论著

文章编号:1000-5404(2006)01-0066-03

大肠癌新型CEA疫苗重组杆状病毒的表达与鉴定

辇伟奇[1],吴玉章[2],王志新[1] (第三军医大学:[1]新桥医院全军肿瘤诊治中心,重庆市肿瘤生物技术研究所,重庆 400037,[2]基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 利用Bac-to-Bac杆状病毒表达系统,构建新型CEA融合表位疫苗(以HPV16L1为蛋白载体)的重组杆状病毒。**方法** 构建含有HPV16L1片段和CEA-PADRE合成片段的表达载体pFastBac1-V,转化DH10Bac感受态菌。利用其含有的细菌Tn7转座系统,将该基因重组至杆状病毒穿梭质粒bacmid中,转染昆虫细胞sf9,获得新型CEA疫苗的重组杆状病毒。**结果** 限制性内切酶酶切和DNA序列分析表明目的片断正确克隆到杆状病毒转移载体pFastBac1中;重组杆状病毒感染昆虫细胞后,PCR检测可以扩增出相应大小的片段。**结论** 利用杆状病毒表达系统,成功构建了CEA融合表位疫苗的重组杆状病毒,为进一步的研究奠定了基础。

关键词:癌胚抗原;疫苗;大肠癌;杆状病毒

中图法分类号:R394.2;R730.51;R735.34 **文献标识码**:A

Construction and identification of recombinant baculovirus of the novel CEA vaccine

NIAN Wei-qi[1], WU Yu-zhang[2], WANG Zhi-xin[1] ([1]Cancer Research Center, Xinqiao Hospital, [2]Institute of Immunology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To design a novel efficient CEA vaccine of fission epitopes with the vehicle of HPV16L1, and construct the recombinant baculovirus in Bac-to-Bac baculovirus expression system. **Methods** The recombinant baculovirus expression vector pFastBac1-V was constructed. HPV16L1 and CEA-PADRE synthesis primers were inserted into bacmid in *E. coli* DH10Bac with the help of Tn7 transposition system. Then the recombinant baculovirus was got by infecting insect cell sf9. **Results** HPV16L1 and CEA-PADRE synthesis primers that were cloned to the baculovirus transfer vector pFastBac1 were assessed by restriction analysis and direct sequencing. The recombinant baculovirus of the novel vaccine had been constructed. After infected sf9, the correct fragment was amplified by PCR. **Conclusion** The baculovirus of CEA vaccine of fussion epitopes with the vehicle of HPV16L1 was constructed.

Key words: CEA; colorectal cancer; vaccine; baculovirus

癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)是高效疫苗较为理想的靶抗原之一。通常情况下CEA被免疫系统视为自身抗原,不能诱发有效的抗肿瘤免疫应答[1]。针对上述问题,我们拟以CEA HLA-A2限制性CTL表位与PADRE(非天然通用Th表位)作为CEA疫苗的融合治疗表位,以人类乳头状病毒16型晚期结构蛋白(HPV16L1)作为CEA疫苗的蛋白载体,并以安全、高效的真核细胞表达体系——Bac-to- Bac杆状病毒表达系统来表达重组蛋白,从而构建新型高效的CEA疫苗。

1 材料与方法

1.1 材料

含全长HPV16L1 ORF的重组质粒114KL1 pFastBac1由美国NIH的Schiller教授惠赠;pFastBac1由军事医学院微生物研究所惠赠;菌株DH10Bac由第三军医大学临床生化教研室惠赠;大肠杆菌DH5α感受态细胞为本室保存;sf9细胞购自武汉大学典型菌种保藏中心。

克隆所需的酶均购于美国NEB公司。胎牛血清、昆虫细胞无血清培养基购自Hyclone公司。

1.2 方法

1.2.1 pFastBac1-L1的构建 根据杆状病毒转移载体pFastBac1多克隆酶切位点和HPV16L1的DNA序列,设计引物:在上游引物的5′端加入*Sal* Ⅰ酶切位点;在下游引物的5′端加入*Not* Ⅰ酶切位点,并加入终止密码子TAA,以除去原DNA分子中编码HPV16L1 C末端的34个氨基酸的序列。将PCR扩增产物回收后,连接入pMD18-T。分别用*Not* Ⅰ和*Sal* Ⅰ酶切HPV16L1 pMD18-T和pFastBac1,回收酶切产物后连接。常规提取质粒,经PCR鉴定筛选后送上海博亚生物公司测序验证。

1.2.2 新型CEA疫苗重组杆状病毒转移质粒载体(pFastBac1-V)的构建 CEA-PADRE可退火引物的设计如下所示:

CEA-PADRE-1: 5′-CTAGAAGCAGCAGCTTTAAGTGTCCA-

作者简介:辇伟奇(1977-),男,吉林省大安市人,硕士研究生,医师,主要从事肿瘤生物治疗方面的研究。电话:(023)65201327

通讯作者:王志新,电话:(023)65209855

收稿日期:2005-09-18;修回日期:2005-12-05

AGCAGCCACAAATTTAGCGAGGTTGAGGTTCGCTCCCGAAAGG-TAGC-3′；CEA-PADRE-2：

5′-GGCCGC TAC CTT TCG GGA GCG AAC CTC AAC CTC GCT AAA

Y L S G A N L N L A K

TTT GTG GCT GCT TGG ACA CTT AAA GCT GCT GCT T-3′

F V A A W T L K A A A

其中，$CEA_{605-613}$（YLSGANLNL）为 CEA HLA-A2 限制性 CTL 表位，PADRE（AKFVAAWTLKAAA）为 Th 表位；另外，两端分别设计可与经 *Not* Ⅰ 和 *Xba* Ⅰ 酶切后 HPV16L1 pFastBac1 结合的各位点。将以上两个引物稀释为 20 pmol，各取 10 μl，95 ℃ 10 min，迅速降温。将 pFastBac1-L1 用 *Not* Ⅰ 和 *Xba* Ⅰ 酶切，与退火后的产物连接。常规提取质粒，送上海博亚生物公司测序验证。

1.2.3　转座效应　　将构建好的融合表位疫苗重组杆状病毒转移质粒和空载的 pFastBac1 用 $CaCl_2$ 转化方法分别转化 DH10Bac，置冰浴 30 min。42 ℃热休克 90 s，冰浴 2 min。加入 900 μl SOC 培养基混匀，以 150 r/min 于 37 ℃摇 4 ~ 6 h。在含卡那霉素 50 μg/ml、四环素 10 μg/ml、庆大霉素 7 μg/ml、X-gal 200 μg/ml、IPTG 40 μg/ml 的 LB 平板上，37 ℃培养 24 h，用蓝白斑表型筛选阳性重组 Bacmid DNA。挑取白斑在含卡那霉素、四环素、庆大霉素的液体 LB 培养基中 37℃摇床培养 20 ~ 24 h，小提质粒重组 Bacmid DNA。

1.2.4　昆虫细胞的培养　　sf9 细胞在含有 10% 胎牛血清的昆虫细胞无血清培养基中 28 ℃、无需 CO_2 培养。

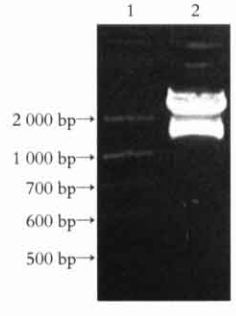
1.2.5　重组杆状病毒的表达　　采用 Lipofectamine2000。将 Bacmid DNA 10 μl，昆虫细胞无血清培养基 90 μl 混匀，室温孵育 15 min 为 A 液；将 Lipofectamine2000 6 μl，昆虫细胞无血清培养基 94 μl 混匀，室温孵育 15 min 为 B 液；上述 A 液和 B 液混匀加入细胞中，加入 800 μl 无血清培养液，27 ℃孵育 3 h，移出液体，加入 2 ml 完全培养基，27 ℃培养过夜，次日换液，继续培养 72 h。收集培养上清，500 × *g* 离心 10 min，将上清分成小份作病毒原种，4 ℃或 −80 ℃保存。

1.2.6　重组杆状病毒鉴定　　取适量重组病毒上清，浸染细胞，感染后 5 d 收集细胞，经酚-氯仿提取病毒基因组 DNA，取适量作模板，加入引物经 PCR 反应扩增，1.5% 琼脂糖电泳观察有无目的基因的扩增片段。

2　结果

2.1　新型 CEA 疫苗重组杆状病毒转移质粒的酶切鉴定

重组杆状病毒转移质粒经 Sal Ⅰ 和 Xba Ⅰ 双酶切后，分别在 4.8 kb 和 1.6 kb 附近处出现载体条带和目的条带。见图 1。



1：DNA 标准；2：重组杆状病毒转移质粒双酶切产物

图 1　重组杆状病毒转移质粒双酶切电泳图

2.2　新型 CEA 疫苗重组杆状病毒转移质粒的测序

测序证实在重组质粒的 Not Ⅰ 酶切位点后，未见编码 HPV16L1 C 末端 34 个氨基酸的序列，且出现合成序列（CEA-PADRE）。具体如下：

cgaagcgcgcggaattcaaaggcctac gtcgac atgcaggtgacttttatttaca

Sal Ⅰ

5581 tcctagttat tacatgttac gaaaacgacg taaacgttta ccatattttt tttcagatgt

5641 ctctttggct gcctagtgag gccactgtct acttgcctcc tgtcccagta tctaaggttg

5701 taagcacgga tgaatatgtt gcacgcacaa acatatatta tcatgcagga acatccagac

… …

6901 cccaggcaat tgcttgtcaa aaacatacac ctccagcacc taaagaagat gatccccctta

6961 aaaaatacac tttttgggaa gtaaatttaa aggaaaagtt ttctgcagac ctagatcagt

7021 ttcctttagg acgcaaattt ttactacaata gcggccgcta cctttcggga gcgaacctca

Not Ⅰ

acctcgctaa atttgtggct gcttggacac ttaaagctgc tgct … …

2.3　重组杆状病毒在 sf9 细胞中的表达

将重组 Bacmid DNA 转染 sf9 细胞后，在 sf9 细胞中装配，产生了重组杆状病毒。转染 72 h 后可观察到细胞病变，显微镜下可见细胞核变圆、肿大，细胞折光性增强等特征，而对照细胞无此变化。见图 2。

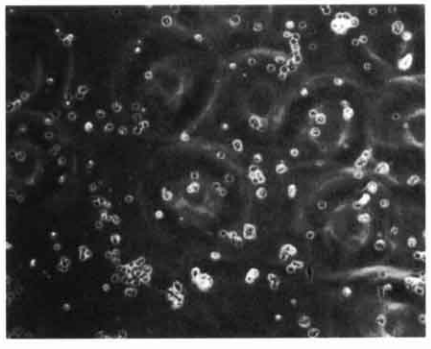
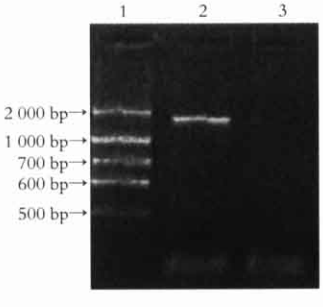


图 2　感染杆状病毒的 sf9 细胞　（×200）

2.4　新型 CEA 疫苗重组杆状病毒的鉴定

细胞 DNA 的 PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳，重组杆状病毒组在 1.6 kb 附近处出现特异性扩增带。见图 3。



1：DNA 标准；2：重组杆状病毒 PCR 产物；3：阴性对照

图 3　重组杆状病毒 DNA PCR 鉴定

3 讨论

癌胚抗原(CEA)是较早发现的肿瘤相关抗原之一。其在大肠癌中的高表达(80% ~90%)和相对特异性,使之成为大肠癌免疫治疗的理想靶点之一[2]。虽然目前已有 CEA 多种疫苗形式可不同程度地激发特异性的 CTL 应答,但各自也都存在一定的不足。因此,设计发展新型安全高效的 CEA 疫苗具有非常重要的意义。

国内外已有大量研究证实,在机体抗肿瘤的免疫应答中,细胞毒性 T 淋巴细胞介导的特异性细胞免疫是一类重要的免疫效应机制。而近年来辅助性 T 淋巴细胞在这一应答过程中的作用日益受到重视。Giuntoli 等[3]的研究表明,仅具备 CTL 表位的肿瘤疫苗,无法克服 AICD(激活诱导的细胞死亡),不能建立有效的免疫应答。因此,高效肿瘤疫苗中一定要包含活性较强的 Th 表位。泛 DR 辅助性 T 细胞表位(PADRE)是通过在多聚丙氨酸骨架中导入能与常见代表性的 DR 分子结合所必须的主要 DR 锚接残基构建而成。作为通用型辅助性 T 细胞表位的 PADRE,它完全为人工合成,与针对的病原体抗原无相关性,可调节 HTL 应答向 Th1 或 Th2 表型极化,其辅助诱导 CTL 的能力比天然 Th 表位高 1 000 倍以上。HIV、胃癌等[4,5]疫苗的研究也已证实,PADRE 与其他抗原 CTL 表位或 B 细胞表位的无间隙融合,可增强表位的免疫原性,有利于打破免疫系统对抗原的免疫耐受。因此,我们构建的疫苗,将实现 CTL 表位和 Th 表位的无隙融合。这必将能有力激活 $CD4^+$ T 细胞,而激活的 Th 细胞可分泌 IL-2、IL-12 等细胞因子,这些细胞因子再以旁分泌方式作用于 CEA 抗原特异性 T 细胞,从而大大增强疫苗的免疫效率。

病毒样颗粒是近几年发展起来并具有潜在临床应用前景的一类疫苗载体。HPV 的结构蛋白 L1、L2 有能够自我组装成为病毒样颗粒(VLPS)的特性。进一步研究还表明[6],HPV16L1 C 末端不参与 VLP 形成,切除其 C 末端 30 ~50 个氨基酸,结合最多可至 60 ~90 个氨基酸残基后,重组蛋白仍可高效地形成稳定的 VLPs。文献[7]报道,HPV16L1 本身还具有极强的免疫原性和免疫综合性,能迅速诱导 DCs 表型、功能上的成熟,引起 DCs 活化并分泌大量 IL-12。后者诱导了 Th 细胞发生 Th1 型极化反应,促使 Th1 细胞分泌 IFN-γ 和 IL-2。而 IFN-γ 和 IL-2 可通过上调 MHC-Ⅰ、Ⅱ类分子及粘附分子的表达,促进 CTL 活化。活化的 CTL 可产生大量 IFN-γ,后者也可诱导 APC 分泌 IL-12。总之,三者间的交叉激活必将实现 CTL 的高效活化。

另一方面,目前已有研究证实[8],大肠癌组织中特异型 HPV 主要以 HPV16 和 HPV18 为主(二者占 HPV 阳性者的 84.2 %),尤以 HPV16 更为重要(占 HPV 阳性者 50% ~70%)。这就使开发以 HPV16L1 为载体的大肠癌疫苗有着一定的现实意义。同时,现已有证据表明[9],L1 VLPs 在体内可诱发 L1 特异性 CTL,可使相关的肿瘤模型消退。因此,本疫苗在机体内将可能诱生针对 HPV16L1 的特异性抗体和 L1、CEA 特异性 CTL,即可预防 HPV16 感染,又可有效治疗大肠癌。

本研究结果将为下一步在昆虫细胞表达重组蛋白疫苗,进而研究其免疫活性和安全性打下了必备的基础。

参考文献:

[1] GREINER J W, ZEYTIN H, ANVER M R, *et al*. Vaccine-based therapy directed against carcinoembryonic antigen demonstrates antitumor activity on spontaneous intestinal tumors in the absence of autoimmunity [J]. Cancer Res, 2002, 62(23): 6944 -6951.

[2] ZEH H J, STAVELY O'CARROLL K, CHOTI M A. Vaccines for colorectal cancer[J]. Trends Mol Med, 2001, 7(7): 307 -313.

[3] GIUNTOLI R L 2ND, LU J, KOBAYASHI H, *et al*. Direct costimulation of tumor-reactive CTL by helper T cells potentiate their proliferation, survival, and effector function[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(3): 922 -931.

[4] DAFTARIAN P, ALI S, SHARAN R, *et al*. Immunization with Th-CTL fusion peptide and cytosine-phosphate-guanine DNA in transgenic HLA-A2 mice induces recognition of HIV-infected T cells and clears vaccinia virus challenge[J]. J Immunol, 2003, 171(8): 4028 -4039.

[5] GUO C C, DING J, PAN B R, *et al*. Development of an oral DNA vaccine against MG7-Ag of gastric cancer using attenuated salmonella typhimurium as carrier[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(6): 1191 -1195.

[6] CHEN X S, GARCEA R L, GOLDBERG I, *et al*. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16[J]. Mol Cell, 2000, 5(3): 557 -567.

[7] LENZ P, DAY P M, PANG Y Y, *et al*. Papillomavirus-like particles induce acute activation of dendritic cells[J]. J Immunol, 2001, 166(9): 5346 -5355.

[8] 曹建彪, 李世荣, 朱秋屏, 等. 人乳头瘤病毒与大肠癌的发生及病理组织学相关性的研究[J]. 中华消化杂志, 2000, 20(5): 327 -330.

[9] OHLSCHLAGER P, OSEN W, DELL K, *et al*. Human papillomavirus type 16 L1 capsomeres induce L1-specific cytotoxic T lymphocytes and tumor regression in C57BL/6 mice[J]. J Virol, 2003, 77(8): 4635 -4645.

(编辑 龙 亮)