

文章编号 :1003-8701(2004)01-0047-05

口蹄疫植物疫苗的研究进展

余云舟,金宁一,王 昱

(解放军军需大学植物基因工程研究中心,吉林 长春 130062)

摘 要:植物疫苗是利用植物表达重组抗原蛋白来生产疫苗。在植物中表达的抗原能够保持其自身的免疫原性。论文简要阐述了近 10 年来用植物表达系统生产口蹄疫疫苗的研究进展、优缺点及其应用前景。

关键词:植物 ;口蹄疫 ;疫苗

中图分类号: S853.31

文献标识码: A

生物技术在农业中的应用主要有两个方向 :一是利用基因工程生产转基因农作物 ,使得主要的粮食作物和经济作物具有抗虫、抗病、抗逆和增产等特点 ,即转基因食品 ;二是利用转基因植物生产医用产物。如利用转基因植物(包括重组植物病毒)生产疫苗、抗体及蛋白质多肽等。植物基因工程疫苗是当前分子生物学研究领域的一大热点 ,已经有十几种疫苗在植物体内获得了成功的表达 ,如乙肝病毒表面抗原(HBsAg)疫苗^[1-5]、大肠杆菌热不稳定毒素 B 亚单位(LT-B)疫苗^[6-8]、霍乱肠毒素 B 亚单位(CT-B)疫苗^[9-11]和口蹄疫病毒 (FMDV)疫苗^[12-17]等。将植物作为一种生物反应器来表达外源抗原生产疫苗 ,具有广阔的应用前景和重要的科学研究价值 ,在学术界和农业领域也引起了人们极大的关注。

1 植物疫苗表达系统

植物疫苗是把植物基因工程技术与机体免疫机理相结合 ,生产出能够使机体获得特异性抗病能力的疫苗。用植物生产基因工程疫苗主要有两种表达系统 ,一是稳定表达系统 ,把编码结构性抗原决定簇参与诱导保护性免疫应答的病原体 DNA 序列构建在植物表达载体中 ,利用农杆菌介导或基因枪轰击等方法 ,将抗原基因转化到植物细胞中 ,并整合到植物细胞染色体上 ,整合了外源基因的植物细胞在一定条件下可生长成新的植株 ,这些植株在生长过程中可表达出疫苗 ,并把这种性状遗传给子代 ,形成表达疫苗的植物品系^[18]。本系统具有以下优点 :①通过有性或无性繁殖的方法 ,可以获得大量的转基因植株 ;②通过有性杂交的方法 ,可以获得多价疫苗的转基因植物 ;③通过利用组织特异性表达启动子可以使抗原基因蛋白在器官或组织中特异性表达。二是暂时表达系统 ,主要是利用基因工程植物病毒为载体将编码疫苗抗原决定簇基因序列插入植物

收稿日期 :2003-06-24

基金项目 :“国家植物转基因中试及产业化基地”专项课题(J99-B-001)和 863 资助项目(2001AA213071)

作者简介 :余云舟(1978-),男,湖北孝感人,解放军军需大学植物基因工程研究中心硕士,研究方向:植物分子生物学及植物基因工程。

病毒基因组中,再用此重组病毒感染植物,抗原基因随病毒在植物体内复制、装配而得以高效表达。这一方法又可分为两种策略:一种是将抗原基因置于病毒基因组启动子控制之下^[19],另一种是将抗原基因与病毒外壳蛋白基因融合在一起^[20]。其中以第2种表达方式产物更具有免疫原性。目前作载体的主要有烟草花叶病毒(TMV)、豇豆花叶病毒(CMPV)、花椰菜花叶病毒(CaMV)和马铃薯X病毒(PVX)等。本方法的优点为表达量高,而且一般认为植物病毒不会传染动物,无交叉感染,但缺点是不能稳定遗传,表达产物仅为瞬时,而且每次以病毒为载体的表达系统每个宿主材料都要接种病毒载体。严格地说,此方法已不属于转基因植物的范畴,因为病原基因并不整合进植物基因组中。

2 植物疫苗的作用原理

利用转基因植物生产疫苗,就是指将抗原基因导入植物,使其在植物中表达,人或动物摄取该植物或食用其提取的抗原蛋白质,就可产生对该抗原的免疫应答。植物抗原引起的保护机制还在研究中,但显然植物细胞壁正好是抗原的临时保护伞,使它们在胃分泌物中相对安全。当细胞壁在肠中开始溶化时,抗原逐渐释放出来激活哺乳动物的免疫系统。消化疫苗时,植物抗原由粘膜免疫系统如胃肠道及呼吸道衬里(lining)的抗原取样细胞—M细胞(mast cells)将抗原传递给巨噬细胞,巨噬细胞和其它抗原呈递细胞再将抗原展示给辅助性T细胞。当辅助性T细胞识别外源的蛋白质片段后,就会刺激B细胞产生和释放能够中和抗原的抗体。当疾病因子出现时,记忆辅助性T细胞一方面刺激细胞毒T细胞攻击受感染细胞,一方面迅速刺激记忆B细胞分泌中和抗体,消灭入侵的病原体,并对“敌人”发动更为广泛的攻击。用植物生产的食用疫苗可同时具有激活粘膜应答和全身应答的双重效应,这将更有益于帮助哺乳动物增强对许多危险微生物的防御。

3 口蹄疫植物疫苗的研究现状

口蹄疫(Foot and mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(Foot and mouth disease virus, FMDV)引起的危及猪、牛偶蹄动物的一种急性、高度接触性、发热性和毁灭性的传染病,牛和猪等偶蹄动物感染后,会迅速传播,感染率和死亡率高,被国际兽疫局(OIE)列为A类传染病。目前防治口蹄疫的方法主要有3种:一是严格的检疫措施及封锁疫区;二是捕杀疫区内的所有病畜和易感动物,并进行彻底消毒;三是广泛的免疫预防。但前两种无论对经济还是社会都造成很大的影响,因而提前免疫防治成为控制该病的有效手段,所以,人们将力量集中于生产研制口蹄疫疫苗上。口蹄疫病毒(FMDV)是口蹄疫的主要病原,FMDV的结构蛋白P1为口蹄疫病毒的抗原位点,其结构蛋白P1成熟后裂解为VP1、VP2、VP3、VP4,其中VP1为主要抗原位点,能诱导机体产生抗FMDV中和抗体和抗病毒保护性免疫,是基因工程疫苗研究的对象。口蹄疫疫苗主要有传统疫苗和新型疫苗。传统疫苗包括弱毒疫苗和灭活疫苗。而传统疫苗由于免疫期短,存在散毒和毒力“返祖”等问题,所以人们积极探索安全有效的新型疫苗。植物基因工程疫苗是新型疫苗中最具有发展前景的一种疫苗。

3.1 暂时表达系统

1992年Lomonsoff等利用豇豆花叶病毒(CPMV)两个基因组的全长cDNA克隆,将口蹄疫结构蛋白基因VP1成功插入CPMV小衣壳蛋白基因的编码区中,重组质粒能转录RNA,并用机械方式接种于豇豆植株。接种植株的叶提取物电镜检测显示,存在聚集的CPMV状颗粒。由被侵染的叶组织纯化出杂合的病毒粒子,进行免疫实验,结果显示

能诱导特异性免疫应答。1999年 Wigdorroriz 等将 FMDV 结构蛋白基因 VP1 成功地插入到烟草花叶病毒(TMV)U1 基因组,接种烟草,用叶子提取物做免疫实验,也检测到免疫原性,能诱导特异性免疫应答。与同时进行的 VP1 转基因苜蓿的试验相比有更好的对 FMDV 免疫应答保护率。中国科学院上海植物生理生态研究所经过反复筛选,利用烟草花叶病毒研制成一种安全性很高的新型口蹄疫疫苗。该所科研人员从烟草中提取大量携带 11 肽、14 肽重组的 TMV 病毒颗粒,用它制成口蹄疫疫苗并将该疫苗在模式动物豚鼠和乳鼠身上进行免疫效率的测定。豚鼠免疫实验和乳鼠保护实验显示,这种疫苗具有良好的免疫性,在接受动物体内可激发出较高水平的中和抗体,抵抗病毒的入侵。但是,该系统尚有几个关键性问题需要解决:①抗原的纯化;②弱毒株系的选择,即病毒对植物的侵染不仅不能使植物生长异常,还要保证抗原基因的整合不会使病毒失去侵染和复制的能力;③现有植物病毒载体侵染的植物宿主范围有限。

3.2 稳态表达系统

由于暂时表达系统存在一些问题,利用稳态表达系统表达 FMDV 疫苗近年来成为研究热点。如 1998 年 Carrillo 等利用转基因拟南芥表达口蹄疫结构蛋白 VP1。他们将 FMDV VP1 基因转化到拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中,用植物叶子提取物注射小鼠,免疫动物对 VP1 区 135~160 合成肽、结构蛋白 VP1 和完整病毒粒子均可产生特异的抗体反应。这是首次利用转基因植物表达抗原引起动物产生抗病毒的全身免疫反应。1999 年 Wigdorovitz 等构建了 VP1 基因的植物双元表达载体,农杆菌介导法转化苜蓿,获得转基因植株,用转基因苜蓿叶子提取物注射小鼠和用新鲜叶子直接饲喂小鼠均可产生抗病毒特异免疫反应。2001 年 Carrillo 等将含 FMDV VP1 抗原基因 DNA 构建到植物表达载体上,转化马铃薯,获得转基因植株,口服饲喂后能够检测到特异性抗体,将其表达产物提取物免疫动物能够诱导动物产生特异性免疫应答。另外,2002 年 Dus Santos 等把口蹄疫病毒 VP1 结构蛋白 135~160 多肽(VP1 135~160)基因片段插入到 GUS 基因的前面构成融合基因,转化苜蓿得到转基因植物,通过检测 GUS 基因的表达,结果证明该多肽在苜蓿中表达,并也能诱导动物的特异性免疫应答。这些研究结果表明,用植物表达系统完全有可能生产有效安全的口蹄疫疫苗。

4 转基因植物生产口蹄疫疫苗的优缺点及其应用前景

目前世界上使用的口蹄疫疫苗仍是以口蹄疫弱毒疫苗为主,尽管这些弱毒疫苗是预防口蹄疫的有效手段,但存在着传播口蹄疫病毒的潜在危险性。因此,利用转基因植物作为生物反应器生产的口蹄疫疫苗易被广大农场主接受和推广应用。与其它基因工程疫苗相比,转基因植物生产基因工程疫苗具有以下优点:

①植物是一个能进行大规模生产的廉价生产系统。在获得稳定遗传的转基因植物后,扩大耕种面积就能提高疫苗的产量,它的上游生产成本较低,而能直接食用的植物疫苗不需特殊贮存条件,同时还可省去下游的加工开支。

②植物细胞具有完整的真核表达系统性。植物具有完整的真核细胞表达系统,表达的产物可进行糖基化、酰胺化、磷酸化和亚基正确装配等,正由于具有这些转译后加工特点,使其表达产物与高等动物细胞表达的产物具有一致的免疫原性和生物学活性,保持了自然状态的免疫原性。使用方便,可直接口服免疫,并产生较强的体液和粘膜免疫反应,比传统的免疫途径更有效,便于推广和普及用转基因植物生产疫苗。

③植物疫苗的安全性。转基因植物生产的疫苗中植物病毒不感染人体,故表达产物

安全可靠,起保护作用的是抗原蛋白,无毒性和副作用,无残存DNA污染和潜在致病、致癌性。

④植物疫苗使用方便,特别是用玉米或苜蓿做疫苗可直接食用,可大范围免疫动物。

FMDV植物疫苗有很大的优势,并且也取得了一定的研究进展,但仍存在很多需要进一步解决的问题。主要表现在:

①重组蛋白的表达问题。重组蛋白疫苗的表达量低,表达效率不稳定,表达效率的提高是亟待解决的问题,这是一个关键性的问题。但以上问题可考虑使用下述策略来解决:使用强启动子、前导序列和增强子;优化选择植物偏爱密码子;不稳定序列的去除;整合非依赖性的表达;伴侣蛋白促进蛋白质的正确表达;通过修饰抗原蛋白基因序列将其定靶于胞内表达;选用易于释放疫苗的植物品种等。

②重组蛋白的转译后修饰及糖基化问题。植物糖基化模式与动物糖基化模式的不同是否会影响到重组VP1蛋白抗原结合性、特异性,其理化性质与生物活性与动物和细菌来源的蛋白之间是否存在一定差异,目前还未见详细报道,有待于进一步研究。

③直接食用时易被消化问题,这也同时是一个作用机理问题。细胞壁是阻止抗原被降解的第一道屏障,植物细胞膜和细胞器膜可进一步保护抗原避免胃液、肠液的降解作用,植物细胞的次生壁可以使内含物释放得更慢,直到到达小肠内植物细胞壁才开始破裂逐步释放抗原,从而实现免疫功能,但需要对其中的细节问题进行研究。也可以采取在抗原基因上附加修饰基因或吸附基因序列(如菌毛蛋白基因),保护疫苗不易被迅速消化,使之长时间地停留在消化系统内,以增强抗消化作用。另外,VP1结构蛋白为口蹄疫病毒的核心抗原位点,但其易突变,可造成保护力不强,长期应用可造成免疫耐受方面的问题。

④表达产物的提取加工费用问题。用转基因植物生产的基因工程疫苗,有的可以直接食用,而有的则需要提取纯化抗原,除去植物碱和其它的一些有毒物质,所以要进一步研究和建立植物外源蛋白的提取和纯化技术,其后期的费用也是相当大的,并且如何进行重组蛋白大规模的提取与纯化还需要进一步研究发展。另外,如何长期保存贮存在植物种子中的重组蛋白等问题还有待于以后解决。

本实验室正在进行口蹄疫植物疫苗的研究工作,将FMDV P1全长基因转化玉米和马铃薯,获得了转基因植株^[21],下一步对其表达水平及免疫活性进行检测,以期获得食用口蹄疫植物疫苗。我们构建的载体含有用于提高目的基因转录和翻译的调控元件,能够在植物中高效高量表达有活性的蛋白产物,并且目的基因是全长P1结构蛋白基因,而不是VP1(主要抗原位点)或多肽序列,从而有可能解决以前用转基因植物生产疫苗外源蛋白表达量低、保护性的免疫力不强和容易引起免疫耐受等难题,为利用转基因植物生产口蹄疫植物疫苗提供了探索性研究。大量研究表明,在转基因植物中表达的病毒抗原,在经过基因工程处理后具有良好的免疫原性,并且这种抗原在安全性、经济性、稳定性和有效性等方面都要优于现有的各种疫苗。采用转基因植物作为生物反应器生产口蹄疫疫苗(包括其它各种疫苗),特别是能食用的疫苗具有很广阔的应用前景和潜在的社会经济效益,它完全能够开辟一个生产廉价疫苗的全新领域。

参考文献:

[1] Mason H S, Lam D M K, Arntzen C J, et al. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants[J]. Pro Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 11745-11749.

- [2] Mason H S, Arntzen C J. Expression of HbsAg in transgenic plants[J]. *Adv Sci Res*, 1994, 11: 1-5.
- [3] Domansky N, Ehsani P, Salmanian A H, et al. Oragan specific expression of hepatitis B surface antigen in potato[J]. *Biotechnol Lett*, 1995, 17(8): 863-866.
- [4] Ehsani P, Khabiri A, Domansky N N. Polypeptides of hepatitis B surface antigen in transgenic plants[J]. *Pro Natl Acad Sci USA*, 1997, 190: 107-111.
- [5] Richter L J, Thanvala Y, Arntzen C J, et al. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization[J]. *Nature Biotechnol*, 2000, 18(11): 1167-1171.
- [6] 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 .
- [7] Mason H S, Haq T A, Clements J D, et al. Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene[J]. *Vaccine*, 1998, 16(13): 1336-1343.
- [8] Tacket C O, Mason H S, losonky G, et al. Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato[J]. *Nature Medicine*, 1998, 4(1): 607-609.
- [9] Hein M B, Yeo T C, Wang F, et al. Expression of cholera toxin B subunit in plants[J]. *Ann NY Acad Sci*, 1995, 792: 50-56.
- [10] Arakawa T, Chong D K X, Merrit J L, et al. Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants [J]. *Trans Res* 1997, 6: 403-413.
- [11] Arakawa T, Chong D K X, Langridge W H R. Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine. *Nature Biotechnol*, 1998, 16(3): 292-297.
- [12] Ush R, Rohll 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: 366-374.
- [13] Wigdorovitz A, Perez Filgueira D M, Robertson N, et al. Protection of mice against challenge with foot and mouth disease virus (FMDV) by immunization with foliar extracts from plants infected with recombinant tobacco mosaic virus expressing the FMDV structural protein VP1[J]. *Virology*, 1999, 264 (1): 85-91.
- [14] Carrillo C, Wigdorovitz A, Olieros J C, et al. Protective immune response to foot-mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants[J]. *Viol*, 1998, 72(2): 1688-1690.
- [15] Wigdorovitz A, Carrillo C, Dus Santos M J, et al. Induction of a protective antibody response to food and month disease virus in mice following oral or parenteral immunization with alfalfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1[J]. *Virology*, 1999, 255(2): 347-353.
- [16] Carrillo C, Wigdorovitz A, Trono K, et al. Induction of a virus-specific antibody response to food and month disease virus using the structural protein VP1 expressed in transgenic potato plants[J]. *Viral immunol*, 2001, 14(1): 49-57.
- [17] Dus Santos M J, Wigdorovitz A, Trono K, et al. A novel methodology to develop a foot and mouth disease virus(FMDV) peptide-based vaccine in transgenic plants[J]. *Vaccine*, 2002, 20: 1141-1147.
- [18] Fullner J, Lara JC, Nester EW, et al. Pilus assembly by agrobacterium T-DNA transfer genes[J]. *Science*, 1996, 273 (5278): 1107-1109.
- [19] Kumagai M H, Turpen T H, Weinzettl N, et al. Rapid high-level expression of biologically active alpha-trichosanthin in transfected plants by a RAN viral vector[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(2): 427-430.
- [20] Turpeu T H, Reiln S T, Charoenvit Y, et al. Malarial epitopes expressed on the surface of recombinant tobacco mosaic virus[J]. *Bio/Technology*, 1995, 13(1): 53-57.
- [21] 李 昌,金宁一,王 罡,等. 基因枪法转化马铃薯及转基因植株的获得[J]. *作物杂志*, 2003, 1: 12-14 .

Progress of Studies on Plant-based Vaccine of Foot and Mouth Disease

YU Yun-zhou, JIN Ning-yi and WANG Gang

(*Quartermaster University of PLA, Changchun 130062, China*)

Abstract: The utilization of plants as bioreactor expressing recombinant antigen proteins to produce vaccine is plant-based vaccine. The recombinant antigen proteins could elicit a significant immune response and maintain their immunogenicity. Studies on foot and mouth disease vaccine using plant expression system in recent ten years were summarized. Advantages and disadvantages of this method were pointed out and prospects of such studies suggested in the paper.

Key words: Plant; Foot and mouth disease; Vaccine