DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.10.014
第22卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 10
954 2000年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)10-0954-04

含CpG寡聚脱氧核苷酸对肿瘤抗原肽P815AB的免疫佐剂效应研究

赵建平[1],吴玉章[1],万 瑛[1],贾正才[1],周 伟[1],邹丽云[1],刘月明[2] (第三军医大学:[1]基础医学部全军免疫学研究所;[2]高原军事医学系卫生统计学教研室;重庆 400038)

提 要:目的 以肿瘤抗原P815AB抗原肽为模式抗原,研究CpG寡聚脱氧核苷酸(CpG ODN)对该肿瘤抗原表位肽的免疫佐剂效应。方法 用[^{3}H]-TdR掺入法研究CpG ODN体外刺激小鼠脾细胞增殖效应,用ELISPOT和[^{3}H]-TdR释放法检测不同构成形式的疫苗在体诱发特异性CTL应答的效应。结果 ODN1826在体外可刺激小鼠脾细胞显著增殖。经4次免疫,在"肽+ODN1826+IFA"组中,4/6的小鼠体内出现了特异性CTL应答;在"肽+ODN1826+PBS"组,有3只小鼠在完成4次免疫前先后死亡,余3只中有1只体内也可检测到相应CTL反应;而对照"肽+IFA"组,6只小鼠体内均未诱发出特异性CTL应答。结论 CpG ODN对P815AB表位肽有较为理想的免疫佐剂效应,但疫苗构成形式对其免疫效果有着决定性的作用,"肽+ODN1826+IFA"是本研究中最有效的疫苗形式,同时需注意到CpG ODN具有一定的毒副作用。

关键词:CpG寡聚脱氧核苷酸;多肽疫苗;肿瘤疫苗;细胞毒性T淋巴细胞
中图法分类号:R392.11;R979.5 文献标识码:A

Adjuvant effects of CpG-containing oligodeoxynucleotide on immunization of tumor-specific peptide P815AB

ZHAO Jian-ping, WU Yu-zhang, WAN Ying, JIA Zheng-cai, ZHOU Wei, ZHOU Li-yun, LIU Yue-ming (Institute of Immunology PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the adjuvant effects of CpG-containing oligodeoxynucleotide (CpG ODN) on the immunization of antigen peptide P815AB. Methods The proliferation of mice splenocytes induced by CpG ODN *in vitro* was assessed by [^{3}H] thymidine incorporation; the specific CTL responses of mice immunized with different forms of peptide vaccines were measured with ELISPOT and [^{3}H] thymidine-release assay. Results ODN1826 could induce the significant proliferation of mice splenocytes *in vitro*. After four immunizations, measurable CTL responses against P815AB could be induced in four of six mice immunized with "P815AB+ODN1826+IFA", and in one of three mice remaining alive immunized with "P815AB+ODN1826+PBS", but none of six mice immunized with "P815AB+IFA". Conclusion CpG ODN is an efficient adjuvant of specific CTL responses for mice immunized with tumor-specific peptide P815AB, and "P815AB+ODN1826+IFA" is the most potent form of vaccine in this study. However, CpG ODN may cause harmful side effects to some extent.

Key words: CpG oligodeoxynucleotide (CpG ODN); peptide vaccine; tumor vaccine; CTL

随着众多肿瘤抗原及相关CTL表位的鉴定,发展有效的抗肿瘤疫苗已成为当今肿瘤免疫学领域的重要课题。在目前多种形式的抗肿瘤疫苗之中,基于肿瘤抗原表位的肽疫苗已在临床实验中取得一定积极的成果,但其较弱的抗原性决定了该类型疫苗常不能诱发足够强的抗肿瘤CTL应答,而通过采用合适的佐剂来增强肽疫苗的免疫原性,即可能获得理想的免疫效应。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39789010)

作者简介:赵建平(1976-),男,山西省长治市人,硕士研究生,主要从事疫苗设计及相关免疫机制方面的研究。电话:(023)68752236

收稿日期:2000-08-04;修回日期:2000-09-21

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

含 CpG 基序的寡聚脱氧核苷酸（CpG-containing oligodeoxynucleotide，CpG ODN）已证明是一种有效的 Th1 型免疫佐剂[1]，可直接促进树突状细胞（Dendritic cells, DC）、巨噬细胞等专职抗原递呈细胞（Professional antigen presenting cells, pAPCs）的成熟和活化，以及 IL-12、IL-18、IFN-γ 等 Th1 型细胞因子的分泌，也可间接促进 T、NK 细胞的活化，从而促进蛋白类或肽类抗原诱发特异性 CTL 应答。本实验以肿瘤抗原 P815AB 表位肽为模式抗原，研究 CpG ODN 对该肿瘤抗原表位肽的免疫佐剂效应，以期为相关肿瘤疫苗设计提供线索。

1　材料和方法

1.1　动物

DBA/2 小鼠（H-2Ld），5～8 周龄，购于北京医科院实验动物中心，动物饲养及有关动物实验均在洁净室内进行（SPF 级）。

1.2　P815 细胞

为 DBA/2 小鼠来源的肥大细胞瘤系，购于上海细胞所，采用 RPMI1640 加 10% 热灭活小牛血清完全培养基，于 37 ℃、5% CO_2 孵箱内常规培养。

1.3　P815AB 肽

序列为：LPYLGWLVF（H-2Ld 限制），由我室于 431A 型多肽合成仪（PE 公司）采用标准 Fmoc 方案合成，并由 RT-HPLC（Waters）鉴定纯度＞95%；取适量多肽溶于 DMSO，浓度为 1.5 μg/μl，存放于－20℃备用。

1.4　含 CpG 基序的寡聚脱氧核苷酸（CpG ODN）

ODN1826 序列为 TCCATGACGTTCCTGACGTT，对照 ODNc 序列为 TCCATGAGCTTCCTGAGCTT，均由上海基康（Genecore）公司采用硫代修饰方案合成，由我室采用鲎试剂检测其内毒素含量，小于 1 ng/mg。

1.5　体外 CpG ODN 刺激脾细胞增殖实验

取 DBA/2 小鼠脾脏分离脾细胞，加于 96 孔无菌培养板中，每孔 100 μl 脾细胞悬液（1×10^6/ml），加入的 ODN 浓度分别为 4、2、1 μmol/L，每个浓度设 3 个复孔，并设培养基对照组。于 37 ℃、5% CO_2 孵箱内孵育 3 d，最后加入[^{3}H]-TdR 掺入 12 h 后于本校同位素室采用 DYQ-Ⅲ型多头样品收集器把细胞收集到玻璃纤维滤纸上，放入液闪杯中测量各孔 cpm 值。

1.6　免疫小鼠

共分 3 组，Ⅰ组：肽＋IFA，Ⅱ组：肽＋ODN1826＋PBS，Ⅲ组：肽＋ODN1826＋IFA。每组 6 只小鼠，各小鼠每次接受的免疫制剂共 100 μl，其中所含 P815AB 肽均为 100 μg（需先溶于少量 DMSO 中），所含 ODN1826 均为 50 μg，余为不完全弗氏佐剂（Incomplete freund's adjuvant, IFA）或 PBS。采用尾根部免疫，共免疫 4 次（间隔 2 周），最后一次免疫 2 周后杀鼠，分别取脾细胞进行如下检测。

1.7　ELISPOT 检测

ELISPOT（IFN-γ）试剂盒购于法国 DIACLONE 公司，参照使用说明进行检测，不同的是采用自制的铺有硝化纤维膜的 96 孔板，各组实验小鼠的脾细胞调节为 1×10^6 个/ml，各设 3 个复孔，体外刺激所用 P815AB 肽浓度为 5 μg/ml，并设 CM 阴性对照组，孵育时间为 48 h，然后在立体显微镜下分别记数各孔出现的色斑数目，并取各复孔的均值。

1.8　体外 CTL 诱导及其杀伤活性检测[4]

将各组小鼠脾细胞，用 10 ml 含 P815AB 肽（1 μg/ml）的 RPMI 1640 完全培养基在 25 cm^2 培养瓶中悬浮（细胞浓度不低于3×10^6/ml），将培养瓶垂直放置于 37 ℃、5% CO_2 孵箱中孵育，进行体外 CTL 诱导。又 1 周后，采用[^{3}H]-TdR 释放法检测特异性 CTL。取上述各组脾细胞，在 96 孔板分别以 100∶1、50∶1、25∶1 的比例与 10^4 个[^{3}H]-TdR 标记了 24 h 的 P815 靶细胞相混合，同时设培养基组以测定靶细胞的最大[^{3}H]-TdR 残留量，余参见文献[2]。然后于本校同位素室采用 DYQ-Ⅲ型多头样品收集器把细胞收集到玻璃纤维滤纸上，放入液闪杯中测量各组[^{3}H]-TdR 残留量，按以下公式计算各组 CTL 杀伤效率：

$$\text{特异性 CTL 杀伤率}(\%)=\frac{1-\text{实验组 cpm 值}}{\text{对照组 cpm 值}}\times 100\%$$

1.9　统计学处理

采用 SPSS 10.0 对各组数据进行方差分析。

2　结果

2.1　体外 CpG ODN 刺激小鼠脾细胞增殖实验

各组数据经双因素方差分析，3 组间差异显著（$P<0.05$）。3 个浓度的 ODN1826 和对照 ODNc 体外刺激脾细胞增殖实验结果见图 1，可见 ODN1826 可明显刺激小鼠脾细胞发生增殖，且呈剂量依赖性；而 ODNc 组及 CM 对照增殖效应则较弱，但 ODNc 组较 CM 对照仍有一定程度的脾细胞增殖效应，可能与所用 ODN 中的硫代磷酸酯主链（Phosphorothioate backbone）有关。

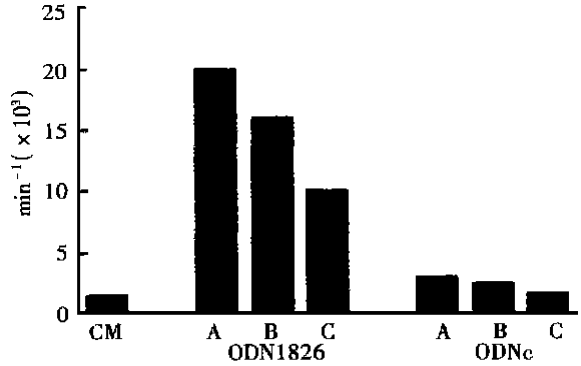


图 1　CpG ODN 体外刺激小鼠脾细胞增殖

Fig 1　Proliferation of mice splenocytes induced by CpG ODN *in vitro*

A: 4 μmol/L; B: 2 μmol/L; C: 1 μmol/L

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

2.2 ELISPOT

各实验组出现的斑点数目，见图2。经单因素方差分析，3组间差异显著（$P<0.05$）。实验中所设CM对照孔出现的斑点数目平均为10个/10^5脾细胞，为非特异性IFN-γ分泌背景，未在图中显示。基于此，将大于10个/10^5的实验组判断为阳性结果，可认为存在P815AB特异性的可分泌IFN-γ的$CD8^+$T细胞，反之定为阴性结果。这样Ⅰ组中全为阴性；Ⅱ组中，存活的3只小鼠中有1只出现阳性结果；Ⅲ组中，有4只小鼠出现阳性结果。

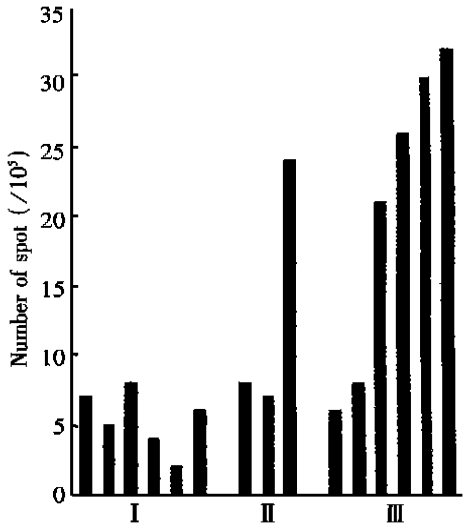


图2 各实验组ELISPOT出现的斑点数目

Fig 2 The number of spots appearing in each group by ELISPOT

Ⅰ：P815AB＋IFA；Ⅱ：P815AB＋ODN1826＋PBS；Ⅲ：P815AB＋ODN1826＋IFA

2.3 特异性CTL应答

各实验组小鼠经4次免疫后，对存活者采用[^{3}H]-TdR释放法检测其体内特异性CTL的杀伤效应，结果见图3。其中，Ⅰ组6只小鼠的特异性杀伤率均小于20%，可认为该组小鼠体内未诱发出相应CTL应答；Ⅱ组存活的3只小鼠中有1只的特异性杀伤率大于20%，可认为疫苗在它体内诱发了特异性CTL应答；Ⅲ组6只小鼠中有4只体内诱发了特异性CTL应答。经双因素方差分析，3组差异显著（$P<0.05$）。

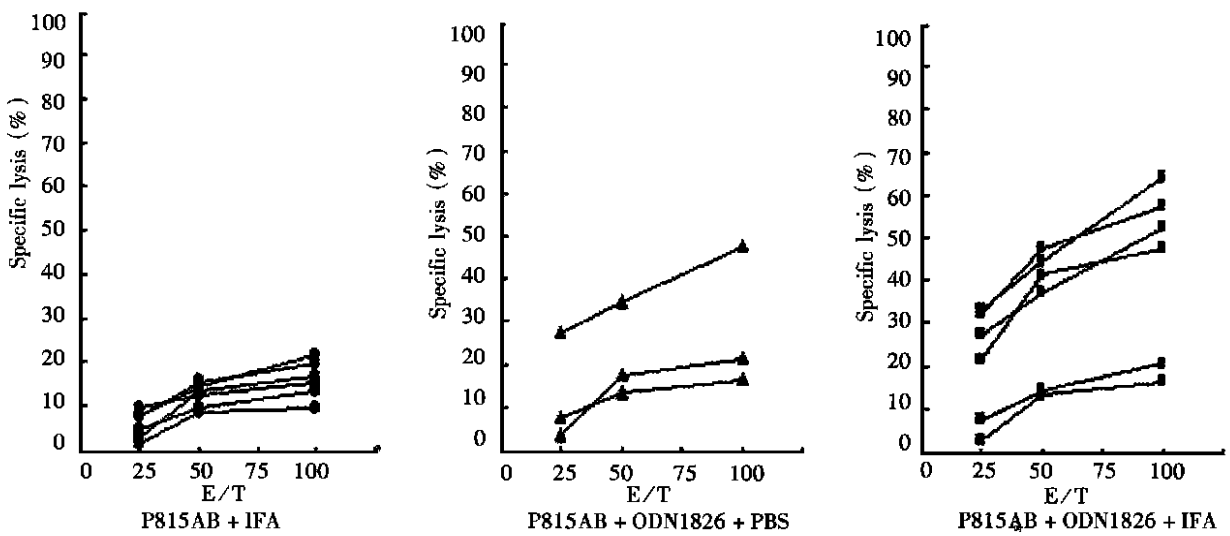


图3 各实验组免疫小鼠激发特异性CTL应答情况

Fig 3 The specific CTL responses induced by immunization in mice of each group

3 讨论

P815肿瘤模型作为一种研究较为成熟的小鼠肿瘤模型，其中的肿瘤抗原P815AB已证明具有免疫显性（Immunodominant），是小鼠体内排斥P815肿瘤的一个重要的靶抗原，其编码基因P1A可在肥大细胞瘤P815、浆细胞瘤J558、纤维肉瘤MethA等多种小鼠肿瘤中表达，而在正常组织中仅出现于睾丸、胎盘等。正由于P1A基因表达分布与人类肿瘤抗原MAGE、GAGE、BAGE等基因家族相似，故而近年来对P815AB抗原的研究较为广泛，并成为一种设计和研究各种肿瘤疫苗方案的理想模式抗原。但已有研究表明P815AB肽的免疫原性较弱，Silla等[3]先后将该肽与CFA、IFA、氢氧化铝等佐剂及Th表位肽联合免疫小鼠，都未有效激发特异的CTL应答；与含有QS21和MPL的佐剂SBAS-1c一起免疫小鼠4次，仅半数出现相应的CTL反应，若再联合应用IL-12，则使全部免疫小鼠出现特异CTL应

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

答, 但也伴发了 IL-12 所致的一些免疫毒性。

CpG ODN 已证明可以模拟含 CpG 基序的细菌 DNA 诱发相应的 Th 1 型免疫反应[1], 包括直接促进 DC、巨噬细胞等 pAPC 的成熟和活化, 表现为 CD80、CD86、CD40、MHC Ⅱ等膜分子的上调以及 IL-12、IL-18、IFN-γ 等 Th1 型细胞因子的分泌, 还可为 T、NK 细胞的活化提供共刺激信号, 是一种有效的 Th 1 型免疫佐剂。已有研究证实: 用 CpG ODN 作为佐剂, 可有效促进某些可溶性蛋白类抗原, 如重组 HBsAg[4], 以及表位肽类抗原, 如 LCMV gp33[5] 的免疫原性, 诱发相应的 Th 1 型抗体和/或 CTL 应答, 在一些研究中, CpG ODN 的佐剂效应甚至超过了 IFA。

但目前尚未见将 CpG ODN 应用于增强肿瘤抗原 CTL 表位肽免疫原性的研究。本研究首次在 P815 肿瘤模型研究了 CpG ODN 对 P815AB 表位肽的免疫佐剂效应, 证明 CpG ODN1826 可一定程度上增强 P815AB 表位肽的免疫原性。经 4 次免疫, 在"肽＋ODN1826＋IFA"组中, 4/6 的小鼠体内出现了特异性 CTL 应答, 未在 6 只小鼠中全部诱发 CTL 应答, 可能也是由于 P815AB 肽较弱的免疫原性所致; 在"肽＋ODN 1826＋PBS"组, 有 3 只小鼠在完成 4 次免疫前先后死亡, 余 3 只中有 1 只体内也可检测到相应 CTL 反应, 这说明该免疫方案也可一定程度上激发特异性 CTL 应答, 但其效率要比"肽＋ODN 1826＋IFA"组低; 而对照"肽＋IFA"组, 6 只小鼠体内均未诱发出特异性 CTL 应答, 这与前述 Silla 等[3] 的实验结果一致。

本研究也提示, 疫苗构成形式对其免疫效果有着决定性的作用。"肽＋ODN1826＋IFA"组出现较高的免疫效应, 一则由于 ODN1826 的佐剂效应; 二则 IFA 可能使 P815AB 肽和 ODN1826 在局部形成缓释灶, 从而延长疫苗在体内的作用时间; 三则 P815AB 肽和 ODN1826 可被 IFA 包裹成小脂粒, 易与被 DC、巨噬细胞等 pAPC 摄入胞内, 进而便于 CpG ODN 发挥对 pAPC 的免疫效应以及 pAPC 对 P815AB 肽的抗原递呈作用, 同时由于 P815AB 肽和 ODN1826 两者可能同时被包在一起被 pAPC 摄入, 使二者在时空上相近, 便于 pAPC 被 ODN 1826 活化后有效递呈 P815AB, 这就提高了进一步活化特异性 CTL 的效率。Klinman 等[6] 以 OVA 为模式抗原研究了 CpG ODN 对蛋白抗原的免疫佐剂效应, 同样发现用 IFA 将 OVA 和 CpG ODN 包裹, 比单纯将两者混合免疫小鼠激发的免疫效应更强; 而若将两者先分别化学胶连以生物素, 后通过亲合素将两者物理性连接在一起, 再免疫小鼠也取得了理想的免疫效应。近来, Cho 等[7] 同样以 OVA 为模式抗原, 采用化学偶联技术将 OVA 与免疫刺激性寡聚脱氧核苷酸(ISS ODN, 即 CpG ODN)联结形成"蛋白-ISS 复合体"(Protein-ISS conjugate, PIC), 并证明该形式疫苗有较好的免疫效应, 进一步研究表明 PIC 可促进外源性抗原进入 MHC Ⅰ类抗原递呈途径, 无须 Th 细胞的参与即可激活特异性 CTL 应答。

但同时需注意到 CpG ODN 具有一定的毒副作用, 如诱发大量 TNF 释放引起致死性休克、增加了机体对内毒素毒性的敏感性等。本研究中"肽＋CpG ODN＋PBS"组, 在 4 次免疫过程中有 3 只小鼠先后死亡, 而其他组未出现类似现象, 推测可能与大量游离 CpG ODN 短时间内扩散入血诱发免疫毒性有关, 而"肽＋CpG ODN＋IFA"组中的 CpG ODN 则由于 IFA 的缓释作用而避免了此毒性的出现。

参考文献:

[1] Krieg A M. Mechanisms and applications of immune stimulatory CpG oligodeoxynucleotides[J], Biochim Biophys Acta, 1999, 1489(1): 107－116.

[2] 吴厚生. 用^{3}H-TdR 释放法测量细胞介导的细胞毒功能[J]. 上海免疫学杂志, 1987, (4): 230－233.

[3] Silla S, Fallarino F, Boon T, *et al*. Enhancement by IL-12 of the cytolytic T lymphocyte (CTL) response of mice immunized with tumor-specific peptides in an adjuvant containing QS21 and MPL [J]. Eur Cytokine Netw, 1999, 10(2): 181－190.

[4] Davis H L, Weeranta R, Waldschmidt T J, *et al*. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen[J]. J Immunol, 1998, 160(2): 870－876.

[5] Oxenius A, Martinic M M, Hengartner H, *et al*. CpG-containing oligonucleotides are efficient adjuvants for induction of protective antiviral immune responses with T-cell peptide vaccines[J]. J Virol, 1999, 73(5): 4 120－4 126.

[6] Klinman D M, Barnhart K M, Conover J. CpGmotifs as immune adjuvants[J]. Vaccine, 1999, 17(1): 19－25.

[7] Cho H J, Takabayashi K, Cheng P M, *et al*. Immunostimulatory DNA-based vaccines induce cytotoxic lymphocyte activity by a T-helper cell-independent mechanism[J]. Nat Biotechnol, 2000, 18(5): 509－514.

(编辑　汪勤俭)

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