

转基因植物疫苗的研究现状及前景

李晓东¹, 程智慧¹, 于 燕²

(1 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨陵 712100; 2 天津市 园艺工程研究所, 天津 300192)

[摘 要] 简介了基因疫苗的特点, 综述了利用转基因植物作为口服疫苗的研究现状及发展前景。

[关键词] 转基因植物; 口服疫苗; 传统疫苗; 基因疫苗

[中图分类号] Q 78

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2001)01-0126-03

200 多年前, 人类首次利用疫苗防治疾病取得了出人意料的惊喜。经过几代科学家的努力, 疫苗已成为人类目前最成功、最有效的防病手段。传统的疫苗有两大类^[1, 2]: 即减毒活疫苗和灭活疫苗。减毒活疫苗虽然效果较好, 但存在一定程度的安全问题; 灭活病原体疫苗比第一类疫苗安全, 但效果差。

随着科技的发展, 特别是分子生物技术的迅速发展, 人们利用基因工程技术开发出专一性强、安全性高的高科技疫苗, 即重组疫苗。这种疫苗是通过把激发机体免疫反应的病原体基因分离出来, 重组到无害的生物体内而制备的。最初生产的是亚单位疫苗^[2], 不具感染力, 但不能激活主要组织相容性复合体(MHC) I 分子, 因而很难激活 T 杀伤细胞, 激活免疫反应能力差。针对亚单位疫苗的缺陷, 又开发了基因疫苗(或称 DNA 疫苗), 它是把外源基因克隆在表达质粒上, 直接注入动物体内使其表达, 产生抗原而激活免疫力。这种疫苗可有选择地激活不同的免疫途径, 能激活 MHC I 和 MHC II 分子, 进而激活 T 细胞或间接激活 B 淋巴细胞而产生抗体^[3]。

传统疫苗和重组疫苗虽然有效, 但对生产、贮藏、运输、使用等各个环节要求较严, 成本较高, 在最需要疫苗的第三世界国家推广应用困难很大。1992 年世界卫生组织(WHO)提出了“儿童疫苗计划(CV I)”, 鼓励运用新技术, 研究、开发和生产成本低、不用冷藏、可以直接食用的防病疫苗^[1]。

1 转基因植物疫苗的研究开发现状

近年来, 转基因植物在某些生物制品的生产上已取代了传统的微生物系统, 而成为一种颇有吸引

力和较为经济的生产手段, 已经被用作生产蛋白、糖类和脂类的生物反应器^[4~6], 尤其是利用转基因植物进行药物生产。比利时利用转基因烟草得到高产量的五肽神经肽; 美国利用转基因植物生产白细胞介素 2(L 2); 荷兰用转基因马铃薯生产人的血清白蛋白; 韩国用转基因番茄和烟草生产人的胰岛素^[7]; 美国在转基因烟草中提取栝楼素(Trichosannin)用于治疗爱滋病^[8]。80 年代以来, 仅日美两国开发的生物技术新药物就达 224 种, 目前在美国已有 50 多种生物药物、疫苗和各种生物制剂投放市场, 尚有 400 多种生物试剂正在临床试验^[9]。

利用转基因植物生产医药取得了一系列成果, 科学家进一步设想利用转基因技术生产用作疫苗的食用植物^[10]。他们将免疫机理与植物 DNA 重组技术相结合, 生产出能使人体获得特异抗病能力的食用疫苗。这种疫苗极其安全, 因为植物病毒基本不感染人体, 而利用动物病毒介导哺乳动物细胞所生产的疫苗可能感染人类, 这就消除了人们的担心。

细菌和病毒因子可侵染或在上皮组织繁殖, 抵御侵染的有效疫苗必须能刺激粘膜免疫系统在粘膜表面分泌免疫球蛋白 IgA (S-IgA)。一般来说, 通过口服产生的粘膜抗原释放的免疫反应比通过注射产生的粘膜免疫反应效果好。已经证明, 包括几种活的或灭活的微生物在内的特殊的抗原具有口服免疫原性。与皮下注射免疫相比, 使用亚基或可溶性抗原的口服免疫常常在刺激免疫反应方面效率较高, 且抗原需要量较小。早期的植物表达来自于肠内的病原体抗原, 人们把抗原组装成类似病毒颗粒的有效结构, 希望抗原更能抗消化, 更易到达肠胃淋巴组

[收稿日期] 2000-01-05

[基金项目] 北京市重点实验室资助项目

[作者简介] 李晓东(1969-), 男, 助理研究员, 博士, 现在华南师范大学从事博士后研究, 广州。

织, 且异源抗原一旦进入肠胃淋巴组织时, 更容易被觉察^[11]。这些研究成果为利用转基因植物生产口服疫苗提供了理论及实践依据。

1990 年, Curtiss R 等报道^[11], 利用转基因烟草可表达链球菌变异株 spA 蛋白, 口服 spA 后在唾液中发现分泌免疫球蛋白 IgA (S-IgA)。这是第一例利用植物表达系统生产口服疫苗的报道。

1991 年, 美国德克萨斯州农工大学生物科学技术研究所 (BT) 的 Artzen 研究小组开始研究用口服疫苗防治肠内疾病, 包括由细菌引起的霍乱和腹泻。他们成功地把大肠杆菌的抗原基因导入烟草和马铃薯, 并使这两种作物表达了大肠杆菌的抗原蛋白, 食用这种马铃薯的小白鼠血液和肠胃器官的粘膜中都存在大肠杆菌抗体。该研究小组还将一种引起腹泻的 DNA (Norwalk Virus, NV) 导入莴笋、番茄和马铃薯, 并发现这 3 种转基因蔬菜中都含有抗大肠杆菌病毒的抗原蛋白, 这种物质对霍乱细菌有免疫作用^[1, 11]。

美国 Scripps 研究所 Mitch Hein 利用土壤农杆菌把霍乱毒素的无毒性 β 链基因转移到苜蓿细胞, 再将其培养成苗, 食用这种苜蓿苗, 霍乱毒素 β 链很快被喉、肠胃等部位的分泌性粘液细胞吸收, 刺激特异性抗体的大量产生, 使机体获得对霍乱的免疫。华盛顿大学 Roy Curtis^[12] 成功地开发出一种转基因烟草, 能生产抗龋齿细菌的疫苗, 英国科学家也有类似研究, 开发了一种抗龋齿细菌的抗原蛋白。

目前这一领域研究较深入的是利用转基因植物生产口服乙型肝炎疫苗的研究^[11, 13, 14]。乙型肝炎是危害全人类健康最重要的传染病之一, 它是由乙肝病毒 (HBV) 感染引起的, 目前全世界大约 3.5 亿人慢性感染 HBV, 每年由 HBV 感染引起的肝硬化等各种疾病 (包括肝癌) 可造成 100~200 万人死亡。由于 HBV 可通过血液、体液、母婴等多种方式传播, 且发病机理较为复杂, 目前清除 HBV、防止肝细胞坏死的治疗效果仍不理想。因此, WHO 规定, 接种 HBV 疫苗是控制乙肝发生的唯一经济有效的途径^[11]。分子生物学家试图通过转基因植物获得安全、经济、有效、更适合广大发展中国家的乙肝疫苗。

1992 年, BT 的 Artzen 小组利用转基因技术将美国临床使用的乙肝表面抗原 (HBsAg) 基因导入烟草并使之表达^[1, 11], 首先证明了这种疫苗蛋白能够在植物中表达。把从这种烟叶中提取的构成乙肝疫苗的 HBsAg 注入小鼠胃内, 小鼠产生了免疫反应抗体, HBsAg 的平均颗粒为 200 nmol/L, 其浮力密

度、抗原性同酵母及乙肝病人血清中得到的类似。总之, 在植物中表达的抗原, 其表位 HBsAg T 细胞和 B 细胞是保守的, 烟草植株中产生的蛋白和市场商用抗原相似。

1995 年, Artzen 小组的 Mason 等又将 HBsAg 基因转入马铃薯得到表达, 用这种马铃薯喂养小鼠, 在小鼠体内检测到保护性抗原, 包括粘膜抗体, 它们分泌到循环系统, 能抵御细菌的侵袭^[11]。这个实验证明, 转基因植物中的抗原可安全通过动物消化道最终成为粘膜性抗原, 不会被蛋白酶降解, 而且只需口服少量的乙肝表面抗原蛋白就可产生良好的免疫应答反应, 并不比肌肉注射所需的量大。

利用烟草和马铃薯只是为了研究工作的方便, 真正要使转基因植物成为口服疫苗而应用, 必须能在生食或只需简单加工 (抗原蛋白加热会受到破坏) 的植物如蔬菜、水果上大量表达抗原蛋白。1996 年 Mason 等利用基因枪将 HBsAg 的 DNA 导入香蕉, 有望得到含 HBsAg 基因的香蕉。

2 转基因植物疫苗研究中的问题

2.1 转基因植物在人或动物体内免疫反应的途径

初步研究认为, 这类疫苗进入人和动物体后通过粘膜免疫系统产生粘膜抗原, 引起人或动物产生免疫反应达到免疫效果。

2.2 口服疫苗能否忍受胃酸和各种消化酶的作用

研究表明, 确有少量抗原蛋白经过消化系统时被消化。但一般认为, 植物细胞抗消化能力强, 有助于保护产生免疫作用的抗原蛋白, 若在抗原基因附近加上一些修饰基因或吸附基因序列, 则口服疫苗不易被迅速消化, 可较长时间停留在消化系统。

2.3 提高转基因植物中蛋白表达量

通过使用强启动子、前导序列和增强子, 优化选择密码子, 整合非依赖性的表达等手段可提高蛋白表达水平。目前转基因植物疫苗抗原蛋白的浓度为 10~30 g/kg, 进一步提高植物抗原蛋白的含量或增加这种转基因植物食用量, 可提高免疫反应水平。

2.4 抗原蛋白在转基因植物中的稳定性

抗原蛋白在转基因植物中能否稳定遗传, 存在时间有多长, 在植物收获前后有何变化等问题也有待进一步研究。

3 转基因疫苗的食品安全性

转基因疫苗同其他转基因技术食品一样, 其食品安全性评价应普遍遵循 1993 年经济发展合作组

织(OECD)提出的实质等同性原则,即生物技术生产的食品及其成分是否与目前市场上销售的食品具有实质等同性^[15]。实质等同性分析主要包括表型性状、关键性营养成分、毒性物质和过敏性蛋白分析等。其中关键毒性物质指该物种中固有的有显著毒性的物质及其含量(如马铃薯的茄碱、番茄的 α -番茄素等);过敏蛋白具有对T-细胞和B-细胞的识别区,产生专一性IgE(免疫球蛋白E)抗体^[16]。分析上述成分在哺乳动物体内的水解速率,是考查产品是否具有安全性的重要参数。若某一产品与市售食品有实质等同性,则认为它与市售食品一样安全。

食品安全性中的另一个重要问题是标记基因的安全性评价。标记基因的安全性包括其本身的安全性和标记基因编码蛋白的安全性。标记基因本身是DNA,与其它任何DNA的组成没有区别,DNA进入消化道后很快被降解,因此,WHO(1991)与FDA

(1994)认为食品中的转基因DNA本身并无安全性问题。基因水平转移的可能性非常小,一方面因DNA可很快被降解,另一方面即使DNA完整存在,其转移并整合进受体细胞也是一个非常复杂的过程,包括很多环节。标记基因编码的蛋白的安全性包括毒性、过敏性及蛋白功能等,目前尚无资料表明这些蛋白有危害性。迄今为止,只有以下两种标记基因具有相对详尽的安全性评价资料,即aph-II卡那霉素抗性标记基因和草甘膦抗性标记基因(编码EPSPS),是公认可以安全使用的两种标记基因。

总之,利用转基因植物生产口服疫苗的研究时间虽短,但进展喜人。随着对转基因植物中基因表达、产物免疫性和临床评价研究的进一步深入,必将开辟一条疫苗生产新途径。届时,疫苗的获得就会象获得苗木和种子一样简单,从而造福全人类。

[参考文献]

- [1] 张弘 美国运用转基因技术生产疫苗植物的研究与发展[J]. 全球科技经济瞭望, 1996, (1): 43- 45
- [2] 王宾 DNA疫苗的发展与应用[J]. 生物工程进展, 1995, 15(6): 21- 23; 32
- [3] 冯建民, 王宾 DNA疫苗研究现状及展望[J]. 生物工程进展, 1997, 17(6): 48- 50
- [4] 宋长征, 韩金详, 王美玲 转基因植物与食用疫苗[J]. 生物技术, 1995, 5(2): 5- 9
- [5] Tavladoraki P, Bervenuto E, Trinca S, et al Plant expressing functional single-chain FV antibody are specifically protected virus attack[J]. Nature, 1993, (366): 469- 472
- [6] O sar J M, Goddijn, Janpen. Plants as bio-reactors[J]. Trends in Biotechnol, 1995, 13(9): 379- 387.
- [7] 陈章良 植物基因工程研究[M]. 北京: 北京大学出版社, 1993
- [8] 罗明典 1991年生物技术领域若干方面研究进展[J]. 生物工程进展, 1992, 12(1): 7- 11.
- [9] 李思经 生物技术发展的现状和展望[J]. 生物工程进展, 1997, 17(1): 48- 51.
- [10] Hugh S M, Charles J A. Transgenic plants as vaccine production system s[J]. Trends in Biotechnol, 1995, 13(9): 388- 392
- [11] 王跃驹, 李刚强, 刘德虎 利用转基因植物生产乙肝口服疫苗[J]. 生物技术通讯, 1997, (5): 21- 25; 27.
- [12] Desheyes A, Herrera-Estrella L, Caboche M. Liposome-mediated transformation of tobacco mesophyll protoplasts by an escherichia coli plasmid[J]. The EMBO J, 1985, 4(11): 2731- 2737.
- [13] 闻玉梅 应用生物技术治疗病毒性肝炎研究[A]. 中国生物技术的崛起[C]. 北京: 科学出版社, 1996
- [14] Murray D K. Universal hepatitis vaccination: the economics of prevention[J]. Can Med Assoc J, 1992, 146(1): 19- 21.
- [15] 贾士荣 生物技术与食品安全性[J]. 生物技术通报, 1997, (1): 4- 9
- [16] 贾士荣 转基因植物的环境及食品安全性[J]. 生物工程进展, 1997, 17(6): 37- 42

The present situation and prospect of transgenic plant as oral vaccine

L I X iao-dong¹, CHENG Zhi-hui¹, YU Yan²

(1 College of Horticulture, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Tianjin Institute of Horticultural Engineering, Tianjin 300192, China)

Abstract The present paper introduces the characteristics of transgenic plant vaccines, and reviews the present situation and prospect of the study on using transgenic plant as oral vaccines

Key words transgenic plant; oral vaccine; traditional vaccine; gene vaccine