

第六届海内外生命科学论坛
国家自然科学基金委员会
军事医学科学院主办

GENE TARGETING AND FUNCTIONAL GENOMICS

基因打靶和 功能基因组学

主 编 杨 晓 邓初夏 叶鑫生
编审委员会 赵达生 黄培堂 孙建中
 叶鑫生 邓初夏 杨 晓

军事医学科学出版社
2001·5 北京

图书在版编目(CIP)数据

基因打靶和功能基因组学/杨晓,邓初夏,叶鑫生主编.

- 北京:军事医学科学出版社,2001.5

ISBN 7-80121-326-2

I. 基… II. ①杨… ②邓… ③叶… III. 基因-理论-国际学术会议-文集 IV. Q343.1-53

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2001)第 24898 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

潮河印刷厂印刷

*

开本:787mm×1092mm 1/16 印张:11.75 字数:285 千字

2001 年 5 月第 1 版 2001 年 5 月第 1 次印刷

印数:1-2000 册 定价:20.00 元

(本社图书,凡有缺、损、倒、脱页者,本社发行部负责调换)

前 言

2000年6月26日,美、英、法、德、日、中六国同时向世界宣布人类基因组计划(HGP)基本完成,2001年2月人类基因组工作框架图正式发表,从而揭示生命科学进入了功能基因组学研究的新时代。与日俱增的海量遗传信息对生物医学科学研究和医学模式产生巨大而深远的革命性影响。发展和应用针对全基因组或全系统的高通量、大规模的整体实验手段,利用结构基因组学提供的信息和材料研究基因的功能将成为这个时代生物医学研究的主要特征。功能基因组学除在分子水平、细胞水平上进行研究外,在很大程度上还将依赖于对模式生物的研究,通过基因打靶对模式生物的遗传物质进行修饰并研究其相关的表型,可以提供某种基因在生理和病理中所起的作用,快速解析相关的分子途径和机制。同时也可用于治疗及新药筛选提供动物模型,为功能基因组的研究开辟了一条新的渠道。

由国家自然科学基金委员会和军事医学科学院共同主办的第六届海内外生命科学论坛学术研讨会将就“基因打靶和功能基因组学”这一主题进行研讨。会议邀请了在国外从事相关领域研究并颇有成就的学者回国讲学,与国内同行就共同感兴趣的领域和问题进行研讨,并谋求共同合作和发展。相信本次会议将对推动国内相关研究领域和学科的发展起到积极的作用。

军事医学科学院院长



2001年5月20日

目 录

1. <i>Brca1</i> 和乳腺肿瘤的发生	邓初夏(1)
2. 转移性黑素瘤的进化分子肖像	王安娜(11)
3. 亨廷顿病(一种由聚谷氨酰胺扩展所引起的遗传性神经退化疾病) 的分子病理学	李晓江(22)
4. 小鼠胚胎干细胞的 ENU 诱变——一种功能基因组学研究的新方法	陈一菁(32)
5. 利用细菌人工染色体微阵列技术检测小鼠和人肿瘤中的基因组改变	蔡伟文(39)
6. 应用动物模型进行白血病起因和造血作用的基因分析	刘 溥(50)
7. <i>Smads</i> 基因在哺乳动物发育中的功能研究	杨 晓(60)
8. TGF- β / <i>Smad3</i> 信号抑制软骨细胞肥大性分化并为维持关节软骨所必需 ...	杨 晓 等(72)
9. 动物模型——“剔除”肿瘤和“敲入”健康的希望	王铸钢(82)
10. 靶向破坏 NDST-1 基因导致小鼠发生肺发育不全及新生儿呼吸窘迫	胡赓熙 等(84)
11. GFP 标记的从小鼠胚胎干细胞分化而来的神经胶质细胞	顾 军 等(92)
12. Myostatin 基因的结构与时空表达调控	朱大海(97)
13. HSP70-2 调控小鼠精原细胞减数分裂 1 期中 CDC2 激酶活性	朱大海 等(100)
14. 转录因子 RBP-Jk 在小鼠胸腺发育中的作用	韩 骅(103)
15. 食管癌中 DNA 聚合酶 β 基因突变的研究	董子明 等(107)
16. 基于 Cre/Loxp 系统的 <i>Smad2</i> 条件基因打靶小鼠的建立	周 江 等(117)
17. 基因科学与 21 世纪的针灸学	吴焕淦 等(126)
18. 放射复合伤口中 Bax, Bcl-2 表达与细胞凋亡的关系	崔玉芳 等(129)
19. 细胞凋亡在小鼠胸腺淋巴细胞辐射损伤与修复中的作用及其机制	崔玉芳 等(136)
20. 两种特异性磷脂酶 C 对中华大蟾蜍发育后期尾部程序性细胞死亡 调节的初步研究	苗俊英 等(144)
21. 小鼠胚胎干细胞体外定向心肌细胞分化的研究	孙彦洵 等(148)
22. 核糖体蛋白 RpL6/Taxreb107 核定位信号的确定及启动子分析	王冀姝 等(154)
23. 非高发区食管癌组织中聚合酶 β 基因的变异研究	赵 勤 等(160)
24. 青岛文昌鱼 MLC-alk 基因片段的克隆	张燕君 等(166)
25. 重组超抗原葡萄球菌肠毒素 A 基因膜型表达载体的构建	马文学 等(170)
26. 腺病毒介导的 p16 和 p53 的联合应用对胆管癌细胞 QBC939 的 生长抑制作用	鲁建国 等(177)

Brca1 和乳腺肿瘤的发生

邓初夏

美国国立卫生研究院糖尿病、消化道病及肾病
研究所发育和疾病遗传学部, 贝塞斯达, MD20892

【摘要】 生殖细胞中 *Brca1* 基因的突变是大多数家族性乳癌和卵巢癌发生的原因, 但该基因在体细胞中的突变却极少在散发性的肿瘤中检测到。不仅如此, 携带有 *Brca1* 无效突变的小鼠胚胎或缺失 *Brca1* 外显子 11 的纯合子胚胎 $Brca1^{\Delta 11/\Delta 11}$, 都由于细胞增殖缺陷而在妊娠期死亡; 这一事实提出了有关 *Brca1* 抑制肿瘤形成的机理的问题。分子生物学分析的结果揭示, *Brca1* 的突变引起胚胎和胚胎性成纤维细胞 (MEF) 对 γ 射线照射过敏和染色体异常。值得注意的是, $Brca1^{\Delta 11/\Delta 11}$ 的 MEF 保持有完整的 $G_1 - S$ 关卡, 但在 $G_2 - M$ 关卡控制方面却有缺陷。这些细胞含有多个有功能的中心体, 从而导致不均等的染色体分离和非整倍性发生。这些资料显示了 *Brca1* 通过调控中心体复制和 $G_2 - M$ 关卡而在维持遗传稳定性中所起关键性的作用, 并为它在肿瘤发生中起着作用提供了分子基础。最后, 我们的观察结果表明, *Brca1* 在乳腺上皮中发生的条件突变, 引起细胞凋亡的增多和导管发育的异常。突变小鼠中乳腺肿瘤的形成, 需经过一个长的潜伏期后才出现并与 *p53* 的突变相关联。这些结果是与 *Brca1* 起着看管人基因 (caretaker gene) 作用的模型相一致的, 即该基因的缺失并不直接启动肿瘤发生而是引起遗传不稳定性; 这种不稳定性便进一步引发各种变化的发生并最终导致肿瘤的形成。

【关键词】 *Brca1*, *p53*; 中心体; $G_2 - M$ 关卡; 肿瘤发生

【Abstract】 Germline mutations in *Brca1* are responsible for most cases of familial breast and ovarian cancers, but somatic mutations in the gene are rarely detected in sporadic tumors. Moreover, mouse embryos carrying *Brca1* - null mutations or homozygous deletions of *Brca1* exon 11 of ($Brca1^{\Delta 11/\Delta 11}$) die during gestation due to proliferation defects, raising questions about the mechanisms by which *Brca1* represses tumor formation. Molecular analysis reveals that these *Brca1* mutations cause hypersensitivity to γ - irradiation and chromosomal abnormalities in embryos and embryonic fibroblast cells (MEFs). Notably, $Brca1^{\Delta 11/\Delta 11}$ MEFs maintain an intact $G_1 - S$ checkpoint, but are defective in $G_2 - M$ checkpoint control. They also contain multiple, functional centrosomes, which lead to unequal chromosome segregation and aneuploidy. These data uncover an essential role for *Brca1* in maintaining genetic stability through regulation of centrosome duplication and $G_2 - M$ checkpoint, and provide a molecular basis for its role in

tumorigenesis. Finally, we show that conditional mutation of *Brca1* in mammary epithelium causes increased apoptosis and abnormal ductal development. Mammary tumor formation in mutant mice occurs after long latency and is associated with *p53* mutations. These results are consistent with a model that *Brca1* acts as a caretaker gene, whose absence does not directly initiate tumorigenesis, instead, causes genetic instability, which triggers further alterations and ultimately leads to tumor formation. 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved

【Keywords】 *Brca1*, *p53*; Centrosome; $G_2 - M$ checkpoint; Tumorigenesis

1. 前言

乳腺和卵巢肿瘤抑制基因 *Brca1* 中发生的突变, 导致妇女易于发生癌症^[1,2]。在大约 90% 的家族性乳癌/卵巢癌患者和在 50% 左右的家族性乳癌的患者中, 都检测到了生殖细胞中的 *Brca1* 发生了突变(见[3]和[4]中的综述)。当前所做的一些研究指出, *Brca1* 在反式激活作用、DNA 损伤的修复, 以及细胞周期的调控中, 都起着重要的作用。

Brca1 含有 24 个外显子, 编码一种大分子蛋白质; 这种蛋白质在人包含有 1 863 个氨基酸, 而在小鼠则包含 1 812 个^[2,5-7]。它还含有许多可能具有不同功能的结构性基序(见[4]中的综述)。在氨基端中的一个锌指区, 通过蛋白质-蛋白质间的相互作用而直接地或间接地与 DNA 发生相互作用^[8-11]。在其羧基端中含有一个与 RNA Pol II 及 p300 发生相互作用的 BRCT 区, 并具有反式激活蛋白或阻抑蛋白的功能^[12-18]。一些已知 *Brca1* 下游的靶基因包括 *p21*^[19]、*ER*^[20] 和 *Gadd45*^[21]。

关于 *Brca1* 可能参与 DNA 损伤修复的头一个证据, 得自于当用致 DNA 损伤的一些物质处理之后, DNA 进行复制时所观察到的 *Brca1* 与细胞核内结构中的 RAD51 发生共定位(colocalize)的现象^[22]。RAD51 参与依赖于 ATP 的 DNA 链交换反应, 并且已知是酵母的 RecA 的一个同系物; 后者具有同源重组和 DNA 损伤修复的功能^[23]。虽然 *Brca1* 与 RAD51 之间的相互作用极有可能是间接发生的^[24], 但最近有一项研究显示, *Brca1* 的外显子 11 与在同源性重组及 DNA 损伤反应中也起着作用的^[26,27] RAD50 直接结合^[25]。关于将小鼠 *Brca1* 与 DNA 损伤修复联系起来的直接证据得自一个新近观察到的结果, 即缺乏 *Brca1* 的细胞对于一些氧化因子, 包括 γ 线照射和过氧化氢, 具有过敏性, 以及在转录偶联的修复方面有缺陷^[28]。

关于在 *Brca1* 与细胞周期控制之间有联系的证据, 得自下列的一些观察。已经表明, *Brca1* 与多种细胞周期的蛋白质, 包括 E2F, cdc2, 以及细胞周期蛋白, 相关联^[29]。*Brca1* 的水平随着细胞周期的不同时期而有所变化。在晚 G_1 和 S 期中该蛋白质发生超磷酸化作用, 而在 M 期之后的早期阶段又发生短暂的去磷酸化^[30,31]。除此之外, 野生型 *Brca1* 的超表达使培养的细胞中 *p21* 发生活化并诱导 $G_1 - S$ 停滞^[19]。

为了研究 *Brca1* 在体内的功能, 我们和其他学者都利用基因打靶技术, 向 *Brca1* 中导入了一系列突变, 包括无效的、形态发育不全的(hypomorphic), 及条件的突变^[10,11,32-36]。对于这些突变小鼠进行分析的结果指出, *Brca1* 通过参与 DNA 损伤修复、细胞周期关卡控制, 以及中心体复制的过程而在保持基因组完整性中起着主要作用。*Brca1* 的丢失, 导致遗传学上的不稳定性并引发一些进一步的变化, 包括癌基因的灭活及(或)肿瘤抑制基因(如 *p53*)的失活, 从而

导致肿瘤的形成。

2. 在 *Brca1* 无效突变胚胎中所观察到的生长缺陷,对 γ 线过敏及遗传不稳定性

至少有 5 个实验室已能使 *Brca1* 发生破坏^[32-36]。令人感到兴趣的是, *Brca1* 突变的纯合子胚胎呈现有表型的变异并在胎龄(E)5.5~13.5 d 之间死亡;其死亡的早晚在很大程度上依赖于所引入突变区的不同。尽管致死作用在胎龄的早晚有所不同,但所有发生突变的胚胎都具有类似的异常表现,包括发育迟缓和细胞增殖缺陷。值得注意的是, *Brca1* 的缺失可部分地借 *p21*^[37] 或 *p53*^[32,36] 的丢失而得以挽救;而 *Brca1* -/- ; *p21* -/- 或 *Brca1* -/- ; *p53* -/- 胚胎,都比 *Brca1* -/- 胚胎平均多存活 2 d。根据所推测的 *Brca1* 在 DNA 损伤修复中所起的作用和关于 *p21* 及 *p53* 在细胞周期控制中的作用的知识而做出的一个假说是, *Brca1* 的丢失引起未得到修复的 DNA 损伤逐渐蓄积起来,从而引发了依赖于 *p53/p21* 的一个细胞周期关卡的活化,于是便导致了 *Brca1* -/- 胚胎的死亡^[32,37]。为了检验这一假说,我们对携带有外显子 11 遭到靶向破坏的一个 *Brca1* 突变株(*Brca1* 11 -/-)胚胎进行了研究^[36]。选择外显子 11 的理由是它编码 *Brca1* 的 60% 以上的氨基酸,以及它与 RAD50 及 RAD51 发生直接的或间接的相互作用^[2,5-7,22,24,25]。 *Brca1* 11 -/- 突变胚胎在原肠胚形成阶段发育迟缓(图 1A),并且也对于 γ 线的照射超敏感。由于电离辐射所造成的最为常见的损伤是 DNA 中发生双链断裂

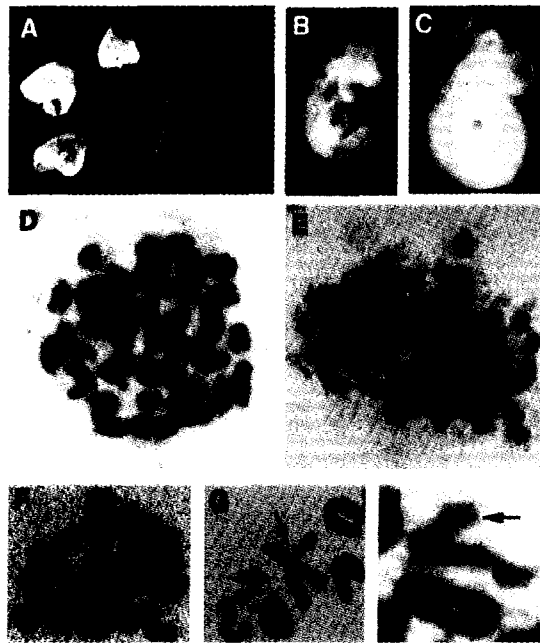


图 1A 具有 *p53* +/+ 或 *p53* -/- 背景的 *Brca1* 11 -/- 胚胎的形态学和染色体的异常

(A) E8.5 胚胎。3 个 *Brca1* 11 -/- 胚胎(左)都比其杂合子或野生型同窝对照胚胎(右)的体积显著为小。

(B 和 C) E9.5 胚胎。 *Brca1* 11 -/- ; *p53* -/- 胚胎(B)小于对照胚胎(C),并显示有变质的迹象。

(D~H) 对照胚胎细胞的染色体(D)和 *Brca1* 11 -/- ; *p53* -/- 胚胎细胞的染色体(E~H)。

(D), (E) 和 (F) 中的染色体数目, 每个细胞分别为 40, 65 和 26 个。(E) 中的箭头所指的为一异常巨大的染色体;

(G) 中的箭头所指为一具有典型的罗伯逊易位的染色体;(F) 中箭头所指为一姐妹染色单位长度不相同的染色体

(DSB)^[38],因此这一观察提示在 *Brca1* 11-/- 胚胎中不能够修复 DSB 的损伤。通过从植入后早期的胚胎直接制备染色体样品,他们发现大约 30% 的 *Brca1* 11-/- 细胞显示有染色体的异常,表现为数量上和结构上的变化(图 1D-H)。剔除 *p53* 能使 *Brca1* 11-/- 胚胎发育到 E9.5~10.5(图 1B)。然而, *Brca1* 11-/- ; *p53* -/- 胚胎存活时间的延长,与染色体异常结构的猛烈增加有关联,即 75% 以上的细胞都表现有大量染色体的变化^[36]。综合起来分析,这些资料表明, *Brca1* 11-/- 胚胎的生长缺陷乃是继发于遗传不稳定性所致,而 *p53* 依赖性细胞周期关卡的活化则造成突变胚胎发育的停滞,从而防止了损伤的 DNA 进一步蓄积起来。这一关卡在 *Brca1* 11-/- ; *p53* -/- 胚胎中被消除之后,便有大量的染色体异常蓄积起来,从而终于导致 *Brca1* 11-/- ; *p53* -/- 胚胎死亡。

3. *Brca1* 外显子 11 同 I 型缺失细胞中表现为有缺陷的 G₂-M 细胞周期关卡和中心体复制的异常

在研究 *Brca1* 对细胞周期关卡控制的可能功能及其与 *p53* 的关系时,必须从突变的胚胎建立胚胎性成纤维细胞系(MEF)。然而,在开始进行这种尝试的初期,由于 *Brca1* 缺失细胞即使在存在 *p53* 无效突变的条件下也不能生长而遭到失败^[36]。为了克服这一困难,研究人员便转向 *Brca1* 精细突变引入及条件基因剔除。

Brca1 位点编码一复杂的 RNA 减接类型^[2,39~44]。最近的研究显示, *Brca1* 外显子 11 的不同剪接方式,产生了两种主要的转录物:1 个 7.2 kb 的全长度转录物和 1 个 3.9 kb 的 Δ -外显子 11 转录物^[10]。为了建立能够让突变的胚胎存活时间较长的一种形态发育不全突变,我们在小鼠生殖细胞中使 7.2 kb 全长度转录物发生特异的缺失,而仍保持 3.9 kb Δ -外显子 11 转录物的完整^[10]。由 *Brca1* ^{Δ 11/ Δ 11} 胚胎所获得的 MEF 细胞,比野生型和杂合子细胞生长得显著慢些(图 2A 和 B),并对一些损伤 DNA 的因子具有选择性的敏感性(比较图 2C 和 D)。虽然

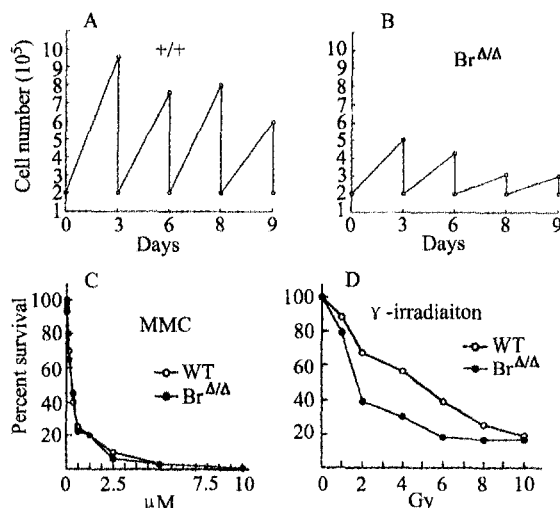


图 2 *Brca1* ^{Δ 11/ Δ 11} MEF 的增殖缺陷及对于一些 DNA 损伤因子的敏感性

(A 和 B) 将从 E14.5 野生型胚胎(A)和突变型胚胎(B)所取 MEF 以 200 000 细胞/孔的密度接种于 6 孔平板中。每隔 3 d 用胰酶消化一次细胞并加以计数,然后再以同样的密度重新进行接种。共观察了 3 个野生型和 3 个突变型胚胎的 MEF,并得到了相似的结果。(C 和 D) 第 1 次接种平板的 MEF 对于丝裂霉素 C(C)和 γ 线照射(D)的敏感性。将细胞用图 2 中所指出的剂量加以处理,并在 4~7 d 后于显微镜下计数在 0.2% 台盼蓝溶液(Sigma)中的细胞

$Brca1^{\Delta11/\Delta11}$ 的 MEF 细胞仍保存有完整的 $p53$ 依赖性 $G_1 - S$ 关卡,然而却被发现 γ 线照射所诱发的 $G_2 - M$ 关卡完全是有缺陷的^[10]。 $G_2 - M$ 关卡的一个关键性的功能,是使含有损伤的 DNA 的细胞停滞于 G_2 期,以便让细胞有更多的时间来修复 DNA 的损伤。 $G_2 - M$ 关卡的缺失导致突变的细胞进入有丝分裂期并将突变的 DNA 传递给子代细胞,从而造成遗传的不稳定性。

利用 $Brca1^{\Delta11/\Delta11}$ 的 MEF,我们还揭示出 $Brca1$ 在调控中心体复制中先前所未曾怀疑到的一个作用^[10]。细胞于正常情况下在间期和在进行有丝分裂的各期,都含有 1 个或 2 个中心体^[45~47]。然而,25% ~ 30% 的 $Brca1^{\Delta11/\Delta11}$ 细胞都含有 3 个以上的中心体和多极的纺锤体,从而将染色体拉向不同的方向。结果就导致不均等的染色体分离和微核的形成。由此可见, $G_2 - M$ 细胞周期关卡的缺陷和中心体复制的异常,都造成在 $Brca1^{\Delta11/\Delta11}$ 细胞中所观察到的大量染色体异常的蓄积。

4. $Brca1$ 在乳腺上皮中的条件突变导致钝端导管的形态发生和肿瘤形成

由于胚胎的死亡与 $Brca1$ 的靶向破坏相关,但仍然不明确的是 $Brca1$ 在小鼠中是否具有肿瘤抑制基因的功能。为了阐明这一问题和建立一个与 $Brca1$ 相关的肿瘤发生的小鼠模型,我们利用一种 Cre - loxP 技术使小鼠乳腺上皮细胞中发生了特异性的 $Brca1$ 突变。正如图 3A

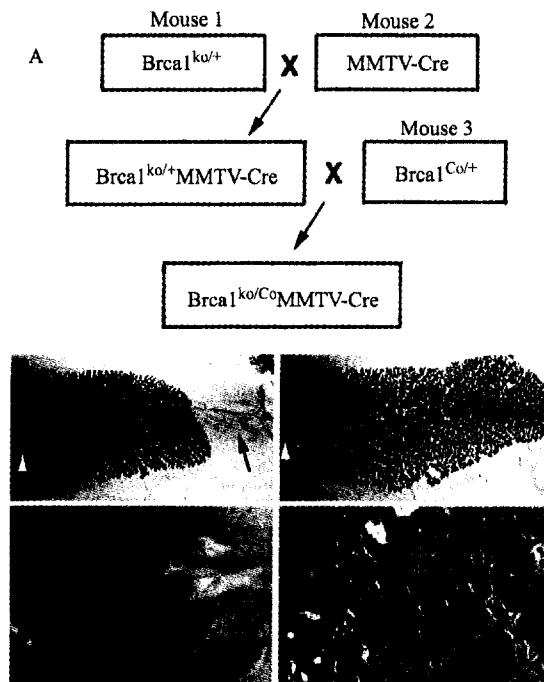


图 3 $Brca1$ 在乳腺上皮中发生的条件性突变造成乳腺的异常发育和肿瘤形成

(A)繁殖 $Brca1^{Ko/Co}$; $MMTV - Cre$ 小鼠的交配路线。用同一的交配路线还繁殖了 $Brca1^{Ko/Co}$; $WAP - Cre$ 小鼠(图中未绘出)。(B 与 C) $Brca1^{Ko/Co}$; $WAP - Cre$ 小鼠(C)和对照小鼠(B)妊娠 d 16.5 时的乳腺。突变小鼠的乳腺发育不良,出现未完全被填充的脂肪垫(箭头所指)。(D 与 E)一直径为 0.5 cm 的实体性肿瘤(D,箭头所指)及其组织学切片(E)。该肿瘤取自一只 13 月龄大的 $Brca1^{Ko/Co}$; $WAP - Cre$ 小鼠的第 3 对乳腺

中绘出的略图所示,在此项研究中使用了3种不同类型的小鼠:剔除了 *Brca1* 的 (*Brca1*^{Ko})^[36]、条件剔除的 (*Brca1*^{Co})^[11], 和 *MMTV - Cre* 或 *WAP - Cre* 转基因小鼠^[48]。由于 *MMTV - Cre* 和 *WAP - Cre* 转基因是主要在乳腺上皮中表达的^[48], 因而 Cre 所介导的 *Brca1* 的重组可以预料会主要发生在乳腺上皮中。

与 *Brca1* 在乳腺上皮中的失活相关的一些突出的特点,是乳腺上皮发育的迟缓和细胞凋亡现象的增强(图 3B 和 C)^[11]。尽管存在有这些异常,但观察到 2~10 月龄的雌鼠仍能为其幼仔哺乳而且无肿瘤发生。到 10~15 月龄时,39 只 *MMTV - Cre* 及 *WAP - Cre* 雌鼠中的 9 只发生了乳腺肿瘤(图 3D,E)。在肿瘤细胞中整个基因组似乎具有内在的不稳定性,表现为蓄积有大量的染色体异常。由于肿瘤的发生并不是普遍性的,而且出现在生命的较晚时期,因而有理由认为, *Brca1* 缺失所造成的遗传不稳定性会引发其他一些因子的突变,从而导致肿瘤的发生。

5. *p53* 的缺失极大地使 *Brca1* 发生条件突变的小鼠中乳腺肿瘤的发生率增高

令人惊奇的是,在所分析的肿瘤中,三分之二的标本显示 *p53* 的转录发生得较晚^[11]。由于这一观察结果揭示在乳腺肿瘤的发生中 *p53* 和 *Brca1* 之间存在有联系,所以我们开始寻找进一步的证据。据报道,人 *Brca1* 家族性乳腺肿瘤经常包含有 *p53* 的突变^[49~52]。然而,仍不明确的是,这些突变是否简单地乃是与肿瘤的进程相关的遗传不稳定性的一个结果,或者它们是否是加速肿瘤形成的促进因子,因为在大约 55% 的所有人体肿瘤中都观察到了 *p53* 突变。最近也有研究结果表明,具有 *Brca1* 和 *p53* 都发生了突变的杂合子 (*Brca1* + / - ; *p53* + / -) 小鼠经 γ 线照射之后,只发生有低频率的乳腺肿瘤^[53]。

为了直接检验 *p53* 在与 *Brca1* 相关的肿瘤形成的作用,让 *Brca1* 条件突变小鼠与 *p53* 基因有打靶突变的杂合子小鼠^[54] 进行交配,从而获得了只具有一个功能性 *p53* 拷贝的动物^[11]。如果 *p53* 的丢失能够加速肿瘤的发生,那么在这些小鼠中肿瘤的发生率就会增高,因为细胞只需要有一个拷贝的 *p53* 失活,而不像是在 *p53* 野生型细胞中那样需要两个拷贝都必须发生改变(图 4A)。在 *Brca1*^{Ko/Co}; *MMTV - Cre*; *p53* + / - 小鼠中观察到了肿瘤发生频率和检测到肿瘤时间方面的剧烈变化(图 4B),提示 *p53* 的丢失的确能加速肿瘤的形成。

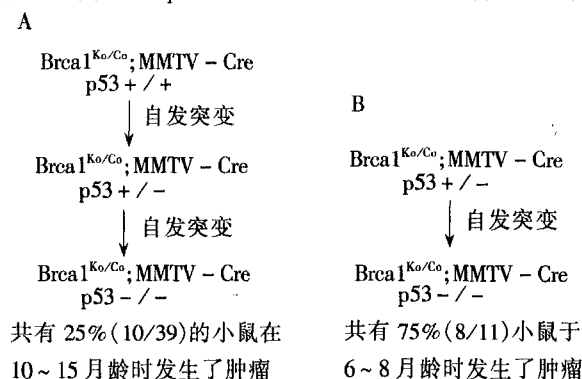


图 4 *p53* 的丢失加速了 *Brca1* 条件性突变的小鼠中肿瘤的发生

(A) 在 *Brca1*^{Ko/Co}; *MMTV - Cre*; *p53* + / + 小鼠中, 经过一长的潜伏期后肿瘤以低的频率形成。绝大多数的肿瘤都有两个野生型 *p53* 等位基因丢失。(B) 在 *Brca1*^{Ko/Co}; *MMTV - Cre*; *p53* + / - 小鼠中, 肿瘤形成的速度被推测加快了, 因为只有 *p53* 的一个野生型等位基因需要在这些小鼠中丢失

综合起来分析,这些观察所见指出,*Brca1* 本身的丢失对于肿瘤发生来说仍是不够的,而还需要在 *Brca1* 突变的细胞中发现的染色体异常所反映出来的基因组失去稳定性。基因,包括抑癌基因和癌基因的突变率在理论上的增加,最终将导致肿瘤的形成。然而,这一参与多基因突变的过程,需要一定的时间来完成。这可能就是在携带有 *Brca1* 突变的人当中,癌的出现有一较长潜伏期,以及在散发性的癌症中体细胞性 *Brca1* 突变极为罕见的原因^[55~58]。

6. 结论

越来越多的证据提示,*Brca1* 基因通过至少下列 3 种功能而在维持基因组的完整性方面起着极为重要的作用:修复 DNA 损伤的能力、对细胞周期关卡的控制,以及调控中心体的复制。*Brca1* 的这些重要功能的缺失就造成遗传不稳定性,从而依次再导致一些细胞周期关卡的活化,包括一个依赖于 *p53* 的 G_1-S 关卡,因为 *p53* 的丢失能部分地挽救 *Brca1* 突变所造成的早期胚胎死亡^[32,36,37]。细胞周期关卡的活化导致细胞停止生长和发生细胞凋亡,从而引起胚胎的死亡。然而,在 *Brca1* 条件性剔除的小鼠中,上述这些异常都只发生于乳腺,从而使这种小鼠仍具有正常的寿命。由于 *Brca1* 的丢失而引起的遗传不稳定性,致使一些基因发生突变的频率增加,包括癌基因的活化及(或)一些抑制肿瘤基因如 *p53* 的失活,并最终导致肿瘤的形成。

致谢

本文作者感谢 Stere Brodie 和 Susan Macken 对原稿所进行的建议性审读工作。

参 考 文 献

- 1 Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC, Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*, 1990; 250: 1684 - 1689
- 2 Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, et al, A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *Brca1*. *Science*, 1994; 266: 66 - 71
- 3 Alberg AJ, Helzlsouer KJ. Epidemiology, prevention, and early detection of breast cancer. *Curr Opin Oncol*, 1997; 9: 505 - 511
- 4 Paterson JW, *Brca1*: a review of structure and putative functions, *Dis Markers*, 1998; 13: 261 - 274
- 5 Bennett LM, Haugen-Strano A, Cochran C, Brownlee HA, Fiedorek Jr FT, Wiseman RW, Isolation of the mouse homologue of *Brca1* and genetic mapping to mouse chromosome 11. *Genomics*, 1995; 29: 576 - 581
- 6 Marquis ST, Rajan JV, Wynshaw-Boris A, Xu J, Yin GY, Abel KJ, Weber BL, Chodosh LA. The developmental pattern of *Brca1* expression implies a role in differentiation of the breast and other tissues. *Nat Genet*, 1995; 11: 17 - 26
- 7 Lane TF, Deng C, Elson A, Lyu MS, Kozak CA, Leder P, Expression of *Brca1* is associated with terminal differentiation of ectodermally and mesodermally derived tissues in mice. *Genes Dev*, 1995; 9: 2712 - 2722
- 8 Jin Y, Xu XL, Yang MC, Wei F, Ayi TC, Bowcock AM, Baer R. Cell cycle-dependent colocalization of BARD1 and *Brca1* proteins in discrete nuclear domains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997; 94: 12075 - 12080
- 9 Wu LC, Wang ZW, Tsan JT, Spillman MA, Phung A, Xu XL, Yang MC, Hwang LY, Bowcock AM, Baer R. Identification of a RING protein that can interact *in vivo* with the *Brca1* gene product. *Nat Genet*, 1996; 14: 430 - 440
- 10 Xu X, Weaver Z, Linke SP, Li C, Gotay J, Wang XW, Harris CC, Ried T, Deng CX, Centrosome amplification and a defective G_2-M cell cycle checkpoint induce genetic instability in *Brca1* exon 11 isoform-deficient cells. *Mol Cell*, 1999; 3: 389 - 395

- 11 XU X, Wagner KU, Larson D, Weaver Z, Li C, Ried T, Hennighausen L, Wynshaw – Boris A, Deng CX. Conditional mutation of *Brca1* in mammary epithelial cells results in blunted ductal morphogenesis and tumor formation, *Nat Genet*, 1999;22;37 – 43
- 12 Ouchi T, Monteiro AN, August A, Aaronson SA, Hanafusa H. *Brca1* regulates *p53* – dependent gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998;95;2302 – 2306
- 13 Zhang H, Somasundaram K, Peng Y, Tian H, Zhang H, Bi D, Weber BL, El – Deiry WS. *Brca1* physically associates with *p53* and stimulates its transcriptional activity. *Oncogene*, 1998;16;1713 – 1721
- 14 Chai YL, Cui J, Shao N, Shyam E, Reddy P, Rao VN. The second BRCT domain of *Brca1* proteins interacts with *p53* and stimulates transcription from the *p21* WAF1/CIP1 promoter. *Oncogene*, 1999;18;263 – 268
- 15 Chapman MS, Verma IM. Transcriptional activation by *Brca1* (letter, comment). *Nature*, 1996;382;678 – 679
- 16 Li S, Chen PL, Subramanian T, Chinnadurai G, Tomlinson G, Osborne CK, Sharp ZD, Lee WH. Binding of CtIP to the BRCT repeats of *Brca1* involved in the transcription regulation of *p21* is disrupted upon DNA damage. *J Biol Chem*, 1999;274;11334 – 11338
- 17 Yu X, Wu LC, Bowcock AM, Aronheim A, Baer R. The C – terminal (BRCT) domains of *Brca1* interact *in vivo* with CtIP, a protein implicated in the CtBP pathway of transcriptional repression. *J Biol Chem*, 1998;273;25388 – 25392
- 18 Neish AS, Anderson SF, Schlegel BP, Wei W, Parvin JD. Factors associated with the mammalian RNA polymerase II holoenzyme. *Nucleic Acids Res*, 1998;26;847 – 853
- 19 Somasundaram K, Zhang H, Zeng YX, Houvras Y, Peng Y, Zhang H, Wu GS, Licht JD, Weber BL, El – Deiry WS. Arrest of the cell cycle by the tumor – suppresser *Brca1* requires the CDK – inhibitor *p21*WAF1/CiP1. *Nature*, 1999;389;187 – 190
- 20 Fan S, Wang J, Yuan R, Ma Y, Meng Q, Erdos MR, Pestell RG, Yuan F, Auburn KJ, Goldberg ID, Rosen EM. *Brca1* inhibition of estrogen receptor signaling in transfected cells. *Science*, 1999;284;1354 – 1356
- 21 Harkin DP, Bean JM, Miklos D, Song Y – H, Truong VB, Englert C, Christians FC, Ellisen LW, Maheswaran S, Oliner JD, Haber DA. Induction of GADD45 and JNK/SAPK – dependent apoptosis following inducible expression of *Brca1*. *Cell*, 1999;97;575 – 586
- 22 Scully RC, Ochs RL, Keegan K, Hoekstra M, Feunteun J, Livingston DM. Dynamic changes of *Brca1* subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell*, 1997;90;425 – 436
- 23 Ogawa T, Shinohara A, Nabetani A, Ikeya T, Yu X, Egelman EH, Ogawa H. RecA – like recombination proteins in eukaryotes; functions and structures of RAD51 genes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1993;58;567 – 576
- 24 Chen J, Silver DP, Walpita D, Cantor SB, Gazdar AF, Tomlinson G, Couch FJ, Weber BL, Ashley T, Livingston DM, Scully R. Stable interaction between the products of the *Brca1* and *Brca2* tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. *Mol Cell*, 1998;2;317 – 328
- 25 Zhong Q, Chen CF, Li S, Chen Y, Wang CC, Xiao J, Chen PL, Sharp ZD, Lee WH. Association of *Brca1* with the hRad50 – hMre11 – p95 complex and the DNA damage response. *Science*, 1999;285;747 – 750
- 26 Petrini JH. The mammalian Mre11 – Rad50 – nbs1 protein complex; integration of functions in the cellular DNA – damage response. *Am J Hum Genet*, 1999;64;1264 – 1269
- 27 Nairz K, Klein F. Mre1s – a yeast mutation that blocks double – strand – break processing and permits nonhomologous synopsis in meiosis. *Genes Dev*, 1997;11;2272 – 2290
- 28 Gowen LC, Avrutskaya AV, Latour AM, Koller BH, Leadon SA. *Brca1* required for transcription – coupled repair of oxidative DNA damage. *Science*, 1998;281;1009 – 1012
- 29 Wang H, Shao N, Ding QM, Cui J, Reddy ES, Rao VN. *Brca1* proteins are transported to the nucleus in the absence of serum and splice variants *Brca1a*, *Brca1b* are tyrosine phosphoproteins that associate with E2F, cyclins and cyclin – dependent kinases. *Oncogene*, 1997;15;143 – 157

- 30 Vaughn JP, Davis PL, Jarboe MD, Huper G, Evans AC, Wiseman RW, Berchuck A, Iglehart JD, Futreal PA, Marks JR. *Brca1* expression is induced before DNA synthesis in both normal and tumor – derived breast cells. *Cell Growth Differ*, 1996;7:711 – 715
- 31 Ruffner H, Vema IM. *Brca1* is a cell cycle – regulated nuclear phosphoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997;94:7138 – 7143
- 32 Ludwig T, Chapman DL, Papaioannou VE, Efstratiadis A. Targeted mutations of breast cancer susceptibility gene homologs in mice; lethal phenotypes of *Brca1*, *Brca2*, *Brca1/Brca2*, *Brca1/p53*, and *Brca2/p53* nullizygous embryos. *Genes Dev*, 1997;11:1226 – 1241
- 33 Hakem R, de la Pompa JL, Sirard C, Mo R, Woo M, Hakem A, Wakeham A, Potter J, Reitnair A, Billia F, Firpo E, Hui CC, Roberts J, Rossant J, Mak TW. The tumor suppressor gene *Brca1* is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. *Cell*, 1996;85:1009 – 1023
- 34 Liu CY, Flesken – Nikitin A, Li S, Zeng Y, Lee WH. Inactivation of the mouse *Brca1* gene leads to failure in the morphogenesis of the gee cylinder in early post – implantation developmeat. *Genes Dev*, 1996;10:1835 – 1843
- 35 Gowen LC, Johnson BL, Latour AM, Sulik KK, Koller BH. *Brca1* deficiency results in early embryonic lethality characterized by neuroepithelial abnormalities. *Nat Genet*, 1996;12:191 – 194
- 36 Shen SX, Weaver Z, Xu X, Li C, Weinstein W, Guan XY, Ried T, Deng CX. A targeted disruption of the murine *Brca1* gene causes γ – radiation hypersensitivity and genetic instability. *Oncogene*, 1998;17:3115 – 3124
- 37 Hakem R, de la Pompa JL, Elia A, Potter J, Mak TW. Partial rescue of *Brca1*(5 – 6) early embryonic lethality by *p53* or *p21* null mutation. *Nat Genet*, 1997;16:298 – 302
- 38 Ritter MA, Cleaver JE, Tobias CA. High – LET radiations induce a large proportion of non – rejoining DNA breaks. *Nature*, 1997;266:653 – 655
- 39 Xu CF, Brown MA, Chambers JA, Griffiths B, Nicolai H, Solomon E. Distinct transcription start sites generate two forms of *Brca1* mRNA. *Hum Mol Genet*, 1995;4:2259 – 2264
- 40 Thakur S, Zhang HB, Peng Y, Le H, Carroll B, Ward T, Yao J, Farid LM, Couch FJ, Wilson RB, Weber BL. Localization of *Brca1* and a splice variant identifies the nuclear localization signal. *Mol Cell Biol*, 1997;17:444 – 452
- 41 Cui JQ, Shao N, Chai Y, Wang H, Reddy ES, Rao VN. *Brca1* splice variants *Brca1a* and *Brca1b* associate with CBP co – activator. *Oncol Rep*, 1998;5:591 – 595
- 42 Cui JQ, Wang H, Reddy ES, Rao VN. Differential transcriptional activation by the N – terminal region of *Brca1* splice variants *Brca1a* and *Brca1b*. *Oncol Rep*, 1998;5:585 – 589
- 43 Wilson CA, Payton MN, Elliott GS, Buaas FW, Cajulis EE, Grosshans D, Ramos L, Reese DM, Slamon DJ, Calzone FJ. Differential subcellular localization, expression and biological toxicity of *Brca1* and the splice variant *Brca1 – Δ 11b*. *Oncogene*, 1997;14:1 – 16
- 44 Lu M, Conzen SD, Cole CN, Arick BA. Characterization of functional messenger RNA splice variants of *Brca1* expressed in nonmalignant and tumor – derived breast cells. *Cancer Res*, 1996;56:4578 – 4581
- 45 Pihan GA, Purohit A, Wallace J, Knecht H, Woda B, Quesenberry P, Doxsey SJ. Centrosome defects and genetic instability in malignant tumor. *Cancer Res*, 1998;58:3974 – 3985
- 46 Rudner AD, Murray AW. The spindle assembly checkpoint. *Curr Opin Cell Biol*, 1996;8:773 – 780
- 47 Winey M. Keeping the centrosome cycle on track: genome stability. *Curr Biol*, 1996;6:962 – 964
- 48 Wagner KU, Wall RJ, St – Onge L, Gruss P, Wynshaw – Boris A, Garrett L, Li M, Furth PA, Hennighausen L. Cre – mediated gene deletion in the mammary gland. *Nucleic Acids Res*, 1997;25:4323 – 4330
- 49 de Cremoux P, Salomon AV, Liva S, Dendale R, Bouchind' homme B, Martin E, Sastre – Garau X, Magdelenat H, Fourquet A, Soussi T. *p53* Mutation as a genetic trait of typical medullary breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 1999;91:641 – 643

- 50 Crook T, Crossland S, Crompton MR, Osin P, Gusterson BA. *p53* Mutations in *Brca1* – associated familial breast cancer. *Lancet*, 1997;350;638 – 639
- 51 Crook T, Brooks LA, Crossland S, Osin P, Barker KT, Waller J, Philp E, Smith PD, Yulug I, Peto J, Parker G, Allday MJ, Crompton MR, Gusterson BA. *p53* Mutation with frequent novel codons but not a mutator phenotype in *Brca1* – and *Brca2* – associated breast tumors. *Oncogene*, 1998;17;1681 – 1689
- 52 Eisingger F, Jacquemier J, Guinebretiere JM, Birnbaum D, Sobol H. *p53* Involvement in *Brca1* – associated breast cancer. *Lancet*, 1997;350;1101
- 53 Cressman VL, Backlund DC, Hicks EM, Gowen LC, Godfrey V, Koller BH. Mammary tumor formation in – *p53* and *Brca1* – deficient mice (in process citation). *Cell Growth Differ*, 1999;10;1 – 10
- 54 Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, CA Montgomery Jr. J. S. Butel, Bradley A. Mice deficient for *p53* are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*, 1992;356;215 – 221
- 55 Easton D. Breast cancer genes – what are the real risks? *Nat Genet*, 1997;16;210 – 211
- 56 Futreal PA, Liu Q, Shattuck – Eidens D, Cochran C, Harshman K, Tavtigian S, Bennett LM, Haugen – Strano A, Swensen J, Miki Y, et al. *Brca1* mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science*, 1994;266;120 – 122
- 57 Struwing JP, Hartge P, Wacholder S, Baker SM, Berlin M, McAdams M, Timmerman MM, Brody LC, Tucker MA. The risk of cancer associated with specific mutations of *Brca1* and *Brca2* among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med*, 1997;336;1401 – 1408
- 58 Xu CF, Solomon E. Mutations of the *Brca1* gene in human cancer. *Semin Cancer Biol*, 1996;7;33 – 40

转移性黑素瘤的进化分子肖像¹

Ena Wang and Francesco M. Marincola

国立卫生研究院临床研究中心输血医学部, 贝塞斯达, MD 20892

【摘要】 我们研究小组在利用免疫疗法治疗转移性黑素瘤和肾细胞癌中积累了大量的经验。近期的研究进展揭示了这种治疗调节宿主免疫系统与肿瘤之间相互作用的分子机制。但是肿瘤排斥所必需的完整的级联过程尚未被发现。我们的实验室致力于鉴别免疫系统介导的肿瘤排斥规律。本文总结了我们在过去、现在以及将来在这个领域中进行的可能会取得成功的一些新策略。

一、简介

肿瘤抗原的鉴定为研究肿瘤与宿主之间的分子免疫学机制提供了合适的工具^(1,2)。但是,随着研究的深入,关于免疫介导的肿瘤表型调节的天然过程,以及与之相反的由肿瘤诱导的宿主免疫活性的适应性改变等新问题也不断出现^(3,4)。尤其是对 T 细胞识别的肿瘤抗原的分子鉴定激起了人们对活性特异接种策略的极大兴趣;这种策略在使用最小化抗原决定簇进行单独免疫或者与抗原呈递细胞相结合是非常成功的^(5,6)。但是这些关键的接种研究也提出了新的问题,即根据一些病例中观察到的反常现象,发现由接种诱导的肿瘤反应性循环 T 细胞与临床疗效无关⁽⁷⁾。事实上,肿瘤消退仍然是反复无常的,而其发生的原因是难以捉摸的。由于接种的主要目的一激发系统性 T 细胞的反应已经实现了;所以临床上失败的原因可能是由于一些影响到接种激发的 T 细胞功能的下游事件。回顾这方面的研究可以发现已经有许多解释人类肿瘤难以预料行为的假说,并且其数量还在增长⁽⁴⁾。绝大部分来源于临床前或者分子模型的假说分析都没能给出一个普遍适用的解释。经验证明,采用遗传背景和发病过程一致的动物模型以及严格的实验条件,所得来的结论通常会偏离人类疾病的行为学。相比之下,人类本身具有遗传多态性,其疾病在病因、解剖学以及表型上均是不同的,因此其治疗方案也会因为考虑到临床、实际和(或)民族等因素而有所改变。人类肿瘤的异质性和极为复杂的生物学特性成为人们发现人类肿瘤排斥所必需的真正规律的无法逾越的障碍。我们最近回顾了可能影响宿主免疫系统⁽⁴⁾进行肿瘤识别以及破坏的大量变量,认为如果必须鉴定出在人体中对免疫调控作出反应的肿瘤消退规律,就必须找到一种新的方法⁽⁸⁾。

1 缩略语: aRNA, 反义 RNA; cDNA, 互补 DNA; CTL, 细胞毒性 T 细胞; FNA, 细针吸活检; IC - FACS, 细胞内 - FACS; IFA, 不完全弗氏佐剂; FACS, 荧光细胞分类; g209, gp100: 209 - 217(210M); IHC, 免疫组织化学; IL - 2, 白细胞介素 2; HLA, 人类白细胞抗原; MA, 黑素瘤抗原; MDA, 黑素瘤分化抗原; MHC, 主要组织相容性复合体; NHEM, 正常人类上皮黑素细胞; PBMC, 外周血单核细胞; PFU, 噬斑形成单位; TA, 肿瘤抗原; TCR, T 细胞受体; Tc - pf, T 细胞前体频数; TIL, 肿瘤浸润淋巴细胞; tHLA, HLA/表位四聚体复合物; TSA, 肿瘤特异性抗原。

1. 肿瘤耐受的多种途径

有人认为不完全或者不稳定的免疫应答或许可以解释肿瘤的顽固^[9,10,3,11]。但是在癌症病人中可以很容易地鉴别出肿瘤抗原(TA)特异性的细胞毒性 T 细胞(CTL)应答,并且与正常的非肿瘤病人相比有所加强^[12]。进一步的研究发现,用来自于肿瘤抗原的抗原表位进行免疫对于免疫能力具有有利而不是阻碍的作用^[7,5]。尽管肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocytes)在肿瘤处的定位是临床应答的前提条件,但是由于它不一定会引起肿瘤消退,因此这并非充分条件^[13]。另外,既然病人的免疫应答在某一个时间点上恒定的,因此混合性应答(以对治疗反应的同期转移的不同行为为特征)的发现指明了肿瘤微环境中的一些因素的重要性。因此,我们主要的目的是希望发展一种策略监测在肿瘤微环境中肿瘤与宿主之间的相互作用。由于与人类多态性及肿瘤异质性相关变量的存在,这个方法依然很复杂。呈递 T 细胞表位的人类白细胞抗原分子是人类基因组中多态性结构最多的部分。另外,与不同的人类白细胞一类抗原的等位基因相关的肿瘤抗原及 T 细胞表位的数量成指数增加^[4]。与 T 细胞和肿瘤之间相互作用的多种可能性(pluri-potentiality)相比,人类白细胞抗原等位基因/表位与抗原决定簇呈严格的相关性^[14]。因此,对于特定的病人,对某一肿瘤抗原的应答程度取决于其表达量、宿主的人类白细胞抗原表型以及肿瘤细胞表达的 HLA 水平^[4]。因此我们有理由认为每一个癌症病人都代表了一个独立的免疫实体,由于同期病灶的表型可能大不相同,同一病人的完全不同的转移灶也可能是独立的生物实体^[15]。

2. 人类疾病中存在的多态性及异质性

利用免疫组化或者分子水平分析手术切除的肿瘤来研究肿瘤与宿主之间的相互作用受限于不可能进行功能性研究。利用新鲜的体外消化的肿瘤细胞可以进行功能研究,但是由于易受其他细胞的污染,不利于定量的估算。扩增切除的肿瘤中存在的肿瘤浸润性淋巴细胞/肿瘤细胞为体外研究细胞毒性 T 细胞与肿瘤细胞之间的相互作用提供了一个很好的模型^[16],但是这种研究不能代表体内的真实情形。最重要的是通过分析切除的肿瘤标本,我们能获得的只是一种疾病经过长时间的遗传不稳定性积累后的静止的信息。因此一旦离开肿瘤发生的天然过程,肿瘤研究也就无法进行了。所以我们建议对肿瘤与 T 细胞之间相互作用的研究应当采用在同一个病灶反复多次细针吸活检(FNA),以尽量与疾病发展的自然过程保持一致。对于同一病灶的系列分析可以降低由于肿瘤异质性带来的实验“噪声”,并对针对单一肿瘤抗原和人类白细胞抗原复合物的表位特异性接种进行监测,两者相结合为我们有效的分析肿瘤与宿主之间交互作用的分子成分提供前所未有的机会。

3. 疫苗激发的 T 细胞频数的确定以及它们的活性状态

尽管体外致敏实验表明接种黑素瘤抗原肽以后,MA 特异性的细胞毒性 T 细胞反应性有所增加,但这种反应在临床上仍是罕见的。这种异常提出一个问题,是否通过体外刺激并扩增 T 细胞获得的数据导致了对接种产生的免疫应答的过高估计。利用人类白细胞抗原与表位的四聚体复合物,我们详查了接种了 gp100:209-217(210M)(g209-2M)的 23 位黑素瘤病人的外周血单核细胞中 MA 特异性的 T 细胞前体频数。单独使用多肽接种的全部 7 名病人以及 5 名同时使用了多肽和白细胞介素 2 病人中的 4 名,均出现了接种后外周血单核细胞中疫苗特异性的 T 细胞前体频数升高;升高的范围分别是 0.2%~2.4%及 0.25%~2.5%。升高的 T 细胞前体频数与体外相应表位刺激后的易感性升高有关。反常的是,在大部分同时使用了 IL-2——一种被认为与肿瘤消退相关的化合物的病人当中,没有发现接种后的 T 细胞前体频数升

高。这些病人中未出现 Tc - pf 升高与培养时不能激发接种特异性的 T 细胞扩增一致。这些研究表明,多肽疫苗可以有效地在癌症病人的 PBMC 中产生可定量的 T 细胞特异性的免疫应答,但是这种应答与临床中转移性黑素瘤的明显消退无关。因此,这些来自于关键的黑素瘤抗原特异性接种的结果表明,这种激发循环 T 细胞应答的有效性与临床功效之间存在谜一样的矛盾^[7,5]。尽管有多种关于肿瘤耐受途径可以为这种反常现象提供一个简单的解释^[4],即常规应用的测定方法所记录的接种激发 T 细胞频数和应答性不能准确地反映它们在体内的数量和(或)活性状态。事实上,循环黑素瘤特异的 T 细胞在未接种的病人中以及正常的非肿瘤病人的人群中也可以检测到^[12,17,18]。有人认为这种未受阻碍的肿瘤增长与循环肿瘤特异性 T 细胞共存的反常现象可以解释为 T 细胞活性状态的选择性减弱^[10]。通过比较我们可以推断没有发生肿瘤消退可能是因为疫苗激发的 T 细胞具有很弱的应答活性。过去,我们判断表位特异性接种的免疫应答范围采用的方法是比较接种前后 PBMC 与体外用任意浓度的疫苗相关表位及外源 IL - 2 刺激的敏感性^[7]。但是,经常会有人指出这种方法可能误导或者夸大了体内疫苗诱导免疫应答的范围及质量。早期的研究表明,直接测定循环接种特异性 T 细胞前体频数和 iHLA 说明其频数与体外扩增的易感性之间存在紧密的联系^[19]。这种联系表明体外致敏实验获得的数据只能粗略地反映接种前后宿主的免疫活性。而且 iHLA 指导的疫苗特异性 T 细胞检测不能表明其功能状态^[10]。事实上,iHLA 结合并不能排除混杂的、低亲和性的 TCR/iHLA 相互作用,这种相互作用无法产生配体诱导的生理学应答^[10,20]。另外,由于 T 细胞活力状态的下降,即使是高亲和性的 TCR 也无法与其天然配体产生有活力的相互作用^[10]。因此,为了联合使用直接定量、描述体内疫苗诱导的 T 细胞活性状态的以及最小限度的离体操作等方法,我们采用细胞内 FACS 分析研究了 iHLA 染色以及疫苗诱导的 T 细胞的活性^[21]。结合 iHLA,我们详查了接种 HLA - A* 相关的 gp100:209 - 217(210M)表位的黑素瘤病人 PBMC 中(gp209 - 2M)疫苗激发的 T 细胞前体频数。利用细胞内 FACS 分析以及定量实时 - PCR,我们检测了接种后 PBMC 产生由疫苗相关表位或疫苗匹配(HLA - A* 0201)黑素瘤细胞激发的细胞因子应答的能力。在研究的 8 名 CD8⁺ 细胞群体频率在 0.3% ~ 2.3% 的范围内的病人中,有 6 名可以用 iHLA 检测到疫苗诱导的 Tc - pf 增强。采用 IC - FACS 或定量实时 PCR 可以分别在 5 名或 6 名病人中检测到疫苗相关的表位刺激诱导产生 IFN - γ 表达。同类刺激引起的 iHLA 染色下调可以作为 T 细胞应答活性的附加的标记。最后,我们在 6 名病人中观察到了对疫苗匹配的肿瘤靶标反应性的增强,这是部分独立于已知的疫苗特异性的免疫应答的。在同一个样品中不论是采用 IC - FACS 还是定量实时 PCR 检测,均可检测到接种后 PBMC iHLA 染色同 IFN - γ 表达之间的强相关性。

因此,T 细胞本身活性状态的减弱不能很好地解释接种后临床应答反应的缺乏。

为了进一步描述离体的 T 细胞的活性状态,在大量病人中利用定量实时 PCR 对 PBMC 中细胞因子基因的表达进行了一系列的测定,以检测循环淋巴细胞以及肿瘤处的功能性免疫应答^[22]。转移性黑素瘤病人用由黑素瘤自身抗原 gp100 经过人工修饰后产生的多肽表位(209 - 2M)来免疫。利用系列基因表达分析,我们证明了直接从免疫后病人的外周血得来的新鲜细胞中,疫苗诱导的 CTL 具有反应活性的功能性证据。我们还进一步证明了疫苗激发的免疫应答在体内肿瘤微环境中的定位。疫苗诱导的 CTL 定位高度依赖于靶向免疫接种的抗原表达。这些实验的结果直接证明了多肽免疫可以导致定位于转移位点处的功能性肿瘤特异 CTL。有趣的是,这种疫苗激发的 CTL 的定位并非肿瘤消退的充分条件,研究过的转移瘤中无一例因