维普资讯 http://www.cqvip.com



表2 实验组和对照组内部各分年龄组比较

| | 打开量值(mm/月) | | 打开时间(月) | |
|---|---|---|---|---|
| | 15岁以下 | 15岁以上 | 15岁以下 | 15岁以上 |
| 实验组 | 1.818±0.3219 | 1.631±0.2287*** | 2.55±0.73 | 2.79±0.441*** |
| 对照组 | 0.9±0.115 | 0.53±0.125** | 5.56±0.61 | 7.24±1.94* |

*$P<0.01$ **$P<0.001$ ***$P>0.05$

## 3 讨论

前牙Ⅲ度深覆𬌗形成的机理主要是前部牙槽骨发育过度,后部牙槽骨发育不足[8]。以前常采用前述活动矫正器和固定矫正器,分别作后牙升高或前牙压入,但费时较长。本文实验组将后牙升高与前牙压入同时进行则明显提高疗效。实验组与对照组相比差异非常显著$P<0.001$。这是因为小平𬌗板没有跨过咬合面的卡环和妨碍后牙升高的基托,所以咬合很快打开,并且实验组内成人与少年打开咬合的速度相似($P>0.05$)。这个方法成功地解决了对大龄深覆𬌗患者治疗困难的难题。由于小平𬌗板的作用,下颌向顺时针方向转动,有利于增大下颌平面角,腭平面 下颌平面角的增大,使面下1/3增加,有利于改变面下1/3高度不足,因此本法尤其适用于面下1/3高度不足者。对照组之所以咬合打开较慢,因为它仅靠固定矫正器压入前牙[4],而压入运动必然慢于升高运动[5],并且受年龄影响,少年根尖周有海绵状及大量髓腔存在,易压入,成年人根尖周骨质致密不易压入,两者差异非常显著,$P<0.01$。

## 4 结论

小平𬌗板及固定矫正器联合治疗前牙深覆牙合患者其疗效明显优于单纯用固定矫正器者,尤其适用于面下1/3不足者,且无年龄界限。

### 参考文献

1.陶宏惠,等.中华口腔医学杂志 1987; 22: 307
2.林久祥,主编.现代口腔正畸学中国医药科技出版社 1991: 189
3.傅民魁,主编.口腔正畸学 第二版人民卫生出版社 1994: 174
4.缪跃强,等.现代口腔医学杂志1994; 8 :117
5.本橋康助,et al.齿科矫正学 1984; 239

(收稿日期 1999－01－20)

# DNA免疫

肝炎研究所 陈力妤* 综述 任 红 审校

中图分类号 R392.11

## 1 前言

随着分子免疫学研究与基因治疗的开展,新一代疫苗随之涌现。其中以DNA免疫(DNA based immunization)或DNA疫苗(DNA vaccine)最为引人注目,它是将含有编码抗原基因的真核表达质粒直接接种机体,该抗原即在体内合成,从而诱发机体产生相应的特异性免疫应答。自1993年Ulmer等用编码流感病毒内部保守蛋白——核蛋白(NP)的DNA免疫小鼠,产生了NP特异性抗体及细胞毒性T细胞(CTL)反应[1],从而开始了DNA免疫在动物模型中保护作用的研究。目前,HIV,轮状病毒及HBV的DNA免疫研究已进入Ⅰ期临床试验阶段。DNA免疫技术已经成为当前疾病预防治疗方面的研究热点。

## 2 DNA免疫的原理

DNA免疫是将抗原基因插入带有强病毒启动子的质粒载体,构建成重组表达质粒。表达载体含有原核复制起始点,能在细菌中(如大肠杆菌)中扩增,纯化后直接注入宿主体内,质粒DNA被宿主

*女,1971－11出生,硕士研究生

维普资讯 http://www.cqvip.com



细胞摄入后即表达编码的抗原蛋白。

将质粒DNA导入机体的方式有多种。其中由于肌肉组织吸收表达外源基因的效率高于其他组织,所以常用的为骨骼肌注射。有基因枪将表面吸附有DNA的金颗粒轰击入表皮,也为有效的方法。另外,皮内注射、静脉注射、腹腔注射DNA疫苗,均可诱发免疫应答,但效果不如肌肉注射。

### 2.1 肌肉内接种DNA的抗原递呈机制

肌注DNA疫苗后,肌细胞似乎是被感染的主要细胞类型。分泌性抗原被内吞,经外源性多肽处理过程,经MHC—Ⅱ类分子递呈过程已经较为清楚,而经MHC—Ⅰ类分子激活$CD8^+$T细胞的机制较为复杂。Ulmer[3]等将编码流感病毒NP蛋白的质粒DNA体外转染C2C12成肌细胞(H—$2^k$),然后移植入H—2d×H—2k杂交一代小鼠,产生的CTL不仅具有H—$2^k$(NP氨基酸50—57位)限制性识别,而且也有H—$2^d$(NP 147—155位氨基酸)限制性识别。因此他认为肌细胞表达抗原足以激活机体有效免疫。然而,肌细胞表达较少的MHC—Ⅰ类抗原,并且不表达MHC—Ⅱ类抗原及诱导CTL所需的共刺激分子B7等,因此可能肌肉细胞仅为最初合成抗原的场所,进而再将抗原递呈给骨髓来源的'职业'抗原递呈细胞(APC)。体细胞与'职业'APC之间的抗原传递机制不太清楚,一种可能是交叉激发(cross-priming)即由非APC产生的抗原与仅在APC上才有的MHC—Ⅰ类分子共同触发CTL。在交叉激发中,抗原多肽在APC的胞质中被降解为短肽,一部分被运至内质网,交接给网膜上的TAP分子(Transporter associated with antigen presenting)而进入内质网进一步与MHC—Ⅰ类结合。将TAP-/-的骨髓植入TAP-/-受体的嵌合体不能对NP转染的CT26细胞产生免疫应答,而能对表达带有提供转移至内质网的信号肽的NP的重组牛痘病毒产生应答[3]说明在交叉激发中抗原蛋白是被运送至APC的胞液中。

### 2.2 体液免疫应答

最初用DNA诱导抗体产生是用包被有人生长激素和α—1抗胰蛋白酶DNA的金颗粒用微粒轰击的方法进入小鼠体内[4]。针对病毒蛋白的抗体最早是在肌注编码流感病毒NP DNA后产生的:Ulmer等选用病毒内部相对保守的NP蛋白基因插入至含有Rous肉瘤病毒启动子的表达载体中,每次100μg注入小鼠骨骼肌,共三次,即在血清中测得NP特异性的抗体存在[1]。接着,Cox等用牛疱疹病毒(BHV—1)糖蛋白基因片段插入至表达载体,免疫小鼠后,在血清中测得高效价特异性抗体,维持时间达24周以上[5]。从此,在动物模型的研究中,观察到DNA免疫后获得对多种抗原的特异性抗体反应,如狂犬病病毒糖蛋白,癌胚抗原(CEA),MHC—Ⅰ类分子,HBc抗原等。正确的抗原构型常需复杂的翻译后修饰和细胞内加工。而DNA免疫能诱导产生保护性抗体,说明DNA免疫后体内表达的抗原能呈现一个天然的结构,具有完整的抗原决定簇。

产生抗体的类型通常为IgG类,但也有从血清中检测到IgM和IgA的报道[6]。到目前为止,在肌注DNA后还未检测到SIgA。一些初步观察提示,肌注DNA/阳离子脂质复合物可诱发SIgA的产生[7]。在小鼠体内,DNA免疫后产生的抗体应答持续时间较长,例如针对流感病毒NP,HA以及HBsAg等,可维持6个月。而在一些灵长类动物,则似乎维持较短,这反映不同物种体液免疫持续时间可有所不同。

### 2.3 细胞毒性T细胞(CTL)应答

DNA免疫除可诱生体液免疫外,更重要的是可产生以特异性CTL为标志的细胞免疫应答。它具有反应快、维持时间长的特点。一般在接种一周后就可观察到,两周后达高峰并可维持数月之久[8]。HBV及流感病毒DNA免疫诱生的特异性抗体及CTL应答持续时间均超过2年[9]。编码流感病毒NP,HBsAg、HBcAg及HIV env.蛋白等的DNA免疫小鼠,其脾脏或淋巴结中的记忆性CTL细胞在体外用同种抗原或分裂原激活后可识别与相应H—2分子结合的表位多肽。而在流感病毒、HIV、LCMV等抗原DNA免疫后,诱生的CTL不仅可识别,还可杀伤相应病毒感染的靶细胞。Ulmer[1]报道了仅需1μg流感病毒NP DNA注射小鼠,即可诱导产生识别NP表位多肽147—155位氨基酸的CTL。3次免疫后,可提供小鼠对流感

维普资讯 http://www.cqvip.com



病毒致死剂量攻击的保护。给恒河猴肌注编码HIV env.(gp160)的基因,诱导出MHC—Ⅰ,env.特异性CTL应答,在体外经刺激后可杀伤env.转染的靶细胞[10]。

## 3 DNA免疫效应的影响因素

影响DNA免疫效果的因素是多方面的:如质粒载体的表达能力, 选用抗原的抗原性、注射DNA的量及次数,以及动物模型的选择等。

### 3.1 载体DNA序列的佐剂作用

质粒载体DNA中的特定核苷酸序列能激活淋巴细胞及NK细胞[11]。如以CpG为核心的回文序列5'-AACGTT-3'。该结构被证明可激活巨噬细胞产生TNF—α,IL—12,并可增强自然杀伤细胞的活力,使Th2细胞向Th1细胞应答类型转变。故有人将该序列称为'单链免疫刺激DNA序列'(ISS)。这说明质粒本身可作为一个佐剂或免疫调节者。

### 3.2 细胞因子的协同作用

除了单独使用病原体结构蛋白基因免疫动物外,有学者采用细胞因子通过不同环节调节和增强DNA免疫效应。 简单的将协同因子的表达质粒与抗原表达质粒混合注射即可观察协同效应,已被人们尝试的有IL—2,IL—4,IL—6,IL—7,GM csf,B7—1等。这些因子的功能差异导致其协同效果亦有一定区别。Xiang等[12]将编码GM-CSF的质粒DNA与编码狂犬病病毒糖蛋白的DNA同时注入小鼠,可增强特异性Th1细胞免疫应答。Tascon R[13]等同时使用编码结核杆菌hsp 65-5协同刺激分子B7 -1/B7-2的质粒,诱导出更高的抗体滴度。Yen-Hung Chow等[14]将编码HBsAg中蛋白(HBsAg+preS2)基因与编码IL—2基因融合成非融合表达,以同样1μg免疫时,所诱导的抗—HBs与用100μg单独HBsAg DNA免疫相似,同时有更强的TL增殖反应与细胞因子分泌活性。

## 4 DNA免疫的安全性问题

### 4.1 质粒DNA整合入宿主细胞基因组

大量实验表明,质粒DNA以游离形式存在于胞内。整合是随机的或是同源重组,而后者可在质粒设计时避免,况且质粒不含有在真核细胞起作用的复制起点。据估计,随机整合机率为10-5。在NP DNA免疫小鼠的研究中,用灵敏的PCR 方法未检测到有整合的质粒[15]。

### 4.2 诱导免疫耐受

DNA免疫后产生的抗原是小量的,且抗原表达要维持数周至数月、因此诱导免疫耐受的问题令人关注。在给非洲绿猴一次低剂量(10μg)注射流感病毒HA DNA,在血清中未检测到抗体应答,但再次用灭活的流感病毒或HA DNA免疫后,即产生了强烈的回忆性抗体反应[14]。即便是肌注亚免疫剂量的DNA疫苗,目前还无引起成年动物产生耐受的报道。在某些物种的新生动物中,DNA免疫可能诱导耐受。给6周龄的小鼠注射编码一种疟疾抗原的质粒后即产生抗体应答,而如果预先在出生2—5天时注射同种质粒,该免疫反应即受到抑制。而在直接注射抗原蛋白的同龄对照组中未出现该现象[4]。但在出生时给黑猩猩注射HBsAg DNA,也诱导出针对HBsAg的抗体,而且保护其免受以后的感染[4]。因此,年龄、物种以及免疫方式可能影响免疫的效果。

### 4.3 产生抗DNA抗体

病理性的抗DNA抗体的产生常被认为是某些自身免疫性疾病的标志。然而,DNA免疫后产生病理性抗DNA抗体的可能性不大。对正常动物用纯化的双链DNA(ds DNA)免疫后,用灵敏的ELISA、免疫杂交或放免方法,几乎未检测到抗DNA抗体[16,17]。目前还不知DNA免疫是否在人体内诱导抗DNA抗体,不过动物实验说明这不大可能。

## 5 DNA免疫的应用前景

DNA免疫技术在短短几年内取得了很大的发展,陆续报道了关于DNA免疫对病毒感染(流感病毒,狂犬病病毒,LCMV…),细菌感染(如TB)及寄生虫感染(利氏曼原虫)等产生有效免疫应答及保护。由于DNA疫苗具有显著优势:如易于构建和改造;不会在真核细胞内复制;内源性的抗原合成易被免疫系统识别;激活全面而持久的免疫力等,因此,虽然目前的研究多处于动物模型阶段,但

维普资讯 http://www.cqvip.com



为人类疾病的预防、治疗开辟了新的途径。

### 5.1 疾病的预防

最早关于DNA疫苗产生免疫保护的研究是流感病毒。由于传统的流感死疫苗难以诱发CTL反应，而诱导产生的抗体无法中和衣壳蛋白发生突变的游离病毒颗粒，因而出现免疫逃避。Ulmer等[1]选用的含病毒相对保守的NP蛋白基因的DNA疫苗免疫小鼠后，产生了NP特异性抗体以及能特异性杀伤NP致敏的靶细胞的CTL。随后用致死剂量的异株流感病毒攻击免疫小鼠，免疫鼠鼻排病毒量明显下降、存活率比对照组高50%以上。说明NP诱导的CTL可提供跨株系保护、这将为针对一些易发生变异的病毒(如HIV)的疫苗的研究提供思路。

乙肝病毒疫苗从最初的血源性疫苗到基因工程疫苗，人工合成的多肽疫苗。但存在着诸如安全性问题、免疫原性不强等。在Davis[18]等人的研究中用HBsAg 的DNA质粒免疫黑猩猩。注射2mg后，抗HBs滴度即＞100mIU/ml、而后分别在8周、16周、27周加强一次，最终抗体达14,000mIU/ml。一般认为抗HBs达到10mIU/ml即能提供保护。虽然用较低剂量400μg的同种质粒仅诱导低的一过性抗HBs升高，但在一年后用HBsAg刺激即产生强的回忆性反应(＞100mIU/ml)。虽然DNA疫苗用量较大、但这仍提示DNA疫苗为乙型肝炎有前途的预防措施。

### 5.2 疾病的治疗

在某些病毒感染过程中，由于机体对病毒抗原不能产生有效的免疫应答，特别是CD4－TL应答的缺乏，使抗体产生及CTL反应低下、从而使病毒持续存在，引起慢性感染，如HBV。Schirmbeck等[19]发现，编码HBsAg的质粒DNA免疫，能在被认为对HBsAg多肽及表达HBsAg的重组痘苗病毒均不能诱生HBsAg特异性CTL活性的小鼠品系(H—2b)诱生CTL。Mancini[20]等以去除核心基因(core gene)的HBV转基因小鼠作为HBV慢性携带状态的动物模型、在DNA免疫打破乙肝免疫耐受方面作了探索。转基因小鼠从出生前起即在肝脏中持续表达HBV包膜蛋白(小、中、大蛋白)，在血清中HBsAg含量在200～9000ng/ml、但在肝细胞中无HBsAg堆积、也无肝脏病变出现。用编码HBV preS2-S的质粒(PCMV-S2,S)100μg肌注小鼠后，血清中HBsAg 水平逐渐下降、4—8周完全清除，同时出现随时间升高的抗体：2—4周即有抗—preS2,8周后开始有抗HBs。免疫12周后，小鼠肝脏中HBV mRNA水平下降或检测不到，而此时血清转氨酶并未升高，说明循环抗原的清除、肝细胞中HBV 基因表达的抑制并不伴有肝细胞的损伤。实验证明，抗体的产生利于HBsAg的清除，而HBV mRNA 水平的下降则主要为活化的TL的作用(CD4－ TL或/和CD8－ CTLs)。CD4－TL的激活主要为Th1类，表现为IgG 2a、IgG2b亚类抗体出现，以及体外刺激脾细胞产生IFN—γ、TNFα等细胞因子。仅一次肌注DNA而无加强免疫，产生的免疫反应至少持续了5个月、DNA免疫可能是治疗慢性HBV携带者的有效措施。

### 5.3 制备单克隆抗体的新方法

Barry等[21]用编码人生长激素的DNA免疫动物，使动物体内合成该蛋白，从而产生相应的单克隆抗体。无需纯化蛋白免疫动物及繁锁的筛选步骤即可获得单克隆抗体。在观察多种抗原成份复杂混合物的致免疫或保护作用时、使用DNA免疫比纯化单个蛋白成分要快捷得多。

## 6 结语

尽管DNA免疫的临床实用价值还未得到证实，但现代免疫学理论及诸多研究报道证明DNA免疫在产生免疫应答和保护方面是有效的。它提供了一个产生抗体及CTL的途径，可作为研究抗原递呈机制、细胞因子作用及病原体DNA在产生免疫应答，效应的一个工具，而且也提供了制备新型疫苗抗原的技术。

## 参考文献

1. Ulmer JB, et al. Science 1993; 259:1745－1749
2. Ulmer JB, et al. Immunology 1996; 89:59
3. Huang AYC, et al. Immunity 1996; 4:349
4. John J, Donnelly, et al. Annu Rev Immunol 1997, 15:617

维普资讯 http://www.cqvip.com



5. Cox G, et al. J Virology 1993; 67:5664
6. Justewicz DM, et al. J Virology 1995; 69:7712
7. Mitchell WM, et al. Immunotechnology 1995; 1:211
8. Davis HL, et al. Hum Gene Ther 1995; 6:1447
9. Donnelly JJ, et al. Life Science 1997; 60(3):163
10.Liu MA. et al. Anitbiotics and Chemotherapy 1996; 48:100
11.Soneharak, et al. J Interferon Cytokine Rev 1996; 16:799
12.Xiang, et al. Viral Immunol 1996; 9(1):1
13.Tascon R, et al. Vaccines 96 Cold Spring Harbor Lab N.Y PP.45
14.Yen-hung Chow,et al. J of Virology 1997; 71:169
15.Nichols WW, et al. Ann N.Y Acad Sci 1995; 772:30
16.Jiao S, et al. Hum Gene Ther 1993; 3:21
17.Katsumi A, et al. Hum Gene Ther 1994; 5:1335
18.Davis HL.et al. Proc Natl Acad Sci 1996; 93:7213
19.Schirmbeck R, et al. J Virol 1995; 69(10):5929
20.Mancini M. et al. Proc Natl Acad Sci 1996; 93:12496
21.Barry MA, et al. Bio Techniques 1994; 16:68

(收稿日期 1998－05－11)

# 免疫亲和色谱在蛋白质分离纯化中的应用

医学检验系 黄 昕* 综述 邱宗荫 审校

中图分类号 R392－33

抗原及其抗体间的相互作用具有高度特异性。长期以来,人们利用这一性质进行抗原的鉴定、定量检测或分离纯化。免疫亲和色谱 (immunoaffinity chromatography,IAC)就是建立在免疫学反应(抗原—抗体相互作用)基础上,纯化蛋白质(抗原)的一种特殊方法[1]。

IAC的分辨率非常高,因为只有具有能被偶联抗体识别的抗原决定簇的蛋白质分子将保留于柱中。这点大大地不同于一些基于基团分离的亲和色谱方法(如:纯化球蛋白的凝集素柱或纯化丝氨酸蛋白水解酶的苯甲脒柱)。IAC可以一步获得高纯度的蛋白质,并且具有从很稀的溶液中浓缩蛋白质的能力。

Tozer等人在1962年首先将多克隆抗体偶联于色谱基质分离纯化抗原[2]。Kohler和Milston[3]成功地创建了单克隆抗体 (monoclonal antibody, McAb)技术,才促使IAC在蛋白质纯化方面大量应用。在70年代后期,IAC的成功不仅在于单抗的使用,也包括易衍生化的、硬性大孔径琼脂糖基质的使用。最先应用偶联单抗免疫亲和色谱纯化的蛋白质是干扰素－$\alpha_2$。干扰素－$\alpha_2$的纯化证明了IAC的两大优点,即:具有纯化蛋白质原液中极低含量抗原的能力和获得高纯度的终产品。

## 1 抗体

单克隆抗体的选择是决定免疫亲和色谱纯化方案成功或失败的首要因素。一般认为亲和常数在$10^{-8}$M数量级或更低的单抗可能是最适合的[4],因为它们与抗原相互作用的亲和势足以在清洗杂蛋白时保留抗原,但又相当微弱,可在相对温和的条件下洗脱抗原。

单抗用作IAC的配体时,必须在偶联反应中以及在抗原洗脱的条件下保持其生物学活性。长期以来,人们多凭经验选择化合物将单抗固定于基质上,然后研究它是否仍然能够结合抗原,如果保持抗原结合能力,再摸索抗原洗脱条件。虽然这样做是有效的,但浪费时间和材料。Hornsey等人[5]最先寻求建立一种理性方法,他们确定了一组潜在的洗脱剂,并检测抗原是否能经受它们的处理。Bonde等人采用一种简单、快速的ELISA方法[6],测定单抗在一系列洗脱试剂中是否保持其生物学活性。将上述两种方法结合起来,有可能合理地

* 男,1967－12出生,讲师,博士