文章编号:1000-5404(2006)02-0169-03

论著

# hTERT 隐性表位肽-核酸病毒样颗粒疫苗抗胃癌免疫的初步研究

郭 红[1],郝 嘉[2],吴 超[3],石 云[3],房殿春[1] (第三军医大学:[1]西南医院全军消化内科中心,重庆 400038,[2]新桥医院心血管外科,重庆 400037,[3]医学检验系临床微生物及免疫学教研室,重庆 400038)

**提 要:目的** 设计新型的人端粒酶逆转录酶(hTERT)肽-核酸病毒样颗粒疫苗,并研究其抗胃癌的作用。**方法** 将阳离子隐性表位肽和DNA疫苗协同性结合于同一疫苗形成病毒样颗粒,通过DNA阻滞试验、DNA沉淀试验、免疫组化等试验优化该疫苗参数,并鉴定其免疫原性和观察其体内激发特异性CTL反应的有效性。**结果** 确定制备疫苗的参数为浓度为150 mmol/L NaCl,电荷比为4。证实该疫苗可激发特异性CTL反应,并对胃癌细胞具有特异性杀伤活性,Elispot实验显示能够有效诱导的IFN-γ分泌。**结论** 成功构建了具有特异性CTL杀伤活性的hTERT隐性表位肽-核酸病毒样颗粒疫苗,为进一步探索其体内抗胃癌免疫作用奠定了基础。

**关键词:** 人端粒酶逆转录酶;胃癌;隐性表位;肽-核酸病毒样颗粒疫苗;细胞毒T淋巴细胞
**中图法分类号:** R392-33;R392.7;R735.2 **文献标识码:** A

# The anti-gastric cancer immunity of the virus-like particulate peptide-nucleic acid vaccine of human telomerase reverse transcriptase

GUO Hong[1], HAO Jia[2], WU Chao[3], SHI Yun[3], FANG Dian-chun[1] ([1]Gastroenterology Research Center, Southwest Hospital, Chongqing 400038, [2]Department of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Chongqing 400037, [3]Department of Clinical Microbiology, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract: Objective** To construct a novel virus-like particulate peptide-nucleic acid vaccine (VPNV) of human telomerase reverse transcriptase (hTERT), and to study the anti-gastric cancer immunity. **Methods** Cationic antigenic peptide was combined with the DNA vaccine to obtain VPNV. The preparing parameters were optimized by DNA blockade assay, DNA precipitation assay, immunohistochemistry *etc*. The immunogenicity of hGM-CSF and hTERT were detected by ELISA and immunohistochemistry. The CTL response and the IFN-γ secretion were detected by lactate dehydrogenase release method and enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay. **Results** The parameters of VPNV should be 150 mmol/L NaCl and at charge ratio of 4. The vaccine was confirmed to trigger effective and specific CTL responses and have specific cytolytic activity to gastric cancer cell KATO-3 and induce IFN-γ secretion *in vivo*. **Conclusion** VPNV that could stimulate antigen specific CTL response was successfully constructed. This paves the way for further investigation of the anti-gastric cancer immunity.

**Key words:** human telomerase reverse transcriptase; gastric cancer; cryptic epitope; virus-like particulate peptide-nucleic acid vaccine; cytotoxic T-lymphocyte

人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)在维持肿瘤继续分裂、增殖和生存中发挥着重要作用。我们发现胃癌组织中端粒酶阳性率高达92.4%[1],且其异常表达或激活是胃癌形成的重要原因之一,并具高度保守性[2,3]。虽然hTERT在人体内少数正常的细胞组织(如胸腺等)内有表达,但目前以其为靶标的实验却很少发现自身免疫反应[4]或自体耐受[2],这可能与其在正常组织中低表达或其多肽未被有效递呈有关。因此如以hTERT为靶标制备瘤苗,将有望激发机体特异性抗胃癌的免疫应答。

现已明确,利用瘤苗有效激活特异性细胞毒T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL),是实现肿瘤主动免疫治疗的关键所在[5],故高效的新型CTL瘤苗正处于积极的研究探索中。本研究结合基因治疗领域富正电荷肽类DNA转运载体进展,同时选取hTERT全长抗原及其隐性表位异形肽p572Y[6],以人粒细胞、巨噬细胞集落刺激因子(human granulocyte macrophage colony stimulating factor, hGM-CSF)为佐剂[7],制备和鉴定了新型的病毒样颗粒肽-核酸疫苗(virus-like particulate peptide-nucleic acid vaccine, VPNV),并评价其激发体内特异性CTL反应的有效性。

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(30400208)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30400208)
**作者简介:** 郭 红(1971-),女,湖南省湘潭市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事消化道肿瘤方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)66930172, E-mail: haoguo11@sina.com
**通讯作者:** 房殿春,电话:(023)68754124
**收稿日期:** 2005-09-14;**修回日期:** 2005-10-28

## 1 材料与方法

### 1.1 多肽合成与质粒构建

参照文献[8]合成 hTERT 的隐性 CTL 表位 p572 异形肽，为 YLFFYRKSV，即 p572Y。合成阳离子包装肽[K]$_{18}$P572Y（其 N 端含 18 个赖氨酸，$K_{18}P_9$），纯化鉴定备用。构建含人 GM-CSF 和人端粒酶催化亚单位 hTERT 的 cDNA 分别克隆入真核载体 pTCAE[9] 的 *Bgl* Ⅱ-*Eco*R Ⅰ表达盒以及 *Sal* Ⅰ-*Bam*H Ⅰ表达盒中，构建重组双表达质粒 pTGH[8]。酶切鉴定并测序。

### 1.2 疫苗制备

参照文献[10]制备方案，将不同量的阳离子抗原肽和 2 μg 质粒 DNA 分别溶于 50 μl 的 87.5 mmol/L 和 150 mmol/L 的 NaCl 水溶液中，将肽滴定混旋入 DNA 溶液中，室温静置 60 min，形成不同电荷比的肽-DNA 聚合物，再通过 DNA 阻滞实验和 DNase I 保护试验来确定最佳电荷比，DNA 沉淀试验确定最佳 NaCl 溶液浓度。

### 1.3 DNA 沉淀分析

将不同 NaCl 浓度下的不同电荷比肽-DNA 聚合物，12 000 ×*g* 离心 30 min，测定上清 *D* 值（260），以质粒终浓度作对照。计算 DNA 沉淀率 = $\{[1-D(260)]/D_{control}\}\times 100\%$。

### 1.4 细胞转染与体外转染效应分析

将制备好的疫苗转染至 COS-7 细胞，以 DOTAP 法转染裸质粒 pTGH 为阳性对照，收获细胞。用 ELISA 法检测 hGM-CSF 的表达水平，由此分析疫苗体外转染效率的高低。用免疫组化法检测 hTERT 的表达，以兔抗人 hTERT 抗体为一抗。

### 1.5 动物免疫

雌性转基因鼠 C57BL/6-TgN（HLA-A2.1）1Enge/J 购自美国 Jackson Lab，于鼠龄 6～8 周免疫。动物分为 VPNV（$K_{18}P_9$/pTGH）、$K_{18}P_9$/pTG、$K_{18}S_{12}$/pTGH 免疫组，每组 5 只。免疫部位为背侧尾根部皮下，免疫剂量为 100 μl/只，免疫 2 次，间隔 1 周。其中 $K_{18}S_{12}$ 是 $K_{18}P_9$ 的无关对照肽，为乙肝表面抗原优势表位 $HBsAg_{28\text{-}39}$，其氨基酸序列为 $K_{18}$-IPQSLDSWWTSL。

### 1.6 特异性 CTL 杀伤活性检测（LDH 释放法）

参照 CytoTox 96 试剂盒（Promega 公司）操作。转基因小鼠免疫完成后 1 周，无菌取各组小鼠脾细胞，用完全 RPMI1640 培养基（含 P572Y1 μg/ml、20 U/ml 重组人 IL-2）刺激培养 5 d。选择胃癌细胞株 KATO-3（HLA-A2$^+$、hTERT$^+$）、T2 细胞株（HLA-A2$^+$、hTERT$^-$）和 P572Y 负载的 T2 细胞（1 μg/ml P572Y）为靶细胞，T2 细胞为阴性对照。设置效/靶比分别为 100∶1，50∶1，25∶1，12.5∶1。靶细胞为 $5\times10^4$/ml。效靶细胞作用 4 h，反应终止后，每孔取 50 μl 上清液检测乳酸盐脱氢酶（LDH）的释放，测定 *D*（490），按公式计算：特异性释放率 =［（实验释放 - 效自发释放 - 靶自发释放）/（靶最大释放 - 靶自发释放）］×100%。

### 1.7 Elisopt 检测分泌 IFN-γ 的特异性 T 细胞频数

酶联免疫斑点法（Enzyme-Linked ImmunoSpot assay，ELISPOT）是近年建立的检测分泌细胞因子的淋巴细胞数量的实验方法，具高度特异性和敏感性，本研究用于定量检测释放 IFN-γ 的有功能的特异性 T 细胞频数。将上组中制备的各组小鼠淋巴细胞，每孔以 $1\times10^5$/100 μl 加入，用 Elispot 试剂盒（R&D 公司）检测分泌 IFN-γT 细胞斑点，参照说明书进行实验操作，结果在显微镜下观察计数。

### 1.8 统计学分析

采用 SPSS 统计软件进行 *t* 检验。

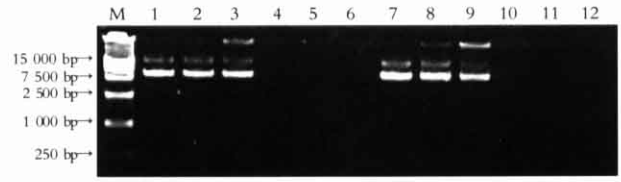
## 2 结果

### 2.1 多肽合成与质粒构建的鉴定

按照标准 Fmoc 方案合成、纯化和鉴定多肽 $K_{18}P_9$ 和 P572Y，纯度达国际多肽试验标准；质谱鉴定相对分子质量与理论值基本相符，证实产物为目标多肽[8]。pTGH 经双酶切鉴定并测序，与 GeneBank 中人 GM-CSF 和 TERT 序列一致，证实质粒构建成功[8]。

### 2.2 疫苗制备

DNA 阻滞试验用于分析不同量多肽与 DNA 发生完全阻滞质粒泳动所需的最小电荷比（r）值。无论 NaCl 溶液的浓度为 150 mmol/L 或 87.5 mmol/L，当 r<2 时，阳离子肽-核酸疫苗的泳动被部分阻滞，随着 r 值的逐渐增大，泳动的聚合物数量迅速减少，滞留在加样孔中的疫苗的 DNA 量相应增多（图 1）。这种阻滞的原因是由于阳离子多肽与 DNA 结合，一方面中和了 DNA 的电荷；另一方面，使 DNA 分子在电场中泳动的阻力增加。当 r≥2 时，聚合物被完全阻滞，提示质粒 DNA 被充分包装所需的最小 r 值为 2。DNase I 保护试验结果也提示 DNA 被包装肽有效保护所需最小 r 值为 2[8]。




M：DL 15 000 标准；150 mmol/L NaCl：1∶r=0；2∶r=0.5；3∶r=1；4∶r=2；5∶r=4；6∶r=8；87.5 mmol/L NaCl：7∶r=0；8∶r=0.5；9∶r=1；10∶r=2；11∶r=4；12∶r=8

**图 1 DNA 凝胶阻滞分析**

### 2.3 DNA 沉淀试验

阳离子多肽与 DNA 的结合受 NaCl 浓度的影响。结果显示 150 mmol/L 的 NaCl 浓度为包装肽和质粒协同性结合的适当条件，因此将此浓度作为疫苗制备的 NaCl 浓度参数。

### 2.4 细胞转染与表达分析

为鉴定肽-DNA 聚合物在体外对哺乳细胞的转染效应以及双表达质粒编码 hGM-CSF 和 hTERT 表达后的免疫原性，本研究分别以 r 值为 1、2、4、8 的疫苗转染 COS-7，通过 ELISA 法检测转染细胞上清中的 GM-CSF 的表达量来评价其转染效应，发现当 r=4 时，可见有较高水平的 GM-CSF 表达，与阳性对照 DOTAP 组比较，疫苗转染效率约为其 78.5%，即此时转染效率最高当。r 为 2 或 8 时，GM-CSF 表达水平下降。同时免疫组化也证实双表达质粒编码的 hTERT 基因能在真核细胞内有效表达，见图 2。

### 2.5 VPNV 有效激发转基因小鼠体内特异性 CTL 反应

分别以 KATO-3 细胞、P572Y 负载的 T2 细胞和 T2 细胞为靶细胞，以证实 VPNV 体内激发 CTL 反应的有效性。如图 3A 所示：证实 VPNV 组免疫诱发的 CTL 对 KATO-3 细胞和 P572Y 多肽负载的 T2 细胞具有明显的溶破效应，且具效靶比依赖性，在效靶比达到 100∶1 时，效应细胞可特异性溶破约 70% 的靶细胞，KATO-3 和 P572Y 负载的 T2 细胞均对其具有明显的敏感

性；但 VPNV 激发的效应细胞对未经 P572Y 负载的 T2 细胞则无溶破能力，提示此杀伤效应具有抗原特异性。K18P9/pTG 组虽然也诱导出 CTL 活性（图 3B），但在效靶比 100∶1 时对胃癌细胞 KATO-3 的特异性溶破率仅约 40% 左右，明显低于 VPNV 诱导的杀伤效应（$P<0.01$）。K18S12/pTGH 组（图 3C）则没有诱导出明显的特异性细胞毒活性（$P>0.05$）。

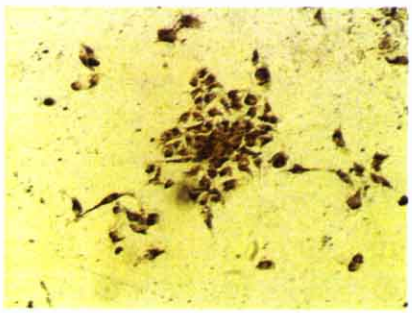
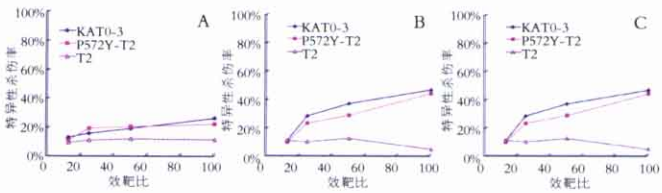


**图 2　hTERT 基因表达的免疫组化**　（DAB×100）




A：VPNV；B：K18P9/pTG；C：K18S12/pTGH

**图 3　免疫小鼠脾细胞的肿瘤特异性 CTL 活性**

### 2.6　CTL 的 IFN-γ 的分泌

显微镜下计数结果显示，VPNV 组刺激其特异的分泌 CTL 的细胞数最多，为（88.2±3.6）/$10^5$ 个细胞；K18P9/pTG 组为（39.1±4.7）/$10^5$ 个细胞，经单因素方差分析其明显低于 VPNV 组（$P<0.01$）；而 K18S12/pTGH 组则为（8.4±0.6）/$10^5$ 个细胞。

## 3　讨论

目前以激发体内 CTL 反应为目标的疫苗包括多肽抗原或核酸抗原分别免疫的方式，但总体疗效并不如人意。阳离子肽类 DNA 转运载体是基因治疗领域中一类备受关注的技术[11]，其中富含正电荷多肽可经电中和作用将富含负电荷的质粒聚合并压缩，形成几十纳米的致密颗粒，从而易于被真核细胞摄入，以达到基因转染的目的。最新的研究表明，源于 hTERT 的隐性 CTL 表位 P572（HLA-A2$^+$），将其改良为 P572Y 异形肽后，即可增强其免疫原性和与 MHC Ⅰ类分子的结合力，又不会破坏其抗原特异性，更可有效激活较强的 CTL 反应[12]，并可对表达水平高低不同的癌细胞产生特异性杀伤[5]。

本研究以 hTERT 为靶标，合成含隐性表位异形肽 P572Y 的阳离子包装肽，并制备含有编码 hTERT 全长基因和 hGM-CSF 基因的双表达质粒，使二者结合形成一种新型的病毒样颗粒肽－核酸疫苗 VPNV，其中的包装肽可有效保护质粒免受 DNase Ⅰ的破坏，并形成致密颗粒，故有利于被抗原递呈细胞摄入加工。实验证明，VPNV 可有效激发特异性 CTL 反应，对胃癌细胞 KATO-3 具有特异性杀伤活性。同时，我们采用 ELISPOT 方法评价 VPNV 对转基因小鼠诱导细胞免疫的影响，ELISPOT 是一种在单细胞悬液中定量检测细胞因子生成细胞的分析方法，虽操作简便，但却能提供极类似体内实验的环境。上述结果显示，当 VPNV 多肽与核酸并置结构中任一成分的丢失都会降低或消除 CTL 激发的有效性，即使这两种成分分别位于不同的病毒样颗粒中，也无法完全达到免疫效果，说明二者在抗癌免疫反应的过程中具有协同效应。依据现有资料，本研究首次同时采用 hTERT 全长和改良隐性表位制备肿瘤疫苗，并合理结合了多肽疫苗和核酸疫苗二者的优势，对其免疫协同效应进行了探索性的研究，研究结果一方面提示 VPNV 将有望成为新型有效的肿瘤疫苗形式，另一方面也初步证实了多肽－核酸抗原并置对于激发有效抗癌免疫的必要性和此疫苗设计理念的合理性，但该疫苗对体内预防和治疗胃癌的价值等方面有待进一步的试验研究。

## 参考文献：

[1] 杨仕明，房殿春，罗元辉，等. 不同病变胃粘膜端粒酶活性及其亚单位的检测[J]. 癌症，2001，20(1)：23－27.

[2] VONDERHEIDE R H. Telomerase as a universal tumor-associated antigen for cancer immunotherapy[J]. Oncogene，2002，21(4)：674－679.

[3] 陈拥军，朱正纲，冯润华，等. 反义人端粒酶 RNA 组分基因对胃癌细胞端粒酶活性的影响[J]. 消化外科，2002，1(3)：185－189.

[4] NAIR S K，HEISER A，BOCZKOWSKI D，*et al*. Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity against unrelated tumors using telomerase reverse transcriptase RNA transfected dendritic cells[J]. Nat Med，2000，6(9)：1011－1017.

[5] BERZOFSKY J A，TERABE M，OH S，*et al*. Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer[J]. J Clin Invest，2004，113(11)：1515－1525.

[6] GROSS D A，GRAFF-DUBOIS S，OPOLON P，*et al*. High vaccination efficiency of low-affinity epitopes in antitumor immunotherapy[J]. J Clin Invest，2004，113(3)：425－433.

[7] CHANG DZ，LOMAZOW W，JOY SOMBERG C，*et al*. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor：an adjuvant for cancer vaccines[J]. Hematology，2004，9(3)：207－215.

[8] 郭　红，郝　嘉，吴　超，等. 端粒酶逆转录酶肽-核酸病毒样颗粒疫苗的制备及免疫原性鉴定[J]. 世界华人消化杂志，2005，13(22)：2645－2649.

[9] CHOW Y H，HUANG W L，CHI W K，*et al*. Improvement of hepatitis B virus DNA vaccines by plasmids coexpressing hepatitis B surface antigen and interleukin-2[J]. J Virol，1997，71(1)：169－178.

[10] LIU G，MOLAS M，GROSSMANN G A，*et al*. Biological properties of poly-L-lysine DNA complexes generated by cooperative binding of the polycation[J]. J Biol Chem，2001，276(37)：34379－34387.

[11] LUO D，SALTZMAN W M. Synthetic DNA delivery systems[J]. Nat Biotechnol，2000，18(1)：33－37.

[12] RIVOLTINI L，CARRABBA M，HUBER V，*et al*. Immunity to cancer：attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction[J]. Immunol Rev，2002，188：97－113.

（编辑　汪勤俭）