

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*

马建^{1, 2)} 姜成刚¹⁾ 林跃智¹⁾ 郭亮^{1, 2)} 郭巍¹⁾ 孔宪刚¹⁾
沈荣显¹⁾ 邵一鸣³⁾ 张晓燕³⁾ 周建华^{1)**}

(¹⁾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 150001;

²⁾东北林业大学野生动物资源学院, 哈尔滨 150040; ³⁾中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心, 北京 100050)

摘要 为了研究马传染性贫血弱毒疫苗 EIAV_{FDDV} 在体内的生物学特性, 特别是在免疫马血浆中低拷贝存在状态的形成原因, 使用连续给予地塞米松的方法, 对 EIAV_{FDDV} 免疫马匹进行了免疫功能抑制. 连续给药 10 天后, 以植物血凝素(PHA)作为刺激原的淋巴细胞非特异性增殖实验表明, 实验马匹的免疫系统功能受到了明显抑制. 使用实时 RT-PCR 对免疫抑制前后实验马匹体内 EIAV_{FDDV} 的载量进行了定量检测. 结果显示, EIAV_{FDDV} 免疫马匹体内的病毒载量在 2 匹马中未见升高, 1 匹马体内略有增高, 但仍处于 EIAV_{FDDV} 在免疫马匹体内载量的正常范围. 作为对照, 强毒株隐性携带马的病毒载量提高了约 25 000 倍, 并出现了典型的临床症状. 实验结果提示, 致弱后病毒特有的生物学特性, 而非免疫压力, 是 EIAV 疫苗株在宿主血浆中低拷贝存在的主要原因. 同时, 在免疫系统功能受抑制状态下, 疫苗株在免疫马体内仍然表现出了相对稳定的低拷贝复制状态, 进一步显示了 EIAV_{FDDV} 在应用中的安全性.

关键词 EIAV_{FDDV}, 减毒疫苗, 免疫抑制, 淋巴细胞增殖实验, 病毒载量

学科分类号 S852.65+2, S852.4

20 世纪 70 年代, Shen 等通过独特的马传染性贫血病毒(equine infectious anemia virus, EIAV)强毒致弱路线, 获得了可诱导马匹产生良好免疫保护的 EIAV 弱毒疫苗, 包括在驴白细胞(donkey leukocyte, DL)上连续传代得到的驴白细胞弱毒疫苗(EIAV_{DLV})和 EIAV_{DLV} 经驴胎皮肤细胞(fetal donkey dermal cells, FDD)连续传代得到的驴胎皮细胞弱毒疫苗(EIAV_{FDDV})^[1~4]. 实验室和现地使用证明, 获得的这些弱毒疫苗可以诱导免疫马匹产生较强的抵抗同源和异源 EIAV 致病力毒株攻击的能力, 其中 EIAV_{FDDV} 诱导的免疫保护水平要略高于 EIAV_{DLV}^[2, 4]. 马传贫弱毒疫苗作为唯一成功大规模应用的可诱导慢病毒免疫保护的疫苗, 其理论和实际意义重大. 探讨 EIAV 疫苗株致弱和诱导免疫保护的机制, 将对慢病毒免疫机理研究和制定疫苗研制策略提供有益的参考.

已有监测数据表明, 免疫马血浆中 EIAV_{DLV} 和 EIAV_{FDDV} 的载量主要在 $10^2 \sim 10^5$ 拷贝/ml 范围变化(马建等, 数据未发表), 明显低于 EIAV 强毒感染

发病马血浆中病毒载量大于 10^7 拷贝/ml^[5] 的阈值水平. 疫苗毒株这一存在状态的形成原因并不清楚. 有两种可能的机制, 一是疫苗弱毒株在病毒生物学特征上, 丧失了亲本强毒株在宿主动物体内较强的复制能力, 二是疫苗弱毒株可较快地诱导免疫马匹产生较高水平的特异性免疫应答, 该免疫应答通过抑制疫苗弱毒株在马体内的复制, 在疫苗弱毒株低拷贝存在状态形成中起作用. 为了确定哪一种机制可能起主要作用, 并进一步了解 EIAV 疫苗株的基本生物学特性, 本实验对 EIAV_{FDDV} 免疫马匹的免疫系统功能进行了抑制, 并对抑制前后马体内血浆中 EIAV_{FDDV} 的载量进行了监测. 本研究结果有助于明确宿主免疫系统在弱毒疫苗低拷贝存在状态形成中所起的作用, 并有助于进一步探讨 EIA 弱毒

* 国家自然科学基金(30771994), 黑龙江省发展高新技术产业专项资金(FW05B007)和哈尔滨市科技攻关项目(2006AA3AS040)资助项目.

** 通讯联系人. Tel: 0451-89535040, Fax: 0451-89535024

E-mail: Jianhua_uc@126.com

收稿日期: 2008-02-27, 接受日期: 2008-04-08

疫苗株诱导免疫保护的机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物、临床指标监测与采样

3 匹 EIAV_{FDDV} 免疫成熟马(实验组, 分别编号为 7#, 8#, 9#)和 1 匹 EIAV 强毒感染耐过后形成的强毒隐性携带马(阳性对照, 编号为 6#)用于本实验研究。在进行免疫抑制给药前 2 天开始监测体温, 到免疫抑制给药结束一周后停止。同时平行采集全血和血浆。全血检测指标包括白细胞分类计数、红细胞和血小板计数等。血浆于 -80℃ 冻存, 用于病毒囊膜表面蛋白 gp90 基因序列分析和病毒载量测定。

1.2 免疫抑制程序与抑制效果评价(淋巴细胞增殖实验)

本实验采用的免疫抑制程序见参考文献[6]和[7]。用地塞米松对每匹马按体重肌注(0.11 mg/kg) 14 天。给药前 1 天和给药后第 10 天分离外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cells, PBMC), 用于以植物血凝素(PHA, Sigma 公司)作为刺激原的非特异性淋巴细胞增殖实验。该实验结果用于对免疫抑制效果进行评价。PBMC 的分离过程参看文献[8]。使用羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯(CFSE, Sigma 公司)对分离的 PBMC 进行荧光标记, 标记过程参见试剂说明书和文献[9]。将染色处理后的 PBMC 按 5×10^5 个/孔铺入 U 型底的 96 孔板。细胞培养液为包含 10% 马血清(Hyclone 公司)、4 mmol/L 谷氨酰胺、50 U/ml penicillin 以及 50 mmol/L streptomycin(Sigma 公司)的 RPMI1640(Hyclone 公司)。每个实验组设 3 个复孔, 将 PHA 按 5 mg/L 的终浓度加入到细胞培养孔中。不加 PHA 的细胞孔作为对照组, 每组设 2 个复孔。将 PBMC 在 37℃ 5%CO₂ 条件下培养 4 天后收集全部细胞, 通过流式细胞仪分析荧光衰减细胞所占总细胞的比例, 评价淋巴细胞增殖情况。淋巴细胞增殖率 = PHA 刺激组 PBMC 的增殖百分比 / 未经 PHA 刺激 PBMC(即本底水平)的增殖百分比。淋巴细胞增殖实验的具体方法参看文献[9]。

1.3 巢式 PCR 和实时 RT-PCR

免疫马和 EIAV 隐性携带马血浆中的 EIAVgp90 基因的序列扩增, 通过巢式 PCR(nest PCR)完成。反转录所使用的引物为 p8, 5' TGACCCCATGATTCATTCCA 3'。nest PCR 所使用的引物包括外套引物: p7, 5' CCACCAGAGTG-

TTGTGGAAAGGTGA 3' 和 p8, 内套引物: p7-1, 5' TTGTAAGGTTTGG TGTAT GGG 3' 和 p8-1, 5' ATGGCAGCTATTATAGCAGA 3'。25 μl 反应液其中包括: 1.2 mmol/L MgCl₂, 0.5 mmol/L dNTP, 上下游引物各 10 μmol/L, 1.25U rTaq 酶以及 DNA 模板 2 μl。PCR 扩增时外套引物扩增的退火温度为 53℃, 内套为 51℃。延伸时间分别为 2 min 和 90 s。将 nest PCR 产物进行 T-A 克隆, 转化感受态细胞 JM109, 并随机挑取阳性克隆用于序列分析。实时 RT-PCR 使用探针法。上游引物 gag-up, 5' CGATGCCAAATCCTCCATTAG 3'; 下游引物 gag-down, 5' CTGATCAAAAGCAGGTTCCATCT 3'; Taq Man 探针序列: FAM-5' CACCACAAGGGCC-TATTCCTATGACA 3'-TAMRA。反应使用一步法 RT-PCR 试剂盒(Takara 公司)进行。反应程序为: 42℃ 反转录 15 min; 95℃ 预变性 10 s; 95℃ 5 s, 60℃ 40 s, 40 个循环; 60℃ 延伸 1 min。用 MX 3000P 进行定量检测和分析结果。

2 实验结果

2.1 免疫抑制过程中的临床指标监测

实验过程中对 4 匹实验马的血液临床指标进行了监测, 包括每匹马的体温、血小板和淋巴细胞计数的动态变化等。疫苗株免疫马 7#、8#、9#, 在免疫抑制过程中体温未见异常, 血液指标基本稳定(数据略)。而 6# 强毒隐性携带马在给药后第 7 天和 10~12 天出现体温升高过程, 发热同期进行的血小板检测提示, 血小板数值低于正常水平(图 1)。临床表征提示马传染性贫血(EIA)复发。

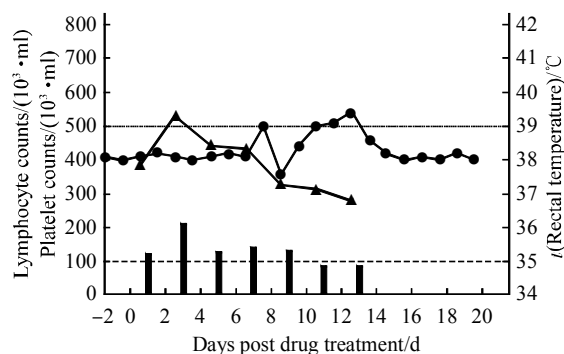


Fig. 1 Clinical and virological profiles of the experimental horse 6# when it was treated with dexamethasone

Febrile episode is defined by a rectal temperature above 39℃ in conjunction with a reduction of the platelets (below 100 000/ml). ●—●: Rectal temperature; ▲—▲: Lymphocyte; ■: Platelet.

2.2 PHA 作为刺激原的非特异性淋巴细胞增殖实验结果

在免疫抑制给药的前 1 天和给药过程中的第 10 天, 分离实验马匹的 PBMC 并进行了 PHA 作为刺激原的非特异性淋巴细胞增殖实验. 经流式细胞仪检测, 淋巴细胞的增殖水平在免疫抑制前后的差异见图 2. 由检测结果可知, 在地塞米松的连续作用下, 在第 10 天时 4 匹实验马匹体内的淋巴细胞增殖水平相对于给药前均明显下降. 证明实验马匹的免疫系统功能已受到抑制.



Fig. 2 Comparison of the lymphocyte proliferation level of the experimental horses before and after drug treatment

Lymphocyte proliferation ration = proliferation percent of the test well with the stimulation of PHA / proliferation percent of the control well without the stimulation of PHA. □: Before drug treatment; ■: After drug treatment.

2.3 Nest PCR 和实时 RT-PCR 的检测结果

在免疫抑制前对 4 匹实验马匹血浆中的病毒 gp90 基因的序列进行扩增, 然后对每匹马各随机挑取 5 个阳性克隆进行测序. 将得到的序列与参考序列进行比对分析, 绘制的进化树见图 3. 分析结果表明, 6# 马体内的优势病毒序列与 EIAV 强毒辽宁株(EIAV_{Liao})位于同一分支, 而 3 匹疫苗株免疫马体内的优势病毒序列则与弱毒疫苗株 EIAV_{FDDV} 处于同一分支.

通过实时 PCR 检测得到的免疫抑制前后实验马匹血浆中病毒载量的变化情况, 见图 4. 6# 强毒携带马在免疫抑制后出现了病毒血症表现. 在给药后第 10 天, 病毒拷贝数明显增加, 高于 EIA 发病时病毒粒子高于 10^7 拷贝 /ml 的阈值^[5], 达 2.5×10^8 拷贝 /ml, 并与临床指标中体温升高时间点相吻合. 由此, 可进一步判定在免疫抑制状态下, 6# 马由 EIAV 强毒携带马转为发病马. 与此相反, 7# 和 9# 疫苗免疫马体内的病毒载量在免疫抑制前后

未见明显改变, 均保持在 $10^3 \sim 10^4$ 拷贝 /ml 的较低水平. 8# 疫苗免疫马体内病毒载量虽然升高了 10 倍左右, 但低于 10^5 拷贝 /ml, 载量水平仍处于 EIAV_{FDDV} 在免疫马体内载量的正常范围.

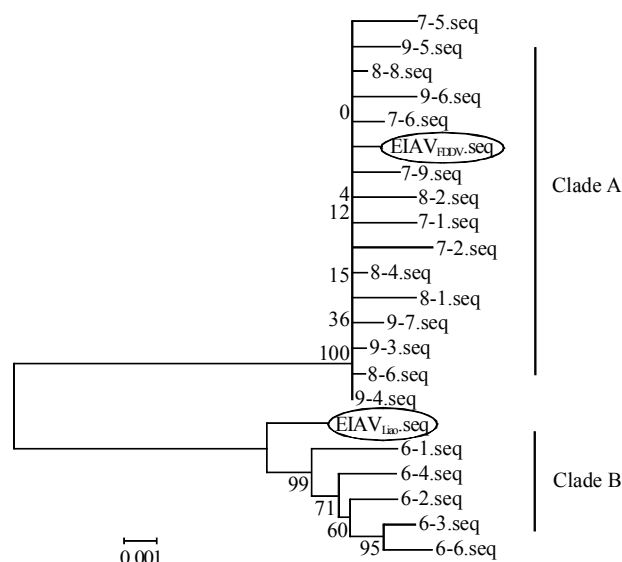


Fig. 3 Phylogenetic analysis of the gp90 nucleotide sequences of EIAV isolated *in vivo*

The gp90 genes of the horse 6# were grouped in the clade B with the pathogenic strain EIAV_{Liao}. The gp90 genes of the other horses were grouped to the clade A with the vaccine strain EIAV_{FDDV}.

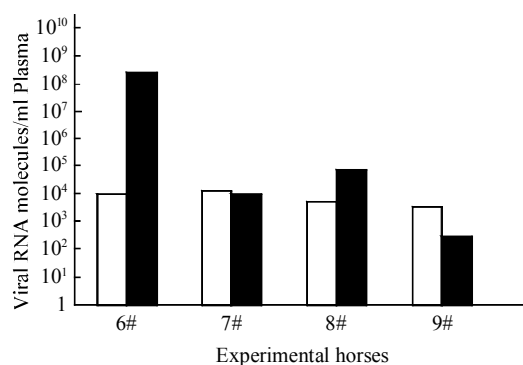


Fig. 4 Comparison of the plasma viral RNA copies of the experimental horses before and after the drug treatment

□: Before drug treatment; ■: After drug treatment.

3 讨 论

弱毒疫苗由于其具有较好的免疫原性和可持续诱导机体产生免疫应答的特点, 免疫效果要优于灭活疫苗和基因工程疫苗. 其应用于某些病毒性传染病如天花、麻疹等的预防上, 表现出了很好的作用^[10]. 但由于存在病毒可感染宿主而带来的一系列安全性问题, 使用弱毒疫苗用于传染病的预防, 尤

其是人类传染病的预防, 争议较多. 在某些特殊病毒的疫苗研制中, 如反转录病毒属的 HIV, 由于其具有整合到宿主基因组中的特性及弱化的毒株可能出现回复突变等因素, 是否采用弱毒疫苗路线, 争议就更多^[11, 12]. 这也是在 HIV 疫苗研制中, 鲜见采用弱毒疫苗路线的主要原因.

对于成功应用于 EIA 预防的 EIA 弱毒疫苗, Shen 等^[2]通过实验证明, 弱毒疫苗株在宿主体内连续传代未见返祖和垂直传播的现象. 而本实验中, 在宿主免疫机能受抑制状态下, 弱毒疫苗株在宿主体内血浆中的载量在 3 匹马中的 2 匹未见明显变化, 另一匹马虽有轻度增加, 但升高后载量水平也在弱毒疫苗体内载量的正常范围内. 这些结果提示, EIAV 疫苗弱毒株在宿主血浆中低拷贝存在状态的形成机制中, 免疫系统产生的特异性控制可能不是主要原因. 在免疫系统功能受抑制时, 弱毒疫苗的复制水平仍保持在较低状态. EIAV 弱毒株的这一生物学特性结合 Shen 等^[2]的研究结论, 进一步支持马传贫弱毒疫苗在应用中的安全性. 另外, 在探讨弱毒疫苗株在宿主血浆中低拷贝存在状态的形成原因时, 由于免疫压力所起作用可能不占主要地位, 则需要更多地从弱毒株本身的病毒生物学特性入手, 进行详细研究.

已有的研究表明, 长末端重复序列(long terminal repeat, LTR)与慢病毒的复制动力学、组织嗜性、致病力等相关^[13]. 已进行的 EIAV 强毒株 EIAV_{Liao} 和疫苗株 EIAV_{FDDV} LTR 序列之间的比对结果提示, EIAV_{FDDV} 相对于 EIAV_{Liao} 在 LTR 的负调控区存在明显的核苷酸插入. 在增强子区存在较高频率的点突变(其中的一个点突变 G→C, 发生在 3' PU.1 结合位点的第一个氨基酸残基). 另外, 在 Tat 蛋白的结合位点 TAR 区, EIAV_{FDDV} 相对于 EIAV_{Liao} 出现了 A→G 的突变. 我们已有的实验提示, LTR 负调控区的插入片段会抑制 LTR 的启动活性^[14]. 考虑到 3' PU.1 结合位点在 PU.1 与 LTR 增强子区的结合及启动反式激活上的重要作用^[15], 该位点的氨基酸突变与强弱毒株间复制水平的差异可能具有相关性. 另外, TAR 区突变位点的出现, 将导致 EIAV_{FDDV} TAR 茎-环结构中茎的起始部位产生改变, 形成一个腺嘌呤突起. 其将破坏茎-环结构的完整性, 可能会影响 Tat 和 TAR 的结合, 从而引起病毒转录水平的变化. 然而, 我们进行的体外强弱毒 LTR 启动活性比较实验表明, 在体外分化的马巨噬细胞中, 弱毒疫苗株的 LTR 的启动

活性要明显高于强毒株^[14]. 除此之外, 将强毒株的 LTR 替换弱毒株的 LTR 后得到的嵌合病毒株感染马匹后, 其在马体内的复制特性与弱毒株相比并未见明显改变^[16]. 以上结果提示, 强弱毒株 LTR 间的差异可能并不是弱毒株在宿主体内低水平复制的主要原因.

通过比较强弱毒株的全基因组序列, 我们发现了其他一些与病毒复制相关基因的改变.

首先, EIAV 强、弱毒株的 gp90 基因存在着多个位点的高度一致性突变, 导致 gp90 V3 到 V5 区在强毒和弱毒之间存在显著差异, 弱毒株相对于强毒株有 4~6 个糖基化位点的消失^[17]. 对弱毒株感染性克隆的 V3 区糖基化突变位点进行回复突变后拯救出的病毒, 其在马匹体内的复制能力明显增高且可导致感染马匹 EIA 发病^[4]. 因此, 囊膜上的氨基酸突变及其可能导致的潜在的糖基化位点的改变, 与弱毒株的低拷贝复制状态可能相关.

对 EIAV_{FDDV} 囊膜基因编码穿膜亚单位 TM(gp45) 的基因进行分析后发现, 随机挑取的 30 个克隆中有 29 个在 *env* 的第 2230 核苷酸位点出现 G→A 的突变, 该突变使得 gp45 基因上提前出现了一个终止密码子 TGA, 导致 TM 蛋白羧基端出现了 66 个氨基酸的截短(马建等, 数据未发表). Luciw 等^[18]研究发现, TM 胞浆区截短的 SIV 感染性克隆毒在感染的猴体内呈低拷贝复制状态. 而进行回复突变的病毒感染的动物呈现出了较高水平的病毒载量和明显的 SIV 临床症状, 揭示 TM 的截短与病毒在宿主体内的复制能力密切相关. 这也提示我们, 高比例存在的 EIAV_{FDDV} TM 的截短与 EIAV_{FDDV} 在宿主体内低拷贝复制的相关性.

EIAV 基因组的附属基因包括 S2 和 S3, 在强、弱毒株间均存在着稳定的突变. 特别是 EIAV_{FDDV} 和 EIAV_{Liao} 之间的 S2 氨基酸差异高达 10.4%^[19], 并至少存在着 3 个非常一致的点突变^[17]. S2 基因作为与病毒体内复制水平密切相关的附属基因^[20], 尽管其起作用的机制尚未明确, 但是在该基因上引入提前终止密码子后得到的 EIAV 病毒 EIAV_{DB}, 在宿主体内的复制水平明显降低, 且其诱导的免疫应答可完全抵抗同源致病力毒株的攻击^[7]. 因此, 我们推测, 中国 EIAV 强、弱毒株在 S2 基因上的差异, 与弱毒株在宿主体内稳定的低拷贝复制状态具有相关性. 另外, EIAV_{FDDV} 在 S3 上与 EIAV_{Liao} 同样存在着稳定的氨基酸突变^[19], 由于 S3 与病毒复制晚期 mRNA 的核外转运密切相关^[21], 这些突变的存

在是否通过影响 mRNA 的核外转运效率而降低其在宿主体内的复制能力,有待进一步的验证.

EIA 发病过程中,从致病毒株感染发病到免疫系统最终对病毒产生控制从而转归为隐性携带状态,病毒与免疫系统分别通过免疫逃逸和免疫重建等机制相互作用,使免疫系统产生了对致病毒株的最终控制.该过程中,病毒感染马匹通常出现 3~5 次明显的病毒血症,并相应地出现强烈的免疫应答^[5, 22, 23].本实验中, EIAV 隐性感染马在免疫系统受抑制后出现典型 EIA 临床症状,血浆中病毒载量由免疫抑制前的 1.1×10^4 拷贝 /ml 明显增高到 2.5×10^8 拷贝 /ml. 这进一步说明强毒感染马转归为隐性携带状态时,免疫系统特异性免疫控制是血浆中病毒低拷贝存在的决定因素.国外已有的研究也发现,在免疫抑制状态下,马匹体内的强毒拷贝数会被明显放大^[7].我们的定量数据显示,疫苗弱毒进入免疫马匹体内至诱导宿主免疫成熟过程中,其血浆中的载量一直处于相当或略低于强毒隐性携带马体内的病毒载量(马建等,数据未发表).而本实验结果提示,这一状态的形成与免疫系统的压力相关性又不大.由此推测,虽然同样能诱导宿主的免疫应答,疫苗弱毒在诱导宿主产生免疫保护过程中其与宿主间的相互作用机制,可能不同于自然感染下强毒株与免疫系统间的相互作用.当然,该推测还需要进一步的实验支持,例如疫苗弱毒在宿主体内的靶细胞和复制能力是否改变、是否存在准种进化和免疫逃逸现象等.

参 考 文 献

- Shen R X, Wang Z. Development and use of an equine infectious anemia donkey leucocyte attenuated vaccine. EIAV: a national review of policies, programs, and future objectives. Amarillo, TX: American Quarter Horse Association, 1985. 135~148
- 沈荣显, 徐振东, 何云生, 等. 马传染性贫血免疫的研究. 中国农业科学, 1979, 4: 1~115
Shen R X, Xu Z D, He X S, *et al.* China Agric Sci, 1979, 4: 1~115
- 沈荣显, 王振漪, 董君平, 等. 马传染性贫血病驴胎皮细胞弱毒疫苗株及其培养方法. 中国专利, 96103323.1. 1999-10-30
Shen R X, Wang Z Y, Dong J P, *et al.* Fetal donkey dermal cells adapted attenuated vaccine of equine infectious anemia virus and its culture method. Chinese Patent, 96103323.1. 1999-10-30
- 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 (6): 738~749
- Leroux C, Craig J K, Issel C J, *et al.* Equine infectious anemia virus genomic evolution in progressor and nonprogressor ponies. J Virol, 2001, 75(10): 4570~4583
- Tomas D B, Hines M T, Perryman L E, *et al.* Corticosteroid immunosuppression and monoclonal antibody-mediated CD5+ T lymphocyte depletion in normal and equine infectious anaemia virus-carrier horses. J Gen Virol, 1994, 75 (Pt 5): 959~968
- Craig J K, Durkin S, Sturgeon T J, *et al.* Immune suppression of challenged vaccinates as a rigorous assessment of sterile protection by lentiviral vaccines. Vaccine, 2007, 25 (5): 834~845
- McGuire T C, Tumas D B, Byrne K M, *et al.* Major histocompatibility complex-restricted CD8+ cytotoxic T lymphocytes from horses with equine infectious anemia virus recognize Env and Gag/PR proteins. J Virol, 1994, 68(3): 1459~1467
- Thompson B S, Mitchell T C. Measurement of daughter cell accumulation during lymphocyte proliferation *in vivo*. J Immunol Methods, 2004, 295 (1~2): 79~87
- Arvin A M, Greenberg H B. New viral vaccines. Virology, 2006, 344(1): 240~249
- Das A T, Baldwin C E, Vink M, *et al.* Improving the safety of a conditional-live human immunodeficiency virus type 1 vaccine by controlling both gene expression and cell entry. J Virol, 2005, 79(6): 3855~3858
- Whitney J B, Ruprecht R M. Live attenuated HIV vaccines: pitfalls and prospects. Curr Opin Infect Dis, 2004, 17(1): 17~26
- Payne S L, Pei X F, Jia B, *et al.* Influence of long terminal repeat and env on the virulence phenotype of equine infectious anemia virus. J Virol, 2004, 78(5): 2478~2485
- 全艳萍. 中国马传染性贫血病毒 LTR 启动子活性及 EIAV/FDD 弱毒株生物学特性的研究. [学位论文]. 北京: 中国农业科学院研究生院, 2007
Quan Y P. Comparison of the LTR promoter activity of Chinese equine infectious anemia virus and biological characterization of the EIAV/FDD attenuated virus. Ph. D Dissertation, Beijing, Graduate School of Chinese Academy of Agriculture Sciences, 2008
- Hines R, Sorensen B R, Shea M A. PU.1 binding to ets motifs within the equine infectious anemia virus long terminal repeat (LTR) enhancer: regulation of LTR activity and virus replication in macrophages. J Virol, 2004, 78(7): 3407~3418
- Tu Y B, Zhou T, Yuan X F, *et al.* Long terminal repeats are not the sole determinants of virulence for equine infectious anemia virus. Arch Virol, 2007, 152(1): 209~218
- 涂亚斌. 马传染性贫血病毒弱毒疫苗致弱过程中 env 基因的变异及 LTR 的作用. [学位论文]. 北京: 中国农业科学院研究生院, 2006
Tu Y B. Variations of env gene and the role of LTR during the attenuation of Chinese equine infectious anemia virus donkey leukocyte attenuated strain. Ph. D Dissertation, Beijing, Graduate school of Chinese Academy of Agriculture Sciences, 2006
- Luciw P A, Shaw K E, Shacklett B L, *et al.* Importance of the intracytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus (SIV) envelope glycoprotein for pathogenesis. Virology, 1998, 252 (1): 9~16
- 王雪峰. 中国马传染性贫血病毒强毒株与驴白细胞弱毒疫苗株前病毒全基因组序列分析. [学位论文]. 内蒙古: 内蒙古农业大学研究生院, 2007
Wang X F. Analysis of Complete sequence of proviral DNA of EIAV Chinese donkey-adapted strain and donkey leukocyte attenuated

- strain. MD Thesis, Inner Mongolia: Graduate School of Inner Mongolia Agriculture University, 2007
- 20 Fagerness A J, Flaherty M T, Perry S T, *et al.* The S2 accessory gene of equine infectious anemia virus is essential for expression of disease in ponies. *Virology*, 2006, **25**; **349**(1): 22~30
- 21 Martarano L, Stephens R, Rice N, *et al.* Equine infectious anemia virus trans-regulatory protein Rev controls viral mRNA stability, accumulation, and alternative splicing. *J Virol*, 1994, **68**(5): 3102~3111
- 22 Hammond S A, Cook S J, Lichtenstein D L, *et al.* Maturation of the cellular and humoral immune responses to persistent infection in horses by equine infectious anemia virus is a complex and lengthy process. *J Virol*, 1997, **71** (5): 3840~3852
- 23 Leroux C, Cadore J L, Montelaro R C. Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us?. *Vet Res*, 2004, **35** (4): 485~512

The Plasma Load of Inoculated EIAV Vaccine Strain EIAV_{FDDV} Was Not Boosted by Immune Suppression*

MA Jian^{1,2)}, JIANG Cheng-Gang¹⁾, LIN Yue-Zhi¹⁾, GUO Liang^{1,2)}, GUO Wei¹⁾, KONG Xian-Gang¹⁾, SHEN Rong-Xian¹⁾, SHAO Yi-Ming³⁾, ZHANG Xiao-Yan³⁾, ZHOU Jian-Hua^{1)**}

(¹⁾National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China; (²⁾Wildlife Resources College, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China;

(³⁾National Center for AIDS Control and Prevention, Beijing 100050, China)

Abstract The attenuated Chinese equine infectious anemia virus (EIAV) vaccine is the first lentiviral vaccine that provides solid protective immunities to vaccinated horses. To investigate properties of EIAV vaccine, especially the relationship between its replication and the immunity, viral plasma loads of an EIAV vaccine strain EIAV_{FDDV} in immune suppressed horses were detected. Three horses, which were immunized with EIAV_{FDDV} for 16 months, were treated with dexamethasone for 14 days to suppress their immunities. Reduced immune response in these animals was confirmed by significantly declined lymphocyte proliferation rate detected after 10 days of the drug treatment. The plasma viral loads of EIAV_{FDDV}, which was indicated by the genomic RNA copy numbers, in horses before and after the treatment of dexamethasone were monitored by real time RT-PCR. Results revealed that the viral plasma loads in two of three immune-suppressed horses were kept a steady low level around $10^3 \sim 10^4$ copies/ml. The load was increased by 10 folds in the third horse, but was still among the standard levels for EIAV_{FDDV} vaccinated horses. As a positive control, the viral copy number of an asymptomatic carrier of EIAV virulent strain EIAV_{Liao} was jumped nearly 25 000-fold higher after being treated with dexamethasone. The typical clinical symptoms of EIA, characterized by febrile episodes and thrombocytopenia, were also appeared in this horse. These results clearly indicate that it is the unique biological feature of the attenuated EIAV vaccine, but not the immunity, resulted in EIAV_{FDDV} remaining in low levels in the body harmlessly. In addition, the steady low level of viremia and the inability to cause clinical symptoms of EIAV_{FDDV} in immune-suppressed hosts further demonstrated the safety of attenuated Chinese EIAV vaccines. The data provide a new sight for studies on the immunity to lentiviruses.

Key words EIAV_{FDDV}, attenuated vaccine, immune suppress, lymphocyte proliferation, plasma viral load

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30771994), Heilongjiang Provincial Foundation for New Technology (FW05B007) and Harbin City Foundation for Science and Technology (2006AA3AS040).

**Corresponding author.

Tel: 86-451-89535040, Fax: 86-451-89535024, E-mail: jianhua_uc@126.com

Received: February 27, 2008 Accepted: April 8, 2008