论著

文章编号:1000-5404(2007)18-1772-04

分枝杆菌 Ag85B/IL-2 融合蛋白对小鼠膀胱癌抑癌效应的研究

杨登科,靳风烁 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所泌尿外科,重庆 400042)

提 要: 目的 探讨分枝杆菌 Ag85B/IL-2 融合蛋白对小鼠膀胱癌的抑癌效应。**方法** 采用小鼠 T_{739} 可移植性膀胱癌模型,共 80 只分为 10 组,于移植瘤处局部注射分枝杆菌 Ag85B/IL-2 融合蛋白,并用 Ag85B 蛋白、BCG、IL-2 和生理盐水作对照,观察治疗后各组的肿瘤质量、体积和存活期。光镜和电镜下观察肿瘤的形态改变。**结果** 分枝杆菌 Ag85B/IL-2 融合蛋白治疗组小鼠肿瘤瘤质量(2.49 ± 0.60) g,非常显著低于 Ag85B 蛋白组、BCG 组、IL-2 组和生理盐水组($P<0.01$);Ag85B/IL-2 融合蛋白治疗组小鼠肿瘤瘤体积(3.01 ± 0.95) cm^3,显著低于 Ag85B 蛋白组、BCG 组、IL-2 组和生理盐水组($P<0.05$, $P<0.01$);Ag85B/IL-2 融合蛋白治疗组小鼠存活天数(35.50 ± 2.60) d,显著长于 Ag85B 蛋白组,BCG 组、IL-2 组和生理盐水组($P<0.05$, $P<0.01$);Ag85B/IL-2 融合蛋白对小鼠的肿瘤质量抑制率为 64.50%,肿瘤体积抑制率为 62.24%,存活延率为 48.66%。光镜下观察 Ag85B/IL-2 融合蛋白治疗组肿瘤细胞有明显的炎性细胞浸润、肿瘤细胞坏死、出血等改变;透射电镜下观察,可见细胞膜破裂,细胞器破坏,细胞质固缩,细胞核破坏,核染色质聚集,凋亡小体出现,巨噬细胞吞噬增多等现象。**结论** 分枝杆菌 Ag85B/IL-2 融合蛋白对小鼠膀胱癌具有抑制作用,并能延长膀胱癌荷瘤鼠的生存期。

关键词: 分枝杆菌;Ag85B;IL-2;膀胱癌;抑癌效应

中图法分类号: R73-362;R730.23;R737.14 **文献标识码**: A

Anti-tumor effect of mycobacterium Ag85B/IL-2 fusion protein on syngeneic mice bearing bladder cancer

YANG Deng-ke, JIN Feng-shuo (Department of Urology, Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the anti-tumor effect of mycobacterium Ag85B/IL-2 fusion protein on syngenic mice bearing bladder cancer. Methods After being implanted BTT739 bladder transitional carcinoma cells from tumor bearing mice, 80 T739 mice were divided into Ag85B protein, BCG, IL-2 and normal saline groups ($n=20$). Mycobacterium Ag85B/IL-2 protein was locally injected to the mice at the site of implanting tumor in the trial group, and Ag85B protein, BCG, IL-2 and normal saline to the control group mice. The weight and volume of tumor and the survival period were recorded after treatment. Results The average weight of Ag85B/IL-2 fusion protein treatment group was significantly lower than those of Ag85B, BCG, IL-2 and normal saline group ($P<0.01$). The average volume of Ag85B/IL-2 fusion protein treatment group was significantly lower than those of Ag85B, BCG, IL-2 and normal saline group ($P<0.05$, $P<0.01$). The average survival period of Ag85B/IL-2 fusion protein treatment group was significantly longer than those of Ag85B, BCG, IL-2 and normal saline group ($P<0.05$, $P<0.01$). The tumor weight and volume inhibition rate of Ag85B/IL-2 fusion protein were 64.50% and 62.24%, respectively, and the survival period prolonging rate of Ag85B/IL-2 fusion protein was 48.66%. Under light microscope, the bladder tumor tissue treated by Ag85B/Il-2 presented obviously inflammatory cells infiltrating, neoplasm necrosis, hemorrhage. With transmission electron microscope, the bladder tumor cell membrane was un-integrated, organelles damaged, cytoplasm pycnosis, nucleus fragmentation, aggregation on chromatin, apoptosis body coming up, macrophage swollen and so on. Conclusion The results indicate that mycobacterium Ag85B/IL-2 protein has obvious anti-tumor effect in T739 mice bearing bladder cancer and can prolong its survival period.

Key words: mycobacterium; Ag85B; interleukin 2; bladder cancer; anti-tumor effect

作者简介:杨登科(1970-),男,苗族,湖北省利川市人,博士,副主任医师,主要从事泌尿系肿瘤治疗和泌尿外科临床方面的研究,发表论文 32 篇,现在解放军第 159 中心医院泌尿外科。电话:(0396)2957396,E-mail:ydk36@163.com

收稿日期:2006-11-20;修回日期:2007-01-30

膀胱肿瘤的免疫生物治疗是近年来膀胱肿瘤治疗方面研究的热点，卡介苗（BCG）膀胱灌注是治疗表浅型膀胱肿瘤及预防其复发最有效的方法之一[1]。有研究表明：BCG 联合白介素-2（IL-2）治疗膀胱肿瘤具有更好的临床疗效[2]，但无论是 BCG 还是 IL-2 在临床治疗膀胱癌方面均存在着剂量大、疗程长、毒副作用大等缺点。为了探寻新的而且副作用小的免疫治疗膀胱肿瘤的药物，我们利用基因工程技术，在前期成功构建了结核分枝杆菌分泌抗原 Ag85B 与人 IL-2 的融合基因[3,4]，并表达纯化了 Ag85/IL-2 融合蛋白[5]。前期研究表明，该融合蛋白具有促进人外周血单个核细胞（PBMC）增殖和 Th1 型细胞因子 IL-12、IFN-γ 分泌的作用，其激活的人 PBMC 对多种膀胱肿瘤细胞株具有细胞毒作用[6]。本研究在此基础上，进一步探索 Ag85B/IL-2 融合蛋白在体内对小鼠移植性膀胱癌的抑癌效应。

1　材料与方法

1.1　材料

分枝杆菌 Ag85B/IL-2 融合蛋白及 Ag85B 蛋白均由本院所泌尿外科表达纯化；BCG 粉剂 60 mg/支，成都生物制品研究所产品；rhIL-2（50 万 U/支），北京瑞得合通。T_{739} 近交系小鼠 80 只，4～6 周龄，体质量 19～24 g，雌雄各半；BTT_{739} 荷瘤鼠 2 只，荷瘤 2 周，作为瘤源，均购自中国医学科学院肿瘤研究所动物中心。

1.2　动物模型的制备

采用细胞悬液接种法制备[7]。颈椎脱臼法处死 BTT_{739} 荷瘤鼠，无菌条件下剥离瘤体，碾碎匀浆，加冰生理盐水混匀后，200 目不锈钢滤网过滤，用冰冷生理盐水调细胞密度为 2×10^6/ml，无菌条件下于每只 T_{739} 小鼠右前腋下皮下接种肿瘤细胞 200 μl。

1.3　动物模型分组

80 只小鼠共分为 10 组，每组 8 只，雌雄各半，Ag85B/IL-2 融合蛋白组、Ag85B 蛋白组、IL-2 组、BCG 组和生理盐水（NS）组各 2 组，分别用于观察抑瘤效应和存活期观察。

1.4　抑瘤效应观察

分别在接种肿瘤的第 1、7、14 天于接种肿瘤部位局部注射 Ag85B/IL-2 融合蛋白 100 μl（100 μg/只）、Ag85B 蛋白 100 μl（100 μg/只）、BCG 100 μl（100 μg/只）、IL-2 100 μl（250 U/只），NS 组注射 100 μl 生理盐水。21 d 后处死 5 组接种小鼠，剥离肿瘤并称质量，游标卡尺测定肿瘤的长径 a 和短径 b，按 $V=ab^2/2$ 算出体积（V），根据以下公式计算移植瘤瘤质量和体积抑制率：

瘤质量抑制率 =（1 − 治疗组平均瘤质量/生理盐水组平均瘤质量）×100%

体积抑制率 =（1 − 治疗组平均体积/生理盐水组平均体积）×100%

1.5　存活期观察

5 组小鼠分别按前述方法于接种肿瘤部位局部注射 Ag85B/IL-2 融合蛋白、Ag85B 蛋白、BCG、IL-2 和 NS，养至小鼠死亡，记录每只小鼠的存活时间，按以下公式计算存活延长率：

存活延长率 =（治疗组平均存活天数/生理盐水组平均存活天数 − 1）×100%

1.6　观察 Ag85B/IL-2 融合蛋白治疗后肿瘤细胞的形态改变

光镜观察：取 Ag85B/Il-2 融合蛋白治疗组和 NS 对照组 21 d 时的肿瘤组织，用 10% 中性福尔马林固定，常规石蜡包埋、切片、HE 染色，光镜下观察组织学改变。透射电镜观察：取 Ag85B/Il-2 融合蛋白治疗组和 NS 对照组 21 d 时的肿瘤组织，3% 戊二醛固定，0.1 mol/L PBS 缓冲液冲洗，饱和醋酸铅染色，系列丙酮脱水，环氧树脂 618 包埋，行超薄切片，醋酸铅、枸橼酸铅染色，JEM-2000 型透射电镜下观察、摄像。

1.7　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 SPSS 10.0 统计软件行单因素方差分析和 t 检验。

2　结果

2.1　动物一般情况

各组小鼠于接种肿瘤第 3～7 天长出肿瘤结节，生理盐水组较 Ag85B/IL-2 融合蛋白组、Ag85B 蛋白、IL-2 组和 BCG 组肿瘤生长迅速；小鼠死亡时极度消瘦，呈恶病质状，解剖后治疗组肿瘤从外观看呈圆形或椭圆形，表面有结节状突起，瘤外有不完整的包膜，质韧，切面实性，灰白色，中心有些有出血、坏死，NS 对照组可见肿瘤侵及肌肉。经病理切片证实为膀胱移行细胞癌。

2.2　分枝杆菌 Ag85B/IL-2 融合蛋白对小鼠移植性膀胱癌的抑瘤效应

Ag85B/IL-2 融合蛋白治疗组瘤质量均显著小于 Ag85B 蛋白组、BCG 组、IL-2 组和 NS 组（$P<0.01$）。Ag85B/IL-2 融合蛋白治疗组肿瘤体积显著小于 Ag85B 蛋白组、BCG 组、IL-2 组和 NS 组（$P<0.05$，$P<0.01$）。见表 1。

表 1　分枝杆菌 Ag85B/IL-2 融合蛋白对小鼠 BTT_{739} 移植膀胱癌的抑瘤效应（$n=8$）

组别	瘤质量(g)	瘤质量抑制率(%)	体积 (cm^3)	体积抑制率(%)
Ag85B/IL-2	2.49 ± 0.60	64.50	3.01 ± 0.95	62.24
Ag85B	4.12 ± 0.85[a]	41.23	4.90 ± 1.62[b]	31.58
BCG	3.85 ± 1.18[a]	45.08	4.71 ± 1.23[b]	33.54
IL-2	5.56 ± 1.14[a]	20.69	5.91 ± 1.81[a]	20.06
生理盐水组	7.01 ± 1.18[a]	—	7.97 ± 1.26[a]	—

a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与 Ag85B/IL-2 组比较

2.3　分枝杆菌 Ag85B 蛋白对荷瘤鼠的生存期的影响

Ag85B/IL-2 融合蛋白治疗组的荷瘤鼠生存期显著长于 Ag85B 蛋白组、BCG 组、IL-2 组和 NS 组（$P<0.05$，$P<0.01$）。见表 2。

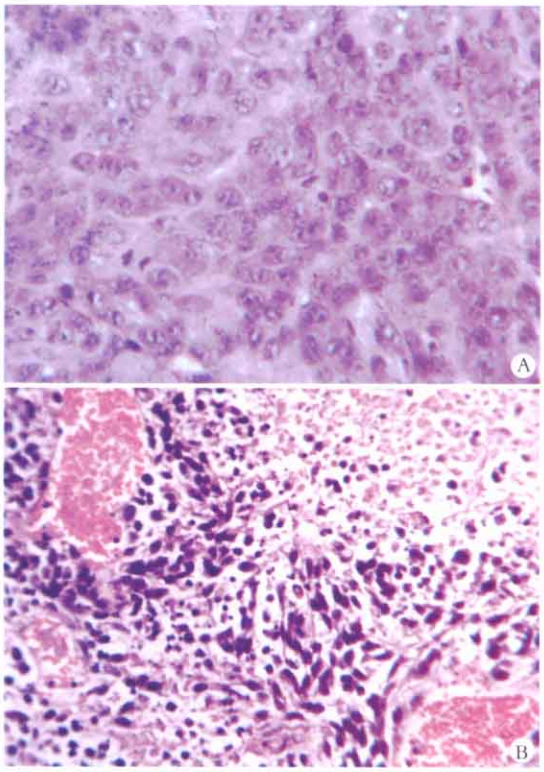
表2 分枝杆菌 Ag85B/IL-2 融合蛋白对 BTT_{739} 荷瘤鼠存活时间的影响($n=8$)

组别	存活天数(d)	存活延长率(%)
Ag85B/IL-2	35.50±2.60	48.66
Ag85B	27.25±2.71[b]	22.34
BCG	29.63±3.25[b]	26.15
IL-2	26.63±3.96[a]	13.32
生理盐水组	23.50±2.45[a]	—

a:$P<0.01$, b:$P<0.05$,与 Ag85B/IL-2 组比较

2.4 光镜下观察肿瘤的组织病理学改变

NS 对照组见肿瘤细胞大小不一,异型性明显,癌细胞呈圆形、椭圆形或梭形,并见瘤巨细胞。细胞核大,核浆比例增大。核圆形、梭形及不规则形,常见双核、多核,染色质粗,有 1~2 个大核仁,核浆比例大,有的细胞质较空亮,病理性核分裂像多见,癌细胞弥漫浸润。Ag85B/IL-2 融合蛋白治疗组肿瘤细胞表现与 NS 对照组类似,但有明显的炎性细胞浸润、肿瘤细胞坏死、出血等。见图1。

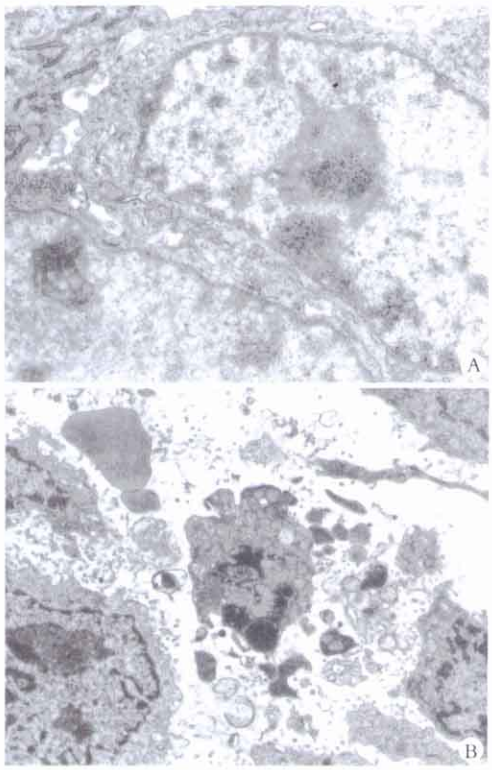


A:生理盐水对照组;B:Ag85B/IL-2 治疗组

图1 治疗前后小鼠膀胱肿瘤病理学观察结果 (HE×400)

2.5 透射电镜下观察肿瘤的超微结构改变

透射电镜下 NS 对照组见癌细胞大小及形态各异,排列不规则,癌细胞呈圆形、椭圆形梭形和不规则形,常染色质增多,常见双核、多核,可见 1~2 个较大核仁靠近核膜。Ag85B/IL-2 融合蛋白治疗组可见细胞膜破裂,细胞器破坏,细胞质固缩,核破坏,核染色质聚集,凋亡小体出现,巨噬细胞吞噬增多等。见图2。



A:生理盐水对照组;B:Ag85B/IL-2 治疗组

图2 治疗前后小鼠膀胱肿瘤超微结构观察结果 (TEM×3 000)

3 讨论

Ag85B 又称为 α-Ag 或 MPB59,是 BCG、结核杆菌及其他分枝杆菌最主要的分泌蛋白[8],也是 BCG 在体外和体内发挥生物学作用的主要成分,能够诱导机体强烈的 Th1 免疫反应[9,10]。利用分枝杆菌 Ag85B 的免疫原性,在膀胱肿瘤免疫治疗中的应用近年引起人们关注。Ag85B 蛋白能够诱导膀胱肿瘤患者外周 PBMC 的增殖反应,并能诱导 Th1 细胞分泌 IFN-γ 和 IL-12 等细胞因子[11]。利用转染 Ag85B 基因的膀胱肿瘤细胞疫苗免疫动物后,抗原递呈细胞(APC)分别通过 MHC Ⅰ类和Ⅱ类分子,既能递呈 CTL 表位肽,又能递呈 Th 表位肽,从而比其他的基因修饰的肿瘤细胞疫苗具有更大的抗肿瘤优势[12]。

为了探寻新的而且副作用小的免疫治疗膀胱肿瘤的药物,我们利用基因工程技术,在前期成功构建了结核分枝杆菌分泌抗原 Ag85B 与人 IL-2 的融合基因,表达纯化了 Ag85/IL-2 融合蛋白。理论上 Ag85B/IL-2 融合蛋白可能具有 Ag85B 和 IL-2 双功能活性,两者融合后能够发挥免疫协同作用。Ag85B 诱导机体的 Th1 免疫反应,IL-2 能够激活 T 细胞、B 细胞、NK 细胞和巨噬细胞。作为一种蛋白性物质,Ag85B/IL-2 融合蛋白具备 BCG 样的免疫原性,但又避免了 BCG 活菌疫苗

的毒副作用。另外，Ag85B 还具有与膀胱壁纤维黏连蛋白(FN)结合的特性[13]，从而靶向性的引导该融合蛋白黏附于膀胱壁，延长作用时间。

前期研究证实该融合蛋白具有促进人外周血单个核细胞(PBMC)增殖和 Th1 型细胞因子 IL-12、IFN-γ 的分泌，其激活的人 PBMC 对多种膀胱肿瘤细胞株具有细胞毒作用[6]。本研究进一步探索其在体内对小鼠移植性膀胱癌的抑癌效应。结果显示：Ag85B/IL-2 融合蛋白治疗组小鼠瘤质量均显著小于 Ag85B 蛋白组、BCG 组、IL-2 组和 NS 组($P<0.01$)；肿瘤体积显著小于 Ag85B 蛋白组、BCG 组、IL-2 组和 NS 组($P<0.05$，$P<0.01$)；Ag85B/IL-2 融合蛋白治疗组的荷瘤鼠生存期显著长于 Ag85B 蛋白组、BCG 组、IL-2 组和 NS 组($P<0.05$，$P<0.01$)，研究结果表明，Ag85B/IL-2 融合蛋白具有对膀胱癌荷瘤鼠的抑瘤效应和生存期延长作用，且这种作用强于 Ag85B 蛋白、BCG 和 IL-2。光镜下观察 Ag85B/IL-2 融合蛋白治疗组肿瘤细胞有明显的炎性细胞浸润、肿瘤细胞坏死、出血等改变；透射电镜下观察可见细胞膜破裂，细胞器破坏，细胞质固缩，核破坏，核染色质聚集，凋亡小体出现，巨噬细胞吞噬增多等现象。

本研究初步证实了 Ag85B/IL-2 融合蛋白对小鼠膀胱癌具有抑癌效应和延长荷瘤鼠生存期的作用，其抑制膀胱癌的具体机制，以及有何毒副作用，是我们下一步研究的方向。

参考文献：

[1] Han R F, Pan J G. Can intravesical bacillus Calmette-Guerin reduce recurrence in patients with superficial bladder cancer? A meta-analysis of randomized trials[J]. Urology, 2006, 67(6): 1216 - 1223.

[2] 温儒民，周广臣，谢叔良，等. 卡介苗联合白细胞介素-2 膀胱灌注预防膀胱癌复发机理的研究[J]. 中华外科杂志，1998，36(4)：247 - 248.

[3] 张　勇，靳风烁，李黔生，等. 分枝杆菌 Ag85B 多克隆抗体的研制[J]. 第三军医大学学报，2004，26(11)：970 - 972.

[4] 杨登科，靳风烁，胡　伟，等. 结核分枝杆菌 Ag85B/IL-2-GST 融合蛋白表达质粒的构建及原核表达[J]. 免疫学杂志，2006，22(3)：350 - 351.

[5] 杨登科，靳风烁，张　勇. 结核分枝杆菌 Ag85B/IL-2 融合蛋白的原核表达、纯化、鉴定及活性初步测定[J]. 第四军医大学学报，2006，27(17)：1562 - 1565.

[6] 杨登科，靳风烁，张　勇. Ag85B/IL-2 融合蛋白在体外对 PBMC 增殖及 Th1 型细胞因子分泌的影响[J]. 医学临床研究，2006，23(2)：181 - 183，187.

[7] 武文森，尹克铮，韩月明，等. 小鼠可移植性膀胱移行细胞癌株(BTT739)的建立及实验研究[J]. 中国肿瘤临床，1996，23(10)：751 - 756.

[8] Harth G, Lee B Y, Wang J, *et al*. Novel insights into the genetics, biochemistry, and immunocytochemistry of the 30-kilodalton major extracellular protein of Mycobacterium tuberculosis[J]. Infect Immun, 1996, 64(8): 3038 - 3047.

[9] Lim J H, Park J K, Jo E K, *et al*. Purification and immunoreactivity of three components from the 30/32-kilodalton antigen 85 complex in Mycobacterium tuberculosis[J]. Infect Immun, 1999, 67(11): 6187 - 6190.

[10] Kariyone A, Tamura T, Kano H, *et al*. Immunogenicity of Peptide-25 of Ag85B in Th1 development: role of IFN-gamma[J]. Int Immunol, 2003, 15(10): 1183 - 1194.

[11] Zlotta A R, Drowart A, Van-Vooren J P, *et al*. Superficial bladder tumors and increased reactivity against mycobacterial antigens before bacillus Calmette-Guerin therapy[J]. J Urol, 1998, 159(6): 1885 - 1891.

[12] Kuromatsu I, Matsuo K, Takamura S, *et al*. Induction of effective antitumor immune responses in a mouse bladder tumor model by using DNA of an alpha antigen from mycobacteria[J]. Cancer Gene Ther, 2001, 8(7): 483 - 490.

[13] Dheenadhayalan V, Shin K S, Chang C F, *et al*. Cloning and characterization of the genes coding for antigen 85A, 85B and 85C of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis[J]. DNA Seq, 2002, 13(5): 287 - 294.

(编辑　王小寒)

文献标识码的标识方法

为了便于文献的统计和期刊评价，确定文献的检索范围，提高检索结果的准确性，每篇文章或资料应当给出1个文献标识码。一般设置以下5种标志：

A：理论与应用研究学术论文(包括综述报告)

B：实用性技术成果报告(科技)，理论学习与社会实践总结(社科)

C：业务指导与技术管理性文章(包括领导讲话，特约评论等)

D：一般动态性信息(通讯、报道、会议活动、专访等)

E：文件、资料(包括历史资料、统计资料、机构、人物、书评、知识介绍等)

不属于上述各类的文章(读者文摘、来稿、简讯、广告、启事等)不加文献标识码

本刊编辑部