

庞帅赛, 王诗诗, 刘光清, 等. 兽用 mRNA 疫苗的研究进展 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (10): 114-121.

PANG S S, WANG S S, LIU G Q, et al. Progress in research on veterinary mRNA vaccines [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (10): 114-121.

兽用 mRNA 疫苗的研究进展

庞帅赛, 王诗诗, 刘光清*, 孟春春*

(中国农业科学院上海兽医研究所伴侣动物生物安全风险预警及防控技术创新团队, 上海 200241)

摘要: 疫苗接种是动物日常保健中必不可少的。近年来, 随着免疫学研究的持续发展和分子生物学技术的不断完善, mRNA 疫苗在动物传染性疾病防治方面取得了一定的成果, 广受各方关注。为加深对 mRNA 疫苗的了解, 本文将从 mRNA 疫苗主要类型、结构特征、免疫机制、独特优势及其在兽用领域的研究现状等几个方面, 对兽用 mRNA 疫苗目前的主要研究进展作一系统性综述, 以期为后续开展 mRNA 疫苗相关的研究提供参考资料。

关键词: mRNA 疫苗; 兽用疫苗; 免疫; 动物传染病

中图分类号: S859.797 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2024)10-0114-08

Progress in research on veterinary mRNA vaccines

PANG Shuaisai, WANG Shishi, LIU Guangqing*, MENG Chunchun*

(Companion Animal Biosecurity Risk Early Warning, Prevention and Control Technology Innovation Team, Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China)

Abstract: Vaccination is essential in the daily health care of both farm animals and companion animals. The continual advancement of immunological studies and the augmentation of molecular biology technology have enabled messenger RNA (mRNA) vaccines to attain certain outcomes in the prevention and treatment of infectious diseases in animals, thus drawing extensive notice in recent times. In order to deepen the understanding of mRNA vaccines, this paper will summarize and make a systematic review on the current progress in research on veterinary mRNA vaccines, including the main types of mRNA vaccines, their structural characteristics, immune mechanisms, unique advantages, and the current status of research in the veterinary field, with a view to providing reference materials for future studies on mRNA vaccines.

Keywords: mRNA vaccine; animal vaccine; immunization; infectious animal diseases

疫苗是动物疾病防治中不可替代的重要组成。回顾历史, 从弱毒苗到灭活苗, 再到基因工程疫苗, 直到第三代的核酸疫苗, 疫苗不断迭代发展, 向着更安全、更高效的目标迈进。核酸疫苗分为 DNA 和 mRNA 两种, 通过将编码抗原蛋白的目的基因导入细胞内表达合成抗原蛋白, 诱导宿主产生对该抗原蛋白的免疫应答, 以达到预防和治疗疾病的目的^[1]。与 DNA 相比, mRNA 作为疫苗分子具有显著的优势: 不需要任何外源信号, 不需要转录, 而且不会与宿主

基因组发生任何结构上的变化^[2]。PubMed 数据库显示, mRNA 疫苗技术自 2004 年以来一直是一个新兴的研究领域, 并且在近几年越发得到关注^[3]。

mRNA 疫苗是分子生物学和免疫学相结合的高新技术产品。早在 1989 年, mRNA 就被提出可作为疫苗, 这一概念在当时引起了广泛关注^[4]。近年来, 随着研究的深入和实验技术的改进, mRNA 疫苗迅速崛起, 而且 mRNA 疫苗展现出安全、高效、免疫原性强且生产成本低等优势, 在抗击癌症和病毒性疾病方面也体现出了令人欣喜的潜力^[4-7]。

近几年 mRNA 疫苗技术逐渐完善^[8]。起初, mRNA 疫苗的稳定性较差, 递送系统也不完善, 容易受到 RNA 酶的破坏, 使之难以投入应用。随着 mRNA 稳定技术和递送系统的进步, mRNA 疫苗和药物的科学研究与试验发展仍取得了长足的进步^[9]。本文将从 mRNA 疫苗主要类型、结构特征、免疫机制、独特优势及其在兽用领域的研究现状等方面对

收稿日期: 2023-08-17; 修回日期: 2024-08-12

基金项目: “十四五”重点研发计划项目 (2022YFD1800100); 国家自然科学基金面上项目 (32272982); 上海市自然科学基金项目 (23ZR1477100)

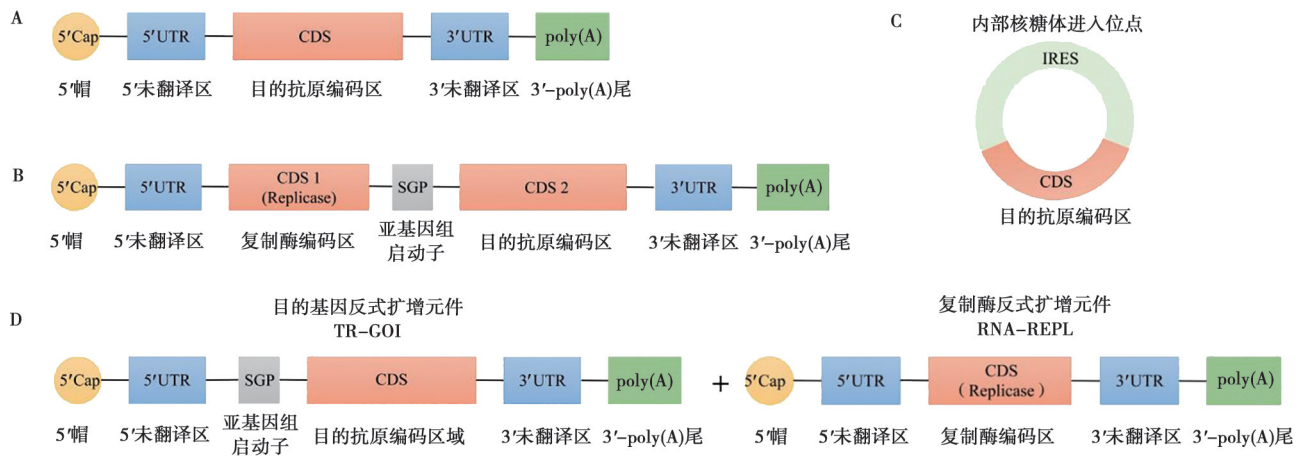
第一作者: 庞帅赛, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 刘光清, 研究员, 主要从事动物病毒学与免疫学方面的研究, E-mail: liugq@shvri.ac.cn; 孟春春, 副研究员, 主要从事动物病毒性传染病的基础性研究及相应生物制品开发, E-mail: mengcc@shvri.ac.cn。

mRNA 疫苗作一综述。

1 mRNA 疫苗的主要类型及结构特征

mRNA 疫苗根据其遗传特征可分为非复制 mRNA 疫苗 (non-replicating mRNA vaccine), 自扩增 mRNA



A. 非复制 mRNA 疫苗结构; B. 自扩增 mRNA 疫苗结构; C. 环状 RNA 疫苗结构; D. 反式扩增 RNA 疫苗结构。

图 1 mRNA 疫苗分类及对应结构

1.1 非复制 mRNA 疫苗

非复制 mRNA 疫苗包含多种功能区, 其中包括 5'端帽子结构 (5' Cap)、未翻译区 (untranslated region, UTR)、编码抗原蛋白的编码序列 (coding sequence, CDS) 及 3'末端的多聚腺苷酸 [poly (A)] 尾^[14]。这一结构能够大幅度提升 mRNA 的传输稳定性, 并且更加精确地进行翻译^[15]。

Cap 结构是 mRNA 的重要组成部分, 它们可以通过加帽酶被添加到核苷酸的 5'端, 与真核翻译起始因子结合从而激活蛋白质的翻译^[16]。

3'端及 5'端的 UTR 对于 mRNA 的转录、翻译以及其他相关的生物学功能都起着至关重要的作用, 它们不仅可以提高 mRNA 的转运效率, 还可以帮助精确定位细胞器, 并维持 mRNA 的结构稳定^[17-18]。 α -和 β -球蛋白基因序列在 UTR 领域的应用越来越普遍, 这些基因可以大大改善 RNA 的转录速度, 增强其稳定性, 有助于促进生物体的发育与进化^[19]。

CDS 区可通过引入修饰核苷酸以及使用优化的密码子来提高 mRNA 的翻译效率^[20]。不同细胞的翻译效率受同义密码子的不同选择影响, 构建 mRNA 疫苗表达目的抗原时可通过使用最优密码子提高翻译速率。然而, 插入适量的稀有密码子延迟翻译速率以保证蛋白正确折叠也是必须的^[21]。

采用 poly (A) 序列作为加尾能够有效地改变 mRNA 的结构和功能^[22]。结合多聚腺苷酸结合蛋白

(self-amplifying mRNA, SAM) 疫苗, 环状 RNA (circular RNA, circRNA) 疫苗和反式扩增 RNA (trans amplifying RNA, taRNA) 疫苗^[10-13]。图 1 为 mRNA 疫苗分类及对应结构示意图。

[poly (A) -binding protein, PABP] 可以显著抑制脱腺苷化的进程, 同时保持 mRNA 的结构稳定, 避免被 PABP 的核酸酶降解, 从而大大提高 mRNA 的稳定性和翻译活性^[23], 并且可以将 PABP 与起始转录因子和 5'Cap 结合, 从而实现终止翻译的目的^[22]。此外通过增加 poly (A) 尾的长度, 可以显著提升多聚核糖体的形成速度, 从而大大提升蛋白质表达的效率^[24]。

1.2 自扩增 mRNA 疫苗

自扩增 mRNA 疫苗可以提供编码靶抗原和其他基因 (例如病毒 RNA 聚合酶) 的遗传信息, 以使 mRNA 能够自我复制。自扩增 mRNA 疫苗基于传统 mRNA 疫苗结构增加了来源于甲病毒 (alpha virus, 又名阿尔法病毒) 的编码复制酶 NSP1~4 的 mRNA 序列和亚基因组启动子 (subgenomic promoter, SGP) 序列。甲病毒通过使用 SGP 来启动编码靶抗原的基因的转录^[14]。甲病毒的 4 个非结构蛋白 NSP1~4, 分别为 mRNA 加帽酶、核苷三磷酸水解酶/解旋酶/蛋白酶、转录调控宏结构域和 RNA 依赖性 RNA 聚合酶^[25]。

通过单载体系统编码的自扩增 mRNA 疫苗, 可以像病毒一样, 在极低的注射剂量下, 通过自身携带的复制酶不断产生新的 mRNA 分子, 从而大大提升抗原的表达水平, 并且引发强烈的免疫反应^[26]。与非复制 mRNA 相比, 每剂自扩增 mRNA 疫苗所需的

核酸量更低,因此能够潜在降低成本和提高生产效率^[27]。最近被用于开发新型冠状病毒肺炎 (corona virus disease 2019, COVID-19) 的自扩增 mRNA 疫苗 (SARS-CoV-2) 已经证明了它们能在动物中诱导高中和抗体滴度^[28]。

1.3 环状 RNA 疫苗

环状 RNA 是由 mRNA 前体通过反向剪接而形成的。环状 RNA 是一类非编码 RNA,其特殊的共价闭环结构使其能够稳定地存在于真核细胞内,为多种生物学功能的探索提供了重要的理论支持^[29]。

环状 RNA 的形成受到多种因素的影响,其中最重要的是顺式和反式作用元件,它们通过头对尾的反向剪接来实现。研究表明, RNA 形成的驱动机制可能包括:内含子配对、RNA 结合蛋白 (RNA-binding proteins, RBPs) 和套索结构 3 种模式,它们分别可能通过不同的机制来促进 RNA 的环状结构的发育和表达^[30]。

尽管环状 RNA 缺乏帽依赖性翻译的基本元件,但可以通过在环状 RNA 的 5'UTR 区域添加内部核糖体进入位点 (internal ribosome entry site, IRES) 实现蛋白质翻译。环状 RNA 可以依靠 IRES 和 CDS 这 2 个基本元件进行翻译^[31]。

与线性 RNA 不同,环状 RNA 在疫苗开发中具有多种优势。环状 RNA 的共价闭环结构可防止核酸外切酶降解,从而增加环状 RNA 的半衰期和稳定性^[32]。根据最新研究,环状 RNA 的稳定性要远远高于其对应的线性 mRNA,其中位半衰期甚至可以达到哺乳动物细胞中线性 mRNA 亚型的 2.5 倍以上^[33]。

此外,之前还有研究报道,当环状 RNA 在室温下保存 2 周时,细胞转染效率仍然得以保持。由于其天然的高稳定性,环状 RNA 已被用于开发 COVID-19 疫苗^[32]。

1.4 反式扩增 RNA 疫苗

Beissert 等^[13]基于自扩增 RNA 疫苗的结构基础进行了优化,用 2 个 mRNA 分别搭载目的抗原的编码序列和复制酶的编码序列,开发出一种全新的反式扩增 RNA 疫苗。该反式扩增 RNA 疫苗由一个编码复制酶的 RNA 和另一个编码目的抗原的甲病毒 RNA 组成二分载体。编码目的抗原的 RNA 不含与前一种编码复制酶的 RNA 形成复制子的复制酶。

Beissert 等^[13]构建的反式扩增 RNA 疫苗用于编码流感血凝素抗原,该疫苗超低剂量 (50 ng) 即可引发中和抗体并诱导保护性免疫反应。这种新颖的疫苗形式具备更好的安全性、更大的优化潜力和更简单的生产过程,是前景广阔的 mRNA 疫苗类型。

2 mRNA 疫苗的免疫机制

mRNA 疫苗经注射进入机体后,被抗原递呈细胞 (antigen presenting cell, APC) 摄取,先启动机体先天免疫应答,后启动机体适应性免疫应答。mRNA 被核糖体翻译成蛋白质,用作内源性抗原,并被蛋白酶体降解为抗原肽,这些肽段又被主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 递呈给 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞或者通过释放被 B 细胞识别,从而激活细胞免疫与体液免疫^[34]。图 2 为 mRNA 疫苗免疫机制示意。

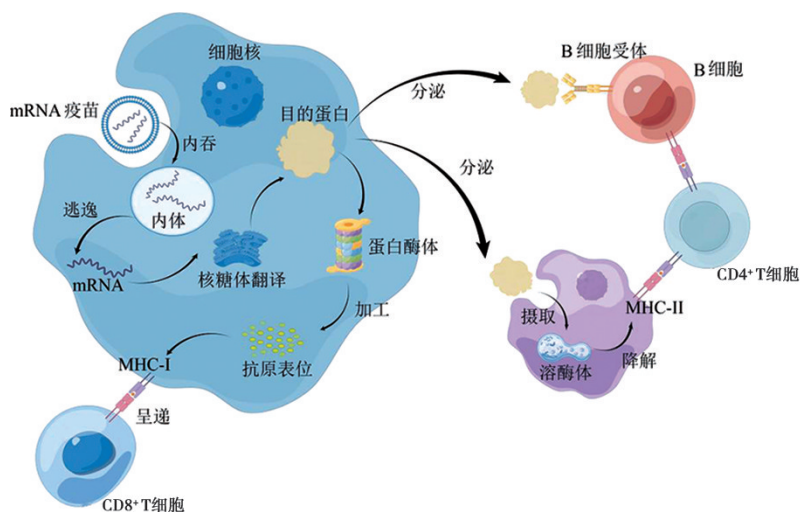


图 2 mRNA 疫苗免疫机制

2.1 mRNA 疫苗的外源性免疫反应

mRNA 疫苗注射进入机体后被肌肉细胞摄取,肌

肉细胞翻译目的抗原蛋白片段并立即将其运输至胞外,使它们能够与不同类型的 APC 结合,例如巨噬

细胞和树突细胞，从而激活机体免疫力^[35]。未成熟的树突细胞吞噬目的抗原蛋白片段并激活成熟的树突细胞。同时，巨噬细胞可以处理合成的蛋白质抗原信息，分泌细胞因子，促进树突细胞成熟。成熟的树突细胞剪接目的抗原蛋白片段，并通过 MHC II 类分子将其呈递给 CD4⁺ T 细胞，进行识别和结合。CD4⁺ T 细胞通过直接结合和分泌细胞因子激活 B 细胞，产生浆细胞和记忆 B 细胞，从而产生一系列以抗体为主的体液免疫效应^[36]。

2.2 mRNA 疫苗的内源性免疫反应

APC 可以剪接 mRNA 疫苗中的目的抗原蛋白，然后通过膜表面的 MHC I 类分子将其递呈给 CD8⁺ T 细胞，从而激活 CD8⁺ T 细胞，产生记忆和效应性 T 细胞^[37]。当再次感染时，细胞免疫和体液免疫同时激活机体产生的记忆免疫细胞，如记忆 B 细胞和抗原特异性细胞毒性 T 细胞，可以快速识别病毒，产生额外抗体，准确杀死感染细胞，消灭病毒，防止感染继续^[38-39]。

3 mRNA 疫苗的递送系统

mRNA 是亲水性、带负电荷的大分子。mRNA 分子稳定性较差，易被核酸酶降解而难以有效内化；分子较大、携带的负电荷多，难以有效跨膜进入细胞内表达。自身免疫原性使其易在表达前被免疫系统清除，裸 mRNA 递送效率极低。故而 mRNA 疫苗递送系统的选择至关重要，递送系统是 mRNA 疫苗开发中的另一项关键性技术（表 1）。

3.1 脂质

脂质纳米颗粒（lipid nanoparticles, LNPs）是当今最先进、最具吸引力的递送系统，它们在 mRNA 疫苗治疗中的应用越来越广泛，并且取得了令人瞩目的成果^[40]。LNPs 包括：可电离脂质，聚乙二醇化脂质（polyethylene glycol-functionalized lipids, PEG-lipids），胆固醇和辅助性脂质（一般为磷脂）4 个组成部分，与 mRNA 自发装配成 100 nm 左右的颗粒，可电离脂质是 LNPs 的核心结构^[41]。其中，磷脂的存在有助于 LNP 的双分子层的发展，从而加速内部物质的排出；胆固醇的加入有助于提高脂质双分子层的稳

定性，促进膜融合^[42]；惰性 PEG-lipids 促进纳米结构的形成，同时保护 LNP 免受巨噬细胞介导的清除，延长 LNP 半衰期。

3.2 肽类

鱼精蛋白（protamine, PRTM）是一种阳离子多肽，它由大约 30 个氨基酸残基构成，位于鱼类精子细胞核内，属于细胞穿膜肽，其中包括 1 个核定位信号，而且它能够与 mRNA 结合，从而提高 mRNA 转染到细胞的效率。PRTM 有助于防止 RNase 的降解，此外还有助于改善它们在细胞内的吸收，并且能够促进机体的免疫反应，从而大大提升 T 细胞的免疫力^[43-44]。通过将 mRNA 凝聚成纳米复合物，可大大增强其稳定性，并且可有效地实现载体的封装。

Zhang 等^[45] 制备了一种鱼精蛋白脂质体（liposome-protamine lipoplex, CLPP），它能够将编码 Survivin T34A 蛋白的 mRNA 导入细胞内，从而形成了一种新型的核壳结构纳米制剂（CLPP/mSur-T34A）。试验证实，该制剂在 C26 肿瘤细胞上表现出较高的 mRNA 转染和表达效率，在体内外表现对各类 C26 结肠癌模型均有明显的治疗作用，且具有较高的安全性。

Armbruster 等^[46] 研发的狂犬疫苗候选疫苗 CV7201 是一种编码狂犬病病毒的主要抗原包膜糖蛋白（rabies virus glycoprotein, RABV-G）的 mRNA 疫苗，该疫苗使用鱼精蛋白作为稳定剂和免疫佐剂，在临床试验中表现良好。

3.3 阳离子聚合物

阳离子聚合物具有多功能、易修饰等特点。高分子聚合物聚乙烯亚胺（polyethylenimine, PEI）是用于基因递送常见的阳离子聚合物，最初作为非病毒载体递送 DNA 进入小鼠大脑^[47]。目前 PEI 作为核酸载体已得到广泛研究。PEI 的分子量通常高达数千道尔顿，因此它是传输大分子 mRNA 的理想选择。

PEI 具有出色的转染效率，但其高分子量也带来了较高的细胞毒性。这是由于高分子量 PEI 提供更多的阳离子残基，严重影响红细胞膜结构、白蛋白构象和凝血过程，最终损害整个生物体。

表 1 各类递送系统优缺点对比

递送载体	优点	缺点
脂质	递送效率高；有免疫佐剂作用；半衰期长；生物相容性好	贮存和运输条件高；存在引起细胞膜的损伤和血清蛋白吸附的风险
肽类	发挥免疫佐剂作用；细胞毒性低；贮存和运输条件低	递送效率较低
阳离子聚合物	分子多样性程度高，可灵活设计；转染效率高	递送效率低；细胞毒性高

4 mRNA 疫苗的独特优势

mRNA 技术是现代疫苗研发的重要基础。mRNA 疫苗通过采用预期的编码技术，可以有效地表达目的抗原，并具有良好的可编译性。接种 mRNA 疫苗后，目的抗原可以被转录到细胞质，并被翻译，从而促进机体的免疫反应。

mRNA 疫苗的显著优势在于它不需要经过细胞核就能够被转录，而 DNA 疫苗只有到达细胞核才能发挥效果，这使得它的转录速度比 DNA 疫苗快数倍，并且能够更快地表达抗原。由于 mRNA 疫苗可以在不经过细胞核的情况下发挥作用，因此它不会对机体基因组造成整合突变，也就是说，它不存在转基因生物安全风险，因此，它的安全性要远远高于 DNA 疫苗。

mRNA 疫苗在动物模型中可激活机体的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞，拥有比目前使用的灭活疫苗更多的优势。mRNA 疫苗能够激活机体的 MHC I 和 MHC II 类免疫通路，从而引发细胞毒性 T 淋巴细胞的反应。mRNA 分子可以在机体细胞内瞬间表达抗原蛋白，这些蛋白会迅速累积，并经过多肽化处理，最终被装载至 MHC I 类免疫通路。mRNA 分子不仅可以作为抗原蛋白的来源，而且还可以在 MHC II 类免疫通路中迅速表达，仅需少量的 mRNA 分子就能够将大量的抗原蛋白传递到 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞，诱导细胞毒性 T 淋巴细胞交叉启动，有效激活细胞免疫^[48-49]。

此外，mRNA 技术的应用使得受体靶向更加精准，在设计 mRNA 疫苗时可自我调节，使得它拥有传统的多肽和蛋白质疫苗所无法比拟的优势。在大规模生产过程中，只需要改变 mRNA 的核糖核苷酸序列，就可以实现大规模的生产和复制，而无需改变其他生产设施和条件。mRNA 疫苗生产过程中不使用病原及抗生素，并确保它们不会被整合到宿主的基因组中，从而提升了生物安全性。

5 兽用 mRNA 疫苗的研究现状

研究结果显示，mRNA 疫苗具有良好的生物安全性和免疫原性，尤其是在病毒病的预防和控制上，mRNA 疫苗可以激活机体的特异性抗体，并且可以有效地阻止病毒的侵袭，从而起到保护作用。随着 mRNA 技术的成熟，其应用场景也逐渐从人用疫苗扩展到兽用疫苗。当前动物常见病毒病、寄生虫病等均有 mRNA 疫苗的研制。

然而，目前 mRNA 疫苗的开发重点是人类疫病及人兽共患病，而针对于动物疫病的开发则相对较

少。因此，兽用 mRNA 疫苗的开发应该更加积极，以期获得更佳的防治效果。

5.1 兽用病毒 mRNA 疫苗

5.1.1 禽流感疫苗

Chahal 等^[50]构建了一种使用 LNP 递送的新型自扩增 RNA 疫苗，能够表达 H1N1 型禽流感病毒 (avian influenza virus, AIV) 的血凝素 (hemagglutinin, HA) 蛋白，并通过试验证明该疫苗只需要给小鼠接种 1 次，就能够有效地抵御 H1N1 型 AIV 的感染。Hajam 等^[51]使用壳聚糖纳米颗粒 (chitosan nanoparticles, CNP) 递送表达 H9N2 型 AIV 的 HA2 及 M2e 蛋白的非复制 mRNA 疫苗，并通过试验证明该疫苗能够有效穿透黏膜屏障到达免疫起始位点，对 H7N9 及 H9N2 型 AIV 形成有效的保护。Bahl 等^[38]构建了使用 LNP 递送的非复制 mRNA 疫苗，能够表达 H10N8 或 H7N9 型 AIV 病毒株的 HA 蛋白，通过免疫小鼠、雪貂和非人灵长类动物，该疫苗都产生了强烈的免疫反应。Feldman 等^[52]通过随机临床试验评估了该 mRNA 疫苗，该疫苗表现出了良好的安全性和抗原性，未报告与该疫苗接种相关的严重不良反应事件。

5.1.2 狂犬病疫苗

Stitz 等^[53]构建了一种非复制 mRNA 疫苗，可通过表达狂犬病病毒 (rabies virus, RABV) G 蛋白诱导产生中和抗体，具有良好的保护效果和热稳定性，在多次热循环条件下该疫苗的免疫原性和保护性仍然保持稳定，可以满足不同的临床需求。Saxena 等^[54]构建了一种自扩增 RNA 疫苗，可通过表达 RABV-G 蛋白引发机体细胞和体液免疫反应，在 CVS 株攻毒试验中，该疫苗能够有效地保护小鼠。Schnee 等^[55]评估了一种使用 PRTM 递送的可特异性表达 RABV-G 蛋白的非复制 RNA 疫苗，通过皮内注射可诱导小鼠产生细胞免疫和体液免疫反应，并在脑内攻毒试验中提供全面保护，且家猪动物模型中也显示出较高的免疫原性和保护性。Li 等^[56]构建了一种表达 RABV-G 蛋白的非复制 mRNA 疫苗 LVRNA001，使用 LNP 递送系统，通过建立小鼠及犬的动物模型评估其免疫原性和保护能力，证实该疫苗可诱导中和抗体产生强烈的细胞免疫应答。

5.1.3 口蹄疫疫苗

Pulido 等^[57]在小鼠模型中使用口蹄疫病毒 (foot-and-mouth disease virus, FMDV) 全长基因组转录产生的非复制 mRNA 疫苗进行免疫，产生了高滴度的 FMDV 中和抗体，约 37.5% 的小鼠得到了有效的保护。

5.1.4 日本脑炎疫苗

Huang 等^[58]构建了一种基于日本脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV) 复制子载体单轮传染性颗粒 (single-round infectious particles, SRIP) 的二联自扩增 mRNA 疫苗 (SRIP-SP70)。经过小鼠免疫和攻毒试验表明, 该疫苗能够有效地抵御 JEV 和肠道病毒-71 型 (enterovirus-71, EV71) 的感染, 从而保护小鼠免受其危害。Chen 等^[59]构建了一种使用 LNP 递送的可表达 JEV P3 株 prM 蛋白及 E 蛋白的非复制 mRNA 疫苗。该疫苗在体外表现出高水平的蛋白表达, 使用小鼠模型进行免疫后观察到较强的细胞免疫反应, 保护小鼠免受 JEV 感染, 并减少 JEV 引起的神经炎症。

5.1.5 猪繁殖与呼吸综合征疫苗

Chang 等^[60]构建了一种使用多聚纳米胶束递送的自扩增 RNA 疫苗, 通过表达猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) dNGP5 抗原蛋白, 有效地诱导 PRRSV 的中和抗体反应, 从而激发出更强烈的细胞免疫反应, 这种免疫反应也在小鼠动物模型上得到证实。

5.2 兽用寄生虫 mRNA 疫苗

5.2.1 刚地弓形虫疫苗

Chahal 等^[50]构建了一种使用 LNP 递送的多联自扩增 RNA 疫苗, 插入多种特异性抗原编码基因, 经试验证明, 这种疫苗能够有效地抑制埃博拉病毒、H1N1 流感病毒和刚地弓形虫的感染, 而且在接种这种疫苗后, 小鼠在 6 个月内没有出现任何临床症状。Luo 等^[61]构建了一由 LNPs 递送的编码弓形虫核昔三磷酸水解酶-II (nucleoside triphosphate hydrolase-II, NTPase-II) 蛋白的自扩增 mRNA 疫苗, 该疫苗能够有效地诱导小鼠产生强烈的细胞和体液免疫反应, 与对照组相比免疫组小鼠的存活时间明显延长。Zhang 等^[62]构建了一种使用 LNP 递送弓形虫新型分子 TGGT1_216200 (TG_200) 的非复制 mRNA 疫苗 (TG_200 mRNA-LNP)。小鼠模型接种该疫苗后产生强烈的免疫反应, 免疫小鼠的存活率较对照组显著提高。

5.2.2 疟原虫疫苗

Versteeg 等^[63]发现疟原虫可产生疟原虫巨噬细胞迁移抑制因子 (plasmodium macrophage migration inhibitory factor, PMIF), PMIF 可减弱机体的免疫应答, 并促进宿主对疟疾的炎症反应。Baeza Garcia 等^[64]采用编码 PMIF 的非复制 mRNA 疫苗免疫小鼠, 它们的特异性免疫反应会得到激活, 导致特异性 CD4⁺ T 细胞和抗体的数量大幅度增加, 表明可通过接种 mRNA 疫苗来提高机体对寄生虫等感染性疾病

的免疫保护能力。

6 展望

COVID-19 疫情期间, 多种疫苗被紧急研发应用。在传染病防控中, mRNA 疫苗作为新一代疫苗发挥了重要作用。相比传统疫苗和普通 DNA 疫苗, mRNA 疫苗因其效力高、开发速度快、制造成本低和用药安全等优点备受关注, 有望成为传统疫苗的替代品。但是, 由于 RNA 不稳定, 且受生产、储存、运输不便等因素影响, mRNA 疫苗的开发应用仍然受到限制。

目前关于 mRNA 疫苗的研究正围绕着优化 mRNA 序列以降低免疫原性, 提高 mRNA 疫苗稳定性与有效性, 开发高效且安全的递送系统和免疫佐剂展开。上述问题一旦解决, mRNA 疫苗将被更广泛地应用于疾病预防中。同时, 随着分子生物学技术的发展以及对 mRNA 疫苗相关研究的深入, 兽用 mRNA 疫苗领域将有更多的突破和创新。相信在不久的将来, 可以看到更多新的 mRNA 疫苗产品问世并得到广泛的应用, 这将会为预防动物传染病带来更加有效的解决方案。

参考文献:

- [1] CAFRI G, GARTNER J J, ZAKS T, et al. mRNA vaccine-induced neoantigen-specific T cell immunity in patients with gastrointestinal cancer [J]. *J Clin Invest*, 2020, 130 (11): 5976-5988.
- [2] HUANG X, ZHANG G, TANG T Y, et al. Personalized pancreatic cancer therapy: from the perspective of mRNA vaccine [J]. *Mil Med Res*, 2022, 9 (1): 53.
- [3] REGEV-YOCHAY G, GONEN T, GILBOA M, et al. Efficacy of a fourth dose of COVID-19 mRNA vaccine against omicron [J]. *N Engl J Med*, 2022, 386 (14): 1377-1380.
- [4] ZHENG X, XU H, YI X, et al. Tumor-antigens and immune landscapes identification for prostate adenocarcinoma mRNA vaccine [J]. *Mol Cancer*, 2021, 20 (1): 160.
- [5] ZUO F, ABOLHASSANI H, DU L, et al. Heterologous immunization with inactivated vaccine followed by mRNA-booster elicits strong immunity against SARS-CoV-2 Omicron variant [J]. *Nat Commun*, 2022, 13 (1): 2670.
- [6] CHEN Z, WANG X, YAN Z, et al. Identification of tumor antigens and immune subtypes of glioma for mRNA vaccine development [J]. *Cancer Med*, 2022, 11 (13): 2711-2726.
- [7] RAMOS DA SILVA J, BITENCOURT RODRIGUES K, FORMOSO PELEGRIN G, et al. Single immunizations of self-amplifying or non-replicating mRNA-LNP vaccines control HPV-associated tumors in mice [J]. *Sci Transl Med*, 2023, 15 (686): eabn3464.
- [8] POLACK F P, THOMAS S J, KITCHIN N, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383 (27): 2603-2615.

- [9] KURHADE C, ZOU J, XIA H, et al. Low neutralization of SARS-CoV-2 omicron BA. 2.75.2, BQ. 1.1 and XBB. 1 by parental mRNA vaccine or a BA. 5 bivalent booster [J]. *Nat Med*, 2023, 29 (2): 344-347.
- [10] IAVARONE C, O'HAGAN D T, YU D, et al. Mechanism of action of mRNA-based vaccines [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2017, 16 (9): 871-881.
- [11] SCHMIDT C, HASTERT F D, GERBETH J, et al. A bivalent trans-amplifying RNA vaccine candidate induces potent chikungunya and ross river virus specific immune responses [J]. *Vaccines (Basel)*, 2022, 10 (9): 1374.
- [12] FULLER D H, BERGLUND P. Amplifying RNA vaccine development [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382 (25): 2469-2471.
- [13] BEISSERT T, PERKOVIC M, VOGEL A, et al. A Trans-amplifying RNA vaccine strategy for induction of potent protective immunity [J]. *Mol Ther*, 2020, 28 (1): 119-128.
- [14] KIM D Y, ATASHEVA S, MCAULEY A J, et al. Enhancement of protein expression by alphavirus replicons by designing self-replicating subgenomic RNAs [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111 (29): 10708-10713.
- [15] YOUN H, CHUNG J-K. Modified mRNA as an alternative to plasmid DNA (pDNA) for transcript replacement and vaccination therapy [J]. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2015, 15 (9): 1337-1348.
- [16] GALLOWAY A, COWLING V H. mRNA cap regulation in mammalian cell function and fate [J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2019, 1862 (3): 270-279.
- [17] MAYR C. What are 3'UTRs doing? [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2019, 11 (10): a034728.
- [18] JIA L, MAO Y, JI Q, et al. Decoding mRNA translatability and stability from the 5'UTR [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2020, 27 (9): 814-821.
- [19] ADIBZADEH S, FARDAEI M, TAKHSHID M A, et al. Enhancing stability of destabilized green fluorescent protein using chimeric mRNA containing human β -globin 5' and 3' untranslated regions [J]. *Avicenna J Med Biotechnol*, 2019, 11 (1): 112-117.
- [20] GUO X, LIU D, HUANG Y, et al. Revolutionizing viral disease vaccination: the promising clinical advancements of non-replicating mRNA vaccines [J]. *Virology*, 2023, 20 (1): 64.
- [21] MAURO V P, CHAPPELL S A. A critical analysis of codon optimization in human therapeutics [J]. *Trends Mol Med*, 2014, 20 (11): 604-613.
- [22] NICHOLSON A L, PASQUINELLI A E. Tales of detailed poly (A) tails [J]. *Trends Cell Biol*, 2019, 29 (3): 191-200.
- [23] BERNSTEIN P, ROSS J. Poly (A), poly (A) binding protein and the regulation of mRNA stability [J]. *Trends Biochem Sci*, 1989, 14 (9): 373-377.
- [24] ECKMANN C R, RAMMELT C, WAHLE E. Control of poly (A) tail length [J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2011, 2 (3): 348-361.
- [25] ABU BAKAR F, NG L F P. Nonstructural proteins of alphavirus-potential targets for drug development [J]. *Viruses*, 2018, 10 (2): 71.
- [26] LELLO L S, BARTHOLOMEEUSEN K, WANG S, et al. nsP4 is a major determinant of alphavirus replicase activity and template selectivity [J]. *J Virol*, 2021, 95 (20): e0035521.
- [27] BALLESTEROS-BRIONES M C, SILVA - PILIPICH N, HERRADOR-CANETE G, et al. A new generation of vaccines based on alphavirus self-amplifying RNA [J]. *Curr Opin Virol*, 2020, 44: 145-153.
- [28] MCKAY P F, HU K, BLAKNEY A K, et al. Self-amplifying RNA SARS-CoV-2 lipid nanoparticle vaccine candidate induces high neutralizing antibody titers in mice [J]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1): 3523.
- [29] CHEN L L. The biogenesis and emerging roles of circular RNAs [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17 (4): 205-211.
- [30] LI X, YANG L, CHEN L L. The biogenesis, functions, and challenges of circular RNAs [J]. *Mol Cell*, 2018, 71 (3): 428-442.
- [31] XIA J, LI S, REN B, et al. Circular RNAs as a potential source of neoepitopes in cancer [J]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1098523.
- [32] QU L, YI Z, SHEN Y, et al. Circular RNA vaccines against SARS-CoV-2 and emerging variants [J]. *Cell*, 2022, 185 (10): 1728-1744.
- [33] ENUKA Y, LAURIOLA M, FELDMAN M E, et al. Circular RNAs are long-lived and display only minimal early alterations in response to a growth factor [J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 44 (3): 1370-1383.
- [34] VERBEKE R, HOGAN M J, LORÉ K, et al. Innate immune mechanisms of mRNA vaccines [J]. *Immunity*, 2022, 55 (11): 1993-2005.
- [35] HEINE A, JURANEK S, BROSSART P. Clinical and immunological effects of mRNA vaccines in malignant diseases [J]. *Mol Cancer*, 2021, 20 (1): 52.
- [36] PAINTER M M, MATHEW D, GOEL R R, et al. Rapid induction of antigen-specific CD4⁺ T cells is associated with coordinated humoral and cellular immunity to SARS-CoV-2 mRNA vaccination [J]. *Immunity*, 2021, 54 (9): 2133-2142.
- [37] BEVERS S, KOOIJMANS S A A, VAN DE VELDE E, et al. mRNA-LNP vaccines tuned for systemic immunization induce strong antitumor immunity by engaging splenic immune cells [J]. *Mol Ther*, 2022, 30 (9): 3078-3094.
- [38] BAHL K, SENN J J, YUZHAKOV O, et al. Preclinical and clinical demonstration of immunogenicity by mRNA vaccines against H10N8 and H7N9 influenza viruses [J]. *Mol Ther*, 2017, 25 (6): 1316-1327.
- [39] TARKE A, COELHO C H, ZHANG Z, et al. SARS-CoV-2 vaccination induces immunological T cell memory able to cross-recognize variants from Alpha to Omicron [J]. *Cell*, 2022, 185 (5): 847-859. e811.
- [40] PERSANO S, GUEVARA M L, LI Z, et al. Lipopolyplex potentiates anti-tumor immunity of mRNA-based vaccination [J]. *Biomaterials*, 2017, 125: 81-89.
- [41] CULLIS P R, HOPE M J. Lipid nanoparticle systems for enabling gene therapies [J]. *Mol Ther*, 2017, 25 (7): 1467-1475.
- [42] SCHOENMAKER L, WITZIGMANN D, KULKARNI J A, et al. mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: structure and stability [J]. *Int J Pharm*, 2021, 601: 120586.
- [43] NASR S S, LEE S, THIYAGARAJAN D, et al. Co-delivery of mRNA and pDNA using thermally stabilized coacervate-based core-shell nanosystems [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13 (11): 1924.

- [44] MAI Y, GUO J, ZHAO Y, et al. Intranasal delivery of cationic liposome-protamine complex mRNA vaccine elicits effective anti-tumor immunity [J]. *Cell Immunol*, 2020, 354: 104143.
- [45] ZHANG X, MEN K, ZHANG Y, et al. Local and systemic delivery of mRNA encoding survivin-T34A by lipoplex for efficient colon cancer gene therapy [J]. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14: 2733-2751.
- [46] ARMBRUSTER N, JASNY E, PETSCH B. Advances in RNA vaccines for preventive indications; a case study of a vaccine against rabies [J]. *Vaccines (Basel)*, 2019, 7 (4): 132.
- [47] BOUSSIF O, LEZOUALC'H F, ZANTA M A, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92 (16): 7297-7301.
- [48] BEVAN M J. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay [J]. *J Exp Med*, 1976, 143 (5): 1283-1288.
- [49] CHEN N, XIA P, LI S, et al. RNA sensors of the innate immune system and their detection of pathogens [J]. *IUBMB Life*, 2017, 69 (5): 297-304.
- [50] CHAHAL J S, KHAN O F, COOPER C L, et al. Dendrimer-RNA nanoparticles generate protective immunity against lethal Ebola, H1N1 influenza, and *Toxoplasma gondii* challenges with a single dose [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113 (29): E4133-E4142.
- [51] HAJAM I A, SENEVIRATHNE A, HEWAWADUGE C, et al. Intranasally administered protein coated chitosan nanoparticles encapsulating influenza H9N2 HA2 and M2e mRNA molecules elicit protective immunity against avian influenza viruses in chickens [J]. *Veterinary Research*, 2020, 51 (1): 37.
- [52] FELDMAN R A, FUHR R, SMOLENOV I, et al. mRNA vaccines against H10N8 and H7N9 influenza viruses of pandemic potential are immunogenic and well tolerated in healthy adults in phase 1 randomized clinical trials [J]. *Vaccine*, 2019, 37 (25): 3326-3334.
- [53] STITZ L, VOGEL A, SCHNEE M, et al. A thermostable messenger RNA based vaccine against rabies [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2017, 11 (12): e0006108.
- [54] SAXENA S, SONWANE A A, DAHIYA S S, et al. Induction of immune responses and protection in mice against rabies using a self-replicating RNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein [J]. *Vet Microbiol*, 2009, 136 (1/2): 36-44.
- [55] SCHNEE M, VOGEL A B, VOSS D, et al. An mRNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein induces protection against lethal infection in mice and correlates of protection in adult and newborn pigs [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2016, 10 (6): e0004746.
- [56] LI J, LIU Q, LIU J, et al. An mRNA-based rabies vaccine induces strong protective immune responses in mice and dogs [J]. *Virology Journal*, 2022, 19 (1): 184.
- [57] PULIDO M R, SOBRINO F, BORREGO B, et al. RNA immunization can protect mice against foot-and-mouth disease virus [J]. *Antiviral Res*, 2010, 85 (3): 556-558.
- [58] HUANG Y T, LIAO J T, YEN L C, et al. Japanese encephalitis virus replicon-based vaccine expressing enterovirus-71 epitope confers dual protection from lethal challenges [J]. *J Biomed Sci*, 2015, 22 (1): 74.
- [59] CHEN T, ZHU S, WEI N, et al. Protective immune responses induced by an mRNA-LNP vaccine encoding prM-E proteins against Japanese encephalitis virus infection [J]. *Viruses*, 2022, 14 (6): 1121.
- [60] CHANG Y H, LIN M W, CHIEN M C, et al. Polyplex nanomicelle delivery of self-amplifying RNA vaccine [J]. *J Control Release*, 2021, 338: 694-704.
- [61] LUO F, ZHENG L, HU Y, et al. Induction of protective immunity against *Toxoplasma gondii* in mice by nucleoside triphosphate hydrolyase-II (NTPase-II) self-amplifying RNA vaccine encapsulated in lipid nanoparticle (LNP) [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 605.
- [62] ZHANG Y, LI D, SHEN Y, et al. Immunization with a novel mRNA vaccine, TGGT1_216200 mRNA-LNP, prolongs survival time in BALB/c mice against acute toxoplasmosis [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1161507.
- [63] VERSTEEG L, ALMUTAIRI M M, HOTEZ P J, et al. Enlisting the mRNA vaccine platform to combat parasitic infections [J]. *Vaccines (Basel)*, 2019, 7 (4): 122.
- [64] BAEZA GARCIA A, SIU E, SUN T, et al. Neutralization of the *Plasmodium*-encoded MIF ortholog confers protective immunity against malaria infection [J]. *Nat Commun*, 2018, 9 (1): 2714.