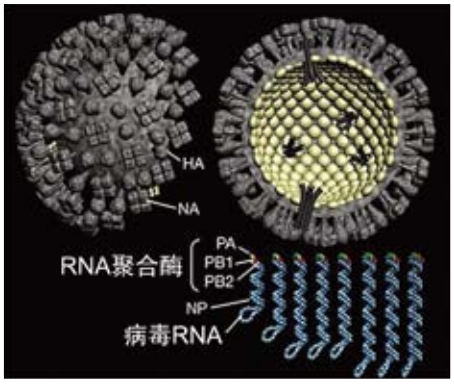

图2 H1N1流感病毒示意图。病毒颗粒被两种表面糖蛋白覆盖，一种为植物血凝素（HA），一种为神经氨酸酶（即NA）。病毒基因组由8条单链RNA片段组成，与核蛋白相互作用，并与聚合酶复合物（PB2、PB1和PA）形成复合物。图片来源：Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus.

疫苗的含义是，凡具有特定抗原性的生物制品接种机体后可诱导机体产生对特定病原的特异性的、保护性免疫力。这些生物制品包括蛋白质、多糖、核酸及载体等。过去常常把细菌性制剂称为“菌苗”，病毒及立克次氏体制剂称为“疫苗”，以细菌代谢产物——外毒素制备的制剂称为“类毒素”。

二十世纪以来，分子生物学和免疫学的迅速发展、各种新技术的出现及其应用极大地推动了新型疫苗的研究。在过去的减毒疫苗和灭活疫苗基础之上，人们希望研制出更加安全、高效的免疫制剂，如近年来研究的核酸疫苗、多肽疫苗以及重组载体疫苗等的制备都已处于迅猛发展的态势。然而，在新型疫苗的研究使用中，人们发现，仅用基因克隆技术获得的一些抗原制备出的疫苗还无法取得有效的免疫保护作用。这提示我们，真正有效的疫苗不仅依赖于鉴定和克隆出能诱导具有免疫保护作用的抗原，还有赖于构建优良的载体系统，研究和评估抗原诱发免疫保护作用的机制和途径。近年来，研究新型疫苗载体，探讨新型疫苗形式，以获得安全、稳定和有效的新型疫苗成为人们关注的热点。

一 新型疫苗载体

按照疫苗研制技术，可把疫苗分为传统疫苗和新型疫苗（表1，图3）。用于制备新型疫苗的载体包括重组细菌、重组病毒、DNA载体、RNA载体、树突状细胞、T细胞以及多肽等。以下着重介绍用于新型疫苗的几种主要载体：重组细菌、重组病毒、DNA载体和RNA载体。

表1 传统疫苗和新型疫苗的大致分类

疫苗类别	定义	疫苗的大致分类			
传统疫苗	运用传统的、常规的方法，用细菌或病毒培养液或含毒组织制成的疫苗	灭活疫苗	减毒活疫苗	由天然生物体某些成分制成的亚单位疫苗	
新型疫苗	应用现代生物工程技术研制的疫苗	重组活载体疫苗	核酸疫苗	T细胞疫苗	树突状细胞疫苗

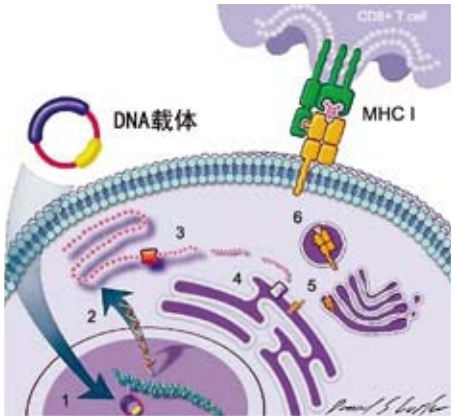

图3 DNA疫苗。载有编码抗原基因的质粒DNA载体，进入细胞核，在核内转录成RNA（1），在细胞质中翻译成蛋白质（2），疫苗来源的蛋白质抗原（3）随后被降解成细胞内小肽（4）。抗原肽结合MHC I类分子（5），抗原肽/MHC I被提呈于细胞表面（6），与CD8+细胞毒素淋巴细胞结合，诱发细胞介导的免疫反应。
图片来源：Investigation of Functionalized Carbon Nanotubes as a Delivery System for Enhanced Gene Expression with Implications in Developing DNA Vaccines for Hepatitis C Virus.

1、重组细菌活载体

重组活菌疫苗，是以某些减毒或者无毒的活菌为载体，将病原体的保护性抗原基因插入细菌的基因组或者质粒DNA中，并使之高效表达的一种新型疫苗。这些活微生物在体内复制时，能够模拟病原体的自然感染并表达这些保护性抗原提呈给宿主免疫系统，这样不仅能刺激机体产生高效持久的体液免疫和细胞免疫，还可以诱发有效的粘膜免疫，产生高效全面的免疫应答。除此之外，重组活菌疫苗还有许多优点。由此可见，重组活菌疫苗与传统疫苗相比具有其独特的优点，并且已经在动物实验及临床研究中显示出良好的前景，是一种极有希望的疫苗形式。

重组活菌疫苗的优点

i. 成本低廉、易于大量生产；
ii. 比其它制剂，如亚单位疫苗具有更长的储存期及更强的稳定性；
iii. 免疫途径简单、易于接种；
iv. 特别适合于大规模的免疫接种等。

目前，被用作重组活菌疫苗载体的微生物主要有两类：一类是经过减毒的微生物，包括减毒的弗氏志贺菌（*Shigella flexneri*）、炭疽芽孢杆菌（*Bacillus anthracis*）、鼠伤寒沙门氏菌（*Salmonella Typhimurium*）、伤寒沙门氏菌（*Salmonella Typhi*）、假结核耶尔森氏菌（*Y. pseudotuberculosis*）和单核细胞增多性李斯特菌（*Listeria monocytogenes*）等；另一类是无毒的微生物，如乳酸杆菌（*Lactobacillus*）等。在临床试验中发现，上述减毒微生物可能会引起免疫抑制，建立潜伏感染，同时存在毒力恢复和外源基因表达不稳定等缺点。而无毒的微生物则存在免疫原性差，难以激起机体有效免疫保护的问题。因而，解决细菌载体的安全性、免疫

原性和外源抗原基因在无抗生素选择压力下能否随宿主稳定遗传等问题是建立有效重组活菌疫苗的关键。

乳酸菌本身是一种对机体既安全又能产生持续免疫力的传递载体。作为一种原核表达系统，乳酸菌表达系统在表达外源基因上有七大特点。

乳酸菌表达系统在表达外源基因方面的七大特点

i. 某些菌种本身带有大量染色体外因子，易建立新的表达载体系统；
ii. 易培养，遗传操作方法成熟、简便、效率高，并且重复性好；
iii. 乳酸菌为食品级细菌，可有效提高基因工程产品的安全性；
iv. 具有活性很高且可调控的启动子系统，可表达毒素基因；
v. 可在细胞内表达，也可在细胞表面进行展示表达或分泌到细胞外；
vi. 乳酸菌安全且没有内毒素，表达的外源蛋白不需经过纯化就可以直接连同菌体一起服用；
vii. 乳酸菌的某些菌株，如乳杆菌对机体有极强的黏附作用，乳酸菌表达的具有治疗或免疫作用的蛋白可以源源不断地在黏膜处产生，持续向机体释放目的抗原蛋白，有效引起机体的免疫应答和免疫耐受，提高在人畜体内的免疫作用。

2、重组病毒活载体

使用存活的病毒作为疫苗可以追朔至1796年。当时Edward Jenner发现牛痘病毒对人体无害，它可以刺激人类的免疫系统产生抗体抵抗更危险的天花病毒。目前，用作载体的病毒主要有痘病毒和腺病毒等。病毒载体，一种是复制缺陷性载体病毒，只有通过特定转化细胞的互补作用或通过辅助病毒叠加感染才能产生传染性后代，所以无排毒的隐患，同时又可表达目的抗原，产生有效的免疫反应；另一种是具有复制能力的病毒，如疱疹病毒、腺病毒和痘病毒等，它们可作为外源基因的载体而保持自身传染性。

痘病毒具有基因组容量大及非必需区基因多的特点，有利于进行基因工程操作，易于构建和分离重组病毒。它还可以插入多个外源基因，并对插入的外源基因有较高的表达水平。如果将编码外壳蛋白的基因（比如乙型肝炎病毒的表面抗原）插入牛痘病毒的基因组则可在牛痘病毒启动子下

插图：Edward Jenner (1749–1823).
图片来源：STEFAN RIEDEL, MD, PHD. (2005) Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *BUMC PROCEEDINGS*, 18(1):21-25.

表达。注射到血液中后，重组病毒的复制不仅导致新的牛痘病毒颗粒产生，还会产生大量的表面抗原，从而对天花和乙型肝炎病毒产生免疫力。因此，构建和利用高效表达痘病毒载体系统成为了表达外源基因的关键一步。由于重组痘病毒不仅能诱导机体产生体液免疫，还能诱导出很强的细胞免疫，因此可以利用痘病毒载体进行重组活疫苗研究。痘病毒作为基因重组活疫苗载体，不需佐剂即可免疫动物，病毒在体内增殖过程中产生的外源蛋白可刺激机体产生免疫反应。总之，痘病毒具有无致癌性、稳定性好、宿主范围广、基因组容量大、非必需基因多、能诱发机体产生很强的体液免疫和细胞免疫等优点。随着对其基因组结构、功能的深入认识和改造，痘病毒将成为分子生物学、基因工程生物活性物质生产、基因重组疫苗及多价疫苗研究的有效工具。

自从分离到第一株人类腺病毒（adenovirus, Ad）以来，目前发现的Ad已有49个血清型。1956年，人类腺病毒4（血清）型（Ad4）被鉴定为美军急性呼吸道疾病的致病因子。自60年代开发出Ad4和Ad7减毒口服活疫苗以来，美国（主要是军人）已有1亿人次口服了Ad4、Ad5以及Ad7活疫苗胶囊，至今无人报告曾发生不良反应，疫苗有效率高达99.7%，从而证实该疫苗安全有效。此外，在人类肿瘤细胞中，目前尚未发现有腺病毒基因的整合，加上腺病毒容易增殖、使用方便、稳定性良好，具有广泛的免疫适应性，既可以在呼吸道增殖，也可以在消化道增殖，因此具备作为活病毒口服疫苗载体的条件。

3、DNA载体

开发DNA疫苗是一种新型疫苗免疫策略，即把一个或几个抗原蛋白的编码基因克隆到真核表达载体上，将此重组质粒转入机体内，使编码基因借助宿主的转录和翻译机制获得表达，进而通过抗原提呈细胞将抗原提呈给免疫细胞，从而激活机体的细胞和体液免疫应答。

DNA疫苗的结构十分简单，它主要由大肠埃希菌来源的质粒组成，没有感染性，只编码目的蛋白质而不包含其它病毒或细菌蛋白质。

针对表面抗原和疫苗的研究证明，在小鼠和人体实验中，流感病毒可以诱导保护性抗体反应。人们通过基因枪免疫途径研究编码流感病毒的不同蛋白HA、NA、M1、NP和NS1质粒的诱导免疫反应能力，结果证明H1-DNA和N1-DNA可以诱导高水平的特异性抗体，并在随后的流感病毒攻击实验中起到很好的保护作用。此外，人们也研究了重组腺病毒载体疫苗对提高NP-DNA疫苗的免疫效率的作用。研究表明，将编码NP蛋白的质粒，经肌内注射初次免疫后，再利用重组腺病毒载体疫苗加强免疫，可以诱导出显著的体液免疫和细胞免疫应答，并且可以帮助小鼠抵抗来自异型流感病毒——高致病性亚型流感病毒的攻击。全球性流感大流行的威胁和传统疫苗的局限性使得DNA疫苗被认为是一种能够替代传统疫苗的免疫策略，值得进一步研究。随着对免疫应答机制的深入了解和分子生物学技术的逐步完善，DNA疫苗将会成为一种强有力的技术平台，以用于预防和治疗多种感染性和非感染性疾病，并在预防和控制流感大流行中发挥重要作用。

4、RNA复制子载体

最近兴起的RNA复制子疫苗，利用了源自RNA病毒的能够自主复制的RNA。它的结构蛋白基因由外源抗原基因取代，保留了非结构蛋白（RNA复制酶）基因。RNA复制酶可使RNA载体在细胞质中高水平复制，实现外源抗原基因的高水平表达，同时诱导细胞免疫和体液免疫应答。大量双链RNA可诱导被感染细胞凋亡，宿主细胞的凋亡有利于免疫系统识别外源抗原。RNA复制子疫苗克服了传统疫苗和普通DNA疫苗存在的缺点，它具有抗原表达效率高、安全性能良好以及应用范围广等优点，因而被视为一种发展前景良好的疫苗形式。将RNA病毒的基因组结构加以改造，构建成RNA载体，制备成疫苗，可激发比传统DNA疫苗更高效的免疫应答。下文将介绍几种可用于制备RNA复制子载体的RNA病毒。

二 RNA复制子病毒

RNA病毒（RNA virus） 也称RNA型病毒，它是核酸为RNA的病毒的总称。艾滋病病毒、烟草花叶病毒、SARS病毒、西班牙流感病毒和甲型H1N1流感病毒等都是RNA病毒。冠状病毒直径为80～160nm，为有包膜的单链RNA病毒。由于RNA病毒缺乏复制校正机制，因此变异很快，由于RNA疫苗要根据病毒的特定基因或蛋白进行开发研制，所以RNA病毒疫苗较难开发。用于开发RNA复制子疫苗的RNA病毒包括：甲病毒、黄病毒、小RNA病毒、副粘病毒和杯状病毒等。

1、RNA复制子病毒种类

1.1 黄病毒

黄病毒（Flavircls）是一大群具有包膜的单正链RNA病毒。这类病毒通过吸血的节肢动物（蚊、蜱和白蛉等）传播而引起感染，故过去曾被归类为虫媒病毒（arbovirus）。在我国，流行的黄病毒主要有乙型脑炎病毒、森林脑炎病毒和登革病毒。

黄病毒有以下几点共性

i. 病毒呈小球形，直径多为40~70nm；
ii. 病毒表面有脂质包膜，其上镶有糖蛋白组成的刺突，包膜内为二十面体对称的核衣壳蛋白；
iii. 病毒基因组核酸为单链正链RNA，病毒均在细胞质中复制；
iv. 病毒对热、脂溶剂和去氧胆酸钠敏感，在pH为3~5的条件下不稳定；
v. 病毒传播媒介是节肢动物（蚊、蜱和白蛉等）。这些节肢动物又是病毒的宿主，人、家畜、野生动物及鸟类动物受其叮咬后感染。