

(或基于复制酶的DNA类似物)的细胞中抗原的产量并不依赖转染的RNA或DNA的量。与甲病毒感染细胞相似,以自我复制RNA转染的哺乳动物细胞是基于甲病毒复制酶引起宿主细胞凋亡的。

人们认为这是宿主细胞企图限制病毒复制的保护反应。因此,假定自我复制RNA疫苗能够通过安全方式模仿病毒感染,就可能在转染宿主细胞中实现抗原的高效表达,这可能会激活抗病毒途径,该途径将增强自我复制RNA编码抗原的免疫应答。



新型疫苗载体的生物安全性问题

1、

核酸疫苗的安全性

目前核酸疫苗接种涉及的可能机理中还有许多问题尚待解答,然而不难看出,直接接种抗原基因免疫机体具有许多优点。

直接接种抗原基因免疫机体具有以下优点

- i. 与传统类型疫苗相比,核酸免疫可全方位调动机体的免疫系统,诱发广泛的体液和细胞免疫应答;同时,由于表达抗原的时间较长,可引起持久的体液和细胞免疫;
- ii. 此种技术为肿瘤和病毒免疫学提供了一种特别有用的工具,可用于肿瘤和传染病的治疗,因为这种技术可诱发免疫应答的所有方面,尤其是CO8+CTL应答对这两类疾病的病理过程都很重要;
- iii. 制备简便、省时省力。由于核酸免疫利用现有成熟的基因重组技术,直接在宿主体内表达目的抗原,从而省略了传统疫苗复杂的体外表达、纯化和加工的过程;此外,对于那些突发性、抗原性漂移迅速的疾病,例如流感病毒来说,这种方法在流行病暴发时可快速开发新型疫苗;
- iv. 比较安全。核酸疫苗一般采用表达载体在动物细胞内进行抗原表达,与减毒活疫苗相比,可避免病毒本身存在的复毒和病毒基因组整合到宿主染色体的危险性;
- v. 可提供多种病毒株的广谱有效疫苗。利用一种表达载体可同时表达多种病毒的抗原蛋白,诱导机体产生针对多种病毒的免疫应答,从而起到一种核酸疫苗同时预防和治疗多种疾病的效果。

尽管各种核酸疫苗的研究如雨后春笋般涌现,而且与传统类型疫苗相比具有上述优点,但到目前为止,仅有少数的如马西尼罗病毒DNA疫苗和鲑鱼传染性出血性坏死病毒DNA疫苗等获准上市,不过针对疟疾、埃博拉病毒、艾滋病和肿瘤的疫苗也相继通过FDA批准进入了临床试验。早在1996年,美国FDA就颁布了相关文件,规定主要从系统毒性、基因毒性、生殖毒性、免疫毒性和致癌性等方面对DNA疫苗临床前的安全性进行评价。

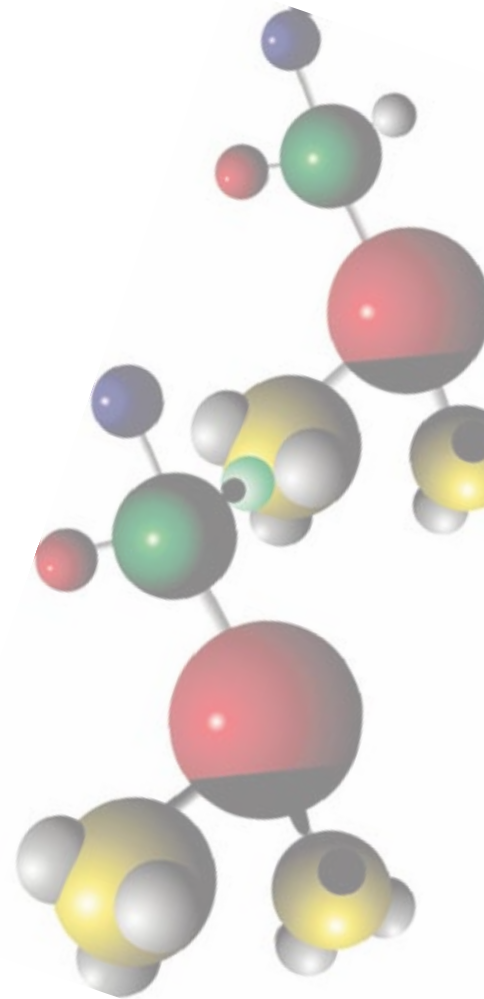
1.1 基因整合

质粒 DNA 是否与宿主染色体 DNA 发生整合，这是人们最关心的问题之一。

外源基因的导入会引起内源性原癌基因的插入性激活和抑癌基因的插入性失活等潜在危险。DNA 疫苗经过不同的免疫传递方式可部分进入细胞，由细胞内的表达系统表达，进而产生免疫反应。通常情况下，游离的外源质粒位于细胞质中，由胞内核酸酶降解及甲基化酶甲基化而失活，经过一定时间可完全代谢。进入细胞的外源DNA，也存在进入细胞核的可能性，进入细胞核的质粒，存在着潜在的同基因组整合的危险。基因整合可以通过随机插入、同源重组或逆转录病毒插入造成基因的断裂或重排，诱发染色体的不稳定性，产生遗传毒性或致瘤反应，其中最有效的是逆转录病毒插入。Polling等人在2002年曾报道给小种猪模型注射乙肝 DNA 疫苗，在 57d 时注射部位仍能检出注射的DNA疫苗，141d 后才被完全代谢，说明DNA有整合的可能性，但是比基因组随机突变的概率低3个数量级。

DNA疫苗主要是由原核细胞复制元件、免疫原基因、致病性病毒启动子和终止子等基因元件组成的真核表达质粒。常用的致病性病毒启动子有人巨细胞病毒（hCMV）、猴病毒40（SV40）、小鼠白血病病毒（murine leukaemia virus）、鼠淋巴肉瘤病毒、鼠乳腺癌病毒的启动子以及人类免疫缺陷症病毒（HIV）长末端重复区启动子。在能感染上述病毒的人或动物体中，由于基因同源性较高，使用含上述病毒启动子的DNA疫苗时出现基因整合的可能也就比较大。另一类启动子是哺乳动物启动子，如人延长因子 EF21 α 启动子、MHC II 启动子、肌动蛋白、肌组织特异性肌球蛋白重链和肌酸激酶启动子，与来源于致病性病毒或致肿瘤病毒的启动子相比，前者较为安全，适合于在人体或动物中使用。此外，要尽可能减少疫苗质粒中的非功能性序列，使用小质粒以消除原核质粒骨架带来的负面效应。

质粒整合与免疫剂量、免疫方式和免疫途径等多种因素有关。人们普遍认为免疫剂量越大，质粒在体内的残留量也越大，整合的风险也越大；相对而言，肌肉注射是一种较安全的接种方式。Leamy等人用阳离子脂质体包裹 DNA质粒pVCL2 AB01，以 100 μ g/50 μ L（约 1.33×10^{13} 个质粒拷贝）单侧和40 μ g/20 μ L（约 5.33×10^{12} 个质粒拷贝）双侧共 80 μ g的方式免疫小鼠，于免疫后2 d、1月、2月用实时定量 PCR检测注射部位的质粒残留量，2个月后发现大剂量单侧组的质粒残留量为 7.42×10^6 个质粒拷贝/ μ g DNA，而小剂量双侧组为 5.22×10^3 个质粒拷贝/ μ g DNA。至于大剂量能否引起整合还有待于进一步研究。Ledwith等人用流感病毒和HIVgag基因DNA疫苗肌肉注射免疫小鼠，6周后发现肌肉部位的质粒残留量为1000~4000个拷贝/ μ gDNA，6个月后质粒残留水平为200~800个拷贝/ μ g DNA，发生整合频率大约



是 $\leq 1\sim 8$ (15万个二倍体细胞), 比生物体基因组自发突变几率低3个数量级, 即1/15万次整合相当于每个细胞突变率为 6.7×10^{-7} 。因此, 研究人员认为肌肉接种DNA疫苗引发的质粒整合的可能性可忽略不计。但一些接种新技术的应用会增加整合的可能性。Wang等人首次证实, 应用电穿孔向机体注射的质粒DNA可与体内基因组DNA发生整合。在用不同方式给小鼠接种编码促红细胞生成素DNA疫苗时发现, 采用电穿孔接种可使组织中的质粒含量增加6~34倍, 即每微克基因组DNA中大约含980个拷贝, 而肌肉接种仅为17个拷贝, 大大增加了整合的几率。用PCR技术证实, 有4只小鼠出现目的片段的随机插入和载体骨架中小片段的同源重组, 即外源DNA发生了基因组整合。

到目前为止, 关于基因疫苗整合到基因组的可能性分析方法(表5)还有待进一步优化, 难点在于如何有效地将基因组DNA和体内游离的质粒分离; 另外关于提高检测整合可能性方法的敏感性也是关键问题, 需要在现有的方法上进一步深入研究, 确立一个方便、简捷和有效的方法。

表5 目前用来检测基因整合可能性的方法

| 方法 | 优点 | 缺点 |
|----------------|---|---|
| 凝胶电泳和PCR的方法 | Ledwith在2000年报道的方法最为经典, 经过多次不同形式的凝胶电泳分离游离质粒和基因组DNA, 尽可能地纯化基因组DNA, 然后通过PCR来检测是否整合, 其灵敏度可达1拷贝质粒/ μg DNA。其方法中采用了多次不同形式的电泳及基因组DNA的提取等手段都确保获得非常纯的基因组DNA | 但其方法比较复杂, 对仪器设备要求较高, 不易推广 |
| Southern blot法 | 2006年, Coelho-Castelo 等人在检测 Hsp65 基因疫苗的整合情况时, 采用Southern blot 的方法, 经过琼脂糖凝胶电泳后, 回收基因组DNA, 将带有标记物的据基因疫苗随机设计的引物同基因组进行杂交, 检测基因整合。 | 由于引进了Southern杂交步骤, 使得实验周期长、操作麻烦、对周围环境易造成DNA污染, 影响后续的实验操作和进一步的分析评价 |
| 荧光定量PCR法 | 通过实时检测 PCR 扩增过程中荧光基团的强度变化, 对 DNA 疫苗残留进行精确定量分析。可检出1个拷贝的目的基因, 是目前世界上最先进的分子定量检测技术, 具有很高的灵敏度和准确性。2006年, 胡斌等人建立了以恒河猴为实验对象的快速检测 DNA 疫苗在生殖腺和血液中的残留量的方法, 应用荧光定量 PCR 技术结合优化的 DNA 提取方法, 灵敏度和特异性完全达到安全性评价的检测要求, 可以快速准确地对 DNA 疫苗的残留进行检测, 是值得大力推广的一种方法 | |
| 其它方法 | 国内关于 DNA 疫苗安全性研究较少, 最普遍的是电泳分离大片段基因组后进行RT-PCR, 同凝胶电泳和PCR方法的策略相似, 但只进行一次电泳, 同常规PCR相比, RT-PCR的检测敏感度更高。另外, 还有电泳分离切胶后采用常规PCR的方法, 检测的灵敏度也相应下降, 在进行基因整合的检测以前, 需通过设定内参引物先对基因组DNA的均一性进行检测。 | |

1.2 生殖毒性

外来化合物对生殖过程的损害作用可以表现为性淡漠、性无能或各种形式的性功能减退。雌性可出现排卵规律改变、月经失调或闭经、卵巢萎缩、受孕减少、胚胎死亡、生殖力降低、不孕或不育等。雄性可表现为睾丸萎缩或坏死和精子数目减少等。

生殖毒性作用的评定：外来化合物对生殖过程作用的评定主要通过生殖毒性试验来进行，过去也称为繁殖试验。生殖毒性试验可以全面反映外来化合物对性腺功能、发情周期、交配行为、受孕、妊娠过程、分娩、授乳以及幼仔断奶后生长发育可能发生的影响。评定的主要依据是交配后母体受孕情况（受孕率）、妊娠过程情况（正常妊娠率）、子代动物分娩出生情况（出生存活率）、授乳哺育情况（哺育成活率）以及断奶后发育情况等。此外还可同时观察出生幼仔是否有畸形出现，但畸形观察主要在发育毒性评定中进行。

生殖毒性试验多用性成熟大鼠，也可用小鼠或家兔。大鼠自然受孕率较小鼠为高，较为理想。一般设三个剂量组，另设对照组。最高剂量组剂量应该超过人类预期实际接触水平，希望能使亲代动物出现轻度中毒，但不出现死亡或死亡率不超过10%，也不能完全丧失生育能力。低剂量组的亲代动物不应观察到任何中毒症状。另设中间剂量组应仅能出现极为轻微的中毒症状。中间剂量与高剂量和低剂量应呈等比级数。

生殖毒性试验观察的指标

- i. 受孕率反映雌性动物生育能力以及雌性动物受孕情况；
- ii. 正常分娩率反映雌性动物妊娠过程是否受到影响；
- iii. 幼仔出生存活率反映雌性动物分娩过程是否正常，如分娩过程受到影响，则幼仔往往在出生4天内死亡；
- iv. 幼仔哺乳成活率反映雌性动物授乳哺育幼仔的能力。

DNA疫苗免疫后是否会运送到性腺、能否与生殖细胞染色体发生整合而导致种系突变也是疫苗安全性评价的重要内容。目前，还没有DNA疫苗与性细胞染色体发生整合而导致种系突变的研究报道。DNA疫苗免疫动物后，偶尔可在睾丸和卵巢内检测到质粒的存在，但很快被降解。Schubbert等人对怀孕小鼠以每天50 μg的剂量经口饲喂噬菌体 M13 DNA片段或含有绿色荧光蛋白的质粒pEGFP2 C1，用PCR和荧光原位杂交方法进行检测，发现外源DNA存在于子代小鼠的多种不同组织细胞核内，其原因是由于外源 DNA通过胎盘传递到胎儿和新生儿体内，而不是由外源DNA整合造成的遗传转移。但在3个胎儿的极少细胞核内发现外源DNA与其两条染色单体发生联合，推测可能是由于母鼠长期饲喂外源DNA的结果，至于是否是由于整合而引发的突变还有待于进一步研究。在对一些可造成垂直传播的疾病，如巨细胞病毒病、弓形虫病、新孢子虫病、疱疹病毒、1型艾滋病和乙型肝炎等的研究中，发现怀孕动物接种 DNA疫苗后均能使胎儿获得安全的免疫保护。

1.3 免疫耐受

由于对接种所用DNA表达抗原的持续时间尚不了解，外源蛋白的长期表达有可能导致免疫病理反应；使被接种者保持一定强度的免疫应答。理论上，如果这种强度和持续时间不能合理加以控制，就有可能引起树突状细胞分泌模式的改变，从而引发免疫耐受，使接种者受到免疫损伤。但至今在对成年动物的研究中，尚未观察到由于接种DNA疫苗而诱发特异性的免疫耐受现象。

外源蛋白可以成为免疫原或耐受原，而且和分子量的大小有关。一般来说，分子量小的蛋白免疫原性差，耐受能力强，并随分子量大小而递减或递增。

大多数疫苗接种人群为婴儿或儿童，由于婴幼儿的免疫系统尚未发育成熟，DNA疫苗持久地表达抗原，并和宿主自身的MHC复合体结合后呈递给免疫系统，因此婴幼儿的免疫系统很容易把它误认为是自身成分，引起免疫耐受，从而增加感染的危险性。免疫耐受是由质粒编码的抗原蛋白而非质粒本身引起，免疫原性低的抗原更容易诱发免疫耐受，此外还与被接种者年龄、免疫途径、免疫剂量、持续时间、质粒骨架中免疫刺激序列及MHC提呈的抗原决定簇的浓度和模式有关。因此，要选择适当的质粒与抗原，避免低表达或弱抗原的情况，还要在模式动物上多进行预试验，筛选免疫剂量和接种次数，这不仅有利于提高疫苗的免疫保护力，还可以消除免疫耐受的产生。

1.4 自身免疫疾病

核酸疫苗诱导的免疫反应有可能诱发或加重自身免疫性疾病的发生。自身免疫疾病的特点是产生针对特异性双链DNA和其它细胞核抗原的自身抗体或形成自身反应性T、B细胞，并选择性地激活Th1型免疫应答。为了增强DNA免疫效果常在构建载体时引入 CpG基序，它是一种未甲基化的六聚核苷酸序列，结构为5'-嘌呤-嘌呤- CpG-嘧啶-嘧啶-3'，可诱导产生抗DNA抗体，加速自身免疫性疾病的发生。此外，DNA疫苗载体中的核定位信号肽也有可能引发自身免疫性疾病。Kwon等人发现用编码T细胞受体的DNA疫苗真皮免疫小鼠可导致实验性自身免疫性脑脊髓炎的发生。

1.5 抗DNA抗体产生

接种质粒DNA时，可能导致宿主体内高水平抗DNA抗体，并诱发异常的自身免疫应答；目前对于抗DNA抗体的产生有两种假设：一是这些抗体由B淋巴细胞增生产生；二是由抗原，即DNA引起B淋巴细胞活化和选择而产生。对于这两种假设均有证据支持。因此，作为核酸疫苗诱导机体产生抗DNA抗体的可能性仍然存在，而抗DNA抗体的出现必然会引发新的疾病。有学者用3种DNA疫苗反复接种健康BALB/c鼠和有红斑狼疮倾向的B/W小鼠，用酶联免疫斑点法（ELISpot）分析了BALB/c鼠体内B细胞分泌的抗DNA自身抗体IgG的绝对数。结果发现免疫后抗DNA抗体IgG水平迅速增加了3倍，血清中抗自身DNA抗体的滴度也相应升高，但与B/W小鼠相比其变化的程度较缓和。尽管小鼠体内检测到较高水平的自身抗体，但它是一过性的，不足以引发BALB小鼠患狼疮性肾小球肾炎和肌炎。

1.6 辅助因子和佐剂的副作用

很多情况下，疫苗引起的免疫应答是由佐剂引起的而不是疫苗本身引起的，这也是产生毒性的原因。抗性基因的存在，其在体内的转移，在免疫部位和体内主要组织器官的存在都有可能对机体产生不良反应。许多基因疫苗是由减毒或灭活的菌体来呈递的，由于菌体本身可作为一种佐剂来加强免疫效应，因而由细菌引起的安全问题也是不可忽略的。革兰氏阴性菌，其细胞壁外层含有高免疫原性的内毒素，菌体蛋白的残留、宿主菌DNA、RNA的残留都是需要检测的因素。有些DNA疫苗需要添加细胞因子来增强免疫效果，但同时也增加了外源基因与染色体整合的可能性，另外这些细胞因子也可能引起机体内相关反应，导致机体正常机能的紊乱。如有些编码分泌性信号肽基因的加入虽能产生较强的免疫应答反应，但其融合可能会诱导免疫交叉反应。

1.7 对环境的影响

核酸疫苗通过重组DNA技术，将微生物的基因引入各种生物的细胞中，甚至还可以人工合成一些自然界中原本不存在的基因。然而，在基因工程药物的研制过程中，那些经过重组而携带各种外源基因的生物体，一旦逃逸到环境中，将会引起生态系统的结构发生改变，从而打破其在长期进化过程中所形成的平衡体系。例如，转抗性基因生物的逃逸会因其竞争力的增强而使该物种过量繁殖，这将会导致与该物种有竞争关系的其它物种更快的灭绝，从而破坏物种的多样性。如果重组DNA过程所用的病原体一旦逃逸到环境中，便会直接危害自然界中的生物。此外，人们还担心用于人类疾病治疗的基因工程药物是否会对人类以外的非目标生物产生危害。

目前比较有效的解决措施是选用质粒/染色体平衡致死系统。这个系统既能保证质粒的稳定性，又能消除抗性基因的扩散问题。采用苏氨酸营养缺陷型标志选择宿主菌（*L. lactis*），可有效避免抗生素的使用，而且这种宿主菌还是一种食品级细菌。为避免免疫呈递菌体的可能性危害，我们通常选择相对安全的细菌来呈递疫苗，也可通过细菌抗体来检测体内细菌的存在与分布，组织病理观察来分析菌体可能产生的危害。对于裸DNA疫苗，可以在提取质粒的过程中去除内毒素，用阴离子交换层析去除RNA和残留蛋白。对于细胞因子和一些免疫增强序列的添加，要根据具体的载体和疫苗来进行选择。如信号肽的序列可通过生物学模型（隐Markov模型）来选择最合适的添加。疫苗中cpG序列的有无和是否添加也要慎重，以避免自身抗体的产生。

2、

细菌和病毒疫苗的安全性

有些病毒具有导致靶组织损伤的基因，如肝炎病毒亲肝基因，决不能用于重组活疫苗的研制。该种基因可能使原本无害的微生物变得极其危险。对于减毒活细菌和病毒载体，要检测其在体内及排泄物中的持续时间，以确定微生物是否可在体内复制，以及检测这些经过基因修饰的微生物是否释放到体外环境中，从而进入食物链，接触易感个体，引起不良后果。另外，还要应用PCR技术来分析代谢物，检测真核表达质粒在环境中转移和扩散的可能性，特别要关注使用了抗性基因的疫苗，以防造成基因污染。

2.1 甲病毒复制子疫苗的安全性

Schlesinger等人发现普通的甲病毒载体可导致宿主细胞在72h内凋亡。宿主细胞过早凋亡，使得外源基因不能持续表达，不利于外源蛋白的转运和免疫细胞对其的加工呈递。Weiss等人用SINV突变株SIN21在BHK221细胞上建立了持续感染系统，结果表明SIN21对细胞的生长影响不大。进一步对这类低致细胞病变株的分析表明，非结构蛋白nsP2可能是决定甲病毒致细胞病变能力的关键因素之一。Lundstrom等人将nsP2胞核定位信号结构域的第649位氨基酸由Arg突变为Asp，同时将第259位氨基酸由Ser突变为Pro，这样的SFV复制子SFV（PD）降低了细胞毒性，能够在初级海马趾和皮层神经元中增强外源基因的表达。

利用低致细胞病变株甲病毒改造成的甲病毒载体，扩大了自身在免疫治疗、细胞发育和特殊的信号转导途径等研究上的应用。但是依据甲病毒载体不同的应用，由载体引起的细胞毒性既有优点又有缺点，如何理解和利用这一特点将是科学家研究的重要课题。

虽然作为载体的SFV和Sindbis原型病毒对人只有极低的致病性，但其安全性问题仍值得注意。近来研究表明，Sindbis病毒可经过复制酶基因的交换而发生重组。在SFVHelper1包装系统中，易经过重组形成具有复制能力的病毒（replication proficient virus, RPV）。为避免这种病毒的产生，目前已构建了SFV刺突蛋白切割缺陷型SGL（Helper2包装系统）。该系统包装产生的重组SFV必须经蛋白酶消化，即在Leu残基处将前体P62切割成成熟的E2，才具有感染性。这样只有在同时发生重组和回复突变时，RPV才有可能形成。Mossman等人在乳鼠脑内接种重组SFV，结果未检测到RPV。一般而言， 10^8 重组病毒颗粒产生的野生型病毒小于1IU，从而大大提高了该系统的生物安全性。而甲病毒RNA复制子载体或DNA-RNA载体均为瞬间表达，持续时间短暂，它们最终在胞质内表达，RNA容易降解，整合于宿主细胞基因组的风险很小。它们在转染细胞后，迅速在宿主细胞内复制，表达外源蛋白，关闭宿主细胞蛋白的合成，诱导宿主细胞凋亡，进一步降低了与宿主基因组整合的可能。Berglund等人认为复制缺陷型SFV载体在与辅助质粒包装过程中，可能会通过类似同源重组的方式产生一小部分野生型SFV粒子。为了避免这种情况发生，他们在结构蛋白基因E2-E3蛋白水解区诱导了三个点突变，生成条件性感染的病毒复制子，通过改变环境条件，如温度来控制甲病毒载体的转染和表达。即使用高浓度的病毒复制子转染细胞，也无法检测到野生型的病毒粒子，说明突变粒子非常稳定，不易发生病毒重组。Smerdou用分别含有衣壳蛋白基因和纤突蛋白（E226K2E1）基因的两种辅助质粒，同时与携带LacZ基因的SFV复制缺陷型质粒进行包装，能够在每 10^6 个被转染的细胞中，检测到 8×10^8 个重组子，但没有检测到具有复制能力的病毒粒子，提示这种包装体系具有较高的安全性。

