

活体电穿孔导入法增强恶性疟原虫核酸疫苗免疫反应研究

高宇辉 邓唯唯 张佳佳 李 月

摘 要 **目的** 采用活体电穿孔免疫方法,研究恶性疟原虫 DNA 核酸疫苗不同免疫剂量对于动物免疫反应的影响,并对载体中 CpG 寡脱氧核苷酸基序的免疫刺激活性进行了初步探讨。**方法** 将恶性疟原虫多表位嵌合抗原 M. RAg-1 基因克隆于真核表达载体 VR1012 中,使用电穿孔导入方法免疫小鼠,采用 ELISA 检测抗体效价,ELISPOT 测定细胞因子分泌水平,探索基因疫苗最佳免疫剂量以及考察免疫反应类型。使用计算机分析恶性疟核酸疫苗中特殊 CpG 基序组成,实验验证基因疫苗中 CpG 基序的免疫刺激活性。**结果** 相同 DNA 免疫剂量下,电穿孔免疫法与单纯肌内注射免疫法相比较,小鼠血清 IgG 抗体效价提高 118 倍,且能显著诱导体内特异性 Th1 和 Th2 型细胞反应。电穿孔免疫小鼠血清可识别天然虫体抗原,抗体效价可达 1:1200。恶性疟原虫核酸疫苗抗原 DNA 含有 24 个 CpG 免疫活性基序,可以有效的刺激人外周血单个核细胞(PBMCs)增殖与 IL-6 分泌。**结论** 活体电穿孔方法可以显著提高恶性疟原虫 DNA 疫苗体液免疫和细胞免疫水平。

关键词 疟疾 DNA 疫苗 电穿孔 VR1012 CpG 基序

中图分类号 R382.9

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.06.006

In vivo Electroporation – based Transfer Enhances Immunogenicity of Plasmodium Falciparum DNA Vaccine. Gao Yuhui, Deng Weiwei, Zhang Jiajia, et al. Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, School of Basic Medicine, Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

Abstract **Objective** To investigate the protection effect using in vivo electroporation with various amount of malaria DNA vaccine in mammalian. **Methods** The malaria poly – epitope chimeric antigen M. RAg – 1 gene sequence was cloned in an eukaryotic expression vector VR1012. The DNA vaccine was introduced in BALB/c mice by electroporation method. The total serum IgG antigen titer and cytokines expression were measured by ELISA and ELISPOT respectively, and the optimum DNA vaccine usage was determined as well as the type of immunity. The specific CpG motif sequences were explored by computer analysis. The CpG motifs' immune – stimulatory activity was also tested in vitro. **Results** In vivo electroporation method can induce higher IgG titer up to 118 folds than intramuscular immunization using the malaria DNA vaccine in mice, and enhance both Th1 and Th2 type cellular immunity. Immune serum from mice can recognize native *plasmodium falciparum* antigen even at titer 1:1200. The CpG motifs buildin malaria vaccine DNA sequence can promote human peripheral blood mononuclear cells proliferation and secretion of IL – 6. **Conclusion** Both humoral and cellular immune response of malaria DNA vaccine are significantly improved by electroporation in vivo.

Key words Malaria; DNA vaccine; Electroporation; VR1012; CpG motif

疟疾是世界上最重要的三大传染病之一,据世界卫生组织统计,在 2013 年全球有 1.98 亿疟疾感染者,58.4 万人死亡^[1]。疫苗被认为是控制疟疾的一种非常有效的策略,但是这方面的研究还不尽如人意,迄今为止还没有疟疾疫苗被批准上市使用,疫苗

研制工作任重道远。M. RAg-1 是本课题组构建的一种多表位人工随机重组蛋白疫苗,包含了 8 个疟原虫抗原的 11 个 Th 细胞和 B 细胞表位。前期在 BALB/c 小鼠、新西兰兔和恒河猴模型中证实, M. RAg-1 具有很好的免疫原性、免疫保护性和安全性,是一种潜在的疟疾候选疫苗^[2]。

DNA 疫苗具有成本低廉、性质稳定、制备简单、易于保存,相对安全等诸多优点,至今已广泛的用于实验室和临床研究^[3,4]。本研究构建 M. RAg-1 真核表达载体,采用活体电穿孔免疫方法,研究该恶性疟原虫多表位抗原 DNA 核酸疫苗在不同免疫剂量、

基金项目:国家高技术研究发展计划(“863”计划)项目(2012AA02A406);国家科技重大专项基金资助项目(2013ZX09102-043)

作者单位:100005 中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院

通讯作者:高宇辉,电子邮箱:gaouv@126.com

免疫时间对于动物免疫反应的影响,并分析了基因疫苗中 CpG 寡脱氧核苷酸基序的组成情况,对其免疫刺激活性进行了初步探讨。

材料与方法

1. 质粒构建及提取:使用引物 5' - CACTGATCAC-CATGGAATTCGGATCAAACAAG - 3' 和 5' - GACAGATCTTTATTAGCTAGCGGATCCGGG - 3', 以恶性疟原虫多表位嵌合抗原 M. RCAg - 1 原核表达质粒 pDS - ex - ES312 (本室构建) 为模板,扩增全长 918bp 的抗原核酸序列,克隆于 VR1012 载体 (Vical Inc. San Diego, CA, USA) 的 Sal I/Bgl II 位点构建 VR1012 - ES312 质粒,经测序验证,转化于大肠杆菌 DH5 α 保存。参照 EndoFree Plasmid Mega Kit 12381 试剂盒 (Qiagen, West Sussex, UK) 说明书提取空载体 VR1012 和 VR1012 - ES312 无内毒素质粒溶于医用生理盐水。

2. 细胞转染及质粒表达检测:293T 细胞及 DMEM 高糖培养基、胎牛血清、抗生素等购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。转染前 24h 将细胞按 $1 \times 10^5 / (0.5 \text{ 毫升} \cdot \text{孔})$ 接种于 24 孔板,待细胞培养至融合度 60% ~ 70% 时,更换新鲜的完全培养基继续在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 1h,按照 VigoFect (威格拉斯生物技术公司) 转染试剂盒说明书操作,以 1.25 μg DNA/0.5 μl VigoFect 每孔的比例加入转染质粒。48h 后,离心收获细胞,经裂解后离心,取 15 μg 上清蛋白进行十二烷基硫酸 - 聚丙烯酰胺 (SDS - PAGE) 凝胶电泳,加蛋白分子质量参照物 (Thermo 26616, SM0671),并进行蛋白印记 (Western blot, WB) 法检测。蛋白转印膜加入 1:2500 亲和纯化制备的抗 M. RCAg - 1 IgY,以及 1:20000 HRP 标记的 Anti - Chicken IgY, HRP conjugate (Promega, Madison, WI, USA),使用增强化学发光液 (ECL) 覆盖膜 3min, X 线片压片显影^[5]。

3. 活体电穿孔免疫:SPF 级雌性 BALB/c 小鼠,6 ~ 8 周,体质量 18 ~ 20g,购自中国医学科学院实验动物研究所,随机分组,每组 5 只,各免疫 3 次。每只小鼠分别注射 100 μl 稀释在生理盐水溶液中的 10、50 和 100 μg 3 个浓度的 VR1012 - ES312 实验组,并设生理盐水和空载体 VR1012 50 μg 对照组,经后肢股四头肌每两周双侧交替注射。电穿孔实验组在肌内注射后,立即采用 II 型 TERESA 基因导入仪 (上海塔瑞莎生物技术有限公司) 双针电极进行电穿孔导入操作。参数设定:电压 60V,脉宽 50ms,频率 1Hz。

4. 特异性 IgG 抗体与细胞因子检测:免疫后第

10 天尾部采血,采用 ELISA 法测定血清抗体效价。小鼠血清按 10 倍或 2 倍比例使用含 3% 羊血清的磷酸盐缓冲液 (PBS) 倍比稀释,每孔 100 μl 加入 100ng 重组 M. RCAg - 1 蛋白检测板,设复孔,37℃ 孵育 2h, 0.1% Tween 20/PBS 溶液洗涤后加入 1:10000 稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG (中杉金桥生物技术有限公司),37℃ 1h,洗涤后采用四甲基联苯胺 (TMB) 系统显色,450nm 波长测定各孔吸光度值 (A)。细胞因子检测,按 U - CyTech 的 ELISPOT 试剂盒 (购自北京达科为生物技术有限公司) 推荐方法准备 IFN - γ 和 IL - 4 抗体包被板,将末次免疫后第 10 天的小鼠处死后分离脾细胞,取 4×10^5 个/孔加入抗体包被板,并加入无内毒素的 M. RCAg - 1 重组蛋白作为刺激物,阳性对照孔加入试剂盒自带 PMA。CO₂ 培养箱孵育 48h 后,按说明书操作加入生物素标记抗体和酶标亲和素,显色 15min,斑点计数,统计分析。

5. 间接免疫荧光试验 (IFA):取红内期恶性疟原虫 3D7 虫株感染红细胞 (感染率约 5%) 涂布载玻片,用 4℃ 预冷的甲醛:丙酮等比例混合液固定 5min,加入不同稀释度的小鼠血清,以正常小鼠血清和 M. RCAg - 1 蛋白免疫小鼠血清作为对照,稀释倍数为 1:200、1:400、1:800、1:1200、1:1600。置于湿盒 37℃ 孵育 1h, PBS 洗涤 3 次,加入 1:200 的 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG (中杉金桥生物技术有限公司),继续孵育和洗涤后在徕卡 DM4000 荧光显微镜下观察和拍照。

6. CpG 基序 (motif) 体外免疫刺激活性分析:将新鲜采集的健康人抗凝血与等体积生理盐水混合,使用人外周血淋巴细胞分离液 (北京索莱宝科技有限公司),离心收集 PBMCs,洗涤后以适量体积培养基 (RPMI 1640 中添加 10% 56℃ 灭活胎牛血清, 2mmol/L L - 谷氨酸, 100U/ml 青霉素及 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素) 重悬细胞并计数,苔盼蓝染色观察活细胞比例。每孔 150 μl 培养基含 5×10^4 个 PBMC 和 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 无内毒素质粒,铺 96 孔细胞培养板,设 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ConA (Concanavalin - A, Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA) 和生理盐水对照组,每组设置 6 个复孔。于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱培养 72h,使用 CellTiter 96[®] Aqueous One Solution 试剂盒 (Promega, Madison, WI, USA) 检测,读取 492nm 光吸收值。对于 PBMCs 分泌细胞因子的分析,将 1×10^6 细胞与 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 无内毒素质粒混合培养 24h,使用优达[®] Human IL - 6 pre-coated ELISA kit (北京达科为生物技术有限公司) 进行检测。

7. 统计学方法:采用 GraphPad Prism 软件对数据进行统计处理和作图,数据结果均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各实验组之间的比较采用 *t* 检验方法,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. VR1012 - ES312 质粒体外表达:无内毒素提取质粒 VR1012 - ES312 转染哺乳动物 293T 细胞的总蛋白抽提物经 SDS - PAGE 电泳,特异性抗 M. RCAg - 1 抗体检测,出现 1 条相对分子质量约 65kDa 的阳性条带,这与 M. RCAg - 1 抗原蛋白原核表达产物在 SDS - PAGE 电泳时表现出的表观相对分子质量大小相近,而空白对照质粒 VR1012 转染产物无

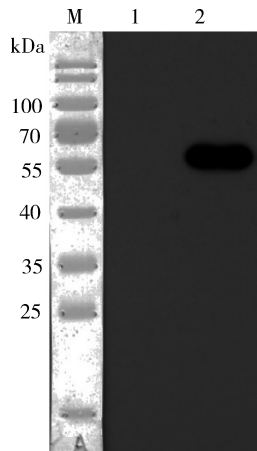


图 1 免疫印记检测 VR1012 - ES312 在真核细胞中的表达

M. 蛋白质分子质量标准;Lane 1. VR1012 转染细胞;
Lane 2. VR1012 - ES312 转染细胞

条带出现(图 1),表明 VR1012 - ES312 表达载体可以在真核细胞中正确表达^[6]。

2. 免疫后各组 IgG 效价和细胞免疫应答检测:免疫小鼠血清 IgG 抗体 ELISA 结果显示,在 10、50 和 100μg 3 个 DNA 电穿孔免疫剂量组中,以 50μg 剂量组抗体效价最高(与 10μg 和 100μg 免疫组比较,进行 *t* 检验分析,*P* 值分别为 0.008 和 0.039)。相同的免疫剂量下(50μg)电穿孔免疫小鼠 IgG 抗体效价较单纯肌内注射免疫小鼠抗体效价提高 118 倍(*P* = 0.003,图 2)。用 ELISPOT 法检测分泌 IFN - γ 和 IL - 4 细胞的数量,分析电穿孔和肌内注射两种方法对细胞免疫的影响。结果表明,电穿孔免疫组与单纯肌内注射免疫组相比,诱导分泌细胞因子 IFN - γ 和 IL - 4 的特异性淋巴细胞克隆数显著高于后者(图 3)。

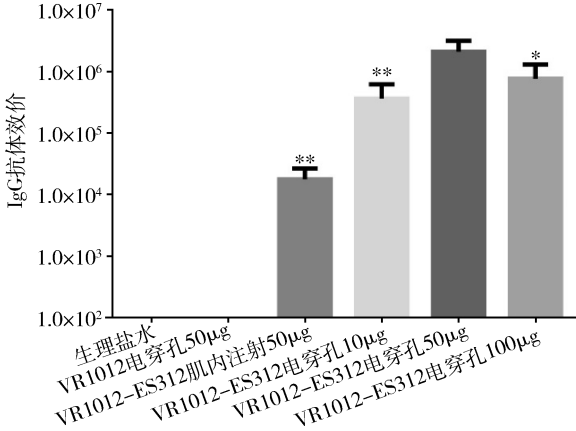


图 2 不同免疫组血清抗体效价 ELISA 检测

R1012 - ES312 电穿孔 50μg 免疫组分别与其他实验组比较,
* *P* < 0.05, ** *P* < 0.01

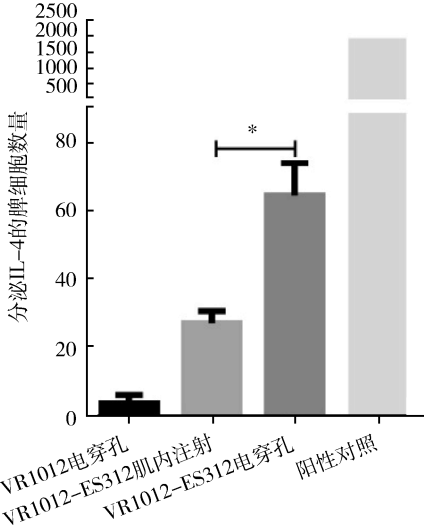
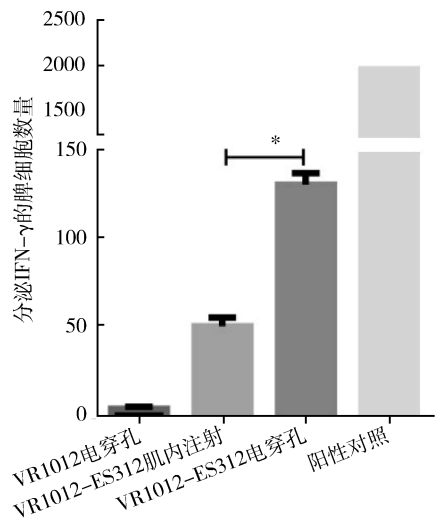


图 3 ELISPOT 法检测小鼠脾淋巴细胞中 IFN - γ 和 IL - 4 分泌细胞的克隆数

* *P* = 0.000

3. DNA 疫苗电穿孔免疫血清对疟原虫天然抗原的识别:IFA 实验显示,DNA 疫苗 VR1012 - ES312 单纯肌内注射免疫和电穿孔免疫均能识别恶性疟原虫 3D7 株天然虫体抗原,然而电穿孔免疫小鼠血清效价

显著高于肌内注射免疫血清效价,分别为 1:1200 和 1:400。对照生理盐水与空载体 VR1012 免疫组不识别天然抗原(图 4)。

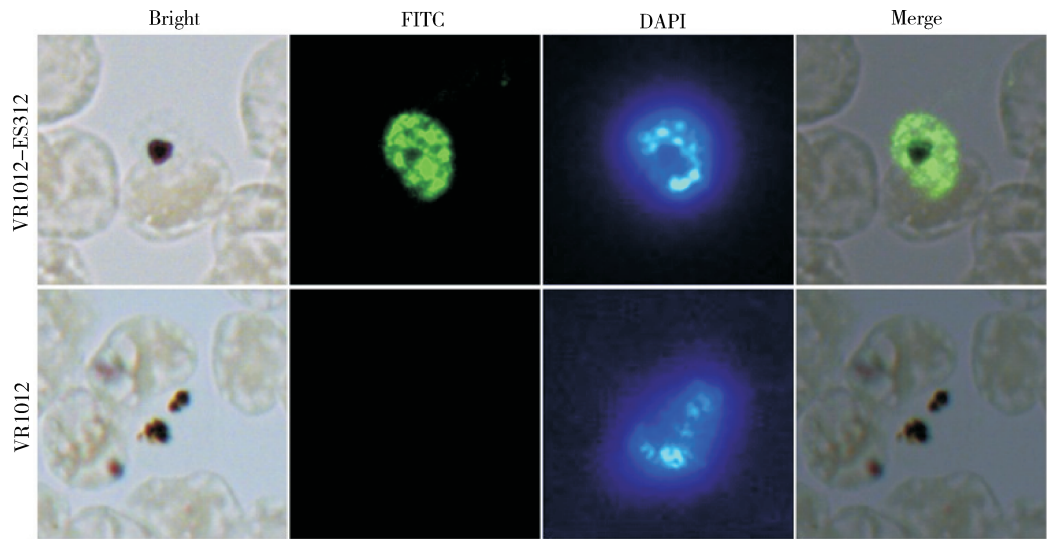


图 4 间接免疫荧光分析 DNA 疫苗电穿孔免疫血清抗体识别虫体抗原

4. 核酸疫苗 CpG 免疫活性刺激序列分析:根据文献报道的 CpG 免疫活性刺激序列特征,使用计算机分析疟原虫抗原 DNA 双链,检索到 24 个 CpG 免疫活性刺激序列,其中含有 6 碱基的 CpG 基序共 23 个,10 碱基 CpG 基序 1 个(表 1)^[7,8]。

pg/ml,说明核酸疫苗 VR1012 - ES312 要比空载体 VR1012 有更强的刺激 PBMC 分泌 IL - 6 的能力($P < 0.05$,图 5B)。

讨 论

不同于传统的蛋白质疫苗,DNA 疫苗是将编码特异抗原的基因片段构建在具有表达调控元件的真核表达质粒中,可以通过简单的肌内注射方法导入动物或人体内,表达质粒被注射部位的肌肉细胞和附近的抗原递呈细胞摄取后表达抗原蛋白,激活机体的免疫系统,引起特异性的体液免疫和细胞免疫反应,从而达到预防或治疗疾病的目的^[3]。然而单纯依靠裸 DNA 肌内注射导入的方法,只能引起机体产生比较弱的免疫反应,因为采用这种导入方式,仅有极少量的 DNA 能进入细胞核,不但抗原表达水平较低,而且 DNA 质粒长期在体内低水平表达,有可能导致机体产生免疫耐受。

表 1 恶性疟原虫核酸疫苗载体中 CpG 免疫刺激序列

CpG 基序(5'→3')	数目
AACGCC	3
ACGCC	3
GACGCC	1
AACGTT	1
GGCGCT	3
GGCGTT	4
GGCGTC	1
GTCGTT	7
GAACGTTCCG	1

5. 核酸疫苗 CpG 基序免疫刺激活性分析:将 VR1012 - ES312 质粒和空载体 VR1012 分别与 PBMC 共孵育,以生理盐水孵育组作为参照,计算细胞增殖刺激指数(stimulation index, SI),VR1012 - ES312 和 VR1012 的 SI 值分别为 2.97 和 2.20,二者的比值为 1.35(图 5A)。VR1012 - ES312 质粒和空载体 VR1012 与 PBMCs 孵育后,用 ELISA 法检测培养上清中的 IL - 6 浓度,分别为 5212pg/ml 和 4344

随着 DNA 导入技术的改进,与裸 DNA 注射相比,电穿孔方法通过提高肌肉细胞通透性,增加细胞摄取 DNA,并促使集中在注射部位的 DNA 分子扩散和分布,与更多的细胞接触而被摄取,显著的提高了抗原表达水平;电穿孔导入过程中电脉冲刺激,可以吸引附近包括树突状细胞在内的免疫细胞向注射部位迁移,增强抗原特异性免疫的强度和持续时间^[9]。

电穿孔技术提高 DNA 疫苗导入活体靶组织的有

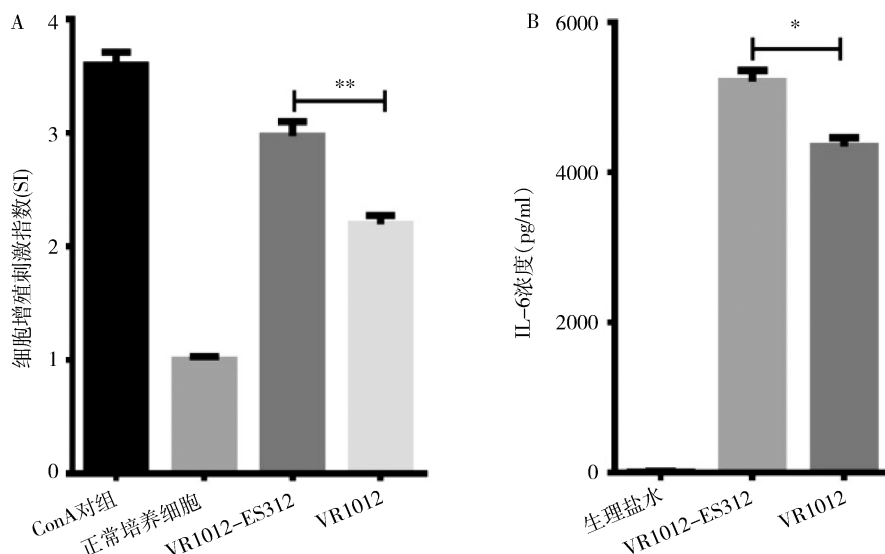


图5 疟原虫核酸疫苗 DNA 体外刺激 PBMCs 增殖以及 IL-6 分泌检测

* $P < 0.05$, ** $P = 0.000$

效性和安全性,已经在从啮齿类动物到大型哺乳动物和人体的实验中得到广泛证实。Daud 等^[10]使用电穿孔技术将表达 IL-12 的质粒导入人黑色素瘤的瘤体,是首个将电穿孔技术应用于人体的临床研究,实验观察到在注射位点及其附近的瘤体组织发生完全的消退,该研究表明电穿孔技术在人体实验中的应用是安全有效的^[10]。DNA 疫苗与电穿孔导入技术结合,越来越受到重视,目前用于肿瘤治疗、感染和传染病防治等诸多研究领域,显示该技术广阔的应用前景^[9,11]。Richie 等^[12]构建了一种针对肝期 (liver-stage) 恶性疟原虫感染的核酸疫苗 MuStDO5,在初步临床研究中,使用电穿孔方法将核酸疫苗导入受试志愿者体内,随后用蚊子叮咬进行疟原虫感染,实验结果尽管受试者没有受到保护,但是证明了该核酸疫苗及电穿孔导入的安全性,并能够在受试者体内诱导中等程度的 T 细胞反应。

恶性疟患者发生临床症状主要是在恶性疟原虫红内期 (erythrocyte-stage) 发育阶段。由于红细胞表面缺乏主要组织相容性复合物 I (MHC-I),也没有处理和递呈外源肽段的结构,一般认为针对疟原虫红内期的免疫主要以体液免疫为主。研究表明疟疾感染者获得保护性与感染早期 IFN- γ 和 IL-12 浓度增加有关,虫血率的控制与感染早期 Th1 细胞介导 IFN- γ 反应、Th2 细胞介导的 IL-4 反应以及抗体类别向 IgG 转换密切相关^[13,14]。本研究构建的针对红内期的多表位嵌合抗原 DNA 疫苗 VR1012-ES312,采用活体电穿孔导入法,可有效地提高疟原虫核酸疫苗

免疫小鼠的体液免疫反应,IgG 抗体效价可提高 118 倍,并能同时显著增强 Th1 型和 Th2 型细胞免疫。

合适的免疫剂量是影响免疫效果的重要影响因素。早在 20 世纪 50 年代,研究者发现过量的抗原反而抑制抗体的产生,甚至免疫无反应,这种现象被称为免疫麻痹 (immunologic paralysis),其机制是过量抗原与抗体中和,导致循环抗体浓度下降。本研究将疟疾 DNA 疫苗分为 10、50 和 100 μg 3 个剂量组,结果发现 50 μg DNA 为最佳免疫剂量,可以诱导产生 1×10^6 的 IgG 抗体效价,然而更高的剂量反而抑制了抗体的产生,这说明免疫效果并不总是随抗原增加而无限提高的。此外,外源 DNA 双链 (dsDNA) 可以刺激正常哺乳动物产生抗-DNA 抗体,高浓度 DNA 使得机体抗-dsDNA 抗体的亲和力增加,可能导致自身被加速清除^[15]。

含有特殊 CpG 基序 (motif) 的寡脱氧核苷酸 (CpG-ODN) 具有较强的免疫刺激活性^[8];通过序列改造和优化,DNA 疫苗的免疫效果与质粒 DNA 上的 CpG 基序密切相关^[16]。CpG-ODN 通过与 Toll-like receptor 9 结合,激活 MyD88、IRAK 和 TRAF-6 信号途径,上调 TNF、IL-1 β 、IL-1 α 等炎症促进因子基因的表达。非甲基化 CpG DNA 可以直接激活 B 细胞和血浆树突状细胞 (pDCs),促进抗体分泌以及刺激 pDCs 分泌 IL-1、IL-6、IL-12、TNF- α 、IFN- γ 等多种细胞因子,增强机体免疫反应^[17]。尽管 CpG 基序引起的免疫反应的机制还未完全阐明,试验已证明通过优化质粒 DNA 序列或插入特定 CpG 基

序,可以作为一种内在佐剂(intrinsic adjuvant)增强DNA疫苗的免疫效果^[18]。

本研究所使用的质粒VR1012是Vical公司开发的真核表达载体,该载体及其衍生载体广泛的用于DNA疫苗研究,一些以VR1012为基础的疫苗已进入临床研究阶段^[12,19]。根据计算机分析,VR1012载体含有21个以CG为核心的CpG免疫刺激序列,在没有外源佐剂的情况下,内在的CpG基序对于VR1012重组DNA疫苗免疫原性和免疫保护性有显著的增强作用^[20]。恶性疟原虫基因组DNA序列平均G/C含量较低而富含A/T,平均AT含量高达80.6%,内含子和基因间区甚至达到90%^[21]。尽管恶性疟M. RAg-1嵌合抗原表位核酸序列全部来源于疟原虫基因,但该抗原基因A/T含量仅为42.8%,远低于疟原虫基因组平均A/T含量。典型的CpG免疫活性刺激序列,在CpG二核苷酸侧翼分别为两个5'-嘌呤和两个3'-嘧啶^[7,8]。经分析发现疟原虫抗原DNA双链含有24个CpG免疫活性刺激序列。PBMC体外增殖试验显示,VR1012-ES312质粒的细胞增殖刺激指数为空载体VR1012的1.35倍,且比VR1012能进一步提高PBMC分泌IL-6的水平,说明M. RAg-1抗原核酸序列中的CpG基序提供了恶性疟DNA疫苗额外的免疫刺激活性。

活体电穿孔是一种简单且高效的核酸疫苗新型递送技术,诸多研究已经表明,体内电穿孔可以在肌肉、皮肤、肝、肺、淋巴结、肿瘤等不同的靶组织中增强DNA导入细胞的效率,提高外源基因的表达水平;而且在诸多不同种类的动物体内的应用效果也得到充分验证;电穿孔过程形成的电刺激还具有特殊的佐剂效应。这些都说明活体电穿孔技术有着其他核酸疫苗导入方法所没有的显著优势,显示该技术具有很好的应用前景。本研究使用活体电穿孔方法显著提高了恶性疟原虫DNA疫苗体液免疫和细胞免疫水平,为下一步评价该核酸疫苗的保护效果以及研究其免疫保护机制建立了良好的实验条件和基础。

参考文献

- World Health Organization. World Malaria Report 2014 [EB/OL]. http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/en/, 2015
- Cai Q, Peng G, Bu L, et al. Immunogenicity and in vitro protective efficacy of a polyepitope *Plasmodium falciparum* candidate vaccine constructed by epitope shuffling [J]. Vaccine, 2007, 25(28): 5155-5165
- Khan KH. DNA vaccines: roles against diseases [J]. Germs, 2013, 3(1): 26-35
- Mairhofer J, Lara AR. Advances in host and vector development for

- the production of plasmid DNA vaccines [J]. Methods Mol Biol, 2014, 1139: 505-541
- Qu JX, Lin YH, Ma RS, et al. Immunoaffinity purification of polyepitope proteins against *Plasmodium falciparum* with chicken IgY specific to their C-terminal epitope tag [J]. Protein Expr Purif, 2011, 75(2): 225-229
- Wang J, Lin Y, Cai P, et al. Effects of vector fusion peptides on the conformation and immune reactivity of epitope-shuffled, recombinant multi-epitope antigens [J]. Protein Pept Lett, 2011, 18(1): 73-83
- Ballas ZK, Rasmussen WL, Krieg AM. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA [J]. J Immunol, 1996, 157(5): 1840-1845
- Krieg AM, Yi AK, Matson S, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation [J]. Nature, 1995, 374(6522): 546-549
- Lee SH, Danishmalik SN, Sin JI. DNA vaccines, electroporation and their applications in cancer treatment [J]. Hum Vaccin Immunother, 2015, 11(8): 1889-1900
- Daud AI, DeConti RC, Andrews S, et al. Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma [J]. J Clin Oncol, 2008, 26(36): 5896-5903
- Lambrecht L, Lopes A, Kos S, et al. Clinical potential of electroporation for gene therapy and DNA vaccine delivery [J]. Expert Opin Drug Deliv, 2016, 13(2): 295-310
- Richie TL, Charoenvit Y, Wang R, et al. Clinical trial in healthy malaria-naïve adults to evaluate the safety, tolerability, immunogenicity and efficacy of MuStDO5, a five-gene, sporozoite/hepatic stage *Plasmodium falciparum* DNA vaccine combined with escalating dose human GM-CSF DNA [J]. Hum Vaccin Immunother, 2012, 8(11): 1564-1584
- Crompton PD, Moebius J, Portugal S, et al. Malaria immunity in man and mosquito: insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease [J]. Annu Rev Immunol, 2014, 32: 157-187
- de Souza JB. Protective immunity against malaria after vaccination [J]. Parasite Immunol, 2013, 36(3): 131-139
- Isaguliant MG, Iakimchouk K, Petrakova NV, et al. Gene immunization may induce secondary antibodies reacting with DNA [J]. Vaccine, 2004, 22(11-12): 1576-1585
- Luo Z, Shi H, Zhang H, et al. Plasmid DNA containing multiple CpG motifs triggers a strong immune response to hepatitis B surface antigen when combined with incomplete Freund's adjuvant but not aluminum hydroxide [J]. Mol Med Report, 2012, 6(6): 1309-1314
- Bode C, Zhao G, Steinhagen F, et al. CpG DNA as a vaccine adjuvant [J]. Expert Rev Vaccines, 2011, 10(4): 499-511
- Yu YZ, Li N, Ma Y, et al. Three types of human CpG motifs differentially modulate and augment immunogenicity of nonviral and viral replicon DNA vaccines as built-in adjuvants [J]. Eur J Immunol, 2013, 43(1): 228-239
- Beckett CG, Tjaden J, Burgess T, et al. Evaluation of a prototype dengue-1 DNA vaccine in a Phase 1 clinical trial [J]. Vaccine, 2011, 29(5): 960-968
- Dai B, You Z, He P, et al. Analysis of CpG motifs in endoflagellar gene (flaB2) and expression vector (VR1012) of leptospiral DNA vaccine [J]. Sichuan Daxue Xuebao: Yixue Ban, 2003, 34(1): 1-4
- Gardner MJ, Hall N, Fung E, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* [J]. Nature, 2002, 419(6906): 498-511 (收稿日期:2015-11-17)
- (修回日期:2015-12-04)