

[文章编号] 1007-385X(2004)03-0170-05

## MUC1 肿瘤抗原表位 PDTRP 基因免疫诱导的体内外抗肿瘤效应

夏明灿, 林 怡, 熊思东, 储以微 (复旦大学上海医学院免疫学系, 上海 200032)

[摘要] 目的: 构建 MUC1 肿瘤抗原表位  $\gamma$ 1neo-PDTRP 质粒, 基因免疫诱导机体产生有效的体内外抗肿瘤效应。方法: 用 Insight II 将 PDTRP 抗原表位与 MUC1 分子模拟, 构建含 PDTRP 的抗原化抗体表达质粒  $\gamma$ 1neo-PDTRP, 体外转染检测表达。用该质粒基因免疫小鼠, 免疫后 ELISA 动态检测血清中抗 PDTRP 抗体的产生及特异性细胞免疫应答; 以 4T1-PDTRP 肿瘤细胞攻击经  $\gamma$ 1neo-PDTRP 免疫小鼠, 观察免疫保护效应。结果: 三串联肿瘤抗原表位 PDTRP 模拟了 MUC1 核心序列的空间结构; 构建  $\gamma$ 1neo-PDTRP 质粒并在体外转染表达, 基因免疫小鼠诱导出特异性抗 PDTRP 体液和细胞免疫应答, 免疫小鼠对 4T1-PDTRP 肿瘤细胞的攻击具有显著的体内保护效应。结论: MUC1 肿瘤抗原表位 PDTRP 可模拟 MUC1 核心序列的天然构象,  $\gamma$ 1neo-PDTRP 基因免疫在体外诱导特异性的体液和细胞免疫应答, 体内诱导对机体的免疫保护效应。

[关键词] MUC1; PDTRP; 基因免疫

[中图分类号] R391.1 [文献标识码] A

## Anti-Tumor Efficacy Induced by Antibodized PDTRP Gene Immunization

XIA Ming-can, LIN Yi, XIONG Si-dong, CHU Yi-wei (Department of Immunology, Shanghai Medical College of Fudan University, Shanghai, 200032, China)

[Abstract] **Objective:** To study the anti-tumor efficacy induced by antibodyed tumor epitope PDTRP gene immunization. **Methods:** Three copies of tumor associate gene PDTRP from MUC1 tandem repeats were designed and mimicked the conformation of MUC1 by Insight II. The  $\gamma$ 1neo-PDTRP plasmid was further constructed, in which the PDTRP target gene was inserted into CDR3 of the  $\gamma$ 1-neo vector. The specific humoral and cellular immune responses towards to PDTRP were detected after intraspleen immunized Balb/c mice with  $\gamma$ 1neo-PDTRP. And the immune protection assay was also done to observe whether the mice immunized with  $\gamma$ 1neo-PDTRP could prolong the survival after tumor challenge. **Results:** The conformation of three copies of PDTRP mimicked the conformation of MUC1 tandem repeats. The expression of  $\gamma$ 1neo-PDTRP could be detected after *in vitro* transfect. The specific antibody against PDTRP epitope could be induced and increase to a higher titer after intraspleen injection with a  $\gamma$ 1neo-PDTRP plasmid. And the specific proliferation and cytotoxic function of lymphocyte were also increased. There is a significant survival from mice immunized with  $\gamma$ 1neo-PDTRP against the 4T1-PDTRP tumor challenge. **Conclusions:** Gene immunization with  $\gamma$ 1neo-PDTRP could elicit both humoral and cellular tumor specific immune response and had the protective effect.

[Key words] MUC1;  $\gamma$ 1neo-PDTRP gene immunization; immune protection

\* 黏蛋白 1 (mucin 1, MUC1) 是分布于腺上皮细胞的跨膜糖蛋白, 在正常和肿瘤细胞表面均表达, 但存在差异。MUC1 在肿瘤细胞表面高表达; 覆盖于肿瘤细胞表面 MUC1 串联重复序列 (variable number of tandem repeats, VNTRs) 的寡糖侧链糖基化不完全, 暴露了 VNTR 中的核心序列 PDTRP, 这一重要差异使得 PDTRP 可能成为肿瘤细胞的靶抗原表位, 诱导针对 PDTRP 的特异性应答, 进而产生抗肿瘤效应<sup>[1-2]</sup>。MUC1 核心序列 PDTRP 作为肿瘤生物治疗的新靶点受

到人们的关注<sup>[3,4]</sup>。

PDTRP 是一小分子量的短肽, 难以诱生有效的免

[基金项目] 上海-联合利华研究与发展基金资助课题(2010)、国家自然科学基金面上项目(30170867)和国家重点基础研究发展计划(2001CB10006)资助课题

[作者简介] 夏明灿(1976-), 男, 江西南昌人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤的基因治疗方面的研究

[通讯作者] 储以微, E-mail: ywchu@shmu.edu.cn

疫应答,因此,我们选用了 PDTRPDTRPDTRP 的三串联表位作为 MUC1 的肿瘤靶抗原表位;同时,为了使抗原表位有一定的空间构象,选用了抗原化抗体质粒作为实验的表达载体,此载体是含免疫球蛋白重链的基因表达载体,含有小鼠的重链可变区和人的重链恒定区。具有:1)空间构象限定,2)CDR 环状结构外显,3)较强的免疫原性等特点,尤其是将一定长度的靶抗原表位克隆入 CDR 区域后,不会破坏抗原化抗体的亲、疏水性及抗原性。

基于上述背景,本研究拟以 PDTRP 的三串联表位 PDTRPDTRPDTRP 为肿瘤靶抗原,将编码抗原表位基因克隆入抗原化抗体的 CDR3 区域,构建含 PDTRP 的抗原化抗体重组质粒。将此质粒基因免疫小鼠,观察其诱导的特异性免疫应答及对机体的抗肿瘤保护效应。

## 1 材料与方法

### 1.1 抗原表位分子模拟

采用 Accelrys 公司产品 Insight II 对串连表位 PDTRPDTRPDTRP 和 MUC1 胞外 VNTR 区中的多肽序列 GVTSAPDTRPAPGST 进行三维重建,并比较抗原表位在空间结构上的差异。计算相应的势能,以推测合成的抗原表位是否拟合 MUC1 的核心序列。

### 1.2 质粒 $\gamma$ 1neo-PDTRP 的构建、鉴定和制备

质粒  $\gamma$ 1neo( Vector )和 pBS-VH62-ANK 由本教研室保存,质粒 pBS-VH62-ANK 为编码人免疫球蛋白 IgG 重链可变区质粒;质粒  $\gamma$ 1neo 为编码人免疫球蛋白 IgG 重链恒定区质粒。人工合成三串联 PDTRP 表位序列( PDTRP 表位序列 PDTRP-1:GTA CCC GGA CAC CAG GCC GGA CAC CAG GCC GGA CAC CAG GCC G; PDTRP-2:GTA CCG GCC TGG TGT CCG GCC TGG TGT CCG GCC TGG TGT CCG G)。将合成的三串联 PDTRP 表位序列退火后克隆于质粒 pBS-VH62-ANK 的 CDR3 区,构建质粒 pBS-VH62-ANK-PDTRP, EcoR I 酶切重组质粒并回收重链可变区片断。进一步将重链可变区片段克隆于质粒  $\gamma$ 1neo,构建含有抗原表位 PDTRP 的编码完整免疫球蛋白重链分子的重组质粒  $\gamma$ 1neo-PDTRP。重组质粒经 EcoR I 和 Xba I 酶切鉴定及测序。质粒的大量制备依照 QIAGEN Plasmid Mega Kit 推荐程序进行,最终调质粒的浓度至 2  $\mu$ g/ $\mu$ l。

### 1.3 重组质粒 $\gamma$ 1neo-PDTRP 的体外转染表达

构建质粒体外脂质体转染仅分泌免疫球蛋白轻链的 J558L 细胞株,如  $\gamma$ 1neo-PDTRP 体外表达,其分泌的免疫球蛋白重链就能和 J558L 分泌的轻链结合成完整的人 IgG 免疫球蛋白,表达在上清中,用 ELISA 方法检

测转染上清中的人 IgG 表达。具体方法是:以 2  $\mu$ g/ml 兔抗人 IgG 纯品包板,加入待测上清并以正常人血清 IgG 为对照,37 $^{\circ}$ C 1 h 后,加入 HRP 标记的二抗 37 $^{\circ}$ C 1 h,加底物液 37 $^{\circ}$ C 15 ~ 30 min,以 2N 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应,测 OD 值。

### 1.4 基因脾脏免疫

小鼠先行麻醉,待 5 min 麻醉起效后,在超净台内施行。取左腹位,消毒皮肤、剔毛。自右肋缘下 0.5 cm 开一小切口,依次剖开腹部皮肤、肌肉和腹膜,暴露腹腔肠系膜,钳夹肠系膜根部将整个脾脏牵拉出腹腔外。用微量注射器缓慢注入 50  $\mu$ l( 100  $\mu$ g )质粒 DNA/生理盐水溶液。注射完毕后将脾脏回纳腹腔后关腹。腹腔注射 2 ~ 3 ml 生理盐水稀释麻醉药品并帮助腹腔脏器复位。手术完毕,小鼠至于 37 $^{\circ}$ C 温箱保暖促苏醒。

### 1.5 基因肌肉免疫

基因免疫前 24 h,于每只小鼠左后腿胫骨前肌中部注射 100  $\mu$ l 0.25% 丁哌卡因以松散肌肉,24 h 后在同一部位分别注射含有不同靶位点的各种质粒 DNA 每只 100  $\mu$ g/50  $\mu$ l。

### 1.6 基因免疫及采血流程

第 0 周经脾脏免疫小鼠,第 4 周肌肉免疫加强。脾免疫后分别于 1、2、4、6 和 8 周经小鼠眼眶采血,全血于 4 $^{\circ}$ C 静置 24 h 后分离血清。

### 1.7 多肽的合成

人工合成 PDTRP 多肽(多肽全序列为 PDTRP-DTRPDTRP)及对照多肽 NVDP(全序列为 NANVNVD-PNANV),由吉尔生化有限公司完成。

### 1.8 抗 PDTRP-Ig 抗体的检测

采用常规 ELISA 间接法,以 PDTRP 多肽(5  $\mu$ g/ml)包被 96 孔酶标反应板(100  $\mu$ l/孔)作为 1 抗,HRP 标记的羊抗小鼠 IgG(1:7 000 稀释)抗体作为 2 抗。

### 1.9 免疫小鼠脾细胞体外增殖活性的检测

第 2 次免疫后 4 周,处死小鼠,无菌取脾,获免疫小鼠脾细胞悬液,加入 96 孔细胞培养板(每孔  $5 \times 10^5$  个/100  $\mu$ l),PDTRP 多肽(5  $\mu$ g/100  $\mu$ l/孔)体外刺激,并以 ConA(每孔 0.5  $\mu$ g/100  $\mu$ l)及 RPMI-1640 培养液为对照。孵育 3 d 后掺入 <sup>3</sup>H-TdR(0.5  $\mu$ Ci/孔),继续培养 16 h 后收获细胞并检测其 CPM 值。

### 1.10 含抗原表位 PDTRP 的肿瘤细胞株 4T1-PDTRP (高表达 MUC1 的乳腺癌细胞株)的建立,及 RT-PCR 方法鉴定转染细胞目的基因的表达

采用电穿孔的方法,取  $1 \times 10^6$  个处于对数生长期的 4T1 细胞重悬于 200  $\mu$ l 的完全 1640 培养液中,加入 10  $\mu$ g 质粒 DNA,调解电压至 270V,放电。将电转后的细胞加入 800  $\mu$ g/ml G418 筛选阳性克隆。4 周后抽提

细胞 mRNA 做 RT-PCR 鉴定,并将 G418 浓度降至 200 μg/ml 维持。

1.11 CTL 杀伤功能分析—<sup>3</sup>H-TdR 标记法

BALB/c 小鼠乳腺癌细胞株 4T1 由本教研室保存。4T1-PDTRP 为稳定转染 γ1neo-PDTRP 的 4T1 细胞。将 4T1-PDTRP 作为靶细胞,以 40 μCi <sup>3</sup>H-TdR(0.8 ml)在 37℃ 水浴中标记 2.5 h 后加入 96 孔圆底板(100 μl/孔)。免疫小鼠脾细胞(即效应细胞在体外先用 50 μg/ml 特异性抗原多肽 PDTRP 刺激 3 d 后作杀伤实验,调整效:靶至 80:1,加入 96 孔圆底板中。CO<sub>2</sub> 孵箱培养 5.5 h,每孔加入 50 μl 双酶溶液( DNaseI 100 μg/ml,胰蛋白酶 1.2%),多头细胞收集仪收集细胞,测量 cpm 值(三复孔计平均值)。

特异性杀伤率(%) =  $\frac{\text{实验释放 cpm} - \text{自然释放 cpm}}{\text{最大释放 cpm} - \text{自然释放 cpm}} \times 100\%$

1.12 γ1neo-PDTRP 基因免疫对 4T1-PDTRP 肿瘤攻击的体内保护效应

以 γ1neo-PDTRP 和对照质粒分别于第 0 周和第 4 周体内基因免疫,在末次免疫后第 4 周,皮下接种 4T1-

PDTRP 肿瘤细胞,观察不同实验组小鼠的生存期。

1.13 统计学处理

应用 Spss10.0 软件做统计分析,所有计量资料做独立样本 t 检验或单因素方差分析。

2 结果

2.1 三串联表位 PDTRP 与 MUC1 核心序列空间构象的比较

为研究三串联抗原表位 PDTRPDTRPDTRP 是否模拟了 MUC1 核心序列的空间构象,我们利用分子模拟软件 Insight II,分析多肽序列 PDTRPDTRPDTRP 的空间构象并与 MUC1 胞外多重复序列中的核心多肽序列 GVTSAPDTRPAGST 的空间构象进行比较。结果发现:三串联抗原表位 PDTRP 的空间结构成环状,总势能为-813.26KJ/M,与 MUC1 核心序列拟合后 RMS = 1.03(完全拟合参数值为 1.0)(见图 1A,1B,1C),提示三串联抗原表位 PDTRP 可以模拟 MUC1 多重复序列的空间构象,并且不会导致表位空间构型显著性改变。

图 1 三串联表位 PDTRP 与 MUC1 核心序列空间构象的比较

Fig. 1 Structure of the core peptide of MUC1 and three copies of PDTRP epitope

A: Structure of the core peptide of MUC1; B: Structure of three copies of PDTRP epitope;

C: Comparison of the core peptide of MUC1 with three copies of PDTRP epitope

2.2 含抗原表位 PDTRP 的抗原化抗体质粒构建

将 PDTRPDTRPDTRP 靶抗原基因克隆入含小鼠免疫球蛋白重链可变区质粒 pBS-VH62-ANK 的 CDR3 区域,构建质粒 pBS-VH62-ANK-PDTRP;经 EcoR1 酶切后,回收重链可变区片段,进一步定向亚克隆至含免疫球蛋白重链恒定区质粒 γ1neo 中,形成重组质粒 γ1neo-PDTRP。其中的 PDTRP 片段测序结果与已知序列完全一致,γ1neo-PDTRP 经酶切鉴定(见图 2),结果提示质粒 γ1neo-PDTRP 构建正确。

2.3 重组质粒 γ1neo-PDTRP 的体外转染表达

将构建质粒体外脂体转染仅分泌免疫球蛋白轻链的 J558L 细胞株。如 γ1neo-PDTRP 体外表达,其分

泌的免疫球蛋白重链就能和 J558L 分泌的轻链结合成完整的人 IgG 免疫球蛋白,分泌在上清中,用 ELISA 方法检测转染上清中的人 IgG 表达。经 3 次重复实验结果发现:在将重组质粒 γ1neo-PDTRP 转染至 J558L 细胞株后,48 h 后培养上清中人 IgG 免疫球蛋白的分泌表达量在 γ1neo-PDTRP 实验组为 35.645 ± 3.71 ng/ml,显著性高于未转染对照组 J558L 细胞株 1.80 ± 0.14(P < 0.05)。结果表明:重组质粒 γ1neo-PDTRP 能够在真核细胞中有效表达。

2.4 γ1neo-PDTRP 基因免疫诱导的特异性体液免疫应答

以 γ1neo-PDTRP 第 0 周经脾免疫 BALB/c 小鼠,

第4周肌肉免疫加强,  $\gamma$ 1neo Vector 为阴性对照。初次免疫后分别于1、2、4、6和8周经小鼠眼眶采血, ELISA方法检测免疫小鼠血清中的特异性抗 PDTRP 抗体。结果发现(见图3):  $\gamma$ 1neo-PDTRP 免疫组小鼠, 免疫后第1周即能检测到特异性抗 PDTRP 抗体的产生, 8周后抗体水平达到高峰, 特异性抗 PDTRP 抗体较对照组相比显著性升高( $P < 0.05$ ), 提示  $\gamma$ 1neo-PDTRP 基因免疫能有效诱导特异性体液免疫应答。

图2  $\gamma$ 1neo-PDTRP 的酶切鉴定

**Fig.2 Identification of  $\gamma$ 1neo-PDTRP by enzyme digestion**

1: Marker 15 kb; 2:  $\gamma$ 1neo-PDTRP(EcoR I 2.3 kb);  
3:  $\gamma$ 1neo-PDTRP(Xba I 1 kb); 4:  $\gamma$ 1neo-PDTRP  
(Xba I + EcoR I 1.8 kb, 0.6 kb, 0.3 kb)

图3 基因免疫后小鼠血清抗 PDTRP-IgG 的检测

**Fig.3 Detection of anti-PDTRP IgG  
in sera after gene immunization**

2.5  $\gamma$ 1neo-PDTRP 基因免疫诱导的特异性细胞免疫应答

与上述基因免疫方法相同, 末次免疫后第4周, 收获脾淋巴细胞, 体外以 PDTRP 抗原多肽刺激, 3 d 后

$^3$ H-TdR 掺入法检测淋巴细胞的特异性增殖及杀伤活性。ConA 体外刺激为阳性对照, NV 无关肽体外刺激为阴性对照。结果显示(见图4):  $\gamma$ 1neo-PDTRP 免疫淋巴细胞增殖活性的刺激指数值(SI)较对照组相比明显升高, 具有显著性差异( $P < 0.05$ ); 杀伤实验结果也证实了相同的结论, 当效靶比例 E:T 为80:1时,  $\gamma$ 1neo-PDTRP 免疫组特异性淋巴细胞的杀伤活性为  $17.09 \pm 2.28$ , 明显高于对照组的杀伤活性  $11.54 \pm 1.6$  ( $P < 0.05$ )。结果说明:  $\gamma$ 1neo-PDTRP 免疫后可以诱导针对 PDTRP 的特异性细胞免疫应答。

图4 PDTRP 基因免疫诱导特异性淋巴细胞增殖

**Fig.4 Proliferation of lymphocytes induced by  
gene immunization with PDTRP epitope**

2.6  $\gamma$ 1neo-PDTRP 基因免疫对 4T1-PDTRP 肿瘤攻击的体内保护效应

以  $\gamma$ 1neo-PDTRP 和对照质粒分别于第0周和第4周体内基因免疫, 在末次免疫后第4周, 皮下接种 4T1-PDTRP 肿瘤细胞, 观察不同实验组小鼠的生存期。结果显示(见图5):  $\gamma$ 1neo-PDTRP 免疫组小鼠肿瘤生长的速度慢于对照组;  $\gamma$ 1neo-PDTRP 免疫组小鼠平均存活时间为 26.88 d, 高于  $\gamma$ 1neo 及 NS 对照组(分别为 19.63 和 12.38 d)。统计结果显示具有显著性差异( $P < 0.0001$ )。这表明:  $\gamma$ 1neo-PDTRP 基因免疫对高表达 MUC1 的肿瘤生长, 具有一定的免疫保护效应。

### 3 讨论

肿瘤靶抗原的确立是诱导特异性抗肿瘤免疫应答的关键, 近年来发现广泛分布于腺上皮细胞表面的糖蛋白 MUC1 可以作为肿瘤相关抗原。理由是: 1) 它在肿瘤细胞上高表达; 2) 结构上, MUC1 松散分布于肿瘤细胞表面, 并且其寡糖侧链糖基化不完全, 暴露了 MUC1 重复核心序列中的 PDTRP 肽, 使 PDTRP 有可能成为 MUC1 来源的肿瘤细胞的靶抗原。有实验室通过分析卵巢癌患者来源的 CTL 细胞, 发现其识别的抗原

表位即 MUC1 的核心序列 PDTRP, 并证明表位 PDTRP 有很强的免疫原性<sup>[5]</sup>。Maraveyas<sup>[3]</sup>等用<sup>90</sup>Yt 标记抗肿瘤 PDTRP 抗体 - HMFG1 注射到腹腔治疗卵巢癌, 显著地提高了病人的生存率。Riethmuller 等<sup>[4]</sup>将抗 PDTRP 的单克隆抗体 HMFG-1 应用于乳腺癌等肿瘤疾病的治疗, 已经取得了一定的治疗效果。为我们应用 PDTRP 作为肿瘤靶抗原对肿瘤进行治疗提供依据。

图 5 各组免疫小鼠对 4T1-PDTRP 肿瘤攻击后的生存曲线  
Fig. 5 Survival curves of mice from different groups after tumor challenge

由于 PDTRP 是一小分子量短肽, 不能诱导有效的免疫应答; 应用三串联抗原表位可以增加分子量, 且 Insight II 结果也证明三串联抗原表位模拟了 MUC1 的空间构象, 与其他实验室研究相符<sup>[6-7]</sup>。但寻找一个合适的基因载体, 使抗原表位能够有效的表达和被递呈亦是基因免疫诱导特异性免疫应答的关键。Zanetti 等<sup>[8,9]</sup>将编码靶抗原的基因构建入免疫球蛋白重链可变区 CDR3 的质粒, 形成抗原化抗体质粒, 此载体能直接靶向 B 淋巴细胞, 并由 B 淋巴细胞呈递<sup>[10]</sup>, 具有靶抗原结构外显、空间构象稳定、免疫原性强等优势, 能在免疫小鼠体内产生针对靶抗原的特异性免疫应答。因此, 我们将三串联 MUC1 肿瘤抗原表位克隆入抗原化抗体 CDR3 区域, 构建了  $\gamma$ 1neo-PDTRP, 基因体外转染细胞能有效表达。用含有靶抗原的质粒分别经脾和肌肉基因免疫小鼠, 体外可以检测到针对 PDTRP 表位的特异性体液和细胞免疫应答, 表明抗原化抗体基因免疫能有效的诱导机体产生特异性免疫应答。

进一步, 为验证所产生的针对 PDTRP 靶抗原特异性免疫应答是否具有免疫保护效应。我们以肿瘤细胞攻击 2 次基因免疫后的小鼠, 发现含有 MUC1 靶抗原免疫的小鼠, 其成瘤小(数据未显示), 存活时间显著

延长。表明 PDTRP 确实可以作为表达 MUC1 肿瘤细胞的靶抗原, 产生抗癌效应。我们还将在基因免疫的剂量和次数等方面作深入探索, 希望获得最佳的免疫保护效应。

另外, 我们还将对荷瘤小鼠进行基因免疫, 以观察 PDTRP 靶抗原是否对已建立的肿瘤模型具有治疗效应, 如果实验结果具有显著性治疗效应, 那么, 以抗原化抗体载有靶基因的基因免疫治疗将以其制备简单、高效、安全成为临床生物治疗肿瘤的有力武器, 具有广阔的应用前景。

#### [ 参考文献 ]

- [ 1 ] Dekker J, Rossen JW, Buller HA, *et al.* The MUC family: An obituary[ J ]. Trends Biochem Sci, 2002, 27( 3 ): 126-131.
- [ 2 ] Taylor-Papadimitriou J, Burchell J, Miles DW, *et al.* MUC1 and cancer[ J ]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1455( 2-3 ): 301-313.
- [ 3 ] Kosmas C, Maraveyas A, Gooden CS, *et al.* Anti-chelate antibodies after intraperitoneal yttrium-90-labeled monoclonal antibody immunoconjugates for ovarian cancer therapy[ J ]. J Nucl Med, 1995, 36( 5 ): 746-753.
- [ 4 ] Riethmuller G, Schneider-Gadicke E, Schlimok G, *et al.* Randomised trial of monoclonal antibody of adjuvant therapy of resected Dukes C colorectal carcinoma[ J ]. Lancet, 1994, 343( 8907 ): 1177-1183.
- [ 5 ] Jerome KR, Barnd DL, Bendt KM, *et al.* Cytotoxic T-lymphocytes derived from patients with breast adenocarcinoma recognize an epitope present on the protein core of a mucin molecule preferentially expressed by malignant cells[ J ]. Cancer Res, 1991, 51( 11 ): 2908-2916.
- [ 6 ] Garcia-Viloca M, Gao J, Karplus M, *et al.* How enzymes work: analysis by modern rate theory and computer simulations[ J ]. Science, 2004( 5655 ), 303:186-195.
- [ 7 ] Wong CF, McCammon AJ. Protein simulation and drug design [ J ]. Adv Protein Chem, 2003, 66: 87-121.
- [ 8 ] Gerloni M, Rizzi M, Castiglioni P, *et al.* T cell immunity using transgenic B lymphocytes[ J ]. PNAS, 2004, 101( 11 ): 3892-3897.
- [ 9 ] Gerloni M, Lo D, Ballou WR, *et al.* Immunological memory after somatic transgene immunization is positively affected by priming with GM-CSF and does not require bone marrow-derived dendritic cells[ J ]. Eur J Immunol, 1998, 28( 6 ): 1832-1838.
- [ 10 ] Xiong SD, Gerloni M, Zanetti M, *et al.* *In vivo* role of B lymphocytes in somatic transgene immunization[ J ]. Proc Natl Acad Sci, 1997, 94( 12 ): 6352-6357.

[ 收稿日期 ] 2004 - 05 - 10

[ 修回日期 ] 2004 - 07 - 16