文章编号:1000-5404(2005)03-0189-03

论著

非洲爪蟾 TGF-β5 和小鼠 TRP-2 联合免疫诱导产生抗肿瘤免疫应答

贾正才,吴玉章,邹丽云,万 瑛,吕燕波 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研究非洲爪蟾转化生长因子-β5(aTGF-β5)基因免疫对肿瘤治疗性质粒 DNA 疫苗诱导抗肿瘤免疫应答的效能的影响,探讨所诱导免疫应答的抗肿瘤机制。**方法** 用 aTGF-β5 真核表达质粒和小鼠酪氨酸酶相关蛋白 2(mTRP-2)真核表达质粒联合免疫野生型 C57BL/6 小鼠、CD4 缺陷的 C57BL/6 小鼠和 CD8 缺陷的 C57BL/6 小鼠,于免疫前或免疫后接种黑色素瘤细胞 B16F10,观测肿瘤生长和小鼠存活情况。**结果** 两种质粒联合免疫能在野生型 C57BL/6 小鼠体内诱导产生保护性和治疗性抗肿瘤免疫,而 mTRP-2 真核表达质粒单独免疫野生型 C57BL/6 小鼠及两种质粒联合免疫 CD4 或 CD8 缺陷的 C57BL/6 小鼠均不能诱导产生抗肿瘤免疫应答。**结论** aTGF-β5 基因免疫能增强编码 mTRP-2 的肿瘤治疗性质粒 DNA 疫苗诱导抗肿瘤免疫应答的能力;T 细胞免疫应答的诱导是抗小鼠黑色素瘤免疫应答所必需的。

关键词: 转化生长因子-β;DNA 疫苗;酪氨酸酶相关蛋白 2;细胞毒性 T 淋巴细胞;肿瘤

中图法分类号: R392.11; R730.5 **文献标识码:** A

Induction of antitumor immunity by genetic immunization with a combination of aTGF-β5 and mTRP-2

JIA Zheng-cai, WU Yu-zhang, ZOU Li-yun, WAN Ying, LU Yan-bo (Institute of Immunology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effects of genetic immunization with Xenopus laevis transforming growth factor-beta 5 (aTGF-β5) on the efficacy of plasmid DNA vaccine encoding murine tyrosinase-related protein 2 (mTRP-2) and investigate the mechanisms of tumor protection after immunization. **Methods** C57BL/6 wild-type mice, CD4-deficient mice, and CD8-deficient mice on the C57BL/6 background were immunized intramuscularly with a combination of aTGF-β5 and mTRP-2, and inoculated subcutaneously with B16F10 melanoma cells one day before immunization or at 7 d after immunization. Tumor growth and survival of immunized mice were investigated. **Results** Immunization with a combination of aTGF-β5 and mTRP-2 induced both protective and therapeutic antitumor immunity in C57BL/6 wild-type mice whereas the antitumor activity was significantly abrogated in CD4-deficient mice and CD8-deficient mice, but immunization with mTRP-2 alone did not induce antitumor immunity in C57BL/6 wild-type mice. **Conclusion** Genetic immunization with aTGF-β5 may enhance the effectiveness of plasmid DNA vaccine encoding mTRP-2 to elicit antitumor immunity. The antitumor activity induced by this immunization strategy may be dependent on $CD4^+$ T lymphocytes. $CD8^+$ cytotoxic T lymphocyte may be the major component responsible for the antitumor activity.

Key words: transforming growth factor-beta; DNA vaccine; tyrosinase-related protein 2; cytotoxic T lymphocyte; tumor

在抗肿瘤免疫应答中,细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)起着关键作用,是抗肿瘤免疫应答的主要效应细胞[1]。但研究表明,黑色素瘤相关抗原酪氨酸酶相关蛋白 2(tyrosinase-related protein 2, TRP-2)特异性 CTL 应答的体外效应与其在体抗肿瘤活性之间并无直接关系[2]。我们的研究发现,用非洲爪蟾转化生长因子-β5(Xenopus laevis transforming growth factor-beta 5, aTGF-β5)真核表达质粒免疫,可在野生型(wild-type, WT)C57BL/6 小鼠体内诱导产生小鼠转化生长因子-β1(murine TGF-β1, mTGF-β1)的中和性抗体,但对 B16F10 黑色素瘤的生长并无影响;而用 aTGF-β5 真核表达质粒和小鼠 TRP-2(murine TRP-2, mTRP-2)真

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(2001CB510001),国家自然科学基金资助重大项目(90208068)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2001CB510001) and the Major Program of the National Natural Science Foundation of China (90208068)

作者简介: 贾正才(1972-),男,四川省彭州市人,博士,实验师,主要从事肿瘤治疗性多肽疫苗和 DNA 疫苗方面的研究,发表论文 10 余篇。电话:(023)68752236-801

收稿日期: 2004-09-09;**修回日期:** 2004-12-11

核表达质粒联合免疫则能打破机体对自身抗原 mTRP-2 的免疫耐受，诱导产生 mTRP-2 特异性的 CTLs[3]。本研究在以往研究的基础上进一步研究了两种质粒联合免疫所诱导免疫应答的在体抗肿瘤活性，探讨了所诱导免疫应答的抗肿瘤机制，为肿瘤治疗性 DNA 疫苗的设计和研究提供新思路。

1 材料和方法

1.1 质粒

表达 aTGF-β5、mTRP-2 的真核表达质粒 pCI-aTGF-β5 和 pVAX1-mTRP-2 的构建和体外表达鉴定已在前期研究中完成。

1.2 细胞系

小鼠黑色素瘤细胞系 B16F10(H-2K^b)在本所传代保存，表达 mTRP-2 和 mTGF-β1 等[4]，采用含 10% 热灭活胎牛血清的 RPMI1640 完全培养基常规培养。

1.3 动物

C57BL/6 WT 小鼠(H-2K^b)90 只由医科院实验动物所繁育场提供；CD4 缺陷的 C57BL/6 小鼠 10 只，和 CD8 缺陷的 C57BL/6 小鼠 10 只，购自美国 Jackson 实验室，在重庆医科大学动物所繁殖。所用动物均为 6～10 周龄，雌性。动物饲养和动物实验均在洁净室内进行(SPF 级)。

1.4 动物免疫

质粒 pCI-aTGF-β5、pVAX1-mTRP-2 和 pVAX1 用 0.01 mol/L PBS 稀释为 1 mg/ml 后，于小鼠股四头肌肌肉内进行免疫，每只小鼠每次注射质粒溶液 100 μl。对于 mTRP-2 单独免疫组和 pVAX1 免疫组，每周用 pVAX1-mTRP-2 或 pVAX1 免疫 1 次，共免疫 3 次。对于 aTGF-β5 和 mTRP-2 联合免疫组，首先用 pCI-aTGF-β5 进行免疫，每周免疫 1 次，共免疫 4 次；pCI-aTGF-β5 第 1 次免疫后 1 周，开始 pVAX1-mTRP-2 的免疫。另设 PBS 对照组，每周注射 1 次(100 μl/只)，共注射 4 次。

1.5 预防模型的建立

C57BL/6 WT 小鼠 40 只，随机分成 4 组，每组 10 只。分别用 pVAX1、pVAX1-mTRP-2 或 PBS 免疫，或用 pCI-aTGF-β5 和 pVAX1-mTRP-2 联合免疫。末次免疫后 1 周，于小鼠背部左侧，皮下接种黑色素瘤细胞 B16F10(2.5×10^3/只)[5]。肿瘤接种后，定期测量肿瘤大小，观测、记录小鼠存活情况。

1.6 抗肿瘤机制研究

C57BL/6 WT 小鼠 20 只，随机分成 2 组，每组 10 只；一组为 aTGF-β5 和 mTRP-2 联合免疫组，另一组用作 PBS 对照。CD4 缺陷的 C57BL/6 小鼠和 CD8 缺陷的 C57BL/6 小鼠各 10 只。C57BL/6 WT 小鼠 aTGF-β5 和 mTRP-2 联合免疫组、CD4 缺陷的 C57BL/6 小鼠和 CD8 缺陷的 C57BL/6 小鼠用 pCI-aTGF-β5 和 pVAX1-mTRP-2 联合免疫，PBS 对照组用 PBS 注射。末次免疫后 1 周，接种 B16F10 细胞，测量肿瘤大小，观测、记录小鼠存活情况。

1.7 治疗模型的建立

C57BL/6 WT 小鼠 30 只，随机分成 3 组，每组 10 只。首先接种 B16F10 细胞，然后于肿瘤接种后 1 d 开始进行免疫。小鼠用 mTRP-2 单独免疫或与 aTGF-β5 联合免疫；对照组用 PBS 进行注射。肿瘤接种后，定期测量肿瘤大小，观测、记录小鼠存活情况。

1.8 统计学处理

采用 Student's t 检验对各组数据进行分析。

2 结果

2.1 保护性免疫应答的诱导

C57BL/6 WT 小鼠肌肉内免疫后 1 周，于皮下接种黑色素瘤细胞。与其他各组相比，aTGF-β5 和 mTRP-2 联合免疫组小鼠肿瘤的出现明显推迟，肿瘤生长速度也明显变缓；而其他各组小鼠的肿瘤的出现、肿瘤生长速度都相近。aTGF-β5 和 mTRP-2 联合免疫组小鼠的平均存活时间(53.7 ± 11.3 d)明显长于其他各组($P<0.01$)，且有 60% 小鼠的存活时间大于 50 d；其他各组小鼠的平均存活时间(mTRP-2 单独免疫组、pVAX1 免疫组和 PBS 对照组小鼠的平均存活时间分别为 35.7 ± 3.7、32.6 ± 3.7、33.6 ± 4.3 d)之间无统计学差异($P>0.05$)，见图 1。

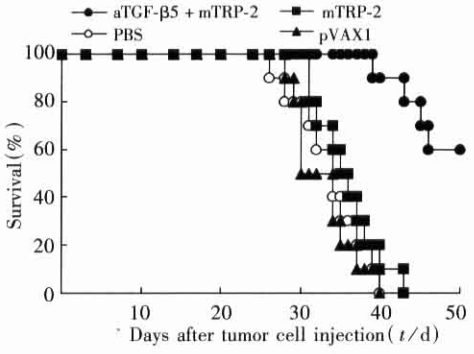


图 1 aTGF-β5 和 mTRP-2 联合免疫诱导保护性免疫应答

Fig 1 Induction of protective immunity by immunization with a combination of aTGF-β5 and mTRP-2

2.2 保护性免疫应答的抗肿瘤机制研究

与 PBS 对照组相比，aTGF-β5 和 mTRP-2 联合免疫后的 C57BL/6 WT 小鼠的存活时间(平均为 49.6 ± 7.0 d)显著延长($P<0.01$)，且有 60% 小鼠的存活时间超过 50 d；而 CD4 缺陷的 C57BL/6 小鼠和 CD8 缺陷的 C57BL/6 小鼠的平均存活时间(分别为 31.0 ± 4.0 d 和 30.4 ± 3.7 d)与 PBS 对照组小鼠的平均存活时间(31.1 ± 5.8 d)无统计学差异($P>0.05$)，CD4 缺陷的 C57BL/6 小鼠和 CD8 缺陷的 C57BL/6 小鼠的平均存活时间之间也无显著差异($P>0.05$)，见图 2。

2.3 治疗性免疫应答的诱导

图 3 显示，与 PBS 对照组相比，C57BL/6 WT 小鼠皮下接种黑色素瘤细胞后 1 d，用 aTGF-β5 和 mTRP-2 联合免疫同样能明显延长小鼠的存活时间(联合免疫组小鼠和 PBS 对照组小鼠的平均存活时间分别为 45.9 ± 12.6、32.6 ± 4.7 d)($P<0.05$)，到肿瘤接种后 50 d，仍有 50% 的小鼠存活；而用 mTRP-2 单独免疫则不能延长小鼠的存活时间(平均为 31.9 ± 4.3 d)($P>0.05$)。

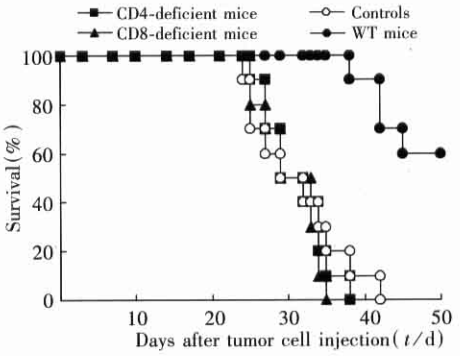


图 2　aTGF-β5 和 mTRP-2 联合免疫所诱导保护性免疫应答的抗肿瘤机制

Fig 2　Mechanism of tumor protection after immunization with a combination of aTGF-β5 and mTRP-2

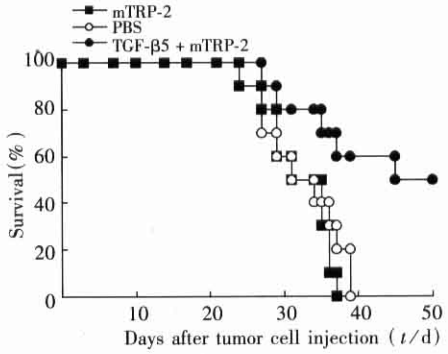


图 3　aTGF-β5 和 mTRP-2 联合免疫诱导治疗性免疫应答

Fig 3　Induction of therapeutic immunity by immunization with a combination of aTGF-β5 and mTRP-2

3　讨论

作为小鼠黑色素瘤相关抗原之一的 mTRP-2 属自身抗原，为小鼠的一种肿瘤排斥抗原。但由于免疫耐受的存在，用编码 mTRP-2 的质粒 DNA 很难在小鼠体内诱导产生抗原特异性的细胞免疫应答和体液免疫应答[6]；即使诱导产生了 mTRP-2 特异性 CTLs，所诱导的免疫应答也没有在体抗肿瘤作用[2]。TGF-β1 是强效免疫系统抑制因子，能通过抑制树突状细胞（dendritic cell，DC）的成熟和分化、抑制 T 细胞分化为 CTL 和 Th 细胞等机制抑制机体的免疫应答[7]。

而用 TGF-β1 中和性抗体中和 TGF-β1 则能提高肿瘤治疗性 DC 疫苗的免疫效能，增强抗肿瘤分子的抗肿瘤作用[8]。本研究表明，用 aTGF-β5 和 mTRP-2 联合免疫能在野生型小鼠体内诱导产生保护性和治疗性抗肿瘤免疫应答。结合我们以前的研究结果提示：用 aTGF-β5 和 mTRP-2 联合免疫可能是通过所诱导产生的 mTGF-β1 中和性抗体对 mTGF-β1 的中和增强了 pVAX1-mTRP-2 的免疫效能，打破了机体对 mTRP-2 的自身免疫耐受，从而在小鼠体内诱导产生了抗肿瘤免疫应答。

研究表明，大部分基于 TRP-2 的肿瘤治疗性疫苗所诱导的抗肿瘤免疫应答都需要 $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ CTLs 的参与[9]。但在有些情况下，抗肿瘤免疫应答的有效诱导却并不需要 $CD4^+$ T 细胞的辅助[5]。在本研究中，CD8 的缺陷导致抗肿瘤活性的完全消失，说明 $CD8^+$ CTLs 是本研究方案所诱导的抗肿瘤免疫应答的主要效应细胞；而在 CD4 缺陷小鼠体内也不能诱导抗肿瘤免疫应答的产生，表明 $CD4^+$ T 细胞对抗肿瘤免疫应答的诱导是必需的。

我们以前的研究结果表明，$CD4^+$ T 细胞是 pCI-aTGF-β5 诱导 mTGF-β1 中和性抗体产生所必需的。可见，$CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ CTLs 都参与了 aTGF-β5 和 mTRP-2 联合免疫对抗肿瘤免疫应答的诱导。但是，我们并没有足够的证据来阐明，在 pCI-aTGF-β5 所诱导的 mTGF-β1 中和性抗体的参与下，mTRP-2 特异性抗肿瘤免疫应答的诱导是否需要 $CD4^+$ T 细胞的参与，下一步我们将就此问题进行更深入的研究。

参考文献：

[1] Mendiratta S K, Thai G, Eslahi N K, *et al*. Therapeutic tumor immunity induced by polyimmunization with melanoma antigens gp100 and TRP-2[J]. Cancer Res, 2001, 61(3): 859 - 863.

[2] Bellone M, Cantarella D, Castiglioni P, *et al*. Relevance of the tumor antigen in the validation of three vaccination strategies for melanoma[J]. J Immunol, 2000, 165(5): 2651 - 2656.

[3] 贾正才，吴玉章，邹丽云，等. 非洲爪蟾 TGF-β5 和小鼠 TRP-2 联合免疫诱导抗原特异性 CTLs[J]. 免疫学杂志，2004，20(3)：165 - 168.

[4] Gorelik L, Flavell R A. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-β signaling in T cells[J]. Nat Med, 2001, 7(10): 1118 - 1122.

[5] Miconnet I, Coste I, Beermann F, *et al*. Cancer vaccine design: a novel bacterial adjuvant for peptide-specific CTL induction[J]. J Immunol, 2001, 166(7): 4612 - 4619.

[6] Steitz J, Bruck J, Steinbrink K, *et al*. Genetic immunization of mice with human tyrosinase-related protein 2: implications for the immunotherapy of melanoma[J]. Int J Cancer, 2000, 86(1): 89 - 94.

[7] Strobl H, Knapp W. TGF-beta1 regulation of dendritic cells[J]. Microbes Infect, 1999, 1(15): 1283 - 1290.

[8] Kobie J J, Wu R S, Kurt R A, *et al*. Transforming growth factor beta inhibits the antigen-presenting functions and antitumor activity of dendritic cell vaccines[J]. Cancer Res, 2003, 63(8): 1860 - 1864.

[9] Perricone M A, Claussen K A, Smith K A, *et al*. Immunogene therapy for murine melanoma using recombinant adenoviral vectors expressing melanoma-associated antigens[J]. Mol Ther, 2000, 1(3): 275 - 284.

（编辑　薛国文）