

# 猪瘟甲病毒复制子载体 DNA 疫苗与重组腺病毒活载体疫苗联合免疫效果评价

孙元, 刘大飞, 王宇飞, 李娜, 李宏宇, 梁冰冰, 仇华吉

中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室猪传染病研究室, 哈尔滨 150001

**摘要:** 本实验室先前分别将构建的猪瘟病毒 E2 基因重组腺病毒疫苗(rAdV-E2)和猪瘟甲病毒复制子载体 DNA 疫苗(pSFV1CS-E2)在猪体上进行了免疫效力评价, 结果显示, rAdV-E2 免疫组所有猪虽然在加强免疫后产生了比较高的猪瘟特异性中和抗体, 但攻毒后个别猪表现短期体温升高和轻微病变; 而 pSFV1CS-E2 免疫组猪只在攻毒后得到了保护, 但产生的抗体水平较低。为了增强猪瘟甲病毒复制子载体疫苗和猪瘟重组腺病毒活载体疫苗的免疫效果, 本研究应用了复制子载体 DNA 疫苗初免和重组腺病毒疫苗加强免疫的初免-加强(Prime-boost)免疫策略, 并在猪体上进行了评价。结果显示, 所有免疫猪均产生了高水平的猪瘟特异性的中和抗体, 用猪瘟强毒攻击后, pSFV1CS-E2 初免组所有猪( $n=5$ )均没有出现任何猪瘟的临床症状和病理变化, 攻毒后在猪血液中也检测不到猪瘟病毒 RNA, 而重组腺病毒初免组( $n=5$ )有一头猪出现短期发热和病毒血症及轻微病理变化。这表明初免-加强免疫策略能显著提高重组疫苗的免疫效力。

**关键词:** 猪瘟, 甲病毒复制子载体, DNA 疫苗, 重组腺病毒, 联合免疫

## A prime-boost vaccination strategy using a Semliki Forest virus replicon vectored DNA vaccine followed by a recombinant adenovirus protects pigs from classical swine fever

Yuan Sun, Dafei Liu, Yufei Wang, Na Li, Hongyu Li, Bingbing Liang, and Huaji Qiu

Division of Swine Infectious Diseases, State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China

**Abstract:** We have previously evaluated a Semliki Forest virus (SFV) replicon vectored DNA vaccine (pSFV1CS2-E2) and a recombinant adenovirus (rAdV-E2) expressing the E2 glycoprotein of classical swine fever virus (CSFV) in pigs. The results showed that the immunized pigs were protected from virulent challenge, but few pigs showed short-term fever and occasional pathological changes following virulent challenge. To enhance the immunogenicity of the vaccines, we tried a prime-boost vaccination strategy using a combination of prime with pSFV1CS2-E2 followed by boost with rAdV-E2. The results showed that all the immunized pigs developed high-level CSFV-specific antibodies following prime-boost immunization. When challenged with virulent CSFV, the immunized pigs ( $n=5$ ) from the heterologous boost group showed no clinical symptoms, and CSFV RNA was not detected following challenge, whereas one of five pigs from the homologous boost group developed short-term fever and CSFV RNA was detected. This demonstrates that the heterologous prime-boost vaccination regime has the potential to prevent against virulent challenge.

**Received:** June 10, 2008; **Accepted:** March 13, 2009

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA10A204).

**Corresponding author:** Huaji Qiu. Tel/Fax: +86-451-85935041; E-mail: huajiqiu@hvri.ac.cn

国家高技术研究发展计划(863 计划)(No. 2006AA10A204)资助。

**Keywords:** classical swine fever virus, alphavirus replicon vector, DNA vaccine, recombinant adenovirus, prime-boost

猪瘟(Classical swine fever, CSF)是由猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)引起猪的一种高度接触性、致死性的传染病,临床上以高热稽留、皮肤和粘膜出现大量出血点为主要特征<sup>[1]</sup>。世界动物卫生组织(OIE)将其列入 OIE 疾病名录(OIE-listed diseases),为需申报的(Notifiable)动物传染病,我国也将其列为一类传染病。

CSFV 是黄病毒科瘟病毒属成员,为有囊膜的正链 RNA 病毒,基因组全长 12.3 kb<sup>[2]</sup>,包括一个大的 ORF。该读码框编码含 3898 个氨基酸的多聚蛋白,这一多聚蛋白在宿主和病毒蛋白酶作用下,加工形成 4 个结构蛋白(C、E<sup>ms</sup>、E1 和 E2)和 8 个非结构蛋白<sup>[3]</sup>。其中囊膜糖蛋白 E2 是免疫优势蛋白,可以诱导抗猪瘟的保护性免疫<sup>[4]</sup>。

在发达国家一般使用非免疫的扑杀政策来控制猪瘟,由于伦理和经济的原因,免疫政策又重新考虑<sup>[4]</sup>。发展中国家多采用免疫政策来防制本病,以避免引起严重的损失。目前,使用最广泛的疫苗是猪瘟兔化弱毒疫苗,它可以诱导完全的保护。该疫苗的缺点是不能用血清学方法有效地区分感染猪与疫苗免疫猪,发展能用血清学方法区分免疫猪和感染猪的新型标记疫苗显得非常重要<sup>[6]</sup>。

本实验室先前构建了表达 E2 蛋白的甲病毒复制子 DNA 疫苗(pSFV1CS-E2)。动物免疫攻毒试验显示, pSFV1CS-E2 能保护猪免受猪瘟强毒的攻击,但在攻毒前疫苗诱导的抗体水平较低<sup>[7]</sup>,因此通过检测抗体效价对此疫苗进行评价显然不够客观。另外个别猪在攻毒后出现短期发热和病毒血症。

腺病毒载体以其安全、高效、宿主范围广、转移和表达外源基因能力强的特点,成为继逆转录病毒载体后在基因治疗和疫苗等方面应用开发得较早的一种病毒载体。尤其是人血清 5 型复制缺陷型腺病毒载体,近年来在活载体疫苗的研制上得到了广泛的应用<sup>[8]</sup>。先前本实验室构建了表达猪瘟病毒 E2 基因的重组腺病毒 rAdV-E2,并在兔体和猪只上进行了免疫效果评价<sup>[9]</sup>。免疫兔和免疫猪都产生了较高的抗体,并对 CSFV 的攻击产生了保护,但有个别猪只在攻毒后有短暂的体温升高,在其血液中也检测到了少量的猪瘟病毒 RNA,并在剖检后出现了轻微猪瘟病变。

联合免疫策略(用一种疫苗首免,然后用另一种疫苗进行加强免疫)在许多疾病的预防上得到了尝试与应用,并且得到了较好的免疫效果。为了弥补猪瘟甲病毒复制子载体疫苗 pSFV1CS-E2 和猪瘟重组腺病毒 rAdV-E2 单独使用时的不足之处,本研究设计了一种联合免疫策略(应用猪瘟甲病毒复制子载体疫苗 pSFV1CS-E2 进行首免,3 周后用猪瘟重组腺病毒 rAdV-E2 进行加强免疫),并在猪体上进行免疫效果的评价。

## 1 材料和方法

### 1.1 疫苗和免疫

表达 E2 蛋白的甲病毒复制子 DNA 疫苗 pSFV1CS-E2<sup>[7]</sup>和表达猪瘟病毒 E2 基因的重组腺病毒 rAdV-E2<sup>[8]</sup>由本实验室构建。

将购自无 CSFV 猪场的 15 头 6 周龄左右的仔猪,用 IDEXX 猪瘟病毒抗体检测试剂盒(IDEXX, 北京)及 RT-PCR 检测为猪瘟抗体及抗原均为阴性后,随机将其分为 A、B、C 3 组,每组 5 头, A 组(pSFV1CS-E2/rAdV-E2 即 pSFV1CS-E2 首免/rAdV-E2 加强)接种 100 μg 表达 CSFV E2 蛋白的复制子载体疫苗 pSFV1CS-E2; B 组(rAdV-E2/rAdV-E2)经后腿肌肉注射接种 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>(1 mL)的重组腺病毒 rAdV-E2; C 组(wtAdV/wtAdV)接种野生型腺病毒 wtAdV。免疫后 3 周对 A 组和 B 组猪只用 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub> rAdV-E2 (1 mL)进行加强免疫, C 组再次接种等剂量的 wtAdV。

### 1.2 猪瘟特异性抗体检测

免疫后每周、攻毒后第 0~14 天每隔 2 d, 采血分离血清,用 CSFV 抗体检测试剂盒(IDEXX 公司)(基于猪瘟病毒中和性单克隆抗体的竞争 ELISA 试剂盒)检测 CSFV 特异性中和抗体产生情况。

### 1.3 细胞免疫应答检测

#### 1.3.1 CFSE 法检测淋巴细胞增殖

无菌采集免疫猪抗凝血 10 mL, 室温静置 1 h, 取上清,用等体积的 Hank's 平衡盐溶液稀释,缓慢加入淋巴细胞分离液,按操作说明书分离外周血单个核细胞(PBMC)。将新鲜分离的 PBMC 计数后,用 RPMI 1640 不完全培养基调整细胞浓度为 10<sup>7</sup> 个/mL,进行 CFSE 标记:将 10 mmol/L 储存浓度的 CFSE 用 RPMI 1640 不完全培养基稀释成不同浓度的溶液,

混匀后加入等体积上述 PBMC 中, 37°C 染色 10 min, 中间振荡混匀数次, 然后用冰冷的胎牛血清 FBS 淬灭多余的 CFSE, 然后用含 3% FBS 的 PBS 洗涤细胞 3 次, 用 RPMI 1640 完全培养基调整细胞浓度为 10<sup>6</sup> 个/mL。将标记的 PBMC 加入细胞培养板, 加入 10 μL 的猪瘟病毒, 每一个刺激剂量在每一块板上设 3 个重复。试验同时设未用 CFSE 标记的细胞对照。将细胞放入含 5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱培养 5 d 后收获细胞, 用含 3% FBS 的 PBS 洗 2 遍, 然后用 PE 标记的小鼠抗猪 CD8 单抗、生物素标记的小鼠抗猪 CD4 单抗(Southern Biotech, USA)冰浴染色 30 min, 用含 3% FBS 的 PBS 洗 2 遍, 用 R-PE-CY5.5 标记的亲本冰浴染色 20 min, 再用 PBS 洗涤细胞 3 次, 最后一次加入 300 μL PBS 后立即上机检测, 或加入 300 μL 1% 多聚甲醛固定直至上机。然后利用 FACS Calibur 流式细胞仪检测, 用 CellQuest 软件获取数据, 分析总淋巴细胞、CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 细胞亚群的增殖。

### 1.3.2 WST-8 试剂检测淋巴细胞增殖

按上述方法分离 PBMC。将新鲜分离的 PBMC 计数后, 将细胞用 RPMI-1640 完全培养液调整细胞浓度至 10<sup>7</sup> 个/mL。将上述制备的淋巴细胞悬液加入 96 孔细胞培养板, 每孔加入淋巴细胞悬液 100 μL。将每组淋巴细胞悬液设 3 个重复, 分别用 CSFV 刺激。将细胞置于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 72 h 后, 每孔加入 10 μL WST-8 试剂(日本同仁化学研究所), 混匀后继续培养 4 h, 测定 OD<sub>450</sub> 值, 计算刺激指数(SI)=OD<sub>450</sub>(刺激孔)/OD<sub>450</sub>(空白对照孔)。

### 1.4 攻毒

第 2 次免疫后第 9 周, 通过颈部肌肉注射 1 mL 新近复壮的 CSFV 石门强毒病毒(10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/mL), 对所有猪只进行攻毒。攻毒后, 每天记录所有猪的

直肠温度和临床变化; 病死猪及处死猪进行病理剖检, 同时采集各脏器, 进行组织病理学检查及免疫组化检测。

### 1.5 免疫组化及病理组织学检测

剖检时, 取所有猪的扁桃腺、淋巴结、脾脏和肾脏等组织, 制备成冰冻切片, 用冷丙酮固定后, 加入抗猪瘟病毒 E2 基因的单克隆抗体 HQ06, 37°C 孵育 1 h, 用含有 0.05% 吐温 20 的 PBS(PBST)洗 3 遍后, 加入 FITC 标记的羊抗鼠 IgG(Sigma 公司), 37°C 孵育 45 min, 用 PBST 洗 2 遍, 再用 PBS 洗 1 遍, 然后封片, 置荧光显微镜下观察。同时制备病理切片, 染色观察各组织病理变化。

### 1.6 用荧光定量 RT-PCR 检测血液中病毒含量

攻毒后不同时间采集抗凝血, 用 Trizol 试剂提取总 RNA, 溶于 40 μL DEPC 处理的灭菌双蒸水中, 取 20 μL 反转录成 cDNA 后, 用已报道的荧光定量 RT-PCR 方法<sup>[10]</sup>, 检测试验猪攻毒后 CSFV 病毒载量。

## 2 结果

### 2.1 免疫猪产生的 CSFV 特异性中和抗体

A 组(pSFV1CS-E2/rAdV-E2)与 B 组(rAdV-E2/rAdV-E2)免疫组在免疫后 3 周从个别猪检测到了猪瘟特异性中和抗体的产生, 加强免疫后抗体持续升高, 其中 A 组于加强免疫后第 6 周达到峰值, 一直持续到攻毒前(抗体阻断率平均值为 72.06%), 攻毒后抗体水平短时下降, 但从攻毒后第 3 天起, 抗体迅速升高, 一直持续到试验结束, 达到最大值(平均值为 84.77%); 而野生型腺病毒对照猪免疫后至攻毒前均未产生特异性抗体(阻断率<30%为阴性)(图 1), 并在攻毒后第 11 天后陆续死亡。

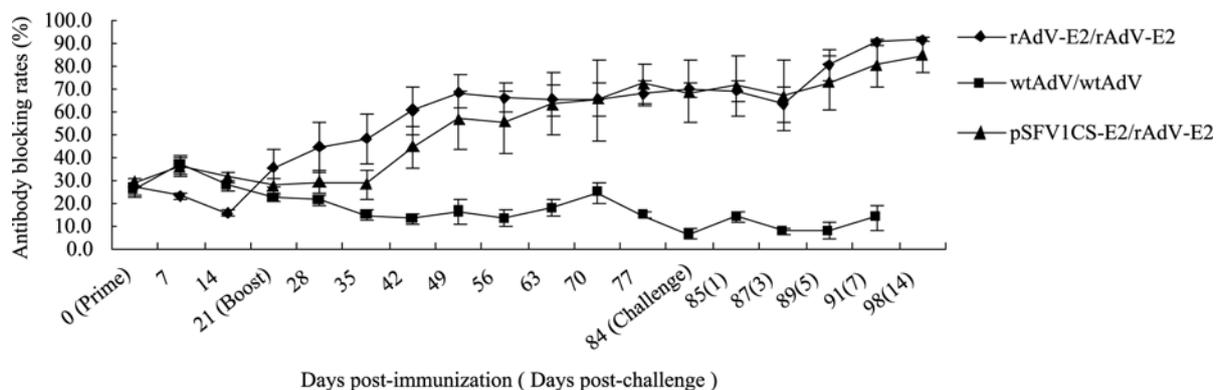


图 1 免疫猪产生的猪瘟抗体

Fig. 1 Detection of serum antibody in immunized pigs using blocking ELISA.

## 2.2 免疫猪的特异性淋巴细胞增殖水平

为了评价免疫后所诱导的细胞免疫反应,用 CFSE 染色方法和 WST-8 试剂检测方法,评价了免疫猪 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup> T 细胞经特异性抗原(猪瘟病毒石门株)刺激后的增殖反应。结果表明, rAdV-E2/rAdV-E2 免疫组猪脾细胞经 CSFV 刺激后诱导了平均 4.57% 的

CD4<sup>+</sup> T 细胞和 4.69% 的 CD8<sup>+</sup> T 细胞增殖, pSFV1CS-E2/rAdV-E2 免疫组猪脾细胞经 CSFV 刺激后诱导了平均 5.2% 的 CD4<sup>+</sup> T 细胞和 5.17% 的 CD8<sup>+</sup> T 细胞增殖,这 2 组淋巴细胞增殖水平与 C 组对照组比较差异极显著( $P<0.01$ ),这 2 组之间比较无显著差异( $P>0.05$ )(图 2)。WST-8 试剂检测结果与之类似(图 3)。

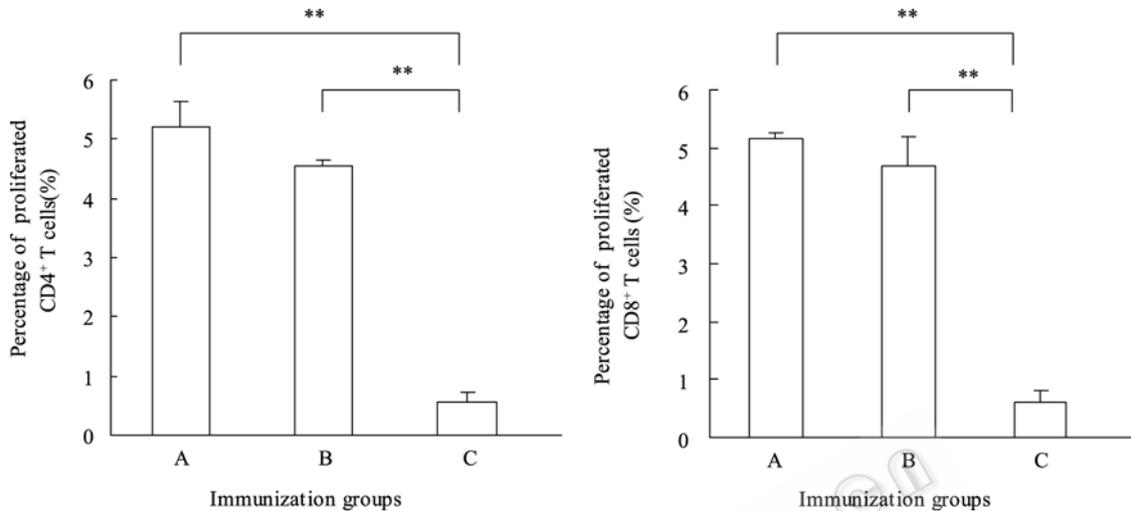


图 2 免疫猪产生的 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup> T 细胞增殖

Fig. 2 The CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells proliferation in immunized pigs measured by CFSE assay. A: pSFV1CS-E2/rAdV-E2; B: rAdV-E2/rAdV-E2; C: wtAdV/wtAdV; \*\*:  $P<0.01$ .

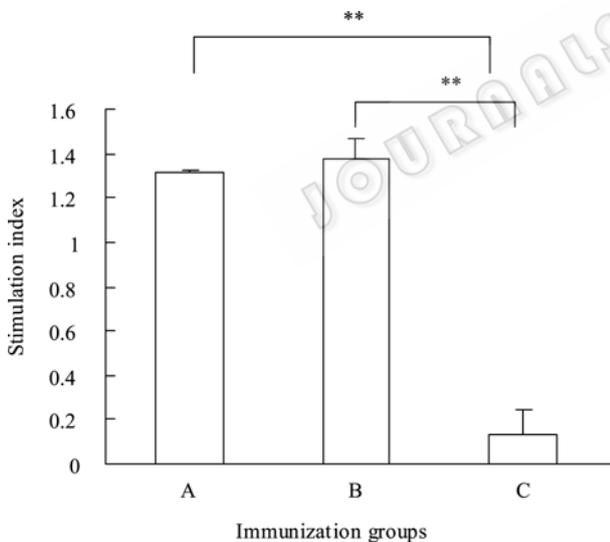


图 3 用 WST-8 试剂检测免疫猪产生的脾淋巴细胞增殖反应

Fig. 3 The splenocyte proliferation responses in immunized pigs measured by WST-8 assay. A: pSFV1CS-E2/rAdV-E2; B: rAdV-E2/rAdV-E2; C: wtAdV/wtAdV; \*\*:  $P<0.01$ .

## 2.3 免疫猪对致死剂量 CSFV 强毒攻击的保护

攻毒后, A 组免疫猪没有出现任何临床症状; B 组中有一头猪出现短期体温升高, 随后恢复到正常,

未见有其他临床症状, 两组猪攻毒保护率达 100%(5/5); C 组对照猪攻毒第 2 天起一直稽留高热, 体温升高至 41°C~42°C(图 4), 精神沉郁、食欲下降乃至废绝、怕冷、嗜睡; 病初便秘, 随后出现糊状或水样并混有血液的腹泻, 大便恶臭; 结膜炎、口腔粘膜不洁、齿龈和唇内以及舌体上可见有溃疡或出血点; 后期鼻端、唇、耳、四脚、腹下及腹内侧等处皮肤上有出血点或斑等猪瘟的典型症状。攻毒后第 15 天将所有试验猪扑杀后剖检, 除了 B 组个别猪在淋巴结或脾脏有轻微病变外, 在 A 组猪和 B 组猪其他脏器无可见典型的猪瘟病理变化。而 C 组所有对照猪均出现典型的猪瘟病理变化: 扁桃体出血、有坏死灶, 淋巴结肿大、出血, 呈大理石状, 脾脏有梗死灶, 肾脏有大量出血点, 形似麻雀蛋, 膀胱有多个出血点, 回盲瓣扣状肿等。

## 2.4 免疫猪攻毒后组织中的病毒抗原

剖检后, 取试验猪相关组织制备冰冻切片, 用免疫组化法检测攻毒后病毒抗原在组织中分布情况。结果表明, A 组免疫猪没有检测到猪瘟病毒; B 组免疫猪仅在其个别组织中检测到少量病毒抗原;

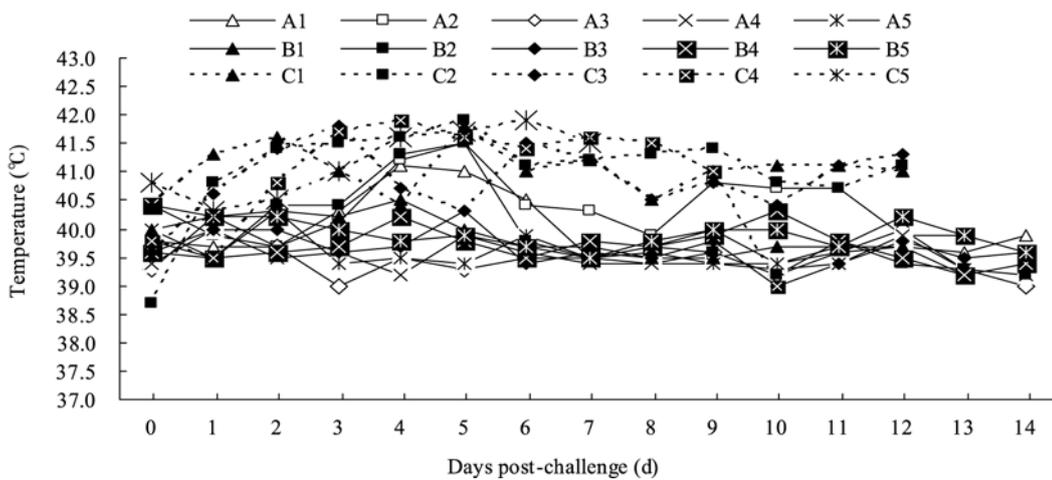


图 4 免疫猪攻毒后直肠温度

Fig. 4 Rectal temperatures of immunized pigs following virulent CSFV challenge.

表 1 用实时荧光定量 RT-PCR 检测攻毒后免疫猪血液中猪瘟病毒 RNA 含量(copies/ $\mu$ L)

Table 1 Detection of the viral RNA in the blood of the immunized pigs following challenge with CSFV by real-time RT-PCR

Groups	No.	Days post-challenge						
		0	1	3	5	7	14	
pSFV1CS-E2/rAdV-E2	A1	-	-	-	-	-	-	
	A2	-	-	-	-	-	-	
	A3	-	-	-	-	-	-	
	A4	-	-	-	-	-	-	
	A5	-	-	-	-	-	-	
r AdV-E2/rAdV-E2	B1	-	-	-	-	-	-	
	B2	-	-	-	$1.23 \times 10^3$	-	-	
	B3	-	-	-	-	-	-	
	B4	-	-	-	-	-	-	
	B5	-	-	-	-	-	-	
wtAdV/wtAdV	C1	-	-	$9.6 \times 10^3$	$6.7 \times 10^6$	$3.79 \times 10^5$	-	
	C2	-	-	$2.99 \times 10^4$	$3.54 \times 10^6$	$7.6 \times 10^5$	/	
	C3	-	-	$4.27 \times 10^4$	$6.2 \times 10^6$	$9.3 \times 10^3$	/	
	C4	-	-	$2.68 \times 10^4$	$1.2 \times 10^6$	$9.6 \times 10^4$	/	
	C5	-	-	$1.23 \times 10^2$	$1.2 \times 10^6$	$9.5 \times 10^2$	/	

-: not detectable; /: death.

从所有 C 组对照猪的扁桃体、淋巴结、脾脏、肾脏等组织中均检出了大量病毒抗原。病理切片结果显示, A 组免疫猪没有任何病理变化; B 组免疫猪在部分组织中出现了病理变化: 腹股沟淋巴结副皮质区内有细胞少量增生伴有少量嗜酸性粒细胞浸润, 脾脏白髓内淋巴细胞轻度增生可见有淋巴细胞分裂相, 颌下淋巴结淋巴细胞轻度增生, 小结体积增大淋巴细胞增多伴有少量浆细胞增生, 副皮质区内有淋巴细胞增生伴有少量巨噬细胞和嗜中性粒细胞浸润; C 组所有猪均出现了猪瘟典型病变: 膀胱粘膜固有层

内有淋巴样细胞浸润灶, 小血管有淤血, 扁桃体淋巴细胞普遍性减少, 小血管严重淤血, 无明显淋巴小结, 腹股沟淋巴结出现结缔组织增生, 肾脏小血管淤血, 肾小管有坏死崩解伴有淋巴样细胞浸润, 脾脏红髓内有大量红细胞, 白髓淋巴细胞明显减少伴有少量巨噬细胞浸润(结果未显示)。

### 2.5 免疫猪攻毒后血液中的病毒含量

用实时荧光定量 RT-PCR 检测试验猪攻毒后血液中病毒 RNA, 结果表明, A 组所有时间点均未检测到 CSFV RNA; B 组免疫猪仅在攻毒后第 5 天有一头

猪(B2)检出了少量 CSFV RNA( $1.23 \times 10^3$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ), 其余所有时间点均未检出 CSFV RNA; wtAdV 对照组所有猪在攻毒后第 3 天直到死亡均检出了 CSFV RNA, 含量最高达到了  $10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  以上(表 1)。

### 3 讨论

多次免疫可以简便有效地提高疫苗的免疫效果。使用同种疫苗反复注射(Homologous boost)长期以来一直在广泛使用, 它在增强体液免疫反应方面非常有效。在本研究中 rAdV-E2/rAdV-E2 免疫组就是在加强免疫后第 3 周以后才产生高水平的猪瘟特异性中和抗体的, 相对于弱毒疫苗而言, 其产生的中和抗体较慢, 这种策略对细胞免疫的增强效果有限, 因为初始免疫产生的针对载体的免疫反应削弱了加强免疫所产生的强势抗原呈递以及适当的炎症信号的产生。这些年, 很多研究显示, 用一种疫苗初免、用另一种不同的疫苗加强(Heterologous boost), 即通常所指的 prime-boost 免疫策略在抗感染免疫中可以起到非常好的效果, 它可以诱导高水平的记忆 T 细胞的产生<sup>[11]</sup>。

prime-boost 策略包括刺激机体产生针对一种载体表达的目标抗原的免疫应答, 然后使用另一种不同载体进一步有选择地增强这种特异性免疫反应。通常人们使用 DNA 疫苗进行初免, 然后使用重组痘病毒或重组腺病毒进行加强。在本研究中, 也证实这种组合的加强效应, 与 rAdV-E2/rAdV-E2 免疫组相比, 应用 pSFV1CS-E2 首免/rAdV-E2 加强, 其免疫增强效果体现在细胞免疫上, 应用 CFSE 染色法检测到了很高水平的淋巴细胞增殖, 这在抵抗猪瘟强毒的攻击上发挥了相当大的作用, 这种组合免疫的猪只, 在攻毒后没有表现任何典型猪瘟临床症状, 也没有出现病毒血症, 其作用主要表现在特异性 T 细胞数目的增加、高亲和力 T 细胞的选择性增强以及抵抗病原体攻击效率的提高等<sup>[12]</sup>, 此外也有很多用重组蛋白加强的例子, 它可以诱导非常强的抗体反应<sup>[13]</sup>。通过使用 prime-boost 免疫策略可以显著提高  $\text{CD4}^+$  和  $\text{CD8}^+$  T 细胞反应性,  $\text{CD4}^+$  T 细胞的反应可以加强体液免疫效果, 还能促进  $\text{CD8}^+$  T 细胞对增强次要抗原的反应性, 调节由主要抗原引起的  $\text{CD8}^+$  记忆性 T 细胞的质量及寿命<sup>[14]</sup>。

异源 prime-boost 方案有效增强免疫效果的详细

机制尚未完全阐明, 但存在几种可能的因素: 使用 2 种不同形式传递抗原表位能使免疫反应集中在目标抗原上, 尽可能少受载体的干扰。用于 boost 的另一种载体只有与 prime 的载体表达相同的抗原才能使已有的针对抗原的记忆性 T 细胞达到最大化增殖。并且使用不同的载体去加强已有的反应, 避免了针对先前载体的体液及细胞免疫反应削弱本应进一步强化的反应, 可以使通过载体获得的宿主免疫逃避最小化, 本研究中应用的甲病毒复制子载体疫苗和重组腺病毒疫苗符合了这种概念。通常, 初免一个系统比增强它要容易得多, 因为已有的 CTL 细胞会对那些在 boost 过程中试图加强反应的抗原呈递细胞产生负面作用。因此, 或许只有免疫原性极强的病毒载体才能够避免受到此种限制而产生有力的加强免疫效果。另外连续使用不同体系表达外源基因可以增加来自载体的特异性以及非特异性刺激, 进而为抗原表达提供一个有力的环境。这个理论有助于解释为什么像 DNA 这类简单的形式就可用于 prime, 引发集中针对几个免疫优势表位的  $\text{CD8}^+$  T 细胞反应, 同时, boost 需要使用来自病毒载体的“危险信号”去增强反应, 迅速放大 prime 引起的抗原特异性记忆 T 细胞。McConkey 等<sup>[15]</sup>用抗疟疾的 DNA 疫苗免疫人, 同时用重组痘病毒安卡拉株加强, 诱导了高频率的抗原特异性  $\text{IFN-}\gamma$  分泌细胞, 抗原特异性 T 细胞反应比只免疫 DNA 疫苗或是重组痘病毒强 5~10 倍。Webster 等<sup>[16]</sup>用 DNA 疫苗初免、用重组禽痘病毒加强也诱导抗疟疾高水平的保护性免疫。针对 HIV-1 的疫苗研究显示, 使用 DNA 疫苗初免、重组病毒加强同样是比较具有优势的选择, 能诱导高水平的抗原特异性  $\text{CD8}^+$  T 细胞。Hammond 等报道了有关 CSFV E2 重组猪腺病毒(rPAVgp55)活载体疫苗和 DNA 质粒(核酸疫苗)联合免疫的研究, 试验显示可 100% 保护断奶仔猪, 75% 保护断奶前仔猪<sup>[17]</sup>。本研究利用 prime-boost 免疫策略取得了完全免疫保护效果, 与猪瘟弱毒疫苗免疫效果大体相当。

本研究应用猪瘟甲病毒复制子载体 DNA 疫苗初免、猪瘟重组腺病毒活载体疫苗加强免疫的免疫策略, 在猪体上得到了很好的免疫效果, 免疫猪在加强免疫后抗体迅速升高, 并能抵抗致死剂量 CSFV 的攻击, 应用这 2 种疫苗进行联合免疫有望对

猪瘟起到较好的预防作用。

## REFERENCES

- [1] Paton, DJ, Sands JJ, Lowings JP, *et al.* A proposed division of the pestivirus genus using monoclonal antibodies, supported by cross-neutralisation assays and genetic sequencing. *Vet Res*, 1995, **26**(2): 92–109.
- [2] Moennig V. Introduction to classical swine fever virus, disease and control policy. *Vet Microbiol*, 2000, **73**(2-3): 93–102.
- [3] Lin M, Lin F, Mallory M, *et al.* Deletions of structural glycoprotein E2 of classical swine fever virus strain Alfort/187 resolve a linear epitope of monoclonal antibody WH303 and the minimal N-terminal domain essential for binding immunoglobulin G antibodies of a pig hyperimmune serum. *J Virol*, 2000, **74**(24): 11619–11625.
- [4] Dewulf J, Laevens H, Koenen F, *et al.* An experimental infection with classical swine fever in E2 subunit marker-vaccine vaccinated and in non-vaccinated pigs. *Vaccine*, 2000, **19**(4-5): 475–482.
- [5] Dong XN, Chen YH. Marker vaccine strategies and candidate CSFV marker vaccines. *Vaccine*, 2007, **25**(2): 205–230.
- [6] van Oirschot JT, Gielkens AL, Moormann RJ, *et al.* Marker vaccines, virus protein-specific antibody assays and the control of Aujeszky's disease. *Vet Microbiol*, 1990, **23**(1-4): 85–101.
- [7] Li N, Qiu HJ, Zhao JJ, *et al.* A Semliki Forest virus replicon vectored DNA vaccine expressing the E2 glycoprotein of classical swine fever virus protects pigs from lethal challenge. *Vaccine*, 2007, **25**(15): 2907–2912.
- [8] Adam E, Nasz I. Significance of recombinant adenovirus in experimental gene therapy. *Orv Hetil*, 1995, **136**(15): 755–761.
- [9] Sun Y, Qi QF, Liang BB, *et al.* Generation and immunogenicity of a recombinant adenovirus expressing the E2 protein of classical swine fever virus in rabbits. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(10): 1734–1739.
- 孙元, 祁巧芬, 梁冰冰, 等. 表达猪瘟病毒 E2 蛋白的重组腺病毒的构建及其在兔体内的免疫原性分析. *生物工程学报*, 2008, **24**(10): 1734–1739.
- [10] Zhao JJ, Cheng D, Li N, *et al.* Evaluation of a multiplex real-time RT-PCR for quantitative and differential detection of wild-type viruses and C-strain vaccine of classical swine fever virus. *Vet Microbiol*, 2008, **126**(1-3): 1–10.
- [11] Ramshaw IA, Ramsay AJ. The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunol Today*, 2000, **21**(4): 163–165.
- [12] McShane H. Prime-boost immunization strategies for infectious diseases. *Curr Opin Mol Ther*, 2002, **4**(1): 23–27.
- [13] Le Gall-Reculé G, Cherbonnel M, Pelotte N, *et al.* Importance of a prime-boost DNA/protein vaccination to protect chickens against low-pathogenic H7 avian influenza infection. *Avian Dis*, 2007, **51**(1 suppl): 490–494.
- [14] Teng HG. Prime-boost immunization strategy using HIV-1 vaccines. Ph. D thesis, Jilin University, 2006.  
滕红刚. HIV-1 疫苗 prime-boost 免疫策略的研究. 吉林大学博士学位论文, 2006.
- [15] McConkey SJ, Reece WH, Moorthy VS, *et al.* Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans. *Nat Med*, 2003, **9**(6): 729–735.
- [16] Webster DP, Dunachie S, Vuola JM, *et al.* Enhanced T cell-mediated protection against malaria in human challenges by using the recombinant poxviruses FP9 and modified vaccinia virus Ankara. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(13): 4836–4841.
- [17] Hammond JM, Jansen ES, Morrissy CJ, *et al.* A prime-boost vaccination strategy using naked DNA followed by recombinant porcine adenovirus protects pigs from classical swine fever. *Vet Microbiol*, 2001, **80**(2): 101–119.