

疫苗生产的新途径——转基因植物

王捷¹, 郭勇²

(1. 广州军区医学实验中心, 广东广州 510010; 2. 华南理工大学生物工程系, 广东广州 510641)

R785 R392-33

摘要: 与发酵生产方式相比, 转基因植物疫苗生产技术具有高效、经济和简便等特点。植物表达系统生产外源蛋白一般采用两种方式: (1) 编码外源抗原基因与植物基因组稳定整合; (2) 利用植物病毒载体, 使外源蛋白在植物细胞中瞬时表达。植物系统生产的抗原疫苗可保持自然免疫原性质, 口服后能够诱发体液和粘膜免疫反应。

关键词: 疫苗; 转基因; 转基因植物

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A

Vaccine production in transgenic plants

WANG Jie, GUO Yong

(1. Medical Research Center of Guangzhou Military District, Guangzhou 510010, China; 2. Department of Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

Abstract: Transgenic plants as vaccine production systems represent an economical, simple and highly effective alternative to fermentation-based production systems. There are two different strategies for transgene expression in plants. (1) Stable genomic integration using genes encoding foreign antigens. (2) Transient expression using viral vectors. The vaccines produced by transgenic plants retain native immunogenic properties. The edible vaccines' can stimulate humoral and mucosal immunonresponses.

Key words: Vaccine; transgene; transgenic plant

生物科学和现代技术的飞速发展, 使原有的传统疫苗生产方式逐渐发生改变。近年来, 转基因植物作为一种新的生产体系正得以深入研究, 在重组蛋白药物和抗体制备领域已显示诱人前景。同时也提出了转基因植物系统生产医用疫苗这一概念, 与传统的细菌系统、酵母系统和哺乳动物细胞系统相比, 植物表达系统具有高效、价廉及方便等特点。目前利用转基因植物制备疫苗的研究在国内处于起步阶段, 至今尚未见正式报道。

1 口服疫苗与粘膜免疫反应

细菌和病毒等感染性因子可通过各种途径, 定居或侵袭上皮细胞膜, 而针对此类感染的疫苗必须

收稿日期: 1998-03-31

作者简介: 王捷 (1964-), 男, 博士, 副主任医师, 主要从事基因工程和生物制药领域的研究。

能够刺激粘膜免疫系统, 在粘膜表面(如消化道和呼吸道上皮)产生分泌型 IgA。应用亚单位疫苗或可溶性抗原进行口服免疫, 其诱导免疫反应的效果较差, 抗原用量大(毫克级水平)。况且发酵法生产的亚单位疫苗成本昂贵, 难于推广应用。由于转基因植物可在其可食用部分表达抗原, 因此可作为低廉的口服疫苗生产和输送体系。随着发展中国家对腹泻性疾病新型口服疫苗需求的增加, 不少来自肠道病原微生物的抗原成为转基因植物表达的外源蛋白。早期有关烟草的转基因研究报道较多^[1]。由于烟叶中含有大量有毒的生物碱, 如表达的抗原不经严格的纯化, 是不可能用于喂养动物的。目前较多采用土豆作为外源蛋白表达的宿主, 这是因为土豆的块茎可作为小鼠的饲料, 况且外源基因转染土豆数月后, 块茎组织即可长出用于喂养动物。近来发展了针对人用疫苗的香蕉转化体系^[2], 并对外源基因于香蕉果实高效表达的条件进行研究。尽管作为动物饲料的谷物, 如苜蓿、玉米和豆类等较难形成同一的转基因模式, 但它们仍是动物疫苗的首选宿主。

2 植物表达系统生产外源蛋白的方式

主要分为两种方式: (1) 外源 DNA 经土壤根癌菌 T-DNA 载体或微粒子轰击等直接方式转入植物, 稳定整合到植物的核基因组上; (2) 采用植物病毒载体, 使外源蛋白在植物中瞬时表达。

2.1 外源抗原基因稳定转染植物基因组

1990 年的国外专利文献最先报道应用植物表达系统生产可食用疫苗的概念。其将链球菌突变株 spaA 蛋白基因经土壤杆菌介导转化, 稳定地整合入烟草基因中并获表达; 表达量占烟草叶片蛋白的 0.02%。1992 年 Mason 等成功地在转基因烟草片中表达乙型肝炎表面抗原 (HBSAg) 基因^[1], 表达量占烟草可溶性蛋白的 0.01%, 电镜检测为 22 nm 球形颗粒。活性与蛋白结构分析表明与重组酵母表达的 HBSAg 几乎相同, 显示植物表达的外源蛋白能够正确折叠。将植物生产的 HBSAg 粗提物免疫小鼠后, 可激发与传统乙肝疫苗类似的免疫反应, 也能产生各型 IgG 和 IgM。在抗乙型肝炎病毒感染过程中, T 淋巴细胞介导的免疫反应起着关键作用。从免疫小鼠的淋巴结中分离出 T 淋巴细胞, 在体外经烟草或酵母表达的 HBSAg 刺激后呈现增殖现象, 表明植物生产的 HBSAg 包含 B 细胞和 T 细胞抗原决定簇, 并以病毒样颗粒形式存在, 其结构与目前商品化疫苗类似。

导致儿童严重腹泻的常见病菌包括霍乱弧菌及相关的肠毒性大肠杆菌。据报道口服灭活的霍乱弧菌和霍乱毒素 B 亚基 (CT-B) 对霍乱弧菌和肠毒性大肠杆菌感染具有保护作用^[3]。但 CT-B 的制备成本昂贵, 限制了其推广应用。研究发现大肠杆菌不耐热肠毒素 (LT) 是一种在结构、功能和抗原性三方面均与霍乱毒素 (CT) 十分相似的多聚蛋白质。LT 由一个分子量 27 KD 的 A 亚基 (LT-A) 和分子量 11.6 KD 的 B 亚基 (LT-B) 五聚体组成^[4]。LT-B 五聚体与粘膜上皮细胞表面的 GM 神经节苷脂特异结合后, 促使有毒性的 LT-A 进入细胞, 因此 LT-B 和 CT-B 均可作为合适的口服免疫原。在 LT-B 的 C 末端加入微粒体滞留序列 (Ser-Glu-Lys-Asp-Glu-Leu) 后, 可提高其在转基因烟草和土豆中的表达水平。LT-B 在微囊中的分离有助于单个亚基结合成稳定的五聚体形式。经凝胶色谱和与神经节苷脂亲合力的分析, 发现转基因烟草生产的 LT-B 至少部分呈五聚体形式^[5]。给鼠喂食 4 次 5 g 转 LT-B 基因土豆后, 肠道粘膜和血清中均出现相应的抗体; 而喂食正常土豆组, 未诱发免疫反应。表明口服含外源抗原的食物能够诱发免疫反应^[5]。

2.2 应用植物病毒载体瞬时表达外源抗原

应用植物重组病毒可在植物细胞中瞬间高效表达重组抗原。烟草花叶病毒 (TMV) 表达外源蛋白有两种方式: (1) 通过病毒基因组启动子控制外源基因的转录; (2) 外源蛋白或多肽通过与病毒衣壳蛋白融合方式。抗病毒蛋白- α 天花粉蛋白可以第一种方式于转染植物中高效表达^[6], 而颗粒形

式存在 (TMV 粒子) 的外源蛋白更具免疫原性, 因此与衣壳蛋白融合是一种更佳的方式。Turpen 等报道将携带疟原虫抗原决定簇的多肽, 以内部或 C 端融合方式与 TMV 衣壳蛋白重组后转染烟草, 均能稳定产生高滴度的重组病毒^[7]。蛋白印迹检测显示相应的抗疟原虫单抗可识别该重组衣壳蛋白。哺乳动物 B 卵母细胞的透明带蛋白 (ZP3) 可作为免疫避孕的靶蛋白。将含有 13 个氨基酸抗原决定簇的小鼠 ZP3, 在植物中以 TMV 衣壳蛋白融合方式表达。该重组病毒免疫小鼠后, 可诱发抗 ZP3 中和抗体产生, 同时卵巢发生病理改变, 免疫小鼠出现避孕现象^[8]。

豇豆斑驳病毒 (CPMV) 做为外源多肽的表达系统的优点在于: 表达量高 (每 kg 植物组织可产病毒 1~2 g), 温度稳定性好及病毒易于纯化。CPMV 是一 20 面体颗粒, 各含 60 个拷贝大、小表面蛋白。研究表明口蹄疫病毒的抗原决定簇可与 CPMV 衣壳蛋白融合表达, 但重组病毒在系列传输后发生插入 RNA 丢失现象^[9]。该表达方式有利于基因的稳定融合, 已用于制备人鼻病毒 14 和人免疫缺陷性病毒 (HIV) 的抗原决定簇, 动物实验显示表达产物具有免疫原性, 所诱导的抗 CPMV-HIV 嵌合抗体能够中和 3 株不同的 HIV-1。

3 展 望

植物系统生产的抗原疫苗可保持天然免疫原的形式, 这使得大规模方式生产抗原疫苗成为可能。如果抗原口服后能激发有效的免疫反应, 则该类疫苗因其制备成本低廉, 便于运输, 极具发展前景。但目前仍存在一些有待改进的问题, 包括如何提高外源蛋白的表达水平、表达的外源蛋白在植物收获后如何稳定地保存、如何增强一些抗原的口服免疫原性等。此外, 随着植物系统生产疫苗技术的发展, 有关口服抗原的变态反应性及免疫耐受性也正受到密切关注。如果外源蛋白属食物中的正常组份, 需要确定诱发口服免疫反应的抗原水平是否低于其诱发免疫耐受水平。由于口服免疫反应具有抗原特异性, 需要在分析单一疫苗的基础上, 确定何类植物最适于疫苗的生产, 这也将涉及探索外源蛋白在相应植物组织和细胞中的表达方式。总之, 在可食用疫苗研究方面, 动物疫苗比人用疫苗更有前景; 同时该领域的研究将促进对相关机制的认识, 从而推动整个疫苗研制的发展。

参考文献:

- (1) Mason H S, Lam D M, Arntzen C J. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992, 89 (24): 11745~11749
- (2) May G D, Afza R, Maso H S *et al*. Generation of transgenic Banana (*Musa acuminata*) plants via Agrobacterium-mediated transformation [J]. *Bio Technology*. 1995, 13 (5): 486~492
- (3) Clements J D, Dack D A, Harris J R, *et al*. Cross-protection by B subunit-whole cell cholera vaccine against diarrhea associated with heat-labile toxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli*: results of a large-scale field trial [J]. *J. Infect. Dis*. 1988, 158: 372~377
- (4) Sixma T K, Pronk S E, Kalk K H, *et al*. Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from *E. coli* [J]. *Nature*. 1991, 351 (6325): 371~377
- (5) Haq T A, Mason H S, Clements J D, *et al*. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants [J]. *Science*. 1995, 268 (5211): 714~716
- (6) Kumagai M H, Turpen T H, Weinzettl N, *et al*. Rapid, high-level expression of biologically active alpha-trichosanthin in transfected plants by an RNA viral vector [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993, 90 (2): 427~430
- (7) Turpen T H, Reinl S J, Charoenvit Y, *et al*. Malarial epitopes expressed on the surface of recombinant tobacco mosaic virus [J]. *Biotechnology*. 1995, 13 (1): 53~57
- (8) Fitch J, Beachy R N, Hein M B. Plant virus expressing hybrid coat protein with added murine epitope elicits autoantibody response [J]. *Vaccine*. 1995, 13 (12): 1051~1057
- (9) Usha R, Rohlf J B, Spall V E, *et al*. Expression of an animal virus antigenic site on the surface of a plant virus particle [J]. *Virology*. 1993, 197 (1): 366~374