DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.10.005
第24卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 10
1140 2002年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2002

文章编号:1000-5404(2002)10-1140-03

论著

小鼠肥大细胞瘤基因疫苗的免疫治疗作用研究

倪 兵,吴玉章,李艳秋,林治华,唐 艳,王 莉,邹丽云,贾正才,周 伟 (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 探讨α-病毒RNA复制酶对基因疫苗的免疫学效应的加强作用,寻找更好的基因疫苗形式。方法 将小鼠肥大细胞瘤P815的肿瘤特异抗原P1A基因克隆到含SFV的RNA复制酶的真核表达载体pSMART2a中,以此作为肿瘤基因疫苗,观察该疫苗对P815种植瘤的防治作用、特异细胞毒T淋巴细胞激活和抗体的生成情况。结果 该重组基因疫苗在体外有很好的表达,注射后CTL的最大杀伤效率为60%,而普通载体疫苗形式pCI-neo/P1A则只有40%的杀伤活性;在观察期限内,前者的动物成瘤率和动物生存率分别为20%和40%,后者则分别为60%和20%。两种情况下都不能检测到任何特异抗体的产生。结论 α-病毒RNA复制酶对基因疫苗的免疫学效应有加强作用。

关键词:基因疫苗;肥大细胞瘤;RNA复制酶
中图法分类号:R392.11;R730.261;R730.51 文献标识码:A

Immune effect of tumor gene vaccine containing mouse mastocytoma tumor specific gene P1A in mice

NI Bing, WU Yu-zhang, LI Yan-qiu, LIN Zhi-hua, TANG Yan, WANG Li, ZOU Li-yun, JIA Zheng-cai, ZHOU Wei (Institute of Immunlogy of PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the enhancing effect of RNA replicase of alpha-virus on the immune effect of genetic vaccine in order to obtain its optimal form. Methods Tumor specific P1A gene of mouse mastocytoma was cloned into eukaryotic expression vector pSMART2a containing RNA replicase of SFV. These recombinants were used as tumor genetic vaccines for tumor loaded mice induced by mastocytoma cell line P815 and their anti-tumor effect was observed. The elicited specific CTL and antibodies were also studied. Results The recombinant genetic vaccine expressed well *in vitro*. The maximal primed specific CTL by the vaccine reached 60%, whereas the maximal CTL primed by normal genetic vaccine-pCI-neo/P1A only reached 40%. Meanwhile, the rate of tumor incidence and animal survival during the experiment for the former were 20% and 40% respectively, but those of the latter were separately 60% and 20%. No specific antibody was detected in the mice inoculated with pSMART2a/P1A or pCI-neo/P1A. Conclusion RNA replicase of alpha— virus has strong immunological effect on tumor genetic vaccines.

Key words: genetic vaccine; mastocytoma; RNA replicase

恶性肿瘤是一种全球性致死性疾病,目前的治疗方法还有许多方面有待改进。由于肿瘤病人,特别是中晚期病人,自身的免疫系统不能产生有效的肿瘤特异性免疫应答,所以,如果能结合外科手术方式,采取其它手段在病人体内激发出肿瘤特异的有效的主动免疫应答,则对于残留病灶和转移性病灶可以起到杀伤作用。

基因疫苗有许多其它疫苗所无法比拟的优点[1,2],利用其作为治疗恶性肿瘤不失为一种好的方法。基因疫苗的免疫学作用是剂量依赖性的,而常规真核表达质粒的表达效率并不够高,因此,如果能采取某些方式提高目的基因的表达则可以部分克服目前基因疫苗免疫效应不够强的问题。近年来随着真核表达载体的研究,出现了利用α-病毒复制酶来提高基因表达的大量研究[3~5]。此酶的催化效率极高,能够在宿主细胞中得到大量的mRNA。所以,将此酶基因和目的基因克隆到相应的真核表达载体中就会得到大量的目的基因mRNA和随后表达的目的蛋白,这将导致更高的肿瘤特异型免疫应答。因此,本研究将小鼠肥大细胞瘤P815的肿瘤特异抗原P1A基因克隆到含SFV的RNA复制酶的真核表达载体pSMART2a中,以此作为肿瘤基因疫苗,观察该疫苗对P815种植瘤的排斥作用,探讨SFV复制酶在提高基因疫苗免疫学效应中的作用,寻找提高肿瘤基因疫苗疗效的新方法。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

6~8周龄雌性DBA/2(K^d)小鼠购自北京实验动物中心,P815细胞系为本室自存细胞,pCI-neo购自Promega公司,DOTAP和ECL Western-blot试剂盒购自Roche公司,细胞培养用品来自Hyclone公司,P1A mAb由比利时LUDWIG癌症研究所Van de Pel博士赠送,效价1∶1 000;ELISA试剂盒购自Roche公司。余试剂均为国产分析纯。去内毒素质粒大量抽提试剂盒购自Qiagen公司。^{51}Cr购自中国同位素公司。P1A表位肽LPYLGWLVF由本室自行合成。pCI-neo/P1A为本室构建[6]。

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(2001CB510001)
作者简介:倪 兵(1968—),男,湖北省黄梅县人,博士研究生,讲师,主要从事肿瘤基因疫苗方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68752236
通信作者:吴玉章,电话:(023)68752680
收稿日期:2002-03-16;修回日期:2002-08-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2　重组基因疫苗的制备和鉴定

重组 pSMART2a/P1A 的构建按常规方法进行[7]。测序和表达鉴定过的重组质粒用去内毒素质粒大量抽提试剂盒进行抽提, 定量质粒, 灭菌生理盐水稀释到 2 μg/μl, 储存备用。

1.3　P815 肿瘤动物模型的复制

取 1× 10^5 个 P815 体外培养细胞皮下注射于 DBA/2 小鼠右腹侧, 触摸观察肿瘤的形成。

1.4　质粒注射

动物随机分组, 每组 10 只, 分别将质粒注射于右腿径前肌内。注射器用 1 ml 皮试针, 针头上套一合适直径的软管, 露出 1 mm 的针尖部分。注射时使注射器与肌肉呈垂直方向进入。用生理盐水稀释到合适浓度。对照组注射 100 μg pSMART2a/LacZ 质粒/100 μl/只或 100 μl 生理盐水。实验组分别注射 100 μg pSMART2a/P1A 或 100 μg pCI-neo/P1A, 注射体积仍各为 100 μl/只。

1.5　免疫小鼠体内 P1A 抗体的测定

将 P815 细胞接种到 96 孔板中, 10^5 个细胞/孔, 培养过夜。细胞用甲醇∶丙酮(1∶1)固定。固定的细胞在封闭缓冲液(1% BSA 于 89 mmol/L 硼酸, 90 mmol/L NaCl, pH 8.3 中)中室温封闭 3 h。加入用封闭液 2 倍稀释的小鼠血清, 4 ℃孵育过夜。用 0.1% Tween-20, 150 mmol/L NaCl 溶液洗板 5 次。加入溶解在封闭缓冲液中的 HRP-抗 IgG, 4 ℃孵育过夜。洗板 5 次, 加入底物邻苯二胺, 室温孵育至阳性孔颜色变深后, 用 2 mol/L 硫酸 50 μl 终止反应。在酶联仪上读取 A_{492} 值, 只有测试样品的 A_{492} 是转染 pSMART2a/LacZ 细胞的 2 倍才为阳性, 判断抗血清滴度。

1.6　免疫小鼠体内特异细胞毒 T 淋巴细胞的检测

从免疫小鼠中取出脾细胞, 制备单细胞悬液, 将细胞接种于 24 孔板中, 10^7 个细胞/孔。培养基中加 10 μmol/L LPYLG-WLVF 肽和 10 U/ml 的重组 IL-2 体外刺激 5 d。第 5 天, 这些细胞就可以作为效应细胞用于 CTL 分析。做杀伤实验时, 在 96 孔板中接入 5 000 个细胞/孔。靶细胞为 P815 细胞。37 ℃, 1.5 h, 用 ^{51}Cr 标记后, 洗涤细胞 3 次, 即可作为靶细胞用于 CTL 分析。效应细胞和靶细胞按一定的比例混合培养 4 h, 取上清用于检测 γ-射线强度。杀伤率的计算:(实验释放－自然释放)/(最大释放－自然释放)×100%。

1.7　疫苗对小鼠移植瘤成瘤和生长影响的观察

为了评价重组质粒的肿瘤保护性作用, pCI-neo/P1A、pSMART2a/P1A、pSMART2a/LacZ 和生理盐水分别注射小鼠各 3 次, 间隔 10 d。最后 1 次注射 10 d 后, 小鼠右侧腹部皮下接种 2 × 10^6 P815 细胞, 60 d 内观察肿瘤的消长情况。为了评价重组质粒的免疫治疗性作用, 1× 10^5 P815 细胞重悬在灭菌 PBS 中, 于小鼠右腹侧皮下注射。第 5 天, 这些小鼠用 pCI-neo/P1A、pSMART2a/P1A、pSMART2a/LacZ 和生理盐水分别接种。记录荷瘤小鼠的生存情况。

2　结果

2.1　重组质粒 pSMART2a/P1A 体外表达

重组质粒用脂质体转染 293 细胞 18 h 后, 用 1× SDS-PAGE 上样缓冲液裂解细胞, 95 ℃中加热 5 min。超声处理后进行 SDS-PAGE 电泳以及随后的蛋白印迹, 见图 1。重组质粒中的 P1A 基因编码区全长 751 bp, 编码 225 个氨基酸, 所表达蛋白质的分子量为 24.75× 10^3。由于表达出来的蛋白是一个融合蛋白, 一部分为目的基因 P1A 片段所编码蛋白, 另一段为质粒载体 pSMART2a 上的 Capsid(30× 10^3)和 tag(3× 10^3)部分。由于 Capsid 部分在这种融合蛋白合成后自动裂解掉, 所以最终形成的目的蛋白产物只有目的蛋白和 tag 部分, 总分子量为 27.75× 10^3。从图中可以看出, 表达产物的表观分子量和理论值一致; 转染 pSMART2a/LacZ 质粒的 293 细胞没有表达任何 P1A 蛋白; 而磷酸钙法和脂质体法转染 pSMART2a/P1A 质粒后, 18 h 后均明显表达目的蛋白 P1A。



The antibody was mAb raised against P1A and the titre was 1∶1 000. 1: 293 cells transformed with pSMART2a/LacZ plasmids; 2: Cells transformed with pSMART2a/P1A plasmids by calcium phosphate; 3: Cells transformed with plasmids pSMART2a/P1A by DOTAP. All lanes were sampled 30 μg/30 μl

图 1　转染 293 细胞裂解物的 Western-blot 结果

Fig 1　Western blot of lysate of transformed 293 cells

2.2　CTL 和抗体的检测

标准 4 h ^{51}Cr 释放实验显示, pCI-neo/P1A 质粒注射即可激发较好的特异 CTLs 杀伤活性, 而 pSMART2a/P1A 则可激发更高的特异 CTLs 的杀伤活性。对照组为只注射 pSMART2a/LacZ 和生理盐水, 未见任何特异杀伤活性, 见图 2。通过细胞 ELISA 方法在所有免疫小鼠血清中均检测不到任何 P1A 特异抗体。

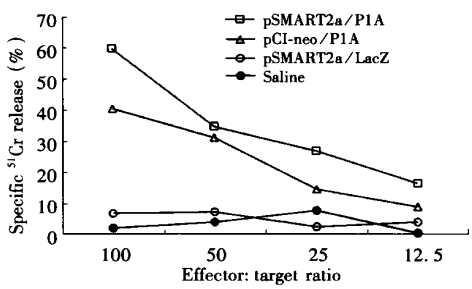


图 2　小鼠脾细胞 P1A 特异性 CTLs 杀伤活性

Fig 2　P1A specific lytic activity of CTL from mice spleen

2.3　移植瘤实验结果

在成瘤率实验中, 接种 2× 10^6 个 P815 细胞后, pSMART2a/P1A 组在观察期限内有 80% 小鼠没有长出肿瘤; 而 PCI-neo/P1A 组只有 40% 小鼠没有触诊到肿瘤; 对照组在观察期限内仍有 10% 的小鼠完全正常, 见图 3。在生存期实验中, 接种 P815 肿瘤细胞后第 5 天注射各种质粒。pSMART2a/P1A 组在 40 d 后即可见稳定生存, 第 60 天仍有 40% 的小鼠存活。pCI-neo/P1A 组也有治疗性作用, 但效果较 pSMART2a/P1A 组差, 在第 60 天时只有 20% 的存活率。两个对照组在第 40 天到观察期只有 10% 小鼠稳定存活, 这可能反映了小鼠的个体差异, 见图 4。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

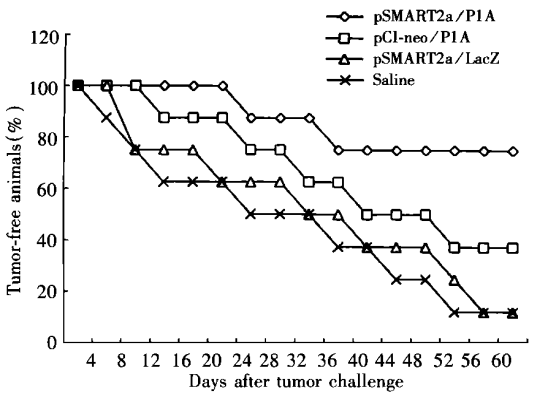


图 3 免疫小鼠的成瘤率

Fig 3 Rate of tumor incidence in immunized mice

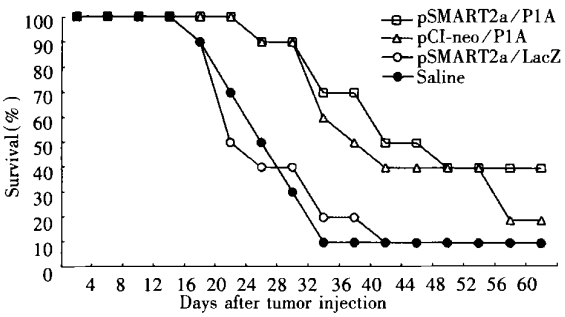


图 4 基因疫苗对小鼠生存期的作用

Fig 4 Effect of gene vaccines on the survival of immunized mice

3 讨论

P1A 基因可在肥大细胞瘤 P815、浆细胞瘤 J558、纤维肉瘤 Meth A 等多种小鼠肿瘤中表达，而在正常组织中仅出现于睾丸、胎盘；在后两者中，P1A 基因仅出现于无 MHC-I 类分子表达的精原细胞和滋养层细胞，因而不会被相应 CTL 所识别[7]。因此，P1A 成为一种设计和研究各种肿瘤疫苗方案的理想模型。

除了特异抗原靶标之外，强力有效的免疫策略对一些疾病如感染性疾病和肿瘤等也是迫切需要的。DNA 疫苗相对于传统的免疫策略有着强大的优势[1,2]。DNA 疫苗接种后，将直接转染体细胞和专职 APCs，并可通过交叉激活途径激活 CTLs[8]。DNA 疫苗本身也是一个非常强的 Th1 型佐剂，这可能是因为细菌质粒含有 CpG 基元的作用[9]。但 DNA 疫苗在人体实验中的效果远不如小动物模型中的那样好，其原因可能是：①质粒中的免疫刺激序列对人类没有太大的作用；②常规使用的真核表达质粒在体内的表达效率不够高。对于前一种原因，我们可以通过寻找对人体有良好刺激作用的序列及去除对人体免疫反应有抑制作用的载体序列，完全可以设计出具有良好佐剂效应的质粒载体，但这需要极大的工作量，短时间内难以取得突破。对于第二种原因，可以通过提高抗原基因的表达水平来加以克服。

随着分子生物学的研究进展，研究显示 α-病毒复制酶可以大大提高其下游基因的表达水平。α-病毒包括许多种病毒，我们所利用的是塞姆利基森林病毒(Semliki Forest virus，SFV)，它是 RNA 病毒，含有催化从 RNA 到 RNA 复制的复制酶(Replicase)。这种复制过程是在宿主细胞的胞质中进行的，效率极高，所以随后的蛋白质的表达量也会得到极大的提高。研究显示，其表达量可以达到宿主细胞总蛋白的 20% 以上。并且，由于其高水平的复制和翻译，占用了大部分宿主细胞的资源，最后宿主细胞会走向凋亡，从而进一步激发机体的免疫应答。而常规使用质粒，如 pCI-neo，由于没有 α-病毒复制酶的特性，所以其表达量远远不及基于 α-病毒复制酶的质粒。如果用它们来免疫动物，则免疫效果显然会不一样。本实验的结果也证实了，pSMART2a/P1A 的刺激特异 CTL 应答能力和对肿瘤的防治作用都高于 pCI-neo/P1A。虽然有些基因疫苗可以产生较高的体液免疫应答[10]，但本实验的两种重组质粒却没有产生任何抗原特异抗体。其中机制尚不太清楚，但无论如何，这对肿瘤免疫来说没有多大影响，因为肿瘤免疫主要作用机制是细胞免疫。

肿瘤治疗目前尚无完美的治疗措施，本研究显示通过提高目的基因表达的方法可以提高相应的免疫学应答，这为临床治疗肿瘤的措施提供了新的思路。

参考文献：

[1] Leitner W W, Ying H, Restifo N P. DNA and RNA－based vaccines: principles progress and prospects[J]. Vaccines, 1999, 18(9－10): 765－777.

[2] Gurunathan S, Klinman D M, Seder R A. DNA vaccines: Immunology, application and optimization[J]. Annu Rev Immunol, 2000, 18(5): 927－974.

[3] Schlesinger S. Alphavirus vectors: development and potential therapeutic applications[J]. Expert Opin Biol Ther, 2001, 1(2): 177－191.

[4] Smerdou C, Liljestrom P. Non-viral amplification systems for gene transfer: vectors based on alphaviruses[J]. Curr Opin Mol Ther, 1999, 1(2): 244－251.

[5] Polo J M, Gardner J P, Ji Y, *et al*. Alphavirus DNA and particle replicons for vaccines and gene therapy[J]. Dev Biol(Basel), 2000, 104(3): 181－185.

[6] 倪 兵，吴玉章，唐 艳 等. 小鼠肥大细胞瘤 P815 特异抗原 P1A 的克隆和表达[J]. 第三军医大学学报，2000，22(10)：949－951.

[7] 倪 兵，吴玉章，李艳秋，等. 基于α-病毒复制酶的高效小鼠 P815 肿瘤疫苗的构建和表达[J]. 免疫学杂志，2002，18(3)：121－124.

[8] 赵建平. 基于小鼠肥大细胞瘤 P815 模型的肿瘤免疫学研究进展[J]. 免疫学杂志，2001，17(13)(增刊)：63－65.

[9] Gurunathan S, Wu C Y, Freidag B L, *et al*. DNA vaccines: a key for inducing long－term cellular immunity[J]. Curr Opin Immunol, 2000, 12(4): 442－447.

[10] Krieg A M, Davis H L. Enhancing vaccines with immune stimulatory CpG DNA[J]. Curr Opin Mol Ther, 2001, 3(1): 15－24.

(编辑 陈聪连)

?1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net