

# DNA 疫苗的研究和应用

谢 文 凯

(中国科学院上海植物生理研究所 上海 200032)

**摘要:** DNA 疫苗作为一种全新的疫苗,同传统的疫苗相比具有多方面的优越性,是一种最有发展前途的疫苗。回顾 DNA 疫苗的飞速发展历程,综述了 DNA 疫苗基础研究和 DNA 疫苗应用研究的新进展,并探讨 DNA 疫苗当前需解决的问题及发展前景。

**关键词:** DNA 疫苗,安全性,机制,应用

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)-01-070-04

90 年代中期,发展了一种新的免疫防治方法,即 DNA 疫苗。所谓 DNA 疫苗,来源于基因免疫或核酸免疫,是指将含有编码序列及表达所必需的调控元件的质粒 DNA,直接导入动物组织,诱导动物免疫系统对编码序列所表达的蛋白质发生免疫应答,这样的质粒 DNA 则称之为 DNA 疫苗。顾名思义, DNA 疫苗至少具有两层含义: (1) 它是一种 DNA 分子; (2) 它能够起到疫苗的作用。显然, DNA 疫苗不同于以前的减毒病原体疫苗和蛋白质或多肽疫苗。同它们相比, DNA 疫苗具有显著的优点: 通过分子生物学方法可以简单有效地制备出; 编码的抗原通过合适的启动子进行转录控制可以在体内长时间地稳定表达, 诱导抗体免疫和细胞免疫。从而为 DNA 疫苗的广泛应用奠定了坚实的基础。实际上, DNA 疫苗的免疫原性和免疫保护作用的有效性已经在大范围的动物模型和初步的人体临床试验中得到了证明。

## 1 DNA 疫苗的研究历史

DNA 免疫现象的发现和研究表明始于 1990 年, Wolff 等发现, 直接注射纯化的 DNA 进入小鼠骨骼肌细胞中, 该基因能在小鼠骨骼肌中表达, 并在接种 60d 后, 编码的酶仍有生物学活性<sup>[1]</sup>。同时, Williams 等通过氮驱动的以包被有 DNA 的微粒轰击鼠肌和鼠肝脏, 发现编码的基因在两种组织中的表达存在达 14d 以上<sup>[2]</sup>。

1992 年, Tang 等将外源 DNA 注射到细胞内后, 发现能引起免疫反应。他们将人生长素基因的质粒 DNA 通过基因枪转移技术转入到小鼠中, 发现产生了特异性的原初免疫抗体应答, 并在随后的免疫过程中得到

加强<sup>[3]</sup>。1993 年, Liu 等进一步发展了将 DNA 免疫原进行肌内运送的方法。他们将编码流感病毒 A/PR/8/34 的核蛋白(NP)基因的质粒注入小鼠体内, 产生了强烈而特异的 CTL 应答, 能够保护机体免受遗传性质不同的流感病毒株系 A/HK/68 的感染<sup>[4]</sup>; 同时的报道也表明, 编码 HA 糖蛋白基因的合适质粒通过肌肉注射的方法能够诱导特异的抗体反应, 保护机体免受同源的流感病毒的感染<sup>[5]</sup>。至此, DNA 疫苗的概念深入人心, DNA 疫苗作为第 3 代疫苗的地位得到确认。

经过近年来的大量工作, 已基本上对 DNA 疫苗临床应用的许多要素作了全面的评估, 主要有 DNA 疫苗的免疫学机制, 疫苗的安全性、有效性、临床应用效率、免疫保护耐受和免疫关联等, 另一方面则是大量的传染病病原体和非传染病的 DNA 疫苗的研究如雨后春笋般蜂拥而出, 例如流感病毒、HBV、HCV、HIV、肿瘤防治, 基因治疗自身免疫、变态反应等。目前 FDA 已批准一些 DNA 疫苗进行人体试验, 例如 HIV 的 DNA 疫苗。

## 2 DNA 疫苗可能的免疫学机制

DNA 疫苗在合适的条件下接种后, 一般能够有效地表达它们编码的抗原而刺激免疫系统, 诱导全面的免疫应答反应, 包括抗体免疫、MHC(主要组织相容性复合体) I 类限制  $CD_8^+$  CTL 应答和 II 类限制  $CD_4^+$  辅助细胞应答。最初, 人们认为 DNA 通过肌肉注射的方法转入肌细胞后, 肌细胞能长时间保留质粒 DNA, 肌

细胞作为维持抗原产生的位点和有效的 APC(抗原提呈细胞)。然而,原初免疫反应对共同刺激信号的强烈要求表明,来源于骨髓的 APC(它们较高地表达共同刺激信号分子并浸润 DNA 注射部位的炎性细胞)对随后的免疫反应作出应答<sup>[6]</sup>。而且,通过对骨髓嵌合体老鼠的研究,获得了源自于骨髓的 APC 细胞在 DNA 免疫过程起重要作用的直接证据。从转染 DNA 的肌肉组织释放出的抗原被 APC 摄入,运送到管状淋巴结中,在 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞表达, I 类 MHC 限制的 CTL 应答可能主要以这种方式产生<sup>[7]</sup>。以前曾认为该

过程需要内源抗原的表达,但现在的研究表明,只要有外源抗原的存在,也能有效地引起 I 类 MHC 限制的 CTL 应答<sup>[8]</sup>。

### 3 动物模型

近几年来,人们对多种传染性疾病的 DNA 疫苗建立了大量的动物模型,通过对这些动物模型的 DNA 疫苗的作用效率、有效性、安全性以及免疫机理的研究,已经对这些传染病的 DNA 疫苗的制备及临床使用等方面所需要素进行了相当细致的优化和评估,为真正临床应用于人体打下了良好的基础。下表列出了一些常

表1 DNA疫苗动物模型

病原体模型	靶抗原	转运方式	动物模型
乙型肝炎	表面抗原	肌肉注射	小鼠/黑猩猩
丙型肝炎	核心蛋白	肌肉注射	小鼠/大鼠
艾滋病病毒 HIV-1	env 和 rev	肌肉注射	小鼠/黑猩猩
乳头瘤病毒	E6	肌肉注射	小鼠
单纯疱疹病毒	糖蛋白 B	肌肉注射	小鼠
流感病毒	血凝素	基因枪、粘膜、皮下、肌肉	小鼠
MHC-I	糖蛋白	骨肉注射	大鼠
结核杆菌	hsp65/抗原85	肌肉注射	小鼠
疟疾	环孢子蛋白	肌肉注射	小鼠
流感病毒 B	流感病毒 B	肌肉注射	小鼠

见的或采用其它方法制备疫苗有较大难度的传染病的 DNA 疫苗的动物模型<sup>[9]</sup>。

### 4 DNA 疫苗载体研究进展

Berglund 等发现以含有  $\alpha$ -病毒复制子的 DNA 疫苗载体免疫小鼠,同常规 DNA 疫苗载体相比,能够产生更高水平的体液免疫和细胞免疫,以免受流感病毒感染。传统 DNA 疫苗载体的表达是持续的并且是组成性表达,而  $\alpha$ -病毒载体的表达是短暂的和逐渐衰减的,因此,有可能克服载体插入染色体 DNA 和诱导免疫耐受的危险性<sup>[10]</sup>。

Hariharan 等构建了 pSIN DNA 疫苗载体,该载体具有很高的免疫效果,表达单纯疱疹病毒 pSIN 载体一次肌肉注射免疫 BALB/c 小鼠,能够产生广泛的免疫应答。且该载体的注射剂量可比常规载体低 100~1000 倍,甚至 10ng/小鼠就能引发相当的免疫。这些结果表明,以  $\alpha$ -病毒为基础的 DNA 疫苗载体更加合适用作 DNA 疫苗的载体<sup>[11]</sup>。近来,我们实验室以四环素调控的 Tet-Off 真核表达调控质粒为载体,构建疟疾 DNA 疫苗载体,使注射后的体液免疫应答有效地受到开关调

控,有望避免因长期表达抗原而带来的不利影响。

### 5 DNA 疫苗在传染病防治方面的应用

人们已将 DNA 疫苗应用于病原微生物和病毒的防治研究。目前已在乙型肝炎病毒、流感病毒、疱疹、疟疾、结核、免疫缺陷病毒等的 DNA 疫苗研究上取得了重要的进展。

(1) 乙型肝炎病毒:乙型肝炎病毒是广泛感染的病毒之一。毫无疑问,乙型肝炎 DNA 疫苗引起了许多研究人员的广泛兴趣。乙型肝炎病毒的 DNA 疫苗的靶抗原是外膜蛋白或称表面抗原。Davis 等<sup>[12]</sup>报道,表达 HBV 外膜蛋白的质粒 DNA 采用肌肉注射方式经多次接种后可有效地诱导小鼠的 CTL 应答,在接种后 6 天可检测到免疫应答且能维持 4 个月。1997 年,Geissler 等<sup>[13]</sup>报道,编码 HBV 外膜蛋白和核衣壳蛋白的重组质粒 DNA 注射入小鼠中,发现免疫小鼠的血清中产生高峰值的针对外膜蛋白和核心蛋白的抗体,更为重要的是,93% 的免疫小鼠产生强烈的针对病毒蛋白 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞应答,表明 HBV 的 DNA 疫苗能够引起细胞和体液的免疫应答。同年,Chow 等<sup>[14]</sup>报道了一个令

人兴奋的研究结果,他们构建了一个 HBV 膜蛋白和 IL-2 共同表达的质粒(两者有各自的 CMV 启动子),用该质粒作 DNA 疫苗免疫小鼠时发现,同单独表达 HBV 膜蛋白的质粒免疫的小鼠相比,引发的体液和细胞免疫效率至少提高了 100 倍。(2) 免疫缺陷病毒(HIV 和 SIV): 免疫缺陷病毒也是最早应用于 DNA 疫苗研究的病毒之一。

1993 年, Wang 等<sup>[13]</sup>报道了编码 HIV 基因 *rev* 和 *env* 的质粒 DNA 采用肌肉注射方式能引起对 HIV-1 的体液和细胞免疫应答。大量的研究表明<sup>[15~17]</sup>, 编码 HIV 或 SIV(猴免疫缺陷病毒)的 gp160, gag 和 nef 蛋白的质粒 DNA 疫苗,用肌肉注射或基因枪方法注入到小鼠或非人类灵长类动物中,能够诱导针对 HIV 或 SIV 的抗体和 CTL 免疫反应。值得注意的是,与 IL-2 或 GM-CSF 共同表达的 DNA 疫苗质粒能够有效地加强 HIV 特异的 CTL 和抗体反应<sup>[17]</sup>。

1997 年, Boyer<sup>[18]</sup>所在的实验室发表了令人激动的实验结果。他们采用的 DNA 免疫方法采用了两个不同的 DNA 质粒。一个编码 HIV-1 MN 的外膜糖蛋白 gp160(*env*)和调节基因 *rev*, 另一个质粒编码 gag 和 pol 结构蛋白,接种 2 只黑猩猩,经过加强免疫,均有特异的细胞和体液免疫应答,第 3 只黑猩猩用对照 DNA 进行接种,最后这 3 只黑猩猩用高剂量的异源 HIV SF2 活病毒进行感染,结果发现,前两只黑猩猩能够抵抗异源 HIV 病毒 SF2 的感染,而第 3 只黑猩猩则在感染后的第 2 周出现病毒血症并且在整个研究过程中呈 HIV 阳性反应,持续 60 周(通过 RT-PCR 反应检测),而前两只感染一年后, HIV 的 RT-PCR 仍呈阴性结果。表明, HIV 的 DNA 疫苗是能够有效地克服 HIV 感染的。

## 6 应用于肿瘤的 DNA 疫苗

DNA 疫苗用于癌症治疗的前景极有吸引力。许多肿瘤细胞免疫原性低,能够逃避宿主的免疫监督。DNA 疫苗为解决这些问题提供了新思路,主要有:(1)激发免疫系统杀死致癌病毒;(2)激发免疫系统识别并消除表达共同癌细胞信号的癌细胞;(3)转染和表达基因工程蛋白,从而使癌细胞成为更好的免疫靶子。

其中,用肿瘤 DNA 疫苗或细胞因子介导的癌症基因治疗已引起许多临床工作人员和分子生物学家的广泛兴趣,并已用于恶性肿瘤的治疗,包括有:(1)编码外源的 I 类或 II 类 MHC 抗原的 cDNA 表达载体,体

外或体内转染靶肿瘤细胞,引发一个免疫激活环境,从而促进针对同源抗原转染的肿瘤细胞和非转染的亲本肿瘤细胞的免疫应答反应<sup>[19]</sup>。(2)利用表达多种细胞因子的转移基因,如 IL-2, IL-12, TFN- $\gamma$ , GM-CSF(主要是 GM-CSF)等的载体转染免疫应答弱的动物肿瘤,例如 B16 黑色毒瘤或人类肿瘤细胞,然后用细胞因子表达的肿瘤细胞疫苗免疫动物和癌症病人,以诱导或加强病人免疫位点的免疫反应,从而可以获得系统的抗肿瘤反应<sup>[20, 21]</sup>。

随着分子生物学的发展,已经发现了许多抑癌基因和原癌基因,例如 P53 抑癌基因,近年来已有人进行 P53 基因的 DNA 疫苗的实验,将表达人或鼠的野生型 P53 基因的重组质粒注入 BALB/c 小鼠,能使小鼠免受高度突变的表达高水平的 P53 蛋白的鼠成纤维细胞的感染而不致癌<sup>[22]</sup>。

## 7 DNA 疫苗待解决的问题

虽然 DNA 疫苗同传统疫苗相比有更多的优点,但 DNA 疫苗的研究时间才短短几年,在真正应用于人体之前,还有许多问题急待解决,例如采用的免疫方案,免疫机理研究,安全性等,归结如下:(1)DNA 疫苗如何在体内发挥作用,其具体过程是怎样的,如何被肌肉细胞吸收,如何表达抗原蛋白,其诱导产生的体液免疫和细胞介导免疫的关系怎样。(2)DNA 疫苗以不同的途径进入人体后产生的效果强弱不一样,原因仍不很清楚。(3)DNA 疫苗的动物模型中,小鼠体内的免疫力最高,大鼠、猫、猴依次降低,说明动物个体越大, DNA 免疫越差,影响在人体上的应用。(4)同其它疫苗一样, DNA 疫苗的安全性是一个值得着重考虑的问题。虽然目前的动物模型实验没有发现,但理论上存在的危险性仍无证据去消除。主要的安全问题有:(1)DNA 疫苗进入人体之后,会不会激发人体原癌基因或者影响调控基因的活性,这个问题被越来越多的学者所关注。(2)DNA 分子免疫接种后可能引起免疫系统本身的功能紊乱,产生抗 DNA 抗体。(3)少量抗原长期表达,很可能引起过度免疫或者针对该抗原的免疫耐受,遭遇病原体后反而可能引起严重感染。

随着 DNA 疫苗研究的进一步发展,相信上述问题将会得到解决。可以乐观地预测,随着基因诊断、基因治疗和基因免疫等研究的进展,人类预防和治疗疾病的一个新纪元正在向我们走来!

## 参 考 文 献

- [1] Wolff J A, Malone R W, Williams P *et al.* Science, 1990, **247**:1465~1468.
- [2] Williams R S, Johnston S A, Riedy M *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 1991, **88**:2726~2730
- [3] Tang D C, Deivit M, Johnston S A. Nature, 1992, **356**:152~154.
- [4] Ulmer J B, Donnelly J J, Parker S *et al.* Science, 1993, **259**:1745~1749.
- [5] Montgomery D L, Shiver J W, Leander K R *et al.* DNA Cell Biol, 1993, **9**:777~783.
- [6] Pardoll D M, Beckerleg A M. Immunity, 1995, **3**: 165~169.
- [7] Corr M, Lee D J, Carson D A *et al.* J Exp Med 1996, **184**:1555~1560.
- [8] Kovacsovic-Bankowski M, Rock K L. Science, 1995, **267**:243~246.
- [9] Chattergoon M, Boyer J, Weiner D B. J FASEB, 1997, **11**:753~763.
- [10] Berglund P, Smerdou C, Fleeton N M *et al.* Nature Biotechnology, 1998, **16**:562~565.
- [11] Hariharan M J, Driver D A, Townsend K *et al.* J Virol. 1998, **72**:950~958.
- [12] Davis H L, Michel M L, Whalen R G. Human Mol Genet, 1993, **2**:1847~1851.
- [13] Geissler M, Tokushige K, Chante C C *et al.* Gastroenterology, 1997, **112**:1307~1313.
- [14] Chow Y H, Huang W L, Chi W K *et al.* J Virol 1997, **11**:169~178.
- [15] Wang B, Ugen K, Srikantan V *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1993, **90**:4156~4160. -
- [16] Yasutomi Y, Robinson H L, Lu S *et al.* J Virol 1996, **70**:678~681.
- [17] Kim J J, Ayyavoo V, Bagarazzi M L *et al.* J Immunol, 1997, **158**:816~826.
- [18] Boyer J D, Ugen K E, Wang B *et al.* Nature Med, 1997, **3**:526~532.
- [19] Armstrong T D, Clements V K, Martin B K *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1997, **94**:6886~6891.
- [20] Dilloo D, Bacon K, Holden W *et al.* Nat Med, 1996, **2**:1090~1095.
- [21] Aruga E, Aruga A, Arca M J *et al.* Cancer Gene Ther, 1997, **4**:157~166.
- [22] Roth J, Dittmer D, Rea D *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1996, **93**:4781~4790.