



# 基因工程疫苗在兽医领域的应用

王瑜,王真\*

(北京农学院 动物科学技术学院兽医学(中兽医)北京市重点实验室 北京 102206)

中图分类号: S85; Q786

文献标识码: A

文章编号: 1004-7034(2023)17-0044-06

**摘要:** 基因工程疫苗即利用 DNA 重组技术,将病原的保护性抗原编码基因片段定向插入载体或表达系统中,使之能够实现体内或体外的高效表达进而制成疫苗,如亚单位疫苗、重组活载体疫苗、基因缺失疫苗和核酸疫苗等。相较于传统疫苗,基因工程疫苗能不断刺激机体免疫系统产生长期免疫;避免因病原体变异而造成免疫逃避;一个质粒载体可克隆多个抗原基因组成多价疫苗,提高了疾病的防治效率和效果,是未来的主要发展和研究方向之一。文章对基因工程疫苗在兽医领域的研究进展进行了概述,旨在为相应研究与实践提供一定参考。

**关键词:** 基因工程疫苗;免疫反应;免疫保护;动物疾病;防控

开放科学(资源服务)标识码  
Open Science Identity (OSID)



现代疫苗学开始于 19 世纪末至 20 世纪初,研究人员通过对微生物进行衰减和灭活等处理获得人工减毒活疫苗,如狂犬病疫苗、卡介苗等;20 世纪中叶,通过提取细菌中的多糖抗原组织,然后与某种蛋白质结合制成多糖-蛋白结合疫苗,此后白喉类毒素和破伤风类毒素面世;20 世纪 70 年代开始,随着 DNA 重组技术的发展,基因工程疫苗成为研究热点,1986 年美国 FDA 批准上市的重组乙型肝炎疫苗是世界上首个基因工程疫苗;进入 21 世纪后,随着全基因组测序技术的发展,反向疫苗学诞生,代表成果包括五价轮状病毒疫苗、流感活疫苗等。

基因工程疫苗在人用疫苗市场的应用更早,目前已上市的有重组戊型肝炎疫苗、基于大肠杆菌研制的人乳头瘤病毒(HPV)16/18 双价疫苗、基于蛋白质重组的 B 型脑膜炎球菌疫苗、新冠 ZYCoV-D 疫苗等;被批准进入临床试验的有 HPV 九价疫苗、腺病毒载体新冠疫苗、流感 A 型疫苗、疟疾疫苗、炭疽疫苗等。兽医领域目前通过注册的基因工程疫苗为伪狂犬病 gE 基因缺失疫苗、禽流感 DNA 疫苗、H5 亚型禽流感

病毒 HA 与 HN 基因的重组禽流感病毒活载体疫苗、口蹄疫病毒的合成肽疫苗、猪 O 型口蹄疫合成肽疫苗和仔猪大肠埃希菌 K88、K99 双基因工程灭活苗等。

相较于传统疫苗,基因工程疫苗具有以下优点:第一,制备简单,可实现更廉价的快速规模化生产;第二,便于区分免疫动物和感染动物;第三,更易于制成多价联合疫苗;第四,免疫程序更简单,安全性高等。文章对基因工程疫苗在兽医领域的研究进展进行了概述,旨在为相应研究与实践提供一定参考。

## 1 基因缺失疫苗

基因缺失疫苗是利用分子生物学技术、基因工程技术去除或破坏病原体中高度保守的毒力基因,保留其免疫原性部分,以刺激机体产生特异性免疫应答,使病原体失去或降低致病力。该疫苗比传统减毒疫苗的安全性更高,且毒力不易返祖;易于利用血清学检测手段鉴别免疫动物和野毒感染动物;免疫期长,能激发体液免疫和细胞免疫,还可高效诱导黏膜免疫。

当前,已获批上市的基因缺失疫苗多为病毒类疫苗及细菌类疫苗,如最早研发并且应用最广的猪伪狂犬病 gE 基因缺失活疫苗和我国历时 18 年自主研发的布鲁氏菌基因缺失标记活疫苗(M5-90 $\Delta$ 26 株)<sup>[1]</sup>。用免疫原性良好的候选株制备的基因缺失疫苗可产生较灭活苗更佳的保护效果。如将副猪嗜血杆菌进行单基因敲除构建的 JS0135 $\Delta$ nanH 基因缺失疫苗对仔猪的免疫保护效果优于 SH0165 $\Delta$ lsgB 基因缺失疫苗及商业灭活苗<sup>[2]</sup>。基因缺失疫苗经连

收稿日期: 2022-09-08; 修回日期: 2023-07-18

基金项目: 北京市教委青年拔尖人才项目(CIT&TCD201904052); 北京农学院青年基金项目(QNKJ202107); 大北农青年基金项目(16ZK007)

作者简介: 王瑜(1996—),女,硕士研究生,研究方向为动物病原学,1763494880@qq.com。

\* 通信作者: 王真(1986—),女,副教授,博士,研究方向为动物疫病诊断和防治, wangzhen3355@163.com。



续代后,仍可产生长久而稳定的免疫保护作用。Su S. 等<sup>[3]</sup>构建了鸡马立克病毒(Marek's disease virus, MDV)的 meq 基因缺失株,以其作为 MD 疫苗,将其命名为 SC9-1,在 CEF 培养基传代过程中 SC9-1 对 SPF 鸡群的保护效果不变。采用同源基因置换法构建的利什曼原虫 LdFBPase 基因( $\Delta$ fbpase)缺失株在 Balb/c 小鼠体内和巨噬细胞内的增殖能力显著降低,并可促进小鼠产生持续性的 Th1 型免疫应答,有望作为候选疫苗株改变因利什曼原虫引起的黑热病尚无有效防控手段的现状<sup>[4]</sup>。基因缺失寄生虫疫苗暂无已上市的产品,但已有疟疾和利什曼病等疫苗的研制进入临床试验阶段<sup>[5-6]</sup>。

对微生物基因组功能认识的不断深入为研究特定多基因缺失的弱毒苗提供了新的思路。伪狂犬病 gE/gI 双基因疫苗对最新流行株的保护作用较差,易导致猪重新发生轻度炎症细胞浸润、出血和脑及肺脏充血。Dong J. 等<sup>[7]</sup>在 PRV ZJ01 强毒株的基础上,合成了 PRV 胸苷激酶(TK)/gE/gI 缺失的 PRV-ZJ01 $\Delta$ TK/gE/gI,其体外生长特征与 PRV ZJ01 亲本株相似,且具有较低的致病性和较高的保护率,是我国预防伪狂犬病的理想候选疫苗。非洲猪瘟疫情让全国养猪行业经历了巨大挑战。Chen W. 等<sup>[8]</sup>以非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV) HLJ/18 毒株为骨架,敲除 DP148R、CD2v 等 7 个基因构建了 HLJ/-18-7GD 候选株,其在猪体内可实现完全减毒,对受 ASFV 感染的猪具有保护作用,有望成为一种安全有效的 ASFV 疫苗。

当前对基因缺失疫苗的研究重点集中在疫苗候选株的筛选方面,例如布鲁氏菌 bp26 基因缺失、vjbR 基因缺失、VirB12 基因缺失疫苗候选株及传染性鼻气管炎 gG-TK-双基因缺失株、弓形虫基因缺失 GRA/ROP 蛋白家族基因缺失虫株等,今后有望将候选株转化为疫苗成品。

## 2 亚单位疫苗

亚单位疫苗是提取微生物的主要保护性免疫原中存在的组分,添加佐剂进行乳化而制成的疫苗。免疫原组分一般包括纯化蛋白(如乙肝疫苗、流感疫苗等)、多糖(如伤寒沙门氏菌 Vi 多糖疫苗)、蛋白质-多糖结合物[如 b 型流感嗜血杆菌(Hib)荚膜多糖-破伤风类毒素结合物(PRPT)]、糖脂或脂蛋白(如 Trumenba b 群脑膜炎球菌疫苗)等。

亚单位疫苗的佐剂可以延缓抗原在体内的降解,增强亚单位疫苗的免疫原性,为疫苗提供更大的设计空间<sup>[9]</sup>。某些蛋白质如外膜蛋白(outer membrane protein, OMPs)可以代替外源性佐剂,有效刺激机体产生先天性免疫应答和适应性免疫应答<sup>[10-11]</sup>。将重组外膜蛋白 F(rOmpF)和外膜囊泡(outermembrane vesicles, OMVs)制成抗肠炎链球菌亚单位疫苗,其免

疫效果优于单独使用 rOmpF,对机体有较强的保护作用,可抑制细菌在鸡体内定植,证实了 OMVs 拥有在亚单位疫苗中作为佐剂的潜力<sup>[12]</sup>。

Y. T. Lo 等<sup>[13]</sup>采用合成生物学方法成功合成膜结合和分泌形式的 G 和 GNS 糖蛋白,将 V5 表位标签基因融合到蛋白质 C 端,实现了分泌型 G 糖蛋白的高水平表达,保证了融合蛋白在小鼠体内具有免疫原性,有效提高了蛋白质在体外的表达水平,缩短了规模化生产时间。另外,采用高通量免疫信息学方法也可快速预测具有潜在翻译意义的抗原表位,降低研发成本<sup>[14-15]</sup>。基于这一原理,P. Kalita 等<sup>[16]</sup>成功用片形吸虫的 7 种抗原蛋白构建了多表位亚单位疫苗,该疫苗具有较好的抗原性、免疫原性和安全性,且疫苗质粒结构能够在适当的生物系统中表达,可快速扩大疫苗生产规模,为多表位亚单位疫苗免疫原性的试验评价提供了基础。

除可高效生产外,亚单位疫苗对防止病毒协同表达引发双重感染也表现出了明显优势。牛呼吸道合胞病毒(Bovine respiratory syncytial virus, BRSV) NP 和睡眠嗜血杆菌(*Haemophilus somnus*, HSO) IbpA DR2 组成的亚单位疫苗能够有效预防两种病原体的双重感染,减轻双重感染者的临床症状,减轻肺部病变,且免疫效果优于使用福尔马林灭活的 BRSV 和 HSO 疫苗<sup>[17]</sup>。

在疫苗的设计和开发中,纳米颗粒既可以作为免疫增强剂,又可以作为所选抗原的传递系统<sup>[18]</sup>。将 A 群链球菌(GAS) C16 脂氨基酸和胆酸与肽抗原(P25-J8)结合,结合产物用  $\alpha$ -聚谷氨酸修饰合成聚电解质复合物(PEC)纳米颗粒,将纳米颗粒与肝素和/或三甲基壳聚糖(TMC)配制为候选脂肽疫苗,结果该疫苗可在离群小鼠中诱导强烈的免疫应答,产生的 IgG 抗体对 GAS 临床分离株具有显著作用<sup>[19]</sup>。

由生物信息学鉴定的多表位组成非天然分子是作为潜在的疫苗候选策略之一,但这一策略仍需大量试验进行验证<sup>[20]</sup>。亚单位疫苗的免疫原性可能根据抗原的固有特性而发生变化,对新开发疫苗免疫效果的评价需要更多的数据作为支撑。

## 3 核酸疫苗

核酸疫苗是将可编码抗原蛋白的外源基因直接导入宿主体内,通过宿主细胞的表达系统合成抗原蛋白,诱导宿主产生特异性免疫应答从而预防或治疗疾病。核酸疫苗的优点是在疫苗中不存在完整生物体,能够针对疫苗中编码的抗原特异性地引导免疫应答,可定制多抗原疫苗。

重组核酸质粒可在宿主体内稳定表达目的蛋白,有效增强机体产生特异性抗体的能力,该疫苗的免疫效力、耐受性及安全性与给药途径具有相关性。Zhao X. 等<sup>[21]</sup>通过肌肉注射(intramuscular injection, IM)、



皮下注射(subcutaneous injection, SC)和静脉注射(intravenously guttae, IV)接种单剂量可编码鸡Ⅱ型胶原(CCⅡ)的抗原特异性DNA疫苗pcDNA-CCOL2A1后,比较CCOL2A1 mRNA和编码CCⅡ蛋白的原位表达水平及对关节炎(CIA)的保护效果。结果表明IM、SC和IV三种途径接种的疫苗均可显著降低血清抗CCⅡ IgG抗体水平,但只有通过IM接种时可显著降低血清类风湿因子(RF)和抗环瓜氨酸肽(抗CCP)抗体水平,表明IM接种可能是首选接种方式。

与传统注射免疫方法相比,DNA传递技术包括喷射传递、基因枪传递及先进的电穿孔(EP)等<sup>[22]</sup>。使用PJI和针头注射器递送系统免疫小鼠,发现PJI注射的蛋白质表达效果比针头注射器更佳,可以有效地将质粒DNA直接转染到细胞核中<sup>[23]</sup>。除传递方法更简单外,DNA疫苗还可诱导靶动物体内产生多种免疫应答。例如使用无针给药方法用多价流感DNA疫苗免疫猪,免疫后猪体内产生了血凝抑制(HI)、交叉反应中和抗体及神经氨酸酶抑制抗体,并呈现出剂量依赖性<sup>[24]</sup>。

DNA疫苗中目标抗原的微小修饰可能会提高其对肿瘤或传染病的疗效。T. Imai<sup>[25]</sup>构建并比较了卵清蛋白(OVA)的两种细胞溶质形式(pOVA<sub>v</sub>和pOVA<sub>y</sub>)。使用基因枪对表达OVA的小鼠胸腺瘤细胞进行预防性DNA疫苗接种,结果显示转染pOVA<sub>v</sub>的骨髓源性树突状细胞(BMDC)在体外诱导OT-I CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞产生更高水平的干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ),证明了DNA疫苗中靶抗原N端的单一氨基酸缺失会导致不同的免疫结果。基于表位预测的基因组测序和生物信息学算法等技术开发的针对个体癌症的新抗原疫苗可诱导强烈的T淋巴细胞反应,具有刺激高度特异性免疫及抗肿瘤反应的潜力<sup>[26]</sup>。Yang X.等<sup>[27]</sup>建立了一个基于DNA的新抗原疫苗平台,通过全外显子测序和RNA-seq技术全面鉴定了个体体细胞突变,验证候选疫苗的树突状细胞(DC)效力靶点,制备了可被DC有效吸收的多表位DNA疫苗,结果成功诱导了针对小鼠黑色素瘤细胞的免疫应答,显著抑制了小鼠模型中黑色素瘤的生长并减轻了肺转移症状,证明了DNA疫苗对肿瘤免疫治疗具有可行性。

虽然DNA和mRNA疫苗在临床试验中得到了有效评估,但目前还没有获批上市的产品,暂未能充分发挥该疫苗的实际应用价值。

#### 4 活载体疫苗

活载体疫苗即将微生物、病原体和某些共生细菌经过基因工程改造降低毒力,以减毒活病毒、减毒活细菌作为载体,并替换后插入部分基因,进而制备为减毒活疫苗。该疫苗可在宿主体内持续传递重组的

异源抗原,刺激宿主免疫系统,这些活载体的一个关键特征是它们能够刺激黏膜、体液和细胞免疫。

活载体的独特性和多功能性也被用于开发抗癌疫苗,理想的疫苗载体不仅能引发宿主产生有效的先天免疫,还能引发机体产生适应性免疫应答。目前使用的载体多为牛痘病毒、脊髓灰质炎病毒、禽痘病毒、腺病毒、疱疹病毒、沙门氏菌、乳酸菌等,其中腺病毒载体应用最多。

##### 4.1 病毒活载体疫苗

病毒载体刺激机体产生免疫应答的关键是刺激机体产生具有细胞活性的T淋巴细胞。作为新型载体的病毒包括基于灵长类动物源性腺病毒、痘病毒、横纹肌病毒、副黏病毒、沙粒病毒和疱疹病毒等。

病毒载体疫苗可能比活疫苗具有更好的免疫效果,减轻疫苗不良反应。F. Prandini等<sup>[28]</sup>使用表达传染性法氏囊炎病毒(Infectious bursal disease virus, IBV)蛋白2的市售火鸡疱疹病毒载体疫苗(vHVT-IBD)和两种IBD活疫苗分别免疫商品鸡,结果活疫苗能更有效地刺激受免疫鸡群的体液免疫系统,产生明显的免疫抑制作用,接种vHVT-IBD疫苗的鸡在攻毒后病变明显少于接种活疫苗和未接种IBD疫苗的鸡,说明vHVT-IBD可能是传统IBD活疫苗的合适替代品。

腺病毒(Ad)是目前常用的疫苗载体,关于腺病毒的研究也更深入。P. K. Sharma等<sup>[29]</sup>利用DC1.8的编码序列设计出纤维-纤维蛋白-sdAb嵌合分子,用该嵌合分子取代原有的Ad5纤维旋扣序列,构建出重组病毒株Ad5FF1.8,该毒株可显著增强DC2.4中的转基因表达,选择性地感染未成熟DC,为设计针对DC或特定DC亚群的Ad载体疫苗提供定向选择方案,显著提高了疫苗的效力。

开发针对病毒基因多样性的载体平台,使机体得到可扩展的保护性免疫是研发通用型疫苗的重点<sup>[30-31]</sup>。如将副流感病毒5(Parainfluenza virus type 5, PIV-5)作为载体,构建表达HA-113重组病毒PIV5-113,在小鼠和猪模型中测试重组病毒的免疫原性和保护效果,结果表明PIV5-113可以保护小鼠和猪免受表达亲代及其他基因型HAs病毒的攻击,PIV-5疫苗载体和嵌合HA-113抗原可能用于开发通用流感疫苗<sup>[32]</sup>。

除经济动物外,宠物临床也有病毒载体疫苗的应用。猫科阿尔法疱疹病毒1(Feline herpesvirus, FHV-1)是一种基因治疗的候选载体,也可作为研究细胞因子表达和调节猫免疫应答系统<sup>[33]</sup>的平台。利用FHV-1作为载体应用同源重组技术构建的重组狂犬病疫苗FHV-RVG在预防FHV-1和RABV感染方面是有效的,该重组疫苗有望成为我国首个猫科狂犬病疫苗<sup>[33]</sup>。



使用动物病毒作为载体,也可实现对人类传染病及癌症的预防。V. K. Manoharan 等<sup>[34]</sup>使用几种新城疫病毒(New Castle disease, NDV)载体表达了人类免疫缺陷病毒 Env 蛋白,结果改良的 NDV 载体 LaSota 能在豚鼠体内诱导更高水平的抗体,表明新型改良 NDV 载体安全性及免疫原性均较好。病毒载体可避免人类先天性免疫对疫苗效果的影响,具有更高的安全性,并可诱导强烈的局部和全身免疫应答。

活病毒载体疫苗更易实现一苗多免的效果,但其能否刺激机体产生先天性免疫、重组病毒的传播途径及减毒后的安全性还存在一些争议。因此,更好地平衡疫苗的安全性和免疫原性之间的关系,是未来减毒活载体疫苗的研究重点。

#### 4.2 细菌活载体疫苗

细菌载体包括减毒菌和益生菌,可以通过基因工程传递目标抗原来刺激宿主的免疫系统。这些活细菌疫苗载体可以刺激持久的体液和细胞免疫。异源抗原在活细菌中的传递策略促进了新疫苗的开发应用。除表达和传递目标抗原外,活微生物的天然特性使其能够作为有效的免疫佐剂。

许多活菌载体是生物治疗领域的有效工具,免疫原表达和传递的形式对宿主免疫应答的质量和水平有着至关重要的影响。研究者在临床试验中已经开展了对细菌载体的评估工作,如通过敲除伊万诺维亚李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM) actA 和 plcB 两个毒力基因开发了新型细菌载体平台,基于该平台构建了含有口蹄疫病毒 vp1 基因的重组菌株 LM $\Delta$ actAplcB-vp1,该菌株兼具安全性和免疫原性,表明以突变型 LM 作为递送平台可增强插入的 FMDV-vp1 异源基因的特异性细胞免疫和体液免疫应答<sup>[35]</sup>。虽证实 LM 活菌可作为外源分子传递的替代系统,但关于活细菌的使用安全性还存在争议。曾有研究人员使用低温保存的李斯特菌犬骨肉瘤疫苗冻干制剂免疫犬,结果少量试验犬发生了李斯特菌阳性的胸腔脓肿,故该疫苗已停产<sup>[36]</sup>。

减毒伤寒沙门氏菌和减毒鼠伤寒沙门氏菌作为活菌疫苗载体在许多方面得到应用,其能够克服胃酸屏障,最终进入小肠,侵入深层组织和诱发系统性疾病,从而刺激促炎介质的分泌,触发早期先天性免疫应答,并创造有利于抗原提呈的局部环境<sup>[37-38]</sup>。Wang N. 等<sup>[39]</sup>以减毒鼠伤寒沙门氏菌菌株 X11802 结合旋毛虫完整的糖蛋白(Ts43)序列构建携带重组质粒 pYA3681-Ts43 的减毒沙门氏菌疫苗,口服后可显著提高小鼠局部肠黏膜 sIgA 和血清 IgG 含量,该疫苗具有免疫程序简单、依从性高及能激活黏膜免疫的优势。

乳酸菌是一种食品级细菌,被认为是最具安全的细菌载体。I. Koko 等<sup>[40]</sup>基于乳球菌噬菌体 TP901-

1 整合系统构建了蛋白质分泌和表面展示的整合载体,该整合载体可用于工业用途的乳酸菌表达系统中异源蛋白质的分泌或表面展示,也可作为活疫苗的递送载体。干酪乳酸菌中含有所需基因的整合载体,其中的位点特异性整合系统允许外源 DNA 整合到宿主基因组的特定位点中,从而实现了外源蛋白质的稳定表达<sup>[41]</sup>。

细菌载体优选胞内寄生菌,李斯特菌、沙门氏菌、乳酸菌是三种最常用的载体平台,针对芽孢杆菌、志贺氏菌等细菌载体、细菌载体中异源抗原的表达及重组细菌的免疫途径研究也逐渐深入。尽管活菌载体是一个很有前景的平台,但对载体的选择应非常谨慎,且要重点关注转基因生物的安全性,以避免出现安全漏洞。

#### 5 小结

基因工程疫苗在动物疫病防治中并未获得较大规模的推广与应用,兽用基因工程疫苗的商品化与具体应用仍需加以重视,以确保疫苗使用过程的高效性及安全性。未来基因工程疫苗面临的重要任务是如何改进工艺、降低生产成本、提高免疫效率等。

综合全球对兽用基因工程疫苗的研究情况来看,我国的研究具有相对良好的基础,但仍需积极研究开发疫苗载体的新系统,加强对新型疫苗的应用,完善疫病防御体系,以保障畜牧业健康发展。

#### 参考文献:

- [1] 李晨.我国自主研发布鲁氏菌基因缺失活疫苗上市[N].中国科学报,2022-06-06(003).
- [2] 齐毅.副猪嗜血杆菌 nanH 和 lsgB 基因缺失株的免疫保护力和毒力研究[D].武汉:华中农业大学,2019.
- [3] SU S, CUI N, ZHOU Y, et al. A recombinant field strain of Marek's disease (MD) virus with reticuloendotheliosis virus long terminal repeat insert lacking the meq gene as a vaccine against MD[J]. Vaccine, 2015, 33(5): 596-603.
- [4] SAINI S, GHOSH A K, DAS S, et al. Reduced pathogenicity of fructose-1,6-bisphosphatase deficient *Leishmania donovani* and its use as an attenuated strain to induce protective immunogenicity[J]. Vaccine, 2018, 36(9): 1190-1202.
- [5] 蔡雅霜, 张志刚, 王鑫.利什曼病疫苗的研究现状[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2017, 35(5): 499-502, 508.
- [6] MURPHY S C, VAUGHAN A M, KUBLIN J G, et al. A genetically engineered *Plasmodium falciparum* parasite vaccine provides protection from controlled human malaria infection[J]. Sci Transl Med, 2022, 14(659): eabn9709.
- [7] DONG J, BAI J, SUN T, et al. Comparative pathogenicity and immunogenicity of triple and double gene-deletion Pseudorabies virus vaccine candidates[J]. Res Vet Sci, 2017, 115: 17-23.
- [8] CHEN W, ZHAO D, HE X, et al. A seven-gene-deleted African swine fever virus is safe and effective as a live attenuated vaccine in pigs[J]. Sci China Life Sci, 2020, 63(5): 623-634.
- [9] PERRIE Y, MOHAMMED A R, KIRBY D J, et al. Vaccine adjuvant systems: enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens[J]. Int J Pharm, 2008, 364(2): 272-280.



- [10] SANDERS H ,FEAVERS I M.Adjuvant properties of meningococcal outer membrane vesicles and the use of adjuvants in *Neisseria meningitidis* protein vaccines [J].Expert Rev Vaccines ,2011 ,10 ( 3) : 323-334.
- [11] LIU Q ,TAN K ,YUAN J ,et al.Flagellin-deficient outer membrane vesicles as adjuvant induce cross - protection of *Salmonella Typhimurium* outer membrane proteins against infection by heterologous *Salmonella* serotypes [J].Int J Med Microbiol ,2018 , 308( 7) : 796-802.
- [12] LI Q ,REN J ,XIAN H ,et al.rOmpF and OMVs as efficient subunit vaccines against *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* infections in poultry farms [J].Vaccine 2020 ,38( 45) : 7094-7099.
- [13] LO Y T ,TULLOCH F ,WU H C ,et al.Expression and immunogenicity of secreted forms of bovine Ephemeral fever virus glycoproteins applied to subunit vaccine development [J].J Appl Microbiol 2021 , 131( 3) : 1123-1135.
- [14] RAPPUOLI R.Reverse vaccinology [J].Curr Opin Microbiol 2000 , 3( 5) : 445-450.
- [15] BARUAH V ,BOSE S.Immunoinformatics-aided identification of T cell and B cell epitopes in the surface glycoprotein of 2019-nCoV [J].J Med Virol 2020 ,92( 5) : 495-500.
- [16] KALITA P ,LYNGDOH D L ,PADHI A K ,et al.Development of multi - epitope driven subunit vaccine against *Fasciola gigantica* using immunoinformatics approach [J].Int J Biol Macromol ,2019 , 138: 224-233.
- [17] GERSHWIN L J ,BEHRENS N E ,MCELIGOT H A ,et al. A recombinant subunit vaccine for bovine RSV and *Histophilus somni* protects calves against dual pathogen challenge [J].Vaccine ,2017 , 35( 15) : 1954-1963.
- [18] KHALAJ-HEDAYATI A ,CHUA C L L ,SMOOKER P ,et al. Nanoparticles in influenza subunit vaccine development: immunogenicity enhancement [J].Influenza Other Respir Viruses , 2020 ,14( 1) : 92-101.
- [19] ZHAO L ,YANG J ,NAHAR U J ,et al. A dual-adjuvanting strategy for peptide-based subunit vaccines against group A *Streptococcus*: lipidation and polyelectrolyte complexes [J].Bioorg Med Chem , 2020 ,28( 24) : 115823.
- [20] CORRADIN G ,VILLARD V ,KAJAVA A V.Protein structure based strategies for antigen discovery and vaccine development against malaria and other pathogens [J].Endocr Metab Immune Disord Drug Targets 2007 ,7( 4) : 259-265.
- [21] ZHAO X ,LONG J ,LIANG F ,et al.Different protective efficacies of a novel antigen - specific DNA vaccine encoding chicken type II collagen via intramuscular , subcutaneous , and intravenous vaccination against experimental rheumatoid arthritis [J].Biomed Pharmacother 2021 ,144: 112294.
- [22] JIANG J ,RAMOS S J ,BANGALORE P ,et al. Integration of needle-free jet injection with advanced electroporation delivery enhances the magnitude , kinetics , and persistence of engineered DNA vaccine induced immune responses [J]. Vaccine ,2019 ,37( 29) : 3832-3839.
- [23] CHANG C ,SUN J ,HAYASHI H ,et al. Stable immune response induced by intradermal DNA vaccination by a novel needleless pyro-drive jet injector [J].AAPS PharmSciTech 2019 ,21( 1) : 19.
- [24] KARLSSON I ,BORGREN M ,ROSENSTIERNE M W ,et al. Protective effect of a polyvalent influenza DNA vaccine in pigs [J]. Vet Immunol Immunopathol 2018 ,195: 25-32.
- [25] IMAI T. Single amino acid deletion at N-terminus of the target antigen in DNA vaccine induces altered CD8<sup>+</sup> T cell responses against tumor antigen [J].Vaccines ( Basel) 2021 ,9( 6) : 540.
- [26] SUN C ,XU S.Advances in personalized neoantigen vaccines for cancer immunotherapy [J].Biosci Trends ,2020 ,14( 5) : 349-353.
- [27] YANG X ,FAN J ,WU Y ,et al.Synthetic multi-epitope neoantigen DNA vaccine for personalized cancer immunotherapy [J]. Nanomedicine 2021 ,37: 102443.
- [28] PRANDINI F ,SIMON B ,JUNG A ,et al.Comparison of infectious bursal disease live vaccines and a HVT-IBD vector vaccine and their effects on the immune system of commercial layer pullets [J].Avian Pathol 2016 ,45( 1) : 114-125.
- [29] SHARMA P K ,DMITRIEV I P ,KASHENTSEVA E A ,et al. Development of an adenovirus vector vaccine platform for targeting dendritic cells [J].Cancer Gene Ther 2018 ,25( 1/2) : 27-38.
- [30] ZHANG W ,FU J ,LIU J ,et al. An engineered virus library as a resource for the spectrum - wide exploration of virus and vector diversity [J].Cell Rep 2017 ,19( 8) : 1698-1709.
- [31] SHIRLEY J L ,DE JONG Y P ,TERHORST C ,et al. Immune responses to viral gene therapy vectors [J].Mol Ther 2020 ,28( 3) : 709-722.
- [32] LI Z ,ZAISER S A ,SHANG P ,et al. A chimeric influenza hemagglutinin delivered by parainfluenza virus 5 vector induces broadly protective immunity against genetically divergent Influenza A H1 viruses in swine [J].Vet Microbiol 2020 ,250: 108859.
- [33] COTTINGHAM E ,JOHNSTONE T ,HARTLEY C A ,et al. Use of feline Herpesvirus as a vaccine vector offers alternative applications for feline health [J].Vet Microbiol 2021 ,261: 109210.
- [34] MANOHARAN V K ,KHATTAR S K ,LABRANCHE C C ,et al. Modified Newcastle disease virus as an improved vaccine vector against simian Immunodeficiency virus [J].Sci Rep 2018 ,8( 1) : 8952.
- [35] MAHDY S E ,LIU S ,SU L ,et al. Expression of the VP1 protein of FMDV integrated chromosomally with mutant *Listeria monocytogenes* strain induced both humoral and cellular immune responses [J].Appl Microbiol Biotechnol 2019 ,103( 4) : 1919-1929.
- [36] MUSSER M L ,BERGER E P ,TRIPP C D ,et al. Safety evaluation of the canine osteosarcoma vaccine , live *Listeria* vector [J].Vet Comp Oncol 2021 ,19( 1) : 92-98.
- [37] LEVINE M M ,GALEN J ,BARRY E ,et al. Attenuated *Salmonella* as live oral vaccines against typhoid fever and as live vectors [J].J Biotechnol ,1996 ,44( 1/2/3) : 193-196.
- [38] FIGUEIRA R ,WATSON K G ,HOLDEN D W ,et al. Identification of salmonella pathogenicity island-2 type III secretion system effectors involved in intramacrophage replication of *S. enterica* serovar typhimurium: implications for rational vaccine design [J].mBio , 2013 ,4( 2) : e00065.
- [39] WANG N ,WANG J Y ,PAN T X ,et al. Oral vaccination with attenuated *Salmonella* encoding the Trichinella spiralis 43 - kDa protein elicits protective immunity in BALB/c mice [J].Acta Trop , 2021 ,222: 106071.
- [40] KOKO I ,SONG A A ,MASARUDIN M J ,et al. Engineering integrative vectors based on phage site - specific recombination mechanism for *Lactococcus lactis* [J]. BMC Biotechnol ,2019 ,19 ( 1) : 82.
- [41] XIN Y ,MU Y ,KONG J ,et al. Targeted and repetitive chromosomal integration enables high - level heterologous gene expression in *Lactobacillus casei* [J]. Appl Environ Microbiol ,2019 ,85 ( 9) : e00033-19.



# 植物源药物防治水产动物纤毛虫病的研究进展

黄璐熹, 明成玥, 玉洁莹, 李毅豪, 叶仕根\*

(大连海洋大学 农业农村部北方海水增养殖重点实验室/大连市海珍品疾病防控  
重点实验室 辽宁 大连 116023)

中图分类号: S816.75; S941.51<sup>+</sup>4

文献标识码: A

文章编号: 1004-7034(2023)17-0049-06

**摘要:** 水产动物纤毛虫病具有传染性强、死亡率高等特点,对我国水产业造成了严重的经济损失。植物源药物具有成本低、易降解、毒副作用小、资源丰富等优势,越来越多地被应用于水产动物纤毛虫病防治工作中。文章从植物源药物抗水产动物纤毛虫病的应用、有效组分和作用机制等方面进行综述,并展望了植物源药物在水产动物纤毛虫病防治中的应用前景和发展趋势,以期能为植物源药物的相关工作提供参考。

**关键词:** 植物源药物; 水产动物; 纤毛虫; 活性组分; 作用机制

近年来,我国水产养殖业发展迅速,但水环境的不断恶化导致水产病害日益增多。据不完全统计,2019年全国30个省内监测到的水产病害共有152种,造成水产业经济损失近200亿元,约占我国2019年淡水养殖总产值的3.2%<sup>[1]</sup>。由原生动物纤毛虫(*Ciliate*)引起的感染性疾病具有传染性强、死亡率高等特点,对我国水产业造成了严重的经济损失,已成为水产养殖业目前面临的重要问题。化学药物治疗容易导致药物残留及环境污染等严重后果<sup>[2]</sup>,而植物源药物由于具有成本低、易降解、不易残留、对鱼体不良反应小、不易产生抗药性等优势,逐渐成为化学药物的良好替代品。近年来,越来越多的植物源药物被广泛应用于水产动物纤毛虫病防治的研究中<sup>[3]</sup>。本文从植物源药物抗水产动物纤毛虫病的应用、活性组分及作用机制等几方面进行了综述,并展

望了植物源药物在水产动物纤毛虫病防治中的应用前景和发展趋势,以期能为新型植物源纤毛虫病治疗剂的开发提供参考。

## 1 植物源药物抗水产动物纤毛虫的作用

### 1.1 植物源药物抗专性寄生纤毛虫的作用

专性寄生纤毛虫可利用纤毛刮取并摄食宿主细胞和组织,破坏宿主组织完整性,影响其正常生理活动,可寄生于宿主的体表、鳍、眼及鳃等组织器官表面,如多子小瓜虫(*Ichthyophthirius multifiliis*)和刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)等<sup>[4]</sup>,严重威胁鱼类养殖产业的健康发展。

研究发现,厚朴<sup>[5]</sup>、苦豆子<sup>[5]</sup>、姜黄<sup>[6-7]</sup>、小米椒<sup>[8]</sup>、补骨脂<sup>[7,9]</sup>、白桑树皮<sup>[10]</sup>、菊蒿<sup>[11]</sup>、白首乌<sup>[7]</sup>、苦参<sup>[5,7,12-13]</sup>、生姜<sup>[7,14]</sup>及大蒜<sup>[14]</sup>等植物源药物具有抗小瓜虫或刺激隐核虫活性。在体外研究中,Liu Y. M.等<sup>[6]</sup>研究结果表明,从姜黄中提取到的多酚化合物姜黄素浓度为1 mg/L时可在(21.7±1.2) min内使小瓜虫掠食体全部死亡,浓度为8 mg/L时可在(31.0±1.0) min内杀灭所有包囊,并且用0.125 mg/L的姜黄素预处理2 h可显著降低掠食体的传染性。

收稿日期: 2022-11-16; 修回日期: 2023-06-02

作者简介: 黄璐熹(1999—),女,硕士研究生,研究方向为水产养殖, h\_maroma@163.com.

\* 通信作者: 叶仕根(1976—),男,副教授,博士,研究方向为水产动物疫病诊断与无公害防控, shgye@vip.163.com.

## Applications of genetic vaccine in veterinary field

WANG Yu, WANG Zhen\*

(Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Veterinary Medicine, Animal Science and Technology  
College, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

**Abstract:** Engineering vaccine uses DNA recombination technology to insert the protective antigen coding gene fragment of pathogen into vector or expression system, so that it can be efficiently expressed and made into vaccine, which mainly include subunit vaccine, recombinant live vector vaccine, gene deletion vaccine and nucleic acid vaccine. Compared with traditional vaccines, engineering vaccine can continuously stimulate the immune system to produce long-term immunity, avoid immune evasion caused by pathogen variation. One plasmid vector can clone multiple antigen genes to form multivalent vaccine, which improves the efficiency and effect of disease control, and is easy to store and transport. It is one of the main development and research directions in the future. This paper mainly discusses the research situation and development trend of engineering vaccine in veterinary field, aiming to provide some reference for the corresponding research and practice.

**Keywords:** genetic engineering vaccine; immune response; immunoprotection; animal disease; prevention and control

(020)