

参 考 文 献

- 1 Dinarello CA *et al.* J Leukoc Biol, 1998; 63 (6):658
- 2 Tone M *et al.* J Immunol, 1997;159(12):6156
- 3 Torigoe K *et al.* J Biol Chem, 1997;272(41): 25737
- 4 Hoshino K *et al.* J Immunol, 1999; 162(9): 5041
- 5 Croston G *et al.* J Biol Chem, 1995;270:16514
- 6 Nakanishi K *et al.* Cytokine, 1997; 9:947
- 7 Dinarello CA. J Allergy Clin Immunol, 1999; 103(1Pt1): 11
- 8 O'Neill LJ *et al.* J Leukoc Biol, 1998;63(6): 658
- 9 Matsunoto S *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 1997;234(2):454
- 10 Robinson D *et al.* Immunity, 1997;7(4):571
- 11 Kanakaraj P *et al.* J Exp Med, 1999; 189(7): 1129
- 12 Kojima H *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 1998;244(1):183
- 13 Burns K *et al.* J Biol Chem, 1998;273(20): 12203
- 14 Adachi O *et al.* Immunity, 1998;9(1):143
- 15 Suji T *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 1997;237(1):126
- 16 Barbulescu K *et al.* J Immunol, 1998;160(8): 3642

(1999-11-20 收稿)

DNA 免疫制备单克隆抗体的研究进展

季玉红综述 张学光审阅

苏州医学院生物技术研究(苏州, 215007)

摘要 DNA 免疫是近年发展起来的一种新型抗体制备法。DNA 免疫克服了传统蛋白质免疫方法的缺陷,能更为有效地激发机体的体液和细胞免疫应答。尤其是在仅知 DNA 编码而不能获得目的蛋白或获得的抗原蛋白为低免疫性的情况下,蛋白质免疫将很难得到特异性的抗体,但通过 DNA 免疫可制备高效价特异性的抗体,这为某些疾病如病毒性疾病和肿瘤等的诊断和免疫治疗开拓了新的途径。

关键词 DNA 免疫; 单克隆抗体; 免疫应答

传统的抗体制备方法通常是采用纯化的蛋白质来免疫动物,但分离和纯化蛋白质颇为费时费力,且难以获得理想的产品。如在不能得到目的蛋白或获得的抗原蛋白为低免疫原性的情况下,将无法采用常规免疫方法制备相应的特异性抗体。随着分子生物学技术和 DNA 重组技术的发展,用 DNA 免疫制备

多克隆抗体和单克隆抗体的方法越来越受到人们的关注,并成为一个比较活跃的领域。

1 DNA 免疫的机制

DNA 免疫激发机体的免疫应答机制一直是人们探讨的热点。现代免疫研究表明,机体对抗原的应答取决于两个要素:①抗原

的免疫原性;②机体对抗原的递呈及相应的反应性。在抗原的免疫原性无法改变的情况下,如通过调节抗原在机体的表达、加工及处理,可提高机体对相应抗原的反应性。目前 DNA 免疫的焦点是抗原的递呈机制及佐剂对 DNA 免疫的影响。虽然 DNA 免疫后在体内如何被细胞摄取及其表达的抗原又如何被递呈尚未完全清楚,但许多文献均证实了肌细胞对 DNA 的摄取及抗原蛋白的表达起到很重要的作用^[1~4]。由皮肤和肌肉途径给予 DNA 均可产生体液免疫应答和细胞免疫应答^[1~4]。Tang 等^[5]证实了在皮内注射 DNA 包被的金颗粒后 DNA 导入表皮细胞能有效地表达,从而导致机体产生对 DNA 编码蛋白的免疫应答;直接肌肉注射 DNA 后,其 DNA 编码的蛋白主要在骨骼肌中表达;而常规免疫时,免疫应答主要起始于骨髓衍生的抗原递呈细胞。Pardoll 等^[6]认为:DNA 转染的肌肉或上皮细胞也能如抗原递呈细胞一样递呈抗原;同时骨髓衍生的抗原递呈细胞也可能在靶位点直接受到转染;同时 DNA 还可从靶位点经血液或淋巴液进入淋巴组织使抗原递呈细胞得到转染。Bouluc 等^[7]通过皮内免疫(PCMV;HEL)小鼠,发现皮肤的树突状细胞(dendritic cells, DCs)也得到转染并能诱导机体初次和再次特异性免疫应答。DNA 免疫的机制可能为:抗原蛋白被抗原递呈细胞摄取后被水解成多肽,一部分与 MHC-I 类分子结合,被 CD₈⁺ CTL 细胞识别;另一部分多肽可以进入溶酶体/内体区与 MHC II 类分子结合,表达在细胞膜后被 CD₄⁺ TH 细胞识别。从而来激发机体有效的免疫应答^[5]。所以 DNA 免疫的抗原递呈过程相同于抗原递呈细胞处理外来抗原的方式^[8]。

2 DNA 免疫的方法

2.1 实验动物

一般选用 5~8 周龄的 BALB/C 雌性小

鼠。根据 Barry 等^[9]实验证实免疫应答与鼠龄呈相关,免疫 6 周龄以下小鼠可获得更好的免疫应答,免疫 4 周龄小鼠特异性蛋白质表达水平最高。Wells 等^[10]报道了 DNA 免疫后基因的表达在小鼠不同性别间存在差异,并认为雌性小鼠更好,但有人认为无差异。

2.2 免疫剂量

一般用基因枪来免疫只要 1~2 μg 的 DNA 即能激发机体的特异性免疫应答^[8];但肌肉注射要用 100 μg 的 DNA 才能激发机体产生免疫应答^[11]。

2.3 免疫途径与方法

Webster 等^[8]认为在 DNA 免疫中最有效的方法和途径是用基因枪在肌肉或皮内免疫 DNA 包被的金颗粒。但有人把 DNA 直接注射至小鼠的股四头肌也能很好地激发机体的免疫应答。通过这两种免疫方法制备的单克隆抗体均能被 DNA 编码的蛋白识别。Costaliola 等^[11]因目前尚无纯化的促甲状腺素的受体(hTSHR),故用编码 hTSHR 的 DNA 免疫小鼠制备抗 hTSHR 的单克隆抗体,在 Balb/c 小鼠的胫骨前肌肉注射 100 μg hTSHR cDNA 的质粒,初次免疫 11 周后,10/14 小鼠产生高效价的抗 hTSHR 的 IgG 抗体,再通过杂交瘤技术制备的单克隆抗体能识别天然的 hTSHR。Wolf 等^[1]证实通过肌肉注射 DNA 在体内可被直接转染,以后又证实了直接肌肉注射质粒 DNA 能诱导相关的免疫应答是一种简单而有效的方法,并认为生理盐水是最佳的赋形剂。如果在给予 DNA 免疫前 20 min 肌肉注射 25% 高渗蔗糖溶液使肌纤维间隙疏松,可促进 DNA 的均匀扩散,使更多的 DNA 被肌细胞吸收并增加其表达。但有人认为这种方法不宜用。Wang 等^[12]报道在 DNA 肌肉注射前 24 h 或同时局部注射麻醉药物(0.5% 0.5 ml bupivacaine),可提高 DNA 在肌肉中的表达,因为麻醉药物既是肌肉坏死剂同时又是肌肉

再生剂,肌纤维的破坏及新生肌纤维的高通透性使更多的 DNA 进入肌细胞内。同年, Wells 等^[13]报道在 小鼠胫骨前肌肉注射 DNA 之前,预先用 0.5% 麻醉药处理,可增加在转染中的 Cat 的活性。Ulmer 等^[2]比较了肌肉和静脉注射 DNA 两种途径的特异性蛋白质表达效率,发现肌肉注射 DNA 的特异性蛋白质表达效率明显高于静脉注射 DNA。Yamkanckas 等^[14]经皮内注射和肌肉注射等量 DNA,发现通过肌肉免疫的方法产生特异性抗体和 CTL 的效率。Tamera 等^[3]通过肌肉、皮内和静脉注射 DNA,证实肌肉注射 DNA 免疫效果最佳,产生的免疫球蛋白为 IgG 类。Sasaki 等^[4]在肌肉和鼻内粘膜内免疫 DNA(HIV)疫苗诱导机体产生抗 HIV 的特异性抗体,产生的免疫球蛋白为高效价的 IgG2 和低效价的 IgG1 和 IgE,用 as-21 皂角甙作佐剂可增加 IgG 的产生,如在 DNA 免疫同时用 IL-2 或抗 IFN- α 单克隆抗体可不用 as-21 皂角甙作佐剂也能增强机体的体液免疫和细胞免疫。谭文杰等^[15]用 HCV 核壳的 DNA 纯化质粒 50~100 μ g(50 μ l 质粒+50 μ l 40%蔗糖)肌肉注射,2、4 周后同法加强免疫 2 次,于 6 周后小鼠血清中抗 HCV 核壳抗体转阳率高达 100%,并可维持 18 周。最近,Chen 等^[16]认为 DNA 免疫的首选方法为间隔 3 周肌肉注射 2 次或间隔 2 周肌肉注射 4 次,即能激发机体产生特异性的体液免疫应答。

因此,通过肌肉注射 DNA 或直接细胞内注射 DNA,均能产生高水平的特异性抗体,这不仅从理论上而且在实践上均得到了证实,从而为特异性强、纯度高的单克隆抗体的制备提供了一个省时省力的好方法。

3 DNA 免疫与传统蛋白质免疫比较所具有的优点

DNA 免疫较常规免疫产生的体液免疫应答强而持久,因此用 DNA 免疫制备单克

隆抗体和多克隆抗体可以省时省力。DNA 肌肉注射后,被肌细胞摄取的 DNA 半衰期延长,蛋白质持续表达,并且加强了 B 细胞和 T 细胞的记忆持久性。国内外已有许多人通过 DNA 免疫制备单克隆抗体和多克隆抗体。1994 年 Barry^[17]等用人生长激素(hGH)的 DNA 免疫小鼠,生产了高水平的抗 hGH 的多克隆抗体,并通过杂交瘤技术得到了多株抗 hGH 的单克隆抗体的杂交瘤株。Schmolke^[18]为了阐明 HGV 的结构与形态,用 HGV 的外壳蛋白的 DNA 制备了抗 HGV 的单克隆抗体。

DNA 免疫可用于已知 DNA 编码而又不能得到目的蛋白或获得的抗原蛋白为低免疫原性抗原的免疫。传统的抗体制备需要用纯化的蛋白质来免疫动物,在杂交瘤技术中虽对抗原没有严格的限制,但在抗原含量太少,免疫原性弱或检测方法不足以区分特异性抗原和杂抗原时,应将抗原尽量提纯,因为阳性杂交瘤的出现率依赖于脾细胞中特异性 B 细胞的数量,所以在制备低免疫原性抗原的单克隆抗体时更是要求用纯蛋白质来免疫动物,否则将影响杂交瘤的阳性率。如果抗原蛋白提纯困难或只知道抗原蛋白的 DNA 序列时,传统的蛋白质免疫方法就无法制备单克隆抗体和多克隆抗体。另外,传统的蛋白质免疫方法对低免疫原性的抗原蛋白较难获得相应的特异性抗体。如红细胞生成素(EPO),人与小鼠的 EPO 氨基酸序列的同源程度高达 90%,所以要通过传统的免疫方法制备鼠抗人 EPO 单克隆抗体难度很大,国际上只有一家公司生产有抗人 EPO 单克隆抗体,国内有多家单位采用蛋白质免疫的方法制备抗人 EPO 单克隆抗体但均未获得理想产品。而 DNA 免疫能克服这两方面的障碍。如天然的促甲状腺素的受体(hTSHR)蛋白国际上尚无很好的分离纯化的方法,但已知 hTSHR 的 DNA 序列,故 Costaliola 等^[9]通过 DNA 免疫成功地制备了抗 hTSHR 的单

克隆抗体。

DNA 免疫可用于大动物免疫如兔、猪等。覃林花等^[19]用 P16 肿瘤抑制基因的 DNA 免疫家兔,制备了抗 P16 的特异性多克隆抗体。Pirzadeh 等^[20]用 GP5 的 DNA 免疫猪,制备了抗 GP5 的中和性抗体。

4 DNA 免疫的应用前景

由于 DNA 免疫克服了传统的蛋白质免疫方法的缺陷,并能有效地激发机体的体液免疫和细胞免疫。随着 DNA 免疫技术的发展,能免疫除多糖类抗原外所有已知 DNA 编码的蛋白质抗原,如病毒蛋白、免疫球蛋白、肿瘤抗原等^[8]。DNA 免疫后的体液免疫能维持较长时间^[14],相应的抗原亦可以不断地加强免疫,所以这种免疫方式可以获得强而持久的免疫应答,这为低免疫性的抗原蛋白特异性抗体的获得提供了理论依据和实践基础。因此 DNA 免疫不仅在无法获得纯化蛋白质的情况下开拓了研制特异性抗体的新途径,而且逾越了抗原的低免疫原性的障碍,有效地激发宿主的特异性免疫应答。同时 DNA 免疫激发机体产生强而持久的体液免疫,这为高产量特异性多克隆抗体和纯度高、特异性强的单克隆抗体的获得提供了必要条件,在许多疾病如病毒性疾病和肿瘤等诊断和免疫治疗中具有良好的应用前景。正因为 DNA 免疫有着蛋白质免疫不可比拟的优越性,因而在特异性多克隆抗体和单克隆抗体的制备上也有着良好的应用前景。

5 结束语

用 DNA 免疫来制备单克隆抗体,就目前的研究进展而言,还处于探索性的实验研究阶段:①DNA 免疫的不同接种途径所需 DNA 剂量差异较大,在肌肉注射时,细胞外

大部分 DNA 被核酸酶降解,解决 DNA 在动物体内的稳定性是 DNA 免疫的关键;②DNA 免疫较蛋白质免疫引起的免疫应答较迟,这可能与 DNA 免疫后需经过特异性蛋白质的表达才能激发机体的免疫应答有关;③DNA 免疫是否还诱导动物产生特异性免疫耐受还有待于深入的探讨。所以目前 DNA 免疫尚不能完全替代蛋白质免疫,而且对 DNA 免疫和加强其免疫应答反应的方法还需要进一步完善。但鉴于 DNA 免疫的诸多优点,其前景还是十分诱人的。

参 考 文 献

- 1 Wolff JA *et al.* Science, 1990;247:1465
- 2 Ulemer JB *et al.* Science, 1993;259:1745
- 3 Tamera M *et al.* J Virol, 1996;70:6119
- 4 Sasaki S *et al.* J Virol, 1998;72:4931
- 5 Tang DC *et al.* Nature, 1992;356:152
- 6 Pardoll DM. Immunity, 1995;3:165
- 7 Boulloc A *et al.* Eur J Immunol, 1999;29:446
- 8 Webster RG. Clin Infect Dis, 1999;28:225
- 9 Barry MA *et al.* Vaccine, 1997;8:788
- 10 Wells DJ *et al.* SFEB Lett, 1992;306:303
- 11 Costaliola S *et al.* J Immunol, 1998;160:1458
- 12 Wang B *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1993;90:4156
- 13 Wells DJ. FEBS Lett, 1993;332:179
- 14 Yankanckas MA *et al.* DNA Cell Biol, 1993;12:771
- 15 谭文杰等. 中国免疫学杂志, 1998;4:453
- 16 Chen Z *et al.* Vaccine, 1999;17:653
- 17 Barry MA *et al.* Biotechniques, 1994;16:616
- 18 Schmolke S *et al.* J Virol, 1998;72:4541
- 19 覃林花等. 生物化学与生物物理学报, 1998;30:347
- 20 Pirzadeh B *et al.* J Gen Virol, 1998;79:989

(1999-08-23 收稿)