

DOI: 10.13376/j.cblls/2021004

文章编号: 1004-0374(2021)01-0026-10

马传染性贫血病毒弱毒疫苗致弱及免疫保护机制研究进展

王雪峰, 张相敏, 林跃智, 杜 承, 王晓钧*

(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, 哈尔滨 150069)

摘 要: 马传染性贫血病毒(equine infectious anemia virus, EIAV)弱毒疫苗是中国科学家在20世纪70年代研制成功的世界上首例慢病毒疫苗, 是迄今为止唯一在临床大规模应用的慢病毒弱毒疫苗。EIAV弱毒疫苗的成功应用不仅消除了该疫病对马业的威胁, 而且在学术上突破了慢病毒不能免疫的理论。该疫苗克服了灭活疫苗免疫原性差的难点, 能有效地提供对同源和异源毒株的免疫保护。因此, 在分子水平上阐明EIAV弱毒疫苗的减毒机理和免疫保护机制对于研究慢病毒免疫保护具有极其重要的科学意义。作者所在的研究团队多年来一直从事EIAV弱毒疫苗的致弱机理及其诱导免疫保护机制的研究, 解析了EIAV弱毒疫苗及其强毒株的基因组进化特征、揭示了疫苗致弱规律和疫苗有效组成、提出了“EIAV弱毒疫苗可能起源于EIAV准种的一个小分支”的假说; 发现EIAV弱毒疫苗可有效激活天然免疫和特异性免疫, 早期诱导的高水平细胞免疫与免疫保护呈正相关; 证明了疫苗株的抗原多样性组成是其诱导保护性免疫应答的关键因素。相关研究成果拓展了慢病毒疫苗研究理论和实践认知, 可为其他慢病毒尤其是HIV-1免疫原的设计以及免疫保护理论提供有价值的参考。

关键词: 马传染性贫血病毒; 疫苗; 慢病毒; 免疫; 准种

中图分类号: S852.4

文献标志码: A

Research progress on attenuation and immune protection mechanism of an attenuated equine infectious anemia virus vaccine

WANG Xue-Feng, ZHANG Xiang-Min, LIN Yue-Zhi, DU Cheng, WANG Xiao-Jun*

(State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150069, China)

Abstract: The attenuated equine infectious anemia virus (EIAV) vaccine developed by Chinese scientists in the 1970s is the first lentiviral vaccine that was approved safe and effective after being applied country-widely and provided a wonderful model for the study of protective immunity to lentiviruses. The successful application of attenuated EIAV vaccine not only eliminates the threat to the horse industry, but also breaks the theory that lentivirus cannot be immunized. The vaccine overcomes the difficulty of poor immunogenicity of inactivated EIAV vaccine and can effectively provide immune protection against homologous and heterologous strains. Therefore, elucidating the mechanism of attenuation and immune protection of the attenuated EIAV vaccine at the molecular level is of great scientific significance for studying the vaccinology of lentivirus. In an in-deep study on the attenuation and induced immune protection mechanism of attenuated EIAV vaccine in recent years, we revealed the pattern of virus attenuating and the effective composition of vaccine, and proposed that the attenuated EIAV vaccine may originate from a small branch of EIAV quasispecies. It was found that EIAV vaccine could activate innate and adaptive immunity effectively, and the induced high level of cellular immunity in the earlier phases was positively correlated with immune protection in vaccine-inoculated horses. It was proved that the antigen diversity

收稿日期: 2020-08-07; 修回日期: 2020-10-12

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31672578); 黑龙江省自然科学基金面上项目(C2017076)

*通信作者: E-mail: wangxiaojun@caas.cn; Tel: 0451-51051749

composition of vaccine strains is the key factor to induce protective immune response. Relevant research results have expanded the theories and practical cognition of lentivirus vaccine research, and may provide valuable reference for the design of other lentiviruses, especially HIV-1 immunogens, and immune protection theories.

Key words: equine infectious anemia virus; vaccine; lentivirus; immune; quasispecies

马传染性贫血(equine infectious anemia, EIA)简称马传贫,是由马传染性贫血病毒(equine infectious anemia virus, EIAV)引起马属动物(马、驴和骡)以发热、贫血、出血、黄疸、消瘦、水肿和心脏衰弱等一系列症状为特征的传染性疾病,是马属动物的主要传染病。EIA是新中国成立之后危害养马业的最重要的传染性疾病之一。20世纪50年代末, EIA在我国大范围暴发流行,给我国国民经济造成巨大损失。近年来,我国马传贫发生已得到整体控制,但是在欧洲和南美洲以及亚洲的日本等国家仍有流行和发生^[1-8]。世界动物卫生组织(英语: World Organization for Animal Health; 法语: office international des épizooties, OIE)将EIA列入《OIE疫病、感染及侵染名录》,我国将其列为二类动物疫病。在国务院颁布的《国家中长期动物疫病防治规划(2012—2020)》中提出,到2020年全国消灭马传染性贫血。

EIAV与人类免疫缺陷病毒(HIV-1)和猴免疫缺陷病毒(SIV)等病毒同属反转录病毒科慢病毒属成员,它们在病毒形态、基因组结构、复制分子机制、免疫机理等方面十分相似^[9]。由于慢病毒具有抗原变异快、病毒基因组可以整合到宿主染色体等特点,国外有学者曾预言“慢病毒病无法免疫”。20世纪70年代,我国科学家沈荣显等^[10]利用经典的细胞生物学方法,通过体外细胞长期培养传代获得了马传染性贫血驴白细胞弱毒疫苗,该疫苗在我国大部分地区推广使用后控制了EIA的发生。2001年,在中国工程院开展的我国20世纪重大工程技术成就的评选中,“马传染性贫血驴白细胞弱毒疫苗”成为全国动物医学领域四大科学成就之一。EIAV弱毒疫苗的研制成功不仅为我国马传贫防控起到了重要作用,而且突破了慢病毒不可免疫的理论,成为慢病毒疫苗研究中成功的范例。马传染性贫血弱毒疫苗已克服了慢病毒抗原高度变异、免疫原性差和抗原漂移的难点,可为包括人类艾滋病在内的慢病毒病免疫研究提供重要借鉴。作者的研究团队长期以来以EIAV弱毒疫苗为研究对象,从慢病毒致弱过程的基因组进化、天然免疫的激发、免疫

应答的诱导以及病毒与宿主相互作用等方面进行了系统的研究^[11-24]。本文将对EIAV弱毒疫苗致弱与免疫保护机制相关的最新研究进展进行综述。

1 EIAV弱毒疫苗的创制历史

EIAV弱毒疫苗的原始种毒(辽毒)来源于辽宁省的一匹亚急性自然感染马,辽宁省兽医研究所将该毒株在马体传代3代后引入哈尔滨兽医研究所,后者继续在马体传代至16代后毒力进一步增加,将其命名为EIAV_{LN40}(图1)。研究人员曾用EIAV_{LN40}病毒接种22匹马,发病潜伏期平均为14.1天、发病率100%,平均24.9天死亡、死亡率81.1%。但是EIAV_{LN40}感染驴发病率低于10%(有实验显示只有5.8%的驴出现典型的马传贫症状)^[25]。

从1962年到1969年,哈尔滨兽医研究所的科研人员历时8年将EIAV_{LN40}在驴体连续传代120多代,使病毒毒力进一步增强,获得了马传贫驴强毒(EIAV_{DV117})(对马和驴致死率均可达100%)^[25]。

我国科学家分别在1965年和1967年用马白细胞和驴白细胞体外培养EIAV获得成功。在此基础上,哈尔滨兽医研究所的科研人员将EIAV_{DV117}在驴白细胞进行体外连续培养驯化,随着培养代次的增加,病毒毒力逐渐下降,60代前的病毒接种马或驴仍有50%以上的发病率或致死率。110代后的病毒接种马或驴不出现任何马传贫症状,而且可以产生良好的免疫保护效果,110代后的病毒即为后来的马传贫驴白细胞弱毒疫苗。经过大量的试验摸索,将制备马传贫驴白细胞弱毒冻干疫苗的种毒控制在121~130代病毒,我们将马传贫驴白细胞弱毒疫苗统一简写为EIAV_{DLV121}。该疫苗对同源强毒株(EIAV_{LN40})和异源强毒株(包括分离于新疆和云南的毒株以及美国、阿根廷和古巴的毒株)的保护率均在80%以上。1975年,哈尔滨兽医研究所成功研制了马传贫驴白细胞弱毒疫苗,之后在黑龙江和山西进行试点免疫。1977年,在全国范围内逐渐扩大马传贫驴白细胞弱毒疫苗的应用,累计免疫接种马属动物6千万匹以上^[25]。

驴白细胞弱毒疫苗的制备需要采集大量驴外周

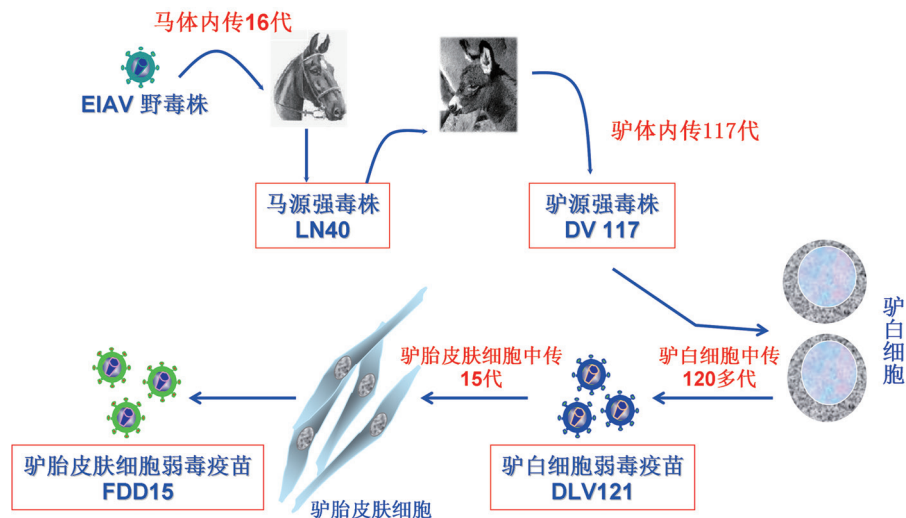


图1 EIAV弱毒疫苗制备路线图

血分离培养白细胞，此过程容易混入EIAV或其他致病因子，而且驴白细胞的培养需要使用100%的牛血清。为适应工业化疫苗生产的生产工艺、降低生产成本、提高疫苗质量，哈尔滨兽医研究所的科研人员从1980年开始寻找一种继代细胞作为培养间质，通过对驴胎皮肤细胞、驴胎淋巴细胞和驴胎胸腺细胞等二倍体细胞进行筛选，发现驴胎皮肤细胞更适合制备EIAV弱毒疫苗^[26]。在此基础上，将驴白细胞弱毒疫苗第123代病毒在驴胎皮肤细胞继续传代15代后建立了马传贫驴胎皮肤细胞弱毒疫苗，其中第8~15代次病毒免疫马匹的保护率可达90%以上，疫苗生产要求将种毒控制在8~15代，我们统一将马传贫驴胎皮肤细胞弱毒疫苗简称为EIAV_{FDDV13}。该疫苗在6个省进行了临床试验，接种马属动物近万匹，用强毒攻击从现地购入的免疫马匹，保护率可达91.6% (11/12)^[25]。

实际上在EIAV弱毒疫苗研制过程中，老一辈科学家曾尝试了多种方法，但是只有EIAV_{LN40}在“马体→驴体→驴白细胞”的方案获得了成功。原军兽医大学将辽毒在马白细胞和骡子白细胞中进行驯化，均未获得成功。在37℃条件下，将辽毒在马白细胞上连续驯化培养了230代，用第200代病毒对马进行试验，未见病毒致弱倾向；在42℃条件下连续培养100多代对马的毒力稍有减弱，但以强毒攻击未见保护作用；原黑龙江省兽医研究所将分离于黑龙江省的EIAV毒株(黑毒)通过逐步降低培养温度的方法，在驴白细胞中连续培养100多代次，病毒毒力变化不稳定，免疫效果不理想。哈尔滨兽医研究所将EIAV_{LN40}在马白细胞中培养85代次，病毒毒

力呈逐渐减弱趋势，但保护效果不佳^[25]。这些现象表明，在EIAV弱毒疫苗创制过程中，种毒的选择及其驯化培养方法是疫苗成功的关键因素。

此外，国外以EIAV美洲毒株EIAV_{Wyoming}研制的灭活疫苗只能抵抗同源毒株的攻击，不能保护异源毒株的攻击^[27]。以囊膜蛋白构建的亚单位疫苗免疫马匹后不仅不能保护马匹应对致病毒株的攻击，反而会加重发病症状^[27]。利用基因工程方法，使EIAV附属蛋白S2表达缺失^[28]，构建的弱毒株(EIAV_{D9})可对同源致病毒株产生100%的保护，但是对异源毒株缺乏保护。而且随着攻毒株与弱毒株在囊膜蛋白的差异增加，保护率逐渐降低，当囊膜差异在13%时，其保护率只有25%^[29]。

2 EIAV弱毒疫苗致弱的分子机制

2.1 EIAV弱毒疫苗致弱过程中病毒基因组进化特征

EIAV是基因组结构比较简单的慢病毒，其编码3个结构蛋白(Gag、Pol和Env)和3个附属蛋白(Tat、S2和Rev)^[30]。非编码区长末端重复序列(long terminal repeat, LTR)位于前病毒DNA的两端，作为启动子调控病毒的转录。囊膜蛋白Env是病毒的主要免疫原(成熟的Env被切割成表面蛋白gp90和跨膜蛋白gp45，二者以非共价键的方式结合形成Env复合物，包裹于病毒粒子表面)，其变异是影响疫苗保护效果的主要因素^[31]。研究表明，Env、LTR和S2是病毒的主要变异区，也是影响病毒毒力的主要因素^[32]。

在马传染性贫血弱毒疫苗制备过程中，随着病毒在体外传代培养代次的增加，病毒毒力逐渐减

弱。我们分析了马传染性贫血病毒弱毒疫苗致弱过程中7个关键代次病毒的前病毒基因组序列, 这7个病毒株包括两个强毒株(EIAV_{LN40}和EIAV_{DV117})、两个疫苗株(EIAV_{DLV121}和EIAV_{FDDV13})以及EIAV_{DV117}在体外驴白细胞中连续传代第34代(EIAV_{DLV34})、62代(EIAV_{DLV62})、92代(EIAV_{DLV92})病毒株(EIAV_{DLV34}和EIAV_{DLV62}仍具有较强的致病性, EIAV_{DLV92}基本丧失了致病性), 上述各毒株代表了EIAV从“强毒株-弱毒株-疫苗株”的致弱过程^[12]。遗传演化分析显示, 随着传代, 致弱病毒基因组不断进化(图2), 表明EIAV在体外培养过程中病毒基因组的进化过程并非随机的, 而是有选择性的定向进化。

在EIAV弱毒疫苗致弱过程中, 病毒基因组的变异大部分集中在强毒株和疫苗株之间的差异位点^[12,33]。这些变异位点在致病毒株和弱毒株之间的突变频率存在显著差异, 提示这些位点在病毒毒力减弱和诱导保护性免疫反应中起着重要的作用。需要特别指出的是, EIAV具有典型的病毒准种特征^[12,34]。准种是病毒的存在形式, 它强调病毒以群体的形式存在, 而这个群体中的不同变异体在环境的影响下处在动态变化之中, 主要表现为在机体免疫压力或选择压力下病毒优势准种(变异体)的转换^[35]。在EIAV弱毒疫苗制备过程中, 随着病毒的传

代, 具有疫苗株特征的变异体在各病毒株中所占比例逐渐增加^[12]。因此, EIAV弱毒疫苗的致弱过程主要表现为具有疫苗株特征的病毒准种不断富集和扩增的过程。

强毒株EIAV_{LN40}是来源于该病毒感染马匹后的第一个发热点的分离株^[25], 病毒准种复杂性较低, 基因组序列高度一致。EIAV_{LN40}感染马匹后, 病毒准种优势序列会随着疾病状态的改变而发生变化, 但是病毒基因组的变异仍主要集中在强毒株和疫苗株之间的差异位点。通过对EIAV_{LN40}感染马匹后gp90、S2和LTR的进化分析发现, 在感染早期(半个月)内)或无症状期, 病毒的优势序列具有疫苗株特征性的突变位点, 而且准种复杂性增加, 呈现低病毒载量的特点; 在发热期, 会再次恢复到以EIAV_{LN40}序列为主的病毒优势准种, 准种复杂性降低, 呈现高病毒载量的特点^[13,36-37]。实际上, 来源于发热点的EIAV_{LN40}准种中仍含有极少量的疫苗株特征性变异体^[20]。由此推测, EIAV在体外培养适应过程中, 受驴白细胞特定天然免疫选择压力的长期筛选, 存在于EIAV准种内具有疫苗株特征性的病毒准种获得优势扩增并且定向进化, 形成独特的疫苗特性, 即“EIAV弱毒疫苗可能起源于EIAV准种进化的一个小的分支”(图3)。

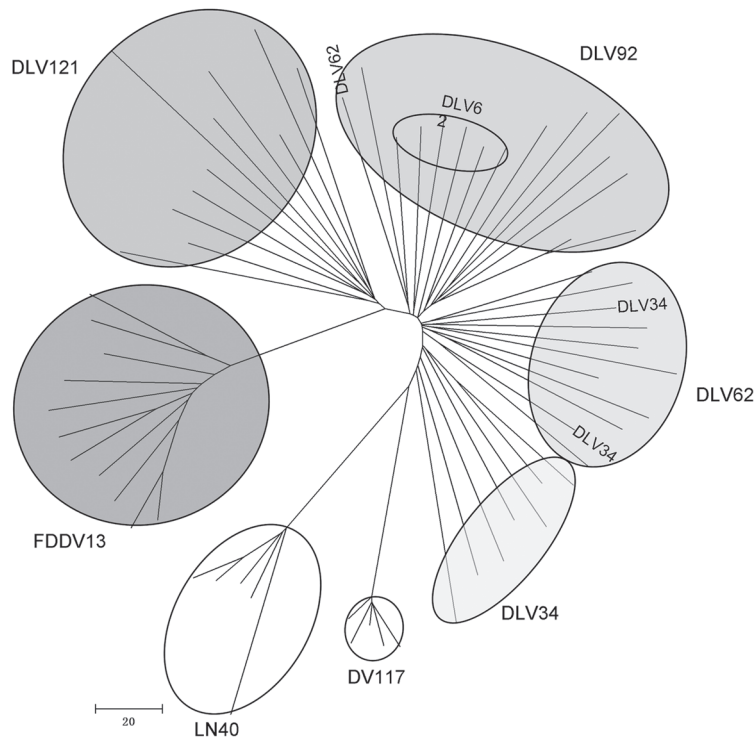


图2 EIAV弱毒疫苗基因组进化特征

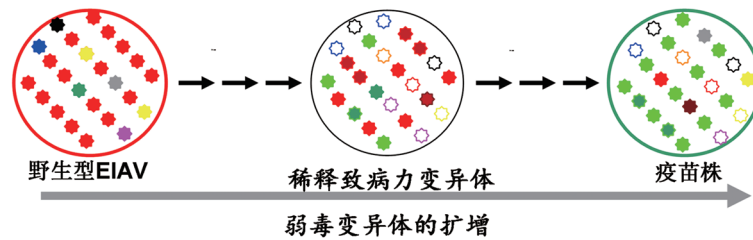


图3 EIAV弱毒疫苗起源和筛选假说

2.3 EIAV弱毒疫苗致弱的关键因素

EIAV弱毒疫苗包括EIAV_{DLV121}和EIAV_{FDDV13}，疫苗株的亲本强毒株包括马源强毒株EIAV_{LN40}和驴源强毒株EIAV_{DV117}。对上述4个毒株基因组分析显示，疫苗株与强毒株在基因组的各个基因均存在一系列稳定突变，其中影响EIAV毒力的主要基因s2、env和LTR是基因组变异率最高的区域^[33]。

S2在EIAV复制过程中的生物学功能尚不清楚，其缺失突变会使强毒株丧失致病性^[38]，但是不影响病毒在体外的复制^[39-40]。EIAV疫苗株在S2存在3个保守的突变位点，但是在EIAV_{FDDV13}感染性克隆(pLGF3-8)的基础上将S2进行回复突变并不会增加病毒毒力^[41-42]。

LTR是慢病毒的启动子，它是影响病毒嗜性和毒力的关键因素之一^[32,43]。EIAV疫苗株LTR的变异主要集中在U3区和R区。在U3区存在多个重复序列的插入突变、缺失突变以及点突变，使得LTR上细胞因子结合位点的类型和位置发生改变^[13]。体外实验显示，疫苗株LTR的转录活性显著高于强毒株^[13,44]。但是，对疫苗株的LTR进行回复突变并不会增加病毒在体外和体内的复制能力及致病性^[45]。

EIAV囊膜蛋白(Env)是病毒的主要免疫原，与诱导中和抗体的产生密切相关^[46]。Env与细胞受体ELR1相结合而起始病毒入侵细胞过程^[47]。Env也具有对抗宿主限制因子Tetherin而帮助病毒释放的作用^[48]。EIAV弱毒疫苗的env基因变异主要集中在gp90^[12]。体外中和实验表明，强毒株的Env对中和抗体敏感性显著低于疫苗株，即疫苗株对中和抗体更加敏感^[49]。糖基化修饰是慢病毒Env的共有特征，通常认为病毒Env糖基化位点的变化是病毒免疫逃逸的重要方式^[50]。疫苗株在gp90的193S/N和237N/K突变引起潜在糖基化位点¹⁹¹NSSN¹⁹⁴和²³⁷NNTW²⁴⁰缺失。所以，EIAV强毒株的糖基化位点数平均在19个以上，而疫苗株只有17个^[12]。另外，疫苗株有部分克隆存在246N/K突变，引起潜在糖

基化位点²⁴⁶NETW²⁴⁹的缺失。在疫苗株感染性克隆pLGF3-8的基础上对上述三个位点进行单独或联合回复突变发现，单独回复突变193或237位点可显著减弱病毒对血清的中和敏感性，而单独回复突变246位点则不会减弱；对193、237或193、237和246位点同时突变后病毒的中和敏感性进一步降低^[51]。因此，EIAV疫苗株糖基化位点的缺失可能会使病毒暴露出更多免疫识别区，从而能更加敏感地刺激机体产生包括中和抗体在内的免疫反应。另外，Shen等^[52]发现，在pLGF3-8基础上对Env(103Y/H、193N/S、236-/N和237K/N)和Gag(100T/A、103S/T和408N/D)联合回复突变后，病毒毒力增加，表明上述位点与EIAV毒力变化密切相关。参照EIAV弱毒疫苗env的变异特点对HIV-1的env进行相应的突变和改造，结果表明突变后的HIV-1 Env诱导的中和抗体广谱性和效价显著增加^[53-54]。

EIAV弱毒疫苗在马属动物体内连续传代不发生返祖和垂直传播的现象^[55]。在疫苗免疫马外周血中，病毒载量仅维持在 $10^2 \sim 10^5$ copies/mL，显著低于EIAV强毒感染发病马血浆中病毒载量大于 10^7 copies/mL的阈值水平^[22,56]。通过连续注射地塞米松对疫苗免疫马匹或强毒隐形感染马进行免疫功能抑制，疫苗株病毒在免疫马体内持续呈现相对稳定的低拷贝复制状态，而强毒感染马的病毒载量显著增加，并发病^[57]。这些现象表明弱毒疫苗具有稳定的生物学特性和良好的安全性。

3 EIAV弱毒疫苗诱导免疫保护的相关因素

如何诱导针对慢病毒的有效免疫保护一直是免疫学领域的研究热点之一，也是慢病毒研究的难点。大多数EIAV感染马最终能控制住病毒的复制，变为隐性感染状态；隐性感染马在受到免疫抑制后或在应激状态下会重新发病^[58]，这表明机体免疫系统具有控制EIAV复制的能力。早期研究发现，部分EIAV感染马耐过后能抵抗病毒的再次感染。哈尔滨

兽医研究所对53匹马传贫耐过马和127匹马传贫耐过驴再次攻毒,发现分别有79.2%和83.5%的动物可以抵抗强毒攻击;接种小剂量EIAV_{DV117}的耐过驴对EIAV_{DV117}再次攻毒的耐过率平均为88.3%^[25]。这些现象表明,EIAV感染后宿主可以建立有效的保护性免疫,这为疫苗的研发建立了信心。

3.1 特异性免疫应答反应在EIAV弱毒疫苗诱导免疫保护中的作用

EIAV弱毒疫苗免疫马匹(或驴)后,建立免疫保护所需的时间比较长(6个月),但是免疫一经建立,可以长期持续(最长测至45个月)。研究显示,用EIAV_{DLV121}免疫驴后,在第15、30、45天攻毒时几乎与对照驴同样出现典型的EIA发病特征,在第60天攻毒的免疫保护率在3/4;用EIAV_{DLV121}免疫马,在3个月时攻毒的保护率是33%,在6个月是71.4%,在10个月是87.5%^[55]。这些现象表明长期建立的特异性免疫应答反应在马传贫弱毒疫苗免疫保护中发挥主要作用。

早期研究发现,马传贫弱毒疫苗免疫后中和抗体(主要针对Env)出现较晚,但持续时间较长,在免疫后40~60天开始出现,第180天达到高峰,以后可持续维持,并很少变动,这与疫苗产生的保护性反应一致;而其他结合性抗体(主要针对p26和Env)出现的早,但下降的快,其变化规律与保护性反应不一致^[55]。后续研究发现,EIAV弱毒疫苗株和强毒株诱导特异性体液免疫应答均存在缓慢的成熟过程,但是抗体产生的时间、滴度和性质存在明显差别^[56,59-60]。疫苗免疫马在免疫后3个月内,Env和p26特异性抗体滴度均显著高于强毒感染马,随时间延长差异逐渐消失,而且Env抗体的亲和力在免疫后3个月内显著高于强毒感染马,但是p26抗体的亲和力在整个观测期统计学无差异。另外,疫苗免疫马Env抗体的构象依赖性水平显著高于强毒隐性感染组^[56]。用EIAV疫苗株的感染性克隆(pLGF3-8)衍生病毒免疫马匹后,能诱导产生特异性的gp90、p26结合抗体以及中和抗体,而且gp90特异性抗体和中和抗体可持续稳定存在^[60]。对中和抗体的研究显示,疫苗免疫马血清的中和活性显著高于强毒感染马;中和抗体在疫苗免疫后3个月明显增加;中和抗体对强毒株的中和能力显著低于疫苗株^[18,49]。动物实验显示,免疫保护马匹的中和抗体水平要显著高于未保护马匹^[18,22]。这提示中和抗体在EIAV弱毒疫苗诱导免疫保护中发挥重要作用。与中国EIAV弱毒疫苗不同,基于EIAV_{Wyoming}制备的灭活疫苗和

亚单位疫苗以及非结构基因缺失型弱毒株在免疫马匹后均未发现中和抗体的变化,与免疫保护没有相关性;在非结构基因缺失型弱毒株免疫马匹后1个月左右,Env特异性抗体滴度迅速增加,并持续稳定存在,而Env抗体的亲和力和构象依赖性呈现逐渐上升的趋势,在免疫后5~6个月趋于稳定;比较免疫保护效果依次递减的3个弱毒株EIAV_{UKΔS2}、EIAV_{UKΔS2/DU}和EIAV_{UKΔS2}发现,它们在体内的复制水平呈现依次递减的特征,而且诱导Env特异性抗体的滴度和构象依赖性呈现依次降低的趋势^[27-28,61]。

用EIAV_{DLV121}的不同蛋白刺激免疫马淋巴细胞进行细胞免疫活性试验,结果显示淋巴细胞对完整病毒及gp90的反应性明显高于其他蛋白,表明gp90含有刺激淋巴细胞免疫活性的主要因素^[55]。用EIAV_{DLV121}免疫马匹2个月后即可检测到淋巴细胞增殖反应,第6个月时淋巴细胞EIAV特异性刺激指数达到3,CTL杀伤效果也达到30%以上。在4匹免疫马中有3匹马的CD8⁺T细胞数呈明显上升趋势,有1匹有所下降,而该马匹在攻强毒后出现发热,这提示CD8⁺T细胞可能在免疫保护中发挥一定的作用^[62-63]。Lin等^[56]对疫苗株和强毒株激活的特异性免疫应答的比较分析发现,疫苗免疫马病毒特异性CD8⁺T淋巴细胞比例显著高于同期的强毒感染马;疫苗免疫马在免疫后1~2个月就可以检测到病毒特异性的CD4⁺T淋巴细胞的增殖,并缓慢上升,维持3个月后就达到稳定平台期。强毒株感染马在感染后也诱导产生病毒特异性T淋巴细胞的增殖,但出现时间较晚(2~3个月),增殖能力弱于疫苗免疫马;病毒特异性CD4⁺T淋巴细胞的增殖水平平均明显高于CD8⁺T淋巴细胞;在免疫初期,CD4⁺T和CD8⁺T淋巴细胞明显上升的马匹能产生有效的初次免疫应答,而所有的发病马在发病期间表现为淋巴细胞的减少和功能的损伤。整体上,疫苗株能更早、更有效地诱导机体产生特异性细胞免疫应答(CD4⁺、CD8⁺增殖水平和分泌IFN- γ 的能力),且病毒特异性细胞免疫应答的水平与免疫保护效率呈正相关。

此外,强毒株和疫苗株感染马体后都可激活细胞因子应答,但是二者在诱导细胞因子上调程度上具有显著差异,强毒感染马特异性高表达致炎因子(IL-1 β 、IFN- α 、IL-8和CXCL10),疫苗免疫马IFN- γ 的表达水平是强毒的几百倍。在疫苗免疫马外周血单核细胞PBMC中,IFN- γ 、IL-2和IL-12的表达量显著高于强毒感染马,并在强毒攻毒后继续升高^[21],

提示疫苗免疫可增强机体IFN- γ 、IL-2和IL-12依赖的抗病毒作用。

3.2 非特异性免疫应答反应在EIAV弱毒疫苗诱导免疫保护中的作用

疫苗株和强毒株感染体外培养的马巨噬细胞后,对细胞因子和趋化因子表达谱分析发现,疫苗株以诱导IFN- γ 、IL-2和IFN- β 等免疫因子为主,而强毒株以诱导TNF- α 和IL-1 α 等炎性因子为主^[64]。疫苗株感染后可引起宿主细胞内可溶性病毒受体sELR1和TLR3等表达上调,并诱导了针对强毒株感染的明显抵制作用^[24]。对疫苗株和强毒株在诱导多种天然免疫限制因子(A3Z3、IFITM3、SAMHD1、SLFN11、TRIM5 α 、Tetherin和Viperin)表达差异的研究中发现,在体外二者均能诱导上述天然免疫限制因子上调表达,但是疫苗株比强毒株诱导表达更多的A3Z3、SAMHD1、SLFN11、TRIM5 α 和Tetherin;在体内,疫苗株免疫马的7种限制因子均上调表达,而强毒株感染马仅A3Z3、IFITM3和Tetherin为上调表达^[65]。

蛋白质组学分析发现,在疫苗株和强毒株感染巨噬细胞后,有447个细胞蛋白发生差异表达,疫苗株感染细胞的NADH脱氢、氧化磷酸化和ATP生成都受到了抑制;疫苗株感染细胞的线粒体膜电位下降、通透性增加、线粒体内膜中的细胞凋亡因子释放到细胞质中,激活了“内源性”细胞凋亡;强毒株感染细胞以糖酵解代谢模式为主,细胞转化为

M1促炎型,分泌促炎因子;疫苗株感染细胞以三羧酸循环为主,糖酵解被抑制,细胞转化为M2抑炎型,分泌抑炎因子;强毒株感染细胞的线粒体分裂加剧,而疫苗株感染细胞的线粒体融合增多^[16,66]。

3.3 EIAV基因组进化与疫苗免疫保护的关系

EIAV弱毒疫苗在长期的体外传代致弱过程中,病毒基因组的多样性呈逐渐上升的趋势,特别是*env*基因多样性增加最为明显^[12,67]。通过比较具有*env*基因多样性的不同的疫苗株和感染性克隆株在免疫保护的差异,发现*env*基因高度多样性的疫苗株的免疫保护效率明显优于基因组多样性较低的感染性克隆病毒,而且*env*基因的多样性与免疫保护呈显著的正相关性,*env*相关的特异性抗体滴度、亲和力、中和抗体与*env*多样性程度呈伴随性相关^[18]。这些结果提示免疫原(*env*)多样性是EIAV弱毒疫苗诱导免疫保护的关键因素。

EIAV强毒株在感染马匹后存在明显的优势病毒准种转换现象,感染早期(2周)的优势病毒准种与疫苗株优势病毒准种具有相同或相似的基因组特征^[13,36-37],主要免疫原Env具有相同的潜在糖基化位点特征^[36]。实际上,在HIV-1的感染过程中也存在类似的现象。在HIV-1感染早期,主要以能够感染巨噬细胞和树突状细胞的R5嗜性病毒准种为主,而在疾病进程中对CD4⁺T细胞有高度感染性的X4嗜性病毒准种逐渐转变为优势病毒^[68-69]。虽然尚不能确定EIAV感染过程中优势病毒准种的转换是否与病毒

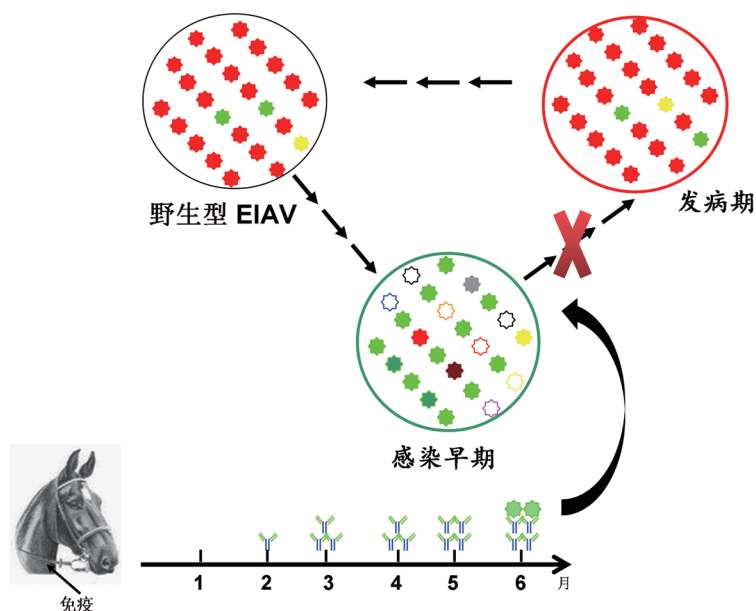


图4 EIAV弱毒疫苗免疫保护模型

细胞嗜性变化有关,但是中和试验表明免疫保护马匹的血清,特别是免疫后3~6个月的血清对疫苗株或疫苗株样的Env具有明显的中和活性^[18,22,70]。由此推测,疫苗免疫马在疫苗免疫成熟期可以建立有效的免疫应答反应,特别是中和抗体可以有效地中和强毒感染早期的病毒准种,从而阻断强毒株的感染过程,达到免疫保护的效果(图4)。

4 结语

当前,HIV-1疫苗研发仍未有突破,确定有效的免疫原和有效的保护性免疫应答反应是其主要的挑战^[71-73]。马传贫弱毒疫苗作为唯一成功应用的慢病毒弱毒疫苗,我们系统分析了EIAV弱毒疫苗及其强毒株的体内体外进化规律,从准种的角度提出了“EIAV弱毒疫苗可能起源于EIAV准种进化的一个小的分支”的科学假设,发现EIAV感染过程中存在优势病毒准种的转换,证明了疫苗Env多样性是影响其免疫保护效果的关键因素;系统评价了EIAV弱毒疫苗激发天然免疫和诱导特异性免疫应答反应的特点,发现中和抗体和病毒特异性细胞免疫应答的水平与免疫保护密切相关。上述研究结果丰富了慢病毒及其免疫的基础理论,希望能为其他慢病毒疫苗的研制提供参考。我们将继续深入研究EIAV弱毒疫苗诱导免疫保护的分子机制,特别是中和抗体在免疫保护中的作用机制。

[参 考 文 献]

- [1] Malossi CD, Fioratti EG, Cardoso JF, et al. High genomic variability in equine infectious anemia virus obtained from naturally infected horses in Pantanal, Brazil: an endemic region case. *Viruses*, 2020, 12: 207
- [2] Bueno BL, Camara RJF, Moreira MVL, et al. Molecular detection, histopathological analysis, and immunohistochemical characterization of equine infectious anemia virus in naturally infected equids. *Arch Virol*, 2020, 165: 1333-42
- [3] Dorey-Robinson DLW, Locker N, Steinbach F, et al. Molecular characterization of equine infectious anaemia virus strains detected in England in 2010 and 2012. *Transbound Emerg Dis*, 2019, 66: 2311-7
- [4] Deshiere A, Berthet N, Lecouturier F, et al. Molecular characterization of equine infectious anemia viruses using targeted sequence enrichment and next generation sequencing. *Virology*, 2019, 537: 121-9
- [5] De Liberato C, Magliano A, Autorino GL, et al. Seasonal succession of tabanid species in equine infectious anaemia endemic areas of Italy. *Med Vet Entomol*, 2019, 33: 431-6
- [6] Dong JB, Zhu W, Cook FR, et al. Identification of a novel equine infectious anemia virus field strain isolated from feral horses in southern Japan. *J Gen Virol*, 2013, 94: 360-5
- [7] Cursino AE, Vilela APP, Franco-Luiz APM, et al. Equine infectious anemia virus in naturally infected horses from the Brazilian Pantanal. *Arch Virol*, 2018, 163: 2385-94
- [8] Barros ML, Borges AMC, Oliveira De ACS, et al. Spatial distribution and risk factors for equine infectious anaemia in the state of Mato Grosso, Brazil. *Rev Sci Tech*, 2018, 37: 971-83
- [9] Cook RF, Leroux C, Issel CJ. Equine infectious anemia and equine infectious anemia virus in 2013: a review. *Vet Microbiol*, 2013, 167: 181-204
- [10] 沈荣显. 马传染性贫血病驴白细胞弱毒疫苗. 农业科技通讯, 1984, 10: 23
- [11] Wang XF, Bai B, Lin YZ, et al. High-efficiency rescue of equine infectious anemia virus from a CMV-driven infectious clone. *Virol Sin*, 2019, 34: 725-8
- [12] Wang XF, Lin YZ, Li Q, et al. Genetic evolution during the development of an attenuated EIAV vaccine. *Retrovirology*, 2016, 13: 9
- [13] Wang XF, Liu Q, Wang YH, et al. Characterization of equine infectious anemia virus long terminal repeat quasi-species *in vitro* and *in vivo*. *J Virol*, 2018, 92: e02150-17
- [14] Wang Y, Zhang H, Na L, et al. ANP32A and ANP32B are key factors in the Rev-dependent CRM1 pathway for nuclear export of HIV-1 unspliced mRNA. *J Biol Chem*, 2019, 294: 15346-57
- [15] Bai B, Wang XF, Zhang M, et al. The N-glycosylation of equine tetherin affects antiviral activity by regulating its subcellular localization. *Viruses*, 2020, 12: 220
- [16] Du C, Duan Y, Wang XF, et al. Attenuation of equine lentivirus alters mitochondrial protein expression profile from inflammation to apoptosis. *J Virol*, 2019, 93: e00653-19
- [17] Ji S, Na L, Ren H, et al. Equine myxovirus resistance protein 2 restricts lentiviral replication by blocking nuclear uptake of capsid protein. *J Virol*, 2018, 92: e00499-18
- [18] Lin YZ, Wang XF, Wang Y, et al. Env diversity-dependent protection of the attenuated equine infectious anaemia virus vaccine. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9: 1309-20
- [19] Lin YZ, Sun LK, Zhu DT, et al. Equine schlafen 11 restricts the production of equine infectious anemia virus via a codon usage-dependent mechanism. *Virology*, 2016, 495: 112-21
- [20] Liu C, Wang XF, Wang Y, et al. Characterization of EIAV env quasispecies during long-term passage *in vitro*: gradual loss of pathogenicity. *Viruses*, 2019, 11: 380
- [21] Liu Q, Ma J, Wang XF, et al. Infection with equine infectious anemia virus vaccine strain EIAV_{DLV121} causes no visible histopathological lesions in target organs in association with restricted viral replication and unique cytokine response. *Vet Immunol Immunopathol*, 2016, 170: 30-40
- [22] Ma J, Shi N, Jiang CG, et al. A proviral derivative from a reference attenuated EIAV vaccine strain failed to elicit protective immunity. *Virology*, 2011, 410: 96-106
- [23] Na L, Tang YD, Wang C, et al. Rhesus monkey TRIM5α protein SPRY domain contributes to AP-1 activation. *J Biol Chem*, 2018, 293: 2661-74

- [24] Ma J, Wang SS, Lin YZ, et al. Infection of equine monocyte-derived macrophages with an attenuated equine infectious anemia virus (EIAV) strain induces a strong resistance to the infection by a virulent EIAV strain. *Vet Res*, 2014, 45: 82
- [25] 冯静兰. 中国马传染性贫血病及其防治[M]. 北京: 中华人民共和国农业部, 1983
- [26] 董君平, 王振漪, 彭达春, 等. 马传贫弱毒继代细胞疫苗的研究. *中国畜禽传染病*, 1993, 52: 15-6
- [27] Issel CJ, Horohov DW, Lea DF, et al. Efficacy of inactivated whole-virus and subunit vaccines in preventing infection and disease caused by equine infectious anemia virus. *J Virol*, 1992, 66: 3398-408
- [28] Li F, Craigo JK, Howe L, et al. A live attenuated equine infectious anemia virus proviral vaccine with a modified S2 gene provides protection from detectable infection by intravenous virulent virus challenge of experimentally inoculated horses. *J Virol*, 2003, 77: 7244-53
- [29] Tagmyer TL, Craigo JK, Cook SJ, et al. Envelope determinants of equine infectious anemia virus vaccine protection and the effects of sequence variation on immune recognition. *J Virol*, 2008, 82: 4052-63
- [30] Leroux C, Cadore JL, Montelaro RC. Equine infectious anemia virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? *Vet Res*, 2004, 35: 485-512
- [31] Craigo JK, Zhang B, Barnes S, et al. Envelope variation as a primary determinant of lentiviral vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 15105-10
- [32] Payne SL, Fuller FJ. Virulence determinants of equine infectious anemia virus. *Curr HIV Res*, 2010, 8: 66-72
- [33] Wang XF, Wang S, Lin Y, et al. Genomic comparison between attenuated Chinese equine infectious anemia virus vaccine strains and their parental virulent strains. *Arch Virol*, 2011, 156: 353-7
- [34] Leroux C, Issel CJ, Montelaro RC. Novel and dynamic evolution of equine infectious anemia virus genomic quasispecies associated with sequential disease cycles in an experimentally infected pony. *J Virol*, 1997, 71: 9627-39
- [35] Domingo E, Perales C. Quasispecies and virus. *Eur Biophys J*, 2018, 47: 443-57
- [36] Wang XF, Wang S, Lin YZ, et al. Unique evolution characteristics of the envelope protein of EIAV_{LN40}, a virulent strain of equine infectious anemia virus. *Virus Genes*, 2011, 42: 220-8
- [37] Wang XF, Wang S, Liu Q, et al. A unique evolution of the S2 gene of equine infectious anemia virus in hosts correlated with particular infection statuses. *Viruses*, 2014, 6: 4265-79
- [38] Fagerness AJ, Flaherty MT, Perry ST, et al. The S2 accessory gene of equine infectious anemia virus is essential for expression of disease in ponies. *Virology*, 2006, 349: 22-30
- [39] Li F, Puffer BA, Montelaro RC. The S2 gene of equine infectious anemia virus is dispensable for viral replication *in vitro*. *J Virol*, 1998, 72: 8344-8
- [40] 耿庆华, 郭巍, 赵立平, 等. S2基因失活突变马传染性贫血病毒感染性克隆的构建及感染性研究. *中国预防兽医学报*, 2010, 32: 499-502
- [41] 何翔, 邵一鸣, 薛飞, 等. 感染性马传染性贫血病毒嵌合克隆的构建. *病毒学报*, 2003, 19: 128-32
- [42] Gao X, Jiang CG, Wang XF, et al. Reverse mutation of the virulence-associated S2 gene does not cause an attenuated equine infectious anemia virus strain to revert to pathogenicity. *Virology*, 2013, 443: 321-8
- [43] Payne SL, La Celle K, Pei XF, et al. Long terminal repeat sequences of equine infectious anaemia virus are a major determinant of cell tropism. *J Gen Virol*, 1999, 80: 755-9
- [44] Zhou T, Yuan XF, Hou SH, et al. Long terminal repeat sequences from virulent and attenuated equine infectious anemia virus demonstrate distinct promoter activities. *Virus Res*, 2007, 128: 58-64
- [45] Tu YB, Zhou T, Yuan XF, et al. Long terminal repeats are not the sole determinants of virulence for equine infectious anemia virus. *Arch Virol*, 2007, 152: 209-18
- [46] Taylor SD, Leib SR, Wu WW, et al. Protective effects of broadly neutralizing immunoglobulin against homologous and heterologous equine infectious anemia virus infection in horses with severe combined immunodeficiency. *J Virol*, 2011, 85: 6814-8
- [47] Du C, Ma J, Liu Q, et al. Mice transgenic for equine cyclin T1 and ELR1 are susceptible to equine infectious anemia virus infection. *Retrovirology*, 2015, 12: 36
- [48] Yin X, Hu Z, Gu QY, et al. Equine tetherin blocks retrovirus release and its activity is antagonized by equine infectious anemia virus envelope protein. *J Virol*, 2014, 88: 1259-70
- [49] 王雪峰, 陈杰, 林跃智, 等. 马传染性贫血病毒弱毒疫苗 env基因变异及其生物学意义[C]. 昆明: 中国畜牧兽医学会生物技术学会暨中国免疫学会兽医免疫分会第十二次学术研讨会, 2016
- [50] Vigerust DJ, Shepherd VL. Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions. *Trends Microbiol*, 2007, 15: 211-8
- [51] Han X, Zhang P, Yu W, et al. Amino acid mutations in the env gp90 protein that modify N-linked glycosylation of the Chinese EIAV vaccine strain enhance resistance to neutralizing antibodies. *Virus Genes*, 2016, 52: 814-22
- [52] Shen T, Liang H, Tong X, et al. Amino acid mutations of the infectious clone from Chinese EIAV attenuated vaccine resulted in reversion of virulence. *Vaccine*, 2006, 24: 738-49
- [53] Liu L, Wan Y, Wu L, et al. Broader HIV-1 neutralizing antibody responses induced by envelope glycoprotein mutants based on the EIAV attenuated vaccine. *Retrovirology*, 2010, 7: 71
- [54] Liu JD, Ren L, Ju B, et al. Comparison of antibody immune responses to different HIV-1 envelope glycoprotein mutants. *Curr HIV Res*, 2017, 15: 1-8
- [55] 沈荣显, 相文华. 马传染性贫血病驴白细胞弱毒株的致病及免疫机理的研究. *中国兽医学报*, 2003, 23: 505-15
- [56] Lin YZ, Shen RX, Zhu ZY, et al. An attenuated EIAV vaccine strain induces significantly different immune responses from its pathogenic parental strain although with similar *in vivo* replication pattern. *Antiviral Res*,

- 2011, 92: 292-304
- [57] 马建, 姜成刚, 林跃智, 等. 免疫抑制对EIAV弱毒疫苗免疫马体内疫苗弱毒株载量的影响. 生物化学与生物物理进展, 2008, 35: 1276-81
- [58] Craigo JK, Montelaro RC. Lessons in AIDS vaccine development learned from studies of equine infectious anemia virus infection and immunity. *Viruses*, 2013, 5: 2963-76
- [59] 朱振营, 林跃智, 王宇虹, 等. EIAV弱毒疫苗株和强毒株诱导的特异性体液免疫应答差别. 细胞与分子免疫学杂志, 2009, 25: 1079-83
- [60] 阳凯, 孟庆来, 陈新江, 等. EIAV 减毒疫苗克隆株诱导体液免疫反应的时相研究. 中国兽医学报, 2009, 31: 156-60
- [61] Craigo JK, Li F, Steckbeck JD, et al. Discerning an effective balance between equine infectious anemia virus attenuation and vaccine efficacy. *J Virol*, 2005, 79: 2666-77
- [62] Zhang X, Wang Y, Liang H, et al. Correlation between the induction of Th1 cytokines by an attenuated equine infectious anemia virus vaccine and protection against disease progression. *J Gen Virol*, 2007, 88: 998-1004
- [63] 张晓燕, 李红梅, 梁华, 等. EIAV减毒疫苗诱导的特异性细胞免疫应答. 细胞与分子免疫学杂志, 2006, 22: 115-8
- [64] Lin YZ, Cao XZ, Li L, et al. The pathogenic and vaccine strains of equine infectious anemia virus differentially induce cytokine and chemokine expression and apoptosis in macrophages. *Virus Res*, 2011, 160: 274-82
- [65] 任会玲. EIAV强毒株与疫苗株诱导多种马限制因子表达谱特征及与免疫保护的相关性分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2017
- [66] Du C, Liu HF, Lin YZ, et al. Proteomic alteration of equine monocyte-derived macrophages infected with equine infectious anemia virus. *Proteomics*, 2015, 15: 1843-58
- [67] 王雪峰, 王帅, 韩秀娥, 等. 马传染性贫血弱毒疫苗株致弱过程中表面蛋白gp90的进化分析. 中国预防兽医学报, 2011, 33: 115-8
- [68] Moore JP, Kitchen SG, Pugach P, et al. The CCR5 and CXCR4 coreceptors--central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2004, 20: 111-26
- [69] Maeda Y, Takemura T, Chikata T, et al. Existence of replication-competent minor variants with different coreceptor usage in plasma from HIV-1-infected individuals. *J Virol*, 2020, 94: e00193-20
- [70] 陈杰, 王雪峰, 林跃智, 等. 马传贫病毒弱毒疫苗免疫马匹后中和抗体变化规律研究. 中国预防兽医学报, 2017, 39: 311-4
- [71] Goh GK, Dunker AK, Foster JA, et al. HIV vaccine mystery and viral shell disorder. *Biomolecules*, 2019, 9: 178
- [72] Dieffenbach CW, Fauci AS. The search for an HIV vaccine, the journey continues. *J Int AIDS Soc*, 2020, 23: e25506
- [73] Bekker LG, Tatoud R, Dabis F, et al. The complex challenges of HIV vaccine development require renewed and expanded global commitment. *Lancet*, 2020, 395: 384-8