

综述与专论

胞内抗体技术及医学应用

周春水 甄永苏

(中国医学科学院, 中国协和医科大学医药生物技术研究, 北京 100050)

摘要 胞内抗体技术是近年来随抗体工程技术发展起来的一项新型基因治疗方法。它将单链抗体表达于非淋巴细胞内, 并使之定向分布于细胞核、细胞浆或内质网等部位, 特异性阻断、干扰分布于该部位的大分子物质生物活性或加工分泌过程。实验证明该技术能抑制生长因子受体的表达, 灭活原癌基因蛋白, 抑制病毒复制。在生物科学及医学研究中具有很大应用潜力。

关键词 抗体工程, 胞内抗体, 单链抗体, 基因治疗

胞内抗体 (intracellular antibody, intrabody) 技术^[1]是应用基因重组技术在非淋巴细胞内表达具有生物活性的抗体, 并通过对抗体分子进行适当修饰, 使之定向分布在细胞核、细胞浆或某些细胞器中, 从而特异性干扰或阻断分布于该部位的某些生物大分子的活性或加工、分泌过程, 引起细胞的一系列生物过程发生改变。它是继反义 RNA、特异性核酶 (ribozyme)、显性负突变 (dominant-negative mutation)、“自杀”基因等技术之后又一新型基因治疗途径, 是抗体工程技术与基因治疗的结合体。体外细胞转化实验证实, 胞内抗体可抑制细胞膜表面受体表达, 灭活原癌基因蛋白产物, 阻碍病毒复制过程^[1-5]。因此该技术在研究信号传递、抗肿瘤、抗艾滋病等领域具有重要应用价值。

1 胞内抗体技术的形成与发展

早在 80 年代中期, Cattaneo 等^[6]就进行了利用非淋巴细胞表达完整单克隆抗体的研究, 结果发现转化宿主细胞不仅能表达抗体的重链与轻链, 而且通过蛋白加工分泌系统能组装出完整抗体, 并分泌出胞外。随后该研究小组又进行了表达抗体的胞内定向分布试验。他

们对抗体表达质粒进行了改造, 将重链与轻链的信号肽区疏水性氨基酸替换成亲水性氨基酸, 这样可使信号肽丧失作用, 抗体滞留于胞浆中。又在轻链的信号肽区增加了一个 SV40 病毒大 T 抗原的核定位信号 PKKKRTV, 用改造后的表达质粒转化 cos 细胞, 以抗 Fab 独特型抗体对转化细胞各组分做免疫检测发现, 虽然 cos 细胞浆是还原性内环境, 不利于抗体的组装, 但所表达重、轻链仍然在胞浆中实现了组装, 而且经过组装后的抗体在轻链上的核定位信号引导下由胞浆进入了细胞核^[7]。尽管这些实验证实了抗体能在转化的非淋巴细胞内表达并且完成组装及定向分布, 但并没有发现胞内抗体具有生物活性的证据, 这说明细胞浆并不能完全提供要装配成四链完整活性抗体所需全部条件。但这些研究开创了一条新的研究方法, 即在非淋巴细胞内表达某些具有生物活性的特异性抗体, 并使它能滞留于细胞内某些部位中, 以干扰或阻断某些细胞内生物过程^[8]。

随着抗体工程等技术不断发展, 单链抗体 (single-chain Fv fragment, scFv) 的出现使得胞内抗体技术得到迅速发展^[9,10], scFv 抗体分

子结构简单,由抗体的重链可变区与轻链可变区通过一短肽 (GGGGS)₃ 连接而成,分子量 25 ku 左右,它基本保持了亲本抗体对抗原的亲合力. scFv 基因比较容易获得,不仅可以用 PCR 技术直接从某一抗特异性杂交瘤中构建所需基因,而且噬菌体单链抗体库技术为 scFv 基因的获取提供了丰富的源泉. 噬菌体抗体库是将各种单链抗体基因重组到噬菌体外壳蛋白基因中,以融合蛋白形式表达于噬菌体外壳表面,然后利用抗原、抗体的特异性结合反应,即可简便地筛选出针对某一抗原并具有较高亲和力的重组噬菌体,从而获得所需 scFv 基因^[9]. 由于 scFv 基因结构简单,便于体外重组操作,且抗体亲和力较高,目前已成为胞内抗体技术最常采取的抗体形式^[1].

根据胞内抗体所针对的靶分子在细胞内存在或经过的部位,对 scFv 蛋白的 N 端或 C 端进行一些修饰,就可将 scFv 人为地滞留于细胞核、细胞浆或内质网中^[7,11]. 实际研究将胞内抗体滞留于内质网中比较多见. 这是由于第一,内质网是多种生物活性蛋白加工、分泌的通路,将抗体滞留于内质网管腔或内质网内膜上大大增加了抗体与抗原相互作用的机会. 第二,研究表明内质网本身也是天然抗体组装的场所,其管腔内存在有利于抗体形成活性构象所需辅助因素^[12]. 第三,内质网滞留抗体生物活性半衰期要长于细胞浆中的胞内抗体^[2].

构建内质网滞留型胞内抗体基因,其重链可变区基因 5' 端需加一个信号肽基因,如信号肽 MDWIWRILFVGAATGAAS 的基因,它能引导胞内抗体进入内质网管腔中. 其轻链可变区 3' 末端需加上 4 肽 KDEL 基因,它能使可溶性蛋白滞留于内质网管腔中. 也可以将 5' 端的信号肽中加 RR 基序,使胞内抗体滞留于内质网内膜上^[13]. 从杂交瘤 mRNA 中构建内质网滞留型抗体基因过程如图 1 所示. 研究表明 4 肽 KDEL 不仅使胞内抗体滞留于内质网中,而且还影响到胞内抗体与靶分子的作用效率、作用方式及稳定性. 例如,同是抗白介素

2 受体 α (IL-2R α) 的两种胞内抗体 scFvTac 和 scFvTac-KDEL,前者对 IL-2R α 的抑制率要低于后者,而且在内质网中前者与 IL-2R α 前体的复合物被降解的速率要快于后者与 IL-2R α 前体所形成的复合物^[2].

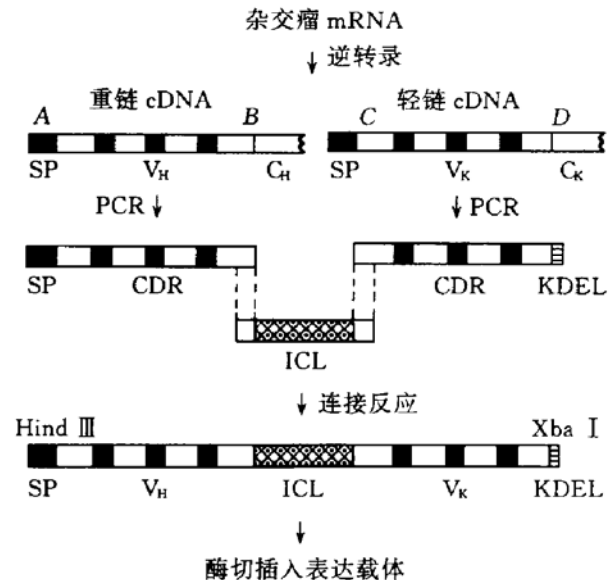


图 1 内质网滞留型胞内抗体(scFv)基因构建示意图
V_H、C_H、V_K、C_K 分别为重链、轻链可变区及恒定区. A、B、C、D 为 PCR 引物; SP: 信号肽; KDEL: 内质网滞留肽; CDR: 超变区; ICL: 连接肽.

如同一般的基因治疗方法,胞内抗体技术最常采用的表达载体也是逆转录病毒. 有些体外转化实验的作者也常采用含有病毒调控序列的重组质粒作载体,但表达质粒转化真核细胞时要采用微注射或常规的电穿孔、磷酸钙共沉淀等方式,转化效率很低^[2,4]. 目前有关胞内抗体的研究均处于体外转化细胞系水平. 如该技术要应用到机体内,所采用的载体应能达到两方面的要求:第一,表达载体必须具有较高的转化效率,能在宿主细胞内持续稳定地表达,并对宿主细胞无不良损害. 第二,胞内抗体的表达需要具有一定的细胞-组织特异性 (cell-tissue specific)^[14]. 前者主要从改进病毒载体的调控结构、改进病毒的包装技术及提高包装后复制缺陷型病毒载体的效价等方面考虑. 而特异性表达问题则需从基因的靶向传递 (targeted gene delivery) 及特异性转录两方面加以

考虑. 基因靶向传递主要包括免疫脂质体转运, 改造病毒外壳蛋白等方法. 已经知道, 逆转录病毒外壳蛋白上有数个分散的细胞表面结合受体, 将某一特异性的配体或单链抗体基因重组到这些膜表面结合受体基因中, 使所表达的嵌合蛋白既能包装病毒颗粒又能特异性结合、侵染靶细胞. 目前已有用红细胞生成素(EPO)、整合素(integrin)及抗低密度脂蛋白单链抗体构建病毒外壳嵌合蛋白的研究^[15]. 特异性转录主要靠给载体中加入有细胞-组织特异性表达基因的启动子加以实现^[16].

几个研究小组均证实, 在真核非淋巴细胞内表达胞内抗体不会对宿主细胞的生理代谢产生明显损害, 转染细胞的形态学生长速率与对照细胞相比无明显差别, 说明该技术对转染细胞是比较安全的^[11].

胞内抗体与其分泌型抗体相比, 生物半衰期明显缩短, 可能是由于胞内抗体受某些胞内物质影响, 构象不如分泌型稳定所致^[17]. 胞

内抗体能定向地分布于细胞内某些部位, 而分泌型抗体主要通过细胞分泌加工系统分泌出胞. 由于它们存在及发生生物作用的部位不一样, 它们引起的生物学效应也就不同. 胞内抗体一般在靶分子发生作用前就将其阻断, 而分泌型抗体则主要在细胞外阻断细胞所分泌的细胞因子或膜表面受体. 因此在同等作用强度下, 前者的作用要比后者彻底^[2].

2 胞内抗体技术的医学应用

由于胞内抗体能定向分布于细胞各部位, 且保持有与相应抗原的特异结合能力, 因此它可通过各种机制干扰或调节细胞的生理生化过程, 或阻碍胞内病原体的生长代谢. 胞内抗体能以灭活或者激活酶或底物来影响胞浆内酶促反应, 还可以封闭胞浆中或内质网内转录因子、生长因子受体, 使它们不能进入效应部位发挥作用(表1). 下面主要介绍一下胞内抗体技术在医学领域的研究和应用.

表1 胞内抗体的特点与生物学效应

抗体形式	胞内定位	定位信号	靶分子	生物效应	参考文献
scFv	内质网	KDEL	IL-2R α EGFR ErbB2 gp160	抑制膜受体表达 阻碍癌蛋白分泌 抑制 HIV-1 感染	[1, 2] [11, 18]
scFv 或 scFv-C _L	细胞浆	信号肽中疏水 氨基酸转换为 亲水氨基酸	p21 ^{ras} Tat, Rev	失活癌蛋白 抑制 HIV-1 复制 阻碍信号传导	[4, 5] [17, 19]
scFv	细胞核	核定位信号	Tat	抑制 HIV-1 复制	[19]

2.1 抑制膜表面受体的表达

细胞表面受体在调控细胞的生长、分化上起重要作用, 许多生长因子、细胞因子参与了肿瘤的发生过程. 白细胞介素2受体在人淋巴细胞白血病中有过度表达. Richardson等^[2]用含抗白介素2受体 α (IL-2R α)单链抗体scFvTac基因的嗜人T淋巴细胞重组病毒转染IL-2R α 高表达的T淋巴细胞Jurkat株, 结果显示转染的Jurkat细胞对IL-2失去了反应能力, 用endoglycosidase H检测到转化细胞内存

在许多IL-2R α 的前体蛋白, 这说明胞内抗体scFvTac在内质网中阻止了IL-2R α 前体向细胞膜表面的加工、分泌. 另一些研究则证实内质网滞留型胞内抗体也成功阻断了NIH/3T3细胞中表皮生长因子受体(EGFR)向膜表面分泌, 使得EGFR依赖性NIH/3T3细胞生长明显受到抑制^[11].

2.2 灭活原癌基因产物

ras癌基因家族参与了多种人类肿瘤的发生发展. ras基因的蛋白产物p21^{ras}是细胞浆中

的一种鸟嘌呤核苷酸结合蛋白,对细胞的生长、分化有调节作用.将构建了去掉N端信号肽的抗p21^{ras}单链抗体基因的表达式直接微注射入非洲爪蟾卵母细胞中,发现卵母细胞不能发生减数分裂成熟(meiotic maturation),而非洲爪蟾卵母细胞的减数分裂成熟是p21^{ras}依赖性的^[4].ErbB2编码产物是一种跨膜蛋白,它具有受体酪氨酸激酶活性,它间接调控表皮生长因子受体(EGFR)的信号传导作用.ErbB2在人乳腺癌,卵巢癌等恶性肿瘤有过度表达,且预后不良.内质网滞留型胞内抗体不仅使NIH/3T3细胞膜表面ErbB2蛋白减少,而且细胞的表型也发生了逆转^[3,18].更深入研究发现在人卵巢细胞系SKOV3中虽能短暂表达抗ErbB2胞内抗体,但这种表达不稳定,抗体生物活性很快消失^[19].这些研究还提示胞内抗体技术也是研究胞内信号传导的重要手段.利用胞内抗体特异性阻断胞内某一信号因子,可以揭示这一因子在信号传导中的作用并推测信号传递的具体过程^[17].

2.3 抑制 HIV-1 病毒的转录与复制

HIV-1病毒感染造成了人获得性免疫缺陷综合症(简称艾滋病).HIV-1病毒主要引起CD₄⁺T淋巴细胞大量死亡,造成人体免疫力低下,病人最终死于继发性感染.抑制HIV-1病毒的方法很多,但实际效果均不理想.胞内抗体技术则为抗艾滋病研究提供了新手段.目前胞内抗体所针对的HIV-1的靶点主要有gp160蛋白,Rev蛋白的C端和Tat蛋白的N端.gp160蛋白是HIV-1病毒外壳蛋白gp120的前体.gp120能与CD₄分子发生结合,是HIV-1病毒侵染C₄⁺T淋巴细胞的关键因素.HIV-1感染细胞还能通过其膜表面gp120与未感染CD₄⁺阳性细胞发生合胞现象(syncytium formation).Marasco等^[1]将人源性内质网滞留型抗gp160抗体scFv105表达于HIV-1感染细胞,发现病毒的扩散能力降低了3个数量级,病理性合胞现象也明显减少.针对Tat、Rev这两种HIV-1调控蛋白也进行了实验研究,Tat是HIV-1病毒转录的激活因

子,Rev可穿梭于胞浆与胞核之间将核内HIV-1的mRNA引导出核.利用相应胞内抗体阻断胞浆中Tat、Rev的活性也取得了明显抑制HIV-1病毒转录与复制的效果^[5,20].研究还发现在抗Tat胞内抗体C端增加一段轻链恒定区,使该抗体抗HIV-1能力加强.可见给scFv末端加上一段恒定区片段后可使胞内抗体稳定性及对抗原的亲合力明显提高^[20].由于HIV-1病毒存在许多突变株以及胞内抗体表达量有限,且这种表达不能稳定持续,因此上述研究只是短暂抑制了体外细胞中HIV-1病毒的复制.要达到对HIV-1的彻底抑制尚需进一步研究.

3 胞内抗体技术的问题与展望

胞内抗体技术是利用细胞内免疫机制进行基因治疗的新方法,从干扰细胞内信号传导到阻碍胞内病原体生长与繁殖,它具有广阔的应用范围.胞内抗体技术基于抗体工程技术,并随抗体技术的发展而发展.近年来人源或鼠源的噬菌体单链抗体库技术与抗体定点诱变技术为构建、筛选高亲和力、高特异性胞内抗体提供了保障^[9].胞内抗体应用中存在的一些问题也正是基因治疗中需要解决的问题.胞内抗体由体外实验进入体内治疗必须处理好以下问题.a.需有高效的特异性的基因转运系统将抗体基因转入足够的靶细胞中.b.能稳定高效表达胞内抗体以产生预期的生物学效应.c.胞内抗体必须无毒性,无免疫原性.目前从体外研究结果来看,转染细胞能够耐受胞内抗体的表达,而人源化胞内抗体可解决免疫原性问题.高效性基因转运与特异性基因表达是目前基因治疗研究的热点与难点.随着基因治疗技术应用与研究的不断深入,胞内抗体技术也必然会得到完善与发展,并且在基础研究与医学应用领域中发挥越来越大的作用.

参 考 文 献

- 1 Chen S Y, Bayley J, Marasco W A. Hum Gene Ther, 1994; 5: 595

- 2 Richardson J H, Sodroski J G, Waldmann T A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995; **92**: 3137
- 3 Graus-Porta D, Beerli R R, Hynes N E. *Mol Cell Biol*, 1995; **3**: 1182
- 4 Biocca S, Pierandrei-Amaldi P, Cattaneo A. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993; **2**: 422
- 5 Duan L X, Bagasra D, Laughlin M A *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994; **91**: 5075
- 6 Cattaneo A, Neuberger M S. *EMBO J*, 1987; **6**: 2753
- 7 Biocca S, Neuberger M S, Cattaneo A. *EMBO J*, 1990; **1**: 101
- 8 Baltimore D. *Nature*, 1988; **335**: 395
- 9 Winter G, Milstein C. *Nature*, 1991; **349**: 293
- 10 Whitlow M, Filpula D. *Methods Enzymol*, 1991; **2**: 97
- 11 Beerli R R, Wels W, Hynes N E. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994; **2**: 666
- 12 Melnick J, Dul J L, Argon Y. *Nature*, 1994; **370**: 373
- 13 Schutze M P, Peterson P A, Jackson M R. *EMBO J*, 1994; **7**: 1696
- 14 Somia N V, Zoppe M, Verma I M. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995; **92**: 7570
- 15 Valsesia-Wittmann S, Drynda A, Deleage G *et al.* *J Virol*, 1994; **7**: 4609
- 16 Ferrari G, Salvatori G, Rossi C *et al.* *Hum gene Ther*, 1995; **6**: 733
- 17 Biocca S, Pierandrei-Amaldi P, Campioni N *et al.* *Bio/Technology*, 1994; **12**: 396
- 18 Beerli R R, Wels W, Hynes N E. *Biol Chem J*, 1994; **39**: 23931
- 19 Deshane J, Loechel F, Conry R M. *Gene Ther*, 1994; **1**:

332

- 20 Richardson J H, Marasco W A. *Trend of Biotech*, 1995; **13**: 306

Intracellular Antibody Technique and Its Medical Application. Zhou Chunshui, Zhen Yongsu (*Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100050, China*).

Abstract Intracellular antibody refers to the recombinant antibody expressed intracellularly. Single-chain Fv fragment, one common form of intracellular antibody with high affinity, can be expressed in transfected nonlymphocytes and targets to a particular cellular compartment to interfere the activity of some macromolecular substances or the process of their secretion. Intracellular antibody has been proved to be capable of inhibiting growth factor receptors, inactivating oncoproteins and inhibiting HIV-1 replication. Intracellular antibody technique is a novel gene therapy approach with potentiality in medical application.

Key words antibody engineering, intracellular targeting, single-chain Fv fragment, gene therapy

活性氧参与艾滋病发病的机理

王兰芳 郑荣梁

(兰州大学生物系, 兰州 730000)

摘要 HIV 的长期感染, 使得患者体内活性氧大量积累, 形成了氧胁迫。各种活性氧介导的氧胁迫, 能够激活转录因子 NF κ B, 从而刺激并促进 HIV 的基因表达。同时氧胁迫还使得 HIV 感染者机体功能陷入紊乱, 表现为 DNA 严重损伤, Ca²⁺ 失去细胞内外的平衡, 酶系统遭到破坏, 能量代谢受阻等诸多方面。应用抗氧化剂治疗艾滋病仍处于探索阶段。

关键词 活性氧, 氧胁迫, 自由基, 艾滋病, 抗氧化剂