>, 刘大伟<sup>2</sup>, 李昂<sup>3</sup>

<sup>1</sup>广东得宝生态养殖有限公司, 英德  
<sup>2</sup>佛山高明新广农牧有限公司, 佛山  
<sup>3</sup>清新县金羽丰鹅业有限公司, 清远  
Email: 275902708@qq.com

收稿日期: 2012年5月17日; 修回日期: 2012年5月23日; 录用日期: 2012年5月28日

**摘要:** 禽流感是严重危害养禽业的重要传染病。目前在禽流感的防治方面, 以传统的全病毒灭活疫苗的应用最为广泛。本文概述了禽流感疫苗的研究现状及发展方向, 为禽流感的防治提供参考。

**关键词:** 禽流感; 疫苗; 进展

### 1. 引言

禽流感不仅给养禽业造成了巨大的经济损失, 而且由于禽流感可直接感染人并导致死亡, 给人类健康带来严重的威胁。据报道, 2005年以来 H5N1 亚型禽流感病毒逐渐在欧洲、中亚和非洲大陆流行(<http://www.OIE.int>; <http://www.WHO.int>)。尤其值得注意的是, 从2005年开始, H5N1 亚型禽流感病毒感染人的报道逐渐增多。截至2011年5月13日, 据世界卫生组织统计, 全球共有553人感染 H5N1 亚型禽流感病毒, 其中死亡323人。这提示我们, 随着时间的推移, H5N1 亚型禽流感病毒对人类健康的威胁在加大。虽然目前

\*基金项目: 广东省金羽丰鹅养殖健康农业科技示范基地(2011A020502003)。

发病的情况仍为个案, 并未形成普遍流行的态势, 不具备人传人的特性。但是随着流感病毒的进化, 流感病毒在人与人之间传播也许会变为可能, 因此我们必须予以高度重视, 坚持长期积极的流感病毒监测政策, 有效地防控 H5N1 亚型高致病性禽流感的暴发。目前在禽流感的防治方面, 以传统的全病毒灭活疫苗的应用最为广泛, 但自身也存在免疫剂量大, 依赖于鸡胚生产, 存在散毒隐患, 影响禽流感的监测和流行病学调查等缺点。为此, 本文概述了具有应用前景的禽流感疫苗研究现状及发展方向, 为禽流感的防治提供参考。

### 2. 全病毒灭活疫苗

禽流感灭活疫苗能有效地减轻免疫鸡群的损失,

并显著减少可能存在于鸡群和环境中的病毒数量,是防控禽流感疫情发生的主要保障。灭活疫苗具有免疫效果确实,免疫持续期长,生产成本较低等特点。东南亚和非洲等部分国家使用禽流感全病毒灭活疫苗进行禽流感的防控,是当今应用最广泛的禽流感疫苗。疫苗株主要利用反向遗传技术降低病毒的毒力,其中 HA 和 NA 基因来源于生产环境流行的禽流感病毒,其余的 6 个内部基因片段来源于高度适应鸡胚生长的 H1N1 亚型流感病毒 PR8 株<sup>[1,2]</sup>。代表疫苗株有:重组禽流感病毒灭活疫苗(H5N1 亚型, Re-5 株),其 HA 基因来源于 2006 年在安徽发病鸭群分离的 A/Duck/AnHui/1/06(H5N1)株, NA 基因来源于 A/Goose/GuangDong/1/96(H5N1),其余的 6 个内部基因片段来源于高度适应鸡胚生长的 H1N1 亚型流感病毒 PR8 株,可在全国范围内用于各种禽类;重组禽流感病毒灭活疫苗(H5N1 亚型, Re-4 株),其 HA 基因来源于 2006 年在山西发病鸡群分离到的 A/n Chicken/Shanxi/2/06 (H5N1), NA 基因来源于 A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1),该疫苗对山西、宁夏等变异株以及我国大部分流行株的侵袭均具有抵御作用,但对青海斑头雁株等病毒攻击的保护率只有 90%左右,因此,该苗不能取代 Re-5 株疫苗。该疫苗需在我国农业部指定范围内应用,主要在我国北方使用<sup>[3-5]</sup>。

### 3. 重组活载体疫苗

不能复制或能复制但不致病的各种病毒,包括痘病毒、疱疹病毒、杆状病毒、腺病毒、新城疫病毒、水泡性口膜炎病毒等,被用作向免疫系统运输流感蛋白的载体。禽流感重组活载体疫苗的研究进展相当迅速,效果确实,显示了诱人的应用前景。

乔传铃等(2004)将禽流感病毒 A/Goose/Guangdong/3/96(H5N1)毒株的 HA 和 NA 基因同源重组到禽痘病毒基因组中,获得了能同时高效表达这两种蛋白的重组禽痘病毒(rFPV-HA-NA)。将 rFPV-HA-NA 经翅膀刺种途径接种 8 周龄 SPF 鸡,免疫后 4 周,分别用 10LD<sub>50</sub> 的高致病力禽流感病毒 A/Goose/Guangdong/1/96(H5N1)和 A/FPV/Rostock/34(H7N1)毒株进行攻击。结果重组禽痘病毒免疫鸡群诱导产生了高水平的抗体,能够完全抵抗 H5N1 和 H7N1 亚型禽流感病毒的致死性攻击;并可有效阻止病毒在泄殖腔的排

出<sup>[6]</sup>。Ge 等(2007)以新城疫活疫苗病毒作为载体,把 A/Bar-headed goose/Qinghai/3/2005(H5N1)HA 基因,插在新城疫 LaSota 疫苗株 P 基因和 M 基因之间,利用反向遗传操作技术,研制出禽流感-新城疫二联活疫苗,该疫苗可同时预防新城疫和 H5 亚型禽流感<sup>[7]</sup>。Prabakaran 等(2010)以霍乱毒素 B 亚单位为佐剂,给实验小鼠经胃肠途径投放表面展示 HA(clade 2.1)蛋白的重组杆状病毒,能保护小鼠抵抗同源毒株(clade 2.1)和异源毒株(clade1.0, clade8.0)的攻击<sup>[8]</sup>。Schwartz 等(2011)用水泡性口膜炎病毒载体表达 A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)HA 蛋白的疫苗免疫猕猴,能产生很好的中和抗体应答,对异源禽流感毒株的攻击能提供一定的交叉保护能力<sup>[9]</sup>。

病毒活载体疫苗具有类似于常规弱毒疫苗的效果,能有效地激发免疫应答反应,具有长远的开发前景。但会受母源抗体的干扰或因机体对活载体的免疫反应性质(载体效应),可限制再次免疫的效果。解决这些问题,对病毒活载体疫苗的商业化及其未来发展相当重要。

### 4. 通用型流感疫苗

一种理想的流感疫苗应该是安全的,产生的体液免疫和细胞免疫应答应该与自然感染相当,能提供长期有效的保护,能提供交叉保护性的通用疫苗。血凝素 hemagglutinin (HA),神经氨酸酶 neuraminidase (NA),基质蛋白 matrix protein (M1),基质蛋白 matrix protein (M2),核蛋白 nucleoprotein (NP)等成为通用流感疫苗的研究热点,其中对 HA, M2 的研究最多。

HA 蛋白由一个三聚体组成,包括一个球状头部和一个茎部区域。流感病毒的 HA 蛋白,茎部区域是保守的。根据系统发育树分析,16 种流感亚型可以分为两大组。每一组在茎部都有一个保守的区域,中和抗体可以作用于这一保守区域。第一组包括 H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16, 第二组包括 H3, H4, H7, H10, H14, H15<sup>[10,11]</sup>。同一组里,某个流感亚型血凝素 HA 茎部的单克隆抗体可以识别在这一组里所有的不同流感病毒,并可以介导病毒的中和反应。最近,美国国家卫生研究院研究人员报道,通用型流感疫苗的问世极有可能。研究人员采用启动/增强分步接种方式,首先用编码 A/New Caledo-

nia/20/99(H1N1)亚型流感病毒血凝素表面蛋白茎部的基因序列作为 DNA 疫苗来启动免疫系统,然后将季节性流感疫苗或携带有 H1N1 亚型流感病毒 HA 基因的复制缺陷型腺病毒载体疫苗作为增强剂。免疫后的实验小鼠和白鼬能抵抗从 1934 年到 2004 年出现的所有 H1N1 亚型流感病毒毒株。提示我们不同流感病毒毒株的血凝素茎部相对保守,针对血凝素茎部产生的抗体能识别和中和多种流感毒株。这一研究成果为通用型流感疫苗的研发奠定了基础<sup>[11]</sup>。Steel 等(2010)用含有完整 HA 基因的疫苗和缺少球形状头部,只含有 HA 基因茎部区域的疫苗分别免疫小鼠,发现只含有 HA 基因茎部的疫苗能产生较好的交叉保护能力<sup>[12]</sup>。相关研究表明,针对特异亚型或者不同亚型流感病毒的茎部区域产生的抗体对不同的流感毒株都具有交叉保护能力<sup>[13,14]</sup>。

基质蛋白 M2 胞外区 M2e(M2 extradomain, M2e)为 24 个氨基酸,M2e 具有极高的保守性。对来源于人,禽,猪,马等 716 株不同的 A 型流感病毒的分析表明,M2e 的 24 个氨基酸同源性高达 94%<sup>[15]</sup>。M2e 特异性抗体虽然不能中和病毒,但是可以通过抗体介导的细胞毒作用(ADCC)清除受感染的细胞,减少病毒的复制<sup>[16,17]</sup>。基于 M2e 的流感疫苗研究进展迅速,某些产品现在已经进入临床试验。赛诺菲巴斯德公司 M2e 的实验疫苗 ACAM-FLU-A 是使用 M2e 和载体相连的方式,基因融合 M2e 和 B 型乙型肝炎病毒核心抗原(HBc),利用重组病毒样颗粒(VLP)方式表达 M2e。ACAM-FLU-A 可以保护 70%的白鼬抵抗 H5N1 亚型高致病性禽流感毒株的攻击<sup>[18]</sup>。(http://www.bioportfolio.com; http://www.sciencedaily.com)。美国 VaxInnate 公司的 M2e 与鞭毛蛋白融合的流感疫苗已经进入临床二期,疫苗对 18~49 岁的健康志愿者是安全的,具有很好的免疫原性(http://www.vaxinnate.com)。

## 5. DNA 疫苗

DNA 疫苗又称为基因疫苗或核酸疫苗,是指利用 DNA 重组技术将病原微生物的保护性抗原基因克隆到真核表达载体上,并通过宿主细胞的表达系统合成抗原蛋白,诱导宿主产生对该抗原蛋白的免疫应答。有关质粒 DNA 疫苗在禽流感预防和治疗作用的研究报道不断增加,其中我国学者对禽流感 DNA 疫苗进行了相当多的研究,实验结果令人鼓舞。姜永萍等

(2004)构建表达高致病力禽流感病毒分离株 A/Goose/Guangdong/1/96(H5N1)HA 基因的 DNA 疫苗质粒 pCIHA5,4 周龄 SPF 鸡免疫后 3 周用高致病性禽流感 GD/1/96(H5N1)的 10 LD<sub>50</sub> 以肌肉注射途径攻毒,结果表明 pCIHA5 虽具有较为稳定的免疫原性和免疫保护性,但其免疫后 HI 抗体产生水平明显低于灭活疫苗,而且其免疫后抗体反应水平有一定的个体差异<sup>[19]</sup>。通过对 HA 密码子进行优化和采用鸡  $\beta$ -actin 启动子表达载体 pCAGGS,可显著提高 H5 亚型禽流感 DNA 疫苗诱导的保护性抗体免疫反应水平,增强免疫保护效果,对免疫鸡产生 100%完全保护(不发病、不致死、不排毒),可以成为预防 H5 亚型 HPAIV 的技术储备候选疫苗<sup>[20-22]</sup>。

## 6. 新型弱毒疫苗

不同于冷适应株(25℃~26℃下鸡胚中连续传代得到减毒毒株),目前研究的新弱毒疫苗主要集中在流感病毒的非结构蛋白 NS1。NS1 蛋白与流感病毒的复制有关,抑制宿主的固有免疫应答,阻止宿主产生干扰素。通过改变或基因敲除 NS1 蛋白而制备的流感疫苗株能阻止病毒的复制,提高体液免疫和细胞免疫反应,产生高水平的干扰素和其他细胞因子<sup>[23,24]</sup>。早期的临床研究表明,健康志愿者鼻内接种 NS1 缺失流感疫苗 DeltaNS1-H1N1 具有很好的耐受性,产生的中和抗体可以中和异源禽流感变异毒株<sup>[25]</sup>。

## 7. 结语

目前,禽流感预防主要采用全病毒灭活疫苗,该疫苗存在着免疫剂量大,并且依赖于鸡胚生产,灭活不彻底,干扰流行病学的血清学监测等缺点。更令人担心的是禽流感病毒不仅变异迅速,而且出现不同亚型病毒同时流行的现象。传统的禽流感疫苗难以提供有效的交叉保护,不利于疫病的防控。理想的禽流感疫苗应该对各种亚型的禽流感病毒都有效。通用型流感疫苗对不同亚型流感病毒都具有广泛交叉免疫保护能力,因此,通用型流感疫苗将会是流感疫苗未来的研究方向。

## 参考文献 (References)

- [1] T. Horimoto, Y. Kawaoka. Strategies for developing vaccines

- against H5N1 influenza A viruses. *Trends in Molecular Medicine*, 2006, 12(11): 506-514.
- [2] R. J. Webby, D. R. Perez, J. S. Coleman, et al. Responsiveness to a pandemic alert: Use of reverse genetics for rapid development of influenza vaccines. *Lancet*, 2004, 363(9415): 1099-1103.
- [3] 裴磊, 王国俊, 熊杰等. Clade 2.2 H5N1 亚型禽流感重组灭活疫苗株的构建及其对小鼠免疫效力的评价[J]. *中国预防兽医学报*, 2010, 32(9): 699-702.
- [4] 田国彬. 禽流感疫苗的种类及使用[J]. *北方牧业*, 2010, 22: 27.
- [5] 曾显营, 钟功勋, 李雁冰等. 禽流感病毒 H5N1 变异株灭活疫苗(Re-4 株)对鸡、鸭和鹅的免疫效果研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2010, 32(10): 800-803.
- [6] 乔传玲, 姜永萍, 于康震等. 共表达禽流感病毒 HA 和 NA 基因的重组禽痘病毒在 SPF 鸡的免疫效力试验[J]. *中国农业科学*, 2004, 37(4): 605-608.
- [7] J. Y. Ge, G. H. Deng, Z. Y. Wen, et al. New castle disease virus-based live attenuated vaccine completely protects chickens and mice from lethal challenge of homologous and heterologous H5N1 avian influenza viruses. *Journal of Virology*, 2007, 81(1): 150-158.
- [8] M. Prabhakaran, S. Madhan, N. Prabhu, et al. Gastrointestinal delivery of baculovirus displaying influenza virus hemagglutinin protects mice against heterologous H5N1 infection. *Journal of Virology*, 2010, 84(7): 3201-3209.
- [9] J. A. Schwartz, L. Buonocore, A. Suguitan, Jr, et al. Vesicular stomatitis virus-based H5N1 avian influenza vaccines induce potent cross-clade neutralizing antibodies in rhesus macaques. *Journal of Virology*, 2011, 85(9): Epub ahead of print.
- [10] R. J. Russell, P. S. Kerry, D. J. Stevens, et al. Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion. *Proceedings of National Academy Sciences USA*, 2008, 105(46): 17736-17741.
- [11] C. J. Wei, J. C. Boyington, P. M. McTamney, et al. Induction of broadly neutralizing H1N1 influenza antibodies by vaccination. *Science*, 2010, 329(5995): 1060-1064.
- [12] J. Steel, A. C. Lowen, T. Wang, et al. An influenza virus vaccine based on the conserved hemagglutinin stalk domain. *Mbio*, 2010, 1(1): Article ID e00018.
- [13] A. K. Kashyap, J. Steel, A. Rubrum, et al. Protection from the 2009 H1N1 Pandemic Influenza by an antibody from combinatorial survivor-based libraries. *PLoS Pathogens*, 2010, 6(7): Article ID e1000990.
- [14] G. Bommakanti, M. P. Citron, R. W. Hepler, et al. Design of an HA2-based *Escherichia coli* expressed Influenza Immunogen that Protects Mice From Pathogenic Challenge. *Proceedings of National Academy Sciences USA*, 2010, 107(31): 13701-13706.
- [15] W. Liu, P. Zou, J. Ding, et al. Sequence comparison between the extracellular domain of M2 protein human and avian influenza A virus provides new information for bivalent influenza vaccine design. *Microbes and Infection*, 2005, 7(2): 171-177.
- [16] A. M. Eriksson, K. M. Schon and N. Y. Lycke. The cholera toxin-derived CTA1-DD vaccine adjuvant administered intranasally does not cause inflammation or accumulate in the nervous tissues. *The Journal of Immunology*, 2004, 173(5): 3310-3319.
- [17] V. C. Huber, J. M. Lynch, D. J. Bucher, et al. FcR-mediated phagocytosis makes a significant contribution to clearance of influenza virus infections. *The Journal of Immunology*, 2001, 166(12): 7381-7388.
- [18] W. Fiers, M. De Filette, K. Bakkouri, et al. M2e-based universal influenza A vaccine. *Vaccine*. 2009, 27(45): 6280-6283.
- [19] 姜永萍, 于康震, 邓国华等. 表达 H5 亚型禽流感病毒 HA 基因的 DNA 疫苗免疫保护效力研究[J]. *中国农业科学*, 2004, 37(7): 1071-1075.
- [20] 姜永萍, 张洪波, 李呈军等. HA 基因密码子及表达载体优化的 H5 亚型禽流感 DNA 疫苗免疫保护效果比较[J]. *农业生物技术学报*, 2006, 14(3): 301-306.
- [21] 姜永萍, 张洪波, 张平静等. H5 亚型禽流感 DNA 疫苗质粒 pCAGGoptiHA5 对商品蛋鸡的免疫保护效果[J]. *中国兽医学报*, 2007, 27(1): 62-65.
- [22] 王国俊, 熊杰, 李俊平等. H5 亚型禽流感病毒 A/Duck/Anhui/1/2006(Clade 2.3)密码子优化 HA 基因 DNA 疫苗的免疫保护效力研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2010, 32(2): 116-120.
- [23] B. Ferko, J. Stasakova, J. Romanova, et al. Immunogenicity and protection efficacy of replication-deficient influenza A viruses with altered NS1 genes. *Journal of Virology*, 2004, 78(23): 13037-13045.
- [24] J. Talon, M. Salvatore, R. E. O'Neill, et al. Influenza A and B viruses expressing altered NS1 proteins: A vaccine approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2000, 97(8): 4309-4314.
- [25] V. Wacheck, A. Egorov, F. Groiss, et al. A novel type of influenza vaccine: safety and immunogenicity of replication-deficient influenza virus created by deletion of the interferon antagonist NS1. *Journal of Infectious Disease*, 2010, 201: 354-362.