DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.10.031

综述

文章编号:1000-5404(2000)10-1012-04

DNA疫苗与CTL

DNA-vaccines and cytotoxic T lymphocytes

倪 兵,吴玉章 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

强力有效的免疫策略对一些疾病如感染性疾病和肿瘤等是迫切需要的,而传统途径和分子免疫途径到目前为止并没有取得太大的成功。最近关于不同T细胞亚群的作用的研究使得解决这个问题有了一个更加合理的途径。现在已知,对多种感染性疾病特别是病毒感染如人免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)的感染以及肿瘤的防治需要产生强有力的细胞介导的免疫反应(Cell-mediated immunity, CMI)。CMI反应一般由$CD8^+$细胞毒性T淋巴细胞(Cytotoxic T lymphocyte, CTL)和Th1表型的$CD4^+$辅助T细胞(T helper, Th)所介导,两者各自表现出各种不同的功能效应。能产生强大的CMI的疫苗现在被认为在控制许多胞内病原包括HIV的感染方面有着美好的前景。现对DNA疫苗与CTL的关系作一综述。

1 DNA疫苗的生物学特性

能模拟感染性微生物抗原性的疫苗最终可能被证明为获得特异保护性免疫反应的最有效的策略。在这方面,DNA疫苗相对于以前的免疫策略有着强大的优势[1,2]:(1)易操作性和稳定性:对于质粒来说,不管其编码序列如何,都可用相同的方法加以纯化和处理。而且质粒的热稳定性远高于蛋白质,这一点决定了DNA疫苗在热带地区应用的优越性。另外,由于其易操作性和稳定性,也决定了DNA疫苗生产成本相对低廉,这就为DNA疫苗在发展中国家的大规模使用铺平了道路。(2)在体内持续表达,持续刺激免疫系统。虽然在免疫后的两周左右,抗原水平有一个骤降,但其后则会维持相当长的一段时间,在有些动物中甚至是终生相随。(3)除了产生强有力T细胞免疫之外,体液免疫功能也较强,并且是抗原特异的中和抗体。(4)可方便地制备出多价DNA疫苗。由于每个人表达MHC分子的特异性(每个人单体型的特异性)决定了哪种抗原蛋白的表位肽将被提呈于细胞表面,所以,传统肽疫苗必须含有很多不同的表位肽来覆盖所有存在于正常人群中的单体型。但是,利用DNA疫苗,可以选用表达全长蛋白的DNA片段(也称为小基因),以便免疫系统根据每个人自己的HLA单体型来选择合适的表位。(5)DNA疫苗在机体内所表达的蛋白将以天然蛋白形式出现,也就是说它可以有正确的空间结构和适当的修饰,这对免疫系统来说无疑更合适。(6)当在质粒中整合入CKs(Cytokines)或共刺激分子基因,或与编码这一成分的质粒共注射时,将能加强随后机体对编码抗原的反应,或可调节正在起作用的免疫反应。(7)DNA疫苗风险小。既不会感染,目前也尚未发现其与宿主基因组的整合。

2 DNA疫苗激活CTL反应的机制

过去几年来DNA免疫的最大进展之一是阐明了细菌质粒编码抗原的体内加工提呈机制。值得指出的是DNA免疫后,DNA疫苗在体内产生的抗原量通常只有皮克到纳克水平。相对于这样少量的抗原,其在体内诱导的免疫反应却很强,这一定与DNA疫苗所转染的细胞类型和/或DNA本身的免疫增强机制(即CpG结构单元)有关。

DNA疫苗在体内的加工和提呈以产生免疫反应至少有3种机制,它们分别是直接转染体细胞(如肌细胞和角质细胞)、直接转染专职APCs和交叉激活。

2.1 直接转染体细胞

两个最早期实验[3,4]显示,将DNA直接注射入肌肉可导致蛋白的表达和CTL反应的诱导。随后又证实,过继转移已稳定转染并表达流感病毒核蛋白的肌原纤维,能保护小鼠免受流感病毒的感染。这直接证明了体内肌细胞表达病毒蛋白足以诱导CTL介导的免疫反应。但问题依然存在,CTL反应是直接由表达蛋白的肌细胞诱导的还是肌细胞所表达的蛋白转移给专职APCs以后而间接诱导(交叉激活)的呢?为了评价在DNA接种后肌细胞在诱导细胞免疫反应中所起的直接作用,随后就出现了骨髓嵌合实验[5]。这些实验结果显示,肌肉内接种DNA后,抗原特异CTL反应不能由非骨髓源性细胞(肌细胞)所诱导。而且,在另一个实验中,肌肉内接种DNA后10 min内切下注射部位的肌肉并不改变随后的免疫反应。所有这些结果提示,在DNA接种后肌细胞所起的调节免疫反应的作用很可能是间接的,并且是通过交叉激活来实现的。

除了肌肉内接种DNA之外,另外一条主要途径是经皮注射DNA疫苗。皮肤除了有丰富的体细胞如角质细胞和成纤维细胞外,还有骨髓源性APCs如Langerhans细胞。在这方面,已有许多实验[6]对DNA接种后皮肤中这些细胞的免疫调节作用进行了评价。实验结果显示,经皮DNA接种后,出现了很好的免疫激活反应,而接种部位却保持完整。而且,免疫反应是由

作者简介:倪 兵(1968—),男,湖北省黄梅县人,博士研究生,讲师,主要从事肿瘤DNA疫苗方面的研究。电话:(023)68752236

收稿日期:2000-08-04;修回日期:2000-09-19

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

源自皮肤的被转染的 APC 所诱导和/或非淋巴细胞转移抗原后由淋巴结内的骨髓源性 APCs 所提呈。另外, 皮肤中转染的体细胞如角质细胞可以作为抗原库以影响免疫反应的幅度和维持的时间[7]。

2.2　直接转染 APCs

在 DNA 接种所激活的免疫反应中, 除了上述的体细胞的作用外, 骨髓源性细胞在此过程中也起着非常重要的作用。在骨髓重构实验中, 注射入 F1-骨髓重构小鼠中的亲本细胞在单倍型体细胞和骨髓源细胞间产生错配; DNA 接种后的免疫反应对重构骨髓的单倍型有严格的限制。这些结果清楚说明骨髓源性细胞在 DNA 接种后的免疫反应激活中起着非常关键的作用。3 个不同的评价各种 APCs 的作用的实验结果显示 DNA 接种后只有很少部分的 APCs 被转染(0.4%)。而且, 在体外实验中, 只有 DC 而不是 B 细胞能有效地提呈抗原给 T 细胞系或杂交瘤。另外, 体内引流淋巴结的直接显示技术也显示 DNA 疫苗所表达的抗原位于形态上与 DCs 一致的细胞内。综合这些结果所得出的结论是在 DNA 接种后, 少量的直接被感染的 DCs 在激活免疫反应中起着关键作用。DCs 可根据其功能与谱系分成各个亚类[8]。在小鼠中, $CD11c^+CD8^+$ 细胞称为"淋巴" DCs, 而 $CD11c^+CD8^-$ 细胞称为"髓样" DCs。在诱导细胞免疫反应方面, $CD11c^+CD8^+$ 细胞有很强的产生 IL-12 的能力。由于 DNA 疫苗的确可以转染 DCs, 并优先产生 Th1 反应(依免疫途径而定), 因此, 是否这些效应是由 DNA 直接转染"淋巴" DCs 所介导的是近年来人们所关注的新研究领域。

2.3　交叉激活

交叉激活机制最近广受人们关注, 它的提出是基于以下现象: 在体内, 从外源蛋白衍生的肽(而非经典的内源途径)可以呈现于 MHC-I 分子上. 这种在 APCs 内没有抗原从头合成的情况下, 对 $CD8^+$ T 细胞反应的诱导称为交叉激活. 抗原特异性 CTL 的激活需要两种信号, 一是 TCR 与 APCs 表面 MHC-I 分子肽结合槽中的表位的识别, 另一个是 CTL 与 APCs 间的非特异性共刺激信号相互识别。MHC-I 类分子几乎存在于所有组织细胞上, 包括肌肉组织, 但第二信号则主要存在于专职 APCs 上。在皮内或肌肉内注射后, 注射点可检测到转基因产物。但最近的研究结果显示, 质粒 DNA 编码的抗原是由髓源性 APCs 提呈的, 而不是由肌细胞本身提呈。实际情况也是这样, 专职 APCs 表达丰富的 MHC-Ⅰ、Ⅱ类分子于其表面, 而肌细胞只表达少量 MHC-Ⅰ分子, MHC-Ⅱ类分子根本不表达, 也缺少第二信号分子的表达。这样, 肌细胞就不可能作为抗原提呈细胞, 而只能作为体内抗原库, 不断地释放抗原至细胞间隙。然后被 APCs 吞噬、加工、提呈, 进入 MHC-Ⅱ类免疫途径。按照这种推理, 肌细胞内表达的蛋白抗原不应该刺激出强有力的 MHC-I 类反应。但实际情况刚好相反。APCs 与肌细胞间肯定存在某种联系。在肿瘤模型中证实[8], 机体内存在着交叉提呈细胞, 其特性介于树突状细胞和巨噬细胞之间。交叉提呈细胞从细胞间隙或细胞表面通过 hsp70 或 hsp90(Heat shock protein)捕获抗原, 经过胞内加工后, 同时提呈 MHC-Ⅰ和 MHC-Ⅱ限制性表位于细胞表面。但其激活 CTL 需要 $CD4^+$ T 细胞的协助, 而且 $CD8^+$ T 细胞和 $CD4^+$ T 细胞必需同时结合于 APC。在这种 3 种细胞的相互作用中, $CD4^+$ T 细胞通过其表面 CD154(主要表达于活化的 $CD4^+$ T 细胞上, 也有少量表达于 $CD8^+$ T 细胞上)与交叉提呈细胞表面的 CD40 分子(主要表达于 B 细胞、活化 DC、滤泡状 DC、内皮细胞)相互作用, 从而上调或诱导产生多种重要的能诱导 CTL 产生的细胞因子: B7. 1、B7. 2、CD44H、ICAM-I、TNF-α、IL-1β 和 IL-12, 最后 CTL 被激活。还有报道指出, 抗原提呈相关转运蛋白(Transporter associated with antigen-presentation, TAPs)缺陷型 APCs 仍能象其野生型一样有效地进行交叉激活。这是否意味着抗原不需经 APCs 加工就可直接激活 CTL 呢? 确实有这种可能。因为肌肉细胞中也有丰富的蛋白酶体, 它们可将肌细胞中质粒表达的抗原蛋白加工成 MHC-I 限制性小肽并提呈于细胞表面供 $CD8^+$ T 细胞识别。虽然肌肉细胞不表达第二信号分子, 但专职 APCs 却可能为其提供。另外, 最近有报告显示, 当专职 APCs 通过对其它细胞的凋亡小体的吞噬而加工其中的肽或蛋白质时, 此时就会出现交叉激活反应。

2.4　其它

(1)吞噬体过载: 其中的外源蛋白质渗漏入胞浆, 从而循 MHC-I 类途径激活 CTL; (2)注射引起的局部炎症反应, 引起淋巴细胞回流至此, 其中的专职 APC 可能乘机摄取质粒 DNA; 注射部位一些细胞的炎症性坏死, 或在随后的 CTC 介导的杀细胞效应中杀死的肌细胞释放胞内的质粒 DNA, 则专职 APCs 也可于此摄取质粒 DNA。

所有的证据清楚地显示, 骨髓源性 APCs 特别是 DCs 在 DNA 接种后的免疫反应的起始中起着关键的作用。这可由 DCs 直接激活 T 细胞和/或由骨髓源性细胞和/或体细胞如肌细胞或角质细胞的抗原转移(交叉激活)而激活 T 细胞。另外, 体细胞在 DNA 接种后的免疫反应强度和持续时间上可能起着重要作用。图 1 示 DNA 免疫的可能机制。

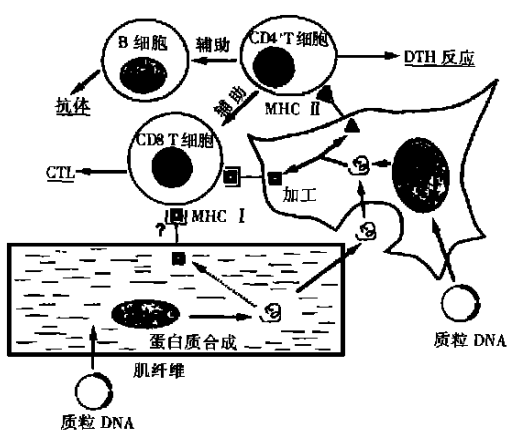


图 1　DNA 疫苗诱导抗原特异的免疫反应的可能机制

3　免疫途径和免疫方法对 CTL 反应的影响

皮肤和粘膜在解剖学上是外源抗原在正常情况下必须遇

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

到的屏障，皮肤中的髓源性APCs（专职APCs），也就是LCs（Langerhans cells）非常丰富，它从皮肤运送外源性抗原至引流淋巴结，并于此激活T细胞。皮内注射编码流感病毒NP质粒或编码 *E. coli* β-gal 的人巨细胞病毒表达载体后，表皮中的角化细胞、纤维母细胞、DCs和巨噬细胞样细胞内均可检测出抗原的表达。肌肉内注射质粒DNA后，用PCR方法在非肌肉组织细胞中不能检测出或只检出很少量的表达。然而，用基因枪方法进行表皮接种，被轰击的细胞许多为DCs（即LCs），并且随后在引流淋巴结中可检测出来。这样看来，注射法应以Th2反应为主（肌肉）或两者兼备（皮内），而基因枪法则两者都很强，因为多数 $CD4^+$ T细胞识别从外源蛋白衍生而来的表位肽。这些外源蛋白可以是肌肉细胞或表皮中非专职APCs细胞摄取质粒后所表达的。这些蛋白被APC摄取后经加工处理，最后与MHC-Ⅱ分子一起呈现于细胞表面。相反，$CD8^+$ T细胞主要识别内源性蛋白产生的肽，这些肽结合于MHC-Ⅰ类分子上。在皮内免疫时，由于皮肤中丰富的APCs，当皮内注射或基因枪时，有许多专职APCs直接被转染，那么理应产生强烈的MHC-Ⅰ类免疫反应。而肌肉组织中，即使有也只有少量职业APCs，则肌肉内注射后，应该产生以MHC-Ⅱ类反应为主的体液免疫。然而，实际情况却不是这样。肌肉注射后往往导致Th1优势反应，而基因枪法往往导致Th2优势反应。这种机制尚有待进一步研究。

4 质粒 DNA 中免疫刺激序列的作用

MHC-Ⅱ限制性 $CD4^+$ Th细胞按其分泌的CKs不同可分为两个亚型：Th1和Th2。在接受APCs提供的抗原刺激后，幼稚Th（Th0）分别由IL-12和IL-4调节而分化为Th1和Th2。Th1细胞主要分泌IL-2和IFN-γ，而Th2细胞主要产生IL-4、IL-5、IL-6和IL-10。鼠胞内病原体感染后，其体内产生Th1优势反应，并导致延迟性超敏反应。通过其分泌的IFN-γ刺激B细胞分泌IgG2a和IgG3的产生。通过IL-2和IFN-γ的产生也会激活MHC-Ⅰ限制性CTL活性。相反，胞外病原体感染则常导致Th2的优势反应。Th2细胞通过其分泌的IL-4而激活B细胞从而产生IgG1、IgE和IgA，并通过IL-5刺激嗜酸性粒细胞增生。Th1和Th2介导的免疫反应就是这样通过它们分泌的细胞因子而经常相互排斥又相互调节的。

DNA接种能产生Th1优势免疫反应已被大家所认识。质粒DNA（pDNA）的免疫原性需短免疫刺激DNA序列协助[9,10]，这一序列中包含存在于特殊碱基串中的非甲基化CpG二核苷酸。CpG基元常以PuPuCpGPyPy的形式出现于细菌基因组DNA序列和质粒中，出现频率为1/16；而脊椎动物中较少，出现频率为1/50。原核细胞CpG中的胞苷酸的甲基化不足5%，而真核则达70%～90%。对于脊椎动物免疫系统来说，非甲基化CpG基序也可能是区别于原核细胞的信号，也是活化宿主防御系统的一个信号。这种非甲基化CpG基元可以和人工合成的含CpG的寡聚脱氧核糖核苷酸（Oligodeoxynucleotides，ODNs）一样在体内活化单核/巨噬细胞系统、DCs、B细胞和T细胞，介导释放多种细胞因子，如IL-12、TNF-α、IFN-α和IFN-β、IFN-γ等，刺激强有力的抗原特异的细胞免疫反应。这种作用的证据来自于这样的事实：无蛋白编码区的载体可以象细菌DNA一样诱导细胞因子的产生。另外，当质粒载体中的CpG二核苷酸的胞苷选择性甲基化后，疫苗的体外刺激细胞因子产生和体内抗体或CTL产生的能力会同步下降。最后，同抗原性蛋白一起注射含CpG基序的ODN会加强抗体和细胞反应，这一点类似于编码同一抗原的质粒DNA的接种。这些结果提示，DNA疫苗本身就是一个复杂的佐剂。而且，这也给为什么相对少量的pDNA能产生非常有效的免疫作出的一种解释。DNA疫苗的高效性显然与此有关，CpG ODNs的免疫刺激作用已在近年用于人体临床试验。

虽然源自细菌DNA的CpG基序可导致体内和体外的免疫刺激，但最近的实验[11]显示，CpG ODN的免疫刺激活性可被某些非CpG基元所封阻。而且，从DNA疫苗的质粒骨架中去掉这些抑制基序（串联重复的CpG）可以提高免疫原性。这些结果可以解释为什么DNA疫苗在人和灵长类动物中远比小鼠中的免疫原性低。因此，目前的工作主要集中在鉴定在人体中有活性的序列单元。用于人体的质粒DNA的优化将包括清除抑制基元和增加刺激基元。另外，也可能，在人体中，某些CpG序列更趋向于诱导体液反应而非细胞反应。所以，质粒DNA接种或用CpG ODNs作为佐剂对那些抗体能起主要作用的疾病有用。至于细胞免疫，即使质粒DNA疫苗不能最佳化用以提高人体的细胞免疫反应，但其仍可以产生抗原并通过MHC-Ⅰ途径呈递。也就是说，DNA疫苗仍可以激活细胞免疫反应，尽管水平较低；而且，这可以用其它类型的疫苗来加强，即‘激活－加强’途径[12]。这一途径是最近出现的一种新免疫策略，就是先用DNA疫苗的低水平长时间表达作为基础免疫，再用重组减毒FPV（Fowlpoxvirus）或MVA（Modified vaccinia virus Ankara strain）加强免疫，后者的特异抗原表达水平更高，扩大DNA免疫所诱导的T细胞免疫反应，也提高已被DNA疫苗所激发的高亲和力T细胞水平（最高可占循环 $CD8^+$ T细胞的30%）[13]并使亲和力更加成熟。两者所表达的抗原是一样的，所刺激的特异免疫反应也是一样的。这种免疫方式的免疫次序和加强免疫的减毒病毒的株都不能随意改变，否则免疫效果会大大下降。这种策略已经在小鼠的流感病毒感染模型[13]、短尾猴的HIV和SIV（simian immunodeficiency virus）感染模型[14]、小鼠的疟疾感染模型[15]等中获得非常好的效果。

5 基因佐剂对 CTL 反应的影响

DNA疫苗可视为一种基因佐剂，常见的基因佐剂见表1。

表1 常见基因佐剂

基因佐剂	免疫途径	抗体产生	DTH反应	CTL活性
IL-12	i.m./i.n.	→	↑	↑
GM-CSF	i.m./i.n.	↑	↑	↑
IL-2	i.m./i.n.	→	↑	↑
IL-15	i.m./i.n.	→	↑	↑
TCA3	i.m.	→	↑	↑
B7.2	i.m.	→	↑	↑
CD40配体	i.m.	↑	↑	↑
MIP 1-a	i.m./i.n.	→	↑	↑

在发现CKs调节Th1和Th2分化方向的基础上，利用表达Th1型CKs的质粒是一条合理的途径。表达IL-12质粒与DNA

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

疫苗共注射是一条吸引人的策略, 而实际上, 在肌肉和鼻腔内两条给药途径中, 它确实可以大大提高 Th1 诱导的细胞免疫[17]。这种策略也可被运用于蛋白质免疫原。同样, IL-2、IL-15 表达质粒也是 Th1 型免疫调节剂。共刺激分子也可用作佐剂, 它可使髓源性 APCs 或非专职 APCs 更易提呈抗原。有报道已证实它们可以作为佐剂提高 DNA 疫苗产生的 Th1 型免疫反应。而且, 循环至 DNA 注射点的巨噬细胞或者淋巴细胞对驱动免疫系统也是一个重要因素, 趋化因子编码 cDNA 可被用于这一目的。在运用这些免疫调节分子时, 应用质粒载体比直接蛋白质注射要好得多。因为蛋白质可被蛋白酶降解, 为了获得持久效应, 必须得到补充注射。虽然 DNA 也有可能被少量降解, 但就目前所知并不需要加强注射即可维持持久的表达。

6　结语及展望

总之, DNA 疫苗对那些需要细胞免疫的疾病来说是一个令人鼓舞的方法。目前, DNA 疫苗已安全地应用于人类的多个临床实验。但也应看到, DNA 疫苗在人体实验的结果远比小鼠等动物模型中的结果差, 因此, 未来研究道路上的一个关键问题是如何优化 DNA 疫苗以使其诱导出强大的细胞免疫和/或体液免疫。这将包括寻找并增加对人体有免疫刺激作用的免疫刺激序列(ISS); 去掉质粒骨架中对人体免疫有抑制作用的核苷酸序列; 在 DNA 免疫的基础上再结合其它免疫方法, 如激活—加强途径; 寻找和利用疫苗佐剂, 包括生物佐剂(如细胞因子和共刺激分子)和化学佐剂等。虽然 DNA 疫苗在人类疾病的应用上还有一定的差距, 但其对那些高死亡率疾病的潜在的广泛应用前景, 使得这种方法仍不失为对付那些灾难性疾病的一种好方法。

关键词: DNA 疫苗; CTL; 免疫刺激序列; 佐剂
中图法分类号: R342.3　　文献标识码: A

参考文献:

[1] Leitner W W, Ying H, Restifo N P. DNA and RNA-based vaccines: Principles, progress and prospects[J]. Vaccines, 2000, 18(9-10): 765—777.

[2] Gurunathan S, Klinman D M, Seder R A. DNA vaccines: Immunology, application and optimization[J]. Annu Rev Immunol, 2000, 18(6): 927—974.

[3] Wolff J A, Malone R W, Williams P, *et al*. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*[J]. Science, 1990, 247(4 949 Pt 1): 1 465—1 468.

[4] Ulmer J B, Donnelly J J, Parker S E, *et al*. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein[J]. Science, 1993, 259(5 102): 1 745—1 749.

[5] Agadjanyan M G, Kim J J, Trivedi N, *et al*. CD86(B7-2) can function to drive MHC-restricted antigen-specific CTL responses *in vivo*[J]. J Immunol, 1999, 162(6): 3 417—3 427.

[6] Corr M, von Damm A, Lee D J, *et al*. *In vivo* priming by DNA injection occurs predominantly by antigen transfer[J]. J Immunol, 1999, 163(9): 4 721—4 727.

[7] Akbari O, Panjwani N, Garcia S, *et al*. DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity[J]. J Exp Med, 1999, 189(1): 169—178.

[8] Reis-e Sousa C, Sher A, Kaye P. The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection[J]. Cur Opin Immunol, 1999, 11(4): 392—399.

[9] Krieg A M. Mechanisms and applications of immune stimulatory CpG oligodeoxynucleotides[J]. Biochim Biophy Acta, 1999, 1 489(1): 107—116.

[10] Krieg A M. CpG DNA: a novel immunomodulator[J]. Trends Microbiol, 1999, 7(2): 64—65.

[11] Krieg A M, Wu T, Weeratna R, *et al*. Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(21): 12 631—12 636.

[12] Ramshaw I A, Ramsay A J. The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination[J]. Immunol Today, 2000, 21(4): 163—165.

[13] Kent S J, Zhao A, Best S j, *et al*. Enhanced T-cell immunogenicity and protective efficacy of a human immunodeficiency virus type 1 vaccine regimen consisting of consecutive priming with DNA boosting with recombinant fowlpox virus[J]. J Virol, 1998, 72(12): 10 180—10 188.

[14] Robinson H L, Montefiori D C, Johnson R P, *et al*. Neutralizing antibody-independent containment of immunodeficiency virus challenges by DNA priming and recombinant pox virus booster immunizations[J]. Nat Med, 1999, 5(5): 526—534.

[15] Schneider J, Gilbert S C, Blanchard T J, *et al*. Enhanced immunogenicity for $CD8^+$ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara[J]. Nat Med, 1998, 4(4): 397—402.

[16] Sasaki S, Inamura K, Okuda K. Genes that induce immunity—DNA vaccines[J]. Microbiol Immunol, 1999, 43(3): 191—200.

[17] Okada E, Sasaki S, Ishii N, *et al*. Intranasal immunization of a DNA vaccine with interleukin 12 and granulocyte macrophage colony stimulating factor(GM-CSF) expressing plasmids in liposomes induce strong mucosal and cell-mediated immune responses against HIV-1 antigen[J]. J Immunol, 1997, 159(7): 3 638—3 647.

[18] Sasaki S, Hamajima K, Fukushima J, *et al*. Comparison of intranasal and intramuscular immunization against human immunodeficiency virus type 1 with a DNA-monophosphoryl lipid A adjuvant vaccine[J]. Infect Immun, 1998, 66(2): 823—826.

[19] Sasaki S, Sumino K, Hamajima K, *et al*. Induction of systemic and mucosal immune responses to human immunodeficiency virus type 1 by a DNA vaccine formulated with QS-21 saponin adjuvant via intramuscular and intranasal routes[J]. J Virol, 1998, 72(6): 4 931—4 939.

[20] Kuklin N, Daheshia M, Karem K, *et al*. Induction of mucosal immunity against herpes simplex virus by plasmid DNA immunization[J]. J Virol, 1997, 71(4): 3 138—3 145.

(编辑　郭建秀)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net