



1990

医药卫生科学技术进展

中国人民解放军总后勤部卫生部编

人民军医出版社

医药卫生科学技术进展

中国人民解放军总后勤部卫生部 编

人民军医出版社

内 容 提 要

本书反映了医药卫生领域内的某些重要学科、专业或研究课题的国内外研究现状及发展趋势。汇集文章共 30 篇, 其中属于基础医学方面的有基因工程疫苗、神经肽、免疫毒素、单克隆抗体技术及医药生物技术等的研究进展; 临床医学方面的有肿瘤、口腔保健、显微外科及多器官衰竭等的研究进展; 军事医学方面的有放射病诊断与治疗、放射卫生防护及潜艇脱险与救生等的研究进展; 生物医学工程方面的有传感器、图像分析和自动控制技术的研究进展。此外, 本书还涉及低温技术在医学中的应用等内容。

本书读者对象为从事医药卫生领域的科研、教学、临床工作人员, 科学管理人员及卫生部门各级领导。

医 药 卫 生 科 学 技 术 进 展

总后勤部卫生部 编

*

责任编辑: 李春德

人民军医出版社出版

(北京复兴路 22 号甲 3 号)

(邮政编码: 100842)

军事医学科学院情报研究所印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

*

开本: 787×1092mm 1/16·印张: 9·字数: 225 千字

1991 年 3 月第 1 版 1991 年 3 月第 1 次印刷

印数: 1~3 000 定价: 6.50 元

ISBN 7-80020-240-2/R·199

368/16

前 言

为了提高医药卫生水平，增强人民健康，使医药卫生更好地为国防现代化服务，为我国社会主义建设服务，总后勤部卫生部聘请军内医药卫生专家撰稿，委托军事医学科学院情报研究所主办，编辑出版了《医药卫生科学技术进展》，供中高级科研、教学和临床人员、各级科管人员和卫生部门领导参阅。自1988年开始每年内部出版一册，1990年由人民军医出版社正式出版发行。

本《进展》反映医药卫生领域重要学科、专业或研究课题的国内外研究现状、水平和发展趋势，在基础医学、临床医学、预防医学、军事医学、中医学和药理学等领域内选题，以新近文献和科技成果材料为主，力求内容新颖，论述全面，文字简炼。因此，本《进展》不仅可供有关人员了解有关学科或专业领域的进展概况，而且还可作为制定规划、计划的论证参考材料。

1990年《进展》共收集了30篇文章，内容涉及医药卫生10多个学科或专业。作者收集了大量资料，运用自己的丰富知识和实践经验，阐述了有关领域内令人感兴趣的问题。读者可以从这些文章中获得有益的启示。

本《进展》在总后勤部卫生部的领导下，全军各单位领导和医药卫生专家对这项工作给予了大力支持。借此，我们对他们表示衷心的感谢。

我们期望通过努力，为读者提供有益的信息。有错误或不当之处，敬请批评指正。

军事医学科学院情报研究所

1990年12月

目 录

基因工程疫苗研究的进展	黄翠芬 (1)
溶血栓药物基因工程研究进展	黄培堂 (5)
免疫毒素研究进展	沈倍奋 (9)
生物工程下游纯化的研究进展	徐明波 (13)
当前医药生物技术研究发展特点与趋势分析	武士华 (18)
单克隆抗体技术在军事医学中的应用概况	杜凤荷 (21)
生物毒素在军事上应用研究的进展	廖应昌 (28)
神经肽对血管运动的调节及其在心血管疾病中的意义	林树新 (31)
受体与疾病关系研究的进展	吕宝璋 (35)
肿瘤临床基础理论研究进展	纪小龙 李维华 (42)
虫媒病毒研究进展	鲁志新 李忠义 (50)
心脏功能非创伤性检查方法的进展	臧益民等 (54)
显微外科进展	朱盛修 (60)
上消化道出血疗法进展	陈百川 (64)
脊柱、脊髓损伤诊断与治疗研究进展	胥少汀 (68)
烧伤感染的研究进展	郭振荣等 (72)
创伤后多系统器官衰竭研究进展	胡 森 盛志勇 (77)
口腔预防保健的发展概况	汪一鸣 (86)
急性放射病诊断和治疗研究的进展	李盈棋 (89)
军队的放射卫生防护问题	郭力生 (94)
军事精神医学研究进展	杨景端 游国雄 (98)
潜艇脱险与救生研究现状及发展趋向	龚国川 (103)
舰艇振动的研究现状及展望	胡正元 (107)
失重生理研究现状与展望	庄祥昌 (110)
生物医学电子工程的发展动态	
——兼谈生物医学电子工程在我军医学发展中的作用	董秀珍等 (115)
传感器在医学中的应用研究进展	何铁春 (119)
图象分析技术在定量病理学中的应用	张振声 (123)
微束分析技术在生物医学中的应用现状及其发展前景	张德添 (127)
自动控制技术在麻醉中的应用	李鲁平等 (131)
医用冷冻保存技术研究进展	陈圣清 (134)

基因工程疫苗研究的进展

军事医学科学院生物工程研究所 黄翠芬

摘要 本文简述了近几年来用遗传工程技术研究新疫苗的进展。我国开展此项研究虽然较国外晚5年左右,但在细菌、病毒重组疫苗方面还是取得了可喜的成绩。如已经证明霍乱疫苗安全有效,成果正在申报鉴定中。乙型肝炎病毒疫苗是国内重点攻关课题,已成功地制成了哺乳动物细胞及痘苗病毒表达系统两种制剂,分别通过了生物制品鉴定,正进行中试及临床观察。此外,还讨论了新疫苗发展的一些内容及当前我国研制新疫苗存在的问题。

疫苗接种能够预防传染病,这是早在200年前已为詹纳用牛痘预防天花所证实,但至1980年天花才绝迹。其它传染病如脊髓灰质炎、麻疹、白喉、风疹等经多年使用相应的疫苗后,亦得到一定的控制。可见,良好的免疫效果有赖于诸多因素的影响,如高质量的疫苗、合理的使用方法、高免疫覆盖率等。又如40年代由于抗生素及化学药物问世,有明显的治疗效果,使疫苗研究一度陷入低潮,被治疗药物所取代。随着抗药性的增加,严重影响了治疗效果;加之人口流动频繁,疾病的传播难以控制,因而疫苗的研究又受到重视。

沿用的疫苗主要有灭活疫苗、减毒疫苗等。灭活疫苗一般是全菌灭活,所含杂质多,副反应大,效果不佳,安全得不到保证,难以推广,这是该疫苗的一些弱点。

随着分子生物学理论及技术的发展,人们对致病因子及其结构与功能的认识日渐深入,促进了新疫苗的研究。例如致病因子染色体或质粒DNA的分离鉴定、重组克隆、筛选目的DNA片段、重组至载体、转入适当的受体而制成疫苗。还可利用体外系统,鉴定抗原蛋白的特性,检测其基因序列,推算其一级结构,在此基础上,通过定向诱变技术,改变其结构,以增强免疫原性或稳定性等。

1986年世界卫生组织提出发展中国家值

得考虑研究的十多种新疫苗,可分为三类:

(1) 急需研究的疫苗有肺炎菌、恶性疟疾、轮状病毒、伤寒(Ty21a)、痢疾。

(2) 中度需要的有乙型肝炎病毒、流感B型、大肠菌、链球菌A型、伤寒(Aro A)、麻疹、霍乱、呼吸道合胞病毒、副流感、狂犬病毒(Vero细胞衍生或糖蛋白)。

(3) 可逐步研究的有甲型肝炎病毒、脑膜炎、黄热病、登革热、乙型脑炎病毒。

这里提到的疫苗,其急需程度应视当地的情况而定。同时这些疫苗的研究也有难易之分,有些虽然急需,但难度大,只能逐步开展。在上述疫苗中,与腹泻有关的就有轮状病毒、痢疾等5种之多。

发展中国家长期以来急性腹泻是婴幼儿发病率和死亡率最高的传染病。世界卫生组织统计1987年5岁以下儿童死亡人数为1400万,其中腹泻死亡占500万。腹泻发病急,传染快,平时战时均是所有人群需要免疫预防的疫苗。我国80年代初开始用DNA重组技术研制的新疫苗进展情况见附表。

从附表可见研究对象包括了细菌、病毒、寄生虫等。这些病原菌的保护性抗原有些是很难制备的,有些产量甚微,有些免疫原性不强。

下面举例说明用新技术研究的情况。

附表 我国疫苗研制进展

疫 苗	进 展 情 况
乙型肝炎病毒	1. 用 CHO 细胞及痘苗病毒系统研制的乙型肝炎表面抗原(S)重组疫苗, 正进入中试 2. Pre S+S 和 Pre S ₂ +S 克隆至昆虫核多角病毒载体中, 得到表达
轮状病毒	1. 获得了成人腹泻轮状病毒的 11 个基因片段的 cDNA 克隆 2. 获得了婴儿轮状病毒 Wa 株第 9 基因 5 型腺病毒重组株
鼻咽癌病毒亚基	获得了表达 EB 病毒膜抗原的 CHO 系, 也可用痘苗病毒表达
流行性出血热病毒	1. 家鼠型出血热病毒的 cDNA 克隆 2. 野鼠型病毒 S 基因在痘苗病毒中表达成功
霍 乱	1. 菌体 O 抗原及肠毒素 B 亚基(CTB)的克隆及表达 2. CTB-灭活菌混合苗正申请临床试用 3. CTB+伤寒 Ty21a 双价疫苗实验研究完成
痢 疾	1. 体内重组宋内-志贺疫苗和宋内-福 2a 疫苗临床试用 2. 体外重组外膜蛋白、志贺毒素的基因克隆
产毒素性大肠杆菌 (ETEC)	1. 获得了 LTB 基因克隆及表达 2. 获得了菌毛 I 型基因克隆及表达
日本血吸虫病	1. 构建了基因文库, 获表面抗原和卵壳蛋白基因克隆 2. 纯化鉴定了 24~26kDa 和 90kDa 靶抗原、单克隆抗体及抗独特型抗体
脊髓灰质炎	以痘苗载体组建了三个 P 型 VP1 质粒
甲型肝炎病毒	以痘苗载体表达了甲型肝炎病毒的 VP2 和大分子 VP, 免疫家兔血清中产生中和性抗体

一、细菌重组工程疫苗

首次研究成功的是荷兰的幼畜腹泻疫苗。研究人员在 ETEC 菌中分离出菌毛 K88 基因, 使之在 K-12 大肠菌中克隆表达。制成的疫苗能很好地预防幼畜 ETEC 感染。荷兰 Akzo 公司 1982 年已投入生产。我国亦于 1984 年初步研究成功 K88-LTB, K88-K99 的双价工程苗, 预计 1991 年可正式投产。

霍乱是烈性传染病, 全球大流行已有 7 次之多。主要在印度、巴基斯坦、尼泊尔、孟加拉国等亚洲及非洲一些国家流行, 已证实疫苗是最佳的预防措施。霍乱工程疫苗有多种, 如 Texas Star SR, JBK70 (A⁻B⁻) 和 CVD101

(A⁻B⁺) 等, 虽然有一定效果, 但接受免疫接种者约 5%~20% 发生腹泻, 难以应用。比较有希望的是灭活菌 (WC) 和肠毒素 B 的混合疫苗。这种疫苗的研究基于对霍乱致病和免疫的认识。霍乱菌首先在肠道粘附、定居、繁殖、产生肠毒素 (CT)。CT 含两种亚基, B 亚基无毒而有免疫原性, 与肠神经节苷脂 GM₁ 结合, 起锚定作用, A 亚基进入胞内, 使 cAMP 上升, 大量分泌体液, 电解质失去平衡, 产生水样腹泻。菌体表面 O 抗原有杀菌作用, CTB 有抗毒素作用, 两者结合有协同效应。目前 CTB 的研究已很成功, 因而制成了 WC-CTB 混合疫苗。1985 年以来, 进行过多次现场试用, 包括各年龄组, 约 9 万

名。将 WC 与 WC-CTB 对比, 结果只用 WC 疫苗, 其保护率为 58%; 而用 WC-CTB 免疫, 保护率可达 85%, 有效期持续 3 年。另外, WC-CTB 疫苗还能保护 67% 的 ETEC 患者。过去 WC 疫苗保护时间短, 从成本-效益计算不值得免疫。现在的新疫苗, 提高了免疫效果。至今霍乱仍难以控制, 孟加拉国每年至少 3 万患者死亡, 全球约 20 万以上患者死亡。由于该疫苗有应用价值, 我国已初步研究成功, 正在鉴定中。

二、病毒重组工程疫苗

由于病毒结构比较简单, 适于采用 DNA 重组技术研究。编码流感、乙型肝炎、疱疹、狂犬及口蹄疫等病毒免疫蛋白基因已能在大肠菌或哺乳动物细胞中表达, 这就为制备病毒工程疫苗提供了方便。但有时这些基因的表达产物与天然蛋白不完全相同, 性能尚有差别, 说明表达产物的结构是生物活性的关键。

乙型肝炎 (HB) 疫苗是较早研究而较成功的一种病毒工程疫苗。全球开发 HB 疫苗的公司和机构有 80 多家。因为全球病毒携带者在 2 亿人以上, 患者达数千万人。国外 1982 年用血源疫苗作预防接种, 此种疫苗除受血源限制外, 还可能受到艾滋病毒污染的威胁, 有些国家已停止生产。我国 1985 年开始生产血源疫苗, 5 个生物制品所年产约 600 万人份, 远远不能满足要求。国外 70 年代末即开始基因工程疫苗的研究, 主要集中研究开发酵母、哺乳动物细胞、痘苗载体共三个系统, 酵母系统较成熟, 也最安全。

乙肝病毒含多种抗原, 即表面抗原 (S) 核心抗原 (c) 和 e 抗原等。其中 S 抗原的免疫保护作用最明显, 因此疫苗的抗原成分以 S 为主, 此外还发现如加入前 S (Pre-S) 则免疫效果更佳。日本正在研究第三代乙肝疫苗含前 S₂, 防御乙型肝炎病毒感染最有效。

国内乙肝疫苗在“六五”期间为国家重点研究项目, 目前在临床观察阶段, 预计 1991 年

可正式投产。投产后每年可提供 2 000~3 000 万人份。血源疫苗 30 美元/人份, 世界卫生组织拟在全球使用, 每剂价格定为 1 美元。如大规模实施, 全球将有 20 亿人适于接种。

三、合成肽疫苗

生物新技术的进展, 能根据核苷酸排列推测其氨基酸的组成, 并由此合成肽段制备疫苗。合成肽的潜能在于能诱导中和抗体及 (或) 诱导免疫记忆的形成。这里以疟疾为例。疟疾威胁着全世界约 2 000 万人, 世界卫生组织估计每年约 300 万人死于疟疾。因此研究疟疾疫苗对平时、战时都是重要的。

目前最有兴趣的是环子孢子蛋白抗原 (CSP), 此抗原能阻止蚊虫感染发病的最初阶段, 但如有个别子孢子逃避免疫屏障, 仍可致病。因此, 理想的疫苗组成还应包括引起疟原虫无性红内期反应的免疫原, 以阻止红细胞感染, 抑制引起临床症状的红内期出现, 缩小配子体的储存。但各期的表面抗原很复杂, 且变异多, 是困难的一个方面。

恶性疟原虫 (*P. falciparum*) 含 CSP, 由 37 个四肽 (Asn-Ala-Asn-Pro) 的重复所构成, 是一个比较保守的结构域, 可通过化学合成, 进行分子克隆, 与载体组合, 加上佐剂进行免疫。经动物试验证明, 可产生良好的中和性抗体。美国 FDA 已批准人体使用。但此疫苗尚有一定的局限性, 还需进一步研究。

四、抗独特型抗体疫苗

抗原分子一般很大, 但只有少数独特结构有免疫作用, 其中又只有一小部分有中和性免疫作用。要制备疫苗, 首先要了解靶抗原性结构及其蛋白质组成。方法是将天然蛋白抗原裂解, 筛选具抗原性部分或用中和性单克隆抗体以鉴别相关抗原位点。由于构象是抗原特异性的决定因素, 用晶体研究蛋白质的三维结构也很必要。对许多蛋白质来说, 初级序列虽然已知, 但晶体数据还很缺乏。因此要根据计算机

分析以预测抗原决定簇, 积累多方面的数据才能有助于设计。此种疫苗用于预防传染病尚在探索阶段。

五、新疫苗发展的前景

根据上述的情况, 用生物新技术研制疫苗, 以获得高效安全的制品是完全可能的, 但很重要是要重视致病和免疫机理的研究, 有目的地寻找具有保护作用的抗原基因/基因组, 为组构新疫苗提供依据。

基因载体-受体系统的研究亦十分重要, 它可以提高产品的质量和产量。目前采用的各种系统各有其优缺点及适用范围, 还有待深入研究。例如抗原蛋白质最好是能分泌至胞外, 一方面易于纯制, 另一方面分泌蛋白的构象易与天然蛋白一致, 保证其抗原特性。又如以无毒鼠伤寒为受体菌取代大肠杆菌制备预防腹泻疫苗, 经口服免疫, 菌体可粘附及侵袭集合淋巴结, 在其间繁殖, 侵袭深层组织, 刺激细胞免疫。细胞免疫与体液免疫的协同, 大大提高了免疫效果。

将有意义的抗原基因合理地组合, 为多价疫苗的构建提供了可能性。例如痘苗病毒是一个 186kb 的大 DNA 基因组, 可容纳 20~25kb 的外源 DNA。目前已成功地组合了 HBsAg、HSV、糖蛋白 D、疟疾 CS、疱疹性口炎病毒 G 蛋白、EB 病毒膜抗原等, 一次接种可引起多价免疫的作用。又如腹泻疫苗, 由于各致病菌间有许多共同的特性, 相似的 DNA 结构, 如将之适当的组合, 就可构成多价腹泻预防疫苗, 在使用和效果上都是比较实际的。

由于合成肽苗、亚基疫苗的发展, 免疫佐剂的研究亦应得到重视, 因为这些抗原分子小, 必须与佐剂结合才能提高免疫力。如脂质体、DEAE-葡聚糖等佐剂的研究很引人注目。另外, 有些 DNA 片段既可作为载体, 同时也可起到佐剂的作用。例如霍乱 CTB 与流感病毒 HA-DNA 偶联疫苗, 鼻腔免疫能产

生 IgA 及血清抗体, 较口服效果强 100 倍。

六、存在问题

1. 新疫苗的研究周期长, 完成实验室研究→小试、中试生产工艺研究→临床观察→试生产, 一般要 10 年时间或更长, 所需经费高, 效益则应以社会效益(包括军事效益)为主, 而经济效益不很高。

2. 我国生物制品生产基地不足, 疫苗只能在指定的少数生物制品所生产。目前遗传工程产品陆续研究成功, 但没有生产单位承担试制, 使科研成果迟迟不能转化为商品。我军没有正式生产基地, 军内成果更难发展。

3. 要提高免疫效果, 应加强管理, 例如提高全民免疫覆盖率就是关键措施。白喉、破伤风、百日咳和脊髓灰质炎的发病率持续下降可以说是免疫覆盖率高的结果。军队生活在社会人群之中, 在突发事件和自然灾害情况下, 军民均同样有机会获得传染病, 应有统一的规划, 保证免疫接种以减轻传染病的流行。

参 考 文 献

1. 吴志纯. 生物工程进展 1989; 9: 28.
2. 陈添弥, 等. 中国科学B辑 1989; 12: 1281.
3. 马清钧, 等. 中国科学B辑 1988; 5: 516.
4. Arnon R. Synthetic vaccine. Boca Raton: CRC Press, 1987.
5. Chen TM, et al. Science in China series B. 1990; 33: 11.
6. Formal SB. Rev Infect Dis 1989; 11(suppl): 3.
7. Holmgren J, et al. Microbiological toxin and diarrheal diseases. London: Ciba Foundation symposium. 1985: 234.
8. Kohler H. Vaccines: New concepts and developments. New York: Longman Scientific & Technical, 1988.
9. Levine MM. Microbiol Rev 1983; 47: 510.
10. Linde K, et al. Vaccine 1990; 8: 25.

溶血栓药物基因工程研究进展

军事医学科学院生物工程研究所 黄培堂

摘要 本文概述了PA型溶血栓药物基因工程研究的进展,特别侧重于新型第三代溶血栓药物研制的情况。作为第二代尿激酶的单链尿激酶原和组织型纤溶酶原激活剂已有成功表达及大量生产的报道,然而我国目前尚处于落后状态。在“七五”期间对这两种药物的基因工程研究已经开始,估计“八五”期间将有突破性进展。国外普遍开展第三代的研究,国内及军内也已开始,不久将有新型的、更为有效、特异的溶血栓药物投放市场。

血栓病,特别是急性心肌梗塞,在严重地危害着人类的健康和生命。据估计,仅我国每年至少有300万人需溶血栓药物治疗。因此,寻找研制更有效的、副作用小的溶血栓制剂,近年来一直是世界范围的热门课题。这里讨论的溶血栓药物主要指纤溶酶原激活剂,即PA型(plasminogen activator)药物。

目前国内外临床应用的主要是链激酶(SK)及高分子量双链尿激酶(HW·tcu-PA或H-UK)。美国于1987年底批准生产的基因工程产品组织型纤溶酶原激活剂(t-PA),已于数千家医院试用。此外尚有单链尿激酶(scu-PA)也开始试用。前两者属第一代制剂,后两者属第二代制剂。这些药物在发病3h以内应用时,打开冠状动脉的有效率分别为:t-PA约79%,scu-PA约70%~75%,tcu-PA约60%,SK约57%。由于现在尚无更有效的药物提供临床使用,显然,这些PA型药物在治疗急性心肌梗塞中起着重要的作用。然而,它们各自存在不同的缺点,不同程度地存在副作用。如尿激酶可能引起周身出血倾向。这样迫使人们研制第三代PA型溶血栓药物。本文拟在简单介绍第一、二代的基础上重点讨论近三四年内第三代药物基因工程研究的概况。其它如国内多个单位研究并在临床试

用的蛇毒消栓酶,是蛇毒中一种以精氨酸酯酶为主的混合组分,作用机理不清,多不属PA型药物,暂不在此文讨论。

一、第一代纤溶酶原激活剂

链激酶(SK) 它来源于溶血性链球菌,尽管它同样可以激活纤溶酶原变成纤溶酶,但其作用机制和u-PA、t-PA不同。它首先与纤溶酶原形成1:1的复合物,并导致其分子构象变化,复合物很快变成SK-纤溶酶,从而具有纤溶酶活性。

临床使用SK的结果表明,在栓塞形成的头4h内,及时静脉注射SK,可使心肌梗塞的死亡率降低约60%。但由于它是一种异于人体的细菌蛋白,重复使用时将发生严重过敏反应。

尿激酶(u-PA) 由于最早发现于新鲜人尿中而得名。u-PA有几种分子形式,而第一代u-PA通常是指分子量为47~55kDa的高分子量双链尿激酶(或H-UK)和分子量为31~34kDa的低分子量尿激酶(L-UK),两者均有PA活性。目前临床使用的u-PA仍是从新鲜人尿中分离纯化得到的。据估计,国际上85%以上的u-PA粗制品来自我国。相对于SK来说,u-PA的主要优点是毒副作用

小,无抗原性,已较广泛用于治疗各种类型的血栓病。然而,尽管尿液来源方便,但大量提取仍受到外部条件和因素的影响。美国 Abbott 实验室 Ratzkin 等和比利时布鲁塞尔大学 Bollon 等 1980 年先后报道了 u-PA 的基因克隆研究,并获得表达有 PA 活性的蛋白,但至今尚无产品上市。临床资料表明,由于这种双链的尿激酶对纤维蛋白没有选择性,其纤溶作用是周身性的,可造成血流中的纤维蛋白原的降解,因而造成出血倾向,甚至发生颅内出血等严重副作用。此外,还由于其半衰期短,需大量重复使用,因而有可能引起体内纤溶酶过量,使机体处于纤溶状态。

二、第二代纤溶酶原激活剂

主要指早期从组织中发现并于 80 年代初开始研究的 t-PA 和新近从尿中得到并立即进行基因工程研究的单链尿激酶 scu-PA。相对于第一代来说,它们的最大特点是对纤维蛋白具有亲和性,临床应用时引起周身出血的危险性小。

t-PA 因组织及细胞含量甚微,尽管较早发现其功能,但其研究工作进展缓慢。1983 年 Pennica 等首先获得 t-PA 的 cDNA 基因克隆并表达出有 PA 活性的蛋白,使 t-PA 迅速成为各国生物工程公司的重点研究项目。美国 FDA 1987 年 11 月批准 Genentech 公司生产 t-PA,在当年的 5 周内销售额达 5 800 万美元,至 1989 年达 2.8 亿美元。它的 cDNA 序列已全部揭示,蛋白质的二级结构已经预测,为其高效表达及蛋白质工程研究打下了良好的基础。t-PA 不仅有较好的溶血栓作用,而且对中毒性休克、出血性休克引起的弥漫性血管内凝血效果显著,在抢救战地伤员方面也有重要的意义。然而,目前多用真核细胞表达 t-PA,产量少,成本高。1989 年法国一个实验室成功地使 t-PA 基因在原核细胞中表达成功,至少达菌体总蛋白的 5%,且恢复了活性,纯化了蛋白。使这一大分子物质表达研究

及大规模商品化生产进入了一个新的阶段。

scu-PA 它是尿激酶 u-PA 的前体。在人体细胞中含量极微,它极易断开形成高分子量双链尿激酶。1973 年首次发现后,已从胎儿肾细胞、人腺癌细胞及新鲜人尿中少量制备。尽管早已克隆成功,但直到 1990 年初才有一篇真正有意义表达水平的报道,从 1 000L 的细胞培养液中获 51g 的有活性的 scu-PA,也标志着 scu-PA 向着商品化、实用化迈进。

虽然第二代纤溶酶原激活剂在性能方面明显优于第一代,然而它们也存在固有的问题。例如 scu-PA 的 K_2 值小,对纤维蛋白的亲亲和性小,稳定性也不理想;而 t-PA 对纤维蛋白的亲亲和性强,但半衰期短,激活纤溶酶原的速度不如 u-PA 快。因此人们在生产第二代的同时,正大力研制第三代纤溶酶原激活剂。

三、第三代纤溶酶原激活剂

所谓第三代纤溶酶原激活剂,是指针对第二代存在的问题,从 1988 年前后开始进行的对 t-PA 和 scu-PA 分别进行改造或两者与其它物质重组成的杂合分子。为此,许多国家的生物工程公司均不惜重金、竞相投入一流人才和设备进行研究。

t-PA 和 scu-PA 的结构与功能 两者均属于丝氨酸蛋白酶类。成熟的 t-PA 由 527 个氨基酸残基组成,分子量为 68~72kDa。它有 5 个结构域,分别为指形区 (F)、类似生长因子区 (G)、两个环柄区 (K_1 和 K_2) 以及 C 端蛋白酶催化活性区 (P)。因此 t-PA 的分子可表示为 FGK₁K₂P。而 scu-PA 由 411 个氨基酸残基组成,仅有一个 K 区,故其分子可表示为 FGKP。两者的 P 区有 45% 的同源性。PA 分子各结构域在结构与功能方面相对独立。t-PA F 区主要负责纤溶酶原的亲亲和性;G 区和细胞膜受体结合有关; K_1 和 K_2 有较大的同源性,但实验结果表明,t-PA 对纤维蛋白的高亲和性主要是由 K_2 区决定

的,而且 K_2 对其催化速度也是重要的。但目前尚不清楚 scu-PA K 区的功能,尽管它和纤维蛋白的亲合性有关,但强度上要比 t-PA 弱。t-PA 和 scu-PA 功能方面的差异主要表现在非催化活性区,如半衰期、特异性等。但 P 区也有不同,如血液中的纤溶酶原激活剂抑制物 (PAI-1) 能不可逆地抑制 t-PA 和 tku-PA (双链尿激酶),但 scu-PA 几乎不被抑制。这些都是临床应用剂量和效果方面的重要参数,也是第三代激活剂基因改造的重要理论基础和方向。

对 t-PA 分子本身的改造 目前主要集中在两个方面:一是增加 t-PA 的半衰期即稳定性,已取得了一定的进展。例如,Integrated Genetics 公司集中对 t-PA 分子的三个 N-糖基化位点进行改造,有选择地将这些位点上的 Glu 突变为 Arg,得到 7 种糖基化位点突变体。其中有一种在体内的半衰期比天然 t-PA 长 10 倍,纤溶活性也有一定提高。美国费城的 Kalyant 等 1988 年将 t-PA 的 N 端 F 和 G 区核苷酸序列缺失 ($\Delta 2-89$) 后,表达的 t-PA 突变体分子半衰期约为天然的 25 倍。此外,还有些实验室将 5 个不同结构域进行不同组合或缺失某个结构域序列,也得到一些可喜的结果。第二个方面通过改造使 t-PA 在血流中逃逸 PAI 的作用。PAI 是一种 PA 活性抑制物。1989 年美国得克萨斯西南大学医学中心 Madison 等利用点突变和缺失方法证明,t-PA 和 PAI-1 结合位点是位于 P 区的 Lys²⁹⁶-Gly³⁰² 序列。将该序列缺失后,表达产物不再受 PAI-1 的抑制,而催化活性仍保持不变,这一结果曾在美国引起轰动。

对 scu-PA 分子本身的改造 scu-PA 的最大问题是它在血流中的含量极微,一经产生即由高分子量的单链形式在 Lys¹⁵⁸-Ile¹⁵⁹ 处断开,形成一个由二硫键连接的高分子量双链形式 (tcu-PA),tcu-PA 便失去了对纤维蛋白的亲合性。为此,人们将 lys¹⁵⁸ 改为 Thr¹⁵⁹ 或 Gly¹⁵⁸、Glu¹⁵⁸ 等。结果,可保持单链形式,

但催化活性却大大降低。后来有人将 scu-PA 分子的 G 区和 K 区缺失,获得了 Leu¹⁴⁴-Leu⁴¹¹ 的低分子量单链尿激酶 (L-UK) 突变体分子,它具有高分子量单链尿激酶 scu-PA 的某些特性,但对纤维蛋白的亲合性却降低了。此外,通过计算机预测发现 u-PA 和底物结合的“口袋”结构方面的差别,正在进行该方面的探索研究。从总的看,对 scu-PA 本身的改造进展并不太大。

融合蛋白的研究 目前主要从三个方面进行研究:

第一,由于 t-PA N 端对纤维蛋白有较强的特异性亲和力,但其 P 区催化活性不如 u-PA,故近年来一个研究热点是构建含有 t-PA 的 N 端与纤维蛋白特异结合序列 (如 1-263) 和 u-PA 的 P 区 (144~411) 序列的杂合分子,但不幸的是几种杂合分子虽具有对纤维蛋白的亲合性,也有某些催化活性,但两者均较天然 t-PA 和 u-PA 的低。

第二,融合蛋白是将纤溶酶原激活剂的 P 区和亲纤维蛋白的 K 区融合。K 区具有高度保守性,是具有三对二硫键的环状结构。血液中 5 种功能不同的凝血和纤溶蛋白中 K 结构出现 11 次之多。如 scu-PA 含有一个 K 区,t-PA 和凝血酶原 (PT) 各含 2 个,而纤溶酶原 (PG) 则含有 5 个。通过结晶衍射分析,预测了它们的空间结构,找到了 t-PA、PG 和 PT K 区表面凹面结合域及疏水结合中心,而 scu-PA 的 K 区则有差异,不能形成疏水结合位点。因此将 PG 的 K 区和 scu-PA 的 P 区融合,组成新的杂合分子。结果表明,此种分子的纤溶作用较 scu-PA 高 2 倍,比纤维蛋白的亲合性高 8 倍。目前正用基因工程手段探索,将两者序列重组以表达这种融合蛋白。

第三,将抗纤维蛋白的单克隆抗体与纤溶酶原激活剂的 P 区融合。由于该单克隆抗体与纤维蛋白的亲合力要比 t-PA 与纤维蛋白亲合力强,故将单克隆抗体和 u-PA 或 t-PA 的

P 区结合（化学交联）后的融合蛋白在特异性和催化活性方面均有较大的提高。用重组 DNA 技术将单克隆抗体的重链基因和 PA 的 P 区序列融合，导入真核细胞内表达产物能识别纤维蛋白，也有催化活性，但效果并不理想，仅为 t-PA 的 70%。融合蛋白分子量大，表达产物的结构功能等方面的问题尚有待进一步探索。

四、国内研究概况及展望

t-PA 和 scu-PA 的研究均属于国家“863”生物高技术项目。目前上海医科大学、北京大学、南京大学和军事医学科学院均为该项目的承担者。1988 年已获得 t-PA cDNA 全长序列的克隆并在真核细胞中表达出活性产物，但至今尚未达到生产水平。1989 年底军事医学科学院获得 scu-PA 全长 cDNA 的克隆并获得表达。我院已得到这两种纤溶酶原激活剂的基因，并均获得表达，还具有多年从事真核基因表达的经验和技术力量，而上述其它单位仅具有一种基因。从上面所述可以看到，两者互有优缺点，今后的发展方向主要是对其进行改造，或者单个改造，或者融合两者的优点。从这一点来说，我们是有优势的。另外，我国人口众多，患者多，需求量大，必须发展多种制剂或多种表达体系。此外，PA 不仅作为溶血

栓药物，而且也在抢救战地伤员方面具有重要的国防意义。由此看来，我们应在原有研究的基础上，加快研究进程，以获得性能优良的溶血栓药物。

参 考 文 献

1. 程新波, 黄翠芬. 生物工程进展 1988; 6 : 30.
2. Haber E, et al. Science 1989; 243 : 51.
3. Pennica D, et al. Nature 1983; 301 : 214.
4. Nelles L, et al. J Biochem 1986; 261 : 5682.
5. Nelles L, et al. J Biochem 1987; 262 : 10855.
6. Sarmientos P, et al. Bio / Technology 1989; 2 : 611.
7. Haigwood NL, et al. Protein Eng 1989; 2 : 611.
8. Kalyan NK, et al. J Biochem 1988; 263 : 3971.
9. Madison EL, et al. Nature 1989; 339 : 721.
10. Avgerinos GC, et al. Bio / Technology 1990; 8 : 54.
11. Runge MS, et al. Circulation 1988; 78 : 509.
12. Robbins KC, Borchers LG. Biochemistry 1987; 26 : 4661.
13. Klein B, et al. ICSU Short Reports 1988; 8 : 206.

免疫毒素研究进展

军事医学科学院基础医学研究所 沈倍奋

摘要 免疫毒素可以分为两类，一类是抗体与完整毒素的结合物称免疫毒素，另一类是抗体与单链毒素的结合物称单链免疫毒素。它们对靶细胞均显示出特异性细胞毒性，而且这种特异性取决于所用抗体的特异性。由于免疫毒素的细胞毒性比较强，因此它在肿瘤治疗上的应用更受重视。近年来，欧美等国已将免疫毒素进行临床Ⅰ期和Ⅱ期试验。用免疫毒素在体外处理骨髓，用于治疗白血病已取得一定成功，在对黑色素瘤等的治疗上也显示了初步疗效。但免疫毒素的体内应用还存在一定问题，目前正从化学、免疫学、分子生物学的角度探索解决的办法。

抗体与毒素的结合物称免疫毒素，由于抗体与相应抗原的结合是特异的，因此能定向地将交联物中的毒素带到靶细胞上，发挥杀伤细胞的作用，所以免疫毒素也是导向药物的一种类型。本世纪初导向药物的概念已由德国药物化学家 Ehrlich 提出，由于种种原因，如可用于结合的药物不多；抗体的纯度和特异性差；制备结合物的方法不理想等，致使上述设想一直未能实现。随着新的抗癌药物和细胞毒药物的出现，尤其单克隆抗体的问世，使这一领域又活跃起来。目前作为导向药物载体的有抗体、激素、凝集素等，而单克隆抗体由于其特异性较高，常是首选的导向药物载体。导向药物的毒性部位俗称“弹头”，可以是放射性同位素、药物、毒素等。由于常用的抗肿瘤药物的细胞毒性远低于毒素，杀死一个细胞往往需要 10^6 个药物分子，而每个抗体分子上能连接的药物数量又有限，一般为 $10\sim 100$ 个分子。相比之下毒素的细胞毒性更强，它们一旦进入细胞，一个分子毒素即可杀死一个细胞。因此以抗体为毒素载体的免疫毒素的应用更受重视。

一、免疫毒素的类型及作用机理

用于制备免疫毒素的毒素很多，用得最多

的是植物毒素和细菌毒素。根据它们的结构特点可分成两类：一类是完整毒素也称双链毒素，如白喉毒素、红豆毒素、蓖麻毒素等，它们由通过二硫键连接的 A 链和 B 链组成，A 链具有抑制细胞内蛋白质合成的活性，但本身很难进入细胞。B 链本身没有毒性，但具有能与细胞表面受体结合的结合部位。当它与细胞结合后就发挥帮助 A 链进入细胞的作用，因此完整毒素对真核细胞的毒性很大。另一类毒素是单链毒素，它们没有 B 链，只具有完整毒素中 A 链的功能，它们可以从完整毒素中分离出来的 A 链，也可以是自然界本身就存在的单链毒素，例如白树素、肥皂草素和商陆抗病毒蛋白等。由上述两种类型的毒素组成的免疫毒素分别称为免疫毒素和单链免疫毒素。前者由于毒素有 B 链，它与细胞的结合往往引起不取决于抗体的非特异性细胞毒性。对于由蓖麻毒素制备的免疫毒素，这种非特异性毒性可以用乳糖或半乳糖抑制，因为蓖麻毒素的 B 链能与细胞表面含乳糖或半乳糖残基的糖蛋白或糖脂结合。在有半乳糖存在时，这种免疫毒素对靶细胞的毒性很大，这类免疫毒素常用于体外处理骨髓以除去 T 细胞或瘤细胞。由于半乳糖在体内很快被排除，所以不能用它抑制 B 链的非特异性结合。因此，这类

免疫毒素的体内应用受到限制。单链免疫毒素由于没有 B 链，它的特异性完全取决于抗体，但没有 B 链的帮助，使它们穿越细胞膜的能力受影响，表现为对靶细胞的细胞毒性不稳定，一般比完整毒素组成的免疫毒素毒性低，用胺类化合物或亲溶剂体化合物可以提高它们的细胞毒性。

毒素对细胞的毒性是通过几步完成的，首先毒素与细胞表面相应受体结合，然后被内化、移位进入胞浆，最后毒素 A 链发挥抑制蛋白质合成的作用，导致细胞死亡。目前对白喉毒素和蓖麻毒素杀伤靶细胞的机理相对了解得比较清楚。白喉毒素通过使辅酶 I 裂解释放出 ADP-核糖，后者共价连接到蛋白质合成过程中必需的延长因子 2 上使之失活。蓖麻毒素中的 A 链是一个高特异的 N-糖苷酶，它裂解 60S 亚单位中 28S rRNA 分子 3'末端 4324 位的腺嘌呤和核糖间的键，从而使蛋白质合成受抑制。

经化学交联剂，如 SPDP 交联而成的免疫毒素，其杀伤靶细胞的过程类似于毒素，因此可以根据不同的阶段选择相应的方法进行测定，例如 ^3H -亮氨酸参入法可以测定免疫毒素使靶细胞蛋白质合成抑制的程度。染料排斥法测定细胞死活，克隆培养法测定活细胞的增殖能力。这些方法配合其它特殊的细胞功能测定法，就可以观察免疫毒素对靶细胞的特异性杀伤。

二、免疫毒素的导向性

免疫毒素的导向性取决于构成它的抗体的特异性。以用于白血病导向治疗的抗 T 免疫毒素和抗普通型急性淋巴细胞白血病免疫毒素 (C-ALL) 为例，说明免疫毒素对靶细胞的特异性毒性。用于白血病导向治疗的免疫毒素中的抗体大多是抗人白细胞分化抗原的单克隆抗体。抗 T 免疫毒素分别由抗 CD_5 、 CD_2 、 CD_8 的抗体和完整蓖麻毒素组成。 ^3H -亮氨酸参入法显示，在半乳糖存在时，抗 T 免疫毒素对

培养的人 T 淋巴母细胞系 Molt-4 有明显的细胞毒性，使细胞蛋白质合成抑制 50% 的浓度 (IC_{50}) 为 10^{-9}mol/L ，同样浓度对人 B 淋巴细胞系 SB 则没有明显毒性。而无关抗体 (例如抗尿激酶的单克隆抗体) 与蓖麻毒素组成的免疫毒素对 T、B 淋巴细胞系均无毒性。抗 T 免疫毒素对靶细胞的毒性不能被半乳糖阻断，说明对细胞的毒性不是由蓖麻毒素 B 链引起的非特异性毒性，而是由于抗体的导向作用，使毒素结合到靶细胞上而引起，单独抗体并不影响靶细胞的蛋白质合成。染料排斥试验的结果与上述结果一致。克隆培养法进一步测得在 10^{-9}mol/L 时，对靶细胞的杀伤达 4 个 lg (即杀死 99.99%)，同样浓度的无关抗体的免疫毒素则没有杀伤作用。淋巴细胞转化试验也表明，在此浓度时抗 T 免疫毒素能使外周血 T 细胞功能丧失 90% 以上。以对 T 细胞杀伤有效的浓度处理骨髓，使骨髓中 T 细胞功能被抑制 95% 以上，而骨髓中粒单系和红系造血祖细胞基本不受影响，活性回收高于 70%。以上结果说明抗 T 免疫毒素能特异性地杀伤 T 细胞，而对其它细胞特别是骨髓中的造血干细胞、祖细胞没有明显影响。

抗 C-ALL 免疫毒素由抗 CD_{10} 和 CD_{19} 的抗体与蓖麻毒素组成。同样显示出对靶细胞 Nalm-6 或 Nalm-1 的特异性细胞毒性，其 IC_{50} 为 $5 \times 10^{-10}\text{mol/L}$ 。在 $5 \times 10^{-9}\text{mol/L}$ 时对靶细胞的杀伤达 2~3 lg。用此浓度处理骨髓，骨髓中造血干、祖细胞的回收在 50% 以上。不论抗 T 免疫毒素还是抗 C-ALL 免疫毒素，它们在体外都能特异性地杀伤靶细胞，而对非靶细胞则无明显影响，表明免疫毒素在体外使用时是一种导向性很好的制剂。

三、免疫毒素的临床应用

研究免疫毒素的最终目的是应用于临床治疗人类的某些疾病，目前欧美等国的临床试验已进入 I 期和 II 期。

1. 骨髓移植 这是研究得最成功的，也

是最有前途的一个领域。骨髓移植主要用于治疗血液系统疾病,如白血病、再生障碍性贫血和某些骨髓转移性肿瘤。骨髓移植又分两种情况,即同种异体骨髓移植和自体骨髓移植。前者主要用抗 T 细胞的免疫毒素处理供体骨髓,去除成熟的 T 细胞以预防和减轻移植物抗宿主病 (GVHD)。1984 年美国 Filipovich 等首次将抗 T 免疫毒素用于骨髓移植以治疗白血病获得成功。1987 年他们又对 17 例急性淋巴细胞白血病患者进行骨髓移植,并用抗 T 免疫毒素处理供者骨髓,然后患者经大剂量放化疗后植入去除了 T 细胞的骨髓。28d 后有 12 位患者移植成功,仅 4 例出现二级 GVHD。与用其它方法防止 GVHD 的患者相比,这些病人恢复得更快、更好。法国 Laurent 等报道,38 例血液系统肿瘤病人在 HLA 相合的异体骨髓移植时用抗 T 免疫毒素清除供体骨髓中的 T 细胞, T 细胞平均清除率达 99.5%。观察 300d,只有 3 例发生二级 GVHD。临床资料说明抗 T 免疫毒素在预防和减轻 GVHD 中是有一定效果的。

自体骨髓移植主要用于那些没有合适供体的血液病患者。首先将病人的骨髓取出,然后对病人进行大剂量的放化疗,尽可能杀灭体内的瘤细胞,同时对取出的骨髓用相应的免疫毒素处理,杀死其中残留的瘤细胞,再输回病人体内以重建造血。骨髓中瘤细胞清除得越彻底,病人复发的机会就越少。由于免疫毒素能特异性杀伤瘤细胞,而对骨髓中造血祖细胞没有损伤,所以是一种安全有效的净化剂。

2. 实体瘤治疗 在多年实验研究基础上,1987 年美国加州儿童医院与 Xoma 公司合作,用抗黑色素瘤的单克隆抗体与蓖麻毒素 A 链组成的单链免疫毒素治疗黑色素瘤。受治者 22 人都是晚期患者,有广泛的肿瘤转移灶。每天静脉注射剂量: $0.01\text{mg}/\text{kg}$ 5d, $1\text{mg}/\text{kg}$ 4d,其中 4 个病人肿瘤缓解期为 2~13 个月不等。有 1 例多次手术和化疗失败的病人,治疗后 1 个月 X 线诊断证明肿瘤开

始消退,8 个月后消失,其余病人的疗效不明显。同年又对 46 位化疗失败的患者进行了 II 期临床试验,结果表明免疫毒素治疗黑色素瘤有一定效果,特别是对转移灶的控制,但免疫毒素的体内应用也显示出一些问题。

四、存在的问题及发展方向

免疫毒素体内应用遇到的主要问题:(1) 抗体的专一性。至今所发现的肿瘤标志都是肿瘤相关抗原,所以相应的单克隆抗体没有绝对的专一性,只有通过大量筛选,找出相对专一性强的抗体。(2) 肿瘤细胞的异质性。同一肿瘤可能有几种类型,它们的表面抗原种类和分布是不同的,靠一种单抗制成的免疫毒素往往难以奏效。因此目前趋势是以抗同一肿瘤的几种单抗制成的免疫毒素混合使用,使杀伤瘤细胞的能力增强。(3) B 链的非特异性结合。完整毒素制备的免疫毒素因其 B 链能与正常细胞结合,以致妨碍了它在体内的应用,但由于它比单链免疫毒素的毒性强,所以不少学者致力于研究如何去掉 B 链的结合部位。目前主要有两种方案:一是通过化学试剂修筛 B 链,使其结合部位失去功能,另一种是用基因工程方法改造 B 链基因,使其丧失与细胞上相应受体结合的能力,但仍保持其它生物活性。(4) 免疫毒素的降解和清除。免疫毒素在体内很容易被单核吞噬细胞系统清除,因为这些细胞上有甘露糖受体,而毒素分子上富有甘露糖侧链,因此用高碘酸或糖苷酶等方法去糖基化后,可以延缓在体内的清除速度。(5) 免疫毒素的免疫原性。迄今为止,大部分单克隆抗体是鼠源性抗体,对人具有免疫原性,而且毒素也是一种异源蛋白,但可用的毒素种类很多,可以通过更换毒素种类来解决。抗体则最好用人源性单抗来取代。最近一个更有希望的解决办法是用基因工程技术,将人免疫球蛋白的恒定区取代鼠抗体中重链的恒定区,以减少鼠蛋白在抗体中所占的比例,或将特异性鼠单抗的超变区基因序列嵌入人抗体可变区基因序

列中,为人抗体提供一个新型抗原结合部位,而且可以通过超变区氨基酸的置换提高抗体亲和力和。这种重构抗体含鼠蛋白量更低。为了使抗体在体内易通过血管屏障和进入细胞,可用基因工程方法将一小段连接肽的基因接到鼠抗体轻链 V 区基因的 C 末端与重链 V 区基因的 N 末端。这样形成的单链抗体分子很小,临床应用时有很多优点。随基因工程技术的开展,可根据需要设计新型抗体,并在基因水平上制备导向药物,使之更符合临床应用要求。

免疫毒素仍然是一个很年轻的研究领域,在克服上述障碍后,将会产生新一代的免疫毒素,它们终将成为肿瘤治疗中有力的“魔弹”。

参 考 文 献

1. Carroll SF, et al. Proc Natl Acad Sci USA

- 1984; 8 : 3307.
2. Endo Y, et al. J Biol Chem 1987; 262 : 5908.
3. 沈倍奋,等. 中华微生物学和免疫学杂志 1985; 5 : 209.
4. 黎 燕,等. 中国免疫学杂志 1989; 5 : 197.
5. 沈倍奋,等. 上海免疫杂志 1989; 9 : 91.
6. Filipovich AH, et al. Lancet 1984; 1 : 469.
7. Filipovich AH, et al. Transplantation 1987; 44 : 62.
8. Laurent G, et al. Bone Marrow Transplant 1989; 4 : 367.
9. Spitler LE, et al. Cancer Res 1987; 47 : 1717.
10. Hardman. Int J Cancer 1989; 44 : 424.
11. LoBuglio AF, et al. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86 : 4220.