

人用狂犬病疫苗研究进展

蔡黎^① 朱政纲^① 文丽^① 陈剑^①

摘要 狂犬病在全球广泛分布,对大众的生命健康造成严重的危害。目前,暴露后处置是预防狂犬病发生的最有效方法。细胞培养的狂犬疫苗目前仍是人类抵御狂犬病病毒的主要手段。随着生物技术的不断发展,新型疫苗的研制也取得了显著成效。

关键词 狂犬病疫苗; 免疫机制; 疫苗类型; 新型疫苗

中图分类号: R979.5 文献标识码: A 文章编号: 1005-0698(2017)12-0841-04

Advances on Rabies Vaccines

Cai Li, Zhu Zhenggang, Wen Li, Chen Jian

Wuhan Centers for Disease Control and Prevention, Wuhan 430015, China

ABSTRACT Rabies was widely distributed around the world, causing serious harm to the life and health of the public. At present, post-exposure treatment is the most effective method to prevent rabies. With the development of biotechnology, the development of new vaccines have achieved remarkable effect.

KEY WORDS Rabies; Mechanism immunity; Type of vaccine; New vaccine

狂犬病是攻击中枢神经系统的急性进行性动物源性传染病。狂犬病的传播发生在动物咬伤过程中,人类由于偶然接触感染的动物而被侵袭^[1,2]。从全球范围来看,家养犬依然是主要的狂犬病病毒(rabies virus, RABV)贮存宿主和人类狂犬病的传染来源^[3]。RABV 主要通过破损的皮肤或黏膜侵入人体,一旦发病,病死率几乎达 100%。全球范围内每年因狂犬病导致的死亡超过 55 000 例^[3,4]。我国狂犬病死亡数居全球第二,近年来每年统计到的死亡人数超过 3 000 例,95% 以上由犬咬伤引起。暴露后处置(PEP)主要包括狂犬病疫苗和狂犬病免疫球蛋白(HRIG)的应用,是暴露后预防狂犬病发生的唯一有效手段^[5]。

1 狂犬病疫苗基本概述

1.1 免疫机制

狂犬病病原体属于弹状病毒科(Rhabdoviridae)、狂犬病病毒属(Lyssavirus)。病毒颗粒由 2 个结构和功能单位组成:外壳上覆盖有 G 蛋白三聚体组成的棘状突起,可识别易感细胞膜上特定的病毒受体;核壳体(ribonucleocapsid)螺旋状排列,由基因组 RNA 与 N、L 及 P 密切相联组成。核壳体确保基因组在胞质中的转录和复制。蛋白 M 占据核壳体和外壳之间的位置,决定了病毒出芽及其子弹状外

形^[6,7]。在 20 世纪 50 年代以前,一直认为 RABV 是单一的。此后通过对来自尼日利亚的与 RABV 有血清学相关性的病毒即拉哥斯蝙蝠病毒(Lagos bat virus, LBV)和莫科拉病毒(Mokola virus, MOKV)的鉴定,发现了 RABV 群的多样性与复杂性,至此狂犬病相关病毒和狂犬病血清型的术语应运而生^[3]。

人体接种狂犬病疫苗后,狂犬病病毒糖蛋白等保护性抗原刺激机体产生体液反应,生成与各蛋白对应的抗体。这些抗体可以预防 RABV 在细胞间直接传播,降低其增殖量,还可以清除游离的 RABV,防止病毒传播蔓延,以保护机体预防狂犬病。

1.2 疫苗类型

狂犬病疫苗的发展经历了 3 个阶段:传统的动物神经组织疫苗、禽胚疫苗、细胞培养粗制疫苗,改良和创新的细胞纯化疫苗,目前利用现代生物技术继续研发的新型疫苗。

2 传统疫苗

法国 Pasteur 于 1882 年开始研制狂犬病疫苗,用连续传代的方法减弱病毒的毒力,以适应制备疫苗^[8,9]。1885 年 7 月 6 日, Pasteur 对 1 例被疯狗严重咬伤(距咬伤 60 h)的 9 岁男孩进行了连续 13 次、毒力逐渐增加的 PEP,并成功预防了狂犬病,这是狂犬病疫苗首次用于人体并获得成功,为人类征

^①武汉市疾病预防控制中心(武汉 430015)。

服狂犬病开创了免疫预防意义上的新时代。Pasteur 创立的街毒与固定毒理论,其减毒的狂犬病固定毒株衍生了多种疫苗株,到目前依然被奉为经典^[10]。此后,许多国家对狂犬病疫苗的研究依然遵循着 Pasteur 确定的原则与方向不断地完善、推陈出新。

2.1 Hoegyes 减毒活疫苗

1887 年匈牙利 Hoegyes 将固定毒以稀释法降低毒力研制出减毒活疫苗^[11],这一方法曾在一些国家广泛使用,并证明效果良好。

2.2 Semple 疫苗

1911 年 Semple 将感染固定毒的羊脑组织悬液于 37℃ 用酚固定、灭活,制备了无毒性的 Semple 疫苗^[12]。该疫苗为完全无感染性活病毒,只用作暴露后注射,主要在非洲和亚洲使用。由于用羊脑研制的疫苗接种后人体异常反应严重,且接种剂次数一般高达 14 次,到 20 世纪 70 年代末细胞培养疫苗逐渐取代之。

2.3 新生鼠脑疫苗(SMBV)

为了减少神经性麻痹的异常反应,1955 年智利学者对出生 3~5 d 的新生鼠,脑内接种 RABV,接种后收脑悬液制备新生鼠脑疫苗(SMBV)。前苏联于 20 世纪 60 年代成功制备乳大白鼠脑疫苗,但 1960 年在委内瑞拉发生 11 例与 SMBV 疫苗相关的神经系统并发症,提示 SMBV 疫苗的不良反应发生率较高^[13]。

3 细胞疫苗

因上述神经组织疫苗、禽胚疫苗接种反应大、免疫效果不佳,20 世纪 60 年代后,研究者开始尝试使用组织培养和细胞培养技术来研发狂犬病疫苗,目的是为了提高狂犬病疫苗的效果、优化免疫程序和降低异常反应发生率,目前世界上技术完善的并且广泛应用的疫苗主要包括:人二倍体细胞疫苗(human diploid cell rabies vaccine, HDCV)、原代地鼠肾细胞疫苗(primary hamster kidney cell rabies vaccine, PHKCV)、纯化鸡胚细胞疫苗(purified chick embryo cell rabies vaccine, PCECV)和纯化 Vero 细胞狂犬病疫苗(purified vero cell rabies vaccine, PVRV)等。

3.1 人二倍体细胞疫苗(HDCV)

HDCV 于 20 世纪 60 年代早期由美国 Wistar 研究所创始,其用人二倍体细胞 WI-38 株适应传代培养病毒研制疫苗,法国 Merieux 研究所用 MRC-5 人二倍体细胞培养病毒生产疫苗^[11],并于 1974 年首次获准生产,1978 年开始商品化。1980 年 6 月,

HDCV 在美国获得批准上市。Winkler 总结了在美国进行的为期 5 年的临床研究结果,疫苗预防狂犬病均获成功。85% 的 HDCV 用于暴露前免疫和维持抗体的加强免疫,15% 用于暴露后免疫。世界范围内超过 150 万人进行了 HDCV 免疫接种。HDCV 安全有效,不良反应轻,注射针次少,被公认为“近乎理想的人用疫苗”,常作为某种新发疫苗的标准对照疫苗^[14]。但是, HDCV 制备较困难,成本高、产苗量低,价格昂贵,难以在发展中国家广泛使用^[15]。目前主要由法国、德国生产,主要在美国、欧洲等发达国家使用。

3.2 原代地鼠肾细胞疫苗(PHKCV)

用地鼠肾细胞组织培养 RABV 制备灭活疫苗由加拿大 Kissling 于 1958 年首先提出^[16],1966 年前苏联用第 33 代地鼠肾细胞培养 Vnukovo-32 株制备 PHKCV,在前苏联和东欧的大部分国家使用量较大,1968 年 PHKCV 在加拿大被批准用于暴露前和加强免疫。经大量临床试验研究和人群接种后免疫原性、安全性观察,发现 PHKCV 对接种人群安全、有效^[17]。

3.3 纯化鸡胚细胞疫苗(PCECV)

1965 年日本学者 Konda 使用 Flary-HEP 株病毒适应在鸡胚细胞培养,采集病毒悬液,经灭活、浓缩、冻干等研制成灭活疫苗并于 1980 年日本当局批准给市场供应。1983 年,德国 Behring 研究所的 Barth 等将 Flary-HEP 株接种原代鸡胚成纤维细胞研制成功,德国于 1985 年批准 PCECV 广泛运用于临床。在美国、德国、印度等国,研究者对 PCECV 进行了大量的临床试验。如印度使用 PCECV 已经超过 10 年,疫苗的耐受性良好;其中在 1 375 名使用者中仅 4% 出现疑似预防接种异常反应。PCECV 的免疫原性良好,暴露后预防的抗体几何平均滴度(GMT)约为 4 IU,只有 0.9% 的研究对象的 GMT 低于 1 IU^[18]。PCECV 免疫后获得良好的中和抗体应答,不良反应较轻微,免疫效果、安全性均较好,效果可与 HDCV 相媲美^[19,20]。

3.4 纯化 Vero 细胞狂犬病疫苗(PVRV)

20 世纪 80 年代,法国 Merieux 研究所用 Vero 细胞贴附在微载体悬浮培养技术批量培养,成功研制 PVRV。微载体技术生产 PVRV,可短时间大规模生产、疫苗产量高、价格相对 HDCV 低廉,且培养的 RABV 滴度高、免疫原性好、安全性也较高,用于暴露后免疫接种的保护效果显著^[21~23],在全世界的范围大面积使用。研究结果显示,接种 PVRV(35 例)

与 PHKCV(46 例) 两种疫苗初免后 7 d 抗体阳转率分别为 58.52% 和 65.22%, 无显著差异, 初免后 14d 的抗体阳转率均为 100%^[24]。WHO 推荐使用 Vero 细胞大量生产狂犬病疫苗。

4 新型疫苗

随着现代生物技术的发展, 狂犬病在分子生物学、分子病毒学、疫苗学上取得了很大的成绩, 研究人员开始利用现代生物技术研发更经济、安全、有效的新型狂犬病疫苗, 涉及的疫苗种类呈多样化^[22], 而研究得较早较多的是重组疫苗、DNA(Deoxyribonucleic acid) 疫苗、亚单位疫苗和多肽疫苗等。

4.1 重组疫苗

重组疫苗是目前认为最有巨大开发前景的动物疫苗, 是借助无病原性或弱毒疫苗株作为活载体, 应用 DNA 重组技术, 对 RABV 的基因进行重组和表达获得重组病毒株, 用于研制疫苗。国内外都在致力于重组疫苗的研究, 痘病毒载体疫苗于 1984 年就开始研制, 即将 RABV 糖蛋白重组到弱毒的痘病毒株中获得表达, 含有狂犬病毒糖蛋白的金丝雀痘病毒载体疫苗目前被证实可用于人类接种^[5]; 腺病毒载体疫苗较痘病毒载体疫苗更安全和稳定, 1990 年开始研究将 RABV 糖蛋白插入腺病毒得到重组腺病毒, 经在动物中口服可诱导较高水平的抗体^[12]。重组疫苗不仅可激发高滴度抗体水平, 且在各毒株间有交叉保护作用, 但当前大多数仍处于动物试验阶段, 仍未付诸临床应用。

4.2 DNA 疫苗

1994 年, Wistar 研究所的 Xiang 等^[25]将狂犬病病毒 G 蛋白插入到质粒 DNA 中, 构建成真核表达质粒直接给小鼠肌肉注射, 产生了抗狂犬病病毒中和抗体、抗 G 蛋白特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL) 和分泌淋巴因子的 Th 细胞, 免疫后的小鼠用 RABV 攻击均能抵抗。我国扈荣良等^[26]、李萍等^[27]也有不同质粒的相关研究。

DNA 疫苗虽然拥有成本低, 便于制备, 对热稳定, 保存方便, 接种量少等优势, 但其外源目的基因不能表达出足够量的免疫原, 且 DNA 疫苗的安全性问题有待进一步观察。

4.3 亚单位疫苗

亚单位疫苗只含有所需免疫原性, 是更安全的狂犬病疫苗。RABV 主要是糖蛋白诱导机体产生免疫作用, 因此亚单位疫苗是从全病毒中提取糖蛋白来制备^[28]。基因工程亚单位狂犬病疫苗, 将保护性

抗原基因在原核或真核细胞中表达, 形成基因产物—蛋白质或多肽免疫体, 可诱导动物对 RABV 的免疫。但亚单位疫苗免疫效果较差。

4.4 多肽疫苗

1982 年 Dietzschold 等^[29]采用化学裂解法将 RABV 糖蛋白裂解成 7 个大小不等的多肽片段, 其中 3 个片段可诱导产生中和抗体, 因此认为这些多肽片段可能存在诱导 RABV 中和抗体的抗原决定簇, 在体外可激活 T 淋巴细胞。狂犬病合成肽疫苗是由狂犬病病毒 T 细胞免疫多肽抗原组成, 在人体内多次免疫不会产生高水平抗体, 但一旦病毒攻击机体就能产生免疫效果和免疫保护作用。多肽疫苗不良反应较小, 目前处于动物实验阶段。

5 我国人用狂犬病疫苗的历史和现状

1980 年以前, 我国一直生产和使用羊脑制备的经石炭酸灭活的脑组织狂犬病疫苗。但是自 1965 年, 我国就已开始了原代地鼠肾细胞培养的原液灭活疫苗的研制, 并于 1980 年获生产许可证书, 同时停止使用羊脑组织疫苗。20 世纪 90 年代以来, 中国已经开发或引进 Vero 细胞为基质的纯化狂犬病疫苗并大量运用于临床, 2014 年国产人二倍体细胞疫苗也批准上市, 疫苗种类与数量不断增加。研究发现国产和进口狂犬病疫苗免疫效果在抗体阳转率、血清抗体水平以及接种后异常反应等方面的差异均无统计学意义, 说明国产疫苗在主要质量指标上与国外同类产品无明显差异^[30-33]。此外, 我国在新型狂犬病疫苗研制方面不断取得突破。

6 总结展望

综上所述, 人用狂犬病疫苗发展经历神经组织疫苗到各种细胞培养疫苗的过程, 并向经济、安全、有效的新型疫苗如基因工程疫苗、DNA 疫苗等发展^[5]。这些新型疫苗对提高免疫原性, 保护人类健康带来了新的希望。但与纯化细胞疫苗相比, 目前大部分优势不明显。个别重组疫苗已应用于野生动物, 但目前在人体的研究进展尚不明确, 其安全性和有效性尚有待研究。不过, 随着科学技术的进步, 人类终将研制出更加安全、有效、经济的疫苗以保护促进人类健康。

参 考 文 献

- 1 俞永新. 狂犬病和狂犬病疫苗[M]. 第 2 版. 北京: 中国医药科技出版社, 2009: 189-300

- 2 陶炳根, 马福宝. 疫苗的应用与发展[M]. 北京: 人民军医出版社, 2009: 417-434
- 3 World Health Organization. WHO Expert Consultation on Rabies. Second report[J]. World Health Organ Tech Rep Ser, 2013(982): 1-139
- 4 路明霞. 世界卫生组织关于狂犬病疫苗的意见书[J]. 中国疫苗和免疫, 2008, 14(2): 187-188
- 5 周航, 李昱, 陈瑞丰. 狂犬病预防控制技术指南(2016版)[J]. 中华流行病学杂志, 2016, 37(2): 139-163
- 6 Jackson A. In Rabies [M]. 3rd ed. London: Elsevier Science, 2013: 3-10
- 7 Morimoto K, Patel M, Corisdeo S, et al. Characterization of a unique variant of bat rabies virus responsible for newly emerging human cases in North America [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(11): 5653-5658
- 8 张斌, 陈进喜, 唐海燕. 狂犬病的免疫防制研究进展[J]. 现代农业科技, 2013(14): 258-259
- 9 王海燕, 邵荣标, 沈进进, 等. 狂犬病疫苗细胞免疫作用研究[J]. 南通大学学报(医学版), 2006, 26(1): 28-30
- 10 杨正时, 房海. 巴斯德开启预防医学的大门——纪念路易斯·巴斯德发明狂犬病疫苗 130 周年[J]. 河北科技师范学院学报, 2015, 29(4): 1-8
- 11 吕元聪, 谭春梅. 狂犬疫苗的发展现状[J]. 右江医学, 2009, 37(6): 734-736
- 12 王根龙, 成建忠. 论狂犬疫苗的研究进展[J]. 现代农业科技, 2009(5): 223-224
- 13 Meslin FX, Kaplon MM, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies 4th ed [R]. WHO. Geneva, 1996: 223-313, 401-416
- 14 严有望. 组织培养狂犬病疫苗研究近况[J]. 预防医学情报杂志, 1988, 4(1): 24
- 15 Vodopija I, 徐冰. 当前人类狂犬病免疫接种问题[J]. 国外医学: 预防、诊断、治疗用生物制品分册, 1989(4): 151-154
- 16 林放涛, 于恩庶. 狂犬病学[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1992: 218-220
- 17 Lin FT, Zeng FZ, Lu LM, et al. The primary hamster kidney cell rabies vaccine: adaption of virus strain, production of vaccine, and post exposure treatment [J]. J Infect Dis, 1983, 147(3): 467-473
- 18 Chen RF, Huang LS, Zheng JB, et al. Emergency treatment on facial laceration of dog bite wounds with immediate primary closure: a prospective randomized trial study [J]. BMC Emergency Medicine, 2013, 13(Suppl 1): 1-5
- 19 胡锦涛, 孙晖, 武道珍, 等. 精制狂犬疫苗与浓缩狂犬疫苗免疫效果与安全性配比分析[J]. 疾病监测, 2002(11): 434-436
- 20 Malerczyk C, Briggs DJ, Dreesen DW, et al. Duration of immunity: an anamnestic response 14 years after rabies vaccination with purified chick embryo cell rabies vaccine [J]. J Travel Med, 2007, 14(1): 63-64
- 21 杨裕华, 王际萃, 黄捷通. 狂犬病的分型、毒株及其免疫制剂的研究进展[J]. 中国人兽共患病杂志, 1994, 10(4): 35-37
- 22 李平忠, 沈伟, 余芬, 等. 用微载体培养 Vero 细胞制备狂犬疫苗[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(23): 2374-2376
- 23 李宏玲, 李河民, 俞永新, 等. 狂犬病毒在 Vero 细胞上的传代适应[J]. 中国生物制品学杂志, 1989, 2(1): 22-25
- 24 赵德峰, 徐葛林, 郑新雄, 等. 两种无佐剂国产狂犬病疫苗的免疫效果观察[J]. 公共卫生与预防医学, 2007, 18(3): 36-37
- 25 Xiang ZQ, Spitalnik S, Tran M, et al. Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus [J]. Virology, 1994, 199(1): 132-140
- 26 扈荣良, 杜坚, 涂长春, 等. 肌注狂犬病病毒糖蛋白 cDNA 表达质粒诱导小鼠体液免疫反应[J]. 中国兽医学报, 1996, 14(4): 32-326
- 27 李萍, 朱家鸿, 严家新, 等. 狂犬病毒糖蛋白及核蛋白在非复制型痘苗病毒天坛株中的共同表达[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2000, 20(5): 481-484
- 28 王三虎, 袁慧君. 狂犬病病毒新型疫苗研究进展[J]. 河南畜牧兽医, 2004, 25(11): 9-10
- 29 Dietzschold B, Wang H, Rapprecht CE, et al. Induction of protective immunity against rabies by immunization with rabies virus ribonucleo protein [J]. Proc Natl Acad Sci, 1987, 84(24): 9165-9169
- 30 刘东霞. 国产纯化狂犬疫苗免疫效果观察[J]. 中国实用医药, 2007, 2(19): 88-89
- 31 廖玉宜, 张吉凯, 游志毅, 等. 国产纯化 Vero 细胞狂犬病疫苗的发展现状[J]. 中国疫苗和免疫, 2015(5): 580-588
- 32 梁毅航. 不同狂犬疫苗的应用效果研究[J]. 中国热带医学, 2004, 4(5): 720-726
- 33 耿艺介, 汪武新, 谢远辉, 等. 国产和进口人用纯化 Vero 狂犬疫苗的免疫效果研究[J]. 中国热带医学, 2005, 5(6): 1168-1170

(2017-07-03 收稿 2017-08-22 修回)

[通讯作者] 蔡黎, Tel: 13971220019, E-mail: 84799760@qq.com