文章编号:1000-5404(2006)15-1591-04

论著

甲胎蛋白DNA疫苗的构建及诱导小鼠抗肿瘤免疫的实验研究

田 耕[1],易继林[1],熊 平[2] (华中科技大学同济医学院:[1]附属同济医院普通外科,[2]免疫学教研室,武汉 430030)

提 要:目的 克隆小鼠甲胎蛋白(murine α-fetoprotein, mAFP)基因,构建mAFP DNA疫苗并检测其诱导mAFP特异性CTL反应及抗肿瘤免疫的能力。**方法** 利用RT-PCR从Hepa 1-6细胞总RNA中克隆出mAFP基因,亚克隆于pcDNA3.1中构建DNA疫苗pmAFP,酶切、测序和表达鉴定;pmAFP稳定转染EL-4细胞建立EL-4(mAFP)细胞系;pmAFP免疫小鼠,接种EL-4(mAFP)细胞,观察肿瘤生长情况;Elispot法检测免疫后小鼠脾脏细胞中产生IFN-γ的细胞频数;另外,对免疫的小鼠采血进行肝、肾功能检测。**结果** RT-PCR成功克隆出小鼠AFP基因;酶切、测序和表达鉴定证实DNA疫苗pmAFP构建成功;RT-PCR证实EL-4(mAFP)细胞中有mAFP mRNA的表达;pmAFP免疫组小鼠的肿瘤体积(1 042.42 ± 123.71) mm^3明显小于pcDNA3.1组($P<0.01$)和PBS组($P<0.01$);pmAFP免疫小鼠的脾脏细胞产生IFN-γ的细胞频数显著高于pcDNA3.1组($P<0.01$)和PBS组($P<0.01$)。各组肝、肾功能无显著差异。**结论** mAFP DNA疫苗构建成功,此疫苗能诱导AFP特异性的CTL增殖并诱导小鼠产生明显的抗肿瘤免疫力,对小鼠肝、肾功能不产生影响。

关键词: 疫苗,脱氧核糖核酸;甲胎蛋白;小鼠;免疫治疗
中图法分类号: R394-33; R394.4; R73-362 **文献标识码:** A

Construction of DNA vaccine encoding murine AFP and its specific anti-tumor effect on C57BL/6 mice

TIAN Geng[1], YI Ji-lin[1], XIONG Ping[2] ([1]Department of General Surgery, Tongji Hospital, [2]Department of Immunology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: **Objective** To clone the murine α-fetoprotein gene, construct the DNA vaccine of mouse AFP and to observe the specific cellular immunologic responses and the anti-tumor responses in mice induced by this vaccine. **Methods** The murine AFP gene was amplified by RT-PCR from total RNA extracted from Hepa1-6 cells and cloned into the vector pcDNA3.1 to construct pmAFP. The DNA vaccine was identified by restriction enzyme analysis, sequencing and expression. EL-4(mAFP) was developed by stable transfection of EL-4 cells with pmAFP. Mice immunized with DNA vaccine by intramuscular injection were inoculated with EL-4(mAFP) cells at back to observe the inhibitory effect of the immunization on tumor. The frequency of cells producing IFN-γ in splenocytes harvested from the immunized mice was measured by ELISPOT. Blood samples were collected from the immunized mice to check the functions of liver and kidney. **Results** The murine AFP gene was successfully cloned by RT-PCR. DNA vaccine was successfully constructed. The expression of mAFP mRNA in EL-4(mAFP) was confirmed by RT-PCR. The tumor volume in pmAFP vaccine group (1 042.42 ± 123.71 mm^3) was significantly smaller than that of other groups ($P<0.01$). The number of IFN-γ-producing cells of pmAFP vaccine group was significantly higher than that of other groups ($P<0.01$). The function of mouse liver and kidney in each group was unchanged. **Conclusion** The DNA vaccine of mAFP was successfully constructed. The vaccine can induce specific cellular immunologic responses and significant anti-tumor responses in mouse and had no impact on the function of mouse liver and kindey.

Key words: DNA vaccine; α-fetoprotein; mouse; immunotherapy

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)为常见消化系统肿瘤,复发率高,预后差。甲胎蛋白(AFP)作为肝癌的相关抗原在70%以上的肝癌中高表达。近来的研究表明AFP存在CTL免疫显性表位,可以作为肝癌免疫治疗的靶的[1-4],为肝癌的免疫基因治疗开辟新的途径。本实验中,我们克隆小鼠甲胎蛋白

作者简介: 田 耕(1971-),男,陕西省宝鸡市人,博士,副主任医师,主要从事肝脏肿瘤临床方面的研究,现在深圳市第二人民医院肿瘤科。电话:(0755)83366388-2118,E-mail :tiangeng666@yahoo.com.cn

收稿日期: 2005-09-25;**修回日期:** 2006-11-20

(murine α-fetoprotein, mAFP)基因,构建 mAFP DNA 疫苗,观察此疫苗诱导 AFP 特异性的 CTL 增殖及诱导小鼠产生抗肿瘤免疫的能力,以及此疫苗对小鼠肝、肾功能的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞、质粒和试剂

小鼠肝癌细胞系 Hepa 1-6 和小鼠淋巴瘤细胞系 EL-4 由第二军医大学王皓老师惠赠。CHO 细胞株由中国典型培养物保藏中心提供。真核表达载体 pcDNA3.1/myc-His 购自 Invitrogen 公司。RT-PCR 试剂盒(Ver.2.1)、*Ex Taq* 高保真 *Taq* 酶、限制性内切酶、T_4DNA 连接酶和 DNA 标准(DL2000)购自宝生物工程(大连)有限公司。Trizol 试剂和 RPMI1640 培养基为 Gibco 公司产品、胎牛血清为 Hyclone 公司产品。脂质体 Lipofectamine 2000 和 Opti-MEM 培养基为 Invitrogen 公司产品。质粒小量制备试剂盒和琼脂糖凝胶核酸纯化回收试剂盒为 Omega 公司产品。羊抗人 AFP 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。HRP 标记的抗羊二抗为北京中山生物工程公司进口分装产品。ECL 显色剂为 Pharmacia 公司产品。其余试剂均为国产或进口分析纯试剂。

1.2 克隆 mAFP 基因

培养 Hepa 1-6 细胞至对数期,收集细胞,用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA。为了克隆包括分泌信号在内的 AFP 全长基因,设计的引物为 P1、P2,P1:5′-CTCAGGAATTCGCCATGAAGTGGATCACA-3′,在 5′ 端引入酶切位点 *Eco*R Ⅰ;P2:5′-CTCTGCTCTAGATTACTCGAGAACGCCCAAAGCATCACG-3′,在 3′ 端引入酶切位点 *Xba* Ⅰ。利用 RT-PCR 试剂盒反转录出 cDNA 第 1 链,引物采用 Oligo dT,条件为:42 ℃ 30 min、99 ℃ 5 min、5 ℃ 5 min。采用 *Ex Taq* 高保真 *Taq* 酶进行随后的 PCR。PCR 条件为:94 ℃预变性 2 min、94 ℃ 30 s、60 ℃ 30 s、72 ℃ 2 min,30 个循环,末次 72 ℃延伸 5 min。取 PCR 产物 3 μl 进行琼脂糖凝胶电泳,观察结果。

1.3 重组质粒的构建、酶切及测序鉴定

克隆的 mAFP 基因经 *Eco*R Ⅰ 和 *Xba* Ⅰ 同时双酶切后,琼脂糖凝胶电泳回收、纯化;质粒 pcDNA3.1/myc-His 同样经 *Eco*R Ⅰ 和 *Xba* Ⅰ 同时双酶切后,回收纯化。目的基因与质粒按 3∶1 的比例混合,加入 T_4DNA 连接酶进行连接反应(18 ℃,16 h)。构建的质粒命名为 pmAFP。将上述连接产物转化大肠杆菌 DH5α,涂平板,氨苄青霉素筛选阳性菌落。挑取单个菌落培养,小量质粒制备。pmAFP 用 *Eco*R Ⅰ 和 *Xba* Ⅰ 进行单酶切或双酶切鉴定。酶切鉴定正确的质粒,挑取相应菌落培养后送上海博亚生物工程公司进行双向测序。

1.4 pmAFP 转染 CHO 细胞与蛋白表达检测

利用脂质体 Lipofectamine 2000 瞬时转染 CHO-K1 细胞,按说明书进行操作,同时做空载体对照。在 6 孔板每孔中加入 5×10^5 个 CHO-K1 细胞,24 h 后加入分别稀释于 Opti-MEM 培养基的 4 μg 质粒和 10 μl Lipofectamine 2000,48 h 后裂解细胞,提取蛋白。蛋白质经电泳后,半干法转印至硝酸纤维素膜上,一抗为羊抗人 AFP 多克隆抗体,然后用 HRP 标记的抗羊二抗孵育,ECL 显色。

1.5 建立 EL-4(mAFP)细胞系

采用脂质体 Lipofectamine 2000 将 pmAFP 转染 EL-4 细胞,G418 (0.4 mg/ml)筛选,并以 G418 (0.3 mg/ml) 维持筛选。抗药克隆用 RT-PCR 检测 mAFP mRNA 的表达。Western blot 检测 mAFP 蛋白表达。

1.6 DNA 疫苗接种对小鼠的免疫保护

5~8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠 18 只,购自北京维通利华实验动物有限公司,体质量(20±2) g,分为 3 组,每组 6 只,以肌肉注射方式免疫,2 周后重复 1 次。3 组分别注射 100 μg pmAFP、100 μg pcDNA3.1 及 100 μl PBS。2 周后按 2×10^5/100 μl 于小鼠背部皮下接种 EL-4(mAFP)细胞,观察肿瘤生长情况,每周 2 次测量肿瘤大小,按 $4/3\pi r^3$(r=半径)计算肿瘤体积。

1.7 DNA 疫苗接种后小鼠体内 CTL 活性的检测

同上法免疫小鼠,2 周后切脾,同时取外周血用于检测 ALT 和肌酐。小鼠脾脏细胞在体外与 EL-4(mAFP) 细胞 37 ℃培养 48 h,同时加入 10 U/ml 的人 IL-2。将再次刺激后的脾脏细胞移入抗 IFN-γ 抗体包被过的 Elispot 96 孔板中,37 ℃孵育 24 h。后续步骤按 Elispot 说明书进行。

1.8 DNA 疫苗接种后小鼠肝、肾功能检测

采用 ALT 试剂盒检测血清中 ALT 水平,采用肌酐试剂盒检测血清中肌酐水平,均按说明书操作。

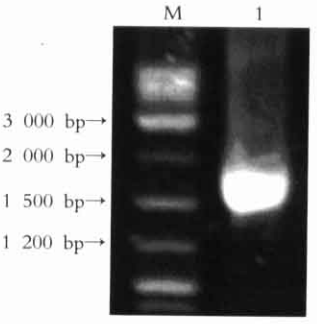
1.9 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 mAFP 基因的克隆

提取的总 RNA $D(260)/D(280)$ 值为 1.885,表明总 RNA 较纯。以反转录的 cDNA 为模板,用设计引物进行 PCR 扩增,所得特异性条带与预期长度为 1.8 kb 的目的基因相符(图 1)。



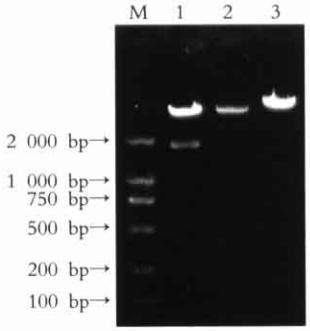
M: DNA 标准; 1: mAFP 基因

图 1 RT-PCR 获得 mAFP 基因

2.2 重组质粒酶切及测序鉴定

酶切结果证明重组质粒带有相应的目的基因(图 2)。对

重组子进行测序，结果与 GenBank Blast 比对，本实验克隆出的 mAFP 基因与 GenBank 所给出的 mAFP 基因有 99.7% 的碱基相同，共有 5 个碱基不同，其中有 2 个碱基为密码子的第 3 位碱基，未改变所编码的氨基酸。

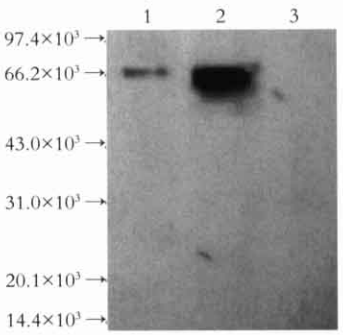


M：DNA 标准（DL2000）；1：pmAFP（*Eco*R Ⅰ + *Xba* Ⅰ）；2：pcDNA3.1（*Eco*R Ⅰ）；3：pmAFP（*Eco*R Ⅰ）

图 2　重组质粒 pmAFP 酶切鉴定电泳图

2.3　Western blot 检测 mAFP 蛋白表达

利用脂质体 Lipofectamine 2000（Invitrogen）瞬时转染 CHO-K1 细胞，48 h 后提取蛋白。Western blot 检测出转染细胞中有分子量为 70 000 的特异性蛋白条带（图 3），表明 mAFP 基因在真核细胞内得到表达。



1：CHO-K1/pmAFP；2：Hepa 1-6；3：CHO-K1/ pcDNA3.1

图 3　Western blot 检测 pmAFP 蛋白的表达

2.4　RT-PCR 检测 EL-4（mAFP）细胞 mAFP mRNA 的表达

提取 EL-4（mAFP）细胞的总 RNA 进行 RT-PCR，产物进行琼脂糖凝胶电泳，可以得到 1.8 kb 的特异性条带，说明该细胞中有 mAFP mRNA 的表达。

2.5　Western blot 检测 EL-4（mAFP）细胞 mAFP 蛋白的表达

裂解 EL-4（mAFP）细胞，提取蛋白。Western blot 检测证实 EL-4（mAFP）细胞中有分子量为 70 000 的特异性蛋白条带，表明该细胞中有 mAFP 蛋白的表达。

2.6　DNA 疫苗接种对小鼠的免疫保护

肿瘤潜伏期 8～12 d，至 2 周时 PBS 组和 pcDNA3.1 组可触及皮下肿瘤，pmAFP 免疫组肿瘤生长缓慢，肿瘤攻击后第 22 天，pmAFP 免疫组的肿瘤体积［（1 042.42 ± 123.71）mm^3］显著小于 PBS 组［（2 303.5 ± 233.13）mm^3］（$P < 0.01$）和 pcDNA3.1 组［（2 292.38 ± 276.94）mm^3］（$P < 0.01$）。

2.7　DNA 疫苗接种后小鼠体内 CTL 活性检测

Elispot 检测结果显示：pmAFP 免疫小鼠的脾脏细胞体外经 EL-4（mAFP）刺激后，产生 IFN-γ 的细胞频数（11.58 ± 1.07）显著高于对照组（1.25 ± 0.76）（$P < 0.01$）和 pcDNA3.1 组（1.58 ± 0.86）（$P < 0.01$）。

2.8　DNA 疫苗接种后小鼠肝、肾功能检测

血清中 ALT 水平和肌酐水平检测结果显示各组无明显差异，表明 pmAFP 肌肉注射免疫对肝功能和肾功能没有明显的影响（$P > 0.05$）（表 1）。

表 1　pmAFP 免疫小鼠后 ALT 和肌酐水平检测结果（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	ALT（U/ml）	肌酐（C_B/μmol · L^{-1}）
PBS	6	51.1 ± 1.7	119.4 ± 6.9
pcDNA3.1	6	50.9 ± 1.5	116.6 ± 9.7
pmAFP	6	51.6 ± 2.5	116.3 ± 6.0

3　讨论

AFP 是由胚胎卵黄囊和胎肝合成、分泌的胚性糖蛋白，因其与肝癌的密切关系已被做为诊断肝癌的 2 个重要指标之一。由于对胚胎期经胸腺阴性选择后体内是否仍然存在抗 AFP 的 T 细胞存有疑虑，致使以 AFP 结构本身作为肝癌生物治疗靶点的设想，一直未能付诸实施。近来的研究表明，人 AFP 存在 4 个特殊的表位，这 4 个表位经加工与 HLA-A0201 结合后能够被人 T 细胞识别，并能分别诱导培养的人 T 细胞和 HLA-A0201/K^b 转基因小鼠产生 AFP 特异性的 CTL[1,2]。另外还发现，尽管 mAFP 终生存在（甚至高于人的水平），其免疫系统也能够产生针对此癌胚抗原的 T 细胞免疫[2-4]。以上的研究说明 AFP 能够作为肝癌免疫治疗的靶的。

我们克隆出的 mAFP 基因共有 1 818 个核苷酸，与 GenBank 所给出的 mAFP 基因有 99.7% 的核苷酸相同，共有 5 个核苷酸不同，其中有 2 个核苷酸为密码子的第 3 位核苷酸，未改变所编码的氨基酸。存在差异的原因可能是 GenBank 所给出的 mAFP 基因来源于小鼠 13 d 胚胎的肝脏。

目前表达 AFP 的小鼠肝癌细胞系有 BWIC3 和由其派生出的 Hepa 1-6。这 2 个细胞系来源于小鼠自发肝癌细胞系 BW7756。由于此细胞系从 1957 年传代至今，已检测不到 MHC Ⅰ 和 MHC Ⅱ 的表达[3]。所以本实验采用 EL-4（mAFP）细胞进行研究。

DNA疫苗技术[5-10]是90年代初发展起来的一项新兴免疫技术,因其独有的特点而更受瞩目。这种疫苗最大的优点是可以通过内源性抗原递呈系统,诱发机体特异性细胞免疫,通过CTL攻击携带有特异性抗原的靶细胞,从而达到预防和治疗的目的。本实验成功构建了mAFP DNA疫苗,免疫小鼠后诱导产生AFP特异性的CTL,对肿瘤生长产生明显抑制作用,并且对肝肾功能无明显影响。结果表明这是一种简便有效的方法,为肝癌的免疫基因治疗提供了新的思路。

参考文献:

[1] BUTTERFIELD L H, MENG W S, KOH A, *et al*. T cell responses to HLA-A*0201-restricted peptides derived from human alpha fetoprotein [J]. J Immunol, 2001, 166(8): 5300-5308.

[2] MENG W S, BUTTERFIELD L H, RIBAS A, *et al*. Fine specificity analysis of an HLA-A2.1-restricted immunodominant T cell epitope derived from human alpha-fetoprotein [J]. Mol Immunol, 2000, 37(16): 943-950.

[3] VOLLMER C M, Jr., EILBER F C, BUTTERFIELD L H, *et al*. Alpha-fetoprotein-specific genetic immunotherapy for hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res, 1999, 59(13): 3064-3067.

[4] GRIMM C F, ORTMANN D, MOHR L, *et al*. Mouse alpha-fetoprotein-specific DNA-based immunotherapy of hepatocellular carcinoma leads to tumor regression in mice[J]. Gastroenterology, 2000, 119(4): 1104-1112.

[5] PUPA S M, INVERNIZZI A M, FORTI S, *et al*. Prevention of spontaneous neu-expressing mammary tumor development in mice transgenic for rat proto-neu by DNA vaccination[J]. Gene Ther, 2001, 8(1): 75-79.

[6] LACHMAN L B, RAO X M, KREMER R H, *et al*. DNA vaccination against neu reduces breast cancer incidence and metastasis in mice [J]. Cancer Gene Ther, 2001, 8(4): 259-268.

[7] OHWADA A, NAGAOKA I, TAKAHASHI F, *et al*. DNA vaccination against HuD antigen elicits antitumor activity in a small-cell lung cancer murine model[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999, 21(1): 37-43.

[8] PARK J H, KIM C J, LEE J H, *et al*. Effective immunotherapy of cancer by DNA vaccination[J]. Mol Cells, 1999, 9(4): 384-391.

[9] LODE H N, PERTL U, XIANG R, *et al*. Tyrosine hydroxylase-based DNA-vaccination is effective against murine neuroblastoma[J]. Med Pediatr Oncol, 2000, 35(6): 641-646.

[10] NEGLIA F, ORENGO A M, CILLI M, *et al*. DNA vaccination against the ovarian carcinoma-associated antigen folate receptor-α (FRα) induces cytotoxic T lymphocyte and antibody responses in mice[J]. Cancer Gene Ther, 1999, 6(4): 349-357.

(编辑 陈聪连)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2006)15-1594-01

腹腔镜胆囊切除术中Calot三角解剖的技巧

郑小东,马 海,杨红春 (南充市中心医院肝胆外科,南充 637000)

在腹腔镜胆囊切除术中,术者解剖Calot三角的技巧对手术风险的控制和术后并发症的减少有着至关重要的作用[1,2]。熟识正常Calot三角解剖及其异常解剖变化,提高Calot三角解剖技巧是手术成功的关键。我们采用经胆囊壶腹部侧后方开始解剖胆囊三角的方法实施腹腔镜胆囊切除术786例,明显降低了肝外胆管和血管损伤等严重并发症。

1 临床资料

本组786例患者,男性265例,女性521例;年龄15~81岁,平均49.4岁;完成腹腔镜胆囊切除784例,中转开腹2例。所有患者均选用气管插管全麻,常规4孔法穿刺建立人工气腹并置镜和手术器械,助手以冲洗棒向左上方顶开肝脏,左手钳住胆囊壶腹部,将胆囊向右后上方牵拉,由胆囊壶腹侧后方开始解剖Calot三角,解剖出胆囊管0.5~1.0 cm即可满足施夹需要,最后再向前侧处理胆囊动脉。

作者简介:郑小东(1972-),男,四川省南充市人,主治医师,主要从事肝胆外科临床方面的研究。电话:13983901892

收稿日期:2006-05-24;修回日期:2006-06-16

2 结果

本组患者中有784例完成了腹腔镜胆囊切除,成功率为99%,其中2例行中转开腹,其原因是:1例术中怀疑为胆囊癌,经术中冰冻证实,1例因有十二指肠胆囊内瘘。术后常规放置血浆引流管,一般术后2~3 d拔出,无肝外胆管损伤、胆囊动脉出血再手术等严重并发症。

3 讨论

在腹腔镜胆囊切除术中,胆囊三角的成功解剖是手术成功的关键。要成功解剖Calot三角,首先要充分显露Calot三角。由于胆囊反复炎症,特别是胆囊颈或胆囊管结石嵌顿常导致胆囊三角致密黏连,解剖困难。一般认为解剖Calot三角多由Calot三角的前方开始。按常规方法由Calot三角前侧开始解剖往往异常困难,且易损伤周围正常结构,极易导致肝外胆管及血管损伤等严重并发症。

我们首先用左手抓钳钳住胆囊壶腹部,再将其向右后上方牵拉,可使Calot三角充分显露,利于辨明"三管一壶"的关系。

(下转1600页)