文章编号:1000-5404(2007)08-0705-03

论著

# 基于survivin的"模拟病毒"瘤苗的制备和鉴定

杨 婴,牛 微,姜 曼,吴玉章,赵建平,王 莉 (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** 制备、鉴定基于肿瘤抗原survivin的"模拟病毒"瘤苗。**方法** 在特定的条件下将阳离子肽和DNA制备成模拟病毒颗粒样的结构,并以扫描电镜、DNA阻滞试验、DNase Ⅰ保护试验和免疫印迹(Western blotting)对该疫苗进行制备鉴定。**结果** 在NaCl浓度为87.5 mmol/L,电荷比为2的制备条件下,该疫苗能形成颗粒,并可有效介导瘤苗所携带基因的表达。**结论** 该研究成功制备了基于肿瘤抗原survivin的"模拟病毒"瘤苗,为新型的肿瘤疫苗的设计奠定了基础。

**关键词**: 基因转染;阳离子肽;疫苗制备;疫苗设计
**中图法分类号**: R392-33; R392.11;R73-3 **文献标识码**: A

# Preparation and identification of mimovirus tumor vaccine based on survivin

YANG Zhao, NIU Wei, JIANG Man, WU Yu-zhang, ZHAO Jian-ping, WANG Li (Institute of Immunology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract**: Objective To prepare and identify the mimovirus tumor vaccine based on survivin. Methods Under specific condition, peptide and DNA were condensed into like-virus particle, and the preparing parameters were optimized by assays of DNA gel retardation, DNase Ⅰ protection and identified by Western blotting. Antigen presentation was also studied by RMA-S/Kd cells. Results The vaccine was condensed into homogeneous particles at charge ratio of 2 in 87.5 mmol/L NaCl concentration, which could effectively mediate expression of the genes carried by vaccine particles. Conclusion The mimovirus tumor vaccine based on survivin was prepared successfully, providing a good foundation for the design of new tumor vaccine.

**Key words**: gene transfection; cationic peptide; vaccine preparation; vaccine design

肿瘤是世界上致死率最高的疾病之一,由于大多数的肿瘤在诊断早期就发生了微转移,所以当前基于手术切除、化疗、放疗的治疗方案仍然不能完全控制其复发率。因此,寻找新的辅助治疗方法迫在眉睫。近年来,以激活细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte,CTL)为主的免疫治疗策略在恶性肿瘤的综合治疗中发挥了重要作用[1,2]。与其他传统的治疗方法相比较,免疫治疗能诱导自身的肿瘤特异性免疫应答,不但可以识别和清除肿瘤细胞,而且还可以诱发免疫记忆,阻止肿瘤的复发[3]。

在诸多以激活CTL反应为目标的疫苗形式中,基于肿瘤抗原表位肽疫苗能有效激发CTL应答,因而成为发展最为迅速的肿瘤免疫学治疗方案之一[4]。但是单一的表位肽疫苗分子量小,呈游离性状,免疫原性低,并且在体内容易受到酶的降解,所以限制了单一的表位肽疫苗的应用。为了克服上述缺点,本研究将阳离子穿膜多肽HIV-$Tat_{49-57}$[5]与来源于肿瘤共享抗原survivin的H2-$k^d$限制性CTL表位肽$survivin_{85-93}$[6]设计成融合肽的形式,利用正负电荷吸引原理,以富含正电荷的阳离子融合肽包装富含负电荷的IL-15 DNA佐剂,形成模拟天然病毒结构的"模拟病毒"瘤苗,力图在肿瘤疫苗的设计上有所创新,为肿瘤的生物治疗策略提供新的思路。研究证实,该"模拟病毒"瘤苗能有效转染细胞,并能介导肿瘤抗原基因的表达。此结果为后期的疫苗机制和效应的探讨打下了基础。

基金项目:国家自然科学基金(30400437,30371329)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30400437,30371329)

作者简介:杨 婴(1980-),男,四川省内江市人,硕士研究生,主要从事肿瘤免疫学及肿瘤治疗性疫苗方面的研究。电话:(023)68752236,E-mail:yangzhao5140@sohu.com.cn
通讯作者:王 莉,电话:(023)68752236,E-mail:wangli2006cq@hotmail.com.cn

收稿日期:2006-06-02;修回日期:2007-01-19

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

融合肽为RKKRRQRRRAFLTVKKQM,委托中科亚光合成。其中N末段RKKRRQRRR为含有正电荷的阳离子穿膜肽HIV-$Tat_{49-57}$,C末段AFLTVKKQM为survivin的H2-$k^d$限制性CTL表

位肽 $survivin_{85\text{-}93}$。小鼠 IL-15 表达质粒 PsectagIL-15 和对照空质粒 Psectag 为日本 Hazama 教授惠赠。细胞株 COS-7 为本教研室保存。Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司，FITC 标记的羊抗兔二抗购自北京中杉公司，兔抗小鼠 IL-15 多克隆抗体购自 BD 公司，化学发光检测试剂盒购自 Roche 公司。其他均为常用试剂。

### 1.2 “模拟病毒”瘤苗的制备

按文献[7]的方法，在特定的 NaCl 浓度下将 100 μl 不同浓度的阳离子肽溶液逐滴滴入 100 μl 混旋状态含有 500 μg/ml DNA 的水溶液中，5 μl/min，从而制备不同电荷比 $r$ 的“模拟病毒”瘤苗。滴定完毕后制备产物继续混旋 30 min，静置 30 min。

### 1.3 DNA 凝胶阻滞分析、DNase Ⅰ保护试验和电镜分析

制备不同正负电荷比的“模拟病毒”瘤苗，各样品于琼脂糖凝胶电泳行 DNA 凝胶阻滞分析。在 DNase Ⅰ保护试验中，各样品与 DNase Ⅰ在 37 ℃孵育消化 15 min，EDTA 灭活 DNase Ⅰ，未被消化的 DNA 经 2 次酚氯仿抽提，琼脂糖凝胶电泳。

### 1.4 电镜分析

将新鲜制备的疫苗滴于 200 目铜网上，吸附 3 min。吸水纸吸干，晾干 30 s。以 1%（质量体积分数）水溶性醋酸铀负染 30 s，吸水纸吸干，晾干 30 s。80 kV 透射电镜观察。以 SigmaScan® 分析软件分析疫苗颗粒电镜照片，测量颗粒面积、长径、短径并记数，以 SigmaPlot® 软件对上述信息进行分析（SigmaScan®、SigmaPlot® 均购自美国 SPSS 公司）。

### 1.5 细胞转染与 Western blot 分析

将 COS-7 细胞于 6 孔培养板内单层培养至覆盖面积 30%。更换培养液 2 ml，无血清培养基，加入 100 μl“模拟病毒”瘤苗，孵育 4 h，更换完全培养基 DMEM 培养 48 h，收获细胞。阳性对照为 Lipofectamine™ 2000 转染质粒 PsectagIL-15，阴性对照为含空质粒 Psectag 的“模拟病毒”瘤苗。常规 Western blot 方案，分别以兔抗小鼠 IL-15 抗体为一抗，以辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 为二抗，经化学发光显色，检测 IL-15 的表达。

## 2 结果

### 2.1 融合肽的质谱和高效液相色谱鉴定

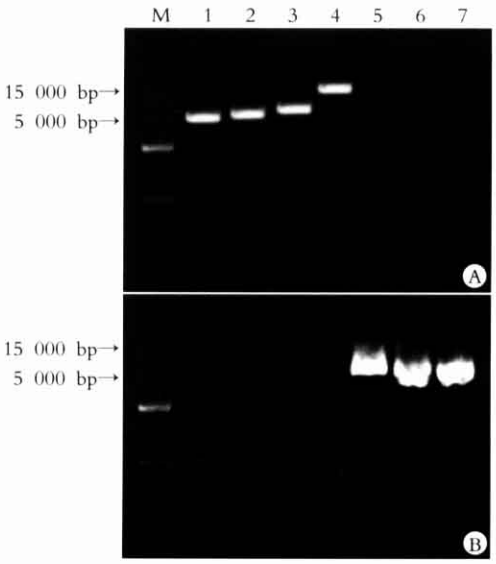
融合肽经质谱和高效液相色谱分析，相对分子质量为 2 386.97，与理论值一致，纯度达 96%，可以用于后期的实验研究。

### 2.2 DNA 凝胶阻滞试验

本研究采用凝胶阻滞试验分析阳离子多肽与 DNA 发生完全阻滞时所需的最小电荷比 $r$ 值。如图 1A 所示，当电荷比 $r<2$ 时，DNA 被部分阻滞，随着电荷比 $r$ 值的逐渐增大，泳动的 DNA 数量迅速减少，滞留在加样孔中的 DNA 量相应增多。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。当电荷比 $r\geq2$ 时，DNA 被完全阻滞，提示质粒 DNA 被充分包装所需的最小电荷比 $r$ 值为 2。

### 2.3 DNase Ⅰ保护试验

血浆、体液和细胞质中存在丰富的 DNA 酶，能够在质粒 DNA 进入核膜之前将其破坏，因此对 DNA 加以保护有利于提高质粒 DNA 携带基因的表达效率和“模拟病毒”瘤苗的免疫效果。本研究采用标准 DNase Ⅰ保护试验分析多肽有效保护 DNA 所需的最小电荷比 $r$ 值。如图 1B 所示，游离的 DNA 在本试验条件下被完全降解；当电荷比 $r<2$ 时，质粒 DNA 不能被有效保护；但是随着电荷比 $r$ 值的增大，保护效应逐渐增加。当电荷比 $r\geq2$ 时，质粒 DNA 分子被有效保护，确定 DNA 被有效保护所需最小电荷比 $r$ 值为 2。基于 DNA 凝胶阻滞分析和 DNase Ⅰ保护试验的结果，以下实验所用“模拟病毒”瘤苗均在电荷比 $r=2$ 的条件下制备。




A：DNA 凝胶阻滞试验；B：DNase Ⅰ保护试验

M：DNA 标准；1：$r=0$；2：$r=0.25$；3：$r=0.5$；4：$r=1$；5：$r=2$；6：$r=4$；7：$r=8$

**图 1 DNA 凝胶阻滞试验和 DNase Ⅰ保护试验电泳结果**

### 2.4 疫苗颗粒的电镜鉴定及粒度分析

“模拟病毒”瘤苗能否形成颗粒样结构是有效转染细胞的关键环节。图 2 显示，质粒 DNA 经阳离子抗原肽包装后，形成的“模拟病毒”瘤苗呈大小均一的近圆形颗粒，绝大多数颗粒长径小于 25 nm。这样的颗粒样结构为疫苗的有效转染打下了基础。

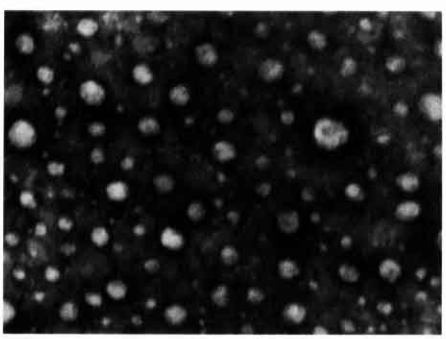
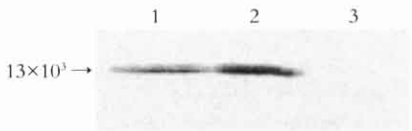


**图 2 “模拟病毒”瘤苗 （TEM × 100 000）**

### 2.5 细胞转染与 Western blot 分析

为鉴定“模拟病毒”瘤苗介导质粒 IL-15 表达的有效性，本研究以该疫苗对 COS-7 细胞进行转染，并对 IL-15 表达的有效

性进行 Western blot 分析。如图 3 所示，泳道 1、2、3 为抗 IL-15 多克隆抗体检测 IL-15 的表达。阳性对照泳道 1 和实验泳道 2 分别可见单一抗体特异性条带，其相对分子质量大小均与预期相符(IL-15，13 170)，而阴性对照泳道 3 则未出现条带。因此可以证实，疫苗颗粒可有效介导质粒 IL-15 基因的表达。




1：Lipofectamine™ 2000 + PsectagIL-15；2：含 PsectagIL-15 的“模拟病毒”瘤苗；3：含空质粒 Psectag 的“模拟病毒”瘤苗

**图 3　Western blotting 分析基因表达**

## 3　讨论

近年来，随着肿瘤发病率的逐年增加，针对肿瘤的治疗与预防研究逐渐深入。在当前的治疗策略中，免疫治疗已成为新兴的研究热点。而在肿瘤疫苗的设计中，关键因素取决于疫苗是否能有效激发机体的抗肿瘤应答。当前基于肿瘤的免疫治疗形式有重组病毒疫苗、基因疫苗、肿瘤抗原肽疫苗和 DC 疫苗等。但这些方式在一定程度上存在效率低、安全性差和操作过程繁琐等问题。为了避免上述方式的不足之处，使得肿瘤疫苗有很好的免疫原性、稳定安全的生物学活性，寻求新的肿瘤疫苗形式迫在眉睫。

本研究所吴玉章等[8]研究发现，如果将 DNA 分子和多肽抗原制备成为模拟天然病毒结构的颗粒样性状，将会大大增强抗原提呈细胞的吞噬能力，提高疫苗的免疫原性，激发快速、持续、强烈针对病毒抗原的 CTL 反应。受此启发，本研究尝试将肿瘤抗原多肽与基因有机地结合起来，形成一种新的疫苗形式“模拟病毒”瘤苗。

survivin 是 1997 年发现的凋亡蛋白抑制因子家族(inhibitor of apoptosis protein，IAP)的一个重要成员，因为其特有的功能，当前已成为肿瘤免疫治疗领域中的热点[9]。当前有大量研究证实几乎所有恶性肿瘤组织中 survivin 呈阳性表达，故该蛋白被视为最具肿瘤特异性的肿瘤共享抗原[10]。另外在抗肿瘤研究中，有许多研究认为 IL-15 是一种与 IL-2 有许多功能重叠的细胞因子，具有明显的抗瘤效应，并且综合指数高于 IL-2，因此在肿瘤免疫中逐渐受到重视[11]。进一步研究提示，IL-15 作为免疫佐剂，可以上调 T 细胞 Bcl-2 和 Bcl-xl 的表达，增强效应细胞抗凋亡能力，成功地诱导出长效的抗原特异性的记忆性 CTL，对抗肿瘤发挥了重要作用[12]。

因此，本研究选取来源于肿瘤抗原 survivin 的 H2-$k^d$限制性 CTL 表位肽 AFLTVKKQM，并结合阳离子穿膜肽 RKKRRQRRR 而形成的融合肽，并采用能调节 CTL 功能的 IL-15 表达质粒基因，制备模拟天然病毒样结构的肿瘤疫苗。扫描电镜证明，在适当 NaCl 浓度溶液和电荷比的条件下，融合肽与 DNA 能产生小而均匀的颗粒性肽-DNA 复合物。这种颗粒模拟了天然病毒的结构，使肿瘤抗原多肽的免疫原性和 DNA 的佐剂效应有效结合，并将疫苗形式从游离状态改变成为颗粒状态，有利于增强疫苗的免疫原性。我们通过 DNA 凝胶阻滞、DNase Ⅰ保护和转染系列试验证明融合肽与 DNA 形成的复合物能避免酶的降解，有效转染细胞并表达所携带的基因。这些结果均提示“模拟病毒”瘤苗具备了良好的理化特性，为能有效激发 CTL 打下了基础，并有可能获得理想的免疫学效应。在下一步工作中，我们将采用该形式的瘤苗，在动物模型体内进行更加深入的研究，来进一步评价其效应。

## 参考文献：

[1] Andersen M H, Schrama D, Thor-Straten P, *et al*. Cytotoxic T cells [J]. J Invest Dermatol, 2006, 126(1): 32 - 41.

[2] 汪　灏，余佩武，郝　群，等. 临床用的抗肿瘤树突状细胞疫苗的制备及保存[J]. 第三军医大学学报，2004，26(14)：1314 - 1316.

[3] 田　耕，易继林，熊　平. 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[J]. 第三军医大学学报，2006，28(15)：1591 - 1594.

[4] 石统东，吴玉章，边　疆，等. 乙型肝炎病毒抗原表位模拟多肽诱导 CTL 应答的研究[J]. 免疫学杂志，2003，19 (3)：165 - 169.

[5] Weeks B S, Desai K, Loewenstein P M, *et al*. Identification of a novel cell attachment domain in the HIV-1 Tat protein and its 90-kDa cell surface binding protein[J]. J Biol Chem, 1993, 268(7): 5279 - 5284.

[6] Siegel S, Wagner A, Schmitz N, *et al*. Induction of antitumour immunity using survivin peptide-pulsed dendritic cells in a murine lymphoma model[J]. Br J Haematol, 2003, 122(6): 911 - 914.

[7] 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.

[8] Wu Y Z, Zhao J P, Wan Y, *et al*. Mimovirus: a novel form of vaccine that induces hepatitis B virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses *in vivo*[J]. J Virol, 2002, 76(20): 10264 - 10269.

[9] Ambrosini G, Adida C, Altieri D C, *et al*. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. Nat Med, 1997, 3(8): 917 - 921.

[10] Schmidt S M, Schag K, Muller M R, *et al*. Survivin is a shared tumor-associated antigen expressed in a broad variety of malignancies and recognized by specific cytotoxic T cells[J]. Blood, 2003, 102(2): 571 - 576.

[11] Lewko W M, Smith T L, Bowman D J, *et al*. Interleukin-15 and the growth of tumor derived activated T-cells[J]. Cancer Biother, 1995, 10(1): 13 - 20.

[12] Oh S, Berzofsky J A, Burke D S, *et al*. Coadministration of HIV vaccine vectors with vaccinia viruses expressing IL-15 but not IL-2 induces long-lasting cellular immunity[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(6): 3392 - 3397.

(编辑　陈聪连)