

- 2 Adachi O, Tayama K, Shinagawa E *et al.* Agric Biol Chem, 1978; **42** (11): 2045
- 3 Adachi O, Tayama K, Shinagawa E *et al.* Agric Biol Chem, 1980; **44** (3): 503
- 4 Ameyama M, Shinagawa E, Matsushita K *et al.* Agric Biol Chem, 1981; **45** (4): 851
- 5 McIntire W S, Stults J T. Biochem Biophys Res Commun, 1986; **141** (2): 562
- 6 Robert A, Meer Van Der, Duine J A *et al.* Biochem J, 1986; **239**: 789
- 7 Groen B, Frank J, Duine J A *et al.* Biochem J, 1984; **223**: 921
- 8 Matsushita K, Shinagawa E. Biochemistry, 1989; **28**: 6276
- 9 Lobenstein-Verbeek C L, Jongejan J A, Frank J *et al.* FEBS Lett, 1984; **170** (2): 305
- 10 Ameyama M, Shinagawa E, Matsushita K *et al.* Agric Biol Chem, 1985; **49** (2): 3623
- 11 Shimao M, Yamamoto H, Ninomiya K *et al.* Agric Biol Chem, 1984; **48** (11): 2873
- 12 赵永芳, 王银善, 刘卫群等. 见: 第七次全国生物化学学术会议专题报告(摘要)及论文(摘要)汇编. 生物化学杂志(专刊), 沈阳, 1993: 135
- 13 Ameyama M, Nonobe J, Shinagawa E *et al.* Anal Biochem, 1985; **151**: 263
- 14 Duine J A, Frank J, Jongejan J A *et al.* Anal Biochem, 1983; **149**: 239
- 15 Mutzel A, Gorisch H. Agric Biol Chem, 1991; **55** (7): 1721
- 16 Geiger O, Gorisch H. Biochem J, 1989; **261**: 415
- 17 Dekker R H, Duine J A, Frank J *et al.* Eur J Biochem, 1982; **125**: 69
- 18 Davidson V L, Jones L H, Kumar M A. Biochemistry, 1990; **29**: 10786
- 19 Ameyama M, Shinagawa E, Matsushita K *et al.* Biol Chem, 1985; **49** (3): 699
- 20 Long Baoxiong, Sekiya J, Shimose N. Agric Biol Chem, 1988; **52** (4): 1065

Advance in the Studies of Pyrroloquinoline Quinone (PQQ). Zhang Jingwei, Zhao Yongfang (School of life science, Wuhan University, Wuhan 430072, China).

Abstract Pyrroloquinoline Quinone (PQQ) is a novel prosthetic group and differs from nicotinamid nucleotides, flavin nucleotides ever studied. In the recent decades, PQQ has been studied in Holland, Japan etc, but it was started studying lately in our country. The discovery, isolation, purification, assay, properties and functions of PQQ are introduced. It is beneficial for further studies of its existence, reaction mechanism, biological properties, physiological functions and application of PQQ. Studying the new prosthetic group has important significants in theory and practice for the development of enzyme sciences.

Key words pyrroloquinoline quinone, prosthetic group, isolation and purification

基因转移与肿瘤基因工程疫苗

付体辉, 谢之荣

(四川省肿瘤研究所, 成都 610041)

摘要 综述了近年来有关利用基因转移技术修饰肿瘤细胞制备肿瘤基因工程疫苗的最新研究进展, 着重阐述了逆转录病毒载体介导的基因转移及其安全性; 归纳了目前可用于肿瘤基因工程疫苗的各种目的基因的特点及作用并对这类肿瘤疫苗制备过程中所存在的问题进行了分析。

关键词 基因转移, 逆转录病毒载体, 免疫原性, 肿瘤基因工程疫苗

自本世纪初 Ehrlich 最早提出研制肿瘤疫苗(tumor vaccine)用于肿瘤主动特异性免疫治疗以来,如何提高肿瘤疫苗的免疫原性一直是肿瘤疫苗研究中的一个重要课题.研究发现,通过病毒感染、化学物质处理、酶处理以及体细胞杂交等方法来修饰肿瘤细胞并使之“异种化”(xenogenization)是增强肿瘤疫苗免疫原性的一个有效途径^[1].近年来,分子生物学的发展和基因重组细胞因子的产生,为肿瘤细胞异种化又提供了一种新的手段.利用基因转移技术已成功地将多种外源性基因导入肿瘤细胞并在一定程度上提高了肿瘤细胞的免疫原性.这种“肿瘤基因工程疫苗”(genetically-engineered tumor cell vaccine)的出现,为最终利用肿瘤疫苗治疗人类肿瘤带来了新的希望.

1 逆转录病毒介导的基因转移

逆转录病毒介导的基因转移(retroviral-mediated gene transfer, RMGT)具有两大特点:一是转移效率高.该病毒一次可感染大量细胞,转染率达100%;二是宿主范围广.经过不断改造的逆转录病毒可感染包括人在内的多种动物细胞,不仅能将目的基因引入粘附细胞,还可引入多种悬浮细胞及造血干细胞.由于这些特点,重组逆转录病毒载体有可能成为肿瘤及某些人类遗传性疾病基因治疗中最有希望的载体系统.

有关逆转录病毒载体的构建及转染过程等国内外已有不少报道^[2,3],这里仅就RMGT的影响因素及安全性进行讨论.

1.1 影响RMGT转染效率的因素

RMGT的转染效率主要由病毒载体的滴度、靶细胞的增殖状态等因素决定.病毒的滴度取决于载体的大小、*gag*区的长度、插入基因中是否含有使载体基因组不稳定的序列、包装细胞系的质量以及将载体导入包装细胞系的方法等^[4].一般说来,载体越小,病毒滴度越高,而载体的大小主要由其中的目的基因的大小所决定.目前的逆转录病毒载体所能携带的基因片段 $\leq 8\text{kb}$,不利于较大基因或需较长启动子

序列的基因进入靶细胞.如何在不降低病毒载体滴度的前提下增加载体携带较大基因片段的能力,尚需进一步研究.另外,在构建某些载体时发现,如在保留的 ψ 区之外再加上*gag*基因靠近5'端的区域,同时将其起始ATG突变为TAG以阻止病毒蛋白的产生,可将病毒载体的滴度提高10倍左右.

1.2 RMGT所涉及的危险性因素

尽管在实际应用中尚未发现因使用RMGT而导致宿主基因突变等严重后果,但RMGT技术中一些理论上的风险因素至今仍未完全排出.

1.2.1 插入突变 目前尚不能将逆转录病毒载体的插入控制为定点插入,因此,携带目的基因的逆转录病毒载体进入靶细胞后往往是随机插入到靶细胞整个基因组的任一个区域(尤其是具有转录活性的区域),其结果可能导致插入突变(insertional mutagenesis),造成某个基因的异常分裂或调节失常,最终使细胞生长失去控制而产生恶性变.但由于肿瘤的发生往往具有一定的潜伏期,且有时候需多个突变基因及某些环境因素的共同作用,故要确定RMGT是否会引起某些继发性肿瘤,还需要人类的临床实践以及在灵长类动物身上进行长期研究才能得出最后结论.

1.2.2 复制活性的恢复 重组后的逆转录病毒为复制缺陷型病毒,本身不能在体内复制、扩散,但由于人体基因组中含有许多内源性逆转录病毒序列(HERV)以及包装细胞系“质量”等原因,逆转录病毒载体有可能因此而恢复复制功能.不过,由于MoMLV(小鼠Moloney白血病毒,为经过改造的、目前广为应用的逆转录病毒载体的前身)留在载体中的部分与目前所知的HERV几乎没有同源性,故出现重组的可能性极小.此外,存在于增强子、启动子及tRNA结合位点这几处的差异也有助于防止功能性重组病毒的产生.包装细胞系经过近年来的不断改造也大大降低了产生复制病毒的可能性^[5].如将*gag-pol*和*env*基因分别置于两个质粒上导入来构建包装细胞系,这样一

来, 包装细胞系基因组要与载体发生多次重组才可能产生复制型病毒, 但这种概率极低, 因而提高了载体的安全性. 还可在 *gag* 起始位点上引入一个终止密码子, 通过降低载体与包装细胞系基因组之间的同源性来避免产生复制病毒. 最后, 所有病毒载体在用于患者之前应当进行严格筛选, 对于使用 RMGT 后怀疑有病毒感染患者应尽早进行检测, 如使用 PCR 技术能从 10^9 个细胞中检测出 1 个复制型病毒感染细胞^[6], 灵敏度极高.

1.2.3 不相关遗传物质的污染 病毒载体在包装细胞系内进行装配时有可能将包装细胞的 mRNA 一起装配进去, 该 mRNA 可随载体一起进入靶细胞, 并被逆转录, 嵌合进靶细胞基因组. 由于这种情况较为罕见, 对其产生的条件、意义及后果等目前尚不清楚.

2 导入肿瘤细胞的目的基因

肿瘤细胞能在体内生长而不被机体的免疫系统所排斥, 除肿瘤诱导的免疫抑制外, 肿瘤本身的免疫原性较弱也是一个重要原因. 因此, 作为导入肿瘤细胞的目的基因应当是能直接或间接增强肿瘤免疫原性的遗传分子, 这主要包括编码以下几类分子的基因.

2.1 肿瘤特异性抗原

一些实验室最近已从人及动物的某些肿瘤中成功地分离并克隆出细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 所识别的特异性抗原基因^[7], 结束了长期以来有关人类肿瘤是否存在肿瘤特异抗原的争论. 将这类基因转移到丢失该基因的肿瘤细胞中使其表达相应的特异性肿瘤抗原, 然后免疫接种到切除肿瘤的患者身上, 对预防肿瘤的复发、扩散以及微小转移灶的治疗可能具有重要意义. 此外, 对于某些病毒源性肿瘤^[8], 其致癌病毒可看作为这类肿瘤的特异性抗原. 因此, 将编码该病毒抗原的某些基因转移到这类肿瘤细胞内也可起到增强肿瘤免疫原性的作用.

2.2 肿瘤相关抗原

属于这一类的抗原如黑色素瘤相关抗原 P97 以及 CEA 等多种胚胎性抗原. 由于肿瘤细

胞大都表达一定量的肿瘤相关抗原, 故单独将这类抗原基因导入肿瘤细胞有时并不能改变肿瘤的免疫原性^[9]. 因此, 目前一般是将编码某种肿瘤相关抗原的基因构建到一种对人体无毒的病毒 (如痘苗病毒) 上获得重组病毒疫苗^[10], 然后再用这种疫苗进行免疫接种. 对于表达肿瘤相关抗原的肿瘤患者, 使用带有肿瘤相关抗原基因的疫苗可能会产生两种结果. 一方面, 因体内已产生免疫耐受而使接种无效; 另一方面, 因肿瘤相关抗原也表达于某些正常组织, 肿瘤疫苗诱导的抗肿瘤免疫反应可能会伤及这些组织.

2.3 主要组织相容性抗原

组织移植实验表明, 主要组织相容性复合体 (MHC) 的吻合程度是决定移植植物是否被机体排斥的一个重要因素, 也即 MHC 抗原可作为机体免疫系统特别是 CTL 识别的靶结构之一. 已经发现, 许多肿瘤都存在 MHC 抗原特别是其中的 I 类抗原表达低下或缺如, 这可能是肿瘤细胞逃避 CTL 杀伤进而逃避免疫的一个重要原因. 将编码 I 类 MHC 抗原的基因转移到多种小鼠和人黑色素瘤细胞后发现^[11], 这些肿瘤的 I 类抗原表达增强, 肿瘤的恶性程度下降, 侵袭力降低, 并能在不同程度上诱导机体产生特异性 CTL, 保护机体免受野生型肿瘤细胞的攻击.

除 I 类抗原外, 已经证明转染 I 类 MHC 抗原基因也能提高某些肿瘤的免疫原性, 并能诱导机体产生较强的抗肿瘤免疫反应^[12].

2.4 细胞因子

将编码某些细胞因子的基因转移到肿瘤细胞内以增强其免疫原性是目前的热门课题之一^[13]. 已经报道的有白细胞介素 (interleukin, IL) 1—7、IL-10、干扰素 (IFN) α 、 β 、 γ 、肿瘤坏死因子 (TNF), 集落刺激因子 (CSF, 包括 G-CSF、M-CSF 及 GM-CSF) 以及单核细胞趋化蛋白 (MCP) 等. 其中, 研究较多且被认为较有效的主要有 IL-2^[14]、IL-4^[15] 和 IFN- γ ^[16]. 总起来说, 经细胞因子基因转移后的这类肿瘤细胞一般具有下述特点: a. 转染细胞的体

外生长多不受影响,但致瘤性(tumorigenicity)下降;b.某些表面分子(如MHC抗原等)表达增加;c.免疫原性增强;d.对自然杀伤细胞(NK)及淋巴因子活化杀伤细胞(LAK)特别是对CTL的杀伤敏感性增加;e.可诱导机体产生特异性抗肿瘤免疫反应及一定的免疫记忆;f.可诱导外周血淋巴细胞杀伤未经转染的亲本肿瘤细胞;g.对某些有转移灶的带瘤宿主有一定的免疫治疗效应;h.转染细胞的某些癌基因(如C-myc)表达下降;i.转染细胞经放射线照射后,其细胞因子的分泌在短期内多不受影响。

2.5 突变癌基因及抗癌基因

某些由于细胞内癌基因突变或易位形成的肿瘤,其细胞表面可表达某种较特异的抗原分子,如ras癌基因突变后形成的肿瘤,其细胞表面出现的转化蛋白可被CTL识别^[17]。因此,将某些突变癌基因引入肿瘤细胞来增强其免疫原性是一条值得探索的途径。此外,将某种抗癌基因导入肿瘤细胞除能降低肿瘤的恶性程度外,也有可能增强其免疫原性^[18]。

2.6 微生物

一些微生物如痘苗病毒、结核杆菌(BCG)等往往具有较强的免疫原性,因此,将编码这些微生物某些成分的基因导入肿瘤细胞可增强肿瘤的免疫原性。Lukacs等^[19]将编码微生物热休克蛋白65(hsp65)的基因转染到小鼠巨噬细胞系肿瘤J774中发现,表达hsp65的肿瘤细胞丧失了在同系小鼠身上形成肿瘤的能力,经这种疫苗免疫后的小鼠对随后攻击的野生型J774细胞有较强的抵抗力,说明这种疫苗能有效地诱导机体产生抗肿瘤免疫反应。

2.7 其它

按照T细胞活化的双信号学说,除了MHC抗原和肿瘤抗原联合提供的第一信号外,T细胞还需肿瘤细胞表面的某些粘附分子(adhesion molecule,AM)提供第二信号才能被完全激活。最近的实验表明^[20],当把编码粘附分子B7的基因转移到小鼠黑色素瘤细胞后,肿瘤细胞的免疫原性明显增强,能够诱导

机体的CD8⁺CTL细胞产生特异性抗肿瘤免疫反应,保护89%的小鼠免受V-K1735黑色素瘤细胞的攻击。

3 问题及展望

就基因转移技术本身而言,发展高效、安全的逆转录病毒载体仍是一项重要任务。高效即通过提高病毒滴度,使之达到或超过 10^{10} CFU/ml,以此增强基因转移的效率;安全性主要是通过对载体进行调节控制使目的基因能定向插入到靶细胞的特定位点,避免插入突变等不良反应的产生。

导入肿瘤细胞的目的基因本身是否有效是直接影响到这类肿瘤疫苗效果的另一个重要因素。一方面,由于所使用的方法及肿瘤细胞类型的差异,同一种基因导入不同的肿瘤细胞后可能会产生不同的效果^[21]。因此,应当对外源基因导入后肿瘤细胞膜表面及细胞内的分子变化进行深入研究,寻找出能产生免疫效应的分子机制;另一方面,有些基因(如某些细胞因子基因)的表达产物往往具有多重效应功能,它们对肿瘤细胞既有抑制作用也有促进作用^[22],所以,在设计用于修饰肿瘤细胞的目的基因时应当充分考虑到这些具有“双重”效应的基因可能会产生的副效应。

为提高肿瘤基因工程疫苗的效果,将具有协同作用的某两个或多个基因同时引入肿瘤细胞可能是一种较为有效的方法。如联合将IL-2和IL-4基因转移到小鼠肺癌细胞后诱导的免疫效果明显强于单用IL-2或IL-4基因转移的效果^[23]。

总之,利用基因转移技术来修饰肿瘤细胞为肿瘤疫苗的研制开辟了一条新途径。相信随着基因转移技术的不断发展和完善,肿瘤基因工程疫苗最终会走出实验室造福于广大肿瘤患者。

参 考 文 献

- 1 Schirmacher V. Cancer Surveys, 1992; 13: 129
- 2 孙洁提,陈诗书. 生命的化学, 1992; 12: 1

- 3 Eglitis M A, Kantoff P, Gilboa E *et al.* Science, 1985; **230**: 1395
- 4 Armentano D, Yu S F, Kantoff P W *et al.* J Virol, 1987; **61**: 1647
- 5 Miller A D. Human Gene Therapy, 1990; **1**: 5
- 6 Morgan R A, Cornetta K, Anderson W F. Human Gene Therapy, 1990; **1**: 136
- 7 Boon T. Int J Cancer, 1993; **54**: 177
- 8 Hellstrom K E, Hellstrom I. Cancer Investigation, 1992; **10**: 285
- 9 Robbins P F, Kantor J A, Salgaller M. Cancer Res, 1991; **51**: 3657
- 10 Kantor J, Irvine K, Abrams S *et al.* Cancer Res, 1992; **52**: 6917
- 11 Kawakami Y, Zakut R, Topalian S L *et al.* J Immunol, 1992; **148**: 638
- 12 Ostrand-Rosenberg S, Thakur A, Clements V. J Immunol, 1990; **144**: 4068
- 13 Gansbacher B, Rosenthal F M, Zier K. Cancer Investigation, 1993; **11**: 345
- 14 Connor J, Bannerji R, Saito S. J Exp Med, 1993; **177**: 1127
- 15 Golumbek P T, Lazenby A J, Levitsky H I *et al.* Science, 1991; **254**: 713
- 16 Ogasawara M, Rosenberg S A. Cancer Res, 1993; **53**: 3561
- 17 Peace D J, Chen W, Nelson H *et al.* J Immunol, 1991; **146**: 2059
- 18 Cajot J, Anderson M J, Lehman T A *et al.* Cancer Res, 1992; **52**: 6956
- 19 Lukacs K V, Lowrie D B, Stokes R W *et al.* J Exp Med,

1993; **178**: 343

- 20 Townsend S E, Allison J P. Science, 1993; **259**: 368
- 21 Hock H, Dorsch M, Kunzendorf U *et al.* Cancer Res, 1993; **53**: 714
- 22 Ohe Y, Podack E R, Olsen K J *et al.* Br J Cancer, 1993; **67**: 939
- 23 Ohe Y, Podack E R, Olsen K J *et al.* Int J Cancer, 1993; **53**: 432

Gene Transfer and Genetically-Engineered Tumor Cell Vaccine. Fu Tihui, Xie Zhirong (Department of Biochemistry, Sichuan Cancer Institute, Chengdu 610041, China).

Abstract The newly developed technique of retroviral-mediated gene transfer (RMGT) which mainly involves the transfecting efficiency and safety aspects of RMGT were discussed. And the characteristics and effects of some exogenous genes which could be used to modify the immunogenicity of tumor cells were also classified and presented. Finally, the problems existed both in RMGT and in the preparation of genetically-engineered tumor cell vaccine were analysed.

Key words gene transfer, retroviral vector, immunogenicity, genetically-engineered tumor cell vaccine

视皮层神经元活动的振荡和同步振荡现象*

曾晓东 汪云九 齐翔林

(中国科学院生物物理研究所视觉信息加工开放研究室, 北京 100101)

摘要 视皮层神经元电活动的振荡和同步振荡现象是神经生理学实验的最新发现之一。这一研究成果在认知科学界引起广泛关注。学术界对它在认知心理学上的解释、作用及意义有不同的评论。

关键词 振荡, 同步, 神经元活动, 皮层

* 国家攀登计划资助项目, 国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1994-01-18, 修回日期: 1994-09-10