

细胞生物学 与 肿瘤免疫学

研究 进展

XIBAO SHENGWUXUE

YU

ZHONGLIU MIANYIXUE

主编 郭亚军

军事医学科学出版社

细胞生物学 与肿瘤免疫学研究进展

主 编 郭亚军
编 委 汤锡芳 卫立辛 刘彦君
王 皓 徐天昊 叶鑫生

军事医学科学出版社
·北 京·

图书在版编目(CIP)数据

细胞生物学与肿瘤免疫学研究进展/郭亚军主编.-北京:军事医学科学出版社,2000.6

ISBN 7-80121-228-2

I. 细… II. 郭… III. ①人体细胞学:生物学-研究 ②肿瘤学:免疫学-研究

IV. ①R329.2②R73

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2000)第 23556 号

* *

军事医学科学出版社出版

(北京市太平路 27 号 邮政编码:100850)

新华书店总店北京发行所发行

艺苑印刷厂印刷

*

开本:787mm×1092mm 1/16 印张:14.125 字数:347 千字

2000 年 6 月第 1 版 2001 年 4 月第 2 次印刷

印数:3001-5000 册 定价:25.00 元

11/802/06

(购买本社图书,凡有缺、损、倒、脱页者,本社发行部负责调换)

前 言

细胞生物学和肿瘤免疫学是生命科学领域中发展极为迅速的两个研究领域,它们不仅在探索生命奥秘的科学过程中发挥着重要的作用,而且与社会经济发展和临床医学实践紧密相关。我国广大的科技人员与国际同道一起,在即将过去的 20 世纪中辛勤耕耘,为这两个研究领域的发展作出了杰出的贡献。特别是在改革开放的 20 多年中,我国政府向外派送了大量的留学和高级进修人员,其中相当的比例是生命科学领域的优秀研究人员,他们在各自的研究领域中都做出了杰出的工作。自 1995 年以来,国家自然科学基金委与有关部门一起,根据不同的专题,先后邀请了数十名海外杰出的留学人员回国进行讲学交流,产生了很好的效果。这些专题讲座不仅通过尚在海外留学和工作的专家将国外最新成果向国内同道进行介绍,而且还能将国内的研究成果向国外同行引荐,使我国科技界对外交流更进一步扩大。特别值得一提的是,通过邀请这些在海外留学工作的中青年学者回国讲学、交流,已促使国内多家科研和教学单位与这些回国讲学的学者建立了实质性的合作关系。海内外科学家可在国内、国外两个合作实验室交流工作并进行同一专题研究和攻关,达到了优势互补、取长补短、强强联合和事半功倍的效果。

值世纪之交的 2000 年,在总后卫生部、国家自然科学基金委和有关部门的大力支持下,我们特别邀请了在细胞生物学和肿瘤免疫学领域中有突出工作的 19 名中青年留学人员和目前正在国内的回国学者就细胞生物学和肿瘤免疫学近年的进展并结合各自的工作与国内同道进行交流。这些中青年学者中既有我们熟悉的老朋友,也有初次回国交流的新朋友,他们分别在细胞凋亡机制、细胞内信号传导、基因调控、肿瘤免疫、病毒致癌机制、自身免疫性疾病、细胞因子和单克隆抗体等方面有着独立的建树,为了能够弥补因讲学时间限制的不足,特将这些学者的工作以文字形式编印成册,以供大家进一步参考之用。

值得一提的是,这本小册子中所有文章的作者均为留学人员,其工作均在国外完成或与国内实验室合作利用国外基地共同完成的,代表着他们的最新研究工作。因为这次讲学、交流活动的宗旨是以交流促合作,重在实质性合作,故此在每篇文章之前对每位作者进行了简要介绍,以利于国内同道对他们进一步了解和便于今后的联系交流。

这次讲学活动将在全国 5 个城市进行,其中有沿海发达城市,也有重庆和西安 2 个地处国家重点支持的西部大城市。如果我们这次组织的讲学活动,能够为国家西部开发战略的重要举措有一些帮助的话,我相信我们所有的讲学人员都会感到由衷的高兴。

由于时间仓促,水平有限,加之这些文章涉及的学科较多,其原文多数用英文写成,在编译过程中难免有失误之处,敬请大家谅解。最后我代表所有讲学交流人员向为编印这本小册子过程中工作过的所有人员表示衷心感谢。

郭亚军

2000 年 5 月 30 日

目 录

1. 新型高效肿瘤疫苗的研究	郭亚军(1)
2. 免疫系统细胞存活与死亡机制	时玉舫(10)
3. 淋巴细胞的共刺激及其在肿瘤学上的应用	陈列平(30)
4. 制备肿瘤疫苗用人肿瘤抗原的鉴定	王荣福(40)
5. 组织重建中细胞凋亡在时空上的调节——两栖类动物的发育研究	石运伯(49)
6. p53 肿瘤抑制功能的调节研究	卢 欣(59)
7. 自身免疫,免疫耐受和基因治疗	陈有海(63)
8. 诊断用放射性药物— ^{99m} Tc 标记小肽	刘 爽(77)
9. 补体调节蛋白的生理与病理学	宋文超(86)
10. 基因改变与人类疾病	李洪华(95)
11. 果蝇信号传导途径的分子和遗传学研究	侯宪玉(124)
12. 病毒致癌和致病机制	李 炎(136)
13. 先天性尿素循环紊乱的基因治疗	叶学海(142)
14. 人端粒及端粒酶与肿瘤	卫立辛(154)
15. 白介素 12 的研究进展	刘彦君(163)
16. T 细胞介导的肿瘤免疫及肝癌特异性杀伤细胞的体外诱导	王 皓(177)
17. 缺陷型腺病毒在肿瘤治疗中的作用	赵 健(186)
18. 细胞凋亡与 HIV 感染	许小宁(201)
19. 抗肿瘤自身免疫反应与异种细胞疫苗研究进展	魏于全(208)

新型高效肿瘤疫苗的研究

郭亚军

第二军医大学国际合作肿瘤研究所
美国内布拉斯加州大学肿瘤研究所

【作者简介】 郭亚军,男,1955年8月13日出生。1978年本科毕业于第三军医大学,1984年获第二军医大学硕士学位,1987年获第二军医大学博士学位。1989年在中科院上海生化所完成博士后训练,1989年至1993年在美哈佛大学医学院进行访问研究,1993年任美国 Case Western 医学院助教、副教授,1996年任美国圣迭戈大学肿瘤免疫基因治疗部主任、教授,2000年任内布拉斯加州大学肿瘤研究所教授,1995年至今任上海第二军医大学东方肝胆外科研究所副所长、主任医师、教授及第二军医大学国际合作肿瘤研究所所长、教授,并任美国免疫学会会员、肿瘤学会会员、国际肿瘤基因治疗学会副主席、肿瘤基因治疗杂志编委。主要研究方向为:1.肿瘤转移机理及抗转移治疗;2.肿瘤特异治疗性疫苗的研制及免疫机理研究;3.肿瘤生物治疗和基因治疗;4.人源化单克隆抗体制备及新方法研究。他在 *Science*, *Nature Medicine*, *J Exp Med*, *Cancer Res* 等国内外杂志发表论文 96 篇,主编和参编专著多部,承担美国和国家多项重大课题。1989年获首届“上海十大科技精英”称号,1998年获“中国青年科学家奖”,为 1997 年度国家杰出青年科学基金获得者。

【摘要】 恶性肿瘤严重威胁着人类的健康。综合治疗是未来肿瘤治疗的发展方向。免疫和生物治疗作为综合治疗的一个重要组成部分,近年来得到医学界的广泛重视,特别是肿瘤疫苗的研制更成为目前肿瘤治疗研究的热点之一。人们设法通过多种方案提高肿瘤的免疫原性,制备肿瘤疫苗,以激发机体的免疫系统,达到抗肿瘤的效果。

现有的提高肿瘤细胞免疫原性的方法有:通过分子生物学技术把某些细胞因子基因、共刺激分子基因等转移至肿瘤细胞,使肿瘤细胞不但能够提供刺激 T 细胞活化的第一信号,亦可提供必需的第二信号。除此之外,把肿瘤抗原肽基因转移至 APC,或者用肿瘤粗提物体外与 APC 混合培养,使之能够刺激机体产生有效的抗肿瘤免疫。本文作者还曾首创了肿瘤细胞和 APC 融合制备肿瘤疫苗的新方法,在实验动物及临床实验中均有较好疗效。这一方法已被广泛用于肾细胞癌、黑色素瘤和其他实体肿瘤的临床治疗。

上述这些旨在提高肿瘤细胞免疫原性的方法虽然各有其独特的优点,但总体上说,这些疫苗多制备繁琐,或者效果不够理想。作者提出了一种新的肿瘤疫苗制备方法,即先设法提高细胞表面抗原提呈必需的第一信号与第二信号分子的表达,然后利用桥联分子修饰细胞。在此基础上,作者单用多种桥联分子修饰肿瘤细胞,也可诱导

机体产生有效的抗肿瘤免疫。该种瘤苗制备方法还可用于由于免疫原性低下所引起的其他疾病。

恶性肿瘤严重威胁着人类的健康,在各种疾病所致的死亡中,恶性肿瘤居第二位,并有进一步增高的趋势。手术、化疗和放疗是治疗恶性肿瘤的3大传统疗法。手术虽能有效地切除肉眼可见的肿瘤,但无法保证所有的肿瘤细胞都被切除,也未能去除肿瘤发生的原因;放化疗除了有严重的毒副反应外,许多肿瘤对其不敏感或产生抗性;再加上肿瘤本身易侵袭转移和复发的生物学特性,使得这些治疗非常局限。

肿瘤的生物治疗研究给人类带来了新的希望。生物治疗主要包括肿瘤的免疫治疗和基因治疗。生物治疗的理想机制,一是诱导肿瘤细胞自身生长的停滞或凋亡;二是提高肿瘤的免疫原性,诱导机体内产生特异性抗肿瘤的T淋巴细胞。从目前国际研究的趋势分析和实际应用的角度来看,后一种途径获得疗效的可能性更大。因此,提高肿瘤的免疫原性,制备高效的肿瘤疫苗,成为目前免疫治疗的研究热点之一。各国科学家根据现代免疫学新理论,采用细胞和分子生物学的新技术设计了多种肿瘤疫苗,这些瘤苗制备方法各有特色,但总体说来,制备工艺复杂,效果相对不够理想。我们借鉴某些全细胞瘤苗制备的经验,提出了一种简单易行的全新高效瘤苗制备方法。该方法不但可用于肿瘤疫苗的制备,而且可推广至由于无免疫原性或免疫原性低所致的各种疾病的治疗。

一、目前全细胞肿瘤疫苗制备方法

抗肿瘤免疫由T细胞所介导。T细胞的充分活化至少需要两个信号:第一信号由抗原提呈细胞表面的MHC-抗原肽复合物和T细胞受体结合所提供;第二信号为由共刺激分子提供的共刺激信号。MHC分子的下调表达及共刺激分子的缺乏均可导致T细胞不能活化。因此,我们可以通过改变肿瘤细胞表面分子的表达情况增强肿瘤细胞的抗原性。经修饰的肿瘤细胞即可作为肿瘤疫苗,诱发机体产生抗肿瘤免疫,治疗已经存在的肿瘤。目前增强肿瘤细胞免疫原性的方法大体可分为两类:一是通过基因转染修饰肿瘤细胞;二是利用抗原提呈细胞提呈肿瘤抗原。

1. 肿瘤细胞的基因转移

人们曾采用多种方法来增强肿瘤细胞的免疫原性。在早期研究中,人们把肿瘤细胞和多种佐剂混合后免疫动物,或者用经化学方法修饰的肿瘤细胞免疫动物,希望其能提供足够的免疫刺激信号。近来基因工程的研究进展是通过转基因修饰肿瘤细胞成为可能。有人将无免疫原性的肿瘤细胞转入MHC类分子基因,可使之重新获得免疫原性。用转移了细胞因子基因,如IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, TNF, G-CSF, GM-CSF, IP-10和IFN γ 基因的肿瘤细胞免疫动物,可诱发机体产生抗肿瘤免疫。其中某些抗肿瘤活性为T细胞所介导,某些为巨噬细胞或中性粒细胞所介导。还有人将啮齿类动物细胞C6胶质瘤细胞转入胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)的反义核苷酸链抑制IGF的表达,亦可使C6细胞增强其免疫原性。

利用病毒载体进行基因转染修饰肿瘤细胞的方法,需要原代肿瘤细胞体外建系培养、基因转染并选择。该方法费时、费力、价格昂贵,因此其临床应用受到一定的限制。后来有人发明了一种肿瘤原位基因转移的方法,无需再在体外建立肿瘤细胞系。把包裹有异体HLA抗原

的脂质体给 5 例进展期黑素瘤病人注射。1 例出现肿瘤结节的消退,此病人的远处转移灶亦完全消退。其余 4 例对治疗无反应。此结果表明,将外源基因直接转入肿瘤细胞有可能成为肿瘤治疗的有效方法。

2. 利用抗原提呈细胞提呈肿瘤抗原

有效的肿瘤疫苗应该提供 T 细胞激活所必需的全部信号。激活的 B 细胞是一种强有力的抗原提呈细胞。除了表达高水平的 MHC II 类抗原外,其还高表达辅助分子和共刺激分子。我们曾把激活的 B 细胞和 BERH-2 细胞融合,制备了一种新型的肿瘤疫苗。该杂交瘤细胞高表达 MHC I, MHC II, ICAM-1 和 B7 分子,丧失了其成瘤性。用肿瘤细胞和活化的 B 细胞或树突状细胞融合制备的肿瘤疫苗免疫小鼠,可以保护实验鼠免受母瘤的攻击,亦能对已经存在的肿瘤有治疗作用。

目前有多篇文献报道,转染了肿瘤特异性抗原或肿瘤相关抗原基因的树突状细胞可诱发机体产生抗肿瘤免疫。但是,基因转染的方法一次只能转入一个或两个基因,而用肿瘤细胞和抗原提呈细胞融合或体外多种肿瘤抗原 APC 细胞的方法,可以使 APC 细胞既具有肿瘤特异性,又能提供共刺激信号。然而,这些方法仍然费时,而且需要大量的激活的 B 细胞或树突状细胞。

二、新型肿瘤疫苗的制备

我们对目前的肿瘤疫苗制备方法进行了改进,提出了两步法制备瘤苗的新方案。该种肿瘤疫苗的制备方案还可用于提高其他细胞的免疫原性,用于治疗其他由于无免疫原性或免疫原性低下,不能诱发有效的细胞免疫所引起的疾病。

我们这样处理 APC 细胞,使之更有效地提呈抗原,诱发机体产生抗肿瘤免疫。首先,使其表面表达肿瘤特异性或相关性抗原,然后予以联结可与 T 细胞表面共刺激分子结合的桥联分子,这样,APC 细胞即可与 T 细胞进行物理接触,提供活化信号。目前,我们可以通过下述方法使 APC 细胞表达肿瘤抗原:①转基因的办法;②肿瘤粗提物脉冲 APC;③纯化的肿瘤抗原肽或蛋白质脉冲 APC 等。

我们也可对无免疫原性或免疫原性低下的肿瘤细胞进行处理,使之成为有效的肿瘤疫苗。首先,使肿瘤细胞表面提高表达 T 细胞激活所必需的第一信号和第二信号分子,然后把可与 T 细胞表面共刺激分子结合的桥联分子联结至肿瘤分子的表面。

该方法的第一步,提高靶细胞表面分子表达的方法有:①转入编码 MHC 类 Ags、共刺激分子、细胞因子的基因;②细胞因子处理肿瘤细胞;③肿瘤细胞与 APC 细胞的融合;④对于病毒性疾病而言,病毒感染细胞等。

如上所述,我们可以体内/体外应用细胞因子的方法来提高肿瘤细胞与 T 细胞激活有关的第一信号和第二信号分子的表达。在体内可采用合适的药物载体或控释制剂予病灶内注射、淋巴结内注射及腔内注射和皮下注射。理论上讲,凡是可以提高肿瘤细胞表面与抗原提呈有关的分子表达的细胞因子均可应用。但是,对于不同情况下的不同肿瘤,细胞因子的种类和浓度选择可能不同。

第二步采用的桥联分子可以是双特异抗体(bi-specific monoclonal antibody, Bi-mAb)、蛋白质或其他大分子、某些多聚物等。桥联分子的一端是与肿瘤细胞上的抗原结合,因此,体内应用桥联分子时,其所结合的抗原应该是特异性的。体外应用时,因为桥联分子已经与肿瘤

表面的分子结合,不会再与体内的其他自身抗原结合,所以体外应用时无须保证其抗原结合的唯一特异性。桥联分子的另一端针对 T 细胞表面的共刺激分子,如 CD28。这样,经修饰的肿瘤细胞便被拉近 T 细胞,其不但可以直接提供共刺激信号,而且使两种细胞的其他分子更易靠近结合,发挥增强的共刺激作用。

桥联分子可通过与肿瘤细胞的共孵育或采用 PEG 或其他交联剂得以和肿瘤细胞联结。桥联分子的修饰可在体外进行,亦可在体内进行,具体要看第一步处理是体内还是体外进行的,以及疾病的具体情况和疾病治疗的临床目标。如果第一步是在体内进行的,第二步亦应在体内进行。如果第一步在体外进行,则第二步既可在体内进行,也可在体外进行。“体外-体外”两步法不但适用于制备全细胞肿瘤疫苗,而且也适用于制备肿瘤特异性 CTL。体外修饰肿瘤细胞可选择使用针对任何肿瘤细胞抗原的桥联分子。

临床医师也可以采用多种方案进行体内修饰,如皮下注射、病灶内注射和淋巴结内注射。淋巴结内注射特别适用于所获得的肿瘤细胞数量较少时。因为淋巴结内有大量 T 细胞,所以,淋巴结内注射疫苗可使之与 T 细胞充分接触。我们的实验证明淋巴结内一次注射 1×10^4 全细胞疫苗就足以诱发有效的抗肿瘤免疫,其效果与皮下注射 100 倍同种疫苗的效果相同。

三、抗 CD28 Bi-mAb 修饰经细胞因子处理的肿瘤细胞制备肿瘤疫苗

上面我们讨论了两步法制备肿瘤疫苗的方法,指出对肿瘤细胞可以采用多种方法进行第一步和第二步修饰。下面我们将着重通过用 Bi-mAb 修饰细胞因子处理的 hepa1-6(cytokine treated hepa1-6, CT-hepa1-6)肝癌细胞制备的疫苗来作进一步介绍。

1. 抗 CD28 Bi-mAb 修饰的经细胞因子处理的肿瘤疫苗制备与体外、体内实验研究

hepa1-6 细胞是从 C57BL/6 小鼠用化学致癌剂诱发的肿瘤,其生长迅速,皮下接种小鼠可很快形成肿块。hepa1-6 细胞表面缺少 MHC I, B7 分子的表达,即使转入 B7-1 和 B7-2 基因,其仍不能诱发机体产生抗肿瘤免疫。

我们把 hepa1-6 细胞与 IFN γ , TNF α 联合孵育,发现其重新表达 MHC I, ICAM- II 和 VCAM- I 等分子,并明显增高表达 ICAM- I。细胞因子撤除 3 d 后无明显改变。但是,其仍可在同种系小鼠形成肿瘤。这可能是因为肿瘤细胞分子不表达 B7,因而不能提供激活 T 细胞所必需的共刺激信号所致。

我们采用了 4 种均可抗 CD28 的 Bi-mAb(CD28:gp55, CD28:gp95, CP115, CD28:gp210)分别与经细胞因子的处理 hepa1-6 细胞联合体外刺激脾细胞,均可明显刺激脾脏 T 细胞的增生。如果没有抗 CD28 的 Bi-mAb 修饰或者不用细胞因子处理肿瘤细胞,均不能刺激 T 细胞增生。有趣的是,转入 B7 基因的肿瘤细胞用细胞因子处理后,仍不能激活处女 T 细胞。该方法刺激产生的多为 CD3⁺CD8⁺CD25⁺T 细胞。这些 T 细胞具有特异性杀伤自体肿瘤的能力。

这种 Bi-mAb 修饰的细胞因子的处理的肿瘤因子成瘤性丧失。而经对照抗体修饰的 CT-hepa1-6 仍具有成瘤能力。用 CT-hepa1-6 和任何一种抗 CD28 的 Bi-mAb 免疫小鼠,均能诱发机体产生有效的保护性免疫。采用母瘤攻击免疫鼠,实验鼠生存 120 d 后仍无肿瘤生长。相反,皮下联合注射未经细胞因子处理的 hepa1-6 细胞和抗 CD28 的 Bi-mAb,或者联合注射 CT-hepa1-6 与对照抗体 CD18:gp55,所有实验鼠在接受母瘤攻击后,均有肿瘤生长,并于 50 d 内死亡。

这种两步法制备的肿瘤疫苗不但可以保护免疫鼠不受母瘤攻击,而且能够治愈已经形成的肿瘤。我们做了3个实验。第一个实验中,40只小鼠分别皮下注射 2×10^6 野生型hepa1-6细胞。14 d小鼠形成微肿瘤灶后,分别予皮下注射经抗CD28 Bi-mAb修饰的CT-hepa1-6,抗CD28 Bi-mAb修饰的hepa1-6,对照抗体修饰的CT-hepa1-6,对照抗体修饰的CT-hepa1-6细胞,剂量均为 2×10^6 。结果抗CD28 Bi-mAb修饰的CT-hepa1-6免疫组小鼠存活均超过100 d,其余各组小鼠均在40 d内死亡。第二个实验选用5组小鼠,每组5只,予皮下注射 1×10^6 hepa1-6细胞。4周后,小鼠均形成直径6-8 mm(最长径)的瘤结节。予小鼠分别注射经CD28:gp55,CD28:gp95,和CD28:gp210的Bi-mAb修饰的CT-hepa1-6细胞,剂量为 1×10^6 。7 d后,同样剂量皮下注射加强免疫。以与CD18:gp55共孵育的细胞和与抗CD28及抗gp55单抗混合物共孵育的细胞作为对照。定期监测肿瘤大小变化。结果显示,用3种抗CD28 Bi-mAb修饰的CD-hepa1-6细胞免疫小鼠,肿瘤在40 d内均消失;相反,其余各组小鼠肿瘤体积增长一倍。第三个实验中, γ 照射抗CD28 Bi-mAb修饰的肿瘤细胞作为疫苗。3组小鼠(每组5只)分别予皮下注射 1×10^6 hepa1-6细胞。两周后,3组小鼠分别予皮下注射。①经CD28:gp55 Bi-mAb修饰的 γ 照射的CD-hepa1-6;②经 γ 照射的CT-hepa1-6与抗CD28,抗gp55单抗混合物;③ γ 照射的hepa1-6细胞。剂量均为 1×10^6 。结果只有经抗CD28 Bi-mAb修饰的经 γ 照射的CT-hepa1-6细胞免疫的小鼠存活,并超过100 d。其余各组均在40 d内死亡。

在上述实验中,我们还检测了肿瘤组织内炎细胞浸润情况。发现在治疗有效的小鼠切除肿瘤组织中,存在大量淋巴细胞浸润。根据体外实验的有关数据,其中绝大多数淋巴细胞为CD3⁺CD8⁺CD25⁺T细胞。采用抗CD28 Bi-mAb修饰的未经细胞因子处理的瘤细胞免疫小鼠,或采用对照抗体修饰的CD-hepa1-6免疫小鼠,切除肿瘤组织中均未见明显的局部免疫反应。为进一步证实肿瘤疫苗所诱发的抗肿瘤免疫为CTL所介导,我们在免疫前后分别用抗体封闭了CD8⁺T细胞。CD8⁺T细胞被封闭的小鼠不能诱发出有效的抗肿瘤免疫。

20%-25%的浸润细胞为CD3⁺CD25⁺CD4⁺T细胞。hepa1-6细胞能在40%的CD4⁺T细胞封闭小鼠中形成肿瘤。因此,该瘤苗诱发的抗肿瘤免疫既需要CD4⁺又需要CD8⁺T细胞。在保护性免疫被诱发后,CD8⁺T单独即可介导对肿瘤细胞的杀伤。

这种肿瘤疫苗制备方案不但适用于肝癌,也适用于其他类型的癌肿。而且,这种肿瘤疫苗具有肿瘤特异性。EL-4是一种淋巴瘤细胞,其仅在转入B7基因后才获得免疫原性;而SMCC这种结肠癌细胞即使在转入B7基因后,仍不能诱发机体产生抗肿瘤免疫。此两种细胞均可在同种系C57BL/6小鼠中迅速生长,形成皮下肿瘤。它们都在细胞表面表达gp55抗原,因此,我们在本实验中同样使用了CD28:gp55 Bi-mAb。3组小鼠分别皮下注射经细胞因子处理的CD28:gp55 Bi-mAb修饰的hepa1-6,EL-4和SMCC-1肿瘤细胞,剂量均为 1×10^6 。两周后,把接受经修饰hepa1-6细胞免疫的小鼠分为3组,分别接受hepa1-6,SMCC-1和EL-4细胞的攻击;接受经修饰SMCC-1免疫的小鼠分为两组,分别接受SMCC-1细胞和EL-4,hepa1-6混合细胞的攻击;接受经修饰的EL-4免疫的小鼠分为两组,分别接受EL-4和hepa1-6,SMCC-1混合细胞的攻击。攻击细胞数量均为 1×10^6 。结果表明,细胞因子处理过的EL-4,SMCC-1经CD28:gp55 Bi-mAb修饰后可作为肿瘤疫苗,诱发机体产生有效的抗肿瘤免疫,免受自体母瘤的攻击。而且,该保护性免疫具有肿瘤特异性。例如:抗CD28 Bi-mAb修饰的CT-hepa1-6免疫小鼠,不能抑制同种系EL-4或SMCC-1瘤细

胞的体内生长。有趣的是,虽然 EL-4 细胞表面高表达 MHC I 类分子,但是,其与抗 CD28:gp55 Bi-mAb 共孵育后,仍不能诱发保护性免疫。另外,从该种疫苗免疫小鼠所得的 CTL,体外只能特异性杀伤亲本母细胞瘤,而不能杀伤其他肿瘤。

在第二节中我们提到,可以体内修饰的方法制备该种肿瘤疫苗。把细胞因子和 Bi-mAb 直接注入肿瘤灶内不会出现系统应用免疫制剂所带来的毒副作用,而且在其病灶供血不足、活检部位不易到达、病灶切除会给病人带来更大危险等情况下特别适用。最好是采用细针注射技术,把细胞因子和桥联分子注入病灶。注射可在影像系统的帮助下进行,医师可以直接观察到病灶的位置,把药物直接送至病灶内。注射的细胞因子和 Bi-mAb 可以直接和肿瘤细胞接触,从而在体内产生肿瘤特异性 CTL。另外,Bi-mAb 或其他桥联分子最好是抗仅存在于肿瘤细胞表面的抗原,以免引起对自身正常细胞的免疫。细胞因子和 Bi-mAb 可以同时注射,亦可分别注射。细胞因子可由编码细胞因子的基因代替。

C57 小鼠皮下注射 1×10^6 hepa1-6 细胞。2 周后小鼠形成肿瘤。每日予瘤内注射 200 U IFN γ 和 200 U TNF α ,连注 3 d,d 3 予瘤内注射 500 μ g Bi-mAb。接受细胞因子和 Bi-mAb 联合治疗的小鼠肿瘤明显消退,生存期延长。该实验证实,瘤内注射细胞因子和 Bi-mAb 可以作为制备肿瘤疫苗的有效方案。

T 细胞与疫苗最先接触可能是在外周淋巴器官,如脾脏或淋巴结。因此,外周组织(如皮肤)注射或静脉注射可能导致 DC 在移行至脾脏和淋巴结时大量丢失。所以,将肿瘤疫苗直接注入淋巴器官可能更为有效。我们的研究表明,注入脾脏 2.5×10^4 个经抗 CD28 Bi-mAb 修饰的 CT-hepa1-6 细胞,即足以诱发抗肿瘤免疫,保护机体不受母瘤的攻击。黑素瘤和肝癌模型被用来确定该方法的有效性及其所需肿瘤疫苗的细胞数。先予小鼠皮下接种 2×10^6 的黑素瘤或肝癌细胞系。2 周或 4 周后,分别予脾脏内注射 1×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 5×10^4 , 1×10^6 Bi-mAb 修饰或对照抗体修饰的细胞因子处理的自体肿瘤细胞。细胞疫苗均采用 #31 针从背部以外科方式注入。该方法亦可用于临床病人的淋巴结内注射。

四、“两步法”制备的肿瘤疫苗的临床实验

1. 肿瘤疫苗的免疫治疗

上述资料表明,联合细胞因子和经抗 CD28 Bi-mAb 修饰的肿瘤细胞,其免疫原性提高,可用于治疗小鼠和大鼠模型的肝癌和结肠癌。为了研究其在人类肝癌和结肠癌治疗上的有效性,我们采用该疫苗方案治疗了 13 例肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)和 5 例结肠癌病人。

接受治疗的 HCC 病人共 13 例(Ⅱ期 3 例,Ⅲ期 7 例,Ⅳ期 3 例),结肠癌 5 例均有远处转移。所有病人均有病理学检查资料。

每名病人 2 周内接受治疗 2 次,每次皮下注射瘤苗 $(1-1.5) \times 10^7$ 。第二次注射后有 15 例病人出现发热,体温在 37.8-38.6℃,持续 8-15 h,未见其他毒性反应或过敏反应。18 例病人中,11 人对自体肿瘤细胞的 DTH 反应明显增加,2 人的远处转移完全消失,4 人远处转移部分消退,4 例 HCC 病人原发瘤体积缩小 30% 以上。两例肿瘤明显缩小的病人重又成功地实施了肿瘤切除。组织病理学检查显示,肿瘤组织内可见明显坏死和大量淋巴细胞浸润。

2. 肿瘤疫苗和肿瘤特异性 CTL 过继联合免疫治疗

11 例 HCC 病人和 5 例胃癌病人接受了联合免疫治疗。其中,HCC Ⅲ期 5 例,Ⅳ期 6 例;

所有的胃癌病人均有复发的远处转移。每名病人2周内皮下注射肿瘤疫苗2次,每次 $(1-1.5) \times 10^7$ 。然后输入 $(1.7-2.1) \times 10^7$ 肿瘤特异性CTL。所有的病人在第二次注射肿瘤疫苗后均出现发热,体温在 $37.8-38.8^\circ\text{C}$,持续8-20 h。未见其他明显毒副反应。17例肿瘤病人中13例出现对自体肿瘤细胞的DTH反应,14例病人T细胞增生明显增强,4例病人远处转移灶明显消退,3例部分消退,2例胃癌病人腹水全部消失,6例病人肿瘤组织内有明显坏死和大量淋巴细胞浸润。结果表明,细胞免疫和肿瘤特异性CTL过继联合免疫治疗可提高肿瘤病人的免疫治疗结果。

五、其他

除了上面应用抗CD28的Bi-mAb修饰的细胞因子处理的肿瘤细胞可作为肿瘤疫苗外,我们发现,对某些肿瘤来说,单用多种桥联分子而不用细胞因子处理肿瘤细胞,亦可诱发机体产生抗肿瘤免疫。

4-1BB是表达于初次激活的 $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$ T细胞表面的糖蛋白。4-1BB与其配体4-1BBL或其抗体结合后,可传导丝裂原性信号,使T细胞活化增殖。有报道称,抗4-1BB单抗可以使小鼠较大的瘤块消失。

我们用两种双特异抗体CD28:gp55和gp115:4-1BB体外修饰EL-4瘤细胞,然后以不同剂量皮下注射同种系小鼠。两周后,以亲本细胞瘤攻击小鼠,观察是否诱发了保护性抗肿瘤免疫。结果发现接受两种双特异抗体修饰肿瘤细胞疫苗的小鼠,在接受剂量达 1×10^6 的母瘤细胞攻击时,仍无肿瘤生成,而接受同样剂量母瘤攻击的对照组,100%有肿瘤生长。在治疗性实验中,我们用两种双特异抗体修饰SMCC-1细胞,用于治疗已经长有该瘤的小鼠,结果接受 5×10^5 的瘤苗免疫的小鼠生存率即可达100%。这些结果表明,抗CD28 Bi-mAb和抗4-1BB Bi-mAb两种双特异抗体修饰肿瘤细胞,不但可诱发有效的保护性免疫,而且可以治疗已经形成的肿瘤。

另外,我们前面提到,该肿瘤疫苗的制备方法也可用于其他与细胞免疫原性低下有关的疾病。如诱导机体产生杀伤病毒感染细胞的T细胞。我们曾以删除了E1B的腺病毒感染临床活检所得的肝细胞,通过RT-PCR和组织学检测确定病毒感染成功。感染了病毒的肝细胞体外予以下处理:1)单用细胞因子;2)单用Bi-mAb;3)联合应用细胞因子和Bi-mAb。经修饰的感染肝细胞经照射后与自体PBL共培养,测定生成的CTL的杀细胞毒性。实验结果显示,联合细胞因子和Bi-mAb修饰的感染肝细胞诱导的CTL毒性为40%,远高于未经处理的肝细胞的3%,而且产生的CTL具有特异性,同样的CTL对未感染病毒的肝细胞杀伤能力也只有3%。

参 考 文 献

- 1 Haddada H, Lewis AM Jr, Sogn JA, *et al.* Tumorigenicity of hamster and mouse cells transformed by adenovirus types 2 and 5 are not influenced by the level of class I major histocompatibility antigens expressed on the cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83(24):9684-9688
- 2 Wallich R, Bulbuc N, Hummerling GJ, *et al.* Abrogation of metastatic properties of tumour cells by *de novo* expression of H-2K antigens following H-2 gene transfection. *Nature*, 1985; 315(6017):301-305

- 3 Tepper RI, Pattengale PK, Leder P. Murine interleukin - 4 displays potent anti - tumor activity *in vivo*. *Cell*, 1989;57(3):503 - 512
- 4 Porgador A, Tzehoval E, Katz A, *et al*. Interleukin 6 gene transfection into Lewis lung carcinoma tumor cells suppresses the malignant phenotype and confers immunotherapeutic competence against parental metastatic cells. *Cancer Res*, 1992;52(13):3679 - 3686
- 5 Hock H, Dorsch M, Diamantstein T, *et al*. Interleukin 7 induces CD4⁺ T cell - dependent tumor rejection. *J Exp Med*, 1991;174(6):1291 - 1298
- 6 Asher AL, Muller J, Kasid A, *et al*. Murine tumor cells transduced with the gene for tumor necrosis factor - alpha. Evidence for paracrine immune effects of tumor necrosis factor against tumors. *J Immunol*, 1991;146(9):3227 - 3234
- 7 Colombo MP, Ferrari G, Stoppacciaro A, *et al*. Granulocyte colony - stimulating factor gene transfer suppresses tumorigenicity of a murine adenocarcinoma *in vivo*. *J Exp Med*, 1991;173(4):889 - 897
- 8 Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, *et al*. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte - macrophage colony - stimulating factor stimulates potent, specific, and long - lasting anti - tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; 90(8):3539 - 3543
- 9 Luster AD, Leder P. IP-10, a -C-X-C- chemokine, elicits a potent thymus - dependent antitumor response *in vivo*. *J Exp Med*, 1993; 178(3):1057 - 1065
- 10 Gansbacher B, Bannerji R, Daniels B, *et al*. Retroviral vector - mediated gamma - interferon gene transfer into tumor cells generates potent and long lasting antitumor immunity. *Cancer Res*, 1990; 50(24):7820 - 7825
- 11 Trojan J, Johnson TR, Rudin SD, *et al*. Treatment and prevention of rat glioblastoma by immunogenic C6 cells expressing antisense insulin - like growth factor I RNA. *Science*, 1993; 259(5091):94 - 97
- 12 Hock H, Dorsch M, Kunzendorf U, *et al*. Vaccinations with tumor cells genetically engineered to produce different cytokines: effectivity not superior to a classical adjuvant. *Cancer Res*, 1993; 53(4):714 - 716
- 13 Nabel GJ, Yang ZY, Nabel EG, *et al*. Direct gene transfer for treatment of human cancer. *Ann NY Acad Sci*, 1995; 772:227 - 231
- 14 Toffaletti DL, Darrow TL, Scott DW. Augmentation of syngeneic tumor - specific immunity by semiallogeneic cell hybrids. *J Immunol*, 1983;130(6):2982 - 2986
- 15 Guo Y, Wu M, Chen H, *et al*. Effective tumor vaccine generated by fusion of hepatoma cells with activated B cells. *Science*, 1994; 263(5146):518 - 520
- 16 Celluzzi CM, Mayordomo JI, Storkus WJ, *et al*. Peptide - pulsed dendritic cells induce antigen - specific CTL - mediated protective tumor immunity. *J Exp Med*, 1996; 183(1):283 - 287
- 17 Donnelly JJ, Ulmer JB, Liu MA. Immunization with DNA. *J Immunol Methods*, 1994; 176(2):145 - 152
- 18 Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, *et al*. Vaccination of melanoma patients with peptide - or tumor lysate - pulsed dendritic cells. *Nat Med*, 1988; 4(3):328 - 332
- 19 Mayordomo JI, Zorina T, Storkus WJ, *et al*. Bone marrow - derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nat Med*, 1995; 1(12):1297 - 1302
- 20 Porgador A, Gilboa E. Bone marrow - generated dendritic cells pulsed with a class I - restricted peptide are potent inducers of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*, 1995; 182(1):255 - 260
- 21 Paglia P, Chiodoni C, Rodolfo M, *et al*. Murine dendritic cells loaded *in vitro* with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen *in vivo*. *J Exp Med*, 1996; 183(1):317 - 322
- 22 Reeves ME, Royal RE, Lam JS, *et al*. Retroviral transduction of human dendritic cells with a tumor - associated antigen gene. *Cancer Res*, 1996; 56(24):5672 - 5677
- 23 Bakker AB, Marland G, de Boer AJ, *et al*. Generation of antimelanoma cytotoxic T lymphocytes from healthy

- donors after presentation of melanoma - associated antigen - derived epitopes by dendritic cells *in vitro*. *Cancer Res*, 1995; 55(22):5330 - 5334
- 24 Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, *et al*. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen - presenting cells *in vitro* and *in vivo*. *J Exp Med*, 1996; 184(2):465 - 472
 - 25 Restifo NP, Kawakami Y, Marincola F, *et al*. Molecular mechanisms used by tumors to escape immune recognition; immunogenetherapy and the cell biology of major histocompatibility complex class I. *J Immunother*, 1993; 14(3):182 - 190
 - 26 Ostrand - Rosenberg S, Thakur A, Clements V. Rejection of mouse sarcoma cells after transfection of MHC class II genes. *J Immunol*, 1990; 144(10):4068 - 4071
 - 27 Armstrong TD, Clements VK, Martin BK, *et al*. Major histocompatibility complex class II - transfected tumor cells present endogenous antigen and are potent inducers of tumor - specific immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997; 94(13):6886 - 6891
 - 28 Townsend SE, Allison JP. Tumor rejection after direct costimulation of CD8⁺ T cells by B7 - transfected melanoma cells. *Science*, 1993; 259(5093):368 - 370
 - 29 Baskar S, Ostrand - Rosenberg S, Nabavi N, *et al*. Constitutive expression of B7 restores immunogenicity of tumor cells expressing truncated major histocompatibility complex class II molecules. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; 90(12):5687 - 5690
 - 30 Johnston JV, Malacko AR, Mizuno MT, *et al*. B7 - CD28 costimulation unveils the hierarchy of tumor epitopes recognized by major histocompatibility complex class I - restricted CD8⁺ cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med*, 1996; 183(3):791 - 800
 - 31 Fearon ER, Pardoll DM, Itaya T, *et al*. Interleukin - 2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response. *Cell*, 1990; 60(3):397 - 403
 - 32 Golumbek PT, Lazenby AJ, Levitsky HI, *et al*. DM Treatment of established renal cancer by tumor cells engineered to secrete interleukin - 4. *Science*, 1991; 254(5032):713 - 716
 - 33 Ertel C, Millar NS, Emmerson PT, *et al*. Viral hemagglutinin augments peptide - specific cytotoxic T cell responses. *Eur J Immunol*, 1993; 23(10):2592 - 2596

免疫系统细胞存活与死亡机制

时玉舫

第二军医大学国际合作肿瘤研究所
美国乔治·华盛顿大学微生物和免疫学系

【作者简介】 时玉舫,男,1960年10月11日出生。1988年获加拿大阿尔伯特大学动物学系硕士学位,1992年获免疫学博士学位。现任美乔治·华盛顿大学微生物和免疫学系副教授、美乔治敦大学微生物和免疫学系客座教授、美国红十字会霍兰研究所细胞研究室主任、美国免疫学会会员。1999年担任第二军医大学国际合作肿瘤研究所副所长、教授,上海市肿瘤学重点实验室副主任、教授。研究方向:免疫系统的细胞凋亡研究。他在国际上率先证实未成熟T细胞激活诱发的细胞凋亡可能是机体的负选择调控机制之一;证实c-myc参与T细胞激活诱导凋亡;发现环孢素A可抑制未成熟T细胞活化诱发的T细胞凋亡;率先在体外证实吗啡可使淋巴细胞Fas表达增加,淋巴细胞凋亡,造成机体免疫力下降。先后在 *Science*, *Nature*, *Nature Medicine* 等国外杂志发表论文近50篇,其中的21篇论文被引文达1438次。现为 *Cell Research* 主编之一, *Journal of Immunology* 杂志的副编辑,并为多个国际性学术杂志的特约审稿人。为1999年度中国杰出青年科学基金获得者。

【摘要】 激活诱导细胞死亡(activation-induced cell death, AICD)在免疫耐受及维护淋巴细胞自稳中发挥关键性作用。AICD常为Fas(CD95/Apo-1)/Fas配体(FasL/CD95L)相互作用所产生的信号所介导。这种相互作用可以不依赖转录的方式激活一系列胱冬肽酶(caspase)。Fas和FasL的表达是决定活化T细胞命运的最后一个检测点。目前,人们已对Fas/FasL诱发的死亡机制进行了广泛的研究,而我们的工作主要是集中在Fas/FasL分子表达的调节机制。我们以前的研究表明,T细胞杂交瘤的活化能导致AICD,此过程完全依赖于Fas及其配体FasL。继我们以前报告过激活所诱导的细胞死亡需要原癌蛋白c-Myc之后,我们又发现c-Myc的作用在于调节FasL的表达。而且,FasL的表达需要PKC激活及Ca⁺⁺内流。FasL的表达似乎仅限于细胞周期的特定阶段,并且受c-Myc途径的调节。但是Fas的表达不依赖于c-Myc,而只受PKC活性的调节,具体机制可能是通过p53和转录因子TDAGS1而发挥作用。与凋亡能力形成对比的是,细胞生命力的维持需要存活信号的存在,特别是当其增殖时更是如此。正常的细胞增殖依赖于参与细胞周期运行的基因活化及肿瘤抑制基因的抑制。在缺乏细胞存活因子的情况下,细胞周期运行与以凋亡方式进行的程序性细胞死亡相联系。目前,人们的研究重点在于对细胞周期机制及凋亡途径中的分子机制的描述,而对细胞增殖过程中存活机制的研究甚少。丝裂原性细胞因子与其相应受体的相互作用可促进细胞进入S期。根据对撤除细胞

因子能导致凋亡的观察结果推测,细胞因子可能能够提供细胞生存信号。但是,这些细胞因子的丝裂原活性及其存活效应是通过一种生化机制抑或是不同的信号传导途径发挥作用,目前尚不清楚。因此,确定细胞因子的生存效应是直接作用的结果还是与组织间液、血液(体内),或培养基(体外)等环境中的存活因子共同作用的结果,具有重要意义。为解决这个问题,我们用细胞因子在体外存在和不存在外源性血清两种情况下分别刺激细胞。在无血清培养基中加入细胞因子孵育,某些类型的细胞发生凋亡,这种现象称为细胞因子促发性凋亡(cytokine-promoted apoptosis)。有趣的是,我们发现血清是细胞存活基因 Bcl-2 最主要的活化因素;但是丝裂原性细胞因子能够增加 Bax 的表达。这种独特的系统能够帮助我们确定新的细胞存活基因。

我们的目的是探讨淋巴细胞的存活与死亡机制。在肿瘤免疫、神经退行性病变和 AIDS 中,均发现有 Fas/FasL 介导的细胞死亡。因此,进一步阐明 Fas/FasL 表达的调节机制可能有助于改善治疗效果及其预后。研究生长因子作用下的增殖过程中细胞生存机制,对于我们理解发育和肿瘤发生中细胞自稳的维持机制会有很大帮助。

一、激活诱导细胞死亡

以凋亡方式进行的程序性细胞死亡,在很多生理过程中发挥重要作用,其失调可导致许多疾病的发生,包括自身免疫、癌肿、肿瘤耐药性的获得、中风、某些退行性病变和 AIDS。凋亡是由很多膜受体及胞浆蛋白参加的一系列分子事件导致的一种细胞主动自杀过程。免疫系统中的凋亡可能发生在 T 和 B 淋巴细胞库选择及 CTL 介导的杀伤过程中。凋亡在介导淋巴细胞自稳中发挥关键性作用。凋亡还参与许多 T 和 B 细胞的清除,以维持免疫自稳。因此这一过程中的缺陷有可能导致潜在的自身反应性 T 细胞、B 细胞的过度积聚。

目前研究最清楚的凋亡系统是可由抗原受体介导死亡的 T 细胞。我们已经证明可通过体内应用抗 TCR 复合物抗体,特异性地诱导不成熟胸腺细胞的凋亡,而成熟胸腺细胞无明显改变,我们把这种现象称为激活诱导细胞死亡(activation-induced cell death, AICD)。这种现象也可发生于胚胎器官培养时应用抗 CD3 或超抗原葡萄球菌内毒素 B 等情况下。给 OVA 特异性 TCR 转基因小鼠体内应用特异性抗原亦可诱发胸腺细胞的死亡。这种发生在不成熟胸腺细胞的激活所诱导的细胞死亡,也许能够解释自身反应性 T 细胞在胸腺发育过程中的阴性选择现象。已有实验证明,激活所诱导的细胞死亡并不仅限于未成熟胸腺细胞,其也发生于 T 细胞杂交瘤和成熟的 T 细胞及 B 细胞。

二、受体介导的细胞死亡

免疫系统细胞的存活和死亡受一组细胞表面蛋白受体的调控,这些受体可触发很多信号传导过程,影响多种细胞功能,包括增生、分化和死亡。其中一个表面蛋白家族能对很多不同器官系统的细胞死亡产生广泛效应。这个受体家族包括 TNF/NGF (tumor necrosis factor/necrosis growth factor) 家族受体,后者通过与其特异性配体相互结合而发挥作用。此配体家族一直在不断壮大,其中具有代表性的有肿瘤坏死因子(TNF)、TNF 相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis inducing ligand, TRAIL)、淋巴毒素和 Fas, CD30, CD40, CD27 和 4-1BB 等的配体,而且这些配体与其相应受体如 TNF-R1, DR3 (APO-3/TRAMP/WSI-1/LARD),

DR4(TRAIL-R1), DR5(TRAIL-R2)及 Fas(CD95/APO-1)相互作用。这些受体的共同特征是能特异性激活胱冬肽酶级联反应的胞浆内功能域。其中研究最广泛,了解最多的配体-受体系统是 Fas 配体(FasLigand, FasL)及其相应受体 Fas。

1. Fas 和 FasL

Fas 是一种细胞表面蛋白,属于 TNF/NGF 受体家族。Fas 死亡受体是一种 I 型跨膜蛋白,分子量为 45 kDa。像 TNF/NGF 家族中其他成员一样,其胞外功能域含有很多(在 Fas 中有 3 个)富含半胱氨酸的重复序列。这些半胱氨酸重复序列可作为相应配体的识别位点;破坏这些重复序列导致效应信号的失表达。它表达于活化的 T 细胞、B 细胞、肝细胞和卵巢上皮细胞等多种细胞类型;在乳腺、卵巢、结肠、前列腺、肝脏等器官的实体瘤中可检测到该受体的表达。其与相应抗体或其自然配体(FasL)的结合通常能诱发快速的细胞凋亡。FasL 属 II 型细胞表面糖蛋白,分子量 40 kDa,其氨基端朝向胞浆侧,羧基端面向细胞外。在某些情况下,可通过金属铂把 FasL 从效应细胞上切下来,这样 FasL 便可通过旁分泌方式诱发凋亡。在激活的 T 细胞、NK 细胞、睾丸的 Sertoli 细胞、眼的角膜上皮细胞及视网膜中均可检测到 FasL 的存在;某些肿瘤亦表达 FasL,有人认为这可能是肿瘤细胞逃避免疫监视的一种方式。在包括淋巴系、内分泌系统及生殖系统的多器官系统中,Fas 和 FasL 的结合会导致对细胞状态的破坏。小鼠淋巴增生(lymphoproliferation, lpr)及弥漫性淋巴增生病(generalized lymphoproliferative disease, gld)等基因突变可导致淋巴腺病、脾大及进行性自身免疫病的发生,分别是 Fas 和 FasL 基因的功能缺失突变所致。

尽管目前普遍认为,胸腺中 T 细胞的阴性选择是以激活所诱发的细胞死亡方式进行的,但在此过程中 Fas/FasL 的作用尚未正式确定。然而现已明确知道,外周 T 细胞和 T 细胞杂交瘤的 AICD 是通过 Fas 和 FasL 的相互作用介导的。因此,我们采用了 T 细胞杂交瘤 A1.1 细胞来研究 AICD 中 Fas 和 FasL 的调节机制。虽然人们在 Fas 传导的死亡信号研究中取得了较大进展,但到目前为止,对 Fas/FasL 的调控表达机制却知之甚微。

2. Fas 突变

Fas 和 FasL 这两个名词早已被提出,但直到近来,Fas/FasL 才在真正意义上被采纳。1989 年,两个相互独立的小组分别研究出单克隆抗体 Fas 和 APO-1,二者均能诱发多种恶性和非恶性细胞的凋亡。2 年后,Nagata 等克隆出 Fas 的基因。虽然 Fas/Apo-1 对免疫系统具有特异性,许多小组证实其并不仅限于免疫系统,因为 Fas 被证实表达于多种细胞,如正常的和恶变的淋巴细胞、非淋巴系肿瘤细胞系等。Fas 及 FasL 在免疫豁免区包括睾丸、脑、眼的存在,引发了关于 Fas 在这些部位的功能的很多探讨。Fas 在维护淋巴细胞状态方面起重要作用,它可清除活化的淋巴细胞,使淋巴反应一旦完成,细胞扩增尽快减慢,因此能够阻止淋巴系恶变或外周免疫耐受的丧失。但是要想真正清楚地了解 Fas/FasL 在免疫调节中的作用,就需要研究 Fas/FasL 表达的调节。

Fas(lpr 小鼠)或 FasL(gld 小鼠)缺陷会引起疾病,其特征性表现为淋巴细胞增生、自身抗体的产生和肿瘤发生。这些现象表明,Fas/FasL 的相互作用对于维持细胞生存与死亡之间的平衡至关重要。

淋巴系增生性疾病的发现远早于 Fas 和 FasL 的克隆。发生于 lpr 及 gld 位点的自发突变目前已知分别为 Fas, FasL 突变。lpr 和 gld 纯合子小鼠中,由于 Fas 或 FasL 的缺陷,二者的相互作用可产生淋巴腺病、脾大、高 γ -球蛋白血症或个体成熟前便发生死亡。而且,脾脏和淋