DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.10.003
第24卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 10
2002年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2002

文章编号:1000-5404(2002)10-1133-04

论著

人肿瘤特异抗原 MAGE-3 基因疫苗的构建和表达

倪 兵,李燕秋,王 莉,唐 艳,周 伟,吴玉章 (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 克隆肿瘤特异性共享抗原 mage-3 基因,制备基于α-病毒复制酶的高效黑色素瘤特异性基因疫苗。方法 用 RT-PCR 方法从黑色素瘤细胞系 LB373 中制备 mage-3 基因,以含α-病毒复制酶的哺乳细胞高效表达质粒 pSMART2a 为载体,构建重组 DNA 疫苗。重组子用载体中的 T7 和 T3 启动子序列为测序引物进行自动测序。再将鉴定过的重组质粒用脂质体法转化 293 细胞,用免疫印迹法和免疫组化法鉴定转化细胞中 mage-3 蛋白的表达。结果 正确构建了 mage-3/pSMART2a 重组质粒,并且在转化此质粒的 293 细胞中检测出了 mage-3 蛋白的表达。结论 此重组 mage-3/pSMART2a 质粒可以作为肿瘤特异的 DNA 疫苗,可进行下一步的肿瘤动物模型的疫苗接种及相关免疫学效应研究。

关键词:mage-3;RT-PCR;克隆
中图法分类号:R392.11;R394.2;R730.262 文献标识码:A

Construction of a human melanoma gene contained vaccine based on alphavirus vector and expression of the gene

NI-Bing, LI Yan-qiu, WANG-Li, TANG-Yan, ZHOU Wei, WU Yu-zhang (Institute of Immunology of PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To clone MAGE-3 gene from melanoma cell strain LB373 to mammalian expressing vector containing alpha-virus replicase for preparing tumor-specific DNA vaccine. Methods Recombinant DNA vaccine was constructed by ligating RT-PCR prepared MAGE-3 gene to the α-virus replicase contained vector pSMART2a which could be expressed in mammal cells with high efficiency. The recombinant was sequenced on automatic sequencer with the sequences of T7 and T3 promoters as primers which were in upstream and downstream of multiple cloning site (MCS) respectively. The expression of MAGE—3 in 293 cells transformed with the recombinant by liposome was detected with Western blotting and immunohistochemistry. Results The recombinant plasmid MAGE-3/pSMART2a was constructed correctly and the expression of MAGE-3 gene in the transformed 293 cells was observed. Conclusion The results indicate tumor vaccine containing MAGE-3/pSMART2a is constructed successfully, which can be used for further study on the immune effect of the tumor vaccine *in vivo*.

Key words: MAGE-3; RT-PCR; cloning

人黑色素瘤 Mage 家族就是一类 CT(Cancer-Testis Antigens)抗原家族,它们广泛分布于各种肿瘤细胞中,而在正常组织中除了封闭性的组织如睾丸和卵巢等之外没有表达,因而,它们是一类理想的可用于基因免疫治疗的肿瘤抗原。

最近几年 DNA 疫苗的发展取得了很大的发展,其中不乏肿瘤 DNA 瘤苗,这些疫苗在一些动物模型中取得了令人鼓舞的结果[1~4]。在基因载体研究方面,也出现了将α-病毒复制酶引入载体的研究,并借助于此酶的高效 RNA 复制活性,在基因治疗领域取得了很大进展[5,6]。因此,本研究拟以含有α-病毒复制酶的哺乳细胞高效表达质粒 pSMART2a 为载体,用 RT-PCR 法从人黑色素瘤 LB373 细胞株中制备 mage-3 基因,再构建 mage-3/pSMART2a 重组质粒,以制备含 CTL 表位的肿瘤 DNA 疫苗。期望利用 DNA 疫苗所表达的质粒主要通过 MHC-I 类途径呈递的特性,在相应的动物模型中取得较好的疗效,并能在共享该抗原的其它肿瘤组织中发挥防治作用。

1 材料与方法

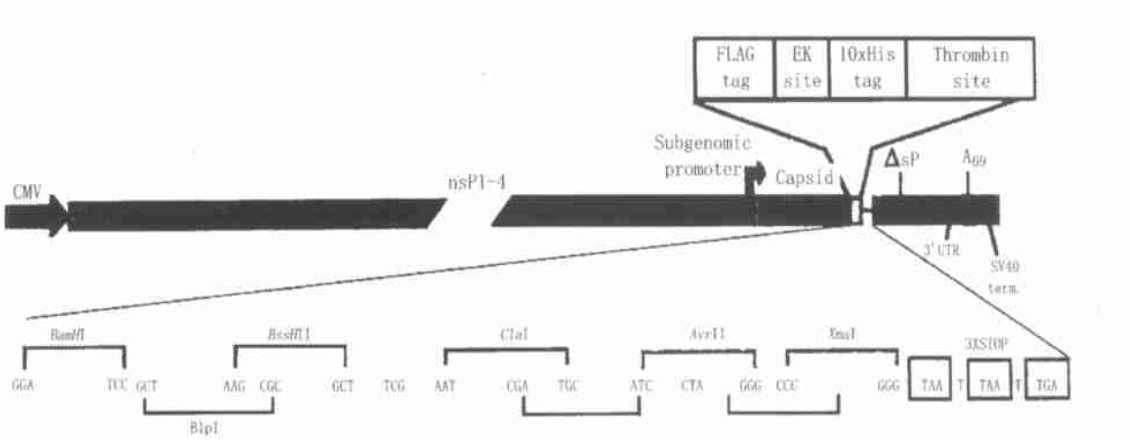
1.1 实验材料

1.1.1 质粒、菌种和细胞株 pSMART2a 为我室与合作单位—加拿大多伦多大学细胞生物学教研室联合制作,见图 1。LB373 细胞为 HLA-A2 限制型的人黑色素瘤细胞系,购于 ATCC。293 细胞购于上海细胞所。Mage-3 单克隆抗体 M3-mAb 由比利时 LUDWIG 癌症研究所 Van de Pel 博士赠送,效价 1∶500。

1.1.2 试剂及耗材 Tripure、High Pure Plasmid Isolation Kit、蛋白酶抑制剂-Complete Mini 和阳性脂质-DOTAP 等均购于 Roche 公司;AMV、核酸内切酶、连接酶、RNA 抑制剂及 oligo(dT)15 购于 Promega 公司;Taq 酶购于 PE 公司;dNTP 和引物购于上海生物工程有限公司,重组质粒测序也由其完成;ECL 和组化分析试剂盒均购于 Roche 公司。

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 DNA 疫苗方面的研究,发表论文 10 篇。电话:(023)68752236,E-mail:nibingxi@yahoo.com
通信作者:吴玉章,电话:(023)68752680
收稿日期:2002-03-16;修回日期:2002-04-18

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



As indicated above, the enhancer/promoter of CMV can immediately drive the transcription. The SFV replicase (nsP1-4) amplifies replicon RNA, and uses the subgenomic promoter to generate RNA for the Capsid-Tags-Target fusion protein. The capsid sequence acts as a translational enhancer, and the encoded protein will be removed by autoproteolysis. The tags are the Flag epitope and 10 histidine residues. △sP: Remaining portion of structural protein gene; 3' UTR: 3' nontranslated region of sP transcript; A60: Viral polyA tail; SV40 term: Polyadenylation and transcriptional termination signal from SV40 virus

图 1 真核高表达质粒载体 **pSMART2a** 图谱

Fig 1 Schematic diagram of the mammalian high-expressing plasmid pSMART2a

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 LB373 和 293 细胞均采用 RPMI1640 加 10%热灭活小牛血清完全培养基, 于 37 ℃、5% CO_2 孵育箱内常规培养。

1.2.2 RT-PCR P815 细胞总 RNA 的提取按 Tripure 试剂盒说明书进行。RT-PCR 按常规方法进行, 采用热启动技术。PCR 引物根据载体 pSMART2a 和 mage-3 基因序列用 DNAStar 序列分析软件进行设计。上游引物为: 5′-cgggatccaccctttgtgcc atg tct-gataac-3′; 下游引物为: 5′-ccatcgattggctaaggtgagaagccatcc-3′。上述黑体带下划线部分序列分别为 *BamH* Ⅰ 和 *Cla* Ⅰ 的酶切位点。此两位点与 pSMART2a 上的相应多克隆位点相吻合。PCR 条件: 95 ℃变性 5 min; (94 ℃, 1 min; 50 ℃, 2 min; 72 ℃, 1 min)× 35 循环; 72 ℃, 10 min。产物于 1.5%琼脂糖凝胶上电泳鉴定纯度和分子量的大小。

1.2.3 PCR 产物在 pSMART2a 上的定向克隆 酚/氯仿抽提 PCR 产物, 乙醇沉淀, TE 溶解备用。提取质粒载体, 然后用 *BamH* Ⅰ 和 *Cla* Ⅰ 对质粒和纯化后的 PCR 产物分别进行双酶切。载体酶切后, 凝胶电泳法回收。再次分别纯化 PCR 酶切产物和载体的胶回收产物, TE 溶解备用。紫外分光光度计上定量载体和 PCR 两种双酶切产物量。然后, 按 1∶1(mage-3: pSMART2a)的摩尔比混合, 并于 16 ℃反应 12 h。置 70 ℃, 10 min 以终止反应。将连接产物转化感受态 DH-5α, 氨苄平板筛选。取阳性单克隆进行扩增, 抽提重组 mage-3/pSMART2a 质粒备用。

1.2.4 重组质粒的鉴定 ①酶切电泳鉴定: 重组质粒 *BamH* Ⅰ/*Cla* Ⅰ 双酶切, 然后在 1%琼脂糖凝胶上电泳鉴定目的片段是否插入。②插入片段及其两侧序列的测序鉴定: 双向测序, 上游测序引物为 T7 启动子序列, 下游测序引物为 T3 启动子序列。抽提的重组质粒寄送上海生工公司测序。

1.2.5 重组质粒转染 293 细胞 本实验采用阳性脂质-DOTAP 法转染 293 细胞。在 6 cm 平板中接种细胞, 细胞数量应以第 2 天产生 40%~60%满底为准。第 2 天, 按 DOTAP 使用说明书进行质粒转化, 细胞置培养箱中培养 24 h。

1.2.6 转染重组质粒的 293 细胞中 mage-3 基因的蛋白表达鉴定 ①Western-blot 法鉴定转染细胞中目的基因的表达: DOTAP 法转染后, 293 细胞生长良好。转染后 24 h, PBS 洗涤细胞。向培养瓶中加入 200 μl SDS-PAGE 上样缓冲液和 20 μl 完全蛋白酶抑制剂-Complete Mini, 轻轻吹打下细胞, 收于 0.5 ml EP 管中, 置沸水浴中加热 10 min, 在用超声处理 2 次。4 ℃, 12 000 r/min 离心 10 min。取上清于 12% SDS-PAGE 凝胶电泳。电印迹于硝纤膜上, 4℃封闭过夜。次日按试剂盒说明书进行抗原抗体反应和发光实验, 最后于暗盒中对 X 片曝光 10 s, 并进行后续处理。②免疫组化法鉴定转染细胞中目的基因的表达及定位情况: 盖玻片上生长的已转染 24 h 的 293 细胞, PBS 洗涤 2 次, -20 ℃甲醇固定 1 min。PBS 洗涤 2 次后, 加一抗(1∶500) 2.5 μg/ml, 室温 1 h。PBS 洗涤 3 次, 加生物素标记二抗, 作用 1 h, 洗涤, 加辣根过氧化物酶标记的三抗, 作用 10 h。洗涤, DAB 显色, 照相。

2 结果

2.1 RT-PCR 结果

Tripure 试剂盒抽提的总 RNA 紫外分光测定 A_{260}/A_{280} 为 2.01, RNA 纯度高。RNA 浓度为 0.45 μg/ml。RT-PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 可见清楚的 1 159 bp 的 mage-3 条带和对照的β-actin 条带。mage-3 条带的大小与 Genebank 中检索的理论值完全一样, 见图 2。

2.2 定向克隆结果

2.2.1 重组质粒筛选鉴定及重组质粒酶切鉴定结果 由于质粒及 mage-3 PCR 产物消化很彻底, 且克隆所使用的内切酶为两个不同的酶, 所以最后在氨苄平板上可见分布均匀、形态大

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

小均一的十余个阳性单克隆细菌; 而对照平板上未见任何菌落生长。挑取阳性单克隆菌落, 扩增后用 High Pure 质粒提取试剂盒提取质粒, 用 *BamH* Ⅰ 和 *Cla* Ⅰ 双酶切, 酶切产物的琼脂糖凝胶电泳显示质粒已完全切开, 为两条带。载体部分与 pSMART2a 的 *BamH* Ⅰ 酶切物位置一致; 插入片段条带与 mage-3 PCR 产物的位置一致。空载体为相应的对照。从结果可以看出, 克隆已基本成功, 见图 3。

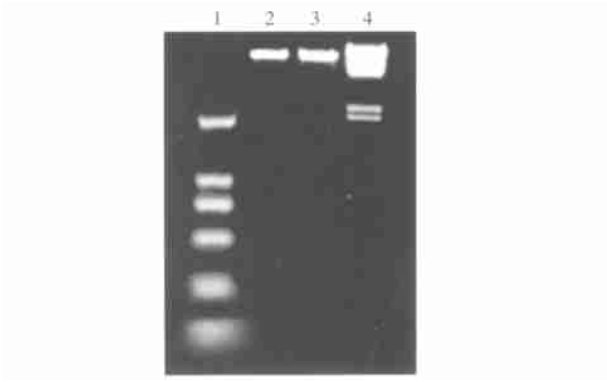
2.2.2　重组质粒测序结果　　重组质粒提取后寄送生工公司测序, 采用克隆位点上游的 T7 启动子序列及下游的 T3 启动子序列作为测序引物进行双向测序, 测序结果与理论值完全一致。



1: DL2000 PCR markers; 2: PCR product of MAGE-3 (1 159 bp); 3: β-actin (300 bp)

图 2　PCR 产物的 1% 琼脂糖凝胶的电泳结果

Fig 2　Electrophoresis of PCR product on 1% agarose gel



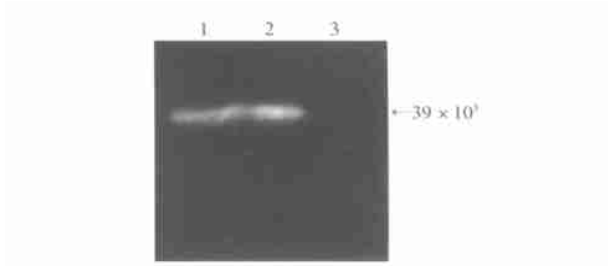
1: DL2000PCR markers; 2: *BamH* Ⅰ /*Cla* Ⅰ double digested product of recombinant plasmid (12 486 bp and 1 159 bp); 3: *BamH* Ⅰ digested product of pSMART2a; 4: DNA ladder (Lambda DNA/*Hind* Ⅲ)

图 3　重组质粒的 ***BamH*** Ⅰ /***Cla*** Ⅰ 双酶切产物在 1% 琼脂糖凝胶上的电泳结果

Fig 3　Eletrophoresis of *BamH*Ⅰ /*Cla*Ⅰ double digested product of recombinant plasmid on 1% agarose gel

2.3　转染后的 293 细胞 mage-3 表达鉴定

2.3.1　免疫印迹法鉴定转化细胞中蛋白的表达　　增强化学发光法 Western-blot 结果, 见图 4 显示, 所表达的目的蛋白条带的位置在 39×10^3 左右。由于此蛋白是一个融合蛋白, 一部分为目的基因片段所编码蛋白(mage-3, 36×10^3), 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 39×10^3。从图中可以看出, 转染 LacZ/pSMART2a 质粒的 293 细胞没有表达任何 mage-3 蛋白; 而磷酸钙法和脂质体法转染 mage-3/pSMART2a 质粒 24 h 后, 均明显表达目的蛋白 mage-3。而且, 所表达的目的蛋白的分子量大小和理论值一致, 都为 39×10^3 左右。



1: 293 cells transformed with plasmid LacZ/pSMART2a; 2: 293 cells transformed with plasmid MAGE-3/pSMART2a by calcium phosphate; 3: 293 cells transformed with plasmid MAGE-3/pSMART2a by DOTAP. All lanes were sampled at 30 μg/30 μl

图 4　转染重组质粒的 **293** 细胞裂解产物的 **Western-blot** 结果, 抗体为 **mage-3** 蛋白单克隆抗体 **M3-mAb**, 滴度 **1∶500**

Fig 4　Western blot of the lysate from transformed 293 cells with M3-mAb as antibody at a titer of 1∶500

2.3.2　免疫组化分析转染细胞中 mage-3 蛋白的表达　　DOTAP 法转染的 293 细胞的部分细胞表达 mage-3 蛋白, 并位于胞质中。



图 5　转染细胞的 **mage-3** 免疫组化结果　(ABC× 400)

Fig 5　Immunohistochemical staining of MAGE-3 in transformed 293 cells with M3-mAb at titer of 1∶500 as antibody (ABC× 400)

3　讨论

肿瘤的免疫治疗的关键是发现并利用肿瘤特异的抗原。近年来, 随着肿瘤抗原鉴定方法学的进展, 越来越多的肿瘤抗原在分子水平得以鉴定, 它们主要包括: ①肿瘤特异性共享抗原 (Tumor-specific shared antigens), 即一类可在多种肿瘤组织表达, 而在正常组织

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

(除睾丸、胎盘外)几乎不表达的肿瘤抗原,故有研究者又称之为 CT 抗原,如MAGE、GAGE 和 BAGE 家族等;②分化抗原;③突变抗原;④过表达抗原;⑤病毒抗原等。其中,CT 抗原由于在多种肿瘤组织中分布,更有希望发展出适用范围较广的肿瘤疫苗,因而备受关注。mage-3 是 MAGE 家族的一个典型代表,它在肺癌中总表达率达到 46%,在肺鳞状上皮细胞癌的表达率更达到90%。另外,其在黑色素瘤、肝细胞癌、食道癌和骨肉瘤中都有非常高的表达[7]。由于 mage-3 在除睾丸和卵巢之外的正常细胞中不表达,而这些组织不表达 MHC-I 类抗原,因此,mage-3 是一个理想的肿瘤疫苗,它将可以杀伤多种肿瘤细胞,而对正常组织却无影响。mage-3 作为一个理想的肿瘤疫苗靶抗原,已经得到大量的研究。目前研究主要集中在利用 mage-3 的表位肽、全蛋白和基于树突状细胞(Dendritic cells, DCs)的疫苗设计而尚未利用基因疫苗来进行研究[8,9]。

基因疫苗相对于传统的免疫策略有着许多优点[10,11]:① 易操作性和稳定性;② 在体内持续表达,持续刺激免疫系统;③除了产生强有力 T 细胞免疫之外,体液免疫功能也较强,并且是抗原特异的中和抗体;④ 可方便地制备出多价 DNA 疫苗;⑤ DNA 疫苗在机体内所表达的蛋白将以天然蛋白形式出现;⑥当在质粒中整合入 CKs(cytokines)或共刺激分子基因,或与编码这一成分的质粒共注射时,将能加强随后机体对编码抗原的反应,或可调节正在起作用的免疫反应。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,产生细胞免疫应答。虽然 DNA 疫苗有许多优点,但其在人体实验中的效果远不如动物模型中的那样好,其原因可能有:①质粒中的免疫刺激序列对人类没有太大的作用。②质粒在机体内的表达量不够高,不能刺激更强的免疫应答。已有实验证实,基因疫苗所激发的免疫应答是剂量依赖型的,所以,对于基因疫苗效果不太好的第 2 个原因,但可以通过改进常规载体,提高外源基因的表达来提高免疫刺激。如本研究所应用的载体,由于有了强有力的α-病毒复制酶的作用,其在体外细胞中的表达量是常规载体的 20~30 倍以上。如用于免疫动物,则所需量仅为常规质粒的 1/1000,即只需 10 ng 的这种质粒即可产生强烈的免疫应答[12]。结合 mage-3 是个良好的肿瘤疫苗靶标和α-病毒载体的高效表达特性,如用其作为基因疫苗很可能取得良好的免疫效果。

参考文献:

[1] Singh G, Parker S, Hobart P. The development of a bicistronic plasmid DNA vaccine for B-cell lymphoma[J]. Vaccine, 2002, 20(9-10): 1 400-1 411.

[2] Ada G. Vaccines and vaccination[J]. N Engl J Med, 2001, 345(14): 1 042-1 053.

[3] Cohen E P. DNA-based vaccines for the treatment of cancer-an experimental model[J]. Trends Mol Med, 2001, 7(4): 175-179.

[4] Wlazlo A P, Ertl H C. DNA tumor vaccines[J]. Arch Immunol Ther Exp, 2001, 49(1): 1-11.

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

[6] 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.

[7] 贾正才, 吴玉章. MAGE 家族研究进展[J]. 国外医学肿瘤学分册, 2000, 27(增刊): 42-45.

[8] Banchereau J, Palucka A K, Dhodapkar M, *et al*. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine[J]. Cancer Res, 2001, 61(17): 6 451-6 458.

[9] Coulie P G, Karanikas V, Colau D, *et al*. A monoclonal cytolytic T-lymphocyte response observed in a melanoma patient vaccinated with a tumor-specific antigenic peptide encoded by gene MAGE-3[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(18): 10 290-10 295.

[10] Leitner W W, Ying H, Restifo N P. DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects[J]. Vaccines, 2000, 18(9-10): 765-777.

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

[12] Hariharan M J, Driver D A, Townsend K, *et al*. DNA immunization against herpes simplex virus: enhance efficacy using Sindbis virus-based vector[J]. J Virol, 1998, 72(2): 950-958.

(编辑 王 红)

(上接 1132 页)

或宫缩剧烈者应考虑软产道损伤中的宫颈裂伤,尽早采取措施解痉镇静,调整宫缩,以防破裂发生。③合理应用催产素。催产素主要是加强子宫收缩,使用时应专人守护,根据宫缩调整滴速和剂量,最好不用肌肉注射给药。使用时如有不协调较强烈宫缩者,胎儿娩出后应严格进行阴道检查。

关键词:利凡诺引产

中图法分类号:R979.22 文献标识码:B

参考文献:

[1] 梁月华, 李玉萍. 三种药物用于终止妊娠 10~14 周妊娠的比较[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 1999, 15(2): 119-120.

[2] 乐 杰. 妇产科学[M]. 第 4 版, 北京: 人民卫生出版社, 1996. 6-7.

[3] 赵菊芬. 中晚期妊娠产后发生无症状子宫颈后唇裂伤 4 例分析[J]. 中华妇产科杂志, 2000, 35(7): 433.

(编辑 王 红)

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