论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201504176

上皮膜蛋白2多肽疫苗在鼠乳腺癌中的免疫防治效果研究

许 颖,吴东明,石 娇,杜红飞,周晓萍,王 丹 (610500 成都,成都医学院第一附属医院检验科)

[摘要] **目的** 研究上皮膜蛋白2(epithelial membrane protein 2,EMP2)在多种人类肿瘤中的蛋白表达谱,并在小鼠乳腺癌模型中研究EMP2多肽疫苗的预防及治疗效果。**方法** 采用大样本组织芯片检测人体常见20种肿瘤中,EMP2在正常组织与相对应的肿瘤组织的表达。体外化学合成EMP2多肽,并与KLH蛋白偶联。于小鼠接瘤前后免疫Balb/c小鼠,ELISA法检测免疫后小鼠抗EMP2抗体的血清效价。建立4T1细胞荷瘤小鼠预防及治疗模型,随机分为生理盐水组、单纯KLH组、单纯佐剂组、KLH-EMP2多肽组,每组各10只。观察KLH-EMP2多肽疫苗对乳腺癌模型的成瘤率、肿瘤生长情况、体重及生存期的影响。**结果** 与相应正常组织比较,EMP2在乳腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、甲状腺癌等肿瘤中明显高表达。而在胰腺癌、前列腺癌及脑部肿瘤中呈低表达或阴性表达。KLH-EMP2多肽免疫小鼠后,构建小鼠乳腺癌4T1荷瘤模型,对照组成瘤率为100%,佐剂组及单纯KLH组成瘤率分别为100%,100%,KLH-EMP2多肽组成瘤率为70%。较之对照组、佐剂组及单纯KLH组,KLH-EMP2多肽组可明显抑制4T1肿瘤生长($P=0.009$)。同时,延长荷瘤小鼠生存时间($P=0.001$),同时,免疫对小鼠的体重无明显变化($P=0.58$)。在4T1肿瘤治疗模型中,KLH-EMP2多肽治疗可明显抑制4T1肿瘤生长($P=0.001$)和大小($P=0.006$)。同时,延长4T1荷瘤小鼠生存期($P=0.03$)。**结论** EMP2在乳腺癌中呈高表达,EMP2多肽疫苗具有明显的乳腺癌预防及治疗作用。

[关键词] 乳腺癌;组织芯片;生物标志物;疫苗

[中图法分类号] R392.7;R737.9; R730.1 [文献标志码] A

Epithelial membrane protein 2 peptide vaccine in immunological control of breast carcinoma in mice

Xu Ying, Wu Dongming, Shi Jiao, Du Hongfei, Zhou Xiaoping, Wang Dan (Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan Province, 610041, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the protein expression profile of epithelial membrane protein 2 (EMP2) in a variety of human cancers, and to determine the preventive and therapeutic effect of EMP2 polypeptide vaccine in mouse breast cancer model. **Methods** The expression of EMP2 in normal tissues and corresponding tumor tissues was detected by tissue microarray. EMP2 polypeptide was synthesized chemically *in vitro*, and then coupled with protein keyhole limpet hemocyanin (KLH). The serum titer of anti-EMP2 antibody was detected by ELISA in the immunized mice. The prevention and treatment of tumor bearing mice of breast cancer 4T1 cells were randomly divided into saline group, KLH group, simple adjuvant group, and KLH-EMP2 group, with 10 mice in each group. The mice were immunized with KLH-EMP2 polypeptide vaccine or other corresponding agents before the establishment of mouse 4T1 breast cancer tumor. Tumorigenesis, tumor growth, weight and survival were observed to determine the effect of KLH-EMP2 peptide vaccine on breast cancer model. **Results** Compared with the normal tissues, EMP2 was significantly higher

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(81001345);四川省科技厅项目(2014JY0039);四川省教育厅项目(15ZA0248);四川省学术带头人培养基金(2014)

[通信作者] 许 颖,E-mail:yingxu825@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151118.1451.015.html(2015-11-18)

in breast cancer, endometrial cancer, ovarian cancer, cervical cancer, bladder cancer, thyroid cancer and other tumors, but it was not or mildly expressed in pancreatic cancer, prostate cancer and brain tumors. The tumor formation rate was 100% for the saline group, KLH group, and simple adjuvant group, but only 70% for the KLH-EMP2 group. KLH-EMP2 peptide resulted in significant inhibitory effect on tumor growth (P = 0.009), prolonged the survival of xenograft mice (P = 0.001), but had no effect on the body weight (P = 0.58) when compared with the other 3 groups. In the 4T1 tumor treatment model, KLH-EMP2 polypeptide significantly inhibited 4T1 tumor growth (P = 0.001) and weight (P = 0.006), and at the same time, prolonged the survival of 4T1 tumor bearing mice (P = 0.03). **Conclusion** EMP2 is highly expressed in breast cancer, and EMP2 peptide vaccine has obvious preventive and therapeutic effect on breast cancer.

[**Key words**] breast neoplasms; microarray; biomarkers; vaccine

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81001345), the Project of Sichuan Provincial Department of Science and Technology (2014JY0039), the Project of Sichuan Provincial Department of Education (15ZA0248), and the Fund of Academic Leaders Training of Sichuan Province (2014). Corresponding author: Ying Xu, E-mail: yingxu825@126.com

乳腺癌的发病率和死亡率仍在女性恶性肿瘤中居第一位[1-2]。因此,迫切需要大量的研究以发现新型乳腺癌生物标志物,用于乳腺癌的早期诊断、临床预后及潜在的治疗靶点。EMP2 作为四重跨膜蛋白,其表达失调与多种肿瘤发生发展相关[3-5]。EMP2 是目前唯一已知的预测子宫内膜癌上皮增生向恶性肿瘤增生的早期诊断标志物。而在泌尿系统肿瘤中, EMP2 作为大豆异黄酮的上调基因,可明显抑制肿瘤生长[6]。

早期的研究表明 EMP2 可能在多种肿瘤中呈现差异较大的表达情况,故而研究 EMP2 多肿瘤组织表达谱,对于 EMP2 作为肿瘤特异性分子标志物应用意义较大。本实验采用多肿瘤组织芯片的方法,高通量的研究 EMP2 在 20 种人体常见肿瘤以及正常乳腺组织中的表达情况,旨在筛选得到 EMP2 蛋白在多种肿瘤组织的表达谱,为临床诊断及靶向治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 免疫组化

EMP2 抗体(1∶100)用于免疫组化检测组织中 EMP2 的表达情况。组织芯片(购自陕西超英)经常规脱蜡、水化后,用柠檬酸缓冲液高压修复抗原,自然冷却。随后用 3% H_2O_2 于室温避光封闭 15 min,PBS 洗涤后 5 min×3 次后滴加山羊血清,37 ℃封闭 30 min;血清封闭后的切片直接孵一抗 4 ℃过夜。第 2 天从 4 ℃ 取出切片,PBS 洗涤 5 min×3 次,滴加山羊抗小鼠 IgG 二抗,37 ℃孵育 30 min;PBS 洗涤 5 min×3 次,滴加辣根过氧化酶标记的三抗, 37 ℃孵育 30 min;PBS 洗涤 5 min×3 次后用 DAB 显色;流水冲 15 min,冲洗掉残余的 DAB,用苏木精复染 1 min 后,流水冲 30 min,待返蓝之后,脱水封片,在光学显微镜下观察并采集图像。免疫组化染色结果通过半定量计分的方法进行评价。EMP2 的染色强度分布为:阴性(0)、弱阳性(1)、中阳性(2)、强阳性(3)。阳性染色的百分比为:<5%(0)、5% ~25%(1)、26% ~50%(2)、51% ~75%(3)、>75%(4)。最终的 EMP2 的免疫组化染色结果(0~12)为每一患者组织标本的染色强度乘以相对应的阳性染色的百分比。

1.2 多肽设计与合成

利用在线软件 BepiPred 1.0 Server(http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/)从 EMP2 全蛋白序列直接预测抗原表位,得到相应 EMP2 抗原肽:DLHQQNRKLYYLLQEGSYGGSGSK。EMP2 多肽由上海科肽公司进行合成,并化学偶联到 KLH 蛋白上,以增强其免疫原性。

1.3 动物免疫

Balb/c 小鼠购自北京维通利华生物, MHC Haplotype: $H2^d$,雌性,鼠龄 6~8 周,体质量约 20 g,于 SPF 级动物房饲养。

EMP2-KLH 多肽首次免疫剂量为 10 μg/只小鼠,与弗氏完全佐剂研磨混匀后,于背部皮下双点注射,100 μL/只。第 2、3 次免疫分别间隔 2 周,免疫剂量为 10 μg/只小鼠,与弗氏不完全佐剂研磨混匀后,于背部皮下双点注射,100 μL/只。第 3 次免疫 2 周后,取小鼠尾静脉血液备用。另取小鼠免疫前血清作为阴性对照。

1.4 ELISA 检测

取血后,于 37 ℃血液凝固 2 h 后,4 ℃放置过夜。当血清自然析出后,4 ℃,1 000×g 离心 10 min,分离血清备用。用 50 mmol/L 碳酸盐包被缓冲液(pH = 9.6)溶解 EMP2 多肽,使抗原浓度为 20 μg/mL,加 100 μL/孔于 96 孔酶标板,4 ℃放置过夜。次日,弃去包被液后,PBST 洗涤 3 次,每孔加入 150 μL 1% BSA

37 ℃封闭 1 h。PBST 洗涤 3 次后，每孔加入 100 μL 不同倍比稀释度的血清，并加入对照样品，37 ℃孵育 2 h。PBST 洗涤5 次后，加入100 μL 稀释后的 HRP 标记的二抗，37 ℃孵育 1 h。PBST 洗涤 5 次后，显色剂显示 20 min 后，酶标仪上读取 D(450)值。

1.5 动物荷瘤模型

鼠乳腺癌 4T1 细胞购买于 ATCC，MHC Haplotype：$H2^d$。培养基于含 10% 胎牛血清，100 U/mL 青霉素和链霉素的 DMEM 培养基中培养。37 ℃、5% CO_2 的孵箱中培养。

KLH 多肽免疫预防模型：当多肽免疫完成，效价达到预定值后。将免疫后小鼠随机分为 4 组：生理盐水组、佐剂组、佐剂 + KLH 组、佐剂 + KLH-EMP2 多肽组，每组各 10 只。将对数生长期的 4T1 细胞进行收集，用无血清 DMEM 培养基洗涤后，进行细胞计数，调整细胞浓度为 5×10^6/mL，每只小鼠腋下接种 100 μL。从肿瘤接种后可扪及肿瘤结节开始，每 2 天用游标卡尺测量肿瘤纵横大小。肿瘤体积计算为：肿瘤体积 = 长 × 宽^2。同时，记录小鼠体重变化情况和小鼠生存情况。

KLH 多肽免疫治疗模型：将对数生长期的 4T1 细胞进行收集，用无血清 DMEM 培养基洗涤后，进行细胞计数，调整细胞浓度为 5×10^6/mL，每只小鼠腋下接种 100 μL。将荷瘤小鼠随机分为 4 组：生理盐水组、佐剂组、佐剂 + KLH 组、佐剂 + KLH-EMP2 多肽组，每组各 10 只。分别于接种肿瘤后第 5 天、第 12 天、第 19 天免疫小鼠。从肿瘤接种后可扪及肿瘤结节开始，每 2 天用游标卡尺测量肿瘤纵横大小。肿瘤体积计算为：肿瘤体积 = 长 × 宽^2。同时，记录小鼠体质量变化情况和小鼠生存情况。

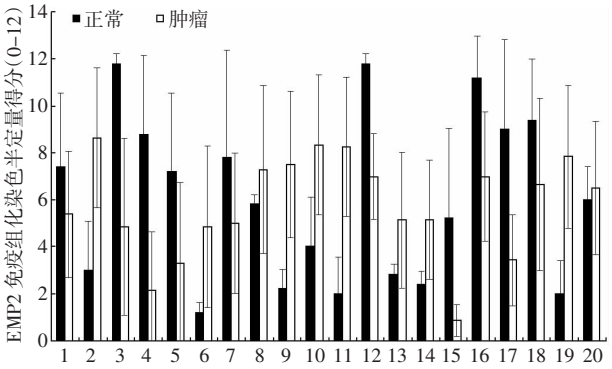
1.6 统计学分析

采用 GraphPad 5.0 软件。数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，进行单因素方差分析，组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 EMP2 在乳腺癌组织中呈高表达

EMP2 在正常乳腺、甲状腺以及子宫颈等正常组织中呈低表达，而在前列腺、肝、胰腺、肺、肾等正常组织中呈高表达。与相对应正常组织比较，EMP2 在乳腺癌($P=0.02$)、卵巢癌($P=0.03$)、宫颈癌($P<0.01$)、膀胱癌($P=0.001$)、甲状腺癌($P<0.01$)、皮肤癌($P<0.01$)等肿瘤中明显高表达，而在胰腺癌($P<0.01$)、前列腺癌($P<0.01$)、肺癌($P=0.002$)、肝癌($P=0.003$)及脑部肿瘤($P<0.01$)中呈低表达或阴性表达(图 1、2)。



1：胃；2：皮肤；3：前列腺；4：脑；5：卵巢；6：乳腺；7：睾丸；8：结肠；9：膀胱；10：子宫；11：甲状腺；12：肺；13：鼻咽；14：淋巴结；15：骨骼肌；16：肝；17：胰腺；18：肾；19：宫颈；20：食道

图 2 正常及肿瘤组织中 EMP2 表达的统计分析

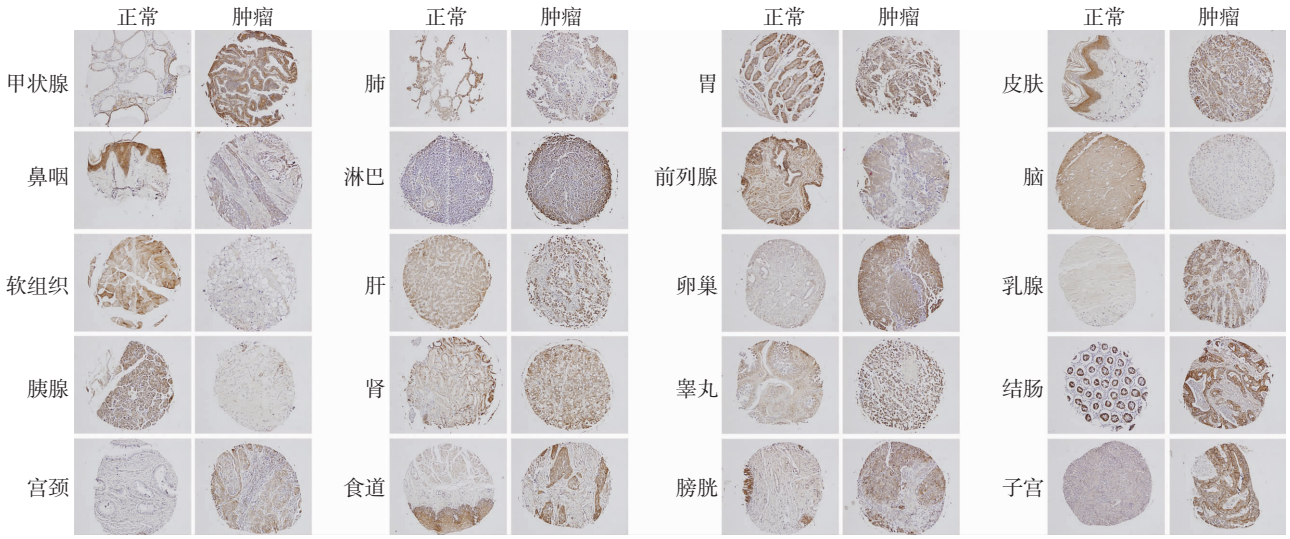


图 1 多组织芯片分析正常及肿瘤组织中 EMP2 的表达

2.2 EMP2-KLH 多肽免疫具有明显的乳腺癌预防效果

KLH-EMP2 多肽免疫完成后，ELISA 检测血清中 EMP2 抗体效价，当免疫血清 $D(450)$/阴性对照血清 $D(450)$(P/N) > 2.1 时，判断为阳性（+）。经计算，EMP2 多肽免疫后效价为 > 1∶12 800，满足肿瘤免疫需求（表 1）。

表 1 ELISA 检测免疫后血清效价

血清稀释倍数	免疫血清 [$D(450)$]	阴性对照血清 [$D(450)$]	P/N
1∶200	2.435	1.027	+
1∶400	2.561	0.803	+
1∶800	2.653	0.482	+
1∶1 600	2.169	0.336	+
1∶3 200	1.497	0.292	+
1∶6 400	0.876	0.252	+
1∶12 800	0.61	0.232	+
1∶25 600	0.426	0.221	−

小鼠 EMP2-KLH 多肽免疫后，可明显抑制 4T1 荷瘤动物模型中肿瘤的生长（图 3）。同时，显著延长小鼠的生存期（图 4），而 EMP2-KLH 多肽免疫对于小鼠的体质量无明显影响（图 5）。

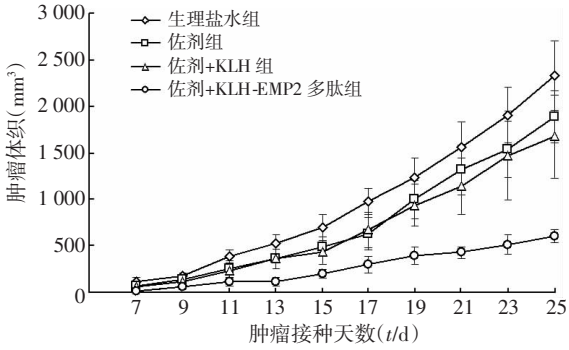


图 3 EMP2-KLH 多肽免疫具有明显的肿瘤生长抑制效果

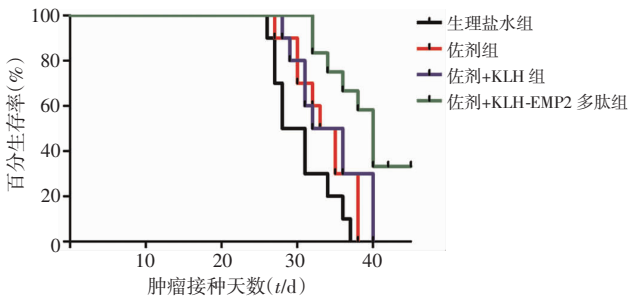


图 4 EMP2-KLH 多肽免疫显著延长小鼠生存期

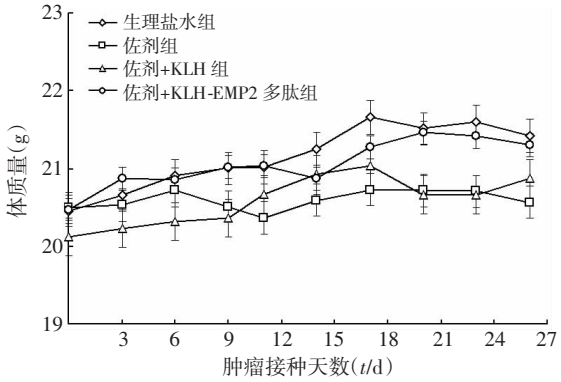


图 5 EMP2-KLH 多肽免疫对小鼠体质量的影响

2.3 EMP2-KLH 具有明显的乳腺癌治疗效果

在小鼠乳腺癌细胞 4T1 荷瘤动物模型中，EMP2-KLH 多肽免疫治疗能明显抑制肿瘤的生长（图 6）。同时，EMP2-KLH 多肽免疫治疗显著延长小鼠的生存期（图 7）。

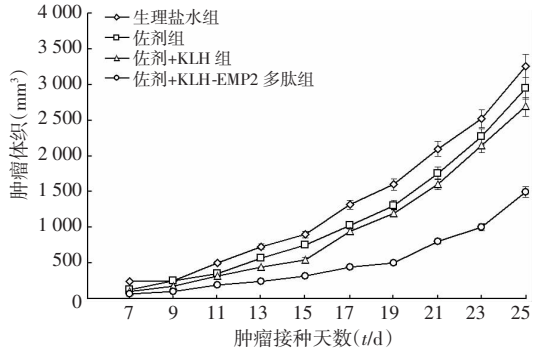


图 6 EMP2-KLH 多肽免疫治疗具有明显的肿瘤生长抑制效果

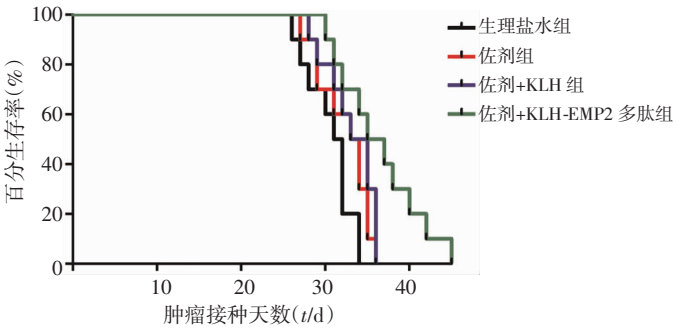


图 7 EMP2-KLH 多肽免疫治疗显著延长小鼠生存期

3 讨论

现有研究表明 EMP2 可与 integrins 及 P2X7 相互作用，进而调节肿瘤生长及转移等过程。与正常卵巢组织相比，EMP2 在超过 70% 的卵巢癌中呈高表达，

anti-EMP2 抗体治疗明显抑制卵巢癌细胞生长、诱导细胞凋亡[7]。在胶质瘤中,95% 的患者高表达 EMP2 蛋白,而在正常脑组织中 EMP2 呈无表达或阴性。EMP2 通过上调 integrin αvβ3 表达、激活 focal adhesion kinase(FAK)及 Src 激酶,进而加速肿瘤生长,促进肿瘤转移[8]。动物实验研究同样表明,anti-EMP2 抗体治疗胶质瘤取得良好的肿瘤治疗效果[9]。大量的研究表明,EMP2 在多种肿瘤中呈高表达,如子宫内膜癌、卵巢癌、宫颈癌等,并与病人生存期呈正相关。通过调节 integrins 及 VEGF 表达、激活 FAK 及 Src 激酶,进而加速肿瘤生长,促进肿瘤转移,在肿瘤中发挥癌基因相关作用[3-5,8-9]。但同时,部分研究表明在部分肿瘤如泌尿系统肿瘤、肺癌中能显著抑制肿瘤转移,与肿瘤患者生存期呈负相关[9]。表明 EMP2 可能具有组织表达特异性,在不同肿瘤组织中具有不同的生物学功能,并受多种可能因素的调节。

在本实验中,我们利用多肿瘤组织芯片,高通量的研究 EMP2 在 20 种不同肿瘤组织中的表达情况,旨在构建相应的组织表达谱,为 EMP2 分子诊断或生物靶向治疗提供相应的理论依据。我们发现,EMP2 在前列腺、肝、胰腺、肾等正常组织中呈高表达。与相应正常组织比较,EMP2 在乳腺癌、宫颈癌、膀胱癌、甲状腺癌等肿瘤中明显高表达,而在胰腺癌、前列腺癌、肝癌、肺癌及脑部肿瘤中呈低表达或阴性表达。表明 EMP2 可能在不同的肿瘤组织类型中具有不同的生物学功能。其中,乳腺癌较之正常乳腺组织,EMP2 表达差异较大,表明 EMP2 在乳腺癌中具有潜在的诊断价值和可作为新型的治疗靶点。

同时,我们发现,在 EMP2 上调的肿瘤类型中,其恶性程度和致死率明显低于 EMP2 下调的肿瘤类型[2]。故 EMP2 在不同的肿瘤类型可能存在不同的分子层面的调控,如基因突变,基因表观遗传学修饰,蛋白泛素化降解,甚至肿瘤微环境的调控,均可能会影响 EMP2 蛋白的表达水平,并对肿瘤功能进行调控。

我们发现 EMP2 蛋白多肽疫苗免疫可明显抑制小鼠乳腺癌细胞的生长,并延长荷瘤小鼠的生存期。同时,EMP2 多肽对荷瘤小鼠的肿瘤生长具有良好的抑制效果,进而延长荷瘤小鼠的生存时间。表明 EMP2 多肽具有较好的肿瘤预防及治疗效果。EMP2 可作为乳腺癌生物治疗的靶点,具有潜在临床运用价值。

参考文献:

[1] Bray F, Ren J S, Masuyer E, *et al*. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008[J]. Int J Cancer, 2013, 132(5): 1133-1145.

[2] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, *et al*. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. Int J Cancer, 2015, 136(5): E359-E386.

[3] Ahmed H G, Abdul-Gader-Suliman R S, Abd-El-Aziz M S, *et al*. Immunohistochemical expression of cytokeratins and epithelial membrane protein 2 in nasopharyngeal carcinoma and its potential implications[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(2): 653-656.

[4] Chen Y H, Wu L C, Wu W R, *et al*. Loss of epithelial membrane protein-2 expression confers an independent prognosticator in nasopharyngeal carcinoma: a cohort study[J]. BMJ Open, 2012, 2(2): e000900.

[5] Habeeb O, Goodglick L, Soslow R A, *et al*. Epithelial membrane protein-2 expression is an early predictor of endometrial cancer development[J]. Cancer, 2010, 116(20): 4718-4726.

[6] Wang Y W, Li W M, Wu W J, *et al*. Epithelial membrane protein 2 is a prognostic indictor for patients with urothelial carcinoma of the upper urinary tract[J]. Am J Pathol, 2013, 183(3): 709-719.

[7] Fu M, Maresh E L, Soslow R A, *et al*. Epithelial membrane protein-2 is a novel therapeutic target in ovarian cancer[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(15): 3954-3963.

[8] Fu M, Rao R, Sudhakar D, *et al*. Epithelial membrane protein-2 promotes endometrial tumor formation through activation of FAK and Src[J]. PLoS One, 2011, 6(5): e19945.

[9] Qin Y, Fu M, Takahashi M, *et al*. Epithelial membrane protein-2 (EMP2) activates Src protein and is a novel therapeutic target for glioblastoma[J]. J Biol Chem, 2014, 289(20): 13974-13985.

(**收稿**:2015-04-30;**修回**:2015-06-03)

(编辑 吴培红)