

植物口服疫苗的动物和临床实验*

于 静^{1,2} 米凯霞¹ 秦智伟² 陈晓英^{1**}

(中国科学院微生物研究所植物生物技术重点实验室 北京 100080)¹ (东北农业大学园艺学院 哈尔滨 150030)²

摘要: 利用转基因植物生产亚单位疫苗用于口服主动免疫具有安全、廉价和方便等优点。植物可以正确地表达细菌和病毒抗原基因,对动物及人类的临床实验研究表明:食用表达某种抗原的转基因植物可在实验动物或人群体内激起系统免疫和粘膜免疫,产生相应的特异性抗体,这些结果表明了植物口服疫苗的可行性。此外,在治疗自身免疫疾病以及癌症等方面,植物口服疫苗也具有值得关注的的作用。

关键词: 转基因植物,口服疫苗,粘膜免疫

中图分类号: Q81 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 05-0132-05

EDIBLE PLANT-BASED VACCINES: PROGRESS IN ANIMAL TESTS AND CLINICAL TRIALS

YU Jing^{1 2} MI Kai-Xia¹ QIN Zhi-Wei² CHEN Xiao-Ying^{**}

(*Laboratory of Plant Biotechnology, Institute of Microbiology Chinese Academy of Science, Beijing 100080*)¹

(*The Northeast Agriculture University, Harbin 150030*)²

Abstract: The vaccine production systems using edible plant are safer, less expensive and more convenient for delivery than those derived from mammalian cells or microorganisms. Plants can faithfully express the bacterial or viral antigens.

* 国家高技术“研究发展”计划项目 (“863”项目) (No. 2002AA206611)

Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 2002 AA206611)

** 联系人 Tel: 010-62522109, E-mail: xiaoying@hotmail.com

收稿日期: 2002-10-06, 修回日期: 2002-12-14

Recent studies have shown that the vaccino gens expressed in plant can induce both the systematic and mucosal responses of animals and humans. Moreover, the potential of edible plant-driven vaccines in treatment for cancers and auto-immune diseases is discussed.

Key words: Transgenic plant, Edible vaccine, Mucosal immunity

哺乳动物的粘膜系统包括呼吸道、消化道、泌尿生殖道等的粘膜组织,总面积可达 400m^2 。由于它直接与外界环境接触,95%以上的感染发生在粘膜或是由粘膜入侵,所以粘膜是重要的防御系统。几乎全身的粘膜部位均存在着粘膜免疫系统,这些粘膜外表面富含B细胞、T淋巴细胞等免疫细胞,这些细胞在粘膜相关淋巴组织内组织起来,成为粘膜免疫体系主要组成部分。

诱导粘膜免疫系统,尤其是在侵染位点的粘膜免疫是抵抗粘膜侵染的主要方式。粘膜表面分泌的主要抗体类型是sIgA,通过特异性结合细菌细胞或病毒颗粒阻止它们与粘膜细胞表面受体的结合,从而避免机体被侵染。研究证明,通过粘膜系统的免疫可以有效地激起粘膜和系统免疫,而非粘膜免疫只能激起系统免疫反应,却不能保护粘膜表面。口服疫苗直接通过胃肠道表面,容易激起粘膜免疫反应,阻断病原体通过粘膜侵染的通道。

利用植物作为疫苗载体生产口服疫苗,具有经济、安全、方便等优点。到目前为止,已有多种重组蛋白在烟草、马铃薯、番茄、玉米、大豆等植物中表达。

植物口服疫苗已在动物身上进行了10年的实验,在人体上也进行了小规模临床研究,结果表明植物口服疫苗是可行的。本文总结了目前植物口服疫苗应用中使用的植物载体、动物实验和人体实验进展,并对今后的研究方向和存在问题提出了一些看法。

1 应用植物口服疫苗的优点

利用植物系统生产疫苗的优点首先在于它的经济性。植物生产成本低,稳定的转基因农作物品系可以进行大面积生产,农作物还易于贮存和运输,不需提纯及冷藏设施,制成果汁、干粉等加工过程已经形成工业化。其次是植物系统的安全性,植物口服疫苗一般只表达病原菌蛋白的一个或几个亚单位,不能复制完整病原体,却能针对完整的病毒或细菌产生免疫反应。植物疫苗还不象哺乳动物细胞系统那样容易污染病原微生物,蔬菜、水果本身不具有危害人类的因素,迄今为止也没有植物病原菌感染人类的报导,因此在医疗设施缺乏以及没有专业医护人员监护的地区也可以安全使用。此外,植物细胞壁的存在可以抵抗胃酸、胰蛋白酶以及其它消化酶对抗原蛋白的直接消化,使其在小肠中逐渐释放,利于激起较强的粘膜免疫反应。

2 植物口服疫苗系统的选择

目前,哪种植物是口服疫苗的最佳系统还没有定论。衡量一种植物是否是合适的疫苗载体,首先要考虑的是可食用性。最初应用的转基因模式植物是烟草和拟南芥,但是它们不可以生食,蛋白必须经过提纯,不利于实际的生产应用。马铃薯是口服疫苗生产的另一个载体植物,可以用农杆菌介导的方法有效产生转基因系,用块茎特异表达的启动子可使抗原蛋白在块茎中特异表达,但是其生食性差,烹饪易使蛋白变性导致免疫活性降低。胡萝卜、番茄、香蕉等虽然转化体系不是很有效,但是生食风味

较好,并且栽培面积较广,从而成为近年来研究的热点。另外,大豆、苜蓿和谷物等在世界范围内广泛种植,尤其是它们蛋白含量较高,是生产动物疫苗的有效载体。

从建立植物转化系统获得转基因植物到进行大规模生产的时间也是一个重要的衡量指标。马铃薯、香蕉等植物转基因后可以进行无性繁殖,不需进行纯合系筛选,简化了育种手续,可以缩减育种时间,而且没有田间杂交的可能性,避免了抗生素等标记基因漂移而引发的生物安全性问题。

3 植物口服疫苗的研究及临床应用进展

利用植物生产口服疫苗有许多报道,但是这些报道多是利用模式植物烟草进行的,而且研究多集中在动物实验阶段。到目前为止,植物口服疫苗在人体的临床实验仅有5种^[1-5]。下面分别介绍进入临床研究的植物口服疫苗。

3.1 细菌性腹泻 霍乱弧菌和肠毒素大肠杆菌(ETEC)分泌的肠毒素通过与小肠上皮细胞表面的神经节苷脂(GM1)结合而导致腹泻。这两类毒素都含有一个毒素A亚单位和五个非毒素B亚单位(介导与GM1的特异结合)。其中霍乱毒素(CT)和热不稳定性肠毒素的B亚基蛋白(LTB)具有高度同源性。对转LTB基因马铃薯的分析表明,LTB具有五聚体结构,在块茎中的最高含量为17.2 $\mu\text{g/g}$ 。用转基因马铃薯(含20~50 μg LTB)喂食小鼠,免疫小鼠血清中产生了IgG抗体^[6]。

LTB马铃薯是第一个用于临床检验的可食用植物疫苗^[1]。在这一项研究中,志愿者食用50~100g的生LTB马铃薯(包含有375~750 μg LTB)或非转基因马铃薯,服用21d。食用LTB马铃薯群体的11组中有10组在抗LTB的IgG血清中和毒素LT的水平上至少高出了4倍。在最后一次加强的38d后依然能够在血清中检测到抗LTB的IgG存在。50%的志愿者的粪便中发现有抗LTB IgA的增加。这一里程碑式的研究证明,食用转基因植物可有效地激起人类的抗体反应。

3.2 病毒性腹泻及病毒样粒子(VLP)疫苗 生产抗病毒性肠炎药剂是口服亚单位疫苗的目标之一。因为重组外壳蛋白可以装配病毒样粒子(VLP),被小肠内的M细胞有效识别。在转基因烟草及马铃薯中表达的诺沃克病毒外壳蛋白(NVCP)可以正确装配VLPs,喂食小鼠后刺激了NVCP特异的抗血清IgG的产生和小肠IgA的产生^[7]。NVCP马铃薯在疫苗发展中心已进入临床研究^[2]。20个成年志愿者食用2~3个剂量的生转基因马铃薯,每个剂量是150g(含有215~750 μg NVCP)。受试者中有19个检测出特异性抗NVCP的IgG类型抗体分泌细胞数量上的增加,6个IgA类型抗体分泌细胞有所增加。其中有6个志愿者的粪便样品中检测出抗NVCP IgA的增加。这项研究说明,口服植物表达的VLPs可刺激免疫应答。

3.3 乙型肝炎VLP疫苗 HBsAg是乙肝病毒(HBV)的主要表面蛋白。在转基因马铃薯中HBsAg的表达量最高可达每克马铃薯中16 μg ^[8],喂食小鼠后产生了高水平的抗HBsAg IgG血清,电子显微镜观察马铃薯叶片切面发现HBsAg VLPs在来源于内质网的囊泡中积累^[9],这样可以保护HBsAg VLPs,使其免于被胃消化。

利用植物HBsAg进行的临床实验已经开始。其中之一是口服转基因生菜,初次服用200g(0.2~3 μg HBsAg)新鲜叶片,2个月内再次服用150g。结果表明,摄食转基因生菜刺激了人的抗HBsAg IgG血清的产生^[3]。2/3的志愿者通过吸收2剂量(含有1 μg 抗原)的HBsAg生菜而获得保护。在Roswell Park癌症研究机构进行的另一项临床实验

验证了 HBsAg 马铃薯的口服免疫性^[8]。

3.4 麻疹病毒疫苗 麻疹是由麻疹病毒 (measles virus) 引起的一种传染性很强的疾病。目前已获得的转麻疹病毒 H 蛋白的植物有烟草和胡萝卜。实验表明, H 蛋白可以在转基因植物中正确表达。曾被麻疹 DNA 疫苗免疫过的小鼠在食用转基因烟草中提取的 H 蛋白以后, 表现出了抗体反应的激增^[10]。在人类临床实验中, 利用转基因胡萝卜对曾经自然免疫或注射疫苗免疫的志愿者进行免疫加强, 志愿者产生了较强的免疫应答^[4]。

3.5 狂犬病疫苗 无论在发达国家还是发展中国家, 狂犬病都是一个广泛存在的问题, 它是由狂犬病毒 (rabies virus) 引起的。用含狂犬病毒 G 抗原的重组苜蓿花叶病毒颗粒 (AIMV) 感染菠菜后, 将叶子喂食小鼠, 实验小鼠产生了特异 IgG 和 IgA 抗体^[11]。另一项实验将狂犬病毒 G 蛋白及 N 蛋白基因转入 AIMV 载体并在菠菜中表达, 摄食转基因菠菜叶子的小鼠获得了免疫保护。在这一基础上进行了人类实验^[5]。5 个曾被狂犬病疫苗免疫过的志愿者中有 3 人在食用表达 G 蛋白和 N 蛋白菠菜叶片后检测到了狂犬病毒抗体水平的增加; 未被免疫过的志愿者在摄食同等数量的菠菜叶子后, 有 5/9 的人产生了免疫应答。这说明志愿者口服抗狂犬病菠菜疫苗取得了较好的效果。

4 植物口服疫苗的潜在应用

植物疫苗除了可以用来防止传染病的侵染外, 还可以用于非传染性疾病的治疗。如利用免疫反应来消灭异常发育的细胞、恶性肿瘤或减少炎症对特定器官的危害等。

利用疫苗可以治疗自身免疫疾病与过敏反应。如 I 型糖尿病, 将 CTB-胰岛素原在马铃薯中融合表达并喂食非肥胖性糖尿病 (NOD) 鼠, 结果表明, 实验小鼠体内胰岛炎症减轻, 这说明了喂食 CTB-胰岛素原诱导的免疫耐受能够减轻这种 T 细胞介导的细胞毒素引起的自身免疫疾病^[12]。

疫苗还可以用来治疗癌症。在许多肿瘤细胞表面, 某些特殊蛋白过度表达。利用诱导出的抗体识别仅存在于癌症细胞中的特殊肿瘤抗原, 可以在一定程度上降低癌细胞的传播。例如来自于鼠 B 细胞淋巴瘤的一个单链 Fv (scFv) 片断与病毒载体共同在烟草中表达, 注射过从烟草中纯化的疫苗的小鼠可在肿瘤的致死剂量下获得保护^[13]。另一个 scFv 与马铃薯 X 病毒外壳蛋白的一个启动子融合表达, 获得了对淋巴瘤和骨髓瘤保护^[14]。

利用转基因植物生产免疫避孕疫苗来控制哺乳动物过度增值也将是一个经济有效的途径。实验动物摄食来自于重要的繁殖组成部分的抗原决定簇, 由此引起免疫反应而导致不育。利用透明带蛋白 (ZP3) 抗原决定簇基因与烟草花叶病毒 (TMV) 外壳蛋白基因融合并侵染植物, 将从植物组织中纯化的类病毒粒子免疫小鼠后, 在小鼠体内检测到了 ZP3 特异性血清抗体^[15]。

5 植物口服疫苗存在的问题及应用前景

综上所述, 许多研究已经证明了植物生产口服疫苗的可行性, 比传统的体液免疫具有许多优势, 但同时还存在一些问题需要解决。

其中一个限制因素是在转基因植物中抗原的表达量低, 摄食相对较少的量不能引起免疫。该弱点可以通过优化植物表达系统来实现, 除使用高效表达启动子外, 还可

以应用叶绿体表达系统或将蛋白质引导到细胞内的特定位点。叶绿体基因组的高拷贝数对于提高重组蛋白表达量是非常有利的。如转叶绿体基因组 CTB 亚单位疫苗, 在烟草叶片中的表达量为总蛋白的 4.1%^[16], 而在细胞核转化体系中表达量仅为 0.1%。另外, 通过在目的蛋白质前添加特异的信号肽, 使外源蛋白质在合适的植物细胞器中积累(如线粒体、液泡、叶绿体、内质网等), 可以避免被植物体内的蛋白酶快速降解或干扰植物细胞正常代谢。Chikwamba 等将 LTB 在玉米种子中表达, 将 γ -玉米醇溶蛋白启动子与 SEKDEL 融合后, LTB 的表达水平比未加此序列的玉米获得很大提高^[17]。Sojikul 等将来自于大豆植物贮存蛋白 vspA 的一个信号肽基因 (VSPalphaS) 与 HBsAg 基因融合后, 将在转基因烟草中表达的 HBsAg 定位于内质网中, 结果表明位于内质网中的 HBsAg 更稳定。在从烟草中提取抗原对小鼠的免疫实验中, VSPalphaS-HBsAg 融合蛋白比未融合的 HBsAg 刺激了更高水平的血清 IgG 的产生^[18]。

如何提高植物口服疫苗的免疫强度也是需要解决的问题之一。近年来的研究表明, 粘膜佐剂与抗原融合表达并通过粘膜路径使用时, 可以增强抗原的免疫原性、免疫应答速度以及肠胃粘膜对疫苗的吸收。例如利用 CTB、LTB 等与 GM1 结合的能力, 可将其融合的目的抗原直接定位到肠壁细胞, 进入胃粘膜相关淋巴组织。提高植物口服疫苗免疫强度的另一个新策略是将不同的免疫途径结合使用, 增强机体对抗原的应答。曾被非肠道免疫后再通过口服途径可以极大的提高粘膜免疫反应, 同时这种口服加强简化了免疫过程。在 Webster 等的实验中, 将麻疹 DNA 疫苗与口服植物麻疹病毒蛋白联合使用, 使实验鼠体内产生了足以用于在人体内抵抗麻疹的抗体^[10]。

另外, 植物可以对动物蛋白进行有效的糖基化, 但植物的糖基化比动物的小。这部分是由于植物缺乏唾液酸, 而在鼠单抗中糖类的 10% 属于唾液酸。植物的多糖具有异质性, N-乙酰神经氨酸是动物多糖的主要末端残基, 而植物多糖中不含有 N-乙酰神经氨酸。因此植物多糖的特殊性有可能会改变重组蛋白的性质。目前, 植物蛋白的糖基化问题还在讨论中。

参考文献

- [1] Tacket C O, Mason H S, Losonsky G, *et al.* Nat Med, 1998, 4 (5): 607 ~ 609.
- [2] Tacket C O, Mason H S, Losonsky G, *et al.* J Infect Dis, 2000, 182 (1): 302 ~ 305.
- [3] Kapusta J, Modelska A, Figlerowicz M, *et al.* FASEB J, 1999, 13 (13): 1796 ~ 1799.
- [4] Muller C P, Fack F, Damien B, *et al.* Vaccine, 2003, 21 (7-8): 816 ~ 819.
- [5] Yusibov V, Hooper D C, Spitsin S V, *et al.* Vaccine, 2002, 20 (25-26): 3155 ~ 3164.
- [6] Mason H S, Haq T A, Clements J D, *et al.* Vaccine, 1998, 16 (13): 1336 ~ 1343.
- [7] Mason H S, Ball J M, Shi J J, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93 (11): 5335 ~ 5340.
- [8] Richter L J, Thanavala Y, Arntzen C J, *et al.* Nat Biotechnol, 2000, 18 (11): 1167 ~ 1171.
- [9] Kong Q, Richter L, Yang Y F, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98 (20): 11539 ~ 11544.
- [10] Webster D E, Cooney M L, Huang Z, *et al.* J Virol, 2002, 76 (15): 7910 ~ 7912.
- [11] Modelska A, Dietzschold B, Sleysh N, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95 (5): 2481 ~ 2485.
- [12] Arakawa T, Yu J, Chong D K, *et al.* Nat Biotechnol, 1998, 16 (10): 934 ~ 938.
- [13] McCormick A A, Kumagai M H, Hanley K, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96 (2): 903 ~ 908.
- [14] Savelyeva N, Munday R, Spellerberg M B, *et al.* Nat Biotechnol, 2001, 19 (8): 760 ~ 764.
- [15] Fitchen J, Beachy R N, Hein M B. Vaccine, 1995, 13 (12): 1051 ~ 1057.
- [16] Daniell H, Lee S B, Panchal T, *et al.* J Mol Biol, 2001, 311 (5): 1001 ~ 1009.
- [17] Chikwamba R, McMurray J, Shou H, *et al.* Molecular Breeding, 2002, 10: 253 ~ 265.
- [18] Sojikul P, Buehner N, Mason H S, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100 (5): 2209 ~ 2214.