

DNA 疫苗及其在家禽上的应用前景

曹永长 毕英佐

(华南农业大学动物科学系, 广州 510642)

摘要 介绍了 DNA 疫苗的概念、免疫机制及一般的研究方法, 阐述了 DNA 疫苗在控制家禽疫病方面的应用前景。

关键词 DNA 疫苗; 免疫应答; 家禽; 应用前景

中图分类号 Q 527.5; S 852.4

在控制各种疫病, 特别是病毒性疾病方面, 疫苗仍然是最佳的选择. 100 多年来, 都是以蛋白质和蛋白类的物质作为主要的免疫原. 无论用致弱的病毒或灭活的病毒作疫苗, 还是用基因工程的方法生产亚单位疫苗, 都是利用病原体的蛋白质来刺激机体的免疫系统, 从而达到防止病原入侵的目的. 但这种蛋白质疫苗并不能解决所有的问题, 免疫失败的例子是经常发生的. 因此, 人们多年来都在致力于寻找某种新形式的疫苗.

DNA 疫苗就是最近几年发展起来的一种新的免疫方式. DNA 疫苗技术又称为 DNA 介导的免疫, 研究者们改变了以往以蛋白质作为抗原的传统, 直接将携带编码抗原蛋白的质粒导入机体内. 这种裸露的 DNA 进入机体的细胞之后, 可以导致强烈的免疫反应, 包括体液免疫反应和细胞免疫反应, 使机体获得抵抗病原感染的能力.

DNA 疫苗技术以 Ulmer 等(1993)的著名论文《注射编码病毒蛋白的 DNA 而获得对流感的交叉保护》为标志, 被认为是免疫学方法上的一次突破, 其重要性可以和过去 100 年里免疫技术的两大进展相媲美. 如果将巴斯德及后来的人们所研制的减毒疫苗或灭活疫苗作为第一代疫苗, 将由于基因工程的兴起而出现的重组蛋白疫苗或亚单位疫苗作为第二代疫苗, 那么 DNA 疫苗可以称为第三代疫苗. 有人断言, 从它所表现出来的免疫效果及制作成本等多个方面的优势来考虑, DNA 疫苗无疑是将来的最佳选择 (Dixon, 1995; Hildegund et al, 1996).

1 DNA 疫苗的潜在优势

DNA 疫苗的研究虽然只有短短 3 年的历史, 但已经吸引了大量的研究人员从事这一领域的研究. 国际互联网(Internet)专门开辟了一个网点(E-mail 地址是 <http://www.genweb.com/Dnavax>), 以便于从事该领域研究的科学家互相交流, 从而促进 DNA 疫苗技术的发展, 使其早日服务于人类. DNA 疫苗如此受到重视, 是和它本身的优势分不开的.

1.1 DNA 疫苗能引起强烈而持续的免疫反应(Whalen et al, 1995)

将编码某种特定蛋白质的 DNA 片断和质粒在体外重组之后, 直接导入机体的细胞之内, 在不存在任何其他佐剂的情况下, 可以引起强烈的免疫反应. 这些免疫反应不仅包括抗体的生成和 T-细胞的激活, 而且还会产生细胞毒性 T 淋巴细胞. 这样, DNA 疫苗不仅能使

机体获得抵抗病原体入侵的能力,而且有可能用于肿瘤疾病的治疗,为人类最终战胜癌症带来曙光。此外,DNA疫苗提供的免疫保护是长期的。用流感病毒DNA疫苗免疫一年之后,小鼠还保持了完全抵抗同源毒株致死剂量攻击的能力。

1.2 DNA疫苗在宿主细胞中表达的抗原更真实

传统的弱毒疫苗或者灭活疫苗,在制作过程中,其蛋白质结构会发生不同程度的改变,因而使其免疫效果减低。而DNA疫苗在宿主细胞中表达抗原,不会有这种危险,比传统疫苗更接近于病原体原来的结构,因而免疫效力更高。

1.3 DNA疫苗制作工艺简单

简单来说,DNA疫苗就是携带了编码蛋白质的质粒。从理论上讲,只要获得了编码某种抗原的基因,就可以用DNA体外重组技术将该基因插入到合适的质粒载体上,从而获得DNA疫苗。这样就免去了外源DNA在体外表达及表达后纯化的繁琐程序,减低了DNA疫苗的制作成本。

1.4 DNA疫苗便于贮存和运输

质粒DNA非常稳定。如果将DNA疫苗在使用前制成干粉,可以保存在常温下而不会遭到降解。这样就不需要“冷链”运输和贮存,大大降低运输和贮存成本,特别是给偏远地区运输和使用疫苗提供了极大的方便。

1.5 DNA疫苗的安全性

DNA疫苗在投入使用前,必须要考虑它的安全性。包括:①作为疫苗的DNA会不会插入到宿主细胞的基因组中?如果整合到细胞基因组中,这种插入引起的突变对机体的危害性有多大?目前还没有证据表明质粒会插入到宿主的基因组中,但尚需进一步验证。②DNA疫苗能在宿主细胞中长期表达抗原,会不会对免疫系统有什么不良的影响?③DNA疫苗会引起针对DNA本身的免疫应答吗?即会不会产生针对DNA的抗体?当然,可能还有其他问题。但是,作者对DNA疫苗的安全性是抱乐观态度的。在法国,有一种由鲑鱼精子DNA组成的药物在市场上卖了约30年,该药物能提高人体的免疫机能。从用量上看,每天用量125~250 mg,与目前DNA免疫一次的量相当(Whalen et al. 1995)。

2 DNA疫苗研究的一般步骤

几年来,研究者们报道了各种DNA免疫的试验模型。其中所涉及的病原大多数是病毒(表1)。因为DNA疫苗进入宿主之后,需要利用宿主细胞来表达抗原,所以DNA疫苗的作用过程看起来和病毒感染相似。

2.1 选择用来作为抗原的DNA片断

一般选用编码病原的主要免疫原的基因,也可以是其他基因,主要根据研究的目的来决定。如果是用聚合酶链反应(PCR)扩增的DNA片断,最好能测定它的核苷酸序列。有时为了需要,还要对DNA片断做适当的修饰。

2.2 挑选表达载体

CMV和RSV启动子是目前应用最多的真核表达的载体。一般情况下,都会挑选较强的启动子,以使DNA在真核细胞中得到较好的表达。但如果某种蛋白质的过度表达会对宿主细胞造成毒害,选用较弱的启动子(如SV40)可能更好。

表 1 DNA 疫苗的动物模型¹⁾

病原	抗原基因	试验动物
牛疱疹病毒	糖蛋白	牛、小鼠
乙型肝炎病毒	核心蛋白	小鼠
乙型肝炎病毒	衣壳蛋白(表面抗原)	小鼠、兔、大鼠、黑猩猩
丙型肝炎病毒	核心蛋白	小鼠
复合疱疹病毒	糖蛋白 B、糖蛋白 D、ICP 27	小鼠
人类免疫缺失病毒. 1 (HIV-1)	表面糖蛋白 gp160 非感染性颗粒	小鼠 猴 猿
房尘虱	变态反应原	大鼠
流感病毒	凝集素 基质蛋白 核蛋白	鸡、小鼠 猿、猴 白鼬
Leishmania major	主要表面糖蛋白	小鼠
狂犬病毒	糖蛋白	小鼠
脉管丛脑膜炎病毒	糖蛋白、核蛋白	小鼠
结核分枝杆菌	hsp 65	小鼠
乳头瘤病毒	主要核衣壳蛋白 L 1	兔

1) 资料来源: DNA vaccine web (URL: <http://www.genweb.com/Dnavax/Ammounce/table.html>)

2.3 插入片断与载体的体外重组及检测

抗原与载体的体外重组可按一般的方法进行, 重组 DNA 可保存于适当的盐溶液中. 在进行 DNA 免疫之前, 还要用重组 DNA 转染哺乳动物细胞系(如 CDS, 3 T 3 或肌肉细胞系等), 以验证载体将 DNA 带入细胞后, 能否使之表达出正常的蛋白质. 可以采用免疫荧光技术或 Western blotting 来检测相应的蛋白质. 如果表达蛋白应是分泌型的, 则应该检测培养细胞的上清液中是否有相应的蛋白质.

2.4 确定 DNA 免疫的途径

质粒 DNA 是不能直接进入细胞的. 一般采用以下几个途径使质粒 DNA 进入动物细胞: ①通过肌肉注射或皮下注射的方式将 DNA 导入细胞; ②用 DNA 包被的全粒子轰击细胞, 从而将 DNA 导入细胞的方法可能是一个更好的方法. 将这一方法用于皮肤组织, 用较少的 DNA 就产生了比肌肉注射或皮下注射更好的免疫应答(Fynan et al, 1993). ③还有人采用滴鼻的方法, 将纯 DNA 溶液导入鼻膜, 也能将 DNA 导入, 但效率就远没有预期的好(Fynan et al, 1993).

2.5 将 DNA 导入动物体内及免疫效果的评价

如果所选择的载体合适, 而且挑选的基因所表达的蛋白质又有足够的抗原性的话, 2 周后将会检测到抗体, 在以后的 4~8 周时间里, 抗体水平还会上升(Michel et al, 1995).

如果 1 个月后还没有检测到抗体, 当然应该将动物继续喂养更长一段时间. 但同时应该考虑以下两种可能性: ①第一次没有真正将 DNA 导入细胞之内, 或者 DNA 的量不足够, 这可以通过第二次免疫来弥补. ②可能存在 CTL 活性. 缺少抗体应答, 可能正是该系统发挥正常功能的表现. 如果抗原是来自于致病粒子的话, 最好的验证方法就是进行攻毒保护试验.

除了检测相应的抗体, 或用攻毒保护试验来验证动物是否产生免疫应答以外, 还可以直接检测外源 DNA 是否真正进入了动物细胞. 一个方法是用 PCR 技术检测动物细胞内是否存在外源 DNA, 但即使成功检测到有外源 DNA 的存在, 也不能保证这些 DNA 就一定得到

正确的表达. 所以, 另一个方法就是采用免疫荧光技术, 从血液或肌肉组织中直接检测这种蛋白质(Davis et al, 1993).

3 DNA 疫苗的免疫机制

3.1 质粒 DNA 进入宿主细胞

携带抗原基因的质粒载体转染细胞是 DNA 疫苗免疫的第一步. 一般来讲, DNA 进入细胞是相当困难的. 但肌纤维细胞似乎特别适合于环状 DNA 的进入. 这可能是由于肌肉注射时对肌肉细胞造成了创伤, 从而使得 DNA 易于进入这类细胞. 然而, 这样由于机械损伤引起的转染效率是很低的. 现阶段采用肌肉注射的方法进行 DNA 免疫, 一般的用量为 200 mg 左右.

除了传统的肌肉注射的方法以外, 人们正努力寻找其他更有效的转化方法. 一个最新的方法是用基因枪将 DNA 包裹的金粒子注入真皮组织. 该方法使 DNA 疫苗的免疫效力大大提高, 只用数百纳克(10^{-6} mg)的 DNA 疫苗即可达到肌肉注射数百毫克 DNA 疫苗的免疫效果(Eisenbraun et al, 1993). 显然, 这是因为该方法能使 DNA 更有效地转染宿主细胞. 用基因枪也是将 DNA 直接引入组织. 不过, 真皮组织里面有一类特化的树枝状白细胞, 称作 Langerhans 细胞, 能够非常有效地提纯抗原, 因而使得 DNA 疫苗的使用量大大下降. 这种树枝状细胞在肾脏和心脏组织中也分离到了(Austyn et al, 1994), 提示 DNA 疫苗免疫的途径和效力将会得到改善.

3.2 DNA 疫苗引起全面的免疫反应

携带抗原基因的 DNA 疫苗进入宿主细胞之后, 利用宿主细胞的“设备”, 表达抗原基因, 产生相应的抗原. 这一过程似乎在注射 DNA 疫苗之后 1 d 左右就发生了(Davis et al, 1993). 在乙肝病毒表面抗原(HBsAg)基因导入肌细胞之后 5 d, 用抗体染色法可以很容易地检测到 HBsAg(Whalen et al, 1995). 在细胞内产生的抗原有一部分会分泌出来, 通过血液循环, 或者通过树枝状细胞将抗原转移给 B 细胞, 从而导致抗体的生成. 在几个试验模型中, 抗体能反复生成, 并且是属于 IgG 类型的. 在针对 HBsAg 的 DNA 免疫中, 抗体水平达到 10^4 的平台水平, 并且保持稳定的水平至少达 18 个月之久, 如果在 7 个月之后进行一次加强免疫, 抗体水平可以增加 10 倍(Whalen et al, 1995).

除了引起体液免疫以外, DNA 疫苗的最大特点是能同时引起强烈而持续的细胞免疫. 这是因为 DNA 疫苗在宿主细胞内表达的抗原能进入细胞内 I 型组织相容性复合体(MHC). 只有来自细胞内部的蛋白质才能通过这一途径被加工. I 型 MHC 分子将病毒蛋白形成的多肽片断携带到细胞表面, 激活 CD8+ 细胞毒 T 淋巴细胞(CTL), 从而促进细胞免疫. 与此相反, 标准的疫苗抗原由巨噬细胞等摄入细胞之后, 是通过 II 型 MHC 系统加工的, 因而主要是引起抗体应答.

4 DNA 疫苗在家禽上的应用展望

DNA 疫苗虽然出现的时间不长, 但由于其有许多现有疫苗无法比拟的优点, 可以预言: DNA 疫苗在控制家禽疫病方面将会大显身手. 目前, 可以从以下几方面着手进行研究.

4.1 禽流感疫苗的研制

禽流感(AI)是危害养鸡业的烈性传染病, 又称真性鸡瘟, 传统 AI 疫苗主要引起体液免

疫反应, 需要产生针对病毒表面抗原的抗体来中和病毒. 由于 AI 病毒表面抗原(HI 抗原和 N 抗原)极易发生变异, 疫苗毒株和流行毒株血清亚型不同, 因而免疫效果极差. Ulmer 等(1993)用流感病毒的核心抗原(NP)基因制成 DNA 疫苗, 用这种裸露的 DNA 疫苗免疫小鼠, 能够保护小鼠抵抗致死剂量的异源(不同毒株)病毒的攻击, 而普通的流感疫苗则不能. NP 抗原是 A 型流感病毒的共同抗原. 不同毒株的 AI 病毒, 其表面抗原差异可能很大, 但 NP 抗原则是相同的. 携带 NP 基因的 DNA 疫苗进入宿主细胞之后, 长时间表达 NP 抗原, 通过 I 型组织相容性抗原复合体, 引起强烈的细胞免疫, 因而可以抵抗异源毒株的攻击. 禽流感 DNA 疫苗可能是 DNA 疫苗在家禽上最早使用的制品.

4.2 传染性喉气管炎疫苗

传染性喉气管炎(ILT)疫苗主要引起细胞免疫. 但使用活的 ILT 疫苗有可能导致鸡群爆发 ILT. 如果采用 DNA 疫苗技术, 将 ILT 病毒的主要免疫原基因和合适的启动子装配到质粒上, 然后用质粒 DNA 免疫鸡只, 有可能达到既能引起较好的免疫反应(包括细胞免疫和体液免疫), 又不会对鸡群造成任何危险的理想结果.

4.3 传染性囊病疫苗

传染性囊病(IBD)是一种引起雏鸡免疫抑制的烈性传染病. 目前使用的 IBD 疫苗总是不尽人意. 如果疫苗毒性太弱, 则不能对鸡群提供有效的保护, 若疫苗毒性太强, 又会对鸡群造成免疫抑制, 使鸡只对其他疫苗的免疫反应下降. 如果用 IBD 病毒的主要结构蛋白(如 VP2)基因制成 DNA 疫苗, 就可以克服现有疫苗的缺点. 比如用强毒株的 VP2 基因制作的 DNA 疫苗免疫后, 就有可能产生理想的免疫反应, 但不会出现免疫抑制的情况.

4.4 其他 DNA 疫苗

由于 DNA 疫苗产生持久而真实的免疫, 所以, 对于种(蛋)鸡群来说, 用 DNA 疫苗来代替传统的新城疫(ND)、减蛋综合征(EDS)等灭活疫苗, 即能达到长时间免疫的目的, 又有可能克服灭活病毒时对病毒结构蛋白的破坏而引起的免疫效果下降的问题. 此外, 还可能将几种不同病原的结构蛋白基因包含在同一个质粒里, 制成一种多价 DNA 疫苗. 例如, 可以用 ND 病毒的 F 基因, 传染性支气管炎(IB)病毒的 S1 基因, 以及 IBD 病毒的 VP2 基因制成 ND+IB+IBD 的三价 DNA 疫苗. 使用这种疫苗既能减少免疫次数, 又能避免不同病毒之间的相互干扰, 达到理想的免疫效果.

参 考 文 献

- Austyn J M, Hankins D F, Larsen C P, et al. 1994. Isolation and characterization of dendritic cells from mouse heart and kidney. *J Immunol*, 152: 2401 ~ 2410
- Davis H L, Michel M L, Whalen R G. 1993. DNA-based immunization for hepatitis B induces continuous secretion of antigen and high levels of circulating antibody. *Human Molecular Genetics*, 2: 1847 ~ 1851
- Dixon B. 1995. The third vaccine revolution. *Bio/Technology*, 13: 420 ~ 424
- Eisenbraun M D, Fuller D H, Haynes J R. 1993. Examination of parameters affecting the elicitation of humoral immune responses by particle bombardment-mediated genetic immunization. *DNA Cell Biol*, 12: 791 ~ 797
- Fynan E F, Webster R G, Fuller D H, et al. 1993. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 11478 ~ 11482
- Hildegund C, J Ertl, Xiang Z Q. 1996. Novel vaccine approaches. *J Immunol*, 156: 3579 ~ 3582

- Michel M L, Davis H L, Schleaf M, et al. 1995. DNA—mediated immunization to the hepatitis B surface antigen in mice, aspects of the humoral response mimic hepatitis B viral infection in humans. Proc Natl Acad Sci USA, 92: 5307~5311
- Ulmer J B, Donnelly J J, Parker S E, et al. 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. Science, 259: 1745~1749
- Whalen R G, Davis H L. 1995. DNA—mediated immunization and the energetic immune response to hepatitis B surface antigen. Clin Immunol Immunopathol, 75: 1~12

DNA VACCINES AND THEIR APPLICATION POTENTIALITY IN POULTRY

Cao Yongchang Bi Yingzuo

(Dept. of Ani. Sci., South China Agric. Univ., Guangzhou 510642)

Abstract

DNA vaccine, a new and unusual approach for evoking an immune response, was introduced and the advantages and general procedure for DNA vaccination reviewed. The authors suggested that DNA vaccine be applied to control poultry diseases.

Key words DNA vaccines; immune response; poultry; application potentiality

(上接第106页)

MIX ED METHOD ON SOLVING FRAMES WHOSE NODES HAVE HORIZONTAL AND VERTICAL DISPLACEMENTS

Cen Chengzhu¹ Li Dewei²

(1 Architectural Design Division of Sihui City, Guangdong, Sihui 526200;

2 College of Polytechnic, South China Agric. Univ.)

Abstract

A Mix Method which combined the Iterative Method with the Displacement Method is described in this paper. The Mix Method excels at calculating frames whose nodes have horizontal and vertical displacements. An engineering case, the Sihui City Daxingwei First Electromatic Drive Station which was calculated by this method and has been built, is also specified in the paper.

Key words Frame; Iterative Method; Displacement Method