

· 特约专稿 ·

痘苗病毒天坛株载体研究与应用概述

阮力

中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京 102206

摘要:1982年,文献首次报道外源基因成功在痘苗病毒WR株(小鼠嗜神经毒株)中获得表达,引起了中国科学家的极大关注。1984年,中国医学科学院病毒学研究所朱既明院士的组织下成立了痘苗病毒基因表达载体研究协作组,提出使用痘苗病毒天坛株开发可用于人体的痘苗病毒基因表达载体的新思路。该研究历时10余年,成功构建了痘苗病毒天坛株高效表达载体,并广泛用于外源基因表达、基因工程疫苗研究、单克隆抗体研制和诊断试剂开发。本文简单介绍了该载体的研究及应用,并对载体疫苗存在的问题及发展前景进行了讨论。

关键词:痘苗病毒天坛株;载体;疫苗

Research and application of vaccinia virus Tiantan strain vector

RUAN Li

National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Abstract: In 1982, a foreign gene successfully expressed in the vaccinia virus WR strain (mouse neurotropic strain) aroused a great concern of Chinese scientists. In 1984, Dr. ZHU Ji-Ming, academician of Chinese Academy of Science organized a collaborative research group in the Institute of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences to develop a novel gene expression system based on vaccinia virus Tiantan strain which was used to prepare smallpox vaccine for human use more than 50 years in China. After more than ten years of effort, a highly efficient vector system for foreign gene expression was successfully established and widely used for the expression of foreign genes, recombinant vaccines, and the development of monoclonal antibodies and diagnostic reagents. This paper briefly described the research and application of the gene expression system and discussed the problems and prospects of vector vaccine development.

Key words: Vaccinia virus Tiantan strain; Vector; Vaccine

痘苗病毒天坛株是中国科学家建立的一株用于预防天花的痘苗病毒,也是世界卫生组织(World Health Organization, WHO)文献记载中成功用于预防天花的疫苗毒株^[1]。至1980年中国停止种痘,该疫苗在中国应用了50余年,接种了数亿人次,在消灭天花中发挥了决定性作用。痘苗病毒天坛株毒

种(毒种编号:752-1)已作为中国防止天花再次出现的应急储备疫苗毒种。

痘苗病毒的宿主泛围广,繁殖滴度高,非必需基因多,外源基因容量大(理论上可达25~50 kb),在胞质复制,无致癌性,免疫力持久,有长期人体应用历史,这种独特的生物学及分子生物学性状引起了

基金项目:“十二五”国家科技重大专项(2012ZX10001009-002-002、2013ZX10004001-005-002)

通信作者:阮力

Corresponding author: RUAN Li, E-mail: ruanli@bbn.cn

病毒学家和分子生物学家将其开发成基因工程载体的极大兴趣。由于对痘苗病毒天坛株的生物学性状和分子生物学特点研究得较清楚,它又是我国特有的预防天花的疫苗株,故应用现代分子生物学技术对其改造,有可能获得免疫效果好、不良反应少的新一代天花疫苗株,并可能发展成为安全、高效的基因工程载体。

1982年,文献首次报道外源基因(疱疹病毒 TK 基因)成功在痘苗病毒 WR 株(小鼠嗜神经毒株)中获得表达^[2],引起了中国科学家的极大关注。1984年,中国医学科学院病毒学研究所朱既明院士的组织下成立了痘苗病毒基因表达载体研究协作组(以下简称协作组),提出使用痘苗病毒天坛株开发可用于人体的痘苗病毒基因表达载体的新思路,从痘苗病毒天坛株的分离与检定、基因组文库的构建与测序、不同类型启动子的克隆与功能特点、不同非必需区生物学及分子生物学特性、重组病毒筛选标记的选择、不同类型重组载体的构建、外源基因在重组病毒中表达、重组病毒毒力和免疫效果及小量人体免疫观察等方面开展了全面研究。

1 痘苗病毒天坛株的挑斑纯化与全基因组测序

痘苗病毒天坛株 752-1 毒种未经过挑斑纯化,也无详细基因组序列研究资料。协作组从该毒种制备的疫苗(批号:7601)中挑斑克隆,筛选了一株在细胞和动物中生物学性状与原始毒种相近的病毒,建立了该毒株 *Hind* III 核酸限制性内切酶基因文库,完成了该毒株全基因组测定^[3],为使用该毒株进行载体的研发奠定了基础。

2 痘苗病毒天坛株启动子克隆及其功能的研究

痘苗病毒天坛株启动子克隆及其功能研究是构建该载体系统的关键步骤。在痘苗病毒天坛株基因组内切酶图谱分析和基因文库构建的基础上,协作组先后克隆了 4 种痘苗病毒天坛株启动子,并化学合成了一个晚期启动子,分别为 11 000 蛋白(F17R)启动子 P11、7 500 蛋白启动子 P7.5、25 000 蛋白(F16L2)启动子 P25、147 000 蛋白启动子(PJ6R)和人工化学合成晚期启动子 PML。阿糖胞苷阻断实验表明,P11 为晚期启动子,P7.5 为早晚期启动子,

PJ6R 为早期启动子,P25 为早晚期启动子,PML 为晚期启动子。各启动子的活性强度为 P11 : P7.5 : PJ6R : P25 : PML \approx 1 : 1 : 0.4 : 0.01 : 1.2。这些启动子的克隆为构建不同类型的痘苗病毒天坛株表达载体提供了重要材料^[4-6]。

3 痘苗病毒天坛株非必需区生物学及分子生物学特性的研究

痘苗病毒天坛株非必需区是外源基因插入表达的部位,外源基因插入后对痘苗病毒生物学性质的影响直接关系到能否使用该非必需区进行重组病毒的构建。另外,非必需区的基因片段又是构建同源重组表达载体的重要组成部分。因此,非必需区生物学功能(尤其是对毒力和稳定性影响)的研究及相应片段的克隆就成为构建不同类型痘苗病毒天坛株载体的另一个关键步骤。协作组应用 *LacZ* 为报告基因,对痘苗病毒天坛株 7 个非必需区〔*Hind* III M-Sph I (VS-1)、*Hind*K-1st Bgl II (VB-1)、*Hind* III K-3rd Bgl II (VB-4)、*Hind*K-4th Bgl II (VB-6)、*Hind* III K/F-H III (VH-1)、*Hind* III F-Bam (VF1GB)和 *Hind* III J-TK (VJ123)〕的生物学性状进行了研究。发现有 4 个非必需区(VS-1、VB-4、VB-6 和 VH-1)对重组病毒的毒力无明显影响,另 3 个(VB-1、VF1GB、VJ123)则对重组病毒的毒力有影响,其中 VF1GB 的影响最大。同时发现痘苗病毒天坛株 TK 区的破坏对毒力影响(1~2 个对数)远较文献中 WR 株(4~5 个对数)小。外源基因(*LacZ*)插入后的稳定性研究表明,7 个非必需区均能稳定表达 *LacZ*,从而为目的基因表达提供了良好的插入区域。另外,重组病毒在不同细胞中的复制特点及不同温度中的稳定性均与亲本株相近^[7]。

4 痘苗病毒天坛株同源重组载体的构建

同源重组载体是获得重组病毒的关键技术环节。协作组应用上述克隆的启动子和非必需区的同源序列片段,构建了 2 类基本载体和 20 余种派生载体^[4-6]。第 1 类载体是含有 P11 和 P25 的双向启动子,并能在 TK 区表达外源基因的 pJ15 和 pJ120 表达载体。其中,pJ15 不含标记基因,可同时表达 2 种外源基因,既可用于疫苗株的构建,也可利用 TK 阴性标记筛选实验用毒株。pJ120 则可利用 *LacZ* 和 TK 阴性双选择标记迅速获得 P11 启动子表达外

源基因的实验用毒株。这 2 种载体的另一个创新点是晚期启动子使用了启动-终止的特殊序列,保留了 P11 启动子天然转录起始位点,获得了 P11 启动子高启动活性。第 2 类载体是应用 P7.5 和 P11 启动子组成的双向表达载体 pJTA1175 和 pJTB1175。这 2 种载体与第 1 类载体相似,但引入了强早晚期启动子 P7.5,适合依赖于早期和晚期的抗原基因表达。使用 C 和 K 的部分同源序列,并在两片段的外侧由 PJ6R 启动子驱动 *neo* 基因表达,构建成 2 种用于去除痘苗病毒天坛株 C-K 间 21.3 kb 基因组的“两步同源重组”载体 pCKneo 和 pCKneoLacZ^[8-10]。这 2 个载体均能在重组率极低的情况下,通过 G418 选择压力富集并获得含 *neo* 基因的重组病毒,然后再通过撤掉 G418 压力,最终获得不含 *neo* 基因并去除了 C-K 片段间 21.3 kb 基因组的非复制型重组痘苗病毒天坛株。其中 pCKneo 载体构建的重组病毒不含 *LacZ* 基因,可直接用于疫苗株研究。pCKneoLacZ 载体构建的重组病毒含有 *LacZ* 基因,结合蓝白斑选择方法也可用于非复制型重组痘苗病毒疫苗株的筛选。2 个载体均有极高的筛选效率,并避免了使用杂交等繁琐的疫苗株筛选方法。

另外,在上述载体的基础上,根据外源基因表达和基因工程疫苗及多价基因工程疫苗的研究需要,派生出了 20 余种相应载体,有的可用于基因表达的实验研究,有的可用于疫苗研究,有的可用于启动子的筛选,有的可任意操纵基因表达单元实现新载体的构建。这些不同类型的载体可满足在痘苗病毒天坛株 8 个不同区域进行外源基因表达的研究,为使用该毒株进行基因工程疫苗和多价基因工程疫苗的研究奠定了重要基础。

5 外源基因在重组痘苗病毒天坛株中的表达和重组疫苗的构建

应用痘苗病毒天坛株表达载体系统,协作组进行了 20 余种外源基因在痘苗病毒天坛株中单独表达的研究,包括来自乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV),甲型肝炎病毒(hepatitis A virus, HAV),麻疹病毒(morbillivirus, MV),呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV),单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV) I、II 型,EB 病毒(Epstein-Barr virus, EBV)等病毒的基因,以及白

细胞介素 2(interleukin 2, IL-2)、IL-6、巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)等细胞因子基因的表达研究。完成了 EBV + HBV、RSV + IL-2、HBV + IL-2、MV + IL-2、HAV + IL-2、HAV + IL-6、HAV + MIF 及 HAV + HBV + MV 等多种基因同时在痘苗病毒天坛株中表达的研究。构建了 40 余株重组病毒,在细胞和动物体内对代表性毒株的生物学性状、毒力及免疫效果进行了科学评价^[11-53]。研究表明,痘苗病毒天坛株表达载体系统适用于外源基因表达和重组疫苗构建研究,该载体构建的重组疫苗在实验动物中安全、有效。构建的非复制型痘苗病毒天坛株表达载体解决了复制型载体的免疫效果依赖于病毒增殖的不安全性瓶颈,不但可作为安全、有效的重组载体,其本身亦可用于安全、有效的新一代天花疫苗的研发。该系统已提供给国内外几十个研究和生产单位,在外源基因表达、基因工程疫苗研究、单克隆抗体研制和诊断试剂开发等方面发挥了重要作用。

6 重组痘苗病毒天坛株疫苗的临床研究

协作组成功构建了针对 HAV、HBV(带 IL-2 和不带 IL-2)、MV、RSV、HSV(I、II 型)及 EBV 等多种单价和多价重组痘苗病毒的人用疫苗株。其中针对 HAV、HBV(带 IL-2 和不带 IL-2)、MV 及 EBV 的 5 种重组痘苗病毒天坛株活疫苗在 20 世纪 90 年代初通过卫生部药政局批准,在国际上率先进行了小量人体免疫观察。

1992 年在美国冷泉港疫苗会议上,我国科学家首次报道了以痘苗病毒天坛株为载体的重组 EBV 疫苗(EBV-MA)和重组 HAV 疫苗(VMS11HAV25)的 I 期临床研究。TK 区表达 EBV-gp350 的重组痘苗病毒天坛株 EBV 疫苗免疫 1~3 岁幼儿 16 个月后,对照组 10 名全部感染 EBV,而试验组 9 名中仅有 3 名感染,且 EBV 抗体的效价均较低,提示重组痘苗病毒 EBV 疫苗可诱发一定的免疫保护^[54,55]。用 M 片段表达 HAV 完整读码框架基因的重组痘苗病毒天坛株 HBV 疫苗免疫 8 名学龄儿童,1 个月后痘苗和 HAV 抗体全部阳转,并产生 HAV 中和抗体。2 年后的随访检测显示,试验组 8 名儿童 HAV 抗体仍为阳性,对照组 8 名儿童中有 2 名 HAV 抗体阳转,其中 1 名曾出现甲型肝炎临床症状^[56,57]。上述试验结果提示,

以痘苗病毒为载体的重组疫苗可产生较好的免疫效果。对 TK 区表达 HBV 表面抗原(HBV surface antigen, HBsAg) 基因 S 的重组痘苗病毒天坛株 HBV 疫苗也进行了小量临床研究^[58], 1 针免疫 4 周后仅有 2 名儿童 HBV 表面抗体低效价阳转〔阳性/阴性 (positive/negative, P/N) 值分别为 2.1 和 2.6〕, 但使用 HBV 亚单位疫苗加强免疫后, HBV 抗体明显升高(P/N 均值为 25.2), 效价明显高于单次 HBV 亚单位(P/N 均值为 12.2)。单次 HBV 亚单位疫苗免疫后 4 周再使用重组痘苗病毒 HBV 疫苗加强免疫, 可明显提高 HBV 抗体效价(P/N 均值为 54.9)。这些结果表明, 重组痘苗病毒 HBV 疫苗单次免疫并不能获得良好免疫, 但可有效作为初次免疫或加强免疫与亚单位疫苗联合应用。这一结果也提示, 重组痘苗病毒载体疫苗并非对所有抗原均有良好免疫效果。

上述 3 种重组痘苗病毒疫苗在人体中的接种反应表明, 痘苗病毒天坛株载体引起的痘疱反应与亲本株非常相近, 皮肤反应较重, 脓疱疹明显, 多数受试者有 37.5 °C 左右发热和腋下淋巴结肿大。鉴于痘苗病毒天坛株较重的接种反应及可能出现的严重并发症, 进一步降低其毒力对提高接种的安全性是必要的。对一株在 TK 区表达 MV 的血凝素(hemagglutinin, HA) 和融合蛋白(fusion protein, F)、在 *Hind*III K 片段表达人 IL-2 的重组痘苗病毒 MV 疫苗(RVJMLHFKIL2) 进行了小量人体免疫观察^[59]。动物实验中, 该疫苗在兔皮、鼠脑和裸鼠腹腔的毒力明显下降, 免疫效果与不带 IL-2 的无明显差别。人体试验中, 该疫苗的毒力明显降低, 发痘率低、痘疱小、发热少、无明显腋下淋巴结肿大, 但免疫效果受到明显影响。在婴幼儿中作为初次免疫, 血凝抑制(hemagglutination inhibition, HI) 和 HL 的抗体效价明显低于常规减毒活疫苗, 但在学龄儿童的加强免疫中该疫苗的加强效果(HI 和 HL 效价)与减毒活疫苗相近, 其中 HL 的效价略高于减毒活疫苗。经综合分析, 用痘苗病毒天坛株载体制备的重组活疫苗免疫效果较好, 但不同抗原的免疫原性不同, 须进行针对性研究。其毒副作用仍较强, 与其亲本株相近。共表达 IL-2 的重组疫苗在人体中明显减毒, 但免疫效果也明显下降。这些结果提示, 通过划痕接种的重组痘苗病毒活疫苗的免疫效果与其在机体内的增殖密切相关, 增殖高, 免疫效果好,

但毒副作用大; 而增殖少, 毒副作用少, 免疫效果又不好。因此, 平衡其增殖能力与免疫效果和毒副作用的关系是复制型重组病毒载体疫苗面临的一个重要研究课题。

7 重组痘苗病毒天坛株载体的其他研究

通过去除特异基因或插入细胞因子等方法, 在降低载体毒力的同时增强其特异免疫效果(如黏膜免疫、细胞免疫、体液免疫等)的研究取得了较好进展。表达多种人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV) 抗原的复制型重组痘苗病毒天坛株 HIV 疫苗已进入 II 期临床研究; 表达多种 HIV 抗原的非复制型重组痘苗病毒天坛株 HIV 疫苗已完成临床前研究; 使用非复制型痘苗病毒天坛株载体研发的新型天花疫苗已申报临床研究。目前, 载体疫苗成功上市应用的是兽用载体疫苗。如表达狂犬病毒糖蛋白重组痘病毒疫苗, 作为食饵口服的活疫苗在特殊地区的野外应用, 用于阻断狂犬病在狼和狐狸中的传播; 表达禽流感病毒 H5N1 及新城疫病毒抗原的禽痘载体活疫苗批准用于鸡群禽流感和新城疫的预防等。在肿瘤治疗性疫苗研发中, 一些疫苗已获批准并进行了临床治疗研究, 展现了较好的应用前景。

8 载体疫苗存在的问题与出路

20 多年来, 许多微生物被用作载体进行载体疫苗研究, 一些载体疫苗已进入人体试验阶段。大量的动物实验和人体试验表明, 多数载体疫苗安全、有效。然而, 在曾感染过载体微生物的机体中, 如感染过腺病毒或沙门菌, 或接种过痘苗或卡介苗的人(或动物)中, 因机体对载体微生物已具免疫力, 接种相应载体疫苗后, 一方面会因再次免疫的加强作用形成对载体的优势免疫反应; 另一方面会因已存在的载体免疫影响重组微生物(载体疫苗)的繁殖, 减少目标抗原的表达量, 从而影响目标抗原的免疫效果。所以, 影响载体疫苗走向应用的最大问题是机体针对载体的免疫反应问题; 机体预先存在的载体免疫会影响载体疫苗的初次免疫效果; 载体疫苗接种后产生的载体免疫反应会影响该疫苗的再次免疫效果; 载体免疫反应的存在将影响该载体广泛应用于其他疫苗的研发; 不同载体诱发的免疫反应不同, 增大了安全评价的复杂性。这也是为什么载体疫苗研

发近 30 年来,虽然动物实验和小量人体试验表明具有良好免疫效果,但至今仍没有人用载体疫苗上市的重要原因。解决载体免疫反应对载体疫苗免疫效果的影响是将这类疫苗推向实用的关键。交替使用不同微生物载体或同种微生物不同血清型载体是目前解决载体免疫反应的重要策略。抗肿瘤、持续感染等治疗性疫苗的开发为适宜的载体疫苗在无相应载体免疫反应的治疗个体中的应用提供了可能。很多动物都未曾感染过可用作载体疫苗研发的微生物,且很多动物生命周期短,有的仅数月,不会在种群中形成长期特异的载体免疫屏障,这为规避载体免疫反应、开辟载体疫苗研发的新领域提供了依据。因此,将载体疫苗技术用于兽用疫苗的研发,特别是用于那些生命周期短的动物,就成了扬长避短,解决载体免疫反应,发挥载体疫苗成本低、效果好、易组成多联多价的优势,将载体疫苗研究推向应用的重要途径。

参考文献

- [1] Fenner F, Henderson DA, Arita I, Jezek Z, Ladnyi ID. Smallpox and its eradication [M]. Geneva: World Health Organization, 1988.
- [2] Panicali D, Paoletti E. Construction of poxviruses as cloning vectors; insertion of the thymidine kinase gene from herpes simple virus into the DNA of infectious vaccinia virus [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1982, 79 (16): 4927-4931.
- [3] NCBI GenBank/AF095689/Vaccinia virus (strain Tian Tan) complete genome [DB/OL]. <http://www.metallife.com/Genbank/6969640>.
- [4] Hsu T, Cao X, Liu GQ, Ruan L, Chu CM. Construction and application of plasmids containing bidirectional promoters of vaccinia virus [J]. J Virol, 1988, 62 (12): 4832-4834.
- [5] 王双平, 阮力, 金奇, 曹旭, 朱既明. 痘苗病毒天坛株 P7.5K 启动子的克隆及其结构与功能的研究 [J]. 中国科学: 化学, 1991, 21 (9): 956-962.
- [6] 王双平, 阮力, 刘洪迪, 朱既明. 痘苗病毒天坛株 J6R 启动子的克隆及其功能研究 [J]. 病毒学报, 1991, 7 (4): 303-308.
- [7] 徐水婵, 阮力, 朱既明. 痘苗病毒非必需区与病毒生物学性状的关系 [J]. 病毒学报, 1992, 8(4): 293-302.
- [8] 娄元梅. 非复制型痘苗病毒天坛株载体的构建及其特性的研究 [D/OL]. 北京: 中国预防医学科学院, 1996. http://so.med.wanfangdata.com.cn/ViewHTML/DegreePaper_Y203409.aspx.
- [9] 郭斐, 陆柔剑, 娄元梅, 孙朝晖, 阮力. 非复制重组痘苗病毒天坛株 C-K 缺失区表达载体的构建及重组病毒生物学性状的研究 [J]. 病毒学报, 2001, 17(1): 24-28.
- [10] 阮力, 朱既明, 娄元梅, 陆柔剑. 复制缺陷型天坛株痘苗病毒: 中国 ZL200610056800.0 [P/OL]. <http://www.apchina.com/faming/1717357>.
- [11] 刘庚起, 曹旭, 张惠芳, 任贵芳, 朱既明. 用痘苗病毒天坛疫苗株做载体表达乙型肝炎病毒 Adw 亚型表面抗原 [J]. 病毒学报, 1985, 1(1): 86.
- [12] 高峰, 刘崇柏, 伊瑶, 阮力, 朱既明. 用重组痘苗病毒作载体表达甲型肝炎病毒抗原 [J]. 病毒学报, 1989, 5(4): 303-311.
- [13] 高峰, 伊瑶, 赵洪兰, 刘崇柏. 含甲肝病毒基因的重组痘苗病毒在动物体内产生针对甲肝病毒的中和抗体 [J]. 病毒学报, 1990, 6(3): 216-218.
- [14] 谷淑燕, 黄天民, 阮力, 江民康, 赵玉和, 韩春卉, 肖瑶, 朱既明, Wolf H. 表达 EB 病毒膜抗原的重组痘苗病毒活疫苗株的建立 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1991, 5(2): 142-152.
- [15] 李景赞, 胡裕文, 容敏清, 阮力, 侯云德, 朱既明. 采用我国痘苗病毒天坛株载体表达单纯疱疹病毒 I 型糖蛋白 D [J]. 病毒学报, 1991, 7(2): 120-124.
- [16] 阮力, 郑浩强, 徐水婵, 王双平, 曹旭, 解燕乡, 朱既明. 呼吸道合胞病毒糖蛋白 F 和 G 在同一个重组痘苗病毒中的表达 [J]. 病毒学报, 1992, 8(2): 101-109.
- [17] 林枫, 朱家鸿, 陈乃民, 侯云德, Joseph Esposito. 表达狂犬病毒糖蛋白的重组痘苗病毒的组建和鉴定 [J]. 病毒学报, 1992, 8(3): 210-214.
- [18] 郭可睿, 伊瑶, 王晓洁, 刘崇柏, 阮力, 朱既明. 人白细胞介素 2 基因的插入对甲型肝炎重组痘苗病毒表达与免疫的影响 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1993, 13(4): 258-260.
- [19] 张帆, 田淑芳, 阮力, 强东, 朱既明. 乙型肝炎病毒 S 基因 (包括 PreS) 和 C 基因在重组痘苗病毒中同时表达 [J]. 病毒学报, 1993, 9(3): 209-217.
- [20] 徐水婵, 阮力, 阎秀军, 许文波, 王湛, 朱既明. 麻疹病毒融合蛋白 (F) 和血凝素 (HA) 在痘苗病毒中的表达 [J]. 病毒学报, 1993, 9(4): 301-307.
- [21] 万晓余, 吴淑华, 黄利文, 张丽兰, 侯云德. 应用痘苗病毒载体在动物细胞中高效表达人 α -肿瘤坏死因子 cDNA 及其特性的研究 [J]. 病毒学报, 1993, 9(1): 30-36.
- [22] 容敏清, 阎辉, 阮力, 侯云德, 何南祥, 朱既明. 表达 HSV-2 gD 基因的重组痘苗病毒保护小鼠对抗致死量 HSV 病毒攻击 [J]. 病毒学报, 1995, 11(3): 220-227.
- [23] 董家新, 任薇芳, 沈倍奋, 朱诚, 阮力. 人白细胞介素 6 受体基因在痘苗病毒载体系统中的表达 [J]. 生物化学杂志, 1995, 11(4): 386-391.
- [24] 杨克俭, 阮力, 朱诚, 孙朝晖, 陆柔剑, 徐水婵, 朱既明. 同时表达麻疹病毒 L4 株 HA 和 F 蛋白及人白细胞介素 2 (IL2) 的重组痘苗病毒疫苗株的构建 [J]. 病毒学报, 1996, 12(4): 299-306.
- [25] 杨克俭, 阮力, 陆柔剑, 孙朝晖, 朱诚, 朱既明. 麻疹病毒 L4 株血凝素基因的克隆与表达及免疫原性 [J]. 病毒学报, 1996,

- 12(3): 227-234.
- [26] 王琴, 阮力, 陆柔剑, 孙朝晖, 朱诚, 马大龙, 朱既明. 三种淋巴因子在重组痘苗病毒中的表达及其对重组病毒毒力和免疫效果影响的初步研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1996, 10(3): 201-206.
- [27] 杨雄虎, 尚大庄, 杨新科, 段淑敏, 侯云德, 阮力, 朱既明. 我国单纯疱疹病毒 I 型 168 株糖蛋白 D 基因的克隆及其在痘苗病毒天坛株中的表达[J]. 病毒学报, 1996, 12(3): 220-226.
- [28] 耿学辉, 王之梁, 钱渊, 阮力, 丁燕, 李元, 朱汝南, 邓洁, 刘成贵, 朱宗涵. 北京地区正常人群血清中呼吸道合胞病毒 F 和 G 蛋白特异性 IgG 抗体水平的观察[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1996, 16(6): 442-446.
- [29] 阎辉, 容敏清, 阮力, 侯云德, 何南祥, 朱既明. 表达单纯疱疹病毒 II 型糖蛋白 D 的重组痘苗病毒活疫苗株的建立[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1997, 11(1): 16-20.
- [30] 马海伦, 孙朝晖, 陆柔剑, 娄元梅, 郭斐, 张帆, 阮力. 同时表达多种外源基因的非复制型重组痘苗病毒的构建[J]. 病毒学报, 1999, 15(1): 21-28.
- [31] 马海伦, 郭斐, 孙朝晖, 陆柔剑, 张帆, 阮力. 非复制型多价重组痘苗病毒粘膜与细胞免疫效果[J]. 病毒学报, 1999, 15(1): 14-20.
- [32] 李萍, 朱家鸿, 严家新, 郭斐, 胡巧玲, 王继麟, 刘碧芬, 阮力. 狂犬病毒糖蛋白及核蛋白在非复制型痘苗病毒天坛株中的共同表达[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2000, 20(5): 481-484.
- [33] 魏滨, 谷淑燕, 李燕, 郭斐, 阮力. 表达 EB 病毒主要膜蛋白 gp350/220 的非复制型重组痘苗病毒的构建[J]. 病毒学报, 2001, 17(1): 29-33.
- [34] 郭斐, 许洪林, 陆柔剑, 李军, 阮力. CpG-ODN 可增强痘苗病毒修饰的癌溶物的抗肿瘤效果[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2001, 8(1): 6-9.
- [35] 郭斐, 陆柔剑, 孙朝晖, 马海伦, 张颖妹, 马大龙, 阮力. IL-5 在非复制重组痘苗病毒中的表达及对重组病毒免疫效果的影响[J]. 病毒学报, 2001, 17(3): 225-230.
- [36] 郭斐, 陆柔剑, 许洪林, 李军, 张颖妹, 马大龙, 阮力. 表达粒细胞巨噬细胞集落刺激因子的非复制痘苗病毒的抗肿瘤效果[J]. 病毒学报, 2001, 17(3): 231-235.
- [37] 职慧军, 韩立群, 任皎, 田厚文, 骆卫锋, 梁雨, 阮力. 表达野生型和突变型 HPV16-E7 重组痘苗病毒诱发的抗肿瘤免疫反应[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2001, 15(3): 222-225.
- [38] 郭斐, 陆柔剑, 孙朝晖, 马海伦, 李军, 张颖妹, 马大龙, 阮力. 非复制重组痘苗病毒中白细胞介素 6 的表达及其对重组病毒免疫效果的影响[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2002, 16(2): 136-141.
- [39] 韩立群, 任皎, 梁雨, 田厚文, 职慧军, 骆卫锋, 陆振华, 魏兰兰, 阮力. 表达 HPV 16 型结构蛋白的非复制型重组痘苗病毒的构建与鉴定[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2002, 16(3): 256-260.
- [40] 王世峰, 许洪林, 陆柔剑, 孟昕, 王文玲, 王志云, 郭斐, 阮力. 痘苗病毒基因组密码子使用频率分析[J]. 病毒学报, 2002, 18(3): 227-234.
- [41] 刘颖, 吴岚, 陈建平, 周克明, 陆柔剑, 洪坤学, 阮力, 邵一鸣. 表达 HIV 多价抗原的重组痘苗病毒的构建及免疫效果研究[J]. 病毒学报, 2003, 19(3): 205-209.
- [42] 王文玲, 陆柔剑, 陆振华, 王世峰, 付士红, 邓瑶, 李仁清, 辛伟, 梁国栋, 阮力. 流行性乙型脑炎病毒 GSS 株 prM、E 和 NS1 蛋白基因的克隆及在非复制型痘苗病毒中的表达[J]. 病毒学报, 2003, 19(3): 210-216.
- [43] 辛伟, 郭斐, 陆柔剑, 王世峰, 邓瑶, 王文玲, 张相民, 李仁清, 吕亦晨, 阮力. 非复制重组痘苗病毒表达人免疫缺陷病毒 Bostwana C 亚型 Nef 蛋白及免疫效果的观察[J]. 病毒学报, 2004, 20(2): 97-103.
- [44] 张相民, 辛伟, 王世峰, 李仁清, 陆柔剑, 王文玲, 吕亦晨, 阮力. 按痘苗病毒优势密码子改造 HIV-1 gag 基因提高表达水平的研究[J]. 病毒学报, 2005, 21(3): 210-216.
- [45] 王文玲, 陆振华, 辛伟, 李仁清, 张相民, 邓瑶, 陆柔剑, 梁国栋, 阮力. 表达乙型脑炎病毒抗原的非复制型重组痘苗病毒能在小鼠中诱发免疫保护[J]. 病毒学报, 2005, 21(5): 370-375.
- [46] 黄微, 田厚文, 任皎, 范江涛, 赵莉, 边涛, 陆振华, 阮力. 共表达 HPV16 L1、L2、E6、E7 蛋白的重组非复制型痘苗病毒构建及鉴定[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2005, 19(3): 240-243.
- [47] 张相民, 王世峰, 辛伟, 邓瑶, 李仁清, 闫克夏, 齐香荣, 高瑛瑛, 谭文杰, 鲁宁, 孟昕, 阮力. 密码子偏性对痘苗病毒载体表达效率影响的研究[J]. 病毒学报, 2006, 22(5): 350-357.
- [48] Bian T, Wan Y, Lu Z, Ye Z, Zhao L, Ren J, Zhang H, Ruan L, Tian H. Human papillomavirus type 16 L1E7 chimeric capsomeres have prophylactic and therapeutic efficacy against papillomavirus in mice [J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(5): 1329-1335.
- [49] Yan K, Tan W, Wang H, Wang Y, Zhang X, Li Y, Ruan L. SARS-CoV spike proteins expressed by the vaccinia virus Tiantan strain: secreted sq protein induces robust neutralization antibody in mice [J]. Viral Immunol, 2009, 22(1): 57-66. doi:10.1089/vim.2008.0064.
- [50] Deng Y, Zhang K, Tan W, Wang Y, Chen H, Wu X, Ruan L. A recombinant DNA and vaccinia virus prime-boost regimen induces potent long-term T-cell responses to HCV in BALB/c mice [J]. Vaccine, 2009, 27(15): 2085-2088.
- [51] Zhao L, Liu B, Ren J, Feng J, Pang Z, Gao J, Zhang H, Tan W, Tian H, Ruan L. Immunogenicity in mice and rhesus monkeys vaccinated with recombinant vaccinia virus expressing bivalent E7E6 fusion proteins from human papillomavirus types 16 and 18 [J]. Virol J, 2011, 8: 302. doi: 10.1186/1743-422X-8-302.
- [52] 齐香荣, 张相民, 邓瑶, 高瑛瑛, 陆柔剑, 孟昕, 谭文杰, 阮力. 表达 HIV-1 六种基因的非复制型重组痘苗病毒在 CEF 细胞

- 中遗传稳定[J]. 病毒学报, 2011, 27(2): 135-143.
- [53] Chen H, Chuai X, Deng Y, Wen B, Wang W, Xiong S, Ruan L, Tan W. Optimisation of prime-boost immunization in mice using novel protein-bases and recombinant vaccinia (Tiantan)-based HBV vaccine [J]. PLoS One, 2012, 7(9): e43730.
- [54] Gu SY, Huang TM, Ruan L, Chu CM, Lu H, Wolf H. Immunogenicity in human volunteers of a recombinant vaccinia virus expressing Epstein-Barr virus membrane antigen. In: Chanock RM, Lerner RA, Brown F, Ginsberg H. eds. Vaccine [M]. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992, 349-355.
- [55] Gu SY, Huang TM, Ruan L, Miao YH, Lu H, Chu CM, Motz M, Wolf H. On the first EBV vaccine trial in humans using recombinant vaccinia virus expressing the major membrane antigen. In: Tursz T, Pagano JS, Ablashi DV, de Thé G, Lenoir G, Pearson GR. eds. The Epstein-Barr Virus and Associated Diseases [M]. Montrouge, France: Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. , 1993, 225: 579-584.
- [56] Guo KJ, Gao F, Liu CB, Ruan L, Chu CM. Characteristics and immunogenicity of hepatitis A virus antigens expressed by a recombinant vaccinia virus. In: Chanock RM, Lerner RA, Brown F, Ginsberg H. eds. Vaccines [M]. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992, 295-298.
- [57] 郭可睿, 阮力, 王晓洁, 伊瑶, 刘崇柏, 任银海, 张玉成, 刘新海, 高栓景, 杨景伟, 朱既明. 以痘苗病毒为载体的甲型肝炎基因工程疫苗初步人体免疫效果的观察[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1992, 12(3): 137-140.
- [58] Ruan L, Liu GQ, Chu CM. A preliminary human trial of sequential immunization with recombinant vaccinia virus expressing hepatitis B surface antigen and recombinant hepatitis B subunit vaccine. Abstracts of Papers Presented at the 1991 Meeting on Modern Approaches to New Vaccines: Including Prevention of AIDS [M]. NY: Spring Harbor Laboratory Press, 1991, 59.
- [59] Ruan L, Yang KJ, Sun ZH, Zhu C, Lu RJ, Wu WT, Ren YH, Zhu JM, Chu CM. Preliminary clinical trial of measles-vaccinia recombinant with expression of human interleukin 2. Abstracts of Papers Presented at the 1995 Meeting on Molecular Approaches to the Control of Infectious Diseases [M]. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995.

(收稿日期: 2013-03-10)