

1、

核酸疫苗发展趋势

DNA疫苗作为第3代疫苗，尤其在人类尚未攻克的疑难病症的预防和治疗方面显示出了良好的应用前景。大量临床实验发现，受试者并没有出现令人担忧的不良症状。目前，DNA疫苗面临的主要问题是，由其引发的体液和细胞免疫达不到理想的状态和人们对其安全性的担忧。因此，在提高DNA疫苗免疫效果的同时还需运用高效灵敏的检测技术进行长期的安全性评价。由于传统疫苗的法规并不完全适用于DNA疫苗，涉及到疫苗安全性的诸多因素还处于研究探索阶段，从疫苗设计、工程菌的选择、生产工艺、质量检验、使用剂量、免疫途径到免疫程序都没有相应的标准和成型的法规。此外，在疫苗设计上，可运用生物信息学合成安全有效的真核表达质粒骨架；选用无抗生素抗性的选择标签，如营养缺陷型和平衡致死系统选择标志，这样既可保证质粒的稳定表达，又可消除因抗性基因引发的疫苗安全性问题，尽可能选择宿主范围窄的质粒复制功能区和缩小质粒也是增加安全性的方法之一，还可采取生物遏制的方法在保证质粒稳定复制的情况下抑制工程菌的过量增殖，以减少细菌内毒素对机体的伤害；或是选用食品级的工程菌如乳酸乳球菌来增加疫苗的安全性。尤其要在适当的动物模型中进行细致的临床前研究，积累大量的实验数据，为DNA疫苗法规的早日成型奠定基础。

2、

甲病毒复制子疫苗发展趋势

目前，这种新型疫苗的研究尚处于研究早期，但国外已有报道用这种方法构建的流感病毒、人单纯疱疹病毒的“自杀性”DNA疫苗免疫实验动物小白鼠，证实这种DNA疫苗不仅在诱导体液免疫和细胞免疫方面均优于相应的常规DNA疫苗，而且低剂量、一次免疫就可提供很强的免疫保护。如Haihanran等人以SIN病毒复制子为载体，以人单纯疱疹病毒HSV21的gB基因为目标基因构建的“自杀性”DNA疫苗，pSIN2.5-gB的免疫剂量较常规DNA疫苗的免疫剂量低得多，0.1 μg即可提供完全保护，展示了“自杀性”DNA疫苗巨大的开发潜力与良好的应用前景。Leitner等人用SINV、SFV载体与肿瘤相关抗原（TAAs）的模式抗原lacZ构建的复制子免疫小鼠，发现两者均产生了较强的体液免疫和细胞免疫，能抵抗同源肿瘤细胞的攻击，还能显著延长荷瘤小鼠的存活时间。Leitner用携带自身肿瘤抗原酪氨酸激酶相关蛋白21的SINV复制子免疫小鼠，可以打破小鼠机体自身的免疫耐受，并使小鼠对黑色素瘤产生免疫。方六荣等人以SFV的复制子为载体构建的伪狂犬病毒gC基因“自杀性”DNA疫苗在实验动物上的研究结果也证实了“自杀性”DNA疫苗在诱导体液免疫和细胞免疫方面均优于相应的常规DNA疫苗。邓瑶等人使用等量的pSCA2SS1和pcDNA3112SS1分别转染细胞后发现，前者表达强度是后者的3倍，诱导凋亡的能力是后者的11倍；用1 μg pSCA2SS1免疫小鼠产生的抗体滴度与CTL水平，分别与pcD2NA3112SS1免疫小鼠中10 μg和100 μg组相当，说明较低剂量的SFVDNA疫苗可诱生与常规DNA疫苗高剂量组相近的结果。说明对于pSCA这类复制型载体，免疫接种的质粒DNA

不是越多越好，这也是由复制型载体的特性所决定的。当机体细胞摄入了较多的质粒DNA后，由于存在RNA的复制，产生大量双链RNA的复制中间体，迅速诱导细胞凋亡，从而影响了抗原表达及处理。Onate等人用携带流产布氏杆菌的Cu、Zn超氧化物歧化酶（SOD）基因重组的SFV载体腹腔接种小鼠，能够有力地抵抗流产布氏杆菌的攻击。

虽然很多研究表明甲病毒载体疫苗具有较好的免疫效果，但也有甲病毒载体诱导的特异性体液免疫反应不及传统的DNA疫苗载体的报道。张健慧等人比较了携带HIV21Pr55gag的SFV复制子和传统DNA疫苗在小鼠中的体液免疫原性，发现用0.1和1.0 μg的SFV及pcDNA2gag表达质粒肌肉注射小鼠均不能诱导出gag特异性免疫反应。而分别用10、30和100 μg剂量的载体SFV及pcDNA2gag表达质粒免疫小鼠，后者诱导的Th1型gag特异性抗体高于前者。产生这种结果与携带的抗原自身有关。SFV复制子过早诱导了宿主细胞凋亡，而gag蛋白转运到细胞膜是一个耗能过程，与介导蛋白质折叠或细胞内转运的多种因子有关，细胞病变可能改变或干扰gag类病毒颗粒的组装和出芽过程。倪兵等人研究的结果证实，pSMART2a/PIA的刺激特异CTL应答能力和对肿瘤的防治作用都高于pCIneo/PIA。但两种重组质粒却没有产生任何抗原特异抗体。其中机制尚不太清楚。陈水平等人在对我国登革热病毒D243株PrME基因的复制型载体质粒DNA的免疫原性研究中发现，该质粒DNA经肌肉免疫BaLB/c鼠，结果诱导产生了登革热病毒的特异性抗体，但抗体水平较低，这可能与多种因素有关。首先是靶基因PrME，其次是免疫途径也直接影响DNA的吸收、表达及细胞抗原的呈递能力。

“自杀性”DNA疫苗免疫效果与插入的外源基因有关。Hsu等人将结核分枝杆菌热休克蛋白（heatshockprotein70, Hsp70）基因和人的多发性乳头瘤病毒16（HPV16）E7基因相连插入含有SFV复制子的复制性DNA载体中注射小鼠，结果能诱发出比不插入热休克蛋白基因更强的细胞免疫。他证明，给抗原基因上连接热休克蛋白基因能极大提高自杀性DNA疫苗的免疫效果。这与张健慧和陈水平等人的研究结果相似，说明免疫效果与插入的外源基因有关。

SFV病毒对神经细胞具有高度的亲嗜性，因此在神经系统的研究中得到了广泛应用。Ehrengruber等人报道了在小鼠海马回神经元细胞中用辛德毕斯病毒载体表达绿色荧光蛋白，表明辛德毕斯病毒复制子能够感染神经元细胞。与BHK细胞在感染辛德毕斯病毒复制子两天后就全部死亡不同，神经元细胞在转染辛德毕斯病毒载体后能够存活5天。细胞病变的延迟可能是因为复制子RNA合成的减少，也可能是不同细胞中细胞因子的差异所致。

近年来甲病毒复制子在肿瘤研究上具有很大的进展。2004年，Tseng等人利用辛德毕斯病毒纤突对细胞表面层粘连蛋白的靶向结合性进行试验，仅单次腹腔内注射携带了抗肿瘤基因的SINV载体，即可靶向作用于皮下、胰脏、腹膜和肺脏的大多数肿瘤细胞，而对正常细胞没有感染能力，同时SINV复制子足以诱导肿瘤的完全退化。2004年，倪兵等人将表达质粒P1A/pSMART2a和包装质粒helper到293细胞中，制备高水平的重组甲病毒P1A/



SFV, 用其免疫动物后能激发比对照组强得多的CTL杀伤效应。在E/T比为100:1时, P1A/SFV组CTL的杀伤率为75%。在保护性和治疗性实验中, 于60d实验期限内, P1A/SFV的效果最好。2005年, Goldberg等人对表达酪氨酸酶的VEEV复制子病毒样颗粒和普通质粒DNA载体, 进行了免疫效果的比较, 结果表明复制子载体较普通质粒DNA载体具有更强的免疫应答与抗肿瘤能力。2006年, Cheng等人将编码钙网织蛋白(calreticulin, CRT)的缺陷型SIN复制子病毒样颗粒免疫BALB/c小鼠, 结果表明具有很强的抗肿瘤效果。

甲病毒表达载体系统已经是一种成熟、安全、高效的表达系统, 已广泛用于蛋白的表达、结构和功能的研究。同时以重组甲病毒作为疫苗的研究也取得了较大的进展。以甲病毒表达载体系统装配成具有感染性的逆转录病毒颗粒, 为基因治疗开辟了一种新途径。对甲病毒诱导的细胞程序性死亡的机制研究, 则为肿瘤的治疗提供了新方法。今后改进甲病毒载体的转染方法, 提高细胞的摄入率; 研制开发有效的甲病毒载体包装细胞系; 在甲病毒载体中引入可调节RNA翻译效率和增强mRNA稳定性等顺式调控元件; 进一步开发可控制表达和诱导细胞调亡的甲病毒载体; 在结构蛋白基因中引入更有效的靶向结合位点等, 都将为甲病毒载体进一步开发和应用提供广阔的前景。

3、

细菌/病毒活载体疫苗发展趋势

为了找到一种能够在体内较长时间存在, 且本身对机体既安全又能产生持续免疫力的疫苗, 利用乳酸菌表达系统生产口服疫苗, 成为未来发展的方向。病毒活载体疫苗的未来发展趋势是一苗多价, 利用基因工程的方法对病毒致病基因进行改造, 并增添外源基因, 生产多价疫苗, 以达到一苗产生多价抗体的目的。

乳酸菌口服疫苗的优点

- i. 可直接口服, 无需静脉注射给药, 避免了由静脉注射导致的感染危险;
- ii. 模仿自然感染途径, 能够同时在消化道、呼吸道、生殖泌尿道和乳腺引起黏膜免疫反应;
- iii. 产生sIgA (3g/d), 引起Th1、Th2-typeCD4+反应和CD8+细胞毒T淋巴细胞反应, 筑起由sIgA介导的第一道防线;
- iv. 高效, 同时引起黏膜和系统免疫反应, 也能诱导全身耐受, 抵抗特异性T淋巴细胞介导的迟发性炎症反应。黏膜表面包含高浓度的淋巴细胞, 如在黏膜相关淋巴组织中有 6×10^{10} 个抗体形成细胞, 而在淋巴器官中只有 2.5×10^{10} 个淋巴细胞。黏膜免疫不仅激发产生大量的sIgA, 而且也产生IgG; 在黏膜组织中, 免疫球蛋白总量的80%是IgA, 尤其是sIgA。黏膜抵抗感染的功能主要依赖于sIgA的免疫屏障作用: 一方面阻止微生物毒素等小分子致病因子以扩散或渗透的方式穿越黏膜屏障; 另一方面阻止大分子致病因子与上皮细胞受体结合, 从而封闭它们黏附到黏膜上皮细胞而入侵机体的致病途径。黏膜免疫能同时产生局部免疫反应和全身性免疫反应, 而经肌肉接种疫苗的途径只能产生全身性免疫反应。IgA抗体, 尤其是sIgA在黏膜免疫反应中具有主要的免疫保护作用, IgG、IgM、IgD和IgE等免疫球蛋白在黏膜免疫反应中也起着不可忽视的作用。

1. 陈水平, 秦鄂德, 于曼. 我国登革2型病毒prM-E基因与SFV病毒载体重组RNA的构建. 军事医学科学院院刊, 2000年第24卷第04期.
2. 仇华吉, 李卫平, 董光志. (2003) RNA复制子疫苗. 中国生物工程杂志, 23(3): 44~49.
3. 仇华吉, 罗玉子, 李娜等. 一种基于塞姆利基森林病毒复制子的新型复制子载体. 中国生物工程杂志, 2004年05期.
4. 段鸿元, 陈水平, 姜涛. 登革3型病毒prM-E基因重组质粒DNA的构建和真核表达. 微生物学杂志, 2005年01期.
5. 方六荣, 陈焕春, 肖少波等. (2002) 猪繁殖与呼吸综合征病毒ORF5基因“自杀性”DNA疫苗的初步研究. 中国预防兽医学报, 24: 259~263.
6. 方美玉, 林立辉, 任瑞文. (2003) 我国甲病毒的研究进展. 中华流行病学杂志, 24(11): 1060~1063.
7. 侯云德主编. (1999) 分子病毒学. 第2版, 北京: 学苑出版社, 430~435.
8. 倪兵, 李燕秋, 王莉等. (2002) 人肿瘤特异抗原MAGE-3基因疫苗的构建和表达. 第三军医大学学报, 24(10): 1133-1136.
9. 倪兵, 杨日高, 李艳秋等. 基于重组 α -病毒的基因疫苗对小鼠肥大细胞瘤P815的防治作用. 细胞与分子免疫学杂志, 2004年01期.
10. 王军阳, 马伟, 袁育康等. (2000) 核酸疫苗的安全性及伦理学问题. 中国医学伦理学, (2):54.
11. 谢京国, 方六荣, 肖少波等. (2006) 双基因共表达的“自杀性”DNA疫苗载体的改造及其体外表达特性. 中国兽医学报, 26(6): 583-585.
12. 张德礼, 郭庆福, 朱关福等. (1994) 人类腺病毒载体活疫苗的开发应用研究进展. 微生物学免疫进展, 22(1): 60-62.
13. 朱武洋, 付士红, 王力华等. 辛德毕斯病毒复制子载体系统的构建. 病毒学报, 2009年第02期.
14. Berglund P, Smerdou C, Fleeton M N, et al. (1998) Enhancing immune responses using suicidal DNA Vaccine. *Nat Biotechnol*, 16(6): 562-565.
15. Gorbalenya A E, Koonin E V, Lai M C, et al. (1991) Putative papain-related thiol proteases of positive-strand RNA viruses. Identification of rubi- and aphtovirus proteases and delineation of a novel conserved domain associated with proteases of rubi-, alpha- and coronaviruses. *FEBS Lett*, 288: 201-205.
16. Gorbalenya A E, Koonin E V. (1993) Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr Opin Cell Biol*, 3: 419-429.
17. Hahn Y S, Strauss E G, Strauss J H. (1989) Mapping of RNA- temperature-sensitive mutants of Sindbis virus: Assignment of complementation groups A, B, and G to nonstructural proteins. *J Virol*, 63: 3142-3150.
18. Hardy W R, Strauss J H. (1989) Processing the nonstructural polyproteins of Sindbis virus: Nonstructural proteinase is in the C-terminal half of nsP2 and functions both in cis and in trans. *J Virol*, 63: 4653-4664.
19. Herweijer H, Latendresse J S, Williams P, et al. (1995) A plasmid based self amplifying Sindbis virus vector. *Hum Gene Ther*, 6: 1161-1167.
20. <http://www.electrophysiology.cn/content.asp?id=807>
21. <http://baike.baidu.com/view/2631675.htm>
22. http://baike.baidu.com/view/324990.htm?fr=ala0_1
23. http://baike.baidu.com/view/999824.htm?fr=ala0_1
24. <http://www.rxyj.org/html/2010/0327/494406.php>
25. http://ncmi.bcm.tmc.edu/ncmi/events/workshops/workshops_7/proceeding/semliki.pdf
26. <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/eri/biote/vk/salonen/pathwayf.pdf>
27. <http://www.sfvectors.ed.ac.uk/>
28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1986720/>
29. http://www.ibioo.com/experiment/dna/clone/2009/7582_2.html
30. <http://daixie.lunwen114.com/like/561.html>
31. JAMES H. STRAUSS, ELLEN G. STRAUSS. (1994) The Alphaviruses: Gene Expression, Replication, and Evolution. *MICROBIOLOGICAL REVIEWS*, 58(3):491-562.
32. K. Mills McNeill, F. Ridgely Benton, Susan C. Monteith. (2000) Epidemic Spread of Adenovirus Type 4-Associated Acute Respiratory Disease between U.S. Army Installations. *Emerging Infectious Diseases*, 6(4):415-419.
33. Keränen S, Ruohonen L. (1983) Nonstructural proteins of Semliki Forest virus: synthesis, processing, and stability in infected cells. *J Virol*, 47(3): 505-515.
34. Koonin E V, Dolja V V. (1993) Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: Implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 28: 375-430.
35. Keränen S, Kääriäinen L. (1979) Functional defects of RNA-negative temperature-sensitive mutants of Sindbis and Semliki Forest viruses. *J Virol*, 32(1): 19-29.
36. Leitner W W, Han Ying, David A, et al. (2000) Enhancement of Tumor-specific Immune Response with Plasmid DNA Replicon Vectors. *Cancer Research*, 60(1): 51-55.
37. LaStarza M W, Lemm J A, Rice C M, et al. (1994) Genetic analysis of the nsP3 region of Sindbis virus: Evidence for roles in minusstrand and subgenomic RNA synthesis. *J Virol*, 68: 5781-5791.
38. Levis R, Schlesinger S, H V Huang. (1990) Promoter for Sindbis virus RNA-dependent subgenomic RNA transcription. *J Virol*, 64(4): 1726-1733.

39. Liljestrom P, Garoff H. (1991) A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Bio Technology*, 9: 1356-1361.
40. Meanger J, Peroulis I, Mills J. (1997) Modified Semliki forest virus expression vector that facilitates cloning. *Bio Techniques*, 23(3): 432.
41. Poch O, Sauvaget J, Delarue M, et al. (1989) Identification of four conserved motifs among the RNA dependent polymerase encoding protein. *EMBO J*, 8(12): 3867-3874.
42. Raju R, Huang H V. (1991) Analysis of Sindbis virus promoter recognition in vivo, using novel vectors with two subgenomic mRNA promoters. *J Virol*, 65(5): 2501-2510.
43. STEFAN RIEDEL, MD, PHD. (2005) Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *BUMC PROCEEDINGS*, 18(1):21-25.
44. Strauss J H, Strauss E G. (1994) Alphaviruses. *Microbiol Rev*, 58: 491-562.
45. Suopanki J D L, Sawicki S G, et al. (1998) Regulation of alphavirus26S mRNA transcription by replicase component nsP2. *J Gen Virol*, 79: 309-319.
46. Vihinen H, T Ahola, M Tuittila, et al. (2001) Elimination of phosphorylation sites of Semliki Forest virus replicase protein nsP3. *J. Biol. Chem*, 276: 5745-5752.
47. Wang Y F, Sawicki S G, Sawicki D L. (1994) Alphavirus nsP3 functions to form replication complexes transcribing negative-strand RNA. *J Virol*, 1994, 68: 6466-6475.
48. Weiss B, Nitschko H, Ghattas I, et al. (1989) Evidence for specificity in the encapsidation of Sindbis virus RNAs. *J Virol*, 63: 5310-5318.
49. Ying H, Tai Z Zarks, Rong Fu Wang, et al. (1999) Cancer therapy using a self replicating RNA vaccine. *Nature Medine*, 5(7): 823-827.

小词典

1. 基因载体（vector）：能携带目的基因，实现无性繁殖所采用的可独立复制的完整DNA分子。又称克隆载体。其中为表达出蛋白质设计的载体又称表达载体。常用的载体：质粒、噬菌体DNA、病毒DNA。载体的选择标准：能自主复制；具有两个以上的遗传标记物，便于重组体的筛选和鉴定；有克隆位点（外源DNA插入点），常具有多个单一酶切位点，称为多克隆位点；分子量小，以容纳较大的外源DNA。

2. 生物安全：指生物技术从研究、开发、生产到实际应用整个过程中的安全性问题。广义的生态危害应包括生物体（动物、植物、微生物），主要是致病性微生物或其产物（来自于各种生物的毒素、过敏原等）对健康、环境、经济和社会生活的现实损害或潜在风险。其狭义概念为由于人为操作或人类活动而导致生物体或其产物对人类健康和生态环境的现实损害或潜在风险，主要包括：基因技术、操作病原体（活的生物体及其代谢产物）和由于人类活动使非土著生物进入特定生态区域，即生物入侵等所造成的危害。

3. 生殖毒性：指外来物质对雌性和雄性生殖系统，包括排卵、生精，从生殖细胞分化到整个细胞发育，也包括对胚胎细胞发育所致的损害，引起生化功能和结构的变化，影响繁殖能力，甚至累及后代。

4. 疑似预防接种异常反应：是指在预防接种过程中或接种后发生的可能造成受种者机体组织器官、功能损害，且怀疑与预防接种有关的反应。

其含义为：① 病例的发生与预防接种存在合理的时间关联性，即必须是在预防接种过程中或接种后一定的时间内发生；② 受种者机体发生一定的组织器官或功能方面的损害；③ 在就诊时怀疑病例的发生与预防接种有关。

疑似预防接种异常反应在国际上称为预防接种不良事件（AEFI）。疑似预防接种异常反应按发生原因分为：一般反应、异常反应、疫苗质量事故、实施差错事故、偶合症、心因性反应和不明原因反应。