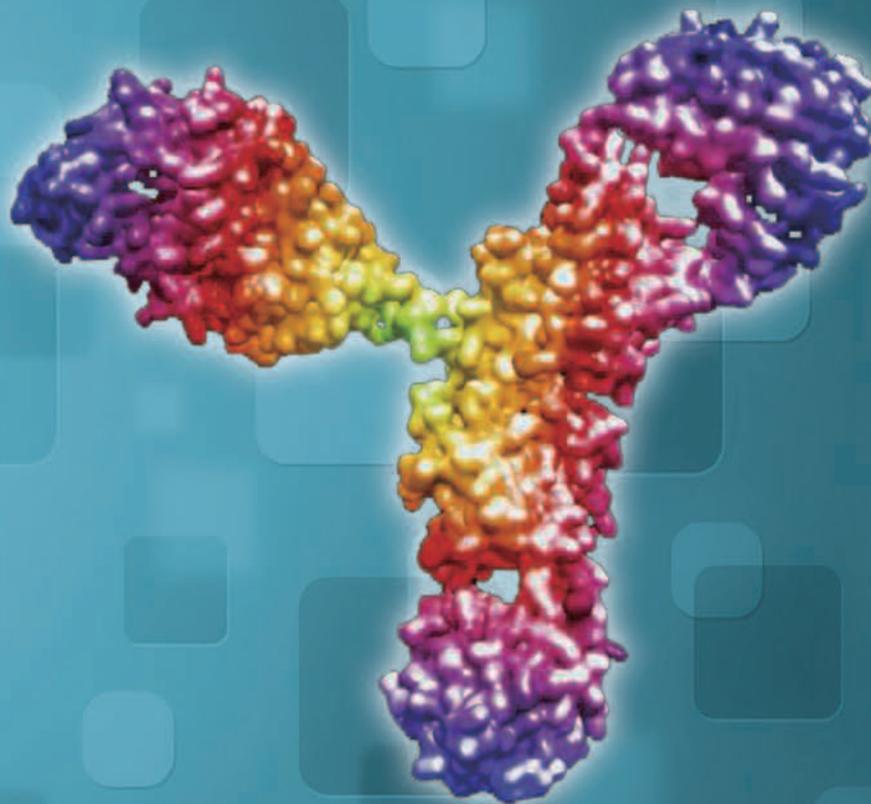


生命奥秘

LifeOmics

2014年 1月刊 总第62期



抗体靶向疗法的现状及其前景展望

把进化史装进瓶子里的人
婴猴从休眠中苏醒的方法

无奇不有

生命世界

解读生命

走进科学

目录 | CONTENTS

专题

抗体靶向疗法的现状及其前景展望

前言	01
一、肿瘤的抗体治疗方法	02
1. 抗癌抗体的分类	03
2. EGFR治疗与HER2治疗相关抗体介绍	07
3. 免疫治疗策略	10
4. 免疫疗法的前世今生及未来的发展方向	15
二、抗体在HIV-1疫苗开发及免疫治疗工作中的作用	16
1. 第一代bNAb抗体	17
2. 第二代bNAb抗体及其靶标位点	18
3. 开发HIV-1疫苗的新方法	22
三、记忆B细胞在起源、转归和功能等方面的差异	29
1. 记忆B细胞形成机制	31
2. 关于记忆B细胞	36
3. 急性和慢性感染免疫反应体液免疫	37
4. 记忆细胞的组成是和谐的还是集中的	38
5. 结论和展望	39

下一期（2014年3月刊）预告：基因功能研究方法简介及其前景展望

后基因组时代的基因功能研究具有极其重要的意义。了解基因的功能，将加深人类对自身、进化、种族血缘、衰老、疾病等生命现象及其本质的认识，并能战胜疾病、克服生存障碍、揭开人类生长、发育、健康、长寿的奥秘，提高人类的生存质量。下一期《生命奥秘》将对基因功能研究方法进行叙述，并展望其前景，希望能给相关研究人员带来启发。

热点

把进化史装进瓶子里的人	42
-------------------	----

百态

温和的热点	51
婴猴从休眠中苏醒的方法	54

本刊文章主要由国外网站文章编译而成，如有版权问题，请版权所有人与本刊联系。
凡本刊所载文章，版权归作者本人和本刊所有，如需转载，请注明作者及出处“生命奥秘”。
本刊提供的任何信息都不能作为医疗凭证和依据，仅供科研参考。

专题

Worthy Issues

抗体靶向疗法的现状及其前景展望

前言

自德国科学家Paul Ehrlich于100多年前创造了“魔球”（magische Kugel）或“魔术子弹”（magic bullet）这两个短语（即利用抗体进行靶向治疗）后，科学家一直试图开发可对抗从癌症到克罗恩病（Crohn's disease）的靶向疗法。多年来，人们从药理学上寻找通向成功的道路，但却收效甚微，直到40年前杂交瘤技术的到来才让事情出现了重大转机。有了这项技术，研究人员可以生产大量的功能特异性的单克隆抗体，这些可以持久抵御多种传染性疾病的抗体可用于治疗多种不同疾病。

又过了10年，人们才首次将这种疗法付诸实践（muromonab，用于预防移植排斥）。自此，该疗法的应用得到广泛推广。目前经美国FDA批准的应用于临床的单克隆抗体已超过了30种，并且多种候选抗体已进入临床阶段。抗体疗法已然成为一种数十亿美元的产业。

本专题详细描述了“魔法子弹”取得的巨大成功，但同时也指出我们对它们的了解还不够。抗体疫苗的设计及相关疗法才崭露头角，它们的潜力有待我们进一步发掘。

一、肿瘤的抗体治疗方法

单克隆抗体（monoclonal antibodies）只用了较短的一段时间，就已经成为了一种主流的抗癌新方法。最开始，单克隆抗体主要是被当作酪氨酸激酶受体拮抗剂来使用的，可到了今天，单克隆抗体的用途已经被大大地扩展了，我们可以将单克隆抗体当作一种载体，进行定向化疗；也可以利用单克隆抗体进行免疫调节，促进抗癌的免疫反应等。随着单克隆抗体在临床上取得越来越多的成绩，我们相信未来会出现更多的治疗用抗体及其衍生产物。

自从1948年发现细胞毒性的叶酸酯抗代谢物（cytotoxic folate antimetabolites）可以被用来治疗少儿白血病（childhood leukemia）之后，临床抗癌治疗基本上都统一为同一种策略，即先通过手术尽可能地清除肿瘤组织，然后再使用各种亚致死剂量（sublethal）的细胞毒性化疗药物，或者放疗等方法杀死残留的肿瘤组织和细胞。可是在最近16年，这种传统的抗癌方式却逐渐发生了一些变化，因为出现了一种新型的抗癌策略，即靶向抗癌疗法（targeted cancer therapy）。所谓靶向抗癌疗法就是使用特定的药物，有针对性地抑制只有肿瘤组织和细胞才表达的特异性的致癌蛋白（oncogenic proteins）及相关的促肿瘤生长因子（survival factor），以达到在杀死癌细胞的同时又不影响其他正常组织的目的。虽然大多数人都认为能够通过口服给药方式吸收，能够以弥散方式透过细胞膜进入细胞内的小分子抑制剂才是靶向药物，但是第一款，也可能是迄今为止疗效最好的一种靶向抗癌药物却是大分子生物制剂——能够针对肿瘤细胞表面表达的肿瘤特定分子发挥作用的重组蛋白（recombinant protein），这些重组蛋白通常都是抗体类药物。这一点非常重要，因为就在历史上第一次使用这种大分子抗癌药物，即使用CD20抗体类药物利妥昔单抗

（rituximab）和HER2拮抗剂类药物曲妥单抗（trastuzumab）进行抗癌治疗之前，大部分人都对这种疗法持有很深的质疑，认为这种疗法会存在很大的安全问题。其中一个最主要的问题就是单克隆抗体通常都源自小鼠，所以大家都认为给人注射这种异源抗体之后会引发严重的免疫反应。不过后来出现了人源化的单克隆抗体制备技术，即将鼠源抗体上特异性的互补决定区（complementarity-determining region, CDR）与人源抗体的免疫球蛋白骨架（immunoglobulin backbone）组合到一起的技术，这个技术的出现一下子解决了所有的问题。

今天，诞生了多种制备人源化抗体的新技术，并且能够使用部分重组人源免疫球蛋白基因的啮齿类动物、人类免疫细胞或者重组的噬菌体和酵母细胞（这些细胞也都能够表达高亲和力的抗体，而且不存在动物来源所导致的免疫排斥反应等问题）来生产人源化抗体。由于有了这些新技术，很快涌现出了很多种治疗癌症以及其它一些疾病的抗体类药物。不过到目前为止，美国食品与药品监督管理局和欧洲医药管理局（Food and Drug Administration /European Medicines Agency）只批准了图1所示的传统IgG抗体及其结合物（conjugates）用于临床抗癌治疗，人工抗体以及更新的抗体样衍生物都正在积极

地开展临床试验，希望能够尽快获得监管部门的批准。

接下来我们将对常用的几种抗体进行介

绍，重点介绍两种抗癌抗体，以及几种最新的临床治疗策略，即利用抗体进行定向化疗和免疫调节的方法。

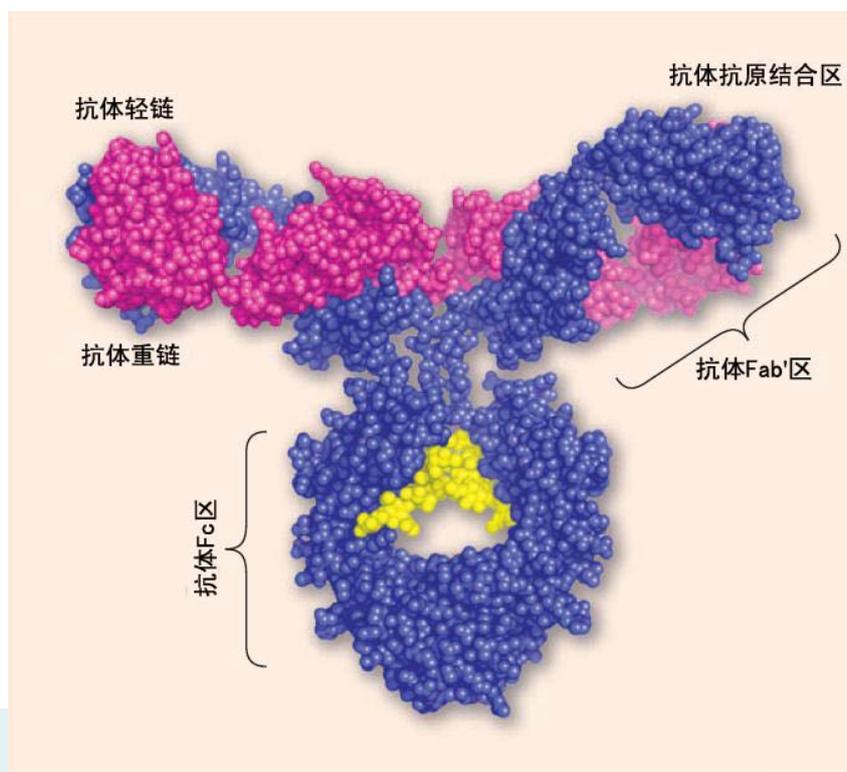


图1 IgG1抗体的空间结构模式图。图中红紫色的是抗体的轻链部分，深蓝色的是抗体的重链部分，黄色表示的是多糖结构。

1. 抗癌抗体的分类

目前有13种抗体已被FDA批准可以用于临床抗癌的治疗工作（表1）。还有更多的同类药品正在进行临床试验工作。用于治疗非何杰金氏淋巴瘤（non-Hodgkin's lymphoma）和慢性淋巴细胞性白血病（chronic lymphocytic leukemia）等造血系统肿瘤的抗体，以及针对CD20、CD52等B细

胞相关靶标的抗体部分的作用机制是它们都能够在与B细胞肿瘤结合之后引导细胞凋亡。第一批获批的抗体是在体外培养的细胞实验中能够特异性抑制表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor, EGFR）和HER2蛋白等肿瘤细胞酪氨酸激酶受体的抗体。

表1 目前常见的几种抗体类药物及其适应症。

抗体类药物名称及其所属类型	作用靶标	所治疗疾病	是否经过Dx 测试	适应症及用法简介
勃列斯多·迈耶·施贵宝公司出品的Cetuximab(Erbitux; Bristol-Myers Squibb), 人—鼠嵌合的IgG1类抗体	EGFR	结肠癌及头颈部癌	是	与FOLFIRI 联用, 治疗野生型KRAS 基因, 表达EGFR, 已转移的结肠癌患者(这是一线抗癌方案); 与irinotecan 联用治疗主要使用irinotecan 治疗无效的结肠癌患者; 单独使用用来治疗oxaliplatin 和irinotecan 治疗无效, 或者对irinotecan 不耐受的结肠癌患者; 联合放疗方案治疗头颈部的局部晚期鳞癌(初次治疗), 也可以与铂剂和5-FU 联用治疗复发的头颈部局部肿瘤或头颈部转移鳞癌; 单独使用用来治疗铂剂治疗无效的头颈部鳞癌复发或转移患者。
Amgen 公司出品的Panitumumab(Vectibix; Amgen), 人IgG1类抗体	EGFR	结肠癌	是	治疗使用含有氟嘧啶(fluoropyrimidine)、奥沙利铂(oxaliplatin)和依立替康(irinotecan)等药物治疗无效的、表达EGFR、KRAS 基因野生型的结肠癌患者。
Genentech 公司出品的Pertuzumab(Perjeta; Genentech), 人IgG1类抗体	HER2	乳腺癌、消化道癌	是	用于辅助治疗淋巴结阳性或阴性、HER2 过表达的乳腺癌患者; 与阿霉素(doxorubicin)、环磷酰胺(cyclophosphamide)以及紫杉醇(paclitaxel)或多西他赛(docetaxel)中的一种联合使用; 与多西他赛和卡铂(carboplatin)联用; 多轮蒽环霉素(anthracycline)治疗无效之后单独使用; 与紫杉醇联用治疗HER2 过表达的乳腺癌转移患者(一线用药方案); 单独使用治疗用其它针对转移肿瘤的化疗药物治疗失败的HER2 过表达的乳腺癌转移患者; 与顺铂(cisplatin)和卡培他滨(capecitabine), 或5-FU 联用, 治疗之前未曾使用过治疗转移癌药物的HER2 过表达的胃癌或胃食管交界腺癌。
Genentech 公司出品的Pertuzumab(Perjeta; Genentech), 人IgG1类抗体	HER2	乳腺癌	是	与trastuzumab 和多西他奇联用治疗之前未曾接受过抗HER2 治疗, 或者转移癌化疗的HER2 阳性的乳腺癌转移患者。
Genentech 公司出品的Ado-trastuzumab emtansine (Kadcyla, Genentech): Trastuzumab 与DM1 的衍生物4-(Nmaleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate 结合而成的ADC 类药物	HER2	乳腺癌	是	治疗曾经使用Herceptin 和紫杉烷治疗过的HER2 阳性的乳腺癌转移患者。

(接下表)

(续上表)

Genentech/Roche 公司出品的 Bevacizumab (Avastin; Genentech/Roche), 人 IgG1 类抗体	VEGF	结肠癌、非小细胞肺癌、恶性胶质瘤、肾癌	否	与5-FU联用治疗转移性结肠癌的1、2线治疗药物; 用于在使用 Avastin 等一线药物治疗失败之后, 与含氟嘧啶的药物联合, 治疗结肠癌转移患者; 与卡铂和紫杉醇联用治疗之前未曾接受过晚期化疗的晚期非小细胞肺癌; 与 α 干扰素联用治疗肾癌转移患者; 单独使用, 治疗之前化疗失败的恶性胶质瘤患者。
勃列斯多·迈耶·施贵宝公司出品的 Ipilimumab (Yervoy; Bristol-Myers Squibb), IgG1 类抗体	CTLA4	黑素瘤	是	治疗全身治疗失败、或不能耐受全身治疗, 不能手术切除的、或已转移的黑素瘤患者。
罗氏公司出品的 Rituximab (Rituxan/Mabthera; Roche), 人-鼠嵌合 IgG1 类抗体	CD20	NHL、慢性淋巴细胞白血病	否	单独使用治疗 CD20 阳性的、复发的或难治性的低度恶性或滤泡型 NHL; 与一线化疗药物联用, 治疗其它疗法治疗失败的、滤泡型、CD20 阳性的 NHL; 单独使用治疗之前用 B 细胞单克隆抗体 Rituxan 联合其它化疗药物取得完全或部分疗效的患者; 在使用一线 CVP 疗法之后单独使用治疗稳定型、低度恶性、CD20 阳性的 NHL; 与 CHOP 或其它蒽环霉素类化疗药联用, 治疗 CD20 阳性的弥散型大 B 细胞 NHL; 与氟达拉滨 (fludarabine) 和环磷酰胺联用, 治疗 CD20 阳性的慢性淋巴细胞白血病。
Genmab 公司出品的 Ofatumumab (Arzerra; Genmab), 人 IgG1 类抗体	CD20	慢性淋巴细胞白血病	否	单独使用治疗氟达拉滨和阿仑单抗 (alemtuzumab) 治疗无效的慢性淋巴细胞白血病患者。
IDEC 制药公司出品的 ⁹⁰ Y-labeled ibritumomab tiuxetan (Zevalin; IDEC Pharmaceuticals): 鼠 IgG1 类抗体, 结合了 tiuxetan (N-(2-Bis(carboxymethyl) amino)-3-(Pisothio-cyanatophenyl)~propyl)-N-(2-Bis(carboxymethyl)-amino)-2-(Methyl)ethyl) glycine	CD20	低度恶性 NHL 或滤泡 B 细胞型 NHL	是	治疗复发的、难治的、低度恶性、滤泡型、转化或用 rituximab 治疗无效的各种 B 细胞 NHL; 用一线化疗药物治疗有一定反应, 但是未曾治疗过的滤泡型 NHL。
葛兰素史克公司出品的 ¹³¹ I-labeled tositumomab (Bexxar; GlaxoSmithKline), 鼠 IgG2 类抗体, 共价结合了 tositumomab	CD20	低度恶性的 NHL 或滤泡型 B 细胞 NHL	是	治疗用 rituximab 治疗无效的、CD20 阳性的、复发的、难治的、低度恶性、滤泡型或转化 NHL。
Genzyme 公司出品的 Alemtuzumab (Campath; Genzyme), 人 IgG1 类抗体	CD52	慢性淋巴细胞白血病	否	单独使用治疗 B 细胞慢性淋巴细胞白血病

(接下表)

(续上表)

Seattle Genetics 公司出品的 Brentuximab vedotin (Adcetris; Seattle Genetics), 嵌合型 IgG1 类抗体, 使用 maleimidocaproyl valine-citrulline-PAB 接头结合了 MMAE	CD30	何杰金氏淋巴瘤	否	治疗其它疗法两次治疗失败、自体干细胞移植治疗失败、或者不适宜使用自体干细胞抑制治疗的何杰金氏淋巴瘤患者; 治疗其它疗法失败的系统型间变性大细胞淋巴瘤 (systemic anaplastic large cell lymphoma) 患者。
惠氏公司出品的 Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg; Wyeth), 人 IgG2 类抗体, 使用 AcBut hydrazone 接头结合了 N-乙酰基 γ 二甲基酰肼刺孢霉素 (N-acetyl gamma-calichaemicin dimethyl hydrazide)	CD33	急性骨髓性白血病	是	2010 年 6 月退市, 之前用于治疗在 60 岁及以上年龄首次复发的、不适宜采用其它细胞毒性化疗药物治疗的、CD33 阳性的急性髓性白血病患者

贝伐单抗 (bevacizumab) 能够与血管内皮生长因子A (vascular endothelial growth factor-A) 这种关键的血管生长必需因子结合, 并抑制其活性, 从而阻止或者延缓肿瘤血管生长, 下调肿瘤组织的血液供应, 因此起到抗癌的作用。虽然贝伐单抗是目前唯一一款获准上市使用的、以分泌蛋白 (secreted protein) 为靶标的抗体类抗癌药物, 但是这种抗体类药物却已经被广泛地应用于治疗各种慢性炎症性疾病 (chronic inflammatory disease), 比如, 针对 α 肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- α) 等多种促炎症细胞因子 (proinflammatory cytokines) 的抗体类药物都已经获得了监管部门的批准, 可以用于临床治疗工作。

现在还有两款新型的抗体类药物获得了监管部门的通过, 这两种抗体上都共价结合了细胞毒性的微管抑制剂 (cytotoxic microtubule antagonist), 所以它们都属于抗体-药物结合物 (antibody-drug conjugates, ADC)。其中一种是以曲妥单抗 (trastuzumab) 为基础开发的, 主要用于治疗HER2阳性的乳腺癌患者。这类药物的出现意味着化疗也进入了靶向时代。由于这两款药物的成功, 近期又兴起了一股开发ADC药物的热潮。

最近刚刚获批的易普利姆玛 (ipilimumab) 又向我们展现了另外一种抗癌

治疗新策略, 即所谓的主动免疫疗法 (active immunotherapy)。易普利姆玛能够抑制负向调控T淋巴细胞CTLA4的活性, 从而激活患者自身的免疫反应, 发挥抗癌作用。这一激动人心的新发现已经在临床上表现出了长期的、持久的抗癌功效。

绝大部分获准上市的抗体类抗癌药物都属于人体内的IgG1类抗体, 这种抗体最能够激活自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK)、巨噬细胞 (macrophages) 和中性粒细胞 (neutrophils) 上的Fc γ 受体。抗体与这些受体结合之后能够诱发抗体依赖的细胞毒性作用 (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC), 或者抗体依赖的胞吞作用 (antibody-dependent phagocytosis, ADP), 从而杀死与抗体结合的肿瘤细胞。由于这种抗体的疗效直接依赖于ADCC或者ADP作用, 而不是通过对信号通路进行调控发挥作用, 所以这一点一定要注意。Fc γ 受体介导的表面抗体交联反应可能会导致多种结果, 比如诱导细胞凋亡 (apoptosis) 等。

新一代的抗体疗法很有可能会突破IgG1抗体的限制, 比如可能会在抗体与FcR结合的Fc段上做文章。由于能够抑制ADCC作用, 所以IgG4抗体也有一定程度的应用, 不过需要对这种抗体的铰链区 (hinge region) 进行改造, 以防止抗体药物过早解离, 与患者血液

内源性的IgG4抗体重链—轻链相结合。我们还可以通过Fc结构域上与Fc γ R结合的特定位点进行修饰，或者人工制备一种不能识别Fc γ R受体，即缺失了Fc重链N端糖基化位点（N-glycosylation）的人工重组抗体的方式彻底消除ADCC作用的影响。但是实验发现，对糖基化位点的改造却能够增强抗体与Fc γ R受体结合的能力，这就是所谓的效应子结构域增强型抗体（effector domain-enhanced antibody），所以这种改造反而有可能增强ADCC作用，或者激活依赖Fc γ R交联作用的信号通路（Fc γ R cross-linking-dependent signaling）。也有人正在尝试其它几种Fc结构域改造方式，他们希望通过这种改造能够增强或者降低IgG与FcRn（neonatal FcR）受体结合的能力，这种受体主要负责让进入内皮细胞（endothelial cell）的抗体重新回到循环系统当中。如果FcRn受体的功能得到加强，那么注入体内的外源性抗体的半衰期就能够得到延长，反之亦然。通过这种方式可以很好地控制抗体药物的药代动力学特征，比如可以通过增强抗体清除率的方法（即缩短半衰期）降低药物的毒性。

与此同时，也有研究人员在开发新型的抗体，比如两种“双效抗体（bispecific antibody）”。拥有不同特异性的抗体（单链—重链复合物）可以通过共价（covalently）、或非共价（uncovalently）的方式连接在一起，这样就能够得到一种可以同时识别两种不同抗原的所谓双效抗体。

不过这种抗体是一价抗体（monovalent），即一次只能结合一个抗原的抗体，还不是真正意义上的双效抗体，为了解决这个问题，有科研人员尝试采用噬菌体展示技术（phage display）开发出了具备双重识别特异性的单一CDR。这种具备双重识别作用的Fab轻链结构域既是具备高亲和力的正常的抗体，也是能够同时与两种抗原结合的双效抗体。MEHD7945A就是这样一种双效抗体，它能够同时识别EGFR和HER3的受体，目前该抗体已经进入了II期临床试验阶段。还有人在开发只剩一条Fab链的“独臂”抗体，比如onartuzumab就是其中的代表，希望能通过这种方式避免产生交联反应等副作用，致使c-Met等受体活化。

除此之外，还有一些人正在对一些不那么典型的抗体进行评估，比如功能较弱的单链抗体（attenuated single-chain antibody）等，这些抗体既可以是单价的抗体，也可以是双效抗体。由于这些抗体较小，所以在注入体内之后存在半衰期较短的问题，因此需要频繁地注射给药。最近也陆续出现了一些较大的、非单链的抗体，或者是融合了其它因子，比如细胞因子、激素及毒素等因子的人工抗体，以及各种人工合成的模拟抗体和抗体类似物。如果这些新产品能够取得成功，那将会极大地丰富临床医生们的选择余地。不过这些新产品与传统抗体的差异越大，就意味着未知的风险也越大，可能会出现未知的毒副作用，或者致敏性等问题。

2. EGFR治疗与HER2治疗相关抗体介绍

2.1 EGFR治疗相关抗体介绍

EGFR家族（ErbB/HER）可谓是开发抗癌治疗产品的一块风水宝地。到目前为止，已经有8款相关的药物获批，可以用于治疗多种实体瘤疾病，另外还有十几款同类产品正在研

发当中。

这些旨在抑制EGFR活性的相关产品大致可以分为两大类，即以西妥昔单抗（cetuximab）和panitumumab为代表的单克隆抗体类药物和以gefitinib及erlotinib为代

表的小分子酪氨酸激酶抑制剂类药物。这些单抗类药物最开始是为了治疗晚期结直肠癌（colorectal cancer）而开发的。在对西妥昔单抗的临床试验工作中发现，将西妥昔单抗与拓扑异构酶I抑制剂（topoisomerase I inhibitor）类药物依立替康（irinotecan）联用可以使患者体内肿瘤的体积明显地缩小，而这些患者都是在之前单独使用依立替康治疗无效的患者。西妥昔单抗是将鼠源单抗225改造之后获得的人源嵌合抗体，能够诱导ADCC反应。而panitumumab则是直接源自转基因小鼠的抗体，所以与西妥昔单抗相比拥有更高的EGFR结合活性。Panitumumab是一种人IgG2抗体，该抗体诱导ADCC反应的能力要弱于IgG1类抗体。这两种抗体都只能用于治疗EGFR过表达、以及KRAS基因未突变的患者，不过还没有人对这两种抗体进行过直接比较，所以很难判断这两种抗体在诱导ADCC反应方面的差异。

虽然EGFR单抗类药物和小分子抑制剂类药物上市至今都已经有了十几年了，但是我们对这两种药物在临床上应该如何应用还知之甚少。首先，尽管临床前研究数据表明，将这两种药物联用能够增强疗效，但是在实际操作中发现将这两种药物联用是没有临床治疗效果的。同样，最开始有人设想通过联合细胞毒性的化疗药物来抑制EGFR的作用。将依立替康与西妥昔单抗联用也是帮助西妥昔单抗获得FDA批准通过的重要原因。可不论是erlotinib还是gefitinib，在与多种化疗药物的联合治疗当中都没有表现出很好的治疗效果。实际上，就有人认为联合用药反而会降低疗效。在临床前研究工作中观察到，很多因素都会影响我们对治疗效果的预测，其中就包括药代动力学（pharmacokinetics）方面的差异，以及更重要的、对药物耐受性（tolerability）的差异等。虽然抑制EGFR的单抗类药物和小分子抑制剂类药物都会引起皮疹（skin rash）等副作用，但是erlotinib和gefitinib还会引起更严重的毒性反应，所以在与传统的化疗药物联

合应用时，患者对erlotinib和gefitinib这两种药物的耐受性反而更低。我们之所以对这种现象如此关心是因为最近有临床研究发现，erlotinib对于治疗携带持续活化突变型EGFR基因的癌症患者有比较好的疗效，而且FDA也已经同意用erlotinib治疗这类患者了。虽然使用上述这些药物可以同时抑制携带野生型和突变型的激酶，但是我们也希望能够有专门针对突变型激酶的药物，这样才能够进一步提高治疗指数（therapeutic index），“放过”表达野生型激酶基因的正常细胞和组织。

2.2 HER2治疗相关抗体介绍

Trastuzumab、pertuzumab和adotrastuzumab emtansine这3种单抗类药物以及lapatinib这一种小分子酪氨酸激酶抑制剂类药物是目前已经获批上市的、可用于治疗HER2阳性乳腺癌患者的几种药物（表1）。我们对这几种药物相关临床数据的解读要比EGFR抑制剂类药物更加清晰。比如Lapatinib这种小分子药物就能够有效地阻断HER2信号通路，而且由于有非常可靠的临床数据表明，该药物能够有效治疗使用trastuzumab治疗无效的患者，所以获得了FDA的批准。因此单独使用HER2酪氨酸激酶抑制剂类药物就足以有效治疗乳腺癌。现在在临床上主要使用trastuzumab和pertuzumab这两种针对HER2蛋白的抗体来抑制HER2信号通路的活性，阻止肿瘤细胞进一步增殖。不过这些抗体也都是人源化的IgG1类抗体，所以也可能存在ADCC样的作用。还有可能会增加抗体与Fc γ R受体亲和力的Fc γ R受体多态性的问题，因此并不会进一步提高这类抗体的疗效。所以ADCC反应才是值得大家关注的问题。

与EGFR抑制剂类药物不同的是，如果将针对HER2蛋白的抗体以及相应的小分子药物与传统的化疗药物联用，在治疗HER2阳性的乳腺癌患者时会收到奇效。由于患者对这类药物的耐受性较好，所以还可以将这类药物与常用的细胞毒性化疗药物（cytotoxic

chemotherapy) 联用。实际上将pertuzumab与trastuzumab和docetaxel联用的方案也已经获得了通过。在抗癌治疗工作中进行联合用药也是一项常规, 因为这样既可以获得更好的疗效, 也可以降低治疗的毒副作用。

如图2所示, 由于etrastuzumab和pertuzumab是分别与HER2蛋白上的不同部位结合的, 所以双效抗体的效果可能会更好一些, 因为它们能够同时抑制两种不同的已活化HER2蛋白。这种想法源自一个II期临床试验项目。在这次实验中, 科研人员们对使用trastuzumab和另外一种细胞毒性化疗药物联合治疗无效的肿瘤患者尝试进行了两种抗体联用的治疗方式, 结果发现有25%的肿瘤体积缩小了, 临床有效率更是高达50%。另外开展的一次辅助治疗试验(neoadjuvant, 即在手术之前的药物治疗) 进一步确认了抗体联用疗法的功效, 而且这些患者全都是之前治疗已经失败过的患者。我们已经知道, 双重抗HER2抗体疗法对于治疗早期乳腺癌患者和晚期已转移乳腺癌患者都有疗效, 所以有人进行了一次非常重要的试验, 以验证这种疗法是否可以作为治疗转移乳腺癌患者的一线方案, 该研究也促使FDA在2012年6月给pertuzumab开了绿灯。实际上, 当我们用患者的病情稳定

期(progression-free survival) 和总体生存期(overall survival) 这两个指标来衡量治疗效果时就会发现, 联用疗法的效果要远远好于trastuzumab, 比如联用疗法下的病情稳定期长达6.1个月, 而使用trastuzumab时只有3.9个月。

综上所述, 特异性针对EGFR家族酪氨酸激酶受体的单抗类药物的出现是我们抗癌治疗史上的一大进步。虽然有一些使用针对其他信号通路受体的单抗类药物治疗癌症的尝试没能取得成功, 比如与多种肿瘤都有确定联系的胰岛素样生长因子1受体(insulinlike growth factor 1 receptor) 等, 而且针对c-Met蛋白的抗体类药物也一直都在开发之中。由于目前正在开展临床试验的单抗类药物的数量还不算太多, 所以我们也很难总结出太多有价值的经验。不过我们需要记住一点, 凡是有效的抗体类抗癌(实体瘤) 药物无非只有两种作用机制, 即识别肿瘤组织里的突变基因产物, 如EGFR或c-Met等, 或者是过表达的基因产物, 如HER2等。抗体不会识别突变的等位基因。当然, 如果抗体能够抑制起决定性作用的促癌(drivers of cancer) 信号通路受体, 或者是耐其它药物的(drivers of resistance) 受体, 就可以取得非常好的抗癌治疗功效。

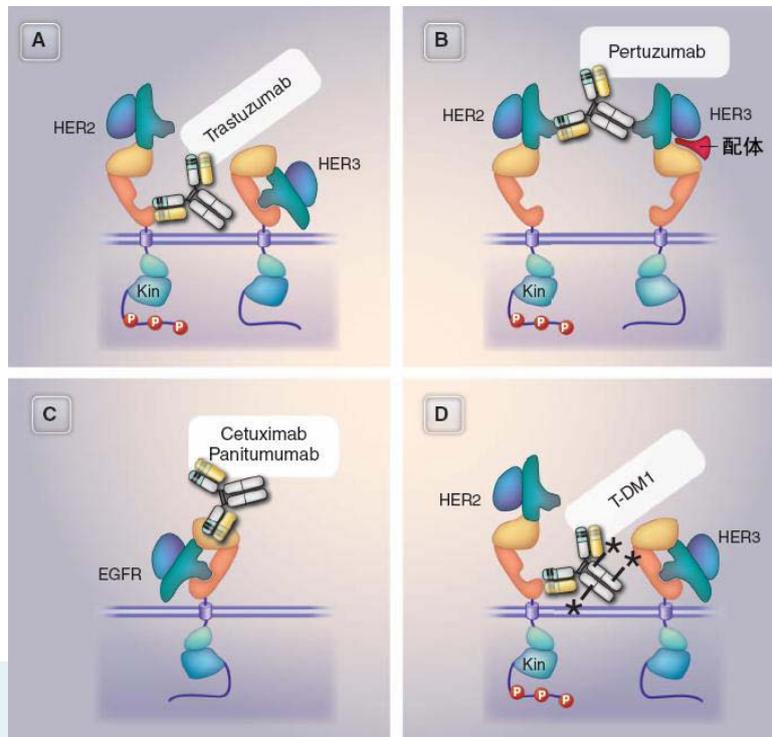


图2 与EGFR及HER2表位结合的抗体类药物作用机制示意图。图中A、B、C、D分别介绍了Trastuzumab、Pertuzumab、Cetuximab或panitumumab以及T-DM1（ado-trastuzumab emtansine）的作用机制。在HER2信号通路中，HER2与HER3之间的相互作用至关重要。HER2激酶能够磷酸化HER3蛋白上的胞内结构域，继而激活后续的磷脂酰肌醇-3-激酶级联反应。HER3蛋白与heregulin等配体结合之后也会被激活，这同样会通过变构效应激活HER2激酶。Pertuzumab可能就能够阻断这种作用机制。图D中的星形符号表示的是细胞毒性药物——美登素1的衍生物（derivative of maytansine 1, DM1）。

3. 免疫治疗策略

3.1 抗体和化疗药物联用的策略

从单克隆抗癌抗体一出现，将抗癌抗体当作一种载体，在上面搭载细胞毒性化疗药物，对肿瘤进行靶向化疗的策略就随之应运而生了。可是直到最近这种策略才取得了成功，这可能是因为以下这3点原因。首先，抗体类药物识别肿瘤细胞的特异性还不够强。其次，所搭载化疗药物的抗癌作用不强，或者这些药物可能具有免疫原性，比如源自细菌或植物的药物等。最后，用来绑定（交联）化疗药物和抗体的方法还不太完善。最后这个困难也是最难解决的一个难题。如果交联的方法不稳定，化疗药物在血液中就很容易与抗体解离，这样就等同于传统的化疗方案，起不到靶向化疗的

作用了，正常的组织同样会大量摄取化疗药物，与此同时，肿瘤组织摄取的药物量也就大大下降了。但是如果交联非常稳定，肿瘤组织就需要对ADC里的“接头”进行充分的水解，释放出化疗药物。另外，对化疗药物的选择也是一个问题，需要进行大量的试验，根据目前的研究进展来看，微管抑制剂类药物（microtubule antagonists）是一个不错的选择。

Gemtuzumab ozogamicin是世界上第一款ADC药物，于2000年上市。该药物以急性髓细胞性白血病（acute myeloid leukemia）肿瘤细胞表面的糖蛋白CD33为靶标。Gemtuzumab ozogamicin是由一个人源化的

IgG4抗体、一个受pH影响（即当pH值发生改变时稳定性会发生变化）的接头，以及一个刺孢霉素（calicheamicin，该药物主要与DNA小沟结合）所组成。不幸的是，该药物在2010年因为没能重复出之前的良好效果而退市。

最近，又有一款针对CD30的药物诞生，那就是由特异性识别CD30的单克隆抗体与微管抑制剂MMAE（monomethyl auristatin E）共价结合所组成的brentuximab vedotin。该药物因为其明显的疗效和优良的安全性已被批准用于治疗晚期何杰金氏淋巴瘤（Hodgkin's lymphom）。在brentuximab vedotin中使用的接头是一种含有肽组份（peptidic moiety）的分子，该分子是组织蛋白酶B（cathepsin B）的底物。brentuximab vedotin在抗体组份的带领下进入CD30分子阳性的肿瘤细胞之后，细胞内富含组织蛋白酶B的内涵体（endosomes）和溶酶体（lysosome）就会降解接头分子，释放出化疗药物MMAE。

T-DM1则是另外一种在最近才获批的ADC类药物，T-DM1主要由trastuzumab（即T-DM1中的T）和DM1组成。这里使用的接头并不是能够被溶酶体蛋白酶降解的物质，只需T-DM1里的抗体成分被部分降解就可以释放出DM1药物。对于使用多种药物进行治疗都无效的晚期HER2阳性的乳腺癌患者，T-DM1能够延长患者的病情稳定期（从未使用T-DM1治疗时的6.4个月增至9.6个月），和总体存活期（从从未使用T-DM1治疗时的25.1个月延长至30.9个月）。

T-DM1和brentuximab vedotin的成功极大地刺激了ADC药物的开发热情。很多单位和机构都在尝试用针对各种抗原的抗体开发治疗其它实体瘤或者造血系统肿瘤的ADC类药物，不过大家选择的化疗药物基本上都是MMAE或DM1。除此之外，也有人在开发新的接头和适合用于ADC的化疗药物，希望能够进一步提高ADC药物的治疗指数，为临床

医生们提供更多的选择。

新的人工抗体平台（engineered antibody platform）也是值得我们关注的焦点之一。比如典型的接头可降解的MMAE药物vc-MMAE就是先还原再与抗体连接，这样抗体上内源性半胱氨酸残基衍生物往往就会参与形成抗体链间的二硫键连接。也陆续开发出了一些对特定连接位点，比如未配对的半胱氨酸残基（unpaired cysteine residues）位点进行人工改造、修饰的技术。科学家们在抗体的重链或轻链上发现了一些特定位点，借助这些位点更容易将抗体与药物连接，也能够利用这些位点对每一个抗体分子上连接的药物分子数进行调控。还有一部分科研人员正在研究能否通过其它修饰手段增强抗体药物与肿瘤细胞结合时的特异性，减少其它未表达肿瘤抗原的正常细胞摄入ADC药物的几率，比如使用双效抗体，通过同时识别两种不同肿瘤抗原的方法提高特异性。还有人在尝试在抗体上再连接一个纳米载体（nanocarriers）来装载化疗药物的方式。虽说这种策略可以提高细胞内吞摄入的药物量，但是却存在一个问题，就是会在血液中非特异性地丢失一部分化疗药物。我们希望在未来几年内，ADC药物的研发工作会取得一个突破性的进展。

3.2 抗体与肿瘤免疫疗法

认为可以利用患者自身的免疫机制来杀死肿瘤细胞的理论也已经诞生很久了，科学家们30多年来一直在从事这方面的尝试。可是与ADC理论一样，即便经过这么多人这么多年的努力，免疫疗法在临床治疗领域还是没能取得太大的进展。这主要是由于我们对机体免疫系统的组织，以及肿瘤对机体免疫反应的调控机制都没有十分深入的认识。除此之外还有另外一个原因，那就是长期以来，科研人员把注意力都集中在抗癌疫苗（anticancer vaccines）这个领域，可是由于肿瘤生长的微环境也存在免疫抑制作用，所以这种策略很难获得成功。很多癌症患者都能够产生抗癌的T

细胞反应，这是因为肿瘤细胞几乎都会持续表达突变的蛋白或抗原，这些不同于天然蛋白分子的“外源”物质会刺激人体免疫系统，产生免疫反应。但是这些免疫反应在临床上几乎都无法反映出实际的疗效。

现在又出现了一种新策略，该策略认为应该抛弃免疫抑制（immunosuppression），采用改善免疫反应质量的方法来进行抗癌免疫治疗。由于有两种抗体已经取得了不错的临床效果，所以这种理论也引起了大家的兴趣和广泛关注。其中一种抗体就是抑制CTLA4分子的ipilimumab。如图3A所示，CTLA4分子是一种在所有T细胞表面都有表达的负向调控分子，它主要与抗原呈递细胞表面的CD80/CD86分子结合，以防止T细胞被过度活化。Ipilimumab则能够阻断CTLA4与CD80/CD86分子之间的结合，所以可以起到加强T细胞免疫反应的作用。阻断CTLA4分子之后还可以诱导调节T细胞（regulatory T cell，我们知道调节T细胞有利于肿瘤微环境产生免疫抑制作用）发生凋亡，但是具体的凋亡机制现在还不清楚。由于ipilimumab是一种IgG1抗体，所以可能是ADCC机制在发挥作用。临床发现，用ipilimumab治疗已转移的晚期黑色素瘤（late-stage metastatic melanoma）患者有奇效，治疗效果非常好，而且维持的时间也很长，甚至能够治愈部分患者，可是这些患者之前都是没有任何治疗手段可以使用的绝症人群。虽然获益患者的比例不太高（在实验组中，3年存活的患者比例为23.5%，可对照组中的比例也有大约10%），而且我们也不能够明确地肯定是不是ipilimumab的疗效，但这个结果还是非常不错的，所以美国FDA还是在2011年给该药提供了上市许可。上市之后又陆续发现，ipilimumab对其它一些肿瘤也表现出不同程度的治疗效果，但是也发现了ipilimumab的一大副作用，它会引发严重的免疫相关问题，比如会导致自身免疫性炎症疾病等。不过这些研究也为研究细胞周期检查点的特异性，以及其它免疫调控因子作用提

供了一套非常重要的概念证明体系（proof of concept）。

紧随ipilimumab之后的就是抑制另外一个T细胞负向调控因子——PD-1的抗体，如图3B所示，该抗体阻断的是PD-1与PD-L1及PD-L2之间的相互作用。针对PD-1的抗体有两种，即nivolumab和lambrolizumab，另外还有一种抗体MPDL3280A则是针对PD-L1的，目前在这一类抗体药物当中，这3种是最接近临床应用的。虽然PD-1的负向调控作用不如CTLA4分子那么强大，但是PD-1也能够在一程度上限制T细胞的活化强度。肿瘤细胞以及浸润进入肿瘤组织的一些免疫细胞往往都能够表达PD-1分子。从进化的角度来看，这些PD-1分子能够在机体被病毒感染时起到免疫调控作用，防止T细胞过度活化之后杀伤未被病毒感染的正常细胞。比如在效应T细胞分泌 γ 干扰素时正常的细胞都会表达PD-L1分子来保护自身，避免被T细胞杀死。对于肿瘤细胞而言，它们也会采取同样的手段来应对细胞毒性T细胞分泌的 γ 干扰素。由此可见，肿瘤细胞分泌的PD-L1分子能够与活化T细胞表面的PD-1分子结合，来抑制T细胞的功能。其具体作用机制可能是PD-1分子的胞内段发生了磷酸化修饰反应，从而抑制了T细胞内的磷脂酰肌醇-3激酶（phosphatidylinositol 3-kinase）信号通路，使得细胞不再表达并分泌细胞毒性分子。所以PD-1/PD-L1系统对于肿瘤细胞而言是一个非常好的免疫抑制机制。树突状细胞表达的PD-L2分子也具有类似的作用，可能在外周免疫耐受（peripheral tolerance）机制中起到了重要的作用。

临床前研究和临床研究都发现，不论是使用针对PD-1的抗体还是针对PD-L1的抗体都可以阻断PD-1与PD-L1之间的相互作用，从而提升T细胞的细胞毒性杀伤作用，起到快速，且持续的抗癌作用，而且肿瘤组织的体积往往都会明显缩小，同时副作用也很小。这种抗癌作用的机制可能就是消除了肿瘤微环境对

抗肿瘤的T淋巴细胞的免疫抑制作用。这一点与抗CTLA4疗法恰好相反，使用抗CTLA4抗体的主要作用是主动提升T淋巴细胞的免疫活性，而且阻断PD-1/PD-L1通路所产生的副作用也要比ipilimumab的副作用明显少很多。虽然现在阻断PD-1/PD-L1通路的抗体已经进入了登记试验（registrational trial）阶段，而且此前的研究成果已经证实了这种策略的治疗效果，但这些抗体在安全性或者疗效方面是否就能够脱颖而出，我们现在还不能过早地下结论。从这个角度来说，我们更加需要强调一点，阻断PD-1的抗体也会抑制T细胞与抗原呈递细胞（这些细胞常见于肺部）表面的PD-L2分子之间的相互作用，这可能会增强药物的毒性作用，当然也可能不会。不过无论如何，使用nivolumab这类阻断PD-1分子的抗体的确存在诱发肺炎（pneumonitis）这种副作用的风险。另外，目前在临床上使用的抗PD-1抗体都属于人IgG4抗体，所以与抗PD-L1的抗体相比，它们诱发ADCC作用的能力都较弱。但是这些经过人工改造、完全消除了与Fc γ R受体结合能力的抗PD-L1的抗体还是能够引发非常严重的肺炎的。所以不论是有没有致ADCC作用，不论是抗PD-1还是抗PD-L1，也许这与药物的安全性或疗效提高都没有太大的关

系。

由于ipilimumab和其它抗PD-1/L1拮抗剂的作用存在补偿机制（complementary mechanisms），最近有一项临床研究发现，将两种不同药物联合用来治疗黑色素瘤患者会产生让人意想不到的协同效应（additive activity），当然毒副作用也会叠加。由于在评价这种联合用药与单独使用一种抗体的临床反应时采用了不同的标准，比如会分别使用《实体瘤反应评价标准》（Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, RECIST）和世界卫生组织的《肿瘤体积缩小标准》（criteria for tumor shrinkage），所以我们还需要进行进一步的研究，以准确评价两种药物联用所产生的协同效应究竟有多么大。

前面介绍过的这些抑制细胞周期检查点的抗体，以及抑制肿瘤产生的免疫抑制作用的抗体都能够起到持久的、患者可耐受的治疗作用，这一点是其它药物或抗癌方案所不能匹敌的。所以这些抗体类药物一定会像15年前登场的EGFR抗体和HER2抗体一样，彻底改变临床抗癌工作的面貌。而且很有可能在未来的几年内，陆续出现其它针对调控靶标分子的抗癌抗体。



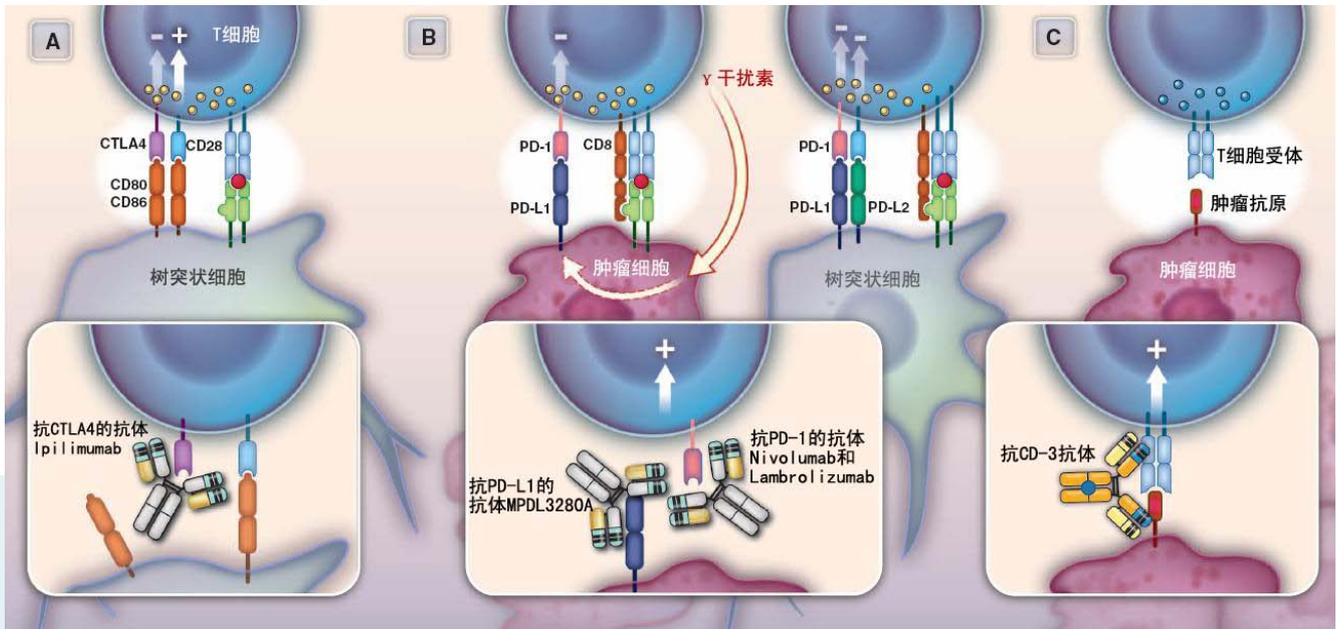


图3 通过抗体对癌症患者的机体免疫系统进行正向和负向调节。(A) 细胞周期检查点 (Checkpoint) CTLA4阻断策略。CD80和CD86都是活化的树突状细胞在向T细胞行使抗原呈递功能时在细胞表面表达的配体。CD80/86与T细胞表面的共刺激因子CD28结合之后能够发挥共刺激作用, 促使T细胞增殖, 同时也能通过与T细胞表面的CTLA4因子结合的方式抑制T细胞的增殖, 使T细胞的活化控制在一个适当的范围内。抗CTLA4的抗体Ipilimumab就能够破坏CD80/86与CTLA4因子之间的结合, 使T细胞持续活化。(B) 细胞周期检查点阻断及免疫抑制阻断策略。左图, T细胞锁定肿瘤细胞之后会释放 γ 干扰素, 使肿瘤细胞表达PD-L1蛋白的水平上调。PD-L1与活化T细胞表达的PD-1分子结合, 活化的T细胞表达PD-1分子, 活化的树突状细胞向T细胞行使抗原呈递功能时, PD1分子也能够与树突状细胞表面的PD-L1或PD-L2分子(这是树突状细胞独有的, 与PD-L1分子非常相似的一种分子)结合, 发挥负向调控作用。所以使用抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体就可以阻断这种负向调控机制, 让受抑制的免疫机制恢复活力。为了图示的方便, 在图中只展示了PD-1、PD-L1以及PD-L2之间最初级的相互作用。(C) 抗CD3的双效抗体能够被动地招募细胞毒性T细胞至肿瘤组织处。Blinatumomab是一种单链双效抗体(图中为了展示的方便该抗体还是以传统IgG的形式出现), 它能够识别T细胞受体CD3, 也能识别B淋巴细胞表面抗原CD19。该抗体将T细胞招募至肿瘤组织处能够有效地杀伤肿瘤细胞。

3.3 其它几种免疫治疗策略

从某些角度来看, 所有使用单克隆抗体的治疗方法全都应该属于免疫疗法, 即依靠机体自身免疫反应来起到治疗作用的方法。可是通常来说, 我们只会把主动调控免疫系统, 大部分时候实际上指的是主动调控T细胞的治疗称作免疫疗法, 比如前面提到的抗CTLA4、抗PD-1和抗PD-L1疗法等。复合疗法 (Hybrid approaches) 也已经有所尝试。比如单链抗体blinatumomab就是由能够与淋巴瘤细胞及正常B细胞表面的CD19结合的单链Fv片段与能够与T细胞上的CD3受体结合的Fv片段串联组合而成的一种抗体。用这种抗体治疗非何杰金氏淋巴瘤效果非常好, 因为它

可以将T细胞招募至淋巴瘤细胞上, 不论T细胞自身的特异性如何, 都能够激活这些T细胞的细胞毒性效应杀死肿瘤细胞。虽然这些抗体一开始疗效非常好, 但是由于它们的分子量太小, 所以半衰期非常短, 需要不断注射给药。毫无疑问, 未来的工作就是如何改造这种抗体, 延长其半衰期, 使其更易于临床使用。

另外一种策略也能够起到同样的作用, 这就是将抗CD3的抗体与抗肿瘤特异性的MHC-1分子的抗体相结合的策略。这种抗体也同样可以将T细胞招募至肿瘤细胞处, 发挥抗肿瘤效应。

我们还可以对患者自身的T细胞进行改造, 使其表达抗肿瘤的膜结合抗体, 并且将这

种抗体与能够诱发T细胞杀伤作用的信号分子结合，杀死肿瘤细胞。这种策略也取得了不错的试验成果，至少在初期的临床实验中发现对造血系统肿瘤效果不错。

传统的抗体也可以进行改造，比如对其Fc段进行改造，从而增强抗体与Fc γ R受体结合的能力，招募巨噬细胞或者自然杀伤细胞来发挥ADCC作用。

4. 免疫疗法的前世今生及未来的发展方向

免疫抗癌疗法有非常悠久的历史，现在也取得了不错的成绩，将来一定会有一个光明的前途。虽然目前还不能确定哪一种策略是今后的主要发展方向，但是毋庸置疑，在近几年内，上面介绍的几种抗体抗癌策略一定是研究的热门方向。将多种抗癌抗体策略联合使用也是一条可行的道路。最近也有非常确定的I期临床试验数据表明，将ipilimumab和nivolumab联用是一个不错的选择。这些治疗

策略能够大大减少，甚至是完全取代目前临床上最主流的化疗药物的用量。在进行手术之前使用抗体类药物对癌症患者先进行全身治疗也是一个不错的方案，而且这些全身治疗甚至还有可能降低手术切除肿瘤的必要性。新的给药平台、新的ADC药物以及新的免疫调控手段也都慢慢地走上了抗癌的主战场，这预示着抗体治疗的春天就要来了，癌症患者们也即将迎来美好的明天。



资讯 · 频道

www.LifeOmics.com

二、抗体在HIV-1疫苗开发及免疫治疗工作中的作用

尽管历经了30多年的努力，科学家们也还是没能开发出一款成功的HIV-1疫苗，大家感到几乎就没有可能用疫苗刺激机体产生有保护效果的免疫力。不过最近有一个疫苗的实验结果，再加上我们发现了自然产生的、对HIV-1病毒具有广谱中和能力的抗体（broad HIV-1-neutralizing antibodies, bNAb）的单细胞抗体克隆技术（single-cell antibody-cloning techniques）又再次燃起了大家的希望。这些bNAb抗体在动物模型试验中能够给动物提供足够的保护，避免被HIV-1病毒感染，同时对于已经被感染的动物也能够有效地抑制动物体内病毒的复制。研究发现，只有少部分的HIV-1病毒感染个体能够产生这种bNAb抗体，这说明我们的疫苗还有更进一步改进的空间，使疫苗能够更有效地顺应机体的天然免疫机制，或者通过对免疫原（immunogen）进行结构优化设计，来提高其抗原性。此外，在小型动物模型试验中取得成功的被动免疫疗法（passive immunotherapy）也说明bNAb抗体有望成为一款非常有潜力的治疗HIV-1感染者的药物。

一款有效的疫苗通常都会刺激机体产生有效的免疫保护抗体，这些抗体能够保护机体不会被致病原感染，甚至还（或者）可以帮助机体消灭、清除体内的致病原。目前市面上所有的疫苗刺激机体产生的抗体所针对的全都是致病原上某种固定不变的组份。我们都知道流感病毒（influenza virus）是一种变异速度非常快的病毒，病毒衣壳表面的刺突蛋白（spike）一直都在进化，可即便是针对季节性流感病毒开发的疫苗，它所针对的也是在当季流行的季节性流感病毒刺突蛋白中相对比较保守的那一部分。所以开发HIV-1疫苗就要困难许多，因为我们知道HIV-1病毒一直都在不停地变化，一个人的体内可能同时会有很多种不同的病毒，这些病毒的刺突蛋白在序列上的差异度可能会达到35%，所以一款有效的HIV-1疫苗必须能够将这些病毒一网打尽。HIV-1病毒除了能够不断变异之外，它还有另

外一个办法来逃避机体的免疫打击，那就是HIV-1病毒上刺突蛋白的数量非常少，而且在这些蛋白上还覆盖了一层不断变化的葡聚糖（glycan），所以机体的免疫防御机制很难识别并抓到这些蛋白。所以一款有效的HIV-1疫苗必须能够刺激机体产生高亲和力的抗体，才能识破葡聚糖的伪装，与数量稀少、而且高度异质化的HIV-1病毒表面刺突蛋白结合。

这种高亲和力抗体并不是科学家们凭空想象出来的，的确有临床试验发现了这种抗体，大约有10~30%的HIV感染者在病毒感染2至4年之后体内会出现这种能够中和多种病毒毒株的抗体。在这些幸运儿当中，还有大约1%的人是超级幸运儿，他们体内能够出现罕见的广谱（cross-clade）中和抗体，我们称之为精英中和抗体携带者（elite neutralizers）。虽然还没有科研人员对这些精英的血清进行过直接的检测，但是有人将他们的血清给黑猩猩进

行过被动免疫，结果发现这种血清具有很好的保护效果，可以使黑猩猩免受HIV-1_{IIIb}病毒的感染。不过由于人类抗体克隆技术的限制，我

们现在还是没能从这些超级中和抗体里鉴定出明确具有保护作用的抗体分子。

1. 第一代bNAb抗体

尽管技术上存在种种限制，还是有好几个科研小组冲破种种困难发现了具有广谱中和活力的抗HIV-1抗体。虽然这些bNAb抗体的效价不太高，但是科研人员借助这些抗体也在HIV-1病毒胞膜的刺突蛋白（该蛋白由3个gp120-gp41异源二聚体组成）上发现了好几个“漏洞”（图1）。这些位点当中就包括可以被447-52D抗体识别的gp120蛋白上的第三个高变区（hypervariable domain, V3）、CD4结合位点（HIV-1病毒就是利用这个蛋白进入T细胞的）、CD4诱导位点（即病毒结合共受体）以及gp41蛋白上的膜近外侧区（membrane proximal external region, MPER）等。在体外试验中发现，b12是中和范围最广、中和能力最强的一种bNAb抗体，对某几种毒株的平均IC₅₀是3.1ug/ml，分布宽度为40%，2G12抗体的IC₅₀是3.0ug/ml，分布宽度为27%，2F5抗体的IC₅₀是3.6ug/ml，分布宽度为58%，4E10抗体的IC₅₀是2.7ug/ml，分布宽度为96%。除了体外中和作用之外，在猕猴动物实验中发现，如果用上述这些抗体进行被动免疫保护也能够对SHIV（SHIV能够表达与HIV-1一样的胞膜糖蛋白）起到非常好的免疫保护效果。

尽管取得了这些科研成果，但是大家对开发HIV疫苗还是没有表现出太大的热情，因为所有这些抗体都不是“等闲之辈”。比如2G12抗体就有3个结合位点，而不是常见的2个结合位点。2F5抗体和4E10抗体则都属于自我反应（self-reactive）抗体。b12抗体则是源自噬菌体的抗体，是由轻链和重链随机匹配而来的一种抗体，在大自然中根本就不存在这种抗体，所以至今也没有一种疫苗能够刺激

机体生成这些抗体。更重要的是，给猕猴注射的抗体非常多，只有这么高滴度的抗体才能够产生足够的免疫保护效果，然而用疫苗接种这种主动免疫的方法是不可能产生这么多抗体的。因此所有以HIV-1病毒胞膜蛋白为靶标的疫苗无一例外地全都以失败告终。既然抗体这条路走不通，大家就都把目光转向了T细胞免疫这条路，尽管到目前为止，还没人在这条路上找到成功的方向。

1.1 新的开始

最近新取得的两项科研成果又重新燃起了大家开发体液免疫疫苗的热情。第一项成果就是单细胞抗体克隆技术，有人用这种技术进行了系统的研究，终于获得了能够对HIV-1病毒胞膜起反应的抗体。第二项进展则是在RV144疫苗人体试验中观察到，疫苗能够在一定程度上降低HIV-1病毒的感染风险，而这种效果正是与能够和HIV-1病毒胞膜刺突蛋白起反应的抗体有关。

单细胞抗体克隆技术是一种非常高效的人类抗体克隆技术，开始主要使用这种技术来研究B细胞免疫耐受机制，后来又逐渐发展为寻找、确定表达特定抗体（比如能够与HIV-1病毒胞膜刺突蛋白结合的抗体）的单个B细胞的技术，或者用来培育并从中筛选出能够分泌中和抗体的B细胞。有科研人员用这种单细胞抗体克隆技术对体内存在高滴度HIV-1中和抗体的志愿者进行了研究，结果发现了大量的新抗体，这些抗体的中和能力要比之前的抗体高出2至3倍。用猕猴对这些抗体进行了保护性试验，结果发现用这些抗体只需要达到15 μg/ml的浓度就足以提供足够的免疫保护力，可

以抵御高滴度的SHIV_{SF162P3}病毒的攻击。小鼠试验也得到了同样的结果，这说明是有可能通过疫苗刺激机体来产生具有保护作用的中和抗体的。

RV144试验又再次将人们的目光拉回到体液免疫这个领域，因为经过修正的意向治疗分析（intention-to-treat analysis）结果显示，31%（P= 0.04）的保护效果都与抗体相关，这些抗体是能够与HIV-1病毒胞膜刺突蛋白V1/V2区域结合的抗体。不过值得注意的是，疫苗刺激机体生成的抗体反应并不能中

和原始的HIV-1病毒毒株，大家认为可能是抗体介导的细胞毒性作用（antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC）在其中发挥了作用。不过这也只是一种推测，并没有得到直接的证明。虽然有一些研究发现非中和抗体也具有一定的作用，但是这些抗体在小鼠实验和其它一些灵长类动物试验中都没能表现出免疫保护作用。所以RV144试验观察到的疫苗保护作用背后的机制是什么，至今还不是非常清楚。

2. 第二代bNAb抗体及其靶标位点

在感染了HIV-1病毒的人体当中，是一种怎样的分子机制让他们的体内产生了广谱的、有效的中和反应呢？单细胞抗体克隆试验发现，有一些人之所以能够生成这种抗体，是因为他们体内针对病毒胞膜刺突蛋白上的2至3个，或者更多不同的位点发生了免疫中和反应；也有一些情况是产生了一种比较强的中和抗体。

到目前为止，科学家们发现的新型bNAb抗体主要针对的是图1中展示HIV-1病毒胞膜刺突蛋白上的4个不同位点。这4个位点分别是CD4结合位点（CD4-binding site, CD4b）、V1/V2上的N160葡聚糖依赖位点（N160 glycan-dependent site）、V3底部的N332葡聚糖依赖位点（N332 glycan-dependent site）以及gp41蛋白上的MPER位点。今后还有可能发现更多的“薄弱”位点，比如8ANC195抗体和3BC176抗体所识别的抗原决定簇就与上述4个位点都不相同，但是目前还没有确定这两个位点的具体位置。

CD4b位点是一个被保护的位点，它缩在胞膜里面，周围布满了葡聚糖和可变区。不过CD4分子以及CD4b抗体还是很容易与这个功能非常保守的位点接触并结合。NIH45-46和3BNC117就是这种CD4b抗体，这些新发

现的bNAb抗体都源自同一个种系可变重链编码基V_H上的V_H1-2段。结构分析发现，虽然这些抗体源自不同的个体，但是这些V_H1-2抗体还是拥有同样的抗原识别模式，即识别CD4分子的骨架残基。抗体轻链上的互补决定区3（complementarity determining region 3, CDRL3）能够与gp120 V5和可变的D环发生相互作用，而CDRL1则能够与D环的Asn²⁷⁶上的葡聚糖结合。

如图1所示，PG9抗体和PG16抗体、CH01-CH04抗体以及PGT141-145抗体都能够与V1/V2上的N160葡聚糖依赖位点结合。结构分析发现，这些抗体都能够依靠长长的阴离子CDRH3链（这是抗体重链可变区上的第3互补决定区）透过葡聚糖“防御工事”，抗体能够与gp120蛋白上的β折叠结合，也能够与胞膜三聚复合物（trimeric envelope complex）上两个相邻的gp120二聚体（protomer）上的N连接葡聚糖相互作用。PG9抗体与胞膜刺突蛋白的结合似乎能够改变胞膜三聚体的稳定性，这可能有助于增强抗体的中和能力。

如图1所示，PGT121和PGT128样bNAb抗体能够识别V3上的N332葡聚糖依赖位点。对PGT128抗体与其配体所组成的复合物进行

晶体结构分析发现，PGT128抗体主要是与V3可变区的C末端，以及分别位于N332和N301上的甘露糖Man_{8,9}葡聚糖和一个人工合成的、缺少N-乙酰葡萄糖胺核心的Man₅葡聚糖接触。PGT121样抗体也是与gp120蛋白的V3可变区，以及N332上富含甘露糖或含有复杂型N

末端葡聚糖的位点结合。虽然这两种抗体可能是从不同的角度接近N332位点，但是它们可能都起到了封闭CD4结合位点，以及干扰CD4与CD4结合位点结合的作用，所以能够阻止病毒感染细胞。

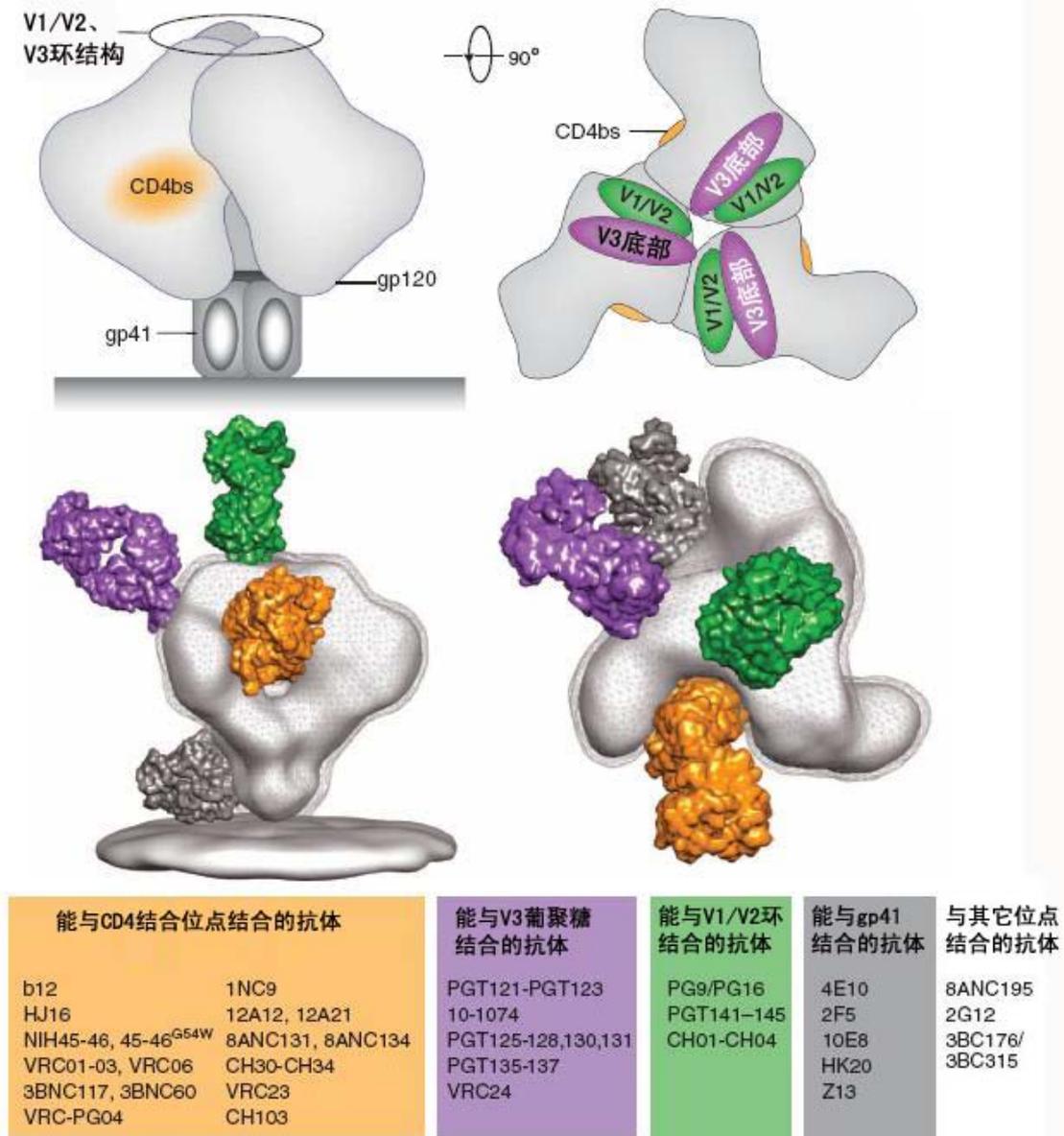


图1 能够与HIV-1病毒膜刺突蛋白结合的抗体识别位点简介。图中展示的就是HIV-1病毒膜刺突蛋白的结构图。该刺突蛋白三聚体中的每一个单体都是由gp120蛋白和gp41蛋白组成的。上表中介绍了4种已经明确的中和抗体的识别位点，其中橙色代表的是CD4识别位点，紫色表示的是V3底部的葡聚糖结合抗原决定簇，绿色表示的是V1/V2环，灰色表示的是gp41蛋白的MPER位点。表中与之对应的则是能够与这些位点结合的bNAbs抗体。图中橙色的是NIH45-46抗体、绿色的是PG16抗体、紫色的是PGT128抗体以及灰色的是2F5抗体。

10E8抗体主要识别gp41蛋白上的MPER位点。该抗体可以识别 α 螺旋，不过它与2F5抗体和4E10抗体这些识别同样位点，但是效价较低的第一代抗体所不同的是，它既不能够自我反应，也不能与磷脂反应。

疫苗设计者们一直都在关注这4个位点，可是他们每个人都只关注其中的某一个位点，都不清楚在自然感染的进程中，上述每一个位点被抗体识别并结合的频次。比如最近根据血清学研究和计算机推算的结果显示，只有一部分能够产生广谱中和抗体的HIV-1感染者可以针对上述这4个位点发生免疫反应，不过这些人体内产生的是大量的特异性CD4b单克隆抗体。这些抗体能够识别多种病毒毒株，而且效价非常高，不过只有少数感染者是经过了全面、系统的研究，今后也会继续发现新的免疫攻击靶点。因此现在就对每一个位点被识别的频次，或者不同抗体的组合能够起到多么大的免疫保护作用，能够识别多少种不同的病毒下一个定论还为时过早。虽然得到这些答案需要付出一定的代价，但是这对于疫苗开发工作还是非常有价值的，因为用疫苗更容易刺激机体产生这些本来就能够天然产生的抗体。

2.1 bNAbs抗体的特点

众多研究人HIV-1抗体反应分子机制的工作都取得了比较突出的科研成果，其中有一项成果尤为引人注目，那就是发现直接针对胞膜蛋白的抗体都是高度变异的（这种突变属于体细胞突变）。人免疫球蛋白G抗体编码基因 V_H 上一般都携带有10至20个体细胞变异（somatic nucleotide mutation）。只有有限中和能力的特异性抗HIV-1 IgG抗体上突变的数量要比这个正常水平高出1倍，而具备强大中和能力的特异性抗HIV-1 IgG抗体上的突变数量要远远超出普通水平，一般都会达到80个以上。

如图2所示，抗体编码基因是在二级淋巴

器官的生发中心（germinal center）针对特定抗原发生免疫反应时发生体细胞突变的。B细胞在与抗原和T细胞发生相互作用之后，就会进入生发中心进行克隆扩增，同时发生体细胞突变和克隆选择，从中筛选出可表达高亲和力抗体的B细胞克隆。这种突变主要发生在抗体的CDR区域上，因为这些CDR区域通常都是与抗原相接触的位置。这种突变方式既能够保证抗体能够最大限度地改变其结合能力，同时又不会对抗体的基本框架结构（framework regions, FWR，这些基础结构是一种保守的结构，能够作为抗体结合位点的基础和支撑）带来太大的改动。生发中心里的B细胞最容易突变并表达高亲和力的抗体，因为在这里能够接触到大量的抗原，这些抗原经过处理并被呈递给滤泡T辅助细胞之后可以提供主动选择信号。这种选择机制的作用就是确保筛选出高亲和力的抗体。抗体亲和力与抗体的“开”、“关”速度直接相关。如果“开”的速度越快，“关”的速度越慢，那么抗体的亲和力就越高。可是由于“开”的速度受到弥散作用的限制，“关”的速度受到抗原内化作用（antigen internalization）的限制，所以亲和选择作用也有一定的限度。一旦抗原进入了细胞并且开始降解，“关”的速度就不再对亲和选择产生影响了。因此任何“关”的速度比抗原内化作用更慢的B细胞在面对亲和选择时其实都是一样的，彼此之间没有差异。如果亲和选择达到了上限，再多的体细胞突变也没有意义了，此时B细胞就会离开生发中心，并且演变为浆细胞或者记忆B细胞。人体内，这种亲和上限（affinity ceiling）通常表现为在 V_H 基因上发生10至15次核苷酸突变。因此高亲和力的抗HIV-1抗体应该不太可能是一轮亲和选择的结果，可能是在致病原持续的刺激之下，经过了多次选择才形成这种高亲和力的抗体，如图2所示。

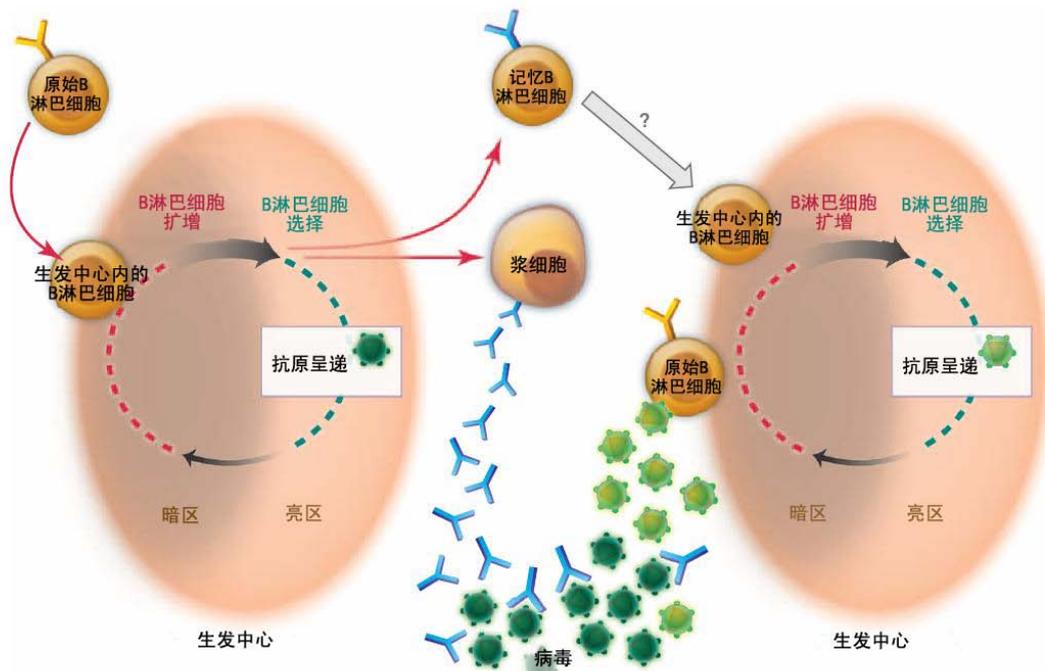


图2 HIV-1病毒胞膜特异性B细胞反应机制模拟图。抗原与T细胞相互作用之后筛选出原始B淋巴细胞，并且被招募至生发中心。在生发中心的暗区里，B细胞继续增殖并且表达脱氨基酶（deaminase），进而发生体细胞突变。这种细胞继续增殖，并且分化为不同的B细胞克隆，这些B细胞克隆迁移到生发中心的亮区里，与此处滤泡树突状细胞表面呈递的抗原接触。能够捕获抗原，并且将抗原呈递给T细胞的高亲和力抗原结合B细胞被筛选出来，重新返回暗区继续增殖并且分化成为记忆B细胞或浆细胞。这些浆细胞能够分泌高亲和力的胞膜结合抗体，这些抗体对病毒构成了选择压力，但是病毒本身也在不断地发生变异。能够被抗体识别的病毒胞膜抗原再一次被呈递给原始B淋巴细胞或记忆B淋巴细胞，再一次启动克隆选择和体细胞突变过程。

bNAbs抗体是一种高度变异的抗体，其中还会包括插入突变和缺失突变，这些突变在其它抗体中可不常见。研究发现，如果让这些bNAbs抗体的编码基因恢复到未突变之前的状态，就会丧失中和活性，甚至无法与大部分HIV-1病毒胞膜蛋白结合，这就出现了一个问题，表达这些“无用”抗体的B细胞是如何参与生发中心反应的。有一种可能就是表达这些抗体的B细胞最初会受到非HIV-1病毒抗原的刺激，然后在偶然的情况下因为突变而产生了抗HIV-1病毒的抗体。另外一种可能则是只有一部分HIV-1病毒胞膜刺突蛋白能够激活原始B细胞，但是这些原始的B细胞即便没有发生突变也能够表达对应的抗体，与HIV-1病毒胞膜刺突蛋白发生免疫反应。有一些SHIV病毒就可以刺激机体产生bNAbs抗体，可是另外一

部分病毒却不行，这也在一定程度上肯定了上面第二种假说。前瞻性试验也发现，有一个感染了HIV-1病毒的感染者体内也出现了针对CD4b的广谱中和抗体。

有人对bNAbs抗体中大量存在的体细胞突变进行了分析和研究，以期了解位于抗体FWR区域里的突变都具有哪些作用。研究发现，bNAbs抗体与包括能够与HIV-1反应的抗体（不过这种抗体的中和能力有限）在内的其它抗体所不同的是，FWR突变对于bNAbs抗体至关重要。与绝大部分抗体都不一样，bNAbs抗体FWR区域里的突变有助于提高bNAbs抗体的中和能力与广谱识别能力，因为这些突变能够改变抗体的柔韧性，增强抗体直接与抗原接触、结合的能力。这一点至关重要，因为IgV基因已经进化成FWR编码区域里不太容易发

生体细胞突变的基因。另外，这些突变通常都不会被筛选出来，因为发生了这类突变的抗体一般都不太稳定。正因为FWR突变如此重要，所以抗体编码基因才需要发生那么多的突变，只有这样才有可能产生所需要的bNAbs抗体。

部分但不是全部bNAbs抗体还拥有另外一个共同的特征，那就是它们全都拥有一个长长的CDRH3链，抗体可以借助这个结构穿透HIV-1病毒表面的葡聚糖“盔甲”。比如能够识别碳水化合物(carbohydrate)和V1/V2复合物的PG9、PG16或者PG145抗体都含有一个长长的CDRH3结构。此外，在能够识别V3环基底部由碳水化合物与蛋白质组成的复杂抗原决定簇的抗体，以及某些针对CD4结合位点的抗体和10E8等针对MPER的抗体中也发现了这种CDRH3结构。

最后需要介绍的是，这种特异性识别HIV-1病毒的记忆B细胞产生的抗体克隆往往都是多反应抗体(polyreactive)。这种多反应性指的是抗体能够与多种不同的抗原结合，但是亲和力都非常低。虽然在人类的抗体系统里，多反应性是一种非常普遍的现象，算得上是人类免疫系统的一大特征，但是在B细胞的发育过程中我们的身体往往都会有选择地去掉这些抗体。不过由于体细胞的突变和选择作用，在生发中心里的抗体多反应性会有所增加，大约有23%的记忆B细胞会产生这种抗体。分泌特异性识别HIV-1胞膜刺突蛋白抗体的记忆B淋巴细胞比较少见，其中大约有70%的抗体是多反应抗体。在B细胞的发育成熟过程中有两个阶段可以实现这种正向选择作用。表达多反应抗HIV-1受体抗体的成熟B细胞更

容易被招募到生发中心进行反应，即便是体细胞突变和亲和力成熟作用往往也不会破坏这种特性。另外，在生发中心的非多反应性的B细胞和正在成熟的B细胞中也都可以选择出多反应B细胞。

科学家们现在还不知道为什么HIV-1抗体是多反应抗体，有一种解释认为这种多反应能力能够增加抗体的原子价(valency)，所以能提高抗体的亲和力。据估计，在一个HIV-1病毒的胞膜表面大约只有15个左右有功能的刺突蛋白，因此这些抗体必须与每一个刺突蛋白结合，除非它能够与同一个三聚体上的两个单体结合。理论上说，多反应性能够发挥异形结合能力(heterotypic binding)，因为这种抗体既能够以一个Fab链识别刺突蛋白，又能够借助多反应性与其它配体结合。这种所谓的多种配体(heteroligation)策略可能就是2F5和4E10抗体(这两种抗体都能够与gp41和病毒胞膜结合)以及21c抗体(这种抗体能够与gp120和CD4结合)的作用机制。

尽管所有的抗HIV-1胞膜抗体几乎都具有多反应性，但是绝大部分新型bNAbs抗体却没有太大的多反应性或自我反应性。中和作用不太强的第一代bNAbs抗体，比如与gp41蛋白MPER区域结合的2F5和4E10抗体，NIH45-46、CH103、CH104、CH106d等针对CD4b的抗体，以及CH01至CH04等针对V1/V2环的抗体是个例外。

综上所述，较低的多反应性是我们人类抗体系统的一大特征，这也被抗HIV-1抗体所利用，用来提高其亲和力和结合价。但我们不应该把这一点当做我们开发HIV-1疫苗的障碍。

3. 开发HIV-1疫苗的新方法

虽然用猕猴和小鼠进行的被动免疫试验都表明，只要疫苗能够刺激机体产生强大的bNAbs抗体，那就能够产生足够的免疫保护

力，但是迄今为止我们也没在人体实验中验证过这一假设。了解人体抗HIV-1抗体免疫反应的本质能够帮助我们找到问题的根本，也可以

为今后的疫苗设计工作提供一些有价值的线索。

由于bNAbs抗体有着不同寻常的结构特点，所以我们也不应该用开发传统疫苗的思路和方法去开发HIV-1疫苗。有一种有可能会成功的方法是模拟天然bNAbs抗体的诞生之路，重复自然感染进程，用取自这些产生了bNAbs抗体的感染者体内的病毒胞膜蛋白做疫苗。这种策略的关键在于要充分地了解病毒与抗体的共进化历程，只有这样才能得到广谱的、强效的中和抗体。到目前为止只有一项相关的研究有过发表。该课题的研究人员使用单细胞抗体克隆技术从一名表达bNAbs抗体的非洲志愿者体

内分离得到了抗体CH103以及原始HIV-1病毒和后面几种突变了的HIV-1病毒。对这些病毒和抗体进行测序分析发现了大量的病毒抗原决定簇变异和抗体体细胞突变，该抗体在IC₅₀为4.54 μg/ml的浓度下可以对55%的HIV-1毒株进行中和。更重要的是，虽然CH103抗体的前体分子并不能与各种各样的病毒胞膜刺突蛋白结合，但是它却可以与最原始的病毒结合。所以其它胞膜蛋白不太可能会刺激机体产生CH103抗体。如果用序贯免疫的方法来模拟HIV-1病毒在人体内的演变历程，应该有可能刺激机体B细胞产生bNAbs抗体，如图3所示。

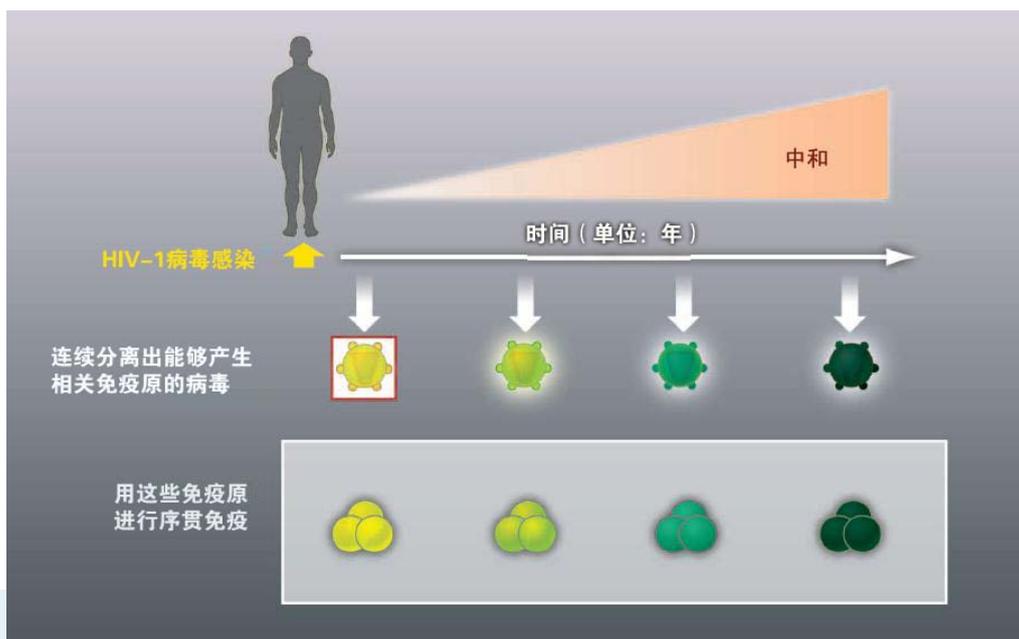


图3 对天然产生bNAbs抗体的HIV-1病毒感染者进行研究，了解病毒及其相关抗体共进化的关系，这有助于开发成功的HIV-1病毒疫苗。有人对HIV-1病毒感染者进行过长期的观察研究，时间跨度覆盖了从最开始感染直到最终产生bNAbs抗体整个过程。HIV-1病毒表面胞膜蛋白的进化促使抗体反应也随之发生了改变。分离出各个阶段的病毒，从最初的病毒（图中红色方框所示）直至最后的病毒（即从浅绿色到深绿色），并对它们进行序贯式分析，能够为科学家们提供非常重要的信息，并了解能够刺激机体产生广谱中和抗体的抗原的变异过程。如果我们能够模拟这样一个抗原渐变的过程，那么就有可能开发出成功的HIV-1疫苗，刺激人体产生bNAbs抗体。

还有一种方法就是设计一种能够特异性活化B细胞的免疫原，不过这种B细胞必须是表达bNAbs抗体前体分子的B淋巴细胞。比如就有人综合计算机选择技术和遗传筛选技术设

计过一种抗原，这种抗原能够激活体外培养的B细胞，这种B细胞就可以表达V_H1-2种系前体抗体分子，该前体分子就是最有效的抗CD4b抗体的前体。不过单靠这些免疫原还不足以刺

激机体产生bNAb抗体，但是这些免疫原却足以刺激能够表达这些抗体的B细胞克隆不断增殖，这可以作为复杂免疫工程里的第一步。

在开发HIV-1疫苗的工作中有一个很大的障碍，那就是大型动物模型，因为这种动物实验通量太低，所以不适合用来开展遗传学实验。所以必须开发出小型动物模型，只有这样才能加快实验速度，才能够让我们更快认识抗HIV-1免疫反应的具体作用机制。

3.1 抗HIV-1免疫疗法

Kitasato和von Behring早在一个多世纪以前就首先使用血清抗体治疗破伤风（tetanus）和白喉（diphtheria）感染。直至今日，血清疗法还被广泛应用于治疗蛇咬伤和蜘蛛咬伤，也被用于被恶狗咬伤之后狂犬病预防。美国食品与药品监督管理局（FDA）已经批准了30多种单克隆抗体类药物，这些药物可以被用来治疗肿瘤、自身免疫病和多种感染性疾病。虽然抗体疗法已经取得了如此多的成就，但是学界通常都认为抗体疗法对治疗HIV-1病毒感染不会有太大的帮助，因为HIV-1病毒的变异速度太快了，而且已经有人进行过这方面的尝试，对人源化的小鼠（humanized mice）和人进行过试验，可最后还是以失败告终。

有人尝试使用b12、2G12和2F5抗体组合方案来治疗感染了HIV-1_{JR-CSF}病毒或HIV-1_{SF162}病毒的人源化小鼠。虽然治疗之后动物体内的病毒载量有过短暂的下降，但是在5至12天之后，病毒水平还是恢复到了基线以上。所以研究者们得出结论，即便是bNAb鸡尾酒疗法也不足以控制HIV-1病毒血症。

也有人用2G12、2F5和4E10抗体组成的鸡尾酒配方治疗过HIV-1病毒感染者，其中有8人是慢性感染者，6人是急性感染者。他们全都接受过抗逆转录病毒治疗（antiretroviral therapy, ART），而且治疗的效果非常好，他们体内的病毒基本已经检测不到了。然后对他们进行了病毒感染试验，不过选择的毒株是在

体外实验中已经证实的对上述三种抗体中至少有两种抗体都非常敏感的毒株。整个抗体鸡尾酒疗法的疗程共计约11周，在开始鸡尾酒治疗一天之后立即停用ART药物。结果让人非常失望，在8名慢性感染者中有6人的治疗是彻底失败的，只有两人的病毒血症被抑制了。另外6名急性感染者的治疗结果更难判断，因为没有设置对照组，不过其中还是有一人的病情得到了控制。需要提醒大家注意的是，2G12抗体是其中唯一促使病毒发生变异逃避的抗体，这说明如果单独使用该抗体，只会对病毒起到选择压力的正向促进作用。另外一个使用了同一种鸡尾酒配方的独立试验也得到了同样的结果，该实验在ART治疗之后进行了为期12周的免疫治疗，一共招募了10名感染者，他们都是急性感染或者初期感染者，其中两人的病情在整个治疗过程当中都得到了很好的控制。不过和前面那个实验一样，也出现了对2G12抗体抵抗的新毒株。这两个实验表明，如果说免疫治疗有效，那么很有可能是其中的某一种抗体在发挥功效，不过这种抗体的活性要比最近新发现的强效bNAb抗体差很多。

小鼠实验和人体试验的结果都证实，抗体不足以有效的控制HIV-1病毒的感染，因为病毒会快速变异成耐药株。

最近新发现的强力bNAb抗体又让我们重新看到了希望，所以有人又开始用人源化小鼠实验来评估这些抗体的治疗效果。这些实验小鼠都是具有免疫缺陷，同时又嵌合了人造血干细胞的小鼠。用HIV-1_{YU2}病毒（这是一种嗜CCR5病毒，很难被抗体中和）感染这些实验小鼠，构建出了动物模型。感染100多天之后，小鼠体内的CD4 T细胞与CD8 T细胞的比例有了明显的下降，同时病毒也有了大量的变异，出现了很多种不同的病毒株。这些小鼠都不足以产生明显的T细胞免疫反应和B细胞免疫反应。最开始检测到的抗体是抗CD4结合位点的45-46^{G54W}抗体，抗N332葡聚糖依赖位点的10-1074和PGT128抗体，抗N160葡聚糖依赖位点的PG16抗体和所识别抗原决定簇尚

不明确的3BC176抗体。虽然这几种抗体在体外实验中都对HIV-1_{YU2}病毒表现出了非常强的结合活性，但是如果单独使用这些抗体进行治疗，都只能暂时控制病毒血症，而且很快就会出现耐药的突变株。不过这些突变株只是在抗体识别位点上发生了少数几个突变，这说明如果使用鸡尾酒配方应该会取得比较不错的疗效。另外，由于这些抗体的半衰期都比较长，所以在停止用药之后疗效还可以维持大约60天左右，具体的时间与抗体治疗疗程的长短，以及使用的抗体剂量正相关。有部分动物即便在体内的抗体滴度降到治疗剂量之下，也还是能够很好地控制病毒复制水平。由此可以看出，免疫治疗和ART疗法有所差异，停药之后，半衰期更长的抗体所能够维持的疗效也更持久。另外，抗体可以在病毒复制周期的多个不同阶段发挥作用，而ART疗法则只能干扰逆转录过程、整合过程、蛋白酶水解过程和病毒侵入细胞的过程，阻止发生新一轮的感染。虽然抗体抑制病毒感染的具体机制还不明确，但是可能与抗体介导的病毒衰退速度增加有关，也可能与ADCC的杀伤作用有关，还可能是因为干扰了CD4结合位点，从而阻止了病毒在细胞之间的传播等。ART疗法和抗体免疫疗法能否互补，或者能否产生叠加效应，这个问题还值得我们更进一步研究。

对人源化小鼠进行的抗HIV-1病毒免疫治疗试验告诉我们，抗体能够有效抑制病毒感

染，同时也提出了另外几个非常重要的问题。比如我们能否用疫苗刺激机体产生bNAb抗体，并让这些抗体与ART药物一起发挥治疗作用？能否只使用免疫疗法来达到长期控制病情的目的，而不再需要每天服用ART药物？在其它疾病的预防工作中被用来当做疫苗预防感染的腺相关病毒等载体能否用于HIV-1治疗，从而达到一次治疗获得长期疗效的目的？能否将免疫治疗当做一种根治的手段？免疫治疗会影响HIV-1病毒的传播吗？

为了更充分认识小鼠实验的结果，我们首先就需要确定该实验结果能否在其它灵长类动物实验中得到重复。感染了SHIV病毒的猕猴就是一个不错的选择，与小鼠动物模型相比，该动物模型的病毒载量更高，而且病毒的异质化程度也更高，另外病情也与人感染HIV-1病毒后比较相似，都是慢性感染，而且最终都会导致免疫缺陷。而且猕猴也与人类一样有适应性免疫系统和完整的效应细胞体系，这些都是小鼠所不具备的优势。这套免疫系统虽然不能够彻底清除HIV-1病毒，但是的确能够对病毒载量起到一定的控制作用。我们推测，适应性免疫系统和完整的免疫系统能够促进抗体免疫疗法发挥更好的治疗功效。猕猴试验应该能够重复小鼠试验的良好结果，多次的小鼠和猕猴试验也会帮助科研人员开发出更新、效果更好的免疫治疗策略（图4）。

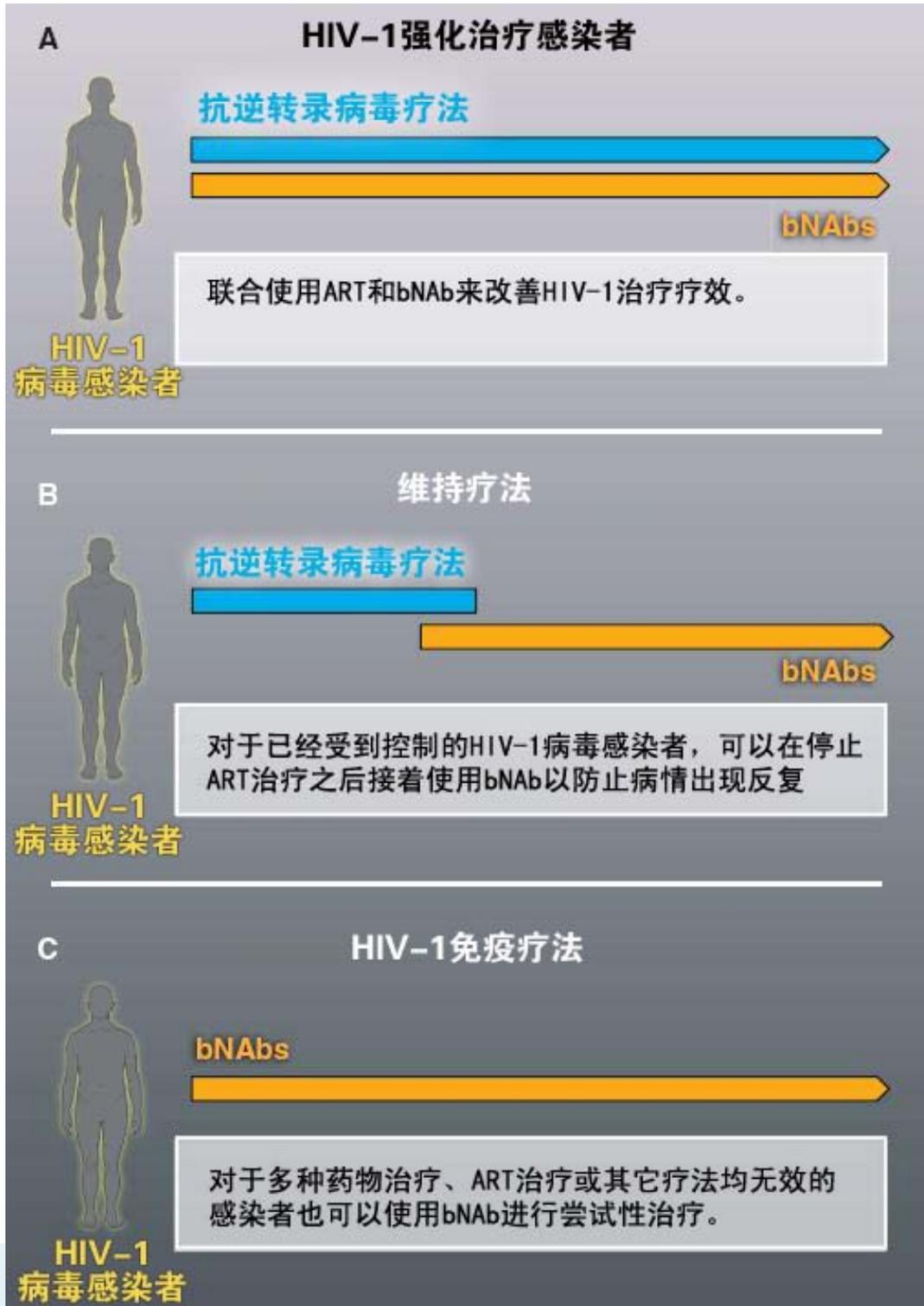


图4 bNAb在抗HIV-1治疗工作中的几种可能用途。在临床实验中多以下面几种方案进行评价。(A) ART与bNAb联用有可能会起到意想不到的治疗效果。(B) 在停止ART治疗之后接着使用bNAb抗体可以防止病情复发。不过为了防止出现漏网之鱼，所以在使用bNAb之前应该尽可能地用药物抑制病毒的复制，将体内的病毒载量尽可能降到最低限度。(C) 单独使用bNAb抗体也许是一种选择，尤其是在不能耐受ART治疗，或者用ART治疗失败的情况下。

猕猴试验应该先于人体试验，但是猕猴试验的结果也不能全信，因为感染SHIV的猕猴在几个重要的方面还是与感染HIV-1病毒的人类有所不同。抗体能否用来控制病毒感染人体，作用机制是什么等问题最终还是只能在人

体临床实验中加以验证和解决。

综上所述，近4年来，抗体克隆技术给HIV-1病毒免疫治疗和HIV-1疫苗开发工作带来了天翻地覆的变化。接下来我们就能够看到这些改变是否能够给临床带来新的气象。



百态 · 频道

www.LifeOmics.com

特约编辑招聘启事

为了及时收集生命科学最新资讯、提高《生命奥秘》办刊质量，现面向从事生命科学或对这学科有浓厚兴趣的科研人员、学生诚聘特约编辑（兼职）。

职位职责：

独立完成《生命奥秘》专题的策划：对基因组学、蛋白组学、生物信息学和细胞生物学等学科的发展以及生物医学领域相关技术（例如基因诊断技术、干细胞和克隆技术、生物芯片技术等）的应用进行翻译及深入评述。

选题要求内容新颖、评述精辟、注重时效和深入浅出。尤其欢迎以自身系统研究为基础的高水平译述与评论，结合所从事的科研工作提出自己的见解、今后设想或前瞻性展望。

要求：

- 1.具备基因组学、蛋白组学、生物信息学、细胞生物学等生命科学学科背景；
- 2.具备良好的生命科学前沿触觉；
- 3.具备较高的外文文献翻译、编译水平；
- 4.具备较强的选题策划、资料搜集、组织能力，以及专业稿件撰写能力；
- 5.具有高级职称；或者拥有（正在攻读）该领域的最高学位。

有意者请将个人简历发送至 editor@lifeomics.com

三、记忆B细胞在起源、转归和功能等方面的差异

免疫记忆是包括长寿命浆细胞（plasma cell）和记忆B淋巴细胞（memory B cell）在内的、一次成功免疫反应之后的遗留产物。很明显，人体内存在多种不同的记忆B淋巴细胞，这些细胞的分布位置、所分泌免疫球蛋白的种类以及在生发中心（germinal center）里的成熟历程都是各不相同的。其中有一些差异是由于抗原的不同而导致的，有一些则是因为记忆形成机制的不同所导致的。下文将介绍记忆B细胞的形成以及在表型方面的差异，以及这些差异与各种不同功能之间的关系。了解记忆细胞形成的机制有助于我们开发出效果更好、功能更具针对性的疫苗产品。

成功的免疫接种其实依赖的就是免疫记忆机制。一般来说，病原体及其产物都能够引发免疫反应，这些机体免疫反应就能够杀死、清除，或者中和这些外来的入侵者。虽然这种免疫反应在很多时候都能够有效地完成任务，消灭外来的入侵病原体，但是在完成了这项任务之后，免疫反应还会继续发挥作用，这主要依靠两条关键的途径。第一条途径是抗体，在感染发生数月，乃至数年之后，人体都可以继续产生足够数量的抗体，提供免疫保护。第二条途径就是病原体特异性的淋巴细胞（pathogen-specific lymphocyte），这种细胞会终身存在，一直在人体内循环，一旦再次遭遇同样的抗原就会立即活化，产生大量的抗体消灭入侵者。不过记忆反应启动之后产生的抗体与第一次产生的抗体会在以下这几个方面有所不同。比如分泌抗体的种类或型别通常都会有所转换，不会再是IgM抗体（该抗体只会在初次免疫反应的初期发挥作用），而且再次产生抗体的速度要比之前迅速得多，抗体对病原体的亲和力也要高得多，往往会高出好几个数量级。因此所谓的免疫记忆具有两个方面的含义，其一在于抗体能够持续表达，其二在于能够相互协作、快速活化之后分泌大量保护性抗体、并重现初次免疫保护反应的B细胞和T

细胞反应。

这种可以发生抗体型别转换、分泌高亲和力抗体的记忆B细胞往往与T细胞依赖的（T cell-dependent, TD）抗体反应相关，也就是说，这些B细胞需要T淋巴细胞的辅助（图1）。快速形成抗体分泌细胞（antibody-secreting cell, ASC）、抗体型别转换以及形成生发中心（germinal center, GC）结构都是TD反应的特征。生发中心就是免疫器官内促使识别抗原的B细胞受体（B cell receptor, BCR）成熟，形成记忆B细胞和长寿命浆细胞（long lived plasma cell, LLPC）的场所。不过这种以生发中心为核心的B记忆细胞形成机制却不足以解释我们为什么观察到的免疫机制会如此复杂。比如，有一种针对不依赖T细胞抗原（T cell-independent antigen）的B细胞记忆是不需要生发中心就能够形成的。再比如，针对依赖T细胞的抗原，也存在一种不会发生型别转换的记忆B细胞。这种细胞不发生可变基因（variable gene）体细胞超变（somatic hypermutation, SHM），也能够在不需要生发中心的情况下形成。此外针对同一个抗原，记忆B细胞与LLPC细胞的BCR在识别特异性的广度方面也存在差异，B细胞的广度要更宽。不同种类的记忆B细胞之间在功能

上也存在差异，有的细胞寿命比较长，有的细胞反应速度比较快。如果上述都不是特例，而是普遍规律，那么了解记忆B细胞的免疫反应

机制就有极大的意义。这些信息将会彻底改变疫苗的开发策略，影响抗原选择和接种方法，以便获得最大的免疫保护效果。

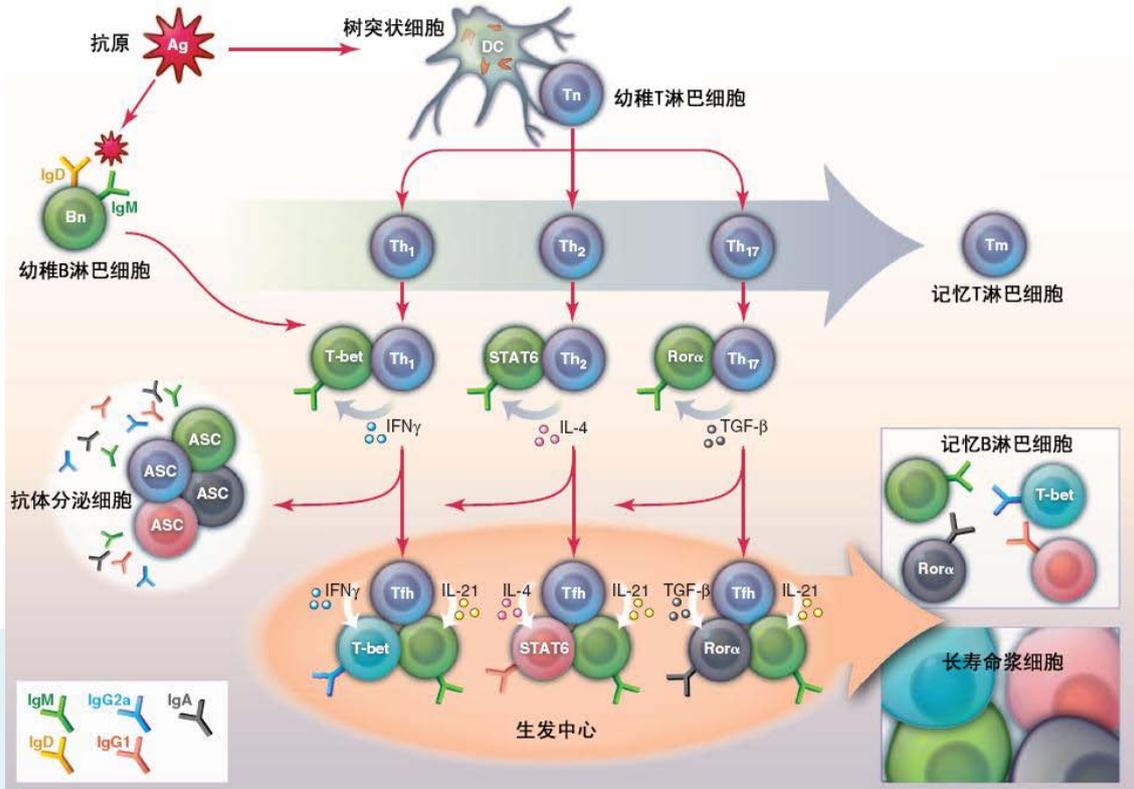


图1 初次抗体反应。人体TD抗原发生体液反应时，幼稚B淋巴细胞（Bn）主要表达IgM和IgD抗体，同时幼稚T淋巴细胞（Tn）也会直接被抗原激活，或者在抗原经过树突状细胞处理之后被激活。这些活化的T细胞会演变为多种辅助T细胞（ T_H ），每一种辅助T细胞都有一种独特的细胞因子表达特征。不需要与B细胞发生相互作用，T细胞活化之后也能演变为记忆T细胞Tm。上图介绍了经典的 T_H 1细胞（该细胞主要在T-bet的调控下分泌 γ 干扰素）、 T_H 2细胞（该细胞主要在GATA3的调控下分泌白介素4）和 T_H 17细胞（该细胞主要在Ror α 的调控下分泌 β 肿瘤坏死因子）。B细胞在T细胞信号因子的诱导下会进一步增殖，发生抗体类型转换重组（class-switch recombination, CSR），分化形成抗体分泌细胞，也会形成型别转换的抗体分泌细胞。B细胞的CSR作用主要受到 T_H 细胞分泌的细胞因子和受这些细胞因子诱导的转录因子来调控。图中展示的就是诱导形成的T-bet的 γ 干扰素可帮助小鼠B细胞完成CSR作用，产生IgG2；诱导产生STAT6的白介素4往往能够促使IgG1和IgE的形成；诱导产生Rora的 β 肿瘤坏死因子则是形成IgA所必须的。活化的B细胞和 T_H 细胞可能也会上调转录因子Bcl-6的表达水平，形成一个生发中心，完成可变基因突变和B细胞选择，提高抗体对抗原的亲合力。生发中心里的 T_H 细胞也被称作 T_{FH} 细胞，这些细胞与初期的 T_H 细胞有所不同，它们除了能够表达 T_H 细胞分泌的细胞因子之外，还能够表达白介素21因子。在生发中心里能够形成亲和力成熟的LLPC细胞和记忆B淋巴细胞，这些细胞表达的抗体的型别就可以反映出是哪些 T_H 细胞发挥了作用。目前看来，已经转换的记忆B细胞能否持续存在取决于是否能够持续表达T-bet（对于IgG2）或Rora（对于IgA）这些必需的转录因子。因此，专门用来清除不同病原体的各种不同的抗体都是由最初树突状细胞和T细胞之间的相互作用所决定的。人体对于疾病的应答会诱导产生多种细胞因子，从而产生决定系统的并发症，例如在流感中，然而这些细胞因子是否独立作用，或者彼此之间存在竞争，抑或是定位于特定的组织，现在还不得而知。

1. 记忆B细胞形成机制

1.1 经典的生发中心记忆B细胞形成机制

B细胞在依赖T细胞的抗原的刺激下会发生分化（differentiation），经典的理论认为，主要有两条途径完成这一反应。如图1所示，第一条途径能够快速形成抗体分泌细胞，第二条途径则会形成生发中心，然后再生成记忆B细胞。科学家们现在还不清楚B细胞为什么会出现这种两极分化的局面。虽然已经发现了高亲和力的BCR受体和早期出现的抗体分泌细胞，但是它们可能并不是被诱导分化而形成的，可能只是既往选择的增殖和扩大的结果。抗原的种类反而可能是一个比较重要的分化调控信号，因为有一些免疫接种策略就能够在不需要生发中心的情况下生成抗体分泌细胞结节（ASC foci）。比如利用靶向系统（targeting system）给边缘区相关树突状细胞（marginal zone-associated dendritic cell）定向输送抗原就能够在不需要生发中心或者记忆B细胞的情况下生成结节外抗体分泌细胞（extrafollicular ASC），除非有Toll样受体（Toll-like receptor, TLR）7或9存在。尽管这反映了TLR激动剂能够促进生发中心形成，但同时也展现了抗原在B细胞早期分化过程中的重要地位。

这些位于二级淋巴器官（secondary lymphoid organ, SLO）B细胞滤泡（B cell follicle）外的抗体分泌细胞结节最开始主要分泌IgM抗体，之后才会发生型别转换，分泌其它种类的抗体。很少有证据证明在这些细胞里发生了可变基因体细胞超变，或者对抗原的亲合力有所增强。相反，这些抗体分泌细胞往往都会在数天内凋亡。因此，这些早期出现的抗体分泌细胞主要负责在第一时间分泌系编码抗体（germline encoded antibody）来应对外来致病原。该免疫反应是一种非常重要的免疫保护机制，但是对帮助形成记忆B淋巴细胞的意义则不算太大。

接种之后数天之内，在二级淋巴器官的B细胞滤泡里就能形成生发中心，根据抗原的差异，这些生发中心可以持续存在数周甚至是好几个月。其中大部分都是B细胞，也会有少数非常重要的滤泡树突状细胞（follicular dendritic cell, FDC）和CD4辅助T细胞，该细胞也被称作滤泡辅助T细胞 T_{FH} 。滤泡树突状细胞和源自血管周围前体细胞（perivascular precursor cell）的非造血细胞（nonhematopoietic cell）都是专门通过补体或抗体Fc段与免疫复合物结合的方式将抗原固定在细胞表面，同时也能够给生发中心里的B细胞提供生长信号。 T_{FH} 细胞则源自另外一条分化途径，这需要转录因子Bcl6，还需要与特定的抗原发生相互作用，以及旁观B细胞（bystander B cell）。 T_{FH} 细胞就是专门为生发中心里的各种反应服务的，它可以表达多种因子，这些因子能调控B细胞的增殖与分化，还可以表达活化诱导的胞嘧啶核苷脱氨酶（activation-induced cytidine deaminase, AID），借助SHM作用可以促使抗体可变区变异、多样化。不过本文并不关注 T_{FH} 细胞的分化和特性，这些内容会在其它文章中进行详细介绍。

到目前为止，生发中心是唯一一个被证实能够通过SHM作用促使BCR可变基因变异，同时还能够选择出高亲合力抗体，并且使其大量增殖的结构。可变基因多次突变，以及对B细胞的不断选择，这就是抗体亲合力不断成熟的过程。生发中心里表达高亲合力抗体的B细胞克隆会优先增殖，这种现象似乎是由 T_{FH} 细胞所分泌的各种因子与 T_{FH} 细胞互相竞争的结果决定的。有人认为高亲合力BCR会提高生发中心里各种B细胞对抗原的捕获能力，这样就能够加强 T_{FH} 细胞的作用，进而分泌促增殖和分化信号，让表达高亲合力抗体的B细胞克隆大量增殖，成为优势群体。因为

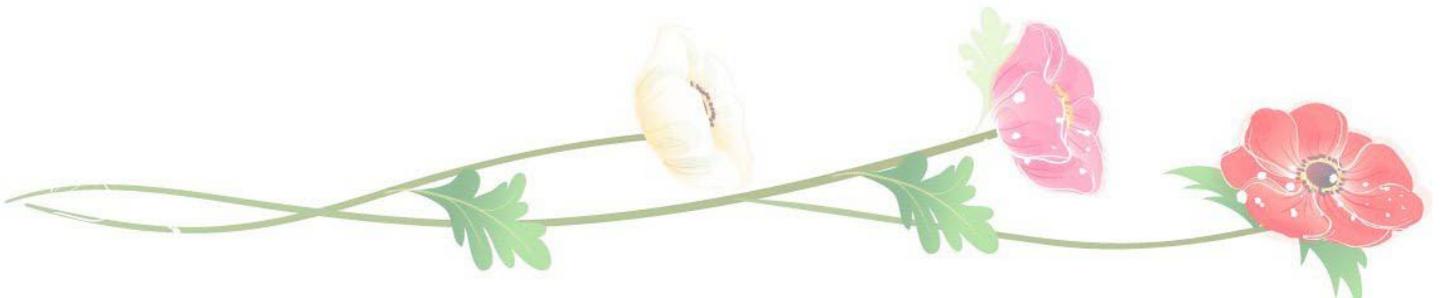
很明显，单单让B细胞存活下来还不足以达成亲和力成熟的目的。不论亲和力成熟的记忆B细胞和LLPC细胞是受到哪种抗原刺激而产生的，它们都需要在 T_{FH} 细胞的帮助下移出生发中心。不过更确切地说，对B细胞亲和力的选择似乎没有对LLPC细胞亲和力的选择那么严格，这可能反映出这些分化事件在一开始就是由不同的机制所决定的。由于一个B细胞克隆继续增殖也可以形成抗体分泌细胞灶和生发中心，所以也有人认为可能是某些“路过者”赋予了B细胞长寿命或回忆敏感性等记忆的特性。因此如果认为SHM作用和亲和力成熟作用是记忆B细胞的特征，那么生发中心就是记忆B细胞和长寿命浆细胞的诞生地。不过现在已经非常确定，除了生发中心之外，还有很多途径可以生成记忆B细胞。

1.2 不依赖生发中心的记忆B细胞形成机制

正式证明可以不依赖生发中心生成记忆B细胞的试验是近年来记忆B细胞研究领域里的重大发现之一。小鼠的B细胞由于不能表达转录因子Bcl6，所以不能生成生发中心，也不能在骨髓里生成抗原特异性的LLPC细胞。不过这些B细胞却能够在完全缺少可变基因SHM的情况下完成型别转换和亲和力成熟，生成记忆B淋巴细胞。不能表达Bcl6的记忆B淋巴细胞从细胞表面表型（surface phenotype）、转归（turnover）、回忆行为（recall behavior）等方面都不能与可以表达Bcl6的记忆B淋巴细胞区别开来，只是在可变基因和基因表达谱方面有所差异，这说明生发中心并不

是记忆B淋巴细胞获得记忆的必要条件。正如前面提到的那样，Bcl6因子也是 T_{FH} 细胞发育所必需的，而 T_{FH} 细胞也是形成生发中心必需的细胞之一。可是 T_{FH} 细胞的形成却并不是那些不依赖生发中心（GC-independent, GCi）的记忆B细胞所必需的。

那么这些不依赖生发中心的记忆B细胞是在哪里对TD抗原发生免疫反应的呢？正如前文提到的，在生发中心形成之前发生的早期B细胞反应似乎就是不依赖生发中心的记忆B细胞出现的时期。对于一个有效的免疫反应而言，活化的B细胞必须与活化的、针对同一抗原的CD4 T淋巴细胞发生相互作用。在二级淋巴器官里，活化的B细胞与T细胞会改变重要细胞因子受体，比如B细胞上的CCR7受体，T细胞也会改变CXCR5受体，通过这种方式沿着B细胞区与T细胞区的交界处重新定位，完成相互作用。如图2所示，T细胞和B细胞之间长期的相互作用致使B细胞迁移至滤泡外和滤泡间。活化的T细胞，而不是 T_{FH} 细胞会伴随B细胞一起，继续进行相互作用，促使B细胞不断增殖，可能也会使B细胞分化。有一些增殖的B细胞会上调Bcl6因子的表达量，这会促使B细胞迁移至滤泡里的滤泡树突状细胞处，与 T_{FH} 细胞会合，形成生发中心（图2）。还滞留在滤泡外层的B细胞中有一部分会迁移到滤泡外，形成抗体分泌细胞灶，另外一些则会继续发育，成为不依赖生发中心的记忆B淋巴细胞（图2）。这条路径也符合不依赖Bcl6因子，或者在Bcl6因子刚开始表达时出现不需要生发中心的记忆B细胞的事实。



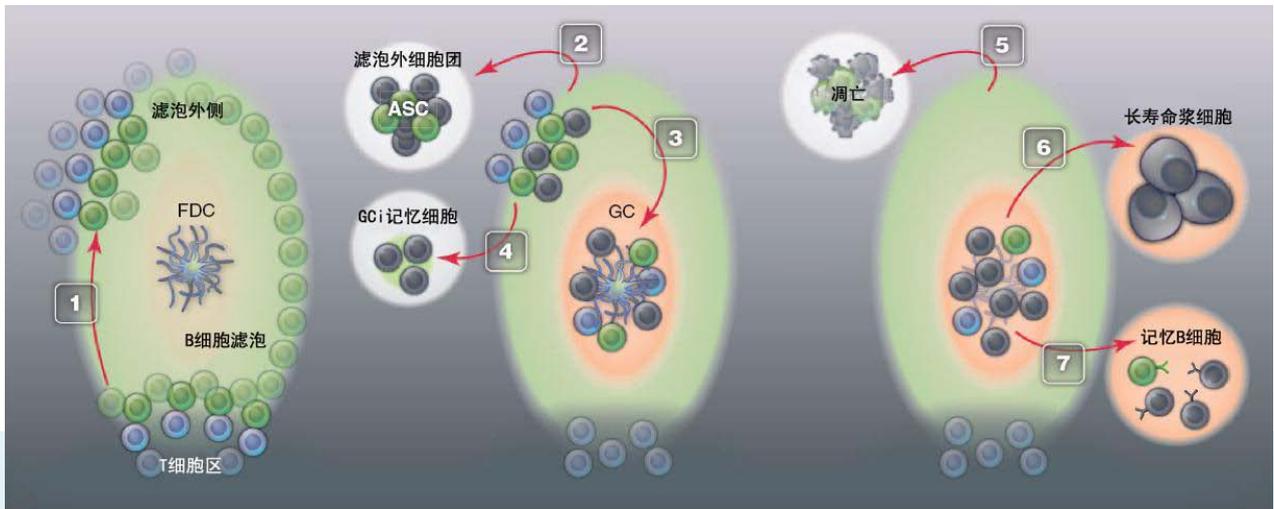


图2 记忆细胞形成机制。在二级淋巴器官里，抗原激活的B细胞和T细胞排列在B细胞滤泡与T细胞区的交界处，互相之间建立稳定的相互作用关系，保证B细胞能够持续地接受T细胞传来的各种信号。（1）活化的B细胞和T细胞会迁移到滤泡外，然后B细胞继续增殖，并且在细胞因子的作用下完成抗体型别转换重组（class-switch recombination, CSR），如图中黑色细胞所示。在这些B细胞中，有一部分会分化成抗体分泌细胞，形成滤泡外细胞团。（2）还有一部分B细胞会返回滤泡内，与滤泡树突状细胞接触，并在 T_{FH} 细胞的辅助下形成生发中心。（3）随着免疫反应的不断进行，滤泡里的部分抗体分泌细胞会出现凋亡（5），生发中心里继续生成传统的、亲和力已经成熟、并且完成了型别转换的长寿命浆细胞（6）和记忆B细胞（7）。我们推测不依赖生发中心的记忆B细胞源自滤泡外，可能包括CSR细胞和IgM细胞，这些细胞可以反映在免疫反应初始阶段被活化的B细胞的组成情况。

虽然很难证明，可由于不依赖生发中心和依赖生发中心的记忆B细胞非常相似，所以这些不依赖生发中心的记忆B细胞也是正常免疫反应的一个组成部分。首先，在依赖T细胞免疫反应的早期，循环的、型别转换过的、抗原特异性的B细胞已经具有了记忆特征，但是由于这些B细胞的可变基因不能完成SHM，所以这些细胞不是在生发中心里形成的。其次，这些活化的B细胞在生发中心细胞形成前，就经过过继性转移（adoptive transfer）生成了记忆B细胞。第三，在未经人工处理过的小鼠体内的型别转换过的记忆B细胞中非常容易发现未突变的可变基因序列。第四，在免疫之后立即用抗体抑制T细胞与B细胞之间的相互作用，比如CD40L与CD40之间的相互作用，或者可诱导T细胞辅助刺激因子（inducible T cell costimulator, ICOS）及其配体ICOSL之间的相互作用，以阻断生发中心的形成。这样就可以形成表型正常的、发生过型别转换的记

忆B细胞，可这些细胞也没有发生SHM作用，或者亲和力成熟的过程。奇怪的是，用能够刺激机体生成滤泡外抗体分泌细胞的免疫策略却不能生成不依赖生发中心的记忆B细胞。这说明生发中心和不依赖生发中心的记忆B细胞都是在抗体分泌细胞形成之后利用其它机制形成的。

综上所述，不依赖生发中心的记忆B细胞似乎是在不表达Bcl6因子的B细胞与T细胞之间的相互作用完成之后，在免疫反应早期形成的（如图2所示）。从这个时间点来看，根据B细胞BCR的特异性可能就可以反映出在抗原诱导的细胞选择作用启动之前出现的最初的免疫反应。对在最开始存在各种BCR和各种抗体的多克隆B细胞免疫反应的记忆能力进行检测有助于发现这个时间点，并确定抗体结合的范围以及是否与抗体的型别有关等信息。因此，这些不依赖生发中心的记忆B淋巴细胞可以保留一部分各不相同的、抗原特异性的B细

胞，而不需要针对特定的抗原完成亲和力成熟过程，这样就能够对彼此相似，但是又不完全相同的一大类抗原形成免疫保护力（图3）。

不过在人体内是否也存在这么一大群B细胞现在还不能确定。

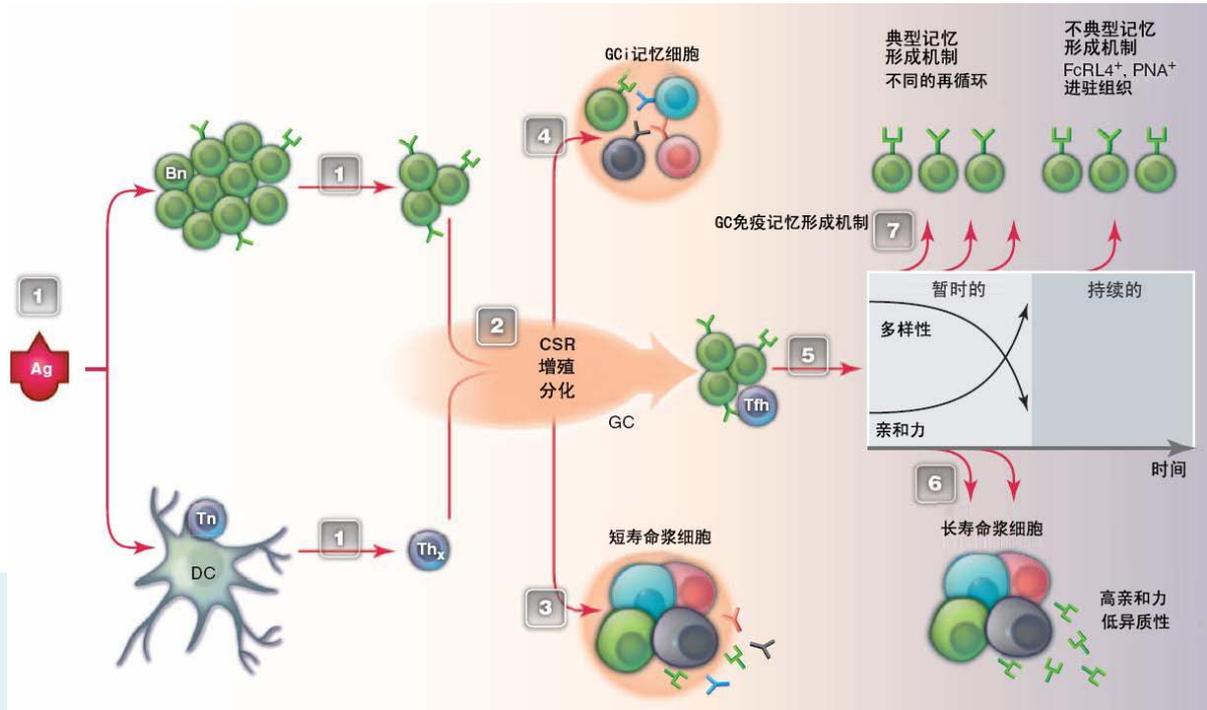


图3 几个帮助体液免疫记忆机制形成，并对其有影响的潜在时间点。（1）抗原的不同会影响B细胞活化的数量及特异性。改变抗原或佐剂，或者使用组蛋白修饰小分子抑制剂的方法改变某些转录因子的表达，这些方式都可以在免疫反应的初期改变T细胞的作用，进而改变细胞因子的表达，影响B细胞的成熟和分化。

（2）在完成CSR作用，以及形成生发中心之前，B细胞各亚群之间的增殖、分化情况可以借助细胞因子或者遗传及表观遗传学的差异进行调控，并调节IgM抗体分泌B细胞与其它型别抗体分泌B细胞之间的比例。如果免疫记忆指的是最初的记忆，那么增强IgM记忆可以增强这部分细胞的比例；如果提高型别转换细胞的比例，则可以改变免疫记忆，能够在下一次感染时立即分化出抗体分泌细胞。不过抑制型别转换在某些时候也是有益的，比如抑制转换出会干扰保护性抗体的抗体，或者抑制转换出IgG2等致病性的自身抗体等。（3）调整滤泡外抗体分泌细胞以避免对生发中心形成反馈抑制，也可以增加保护性抗体生成的速度。

（4）可能涉及多种不同免疫原的不依赖生发中心的记忆细胞能够产生多种反应性抗体。（5）控制B细胞进入，以及控制生发中心里T_{FH}细胞的活性能够解决亲和力成熟与克隆多样性丢失之间的平衡问题。（6）控制生发中心里浆细胞的生成数量也能够影响LLPC细胞的组成情况，控制这些细胞的存活时间。（7）增强生发中心里特异性B细胞的多样性可以提高机体对不同致病原的免疫抵抗力。另外，因为表观遗传学调节也会调节记忆B细胞与浆细胞之间的比例和平衡，所以这也可以帮助我们明确病情，比如是浆细胞过度增殖导致自身免疫病还是记忆性B细胞增殖不够形成了免疫缺陷。最后，在记忆B细胞群体里存在多种不同的免疫记忆，这主要取决于是否有急性免疫反应，还是因为抗原持续存在或多重感染引发了持续性的免疫反应。比如在疟原虫感染时就会生成不典型的记忆B细胞，依靠这些细胞完成有效的体液免疫保护反应。因此了解哪些因子参与了这些细胞的形成也有助于我们开发出成功的疟疾疫苗，刺激机体产生这类抗体。

1.3 抗体型别的重要性

记忆B细胞的异质性并不仅限于是否在生发中心里生成，它们彼此之间在功能

上也存在差异，而这种差异就与每一种B细胞表达的抗体种类有关。比如分化成浆母细胞（plasmablasts）和自我更新（self-

renewal) 等特定的功能就是不同记忆B细胞各自专属的本领。所以了解各种不同的感染、疫苗或佐剂能够刺激机体产生哪种记忆B细胞, 以及各自的比例, 这有助于我们认识各种不同免疫反应半衰期不同的机制。

体液免疫系统已经进化成了可以对各种不同的致病原发生免疫反应, 产生各种型别的相应的抗体, 以最高的效率清除致病病原体, 比如分泌IgG2a抗体行使抗病毒免疫反应等。最近有两篇文章将记忆B细胞持续存在的功能, 以及快速分化为成浆母细胞的功能与抗体型别给联系到一起。这两项研究都发现, 激活型别转换过的记忆B细胞只会生成浆母细胞, 这些B细胞不会重新再进入生发中心。相比之下, 分泌IgM抗体的记忆B细胞就可以形成生发中心, 因为这需要抗原特异性的IgM抗体, 尽管这种功能非常弱。将分离得到的分泌IgM抗体的记忆B细胞植入实验鼠体内之后会发生非常明显的型别转换, 并且形成生发中心。此外, 这些分泌IgM抗体的记忆B细胞在小鼠体内至少能够以近峰值的水平存活450天, 而分泌IgG抗体的记忆B细胞则会以几何级数的速度从峰值水平快速消退。这两种细胞里都含有突变序列, 只不过在表达IgM抗体的细胞中突变的频率要相对少一些。所以这些IgM细胞可能, 但不一定全是来自生发中心, 而且一定是在早期(大约在接触抗原之后10天左右)出现的, 类似于IgM⁺记忆B细胞。

虽然我们还不知道IgM细胞与其它发生了型别转换之后的B细胞在功能上为什么存在差异, 但是已经发现有一些分子参与了型别转换过程。在免疫反应进行过程当中, 抗原激活的B细胞与多种环境因素整合之后最终确定了细胞的行为和特性。细胞表面配体和受体、可溶性细胞因子以及趋化因子都能够对B细胞的行为起到非常重要的调控作用, 比如细胞分化、抗体型别转换及细胞迁移等。各种不同的病原体会刺激抗原特异性的T细胞, 使其分泌不同的细胞因子, 促使B细胞完成型别转换, 转录因子也在其中起到了非常重要的作用(图

1)。Coutelier等人曾经进行过一项开创性的研究, 他们用不同的抗原对小鼠进行了免疫接种, 想看看都能产生哪些不同种类的抗体。结果发现IgG2主要发挥抗病毒作用, 而可溶性蛋白主要刺激IgG1抗体产生。另外, B细胞的型别转换作用还会受到细胞因子的调控, 比如 γ 干扰素能够刺激生成IgG2a抗体, 白介素4能够刺激细胞从IgG1型转换成IgE型, β 转化生长因子能够刺激细胞从IgG2b型转换成IgA型等。T细胞分泌的细胞因子反过来也会反映T细胞受到了树突状细胞的刺激, 而树突状细胞反映的就是最初的免疫原信号。

如图1所示, 这些细胞因子诱导生成的转录因子也是调控B细胞行为所必需的因子之一。比如白介素4诱导生成的NFIL3因子对于IgE抗体转录就至关重要。T细胞(T-bet)表达的 γ 干扰素诱导产生的T-box转录因子也是促使生成IgG2a和IgG2a⁺记忆B细胞的重要调控因子。有意思的是, T-bet是IgG2a⁺记忆B细胞的重要调控因子, Ror α 是IgA记忆B细胞的重要调控因子, 这两种不同的途径最终却都是对BCR的转录进行调控。发生感染时, 细胞因子并不是被单独诱导表达的, 会同时表达多种细胞因子。因此, B细胞需要能够整合多种信号, 同时也要能够对每一种特定的抗原迅速、有效地启动免疫反应。比如IgG2a和IgA抗体对于抗流感免疫都非常重要, 因此考察在感染流感病毒之后分别是哪种转录因子决定了最终形成哪种型别的记忆B细胞就是一个非常值得研究的课题。由此可见, 控制型别转换的关键途径就是控制细胞因子表达谱, 利用抗原或佐剂可能会达到这个目的, 通过这一途径能够最终控制B细胞里某个转录因子的表达, 达到控制型别转换的目的(图3)。这一点非常有利于疫苗的开发工作, 不仅能够更好地与病原体进行匹配, 刺激机体产生最有保护效果、能够在最有利的位置分布抗体, 同时也能够避免抗体之间的干扰。比如有研究人员发现, IgA抗体在多种情况下都可以干扰IgG抗体的功能, 最近在HIV疫苗的研究工作中也发现了

这一点。

充分掌握都有哪些分子参与了这些不同记忆细胞的形成过程，这一点非常重要，同时也有利于我们认识不同抗体为什么会表现出不同的功能。有一种研究方法就是使用不同的人体脾脏细胞来研究IgM细胞与其它型别记忆细胞之间的遗传差异。虽然细胞表面分子以及细胞在参与最初的免疫反应时所表达的基因有所差异，但是这些记忆B细胞的转录谱与幼稚B细胞还是非常相似的。因此，在记忆B细胞的分化过程中转录因子网络很有可能并没有发生

太明显的改变。不过记忆B细胞之前已经受过抗原的刺激，所以在下一次进行免疫反应时可能也会保留上一次的表观遗传学记忆。如果这种观点能够成立，那么生发中心反应可能就是B细胞的一种基因表达重编程手段，借助表观遗传学标记在记忆B细胞里建立起一个不同于幼稚B细胞的新的、稳定的基因表达模式。比如组蛋白修饰物可能就有有助于形成长寿命的、稳定的IgM记忆B细胞，也可能抑制细胞周期，促使记忆B细胞快速分化为抗体分泌细胞。

2. 关于记忆B细胞

2.1 记忆B细胞长期存在的问题

疫苗的成功就在于能够形成长寿命的LLPC细胞和记忆B细胞。转归速度非常慢，即便在缺乏记忆B细胞的情况下也可以生存的LLPC细胞的持续存在需要依赖促存活蛋白Mcl1的持续表达。这反过来又需要依靠周围细胞持续表达促生长信号，这些周围细胞一起组成了浆细胞生长微环境。LLPC细胞的生存因子受体非常多，其中就包括分别由嗜酸性粒细胞、间质细胞和巨核细胞表达的APRIL、白介素6及CXCL12等。虽然缺少很多细胞或者细胞因子都会影响LLPC细胞的存活，但是除了Mcl1蛋白之外，到目前为止还没有发现哪一个因素是LLPC细胞生存所必需的。这说明这个关键的功能还是存在一定程度的冗余性。

如果不考虑抗原的特异性，在感染时也会出现记忆细胞旁路增殖情况，这种机制可以对记忆B细胞起到一个补充作用。这是一个非常有意思的假设，不过还是有一些科研人员发现只有记忆B细胞的增殖是需要依赖抗原的，这说明抗原不大可能是维持记忆的原因。具体维持免疫记忆的机制和因素现在都还不是太清楚。比如LLPC细胞、记忆B细胞都可以在没有抗原-BCR信号、没有T细胞辅助，或者没有前体信号的情况下持续存在。而且记忆B细

胞能够上调Bcl2等细胞存活因子的表达，细胞对抑制这些因子的功能也会非常敏感，所以记忆B细胞很有可能还会存在一些同样的具备自我更新作用的关键因子，只不过是我们目前还没有发现。在小鼠实验中观察到的IgM记忆能够持续保持高水平，可是IgG记忆却很快消失的现象表明，不同的免疫记忆应该会有不同的维持机制。另外，为了维持免疫记忆，就一定得有一套机制确保在发生第二次免疫反应时不会将记忆B细胞消耗殆尽。所以细胞多功能分化和维持机制是一个值得深入探讨的领域。

2.2 记忆B细胞快速反应机制

如果再次遇到同样的致病原，记忆B细胞就会快速分化为浆母细胞，分泌大量抗体清除感染，这次的反应速度要比初次免疫反应快得多，这就是疫苗之所以具备免疫保护功能的原因。记忆B细胞能够快速进入分裂期，其速度远远超过了幼稚B细胞，但是现在还不清楚这条信号通路的具体作用机制。科研人员们已经借助各种手段对这个问题进行过研究，他们也从抗体型别入手寻求过答案。之前发现，IgG抗体的胞质尾区（cytoplasmic tail）是促使IgG表达细胞形成的重要信号，于是大家认为这也是再次启动免疫反应时形成大量浆母细

胞的必需因子。之后又陆续发现的大量证据表明，配体蛋白Grb2被招募至各自对应胞质尾区上的磷酸化修饰的酪氨酸位点是有助于表达IgG或IgE抗体的B细胞增殖的信号因子。

IgG1抗体胞质尾区上的近胞膜区域也被发现能够促使受体聚集，在受体与抗原结合之后启动相应的信号通路。虽然IgG信号能够提高免疫反应性，但是记忆B细胞即便在缺少BCR信号刺激的情况下，其免疫反应的速度与强度也要远远超过幼稚B细胞。实际上，人IgM细胞与型别转换记忆B细胞和幼稚B细胞比起来，都能更快速地进行细胞分裂，这是因为这些细胞都下调了细胞周期抑制因子的表达。因此，一定有BCR信号通路之外的其它机制在发挥作用，帮助提高记忆B细胞的免疫反应性。

用人工改造过的、幼稚B细胞就能够表达IgG1抗体的小鼠进行试验发现了IgG抗体在二次免疫反应中的作用。免疫接种之后，这些B细胞表现得还是和普通的表达IgM抗体的幼稚B细胞一样，并没有表现出IgG1记忆，而且这些细胞都分化成了生发中心B细胞，并没有分化成为浆母细胞。由此可见，单单依靠IgG信号是不能解释为什么记忆B细胞的反应性会发生改变这个问题的。这些IgG1记忆B细胞能够表达少量的转录因子Bach2，这些因子更有利于细胞分化成浆母细胞，可是在表达IgM和IgG1抗体的幼稚B细胞里这些转录因子的表达水平也不低。因此这是一个非常奇怪，但是又很值得研究的问题，为什么IgM记忆B细胞表达Bach2因子之后会生成生发中心，而不是分

化为浆母细胞呢？如果下调Bach2因子的表达量，使其降到IgG1细胞里的水平，是否就可以促进IgM记忆B细胞分化为浆母细胞呢？

2.3 记忆B细胞的所在位置

LLPC细胞主要见于骨髓、脾脏和肠道淋巴组织当中，记忆B细胞则不一样，该细胞主要位于组织里，或者在二级淋巴器官里循环。在脾脏边缘区（splenic marginal zone）、粘膜上皮细胞（mucosal epithelium）以及二级淋巴器官里与生发中心相邻的位置上都已经发现过记忆B细胞。在人类的扁桃体内还发现记忆B细胞能够表达Fc受体样蛋白4（Fc receptor-like protein 4, FcRL4）。这些细胞也能够进行相应的SHM突变，完成型别转换，成为不表达FcRL4蛋白的记忆B细胞，但是不能够继续增殖，只能分泌Ig。最近有两个研究都在研究小鼠鼻内感染流感病毒之后记忆B细胞的分布情况。在肺部和淋巴引流液中都能够发现IgG和IgA记忆B细胞，而且有一项研究还发现，在感染5个月之后还能够检出这些细胞。IgA记忆B细胞只局限在局部反应组织里，这可能是因为这些细胞上调了粘膜整合素 $\alpha 4 \beta 7$ 蛋白的表达水平，而IgG记忆B细胞则会广泛地分布在免疫反应发生的组织内和没有发生免疫反应的其它各个地方。表达不同型别抗体的记忆B细胞在分布位置上的这种差异是从事疫苗开发工作的科研人员非常感兴趣的一个问题，尤其是因为粘膜表面是各种感染最易发的部位。

3. 急性和慢性感染免疫反应体液免疫

在发生急性和慢性感染之后，各种记忆B细胞在功能上的差异也是目前记忆B细胞发育研究领域的一大空白，这些信息对于疫苗开发工作非常重要。各种不同的记忆B细胞都需要不同的存活信号，这些信号可能与所接触抗原的时间有关，比如到底是急性感染、慢性感

染还是复发感染等。这也关系到用不同的疫苗刺激机体产生的抗体持续时间的问题。因此，各种病原体刺激机体产生的记忆B细胞彼此之间也存在根本的差异，这可能就是某些疫苗需要反复加强接种，而某些疫苗的免疫保护力就可以持续一辈子的原因。实际上，人体如果持

续接触某一抗原，是会改变记忆B细胞的组成的。正如前面讨论过的那样，有一部分扁桃体内的记忆B细胞就可以表达FcRL4。科学家们在越来越多的感染了疟原虫和HIV病毒的患者外周血中检测到了表达FcRL4的、所谓的不典型组织样记忆B细胞（atypical, tissue-like memory B cell），这些细胞都能够高表达抑制受体。科学家们目前已经对这些受体的抑制功能有所了解。比如，FcRL4蛋白能够抑制B细胞免疫突触（immune synapse，这种免疫突触就是在细胞表面的一大群信号分子和粘附分子，这些分子是抗原呈递细胞与淋巴细胞之间进行双向信号传递的基础）的形成，阻断BCR信号通路；反过来，如果用siRNA技术抑制FcRL4的表达则能够诱导BCR信号通路反应。至于HIV感染，这些记忆细胞可以被诱导成抗体分泌细胞，分泌抗体来杀灭HIV病毒。不过由于这些抗体并不存在于血清里，所以我们一直都认为这些记忆B细胞是没有功能的。

虽然在健康人体内也能发现这些抗体，但是直到最近才弄清楚以下这几个问题：这些位于局部组织里的细胞是否与在疟原虫和HIV病毒感染者血液里发现的细胞有所差异；慢性感染是否能够增加这些记忆细胞的数量；这些细胞是否能够抑制记忆B细胞反应，所以无法有效地扩增，并分化成抗体分泌细胞，来彻底清除感染。最近的证据显示，这些细胞实际上是可以产生保护性抗体的，慢性感染是可以诱导、增加不典型记忆B细胞的数量，而不是使所有的记忆细胞丧失功能。这群细胞以及其它组织内的记忆B细胞在正常和患病状态下的进化和功能都是值得我们深入研究的。总而言之，认识急性或持续感染的免疫应对机制，以及这些病原体诱导形成的微环境、转录因子、表观遗传学修饰等情况，了解不同记忆B细胞产生、维持以及再度被激活的机制，以期能够为将来设计疫苗，诱导特定记忆B细胞产生打下坚实的基础。

4. 记忆细胞的组成是和谐的还是集中的

所谓“B细胞记忆”现在包含了休眠的记忆B细胞和LLPC细胞，这两种细胞都是在初次免疫反应时生成的，也都能在抗原被清除之后持续存在很长一段时间。这就让我们自然而然地想到一个问题，这些细胞彼此之间相互重叠的程度有多少，如果它们彼此之间不和谐（当然有这种可能），会不会存在一种选择机制，这样会产生什么样的后果。虽然已经对这些细胞进行过全面、系统的检查，这也是解决上述问题最有效的手段，但是科学家们还是没能彻底回答这些问题，只有一些推理性的研究取得了一定的成果。

对小鼠用模型抗原进行试验往往只能检测抗体的亲和力（而不是特异性），这一方面是由于B细胞的限制性（因为是转基因小鼠，所以只能形成一种BCR克隆），一方面是由于抗原的限制性（比如半抗原），或者两

者兼而有之。这些研究都发现了亲和力方面的差异，比如对LLPC细胞的选择就要比记忆细胞严格得多，LLPC细胞在生发中心里出现得比较晚，记忆B细胞出现得比较早。

各种记忆细胞在反应性方面的差异已经被小鼠西奈病毒感染试验所证实。该研究发现，在初次免疫反应中LLPC细胞生成的抗体几乎全都是特异性针对西奈病毒的中和抗体，很难与变异病毒结合。不过这些记忆B细胞中有一些细胞对变异株有一定的反应性，其中有一些细胞产生的抗体对变异株的亲和力甚至要超过被感染的试验株。该研究证实，感染之后出现的抗体是不均一的。很明显，记忆B细胞保留的特异性并没有传递给LLPC细胞。虽然这个研究和前面介绍的半抗原研究不太一样，但是得出的结论是一样的，即记忆B细胞在抗原结合能力方面的多样性要远远超过LLPC细胞。

细胞。这也可以解释为什么被一种病原体感染后会对多种相似的病原体产生免疫保护力。

对于我们人类，可以用好几种方法了解记忆B细胞的组成情况，但是很难对同一个的记忆B细胞和骨髓LLPC细胞进行直接比较。不过有证据显示记忆细胞的组成情况是因人而异的。还有一个办法能够解决这个问题，那就是利用免疫反应，比如感染流感病毒或者接种疫苗等方法。感染了H1N1 2009流感病毒的患者体内可以生成罕见的、具备广泛中和能力的抗体，这是接种普通流感疫苗不可能实现的。在H1N1 2009病毒出现之前，研究人

员对人群的血样进行分离，筛选出记忆B细胞进行研究。结果发现，在现有的流感记忆细胞中都存在这些广谱中和抗体所能够识别的特异性，只不过传统的疫苗不能够促进这些记忆细胞分化成LLPC细胞。因此，生发中心来源的、型别转换过的记忆B细胞的抗原识别特异性并不能被LLPC细胞复制，但是这种特性具有免疫保护价值，所以这也算是一种进化优势。目前欠缺的就是对这些记忆细胞进行更系统的分析，了解彼此之间的相互作用关系，记忆细胞与LLPC细胞的关系，以及对再次免疫反应的价值等。

5. 结论和展望

这篇文章介绍了在依赖T细胞的免疫反应中形成记忆B细胞的起源和功能（表1）。IgM细胞和其它记忆B细胞的免疫应答能力各有侧重，可能每一次反应都会生成一种记忆B细胞，代表一个生发中心，这也就意味着可能会生成很多种不同的记忆细胞，每一种针对一个抗原。仔细分析这些细胞的组成情况就有可能发现每一种B细胞的特异性，不需要在这些

细胞在生发中心里增殖、成型的过程中进行选择。我们推测，这更符合不需要生发中心的IgM记忆细胞的情况。最后，一旦确定了这些特异性记忆B细胞的形成和反应机制，我们就可以利用各种不同的抗原、佐剂或细胞因子和免疫反应持续时间等因素，设计初次免疫方案和再次免疫反应方案，最大限度地获得免疫保护效果。

表1 各种记忆B细胞的特点。免疫记忆可以表现为产生多种不同的抗体，我们将其总结在下表里。细节参见正文，除了IgA记忆B细胞的突变之外。PB (plasmablast)：浆母细胞。

TD免疫反应里的记忆B细胞种类				
	IgM	IgG	IgA	LLPC
是否依赖生发中心	依赖 不依赖?	依赖 不依赖?	依赖 不依赖?	依赖
组织趋向性	循环系统	循环系统	粘膜	骨髓、粘膜
SHM作用	无至低水平	无至高水平	高水平	低至高水平
细胞寿命	不定	逐渐消退	情况不明	不定
再活化	低血清IgG里的GC	PB >> GC CSR	PB >> GC	不活化
组成情况	记录在案?	丰富	情况不明	较单一

原文检索:

Mark X. Sliwkowski and Ira Mellman. (2013) Antibody Therapeutics in Cancer. *Science*, 341:1192-1198.

Florian Klein, Hugo Mouquet, Pia Dosenovic, Johannes F. Scheid, Louise Scharf, Michel C. Nussenzweig. (2013) Antibodies in HIV-1 Vaccine Development and Therapy. *Science*, 341:1199-1204.

David Tarlinton & Kim Good-Jacobson. Diversity Among Memory B Cells: Origin, Consequences, and Utility. *Science*, 341:1205-1211.

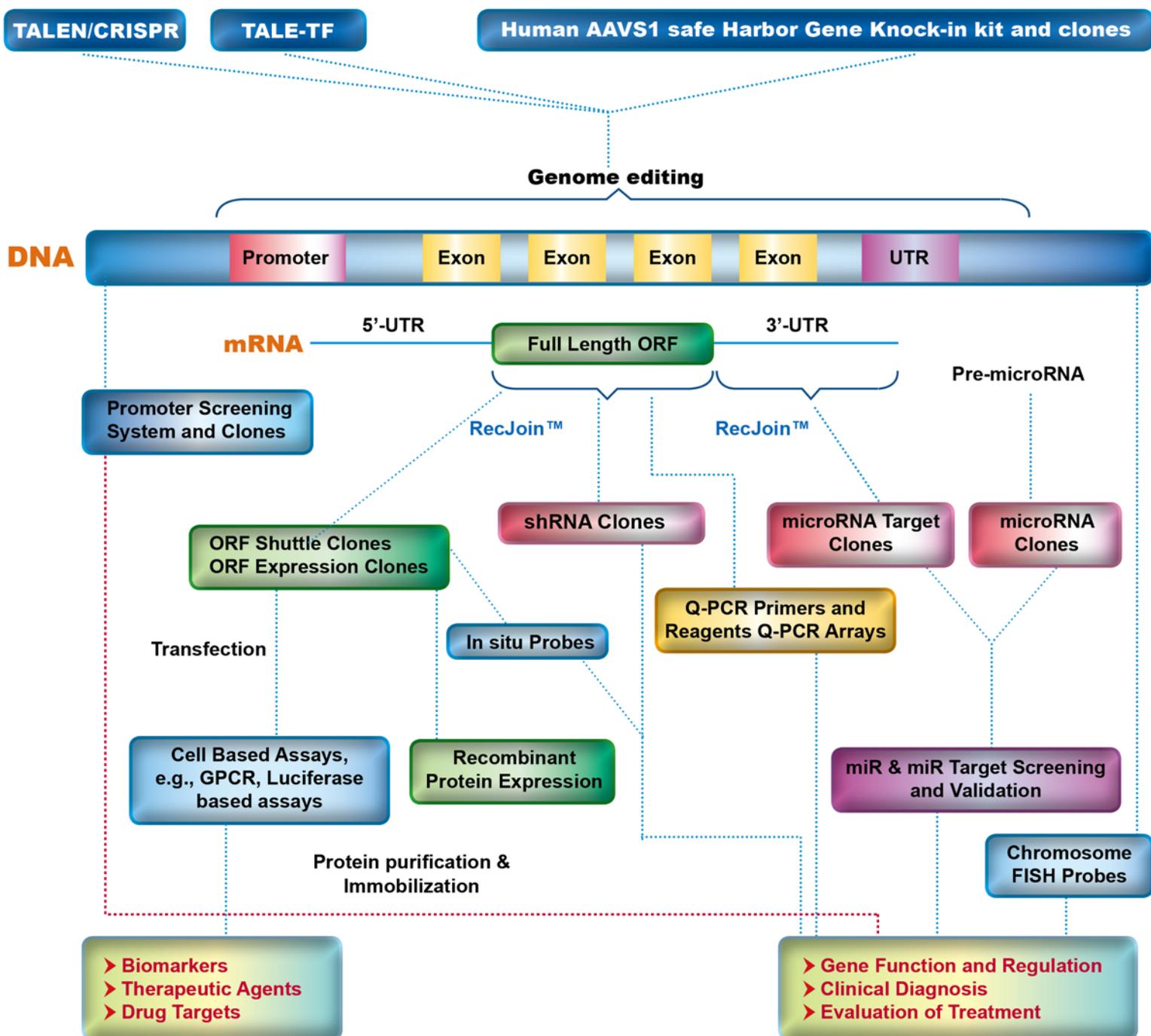


YORK、筱玥/编译



功能基因组研究线路概览 (GeneCopoeia产品与服务)

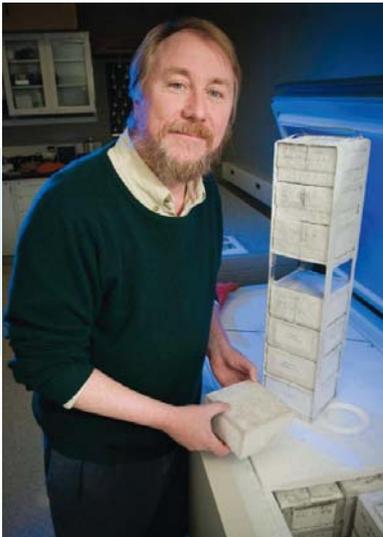
Products and Services: A Functional Genomics View



热点

Hot Topics

把进化史装进瓶子里的人



时间旅行者。为了让进化时钟往回走，Richard Lenski一头扎进了他的冰箱里。

Richard Lenski用了25年的时间来研究细菌的进化问题，他用大量的试验证实了突变与选择对生物的塑造作用，而且总是能够不断地给我们带来惊喜。

大部分生物学家都希望了解进化的本质，他们想尽了各种办法，有的去研究化石、有的深入大自然寻找线索，可Richard Lenski和他们都不同，他的方法是穿过美国密歇根州立大学（Michigan State University）校园，到他实验室的冰箱里寻找答案。在他的冰箱里储存了4000个玻璃瓶，这些是他从1988年就开始收藏的细菌标本，这就是他的全部宝藏。就在1988年，Lenski开始了一个简单，但却是非常基础的试验工作。他的试验是这样的，将大肠杆菌（*Escherichia coli*）放入糖溶液中，然后塞住瓶口，试验就完成了，接下来的工作就是等着看究竟会发生些什么。这项研究根本就没有一个预计的终点，所以他也没有花太大的精力为这项研究争取科研经费，因为谁都知道这个工作的未知性（风险）太大。

25年之后，Lenski已经攒下了5.8万个这样的小瓶子，他培养的这些细菌还在不停地生长、突变及进化着。这项工作的意义也得到了体现，该项目对Stephen Jay Gould的软体动物（mollusks）进化研究工作起到了很好的补充作用。Lenski这种简单的细菌实验已经证实了很多问题，比如多个微小的突变如何为将来的巨大改变打下基础？新的物种是如何产生，又是如何分化的？而且同时为Gould平反了，因为当初Gould宣称如果再给一次进化的机会，生物的进化很有可能会朝着另外一个方向进行下去，可是所有人都认为他错了。最近，这些细菌又证实了另外一点，进化从未停止，哪怕环境是一成不变的，进化也不会停下自己的脚步，这一点与很多生物学家的认识都有冲突。美国纽约Stony Brook大学（Stony Brook University in New York）的进化生物学家Douglas Futuyma这样评价道：“这项工作绝对是一个了不起的工作，取得了令人瞩目的成就。”

还有一些科研人员也在从事试验进化（experimental evolution）方面的工作，他们也在实验室里受控的条件下培育了大量的昆

虫、酵母，甚至还有鱼，也曾经让这些实验动物接触过短时间的环境压力。但是还没有人像Lenski这样进行过这么长时间的试验进化研究，用Futuyma的话来说就是，Lenski的工作要比其他人的工作高出好几个数量级。

这项已经持续了四分之一世纪的研究工作见证了生物信息学的兴起，也见证了全基因组测序技术的诞生，Lenski当然也没有错过这些机会，他也在研究工作中借助了这两项技术的力量。一代又一代的学生都在照料这些细菌，也都在分析这些微生物，不过这项工作也让Lenski和神创论者产生了一场具有历史意义的冲突。15年前，Lenski差一点就因为数字进化模型而放弃了他的研究工作，直到后来他的这些细菌出现了一次非常明显的进化，他才重新恢复了信心。正如美国哈佛大学（Harvard University）的进化生物学家Scott Edwards在今年6月召开的进化大会上评价的那样：“Rich发现的进化规律深深地触动了我们每一个人，也让我们明白应该用一种全新的眼光去看待进化问题。”



瓶子中的进化史。在12个培养瓶中，有一瓶细菌（第一排从左数第三瓶）因为发生了突变而快速扩增起来，使培养基明显变混。科研人员将两种细菌混合培养，然后计算培养皿上的克隆数就可以比较出这两种细菌的适应性。携带了突变的细菌克隆会呈现红色。

■ 坚实的数据

现年57岁的Lenski一直都是麦克阿瑟（MacArthur）样的人，他是好几个杂志的编委，是一个社团的领袖，也是美国科学院（National Academy of Sciences）的成员，同时也是转基因物种评价委员会的委员，还参加了2001年美国炭疽恐怖袭击（anthrax attacks）的调查工作。今年8月，Lenski又爱上了推特，也在网上开了一个个人博客，博客的名字是“Telliamed Revisited”。这个名字源于一本写于18世纪的书，在这本书里强调了应该通过仔细的观察，而不是宗教教条去认识世界。Lenski还热衷于收集古老的科学文献和棒球统计资料，不过最近他也说过：“我的孙女是我最近的爱好。”

虽然Lenski有这么多爱好，但是有一件事情总是能够吸引他的注意力。他的研究生Michael Wiser就介绍说，只要拿一些新鲜的数据站到Lenski的门口，他就会像一个5岁的孩子看到圣诞节礼物时那么高兴。这种对进化数据的热爱和渴望就是驱使他开展细菌研究的原动力。Lenski从来没有上过微生物学的课程，作为一名美国北卡罗莱纳大学教堂山分校（University of North Carolina, Chapel Hill）毕业的研究生，他只学过地甲虫生态学，这项工作他也觉得很有趣，但是兴趣还不算太大。今年8月，Lenski在博客里这样写道——很难想出这样简单的一个试验，能够这么容易地验证让我如此着迷的科学假设。Lenski在1982年做了博士后，当时他改变了研究方向，进入了Bruce Levin的实验室，Levin是当时少有的几位从事微生物进化实验研究的科学家之一。他们一起对细菌与噬菌体（bacteriophages）这种病毒之间的相互作用开展了研究。但是他们的试验系统太复杂了，所以不能回答Lenski最感兴趣的一个问题——Gould关于进化是不可复制的理论正确吗？或者说如果再给一次机会，是不是就可以重复一次进化历程呢？

后来Lenski终于在加州大学尔湾分校

（University of California, Irvine）有了一间属于自己的实验室，于是他利用获得的美国国家科学基金总统青年科研人员大奖（National Science Foundation Presidential Young Investigator Award）的奖金自己建立了一套简单的研究系统，只利用细菌进行科学研究。

“这就好像是一个物理学试验，你试着去除掉所有不相关的因素，只针对自己感兴趣的现象进行研究。” Lenski的博士后，物理学家Noah Ribeck这样评价这套体系。

1988年，Lenski做了一次试验，他将大肠杆菌放入了12个培养瓶，瓶里装的除了普通的液体培养基之外，还有浓度达到25mg/L的葡萄糖。然后将这些培养瓶放入37℃恒温震荡摇床里培养，每隔24个小时，细菌都会爆炸式地增长，同时会大量消耗葡萄糖。Lenski每天都会从培养瓶中挑出1%的细菌，接种到一个新的、含有葡萄糖的固体培养平板里。这样大约75天左右就可以得到500代的大肠杆菌，然后Lenski等人会将这些细菌冻存起来备用。就这样日复一日、年复一年、毫不间断地一直持续了25年。其中只有一次短暂的中断，那是因为有一次寒假，Lenski把实验室搬到了密歇根。

Lenski认为，建立这样一套试验系统，并且一直坚持下去是需要很大的毅力和前瞻性的。之前，质疑者都认为细菌的进化，尤其是让细菌在一个稳定、舒适的环境中生长，这样的试验不可能反映自然界里真实的进化情况。可是质疑归质疑，Lenski还是继续着他们的研究，而且他们也在对培养基进行监测，通过这种监测他们发现了一个非常类似于有着正向加速度的进化历程。由于使用的试验材料是细菌，而不是其它生长周期很长的生物，所以大大节约了时间。大肠杆菌每天可以繁殖6.6代，而小鼠要用1年多的时间才能繁殖这么多次。Lenski这25年的细菌试验等于人类数百万年的进化历程。“这样就可

以对整个假设进行检验，而这在以前是根本不可能做到的。”加拿大麦吉尔大学（McGill University in Montreal, Canada）的进化生物学家Graham Bell这样评价道。

只需要拿出一瓶冻存的细菌解冻、复苏，Lenski就可以随时了解进化过程中任何一个时间点上的情况。“这就是一份完美、完备的化石记录。可以精确地找出某个性状是在什么时候出现的。”蒙大拿大学（University of Montana in Missoula）的进化生物学家Douglas Emlen赞叹道。而且Lenski还可以用任意一瓶细菌重新开始试验，看看这个进化过程是否可以重复。Lenski之前的博士后，现在是美国哈佛大学（Harvard University）微生物学家的Christopher Marx进一步介绍说，今天，一名22岁的研究生也可以使用这些在他出生之前就已经存在的细菌开展试验，并且可以用最新的技术对这些细菌进行研究。

在研究开展的头十年里，事情一直进行得非常顺利。科研人员们一直在监测细菌的适应度，他们的方法就是比较最新的细菌与最老的细菌的繁殖扩增速度。最开始，细菌的适应性增长得非常快，可是之后这个速度就渐渐地慢了下来。纵观整个25年时间的试验，细菌的适应性整体提高了70%，这也就是说最近这一代细菌的倍增速度要比第一批细菌快了1.7倍。

所有12瓶试验菌差不多全都得到了

同样的试验结果，这说明进化是可复制的（*Science*, 25 June 1999, p. 2108）。但是有一些细菌的生长速度会变得更快一些，对这些细菌进行遗传分析之后发现，它们彼此之间选择了不同的进化途径。比如有六种细菌出现了DNA修复机制缺陷，不过它们并没有因此而死亡，只是变得比其它细菌的突变率更高了而已。美国密歇根州立大学（Michigan State University）的进化生物学家Janette Boughman解释说：“根据历史经验来看，越早出现的突变，就越能改变后来的进化方向。但是最终得到的结果却都是一样的，所有的细菌都适应了有葡萄糖存在的环境。”

这些细菌还进化出了其它的差异。大约在试验开始后的第3年，已经繁殖到了第6500代细菌，此时在一个培养皿里进化出了两种大肠杆菌，其中一种细菌形成的克隆比较小，细菌的体积相对也比较小，另外一种不论是细菌的体积还是形成的克隆都比较大。Lenski希望最终这两种细菌里只有一种能够胜出，生存下去，或者这两种细菌都被另外一种适应性更强的突变株取代。但是出乎他预料的是，这两种细菌全都存活下来，形成了一个小型的生态系统，两种细菌彼此之间既存在竞争也存在相互作用，竟然和平共处下来。“它们创造出了它们自己的Galápagos岛。”Marx这样评价道。

数字化试验

随着数字化技术的兴起，Lenski差一点就放弃了他的培养皿试验工作。因为他发现了一种更简便、更快速的试验进化系统。据美国耶鲁大学（Yale University）的进化生物学家，过去曾经是Lenski学生的Paul Turner介绍，Lenski是一个非常敏锐的、客观的研究者，如果有一样东西是值得追求的，那么他一定不会轻易放手。比如有一位物理系的同事就曾

经邀请Lenski参加加州理工学院的物理学家Christoph Adami举办的学术交流会。Adami和他的研究生Charles Ofria一起开发了一个能够自我复制的计算机软件——“aka数字化生命体（aka digital organisms）”。这个程序原本是为了提高计算机的运算能力，开发计算机新功能而设计的，可是Lenski一下子就被它吸引住了，他回忆说：“Adami展示的第一张

数据看上去就和做了很久的试验才得到的数据差不多。”

1998年，Adami给Lenski寄了一本由他撰写的《人工生命简介》（Introduction to Artificial Life）（该书介绍详见*Science*, 8 May 1998, p. 849）。Lenski花了两个晚上一口气读完了这本书，并且尝试仿照这套程序自己开发了另外一套程序。这套数字化试验系统的复制速度要比他的大肠杆菌快好几千倍，而且可以更细致地追踪突变信息。于是在接下来的6年里，Lenski除了进行大肠杆菌试验之外，还用了同样的精力关注他的计算机模拟程序。

2003年，Lenski与Ofria和Adami，以及哲学家Robert T. Pennock一起组成了课题小组，开始对一个个的突变进行跟踪，研究计算机程序除了复制进化历程之外，究竟能完成哪

些工作，能否完成复杂的工作，比如验证一个数字串是否等于另一个数字串等。他们发现，很多早先出现的突变（其中有一些突变在短期内是有害的）都必须先积累到一定的程度，直到出现某一个决定性的突变，才会进化出一个新的性状。这项研究工作证实，像脊椎动物的眼睛这样复杂的性状很有可能是经过了一系列的中间步骤，才最终形成的。

数字化研究丝毫没有减弱Lenski的学术影响力。2010年，他与Ofria以及其他一些人一起获得了BEACON的资助。BEACON是美国科学基金中心专门设立的一个进化研究项目（Study of Evolution in Action），美国5所大学的400多名科研人员都参加了这个项目，他们的工作就是对活生生的生物，以及数字化生物的进化过程开展研究。

Lenski的长期进化试验项目

12个批次的细菌不断复制、进化了25年之久，这么巨大的努力终于获得了丰厚的回报。

58,000* 细菌的繁殖代数
（* 截止2013年6月）

每天繁殖
6.6代



大约有 **10¹⁴** 个细菌

一共试验了**12瓶**
(群体)细菌

这12瓶细菌都是大肠杆菌，但是到后来这些细菌全都不一样了。

试验至今积攒的**冻存细菌**已经超过了**4000瓶**，其中包括试验开始时候的菌株和最近的菌株。

液体培养基  使用冰箱**6台**
超过**1万升**

Lenski的试验

持续了**25年**，
预计总共投入了
400万美元

耗费的人力约合
75人年数



共计**30个**研究生和
博士后参与了这项工作

外部合作者**40个**



发表文章**50**多篇

值得庆幸的是，Lenski没有放弃最初的细菌实验工作。就在发现数字化生命体程序的那个周末，Lenski告诉他的妻子，他打算终止这个持续了十几年的试验工作。但是他的妻子仍然让他坚持下去。2003年1月，这项漫长的研究工作终于显露出了它应有的价值。“计算机程序的好处是你可以得到与试验相关的所有信息，细菌试验则要更加复杂一些，但是细菌更加‘诡计多端’，所以细菌也会有很多让我们预想不到的进化方向。” Lenski这样评价道。

一天清晨，Lenski等人注意到有一个培养瓶里的培养基变浑浊了，这说明里面的细菌长得非常多。他们怀疑可能是出现了细菌污染，但是还不能确定。于是他们调出了最近的一批冻存细菌Ara-3，重新进行了试验。3个星期之后，培养基又变浑浊了。这一次他们彻底进行了检测，排除了污染的可能。然后他们又用各种不同的培养基来培养Ara-3细菌，结果发现这种细菌已经进化出了一种新的滋养模式。它们不再需要稀少的葡萄糖来生长，它们可以依靠培养基里的另外一种成分——柠檬酸盐（citrate）来供能，所以这种细菌能够生长得更好，菌体密度更大，因此会使培养基变得浑浊。“这是整个大肠杆菌试验里最重要的一件事。没有任何明显的影响因素，就可以使大肠杆菌进化出一种非常复杂的新功能，这是一件非常重要，也是非常值得大家关注的事情。” Adami评价道。

现在，研究生Zachary Blount接手了这个项目，他将告诉我们大肠杆菌都发生了哪些改变。这种适应能力是一个突变造成的吗？如果真是一个突变导致的，为什么不能早点发生呢？要知道这么长的时间足够大肠杆菌里每一个基因都突变一次了。如果是多个突变共同造成的结果，那么是在什么时候开始出现第一个突变的？每一个突变之间的先后顺序又是怎样的？为了找到这些问题的答案，Blount又重复了一遍试验。他解冻了早期的细菌样品，然后用同样的培养基又培养了一次，希望重复出细

菌的进化历程。结果在72个培养瓶中有4个瓶的细菌表现出了利用柠檬酸盐的特性，而这4瓶细菌全都是来自增殖代数较高的细菌。这说明这种新特性应该是多个突变共同作用的结果。代数较高的细菌已经积累了足够多的突变，所以能够实现从量变到质变的飞跃。

Blount和Lenski的试验结果在2008年一经发表就引起了大家的关注，而且不仅仅是学术界关注他们的科研成果，大众媒体也表现出了极大的兴趣。保守的Christian Andrew Schlafly在他的博客Conservapedia上对这个科学结论表示了质疑，他不认为细菌能够进化出一种新技能，并且要求Lenski公布原始的试验数据。Lenski提交了原始的论文，但是Schlafly还是坚持他的观点。于是Lenski写了一封言辞犀利的评论作为回应。“他一夜之间就成了我们科研界的摇滚明星。” Adami这样评价道。

与此同时，柠檬酸盐的工作也还在继续着。由于微生物全基因组测序的费用大幅度下降，所以Blount终于能够明确地了解到这些细菌究竟发生了哪些突变。他发现在这些能够利用柠檬酸盐的细菌基因组里有一段2933bp的DNA片段出现了重复，从而激活了一个原本沉默的基因，该基因的编码产物就是柠檬酸盐转运子。之后的遗传突变又进一步增强了这个转运子的转运效率。Blount和Lenski在2012年发表文章公布了这一发现。

这些能够利用柠檬酸盐的大肠杆菌让已经是实验室里博士后的Blount和Lenski能够对另外一个进化问题开展研究——那就是如何进化出一个新物种。我们通常都只会对每一个单独的品种进行检测，这是因为不同的品种彼此之间很难成功杂交，但是这一规则不适用于细菌，因为细菌是无性繁殖的。不过由于大肠杆菌的特性之一就是在有氧环境下不能利用柠檬酸盐，所以这种新出现的、在有氧环境下能够利用柠檬酸盐的细菌就可以被称作是一个新的品种。它们甚至符合传统的新品种的定义。我们不能对细菌进行杂交，但是可以将不同细菌

的基因组混合在一起。Lenski今年6月在一个进化讨论会上介绍，这些可以利用柠檬酸盐的细菌基本不能依靠葡萄糖生存，将这些细菌与

它们的“父辈”菌混合在一起能够得到一种适应度稍差的杂交菌。



Zachary Blount用身后所有的培养皿来研究细菌是如何进化出用柠檬酸盐供能的新技能。

永无终点的进化

现在，Lenski已经不再考虑什么时候中断他的细菌试验了，他说：“现实情况已经越来越明显，短期的试验没什么意义。任何一个有足够人力的微生物实验室都应该规划一个为期20年的长期试验项目。”资金管理人也同意这个观点。这个曾经一度被美国国立健康研究院（NIH）拒绝过的项目现在也已获得了美国科学基金会的青睐，获得了一个为期十年的环境生物学研究基金。

长时间的坚持也得到了回报，Lenski、Wiser、Ribeck等人本周又在《科学》（*Science*）杂志网络版上发表了一篇文章（<http://scim.ag/MWiser>）。科学家一直都认为一旦生物体遇上了新鲜的环境，就一定会在第一时间很快地适应，然后只要环境因素一直保持稳定，就可以达成一个适应状态（adapted state）。当达到适应的顶峰之

后，适应性进化就会停止。Wiser已经对12瓶细菌的适应性都进行了检测，涵盖了整个进化历程中的41个时间点。经过5年，大约繁殖了1万代之后，细菌似乎已经达到了适应的顶点。但是现在Lenski团队发现，经过了5万代的增殖，虽然细菌进化的速度有所减缓，但是并没有像我们预期的那样完全停滞下来。“进化顶点的提法要比我预期的更难以捉摸。我认为适应性进化可能会一直持续好几百万年。即便在一个稳定的环境中，进化似乎也是永远不会停止的。”Lenski这样认为。Boughman对此评价道：“这是一个非常有见地的看法。”

这对Lenski已经传了58500代的细菌研究来说是一个非常好的预兆。Lenski介绍说：“如果你在20年前问我们要不要这么干，我想大家肯定都会说‘不’，宁愿选择去干其他

的事情。”他又说道：“可到了现在，我觉得肯定都会毫不犹豫地继续干下去。” Lenski 最近在一个进化大会上担任会议主席，他在做

主席发言时这样说道：“如果你们听说有谁想做一个数百万年的试验，一定要让那个人联系我。”

原文检索：

ELIZABETH PENNISI. (2013) The Man Who Bottled Evolution. *Science*, 342:790-793.



YORK/编译



Gene and miRNA qPCR Arrays

GeneCopoeia提供的qPCR检测阵列是基于SYBR® Green I染料法的定量检测技术，可用于基因表达差异研究，具有易操作和可靠等优点。该系列产品有96和384孔板两种规格，专为检测不同组织或细胞中特定信号通路或疾病相关的基因（miRNA）的表达量而设计。检测结果所显示出来的表达差异，可帮助研究者获取关于这些基因的进一步研究线索。



特点与优势：

验证引物：每对引物均使用专利算法设计并经过实验确证；

性能优越：严谨的质量监控保证产品的高品质、特异性好及高灵敏性（最低可检测4个mRNA分子）；

覆盖范围广：目录产品包含通路分析、癌症和其他研究热点，定制产品可根据客户要求选择设置。

类别	产品名称	描述	配套产品
基因表达量检测阵列	ExProfile™ Cancer Gene qPCR Arrays	癌症相关基因表达量检测阵列	RNAzol® RT RNA Isolation Kit All-in-One™ First-Strand cDNA Synthesis Kit
	ExProfile™ Pathway-Focused Gene qPCR Arrays	信号通路相关表达量检测阵列	All-in-One™ qPCR Mix All-in-One™ gene qPCR Validated Primers
miRNA表达量检测阵列	miProfile™ miRNome qPCR Arrays	覆盖miRBase V19.0	RNAzol® RT RNA Isolation Kit All-in-One™ qPCR Mix All-in-One™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit All-in-One™ miRNA qPCR Validated Primers
	miProfile™ Cancer miRNA qPCR Arrays	人与鼠癌症相关miRNA表达量检测阵列	
	miProfile™ Disease and Focus-Group miRNA qPCR Arrays	疾病或特定群组相关的miRNA表达量检测阵列	
表达量检测阵列的定制服务	Custom-made Gene or miRNA qPCR Arrays	有96和384孔板供选择 阵列定制和qPCR检测服务	
数据分析工具	Online data analysis tool	完全免费，且操作简便	

百态

Amazing Lives

温和的热点

在关于岩礁鱼的多项全球调研中，大量数据都显示了有关功能生物多样性的新热点，但并非所有的数据都表明热点具有高度的物种丰富度。这项发现很可能会影响生物保护的优先度。

一听到“热点”这个词，你可能首先会想到wifi。但此处的“热点”特指生物多样性，亦即在很小的地域面积内包含极其丰富的物种多样性。显而易见，它对整个生态网络的维护具有深远的意义。

目前，我们对全球海洋生物多样性模式的了解主要是建立在生活于不同地域的物种数量的基础上的。因此，物种丰富度成为一种重要的衡量标准。但是，人们期待有一套更为广泛的度量方法将生态信息的各个方面完全整合起来，以检测出某些可能物种不太丰富，却具有特殊生态学的地域。最近，人们对生物个体和种群之间的功能多样性特别感兴趣，这是因为大量研究将此特点与生态

系统所提供的产品和服务联系起来，亦将这与生态系统的恢复力联系起来。在本期杂志（*Nature* Vol 501）第539页，Stuart-Smith等人展示了一份令人瞩目的以标准化潜水方式实施的水下调研汇编，这份汇编显示了全球岩礁鱼的各种有趣的功能生物多样性模式。

任何一位在遍布热带珊瑚礁的缤纷鱼群之间漂浮的潜水员都会告诉你，在水下识别鱼儿是项多么艰难的工作。因此，可以推断，人们要想精确评估它们的数量将会多么困难。但是，我们可以努力想办法，比如说应用水下可视普查法（underwater visual censuses, UVCs）。这种方法既能执行标准

的静态点计数（潜水员在一段特定时间内，在一个定点识别某个圆环区域的鱼类），也能沿着潜水员游过的地方对特定长度及宽度的样带执行标准测定。

这样，基于UVCs，就有两种可能的途径来汇编一套全球性数据。第一种是从已经开展的大量同类研究中整合现有的数据。像这样利用大量调研数据的优点其实是很明显的，但应该选用哪一种统计方法来修正不同的研究方法

学之间的差异呢？这也是此法的缺点所在。而另一种方法是利用抓取到的数据设计一个全球性标准化抽样项目，比如Stuart-Smith等人所利用的岩礁生物研究。这个研究项目吸引了不少研究者和“公民科学家”（志愿潜水员）参与，他们在海洋生物学家的培训与指导下，在全球大约2000个地点完成了4000余项样带研究（图1）。



图1 海洋研究。一位参与岩礁生物研究的志愿潜水员沿着样带对岩礁鱼类进行统计。

研究作者首先利用这些数据对全球岩礁鱼类的种群密度（每个样带的相对生物丰富度）和功能-种群丰富度（生态学相异的种群数量）进行分析。这两个变量均证明了符合典型纬度梯度的模式——距离赤道越远，种群数目越少。至此，结论都是我们所熟悉的。然而，当他们沿用自己获取的全部丰富数据来评估种群平均度（种群中个体的分布）和功能多样性（将功能和相对丰富度整合起来的指标）时，意外出现了。研究作者发现，种群平均度向两极方向增加，这与丰富度的走向相反。同时，功能多样性数据呈现出一种古怪的特型：在无法与丰富度热点相当的地区反而出现了高峰。事实上，其中一些功能多样性的热点完全超出了热带地区的范围，其中有不少位于流

向赤道的温带边界洋流中，比如本格拉寒流（Benguela Current）。这些水流通常具有高度的生物生产力特性（这是由富含营养的水域带来的）。

与Stuart-Smith的研究相比，此前多项关于全球范围的功能多样性分析均为典型的陆生动物研究，且结论都建立在以丰富度为基础，而非以多样性为基础的测量方法之上。而新研究则向人们揭开了关于海洋动物的新观点，即物种丰富度高，不一定等于功能多样性也高。这一概念对此前某项关于地域性陆栖动物的研究作了补充，该研究也发现，功能多样性的模式与物种丰富度的模式有显著不同。

Stuart-Smith等人为其研究的功能多样性热点提出了两个大概的类型。第一类大多位于

温带地区，特点是具有高度的物种平均度；尽管这类地区没有物种丰富的必然性，却有一定数量的物种显示出比平均水平高得多的功能多样性。这类热点可被视为鱼类世界的“社会主义社会”——因为它们相对平衡，种群都满足于明确的角色分工。第二类则囊括了具有高度功能多样性和中度物种平均度的热带地区。这类热点属于“机会主义者的地盘”，顾名思义，就是没那么平衡，但具有更多可获取的角色分工。

其实，上述发现还隐含着更为广阔的科学寓意，这取决于岩礁鱼类如何能够更好地取代其它种类的空间梯度。海岸生物的物种丰富度趋势明显是一致的，但海洋中的生物则与其海岸同胞完全不同。这有利于其他研究者继续探究Stuart-Smith等人关于平均度和功能多样性的意外发现是否适用于其它海洋生物。但我们目前仍缺乏一个可测试的机制框架，通过该框架能够帮助我们在作者的观测下，对物种平均度和丰富度模式的产生过程提出解释。

Stuart-Smith等人目前仅仅限于将自己的相关研究成果用于生物保护和管理上，当然，它们值得我们进行重点讨论。目前，生物学家和资源管理者越来越重视生态系统的功能，若将研究者的功能多样性分布图谱覆于世界海洋保护区之上，对于评估功能保护（而非仅仅是评估物种丰富度）而言将会是简单明了的第一步。研究结果还提出了新的问题：哪一种区域应该放在保护的优先地位？是丰富度（可能也是物种发生的启动机）高的中心地带，还是功能脆弱或者功能多样化的地区，抑或是给人类带来不均衡发展的地带？

当然，对于整个世界而言，最好的做法恐怕是保护上述所有的地域。但我们的世界远未达到这种过于乐观的理想状态。必须承认，Stuart-Smith等人所提供的信息可能并未简化我们的决定，但他们却为我们提供了有关海洋生物多样性各个方面的广泛数据，这至少能使人们在做决定时，拥有更强大的科学基础。这就是进步，也是走向未来的阶梯。

原文检索：

DEREK P. T I TTENSOR. (2013) Temperate hotspots. *Nature*, 501, 494-495.



文佳/编译

婴猴从休眠中苏醒的方法

想象一下，如果你是一只面临低温寒冷天气和/或食物匮乏的动物，只能选择降低体温，沉入冬眠的梦乡。只是，一旦适合的时机来到，你还要能够重新升高体温，这样才可以生龙活虎地去觅食和生存，对吗？今天，我们就来讨论关于苏醒的事情。

生长在寒带或温带地区的动物通常在入冬前就已经把营养物质储存到了褐色脂肪细胞里，这种细胞在受到去甲肾上腺素（noradrenaline）激发时，就会通过一种叫做“非战栗产热”（nonshivering thermogenesis, NST）的反应来燃烧脂肪，从而产热。可是，生长在较温暖地区（比如非洲）的动物是如何产热的呢？它们也用非

战栗产热法来热身吗？还是能依靠源自周边环境的被动式加热方法来提高体温？来自德国汉堡大学（University of Hamburg）的Julia Nowack告诉我们，对于这个问题目前争论颇多。可这并不妨碍它成为一个好的论题。于是，Nowack在其导师——同样来自于汉堡大学的Kathrin Dausmann，以及来自南非纳尔逊·曼德拉都市大学（Nelson Mandela Metropolitan University）的Nomakwezi Mzilikazi的协助下，决定对非洲婴猴（lesser bushbaby）开展研究。这种动物在休眠之后，总会碰到怎么热身苏醒的大难题。而Nowack就想看看它们是否具备利用非战栗产热来苏醒的能力。



首先，Nowack来到南非，用香蕉、蜂蜜和花生奶油等美食来诱捕婴猴。然后，她把抓到的婴猴置于室外的围栏中。在那儿，夏季的白日平均温度高达30℃，而冬天可降至-5℃。为了测试婴猴是否能够利用非战栗产热法，Nowack给它们注射了去甲肾上腺素。

结果发现，婴猴的耗氧量增加了，同时其体表温度升高了1℃——这是一个良好的信号，说明它们正在燃烧体内的脂肪。而在寒冬腊月，虽然婴猴总体上没有NST的异常增加，但Nowack确实发现，在短时段冷状态下，它们的NST能力有所增强，以此热身。而且，

当她把两只死于自然因素的婴猴进行解剖时，清楚地观察到遍布它们体内的褐色脂肪细胞沉积物。

Nowack的发现显然说明，至少非洲婴猴是可以利用非战栗产热来热身的。但是，由于它们在冬季中并没有发生总体性的NST增

加，因此很可能更多地是利用被动式加热法或者抱团式方法来热身。这样，无论用哪一种方法，婴猴或许都可以在全年期间进行休眠，而不需要像寒带动物那样，非得经历储存脂肪的阶段来增加其NST了。

原文检索：

Nowack, J., Dausmann, K. H. and Mzilikazi, N. (2013). Nonshivering thermogenesis in the African lesser bushbaby *Galago moholi*. *J. Exp. Biol.* 216, 3811-3817.



文佳/编译



慢病毒完整解决方案

-  **40,000**个现货克隆，即选即包，完全**免费**！
-  ORF表达克隆的病毒低至**8000**元；miRNA、shRNA克隆的病毒低至**3000**元！
-  滴度高达 **10^{10}** copies/mL！
-  最快**20**个工作日内送货！
-  已发表几十篇**高分文章**，详情见官网。

注：以上荧光图为真实实验结果图

A group of people are performing a human pyramid against a cloudy sky with a bright sun. The pyramid consists of four people standing on the ground, two on top of them, and one person at the very top. The text is overlaid on the center of the image.

合办专题专刊
网站广告合作
邮件群发推广

请致电 (020) 32051255

www.LifeOmicS.com
www.LifeOmicS.com