

DNA 疫苗用于防治艾滋病的研究概况

李 军(乌鲁木齐 830001 新疆自治区临床药理学研究所)

摘要 目的:将能表达抗原的 DNA 作为疫苗接种。方法:直接注射(皮下,肌肉等)含有 DNA 的制剂。结果:接种后机体可产生体液免疫和杀伤性 T 淋巴细胞(CTL)反应,并使机体产生抗病保护。结论:DNA 疫苗将有可能用于防治人类艾滋病的理想化疫苗。

关键词 DNA 疫苗;艾滋病

The usage of DNA vaccine in the prevention and treatment of Human AIDs

Li Jun(Li J) (*Xinjiang Institute of Clinical Pharmacy Reseach , Urumqi 830001*)

ABSTRACT **OBJECTIVE**:DNA with expressing antigen was used as vaccine . **METHOD**:Inject DNA solution via sc or im . **RESULTS**:After injection ,body humoral and cellular immune responses were stimulated to human immunodeficiency virus(HIV) ,and protected the body from being infected . **CONCLUSION** :DNA vaccine will be a novel vaccine against HIV infection .

KEY WORDS DNA vaccine , HIV

DNA 疫苗又称基因疫苗(Genetic vaccine)、基因接种(Genetic inoculation) 或 DNA 免疫(DNA Immunization) ,它是一种直接将编码某种蛋白的外源基

因导入人体和动物体内,借机体的细胞表达出模仿真病原体抗原的一种疫苗。

1 DNA 疫苗的发展简史

最早用纯化 DNA 接种动物是在 1962 年,是用纯化的肿瘤病毒 DNA 皮下接种新生仓鼠,结果仓鼠产生了抗病毒抗体,并且长出了肿瘤。随后在 1979 年同样用肿瘤病毒 DNA 取得了类似的结果。但直到 1990 年 Wolff 等^[1]发现用质粒 DNA 可以很好地转化到肌细胞内并表达蛋白,提出用 DNA 注入机体内可产生免疫反应后,以 DNA 质粒为材料的免疫方法开始发展起来。Ulmer 等 1993^[2]报道了将重组甲型流感病毒核蛋白(NP)的 cDNA 片段插入质粒中并置于 Rous 肉瘤病毒(RSV)或巨细胞病毒(CMV)启动子的控制下,将质粒直接注射小鼠的四头肌内,结果产生了特异的杀伤性 T 淋巴细胞(CTL)应答和高滴度的抗体。在致死剂量同型病毒异源毒株 A/HK168 的攻击下,免疫小鼠存活率为 95%,而注射空白载体(无 NP 序列)的小鼠全部死亡。用基因工程方法表达并纯化的 NP 蛋白免疫小鼠可产生高水平抗 NP 抗体,但此抗体不能中和病毒,该蛋白也不能激发 NP 特异性 CTL 应答,对小鼠没有保护作用。Ulmer 之后,该技术很快被用于其它疾病的防治研究,如肿瘤、肝炎、狂犬病、疱疹、霍乱、疟疾及蠕虫病等。

艾滋病病毒又称人免疫缺陷病毒(HIV),其病原体是一种逆转录病毒。同其它逆转录病毒一样,病毒表面膜蛋白包裹内部有逆转录酶、蛋白水解酶、整合酶及一些调节因子和正链的 RNA 遗传物质。HIV 一旦进入体内,HIV 的膜蛋白会与 CD₄ 阳性 T 淋巴细胞结合而进入细胞内并逆转录,整合在基因组中,从而开始其生命周期和大量复制,CD₄ 阳性 T 淋巴细胞最后被破坏和死亡,反复多次后,人体的大量 CD₄ 阳性 T 淋巴细胞数下降,机体本身的免疫系统遭到破坏,免疫力下降。

业已证明 HIV 的包膜糖蛋白 gp160 具有一定的免疫性^[3-7]。Levi 等(1993)依据 gp160 蛋白序列合成多聚短肽(MAPs)接种动物,结果产生了较强的体液和细胞免疫应答^[4]。用灭活的病毒可以使机体产生特异的细胞激动素^[3]。对类人猿免疫缺陷病毒(SIV)的研究表明通过免疫法治疗艾滋病是可能的^[5,8,9]。基于以上研究结果,Wang 等^[9,10]把经 PCR 扩增的 HIV-1 型 gp160 的 env 基因连接到质粒上,在鼠乳腺瘤病毒启动子(mmTV-LTR)和 RSV 增强子的调控下,构建成质粒 pm160 用于接种小鼠和非人灵长目动物,产生了抗 HIV-1 gp160 的特异性抗体,并能在体外中和 HIV-1 病毒感染和抑制 HIV 介导的合胞体形成及 CD₄ 与 gp160 的结合,同时促进了 T 细胞增殖产生了特异性的细胞免疫。

为证明 DNA 疫苗的保护效果,Wang 等^[11,12]建立

了一种实验动物强攻模型系统,即将 HIV-1 型的 env 基因转染到小鼠 SP2/0 骨髓瘤细胞中,建成 SP2/0-160 细胞株,将构建的含有 env 基因的质粒(pm160)注射到小鼠体内,并用相同的空载质粒作为对照,用 3×10^6 SP2/0-160 细胞强攻,结果对照组即注射空载质粒组的小鼠在 13d 开始形成肿瘤,9~10 周后全部死亡,而接种 pm160 组无一死亡,8 个月后仍无肿瘤产生,而接种 pm160,用 SP2/0 细胞强攻,小鼠全部形成肿瘤并全部死亡。该结果证明:注射含 env 基因的质粒能在肌细胞内表达,诱导体液和细胞免疫并特异地杀灭含有 env 基因的靶细胞。

Wang 等^[13,14]用类人猿做试验,肌内接种 100 μ g 质粒 pm160,产生了高滴度的抗体,该抗体在体外能中和 HIV-1 的感染。接种后 T 淋巴细胞明显增殖。首次证明了类人猿能通过接种质粒 pm160 产生非常强的特异性 CTL 应答,强攻试验表明^[14],注射 pm160 后,所有的类人猿都有不同程度的抗感染能力,其中一组取得了 100% 的抗感染力。在治疗方面对感染 HIV 的大猩猩接种 pm160,3 个月后在体内的病毒数明显下降,半年后用 PCR 检测技术检不出 HIV 的 DNA。此结果说明 DNA 疫苗接种技术不仅可预防艾滋病,同时可产生 T 杀伤细胞清除体内的感染病毒细胞以达到治愈的目的。

2 DNA 疫苗的优点及作用机理

同以往所使用的疫苗如灭活苗、减毒苗、亚单位及多肽苗相比,DNA 疫苗有以下优点:①能象减毒苗那样,同时激活体液免疫和细胞免疫,但由于其本质是一段核酸,不是病原体,因此不象减毒苗那样存在着安全问题。这种激活和使机体产生很强的抗病保护的机理尚不清楚,一般是这样理解的:由于所使用的质粒都含有真核细胞表达的启动子,如来源于呼吸道合胞病毒(RSV)SV₄₀和 CMV 启动子,它们所构建的质粒在哺乳细胞中均能高水平表达外源蛋白,而肌细胞含有肌质网和 T 小管系统,该系统含有细胞外液并能伸入到细胞内部。Wolff 等^[15]发现组织培养的肌细胞通过 T 小管和细胞膜穴样内陷将质粒纳入,这样质粒便可象自然病毒感染引起保护一样激活免疫系统^[12]。质粒在肌细胞内表达抗原蛋白,这种抗原的构象与天然抗原一致,并能按正常途径加工处理,提呈给免疫系统。首先刺激 B 淋巴细胞的产生,诱导特异性体液免疫。另外加工处理的抗原蛋白在组织相容性复合物(MHC)分子的作用下诱导出细胞免疫:分泌到肌细胞外的蛋白,被巨噬细胞和/或树突状细胞吞噬处理,与 MHC II 类分子结合形成抗原复合物,转移到细胞表面后被 CD₄ 阳性

限制的 T 细胞(Th) 所识别,使 CD₄ 阳性 T 淋巴细胞激活;而在肌细胞内的抗原蛋白经细胞自身加工成肽链与 MHC I 类分子组合成复合体,然后转移到细胞膜上,被 CD₈ 限制的 T 细胞识别并使之激活而成为杀伤性 T 细胞,诱导出 CTL 应答。②保护期长。外源基因注射到机体内,其抗原表达目前已监测 18 个月,并保持高滴度抗体^[16,17]。③安全。现有的实验表明 DNA 疫苗接种后,没有毒性反应及机体耐受反应,并且不引起其它疾病如癌症、自身免疫病等;动物的长期观察也没有检测到任何毒性反应。④生产的成本低。用于接种的核酸可以以质粒 DNA 的形式存在,这种质粒可以通过转化到细胞或大肠杆菌内经细胞培养或发酵大量生产。质粒的纯化手段远远简单于蛋白的纯化,因而其成本远低于于基因工程疫苗。另外还有保存条件简单、接种途径广泛等优点。

3 可能出现的问题

DNA 疫苗的出现仅在近几年取得了快速发展,目前影响其命运的问题还没有出现,还需进一步的观察,但人们所关注的有以下两个问题:①外源 DNA 与宿主基因组整合的可能性,如果能整合,则可能导致癌变或遗传性状改变等一系列问题的产生。目前还没有发生此种现象。②基因长期高水平表达,这无疑对疾病的预防有益,但对抗体有可能产生一些不良后果,如产生免疫耐受性、自身免疫病、过敏反应、超免疫力或自身攻击等。如果这些问题得以圆满解决,DNA 疫苗将导致疫苗领域的一场革命,并使艾滋病的防治问题有可能在下一个世纪解决。

参考文献

- 1 Wolff JA, Malone RW, Williams P, *et al*. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 1990, 247: 1465.
- 2 Ulmer JB, Donnelly J, Parker SE, *et al*. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protection. *Science*, 1993, 259: 1745.
- 3 Mills KHG, Page M, Chan WL, *et al*. Protection against SIV infection in macaques by immunization with inactivated virus from the BK28 molecular clone, but not with BK28-derived recombinant env and gag proteins. *J Med Primatol*, 1992, 21: 50.
- 4 Levi M, Ruden U, Redfield R, *et al*. Effects of adjuvants and multiple antigen peptides on humoral and cellular immune responses to gp 160 of HIV-1. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 1993, 6: 855.
- 5 Hu SL, Abrams K, Barba G, *et al*. Protection of macaques against SIV infection by subunit vaccines of SIV envelope glycoprotein gp160. *Science*, 1992, 255: 456.
- 6 Parry C, McLain L, Dimmock NJ. Production of long-lived neutralizing antibodies to HIV-1 III_B in mice with a vaccinia recombinant virus-infected cell vaccine expressing gp 160. *AIDS Res. Hum Retroviruses*, 1994, 10: 205.
- 7 Ugen KE, Goedert JJ, Boyer J, *et al*. Vertical transmission of human immunodeficiency virus (HIV) infection, reactivity of maternal sera with glycoprotein 120 and 41 peptides from HIV type 1. *J Clin Invest*, 1992, 89: 1923.
- 8 Schultz AM, Hu SL. Primate models for HIV vaccines. *AIDS*, 1993: S161.
- 9 Wang B, Ugen KE, Srikantan V, *et al*. Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 4156.
- 10 Wang B, Ugen KE, Srikantan V, *et al*. Genetic immunization: a novel method for vaccine development against HIV. *Vaccine*, 1993, 93: 143.
- 11 Wang B, Merva M, Dang K, *et al*. Immunization by direct DNA inoculation induces rejection of tumor cell challenge. *Human Gene Therapy*, 1995, 6: 407.
- 12 Wang B, Merva M, Dang K, *et al*. Vectors and novel vaccines: DNA inoculation induces protective *in vivo* immune responses against cellular challenge with HIV-1 antigen expressing cells. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1994, 10: 935.
- 13 Wang B, Boyer J, Srikantan V, *et al*. DNA inoculation induces neutralizing immune responses against human immunodeficiency virus type 1 in mice and non human primates. *DNA Cell Biol*, 1993, 12: 799.
- 14 Wang B, Boyer J, Srikantan V, *et al*. Induction of humoral and cellular immune responses to the human immunodeficiency type 1 virus in nonhuman primates by in vivo DNA inoculation. *Virology*, 1994, 211: 102.
- 15 Wolff JA, Dowty ME, Jiao S, *et al*. Expression of naked plasmid by cultured myotubes and entry of plasmids into T-tubules and calveolae of mammalian skeletal muscle. *J Cell Sci*, 1993, 103: 1249.
- 16 Cheng L, Ziegelhoffer PR, Yang NS. In vivo promoter activity and transgene expression in mammalian somatic tissues evaluated by using particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 4455.
- 17 Wolff JA, Ludtke JJ, Acsadi G. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Genet*, 1992, 1: 363.

收稿日期: 1998 - 07 - 03