DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.10.004
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)10-1137-03

论著

HER2/neu诱导DBA/2小鼠特异性CTL应答及其抑瘤效应研究

方 路,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 探讨HER2/neu原癌基因DNA疫苗免疫诱导特异性细胞免疫应答及其在体内的抑瘤效应。方法 将重组HER2/neu原癌基因真核表达载体转染P815细胞,用细胞组织化学及Western-blot方法鉴定质粒在细胞中的表达。在DBA/2小鼠体内构建表达HER2抗原的肿瘤动物模型,通过重组质粒免疫小鼠,诱导小鼠产生细胞免疫应答,观察免疫动物体内的抗瘤效应。结果 在体外获得了稳定表达HER2/neu基因的P815细胞;免疫小鼠脾细胞中诱导出特异性CTL,并杀伤HER2/neu阳性的P815细胞;荷瘤小鼠的肿瘤生长受抑,存活期延长。结论 HER2/neu原癌基因DNA疫苗免疫可诱导特异性细胞免疫应答,并具有一定抗瘤效应。

关键词:HER2/neu;疫苗;细胞免疫;抗瘤效应
中图法分类号:R392.2;R394.2;R730.51 文献标识码:A

Induction of specific CTLs and anti-tumor effect in DBA/2 mice by HER2/neu genetic immunization

FANG Lu, WU Yu-zhang (Institute of Immunology of PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the cellular immune response and the anti-tumor effects induced by intramuscular DNA immunization with HER2/neu gene. **Methods** HER2/neu oncogene vector was transfected into P815 cells, and the expression of the gene DNA was identified with immunocytochemistry and Western blotting. The cellular immune response and anti-tumor effects of the transfectants were analyzed by examinating the expression of HER2 in DBA/2 mice after intramuscular DNA immunization. **Results** P815 cells were observed to express HER2/neu oncogene *in vitro*. HER2/neu specific CTLs were induced in immunized DBA/2 mice, which showed specifically killing effects on HER2/neu positive P815 cells. Tumor growth was inhibited and the survival of mice was prolonged. **Conclusion** Specific cellular immune response and anti-tumor effect are elicited by HER2/neu gene immunization.

Key words: HER2/neu; vaccine; cellular immunity; anti-tumor effect

肿瘤特异性的免疫学治疗正日益受到人们的重视[1],其中基因疫苗又称DNA疫苗,它是由编码某一抗原蛋白的基因片段和载体构建而成,将其导入动物组织细胞,质粒DNA能在体内被细胞摄取,并通过转录、翻译、表达出相应的抗原蛋白,其中含多个T细胞表位,通过激活T细胞,诱导机体产生特异性免疫应答,打破机体对肿瘤的免疫耐受[2],从而达到治疗和预防肿瘤的目的。

本研究正是基于DNA疫苗的这些特性,将人类原癌基因HER2克隆到真核表达载体pCMV上作为肿瘤特异的基因疫苗。人类原癌基因HER2/c-erbB-2与鼠的原癌基因c-neu是同源的,位于染色体17q21,编码185×10^3的跨膜糖蛋白(P185)[3]。$P185^{HER2}$是一种生长因子受体,有内源性酪氨酸激酶的活性,它在胎盘、胚胎上皮细胞及许多肿瘤细胞中高表达,而在正常组织中不表达或微量表达。因此它可作为肿瘤治疗的靶抗原,刺激免疫系统产生免疫应答。使宿主获得保护性抗肿瘤免疫。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 P815细胞为DBA/2小鼠来源的肥大细胞瘤,购于上海细胞所。采用含10%小牛血清的1640培养基,5%的CO_2,37℃培养。

1.1.2 实验动物 DBA/2小鼠(H-2L^d),雌性,6~8周龄,购自军事医学科学院实验动物中心。

1.1.3 质粒 Pcmv/erbB-2A为重组真核表达载体,其中插入了人HER2/neu基因突变体片段(K753→A753),它受CMV启动子驱动。本质粒由美国Karmanos Cancer Institute的Wei-Zen Wei博士惠赠。质粒pCI-neo(Promega公司)为阴性对照。

1.1.4 试剂 鼠抗人HER2/neu单抗购自博士德公司;$Na^{51}CrO_4$液购自美国同位素公司;DOTAP脂质体转染试剂盒购自德国Boehringer mannheim公司;DBA试剂盒、免疫组化染色S-P试剂盒、Western-blot试剂盒购自Roche公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒Pcmv/erbB-2A、pCI-neo转染P815细胞及筛选阳性克隆 脂质体法转染细胞:无菌EP管中,3μg质粒pCMV/erbB-2A(2.3μl)、3μg质粒pCI-neo(1.2μl)溶于21.5μl HBS;另一个无菌EP管15μl DOTAP与35μl HBS混匀;将两管混匀,室温放置15 min;在DOTAP/质粒混合液中加入2 ml新鲜培养基,混匀;置24孔板37℃孵育24 h;G418 600μg/ml反复筛选细胞。

将转染pCMV/erbB-2A和pCI-neo的P815培养细胞进行有

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:方 路(1967-),女,上海市人,硕士,主治医师,主要从事疫苗与免疫方面的研究,现在第三军医大学附属西南医院全军泌尿中心肾科工作。电话:(023)65306969
通信作者:吴玉章,电话:(023)68752680
收稿日期:2002-05-10;修回日期:2002-08-12

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

限稀释，至细胞浓度为 2.5 个/ml，以 200 μl/孔接种于 96 孔细胞培养板培养 7~10 d，挑取有单克隆细胞生长孔内的细胞至 25 cm^2 培养瓶中扩增培养，分别作免疫组化及 Western-blot 鉴定 erbB-2A 阳性的单克隆，扩增培养。

1.2.2 免疫细胞化学检测 P815 细胞 HER2/neu 的表达 将上述扩增培养的各组 P815/HER2 细胞分别作免疫细胞化学，在 25 cm^2 培养瓶中放置盖玻片，使细胞粘附其上生长 48 h，取出盖玻片 PBS 漂洗 3 次，5 min/次，4% 多聚甲醛固定 37 ℃ 30 min，PBS 漂洗 3 次，5 min/次，ReagentA 37 ℃ 30 min，加鼠抗人 HER2/neu 单抗（即用型），置湿盒 4 ℃ 20 min，PBS 漂洗 3 次，5 min/次，加生物素化二抗（兔抗鼠）置湿盒 37 ℃ 1 h，PBS 漂洗 3 次，5 min/次，HRP 37 ℃ 30 min，PBS 漂洗 3 次，5 min/次，DBA 底物 5 min，PBS 终止反应。空质粒 PCI-neo 转染 P815 细胞为阴性对照。

1.2.3 Western-bolt 检测 P815 细胞 HER2/neu 的表达 将转染 Pcmv/erbB-2A 阳性率最高的 P815 细胞胰酶消化后，PBS 漂洗 2 次，5 min/次，加细胞裂解液 100 μl，100 ℃煮 5 min，Western-blot 方法参考《分子克隆实验指南》，SDS 电泳后电转移至硝酸纤维素膜上，丽春红 S 染色 5 min，10% 封闭液封闭 4℃过夜，加鼠抗人 HER2/neu 单抗（浓缩型 1∶100）与 0.5% 的封闭液 4 ℃共孵育 1 h，TBST 缓冲液漂洗 3 次，10 min/次，加 POD 二抗孵育 30 min，TBST 漂洗 3 次，10 min/次，加入化学发光剂，放入暗盒压片，1~10 min 后显影、定影。空质粒 PCI-neo 转染 P815 细胞为阴性对照。

1.2.4 体内诱发特异性 CTL 的检测 DBA/2 小鼠 10 只，随机分为实验组、对照组，每组 5 只小鼠。每只小鼠胫前肌注射质粒 pCMV/erbB-2A（100 μg/次），每 2 周 1 次，共 3 次，最后一次免疫后 2 周，取脾细胞检测 CTL。

1.2.4.1 脾细胞制备 将免疫小鼠第 8 周处死取出脾脏，Hanks 液中洗涤，200 目无菌不锈钢网中压碎，Hanks 液吹打混匀，去除其中红细胞（1 ml 无菌水处理 30 s 低渗涨破，后立即用等体积的 1.8% NaCl 调至等渗），用无血清的 1640 培养液洗涤并与经 ^{60}Co 照射后的转染 pCMV/erbB-2A 的 P815 细胞共同培养 7 d，进行体外 CTL 诱导增殖。

1.2.4.2 靶细胞制备 将转染 pCMV/erbB-2A 的 P815 细胞调至 2×10^6/ml，取 1×10^6 靶细胞加 $Na^{51}CrO_4$ 溶液 100 μl 共育 1.5 h，无菌 PBS 清洗细胞 8 000 r/min 离心 5 min，收集细胞沉淀，同时设转染 pCI-neo 的 P815 细胞为对照靶细胞。

1.2.4.3 将脾细胞离心后调至 10^7/ml，将靶细胞调至 10^5/ml，脾细胞在 96 孔板（V 形底）分别以 100∶1、50∶1、25∶1 和 12.5∶1 的比例与（2）中制备的靶细胞相混合，同时设 2 mol/L HCl 孔以测定靶细胞的最大 ^{51}Cr 释放量，培养基孔以测定靶细胞的自释放量，300 r/min 离心 5 min，使效应细胞和靶细胞充分混合，37 ℃ 孵箱中孵育 4 h。

1.2.4.4 1 000 r/min 离心 5 min，各孔分别收集 100 μl 上清，r-记数器测定各孔上清的 CPM 值，各组数据分别取平均值。其中自释放值应小于最大释放值的 15%。据如下公式计算各组 ^{51}Cr 释放百分数，即特异性 CTL 杀伤效率。

$$\text{特异性 CTL 杀伤率}\% = \frac{\text{实验组释放值} - \text{自释放值}}{\text{最大释放值} - \text{自释放值}} \times 100\%$$

1.2.5 肿瘤生长抑制效应 20 只小鼠随机分为肿瘤治疗组、治疗对照组、肿瘤预防组、预防对照组，每组 5 只。

1.2.5.1 肿瘤治疗组 每只小鼠腹部皮下注射 1×10^4 转染质粒 pCMV/erbB-2A 的 P815 细胞，5 d 后胫前肌注射质粒 pCMV/erbB-2A（100 μg/次），每 2 周 1 次，共 3 次。

治疗对照组：每只小鼠腹部皮下注射 1×10^4 转染质粒 pCI-neo 的 P815 细胞，5 d 后胫前肌注射质粒 pCMV/erbB-2A（100 μg/次），每 2 周 1 次，共 3 次。

1.2.5.2 肿瘤预防组 每只小鼠胫前肌注射质粒 pCMV/erbB-2A（100 μg/次），每 2 周 1 次，共 3 次，第 8 周注射 2×10^5 转染质粒 pCMV/erbB-2A 的 P815 细胞。

预防对照组：每只小鼠胫前肌注射质粒 pCMV/erbB-2A（100 μg/次），每 2 周 1 次，共 3 次，第 8 周注射 2×10^5 转染质粒 pCI-neo 的 P815 细胞。

1.3 统计学处理

采用 SPSS10.0 对各组数据进行 t 检验。

2 结果

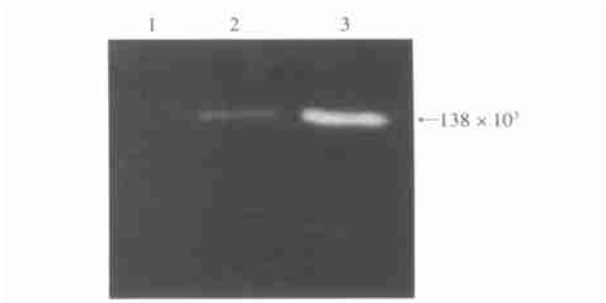
2.1 免疫细胞化学检测

质粒 pCMV/erbB-2A 转染 P815 细胞 48 h 后，P815 细胞的胞质和核周有棕褐色的阳性颗粒，说明在胞质中有 erbB-2A 的蛋白表达。

质粒 pCI-neo 转染 P815 细胞 48 h 后，P815 细胞的胞质为浅黄色，无棕褐色的阳性颗粒，说明细胞中无 erbB-2A 蛋白表达。

2.2 Western-blot 检测结果

转染 pCMV/erbB-2A 的 P815 细胞裂解后，经电泳、电转移至硝酸纤维素膜上进行杂交，图 1 可见 2、3 泳道有 138×10^3 的荧光条带，表明目的蛋白成功表达。



1: Transfected with pCI-neo; 2, 3: Transfected with pCMV/erbB-2A

图 1 质粒 pCMV/erbB-2A 转染的 P815 细胞 Western-blot 检测

Fig 1 Western blot of P815 cells transfected with plasmid pCMV/erbB-2A

2.3 质粒 DNA 诱导的特异性 CTL 效应

实验组效应细胞对靶细胞（转染 pCMV/erbB-2A 的 P815 细胞）的特异性 CTL 杀伤率在 100∶1、50∶1、25∶1、12.5∶1 的效/靶比例下，分别为 69%、55%、38%、22%；而对照组效应细胞对靶细胞（转染 pCI-neo 的 P815 细胞）的特异性 CTL 杀伤率在 100∶1、50∶1、25∶1、12.5∶1 的效/靶比例下，分别为 18%、16%、13%、8%，可见实验组小鼠体内诱发了特异性 CTL 应答，对照组小鼠体内未诱发出特异性 CTL 应答。二者差异有显著性意义（$P<0.01$），见图 2。

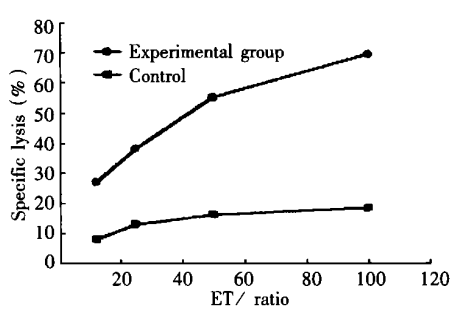


图 2 小鼠特异性 CTL 效应

Fig 2 ^{51}Cr release cytoxicity against HER2-expressing tumor cells in mice after intramuscular DNA immunization

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

2.4　肿瘤生长抑制效应

2.4.1　治疗肿瘤效果　　治疗组小鼠平均 7.4 d 可触及肿瘤结节, 30 d 肿瘤平均体积 856 mm^3, 小鼠平均生存 60.8 d。对照组小鼠平均 6.8 d 可触及肿瘤结节, 30 d 肿瘤平均体积 7 780 mm^3, 小鼠平均生存 33.4 d, 见图 3, 在第 10、20、30 天测量肿瘤体积, 治疗组肿瘤生长比对照组明显受抑, 二者差异有非常显著性意义($P<0.01$), 见图 3。

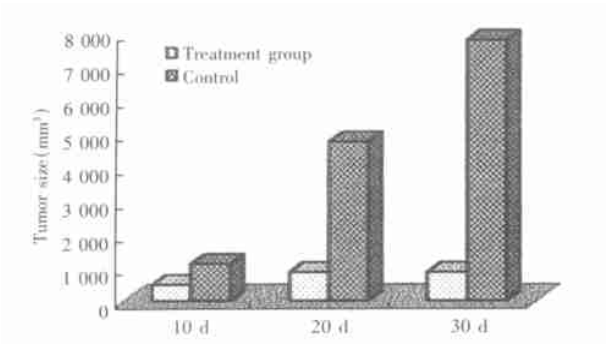


图 3　pCMV/erbB-2A 对荷瘤小鼠的治疗效果

Fig 3　Therapeutic efficiency of pCMV/erbB-2A on tumorous mice

2.4.2　预防肿瘤效果　　预防组小鼠成瘤潜伏期延长, 平均 10.6 d, 30 d 肿瘤平均体积 805 mm^3, 小鼠平均生存 63.2 d。对照组小鼠成瘤潜伏期平均 6.8 d, 30 d 肿瘤平均体积 7 520 mm^3, 小鼠平均生存 35 d, 见图 4。在第 15、20、30 天测量肿瘤体积, 预防组肿瘤生长比对照组明显受抑, 二者差异有非常显著性意义($P<0.01$), 见图 4。

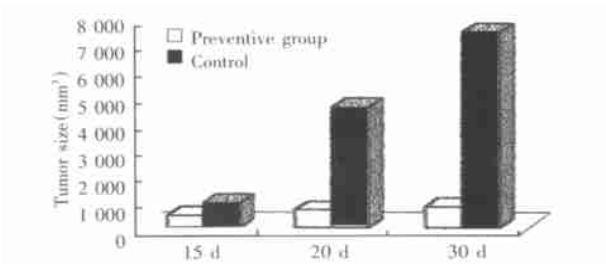


图 4　pCMV/erbB-2A 预防小鼠肿瘤生长的效果

Fig 4　Preventive effect of pCMV/erbB-2A on the tumor growth in mice

3　讨论

HER2/neu 基因是特异性较强的肿瘤相关抗原, 在乳腺癌的发生、发展、治疗和预后中起重要作用, 可作为肿瘤免疫治疗的靶子, 诱导机体产生有效的免疫应答。近年国外研究表明肽类疫苗免疫往往局限于某些表位并涉及到病人个体的单倍型的问题, 而蛋白类疫苗以诱导抗体免疫应答为主, 对肿瘤的治疗或预防意义有限, 基因疫苗则可以克服蛋白和肽类疫苗的这些缺陷, 因而有着广阔的前途。国外采用 HER2 单抗导向治疗乳腺癌已得到 FDA 批准上市。

本研究以 HER2 为靶抗原, 探讨主动特异性免疫治疗乳腺癌的可能性。野生型 erbB-2 是一个原癌基因, 基于安全性考虑, 本实验创新采用了其突变体 erbB-2A (K753→A753) 编码全长 DNA[4], 它既保留了抗原蛋白的绝大部分抗原表位, 同时又消除了酪氨酸激酶的活性, 降低了人或鼠来源的 erbB-2 的致瘤活性。用此重组突变体 pCMV/erbB-2A 来免疫动物, 使抗原编码基因能够在宿主体内得到表达, 打破机体免疫耐受, 诱导机体产生针对肿瘤细胞的特异性 CTL。

利用脂质体法将 pCMV/erbB-2A 转染至 P815 细胞, 通过有限稀释法挑选阳性细胞克隆, 运用免疫细胞化学和 Western-blot 方法鉴定 erbB-2A 在细胞中的表达, 并将转染该质粒的 P815 细胞注入小鼠体内, 建立动物肿瘤模型。通过 DNA 疫苗免疫小鼠, 实验结果显示: 治疗组的小鼠经 pCMV/erbB-2A 免疫后肿瘤生长较对照组明显减慢, 小鼠存活时间延长。预防组的小鼠经 pCMV/erbB-2A 免疫后较对照组成瘤潜伏期延长, 肿瘤生长明显减慢, 小鼠存活时间延长。同时小鼠呈现较为明显的特异性 CTL 杀伤效应, 而对照组则未呈现特异性 CTL 杀伤效应。由此可见, 在抗肿瘤的免疫应答中细胞免疫起着主要作用, 特别是 CTL, 它是抗肿瘤免疫的主要效应细胞[5]。当质粒 DNA 注射至小鼠肌肉后, 宿主肌细胞通过胞饮方式摄取外源性 DNA, 质粒编码的抗原基因在肌细胞内首先转录成 mRNA, 再翻译成抗原蛋白, 经加工处理后抗原分子与肌细胞表达的 MHC-Ⅰ类抗原形成复合物, 并将抗原递呈给 CD^{8+} 细胞, 诱导产生特异性 CTL[6,7], 杀伤表达此类抗原的肿瘤细胞。而且细菌质粒 DNA 本身含有 CpG 基序, 它可以调节 Th0 细胞向 Th1 方向极化, 从而更容易产生细胞免疫[8]。因此, HER2/neu 基因免疫小鼠后可以有效的在小鼠体内诱发特异性 CTL 应答, 而且对 HER2/neu 阳性的肿瘤细胞在体内生长有明显的抑制作用, 这为 HER2/neu 基因疫苗的研制提供了理论依据, 也为肿瘤免疫治疗提供了新的途径。

参考文献:

[1] Waalen J. DNA vaccines: The making of a revolution[K]. Ann Intern Med, 1997, 126(2): 136-138.

[2] Encke J, Putlitz J Z, Wands J R. DNA vaccines[J]. Intervirology, 1999, 42(2-3): 117-124.

[3] Graus-Porta D, Beerli R R, Daly J M, *et al*. ErbB-2, the perferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral sifnaling[J]. EMBO J, 1997, 16(7): 1 647-1 655.

[4] Wei W Z, Shi W P, Galy A, *et al*. Protection against mammary tumor growth by vaccination with full-length modified human ErbB-2 DNA[J]. Int J Cancer, 1999, 81(5): 748-754.

[5] Kawakami Y, Eliyahu S, Jennings C, *et al*. Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-in-filtrating T lymphocytes associated with *in vivo* tumor regression[J]. J Immunol, 1995, 154(8): 3 961-3 968.

[6] Wang R, Doolan D L, Charoenvit Y, *et al*. Simultaneous induction of multiple antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in nonhuman primates by immunization with a mixture of four plasmodium falciparum DNA plasmids[J]. Infet Immun, 1998, 66(6): 4 193-4 202.

[7] Hoffman S L, Doolan D L, Sendegah M, *et al*. Toward clinical trials of DNA vaccines against malaria[J]. Immunol Cell Biol, 1997, 75(4): 376-381.

[8] Chu R S, Targoni O S, Krieg A M, *et al*. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity[J]. J Exp Med, 1997, 186(10): 1 623-1 631.

（编辑　王　红）

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