

以抗原表位为基础的基因免疫

Epitope-based Gene Immunization

徐薇¹ 熊思东²

(上海基因免疫与疫苗研究中心, 复旦大学医学院, 博士生¹; 教授² 上海 200032)

基因免疫 (gene immunization) 是指通过将目的基因克隆于真核表达载体后直接注入机体, 表达相应抗原, 诱生免疫应答。1990 年, Wolff 等在研究 DNA 的化学损伤及修复时偶然发现: 肌肉注射含有编码虫荧光素酶 (luciferase) 报告基因的裸露质粒 DNA 时, 在注射局部有该报告基因的表达及酶活性表现。此后的研究发现表达的蛋白可在机体内诱生特异性的体液免疫应答。1993 年, Ulmer 等半流感病毒 NP 表达质粒注射入小鼠骨骼肌, 不仅检测到特异性 IgG 抗体, 而且免疫小鼠的脾细胞在体外可特异杀伤 NP 致敏的靶细胞, 证实 DNA 免疫同时可诱生特异性的 CD8⁺ 杀伤性 T 淋巴细胞 (Cytotoxic T Lymphocytes, CTL) 应答。与常规蛋白质疫苗免疫相比较, 基因免疫具有易制备、操作简便, 并可诱导体液免疫和细胞免疫应答的优势, 因此已被广泛应用于抗病毒、细菌、寄生虫、肿瘤及自身抗原等的免疫应答研究。由于基因免疫系将抗原编码质粒 DNA 直接导入机体组织, 由机体的体细胞完成抗原编码基因的转录、翻译、折叠装配和翻译后加工, 从而“天然”地表达该抗原蛋白, 因此, 基因免疫可模拟天然病原体的感染过程,

一、问题提出

最初的基因免疫承袭了蛋白免疫的格局, 即以全长蛋白或其大片段编码基因为目的基因, 置于合适启动子之下, 构建表达载体。随着对抗原分子的一级结构和空间构象的研究的深入, 研究者逐渐认识到全蛋白基因中包含有多种不同抗原表位、调控序列、无关序列和免疫抑制序列。为减少不同免疫优势抗原表位的互相干扰、无关和抑制序列的负作用以及便于对候选基因进行改造, 人们将视线转至抗原中诱生特异性免疫应答的最基本的结构和功能单位——抗原表位 (epitope)。选择特定的 B、T、T_H 细胞表位, 构建于合适的载体中, 再辅以必需的侧翼序列或免疫调控序列, 诱生针对所选表位的特异性免疫应答。以抗原表位为基础的基因免疫

(Epitope-based gene immunization, EBGI), 其最大优势在于通过选择最佳和最具免疫保护潜力的表位以诱生特异性免疫应答, 尽量减少无关、干扰和抑制序列可能产生的负作用。此外, 由于表位基因的构建易于改造和操作, 对于如 HIV、流感病毒等易发生抗原漂移和变异的病原体则可通过随时监视和及时改构来实现对变异毒株传播的控制。EBGI 集合了表位免疫原的优势和基因免疫的优势, 如: 质粒 DNA 的无毒性及可在细胞内持续表达一段时间; 体内表达使表位多肽可能获得天然构象; 表位的联合、修饰或改造在质粒水平上可及时、方便地操作; 质粒 DNA 的提取纯化简便而经济; 免疫无需另加佐剂, 操作简单, 因此与传统蛋白疫苗以及多肽疫苗相比, 其应用性和可操作性都大为增强。

二、EBGI 的组建方式

以表位为基础的基因疫苗的设计关键在于目的表位的筛选及其在基因疫苗中的组建方式。随表位基因疫苗的发展, 候选表位已由过去的单一表位概念扩展为多数目、多种类表位。这些表位在载体中的组建方式有以下 4 种。

1. 单一表位 这是以表位为基础的基因免疫的最基本组建方式。Ciernik 等首次构建了单一 CTL 表位基因疫苗, 将来自突变 p53 的单一 CTL 表位 p₁₂₈₋₁₄₅ 以及 HIV gp120 的 CTL 表位 p18 III B 分别构建于真核表达载体 pRc/CMV 中, 以基因枪于耳后和皮下单次免疫 BALB/c 小鼠, 结果分别诱生了突变 p53 和 p18 III B 特异性 CTL 应答, 同时发现: 以突变 p53 的单一 CTL 表位 p₁₂₈₋₁₄₅ 进行基因免疫所诱生的 CTL 具有与以突变 p53 全蛋白基因免疫诱生的 CTL 相似的杀伤活性。这表明合适的单一表位可取代全蛋白, 具有诱生特异性免疫应答的潜能。

2. 同源多表位串联 在单一表位构建基因疫苗的基础上, 人们尝试了将多种表位串联, 期望以增大量和多种类的抗原多肽诱生更为有效的免疫应答。Ripalti 等^[5] 选择来自 HCMV 包膜的 150KDa 基

质磷蛋白中的两个 B 细胞表位 ppUL32₅₉₅₋₆₁₄ 和 ppUL32₁₀₂₄₋₁₀₄₈, 其中前者可与 100% HCMV 阳性血清 IgM 反应; 后者则与 80% IgM 反应。采用原核表达载体 pROS, 将单独克隆 ppUL32₅₉₅₋₆₁₄, 单独克隆 ppUL32₁₀₂₄₋₁₀₄₈, 连续克隆 2 个、3 个 ppUL32₁₀₂₄₋₁₀₄₈ 表位以及同时克隆两种表位的质粒分别命名为 pMB28、pMB30、pMB31、pMB32 和 pMB33, 以质粒转染 E. coli, 首先以 western Blot 证实质粒在菌体内确有表达, 而后检测裂解蛋白产物与 HCMV 阳性血清 IgG 或 IgM 的反应性, 结果发现: 与 IgG 的反应中, 以同时克隆两种表位的 pMB33 反应最强, 克隆 ppUL32₅₉₅₋₆₁₄ 表位的 pMB28 次之, 连续克隆 1、2、3 个 ppUL32₁₀₂₄₋₁₀₄₈ 表位的 pMB30、pMB31、pMB32 反应最弱, 且强度无差别; 而在对 IgM 的反应性中, 反应强度依次为 pMB32 > pMB30 > pMB31。该实验提示: 克隆于原核表达载体中的 B 表位可良好表达, 且可被抗天然蛋白的抗体识别; 表位之间有反应性的差别; 同表位连续串联的优势不明显, 但其加长和复杂结构有利于与 IgM 之类多价抗体的结合稳定性。

3. 异源多表位串联 理想的疫苗应具备多能性, 即可同时防治若干种不同的病原体, 这使研究者产生了在同一载体中组合异源多表位的思想。Thomson 等将 10 种不同病毒、细菌、蛋白的 10 个 CTL 表位 (分别为 H-2K^d、I^d、K^d、D^b、K^b 限制性) 和 1 个 B 细胞表位连续地串联在一起, 之间不含连接子, 构建了 CTL 表位的基因疫苗, 肌注免疫 C57BL/6 和 BALB/c, 结果在两种小鼠中分别诱生了针对这 10 个 CTL 表位的 MHC 限制的特异性 CTL 应答, 这些 CTL 应答可以成功地保护 C57BL/6 和 BALB/c 免受 E. G7 肿瘤、重组牛痘病毒和活流感病毒等的侵袭, 并且可持续 1 年的记忆性。An 等以 5 种病毒和结核分枝杆菌 (MT) 的 6 种表位, 包括 B、T_H 和 CTL 表位无间隔序列地串联, 构建了 1 个多能表位基因疫苗, 结果在 BALB/c 中诱生了 Mengo 病毒 B 表位特异的中和抗体以及针对 MTT_H 表位的特异性增值反应; 在 BALB/c 和 C57BL/6 中诱生了呼吸道合胞病毒 (RSV) 和淋巴细胞脉络丛脑炎病毒 (LCMV) CTL 表位特异的 CTL 应答, 其中 Mengo 病毒 B 表位特异的中和抗体以及 LCMV CTL 表位特异的 CTL 应答具有免疫保护作用。Mateo 等^[2]则将来自黑色素瘤 Mart-1、MAGE3、酪氨酸酶、gp100 和 N-乙酰葡萄糖胺转移酶 V 基因内含子 5 种抗原的 10 个 CTL 表位连续串联, 克隆至重组痘病毒, 构建了 1 个 HLA-A2 多表位基因疫苗 rVV.mel.pt, 以其免疫 HHD 转基因小鼠, 结果诱生了针对 10 种多肽致敏靶细胞的特异性 CTL, 且这些 CTL 可识别和杀伤人黑色素瘤细胞。此外, Woodberry 等^[3]将 7 个来自 HIV、Nef、Pol、Gag、gp120 的 CTL 表位串联, 构建痘病毒重组体, 基因免疫 HHD 转基因小鼠, 诱生了其中 4 种表位特异性

CTL 应答。以上研究预示了异源多表位基因疫苗 (polytope gene vaccine) 的可操作性和有效性, 其优势在于通过诱生足够多种类的表位特异性 CTL 应答, 可最大程度地抵御多种病毒变异株或肿瘤变异抗原对机体的侵袭, 达到更有意义的免疫预防和保护作用。

4. 表位插入“基因疫苗佐剂”之中 将表位插入某些已知的免疫原性较强的蛋白或分子中, 利用后者协同辅助转录后处理以提高表达水平, 或通过后者的强免疫原性可激活免疫系统, 提高免疫应答。Borgne 等^[4]利用 HBV S 抗原作为“载体分子”, 将 HIV-1 Lai V3 区 (含 B、T 细胞表位) 插入 S 抗原的 PreS 区域中, 以构建的编码 V3/HBsAg 融合蛋白的质粒 DNA 免疫 BALB/c 小鼠和恒河猴, 结果在诱生较强的针对 V3 和 HBsAg 的特异性抗体的同时, 还诱生了强烈的 V3 和 HBsAg 特异性 CTL 应答。这表明克隆于 HBV 中等蛋白中的 V3 表位可正确地进行 I 类抗原递呈。同时还发现: 免疫后脾细胞经 HBV S 12 肽特异刺激后, 不仅可裂解 S 12 肽激活的靶细胞, 同时可有效裂解 V3 10 肽激活的靶细胞。这一旁路激活效应可能来自 S 激活 T 细胞分泌的细胞因子对 V3 特异性 CTLp 的非特异性克隆扩增作用。这表明 HBV S 作为“载体分子”的又一辅助作用。Desmezieres 等^[5]将截短的以及嵌合的狂犬病毒糖蛋白 GP 基因作为携带外源 B/T 表位的基因载体, 其中前者 (GPV III) 含 I 型巴氏狂犬病毒 (PV) GP C 端包括抗原位点 III、跨膜区和胞浆区的基因片段 253-503; 而后者 (GEBL1-PV) 由 GPV III 和 5 型欧洲蝙蝠狂犬病毒 (EBL) GP N 端抗原位点 II 基因片段 1-250 组成, 抗原位点 II 和 III 均与诱生中和性抗体相关。在两种载体中插入来自 1 型脊髓灰质炎病毒衣壳蛋白 VP1 的 C3 中和 B 细胞表位和来自 LCMV 核心蛋白 NP 的 H-2^d 限制性 CTL 表位, 以重组质粒肌注免疫 BALB/c 小鼠, 结果截短的 GPV III 重组体的效果不佳, 但克隆于嵌合的 GEBL1-PV 中的 B/CTL 表位有效诱生了针对载体狂犬病毒及外源脊髓灰质炎病毒的特异性中和抗体, 且可保护 70% 小鼠免受 LCMV 攻击, 并于 21 天后彻底清除病毒。Yasutomi 等以重组牛分枝杆菌作为载体分子携带 HIV_{gag} 表位也获得了理想的结果。

三、EBGI 诱生的特异性免疫应答

EBGI 通过选择和组合不同的 B、T 表位, 已在若干种动物模型中成功地诱生了表位特异性的体液免疫应答、细胞免疫应答和 T 辅助细胞免疫应答。

1. B 表位基因免疫诱生的体液免疫应答 Casares 等以免疫球蛋白 Ig 为基因载体, 在 VH 的

CDR2 和 CDR3 中分别插入来自流感病毒 A/PR/8/34 株血凝素 HA 的 B 细胞表位 HA₁₅₀₋₁₅₉ 和 T_H 表位 HA₁₁₀₋₁₂₀, 以该质粒 pVH-TB 经肌肉免疫 BALB/c 小鼠, 分别诱生了特异性体液免疫应答和细胞免疫应答, 且可保护小鼠对致死量流感病毒 A/PR/8/34 株的攻击。这表明克隆于 Ig 基因载体中的 B 细胞表位可诱生有效的具免疫保护作用的表位特异性体液免疫应答。Gerlioni 等^[6]将含疟原虫孢子蛋白内 B 细胞表位 (NANP) 3 编码基因的 Ig 重链基因经脾免疫小鼠, 于免疫后 4 天左右在小鼠体内检出 NANP, 两周左右达高峰; 抗 NANP 特异性抗体于免疫后 1 周出现, 随后持续上升, 4 周达高峰; 该特异性抗体可持续达 2 年。初次免疫 10 周后以 (NANP) 3 抗原化抗体蛋白加强免疫, 可诱生强烈的再次应答, 该应答水平强于以重组疟原虫孢子蛋白辅以佐剂免疫小鼠所诱生的抗体应答水平, 该记忆也持续达 2 年。这表明以 B 细胞表位为基础的基因免疫不仅可诱生表位特异性抗体应答, 还可诱生免疫记忆, 是一种有效的免疫系统。

2. CTL 表位基因免疫诱生的细胞免疫应答
Ciemik 等将突变的 P53 128-145 T 细胞表位及 HIV_{gp160} 来源的 T 细胞表位 p18 III B 克隆入载体, 以基因枪免疫 BALB/c 小鼠, 发现这两种 T 细胞表位疫苗都可诱导有效的特异性 CTL 应答。与编码突变 P53 全蛋白基因的基因疫苗相比, 突变 P53 128-145 T 细胞表位基因疫苗诱导了更强的 CTL 应答。并且, 表位疫苗所诱生的 CTL 都可一定程度地保护小鼠免受肿瘤攻击。这表明单一 CTL 表位基因疫苗有较好的诱生特异性 CTL 应答的能力。在对多表位基因疫苗系统的设计中, 大部分研究热点集中于多个 CTL 表位的串联, 其中有以多个来自不同病原体的 CTL 表位为特征的“多能”性多表位基因疫苗, 也有含来自同一病原如 HIV 不同组分的多个 CTL 表位的“多向”性多表位基因疫苗。多表位基因疫苗系统的有效性进一步扩展了 CTL 表位基因疫苗应用于抗感染免疫防治的前景。由于病毒和肿瘤抗原的多样性和高变性, 要求在病毒和肿瘤疫苗的设计上考虑多表位的选用; 同时, CTL 应答的有效诱生又是清除胞内病毒感染、杀伤肿瘤组织、彻底治疗病毒和肿瘤的的必要条件, 因此, 多 CTL 表位基因疫苗系统的建立对抗病毒和抗肿瘤免疫研究有其重大意义。

3. T_H 表位基因免疫诱生的 T 辅助细胞免疫应答
T_H 表位通常不作为主体目的表位, 但其发挥的免疫调控和协同辅助作用对 B、CTL 表位基因免疫的有效性都必不可少。An 等在 5 种病毒和结核分枝杆菌 (MT) 的 B、CTL 表位构建的多能表位的基因疫苗中, 加入来自结核分枝杆菌的多能 T_H 表位 P₃₅₀₋₃₆₉ (I-A^d、I-A^b 限制)、基因免疫 BALB/c 和 C57BL/6

小鼠, 6 周后取脾细胞, 与以 P₃₅₀₋₃₆₉ 多肽致敏并灭活的同种脾细胞孵育, 结果使 BALB/c 脾细胞发生强烈的特异性增殖。这表明多能 T_H 表位 P₃₅₀₋₃₆₉ 在多表位载体环境中, 被 H-2^d 型 T 细胞有效地处理和递呈, 诱生特异性 T 辅助细胞应答。在笔者所在单位以往的研究中, 以免疫球蛋白 Ig 为基因载体, 在其中的 2 个 CDR 区中分别克隆来自 HBV PreS2 的 B 细胞表位 P₁₃₃₋₁₄₅ 和来自破伤风毒素 (TT) 的多能 T_H 表位 TT₈₃₀₋₈₄₄, 进行以表位为基础的基因免疫, 结果单独 B 表位基因疫苗 γ 1-B 在 BALB/c 和 C57BL/6 小鼠中均诱生了持久的、较高水平的 HBV PreS2 特异性抗体, 而 T_H 表位 TT₈₃₀₋₈₄₄ 的联合使在两种小鼠中诱生的抗体反应都得到增强。这表明多能 T_H 表位 TT₈₃₀₋₈₄₄ 在不同 MHC 个体中, 与 B 表位协同作用, 增强了 B 表位的免疫原性, 并在一定程度上超越 MHC 限制, 诱生了更强的 HBV 特异性抗体应答。

四、展望

由于表位是抗原分子中诱生特异性免疫应答的基本的结构和功能单位, 以表位为基础的基因免疫将成为研究表位及其所在抗原免疫原性的良好模型。运用这一模型, 利用单一表位或多表位并存进行基因免疫, 研究单一表位在机体中诱生特异性免疫应答的现象及机制, 探讨多表位同时作用的相互联系与影响, 将使我们对于表位免疫原性的分子基础产生更直接和深入的理解, 有助于进一步阐明免疫应答的基本规律。

以表位为基础的基因免疫不仅有理论上的探讨价值, 更重要的是它可能具有巨大的免疫防治的应用潜能。以表位为基础的基因免疫已在若干种动物体内成功地诱生了针对若干病原体的免疫应答反应, 这些免疫应答反应既包括体液免疫应答, 也包括细胞免疫应答, 其中一些还具有免疫保护作用。这表明, 针对特定抗原表位设计的表位基因疫苗, 可诱生表位特异性免疫应答、提供特定的免疫保护力, 有望成为疾病防治性疫苗设计的又一新热点。

参考文献

- [1] Thomson SA, Sherritt MA, Medveczky J, et al. Delivery of multiple CD8 cytotoxic T cell epitopes by DNA vaccination. *J. Immunol* 1998, 160: 1717
- [2] Mateo L, Gardner J, Chen Q, et al. An HLA-A2 polytope vaccine for melanoma immunotherapy. *J. Immunol* 1999, 163: 4058
- [3] Woodberry T, Gardner J, Mateo L, et al. Immunogenicity of a human HIV polytope vaccine containing multiple HLA-A2 HIV CD8⁺ cytotoxic T-cell epitopes. *J. Virol* 1999, 73: 5320
- [4] Borgne SL, Mancini M, Grand RL, et al. In Vivo induction of specific cytotoxic T lymphocytes in mice and Rhesus Macaques immunized with DNA vector encoding an HIV

我国再植外科的发展、困境及对策

Development and Problems of China's Replanting Surgery and Their Solutions

曹学成¹ 蔡锦方²

(第二军医大学, 博士生¹; 博士生导师²)

(济南军区总医院骨创伤外科¹ 济南 250031)

1960年, 屠开元教授在狗腿上行断肢再植实验研究获得成功, 开创了我国断肢再植外科探索的先例^[1]。1963年1月上海第六人民医院陈中伟医师成功地为一位断臂工人进行了再植术, 轰动了全国^[2]。此后, 断肢再植技术在全国几个中心医院先后都大力开展起来, 使我国的再植技术在世界上长期处于世界领先地位。现在这一技术已在全国的基层医院得以普及, 并在许多医院实现了多项突破^[3]。可以说, 对各种断肢体损伤的病患, 大都有再植成功的报道。然而, 纵观再植外科在我国的发展史, 不得不令人对一些现象进行反思, 这不仅有利于解决长期困扰我们的一些思想问题, 也有利于调整今后的发展方向。

一、再植外科在我国的迅速发展源于我国的社会、经济环境

我国医学领域给人的印象似乎是距西方先进国家相差并不远, 或在某些方面是先进的。许多成果往往冠以世界领先或先进水平的招牌。如果说一些所谓世界领先的医学成果还不能让人信服的话, 那么再植技术在国际上的领先却是众所周知的^[4]。再植技术之所以如此, 是与我国的政治经济环境密切相关的。

首先, 我国国民经济基础薄弱, 尖端仪器设备的购置比较困难; 而再植外科的主要工具只不过是一台显微镜及常规手术器械而已, 因此, 多数医院可以突破经济困难的限制。其次, 我国人口众多, 直接从事生产劳动的人口数量巨大, 劳动保护意识及措施远远落后于发达国家, 所以会产生大量伤病患, 且伤情多种多样、稀奇古怪, 这为再植外科的发

展提供了社会需求的背景。第三, 多年来, 特别是20世纪60年代以来, 我国在思想上一直强调“忘我”精神, 鼓励众多医生积极参加“在脑力劳动领域中最重的体力活动”, 不计个人得失, 从而取得了许多令人惊叹的成果。因此, 再植术成了一项“低投入高社会效益”的技术, 其发展符合社会的需求, 所以就有了较好的发展空间; 促使其处于国际领先地位。

二、再植外科所处的困境

尽管有如上所述的优势, 但是不难发现诸多困境像幽灵一样, 一直存在于再植外科领域, 突出表现在以下几个方面。

1. 发展潜力困境 在再植外科领域, 争论得最为激烈的莫过于再植外科还有没有发展前途的问题。一些医生认为再植外科已经到了“顶峰”, 其理由是, 再植外科发展到今天, 已实现了“十指离断再植”及“四肢离断”再植成功的突破^[5], 从肢体最近端至指尖都有再植成活的报道^[6]; 实现了再植年龄的突破, 在几个月的婴儿至年逾70的老人的身上都取得了再植的成功^[7]; 直径0.2mm的血管吻合也有很高的通畅率^[3]。有些人认为: 人只有四肢十指, 所以不可能取得更多肢(指)再植的成功, 这就是所谓的“顶峰论”。

2. 现实技术困境 再植技术发展至今已基本成形, 已为大多数医院所掌握。但在医疗市场“效益竞争”日趋激烈的情况下, 多数已掌握该项技术的医院却不愿接受断肢(指)病人; 有些有名的医院不愿做或根本不会做再植术, 即使接受了病人, 也只是让低年资医生独立操作, 使病人几乎成了他们练习技术的试验品, 因此形成了实际技术趋于下降、

epitope fused with Hepatitis B surface antigen. *Virology* 1998, 240: 304

[5] Desmezieres E, Jacob Y, Saron MF, et al. Lyssavirus glycoproteins expressing immunologically potent foreign B cell and cytotoxic T lymphocyte epitopes as prototypes for multivalent vaccines. *J. Gene. Virol* 1999, 80: 2343

[6] Gerloni M, Xiong S, Zanetti M, et al. Durable immunity and immunologic memory to a parasite antigen induced by somatic transgene immunization. *Vaccine* 1998, 16: 293

(删去1998年以前的英文文献9篇)

(责任编辑 肖庆山)