

一个碱基固定的 oligo-dT 引物减少了每个 mRNA 样品对逆转录反应种类的需要, 把由于引物的简并性引起的某些 RNA 的代表性差和 RNA 数量过多的现象降低到最低程度. 第二, 在固定和随机引物的 5' 末端引入限制性内切酶识别位点. 使在克隆后的 cDNA 扩增易于操作. 同时, 由于引物变长, 使 cDNA 的扩增更有效. 随着这种方法的不断完善和简化, 其在肿瘤学、心血管疾病研究、胚胎发生、细胞分化等领域的应用, 将会越来越广泛.

参 考 文 献

- 1 Liang P, Pardee A B. *Science*, 1992; **57**: 967
- 2 Donohue P J, Alberts G F, Guo Y *et al.* *J Biol Chem*, 1995; **270** (17): 10351
- 3 Bauer D, Muller H, Reich J *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1993; **21** (18): 4272
- 4 Marechal D, Forceille C, Breyer D *et al.* *Anal Biochem*, 1993; **208**: 330
- 5 Shinoura N, Shamraj O I, Hugenholtz H *et al.* *Cancer Lett*, 1995; **89** (2): 215
- 6 Frankfort B J, Gelman I H. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995; **206** (3): 916
- 7 Blok L J, Kumar M V, Tindall D J. *Prostate*, 1995; **26** (4): 213
- 8 Mou L, Miller H, Li J *et al.* *Biochem Biophys Commun*, 1994; **199** (2): 564
- 9 Callard D, Lescure B, Mazzolini L. *Biotechniques*, 1994; **16** (6): 1096
- 10 Ito T, Kito K, Adati N *et al.* *FEBS Lett*, 1994; **351**: 231
- 11 Liang P, Averboukh L, Pardee A B. *Nucleic Acids Res*, 1993; **21** (14): 3269
- 12 Zimmermann J W, Schultz R M. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994; **91**: 5456
- 13 Lohmann J, Schickle H, Bosch T C G. *Biotechniques*, 1995; **18** (2): 200
- 14 Liang P, Zhu W, Zhang X *et al.* *Nucleic Acids Research*, 1994; **22** (25): 5763

Isolate Specifically Expressed Genes by Differential Display. Sun Tao, Liu Xuefeng (*Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China*).

Abstract There are about 100 000 different genes in higher organisms, and only 15% of them are expressed in any individual cell. Thus it is very important to isolate specific genes. Comparing with subtractive hybridization, differential display is a more effective approach to isolate specifically expressed genes. In differential display, reverse transcribed products of mRNA are amplified and displayed on sequencing gel. Then differentially expressed genes are isolated. Although there are many difficulties in using this method, as further improved, it will be useful in various fields.

Key words differential display, isolate, specifically expressed gene

诱导免疫应答的一种新手段 ——基因免疫

雷章恒 潘星华 傅继梁

(第二军医大学医学分子生物学开放实验室, 上海 200433)

摘要 近年来, 一种诱导免疫应答的新手段——基因免疫, 正在引起人们越来越多的关注. 所谓基因免疫, 是将含有编码序列及必要表达调控元件的质粒 DNA, 直接导入动物组织, 经诱导动物免疫系统对编码序列所表达的蛋白质发生免疫应答, 达到免疫的目的. 文章介绍了基因免疫的基本方法, 综

述了这一新兴领域中涉及传染病、肿瘤、移植等方面的研究成果及存在的问题,并展望了研究前景.

关键词 基因免疫, 质粒 DNA, 基因转移

近年来,一种刺激免疫系统诱导免疫应答的崭新手段——基因免疫,正在引起人们越来越多的关注.所谓基因免疫(gene immunization),又称为基于 DNA 的免疫(DNA-based immunization)、DNA 介导的免疫(DNA-mediated immunization)、遗传免疫(genetic immunization)、核酸免疫(nucleic acid immunization),是将含有编码序列及必要表达调控元件的质粒 DNA,直接导入动物组织,以诱导动物免疫系统对编码序列所表达的蛋白质发生免疫应答,达到免疫的目的.基因免疫,是基因治疗研究的一个副产品.在过去的 10 年里,文献中有零星的关于活体 DNA 转移引起宿主免疫应答的报告,但没有引起人们足够的重视.迄今,利用质粒 DNA 转移以校正遗传缺陷,对于任一组织的大多数细胞来说,其效率都不尽人意.然而,被转染细胞的数目及所表达的外源蛋白质的量,却足以引起宿主对这种在自身体内表达的外源蛋白质产生强烈且广泛的免疫应答.这一偶然的发现,导致了这一新的免疫手段的出现.1993 年 3 月, Ulmer 及其同事^[1]在《Science》上发表了他们在这一领域内的研究报告.这篇文章,不仅向科学界展示了其向学术禁区的挑战,而且开辟了疫苗研究的新时代.本文将对基因免疫领域所取得的成就及存在的问题作一综述,并对研究前景作出展望.

1 基本方法

1.1 基因免疫的基本方法

活体基因转移的基本方法有两种:a.将裸露的质粒 DNA 盐溶液,用注射器直接注射入宿主动物体内^[2-4];b.在进行基因转移以前,对质粒 DNA 进行脂类或金包被,以形成脂类或金包被的质粒 DNA 颗粒,然后用注射器或特制的基因枪,将这些携带质粒 DNA 的“炮弹”打入宿主动物体内^[5-7].

用方法 a 进行肌肉内基因转移,通常都先用某种方式对注射部位的肌肉组织造成损伤,再将裸露的质粒 DNA 注射入新生的肌肉中,因为这种操作方式,可以增强肌肉对 DNA 的吸取和表达,引起免疫应答的效果更好^[4,8,9].然而,用该方法进行皮内基因转移,似乎是一种更佳的方法. Raz 等^[10](1994 年)的报告显示,皮内一次性注射 0.3~15 μg 裸露的质粒 DNA,诱导产生的特异性细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL),至少持续存在 68~70 周.而皮内基因转移所诱导产生的抗体滴度,也比骨骼肌内基因转移所诱导产生的抗体滴度更高.文献报道中主要采取裸露 DNA 直接注射的方法.

通常情况下,方法 a 所需的质粒 DNA 的量为几十微克到几百微克.而使用方法 b 诱导宿主产生免疫应答所需的质粒 DNA 的量,通常为几百纳克^[7,11],其效率比方法 a 高得多.基因转移以前对质粒 DNA 的脂类或金包被,很可能是增强了 DNA 进入细胞的能力,因而在质粒 DNA 用量甚微的情况下,也能成功地诱导宿主产生免疫应答.

1.2 选择基因直接导入的活体组织

活体基因转移的方法 b 对组织的选择不严格要求,但方法 a,即将含有编码序列及必要表达调控元件的纯化质粒 DNA 直接导入动物组织,却面临着组织选择的问题.裸露质粒 DNA 能成功地进入哪些组织细胞,并被表达,这是使用方法 a 所要解决的第一个问题.最初,肌肉组织被认为是在没有物质载体存在的情况下,能有效吸取并表达裸露质粒 DNA 的唯一组织.在肌肉组织中,又只有横纹肌具有这种功能.以后,又发现甲状腺滤泡细胞也能吸取注射入其中的 DNA^[2,3].1994 年, Raz 等^[10]将裸露的质粒 DNA 直接注射在小鼠尾部皮内,成功地诱导了宿主对质粒 DNA 编码的蛋白质的免疫应答.笔者将裸露的含乙型肝炎

炎病毒 (HBV) 基因的质粒 DNA 直接注入小鼠肝脏, 也成功地获得了宿主小鼠对质粒 DNA 编码的蛋白质发生免疫应答的动物模型 (待发表). 以上事实表明, 皮和肝脏中有某种细胞具有吸取并表达注入其中的裸露 DNA 的功能. 我们认为, 还可能其他的组织也有吸取并表达裸露的质粒 DNA 的能力.

2 现有的基因免疫模型及取得的成就

2.1 现有的基因免疫模型

将含有不同编码序列及必要的表达调控元件的质粒 DNA 导入动物组织, 已获得了多种基因免疫动物模型. 在这些模型中, Ulmer^[1] (1993 年) 率先建成的抗流感病毒 A

表 1 基因免疫动物模型

模 型	被表达的蛋白质	动物种类	注射方式
蛋白质免疫	人 GH $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶	小鼠	皮内或表皮内
肿瘤免疫	人畸胎瘤抗原 (CEA)	小鼠	肌肉内
牛疱疹病毒免疫	糖蛋白	小鼠、牛	肌肉内
乙型肝炎病毒免疫	表面抗原	小鼠	肌肉内
流感病毒 A 免疫	核心蛋白 (NP)	小鼠	肌肉内
流感病毒 A 免疫	血细胞凝集素糖蛋白	小鼠、鸡	皮内、肌肉内、鼻内、静脉等
HIV-1 免疫	糖蛋白 160 (gp160)	小鼠、猴	肌肉内
狂犬病毒免疫	糖蛋白	小鼠	肌肉内
疟疾 (<i>P. yoelii</i>) 免疫	循环孢子体蛋白	小鼠	肌肉内
MHC-I 免疫	MHC-I 表面糖蛋白	大鼠	肌肉内
肿瘤免疫	MHC-I 表面糖蛋白	小鼠	肿瘤内
单克隆抗体生产	人 GH	小鼠	肌肉内
人急性乙型肝炎	乙型肝炎抗原	大鼠	肝脏内

注: GH 为生长激素, HIV 为人类免疫缺陷病毒, MHC 为主要组织相容性复合体.

(influenza A virus) 感染的小鼠模型及 Takahashi 等^[12] (1995 年) 建成的急性乙型肝炎大鼠模型尤其引人瞩目. 已获得的基因免疫模型已涉及传染病、肿瘤、移植等诸多领域, 现将有关模型列于表 1.

2.2 基因免疫研究所取得的成就

1993 年, Ulmer 及其同事^[1] 报告了他们将流感病毒不同株间的保守性抗原, 核心蛋白 (nucleoprotein, NP) 基因及必要的表达调控元件导入小鼠, 获得了在后续的病毒感染实验中具有明显抗感染能力的基因免疫小鼠. NP 基因导入后, 诱导了宿主特异的细胞免疫和体液免疫. 他们认为给小鼠带来免疫保护的并不是特异抗 NP 蛋白抗体, 而很可能是特异的细胞免疫. 这种基因免疫小鼠, 对与免疫基因不同

株的病毒感染也具有抵抗作用.

Davis 等^[8] (1993 年) 发现, 给小鼠肌肉内注射一次含有乙型肝炎病毒 (HBV) 表面抗原基因的表达载体两周后, 小鼠血液中 HBV 表面抗原的含量达 $1 \mu\text{g/L}$. 在 1~2 个月内, 血中一直能检测到少量的 HBV 表面抗原. 基因转移两周后, 抗体也可在毫国际单位 (IU/L) 水平被检测到, 并在 2 个月内持续增加. 1995 年, Michel 等^[13] 将编码 HBV 三个包膜蛋白 (pre-S1, pre-S2, S) 的表达载体导入小鼠, 发现基因转移 1 周后, 出现针对 pre-S2 的强烈的 IgM 应答, 随后是 IgM 与 IgG 的类别转换.

1995 年, Takahashi 等^[12] 将具有复制功能的 HBV DNA 结构用脂包被后导入大鼠肝组

织, 在大鼠肝脏中检测到了 HBV mRNA 和 3.2 kb 的 HBV DNA. 活体转移后 3~7 d, 大多数大鼠血中可检测到 HBV 颗粒和 HBV e 抗原, 随后抗 e 抗体出现. 2~3 周后, 血清谷丙转氨酶 (GTP) 水平升高, 肝细胞死亡, 门静脉附近有淋巴细胞侵入, 血清中也检测不到 HBV 颗粒. 这一活体基因转移模型, 其基因转移的目的, 并非只是为了诱导宿主对 HBV 基因产物产生免疫应答, 但却带给我们巨大的启示: 基因免疫虽是基因治疗领域的副产品, 但基因免疫的方法, 在这里却向我们展现了另一种应用前景.

基因免疫方法已被用于移植和肿瘤的免疫治疗的研究. 1994 年, Geissler 等^[14]发现, 将含有编码同种异体 MHC-I 移植抗原的表达载体导入宿主肌肉组织内, 导致对后续的同种异体心脏移植的排斥反应增强. 1993 年, Plautz 等^[15]将含有编码同种异体 MHC-I 的表达质粒用脂包被后, 导入小鼠腺癌或纤维肉瘤细胞, 以诱导针对肿瘤块的广泛的细胞毒作用. 这种免疫反应大大减缓了肿瘤的生长, 在很多小鼠中, 甚至使肿瘤完全消退. 显然, 这种基因免疫治疗方法, 无论在可操作性还是治疗效果上, 都优于传统的 *ex vivo* 方法.

基因免疫也为低免疫应答个体获得免疫保护提供了一种新的技术手段. Milich 等^[16]的研究表明, 用制备好的乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) 免疫小鼠, 不同品系的小鼠产生的抗体量是不相同的. 这种差异是受免疫反应基因控制的, 因为淋巴细胞对 MHC-I 类和 II 类抗原表位的应答, 受某些单倍型的限制. 对于有些小鼠, 可以通过增大注射蛋白质的量或选择不同的注射部位来克服其低应答性. 1993 年, Davis 等^[17]比较了他们用对 HBsAg 表现低应答的 SJL 小鼠和应答良好的 BALB/c 或 C57BL/6 作基因免疫的结果发现, SJL 小鼠对基因免疫的应答也比 BALB/c 或 C57BL/6 低, 但 2 个月 after, SJL 小鼠所产生的抗体达 100 IU/L, 虽然也比高应答小鼠 BALB/c 低, 但是其免疫效果远比蛋白免疫好. 这一事实表

明, 基因免疫在这种情况下是优于蛋白免疫的.

3 问题与展望

3.1 问题

基因免疫作为一种新的免疫手段, 从它出现的那一刻起, 就带有明显的新奇性和挑战性. 基因免疫与传统免疫手段相比, 有一些明显的不同之处. 基因免疫可同时诱导宿主的体液免疫和细胞免疫, 与病毒感染诱导的免疫反应十分相似. 基因被导入细胞后, 其所表达的蛋白质的量通常不会很高, 一般都在 ng 水平, 这就向我们提出了一个关于这种新奇免疫手段的普遍问题: 如此微量的抗原, 是怎样诱导出宿主的免疫应答的. 对这个问题的回答, 可能会对今天及未来的疫苗设计提供相关的理论根据和有用的实践材料, 也会有助于我们对自身免疫机制的理解.

基因免疫与传统免疫手段虽然存在一些明显的差别, 但它们却有一个共同的特点, 受到同一问题的困扰, 即我们要事先知道哪个多肽或抗原表位能为宿主提供免疫保护, 才能对宿主进行某种免疫.

现有的基因免疫模型虽然已涉及牛^[18]、鸡^[7]及猴^[19,20]等多种动物, 但目前基因免疫主要以小鼠作为实验动物, 对小鼠以外的其他动物的研究相对较少. 鉴于不同物种的动物或同种动物的不同品系对某种抗原的免疫应答或应答强度存在着差异, 因此, 对小鼠以外的其他动物特别是灵长类动物进行广泛的基因免疫研究是十分必要的.

基因免疫研究所取得的成就, 已在一定程度上展示了基因作为疫苗的可能性. 但是, 基因在作为疫苗被广泛使用之前, 有一个问题需要得到澄清: 被导入组织的 DNA 的去向. 被导入组织的 DNA 在被注射位点的细胞吸取后, 会不会整合到宿主的基因组中, 引起插入突变; 没有被注射位点的细胞吸取的 DNA, 其去向怎样, 会不会通过某种方式整合到生殖细胞中, 导致后代中遗传病的出现.

3.2 展望

基因免疫作为一种免疫手段,有许多问题需要解决与澄清,离广泛的临床应用还有一段距离.但是,基因免疫研究的初步成果充分显示,这种免疫方式作为一种治疗手段,至少对某些类型的免疫相关疾病来说,其前景是毋庸置疑的;基因免疫作为一种基础研究的手段,其重要性也是不可低估的.

参 考 文 献

- 1 Ulmer J B, Donnelly J J, Parker S E *et al.* Science, 1993; **259**: 1745
- 2 Wolff J A, Malone R W, Williams P *et al.* Science, 1990; **247**: 1465
- 3 Sikes M L, O'Malley B W Jr, Finegold M J *et al.* Hum Gene Ther, 1994; **5**: 837
- 4 Davis H L, Demeneix B A. Hum Gene Ther, 1993; **4**: 733
- 5 Pecorino L T, Lo D C. Curr Biol, 1992; **2**: 30
- 6 Tang D C, De Vit M, Johnston S A. Nature, 1992; **356**: 152
- 7 Fynan E F, Webster R G, Fuller D H *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1993; **90**: 11478
- 8 Davis H L, Michel M-L, Whalen R G. Hum Mol Genet, 1993; **2**: 1847
- 9 Davis H L, Whalen R G, Demeneix B A. Hum Gene Ther, 1993; **4**: 151
- 10 Raz E, Carson D A, Parker S E *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1994; **91**: 9519
- 11 Eisenbraun M D, Fuller D H, Haynes J R. DNA Cell Biol, 1993; **12**: 791
- 12 Takahashi H, Fujimoto J, Hanada S *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1995; **92**: 1470
- 13 Michel M-L, Davis H L, Schleef M *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1995; **92**: 5307
- 14 Geissler E K, Wang J, Fechner J J *et al.* J Immunol, 1994; **152**: 413
- 15 Plautz G E, Yang Z Y, Wu B Y *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1993; **90**: 4645
- 16 Milich D R, McLachan A, Chisari F V *et al.* J Immunol, 1986; **137**: 315
- 17 Davis H L, Michel M-L, Mancini M *et al.* In: Girard M eds. Retroviruses of human AIDS and related animal diseases. Paris: Eighth "Cent-Gardes" Colloquium, 1993: 329
- 18 Cox G J, Zamb T J, Babiuk L A. J Virol, 1993; **67**: 5664
- 19 Wang B, Boyer J, Srikantan V *et al.* DNA Cell Biol, 1993; **12**: 799
- 20 Wang B, Boyer J, Srikantan V *et al.* Virology, 1995; **211**: 102

A New Approach for Evoking an Immune Response: Gene Immunization. Lei Zhangheng, Pan Xinghua, Fu Jiliang (*Open Laboratory of Medical Molecular Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China*).

Abstract A new approach for evoking an immune response: gene immunization becomes more and more interesting for many researchers. Gene immunization is to introduce purified plasmid DNA which contains protein coding sequences and the necessary expressing regulatory elements into certain tissues of animals, in order to evoke the immune response to the proteins coded by the plasmid. The basic methods, achievements and problems of this new field are described here.

Key words gene immunization, plasmic DNA, gene transfer

细胞程序性死亡的判定方法

李德玲 王会信 周廷冲

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 细胞程序性死亡有别于一般意义上的死亡——坏死, 所以对其判定显得格外重要. 国内外目前常从细胞形态、细胞膜完整性、DNA 及某些重要生化指标等方面进行判定.