

抗动脉粥样硬化核酸疫苗安全性的初步研究^{*}

叶家辉 吴洁 茅丹 顾凯 曹荣月 刘景晶

(中国药科大学生命科学与技术学院 江苏 南京 210009)

摘要 目的: 研究抗动脉粥样硬化核酸疫苗的安全性。方法: 观察该质粒在小鼠组织中的分布和急性毒性, 并在正常给药的情况下对新西兰大白兔进行 6 个月毒性试验。采用肌肉注射 20 μ g/只和 100 μ g/只, 用 PCR 法检测外源基因在小鼠组织的分布和存留时间; 同样采用肌肉注射, 对最高剂量达到 50mg/kg 体重的小鼠进行急性毒性试验。结果: 实验证明该核酸疫苗在注射部位可存留时间为 8 周, 其他组织如心、肝、脾、肺、肾、脑和生殖器官也有低水平分布, 急毒试验显示, 在剂量达到有效剂量的 60 倍的情况下, 无可观察到的毒性反应发生, 小鼠血液学和生化指标亦无异常; 新西兰大白兔毒性观察, 体内生化指标以及解剖学研究结果表明, 该药无可观察到的毒性反应发生。结论: 该核酸疫苗无可观察到的明显毒性反应, 安全性良好。

关键词: 核酸疫苗; 动脉粥样硬化; 安全性评价; 急性毒性

Safety evaluation of the DNA vaccine against atherosclerosis in mice and rabbits

YE Jia-hui, WU Jie, GU Kai, et al

Minigene Lab, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Correspondence to: Liu Jing-jing, Minigene Lab, China Pharmaceutical University, No. 24 Tongjiaxiang Road, Nanjing 210009, China

ABSTRACT Objective: To evaluate the safety of the DNA vaccine against the atherosclerosis. **Methods:** 80 ICR mice were divided into low dosage group (n=30, DNA vaccine 20 μ g each), high dosage group (n=30, DNA vaccine 100 μ g each), and control group (n=20, normal saline); 15 New Zealand white rabbits were randomly divided into three groups: normal saline control group, DNA plasmid group and DNA vaccine group, equally. The vaccine's tissue distribution and acute toxicity in mice were investigated, and its toxicity on New Zealand white rabbit was also evaluated in our studies. Plasmid DNA was detected by PCR in doses of 20 μ g and 100 μ g IM. Its dose was up to 1000 μ g in the acute toxicity. The toxicity on the New Zealand white rabbits was observed in the normal dose. **Results:** The muscle tissue distribution was kept for eight weeks, which was longer than other tissues such as liver, spleen, lung, kidney and brain. The acute toxicity showed that when the maximum dose was 60 times as much as the normal dose, there was no toxicity influence on the hematology and biochemical indicators of the mice and the rabbits. **Conclusion:** In our studies it is suggested that the DNA vaccine is safe for the atherosclerosis treatment.

Key words: DNA vaccine; Atherosclerosis; Safety evaluation; Acute toxicity

把编码免疫原或与免疫原相关的外源基因克隆到真核质粒表达载体上, 然后将重组的质粒 DNA 直接注射到动物体内, 使外源基因在动物体内表达, 产生的抗原激活机体的免疫系统, 引发免疫反应^[1], 本实验室构建的核酸疫苗免疫机体后能激发机体产生抗 CETPC 抗体, 该抗体与内源 CETP 结合后抑制其活性, 调节体内胆固醇的分布与代谢, 减少动脉粥样斑块的形成; 抗动脉粥样硬化核酸疫苗在药效学研究中取得不错的结果, 给药组与对照组相比病斑面积有显著性降低, 结果显示该核酸疫苗的基因免疫可明显抑制兔主动脉内壁上脂质斑块的形成, 起到抗动脉粥样硬化作用。为评价该疫苗的安全性, 实验主要进行了核酸疫苗在小鼠组织中的分布及存留时间, 以及急性毒性和新西兰大白兔正常给药情况下的毒性观察和组织切片研究, 为该疫苗进入临床试验提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级 ICR 小鼠, 15~18g, 雌雄各半, 由扬州大学比较医学实验动物中心提供。许可证号: SCXK(苏)2002-0009。

新西兰大白兔, 雌性, 平均体重约为 1.5kg, 购自江苏省农科院种兔场。

1.2 实验仪器

PCR 扩增仪(美国), 高速冷冻离心机(Kendro), 核酸检测仪(南京大学), 752 紫外分光光度计(上海第三分析仪器厂), 恒温振荡器(国华企业), Beckman LX-20 全自动生化分析仪(美国), 雅培 CD1400c11-Dyn 血球分析仪(美国)。

1.3 药物和剂量

本实验室已完成抗动脉粥样硬化核酸疫苗 pCR-X8-HBc-CETP 构建^[3]。该 DNA 疫苗的提取方法是经典的提取质粒方法^[4]并经过纯化, 质检证明其纯度、DNA 蛋白比值、酶切分析等均符合标准, 使用前用生理盐水配成所需浓度, 混合注射。

1.4 改进的基因组 DNA 的提取方法

经典的提取基因组 DNA 方法^[4], 简化步骤, 优化提取方

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.30500458)

作者简介: 叶家辉, (1982-), 男, 江苏南京, 硕士, 主要从事微基因药学的研究。

通讯作者: 刘景晶, Tel: 025-83271369 江苏省南京市童家巷 24 号, 中国药科大学生命科学与技术学院酶工程实验室 210009

(收稿日期: 2006-03-20 接受日期: 2006-03-31)

法。如下：取出一样本，每管加入 0.5ml 的分离缓冲液，用灭菌的牙签将组织搅碎，加入 150 μ l SDS 40 μ l 5mg/ml 蛋白酶 K，摇匀，室温每 8h 摇匀一次，共 48h；12000r/min 高速离心 1min，取出 200 μ l 上清，加入等体积的酚：氯仿：异丙醇（25：24：1），反应 15min；4000r/min 离心 3min，取上清 100 μ l，加入 200 μ l 无水乙醇，很快就会有絮状物出现，12000r/min 离心 1min，弃去上清，干燥。过夜，加入蒸馏水，即可进行 PCR 操作。

1.5 PCR 检测

本实验室构建质粒 DNA，该疫苗的抗原表位编码区以胆固醇酯转移蛋白 C-1 末端 26 肽基因为核心，另在质粒载体骨架中插入由多个 C₁G 基元组成的免疫刺激序列，质粒选择特异的序列设计引物。

CMV 正义扩增引物：5-CGTTCACATTCATTATTCAC-3

反义引物：5-GACCTCCACCGTACACGCC-3。

引物由上海博亚合成。

1.6 小鼠组织质粒分布实验^[5]

1.6.1 样本清洁级的 ICR 小鼠，80 只，雌雄各半，18~22g，低剂量 30 只，给予 DNA 疫苗 20 μ g/只；高剂量组 30 只，给予 100 μ g/只；和对照组 20 只，给予生理盐水。每组均于小鼠右后肢胫前肌注射各组均为 0.1ml。低剂量组于接种后 1, 2, 4 和 8 周，高剂量组于接种后 2, 4, 8 和 12 周，两组分别各处死 5, 5, 10 和 10 只动物，对照组于上述时间点各处死 4 只。全部动物摘取心、肺、肝、脾、肾、生殖器官、脑、注射部位肌肉，样本置于一 80 $^{\circ}$ C 保存待测。

1.6.2 电泳分析 PCR 检测进行 PCR 扩增，反应液组成为：. dNTPs 0.2mmol/L，引物 0.1 μ mol/L，MgCl₂ 2.0mmol/L，聚合酶 2.5U。PCR 扩增条件为：94 $^{\circ}$ C，10min，1 个循环；94 $^{\circ}$ C，60s，58 $^{\circ}$ C，60s，72 $^{\circ}$ C，90s，30 个循环；72 $^{\circ}$ C，10min，1 个循环。每次 PCR 反应均设阴性对照（以对照组小鼠肝脏 DNA100ng 为模板）和阳性对照（以纯质粒 10ng 为模板），取 15 μ l PCR 产物进行电泳分析。

1.7 安全性初步研究

1.7.1 急性毒性实验^[6] 在急毒试验中，小鼠按被分为 4 组，每组 20 只，雌雄各半，这些动物均采用肌肉注射，剂量分别为 0, 2000, 10000, 50000 μ g/kg，检测 14 天，检查死亡，观察各种毒性反应症状以及记录体重。试验结束，我们进行尸检。试验观察：给受试药物后观察 2 周，对每只动物仔细观察和详细记录各种毒性反应出现和消失的时间。从动物体重，血管指征，眼睑指征，呼吸指征，运动指征，皮肤（包括毛色），胃肠指征，肌张力，死亡时间，死亡症状等方面对动物进行观察。在试验结束时，每组取动物十只，雌雄各半，取血，进行血液学和体内生化指标的测定。

1.7.2 正常给药情况下的新西兰大白兔的毒性试验 选用新西兰大白兔，随机分成 3 组，每组 5 只，分别为生理盐水对照组，质粒载体对照组和核酸疫苗试验组。核酸疫苗或对照质粒以灭菌生理盐水配成 0.5 μ g/ml，剂量 250 μ g/只。分别于第 1, 3, 7, 11, 16 和 22 周各进行一次免疫，每次免疫时预免疫处理、接种方法及剂量均相同。28 周后将处死的新西兰兔肾、脾、肺和肝取出，经 10% 甲醛溶液固定，常规取材，脱水，石蜡包埋，制片（4 μ m 厚），苏木精和曙红染色，在光学显微镜下阅片，观察各组织病理学改变情况。体重每周称量一次，准确记

录，试验结束所有动物取血进行体内的血液生化指标测定。

2 结果

2.1 抗动脉粥样硬化核酸疫苗在小鼠组织中的分布和存留时间

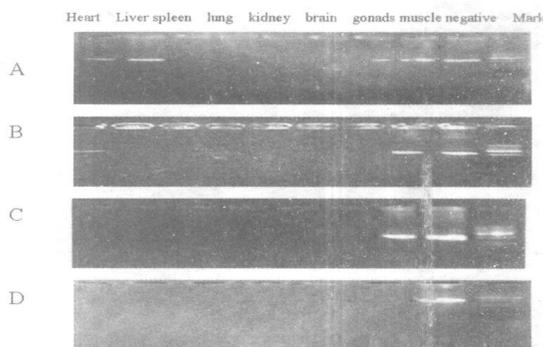
所有阴性对照小鼠组织均未检出特异性扩增产物；注射疫苗 1 周后，质粒在所有小鼠注射部位肌肉均可检测到，其他组织也有部分检测到。4 周后，质粒在低剂量组部分小鼠注射部位肌肉仍可检测到，而其他组织均检测不到，8 周后注射部位肌肉组织检测不到外源基因。高剂量组小鼠质粒分布情况与低剂量组相似，但注射部位肌肉组织 8 周后仍可检测到质粒，只是检出率明显降低，反应减弱，12 周后注射部位肌肉组织检测不到外源基因（表 1、2 图 1）。

Tab 1. The PCR analysis of the distrabution of DNA plasmid in mice in low dosal. (The number of the positive / the number of the sum)

Time (weeks)	Heart	Liver	Spleen	Lungs	Kidney	Brain	Gonads	Muscle
1	2/5	2/5	1/5	2/5	2/5	1/5	2/5	5/5
2	2/5	2/5	1/5	2/5	1/5	0/5	1/5	5/5
4	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	2/10
8	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

Tab 2. The PCR analysis of the distrabution of DNA plasmid in mice in high dosal. (The number of the positive / the number of the sum)

Time (weeks)	Heart	Liver	Spleen	Lungs	Kidney	Brain	Gonads	Muscle
2w	4/5	3/5	2/5	3/5	4/5	2/5	3/5	5/5
4w	2/5	1/5	2/5	2/5	1/5	2/5	1/5	5/5
8w	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	2/10
12W	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10



A. 20 μ g/ animal the distrabution of DNA plasmid in mice after two weeks;
 B. 100 μ g/ animal the distrabution of DNA plasmid in mice after four weeks;
 C. 100 μ g/ animal the distrabution of DNA plasmid in mice after eight weeks;
 D. 100 μ g/ animal the distrabution of DNA plasmid in mice after twelve weeks;

Fig 1. The PCR analysis of the distrabution of DNA plasmid in mice.

2.2 急毒试验结果

2.2.1 急毒试验的观察结果 在实验期间无动物死亡，也没有观察到明显的毒性反应。小鼠雌雄两组在最大剂量组出现过一次性短暂的体重减轻，体重减轻的动物也没有剂量依赖性。在试验过程中出现竖毛，活动迟缓，运动无力，但无明显的组间差别。在尸检中，在生理盐水组发现 1 只动物肺部肿

胀, 雄性(2000 μ g/kg)组, 一只动物右侧肺下部水肿, 其他动物没有发现明显的毒性反应。我们根据以上的情况可以得出以下结论: 该药在达到理论有效剂量 60 倍的情况下, 无明显的毒性反应。

2.2.2 血液学检查 给药 14 天, 处死前取血测血液学指标, 雄性高剂量组白细胞明显高于对照组($P < 0.05$), 但没有明显的剂量依赖性, 其他血液学指标和对照组相比无显著性差异

($P > 0.05$)。

2.2.3 体内生化指标检查 给药 14 天后, 处死前取血进行血液生化指标的检查, 雄性高剂量组(50000 μ g/kg)的丙氨酸氨基转移酶(ASL)明显高于对照组和低剂量组($P < 0.05$), 但没有明显的剂量反应关系; 高剂量组其他生化指标与对照组相比无显著性差异($P > 0.05$); 低剂量组所有指标与对照组无显著性差异($P > 0.05$), 见表 3。

Tab 3. The biochemistry index of ICR mice injected with DNA vaccine

Item	Male(n=5)				Female(n=5)			
	α^t g/kg	2000 μ g/kg	10000 μ g/kg	50000 μ g/kg	α^t g/kg	2000 μ g/kg	10000 μ g/kg	50000 μ g/kg
AST(U/L)	100 \pm 38	96 \pm 28	107 \pm 35	127 \pm 3*	87 \pm 24	87 \pm 8	95 \pm 56	94 \pm 57
ALT(U/L)	36 \pm 5	41 \pm 7	34 \pm 15	37 \pm 4	40 \pm 8	41 \pm 9	43 \pm 6	35 \pm 7
ALP(U/L)	144 \pm 6	163 \pm 4	154 \pm 13	167 \pm 25	145 \pm 43	157 \pm 34	145 \pm 34	166 \pm 32
BUN(mmol/L)	7.68 \pm 1.5	8.52 \pm 1.2	9.11 \pm 1.5	8.23 \pm 1.3	8.12 \pm 1.4	9.97 \pm 0.5	8.12 \pm 1.4	9.41 \pm 1.5
Crea(μ mol/L)	24.9 \pm 3.2	23.1 \pm 2.4	18.4 \pm 3.1	17.4 \pm 1.2	22.8 \pm 2.4	27.1 \pm 1.4	26.1 \pm 0.4	23.1 \pm 0.6
TP(g/L)	42.1 \pm 2.1	40.5 \pm 1.6	41.3 \pm 1.6	41.2 \pm 1.3	40.5 \pm 1.8	41.4 \pm 1.9	42.1 \pm 0.6	40.1 \pm 0.7
Alb(g/L)	14.1 \pm 0.1	15.3 \pm 0.6	14.2 \pm 0.8	16.1 \pm 1.4	15.1 \pm 1.6	14.2 \pm 0.1	15.2 \pm 0.5	17.2 \pm 0.1
Glu(mmol/L)	5.43 \pm 1.7	6.82 \pm 1.5	6.73 \pm 1.3	5.24 \pm 1.7	6.21 \pm 1.5	6.64 \pm 1.6	6.74 \pm 1.9	6.85 \pm 1.1
T-BIL(μ mol/L)	9.8 \pm 1.3	9.7 \pm 1.9	8.2 \pm 0.6	9.7 \pm 0.9	10.1 \pm 1.0	8.2 \pm 0.9	9.9 \pm 1.7	9.9 \pm 1.5
T-CHO(mmol/L)	1.73 \pm 2.5	1.85 \pm 2.1	1.71 \pm 1.9	1.81 \pm 0.9	1.81 \pm 0.1	1.91 \pm 0.1	1.81 \pm 0.6	1.61 \pm 0.7

Compare with α^t g/kg, * $P < 0.05$

2.4 新西兰大白兔毒性记录

2.4.1 实验动物体征的观察在兔药理学实验中, 各组动物之间的体重变化无显著性差异, 每组动物中都出现了程度不同的体癣和体重偏轻等体征变化。体癣的产生可能与饲养环境和个体差异有关, 因为在相同的饲养环境下, 也有个别未免疫

的动物发生了较严重的体癣。但这也不能完全排除体癣是由诱发的免疫反应所导致的可能性。

2.4.2 正常给药六个月后, 处死取血。进行血液生化实验, 结果显示对照组和给药组无显著差异($P > 0.05$), 且无剂量依赖型, 结果如表 4

Tab 4. The biochemistry index of the New Zealand white rabbits injected with DNA vaccine.

Item	Saline Control(n=5)	Empty plasmid/ i. m(n=5)	DNA vaccine/ i. m(n=5)
AST(U/L)	56 \pm 8	66 \pm 28	57 \pm 35
ALT(U/L)	34 \pm 5	31 \pm 7	35 \pm 7
ALP(U/L)	85 \pm 6	93 \pm 4	84 \pm 13
BUN(mmol/L)	4.68 \pm 1.5	4.52 \pm 1.2	4.11 \pm 1.5
Crea(μ mol/L)	49.9 \pm 3.2	47.1 \pm 2.4	48.4 \pm 3.1
TP(g/L)	56.1 \pm 2.1	50.3 \pm 1.6	55.7 \pm 1.6
Alb(g/L)	14.5 \pm 0.1	16.3 \pm 0.6	15.1 \pm 0.8
Glu(mmol/L)	9.43 \pm 1.7	9.82 \pm 1.5	8.73 \pm 1.3
T-BIL(μ mol/L)	4.2 \pm 1.3	4.7 \pm 1.9	4.2 \pm 0.6
T-CHO(mmol/L)	1.83 \pm 2.5	1.85 \pm 2.1	1.71 \pm 1.9

2.4.3 免疫后兔肝、肾、脾、肺和胸腺的病理学检查 在核酸疫苗免疫组(n=5)中, 肝细胞排列呈索状, 2 例肝细胞为轻度水肿, 其余 3 例肝细胞未见水肿; 肝窦无明显扩张, 肝小叶结构完整, 汇管区无炎症细胞浸润及纤维结缔组织增生。肾脏中肾小球细胞数未增多, 毛细血管管腔无扩张, 肾小管上皮细胞无明显变性坏死, 未接管型。肾间质内无明显充血、水肿及炎症细胞浸润。脾脏中包膜无增厚, 脾小体清晰可见, 脾窦无明显扩张, 脾小梁未见增粗。肺脏中肺膜无明显增厚, 肺泡腔内无渗出物, 支气管完好无损。胸腺小体清晰可见, 间质血管无充血及炎症细胞浸润。结果表明基因免疫后兔的肝、肾、脾、肺和胸腺未发生明显病变, 组织形态良好, 说明肌肉注射该核酸疫苗对兔无明显毒副作用。

3 讨论

核酸疫苗可经肌肉注射、静脉注射、滴鼻、粘膜接种、皮下注射及皮下注射等多种途径, 但不同的接种方式不仅引起机体产生不同的免疫效果, 而且影响质粒在体内的分布及宿主细胞对质粒的摄取。最近, Chun^[6]将质粒 DNA 通过粘膜免疫动物, 发现质粒在体内迅速而广泛地分布于全身各组织, 而这种传播机制似乎是通过血液进行的, 因为在血浆中也检测到质粒 DNA 的存在。但免疫 8 周后, 除接种部位外, 其它组织均未检测到质粒 DNA。这些结果也与本研究的结果一致, 可见核酸疫苗在接种的后期主要分布于接种部位, 如肌肉, 粘膜等组织^[7,8]。

(下转第 14 页)

相互之间的攻击性增强。有报道, 磁场照射可影响动物的“下丘脑—垂体—肾上腺皮质”轴(生物体面临紧张或应激时所涉及的调节通路), 并改变动物血液中的皮质酮含量^[9]。“下丘脑—垂体—肾上腺皮质”轴和皮质酮含量均与动物的应激、紧张相关, 并可影响动物的活动性和学习记忆。本实验中, 长期 65 高斯/50Hz 磁场处理损伤 Y- 迷宫测试中的空间辨别能力, 提高旷场行为的活动性可能与此机理相关。

但是统计结果显示, 同样强度的磁场照射未导致水迷宫空间和非空间记忆的损伤, 可能由于该水迷宫模型需要动物学会躲避溺水的威胁, 且水造成了较强的应激, 从而干扰了磁场对小鼠学习记忆的影响。

在本实验中, 我们发现, 低频磁场对小鼠的行为, 包括某些学习记忆和活动性是有影响的, 并且这种影响是依赖于磁场强度的。

据发现, 小鼠头前部背侧中央处积聚了对磁场敏感的物质, 给小鼠磁场处理后, 其空间记忆会受到影响。

随着科技的迅速发展, 人类使用电器的频率已经越来越高, 使用的时间也越来越长。从而可能给人类带来一些负面影响, 比如移动电话、计算机等电器产生的磁场也许会损伤人类的健康, 并可能造成人类认知障碍, 并对学习记忆产生不良影响。本实验较好的模拟了人类在日常生活中所受到的磁场照射, 因而为我们探讨磁场是否影响人类健康(包括认知功能)这一争论不休的论题提供了一些实验数据。

进一步的工作将探讨低频磁场对小鼠行为的影响的机制, 并寻找小鼠对磁场的敏感期, 以助于我们探讨预防和治疗

磁场对人体的危害作用。

致谢

感谢中国科学院昆明动物研究所灵长类神经生物学实验室孙华英、王秀松博士及张华仙老师提供的帮助。

参考文献

- [1] 席晓莉, 文峻. 极低频脉冲磁场对小鼠学习记忆能力的影响[J]. 第四军医大学学报, 1998, 19(2): 214-215
- [2] 郭红梅, 郭凤彩, 彭燕华, 等. 磁场作用对小鼠学习记忆的影响[J]. 生物磁学, 2004, 4(3): 1-3
- [3] Reed L, Levine L, James K, et al. Magnetic field effects on spatial discrimination and melatonin levels in mice[J]. Physiology & Behavior, 1995, 58(3): 535-537
- [4] Sienkiewicz ZJ, Haylock RG, Bartnum R et al. 50 Hz magnetic field effects on the performance of a spatial learning task by mice[J]. Bioelectromagnetics, 1998, 19(8): 486-93
- [5] Lei YL, Liu TY, Wilson F, Zhou DM, et al. Effects of extremely low-frequency electromagnetic fields on morphine-induced conditioned place preferences in rats[J]. Neuroscience Letters, 2005, 390: 72-75
- [6] Dellu F, Mayo W, Cherkouji J, et al. A two-trial memory task with automated recording: study in young and aged rats[J]. Brain Res., 1992, 588: 132-139
- [7] 孙华英, 刘小粉, 车轶, 等. 出生前工频磁场暴露对新生小鸡学习记忆能力的影响[J]. 生物物理学报, 2005, 21 卷(增刊): 38
- [8] Keck ME, Welt T, Post A, et al. Neuroendocrine and behavioral effects of repetitive transcranial magnetic stimulation in a psychopathological animal model are suggestive of antidepressant-like effects[J]. Neuropsychopharmacology, 2001, 24: 337-49

(图 1-9 请见封 3)

(上接第 10 页)

此外, 在急性毒性试验和对新西兰大白兔的毒性试验, 本研究结果显示, 累积剂量的 60 倍, 未引起明显毒性反应, 动物生存率、解剖检查、体重、血液生化和血液学等指标均无明显异常。个别血液学、血生化指标与对照组有差异, 但未见有明显的剂量反应关系, 且未见与之相对应的病理学改变, 因此认为是偶发现象, 与给药无关。这与国外其他裸 DNA 疫苗的安全性试验结果基本一致^[4,9]。而且对新西兰大白兔给药 6 个月肝、肾、脾等脏器的外观检查及切片检查, 未发现会诱导体内抗原抗体复合物在这些脏器中沉积, 也未发现核酸免疫对这些脏器产生明显的毒副作用, 这为该核酸疫苗的安全使用进一步提供了实验依据。

参考文献

- [1] Alaron JB, Waine GW, McManus DP. DNA Vaccines: technology and application as antiparasite and anti-microbial agents [J]. Adv Parasitol, 1999, 42(4): 343-410
- [2] 刘景晶, 茅丹, 朱政, 吴洁, 曹荣月, 宗莉. 抗动脉粥样硬化核酸疫苗及制备方法[P]. 中国专利. CN1562349. 2005-01-12
- [3] 萨姆布鲁克 D. W. 拉塞尔著, 黄培堂等译. 分子克隆实验指南

[M]. 第三版. 北京: 科学技术出版社, 1999: 32-36

- [4] Kyung Koo, Kang Seul, Min Choi, et al. Safety Evaluation of GX-12, a New HIV Therapeutic Vaccine: Investigation of Integration into the Host Genome and Expression in the Reproductive Organs[J]. Intervirology, 2003, 46: 270-276
- [5] 周立国. 药物毒理学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2003: 145-147
- [6] Chun S, Daheshia M, Lee S, et al. Distribution fate and mechanism of immune modulation following mucosal delivery of plasmid DNA encoding IL-10[J]. J Immunol, 1999, 165(5): 2393-2402
- [7] Choi SM, Lee DS, et al. Safety evaluation of GX-12: A new DNA vaccine for HIV infection in rodents[J]. Drug Chem Toxicol., 2003, 26(4): 271-284
- [8] Johnson LE, Frye TP, et al. Safety and immunological efficacy of a prostate cancer plasmid DNA vaccine encoding prostatic acid phosphatase (PAP) [J]. Vaccine, 2005, 8: 19-29
- [9] Coelho-Castelo A, Trombone A, Rosada R, et al. Tissue distribution of a plasmid DNA encoding Hsp65 gene is dependent on the dose administered through intramuscular delivery[J]. Genet Vaccines Ther, 2006, 3(4): 4-11