

DNA 疫苗与肿瘤免疫

顾琳娜¹, 顾昊²

(1. 浙江省湖州市食品药品检验所, 313000; 2. 首都医科大学附属北京朝阳医院, 100020)

[摘要] 肿瘤 DNA 疫苗是近年来发展起来的新一代疫苗,因其能诱发有效而持久的免疫反应,因此在治疗恶性肿瘤中被广泛研究。DNA 疫苗的抗肿瘤机制包括直接诱导特异抗肿瘤作用和间接增强机体免疫反应。目前已构建出多种肿瘤 DNA 疫苗,如根据胚胎抗原构建的 DNA 疫苗、独特型 DNA 疫苗及根据病毒相关抗原构建的 DAN 疫苗等。基因佐剂可将编码某些细胞因子及 T、B 细胞表面共刺激因子等的基因与目的基因克隆于同一载体或不同载体共同免疫动物,其表达的相应蛋白起到佐剂的作用,可大大增强 T、B 细胞的免疫应答水平。肿瘤 DNA 疫苗对人类肿瘤治疗与预防的有效性和安全性将是未来研究的重点。

[关键词] DNA 疫苗;肿瘤免疫;基因佐剂

[中图分类号] R979.5;R979.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-0781(2008)12-1284-03

一个世纪前,William Coley 首先报道了由细菌毒素引发的机体免疫反应可以诱发肿瘤缩小,从而开启了肿瘤免疫治疗学的研究。1990 年 WOLFF 等^[1]提出了 DNA 疫苗(或基因疫苗)的概念,使 DNA 疫苗在实验及临床应用中都有很大的发展。DNA 疫苗是将编码某种抗原的基因片段克隆到真核表达质粒,再将其导入体内,抗原编码基因能够在宿主体内表达,并刺激其产生体液和细胞免疫应答^[2,3]。

1 DNA 疫苗抗肿瘤的免疫机制

DNA 疫苗抗肿瘤免疫机制可包括直接诱导特异抗肿瘤作用和间接增强机体免疫反应两方面^[4]。直接诱导特异抗肿瘤作用是含编码特定抗肿瘤抗原的 DNA 表达质粒局部注射后,可被局部组织细胞、APC 细胞或其他细胞所摄取。质粒在其中转录并进一步翻译成蛋白质,这些蛋白质被蛋白酶复合体降解成短肽片段后,一部分被运入内质网并与 MHC-I 类分子结合,在细胞膜表面表达,被 CD₈⁺ T 细胞前体细胞识别,同时需要 T 细胞上的 CD28 与抗原提呈细胞上的 B7 相互作用,在 CD₄⁺ T 细胞分泌的淋巴因子刺激下,前体 CD₈⁺ T 细胞被激活成 CTL,以杀伤肿瘤靶细胞。另一部分短肽可以进入溶酶体与 MHC-II 类分子结合,运至细胞表面被 CD₄⁺ T 细胞识别而活化,有效激活 CD₈⁺ 或 CD₄⁺ T 细胞,同时该复合物可提呈给 B 细胞。在 CD₄⁺ T 细胞辅助下,刺激 B 细胞产生中和抗体,诱发体液免疫^[3]。

间接增强机体免疫反应是指基因佐剂的联合应用。即将编码某些细胞因子及 T、B 细胞表面共刺激因子等的基因与目的基因克隆于同一载体或不同载体共同免疫动物,其表达的相应蛋白起到佐剂的作用,以改善抗原的周边微环境,从而增强 T、B 细胞的免疫应答水平。

2 抗肿瘤 DNA 的构建及 DNA 疫苗

组成 DNA 疫苗的两大要素是目的基因和表达载体。因质粒可用大肠埃希菌大量生产,且不会在哺乳动物细胞中复制和

整合,所以 DNA 疫苗选择的主要载体是质粒。常见的质粒有 pSV2、pRSV、pcDNA3.1 和 pCI 等。细菌质粒 DNA 主要包括两个功能区:一个是抗原表达盒区域,另一个是起关键作用的免疫刺激区(ISS)^[5]。这些载体一般都设计有真核基因表达调控序列。简言之,DNA 疫苗的构件就是在细菌质粒上引入一个真核启动子,在启动子的下游插入目的基因,其后接上 PolyA 和转录终止序列。质粒经细菌扩增,再提取和纯化后溶于 0.9% 氯化钠溶液就可直接用于免疫接种。

目前用于构建 DNA 疫苗的外源基因主要是抗原基因、抗体可变区基因、细胞因子基因、共刺激因子基因等。以下介绍几种重要的 DNA 疫苗。

2.1 根据胚胎抗原构建的 DNA 疫苗 癌胚抗原是 1965 年发现的一种肿瘤相关抗原(TAA),具有较强的免疫原性,主要存在于胎儿肠道,结直肠癌、乳腺癌和非小细胞性肺癌中。1994 年 LONRY 等首先构建了癌胚抗原全长基因序列 cDNA 的癌胚抗原多聚核苷酸疫苗。1998 年获得进入 I 期临床试验。

2.2 独特型 DNA 疫苗 所谓独特型 DNA 疫苗即抗体可变区 DNA 疫苗。HAWKINS 等构建了包含免疫球蛋白重链和轻链 V 区片段(single-chain Fv, scFV)的表达质粒,通过 PCR 分别获得 VH 和 VL 基因,将 VH 和 VL 连接起来,克隆至真核表达载体来制备 DNA 疫苗。编码 scFV 的 DNA 疫苗已经用于淋巴瘤的治疗。但诱导的独特型抗体不足以抑制肿瘤的发展,而细胞因子(GM-CSF 和 L-12)质粒、破伤风类毒素片段 C(Fr-C)或化学因子等可加强独特型 DNA 疫苗的免疫效果^[6]。

2.3 根据病毒相关抗原构建的 DAN 疫苗 由病毒引起的肿瘤或与病毒密切相关的肿瘤约占人类肿瘤的 15%,其肿瘤细胞抗原多为该病毒的产物。根据这一特点,构建编码病毒抗原的 DNA 疫苗免疫机体后,其表达的特异性病毒抗原将诱导产生特异性抗体和细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)反应,可以杀死肿瘤细胞,使肿瘤退化。

绝大多数宫颈癌与人乳头瘤状病毒(HPV)有关,因此根据 HPV 不同基因片段设计的 DNA 疫苗已用于治疗宫颈癌^[7]。研

[收稿日期] 2008-01-20 **[修回日期]** 2008-04-17

[作者简介] 顾琳娜(1955-),女,浙江湖州人,副主任药师,主要从事中药鉴定工作。电话:0572-2750808,E-mail: gln8168@sina.com。

究表明,编码人 T 细胞白血病 I 型病毒抗原的 DNA 疫苗免疫小鼠,可诱导产生特异的 CTL 反应,对病毒诱导的人 T 细胞白血病(ATL)发挥抗肿瘤免疫作用^[8]。

3 基因佐剂

由于某些肿瘤及病毒的 T、B 细胞表位抗原性弱,难以诱导有效的 T、B 细胞免疫应答。基因佐剂可将编码某些细胞因子及 T、B 细胞表面共刺激因子等的基因与目的基因克隆于同一载体或不同载体共同免疫动物,其表达的相应蛋白起到佐剂的作用,可大大增强 T、B 细胞的免疫应答水平^[9]。

3.1 细胞因子基因佐剂 细胞因子基因佐剂可把某些细胞因子的基因片段与特异的 DNA 疫苗序列构建到同一载体或不同载体上,一起免疫动物。研究表明:白细胞介素(IL)-12、IL-2、IFN- γ 、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)等细胞因子在增强 CTL、NK 细胞活性和募集 APC 方面有着很重要的作用,是促进 CTL 免疫应答的最佳细胞因子环境。尤其 IL-12 由于能够诱导 CD₄⁺ Th 细胞产生高水平的 IFN- γ ,通常被认为是介导 Th1 免疫应答的首要决定因素。另外 IL-1、IL-18、IL-4、IL-6、IL-15 等均可作为基因佐剂。

汪千里等^[10]用 IL-12 基因疫苗治疗低负荷恶性淋巴瘤,其结果显示 50% 小鼠长期无瘤生存,且可耐受大剂量野生肿瘤的再次攻击。小鼠成瘤时间延迟,总体成活时间长,并且出现肿胀消退和肿瘤体积减小等现象,而对照组全部成瘤死亡^{*}。

GM-CSF 在增强 CTL、NK 细胞活性和募集 APC 方面起着重要的作用,是促进 CTL 免疫应答的最佳细胞因子环境。HONGXUN 等^[11]将携带 GM-CSF 基因的重组质粒(Pngv-hFL + 3L)作为佐剂与 HIV 基因疫苗 p17HIVp 或 VAX-gag 共同免疫小鼠,结果在注射部位及其相应的淋巴结中可集聚大量的树突状细胞(DC),并且比单独应用基因疫苗产生更强烈的细胞免疫应答及脾细胞抗原特异性 IFN- γ 。

3.2 共刺激分子基因佐剂 在细胞免疫应答过程中,T 细胞需要接受双信号共同刺激才能被激活,即 T 细胞表面抗原特异性受体 TCR 识别 APC 表面的 MHCAg 复合物产生第一信号;APC 表面的黏附分子与 T 细胞表面相应配体结合产生诱导 T 细胞激活的协同刺激信号,即第二信号。若缺乏协同刺激分子提供的第二信号,T 细胞将不能被激活,而成为无反应性 T 细胞。将一些重要的协同刺激分子基因与抗原表位基因利用基因重组技术克隆于同一表达载体内实现同时表达,或克隆入不同载体共刺激,可增强 CTL 的免疫效果。B7-CD28 是近年来研究较多的细胞膜分子,在 T 细胞活化过程中,二者结合所产生的信号发挥协同刺激作用,并能参与 CTL 的杀伤效应。

将免疫原性较弱的流感病毒核蛋白(NP)突变株(NPO)与 B7-2 基因重组于同一质粒表达载体作为基因疫苗免疫小鼠,可明显地诱导出较强的针对 NP CTL 表位的特异性 CTL,而仅用 NPO 基因免疫小鼠的 CTL 应答水平却不甚明显^[12]。

3.3 免疫刺激 DNA 序列基因佐剂 免疫刺激 DNA 序列(immucostimular DNA sequence, ISS)为非甲基化的短核苷酸重复序列(即 CpG 序列),是一种强有力的非特异性免疫刺激基因。在 DNA 疫苗载体骨架中导入该基因序列,能快速活化 T、B

细胞,诱导产生 TH1 型细胞因子(IL-1、IL-6、IL-12、IL-18、TNF- α 等)及多价 IgM,增强 MHC II 类分子、CMF、CD40、B7-2、ICAM 表达,还能促进 APC 细胞的增生与成熟。CpG 序列是目前被广泛接受的基因佐剂^[13]。

近来有报道用编码 HIVtat 序列和非甲基化 CpG 序列免疫猴子,可保护其抵抗猴/人免疫缺陷病毒(SHIV)的感染^[14]。针对 tat 的 CTL 的出现是控制感染初期病毒早期复制的关键,而非甲基化 CpG 序列的存在可以提高天然免疫,驱动更多的 T 细胞参加免疫应答。

3.4 其他基因佐剂 除上述基因佐剂外,尚有大量基因佐剂也被广泛研究。包括 MHC 分子基因佐剂;细菌、病毒等病原微生物的成分及其毒素分子的基因佐剂,如热休克蛋白基因、HBV 表面抗原基因等;颗粒酶基因;可溶性淋巴细胞活化基因 3 (lymphocyte activation gene-3, LAG-3);可诱导共刺激分子(inducible costimulatory molecule, ICOS)等。

4 结束语

肿瘤的免疫治疗是除手术治疗、放疗和化疗的第 4 个重要措施。DNA 疫苗作为新的疫苗,大部分是在动物模型中研究和应用,虽然有的已进入 I 或 II 期临床试验,但在人体上的试验和应用还较少。而且,肿瘤 DNA 疫苗在临床试验的结果远比动物试验的效果差,应用于人类肿瘤的治疗还有相当长的距离^[15]。肿瘤 DNA 疫苗对人类肿瘤治疗与预防的有效性和安全性将是未来研究的重点^[16]。

[参考文献]

- [1] WOLFF J A, MALONE R W, WILLIAMS P, *et al.* Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo* [J]. *Science*, 1990, 247 (4949 Ptl): 1465 - 1468.
- [2] YAN K, ZHANG Q, ZHAO B H. Research progress on the function mechanism and the new immunity strategy of DNA vaccine [J]. *Chin J Vete Med*, 2007, 41(7): 39 - 41, 44.
- [3] LUO C. DNA vaccines and cancer immunotherapy [J]. *Int J Pathol Clin*, 2006, 26(4): 333 - 335.
- [4] WEN B. DNA vaccines and cancer immunity [J]. *For Med Sci*, 2003, 26(1): 17 - 19.
- [5] KRIEG A M, YI A K, SCHORR J, *et al.* The role of CpG dinucleotides in innate DNA vaccine [J]. *Trends Microbiol*, 1998, 6 (1): 23 - 27.
- [6] ZHANG Y P, ZHU P. Research on idiotypic antigenic receptor DNA vaccine to treat lymphocytoma [J]. *J Prac Onco*, 2001, 16(2): 76 - 78.
- [7] CHEN J. Cancer of the cervix and HPV vaccine [J]. *Medical Recapitulate*, 2007, 13(7): 512 - 513.
- [8] OHASHI T, HANABUCHI S, KATO H, *et al.* Prevention of adult T-cell leukemia-like lymphoproliferative disease in rats by adoptively transferred T-cell from a donor immunized with human T-cell leukemia virus type 1 Tax-coding DNA vaccine [J]. *J Virol*, 2000, 74(20): 9610 - 9616.
- [9] HUANG A Q, LAI Y D, LI X Y. Construction of carcinoembryonic antigen (CEA) gene vaccine and stable coexpression with an immune adjuvant [J]. *Chin J Can*, 2004, 23(3): 282 - 287.

[10] WANG Q L, WA W M, OU Y X, *et al.* Experimental study of interleukin212 gene vaccines in the treatment of lowload malignant lymphoma (EL4)[J]. *Chin J Hema*, 2001, 22(11): 565-568.

[11] HONGXUN S, VLADIMIR M P, COREY M, *et al.* Regional, but not systemic recruitment/expansion of dendritic cells by a pluronic-formulated Flt3-ligandplasmid with vaccine adjuvant activity [J]. *Vaccine*, 2003, 21(26): 3019-3020.

[12] WASAKI A, STIERNHOLM B J, CHAN A K, *et al.* Enhanced CTL responses mediated by plasmid DNA immunogens encoding costimulatory molecules and cytokines [J]. *J Immunol*, 1997, 158(10): 4591-4601.

[13] SHIN S, FUMIHIKO T, KE-QIN X, *et al.* Adjuvant formulations and delivery systems for DNA vaccines[J]. *Methods*, 2003, 31(2): 243-254.

[14] LIU Q, YANG G B, SHAO Y M. SHIV construction and application in the AIDS vaccine[J]. *Virolog Sinica*, 2006, 21(5): 523-527.

[15] SMICH C L, DUNBAR P R, MIRZA F, *et al.* Recombinant modified vaccinia ankara primes functionally activated CTL specific for a melanoma tumor antigen epitope in melanoma patients with a high risk of disease recurrence[J]. *Int J Cancer*, 2005, 113(2): 259-266.

[16] PRUD' HOMME G J. DNA vaccination against tumors[J]. *J Gene Med*, 2005, 7(1): 3-17.

中医药抗肝纤维化的研究进展

胡芳,程建明,马海勇

(南京中医药大学药学院,210046)

[摘要] 肝纤维化是大多数慢性肝病所共有的病理特征,药物防治肝纤维化是国内外的研究热点。随着肝纤维化形成机制研究的深入,近几年中医药防治肝纤维化研究取得显著成绩。具有防治肝纤维化功能的中药提取物有粉防己碱、甘草酸苷、苦参碱、苦参素、大黄素等;单味中药有丹参、冬虫夏草、黄芪等,中药复方有丹芪和肝冲剂、复方鳖甲软肝片等。虽然中医对肝纤维化的研究仍存在很多不足,但中医中药在治疗肝纤维化方面体现出巨大的优势,近几年中医药治疗肝纤维化的实验和临床研究的成果展示了其广阔的应用前景。

[关键词] 肝纤维化;中医;中药

[中图分类号] R975;R28

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2008)12-1486-03

肝纤维化可归属于中医学“积证”范畴,从病因看,外感六淫、内生七情、饮食劳倦与蛊毒等均可作用于肝,导致慢性肝病,并逐渐形成肝纤维化。肝纤维化是一个“由实转虚、由聚至积、由气入血及络”的动态病变过程。湿热疫毒残留难尽是启动因子和持续因素,正气虚弱是内因和转归,肝血瘀阻是病理基础,并随病程、病性、病情的不同而兼有寒热虚实的表现^[1]。

1 发病机制

有学者结合现代病理学研究指出,肝细胞及窦内皮细胞的变性坏死,引起肝组织微循环障碍而产生血瘀证,同时贮脂细胞及肝细胞增生分泌大量胶原蛋白,形成胶原纤维束,逐渐发展为纤维化,也形成血瘀证。另有学者通过病理研究得出了同样结论,慢性肝病存在严重的微循环障碍,肝组织内血管病变与肝组织的病理学炎症、坏死及纤维增生相伴发生,重度的血管阻塞可能是肝硬化的重要原因之一。以上研究结果充分表明血瘀是肝纤维化的病理基础及病机关键,而在肝纤维化的发病过程中,血瘀与痰湿又相互伴生及互为因果。瘀血阻络,必阻碍气机,气机阻滞,津液不布,水湿不化,而聚湿生痰;同理,

痰湿阻络,亦必阻碍气机,血为气之母,气为血之帅,气机阻滞,血行不畅,而致瘀阻经络。

2 中药提取物

2.1 粉防己碱 粉防己碱是从防己科植物粉防己等的根中提取的一种异喹啉类生物碱。陈颖伟等^[2]通过汉防己甲素早期治疗肝纤维化实验提示其对I、III、IV型胶原(C)基因的表达在转录水平上有抑制作用,亦可降低肝纤维化时血小板源性生长因子(PDGF)、转化生长因子(TGF)- β_1 等肝纤维化相关细胞因子的表达而间接抑制胶原合成,体外可抑制肝星状细胞(HSC)的NF- κ B转录活性并抑制胶原蛋白沉积,在大鼠实验性肝纤维化肝胶原蛋白降低^[3]。在临床中可降低肝硬化患者食管静脉压力,降低血清III型前胶原水平,是一种可广泛应用临床的抗肝纤维化药物。

2.2 甘草酸苷 甘草酸苷是从甘草中提取的有效成分,能使肝纤维化模型大鼠纤维化程度降低。其可抑制培养细胞I、III型前胶原(PC)mRNA的表达和肝脏NF- κ B的活性;尚可具有诱导IFN的免疫调节活性。对体外培养的HSC的增殖有明显抑制作用,并能减少HSC对³H-脯氨酸的参入,进而抑制胶原合成。

2.3 苦参碱、苦参素 苦参碱、苦参素是从豆科植物苦参、苦豆子中提取的有效成分,具有抗炎、免疫调节、抑制某些细胞因子等作用,已应用于临床慢性病毒性肝炎的治疗,有一定的疗

[收稿日期] 2008-01-12 **[修回日期]** 2008-03-27

[作者简介] 胡芳(1983-),女,江苏吴江人,在读硕士,主要从事药剂学方面的研究。电话:(0)13002598522,E-mail:jingxi_hf@yahoo.cn.

[通讯作者] 程建明(1965-),男,副研究员。电话:025-86798393,E-mail:mimg5666@sina.com.