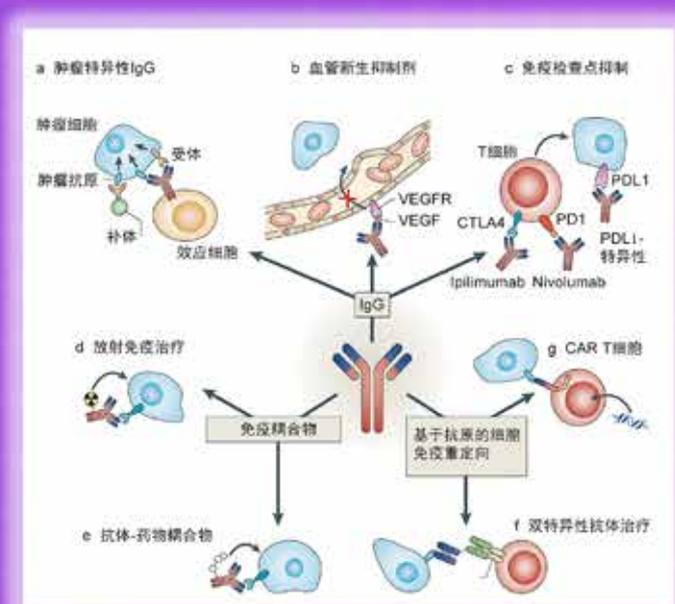


生命奥秘

LifeOmics

2016年 5月刊 总第85期



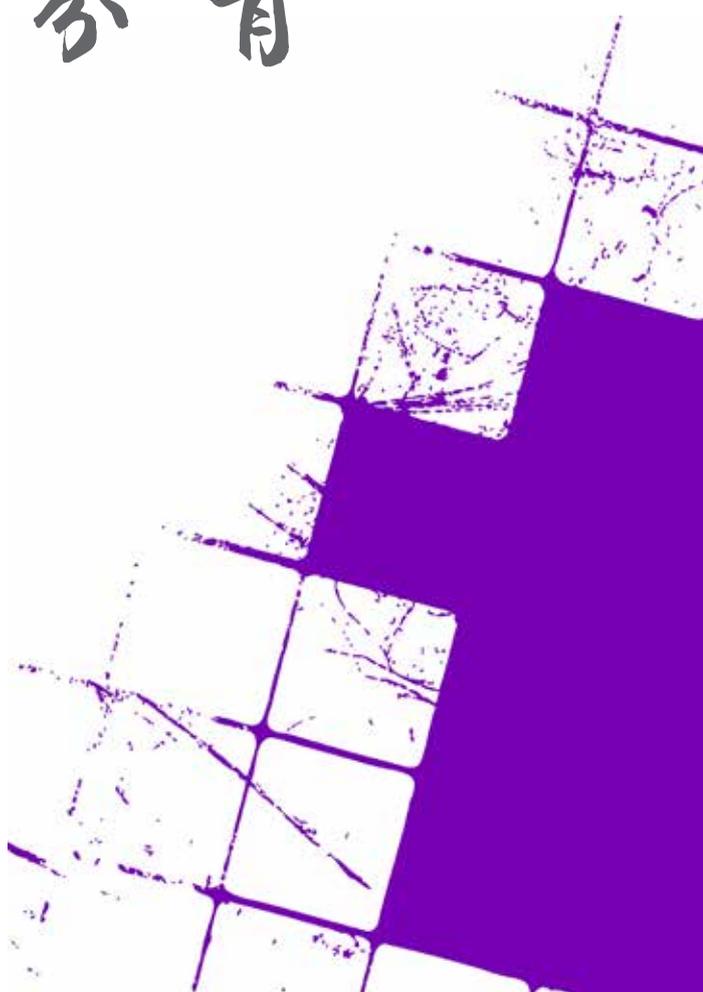
单克隆抗体癌症免疫疗法汇总

DNA也不靠谱

饮食能够改变鳗鱼的头型？



无奇不有
生命世界



解读生命
走进科学

目录 | CONTENTS

专题

单克隆抗体癌症免疫疗法汇总

前言	01
一、单抗癌症免疫疗法概述	02
二、靶向癌细胞	05
1. 单抗介导的细胞信号通路	05
2. 补体	07
3. ADCC	07
4. 单抗诱导的细胞毒性的互动机制	07
5. T细胞受体类似单抗	09
三、改变宿主响应	11
1. 抑制血管生成	11
2. T细胞检查点抑制	11
四、载带细胞毒性分子	12
1. 放射免疫	12
2. 抗体药物耦合物	13
五、重定向T细胞	14
1. 双特异性抗体	14
2. 嵌合抗原受体T细胞 (chimeric antigen receptor T cells, CART)	14
六、总结	15

下一期 (2016年6月刊) 预告: 生物医学大数据

下一期《生命奥秘》专题是《生物医学大数据》。现在对30亿DNA碱基对进行测序, 要比进行脑部扫描费用更低, 从而逐渐让我们获得了大规模的基因组数据, 但是, 如何才能将这些基因组数据转化成治疗方法呢? 生命科学家正在将基因组测序、实验室研究和病人档案中获取的大规模信息整合起来。对这些大数据的分析让我们逐渐步入精准医学时代——但是我们必须清晰地明白, 来自科学研究、工程技术和机构方面的挑战仍然存在。

热点

DNA也不靠谱	18
---------------	----

百态

饮食能够改变鳗鱼的头型?	25
高温有助于鲑鱼对抗缺氧	27

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

单克隆抗体癌症免疫疗法汇总

特约编辑：张洁, 女, 博士在读, 研究方向：神经生物学

前言

在过去的20年里，单克隆抗体（单抗，mAb）已成为癌症治疗的主要手段之一。但科学家们并不满足于此，仍在不断探索改进，以求发展出更好的基于单抗的癌症疗法。抗肿瘤单抗通过多种机制杀伤肿瘤，包括：直接针对恶性细胞、改变宿主体内应答、载带细胞毒性分子，以及重定向免疫效应细胞等。单抗的很多特性都能影响它的效力，这些特性包括抗原特异性、整体结构、与目标抗原的亲合力，以及抗体载带体系的构建形式等。这里我们将会介绍各种基于单抗的癌症疗法的特点、使用策略以及现有案例。

一、单抗癌症免疫疗法概述

200多年来，人们对抗体的认识，从细流汇聚成大海。而事实上，多克隆抗体在传染性疾病治疗上的运用也已有几十年历史了。在这里，我们首先介绍一些单克隆抗体和多克隆抗体的概念。单克隆抗体是由单一B细胞克隆产生的高度均一、仅针对某一特定抗原表面的抗体，简称单抗；而多克隆抗体则是由多种抗原决定簇刺激机体产生的、包含多种单克隆抗体的抗体，简称多抗。

1975年，Kohler,G和Milstein,C首次成功获得单克隆抗体（10年后，他们因这项工作获得诺贝尔奖）。随后，单抗很快就被公认为是一种独特的生物工具，并迅速成为病理诊断和基础科研的宝贵工具。由于单抗能与特定抗原表位特异性结合，因此很快被用于快速检测血细胞的分子表型，后来这一用途也被推广到器官上。通过抗体鉴别的分化抗原簇现在还在临床诊断上有广泛应用。单抗在免疫组织化学、流式细胞仪及相关技术中的运用也非常普遍。单抗问世时，人们认为它具有很大的治疗疾病的潜力——从理论上讲，单抗可以根据分子表型特异性地靶向肿瘤细胞。

然而，早期探索单抗治疗的临床结果却令人失望。20年前，一些专家甚至断言，基于单抗的癌症治疗注定无法成功。这是因为，临床上评估的第一个用于治疗癌症的单抗来源于小鼠。尽管有部分线索显示单抗治疗有可能成功，但由于单抗来自鼠源，来源问题限制了单抗的临床使用。一方面，鼠源单抗在人体内会

引起免疫响应，机体会很快将其清除掉；另一方面，鼠源单抗引起免疫系统特异性杀伤肿瘤细胞的能力相对弱。

幸运的是，研究人员没有轻易放弃，而是坚持不懈地努力探索。他们评估了多种策略，包括使用免疫球蛋白G（IgG）直接靶向癌细胞、改变癌症的宿主反应、对癌细胞释放细胞毒性物质，以及重定向免疫细胞对癌症的反应（表1）。

由于在人体内使用的鼠源单抗具有很高的免疫原性，因此，为了解决这一问题，科学家们通过基因修饰，实现了小鼠-人类嵌合抗体。而单抗免疫治疗的成功也由此开始。这种单克隆抗体和天然的人类IgG的免疫特性基本相同，不太可能被人体免疫系统识别为抗原，生命周期也和天然抗体接近（一般为2-4周），并能有效引起免疫系统对肿瘤的反应。病人可以定期服用这种单抗（一般是一周一次，或一月一次），并且使用数月后病人血液中的单抗含量足以起到有效治疗效果。单抗药物在血管内外都有分布，通过长时间在肿瘤内部与恶性细胞、淋巴细胞、基质细胞、良性淋巴细胞、胞外基质发生互动，从而杀伤肿瘤。

经过多年的研究，各种基于单抗的癌症治疗方法大获成功，研究者们也设想出了越来越多的治疗策略（图1）。现在基于单抗的癌症免疫疗法已成为癌症治疗的常规手段，而更多、更好的单抗疗法也正在酝酿中。

表1: 基于单抗的治疗方法

基于单抗的疗法	结构	目标抗原的特点	目前研究探讨的问题
抗肿瘤单抗	未修饰/经过修饰的IgG, 增强ADCC作用	肿瘤相关表面抗原	当IgG修饰后, 与Fc受体的亲和力增强时, 是否能增强治疗效果?
抑制血管新生	未修饰的IgG	控制血管新生的宿主分子	评价血管新生抑制剂疗效的最佳方式是什么?
T细胞免疫检查点抑制	IgG1 (阻断免疫检查点, 介导ADCC作用) 或IgG4 (阻断免疫检查点, 不引起广泛的ADCC作用)	抑制T细胞响应的分子	如何把免疫检查点抑制、其它免疫疗法以及抗癌药联合起来使用?
放射免疫疗法	未修饰的IgG或单抗片段	未覆盖的或血液中存在的肿瘤抗原	如何简化服用放射免疫药物的后勤问题, 从而增加它的临床适用性?
抗体-药物复合体	经过修饰的IgG, 通过可切割的衔接分子与药物连在一起	高度特异性的、与单抗结合时会内翻的肿瘤相关抗原	每个单抗和抗原对应的最佳药物和衔接分子组合是什么?
双特异抗体	肿瘤特异性的单抗, 能与T细胞结合, 激活T细胞	在抗原丢失的耐药型肿瘤中也存在的肿瘤抗原	有能改善双特异性抗体的药物动力学, 从而减少连续注射的方法吗?
嵌合T细胞抗原受体	通过插入编码单抗的DNA片段修饰T细胞	在抗原丢失的耐药型肿瘤中也存在的肿瘤抗原	这种治疗对实质瘤的效果怎么样? 对抗原表达相对低的良性细胞的损伤作用有多大?

注: ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity): 抗体依赖性细胞毒作用。



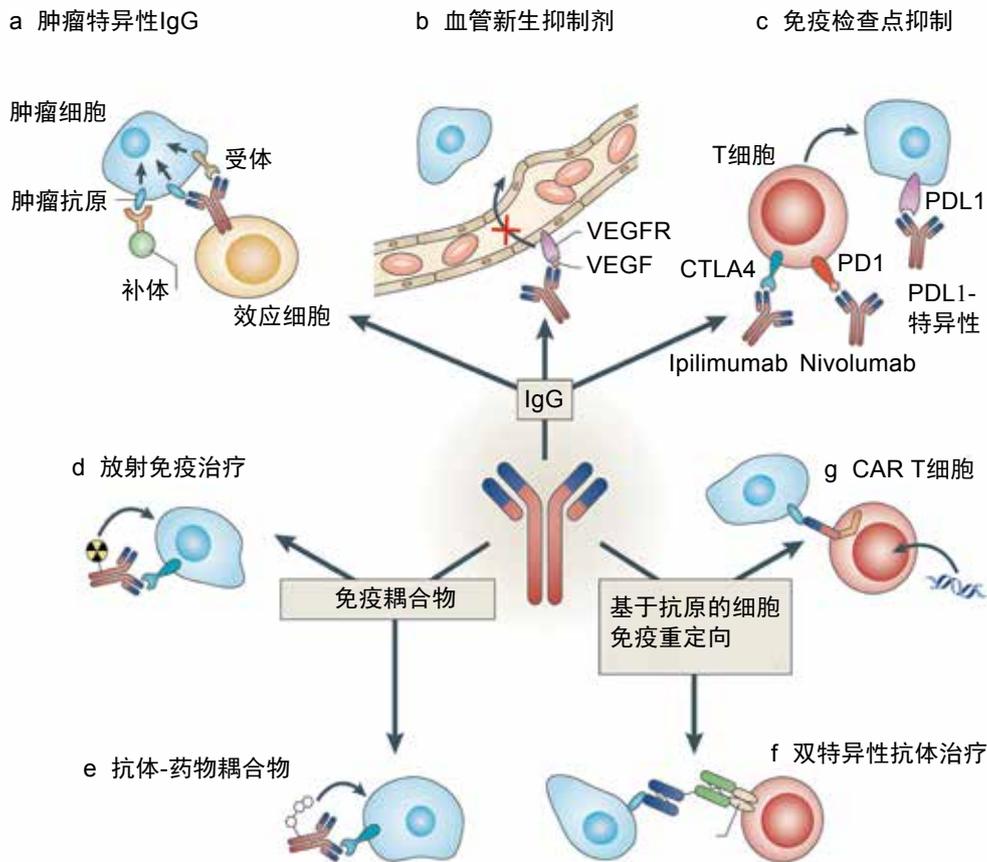


图1 基于单抗癌症免疫治疗策略。成功的单抗治疗可以使用的治疗策略非常多。(a) 与目标癌症细胞结合的IgG分子能通过免疫效应细胞实现抗体依赖性的细胞毒作用(ADCC)、诱导补体介导的细胞毒作用(complement-mediated cytotoxicity, CMC),或直接激活癌症细胞的死亡通路(例如利妥昔单抗rituximab和赫赛汀herceptin)。IgG单抗也能用于抑制血管新生(例如贝伐单抗bevacizumab)(b),或阻断免疫抑制通路(c),从而增强T细胞的抗肿瘤响应(如伊匹单抗ipilimumab和纳武单抗nivolumab)。放射免疫偶合物(d)(例如I tositumomab 和ibritumomab tiuxetan)把化疗药物靶向性释放到癌症细胞处,而抗体-药物偶合物(e)(例如brentuximab vedotin 和 trastuzumab emtansine)能把高毒性药物靶向性递送到癌症细胞。双特异性单抗一端可识别肿瘤细胞,一端可激活免疫细胞(f)(例如blinatumomab)。也可以通过转基因把单抗可变区的DNA与T细胞的信号肽融合在一起,形成靶向肿瘤的嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor (CAR) T cells)(g)。CD3(T cell surface glycoprotein CD3 ϵ -chain): T细胞表面糖蛋白分化簇3链;CTLA4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4): 细胞毒T淋巴细胞相关抗原4;PD1: 程序性死亡蛋白1;PDL1: 细胞程式死亡配体1;VEGF(vascular endothelial growth factor): 血管表皮生长因子;VEGFR: 血管表皮生长因子受体。

二、靶向癌细胞

单抗已被用于靶向多种癌细胞表面抗原。合适的癌细胞表面抗原需要符合以下几条标准：在恶性细胞中表达一致性强、表达密度高；在重要的良性细胞中表达低；出现该抗原阴性突变肿瘤细胞的概率低；以及抗原的可溶性靶标少。同时抗原的选择还综合考虑单抗构建系统、肿瘤类型（例如实质瘤和血液瘤）以及单抗药物的作用机制等因素。

体外模型和动物模型的数据表明，一些靶向恶性细胞表面抗原的单抗能通过跨膜信号通路直接诱导细胞凋亡。也有证据表明，单抗能通过诱导补体介导的细胞毒作用（CMC）和抗体依赖性细胞毒作用（ADCC）来杀伤靶细胞。目前研究者们急需解决的一个问题就是确定不同临床实验中哪种机制起到最主要的作用（图2）。

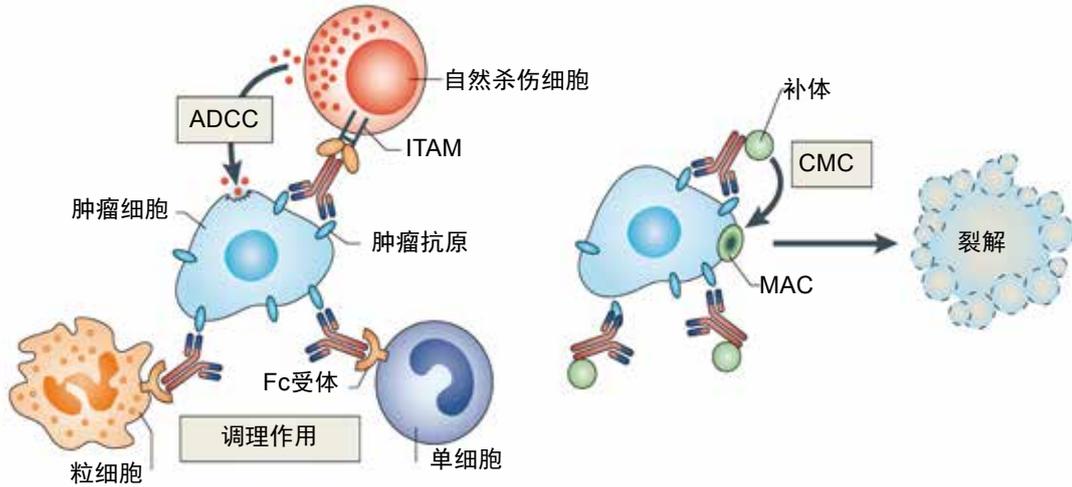
1. 单抗介导的细胞信号通路

一些单抗在没有免疫效应机制时，在体外也能杀伤肿瘤细胞。这种杀伤效果很大程度上取决于单抗、靶抗原和靶细胞的类型。体外实验评估一个给定单抗是否能够通过信号通路诱导细胞死亡，有时需要二抗交联，如针对IgG的二抗交联，从而增强受体的聚集，产生更强的信号，便于实验检测。这一体外模型并不一定能代表体内的真实情形，体内与恶性细胞结合的单抗可能通过IgG的恒定区与肿瘤微环境中多种细胞的Fc受体的结合来实现受体交联。此机制仍存在一些疑问：实验中二次交联加速和增强了单抗的信号作用，但临床上单抗是否无法达到这样的效果？或者相反，单抗的信号作用太强，可能会引起一些对临床疗效无关的变化？

由于体外环境和临床环境存在很大差别，在解读体外信号通路检测结果时必须非常谨慎。体外研究中通常选用可以快速增殖、稳定传代的细胞株——这与正常的细胞生长完全不同。其可能会影响细胞对多种信号的敏感性，而使用从病人身上获得的原代细胞抗原能解决这个问题。然而，原代细胞的培养需要诸多预处理，包括切碎、过滤和洗涤。这些操作会引起微环境的变化，改变细胞的生长特性，在没有药物处理的情况下，也会激活凋亡通路。体外信号通路检测通常的时间范围是分钟到小时，而临床效果检测则是以周和月为周期。尽管有这些缺陷，体外检测信号通路诱导的凋亡已成为分析单抗的信号通路作用的常用方法。

但即使已知一个单抗能影响信号通路，并且在临床上有效，也很难用体外实验来验证单抗是否能阻断那些维持癌症细胞存活的活化配体与癌症细胞的结合，抑制受体二聚化，从而阻断激活信号或与受体交联诱导凋亡信号，直接杀伤靶细胞（图2b）。如trastuzumab和pertuzumab之类的单抗能识别多种受体家族，其中对ERBB酪氨酸激酶受体家族及其配体的研究最为广泛。ERBB受体家族成员有多个配体，单抗能改变它们的二聚化。单抗靶向的二聚体是同质还是异质还会影响其信号通路性质。了解这种复杂性远不只是一个学术问题，它对新药物，包括单抗药物的研发和临床试验都有着重大影响。一些癌症细胞会通过激活补偿通路，产生小分子抑制剂抵抗，形成耐药肿瘤。通过信号通路杀伤肿瘤的单抗药物也可能遇到同样的耐药问题。与小分子抑制剂疗法一样，单抗免疫疗法也能通过与其它疗法的联用来克服耐药问题。

a 肿瘤特异性IgG的免疫调节作用



b 肿瘤特异性IgG的直接作用

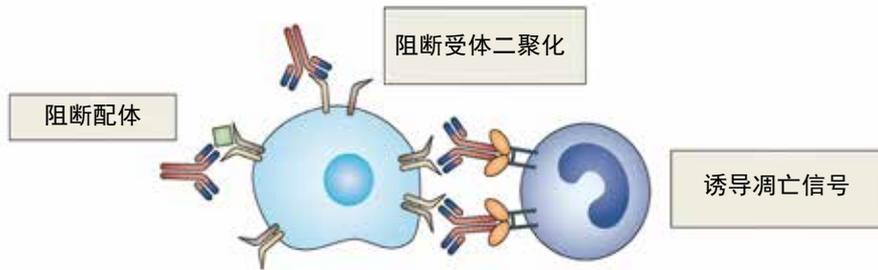


图2 靶向癌细胞单抗的作用机制。直接与癌细胞结合的单抗能通过多种机制杀伤肿瘤。这些机制经常通过体外模型确定，但其在临床单抗治疗中的具体作用难以确定。(a) 单抗可通过那些表达酪氨酸活化基序 (tyrosine-based activation motifs, ITAM) 免疫受体的免疫效应细胞，如自然杀伤 (NK) 细胞、单核细胞、巨噬细胞和粒细胞，实现抗体依赖性细胞毒作用 (ADCC)。固定补体可以触发靶细胞的调理作用 (opsonization)，从而增强单核细胞和粒细胞的吞噬和裂解作用。补体介导的细胞毒作用 (CMC)，可以直接诱导膜攻击复合物 (membrane attack complex, MAC) 的形成，从而直接导致靶细胞死亡。(b) 单抗也可以通过阻断那些维持癌症细胞存活的活化配体与癌症细胞的结合，抑制受体二聚化，从而阻断激活信号或与受体交联诱导凋亡信号，直接杀伤靶细胞。当一个单抗与表达Fc受体的细胞结合时，增强受体交联。受体交联：抗体可通过其本身的Fc段与B细胞表面的Fc受体结合，而抗体的Fab段可与抗原表位结合，从而介导FCR和BCR的交联，启动抑制性信号，控制B细胞活化和抗体产生，从而发挥副调节作用。

2. 补体

早在一百多年前，就有增加补体能增强抗体介导的细胞溶解能力的实验结论。当时，人们对抗体和补体的了解都非常少，该实验的目的是评估眼镜蛇毒对红细胞和细菌的裂解效果。此后，研究者们对补体的了解越来越多，尤其是补体对单抗治疗效果的增强方面。现在已知的是一些（但不是全部）单抗可介导CMC作用。补体存在的情况下，特定单抗诱导CMC的能力部分依赖于抗原的浓度、细胞膜上抗原的朝向，以及细胞表面抗原是以单体还是聚合物形式存在。CMC作用也取决于单抗的类型和靶细胞的特征，包括靶细胞是否表达补体中和分子。即使是靶向相同抗原的同一类单抗，固定补体的能力也可能不同。I型人IgG1 CD20特异性单抗（例如，利妥昔单抗rituximab）可交联CD20四聚体，同时固定补体。相比之下，II型IgG1 CD20特异性单克隆抗体（如obinutuzumab）既不交联四聚体，又不结合补体。研究人员利用抗体工程技术，改变抗体恒定区的序列，或改变单抗的糖基化，从而控制抗体的多种特性，如固定补体的能力（图3）。

许多探索CMC的研究以血清作为补体的来源，这显示了血液中CMC的重要性。的确，针对血液肿瘤的单抗药物主要依赖CMC作用来杀伤肿瘤——因为血液中的肿瘤细胞暴露于补体之中。然而，补体与靶细胞结合，不一定会导致靶细胞的裂解。当CD20特异性的单抗结合到血液中的慢性淋巴细胞白血病（CLL）细胞上，并有补体参与结合时，抗原—单抗—补体复合物在经过肝脏和脾脏时，可能从CLL细胞表皮剥落，这个过程被称为胞啃作用，由表达Fc受体的单核细胞执行。胞啃作用导致循环中的恶性细胞暂时丢失抗原，从而躲过靶向该抗原的单抗。血管外液体中的补体浓度并不明确，有可能不足以诱导CMC。一般认为，在血管外的肿瘤，也就是实质瘤中，CMC的作用有限。

3. ADCC

单抗可通过结合Fc受体诱导ADCC。Fc受体在多种免疫效应细胞，包括自然杀伤（NK）细胞、粒细胞、单核细胞和巨噬细胞中广泛表达（图2）。部分效应细胞同时表达Fc受体和免疫受体酪氨酸活化基序（ITAM）。ADCC的发生机制如下：单抗与靶细胞结合，然后与Fc受体互动，信号传递到ITAM，从而激活效应细胞。一些细胞表达免疫受体酪氨酸抑制基序（ITIM），可以抑制ADCC。单抗包被的靶细胞可诱导表达Fc受体的免疫效应细胞产生和释放细胞因子。这些细胞因子可以激活肿瘤微环境中的其它免疫效应细胞。因此，一方面，单抗可通过Fc受体激活免疫细胞，直接诱导ADCC；另一方面，单抗可诱导免疫细胞释放细胞因子，控制肿瘤生长。

4. 单抗诱导的细胞毒性的互动机制

越来越多的证据表明，单抗抗肿瘤的多种机制之间存在广泛互动，既有协同互动，又有拮抗互动。研究者设计单抗时，可能只设想了一种机制，但其它机制可能也起到了重要作用。补体结合的效果十分复杂。一方面，CD20特异性单抗利妥昔单抗和ofatumumab以及CD52特异性单抗alemtuzumab，能在体外迅速杀伤靶细胞；另一方面，补体结合可以阻断单抗与NK细胞上Fc受体的互动，从而减轻ADCC。因此，在某些情况下，补体结合可能可以诱导CMC，增强单抗疗效。但另一些情况下，补体结合又能阻断ADCC，降低单抗效果。单抗与靶细胞结合产生的信号可以改变靶细胞的ADCC敏感性。至少在临床前模型中，单抗诱导的癌细胞裂解，能导致靶抗原摄取和随后的细胞（如树突状细胞）交替呈递的增强，因此增强免疫响应。表达Fc受体，但不表达激活基序（即ITAM）的恶性B细胞可能会正面促进单抗的抗肿瘤效果。无论B细胞特异性单抗是通过可变区与靶抗原结合，还是

与同一细胞或邻近恶性细胞的Fc受体结合，这些Fc受体都能促进B细胞特异性单抗的自分泌交联。

靶抗原在癌症细胞表面的表达水平要足够高，以至于其一旦单抗与靶细胞结合，就能引发一个或多个效应机制。同时，该抗原在重要的良性细胞上的表达相对要低，如果是可溶性抗原，在血液中的浓度也要相对低，尽量减

轻副作用。尽管部分学者认为，大部分能被未修饰的IgG有效靶向的抗原都已被发现，但研究者们仍在努力探索新的肿瘤相关抗原。研究者们也通过赋予抗体新特性来提高现有直接靶向癌细胞的IgG的药效，例如通过HER2单抗（阻断受体异源二聚化）和修饰IgG恒定区，来增强单抗和免疫系统的互动（图3）。

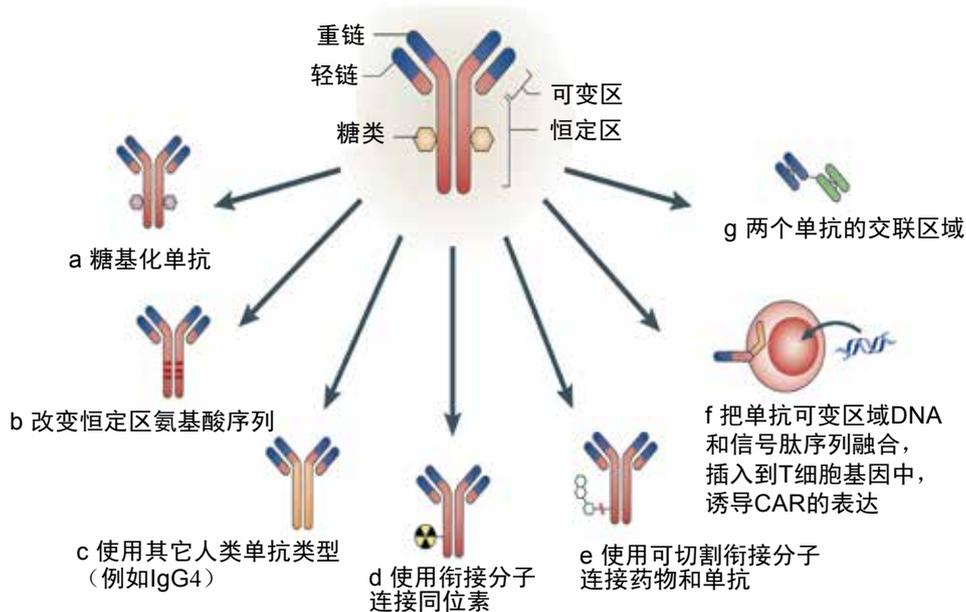


图3 修饰单抗结构。研究者们可以根据需要的作用机制来修饰单抗的结构。IgG1是诱导抗体依赖性细胞毒作用（ADCC）最强的天然人类IgG。糖基化单抗（a）（如obinutuzumab）增强了单抗与IgG Fc受体（Fc γ Rs）的结合能力，从而增强ADCC。岩藻糖基化单抗由缺乏岩藻糖基化酶的细胞株产生。Obinutuzumab等抗体修饰了Fc端氨基酸序列（b），增强了结合Fc γ Rs的能力，从而增强了ADCC。如果不想产生ADCC作用，可以选择IgG4。IgG4（c）单抗诱导ADCC的能力比IgG1弱。Nivolumab就是一种IgG4单抗，作用机理是阻断T细胞上程序性细胞死亡蛋白1（PD1）的作用。生产放射免疫治疗单抗需要把放射性元素与单抗连接起来。一个稳定的连接分子（d）需要尽量减少放射性同位素的泄露。相反，最佳的抗体药物偶联物（antibody-drug conjugates, ADC）则需要可切割的衔接分子（e）。为了避免非特异性毒性，理想的ADC药物的毒性最好是癌细胞特异的，只杀癌细胞，对其它细胞的杀伤能力较弱。ADC常用的衔接分子是PH敏感的，或是可通过酶切割的。嵌合抗原受体T细胞（CART细胞）从单抗可变区获得特异性，是一种基因治疗，而非蛋白治疗。CART细胞的产生来源于单抗可变区域的DNA编码序列与编码T细胞信号肽的基因的融合（f）。双特异性抗体需要移除单抗的功能恒定区，从而确保抗体不会发生非特异性的交联，避免激活T细胞（g）。由于缺乏功能恒定区，双特异性单抗的半衰期较短，从而需要持续注射，保持有效的药物浓度。

增强单抗与免疫系统互动的的方法包括改变氨基酸序列或改变IgG糖基化模式、增强IgG与效应细胞上Fc受体的互动。体外试验证明，这种修饰，可以提高单抗疗效。临床试验表明，这种修饰似乎是安全的。最近美国食品和药物管理局（FDA）批准糖基化单抗obinutuzumab用于治疗慢性淋巴细胞性白血病（Chronic Lymphocytic Leukemia, CLL）。Obinutuzumab具有一些独特的特性，例如它与靶抗原CD20的交联方式。但目前IgG糖基化对实际临床效果的影响还不明确。也有研究探索基于其它抗体亚型，如IgA单抗的临床前景。这些药物有一些有趣的特

性，但尚未进入大规模临床研发阶段。

5. T细胞受体类似单抗

许多肿瘤相关抗原在肿瘤细胞表面不表达，于是出现了一种靶向人类白细胞抗原（human leukocyte antigen, HLA）分子上的多肽的单抗。这种单抗识别PR1和WT1等来自胞内致癌蛋白的多肽。这些单抗是HLA-限定的（只能结合来自特定HLA基因型患者的细胞表面抗原），目前还处于研发初期；然而，此类单抗的发现意义重大——扩大了潜在的靶向分子范围。



资讯 · 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）。

岗位职责：

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、改变宿主响应

1. 抑制血管生成

早在上世纪70年代，Folkman, J等人就提出假设，肿瘤的生长需要新生血管，肿瘤产生的促血管生成因子刺激血管的新生。研究者们已经发现了多种能刺激内血管生长的物质，包括血管内皮生长因子（VEGF）。单抗（包括贝伐单抗）的作用机制就是阻断VEGF，从而抑制新血管生长（图1）。血管新生被抑制后，由于缺乏氧气和营养，肿瘤生长减慢。血管生成抑制剂不直接靶向肿瘤，而是通过抑制癌细胞的生长，并非通过杀伤肿瘤来抗肿瘤，因此一般都会和其它细胞毒性药物联用。这种方法的一个重要优势是，它不依赖于一个特定的靶抗原的表达，而是基于VEGF在新生血管形成的作用，掐断肿瘤的氧气和营养供给。在多种癌症，包括结肠癌、肺癌、乳腺癌、肾癌、脑癌和卵巢癌的临床试验中，贝伐单抗已被证实有效。

由于抑制血管新生的效果并不是直接杀伤肿瘤，因此评估疗效比较麻烦。评估大多数抗癌药物的疗效的标准方法是肿瘤体积缩小鉴定。有文献指出，血管生成抑制剂可能会暂时缩小肿瘤体积，但对恶性细胞的生长没有显著的影响。因此，一些专家认为，血管生成抑制剂的疗效评价应基于整体的生存期而非肿瘤体积缩小。目前这类争论仍在继续。

2. T细胞检查点抑制

经过数年对T细胞免疫调控网络的研究，研究者们发现，配体和受体的共调控对抗原特异性（和肿瘤特异性）的T细胞激活和抑制起到关键作用。这种精确控制确保了免疫系统对抗原保持响应的同时，又不会发生过度激活。在过去的十年中，研究者们研发了能干扰T细胞抑制信号的单抗。这些单抗被称为检查点

抑制单抗，它们可以延长T细胞激活的时间，增强T细胞介导的裂解作用（图1）。在癌症中，这种抗体可以诱发更强大的、持续的T细胞抗肿瘤反应。

细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4（CTLA4；又称CD152）是活化T细胞表达的、负调控T细胞激活的受体。CTLA4和其它T细胞的负调控因子能减轻T细胞的活化程度，从而抑制过度激活，避免自免疫等情况。但对于抗肿瘤来说，这种抑制会减轻T细胞对肿瘤的杀伤作用。阻止这条负调控通路有望增强和维持肿瘤的免疫响应，事实证明的确如此。伊匹单抗，一种阻断CTLA-4的单抗，已通过FDA批准，可用于治疗黑色素瘤。伊匹单抗能产生强劲而持久的临床反应。研究者们正在探讨伊匹单抗的各种使用方式，包括单用或联用。由于伊匹单抗能增强T细胞反应，与能诱导抗原释放的疫苗或药物联用可能有非常好的效果。检查点抑制单抗也有一些缺点，最典型的的就是会引发自身免疫疾病。

另一些单抗则作用于另一条T细胞调控通路——程序性细胞死亡蛋白1（PD1）受体—PD1配体1（PDL1）轴，并且也取得了喜人的成果。一些单抗与配体结合，另一些则与受体结合。早期临床试验中，这两种方法的效果都不错。我们确信在未来的几年中，这些方法还会进入后期临床试验，得到更多成果。事实上，FDA最近批准了两个PD1特异性单抗（pembrolizumab和nivolumab），以用于治疗黑色素瘤。一种针对PDL1的单抗在早期临床试验中取得了惊人效果，被FDA评为“突破性疗法认定药物”。CTLA4从头调节免疫反应，而PD1—PDL1轴对T细胞免疫反应的调控效果更强。因此，尽管都是免疫检查点抑制疗法，CTLA4单抗和PDL轴单抗的毒性和药效

可能是不一样的。例如，部分对CTLA4单抗治疗无响应的黑色素瘤患者却对PD1单抗产生响应。尽管免疫检查点抑制会引起自身免疫的问题，CTLA4和PD1的联合研究仍具有重大意义。

最近科学家们发现，在霍奇金淋巴瘤中，PD1-PDL1轴起到极其重要的作用——里德-

斯德伯格氏细胞能表达PDL1和PDL2，从而关闭T细胞响应。这解释了几十年来一直困扰血液学家的一个问题：恶性里德-斯德伯格氏细胞是如何在被良性免疫细胞包围的情况下存活的。早期临床试验表明，PD1单抗对于复发或难治性霍奇金淋巴瘤疗效显著。

四、载带细胞毒性分子

自从Paul Ehrlich（1908年的诺贝尔生理学或医学奖得主，著名的研究包括血液学、免疫学与化学治疗，成功预测了自体免疫的存在）把抗体称为“魔法炸弹”后，免疫学领域就常用军事词汇进行比喻。近年来，载带细胞毒性分子进入肿瘤细胞的单抗被称为“智能炸弹”。单抗成功载带的细胞毒性分子多种多样，它们包括放射性分子、细胞毒性小分子和免疫系统的细胞因子（图3）。

1. 放射免疫

用¹³¹I治疗甲状腺癌是第一个高度有效的肿瘤靶向治疗，其成功得益于甲状腺对碘元素的特异性吸收。¹³¹I会发射β粒子，还发出少量的γ辐射，可用于诊断（成像）和治疗。这一成功引起了研究人员探讨各种载带方法，包括抗体，来靶向运输放射性同位素到癌症细胞。在单抗技术还未问世前，研究者们曾尝试使用多抗载带放射性元素治疗癌症。Order, S. E.等人使用人铁蛋白免疫各种物种（包括兔、猪、猴、牛），获得多抗。用¹³¹I标记从这些动物体内提取的抗血清来治疗铁蛋白受体表达水平高的肿瘤患者。结果显示该药物确实能靶向肿瘤，但多抗药物的疗效不显著，而且暴露了多个问题，例如抗血清的一致性和质量控制问题、宿主体内对外来蛋白的免疫响应等问题。

单抗技术解决了部分问题，并重燃了学界对放射免疫治疗的兴趣。然而，难题仍然存在，放射免疫治疗的临床应用依然有限。当正常组织非特异性摄取了药物，或药物随着血液循环时，放射性同位素不断衰减，从而会对正常组织造成辐射损伤。骨髓对辐射非常敏感，并且很容易受血液中的放射性元素抗体复合体的影响。由于肾脏和肝脏负责清除药物和放射性同位素，这两个脏器受到的辐射最大。即使是靶向性最好的药物，最后也只是一小部分（通常为0.01–0.001%/克肿瘤）的注入剂量会停留在肿瘤中。因此，缩小放射免疫治疗的治疗窗需要谨慎选择单抗、放射性同位素和衔接分子。过去25年的经验告诉我们，针对实体肿瘤的放射免疫药物在诊断上是有用的，但由于肿瘤的耐辐射性，放射免疫治疗疗效有限。目前在中国，某个靶向坏死肿瘤细胞的放射单抗已被批准用于临床。而某些研究则正在评估放射免疫治疗与化疗联用的效果。

淋巴瘤非常适合使用放射免疫治疗，这是因为淋巴瘤具有高度特异性的靶抗原，且放射敏感性低。替伊莫单抗和托西莫单抗已被FDA批准用于治疗淋巴瘤。它们都是CD20特异性单抗，但使用的同位素不同（替伊莫单抗使用⁹⁰Y和托西莫单抗使用¹³¹I）。两种药物的剂量和药代动力学不同，但其临床疗效和毒性作用是相似的。尽管淋巴瘤放射免疫治疗的临床疗

效明显，且毒性相对小，但该方法的临床使用仍然非常有限。原因似乎是放射免疫治疗药物复杂的物流要求（放射性药品辐射安全管理非常复杂，需要有经验的核医学医师），而同时新出的一些淋巴瘤药物的管理要简单得多。近期的研究正在探索淋巴瘤放射免疫治疗的相关问题，包括治疗时机（诊断与复发）、适用的淋巴瘤类型（对滤泡性淋巴瘤最有效）以及如何与其它治疗方法（包括骨髓移植和新药）联用。

目前研究者们也正在尝试使用新的放射性同位素，如 α 辐射体。 α 辐射体的优点是，电离辐射范围小（辐射范围仅为几个细胞直径），因此可以降低对周边良性细胞的辐射损伤。这种高度特异性的辐射非常适用于治疗没有地理隔离、但对辐射高度敏感的恶性肿瘤，如白血病。这些放射性同位素的生产和管理非常复杂，因为它们半衰期短，部分元素的生产还需要回旋加速器，如 ^{211}At 。然而，并不是所有的 α 辐射体的半衰期都短。 α 辐射体的初步临床前和临床结果非常有趣，大量相关研究也正在进行中。

2. 抗体药物耦合物

上世纪70年代和80年代，许多研究人员开始开发和测试由单抗和强效蛋白毒素（如蓖麻毒素、铜绿假单胞菌外毒素和白喉毒素）结合而成的免疫毒素。免疫毒素耦合物的作用机制是：与癌细胞的表面抗原结合，药物通过内吞作用进入细胞，运输至细胞内作用靶点，从而杀死细胞。药物需要修饰，除去部分能与正常细胞非特异性结合的基团，以确保细胞的靶向和吸收由单抗控制。初步研究利用蛋白质连接技术来连接单抗和毒素，如使用异双功能试剂。随后的工作则使用重组技术。这些药物非常有效，但蛋白毒素的免疫原性和非特异性结合会带来很大副作用，因此制约了免疫毒素的发展。

研究者们把免疫毒素研究中学到的重要经验教训应用到了抗体药物耦合物（antibody-

drug conjugate, ADC）的研发和测试上。目前抗体药物耦合领域前景无限。ADC结合了药物的毒性和单抗的特异性，因此克服了毒素的非特异性和单抗的特异但无效的问题。ADC的靶抗原和单抗与其它未标记单抗的选择标准不同。与普通单抗药物相比，ADC靶向的肿瘤抗原的表达水平不需要那么高。这是因为几个ADC分子携带的高毒性毒素足以杀死细胞。目前来讲，只有少数毒性药物能够达到只要胞内有几个分子就足以杀死细胞的这一要求。内在化（毒性分子进入细胞）也非常重要。未标记的单克隆抗体不需要进入细胞，只需要停留在肿瘤细胞表面，帮助免疫细胞识别靶细胞。但对于ADC，只有内在化，毒性药物才能释放到胞内，发挥毒性作用。

ADC使用的毒性分子是小分子而非蛋白毒素，以此降低免疫原性。ADC使用的小分子包括卡奇霉素（能与DNA小沟结合，导致DNA链断裂）；单耳他汀E（monomethyl auristatin E，阻止微管蛋白聚合）；美坦辛（抑制微管的组装）以及pyrrolobenzodiazepines（诱导DNA的交联）等强效药物。这些都是非常有效的药物；事实上，其中的一些药物曾被看作是非常杰出的化疗药物，但可惜未被批准进入临床，因为这些药物即使在低剂量情况下，毒性依然很强，副作用太大。连接抗体与药物的衔接分子至关重要。衔接不能影响单抗的特异性，还要确保当药物和单抗结合在一起时能稳定在血液中循环，没有毒副作用。同时，当ADC与靶抗原结合后，药物能进入细胞，发挥作用。衔接分子包括硫化物、胺、肽和硫醚。一些衔接分子是可切割的，另一些则不能，这主要是由单抗的性质和毒性药物在细胞内的特定分布决定的。

与放射免疫药物一样，ADC似乎对淋巴瘤特别有效，同时ADC也显示出了对实质肿瘤的治疗效果。Brentuximab vedotin（淋巴瘤药物）和曲妥珠单抗（ado-trastuzumab

emtansine, 乳腺癌药物)是首批通过FDA认证的ADC药物。ADC领域在迅速扩大,目前有30多个ADC处于研发或临床试验中,其中部分ADC的初步结果非常喜人。ADC领域目前处于起步阶段,一系列重大进步,如新的ADC设计和对使用方式的理解,正在发酵中。

一种既能靶向癌细胞,又能改变肿瘤微环境的药物是单抗-细胞因子耦合物。这种耦合物一方面能通过单抗的直接效应杀伤细胞,

另一方面可以递送白介素-2或粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)等细胞因子来抗肿瘤。这方面最突出的研究是基于神经节苷脂GD2的单抗-细胞因子耦合物,该药物主要用于治疗神经母细胞瘤,疗效显著。这种药物的改进版本减少了补体结合,降低了神经毒性,在早期临床试验中效果显著。

五、重定向T细胞

肿瘤免疫学告诉我们,T细胞免疫是许多癌症免疫排斥的关键。T细胞和靶细胞形成耦合物是细胞介导的细胞溶解的起始步骤。T细胞表面受体的激活,会诱发杀伤肿瘤细胞的毒性反应。研究者们通常使用两种方法把单抗的特异性与T细胞的免疫响应结合在一起,增强肿瘤的免疫排斥。这两种方法的目的都是绕过T细胞表面受体识别肿瘤表面抗原的过程,直接重定向大量T细胞,使其靶向肿瘤。

1. 双特异性抗体

第一种方法是创造一种双特异性抗体分子,使其一端包含靶向肿瘤细胞的单抗,另一端包含能激活T细胞、NK细胞等免疫细胞表面受体的分子。大多数双特异性抗体都靶向T细胞表面糖蛋白CD3 ϵ 链(分化簇3)。这并不是一个新概念,但前期研发和临床实验的经验以及技术进步都大大推动了双特异性抗体的发展。例如,早期的研究表明,具有完整Fc的双特异性抗体会非特异性地激活T细胞,导致很强的副作用。较小的、缺乏Fc的双特异性分子半衰期短,需要连续输注,但这些分子非特异性免疫激活较少。最近双特异性单抗blinatumomab的临床试验效果良好,通过了

FDA认证。其它双特异性抗体正在开发中,这些抗体包括一些结构不同、半衰期相对长,以及不需要持续输注的双特异性单抗。

2. 嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T cell, CART)

基于单抗的癌症免疫治疗领域中又一个有志者事竟成的例子是CART细胞的研发。研究者们经过几十年的努力,终于获得了如今的嵌合抗原受体T细胞。CAR T细胞包含特异性抗体可变区和T细胞激活的基序,基因修饰后会表达特定抗原的靶细胞产生响应。几十年来,研发者们一直努力探讨不同的抗原特异性复合物构建和把构建物融合到T细胞的方法。近期临床试验表明,一些新的CAR T细胞疗效非常显著。但问题是,这些CAR T细胞大批激活T细胞,释放大量细胞因子,形成“细胞因子风暴”,会带来较大的毒性作用。但幸运的是,这种毒副作用越来越可控。与其它肿瘤免疫疗法不同的是,CAR T细胞的抗肿瘤效果是持续的,不需要连续用药,因为CAR T细胞会分裂,形成的子细胞也具有肿瘤特异性。

事实上,研究者们发现,很多病人体内存在寿命较长的CAR记忆T细胞。这种记忆反

应既有利处，也有害处。一方面，记忆响应会带来长期的临床反应，带来长期的疗效。另一方面，这样的长期记忆响应会造成表达该靶抗原的细胞（不一定是肿瘤细胞）的长期、甚至永久性的缺失。在B细胞恶性肿瘤的情况下，长期缺乏良性的、表达CD19的B细胞造成的副作用还在可接受范围内。但问题是，大多数肿瘤抗原的特异性都远不如CD19，这意味着，即使一个重要脏器有非常低的靶抗原表达水平，CAR T细胞都会对这个脏器产生长期毒副作用。因这种毒副作用也限制了CAR T细胞适用的肿瘤类型和肿瘤数目。

双特异性抗体和CAR T细胞各有利弊。双特异性抗体不需定制，一旦出现自身免疫毒

性，就可以停止用药。这就对医疗工作者提出了能力要求。CAR T细胞需要为个人量身定制，这样可以增强肿瘤杀伤效果，形成长期的抗肿瘤免疫响应。这两种方法都可以快速激活大量T细胞，使其与大量表达靶抗原的细胞发生互动。大量细胞因子释放，形成“细胞因子风暴”，可能会导致一个破坏性的生理效应，包括心血管崩溃。细胞因子的危险可通过停止使用双特异性抗体来减轻，或使用含有抗细胞因子的单抗，如IL-6特异性CAR T细胞来阻断。随着CAR T细胞经验的积累，研究者们已经发展出一些防治这种并发症的方法。若想要确定这两种治疗方法在治疗癌症上的相对疗效、毒性和价值，还需进一步研究。

六、总结

距首次以未修饰的鼠单克隆抗体作为抗肿瘤药物至今，已经过去几十年了。在这几十年里，癌症单克隆抗体治疗取得了跨越式的发展。各种各样的基于单克隆抗体的策略已被证明在癌症患者治疗上是有效的，这些策略包括：未标记的、直接与癌细胞结合的IgG、改变宿主对肿瘤的应答的单抗、把细胞毒性分子定向输送到癌症细胞的免疫偶联物，以及利用单克隆抗体的特异性重定向免疫细胞的单抗药物。这些方法的成功得益于研究者的奉献和坚持。

事实上，基于单克隆抗体的癌症免疫疗法

得到了公共和私营部门前所未有的大力投资，该领域的进步速度也是空前的。最近免疫检查点抑制、单抗药物耦合物、CAR T细胞和双特异性抗体的进展巨大，临床结果十分喜人。不断推出的新疗法，对生物机制的深入理解，以及来自于临床试验和FDA认证药物使用的临床经验，这些都推动着单抗疗法的跨越式发展。随着基础、转化和临床研究的进展，在未来几年里，我们还会看到更好的抗肿瘤单抗出现。此外，还有一类研究非常重要：如何最好地使用这些药物，单用还是联用等，以更好地服务病人。

原文检索：

George J. Weiner. (2015) Building better monoclonal antibody-based therapeutics. *Nature Reviews*, 15: 361-370.

<http://wenku.baidu.com/link?url=0jgYMuM4KSIOQmD40SakfqJwX-PA0N0grtYZV0Je9RVIWh37oVQWLCx-Xg54XAeBelkH50IudHXdmjBG4AIGA-WNtFaUhwttiCpWOMGHUW>

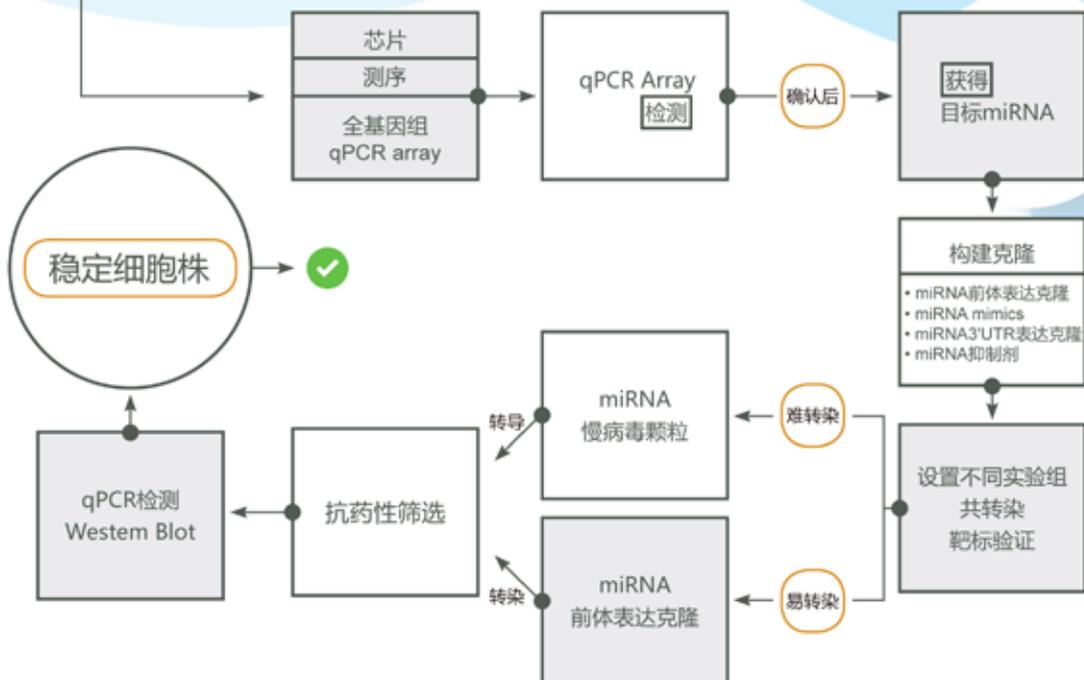
miRNA研究整体解决方案

专为您打造miRNA研究 经典实验思路

遇到以上问题，找 GeneCopoeia！它提供从miRNA表达量检测、靶标预测、克隆构建、靶标验证、慢病毒包装到稳定细胞株筛选的一站式服务，并且可根据您的研究需求设计专属的实验方案。

您是否遇到了以下问题？

- ▶ miRNA靶标预测后无从下手
- ▶ 克隆构建耗费太多时间，却仍无结果
- ▶ 病毒包装了一遍又一遍
- ▶ 苦于寻找一家有技术实力、经验丰富、价格合理的服务供应商。



MicroRNA (miRNA)是真核细胞转录形成的非编码单链小分子RNA。它们的序列高度保守，通常是21到23个核苷酸长度，几乎与所有的细胞功能和基因表达调控有关。miRNA通过靶定到mRNA 3'非翻译区(3' UTR)来调节基因的表达，从而作用于细胞功能与疾病发生等生物体生命过程。

- ▶ miRNA种类涵盖最新miRBASE数据库中几乎所有人、小鼠、大鼠miRNAs；
- ▶ 近50,000个人、小鼠、大鼠miRNA靶标(3'UTR)表达克隆；
- ▶ 靶标验证可选用非分泌型(Firefly and Renilla Luciferase)与分泌型(Gussia Luciferase and SEAP)的双报告系统；
- ▶ 10多年的克隆经验+优秀的技术工程师=质量保证+服务周期短；
- ▶ 至今，全球引用 GeneCopia miRNA 产品的文章已达300多篇，其中在 Nature 与 Cell 杂志上发表文章20多篇。

实验实例

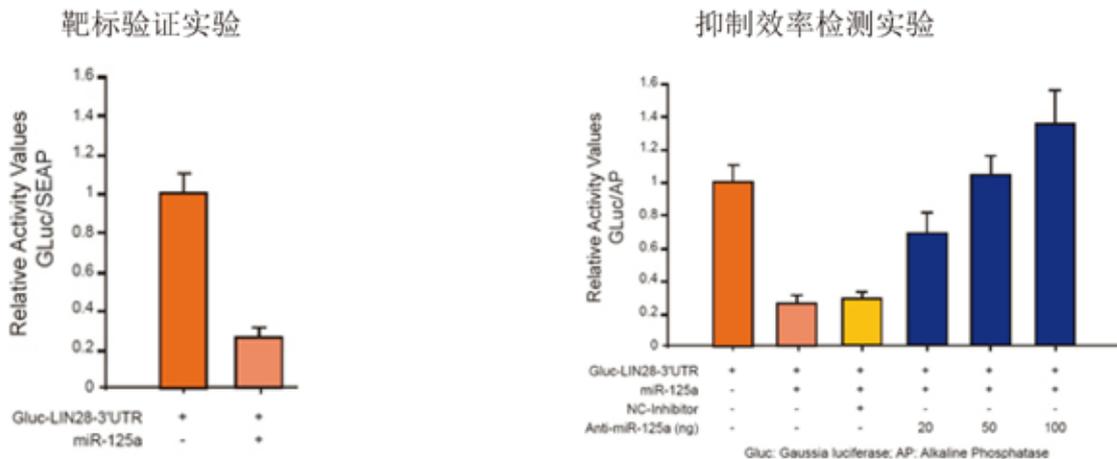


图1. 靶标序列(3' UTR)表达克隆中miRNA的抑制作用。

LIN28是miRNA-125 α 的靶标。左：LIN28 3'UTR表达克隆转染293细胞；右：miR-125 α 前体表达克隆与LIN28 3'UTR表达克隆共转染HEK293细胞。转染24小时后检测GLuc荧光素酶与SEAP内参活性。LIN28 3'UTR转染细胞后GLuc与SEAP活性之比为1(左)，共转染结果如图(右)。结果显示，LIN28 3'UTR活性被抑制70%以上。

图2. 不同剂量miArrest™ miRNA抑制剂克隆对靶miRNA抑制作用的对比。

HEK293细胞中共转染miR-125 α 抑制剂表达质粒 (Cat. HmiR-AN0094-AM01)、miR-125 α 前体表达质粒 (Cat. HmiR0309-NR03) 和miR-125 α 的靶标克隆质粒(Cat. HmiT019205-MT02) 转染24小时后检测报告基因Gussia荧光素酶和参照基因碱性磷酸酶活性比值设为1，用来标准化其他细胞样品中的报告基因活性。结果表明miR-125 α 抑制了Gluc-LIN28-3'-UTR中Gluc 70%以上的活性。这种抑制效应可被导入不同的剂量的miR-125 α 抑制剂表达质粒特异性的阻遏。转染100 ng 抑制剂表达质粒时，细胞内报告基因/参照基因活性比值(右数第一条)已超出单独转染Gluc-LIN28-3'-UTR报告质粒的对照组。这说明miR-125 α 抑制剂可以阻遏外源和内源性的miR-125 α 对靶标基因的抑制，提高GLuc-LIN28-3'-UTR转录本的翻译水平。



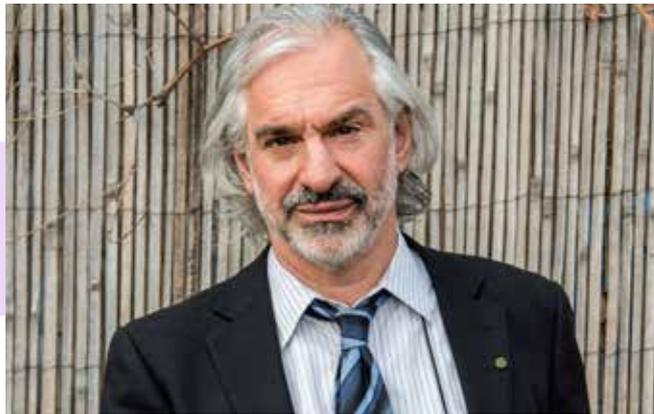
GeneCopia, Inc.

Tel: 4006-020-200 020-32068595
Email: sale@fulengen.com
Web: www.fulengen.com
www.genecopia.com.cn

热点

Hot Topics

DNA也不靠谱



美国博伊西州立大学（Boise State University, BSU）生物学家Greg Hampikian。

Greg Hampikian指出，尽管DNA鉴定已经帮助成千上万的人洗清了罪名，但它也把不少无辜的人投进了监狱。

一个周二的早晨，位于美国爱达荷州首府博伊西（Boise）的博伊西州立大学（Boise State University, BSU）的生物学家Greg Hampikian正在与在州监狱（Idaho State Correctional Institution in Kuna）里服刑的Christopher Tapp通电话。Tapp被控谋杀，但是他坚称自己无罪。包括律师、记者、由前法官组成的专业团体，甚至连被害人的母亲在内的许多人也都认为Tapp是清白的。但却没有一个人能够像Hampikian这样，长期以来一直坚持为Tapp申辩。

“你最近怎么样，Chris？” Hampikian问候道。

“我在夏令营过得还不错。不过你也知道的，我现在手头有点紧。我和某些人之间有点误会，我正在办离婚。” Tapp回答道。

“哦，那真的是挺麻烦的。不过我之前的承诺一直都有效。只要你愿意上学，我愿意为你承担费用。我们已经从法庭那里申请到了一次重新做DNA检测的机会，但法庭只允许我们做几个检测，所以我们必须先决定做哪些检测项目。” Hampikian接着说道。

Tapp于1998年入狱，刑期25年，他被控谋杀了一名叫做Angie Dodge的19岁女孩。经过了漫长的审讯之后，Tapp表示认罪。警方

在犯罪现场发现了大量男性DNA，但是检测结果却显示，这些DNA不是Tapp本人的。即便如此，检察官和陪审团也还是接受了Tapp的认罪。

Hampikian在BSU大学的生物系和犯罪学系都有任职，同时也是“爱达荷州无罪项目（Idaho Innocence Project）”的负责人。近二十多年来，他一直在为像Tapp这样的人提供帮助。Hampikian与全世界的辩护律师和警方一起，努力为清白的嫌犯洗脱罪名，他们的主要武器就是DNA法医学技术（DNA forensics），一方面是尽可能地利用该技术的优势，而另外一方面则是指出该技术上的不足。据“佐治亚州无罪项目（该组织也是在Hampikian的帮助下成立的）”的负责人Aimee Maxwell介绍，在全美各个无罪项目中，Hampikian是唯一一位拥有科学家背景的领导，他绝对是我们需要的那种人。

在Tapp这个案子中，Hampikian使用了一种新型的、有争议的DNA技术，因为他认为使用这种技术能够揪出真凶，还Tapp清白。而在震惊意大利全国的Amanda Knox杀人案中，Hampikian又指出了他们所用DNA证据的不足之处。Hampikian认为，不能因为使用了DNA，就证明这是一个科学的证据。



美国留学生Amanda Knox被控在意大利谋杀了她的同学，证据就是在她们合租的公寓里发现了一把沾有Knox DNA的刀。

现年54岁的Hampikian长得有几分像喜剧演员Bill Maher，看起来非常友善，还挺喜欢说格言警句，比如在聊到科学与宗教时他就会说：“神学家都愿意为了他们的信仰牺牲自己的生命，但是科学家只会让他们自己的信仰无路可走。”

Hampikian是在多年之后才与法医学结缘的。他最开始在澳大利亚从事与人Y染色体相关的研究，然后又在美国佐治亚州的克莱顿州立大学（Clayton State University in Morrow, Georgia）教了好几年书。1993年，著名的犯罪学家Henry Lee的一位助手找到Hampikian，问他是否可以利用科学手段，仅仅依靠遗留在犯罪现场的一点唾液样本来判断这个人的性别。在那之后，他又被Calvin Johnson的强奸案所吸引。Johnson被控犯有强奸罪，被叛入狱16年，但最后在1999年，因为提供了DNA证据而无罪释放。出狱之后，Johnson在Hampikian的帮助下完成了自传——《重获自由》（*Exit to Freedom*）。

据Hampikian介绍，用这么一点东西就能够帮助人们获得清白，那种感觉让他十分兴奋。

于是他加入了“佐治亚无罪项目”的初创团队，该组织于2002年正式成立。2004年，Hampikian来到了BSU大学，他在教课和开展遗传学研究之余，着手创建了“爱达荷州无罪项目”组织。他借助DNA技术为美国、台湾和意大利的十几位被错判者恢复了清白。不过他也“失手”过，在他的委托人中有4人还是被判有罪。

DNA证据是非常强大的证据，因为从科学的角度来看，这属于确凿无误的证据。科研人员们关注人体基因组中的13个，或更多的位点。在人类基因组中，这些位点都属于多样性相当高的位点。每一个位点中都含有短串联重复片段（short tandem repeat），即某一小段DNA会反复、多次重复出现。每个人体内每个位点中这些片段重复出现的次数都不一样，少的可以只出现几次，多的可以出现五十多次。由于人体的两条染色体分别来自于父母

双方，所以在每一条染色体上，这种位点里的重复数量都不一样，即每一个位点会呈现两个不同的重复数字，通过电泳图就能看出这种区别。

两个人在所有13个位点上全都出现相同电泳图样的几率非常低。这就好比两台各有13组图案的老虎机出现完全一样的结果，几乎是不可能的。为了更进一步地提高准确率，美国联邦调查局（Federal Bureau of Investigation, FBI）很快就会要求，法庭必须使用20个以上位点的法医DNA检测报告。

正是因为DNA证据拥有如此之高的准确性，所以大家都认为这是不可能出错的证据。美国国家研究委员会（National Research Council）曾经在2009年公布过一份著名的报告，该报告指出，除了DNA证据可以被看作是科学的证据之外，其它绝大多数法医证据都属于无法被证明的“民科”证据。但是近几年来，Hampikian等遗传学家们开始对这种法医技术提出了质疑。因为PCR等技术上的进步，我们现在可以检测出极微量的DNA标本，灵敏度比上世纪80年代时提高了数千倍。调查人员甚至可以从指纹上提取DNA标本，很多时候，其实只需要25~30个左右的细胞就足够了。

但是这种超高灵敏度在给我们带来方便的同时也带来了假阳性的问题。分析人员面对的DNA样品很容易被污染，比如两个人都触碰了同一件物品，或者调查人员无意中将某个样品从一个犯罪现场带到了另外一个犯罪现场，甚至还可以因为两个证物在证物袋里有过接触等。

Amanda Knox那个案子就属于这种情况。美国留学生Knox被指控在意大利杀害了她的室友——来自英国的Meredith Kercher。佩鲁贾当地警方原本指控一个名叫Rudy Guede的意大利当地青年男子性侵并杀害了Kercher。掌纹、指纹以及DNA等证据都支持警方的判断，最终也确实证实Guede有罪。不过意大利检察官还认为Knox和他的男朋友

Rafaele Sollecito同样有罪。因为在Kercher的胸罩上也发现了Sollecito的DNA，这表明Sollecito也对Kercher有过性侵，同时在Sollecito的厨房里还找到了一把刀，刀柄上留有Knox的DNA，而刀刃上则留有Kercher的DNA。

Hampikian听说这个案子之后也加入了进来，他为辩护团队重新梳理了整个实验室鉴定流程以及DNA法医学证据。Hampikian注意到，Kercher的胸罩是在事发46天之后才采集的证物，而且有好几位调查人员都拿起过这个胸罩，随后才重新将胸罩放回楼下进行拍照，这些动作都有可能污染证物，使其染上Sollecito的DNA。此外，虽然在刀柄上留有大量的Knox的DNA，但这也是她租住的房间，她本来就经常用到这把刀，而刀刃上残留的Kercher的DNA则非常少，连FBI采信所需要的最低标准的一半都达不到。

其他9位著名的遗传学家也都公开联名支持Hampikian的观点，并且对公众提出了他们的质疑。与此同时，Hampikian也让他的学生模拟了部分的调查过程。他们在午饭后从BSU大学艺术及科学院院长的办公室里收集了5个苏打罐，随后分别将这些罐放到5个证据袋里。然后，在没有换手套的情况下，又往每个袋里放进了一把刀，这些刀全都是新买的。然后，他们就像意大利警方一样，在这些证据上寻找微量的（远低于FBI采信所需要的最低标准）DNA样品。结果，真的就在一把刀的刀刃上找到了院长办公室一位工作人员的DNA。但这位工作人员根本就没碰过这把刀，也没有和这把刀共处过。

但意大利法庭还是判Knox和Sollecito有罪。他们在监狱里呆了4年，然后才上诉成功并获释，但是后来又被判有罪。直到去年春天，经过意大利的DNA专家们再次仔细审查了案件，意大利高级法院才宣布他们两人无罪。

如果在同一个犯罪现场存在多名嫌疑人的DNA，那么DNA分析的结果就更加具有迷惑

性了。比如举一个简单的例子，在分析DNA样品里的一个位点时，我们可以看到两个峰，它们分别代表嫌犯和被害人，但如果是多个人的DNA混杂在一起，我们就会看到很多个峰，此时除了能够辨认出受害人的DNA之外，就无法区分其他人的DNA了。出何种判断就是非常主观的行为了。

科学研究也的确证实了这种情况。2013年，美国马里兰州国家标准技术研究院（National Institute of Standards and Technology in Gaithersburg, Maryland）的遗传学家Michael Coble设置了一个假设的场景，他模拟了多起抢劫案，然后在一个案发现场遗留了一个滑雪口罩，并在滑雪口罩上放置了由多个人的DNA混合而成的样品。然后要求全美108个实验室进行DNA检测，要求他们确定这个口罩上是否含有某一个人的DNA。结果有73个实验室都判断错了。他们的结果都显示，口罩上含有该嫌疑人的DNA，但实际上却并没有。Coble形容道：“对于分析人员而言，这就好比尚未开发的西部，不知道该往哪走，好像去哪都行一样。”

Hampikian也做过类似的研究，不过他可没有“伪造”犯罪现场，因为他用的DNA证据真的就来自犯罪现场。这就是Kerry Robinson案件。Robinson是佐治亚州人，他因为被判犯有轮奸罪而被判了20年徒刑。受害人指认，在侵犯她的几人当中，有一人叫做Tyrone White。可实际上，在采自犯罪现场的DNA混合证物里，White的DNA与不属于被害人的DNA高度吻合（在13个位点里有11个都吻合）。为了获得宽大处理，White供出了Robinson。Robinson有2处位点与在被害人身上发现的DNA证据吻合，但Hampikian认为，这两处位点所能提供的证据信息都处于临界值，所以他认为Robinson绝对是清白的。

为了做这项研究，Hampikian与英国心理学家Itiel Dror走访了17位来自美国著名实验室的分析人员，给他们看了DNA电泳图。

其中有12人都认为Robinson肯定不在犯罪现场，4人表示不能根据这份电泳图得出结论，只有1人认为Robinson有问题。Hampikian的实验室则对当地电视台的4名员工进行了DNA检测，其中也有2人与Robinson一样，他们的DNA有2个位点与犯罪现场发现的DNA相吻合。其中还有一位26岁的白人女性，有3个位点与犯罪现场发现的DNA相吻合。

Robinson的辩护律师，来自美国亚特兰大Zell & Zell律师事务所的Rodney Zell表示，Greg太神了。他非常专业，是一个非常棒的证人。可即便如此，上诉法院还是在去年秋天驳回了Robinson的上诉。于是Rodney Zell上诉至了佐治亚州高级法院，该案件现在还处于审理之中。不过Tyrone White已经获得了减刑，并重获自由。

“我不相信人们（法官、陪审团等）是邪恶的，不过一旦他们相信了某件事，就会想尽办法去相信它。”在与Chris Tapp通电话时，Hampikian这样向Tapp解释翻案这么难的原因。不过Hampikian还是相信，最新的DNA分析技术会还Tapp一个公道。

Idaho市警察局之所以会逮捕Tapp，是因为他是一名嫌犯的朋友，而这名嫌犯最终被无罪释放了。因为大家都认为，Angie Dodge被好几人侵犯，所以警方向Tapp承诺，如果他供出其他嫌犯，就可以获得宽大处理。数周以来，Tapp已经供出了几十个名字，但是经过DNA检测之后却发现，这些人都不在现场。最终，因此警方也没有遵守承诺，对Tapp提起了起诉。警方声称，Tapp是协从犯，是他拉住了Dodge的胳膊，让其他人侵犯并杀死了Dodge。

如果要提起上诉，Tapp的律师必须收集足够的证据，但是以当时的情况，他们无法做到这一点。有一种方法就是收集家族DNA（familial DNA）。如果警方无法在FBI的数据库中找到能够与在犯罪现场找到的DNA相匹配的数据，那么再放宽检索标准，这样就有可能找到一些“部分匹配者”，即嫌犯的亲

可能找到一些“部分匹配者”，即嫌疑人的亲戚，这样也能够为破案提供线索。但是人权人士对此提出了反对的意见。因为这会让嫌疑人的亲戚成为警方关注的目标，所以马里兰州法院及哥伦比亚特区法院（Maryland and the District of Columbia）都禁止了这种做法。但是利用这种方法还是解决了不少非常重要的案件，比如加州的Grim Sleeper连环杀人案。

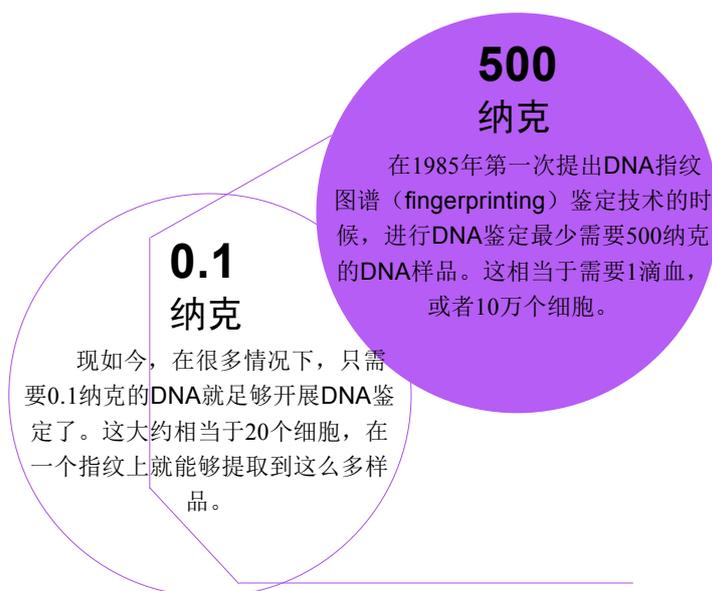
让我们再回到Angie Dodge的案子上，Idaho Falls警方用在犯罪现场发现的DNA信息到FBI的数据库里进行了比对，可是一无所获（我们也不清楚他们是否进行了部分比对）。根据Hampikian的建议，他们还做了“家系检索（genealogical search）”。警方让法医实验室对采自犯罪现场精液DNA的Y染色体上的35个位点进行了鉴定，然后让世界上最大的家系公司——Ancestry.com出庭作证，因为该公司对他们的Y染色体数据库（该数据库于2012年从摩门家系基金会购得）进行了比对。

结果发现，一位没有前科的密西西比州男性居民与在罪案现场发现的精液高度匹配，在35个位点中有34个相符。但是这个人的年龄太大，与嫌犯特征不符，不过警方锁定了他

的儿子，在路易斯安那州新奥尔良工作的制片人，36岁的Michael Usry, Jr.。他曾经拍摄过多部血腥的谋杀电影，而且在1996年案发时也刚好经过了Idaho市。于是法庭于2014年对Usry进行了DNA鉴定：检测结果却表明他也是清白的。Tapp的律师John Thomas表示，他正在要求法庭做家系检索。Usry也表示，他对Tapp这个案子非常感兴趣，正在计划将其搬上银幕。

去年春天，Thomas获得了法庭的准许，做了“触摸DNA检测（touch DNA test）”，即对取自Dodge手上的痕量DNA进行检测。如果这样也没有找到Tapp的DNA，那么就可以推翻检察官认为是Tapp拽住了Dodge的胳膊的起诉。Hampikian表示，他们将继续一步一步的前进。他担心州法院可能会像对待之前的上诉案件那样，拒绝接受他们提交的新证据。Hampikian还担心可能到2026年，Tapp都不能获得自由。不过他还是给Tapp打了这个电话。

Tapp在电话里也说道：“我非常感激你们每个人为我所做的一切……”，但是话还没说完，电话就断掉了。





毛发如何提供线索

Hanae Armitage & Nala Rogers 撰稿

一直以来，法医学毛发鉴定技术的口碑就很差。该技术仅仅依靠毛发的颜色、厚度、弯曲度等性状来辨认罪犯。美国司法部（U.S. Justice Department）正在进行的再次分析告诉我们，分析鉴定人员在法庭上往往都会夸大其词，很多仅仅依靠毛发鉴定就被认为有罪的人最终被发现都是清白的。

不过现在，先进的科学技术又给毛发鉴定技术注入了新的生命。不过现如今的毛发鉴定技术不再被用于确定嫌犯是否到过犯罪现场，而是用来了解嫌犯或受害人的生理特征，甚至是旅行史。据美国西弗吉尼亚州立大学（West Virginia University in Morgantown）的法医科学家Glen Jackson介绍，大部分遗留在犯罪现场的毛发都非常少，不足以进行DNA检测，只能够进行化学分析，了解一些相关的性状。

据Jackson介绍，角蛋白（Keratin）是人体毛发最主要的组成蛋白，一共由21个氨基酸组成，但是这些氨基酸的比例却会因人而异。将角蛋白水解之后，测定出组成氨基酸的含量，就可以获得一个人的毛发特征数据，然后再与数据库进行比对，就可以获得相关的年龄、性别、BMI及所在地等信息，不过准确度有限。

同位素也能够给毛发鉴定提供线索。比如不同地区水里H、O同位素的比例也不一样，这些差异都能够反应在人体的毛发上。因此，对毛发进行同位素分析（isotopic analysis）就可以知道这个毛发的主人在近几年来（如果这毛发不是新生的）都去过哪些地方。2008年，美国犹他州一家名为Isoforensics的公司发现，8年前在当地死亡的一名妇女曾经频繁地往返于美国西北部和盐湖城之间，根据这一线索，最终于2012年确认了她的身份。据Isoforensics公司的主席Lesley Chesson介绍，很多人听说这个事之后都跑来问他，‘我们这有个1976年的悬案，你们有办法吗？’。

原文检索：

Douglas Starr. (2016) WHEN DNA IS LYING. *Science*, 351:1133-1136.

Eason/编译



百态

Amazing Lives

饮食能够改变鳗鱼的头型？



窄头鳗苗和宽头鳗苗。

当细小的鳗苗抵达北欧冰冷的河口时，它们盛大的迁徙活动才刚刚开始。来自比利时根特大学（Ghent University）的Jens De Meyer告诉我们，在这种娇小的生物游离海水时，它们就变成透明的玻璃鳗，为随后艰苦的逆流之旅做好准备。在这趟旅程中，它们将用3-12年的时间成长为黄色的幼鳗。有趣的是，当鳗鱼完全成年并准备再次踏上艰苦的马尾藻海（Sargasso Sea）洄游之旅时，其中一些头部变得细长，而另一些则变得宽大。那么，在鳗鱼的生命周期中，到底何时发生了这种二态性改变，这种改变又是如何发生的呢？De Meyer和Joachim Christiaens猜测，鳗鱼的饮食可能影响了其头部形态的变化。于是，他们来到比利时利奥波德运河（Leopold Canal）的河口闸门处，捕捉体色透明的玻璃鳗，以期发现可能改变其头部形态的饮食种类。

两位研究者将鳗鱼分为三组，每组给予一种不同的严格的饮食：一组给予坚硬食物，二组给予软食，三组则是前两组的混合。对此，De Meyer表示，选择饮食是试验中最难的部分，因为既要给予坚硬食物组足够多样化的饮食，以使它们得到良好的锻炼；也要使软食组在得到同样营养的同时，享受到相对轻松的时光。于是，De Meyer和Dominique Adriaens一块儿查了文献，找到了几种给鳗鱼吃的食物，然后观察它们的摄食行为：需要咬或刺的食物，被认定为“硬食”；可以吸食的食物，被认定为“软食”。最后，他们在5个月内，每月

都拍下玻璃鳗的头部，然后分析其生长发育情况，以观察饮食是否可以改变鳗鱼头部的发育。

神奇的是，在试验末期，研究小组可以观察到小鱼头部的形状产生了明显的差异。食用“硬食”的鳗鱼拥有较宽的头部，原因很可能是以较为发达的下颌肌肉来适应硬食的撕咬；而一直食用“软食”的鳗鱼则拥有较为细长的头部。当然，De Meyer表示，他们并不期望小鳗鱼能够产生如此迅速而明显的头部多样化形态，而认为在它们进入生长发育期（黄鳗）时，这种差异会逐渐呈现出来。并且，De Meyer对食用混合食物的鳗鱼进行了研究，发现部分鱼儿的头部是宽大的，另一部分则是细窄的。这表明，当鳗鱼获得选择权时，其中一些会优先选择硬食，而另一些则选择软食。这种优先选择食物的差异可能会减少它们之间对食物的竞争，从而增加生存率。

不过，De Meyer补充说，目前已有有人对欧洲河道中的鳗鱼种群利益产生了关注。他警告大家，与窄头鳗鱼相比，宽头的鳗鱼可能面临更大的种群风险，这是因为它们在食物链中的地位比前者更高，且其饮食可能已经累积了更多的污染。最后，De Meyer表示，这项研究表明，在鳗鱼的生命周期中，其在食物链中所处地位的差异可能很早就呈现出来了。他希望人们能够进一步理解：对于在欧洲日益耗竭的河水中生活的鳗鱼群体而言，饮食对它们产生的影响能够成为其群体重建的关键。

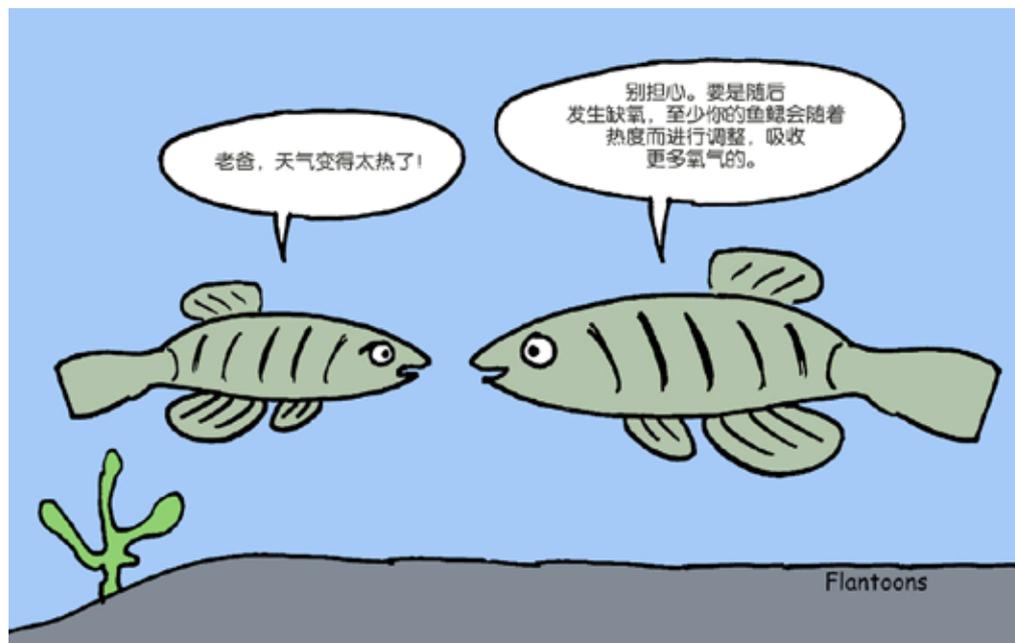
原文检索：

De Meyer, J., Christiaens, J. and Adriaens, D. (2016) Diet-induced phenotypic plasticity in European eel (*Anguilla anguilla*). *J. Exp. Biol.* 219, 354-363.

文佳/编译



高温有助于鳉鱼对抗缺氧



我们都知道，完成多任务是极具挑战性的。但若你想象一下，随着鱼类所适应的环境发生改变，它们将会面临多种生理性障碍，那该怎么办呢？举个例子，二氧化碳水平和水温上升，导致氧气浓度下降，而污染往往使情况更加恶化。多种水生动物也必须同步与发生的环境挑战过招。不过，来自加拿大英属哥伦比亚大学（University of British Columbia）的 Patricia Schulte 等人认为，很少有人知道鱼类在面临多种同时发生的生理性威胁时会产生何等反应，因为鲜有研究会考虑生物机体在长期暴露于某种应激源时，所经受的多种生理性改变是否会使另一种应激性发生变化的可能性。于是，他们打算就此开展研究。Schulte 等人已知适应了较暖条件的鱼类可使鳃部发生变化，以满足增加了的氧气需求（伴随代谢率增加）；那么，若是氧气水平下降，这类适应了

温暖环境的鱼儿还能做好准备，应付这种变化吗？

Schulte、Tara McBryan、Timothy Healy 和 Kristen Haakons 显然很聪明，他们把实验对象定为自己比较熟悉的大西洋鳉鱼 (Atlantic killifish, *Fundulus heteroclitus*)——这种鱼儿栖居于盐沼泽地中，那儿的水温和氧气饱和度日变化率很大，由此可以很好地观察它们在已经适应了较温暖条件的情况下，当氧气量下降时，如何应对环境的变化。因此，McBryan 将鳉鱼从它们的大西洋海岸之家移送到温哥华实验室，让它们先适应 15°C 的生活。然后让不同组的鱼儿分别适应 20、23 和 30°C 的水温，再将氧气量降低至 2% 的空气饱和度，以测试它们是否能很好地应对。

在 15°C 水温中，鱼儿能完美应对，表现为在一小时后才发生昏厥；但在 23°C 水中的鱼儿

则表现得很抓狂，仅在2.6分钟后就发生了昏厥；而在最热的30℃水中，氧气尚未达到实验目标值，鱼儿就已经不行了。接着，McBryan让鱼儿在此前进行氧气反应测试的水温中适应6周，然后再一次降低氧气量。这回，所有鱼儿的表现都比上次要好得多，在昏厥之前坚持的时间明显延长。McBryan随后研

究了它们的鳃部，发现其吸收氧气的表面积明显增加。对此，Schulte表示，实验表明，高温下的生活使鱼儿的鳃部发生了变化，这种变化有助于它们耐受缺氧。这种能力应该能够帮助它们应对与人为气候变化相关联的复杂性多应激源刺激。

原文检索：

McBryan, T. L., Healy, T. M., Haakons, K. L. and Schulte, P. M. (2016) Warm acclimation improves hypoxia tolerance in *Fundulus heteroclitus*. *J. Exp. Biol.* 219, 474-484.

文佳/编译



百态·频道

www.LifeOmics.com

A group of people are performing a human pyramid against a cloudy sky with a bright sun. The pyramid consists of several layers of people standing on their feet, with the top person reaching out. The overall scene is bathed in a purple and blue light.

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