文章编号:1000-5404(2009)20-1997-04

论著

基于TEM-8新型颗粒性疫苗的制备、鉴定和体外激发CTL杀伤活性的研究

刘 平,梁后杰,阮志华,郑晨宏,欧娟娟,童晶涛,谢赣丰,耿培亮,边志衡 (第三军医大学西南医院肿瘤科,重庆 400038)

摘 要:目的 制备、鉴定基于肿瘤抗原TEM-8(tumor endothelial marker-8)的复合颗粒性疫苗,研究其在体外激发CTL杀伤活性。**方法** 在特定的条件下将阳离子肽和DNA制备成复合颗粒性的结构,以透射电镜、DNA阻滞试验、DNaseI保护试验、Western blot等对该疫苗进行制备和鉴定,同时进行体外激发CTL杀伤活性的标准^{51}Cr释放实验。**结果** 在NaCl浓度为87.5 mmol/L、电荷比为2的制备条件下,电镜扫描结果显示该疫苗能形成颗粒;Western blot鉴定其可有效介导TEM-8蛋白表达;该疫苗有明显的杀伤毒性,杀伤率为59.7%,与对照组性比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 成功制备了基于肿瘤抗原TEM-8的复合颗粒性疫苗,其在体外能够有效激发出特异性CTL应答。

关键词: TEM-8;阳离子肽;疫苗制备;T淋巴细胞
中图法分类号: R392.7;R944.27;R967 **文献标识码:** A

Preparation and identification of a novel particle vaccine based on pTEM-8 and its ability to stimulate CTL cytotoxic activity

LIU Ping, LIANG Hou-jie, RUAN Zhi-hua, ZHENG Chen-hong, OU Juan-juan, TONG Jing-tao, XIE Gan-feng, GENG Pei-liang, BIAN Zhi-heng (Department of Oncology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To prepare and identify the particles tumor vaccine based on tumor endothelial marker-8 (TEM-8) and stimulated cytotoxic activity of CTL *in vitro*. **Methods** Under specific condition, peptide and DNA were condensed into particle, and the preparing parameters were optimized by assays of DNA gel retardation, DNase I protection, and identified by Western blotting and ^{51}Cr release assay. **Results** The vaccine was condensed into homogeneous particles at charge ratio of 2 in 87.5 mmol/L NaCl concentration, which effectively medicated the expression of the genes carried by vaccine particles. **Conclusion** The tumor vaccine based on pTEM-8 is prepared successfully, and induces specific CTL with specific cytotoxic effect. These results provide a good foundation for the design of new tumor vaccine.

Key words: tumor endothelial marker-8; cationic peptide; vaccine preparation; T-lymphocytes

肿瘤的早期微小转移灶是影响手术、放化疗效果的重要因素,而微小转移灶的进一步生长必须依靠新生血管的形成[1]。抗肿瘤血管生成治疗已经应用于临床,在控制术后残留病灶复发、抑制远处隐性转移病灶等方面已经取得了一些进展。与以往的抗肿瘤血管生成分子治疗策略不同,抗肿瘤血管生成疫苗所介导的免疫治疗是以激活细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte,CTL)为主,诱导自身的肿瘤特异性免疫应答,识别和针对性清除肿瘤血管内皮细胞,从而降低肿瘤微血管生成。在诸多种抗肿瘤血管生成疫苗形式中,寻找到特异性高、免疫原性强是疫苗设计的关键。

阳离子肽类DNA转运载体(cationic peptides DNA delivery systems)是目前DNA转运载体中的新进展。该类DNA转运载体是一些富含正电荷氨基酸的多肽,利用正负电荷相互吸引原理,与含负电荷的pTEM-8结合,形成致密颗粒性结构。该颗粒性结构的疫苗易于被真核细胞摄入,有效转染细胞并介导目的基因的表达。TEM-8是被认为在结肠癌血管内皮中具有高特异性的肿瘤内皮标志物,是比较理想的免疫治疗候选靶点之一[2]。

本实验应用"肽-DNA复合疫苗"技术,构建编码

基金项目:重庆市自然科学基金(CSTC 2007B135041)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC 2007B135041)
作者简介:刘 平,男,山西省长治市人,硕士,主治医师,主要从事肿瘤耐药及肿瘤免疫治疗方面的研究。E-mail:2006_liuping@163.com
通信作者:梁后杰, E-mail:lianghoujie@sina.com
收稿日期:2009-03-06;修回日期:2009-04-28

TEM-8 的 DNA 疫苗作为应用型疫苗,以期为肿瘤免疫治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

融合肽 $[K]_{16}$-tat_{49-57} 为 RKKRRQRRRKKKKKKKKKKKKK-KKKK,委托上海吉尔公司合成。其中 N 末端 RKKRRQRRR 为含有正电荷的阳离子穿膜肽 Tat_{49-57},C 末端富含阳离子多聚赖氨酸 KKKKKKKKKKKKKKKK。真核表达质粒 pTEM-8 由美国国立卫生研究所 Stephen H. Leppla 教授惠赠。细胞株 COS-7 本中心实验室保存。Lipofectamine™2000 购自 Invitrogen 公司,羊抗人 TEM-8 多克隆抗体(R13)购自 Santa 公司。8 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自第三军医大学实验动物中心,$Na^{51}CrO_4$ 试剂盒购自购自中国北京同位素公司,CT-26 细胞株本实验室保存,其他均为常用试剂。

1.2 颗粒性疫苗的制备

本研究参照文献[3]制备方案,在 NaCl 浓度为 87.5 mmol/L 下将 100 μl 不同浓度的阳离子肽 $[K]_{16}$-tat_{49-57} 溶液逐滴滴入 100 μl 混悬状态、含有 500 μg/ml DNA 的水溶液中,5 μl/min,从而制备不同电荷比 r 的颗粒性疫苗。滴定完毕候制备产物继续混悬 30 min,静置 30 min。制备成新型肽-DNA 疫苗即 $[K]_{16}$-tat_{49-57}/ pTEM-8,以 Lipofectamine™2000 包裹的 pTEM-8 即 Lipofectamine™ 2000/ pTEM-8 作为阳性对照,以 $[K]_{16}$-tat_{49-57}/ pSecTag 为阴性对照。

1.3 DNA 凝胶阻滞分析、DNaseI 保护实验和电镜分析

制备不同正负电荷比的颗粒性疫苗,制备 0~4 不同电荷比的阳离子肽-DNA 复合物,各取 2 μl 样品凝胶加样,5 V/cm 电泳 10 min,观察不同复合物泳动情况。与 DNaseI 在 37 ℃ 孵育消化 15 min,EDTA 灭活 DNaseI,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

将制备好的疫苗滴于 200 目铜网上,吸附 3 min。吸水纸吸干,凉干 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,凉干 30 s。80 kV 透射电镜观察。以 Sigma Scan、Sigma Plot 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 Sigma Plot 软件对上述信息进行分析。

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,无血清培养基,加入 100 μl 颗粒性疫苗,孵育 4 h,更换成完全培养基 DMEM,再培养 48 h,后收集细胞。用 Lipofectamine™2000 转染质粒 pTEM-8 作为阳性对照,用 $[K]_{16}$-tat_{49-57} 转染空质粒 pSecTag 作为阴性对照。以羊抗人多克隆抗体(R13)为一抗,以辣根过氧化物酶标记的 IgG 为二抗,经化学发光显色。

1.6 效应细胞的制备

按照参照文献[4]方法,选择 8 周 BALB/c 小鼠,分 3 组每组 3 只;每组分别用上述 3 种疫苗在小鼠尾根皮下免疫,每周 1 次,连续 3 次,100 μg/次,第 3 次免疫后 7 d 处死小鼠,收获脾细胞。具体步骤如下:处死各组小鼠,无菌剥离脾脏,获得较纯的单个核细胞悬液;加入红细胞裂解液,静置 3 min 去除红细胞,以去除贴壁的单核巨噬细胞;将淋巴细胞悬液加入内盛尼龙毛的注射器,37 ℃ 培养箱内孵育 30 min,加入适量的 37 ℃ 预温的 1640 培养液,将淋巴细胞缓缓冲下,控制速度为 1 ml/min,所得即脾 T 淋巴细胞,用 1640 培养液调整细胞浓度 2×10^6/ml。

1.7 靶细胞的制备和标记

方法同 1.5,用 pTEM-8 转染 CT-26 后,得到能够表达有 TEM-8 的 CT-26 细胞作为靶细胞,转染细胞命名为 CT-26/pTEM-8,收获 CT-26/pTEM-8 细胞,将 5×10^6 个细胞加入 100 μCi ^{51}Cr,混匀;于 37 ℃,孵育 2 h,约 30 min 摇匀 1 次,收集细胞,并以 1640 液洗涤 3 次,去除游离同位素,调细胞浓度为 2×10^5/ml。

1.8 细胞毒性实验

在 U 型 96 孔反应板中,以效靶(E/T)比例 100:1混合不同组的效应细胞和 ^{51}Cr 标记的 CT-26/pTEM-8 细胞,每个效靶比做 3 个复孔;最大释放管:将 ^{51}Cr 标记的 CT-26/pTEM-8 (2×10^5/ml)细胞 100 μl 加入等体积 HCl (2 mmol/L);自释放管:上述细胞 100 μl 加入等体积的混合培养液中,放置 37 ℃ 孵箱孵育 4 h,取出 U 型 96 孔反应板离心,1 000 r/min,5 min;收集每孔上清 100 μl,在 FT-603 型 γ 计数器分别测定各自的脉冲数(cpm);计算用以下公式:细胞特异性裂解率(%) = [(实验组释放 - 自发释放最大释放)/(最大释放 - 自发释放)] × 100%。

1.9 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 融合肽的质谱和反相高效液相色谱鉴定

融合肽经质谱和反相高效液相色谱分析,相对分子质量为 3 390.44,与理论值一致,纯度达 96.57%,可以用于后期的实验研究(图 1)。

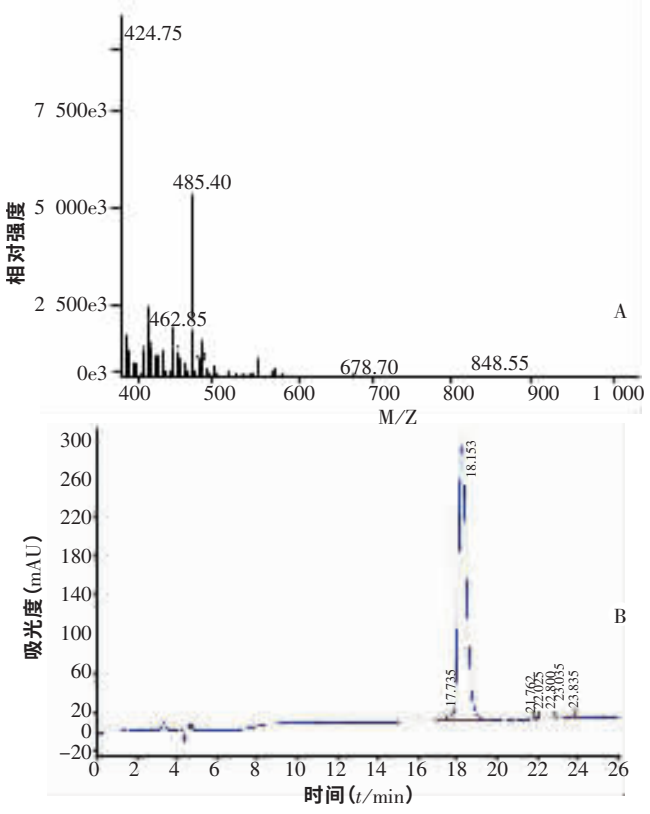
2.2 DNA 凝胶阻滞试验

采用此试验分析不同量多肽与 DNA 发生完全阻滞质粒泳动所需的最小 R 值。如图 2A 所示,当电荷比 R<2 时,肽-DNA 复合物的泳动被部分阻滞,随着 R 值的逐渐增大,泳动的复合物数量迅速减少,滞留在加样孔中的复合物的 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。R≥2 时,复合物被完全阻滞,提示质粒 DNA 被充分包装所需的最小 R 值为 2。

2.3 DNaseI 保护试验

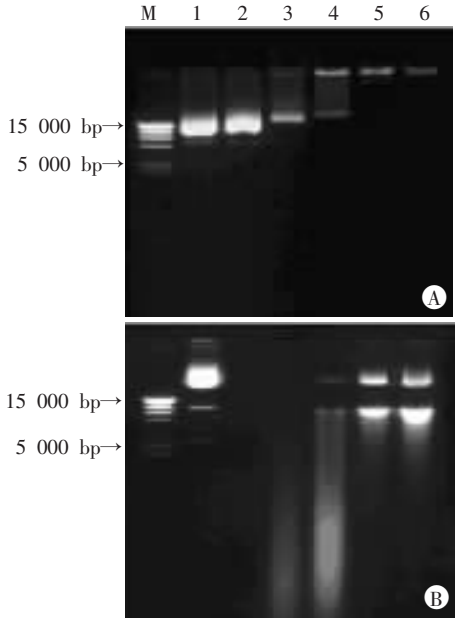
如图 2B 所示,当 R=0 时,游离的 DNA 在本试验条件下被 DNA 酶完全降解;当 R=0.5 和 1 时,质粒 DNA 不能被阳离子肽有效保护,但是随着 R 值的增大,被 DNase Ⅰ 酶解的片段有所增大,保护效应逐渐增加,在 R=1 时,出现了完全保护的 DNA 条带。当 R>2 时,质粒 DNA 分子被有效保护,DNA 有效

保护所需最小 R 值为 2。基于 DNA 凝胶阻滞分析和 DNase Ⅰ保护实验的结果,以下实验所用颗粒均在 R = 2 的条件下制备。



A: 融合肽经质谱分析; B: 反相高效液相色谱仪鉴定

图 1　融合肽[K]$_{16}$-tat$_{49\text{-}57}$的质谱及反相高效液相色谱分析



M:标准;1:纯 DNA;2:R = 0;3:R = 0.5;4:R = 1;5:R = 2;6:R = 4

A: DNA 凝胶阻滞实验结果;B: DNase Ⅰ保护实验结果

图 2　DNA 凝胶阻滞实验和 DNase Ⅰ 保护实验结果

2.4　疫苗颗粒电镜及粒度分析

阳离子肽-DNA 复合物能否通过细胞核膜是基因表达的关键,其直径不应超过 25 nm[5]。图 3 所示,质粒 DNA 经阳离子肽包装后,呈大小均一的近圆形颗粒,绝大多数颗粒直径小于 25 nm,以 R = 2 时,质粒 DNA 被阳离子肽充分包裹,能有效抵抗 DNA 酶的降解。

2.5　细胞转染与 Western blot 分析

为鉴定颗粒性疫苗介导质粒 TEM-8 表达的有效性,遂进一步对 COS-7 细胞进行转染,并检测 TEM-8 表达情况。如图 4 所示,疫苗颗粒可以有效介导质粒 TEM-8 基因的表达。

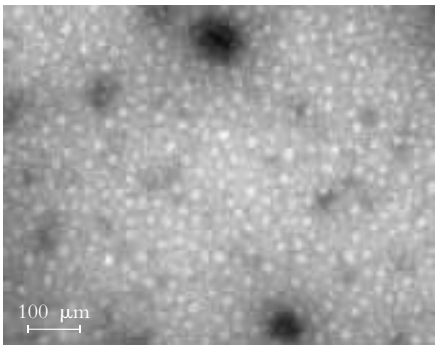
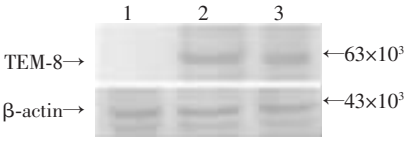


图 3　颗粒性疫苗电镜观察结果



1: [K]$_{16}$-tat$_{49\text{-}57}$/pSecTag; 2: Lipofectamine™ 2000/pTEM-8; 3:[K]$_{16}$-tat$_{49\text{-}57}$/pTEM-8

图 4　Western blot 检测 TEM-8 基因表达

2.6　颗粒性疫苗激发 CTL 的细胞毒活性

为了证实颗粒性疫苗所激发 CTL 对靶细胞具有细胞毒效应,观察了颗粒性疫苗免疫小鼠后,诱导的 CTL 对 CT-26/pTEM-8 的特异性细胞毒效应,实验表明[K]$_{16}$-tat$_{49\text{-}57}$/pTEM-8 所诱导的特异性 CTL 细胞毒效应最强,在 E∶T = 100∶1时,靶细胞的特异性溶破率为 59.7%,Lipofectamine™2000/pTEM-8 为 40%,而[K]$_{16}$-tat$_{49\text{-}57}$/pSecTag 的对照组为 18%。将各组数据用 SPSS13.0 软件进行分析,结果表明[K]$_{16}$-tat$_{49\text{-}57}$/pTEM-8 的颗粒性疫苗与 Lipofectamine™2000/pTEM-8 的颗粒性疫苗差异有统计学意义($P < 0.05$)。且二者明显高于阴性对照组,说明穿膜肽包裹的颗粒性疫苗能有效的激发 CTL 产生细胞毒作用,对靶细胞有较强的杀伤作用(图 5)。

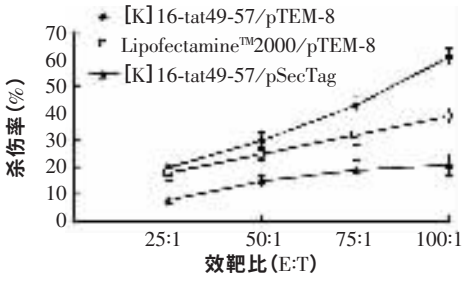


图 5　CTL 的细胞毒性实验结果

3 讨论

类似于肿瘤疫苗,抗肿瘤血管生成疫苗也可以分为细胞疫苗和分子疫苗2种。其在动物实验中取得了比较肯定的效果,但也存在着目的抗原特异低、疫苗的免疫原性弱,操作复杂等问题[6-11]。因此,急需寻找一种既可以避免以上不足,又保证较好体内效果的疫苗出现。

研究发现,将DNA分子与含有阳离子的穿膜肽复合物形成颗粒性疫苗,易于进入真核细胞,提高抗原提呈细胞的吞噬能力,从而提高免疫原性,使机体产生比较强的CTL反应,达到抗肿瘤作用。本研究在采用此方法的基础上,与抗肿瘤血管特异的基因结合,形成新的疫苗,从而进一步研究其作用。

St-Croix等[2]发现在结肠癌血管内皮中,由9条基因特异性比较高,分别命名为肿瘤内皮标志物1~9(tumor endothelial markers,TEMs)。经原位杂交检测发现,大多数TEM的mRNA在部分正常组织中(如黄体核创伤愈合过程时的新生血管)也丰富表达,但TEM-8却例外,提示TEM-8可能最具有肿瘤特异性。随后的研究表明,在成年小鼠体内,TEM-8的mRNA在正常组织中不表达或者微量表达,而在其肿瘤内皮中的表达却非常丰富[12]。在人体内,TEM-8 mRNA和TEM-8蛋白几乎在所有的结肠癌、食管癌、膀胱癌和肺癌病例中高表达,而在同一病例的癌旁组织和正常组织中却不表达,在黄体和伤口愈合过程中的新血管中也没有检测出TEM-8蛋白分子[13]。研究结果提示TEM-8是目前较为理想的免疫候选靶点之一。

Felicetti等[14]研究表明在单独的TEM-8疫苗的形式下,免疫原性低,分析其原因认为,单纯疫苗转染效率低,且在体内容易被降解,不能够有效提高抗原提成细胞的吞噬能力,在此基础上,我们按照Hashida等[15]引入阳离子穿膜肽tat_{49-57},并对其进行了改建,和富含阳离子的多聚赖氨酸$[K]_{16}$形成的融合肽,并和TEM-8真核表达质粒进行结合,制备成颗粒性结构的抗肿瘤血管生成新型疫苗。电镜扫描证明,在NaCl浓度为87.5 mmol/L,和电荷比R≥2的条件下,融合肽和质粒结合能产生直径小于25 nm的颗粒性肽-DNA复合物。具有了此种结构的颗粒性疫苗,改变了以往疫苗形成呈游离状态,颗粒状态。同时可以更有效地提高肿瘤抗原多肽的免疫原性。通过进一步的DNA凝胶阻滞、DNase Ⅰ保护和Western blot试验证明,阳离子多肽-DNA复合物可以避免进入细胞后的降解,有效转染入细胞并可以表达TEM-8蛋白。

本研究在成功构建了颗粒性疫苗的基础上,进一步做体外激发实验。理论上靶细胞表达特异性抗原TEM-8,并能够在细胞表面呈递肿瘤抗原相关表位肽,因此所激发的效应细胞能识别靶细胞表面MHC/PEPTIDE的复合物,所以能够特异杀伤靶细胞。本实验研究结果证实颗粒性疫苗所激发的CTL能够特异性的杀伤转染有pTEM-8的CT-26靶细胞,提示此颗粒性疫苗具备较好的理化性质,为以后检测抗肿瘤效应提供研究基础。

参考文献:

[1] Folkman J, Kalluri R. Cancer without disease[J]. Nature, 2004, 427(6977): 787.

[2] St-Croix B, Rago C, Velculescu V, *et al*. Genes expressed in human tumor endothelium[J]. Science, 2000, 289(5482): 1197-1202.

[3] 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.

[4] Liu J Y, Wei Y Q, Yang L, *et al*. Immunotherapy of tumors with vaccine based on quail homologous vascular endothelial growth factor receptor-2[J]. Blood, 2003, 102(5): 1815-1823.

[5] Nigg E A. Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation[J]. Nature, 1997, 386(6627): 779-787.

[6] Wei Y Q, Wang Q R, Zhao X, *et al*. Immunotherapy of tumors with xenogeneic endothelial cells as a vaccine[J]. Nat Med, 2000, 6(10): 1160-1166.

[7] Okaji Y, Tsuno N H, Kitayama J, *et al*. Vaccination with autologous endothelium inhibits angiogenesis and metastasis of colon cancer through autoimmunity[J]. Cancer Sci, 2004, 95(1): 85-90.

[8] He Q M, Wei Y Q, Tian L, *et al*. Inhibition of tumor growth with a vaccine based on xenogeneic homologous fibroblast growth factor receptor-1 in mice[J]. J Biol Chem, 2003, 278(24): 21831-21836.

[9] Su J M, Wei Y Q, Tian L, *et al*. Active immunogene therapy of cancer with vaccine on the basis of chicken homologous matrix metalloproteinase-2[J]. Cancer Res, 2003, 63(3): 600-607.

[10] Niethammer A G, Xiang R, Becker J C, *et al*. A DNA vaccine against VEGF receptor 2 prevents effective angiogenesis and inhibits tumor growth[J]. Nat Med, 2002, 8(12): 1369-1375.

[11] Li Y, Wang M N, Li H, *et al*. Active immunization against the vascular endothelial growth factor receptor flk1 inhibits tumor angiogenesis and metastasis[J]. J Exp Med, 2002, 195(12): 1575-1584.

[12] Carson-Walter E B, Watkins D N, Nanda A, *et al*. Cell surface tumor endothelial markers are conserved in mice and humans[J]. Cancer Res, 2001, 61(18): 6649-6655.

[13] Nanda A, Carson-Walter E B, Seaman S, *et al*. TEM8 interacts with the cleaved C5 domain of collagen alpha 3(VI)[J]. Cancer Res, 2004, 64(3): 817-820.

[14] Felicetti P, Mennecozzi M, Barucca A, *et al*. Tumor endothelial marker 8 enhances tumor immunity in conjunction with immunization against differentiation Ag[J]. Cytotherapy, 2007, 9(1): 23-34.

[15] Hashida H, Miyamoto M, Cho Y, *et al*. Fusion of HIV-1 Tat protein transduction domain to poly-lysine as a new DNA delivery tool[J]. Br J Cancer, 2004, 90(6): 1252-1258.

(编辑 吴培红)