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。

1.2 小RNA病毒

小RNA病毒是由RNA病毒中最小的类群组成的一科病毒。本科成员为22～30纳米的二十面体，壳粒60个，无包膜，含29～32%的连续线性单链RNA，分子量为2.5×10^6。RNA是正链的，它本身具有感染性，能直接作为翻译蛋白的mRNA。RNA外包有由4种主要多肽组成的衣壳，氯化铯浮力密度为1.33～1.45。病毒在细胞质内成熟，常呈晶格样排列。本科下分4属：肠道病毒属、鼻病毒属、心病毒属和口疮病毒属。

1.3 副粘病毒

副粘病毒（Paramyxoviruses）是与粘液蛋白有特殊亲和性的一类病毒。其中的麻疹、呼吸道合胞和新城疫病毒等可感染人或动物，在医学和兽医学中比较重要。该病毒具多形性，比正粘病毒稍大，直径150纳米或更大，有包膜，包膜表面有由糖蛋白构成的脊状突起。病毒颗粒内的核酸是一条ssRNA。

1.4 杯状病毒

杯状病毒（Caliciviridae）具有正链完整RNA。它们不具有包膜，且蛋白壳体为正20面体。由于十分难培养，故研究得不多。Caliciviridae的名字源自于拉丁文calyx，意思为杯状。常见的病原体为诺瓦克病毒（Norwalk virus）。杯状病毒主要经由粪口途径传染，但也可以借由飞沫传染。杯状病毒主要造成肠胃炎、呕吐和腹泻。

1.5 甲病毒（见2. 甲病毒简介）

2、甲病毒概述

2.1 甲病毒的分类

表2 与人类疾病密切的甲病毒

甲病毒中文名称	英文名称/缩写
基孔肯雅病毒	Chikungunya virus, CHIKV
马雅罗病毒	Mayaro virus, MAYV
罗斯河病毒	Rossriver virus, RRV
辛德毕斯病毒	Sindbisvirus, SINV
东方马脑炎病毒	eastern equine encephalomyelitis virus, EEEV
西方马脑炎病毒	Western equine encephalomyelitis virus, WEEV
委内瑞拉马脑炎病毒	Venezuelan equine encephalomyelitis virus, VEEV
阿尼昂尼昂病毒	Onyongnyong virus, ONNV
罗斯河病毒	Ross river virus, RRV

甲病毒属于披膜病毒科（Togaviridae），它是有包膜的正链单链RNA病毒。甲病毒是一类由吸血昆虫或节肢动物叮咬易感脊椎动物而传播的病毒。蚊虫为其主要传播媒介。目前已发现

包括罗斯河病毒（Ross river virus, RRV，图4）、辛德毕斯病毒（Sindbis virus, SINV）、塞姆利基森林病毒（Semliki forest virus, SFV，图5）、委内瑞拉马脑炎病毒（Venezuelan equine encephalomyelitis virus, VEEV）等30个成员。其中与人类密切的病毒（表2）可引起人类和动物产生严重的疾病。

2.2 甲病毒的基因组结构

甲病毒病毒粒子是由一个拷贝的RNA、衣壳蛋白（C）和外膜糖蛋白二聚体（E1-E2）组成的对称二十面体。病毒基因组全长12 kb（SFV 11.5 kb，SIN 11.7 kb），5'末端有帽子结构，3'末端有多聚A尾。基因组分为2个开放阅读框，编码9种蛋白质。基因组5'末端的前2/3部分，编码非结构蛋白，称为非结构区。而3'末端的后1/3称为结构区，也称为亚基因组RNA或26S mRNA。非结构蛋白由基因组RNA转录并翻译而成；结构蛋白则由亚基因组mRNA翻译而成。感染细胞后，病毒RNA首先翻译复制酶复合物，复制酶复合物又反过来驱动自身RNA复制，随后控制合成基因组负链，负链除了能作为基因组正链RNA合成的模板，还能作为亚基因组RNA编码病毒的结构蛋白。

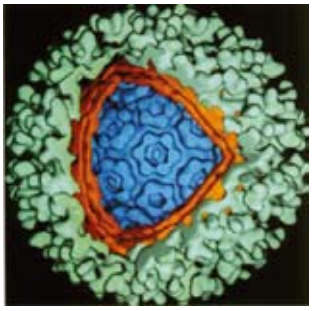

图4 RRV粒子结构示意图。图片来源：JAMES H. STRAUSS, ELLEN G. STRAUSS. (1994) The Alphaviruses: Gene Expression, Replication, and Evolution. *MICROBIOLOGICAL REVIEWS*, 58(3):491-562.

2.2.1 非结构区

甲病毒基因组的非结构区含7600 nt，也称49S RNA。该区共编码四种非结构蛋白nsP1~4（包括RNA复制酶）。甲病毒RNA编码的四种非结构蛋白是一种多聚蛋白（nsP1234，2500 aa），其半衰期很短只有10分钟，所以很快会被nsP2蛋白酶水解。nsP2水解酶活性区域位于C末端，存在类似于木瓜蛋白酶的半胱氨酸蛋白酶结构域。水解最先发生在nsP3和nsP4之间，将前体多聚蛋白水解成nsP123和nsP4。最后，nsP123被水解成nsP1、nsP2和nsP3（图6）。nsP4（SFV 614 aa，SIN 610 aa）具有RNA依赖的RNA聚合酶活性，其活性区域位于c末端，也包括GDD（Gly-Asp-Asp）基序。突变SIN病毒的nsP4中153位的Gly变为Glu，结果RNA合成受到抑制。被甲病毒感染的细胞中，nsP4的数量较其它nsPs低，这是因为它受到了终止密码子的抑制。另外，nsPs也易被N末端蛋白体降解。nsP3的作用尚不清楚，但研究表明它与病毒复制、负链RNA和亚基因组RNA的合成有关。另外，nsP3还具有细胞膜结合活性。nsP2具有多种功能，它包含两个结构域：N-末端的RNA/DNA解螺旋酶和C末端的半胱氨酸蛋白酶结构域。nsP2（SFV 799 aa，SIN 807 aa）通过直接或者间接与26S RNA启动子作用，调控亚基因组RNA的合成。nsP1（SFV 537 aa，SIN 540 aa）也是组成复制酶的重要蛋白质，它参与了基因组和亚基因组mRNA的加帽反应。

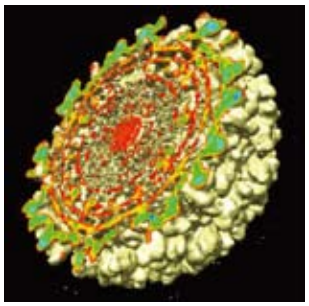

图5 SFV粒子结构示意图。图片来源：http://ncmi.bcm.tmc.edu/ncmi/events/workshops/workshops_7/proceeding/semliki.pdf

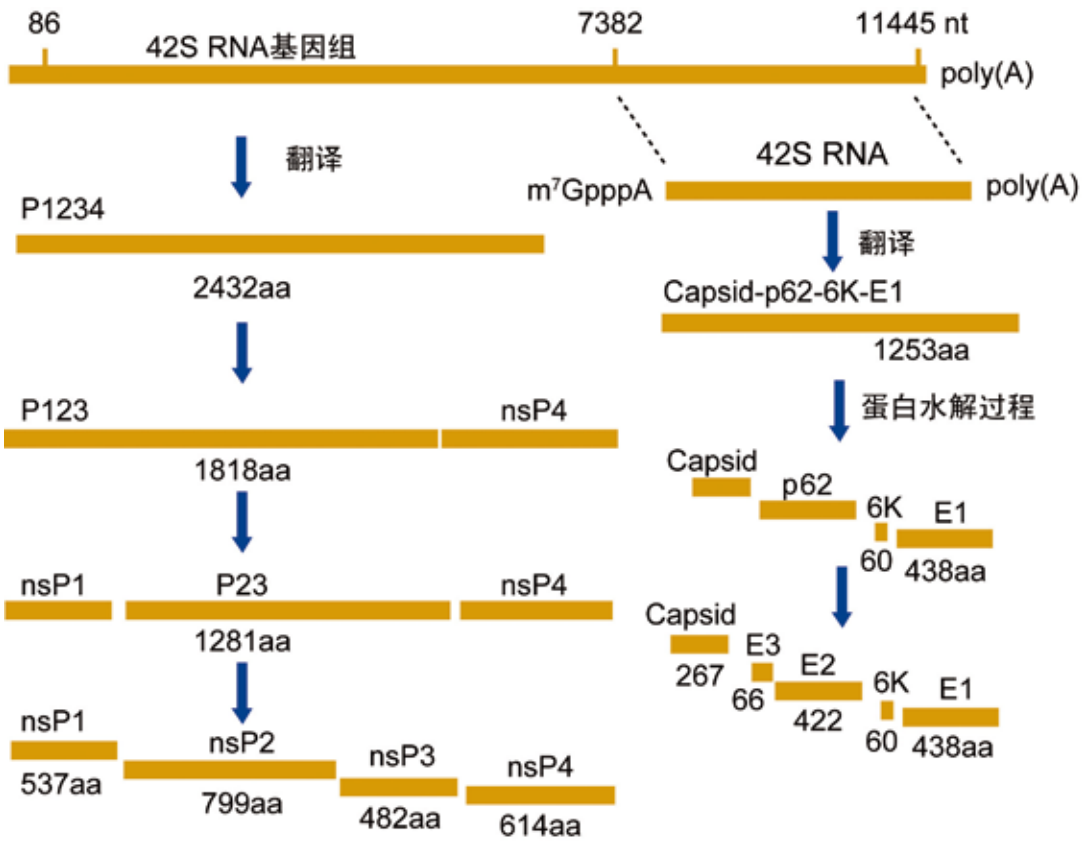

图6 SFV结构与非结构蛋白的翻译及蛋白酶解加工过程示意图。
图片来源：http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/eri/biote/vk/salonen/pathwayf.pdf

2.2.2 结构区

甲病毒基因组的结构区约4100 nt，编码五种蛋白质的聚蛋白前体NH2-capsid-p62（E3+E2）-6K-E1-COOH，在宿主和病毒编码的蛋白酶作用下，产生壳蛋白C及胞膜蛋白E1、E2和E3。跨膜的E1-E2二聚体与分泌型的E3形成三聚体，构成刺突蛋白。壳蛋白C和基因组RNA的复合体形成二十面体核衣壳，与跨膜E蛋白的胞浆区相互作用，使病毒由浆膜芽生。在基因组RNA非结构与结构基因结合区的核苷酸序列是亚基因组RNA的启动子，在亚基因组RNA起始上游的19 nt和下游的5 nt是起始转录的最小序列，在甲病毒中具有高度保守性。当最小启动子的侧翼序列存在时，可大大提高亚基因组RNA的转录水平。基因组5'端（位于nsP2编码区）有一个特异识别信号，它作为加壳的位点，可以保证基因组被包装成病毒颗粒。

2.2.3 基因组保守序列

甲病毒基因组核酸序列中具有4个完全相同的区域，它们被称为序列保守区（表3）。一般说来，基因组序列愈保守，在功能上就愈重要。

表3 甲病毒基因组核酸序列中的4个序列保守区

保守区	保守区特点
第一保守区	由基因组5'端帽结构之后的44 nt组成，成带柄环状结构，具有启动子功能
第二保守区	紧接第一保守区，由51 nt组成，其功能目前尚不清楚
第三保守区	在基因组49S与26S mRNA的接合部，由24 nt组成，为26S RNA的转录启动子
第四保守区	在基因组3'末端，其后多为多聚腺苷酸尾，由19 nt组成，也称为19核苷酸保守区

2.2.4 基因组3' 末端重复序列

在基因组3'末端的核苷酸序列有一长度在40~60碱基的重复序列，所有的甲病毒都有重复序列，但其重复序列的长度、碱基排列的顺序、重复序列之间的距离以及重复序列距终止密码子的距离都不相同，但相同病毒不同地理株的病毒却基本一致。因此，甲病毒基因组的3'末端重复序列可作为甲病毒属内鉴定的根据。

3、甲病毒复制子载体与基因疫苗

3.1 甲病毒复制子疫苗的发展历程

在人类与疾病抗争的历史中，预防工作一直是极为重要的环节之一，疫苗则是人们预防疾病的一大法宝。回顾历史，疫苗经历了三次重大变革，核酸疫苗技术被誉为“疫苗的第三次革命”。DNA疫苗出现至今仅十年，但已经广泛用于预防传染性和恶性疾病。虽然基因疫苗技术有了显著进步，但是还存在许多不足之处。

DNA疫苗主要有以下几点不足

i. 核酸疫苗能长期在体内表达，引起机体过量免疫或产生免疫耐受现象，最终导致机体免疫抑制；
ii. 外源基因进入机体后，可能会与宿主的基因发生整合，导致宿主细胞肿瘤基因发生活化且进入宿主细胞的DNA最终去向不明；
iii. 持续的抗原表达所激起的强烈CTL应答可能会对机体其它细胞产生毒性杀伤作用。

鉴于DNA疫苗的缺陷，人们设想用RNA替代DNA作基因疫苗。从理论上讲，RNA疫苗不会与宿主染色体DNA直接结合，可降低基因的插入突变和整合的概率，这样既能克服DNA疫苗可能引起细胞转化的潜在危险，也能解决DNA通过核膜的困难，限制其高效表达的缺陷。但是

RNA容易降解、稳定性差，且体内转移效率低，这无疑限制了RNA疫苗的使用。随后，有人采用具有“自我复制”功能的RNA疫苗来增强RNA疫苗的免疫效应。Ying等人构建了包含野生型甲病毒SFV RNA复制酶的RNA载体，肌内注射0.1 μg即可诱导产生抗原特异性抗体和CD8+T细胞反应。此RNA载体免疫可保护小鼠免受肿瘤攻击，延长荷瘤小鼠的生存期。

对“自主复制型”RNA疫苗研究的成功开展，为新型核酸疫苗的研究提供了一条新的思路，但这种以甲病毒复制子为载体的RNA疫苗需要进行体外转录和加帽，其操作、保存及运输都不方便，而且成本较高，这对于许多疫苗，尤其是兽用疫苗的推广应用是一大障碍。随着病毒cDNA感染性克隆的建立，研究人员开展了以甲病毒复制子为基础的“自杀性”DNA载体的研究。“自杀性”DNA疫苗（suicidal DNA vaccine）是基于常规DNA疫苗和“自主复制型”RNA疫苗（self-replicating RNA vaccine）的基础，为了克服一些目前基于DNA和RNA基因疫苗的低效问题而发展起来的一种新的疫苗设计思路。Berglund等人证明，利用辛德毕斯病毒构建的表达LacZ的质粒DNA，在小鼠体内诱发了高于常规DNA载体100~1000倍的免疫应答。

“自杀性”DNA疫苗充分利用甲病毒复制子的自主复制功能，在病毒非结构蛋白基因上游插入强启动子元件（如CMV的早期启动子/增强子），直接在体内启动全长基因组的转录，一旦由强启动子驱动的甲病毒非结构蛋白编码的复制酶复合物合成，便可介导细胞浆内重组RNA的大量复制，从而导致外源基因编码的mRNA的高水平表达，激发很强的免疫反应。同时，甲病毒复制子能在短时间内诱导被转染细胞发生凋亡（一般为2~5 d），而凋亡产生一系列“危险信号”，不仅可使表达抗原更易被树突状细胞摄取，而且还能激发许多免疫刺激因子（如HSP、IFN和PKR）的产生。

“自杀性”DNA疫苗不仅具有“自主复制型”RNA疫苗的安全性与有效性，而且结合了常规DNA疫苗的优点，可突破免疫耐受，这使得自主复制型”RNA疫苗成为近年基因疫苗发展的重大突破。“自杀性”DNA疫苗这一创造性的疫苗设计，一方面提高了常规DNA疫苗的安全性和有效性，另一方面也避免了RNA疫苗不易制备、运输和保存等不足。“自杀性”DNA疫苗是核酸疫苗研究的一个新的里程碑，具有广阔的应用前景。可以预测，在今后一段时间，基于甲病毒“自杀性”DNA疫苗的研究将形成核酸疫苗研究的又一高潮和热点。

3.2 甲病毒复制子结构以及递送方式

甲病毒复制子包含病毒基因组5'和3'末端的顺式作用序列和全部非结构蛋白基因，其病毒结构蛋白基因被外源基因所取代（图7）。RNA复制酶可以使RNA在胞浆中高水平复制，从而极大提高基因的表达水平。单细胞中4 h内有近2×10^5拷贝RNA产生。

表达外源蛋白的RNA复制子可由三种方式递送

i. 体外转录的裸RNA（基于RNA）；

ii. 构建成质粒DNA，由细胞RNA聚合酶II体内转录成复制子RNA（基于DNA）。质粒DNA直接转染细胞，在CMV启动子控制下由细胞RNA聚合酶Ⅱ胞内转录成复制子RNA，再在复制酶控制下复制RNA。外源基因由亚基因组mRNA启动子（26S subgenomic mRNA promoter）控制转录成mRNA，并高水平表达；

iii. 由辅助RNA反式提供结构蛋白将复制子RNA包装入病毒复制子颗粒（VRP）（图8）。

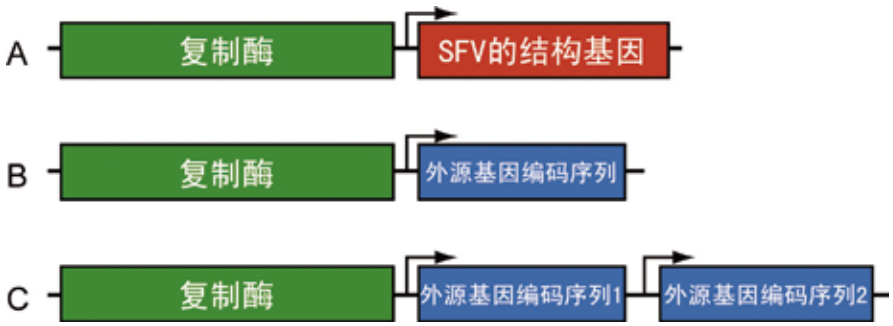

图7 甲病毒复制子载体的构件。SFV载体家族来自有感染能力的SFV病毒RNA的cDNA（A）。外源基因编码序列替代SFV的结构基因部分，构建成普通的表达载体（B）。这种重组的RNA具有自我复制能力，这样即可建立在转染的动物细胞中高效表达外源序列的技术。这一系统也适合表达两个外源基因（C）。图片来源：http://www.sfvectors.ed.ac.uk/

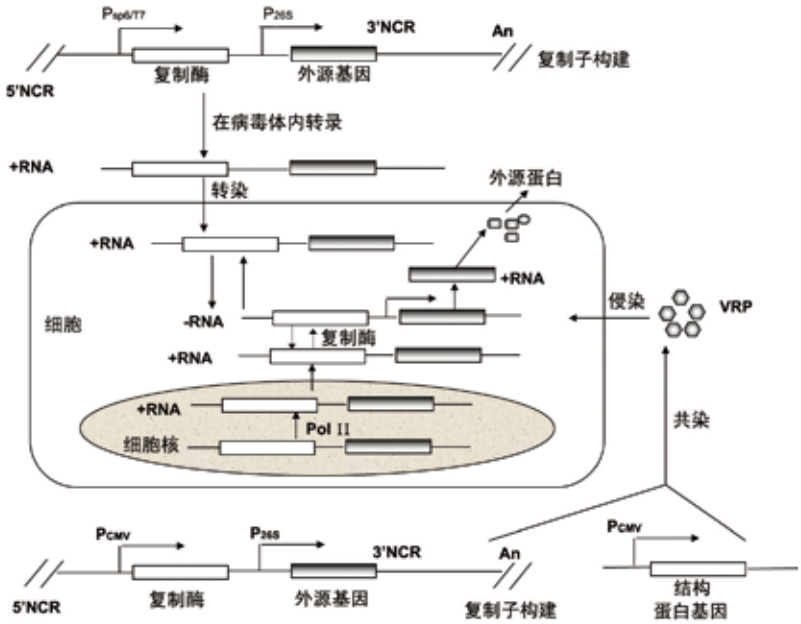

图8 RNA复制子递送方式。$P_{SP6/T7}$: SP6/T7 RNA聚合酶启动子；P26S: 26S 亚基因组RNA启动子；P_{CMV}: 巨细胞病毒直接早期启动子；Pol II: RNA 聚合酶II ; VRP: 病毒复制子颗粒。图片来自：仇华吉, 李卫平, 童光志．(2003) RNA复制子疫苗. 中国生物工程杂志, 23(3): 44-49.

3.3 甲病毒复制子载体种类

为了提高甲病毒载体的安全性和稳定性，根据甲病毒转录、复制及其包装的特征以及原核和真核细胞表达外源蛋白的特点，人们构建了多种形式的甲病毒载体以用于目的蛋白的表达。根据表达外源序列的方式不同，可以将甲病毒载体分成三类：复制-包装型载体（复制型载体）、RNA复制子载体（复制缺陷型载体）以及DNA-RNA载体。

3.3.1 复制-包装型载体（复制型载体）

这种载体携带有编码病毒结构蛋白的亚基因组启动子，感染宿主细胞后可产生子代病毒颗粒。目的基因插在全长的甲病毒基因组中，在病毒复制过程中获得表达。有复制能力的病毒颗粒感染宿主细胞后可产生明显的病毒复制。Levis等人通过缺失突变研究确定了亚基因组转录起始位点下游的2 nt和上游的19 nt为亚基因组启动子。外源基因前加上亚基因组启动子，然后置于结构基因的5'端或3'端，便构建成了含有两个启动子的复制包装型载体（dsSIN）。这种载体能够自我复制和包装，重组病毒滴度可达10^8/mL-10^9/mL。由于包装容量的限制以及长期传代的不稳定性，dsSIN重组子插入外源基因的容量较小，通常为2kb以下。

3.3.2 RNA复制子载体（复制缺陷型载体）

此类载体携带病毒非结构蛋白基因（复制酶基因）和外源基因，与携带病毒结构蛋白基因的辅助载体共同包装成甲病毒颗粒，由此构建成的甲病毒颗粒具有感染宿主细胞的能力。由于病毒的结构蛋白基因不能表达，不能产生子代病毒颗粒，因此只能获得短暂的转基因表达，此种复制缺陷性载体又被称之为“自杀性载体”。1989年，Xiong用氯霉素乙酰转移酶基因（CAT）替换了感染性SIN的结构蛋白基因，同时采用辅助的SIN，以提供包装所需的结构蛋白，这种SIN复制子RNA可在宿主细胞内稳定存在至少7个病毒感染周期。而在转染细胞16~20h后，每个细胞内的CAT多肽可达10^8个拷贝。Liljestrom构建了将结构基因和非结构基因分开的SFV表达载体系统。在这一系统中，非结构蛋白上游为噬菌体SP6或T7聚合酶启动子，病毒的结构基因编码区被删除，但仍含有包装信号（VPs）以及亚基因组启动子。插入的外源基因位于甲病毒的26S亚基因组启动子和3'非翻译区及转录终止信号序列A69之间。病毒辅助质粒载体含有完整的结构蛋白基因和主要的顺式调控作用元件。辅助质粒缺乏包装信号。这种结构必须通过SP6或T7RNA聚合酶启动子在体外对“全基因组”进行转录和加帽，获得5'端含有帽子结构的重组RNA，用于体外表达或免疫动物。由于这种系统以原核启动子（SP6）启动，表达效率不高，同时因RNA的转录和加帽，增加了试验操作的不便。

3.3.3 DNA-RNA载体

上面介绍的载体在使用前都需要先在体外转录成RNA，然后再转染到细胞中，操作过程比较繁琐。如果能直接将DNA转染到细胞中，表达外源基因的病毒载体的操作将大大简化。为了使用方便，发展了DNA/RNA序贯式表达的载体系统。其特点是：可以将携带病毒复制酶基因和外源基因的重组质粒DNA载体直接转染宿主细胞；然后由RNA多聚酶Ⅱ表达序列启动自我复制RNA载体的转录，在宿主细胞内完成外源基因的高效转录与表达过程。使用这种技术，甲病毒载体重组质粒DNA可被直接用于转染和表达的研究。

Diciommo等人将RNA复制子系统改建成了以DNA为基础的甲病毒载体，又称DNA－RNA系统。这种载体为携带了病毒复制酶基因和外源基因的重组质粒DNA，它缺失了病毒结构蛋白基因。DNA－RNA载体通过RNA聚合酶Ⅱ依

赖性的表达序列，如人巨细胞病毒（CMV）早期启动子/增强子，启动自我复制的甲病毒载体的转录。同时，它在甲病毒本身的终止信号（A69）后插入强转录终止信号SV40poly（A），正常终止转录，并在RNA的3'末端加上polyA(A)尾，进一步增强了自身稳定性。该质粒DNA转染宿主细胞后，可利用宿主RNA聚合酶Ⅱ在细胞核内转录，合成甲病毒复制酶，再合成亚基因组RNA及大量外源蛋白。DNA质粒载体克服了甲病毒RNA复制子疫苗必须进行体外转录和加帽以及操作、保存和运输均不便的缺点。HerweiJer等人把辛德毕斯病毒的cDNA置于劳氏肉瘤病毒长末端重复序列启动子的下游，组装入pBS质粒，转染3T3、HepG2和293等哺乳动物细胞，均有绿色荧光蛋白报告基因的表达。将质粒转染大鼠肌肉也可获得高效表达。在分化的肌细胞中，表达水平比传统的RSV表达载体高出200倍。质粒性辛德毕斯病毒载体体内表达也是瞬时型，转染5天后表达量开始下降，最长持续到16天左右。

最新研究表明：作为疫苗载体，质粒型辛德毕斯病毒载体比普通的带有巨细胞病毒启动子的质粒能更为有效地诱导机体的体液和细胞免疫应答。用10ng表达HSV-1糖蛋白B的质粒型辛德毕斯病毒载体即可诱导CTL前体细胞，使小鼠对HSV-1产生保护性免疫反应。质粒型辛德毕斯病毒载体最大的优点是操作简便、安全性好，可避免重组野病毒的出现。

3.4 甲病毒复制子疫苗优点

第一代疫苗是简单的减毒病原体，这种疫苗在许多疾病的防治中获得了巨大的成功，但当病原体减毒量不足时，有导致感染的危险。通过严格的减毒来增加疫苗的安全性则会导致其效力降低。而基于甲病毒复制子的疫苗则具备简单、低价等优点（表4）。

表4 基于甲病毒复制子的疫苗具备七项优点

特点	详细介绍
简单	RNA仅编码目的基因
低价	mRNA能够在体外大量合成
安全	RNA在细胞中的半衰期短，编码蛋白后RNA很快降解，没有整合入被转染细胞基因组的危险
	注射的RNA分子能在宿主细胞质中直接翻译成蛋白质，而不像DNA疫苗需在细胞核中转录，所以它不依赖于宿主的转录因子
	RNA复制子导致转染细胞溶解，避免了有复制能力病毒的产生
	复制子系统能自主复制，但不能自行包装为感染性病毒颗粒，因此也被称为“自杀性”疫苗
复制效率高	用量远远低于常规DNA质粒就能诱导免疫应答，转基因表达水平极高，可诱导很强的免疫应答
免疫效果好	可同时诱导全身免疫和粘膜免疫、抗体应答和CTL反应
宿主范围广	甲病毒复制酶能在广泛宿主细胞（包括哺乳动物、鸟类、爬虫类、两栖动物和昆虫的细胞）中发挥作用
用途广	可用于防治传染病和肿瘤等
	甲病毒载体能通过使用一种基因编码RNA复制酶，包含RNA复制酶的载体比常规的载体具有更高的免疫原性，仅以0.1 μg的剂量免疫小鼠核酸一次肌肉注射

4、RNA复制子基因疫苗高效的机制

基于复制酶的DNA疫苗比常规DNA疫苗具有显著的免疫性和高效性。实际上，毫微克的基因复制酶的疫苗就能诱导产生抗原特异性的抗体和CD8+T细胞反应。自我复制载体转染细胞能在细胞凋亡前短暂地产生大量抗原。该凋亡可能是一种能超激活树突状细胞（dendritic cells, DC）的双链RNA介入的结果。这样，自我复制型基因疫苗能增强免疫原性可能是产生dsRNA的结果，这种dsRNA类似RNA病毒感染宿主细胞的过程，它可将抗原编码基因置于甲病毒RNA复制酶的控制之下，用来增强抗原表达和提呈。

出乎意料的是，体外基于复制酶构成物的抗原表达水平不一定比获得的常规DNA或RNA载体更高。抗原表达水平和免疫原性增加的不一致性表明该过程可能包含其它机制（图9）。

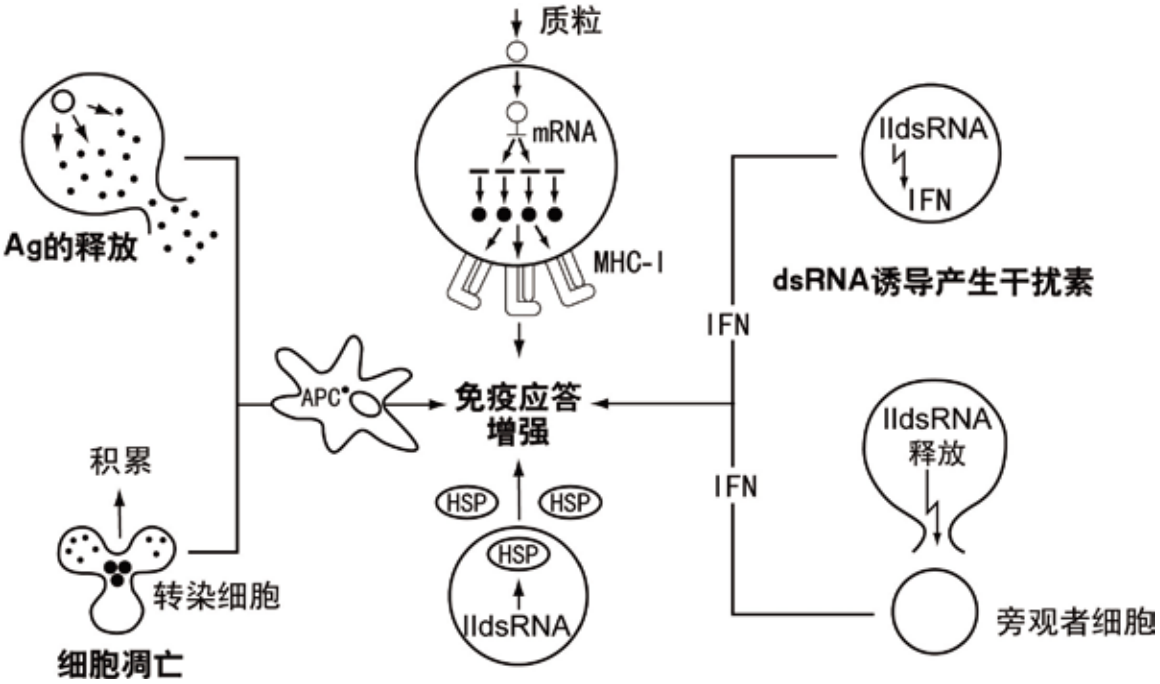

图9 RNA复制子基因疫苗高免疫原性的机制。自我复制基因疫苗高免疫原性的潜在要素。被转染细胞抗原的积累可高效诱导MHC-I分子的产生。危险信号可能会生成干扰素，来自感染的细胞产生的干扰素是由于双链RNA的存在造成的。干扰素也可能由旁观者细胞产生，而这些细胞是被由死亡的细胞，溶解的转染细胞释放的双链RNA而激活。热休克蛋白（HSP）也被证明是细胞中双链RNA的存在而产生。载有抗原的凋亡细胞被APC摄入也能够激发强大的免疫反应。最后，转染细胞的注入点大量释放的抗原可能被摄入APC。图片来源：http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1986720/

基于复制酶的DNA疫苗和常规DNA疫苗之间的基本差别是被转染的宿主中存在病毒样RNA的复制。基于复制酶的基因疫苗转染宿主细胞后能触发一系列危险信号。基于复制酶的DNA或RNA体外诱导宿主细胞凋亡正如甲病毒感染诱导宿主细胞凋亡一样，这些凋亡的细胞可能被树状突细胞选择提呈到免疫系统。自我复制基因疫苗的转染也可能引起转染的细胞或旁侧细胞中热休克蛋白（heat-shock protein, HSP）的产生。dsRNA在复制型基因疫苗产生免疫原性中可能起到了重要作用。dsRNA由RNA病毒感染的细胞产生，它被看作自我复制型基因疫苗传递后

复制酶介导的mRNA的中间体。dsRNA自身是一种干扰素的有效诱导剂，病毒来源的dsRNA能在细胞和体液免疫反应中起到强大的辅助作用。

已知许多分子与dsRNA有关，并且能被dsRNA激活，例如2'-5'腺苷酸（2-5A）合成酶和RNA蛋白激酶（protein kinase-RNA, PKR）。2'-5'腺苷酸合成酶系统通过2-5A的合成促进干扰素抗病毒效果和自身RNA酶的活化，它能降解病毒和细胞的RNA。PKR的表达能诱导干扰素的产生并被干扰素所诱导。然后，PKR被dsRNA活化从而磷酸化自身的底物，包括eIF2，结果导致翻译过程受到抑制，进而抑制病毒的复制。

dsRNA引起的细胞凋亡可能是由2-5A系统诱导的RNA酶和PKR的一些底物介导发生的。INF-γ使dsRNA引起的细胞凋亡效果成为可能（图10）。病毒和细胞中的一些因子能够抑制病毒感染细胞的凋亡，如牛痘E3L、HIV-1的Tat蛋白和细胞的P85IPK。病毒编码的抑制因子容许病毒的有效复制，而逃脱细胞的防御机制。虽然自我复制基因疫苗转染细胞引起的凋亡可能增强了免疫原性，但是同时其免疫效果也可能被宿主细胞的快速死亡所限制。这往往是因为缺少编码凋亡抑制因子的序列，导致不能延迟细胞凋亡所致。细胞凋亡的控制可能成为疫苗学家探索的雷区。

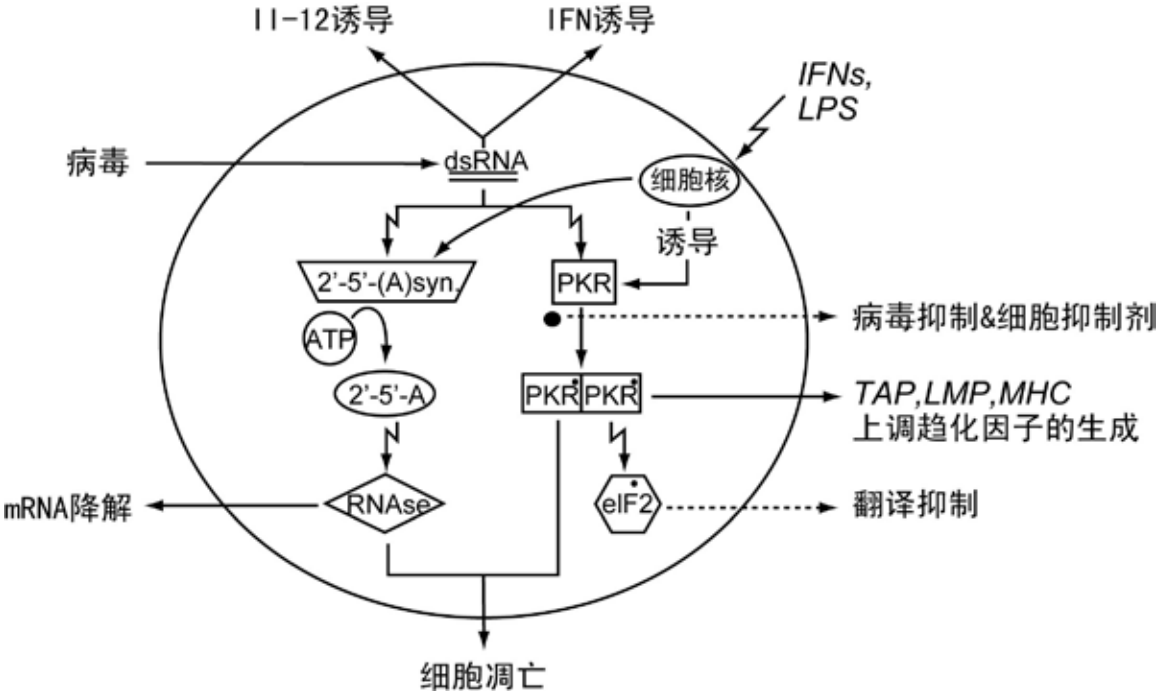

图10 RNA复制子基因疫苗dsRNA在细胞和体液免疫反应中起重要作用。dsRNA在复制型基因疫苗产生免疫原性中可能的重要作用。dsRNA由RNA病毒感染的细胞产生，它被看作自我复制型基因疫苗传递后复制酶介导的mRNA的中间体。dsRNA是干扰素的有效诱导剂，反过来也诱导PKR和2-5A合成酶的表达。这些酶被双链RNA激活后介导其中一些与病毒感染相关的细胞内反应，包括细胞凋亡，目的是防止病毒蔓延。这些酶被激活后产生的“危险信号”可以增强基于复制子的基因疫苗的免疫原性，并起到免疫佐剂的作用。图片来源：http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1986720/

甲病毒基因组编码一种用于病毒在宿主细胞质中有效复制病毒基因组的复制酶。既然这种机制不依赖于宿主细胞的酶，所以它能广泛在各种类型的细胞或物种中起作用。这种类型的RNA疫苗能在体内和体外有效补偿RNA降解。在理论上，宿主细胞仅需选取单分子的这种自我复制RNA就能产生足够量的抗原来诱导免疫应答。Leitner等人的试验证明了转染自我复制RNA

（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。

三 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。