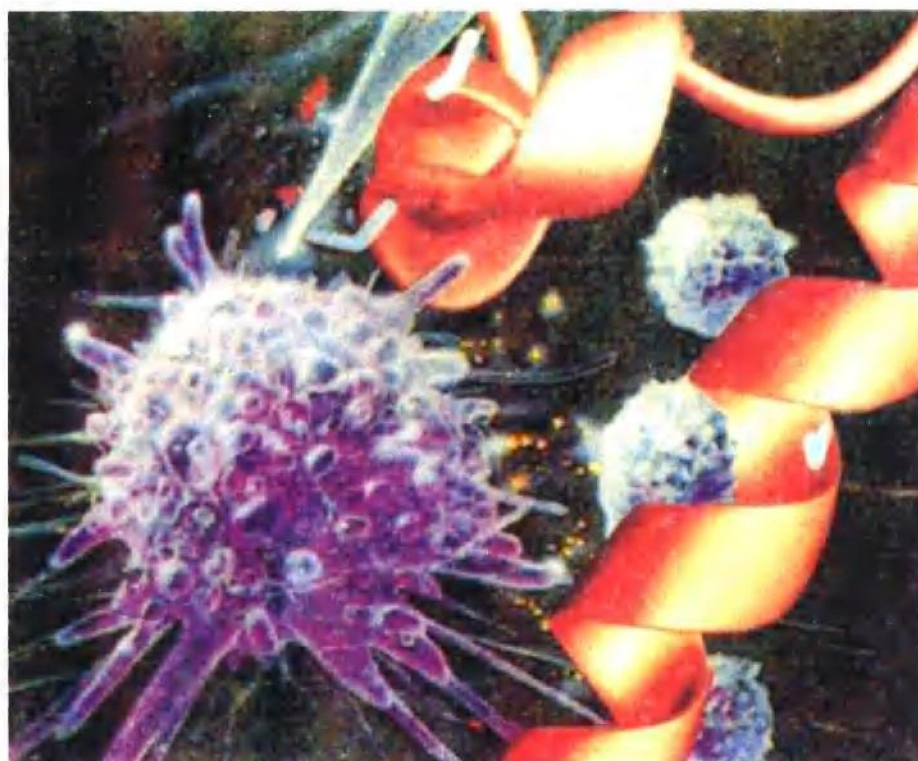


肿瘤分子生物学研究进展

Current Advance in Tumor Molecular Biology

主 编 李春海 郭亚军

副主编 叶鑫生 汤锡芳



军事医学科学出版社

0.2-53

PH

肿瘤分子生物学研究进展

Current Advance in Tumor Molecular Biology

主 编 李春海 郭亚军

副主编 叶鑫生 汤锡芳

军事医学科学出版社

内容提要

本书为“96 北京国际肿瘤分子生物学学术会议”论文汇编。由多位尚在海外留学与工作的学者和国内有关知名学者结合他们自己的研究工作,介绍了近年来国内外肿瘤分子生物学的最新研究进展。主要内容包括癌基因和抗癌基因、细胞凋亡、肿瘤标志、肿瘤转移、肿瘤免疫、肿瘤酶学及肿瘤生物治疗等基础理论方面的研究成果及临床应用前景。本书可供从事肿瘤防治的研究人员、临床医务人员和医学院校师生学习参考。

图书在版编目(CIP)数据

肿瘤分子生物学研究进展 / 李春海, 郭亚军编著. 北京: 军事医学科学出版社, 1996. 10

ISBN 7-80121-056-5

I. 肿… II. ①李… ②郭… III. 肿瘤-分子生物学-研究-进展-国际学术会议-文集 IV. R730.2-53

中国版本图书馆 CIP 数据核字(96)第 18467 号

*

肿瘤分子生物学研究进展

主 编 李春海 郭亚军

责任编辑 张立新 钱 军

军事医学科学出版社出版

(北京太平路 27 号 邮政编码: 100850)

新华书店总店科技发行所发行 各地新华书店经售

北京四环科技印刷厂印刷

* *

开本: 787×1092 mm 1/16 印张: 8.75 字数: 210 千字

1996 年 10 月第 1 版 1996 年 10 月第 1 次印刷

印数: 1-3 000 册 定价: 18.00 元

ISBN 7-80121-056-5 / R · 042

肿瘤分子生物学研究进展

Current Advance in Tumor Molecular Biology

——'96 北京国际肿瘤分子生物学学术会议论文汇编

1996 年 10 月 21~23 日 北京

——'96 Beijing International Conference of Tumor
Molecular Biology

1996.10.21~23, Beijing

主办单位: 国家自然科学基金委员会

承办单位: 军事医学科学院

前 言

肿瘤是当今生物医学界的重点研究课题，它涉及许多目前人们急待了解的生物现象。诸如细胞分裂周期的精确控制，细胞外信息的跨膜传递，基因表达调控以及细胞免疫应答等。

从分子生物学角度来讲，肿瘤形成源于细胞遗传物质的改变，而这种改变，造成了许多基本生命活动，如细胞增殖、细胞分化、细胞凋亡等异常，因此，对肿瘤的深入研究，不但可以增强人们抵御和防治这种疾病的能力，造福于人类，同时也可以使我们对许多与之相关的生命活动加深理解。近年来，随着分子生物学、细胞生物学、免疫学等学科的迅猛发展，对肿瘤发生机理的研究以及对肿瘤治疗途径的选择都已取得了令人瞩目的成果。

为加强学术交流，促进国际合作，进一步推动我国肿瘤研究事业的发展，由国家自然科学基金委员会主办，军事医学科学院承办“96 北京国际肿瘤分子生物学学术报告会”。我们邀请了取得突出成就并在相关研究领域具有一定影响的国外留学人员和国内知名学者参加此次盛会，他们结合自己的研究工作，介绍肿瘤分子生物学不同领域的最新研究进展，包括癌基因、抗癌基因、细胞凋亡、肿瘤标志、肿瘤转移、肿瘤免疫、肿瘤酶学以及肿瘤的生物治疗等。我们很高兴地把这些高水平的学术报告收录成册，并把它推荐给国内同仁，希望它能为我们的研究和临床工作提供有益的参考和帮助，使我们能尽快涉足到肿瘤分子生物学研究的前沿。

30 年前，著名学者 Reyton Rous 曾在诺贝尔奖颁奖仪式上说：“虽然我们经过 70 多年研究，但目前对肿瘤的起因一无所知，至今还没有任何对付它的办法”。这基本代表了当时的肿瘤研究水平，而科学飞速发展到今天，我们不仅对肿瘤发生机理进行了深入研究，而且在肿瘤临床诊断和治疗上也取得了可喜的进展。相信在不久的将来，在科学界同仁的共同努力下，肿瘤一定会被人类所征服。

吴祖泽

1996 年 9 月 1 日

编者的话

为了促进我国肿瘤分子生物学基础研究和应用的发展,国家自然科学基金委员会主办“'96 北京国际肿瘤分子生物学学术会议”。这次会议委托军事医学科学院筹备和承办,并邀请郭亚军等 8 位尚在海外留学的人员及陈竺等国内知名学者,结合他们自己的研究工作,介绍了近年来国际上肿瘤分子生物学的最新进展。

为了适应当前肿瘤分子生物学全面飞速发展的形势,更好地进行学术交流,我们将这些高水平的学术报告汇编成册,以进一步为控制癌症、造福人类做出我们应有的贡献。

在本书的编写过程中,由于文章来源和语种不一,我们请军事医学科学院肿瘤分子生物学实验室的张立新、冯东晓、王尧河、陈高明、陈洁平、丁秀云、王宏、李敏、刘广贤、卞丽红、王鑫和上海第二军医大学东方肝胆外科研究所的谢天培、沈锋、王皓、刘彦君、仇毓东等同志参加了编译、整理和校对。此外,我们还特请军事医学科学院情报研究所程违教授对书各章进行审定,编辑和加工。并由王红丽、钱卫珠、王华善同志录入,在此深表感谢。

在本书的出版过程中,国家自然科学基金委员会给予了大力支持,军事医学科学院科技部训练处黄留玉、钱军和张宏为本书出版进行精心的筹划,并做了大量具体工作,也在此表示感谢。鉴于时间紧迫,水平有限,部分文章的文字和内容未作仔细加工处理,错误之处,尚祈同道及读者谅解、批评和指正。

李春海

1996 年 9 月 1 日于北京

目 录

前 言	吴祖泽
编者的话	李春海
1. 肿瘤的免疫治疗研究	郭亚军(1)
2. 大规模基因开发——在癌症治疗中的应用	李 毅(11)
3. 共刺激引起的肿瘤免疫反应具备治疗价值吗?	陈列平(16)
4. 腺病毒载体及其在基因治疗上的应用	张维维(30)
5. 热休克蛋白 70(HSP70)在调节肿瘤细胞死亡中的作用 ...	魏于全 赵 霞(42)
6. 反义 RNA 在肿瘤研究中的应用	李 勇 王玉芝(47)
7. 细胞骨架刚性的调控与癌症的抑制	汪 宁(53)
8. 抑癌基因 p53	卢 欣(57)
9. 细胞凋亡与免疫调节	时玉舫 王若翔(61)
10. 基因修饰诱导肿瘤细胞凋亡	郭 宁等(70)
11. 细胞凋亡的分子机制及 其在白血病治疗中的应用意义	贺福初等(79)
12. 维甲酸调节通路.染色体易 位与急性早幼粒细胞白血病	陈 竺 陈赛娟(92)
13. 急性白血病基因分型研究现状及展望	艾辉胜 朱元晓(98)
14. 谷胱甘肽 S-转移酶基因家族在癌变中的作用	李春海(103)
15. MUC1 粘蛋白及其基因在肿瘤诊断和治疗中的应用 ...	张立新 李春海(117)
16. STAT1 介导的细胞增殖抑 制和蛋白激酶抑制剂的诱导	傅新元(129)

Contents

1. Tumorigenicity and tumor vaccine immunotherapy Ya-Jun Guo(1)
 2. Large-scale gene discovery: application in cancer therapy Yi Li(11)
 3. Can co-stimulated tumor immunity be therapeutically
efficacious? Li-Ping Chen(16)
 4. Adenoviral vectors and their application in gene
therapy Wei-Wei Zhang(30)
 5. Role of heat shock protein (HSP)70 in regulation of cancer
cell death Yu-Quan Wei, Xia Zhao(42)
 6. The application of antisense RNA to cancer
research Yong Li, Yu-Zhi Wang(47)
 7. Modulation of cytoskeletal stiffness and cancer inhibition ... Ning Wang(53)
 8. Tumor suppressor gene p53 Xin Lu(57)
 9. Apoptosis in lymphocytes and
cancers Yu-Fang Shi, Ruo-Xiang Wang(61)
 10. Apoptosis induced by gene modification Ning Guo et al(70)
 11. Molecular mechanism of apoptosis of cells and its application in
treatment of leukemia Fu-Chu He et al(79)
 12. Retinoic acid regulatory pathways, chromosomal and acute
promyelocytic leukemia Zhu Chen, Sai-Juan Chen(92)
 13. Advance in research into genotype in acute
leukemia..... Hui-Sheng Ai, Yuan-Xiao Zhu(98)
 14. The role of glutathione S-transferases gene family in
carcinogenesis Chun-Hai Li(103)
 15. MUC1 and its gene: applications in cancer diagnosis and
treatment Li-Xin Zhang, Chun-Hai Li(117)
 16. Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase
inhibitor p21 WAF1 / CIP1 mediated by STAT1 Xin-Yuan Fu(129)
-

肿瘤的免疫治疗研究

郭亚军

第二军医大学东方肝胆外科研究所

美国凯西大学肿瘤免疫研究中心

作者简介 郭亚军, 1955年8月出生, 1978年毕业于第三军医大学。1984年获第二军医大学硕士学位, 1987年获博士学位。1989年赴美国哈佛大学医学院肿瘤中心作访问研究, 1993年至1996年任美国凯西大学肿瘤免疫研究中心主任, NIH资助的临床基因治疗中心和单克隆抗体中心实验室访问教授。现为第二军医大学肿瘤免疫和基因治疗中心主任, 美国圣迭戈 Sidney Kimmel 癌症中心主任, 访问教授。近年主要从事肿瘤转移机制和恶性肿瘤免疫基因治疗的研究。作者用抗原提呈细胞制作肿瘤疫苗的研究被列为当前肿瘤生物治疗的四大模式之一。

摘要 肿瘤的免疫治疗是一种新型的肿瘤治疗模式, 是对三大传统疗法的有效补充, 主要是通过相关的技术方法来增强肿瘤抗原的免疫原性, 进而诱导机体产生肿瘤特异性的细胞免疫应答来消除肿瘤。肿瘤相关及特异性抗原的存在是肿瘤免疫学治疗的基础, 但因受到肿瘤细胞本身及外在多种因素的影响, 怎样诱发有效的肿瘤免疫, 是一个令人困扰的问题。随着对免疫应答特别是抗原递呈作用分子机制研究的逐渐深入, 新思路、新方法不断产生, 有些已用于临床并初见成效。本文根据目前的研究热点, 结合我们自己的工作, 阐述肿瘤免疫治疗的近期发展概况。

恶性肿瘤是严重危害人民健康和生命的疾病, 在各种疾病所致的死亡中, 居第二位, 并有进一步增高的趋势。它所以被人们公认为“绝症”, 是因为其预后极差。手术、化疗和放疗是治疗恶性肿瘤的三大传统疗法。由于恶性肿瘤的生物学特性, 使上述这些治疗的疗效都非常局限。

手术治疗尽管能够有效地去除肉眼可见的肿瘤, 但无法保证切除所有的肿瘤细胞, 也未去除肿瘤发生的原因, 因此一直无法解决术后的复发问题。放疗及化疗除了有严重的毒副反应外, 由于许多肿瘤细胞对其不敏感, 或增强了耐受性, 使疗效非常有限。

近年来肿瘤生物治疗研究是一个热点, 已成为肿瘤治疗的新模式。生物治疗主要包括肿瘤的免疫治疗和基因治疗。实质上, 目前所有免疫或基因治疗达到治疗作用理想机制, 一是诱导肿瘤细胞自身生长的停滞或凋亡, 二是机体内具有抗肿瘤特异性和细胞毒活性的T淋巴细胞的产生, 达到特异性攻击肿瘤的作用。从目前国际研究的趋势分析, 从实际应用的角度推测, 后一种途径获得疗效的希望更大。本文就肿瘤免疫治疗的问题结合作者近年的工作做一阐述。

肿瘤特异性移植抗原

1957年, Prehn 和 Main 首次发现近交系小鼠可对 MCA(Methylcholanthrene, 一种致癌剂)诱导的肉瘤产生免疫反应。以某一种肿瘤免疫的小鼠只可对同种肿瘤产生保护性免疫, 但对其他肿瘤则无此保护性免疫。后来用免疫刺激后观察肿瘤排斥的方法发现, 许多肿瘤具有免疫原性。由此推论化学诱变所致癌症具有个体特异的肿瘤特异性移植抗原(TSTA)。继而以几种肿瘤重复免疫发现, 在不同的化学诱导的肿瘤间存在交叉保护性免疫。因此, 化学诱导的肿瘤可能共同表达弱的 TSTA。为显露这种共同的弱 TSTA, 必须给予较为强烈的免疫刺激。已知许多化学诱导的肿瘤均表达激活或突变的原癌基因, 这些原癌基因可能与弱 TSTA 有关。与化学诱癌类似的是, 物理因素如紫外线诱发的肿瘤也有特异的 TSTA 表达。致癌剂诱发的肿瘤 TSTA 的理化特性尚不清楚。

致癌性病毒引起细胞转化的过程中需表达某些病毒特异性蛋白, 这些蛋白也表达于病毒诱发的不同组织来源的肿瘤细胞。因此, 与化学及物理因素引起的肿瘤不同的是, 由致癌性病毒引起的肿瘤往往具有共同的 TSTA。据认为 16,18 型乳头瘤病毒均与某些人类肿瘤发病有关。因此, 乳头瘤病毒的基因产物可能成为 TSTA。由于目前绝大多数人类肿瘤的病因尚不清楚, 我们尚不知道是否人类肿瘤也表达 TSTA。虽然也有多种针对人类肿瘤细胞的单抗, 但其中绝大多数与非肿瘤细胞有交叉反应。

无论是化学诱导的或是病毒诱发的肿瘤均有 TSTA 表达, 因而具有免疫原性。然而, 对啮齿动物的自发性肿瘤和人类的自发性肿瘤, 以经典的移植排斥试验检测均显示无免疫原性。最近, Prehn 提出自发性肿瘤也可具有免疫原性。据 Prehn 推论, 移植排斥试验的敏感性较低, 不能测出一些足以诱导出某种免疫反应的弱免疫原性。既然自发性肿瘤也可能存在较弱的免疫原性, 那么我们就可能通过增强肿瘤免疫原性的方法激发机体免疫。

这一设想最近得到了支持: 近来研究发现, 某些人类肿瘤表达突变的癌基因及突变的抑癌基因, 这些突变基因的产物可能成为宿主免疫系统攻击的目标。最近, 在人黑素瘤细胞系中克隆了一个基因 MZ2-E, 其编码的抗原可为 CTL 细胞所识别。该基因表达于原发的黑素瘤细胞、其它黑素瘤细胞系以及一些其它组织来源的肿瘤。在多种正常组织中未检测到该基因的表达。这种在多种人类肿瘤中可能存在共同潜在 TSTA 的现象, 对于肿瘤的免疫治疗可能产生深远影响。

影响宿主肿瘤免疫的因素

对大多数肿瘤的免疫来说, T 细胞均起关键的作用。在有些试验系统中起主要作用的是 $CD8^+$ 细胞毒性 T 细胞; 在另一些系统中, $CD4^+$ T 细胞是主要的效应细胞。 CD^+ 细胞可以为细胞毒性 T 细胞的克隆扩增提供必要的辅助, 同时其分泌的细胞因子可激活巨噬细胞等效应细胞, 这些细胞也可控制肿瘤生长。肿瘤细胞须释放 TSTA 才能激活 $CD4^+$ 细胞。TSTA 释放后, 经抗原提呈细胞(APC)摄入后加工成短肽, 然后经 MHC-II 类抗原提呈。由于绝大多数肿瘤细胞缺乏 MHC-II 类抗原, 因此在机体的抗肿瘤免疫反应中, APC 起主要的加工和提呈抗原的作用。如果要用肿瘤细胞直接激活 $CD8^+$ T 细胞, 必须将 TSTA 在肿瘤细胞内加工为小肽后提呈于细胞表面的 MHC-I 类分子。肿瘤细胞可能通过多种方式逃避机体免疫监视, 例如, 它们可以缺乏一种或多种激发机体免疫系统所必需的成分。

肿瘤细胞 TSTA 的改变及封闭

肿瘤细胞可能暂时性地调整其自身的 TSTA 以逃避机体的免疫监控,或适应环境的改变。这一理论首先在小鼠白血病细胞系中得到证实,该细胞系经抗体、补体处理后,缺失了细胞表面的胸腺白血病抗原(TL 抗原)。抗 TL 的抗体与肿瘤细胞结合后,细胞表面出现斑点、抗原分布改变直至该抗原消失。这可能是肿瘤逃避机体免疫的机制之一。在其它实验中又发现,某些抗 TSTA 的抗体可以对该 TSTA 起封闭作用,这类抗体又被称为“封闭抗体”。有些人胶质细胞瘤可合成并分泌糖蛋白,这些糖蛋白分布于肿瘤细胞表面,可以阻止 CTL 细胞识别并杀伤肿瘤。

肿瘤细胞可以低表达 MHC 分子

低表达 MHC 分子也是肿瘤细胞免疫逃避的重要机制之一。12 型腺病毒在体内致瘤的同时,伴随着导致机体 MHC-I 类分子表达减弱;而缺少一个名为 E1A 基因的缺陷型腺病毒,以上两种作用同时消失。将腺病毒转化的细胞用 IFN- γ 处理,上调 MHC-I,或转染适当的 MHC-I 基因,可减弱其致瘤性。Gross 白血病病毒感染小鼠可诱发胸腺瘤。该高度恶性的胸腺瘤的 H-2D 表达正常,然而缺乏 H-2K,将 H-2K 基因人工转染该细胞可明显降低其在正常免疫力小鼠体内的致瘤性,但对其在裸鼠体内的生长和转移能力无影响。由此可以认为,向肿瘤细胞转染 MHC-I 分子是通过影响宿主的 T 细胞免疫反应而杀伤肿瘤,而不是直接改变肿瘤的生物行为。

人类肿瘤细胞是否也可通过下调 MHC 分子的表达来逃避机体免疫尚不清楚,但通过研究转移性黑素瘤、乳腺癌及结肠癌的 HLA-I 类抗原的表达发现,这些肿瘤均有 HLA-I 类抗原改变。然而不同的肿瘤往往有各自特定的 HLA-I 等位基因的丢失,而不是所有的 HLA-I 基因缺失。因此,由以往的临床资料尚不能得出关于 MHC 与患者肿瘤免疫逃避之间关系的结论性意见。

肿瘤细胞可能改变其抗原加工途径,而不将特异性抗原提呈给宿主 T 细胞

抗原加工是一个复杂的过程。通常认为 CD8⁺细胞毒性 T 细胞所识别的抗原多肽是在胞质内的蛋白中产生的,这些抗原多肽与 MHC-I 的 α 链和 β_2 微球蛋白在分泌过程早期结合。另外二种 MHC 基因产物 LMP7 和 LMP-2 则可以改变蛋白酶体的位置或功能,以利于抗原多肽产生,或利于它们与 MHC-I 的结合。MHC 的另外二个基因产物 TAP-1 和 TAP-2 可提高细胞加工抗原的效率。

Restifo 等人研究了 26 种不同的人类肿瘤细胞系的抗原加工能力。他们用重组的痘苗病毒瞬时表达鼠的 MHC-I 类 Kd 分子。三种人类小细胞肺癌细胞系始终不能将内源性蛋白呈递给对 Kd 限制性的痘苗病毒特异性的细胞毒性淋巴细胞。生物化学的分析提示这些细胞系不能将 MHC-I 分子从胞浆内质网转移到细胞表面。这些肿瘤细胞的 LMP-1, LMP-2, TAP-1, TAP-2 四种抗原加工和提呈所必需蛋白的 mRNA 表达也较低甚至无法测出。用 IFN- γ 处理这些细胞会增加这些 mRNA 的表达并逆转这些功能和生物化学上的缺失。这些细胞确切的缺陷机制还不清楚,但结果提示抗原加工的下调,可能是肿瘤细胞逃避免疫监视的一种策略。这些实验多是使小鼠的 MHC-I 类抗原在人类肿瘤细胞系中

瞬时表达,再以鼠的细胞毒性 T 细胞克隆测定杀伤活性。因此,人类的肿瘤细胞是否也通过改变其抗原加工机制来逃避免疫监视,仍然需要进一步明确。最近,有人用抗人 TAP-1 蛋白的特异性抗血清免疫组化分析测定了 76 例宫颈癌 TAP-1 的表达,结果显示其中的 37 例无 TAP-1 表达。对肺、大肠、乳腺癌中的免疫组化测定初步结果提示 TAP-1 不仅在宫颈癌中表达减少,而且可能是人类肿瘤中的普遍现象。

肿瘤细胞可能缺乏共刺激或粘附分子

很多具有正常免疫力的宿主并不能立即清除体内的高免疫原性肿瘤。肿瘤细胞可能不能传递共刺激的第二信号。绝大多数鼠肿瘤均表达 MHC-I 抗原,但缺乏共刺激分子 B7-1,将 B7-1 基因转入表达人 16 型乳头瘤病毒的 E7 基因编码的肿瘤特异性抗原的小鼠肉瘤细胞系中,能增加其免疫原性。将 B7-1 基因转入鼠 K1735 黑素瘤细胞中也会使之被具有正常免疫力的小鼠所排斥。用 B7+ K1735 肿瘤细胞免疫过的小鼠可产生抗亲代 B7 阴性的 K1735 肿瘤细胞系的免疫反应。将 MHC-II 基因片段及 B7-1 共转染 Sal 肉瘤,可明显提高其免疫原性。然而,单纯的 B7-1 转染并不能激发免疫反应消灭肿瘤。很多 B 淋巴细胞表达高水平的 B7-1;另外,将 B7-1 基因转入用经典的移植试验测定为无免疫原性的肿瘤细胞,并不能使它们产生免疫原性。有些肿瘤细胞可能缺乏 TSTA 或抗原加工途径有缺陷。此外,它们也可能并不需要或不仅需要 B7-1,而是还需要其它共刺激分子如 ICAM-1, IFA-3, VCAM-1 或 HSA。

肿瘤细胞可能产生改变宿主免疫反应的因子

某些肿瘤细胞可分泌某些细胞因子刺激自身生长,或抑制宿主对其免疫反应,从而促进肿瘤生长。肿瘤细胞释放的巨噬细胞趋化因子(MCPs)可吸引巨噬细胞至肿瘤部位,浸润的巨噬细胞能释放其它细胞因子和生长因子,如血小板生长因子(PDGF),刺激肿瘤生长。有些肿瘤会产生 TGF- β ,它可以促进新生血管生成和细胞外基质合成,还能促进其它细胞因子的产生。此外,TGF- β 还是一种免疫抑制因子,它能在体外阻止 T 细胞反应。因此,产生 TGF- β 的肿瘤细胞在体内还能通过抑制宿主淋巴细胞活性来逃避免疫攻击。

通过基因转染制备特异性肿瘤疫苗

当前,有很多方法可提高肿瘤的免疫原性。早期的研究中,通常用免疫佐剂与肿瘤细胞混合或用化学方法修饰肿瘤细胞以免疫动物。随着基因工程技术的发展,我们可以用基因转染的方法修饰肿瘤细胞。将 MHC 基因转入肿瘤细胞可以使无免疫原性的肿瘤细胞产生免疫原性。用转染细胞因子基因的肿瘤细胞免疫动物也能诱导抗肿瘤免疫反应,这些细胞因子基因包括 IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, TNF, G-CSF, GM-CSF, IP-10 及 IFN- γ 。在上述研究中,某些实验的抗肿瘤免疫是由 T 淋巴细胞介导的,另外一些实验则提示抗肿瘤免疫由巨噬细胞和白细胞介导。用表达反义 IGF 的载体转染细胞以抑制胰岛素样生长因子的分泌,可提高鼠 C6 胶质瘤的免疫原性。

向肿瘤细胞内分别转染 IL-2, IL-4, IL-7, TNF 或 IFN- γ 基因,使其过度表达。将上述产生细胞因子的肿瘤细胞免疫动物,然后再种植其亲代的野生型细胞。当种植的亲代细胞数目较少时,所有动物无肿瘤生长,但若亲代细胞种植数目较多时,保护性免疫的作用则不明

显。令人惊讶的是,将亲代肿瘤细胞与佐剂小棒杆菌(*Corynebacterium parvum*)混合免疫动物,其效果与上述产生细胞因子的肿瘤细胞是相同的。将2种细胞因子基因同时转染肿瘤并表达,其免疫原性并未进一步增强。这一结果提示须进一步深入研究才能确定细胞因子转染能否制备特异性肿瘤细胞疫苗。

尽管特异性肿瘤疫苗在实验模型中取得了进展,但基因工程制作的肿瘤疫苗在人体的应用却未显出疗效。进行基因转染的操作步骤包括肿瘤细胞的体外培养、转染外源基因到原代培养肿瘤细胞及体外筛选等。这些步骤操作复杂、费时、昂贵,从而限制了临床应用。而且,不同个体T细胞有效激活的机制不同,因而若要将无免疫原性的肿瘤转化为有免疫原性的肿瘤疫苗,必须首先确定每个患者个体的肿瘤逃避机制和T细胞激活缺陷的机制。例如,对于TAP转运蛋白缺乏的肿瘤细胞来说,因这种肿瘤细胞无法提呈TSTA,转染细胞因子基因或共刺激分子基因就不会产生预期的效果。

为避开肿瘤细胞原代培养的困难,有人曾尝试将基因直接转染至肿瘤原位。将脂质体包裹的同种异体HLA基因注射至5名晚期黑素瘤患者的肿瘤内,其中一名患者的肿瘤消退,且远处转移结节完全消失;而其余患者则无反应。这些结果提示,将外源基因直接注射肿瘤部位的方法具有潜在价值。

以肿瘤细胞修饰APC制备肿瘤疫苗

一种有效的肿瘤疫苗应该具有T细胞激活所需的各种信号。激活的B细胞是有效的抗原提呈细胞,除表达高水平的MHC-II类抗原外,它还表达高水平的辅助和共刺激分子。我们曾将激活的B细胞与BERH-2肝癌细胞系体外融合,杂交瘤细胞表达高水平的MHC-I类、II类抗原、ICAM-1及B7,丧失了在同种动物体内的致瘤性。用该杂交瘤细胞免疫动物,可消除亲代肿瘤细胞的致瘤性,并治愈已形成的亲代肿瘤。CD4和CD8细胞在这种保护性免疫反应的诱导阶段均不可缺少,但在消灭肿瘤的效应阶段,只有CD8⁺细胞是必需的。据最近的几篇论文报告,以肿瘤相关性或特异性抗原体外处理自体树突状细胞后立即接种,可起到肿瘤细胞疫苗的作用。与基因转染的方法不同的是,上述两类方法一次不只转染单个基因,而是使APC同时具有多种肿瘤特异性及辅助信号。然而这些方法仍然花费大量时间且操作复杂,需要大量激活B细胞或树突状细胞。鉴于这些实验的结果及存在问题,我们又研究了一种进一步简化操作的疫苗制备方法,以便扩展肿瘤细胞疫苗的临床应用范围。

以双特异抗体修饰肿瘤细胞制备肿瘤疫苗

在T细胞激活所需的各种信号分子中,B7是重要的共刺激分子,最近的实验表明,B7除可以向T细胞的CD28分子提供正性信号外,还可向T细胞的CTLA-4分子提供负性信号。为了防止负性信号的产生,我们发展了一种新的双特异抗体修饰肿瘤细胞制备肿瘤疫苗的方案。第一步是以各种细胞因子体外处理同种肿瘤细胞,以提高其抗原提呈信号及共刺激分子的表达。第二步是以抗CD28肿瘤细胞表面抗原双特异性抗体装备肿瘤细胞。用这种方法处理的肿瘤细胞可体外刺激天然脾细胞产生CTL。这种肿瘤疫苗可治疗已经形成的肿瘤。这种方法可以用于低或无免疫原性的肿瘤模型,方法简单,因此可能具有广泛的临床应用前景。

由肿瘤疫苗体外诱导 CTLs 的过继免疫治疗

尽管通过修饰的肿瘤细胞或 APC 细胞已经具备了 T 细胞激活所需的信号分子, 具有较强的免疫原性, 但由于有些肿瘤患者体内的免疫抑制因素, 仍不能有效地激发机体的抗肿瘤免疫。为此, 我们在制作上述肿瘤疫苗的基础上, 分离出其相应的 T 淋巴细胞, 在体外可控条件下用肿瘤疫苗刺激 T 细胞, 并筛选出被激活的 CTL, 通过扩增后回输给患者。从而建立了肿瘤特异性主动与肿瘤特异性被动联合的免疫治疗方案, 进一步提高了对肿瘤的治疗效果。

参考文献

- 1 Klein G, Boon T. Tumor immunology: present perspective. *Current Opinion in Immunology*, 1993;5:687-692
- 2 Finn O J. Tumor-rejection antigens recognized by T lymphocytes. *Current Opinion in Immunology*, 1993;5:701-708
- 3 Chen L P, McGowan P, Ashe S *et al*. Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity. *J Exp Med*, 1994; 179:523-532
- 4 Boon T. Teaching the immune system to fight cancer. *Sci Am*, 1993;3: 82-89
- 5 Anichini A, Maccalli C, Mortarini R *et al*. Melanoma cells and normal melanocytes share antigens recognized by HLA A2-restricted cytotoxic T cell clones from melanoma patients. *J Exp Med*, 1993;177: 989-99
- 6 Van Der Brugen P, Traversari C, Chomez P *et al*. Transfection and expression of a gene coding for a human melanoma antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes. *Science*, 1991; 254:1643-1647
- 7 Falk K, Rotzschke O, Rammensee H-G. Cellular peptide composition governed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*, 1990;348:248-251
- 8 Neefjes J J, Ploegh H L. Intracellular transport of MHC class II molecules. *Immunol Today*, 1992;13:179-184
- 9 Doyle C, Strominger J L. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediated cell adhesion. *Nature*, 1988; 330:256-258
- 10 Norment A M, Salter R D, Parham P *et al*. Cell-Cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules. *Nature*, 1988; 336:79-81
- 11 Townsend S E, Allison J P. Tumor rejection after direct costimulation of CD8⁺ T cells by B7-transfected melanoma cells. *Science*, 1993;259: 268-270
- 12 Bretscher P, Cohn M. A theory of self-nonself discrimination. *Science*, 1970; 169: 1042-1049
- 13 Matsui K, Boniface J J, Reay P A *et al*. Low affinity interaction of peptide-MHC complexes with T cell receptors. *Science*, 1991;254: 1788-1791
- 14 Marrack P, Kappler J. T cells can distinguish between allogeneic major histocompatibility complex products in different cell types. *Nature*, 1988;332:840-843
- 15 Dustin M L, Springer T A. Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell lo-

- comotion. *Annu Rev Immunol*, 1991;9:27-29
- 16 Springer T A, Dustin M L, Kishimoto T K *et al*. The lymphocyte function-associated LFA-1, CD2 and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system. *Annu Rev Immunol*, 1987; 5: 223-229
 - 17 Springer T A. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, 1990; 346:425-434
 - 18 Hogg N, Landis R C. Adhesion molecules in cell interactions. *Current Opinion in Immunology*, 1993; 5:383-390
 - 19 Lieping C, Linsley P S, Hellstrom K E. Costimulation of T cells for tumor immunity. *Immunol Today*, 1993; 14:483-485
 - 20 Freeman G J, Gray G S, Gimmi C D. Structure, expression and T cell costimulatory activity of the murine homologue of the human B lymphocyte activation antigen B7. *J Exp Med*, 1991; 174: 625-631
 - 21 Gross J A, St John T, Allison J P. The murine homologue of the T lymphocyte antigen CD28. *J Immunol*, 1990; 144:3201-3210
 - 22 Frasier J D, Irving B, Crabtree G *et al*. Regulation of interleukin-2 gene enhance activity by the T cell costimulatory molecule CD28. *Science*, 1991;251:313-315
 - 23 Brunet J F, Denizot F, Lucian M F *et al*. A new member of the immunoglobulin superfamily CTLA-4. *Nature*, 1987; 328: 267-270
 - 24 Linsley P S, LeBret J A. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol*, 1992; 11:191-196
 - 25 Linsley P S, Wallace P M, Johnson J *et al*. Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. *Science*, 1992;257:792-795
 - 26 Hathcock K S, Laszlo G, Dickler H B *et al*. Identification of an alternative CTLA-4 ligand costimulatory for T cell activation. *Science*, 1993; 262: 905-907
 - 27 Linsley P S, Brady W, Urnes M *et al*. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med*, 1991;174: 561-569
 - 28 Lenschow D J, Zeng Y, Thistlethwaite J R *et al*. Long-time survival of xenogenic pancreatic islet grafts induced by CTLA-4 Ig. *Science*, 1992;257:789-792
 - 29 Freeman G J, Borriello F, Hodes R J *et al*. Uncovering of functional alternative CTLA-4 counter-receptor in B7-deficient mice. *Science*, 1993; 262:907-909
 - 30 Freeman G J, Gribben J G, Boussiotis V A *et al*. Cloning of B7-2: A CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science*, 1993; 262: 909-911
 - 31 Osborn L, Vassallo C, Benjamin C. Activated endothelium binds lymphocytes through a novel binding site in the alternately spliced domain of vascular cell adhesion molecule-1. *J Exp Med*, 1992; 176: 99-107
 - 32 Vonderheide R H, Springer T A. Lymphocyte adhesion through very late antigen 4: evidence for a novel binding site in the alternatively spliced domain of vascular cell adhesion molecule 1 and an additional $\alpha 4$ integrin counter-receptor on stimulated endothelium. *J Exp Med*, 1992; 175: 1433-1442
 - 33 Stein P H, Singer A. Similar co-stimulation requirement of CD4⁺ CD8⁺ primary T helper cells: role of IL-1 and IL-6 in inducing IL-2 secretion and subsequent proliferation. *Int Immunol*, 1992;3:327-331
 - 34 Fanslow W C, Sims J E, Sassenfeld H *et al*. Regulation of alloreactivity in vivo by a soluble form of the interleukin-1 receptor. *Science*, 1990;248:739-741

- 35 North R J, Neubaure R H, Huang J H, *et al.* Interleukin-1 induced T cell mediated regression of immunogenic murine tumors. *J Exp Med*, 1988;168:2031-2043
- 36 Duff G W, Durum S K. The pyrogenic and mitogenic action of interleukin-1 are related. *Nature*, 1983;304:449-452
- 37 Prehn R T, Main J M. Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J Natl Cancer Inst*, 1957;18: 769-778
- 38 Kripke M L. Antigenicity of murine skin tumors induced by ultra violet light. *J Natl Cancer Inst*, 1974; 53:1333-1336
- 39 Koch S, Zaleberg J R, Mckenzie I F C. Description of a murine B lymphoma tumor specific antigen. *J Immunol*, 1984;133:1070-1077
- 40 Basombrio M A. Search for common antigenicity among twenty five sarcomas induced by methylcholanthrene. *Cancer Res*, 1970;30:2458-2462
- 41 Ward P L, Koeppen H, Hurteau T *et al.* Tumor antigens defined by cloned immunological probes are highly polymorphic and are not detected on autologous normal cells. *J Exp Med*, 1989;170:217-232
- 42 Tevethia S S, Tevethia M J, Lewis A J *et al.* Biology of simian virus 40(SV40) transplantation antigen (TrAg)IX. Analysis of TrAg in mouse cells synthesizing truncated SV40 large T antigen. *Virology*, 1983;128: 319-330
- 43 Tevethia S S, Greenfield R S, Flyer D C *et al.* SV40 transplantation antigen relationship to SV40-specific proteins. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, 1980;44:235-242
- 44 Habel K. Resistance of polyoma virus immune animals to transplanted polyoma tumors. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1961;106:722-725
- 45 Sjogren H O, Hellstrom I, Klein G. Resistance of polyoma virus-immunized mice to transplantation of established polyoma tumors. *Exp Cell Res*, 1961; 23: 204-208
- 46 Zur Hausen H. Viruses in human cancers. *Science*, 1991;254:1167-1173
- 47 Chen L P, Thomas E K, Hu S L. Human papillomavirus type 16 nucleoprotein E7 is a tumor rejection antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991;88:110-114
- 48 Bishop J M. Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, 1991; 64: 235-248
- 49 Levine A J, Momand J, Finlay C A. The p53 tumor suppressor gene. *Nature*, 1991;351:453-456
- 50 Basombrio M A, Prehn R T. Studies on the basis of diversity and time of appearance of chemically-induced tumors. *Natl Cancer Inst Monogr*, 1972; 35:117-124
- 51 Vander Gruggen P, Traversari C, Chomez P *et al.* A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 1991; 254:1643-1647
- 52 Traversari C, Vander Bruggen P, Luescher I F *et al.* A nonpeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ-2E. *J Exp Med*, 1992; 176 :1453-1457
- 53 Old L J, Cancer immunology: the search for specificity- G. H. A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res*, 1981;41: 361-375
- 54 Old L J, Boyse E A, Stockert E. Antigenic properties of experimental leukemias. I. Serological studies *in vivo* with spontaneous and radiation-induced leukemias. *J Natl Cancer Inst*, 1963;31:977-986

- 55 Gately C L, Muul L M, Greenwood M A *et al.* *In vitro* studies on the cell-mediated immune response to human brain tumors. II . Leukocyte -induced coats of glycosaminoglycan increase the resistance of glioma cells to cellular immune attack. *J Immunol*, 1984; 133: 3387-3395
- 56 Haddada H, Lewis A M Jr, Sogn J A, *et al.* Tumorigenicity of hamster and mouse cells transformed by adenovirus type 2 and 5 is not influenced by the level of class I major histocompatibility antigens expressed on the cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83: 9684-9688
- 57 Wallich R, Bulbuc N, Hammerling G J *et al.* Abrogation of metastatic properties of tumor by *de novo* expression of H-2K antigens following H-2 gene transfection. *Nature*, 1985; 315: 301-315
- 58 Ruiter D J, Bergman W, Welvaart K *et al.* Immunohistochemical analysis of malignant melanomas and nevocellular nevi with monoclonal antibodies to distinct monomorphic determinants of HLA antigens. *Cancer Res*, 1984; 44: 3930-3935
- 59 Bron M C, Driscoll J, Monaco J J. Structural and serological similarity of MHC-linked LMP and proteasome(multicatalytic proteinase) complexes. *Nature (Lond.)*, 1991; 353: 355-357
- 60 Goldberg A L, Rock K L. Proteolysis, proteasome and antigen presentation. *Nature (Lond.)*, 1992; 357: 375-377
- 61 Restifo N P, Esquivel F, Kawakami Y *et al.* Identification of human cancers deficient in antigen processing. *J Exp Med*, 1993; 177: 265-272
- 62 Chen L P, Ashe S, Brand W A *et al.* Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell*, 1992; 71: 1093-1102
- 63 Baskar S, Ostrand-Rosenberg S, Nabavi N *et al.* Constitutive expression of B7 restores immunogenicity of tumor cells expressing truncated MHC class II molecules. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; 90: 5687-5703
- 64 Van-Damme J, Proost P, Lenaerts J P *et al.* Structural and functional identification of two human tumor derived monocyte chemotactic protein (MCP-2 and MCP-3) belonging to the chemokine family. *J Exp Med*, 1992; 176: 59-65
- 65 Mantovani A, Bottazzi, Colotta F *et al.* The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today*, 1992; 13: 265-270
- 66 Ruoslahti E, Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulator of growth factor activities. *Cell*, 1991; 64: 864-869
- 67 Torre-Amione G, Beauchamp R D, Koeppen H *et al.* A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor β 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; 87: 1486-1490
- 68 Moses H L, Yang E Y. TGF-beta stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanism insight. *Cell*, 1990; 63: 245-247
- 69 Zoller M, Douvdevani A, Segal S *et al.* Interleukin-1 production by transformed fibroblasts. II . Influence on antigen presentation and T cell-mediated anti-tumor response. *Int J Cancer*, 1992; 50: 450-457
- 70 Bubenik J, Simova J, Jandlova T. Immunotherapy of cancer using local administration of lymphoid cells transformed by IL-2 cDNA and constitutively producing IL-2. *Immunol Lett*, 1990; 23: 287-292
- 71 Tepper R I, Pattengale P K, Leder P. Murine interleukin-4 displays potent anti-tumor activity *in vivo*. *Cell*, 1989; 57: 503-512