

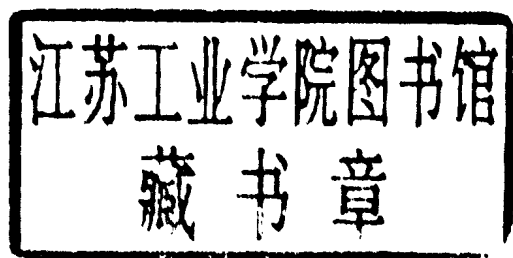
现代疫苗设计原理

姜 平 李祥瑞 主编

中国农业出版社

现代疫苗设计原理

姜平 李祥瑞 主编



中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

现代疫苗设计原理/姜平, 李祥瑞主编. — 北京: 中国农业出版社, 2000.2

ISBN 7-109-06174-4

I. 现… II. ①姜…②李… III. 疫苗-研究 IV. R979.9

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (1999) 第 70774 号

中国农业出版社出版
(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100026)

出版人: 沈镇昭

责任编辑 王玉英

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行
1999 年 12 月第 1 版 1999 年 12 月北京第 1 次印刷

开本: 850mm×1168mm 1/32 印张: 6.75

字数: 166 千字 印数: 1~2 200 册

定价: 18.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

主 编 姜 平 李祥瑞

副 主 编 朱鸿飞

编写人员 (以姓氏笔画为序)

朱鸿飞 (南京农业大学 硕士)

吴贤福 (中国兽药监察所 博士)

李祥瑞 (南京农业大学 博士)

杨 奎 (南京农业大学 博士)

金 红 (中国农科院哈尔滨兽医研究所 博士)

范红结 (南京农业大学 硕士)

单松华 (上海出入境检验检疫局 硕士)

姜 平 (南京农业大学 博士)

审 稿 蔡宝祥 (南京农业大学 教授)

张振兴 (南京农业大学 教授)

序

邓小平同志曾说过，中国在世界高科技领域要占有一席之地。面临世纪之交，经济和社会的持续高速发展，对基础研究提出越来越高的要求。许多科学问题都迫切需要通过基础研究从深层次上探求解决办法。在预防人类和动物疫病研制方面也迫切需要通过高科技的基础研究，为研制高质量的新型疫苗提供科学技术储备。姜平和李祥瑞等几位青年博士收集了大量有关专业文献，系统总结了国内外疫苗研究的新理论和新知识，编写成这本《现代疫苗设计原理》。本书以分子生物学和分子免疫学理论为基础，探讨了发展现代新型免疫中有关免疫机理、病原体致病机理以及重组活载体疫苗的载体等问题，可为新型疫苗的研究提供理论指导。该书内容基本反映了国际现代疫苗的发展水平和研制新型高效疫苗的设计原理，该书的出版将可填补国内尚无此类专著空白，并将为我国的生物制品研究在 21 世纪初迈进世界高科技领域作出有益的贡献。

蔡宝祥

1999 年 8 月

前 言

众所周知，疫苗是控制疫病流行的重要手段之一。随着分子生物学和分子免疫学的发展，新型疫苗研究已经成为现代生物技术的热点之一，其中包括基因缺失疫苗、遗传重组疫苗、多肽或亚单位疫苗和合成肽疫苗等。但是，迄今为止，已投产销售的人畜新型疫苗，仅有预防幼畜腹泻用的致病性大肠杆菌菌毛疫苗、猪伪狂犬病基因缺失疫苗及人的乙型肝炎疫苗等少数几种，其主要原因是对其免疫机理和保护效果机理知之甚少，以及新型疫苗要解决的问题常常是多年以来常规疫苗没有解决的难题。在我国，尽管新型疫苗的研究也已开展多年，但大多数是根据经验或仿照国外研究报道，创新不够，缺乏理论指导，而近几年，国外在免疫机理和病原致病机理及重组活载体疫苗等多方面，有了很多研究报道。鉴此，作者组织了国内从事过新型疫苗研究的5名青年博士和3名硕士，收集了大量国内外成熟的研究文献，系统总结了国内外疫苗研究新理论和新知识，编写成《现代疫苗设计原理》一书。

本书共分八章，集中介绍了：(1) 免疫记忆与致病性和疫苗保护效果的关系；(2) T淋巴细胞共刺激和B协同刺激机理及其对疫苗有效性的重要意义；(3) 细胞因子用于疫苗的理论基础及作为疫苗佐剂的实际效果；(4) 肠道黏膜免疫机理与发展新型口服疫苗可行性；(5) 构建活载体疫苗的细菌载体和病毒载体的基本理论和应用前景，内容丰富新颖，基本反映了国际现代疫苗的发展水平和研制新型高效疫苗的设计原理。本书既可作为医学和兽医学专业教师和研究生教学参考用书，同时也是我国致力于生

物制品研究学者和从事生物制品制造和管理人员的参考资料。

本书涉及到分子免疫学及分子病毒学最新理论和疫苗设计的最新原理等多个方面，由于编写时间仓促，才疏识浅，错误与疏漏在所难免，诚望有关专家学者和广大读者予以批评指正。

编 者

1999年8月3日

目 录

序

前言

第一章 免疫记忆与致病性和疫苗保护效果的关系	1
一、致敏细胞调节免疫记忆反应	1
二、影响反应时间的因素	2
三、不同的效应功能	7
四、免疫记忆反应的局限性	9
五、结语	14
参考文献	14
第二章 T 细胞共刺激与疫苗设计	24
一、CD28/CTLA4 相互作用介导的共刺激途径分子	25
二、诱导记忆 T 细胞的多重共刺激途径	28
三、T 细胞共刺激与 CD4 ⁺ 、CD8 ⁺ T 细胞的免疫 辅助	30
四、T 细胞共刺激与肿瘤疫苗	33
五、结语	34
参考文献	35
第三章 B 细胞协同刺激和疫苗设计	46
一、T 细胞依赖性 & 非 T 细胞依赖性抗体应答	47
二、疫苗接种中非 T 细胞依赖型抗体应答的协同 刺激作用	47
三、体液应答中 CD40-CD40L 的相互作用	48
四、其它刺激信号	51

五、记忆 B 细胞发育所需要的协同刺激和细胞因子 以及生发中心微环境	53
六、结语	54
参考文献	54
第四章 细胞因子用于疫苗的理论基础	64
一、细胞因子在常规疫苗中的作用	65
二、抗免疫病理疫苗	74
三、新细胞因子遗传学	75
四、结语——含细胞因子疫苗之未来	76
参考文献	76
第五章 细胞因子佐剂——过去的认识和对未来的指导	84
一、干扰素 (interferons, IFN)	84
二、炎症细胞因子	87
三、淋巴细胞刺激细胞因子	90
四、细胞因子的毒副作用	94
五、细胞因子的给药方式	95
六、IL-12 和 T 辅助细胞的作用机制	96
七、平衡应答	99
八、结语	99
参考文献	100
第六章 肠道黏膜疫苗的设计	111
一、胃肠道免疫系统	112
二、接种疫苗的考虑: 胃肠道抗原特异免疫反应	117
三、新的黏膜免疫佐剂——神经肽	124
参考文献	127
第七章 构建活载体疫苗的细菌载体	137
一、沙门氏菌载体	138
二、卡介苗载体	152
三、其它细菌疫苗载体	156

四、结语	164
参考文献	165
第八章 构建活载体疫苗的病毒载体	178
一、用作活载体的疫苗病毒	179
二、用基因工程法制备安全的疫苗和载体	188
三、制备病毒疫苗的其他方法	191
参考文献	197

第一章 免疫记忆与致病性和疫苗保护效果的关系

在初次免疫中，免疫反应的产生遵循下列规则，即当宿主再次接触病原时，更有能力预防疾病发生。接触过抗原的 T、B 淋巴细胞可以长期存在，在再次遇到相应抗原时，可以产生免疫记忆反应。众所周知，初次 B-、T- 淋巴细胞反应与抗原再次攻击所引起的免疫反应不同。免疫记忆这一术语被用于区分二次和初次反应。初次反应中，记忆细胞对特异性抗原和非特异性信号产生应答而逐渐形成记忆功能。

尽管对记忆或回忆反应的细胞或分子机理知之甚少，但已经产生了许多成功的疫苗。然而，在控制许多重要疾病中，传统疫苗已显现出明显缺陷。同样，现代疫苗也面临巨大挑战，包括（1）对那些自然接触病原后诱导的免疫不能控制的疾病进行免疫保护。（2）延长疫苗免疫力的持续时间。（3）保护黏膜表面。（4）有效预防小儿和成人急性疾病。我们必须将保护性免疫的产生机理与疾病致病机理的有关知识相结合，运用各种独立的技术（如分子生物学，配方，细胞生物学，遗传致弱等）预防那些传统疫苗不能控制的疾病。本章将阐述在疫苗设计中需要认真考虑的问题。

一、致敏细胞 (educated cells) 调节免疫记忆反应

免疫记忆通常在初次免疫后相当长时间内有能力对抗原产生更强的二次反应。这一原理是疫苗免疫的基础，其细胞与分子机理正逐渐被阐明^[1~6]。

一般认为,二次免疫反应的效应细胞群来自特定的 T、B 细胞亚类。这些特定的细胞亚类在初次感染中形成,称为记忆细胞(memory cell)。之所以称为记忆细胞,是因为它们由初始细胞分化而来。初始细胞可以产生初次反应的效应细胞和记忆细胞。与初始细胞相比,记忆细胞通常能更快地产生免疫反应,它定居于特定的组织中,抗原识别能力和效应功能更强。这些特性均在初次反应中获得。必须强调的是,诱导记忆反应并不一定对二次感染产生免疫保护。正象 Doherty^[2]所指出的那样,免疫记忆是一个可数量化的生物学整体过程,而对再次感染所致疾病的免疫保护机制也极为复杂,两者必须加以区别。

二、影响反应时间的因素

感染与产生功能性免疫之间的时间间隔对疾病病理变化的发展极为关键。因此,激发二次免疫反应的速度对控制二次感染及其扩散至关重要。下面将简述与加速免疫反应相关的细胞及分子机制。

1. 效应细胞比率长期增加

有证据表明,在二次免疫反应过程中,能够对抗原起反应的前体细胞(precursor cell)的比率高于初次反应。运用有限稀释分析法(limiting dilution analysis)计数接触抗原过程中前体细胞的数目,已在多种模型中证明了这一现象^[2]。计算抗体生成细胞(antibody-producing cell)数^[3,4],可以研究 B 细胞的比率。测定细胞增殖、细胞因子产生、或细胞毒性能够确认 T 细胞的比率。这些研究表明,初次免疫反应后前体细胞的比率大大提高。通过对富集的 CD4⁺ 细胞的计数,证明仙台病毒(Sendai virus)感染后病毒特异性记忆细胞的比例大约为 1:400,而初次感染鼠前体细胞的比率为 1:1000^[5]。还有报道^[6]表明,用可溶性蛋白(KLH)加佐剂免疫后,抗原特异性 CD4⁺ T 细胞增加 20~50 倍,细胞毒性 T 细胞(CTL)的前体细胞比率也有类似

的增加。记忆反应的形成与抗原特异性细胞比率增加有关，若不保持高比率的前体细胞（即很大的细胞库）则不能产生记忆反应。

早期的研究表明要保持长期记忆反应，就需要抗原的长期存在。研究表明，2, 4-二硝基苯酚（DNP）活化的 B 细胞被动转移后，在无抗原存在时不能长期生存^[7]。这一点得到了有力支持。人们发现，在数月或数年内仍可以从生发中心的滤泡树突状细胞（follicular dendritic cell）表面分离到抗原^[8]对鼠辅助性和细胞毒性反应所进行的研究也支持这一点。将针对 KLH 的辅助性 T 细胞转移给辐照过的鼠后，对 KLH 的免疫应答时间很短^[9]。将 H-Y 活化的 T 细胞转移给裸鼠（nude mice），同时注射或不注射抗原，也获得了类似的结果。在淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒（LCMV）抗原持续存在时，CTL 反应增强，但在无抗原时，病毒抗原特异性 CD8⁺ 记忆细胞很快消失^[10]。在上述各项研究中，通过被动转移，使淋巴细胞不能与抗原接触，可导致记忆活性在几周内明显丧失，同时前体细胞比率降低。

其它一些研究则表明，抗原并不是长期保持记忆所绝对必须的^[11]。在测不到抗原存在的情况下，记忆性 CD8⁺ 细胞毒性 T 淋巴细胞可长期存在，并可对攻击产生免疫保护。从 LCMV 免疫鼠中纯化 CD8⁺ T 细胞，去除抗原提呈细胞，被动转移给未感染鼠后，测定它们的存活时间。在转移之前，对纯化的细胞严格检查，以确定无病毒物质存在。受体鼠经 PCR 检查，不能检出病毒，也无任何血清学变化。转移后，定期剖杀受体鼠，用体外试验再次刺激脾细胞，以确定 LCMV 特异性 CTL 活性。结果表明，受体鼠内来自供体的 CTL 反应在一年多的时间内下降不足 2 倍^[12]。同样，针对其它病毒的记忆 CTL 在无特定抗原的环境中也极为稳定。流感病毒活化的 CTL 转移至辐照的受体后，可以持续至少 25 周^[13]。同样，仙台病毒特异性 CTL 前体细胞在辐照过的、缺 $\beta 2$ 微球蛋白的无感染鼠体内可以保持 5 周以上。

表明, 记忆 CTL 可以在无抗原的情况下长期存在^[14]。抗原在保持长期记忆反应中的重要性也受到细胞退化 (cell depletion) 试验的挑战。用抗 CD4⁺ 单克隆抗体处理长期致敏的小鼠, 结果显示, 对 T 细胞依赖性抗原的 B 细胞记忆反应并不降低。

有关保持高比率前体细胞的第三种模型认为, 长期记忆反应是靠交叉反应性抗原周期性活化 T 细胞而保持的, 这些交叉反应性抗原可能是自身成分或外来抗原^[16]。最近报道^[17], 先以 LCMV 免疫 C5BL/6 小鼠, 再接种 pichinde 病毒 (PV) 或疫苗毒 (VV), 所引起的 CTL 反应可以诱导针对 LCMV 的特异性记忆反应^[17]。运用有限稀释分析法证明, 在 LCMV 免疫小鼠中, 至少有部分记忆细胞反应在克隆水平上与交叉反应有关, 而不是由保守蛋白所引起。研究还表明, 对某种病毒的免疫可以调节对第二种病毒的初次免疫反应, 其结果是, 事先接触无关病原可能修正宿主对病毒感染的初次反应。记忆 T 细胞表面黏附分子 (adhesion molecules) 反应性的增强有利于与交叉反应抗原的低亲和性 (low affinity) 作用。

在人类或兽医病毒感染中, 感染或注射疫苗后, 抗体可持续或长期存在^[18]。小鼠从单次感染恢复后, 高水平病毒特异性血清抗体可终生存在。在这种情况下, 3 或 4 周后, 淋巴结或脾脏中只能发现少数免疫球蛋白 (Ig) 形成细胞, 一些浆细胞也短暂地定位于诸如消化道或呼吸道的黏膜部位。但是, 在小鼠的一生中, 均可在其骨髓中发现病毒特异性抗体形成细胞 (AFC)^[5]。综合考虑所有这些发现, 可以推测, B 和 T 细胞记忆反应的长期存在是否需要抗原将因病原或抗原而易。这些发现还表明, 记忆细胞是短时还是长期存在, 可依赖于抗原, 也可不依赖于抗原。这种不同的需要将会影响疫苗对不同病原的免疫效果。

2. 对协同刺激信号反应性和识别能力增强

原始抗原特异性细胞 (naive antigen-specific cell) 需要强信号刺激, 而活化 (educated) 的或记忆细胞则不需要。原始或静

止 (resting) T 细胞需要很强的刺激, 而抗原活化的记忆细胞对刺激的反应更强。但是, 无论是原始或静止细胞, 还是记忆细胞, 均需 T 细胞辅助。记忆 B 细胞所需要的辅助较低, 它们受到少量抗原刺激即可增殖, 且只需少量辅助 T 细胞和少量淋巴因子。记忆细胞反应能力被全面增强还表现在它们不需要太严紧的抗原提呈细胞。这一点在 T 细胞受体 (TCR) 转基因小鼠中得到证明。在 TCR 转基因小鼠中, 所有抗原特异性转基因细胞均属于静止或原始细胞表现型^[22], 只有当抗原提呈至树突状细胞 (dendritic cell) 或活化的 B 细胞时, 原始 T 细胞才对之起良好反应。原始转基因 T 细胞对由未活化的巨噬细胞或静止期 B 细胞提呈的抗原反应性很差。与之相对, 静止 B 细胞或巨噬细胞可有效地再刺激静止记忆细胞和活化的效应细胞。一些细胞具有较强的抗原提呈细胞 (APC) 功能, 可能与表面受体的表达有关。这些表面受体可与 T 细胞受体 (TCR) 刺激信号一起成为协同刺激因子, 其中包括 B7 (后面将讨论)。在即使是抗原由非 APC 提呈时, 活化过的记忆细胞也能识别抗原, 这一点必定依赖于 T 细胞的表型特征, 而这些表型特征是 T 细胞在初次免疫反应中获得的。这样, 在开始与抗原接触过程中所传递的信号, 使记忆 T 细胞做好了准备, 以至于所需的再次刺激强度变低。也有可能, 在初次反应中的活化, 是生发中心克隆选择和 B 细胞体细胞突变 (somatic mutation) 所引起, 并导致抗体成为更有效的 B 细胞抗原受体^[23]。二次反应与初次反应的全部 B 细胞类群不同^[24~27], 支持了上述观点。有人推测^[28], 在初次反应中, 随着抗原浓度的降低, 只有具有高亲和性 (high affinity) 受体的 B 细胞被选择并被扩增。在生发中心, 表达高亲和性 Ig 的变异细胞更能成功地与滤泡树突状细胞 (FPC) 表面免疫复合物中的抗原竞争性结合^[29,30]。只有那些与抗原具有高亲和性的克隆被选择^[31~33]。高亲和性抗原结合细胞被选择后进入记忆库中或进一步分化为浆细胞。目前, 正在对指导细胞进入这些路径的信

号进行研究。经由 CD40 传递的信号促使小静止淋巴细胞发育。这些小静止淋巴细胞的表型似乎与 B 细胞相似^[34~36]。所有这些观察表明,对抗原的有效识别是形成免疫记忆的关键,而非特异性辅佐细胞在这一活化过程中居中心地位。这样,初次反应中传递的信号对淋巴细胞进行活化,使再次反应从质和量上有别于初次反应。

3. 黏附分子、归巢(homing)分子和复合受体分子的表达发生变化

记忆细胞各亚类的移行与原始细胞极为不同。原始细胞相对均匀地移行至二级淋巴组织^[38],但很少定居于其它淋巴器官。相反,记忆细胞移行很不一致。在某种情况下,就特定的二级或其他淋巴组织而言,移行因组织而不同^[39,40]。

积累的大量资料表明,原始细胞、效应细胞和记忆细胞倾向于经由不同的组织移行,这是因为淋巴细胞和血管内皮细胞表达的黏附分子不同。对绵羊淋巴细胞的分析揭示,正常皮肤 T 细胞几乎全部是记忆细胞,相反,输出血管内 T 细胞(其中大多数取自内皮小静脉)大多数为原始表型^[38,41,43]。用啮齿动物和绵羊所进行的研究表明,来自内脏的淋巴细胞倾向于移行回内脏,来自皮肤或淋巴结的倾向于移行回皮肤或淋巴结^[44~46]。

用皮肤淋巴细胞抗原(CLA)所做的试验揭示,细胞因子在训练淋巴细胞更有效移行中可能起作用。CLA 是一低聚糖,仅由与皮肤有关的记忆或效应 T 细胞表达,其配体(E-选择蛋白, E-selectin)倾向存在于皮肤部位^[39,40]。最近的研究表明,在体外试验中,在白细胞介素-2(IL-2)和转化生长因子(TGF- β 1)及少量 IL-6(但不是大量的其它细胞因子)存在时,活化未接触抗原的 T 细胞,可导致 CLA 表位表达水平的稳定提高,以及结合 E-选择蛋白的能力增强^[48]。这些观察使人们认为,细胞因子微环境通过修正淋巴细胞归巢受体(homing receptor)及其配体的表达和功能,进而在免疫细胞的分布中起关键作用^[49]。

IgA 浆细胞往往位于黏膜中，这是 B 细胞选择组织而居的典型例子^[50]。相反，淋巴结和脾脏内的母细胞或浆细胞通常为 IgM 或 IgG 型。胎儿中的 B 细胞 ($\mu + \delta +$) 已经表达 L-选择蛋白，并移至淋巴结。在第二次反应中，骨髓中的大多数抗体生成细胞来自浆细胞，这些细胞源自淋巴结，经淋巴和外周血液循环移至骨髓。上述观察表明，初次反应 T、B 淋巴细胞所需的组织特异性，是二次反应加速的首要前提。

三、不同的效应功能

抗原再次攻击所引起的体液和细胞免疫效应功能与初次接触抗原后所检测到的极为不同。“记忆免疫反应比初次反应更快、更强”这句话是对这一现象的通俗描述。这句话通常指二次反应的应答细胞更多、抗体量更大。但未描述也未考虑反应类型的巨大不同。有证据表明，二次和初次反应效应细胞功能有质的不同，这是记忆反应保护力的关键。

1. 细胞因子产生范围更广

原始 CD4⁺ 细胞产生高水平的 IL-2，但很少或不产生其它细胞因子^[22,52]。事实上，比较新生儿和成人 T 细胞后发现，两者均表达 IL-2 及其受体，但只有成人 T 细胞可以转录 IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、干扰素 (IFN) - γ 和粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) mRNA。已经证明，在体外对新生儿 T 细胞进行活化，可以使 T 细胞功能发生分化，使之表达的所有淋巴因子呈现出接触过抗原的成人 T 细胞的特征。这些细胞在功能上已变得与成人血液中被抗原刺激过的 T 细胞难以区分^[53]。所以，记忆细胞区别于原始细胞的一个重要特征是它们可以产生高水平的细胞因子而不仅仅是 IL-2^[54]。在无慢性刺激存在时，T 细胞反应的效应阶段通常很短，但已足以使静止记忆细胞产生强记忆细胞。令人感兴趣的是，在训练 T 细胞具有更广效应细胞功能的过程中似乎伴有记忆细胞的发育。这些记忆细胞在二次接触抗