DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.10.011
第22卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 10
946 2000年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)10-0946-03

噬菌体呈现颗粒疫苗诱导抗肿瘤细胞毒性T细胞反应

万 瑛,吴玉章,边 疆,赵建平,王祥智,周 伟,周丽芸,唐 燕,贾正才 (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 构建呈现肿瘤相关抗原P815A的噬菌体颗粒,在体诱导针对肥大细胞瘤P815的特异性细胞毒性T细胞(CTL)反应。方法 构建呈现CTL表位$P1A_{35\sim43}$的噬菌粒载体,大量制备呈现此表位的重组噬菌体颗粒,小剂量、无佐剂皮下免疫DBA/2小鼠($H\text{-}2^d$),采用^{51}Cr释放法、ELISPOT观察针对肥大细胞瘤P815的CTL反应。结果 重组噬菌体呈现颗粒疫苗在体诱导了针对弱抗原P815A的CTL反应。结论 丝状噬菌体呈现疫苗增强肿瘤相关抗原的免疫原性,是一种颇有潜力的抗肿瘤疫苗形式。

关键词:疫苗;肿瘤;细胞毒性T细胞;丝状噬菌体
中图法分类号:R392.7;R394 文献标识码:A

Induction of anti-tumor cytotoxic T lymphocytes response by a particulate vaccine

WAN Ying, WU Yu-zhang, BIAN Jiang, ZHAO Jian-ping, WANG Xiang-zhi, ZHOU Wei, ZHOU Li-yun, TANG Yan, JIA Zheng-cai (Insititute of Immunology PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective Genetically engineer hybrid filamentous phage particles containing mutant gVIII with the P815A epitope and induce of the mouse mastrocytoma P815 specific cytotoxic T lymphocytes response *in vivo*. Methods We constructed the hybrid filamentous phage particles, which displayed the $P1A_{35\sim43}$ epitope, and then injected of low doses of the hybrid virus particles into DBA/2 ($H\text{-}2^d$) mice without adjuvants. The anti-tumor cytotoxic T lymphocytes response was investigated by ^{51}Cr release assay and ELISPOT. Results The peptide epitope in the hybrid bacteriophages primed the tumor associate antigen PLA specific CTL response. Conclusion These data suggest that the filamentous phage display vaccine could be a kind of potentially efficient form to develop the anti-cancer vaccine.

Key words: vaccine; cancer; cytotoxic T lymphocyte; filamentous phage

近十年来随着肿瘤抗原筛选技术的进展,许多肿瘤相关抗原得已鉴定[1]。其中被称为CT抗原(Cancer-testis antigens)的MAGE、P1A等抗原是一类在多种恶性肿瘤中表达,而在正常组织中(除睾丸、胎盘外)几乎不表达的肿瘤抗原,是肿瘤疫苗研究的主要靶抗原之一[2,3]。此类抗原是机体正常蛋白,免疫原性较弱,故常采用此类抗原评价肿瘤疫苗形式的可行性。

我们已证实呈现$HBs_{28\sim39}$表位的噬菌体颗粒,能在体诱导针对$HBs_{28\sim39}$的特异性CTL反应。本研究采用肿瘤相关抗原P1A系统,进一步评价噬菌体呈现疫苗在体诱导特异性细胞毒性T细胞反应的效率,为发展高效的抗肿瘤疫苗奠定基础。

1 材料和方法

1.1 质粒和菌株

丝状噬菌体呈现质粒pC89[4]由本所李华硕士提供,宿主菌XL1-Blue由本校分子遗传教研室提供。

1.2 细胞系和动物

来源DBA/2小鼠的肥大细胞瘤细胞系P815购于上海细胞所,F3为经有限稀释获得的P815细胞克隆,RT-PCR证实F3细胞系存在P1A表达[5]。其MHC-I分型为$H\text{-}2^d$。DBA/2小鼠由中国医学科学院动物所提供。

1.3 肽合成

采用标准的F-moc方案合成$H\text{-}2^d$限制的CTL表位

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39789010)
作者简介:万 瑛(1972—),男,湖北省沙市人,博士,助教,主要从事分子免疫方面的研究,发表论文11篇。电话:(023)68752236
收稿日期:2000-08-04;修回日期:2000-09-27

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

$P1A_{35\sim43}$, 其序列为: LPYLGWLVF。合成肽经 HPLC 纯化, 纯度>90%。

1.4　构建重组噬菌粒

将合成的寡聚核苷酸 AATTCCTGCCTTATC TAGGTGGCTG-GTCTTCGGG 和 GATCCCCG AAGACCAGCCACCCTAGATAAGGCA-GG 复性, 与 *EcoR* Ⅰ、*BamH* Ⅰ 双酶切的 pC89 连接后转化 XL1-Blue。根据重组菌落在 X-gal 平板的蓝斑强弱挑选培养筛选。

1.5　DNA 测序

重组噬菌粒采用 M13 forward-40 测序引物证实。

1.6　丝状噬菌体颗粒的大量制备

证实的重组菌落(pC89P1A)在 2 ml LB 培养基(含 40 μg/ml 四环素, 50 μg/ml 氨苄青霉素) 37 ℃培养过夜, 次日将菌液移至 1 L LB 培养基(含 10 μg/ml 四环素, 50 μg/ml 氨苄青霉素), 加入 10^{12}噬斑形成单位(pfu)的辅助噬菌体 VSCM13 超感染, 继续 37 ℃培养 10 h。10 000×g 离心 10 min 收集上清, 加入 PEG8000 至 4%, NaCl 至 3%, 冰浴 30 min 后, 12 000×g 离心 20 min 弃上清。用 10 ml 的 PBS 溶液重悬沉淀, 10 000×g 离心 5 min, 弃不溶物, 收集上清, PEG8000 重复沉淀 1 次, 重悬沉淀于 2 ml 的 PBS 溶液。

1.7　动物免疫方案

雌性 DBA/2 小鼠(8~10 周)随机分成 3 组, 每组 5 只, 分别尾根部皮下注射重组丝状噬菌体颗粒 pC89P1A(10 μg)、来源 VASM13 的野生型丝状噬菌体颗粒(10 μg)和合成的 $P1A_{35\sim43}$9 肽(10 μg), 1 周后同样剂量皮下加强免疫 1 次。

1.8　靶细胞制备

收集生长良好的 F3 细胞, 加入 200 μCi ^{51}Cr 标记靶细胞 90 min, 洗涤 3 次后, 调整细胞溶度为 10^5 细胞/ml。

1.9　特异性细胞毒分析

末次免疫后第 8 天, 拉颈处死免疫小鼠, 无菌制配脾细胞悬液, 洗涤 3 次后, 以 3× 10^7 细胞/ml 溶度重悬于 10 ml IMDM 培养基(含 25 mmol/L HEPES, 4.0 mmol/L L-谷氨酸, 10%胎牛血清), 加 $P1A_{35\sim43}$ 9 肽至 1 μg/ml, hIL-2 至 20 U/ml, 体外刺激培养 7 d后, 收集洗涤效应细胞, 按一定比例与 1× 10^4 个靶细胞在 96 孔 V 型底共培养 4 h(总体积 200 μl)。收集 100 μl 上清, γ 计数器测定每孔的 Bq 值。特异细胞裂解率计算方法如下: 特异细胞裂解率=(试验组释放 Bq-自发释放 Bq)/(最大释放 Bq-自发释放 Bq), 其中自发释放为靶细胞对照的 Bq 值, 最大释放为靶细胞加 2 mol/L HCl 的 Bq 值。

1.10　ELISPOT 检测

末次免疫后第 8 天, 无菌制配免疫小鼠的脾细胞悬液, 洗涤 3 次后, 以 3× 10^7/ml 溶度重悬于 10 ml IMDM 培养基(含 25 mmol/L HEPES, 4.0 mmol/L L-谷氨酸, 10% 胎牛血清), 加 $P1A_{35\sim43}$ 9 肽至 1 μg/ml, hIL-2 至 20 U/ml, 体外刺激培养 10 h、4 d 后洗涤收集脾细胞。

自制圆形 NC 膜, 放置于 96 孔培养板底部, 75%乙醇消毒后, 加入小鼠 IFN(单抗 4 ℃包被过夜, 次日 PBS-0.1%Tween 20 洗涤后, 每孔加入 10^5 个体外刺激后脾细胞(含 $P1A_{35\sim43}$ 5 μg/ml), 37 ℃培养 16 h 后, 采用小鼠 IFN-γ 生物素化单抗检测 NC 膜上捕获 IFN-γ 的点数。

2　结果

2.1　重组噬菌粒的构建

重组噬菌粒的构建过程, 见图 1, 筛选的阳性克隆 pC89P1A 经 DNA 测序证实。

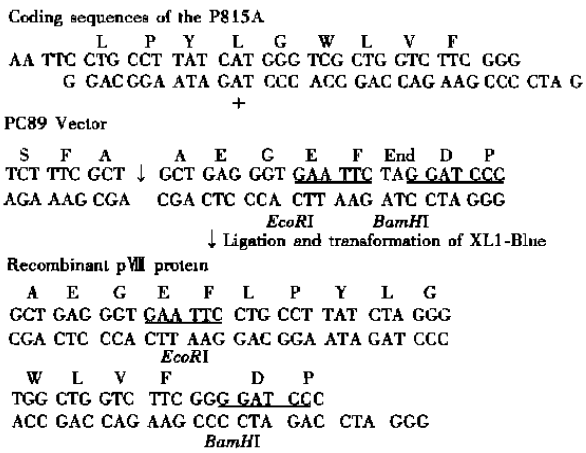


图 1　呈现 **P815A** 的噬菌粒载体构建

Fig 1　Engineering of phagmid displaying the P815A

2.2　重组的噬菌体颗粒在体诱导 P815A 特异性 CTL 反应

重组噬菌体颗粒两次皮下免疫后, 采用标准的^{51}Cr 释放试验, 观察到效应细胞特异性溶破靶细胞 F3, 而野生型噬菌体颗粒与 $P1A_{35\sim43}$肽均未诱导此效应, 见图 2。

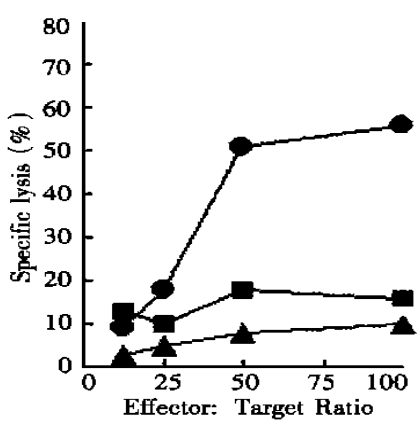


图 2　重组的噬菌体颗粒在体诱导 **P815A** 特异性 **CTL** 反应

Fig 2　*In vivo* CTL priming by phage particles

Spleen cells from DAB/2 mice that had been immunized with the hybrid filamentoux phage particles (●), wild-type filamentous phage particles (▲), synthesis P815A oligopeptide (▲). The resulting effectors were then tested for lysis of ^{51}Cr-labeled P815.

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

2.3 ELISPOT 显示特异性 CTL 扩增

活化的 CTL 细胞在体外受抗原刺激能分泌 IFN-γ，故采用 ELISPOT 方法可推测 $P1A_{35\sim43}$ 特异性 CTL 细胞的数目。结果显示重组噬菌体颗粒免疫小鼠的脾细胞存在大量的针对 $P1A_{35\sim43}$ 特异性分泌 IFN-γ 的细胞，并在体外随刺激时间扩增，而野生型噬菌体颗粒与 $P1A_{35\sim43}$ 肽均未诱导此效应，见图 3。

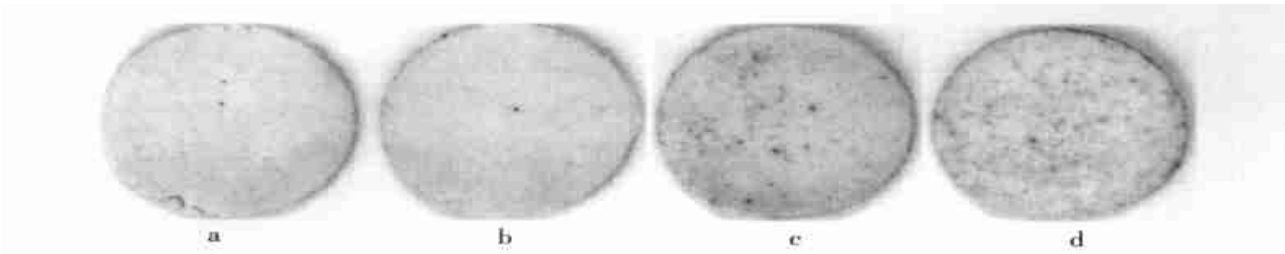


图 3 ELISPOT 显示特异性 CTL 扩增

Fig 3 ELISPOT assay for the P815A-specific IFN-γ producing cells

Spleen cells for DAB/2 mice that had been immunized with the wild-type phage particles (a), Synthesis P815A oligopeptide (b), the wild-type hybrid phage particles [c(10 h), d(4 d)]

3 讨论

P1A 基因是 80 年代 Boon 小组采用 CTL 克隆筛选方案分离的小鼠肿瘤相关抗原。此基因在多种小鼠肿瘤细胞系，如 P815、J558、MethA 等存在表达，而在正常组织(除睾丸、胎盘外)几乎不表达[6]，这种分布特点使它成为目前唯一与人类肿瘤相关抗原 MAGE、GAGE、BAGE 等基因家族相似的小鼠基因，成为发展肿瘤疫苗的主要研究模型之一。

CTL 表位 P815A 位于 P1A 编码蛋白 35 至 43 之间，在体呈免疫显性，受 MHC Ⅰ类分子 $H\text{-}2^d$ 的限制，是 P815 肿瘤细胞的主要的排斥抗原。但实验证实此表位免疫原性较弱，如接种抗原肽包被的树突样细胞或灭活的肿瘤细胞均不能有效诱导 P815A 特异性 CTL 应答[7]，而且直接肽免疫反而加快肿瘤细胞的生长[8]。

在本研究中，采用呈现 P815A 的噬菌体颗粒，二次皮下免疫后，即激发了 P815A 特异性 CTL 应答，能在体外溶破 P815 细胞。ELISPOT 显示在末次免疫后 7d 出现大量针对 P815A 特异性分泌 IFN（的淋巴细胞，结合我们以往的结果，提示重组噬菌体颗粒诱导了特异性 CTL 细胞的扩增，是一种有效刺激 CTL 应答的疫苗形式。我们将近一步研究此重组噬菌体颗粒疫苗对肿瘤细胞的预防和治疗效果。另外重组噬菌体作为一种外源抗原经尚不清楚的非经典途径激发 CTL 反应，故对其机制的研究将有可能加深我们对非经典途径的了解。

参考文献：

[1] Ockert D, Schmitz M, Hampl M, *et al*. Advances in cancer immunotherapy[J]. Immunol Today, 1999, 20(2): 63－65.

[2] Van den Eynde B J, van der Bruggen P. T cell defined tumor antigens[J]. Cur Opin Immunol, 1997, 9(3): 684－693.

[3] Chattopadhyay U. Tumour immunotherapy: developments and strategies[J]. Immunol Today, 1999, 20(11): 480－482.

[4] Felici F L, Castagnoli A, Musacchio R, *et al*. Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector[J]. J Mol Biol, 1991, 222(2): 301－310.

[5] 邹丽云，吴玉章，贾正才，等. 小鼠肥大细胞瘤 P815 模型的建立与初步应用[J]. 免疫学杂志，2000, 16(5): 339－341.

[6] Lethe B, Van den Eynde B, Van Pel A, *et al*. Mouse tumor rejection antigens P815A and P815B: two epitopes carried by a single peptide[J]. Eur J Immunol, 1992, 22(19): 2 283－2 282.

[7] Brandle D, Bilsborought J, Rulicke T, *et al*. The shared tumor-specific antigen encoded by mouse gene P1A is a target not only for cytolytic T lymphocytes but also for tumor rejection[J]. Eur J Immunol, 1998, 28(18): 4 010－4 019.

[8] Nieland J D, Da Silva D M, Velders M P, *et al*. Chimeric papillomavirus virus-like particles induce a murine self-antigen-specific protective and therapeutic antitumor immune response[J]. J Cell Biol, 1999, 73(1): 145－152.

（编辑 汪勤俭）

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