

- against Alzheimer's Disease [J]. Neural Plast, 2016, 2016: 4626593.
- [24] Skucas VA, Mathews IB, Yang J, et al. Impairment of select forms of spatial memory and neurotrophin-dependent synaptic plasticity by deletion of glial aquaporin-4 [J]. J Neurosci, 2011, 31(17): 6392-6397.
- [25] Auguste KI, Jin S, Uchida K, et al. Greatly impaired migration of implanted aquaporin-4-deficient astroglial cells in mouse brain toward a site of injury [J]. Faseb J, 2007, 21(1): 108-116.
- [26] Ikeshima-Kataoka H. Neuroimmunological Implications of AQP4 in Astrocytes [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(8): 1306.
- [27] Li L, Zhang H, Varrin-Doyer M, et al. Proinflammatory role of aquaporin-4 in autoimmune neuroinflammation [J]. Faseb J, 2011, 25(5): 1556-1566.
- [28] Asai H, Kakita H, Aoyama M, et al. Diclofenac enhances proinflammatory cytokine-induced aquaporin-4 expression in cultured astrocyte [J]. Cell Mol Neurobiol, 2013, 33(3): 393-400.
- [29] Aoki-Yoshino K, Uchihara T, Duyckaerts C, et al. Enhanced expression of aquaporin 4 in human brain with inflammatory diseases [J]. Acta Neuropathol, 2005, 110(3): 281-288.
- [30] Hirt L, Fukuda AM, Ambadipudi K, et al. Improved long-term outcome after transient cerebral ischemia in aquaporin-4 knockout mice [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2017, 37(1): 277-290.
- [31] Katada R, Akdemir G, Asavapanumas N, et al. Greatly improved survival and neuroprotection in aquaporin-4-knockout mice following global cerebral ischemia [J]. Faseb J, 2014, 28(2): 705-714.
- [32] Wang L, Du Y, Wang K, et al. Chronic cerebral hypoperfusion induces memory deficits and facilitates Abeta generation in C57BL/6J mice [J]. Exp Neurol, 2016, 283(Pt A): 353-364.
- [33] Wang Z, Fan J, Wang J, et al. Chronic cerebral hypoperfusion induces long-lasting cognitive deficits accompanied by long-term hippocampal silent synapses increase in rats [J]. Behav Brain Res, 2016, 301: 243-252.

## 阿尔茨海默病 DNA 疫苗的研究进展

郭婉姝 综述 陈晓虹 审校

中国医科大学人民医院/辽宁省人民医院神经内科,辽宁省沈阳市 110016

**摘要:**  $\beta$  淀粉样蛋白 ( $A\beta$ ) 免疫治疗, 阻止  $A\beta$  产生、聚集和/或增加  $A\beta$  清除被认为是治疗阿尔茨海默病的有效治疗策略。 $A\beta$  主动和被动免疫治疗的临床试验并未如动物实验那样达到预期的疗效, 为此研究人员关注到了一种安全、有效、高产的 DNA 疫苗。本文将对构建 DNA 疫苗的多方面因素: 抗原选择、载体系统、佐剂、免疫接种途径、剂量、时间、加强免疫剂型等作一综述。

**关键词:** 阿尔茨海默病;  $\beta$  淀粉样蛋白; DNA 疫苗

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2018.01.025

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种神经系统变性疾病, 是临床最常见的老年痴呆类型, 其主要病理特征是细胞外老年斑 (senile plaque, SP) 和细胞内神经元纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFTs) 的形成。目前全球有超过 4680

万的患者, 预计到 2050 年患者数将达到 1.31 亿<sup>[1]</sup>。然而目前并没有有效的治疗措施。 $\beta$  淀粉样蛋白 (amyloid  $\beta$ -protein,  $A\beta$ ) 的异常聚集是导致 AD 整个神经病理过程的最初和最关键的步骤, 也是免疫治疗的靶点<sup>[2]</sup>。

**基金项目:** 辽宁省博士启动基金 (2016011039-301)

**收稿日期:** 2017-08-09; **修回日期:** 2017-11-19

**作者简介:** 郭婉姝 (1980-), 女, 副主任医师、博士学位, 主要从事阿尔茨海默病的研究。

**通信作者:** 陈晓虹 (1963-), 女, 主任医师, 博士学位, 主要从事阿尔茨海默病和脑血管病的研究。E-mail: cxh\_ly@163.com。

动物实验证实,  $A\beta$  主动免疫治疗和被动免疫治疗不仅能够减少脑内  $A\beta$  沉积, 还能够延缓认知功能的减退。然而, 到目前为止, 大多数  $A\beta$  免疫治疗的临床试验并未如动物实验那样达到预期的疗效<sup>[2]</sup>。因此研究者们开始更多的关注一种新型疫苗——DNA 疫苗。DNA 疫苗是一种安全、有效、高产的疫苗, 是需要载体介导、人为编码的 DNA 片段。设计一个有效的 DNA 疫苗需要考虑多方面的因素: 抗原的选择、载体系统、佐剂、免疫接种途径、剂量、时间和加强免疫剂型等, 这些都将影响疫苗诱导免疫应答的强度和性质, 从而对免疫的最终结果产生影响。

## 1 抗原

$A\beta$ N-末端作为免疫原能够产生强烈的体液免疫反应, 避免了有害的  $A\beta$  特异性 T 细胞反应。已有研究证实  $A\beta$  的 B 细胞抗原决定簇位于在 1~15 区域, 是产生抗  $A\beta$  抗体的主要表位;  $A\beta$  的 T 细胞抗原决定簇位于 16~42 区域, 是诱导  $A\beta$  特异性的 T 淋巴细胞反应的表位<sup>[3]</sup>。因此可以选用  $A\beta$  的 B 细胞抗原决定簇作为 AD 疫苗免疫原, 它不仅对 AD 的预防及治疗有效, 又不诱发炎症反应, 而且还可因它不是引起 AD 的毒性肽, 多次应用后无脑内沉积及细胞毒性的危险。Frenkel 等<sup>[4]</sup> 分析了多个 N 末端片段认为  $A\beta$  N 端第 3~6 位氨基酸残基 EFRH 是影响  $A\beta$  可溶性或成纤维的主要表位, 缺少 3 号位氨基酸时其与抗  $A\beta$  抗体的亲和性明显降低。于是研究者选用了不同的抗原表位:  $A\beta_{1-5}$ 、 $A\beta_{1-8}$ 、 $A\beta_{1-9}$ 、 $A\beta_{4-10}$ 、 $A\beta_{3-7}$ 、 $A\beta_{1-10}$ 、 $A\beta_{1-6}$  (CAD106)<sup>[5]</sup>、 $A\beta_{1-7}$  (ACC-001)<sup>[6]</sup>、 $A\beta_{1-11}$  (AV-1955)<sup>[7]</sup>、 $A\beta_{3-10}$ <sup>[8]</sup>、 $A\beta_{1-14}$  (UB-311) 和  $A\beta_{1-15}$  (ACI-24) 等, 通过抗  $A\beta$  抗体的产生、Th1 型反应引起的副作用、对实验动物或是患者安全、可耐受、延缓 AD 进展等方面进行评价。

## 2 载体

DNA 疫苗的载体主要有病毒和质粒。病毒载体作为基因传递工具, 有许多优点: 基因结构清楚, 易于重组改造; 感染效率高; 某些载体可长期表达目的基因; 部分载体尚有靶向性。重组腺伴随病毒 (AAV)<sup>[9]</sup>、腺病毒<sup>[10]</sup> 和流感病毒<sup>[11]</sup> 等被当作病毒载体用于动物实验。但是, 病毒 DNA 疫苗不能避免病毒的感染与转化, 因此安全性问题仍是制约病毒载体应用的首要问题。与病毒载体相比, 质粒载体 DNA 疫苗优势突出<sup>[12]</sup>: 易于大规模生产; 操作简单; 花费低; 不可能有病毒的感染及转化; 安

全性高; 能够诱导有效的免疫应答; 不整合到宿主基因组中; 也不会引起抗 DNA 的自身免疫应答。如果有副反应发生、可以通过停止进一步的疫苗接种来控制, 因为相比病毒疫苗, 质粒载体半衰期要短。质粒 DNA 编码的  $A\beta$  蛋白能够刺激特异性的抗  $A\beta$  抗体的产生, 诱发 B 细胞免疫反应并且无 T 细胞介导的免疫反应的发生<sup>[2, 8]</sup>。鉴于临床中, AD 患者需终生应用疫苗, 上述优势对于治疗的选择是非常重要的因素。因此, 非病毒质粒载体是目前 AD 基因疫苗治疗中最好的选择。

## 3 佐剂

尽管 DNA 疫苗优势明显, 但仍然有投送效率低和免疫原性弱的巨大瓶颈。DNA 疫苗佐剂有可能弥补 DNA 疫苗的不足。霍乱毒素 B 亚基 (CTB)、皂苷类佐剂 (QS-21) 和脂多糖衍生物类佐剂 (LPS) 均可被运用于 DNA 疫苗中, 而寡聚核苷酸类佐剂和基因佐剂是 DNA 疫苗较为有特点的佐剂, 其不但可以是单独的佐剂形式, 也可能是质粒 DNA 的组成部分。基因佐剂通常是质粒 DNA 编码的细胞因子、生长因子、共刺激分子或转录因子基因, 与含有抗原基因的 DNA 共同免疫, 使得细胞因子和抗原在体内表达, 诱导特异性免疫应答反应, 增强免疫应答水平。补体 C3d<sup>[13]</sup>、补体 C3d-p28<sup>[8]</sup>、白细胞介素 4<sup>[14]</sup>、褪黑素<sup>[15]</sup> 和白细胞介素 10<sup>[16]</sup> 等佐剂的应用, 使得  $A\beta$  的免疫原性大大地增强, DNA 疫苗的有效性也大大地提高。

## 4 免疫接种途径

选择 DNA 疫苗免疫接种途径时主要有 3 个因素需要考虑: 一是 DNA 疫苗对机体细胞的转染效率; 二是抗原基因表达水平; 三是抗原向免疫系统的呈递能力。目前 AD 基因疫苗的免疫接种途径主要有以下几种方法: 肌肉注射法、粘膜表面涂布法 (鼻粘膜免疫法和口服免疫法)、基因枪导入法、皮下注射法和腹腔注射法等。肌肉注射法是目前基因疫苗免疫最常用的方法。这是因为骨骼肌和心肌等横纹肌可以高效摄取和表达外源基因, 其中骨骼肌具有免疫接种容量大, 注射方便和安全等优点, 因此, 经常用来进行基因疫苗注射<sup>[8]</sup>。鼻粘膜免疫方法, 可经鼻脑通道直接入脑, 是一种更方便快捷的方式, 且主要产生 Th2 型免疫反应<sup>[17]</sup>。Yoshida 等<sup>[18]</sup> 将  $A\beta$ 42 基因与绿色荧光蛋白基因融合入大米中饲养 C57BL/6J 鼠, 血浆抗体滴度升高。基因枪导入法<sup>[19]</sup> 被认为是质粒 DNA 疫苗向体内转染最有效的

物理方法,并且目前正应用于临床。基因枪导入是一种无针的弹道装置,将质粒 DNA 包裹的金颗粒呈递到皮肤表皮层,使得动物和人对 DNA 疫苗产生强烈的免疫应答,以 Th2 型免疫反应为主。

## 5 其他

大多研究人员设计的 A $\beta$  免疫原有效片段较小,而肽段越小其抗原性越弱,因此,将 A $\beta$  免疫原重复多次序列以增加分子重量,减少肽段的降解,以增强抗原的免疫原性。DNA 疫苗抗原浓度 1.0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  为可选择的适宜剂量,而探索注射剂量对诱发强烈的免疫应答水平有重要意义。尽管 DNA 疫苗单次注射就能获得较长时间的免疫应答,但加强注射能明显增强应答水平,部分研究人员选择初次注射后,间隔 2 周免疫 1 次,1 月后每月加强免疫 1 次;或是初次注射后,每隔 3 周免疫 1 次。所以探索实验的注射间隔和次数有利于获得满意的应答水平。幼龄动物接种 DNA 疫苗诱发免疫应答的水平强于老年动物。

在 AD 基因疫苗研究中,学者们已取得了一些进展,但仍然有很多问题亟待解决。AD 患者需要更加安全、有效的 DNA 疫苗,相信在不久的将来一定会有突破性的进展。

## 参 考 文 献

- [1] Prince M, Wimo A, Guerchet M, et al. World Alzheimer Report 2015, The Global Impact of Dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends [M]. London: Alzheimer's Disease International, 2015.
- [2] Cynis H, Frost JL, Crehan H, et al. Immunotherapy targeting pyroglutamate-3 A $\beta$ : prospects and challenges [J]. Mol Neurodegener, 2016, 11(1): 48.
- [3] Lemere CA. Immunotherapy for Alzheimer's disease: hoops and hurdles [J]. Mol Neurodegener, 2013, 8: 36.
- [4] Frenkel D, Kariv N, Solomon B. Generation of auto-antibodies towards Alzheimer's disease vaccination [J]. Vaccine, 2001, 19(17-19): 2615-2619.
- [5] Farlow MR, Andreasen N, Riviere ME, et al. Long-term treatment with active A $\beta$  immunotherapy with CAD106 in mild Alzheimer's disease [J]. Alzheimers Res Ther, 2015, 7(1): 23.
- [6] Hull M, Sadowsky C, Arai H, et al. Long-Term Extensions of Randomized Vaccination Trials of ACC-001 and QS-21 in Mild to Moderate Alzheimer's Disease [J]. Curr Alzheimer Res, 2017, 14(7): 696-708.
- [7] Davtyan H, Ghochikyan A, Petrushina I, et al. The MultiTEP platform-based Alzheimer's disease epitope vaccine activates a broad repertoire of T helper cells in nonhuman primates [J]. Alzheimers Dement, 2014, 10(3): 271-283.
- [8] Guo W, Sha S, Xing X, et al. Reduction of cerebral A $\beta$  burden and improvement in cognitive function in Tg-APPswe/PSEN1dE9 mice following vaccination with a multivalent A $\beta$ 3-10 DNA vaccine [J]. Neurosci Lett, 2013, 549: 109-115.
- [9] Prasad T, Zhu P, Verma A, et al. Amyloid $\beta$  peptides over-expression in retinal pigment epithelial cells via AAV-mediated gene transfer mimics AMD-like pathology in mice [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 3222.
- [10] Kim HD, Tahara K, Maxwell JA, et al. Nasal inoculation of an adenovirus vector encoding 11 tandem repeats of Abeta1-6 up regulates IL-10 expression and reduces amyloid load in a Mo/Hu APPswe PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease [J]. J Gene Med, 2007, 9(2): 88-98.
- [11] Davtyan H, Ghochikyan A, Hovakimyan A, et al. A dual vaccine against influenza & Alzheimer's disease failed to enhance anti- $\beta$ -amyloid antibody responses in mice with pre-existing virus specific memory [J]. J Neuroimmunol, 2014, 277(1-2): 77-84.
- [12] Okura Y, Matsumoto Y. Recent advance in immunotherapies for Alzheimer disease [J]. Hum Vaccin, 2009, 5(6): 373-380.
- [13] Movsesyan N, Mkrtichyan M, Petrushina I, et al. DNA epitope vaccine containing complement component C3d enhances anti-amyloid-beta antibody production and polarizes the immune response towards a Th2 phenotype [J]. J Neuroimmunol, 2008, 205(1-2): 57-63.
- [14] Xing XN, Sha S, Chen XH, et al. Active Immunization with DNA Vaccine Reduced Cerebral Inflammation and Improved Cognitive Ability in APP/PS1 Transgenic Mice by In Vivo Electroporation [J]. Neurochem Res, 2015, 40(5): 1032-1041.
- [15] Sha S, Xing XN, Cao YP. Active immunotherapy facilitates A $\beta$  plaque removal following through microglial activation without obvious T cells infiltrating the CNS [J]. J Neuroimmunol, 2014, 274(1-2): 62-70.
- [16] Asselineau D, Benlhassan K, Arosio B, et al. Interleukin-10 Production in Response to Amyloid- $\beta$  Differs between Slow and Fast Decliners in Patients with Alzheimer's Disease [J]. J Alzheimers Dis, 2015, 46(4): 837-842.
- [17] Hara H, Mouri A, Yonemitsu Y, et al. Mucosal immunotherapy in an Alzheimer mouse model by recombinant Sendai virus vector carrying A $\beta$ 1-43/IL-10 cDNA [J]. Vaccine, 2011, 29(43): 7474-7482.
- [18] Yoshida T, Kimura E, Koike S, et al. Transgenic Rice Expressing Amyloid  $\beta$ -peptide for Oral Immunization [J]. Int J Biol Sci, 2011, 7(3): 301-307.
- [19] Davtyan H, Ghochikyan A, Movsesyan N, et al. Delivery of a DNA vaccine for Alzheimer's disease by electroporation versus gene gun generates potent and similar immune responses [J]. Neurodegener Dis, 2012, 10(1-4): 261-264.