

DNA 疫苗在寄生虫病疫苗研制中的前景

李水仙 车德才

(山西省长治医学院 山西长治 046000)

关键词 DNA 疫苗 表达 寄生虫

中图分类号 R53 文献标识码 A 文章编号 10250-326X(2000)01-43-05

疫苗是人类与传染病斗争的最有效武器。纵观疫苗的发展过程,人们将巴斯德及后来许多学者开创的减毒和灭活疫苗称为第一次疫苗革命,将由微生物的天然及纯化组分或由基因重组产物而生产的疫苗称为第二次疫苗革命,本世纪 90 年代兴起的核酸疫苗技术则被誉为第三次疫苗革命^[1]。核酸疫苗是将一段已知的编码保护性抗原蛋白的外源性基因插入能在动物细胞表达的质粒或其它载体后直接接种机体,使之在体内表达目的抗原蛋白,从而激发机体免疫应答的一种新型疫苗。核酸疫苗可分为 RNA 疫苗^[2]和 DNA 疫苗^[3]两种。也有学者称核酸疫苗为基因疫苗^[4],或遗传免疫法(genetic immunization)^[5]。由于双链 DNA 与单链 RNA 相比,具有结构稳定、操作简单等许多优点,因此 DNA 疫苗比 RNA 疫苗更受学者们的青睐^[6,7]。

1 DNA 疫苗与传统疫苗的比较

传统用于传染病预防的疫苗有减毒活疫苗、灭活疫苗、亚单位疫苗和重组活疫苗。减毒活疫苗虽诱导的免疫应答较为全面,包括细胞免疫和体液免疫,且诱生的免疫力较为持久,但如未充分减毒,则可使接种者发生临床型感染,同时还存在着毒力返祖的危险。灭活疫苗和亚

单位疫苗虽较安全,但免疫力维持时间短暂,且一般只能诱导体液免疫。此外,灭活疫苗在灭活过程中常造成重要抗原的丢失,难以产生完全的体液免疫。以痘苗病毒、杆状病毒等为载体的重组活疫苗,虽和减毒活疫苗一样,可诱导细胞免疫和体液免疫,但因其病毒载体具有免疫原性,反复接种可引发对载体的免疫应答,同时,重组活疫苗也存在毒力回升和使免疫低下者发病的危险。

DNA 疫苗与传统疫苗相比,则具有许多独特的优点:DNA 疫苗接种后,编码目的抗原的基因在宿主细胞内表达,可直接与 MHC I 类和 MHC II 类分子结合,全面引发宿主的体液免疫和细胞免疫应答,且无毒力回升的危险。DNA 疫苗通过在自体细胞中表达抗原蛋白,模拟了抗原蛋白自然状态下的三维空间构象,这一特点对于构象型抗原表位引发保护性免疫尤为重要。DNA 疫苗可通过基因重组技术,将强化免疫应答成分的基因,或其它抗原蛋白基因插入同一个载体中,以达到加强免疫效果或多价疫苗的目的,为联合免疫提供了可能性。作为一

第一作者介绍:李水仙,女,1965年生,山西高平人,副教授,医学硕士,研究抗感染免疫;

收稿日期:1997-09-23,修回日期:1999-01-26

种重组质粒 DNA 疫苗可转入大肠杆菌内快速增殖,再经较为简便的方法加以提纯,如此制备的 DNA 疫苗可以直接溶于生理盐水中通过肌肉注射或基因枪直接将 DNA 打到表皮组织细胞浆或细胞核内,后者大大提高了总体抗原表达机率,能取得更好的免疫效果;同时或经冻干,用前以生理盐水稀释即可,避免了制备传统疫苗所需的蛋白纯化等繁琐过程引起的免疫原性改变,也可大大降低疫苗的成本,便于保存及运输。

2 DNA 免疫的可能机理

DNA 免疫的详细免疫机制尚不清楚。DNA 免疫的免疫机制研究主要涉及 DNA 疫苗如何转染体内的靶细胞及靶细胞的种类,如何在靶细胞内表达,表达的抗原蛋白如何被呈递给免疫活性细胞等一系列理论性问题。笔者认为,肌肉注射 DNA 疫苗时,肌细胞和肌肉组织中的抗原呈递细胞(APC)均可能被 DNA 疫苗通过某种特殊的方式转染,进而表达抗原蛋白并呈递给免疫活性细胞,其中肌细胞表达的抗原蛋白也可释放于细胞外,被抗原呈递细胞(APC)摄取、加工、处理后再呈递给免疫活性细胞。经皮肤和粘膜组织接种 DNA 疫苗时,皮肤粘膜细胞及皮肤粘膜部位的 APC 则为主要的转染靶细胞并表达抗原蛋白,之后,APC 可将表达蛋白呈递给免疫活性细胞;但是皮肤粘膜细胞由于代谢更替活跃,其内抗原蛋白的表达常为一过性,加之皮肤粘膜部位的 APC 较为丰富,因此,皮肤粘膜细胞可能很少执行抗原呈递功能,它们表达的抗原蛋白可能是通过皮肤粘膜部位较为丰富的 APC 摄取、加工、处理后呈递给免疫活性细胞的。

3 DNA 疫苗在寄生虫病疫苗研制中的应用

(1) 疟疾 DNA 疫苗:有关研究已表明,经辐射处理的疟原虫子孢子疫苗的免疫接种能够使人和动物获得抵抗疟原虫感染的能力,此疫苗促发保护性免疫产生的抗原是环子孢子蛋白

抗原。然而,这种疫苗的生产远远不能满足实际需要,为此,人们一直希望能研制出其它实用有效的疟疾疫苗。1994 年 Sedegah 等^[8]首先将 DNA 疫苗技术引入疟疾疫苗的研制领域中,并取得了一些可喜的结果。在他们的研究中,成功的构建了编码约氏疟原虫环子孢子蛋白(PyCSP)的哺乳动物细胞表达质粒——pDIP/PyCSP·1,并以此作为约氏疟原虫的 DNA 疫苗,通过肌肉注射免疫 BALB/c 小鼠后发现,与辐射处理的疟原虫子孢子疫苗相比,此 DNA 疫苗可诱导小鼠产生更高滴度的特异性抗体和更高水平的杀伤 T 细胞(CTL)应答,同时也赋予小鼠对子孢子攻击具有较强抵抗力。作者认为, DNA 疫苗技术有助于对抗原蛋白中的保护性 T、B 淋巴细胞识别表位进行鉴定。接着, Sedegah 及其合作者^[9]对此约氏疟原虫 DNA 疫苗进行了更深入的研究,旨在对免疫接种 DNA 疫苗的方案进行优化,并对其产生免疫保护作用的机制进行探索。1995 年 Mor 等^[10]分别对此 DNA 疫苗初次免疫和再次免疫小鼠后抗体形成细胞的存在部位,所产生抗体的亚类和所分泌细胞因子的类型进行了细致的研究后发现:小鼠对此 DNA 疫苗的初次免疫应答发生在引流淋巴结构,产生的抗 - PyCSP 抗体亚类主要是 IgG₁,分泌的细胞因子类型主要是 IL-4;小鼠对此 DNA 疫苗的再次免疫应答发生在脾脏,产生的抗 - PyCSP 抗体亚类主要是 IgG_{2a},分泌的细胞因子类型主要是 IFN- γ 。表明,此 DNA 疫苗初次免疫小鼠主要引起小鼠的 Th₂ 免疫应答,再次免疫则主要引起 Th₁ 免疫应答。作者指出, DNA 疫苗初次和再次免疫小鼠时产生的免疫应答类型不同影响疫苗的免疫效果。因为在他们的实验研究中,接受一次免疫的小鼠有一半获得了对疟原虫攻击的抵抗力,而接受多次免疫的小鼠全部获得了对疟原虫攻击的抵抗力。勿容置疑,从疟疾有效性保护抗原的角度来分析,上述国外学者们构建并研究的疟疾 DNA 疫苗属于抗子孢子疫苗。我国学者李学荣等^[11]则将抗子孢子疫苗候选抗原(CSP)与抗红细胞内期疫苗候选抗原

(MSA1、MSA2、RESA、MSP1C 端 19 肽 MSP1₁₉) 的编码基因重组后构建了恶性疟原虫的多价 DNA 疫苗——编码多价保护性抗原的重组质粒 pcDNA3-Pf8, 以此重组质粒肌肉注射免疫 BALB/c 小鼠后的检测结果显示: 免疫鼠血清的特异性抗体滴度达 1:2560, 恶性疟原虫可溶性抗原能特异性地刺激免疫鼠脾细胞增殖, 免疫血清在体外还能抑制恶性疟红细胞内期疟原虫的生长发育。从而表明: 编码恶性疟原虫多价保护性抗原的重组质粒 pcDNA3-Pf8 直接免疫 BALB/c 小鼠后, 能特异性地刺激小鼠产生体液免疫和细胞免疫应答, 其免疫血清在体外对疟原虫生长发育具有明显抑制作用。鉴于针对疟疾的抗传播疫苗, 热休克蛋白疫苗已有初步成功的研究报道^[12], 因此我们认为: 研制疟疾 DNA 多价疫苗时还应包括抗传播疫苗的候选抗原(如 Pfs48/45、Pfs25、Pfs40) 和热休克蛋白疫苗候选抗原(如 hsp70I) 的编码基因。

(2) 黑热病 DAN 疫苗: 在 1994 和 1995 两年间, Xu 等^[13, 14]将大型热带利什曼原虫表面糖蛋白 gp63 的 cDNA 插入质粒 pcDNA 1 和 pRc/RSV 两种真核细胞表达载体, 构建成表达 gp63 的两种真核细胞表达质粒 pCMV/gp63 和 pRSV/gp63, 并将它们作为大型热带利什曼原虫的两种 DNA 疫苗分别经大腿肌肉注射对 BALB/c 小鼠进行了免疫, 对照组小鼠注射空载质粒或不注射。40 天后将小鼠接种部位的肌肉切下, 通过 PCR 检测, 在注射 pCMV/gp63 和 pRSV/gp63 的小鼠均显示 gp63DNA 阳性, 对照组小鼠为阴性。进一步的免疫组化检测显示: 免疫组小鼠肌肉组织 gp63 蛋白抗原阳性, 对照组为阴性, 表明免疫组小鼠肌肉组织中有 gp63 抗原的表达。免疫组小鼠的脾细胞和淋巴结细胞在体外经大型热带利什曼原虫抗原刺激后, 对其上清液进行的 IL-2、IFN- γ 和 IL-4 的检测结果表明, 可测到高水平的 IL-2 和 IFN- γ , 但测不到 IL-4; 对照组小鼠的脾细胞和淋巴结细胞经相同方法处理后上清中 IL-2、IL-4 和 IFN- γ 的检测均呈阴性。因此作者认为,

pCMV/gp63 和 pRSV/gp63 DNA 疫苗主要产生 Th₁ 免疫应答。经 10⁶ 静止期大型热带利什曼原虫的前鞭毛体进行的攻击试验显示, 免疫组小鼠的皮肤损害(Lesion) 明显较小, 出现时间也较对照组晚, 并且免疫组小鼠脚垫攻击部位的原虫量也较对照组少 2~3 倍, 表明 gp63DNA 疫苗对易感小鼠的利什曼原虫感染具有高度保护作用。鉴于 IFN- γ 能介导对利什曼原虫感染具有保护性, 作者还用表达 IFN- γ 的质粒 pcDNA/IFN- γ 对 BALB/c 小鼠进行了两次免疫, 然后用前鞭毛体进行攻击, 结果免疫组小鼠的皮肤损害明显较对照组轻, 从而提示细胞因子 DNA 疫苗如同细胞因子本身一样可用于预防利什曼原虫感染。

(3) 隐孢子虫病 DNA 疫苗: 微小隐孢子虫是一种可致人畜共患的肠道机会致病原虫。最易感染幼年动物和儿童, 也是免疫缺陷者如 AIDS 病人的一大隐患, 近年来国内外对隐孢子病的研究报道日趋增多, 成为寄生虫学领域的一个研究热点。1995 年 Jenkins 等^[15]将分子质量为 15 和 60ku 的微小隐孢子虫孢子表面蛋白的 cDNA 构建成真核细胞表达质粒 pCMV-CP15/60, 并以此作为微小隐孢子虫的 DNA 疫苗对分娩前母羊进行了免疫接种, 证实了此 DNA 疫苗可诱导母羊产生特异性免疫应答, 在其血清和初乳中检出特异抗体。此项研究中, 研究者们是采用骨骼肌注射与乳房组织注射二种途径, 1000 μ g、100 μ g、10 μ g 三种剂量对分娩前母羊实施接种。ELISA 检测结果表明: 血清和初乳中特异性抗体产生的滴度呈剂量依赖性, 与接种途径关系不大。通过与冻融得到的微小隐孢子虫孢子的天然蛋白进行的免疫印迹实验证实血清和初乳中产生抗体的特异性。之后, 研究者们又将这些特异抗体与此天然蛋白洗脱, 并通过间接免疫荧光染色显示它们可与微小隐孢子虫孢子的表面抗原结合, 进一步确证了血清和初乳中产生抗体的特异性。

(4) 血吸虫病 DNA 疫苗: 在 1996 年召开的关于核酸疫苗预防感染性疾病和核酸疫苗管

理方面的国际会议上^[16], Harn 报道:肌肉接种编码血吸虫 23ku 抗原的 DNA 疫苗,实验动物的排卵率降低了 70%~85%;而 Waine 却报道:编码血吸虫副肌球蛋白抗原 DNA 疫苗的应用,虽有抗体应答产生,但无保护效果出现。我国学者李传明等^[17]构建了日本血吸虫 26ku 谷胱甘肽 S—转移酶(Sj26GST)的两种 DNA 疫苗(pCD-Sj26、pBK-Sj26),分别肌肉注射免疫 BALB/c 小鼠,免疫鼠产生了一定水平的抗血吸虫抗体,对免疫小鼠行日本血吸虫尾蚴攻击后,两种疫苗免疫鼠的减虫率分别为 37.19%、44.44%,肝组织减卵率分别为 73.80%、47.20%,每对成虫产卵分别减少 56.88%、15.67%。从而表明:实验所用两种血吸虫 DNA 疫苗均可使小鼠形成一定水平的保护性免疫力,对血吸虫尾蚴感染具有一定的抵抗能力。谢来平等^[18]则用日本血吸虫成虫 32ku 蛋白的 cDNA 构建了血吸虫的 DNA 疫苗(pCDSj32),经 100 μ g 和 200 μ g 两种剂量免疫 BALB/c 小鼠后,减虫率分别为 52.43%、36.47%,肝组织减卵率分别为 54.19%、57.79%,并均能明显抑制肝脏虫卵肉芽肿的形成。目前资料表明:血吸虫潜在的疫苗候选抗原分子有数十种^[19],选择若干种主要候选抗原分子的基因构建多价 DNA 疫苗应是研制血吸虫 DNA 疫苗未来的方向,并对这些多价 DNA 疫苗诱发机体的体液免疫应答能力和细胞免疫应答能力加以全方位的评估。与此同时,很有必要对血吸虫与宿主间的相互作用进行深入的研究和了解,以期血吸虫的保护性抗原和机体的抗血吸虫免疫机制得以阐明。

除上述四种寄生虫病外,针对寄生虫病的 DNA 疫苗研究还涉及囊虫病的 DNA 疫苗。有关文献显示:用编码绦虫保护性抗原基因(45w)构建成 DNA 疫苗并免疫接种羊后,诱发羊产生了特异性免疫应答,且能保护羊抵抗绦虫卵的攻击^[20]。

综上所述,DNA 疫苗不但具有众多优势,而且在寄生虫病疫苗研制中已显现出良好的发展前景。随着核酸疫苗的研究不断深入,英特

网上已辟有专页介绍,网址为 <http://www.genweb.com/dnavax/dnavax.html>^[20]。Whalen 博士也提出一个自我帮助程序,具体步骤与方法在有关的综述文章中已有介绍^[20],我们就不再赘述。可以相信,随着 DNA 疫苗技术的日臻完善,寄生虫病 DNA 疫苗的研制也必将迈入一个新的阶段。

参 考 文 献

- [1] Dixon B. 第三次疫苗革命.《国外医学》预防、诊断、治疗用生物制品分册,1996,19(1):1~2.
- [2] Zhou X, P. Berglund C, Rhodes *et al*. Self-replicating Semliki Forest virus RNA as recombinant vaccine. *Vaccine*, 1994, 12(16):1510~1514.
- [3] Lowrie D, B. R. E. Tascon M, J. Colston *et al*. Towards a DNA vaccine against tuberculosis. *Vaccine*, 1994, 12(16):1537~1540.
- [4] 鲁凤民,朱永红,庄辉等.戊型肝炎病毒(HEV)基因疫苗免疫小鼠的初步研究.北京医科大学学报,1995,27(2):111~112.
- [5] Tang D, C. M. De Vit S, A. Johnston. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature*, 1992, 356:152~154.
- [6] Robinson H, L. C. A. Boyle D, M. Feltquate *et al*. DNA immunization for influenza virus: studies using hemagglutinin-and nucleoprotein-expressing DNAs. *The Journal of Infectious Diseases*, 1997, 176(Suppl. 1):s50~s55.
- [7] Ishii N, Y. Sugita H, Nakajima *et al*. Genetic control of immune responses to HIV-1 env DNA vaccine. *Microbiol. Immunol.*, 1997, 41(5):421~425.
- [8] Sedegah M, R. Hedstrom P, Hobart *et al*. Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91(10):9866~9870.
- [9] Hoffman S, L. M. Sedegah S, C. Hedstrom. Protection against malaria by immunization with a plasmidium yoelii circumsporozoite protein nucleic acid vaccine. *Vaccine*, 1994, 12(16):1529~1533.
- [10] Mor G, D. M. Klinman S, Shapiro *et al*. Complexity of the cytokine and antibody response elicited by immunizing mice with Plasmodium yoelii Circumsporozoite protein plasmid DNA. *J. Immunol.*, 1995, 155:2039~2045.
- [11] 李学荣,余新炳,罗树红等.恶性疟原虫重新质粒 DNA 接种诱导 BALB/c 小鼠的免疫应答.中国寄生虫学与寄生虫病杂志,1998,16(4):241~245.
- [12] 黄建生.疟疾疫苗的研究进展.国外医学寄生虫病分

- 册. 1995 , **22**(1):10~14.
- [13] Xu ,D ,F. Y. Liew. Genetic vaccination against Leishmaniasis. *Vaccine* ,1994 ,**12**(16):1534~1536.
- [14] Xu ,D ,F. Y. Liew. Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein , gp63 of *L. major*. *Immunology* ,1995 ,**84**(2):173~176.
- [15] Jenkins ,M. ,D. Kerr ,R. Fayer *et al.* Serum and colostrum antibody responses induced by jet-injection of sheep with DNA encoding a *Cryptosporidium parvum* antigen. *Vaccine* , 1995 ,**13**(17):1658~1664.
- [16] Spier ,R. E. International meeting on the nucleic acid vaccines for the prevention of infectious disease and regulating nucleic acid(DNA)vaccines. *Vaccine* ,1996 ,**14**(13):1285~1288.
- [17] 李传明 ,石佑恩. 日本血吸虫 26kDa 谷胱甘肽 S-转移酶 DNA 疫苗的研究及其保护性免疫效果观察. 中国寄生虫病防治杂志 ,1998 ,**11**(3) 207~211.
- [18] 谢来平 ,石佑恩 ,韩家俊等. 不同剂量日本血吸虫裸露 DNA 疫苗 pCDSj32 诱发小鼠保护性免疫力的初步研究. 中国寄生虫病防治杂志 ,1998 ,**11**(4) 305~307.
- [19] 姜小山 ,赖建平. 血吸虫疫苗的研究现状与展望. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 ,1997 ,**15**(2):111~116.
- [20] 陈蕊雯 ,戴建新 ,孙树汉. 寄生虫的核酸疫苗研究. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 ,1998 ,**16**(3) 223~225.